

毛细管电泳-电喷雾-质谱-质谱分离鉴定粉防己生物碱

柳仁民*, 何风云, 孙爱玲

(聊城大学 化学化工学院, 山东 聊城 252059)

摘要: 目的 以非水毛细管电泳对粉防己甲醇提取物中的生物碱进行分离, 并利用在线电喷雾离子阱质谱得到的准分子离子及碎片信息对其进行鉴定。方法 使用未涂层毛细管(86 cm × 75 μm ID, 紫外检测器距进样端 21 cm), 50 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-4% HAc-甲醇溶液为运行缓冲液, 分离电压为 25 kV。质谱接口为同轴鞘液接口; 电喷雾电压为 4.5 kV。铝毛细管温度为 170 °C; 鞘液组成为 60% 异丙醇-39% 水-1% HAc, 鞘液流速为 5 μL·min⁻¹。MS-MS 的碰撞能量为 30%, 所要求的最小信号计数为 1 × 10⁵。结果与结论 毛细管电泳-质谱及质谱-质谱联用技术对粉防己甲醇提取物中生物碱进行了分离鉴定, 比传统的根据迁移时间或淌度定性更加准确, 可用于研究中药复杂成分。

关键词: 非水毛细管电泳; 电喷雾质谱; 粉防己; 生物碱

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513 - 4870(2004)05 - 0363 - 04

Separation and identification of alkaloids in *Stephania tetrandra* by capillary electrophoresis electrospray-MS/MS

LIU Ren-min*, HE Feng-yun, SUN Ai-ling

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: **Aim** To establish a method for separation and identification of alkaloids in *Stephania tetrandra* S. Moore methanol extracts by using non-aqueous capillary electrophoresis interfaced with electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Methods** The molecular ions or adducts of alkaloids and fragments of specific parent ions were used for the identification. An uncoated capillary (86 cm × 75 μm ID, on-line UV detection occurred at 21 cm from the inlet of the capillary) was used. Ammonium acetate (50 mmol·L⁻¹) containing 4% HAc in methanol was used as the running buffer; separation voltage was 25 kV. A coaxial sheath flow interface was used as the CE-MS interface; the electrospray voltage was 4.5 kV; the temperature of aluminium capillary was 170 °C; 60% isopropanol-39% water-1% HAc was used as the sheath liquid with the flow rate of 5 μL·min⁻¹; the collision energy of MS-MS was set at 30% and the least ion counts was 1 × 10⁵. **Results and conclusion** The alkaloids in *Stephania tetrandra* S. Moore methanol extracts were separated and identified by CE-ESI-MS/MS. The proposed method is of high accuracy and can be used for the investigation of traditional Chinese medicine.

Key words: non-aqueous capillary electrophoresis; ESI-MS/MS; *Stephania tetrandra*; alkaloid

生物碱是天然植物中一类重要的活性成分, 在一定的条件下易带正电荷, 因此毛细管电泳在生物碱的分离分析中有着特殊的优势^[1]。质谱作为检测器的突出特点是能够提供分子量信息和结构信息,

具有非常强的定性能力, 毛细管电泳与质谱的联用在复杂成分的分离分析中将会发挥重要作用。天然植物药各组分结构往往比较相似, 用 CE-MS 法无论是对分离还是鉴定都显示了很大的优势^[2-6]。

粉防己 (*Stephania tetrandra* S. Moore) 是一种常用中药, 含多种生物碱, 主要有粉防己碱 (又称粉防己甲素, tetrandrine)、防己诺林碱 (又称粉防己乙素,

收稿日期: 2003-05-28.

* 通讯作者 Tel: 86 - 635 - 8238840, Fax: 86 - 635 - 8239121,

E-mail: renminliu@163.com

fangchinoline)和黄柏碱等。粉防己生物碱具有镇痛、消炎、抗过敏、降压、松弛骨骼肌、抗菌、抗原虫和抗肿瘤等作用。本文以甲醇为非水介质,利用毛细管电泳对粉防己甲醇提取物进行了分离,利用电喷雾质谱和质谱-质谱得到的准分子离子及碎片信息,结合模拟对照,对电泳峰进行了确认。

材料与方 法

仪器与试剂 P/ACE 5000 毛细管电泳仪 (Beckman, USA); LCQduo 离子阱质谱仪 (Finnigan, USA), 配有电喷雾离子源; CE-ESI-MS 接口采用同轴流体接口 (Finnigan, USA); 分离条件优化中使用的毛细管总长为 37 cm, 内径 75 μm , 有效长度为 30 cm; CE-MS 联用使用的毛细管总长为 86 cm, 内径为 75 μm , 紫外检测器窗口距正极端为 21 cm。

实验用水为二次蒸馏水, 甲醇、乙腈为高效液相色谱纯, 异丙醇、冰醋酸、氢氧化钠为分析纯。

样品溶液的制备 称取粉碎的粉防己粉末 1 g, 加入甲醇 30 mL, 冷浸 12 h, 超声提取 30 min, 离心, 上清液用 0.45 μm 滤膜过滤。

分析方法 毛细管使用前分别用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液冲洗 15 min, 水冲洗 10 min, 每两次运行之间用缓冲溶液冲洗 5 min。缓冲溶液为 50 mmol·L⁻¹ NH₄Ac-4% HAc 的甲醇溶液; 气压进样: 4 s; 分离电压: 25 kV。采用 ESI(电喷雾)离子源, 正离子模式检测; 电喷雾电压为 4.5 kV; 铝毛细管温度 170 $^{\circ}\text{C}$; 60% 异丙醇-39% 水-1% 冰醋酸为鞘液, 流速为 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。全扫描范围为 m/z 150 ~ 800。MS-MS 中设置碰撞能量 30%, 所要求的最小信号记数为 1×10^5 。

结果与讨论

1 分离介质的选择

利用毛细管电泳-紫外检测器 (CE-UV) 分析粉防己及其制剂中粉防己碱和防己诺林碱已有报道^[7], 但使用的是难挥发的磷酸盐为背景电解质且使用了大量的表面活性剂——Tween-20。这种含非挥发性背景电解质和表面活性剂的缓冲溶液不适用于 CE-ESI-MS 分析。

为使 CE 与 ESI-MS 联接, 本文改用易挥发性的醋酸铵-醋酸溶液作为背景电解质, 考察了浓度、pH 及有机溶剂对分离的影响。

当以醋酸铵-醋酸缓冲体系 (pH 3.5 ~ 6.5) 进行电泳分离时, 只得到两个电泳峰。在缓冲溶液中加入

高含量的有机溶剂可提高分离能力, 并有利于离子喷雾过程, 如果在缓冲溶液中加入高含量的甲醇, 则可得到 3 个电泳峰 (图 1)。

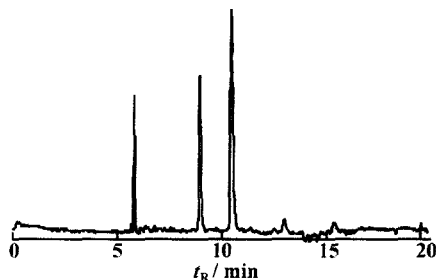


Figure 1 Electropherograms of *Stephania tetrandra* methanol extracts

Electrophoresis conditions: uncoated capillary (37 cm \times 75 μm ID, effective length 30 cm); separation voltage: 10 kV; pressure injection: 4 s; detection wavelength: 200 nm; buffer: 50 mmol·L⁻¹ acetic acetate containing 4% HAc in methanol

为进一步优化分离条件, 考察了 50 mmol·L⁻¹ 醋酸铵甲醇溶液中醋酸含量 (0.5% ~ 5%) 对样品中各组分分离的影响。实验结果表明, 随着醋酸含量的增加, 分离速度加快, 但相邻组分分离度降低。当醋酸含量为 4% 时, 既可得到理想的分离效果, 分离速度也较快, 故本实验以 50 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-4% HAc 甲醇溶液为 CE-MS 联用时的运行缓冲溶液。

2 鞘液

鞘液流速为 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, HAc 含量为 1% 时, 考察不同组成的甲醇-水, 乙腈-水, 异丙醇-水为鞘液对质谱信号的影响, 结果表明以 60% 异丙醇-39% 水-1% HAc 为鞘液可获得稳定的质谱信号。

3 保留时间重现性

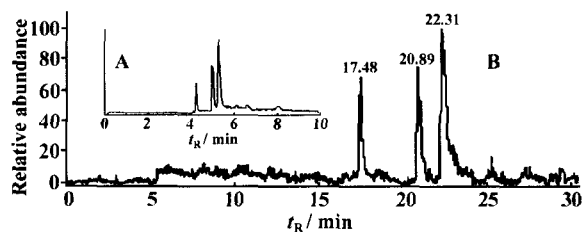
按分析方法对样品溶液连续进行 5 次分析, 3 组分保留时间的 RSD 分别为 6.3%、6.8% 和 5.3%。以第 1 组分为标准, 后两组分的相对保留时间的 RSD 分别为 1.8% 和 1.4%。

4 电泳峰的 MS, MS/MS 鉴定

从优化实验条件下粉防己甲醇提取物的 CE-UV 和 CE-TIC 图 (图 2) 可见, 样品经分离后, 紫外检测和质谱 TIC 检测均得到了 3 个组分, 3 组分保留时间比值相同, 说明紫外检测的 3 个组分与质谱检测的 3 个组分相同。

图 3 和图 4 分别为粉防己甲醇提取物各电泳流出组分选择离子监测 SIM 图和 ESI-MS 图。由图 3 和图 4 可见, t_R 17.48 min 的组分 m/z 342, t_R 20.89

min 的组分 m/z 609, t_R 22.31 min 的组分 m/z 623。



A: CE-UV; B: CE-MS TIC

Figure 2 Electrophoresis graph of *Stephania tetrandra* methanol extracts

CE conditions: uncoated fused-silica capillary (86 cm \times 75 μ m ID, 21 cm to UV detector); running buffer: 50 mmol \cdot L⁻¹ ammonium acetate containing 4% HAc in methanol; pressure injection: 4 s; applied voltage: 25 kV; MS conditions: full scan mode, m/z 150 – 800, positive mode; ESI voltage: 4.5 kV; sheath flow: isopropanol-water-HAc (60:39:1); flow rate: 5 μ L \cdot min⁻¹

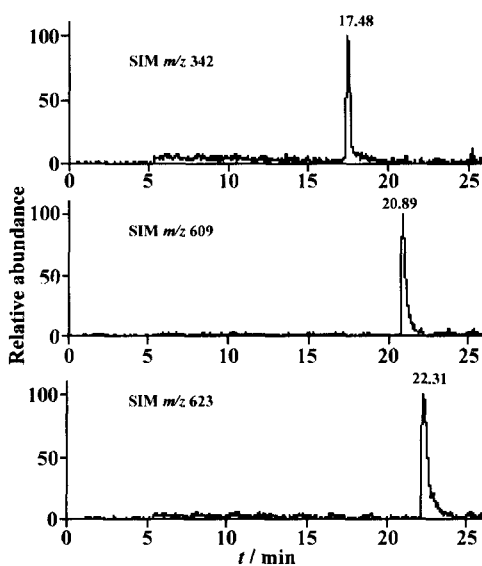


Figure 3 SIM of components in *Stephania tetrandra* methanol extracts (experimental conditions are same as in Figure 2)

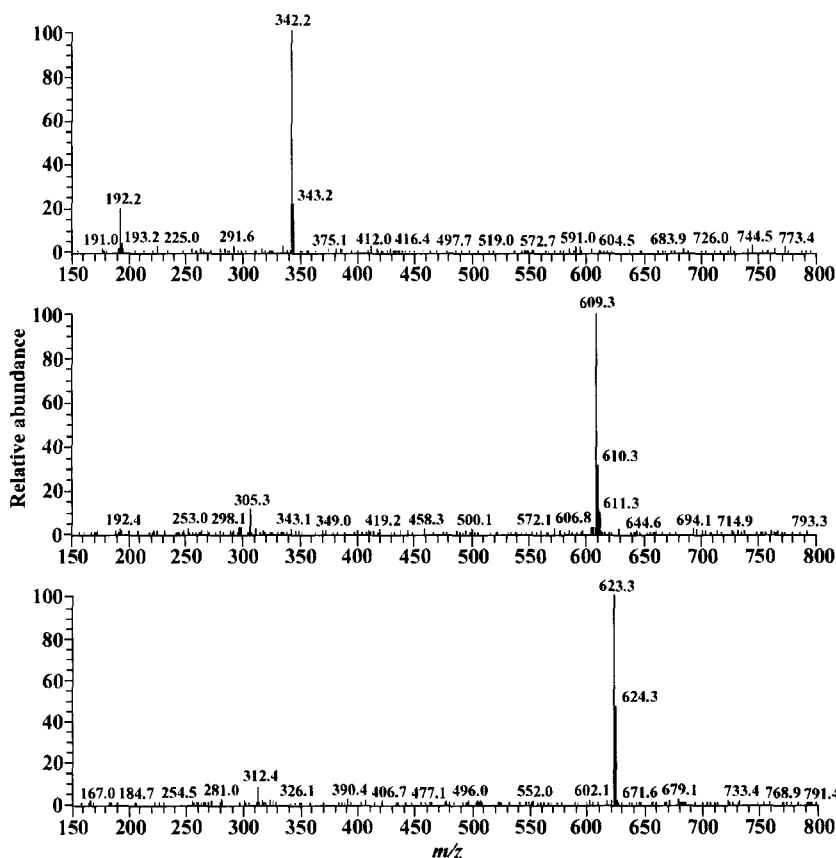
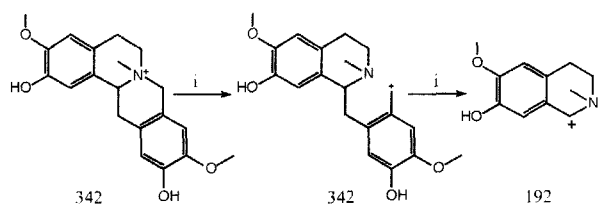


Figure 4 CE-ESI-MS of *Stephania tetrandra* methanol extracts (experimental conditions are same as in Figure 2)

t_R 17.48 min 组分的 ESI-MS 准分子离子峰 m/z 342, 表明该组分为分子量 341 的非季铵碱类, 或分子量为 342 的季铵碱类。该组分的 ESI-MS/MS 主要碎片峰为 m/z 192。利用 Mass-Frontier 软件对粉防己

中分子量为 341 或 342 可能的生物碱四氢非洲防己胺、黄柏碱、木兰花碱的结构进行模拟轰击, 只有结构为黄柏碱可得到碎片 192, 与 Henion 等^[7] 报道的黄柏碱的碎片一致, 故可确认 t_R 17.48min 组分为黄

柏碱。其主要碎片为 192, 来源可能为:



t_R 20.89 min 组分的 ESI-MS 准分子离子 m/z 609, 其 ESI-MS/MS 主要碎片峰为 578, 566。防己诺林碱的分子量为 608, 经对结构为防己诺林碱进行模拟轰击, 所得主要碎片也为 578 和 566, 因此可确认该组分为防己诺林碱, ESI-MS 中的 m/z 609 为 $[M + H]^+$, ESI-MS/MS 的主要碎片可能来源见图 5。

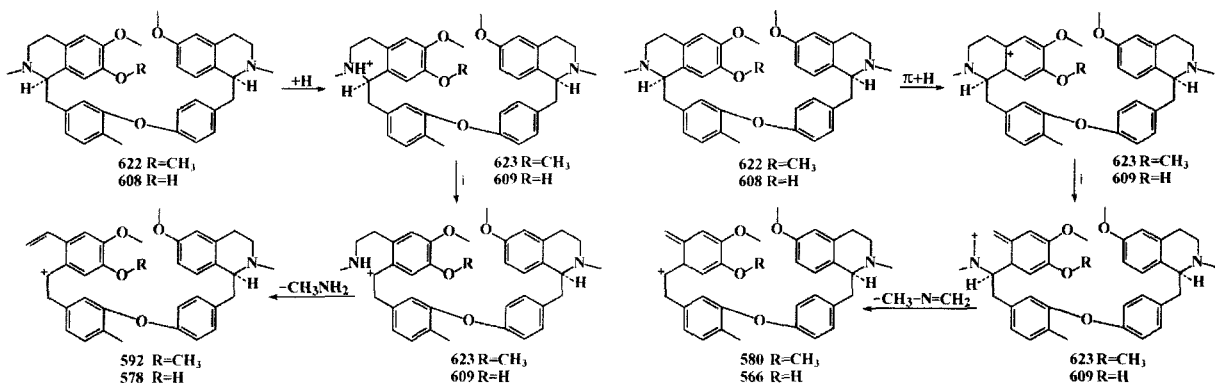


Figure 5 Possible mechanism of the main ion fragments

t_R 22.31 min 组分 ESI-MS 图中丰度最大的准分子离子 m/z 623, 可能为粉防己碱的 $[M + H]^+$ 。该组分的 ESI-MS-MS 主要碎片峰为 592 和 580。经对结构为粉防己碱进行模拟轰击, 所得主要碎片也为 592 和 580, 因而可以确认 t_R 22.31 min 的组分为粉防己碱, ESI-MS-MS 592 和 580 可能来源见图 5。

结论

本文利用非水毛细管电泳-质谱及质谱-质谱联用技术对粉防己甲醇提取物中生物碱进行了分离鉴定, 不但比传统的根据迁移时间或淌度定性更加准确, 还省去了用标准品标记指认化合物的过程, 这对于研究中药复杂及未知成分具有重要的意义。

References:

[1] Song J, Xu HX, Bi PX. Capillary electrophoresis and its application to the analysis of alkaloid [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1999, **19**(6):416 - 421.
 [2] Unger M, Stöckigt D, Belder D, et al. General approach for the analysis of various alkaloid classes using capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 1997, **767**(1 - 2):263 - 276.

[3] Sturm S, Stuppner H. Analysis of isoquinoline alkaloids in medicinal plants by capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. *Electrophoresis*, 1998, **19**(16 - 17):3026 - 3032.
 [4] Mateus L, Cherkaoui S, Christen P, et al. Capillary electrophoresis-diode array detection - electrospray mass spectrometry for the analysis of selected tropane alkaloids in plant extracts [J]. *Electrophoresis*, 1999, **20**(17):3402 - 3409.
 [5] Henion JD, Mordehai AV, Cai J. Quantitative capillary electrophoresis-ion spray mass spectrometry on a benchtop ion trap for the determination of isoquinoline alkaloids [J]. *Anal Chem*, 1994, **66**(13):2103 - 2109.
 [6] Chen YR, Wen KC, Her GR. Analysis of coptisine, berberine and palmatine in adulterated Chinese medicine by capillary electrophoresis-electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2000, **866**(2):273 - 280.
 [7] Yang JJ, Long H, Liu HW, et al. Analysis of tetrandrine and fangchinoline in traditional Chinese medicines by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1998, **811**(1 - 2):274 - 279.