

夏天无生物碱电喷雾质谱分析

沈燕¹ 韩超² 周秀锦³ 朱振瓯² 邵黎雄¹ 高文霞¹

(1. 温州大学化学与材料工程学院 温州 325035; 2. 温州出入境检验检疫局 温州 325027;

3. 舟山出入境检验检疫局 舟山 316000)

摘要 目的: 用液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS) ,对夏天无生物碱(四氢巴马亭、盐酸巴马亭、原阿片碱、比枯枯灵) 在电喷雾质谱下的裂解途径进行探讨。方法: 正离子模式下进行检测。液相色谱条件: 色谱柱为 Waters X BridgeTM C₁₈ 反相柱(2.1 mm × 150 mm 3.5 μm) ,流动相为 0.2% 乙酸-乙腈 梯度洗脱 流速为 0.25 mL · min⁻¹。结果: 在正离子模式下, 夏天无生物碱化合物较容易失去甲醛和一氧化碳, 也能够失去苯环, 呈现出一定的裂解规律。结论: 本文为夏天无生物碱的快速检测提供了一种有效的质谱方法。

关键词: 罂粟科植物; 伏生紫堇(夏天无); 生物碱; 原阿片碱(PTP); 四氢巴马亭(THP); 盐酸巴马亭(PMT HCl); 比枯枯灵(BCL); 电喷雾质谱; 裂解途径

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011) 12-2318-04

Electrospray ionization mass spectrometry analysis of alkaloids in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.

SHEN Yan¹ , HAN Chao² , ZHOU Xiu-jing³ ,
ZHU Zhen-ou² , SHAO Li-xiong¹ , GAO Wen-xia¹

(1. College of Chemistry and Materials Engineering , Wenzhou University , Wenzhou 325035 , China;

2. Wenzhou Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau , Wenzhou 325027 , China;

3. Zhoushan Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau , Zhoushan 316000 , China)

Abstract Objective: To study the collision-induced dissociation fragmentation pathways of the alkaloids (tetrahydropalmatine , palmatine hydrochloride , protopine , bicuculline) in electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) . **Methods:** The samples of alkaloids were analyzed by LC-ESI-MS/MS in positive ion mode. An Waters X BridgeTM C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm 3.5 μm) column was adopted; The mobile phase was a mixture of 0.2% acetic acid-acetonitrile at a flow rate of 0.25 mL · min⁻¹. **Results:** The alkaloids were clines to loss CH₂O and CO , furthermore , the loss of benzene ring could be also observed. **Conclusion:** The established method by LC-ESI-MS/MS can be adopted for sensitive and rapid identification of alkaloids in the rhizome of *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.

Key words: papaveraceae plant; *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. ; alkaloids; protopine (PTP) ; tetrahydropalmatine (THP) ; palmatine hydrochloride (PMT HCl) ; bicuculline (BCL) ; electrospray ionization mass spectrometry; fragmentation pathway

夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 [*Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.] 的干燥块茎, 具有活血通络、行气止痛的功效, 主要用于治疗中风偏瘫、风湿性关节炎、坐骨神经痛等^[1]。原阿片碱(protopine , PTP)、四氢巴马亭(tetrahydropalmatine , THP)、盐酸

巴马亭(palmatine hydrochloride , PMT HCl)、比枯枯灵(bicuculline , BCL) 是夏天无中所含的 4 种重要的生物碱, 具有广泛的生物活性, 药理作用表现为镇痛、催眠、降低冠脉阻力及增加血流量等^[2]。夏天无生物碱的含量测定及其药理已有较多研究^[3-7],

但其电喷雾质谱分析未见报道。

因此,建立一种简便、快速的该类化合物结构鉴定的方法,对其药理活性和其他作用的研究有重要意义。高效液相色谱(HPLC)与质谱(MS)联用技术结合了HPLC分离和MS定性的优势,MS不但可以提供相对分子质量的信息,还可以提供化合物的碎裂信息,可为化学成分的归类和结构鉴定提供依据,从而简化了化学成分的鉴定过程^[8]。本文通过高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-ESI-MS/MS)技术对上述4种夏天无生物碱在软电离模式下呈现的裂解规律进行了总结,提出了该类化合物在ESI-MS/MS下的快速鉴定方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 HPLC 仪(美国 Agilent 公司)、API 4000 QTrap 四极杆-线性离子阱质谱仪(美国 AB 应用生物系统公司);P300H 超声波清洗器(德国 Elma 公司),Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司);甲醇、乙腈均为色谱纯(德国 MERCK 公司),其他试剂均为分析纯。PTP、THP、PMT HCl、BCL 4 种生物碱纯度均 $\geq 98\%$,购自上海诗丹德生物技术有限公司。

2 色谱及质谱条件

2.1 色谱条件 Waters XBridgeTM C₁₈ 反相柱(2.1 mm $\times$ 150 mm 3.5 μ m);流动相:A 为 0.2% 的乙酸水溶液,B 为乙腈 梯度洗脱 0 $\rightarrow$ 10 min;流动相 A 和 B 的比例为 80:20 $\rightarrow$ 70:30;流速:0.25 mL $\cdot$ min⁻¹,进样量:5 μ L 柱温:30 $^{\circ}$ C。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源:正离子扫描;离子源温度 550 $^{\circ}$ C;电喷雾电压 4.5 kV;雾化气(GS1)压力 344.5 kPa;辅助气流速(GS₂) 275.6 kPa;气帘气压力 68.9 kPa;碰撞气 CAD 68.9 kPa,扫描范围: m/z 50~500。

3 对照品溶液

取各对照品约 10 mg,精密称定,分别置 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,所得溶液的浓度均为 200 mg $\cdot$ L⁻¹。使用时,用甲醇稀释上述标准储备液,配制成 20 ng $\cdot$ mL⁻¹的溶液,各取 5 μ L,分别注入高效液相色谱-电喷雾串联质谱(LC-

ESI-MS/MS)进行质谱分析。

4 结果与讨论

在进行 LC-ESI-MS/MS 联机分析之前,将标准储备液稀释成 100 μ g $\cdot$ L⁻¹单标准工作溶液,通过流动注射泵连续进样,调谐质谱参数。使用 ESI 源和大气压化学电离 APCI 源在正离子和负离子模式下进行了全扫描以选择适当的定性、定量离子和电离方式。结果表明:在 ESI 源的正离子模式下 4 种生物碱均呈现出最佳响应。故本文以 ESI 正离子模式进行分析。

通过对 LC-ESI-MS/MS 检测结果分析,对上述几个化合物的裂解途径进行了如下推导:

THP、PTP、BCL 生物碱一级全扫描质谱均出现 $[M+H]^+$ 峰 m/z 分别为 356,354,368;PMT HCl 生物碱一级全扫描质谱出现 $[M]^+$ 峰 m/z 为 352。

THP、PMT HCl、PTP、BCL 生物碱二级质谱见图 1。

THP 二级质谱中产生 m/z 为 192 和 165 碎片峰,均为丢失甲氧基和苯环裂解的产物。THP 可能的裂解途径见图 2-A。

PMT HCl 二级质谱中产生 m/z 为 336,322,308 碎片峰。推测 PMT HCl 首先丢失一个 H 和 -CH₃,生成最主要的特征碎片 m/z 336;该碎片再丢失 CO,裂解成碎片 m/z 308;PMT HCl 也可以丢失 -CH₂O,裂解成碎片 m/z 322。在 MS³ 质谱中, m/z 336、308 的三级质谱均产生 m/z 292,因此 m/z 292 是该化合物的特征裂解碎片。PMT HCl 可能的裂解途径见图 2-B。

PTP 二级质谱中,图谱信息丰富,产生 m/z 为 189,149,206,275 等碎片峰,均为各环逐渐裂解的产物,其中以 m/z 188 为基峰。PTP 可能的裂解途径见图 2-C。

BCL 二级质谱中,图谱信息丰富,产生 m/z 为 307,190,277,249,319 等碎片峰。均为各环逐渐裂解的产物,其中以 m/z 307 为基峰;在 MS³ 质谱中, m/z 307 的三级质谱产生 m/z 277 和 m/z 249,因此 m/z 277 和 m/z 249 是该化合物的特征裂解碎片。BCL 可能的裂解途径见图 2-D。

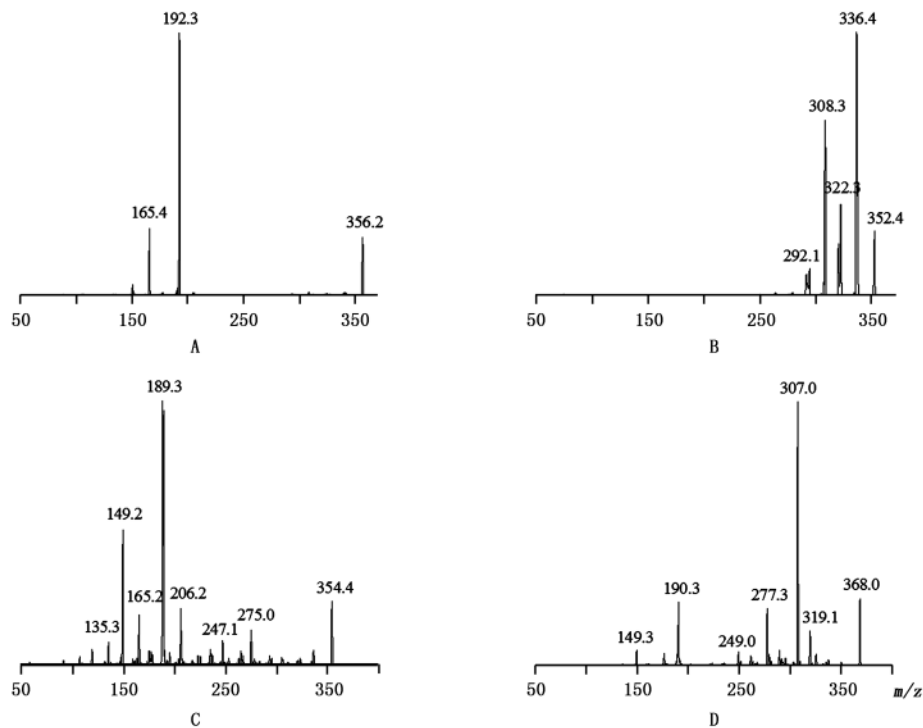


图1 4种生物碱在ESI正离子模式下的二级质谱图

Fig 1 Positive ESI-MS of 4 alkaloids

A. THP B. PMT HCl C. PTP D. BCL

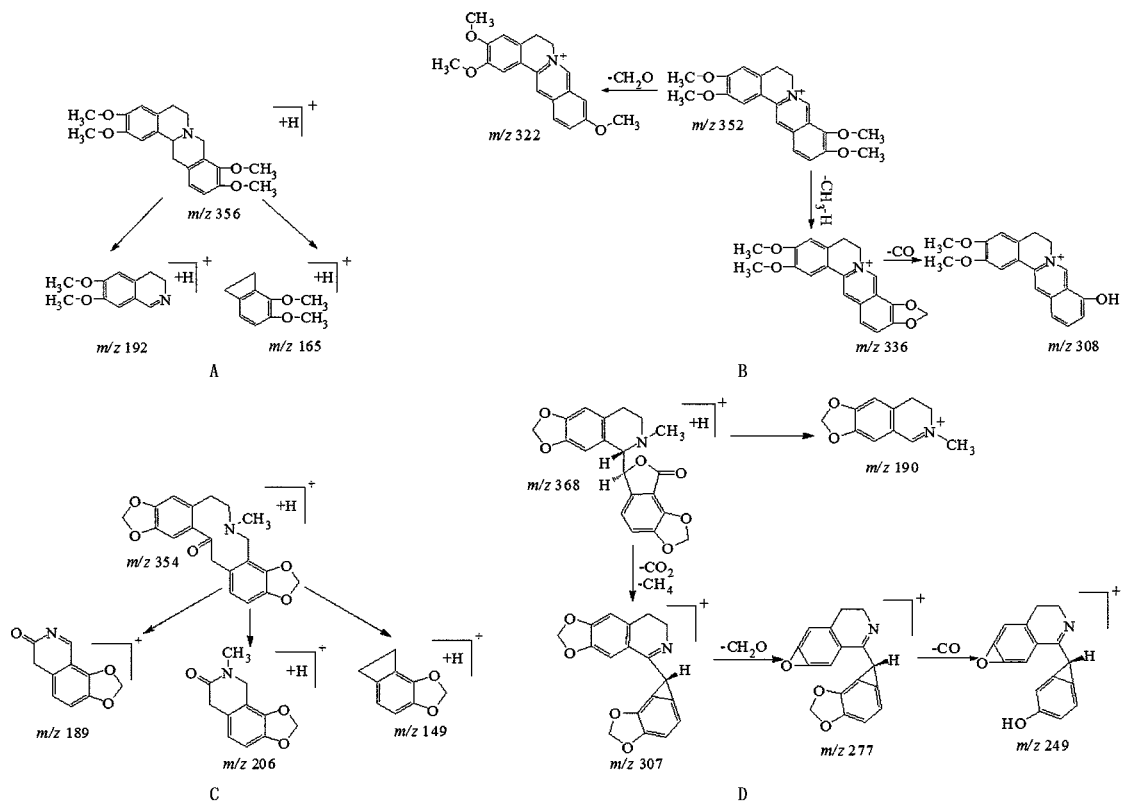


图2 4种生物碱在ESI正离子模式下的裂解途径

Fig 2 Proposed fragmentation pathways of 4 alkaloids

A. THP B. PMT HCl C. PTP D. BCL

结果表明,THP 和 PMT HCl 尽管结构非常相似,但其可能的裂解途径却大不相同。THP 在正离子模式下很容易丢失甲氧基和苯环,PMT HCl 在正离子模式下只丢失 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{O}$ 和 CO 等小分子。PTP 和 BCL 在正离子模式下很容易失去苯环和其他小分子。

实验中选择了蠕动泵进样和 HPLC 进样-色谱柱分离 2 种方式进行考察,结果显示两者区别不大。中药成分分析一般都是 HPLC 进样、通过色谱柱达到分离和鉴定的目的,因此本实验也选择 HPLC 进样方式。

参考文献

- 1 WANG Dai-jie (王岱杰),LIU Jian-hua (刘建华),GENG Yan-ling (耿岩玲), *et al.* Separation of alkaloids from *Corydalis Decumbens* (Thunb.) Pers by high speed counter current chromatography (夏天无生物碱的高速逆流色谱分离纯化). *Chin J Anal Chem* (分析化学) 2010 38(6):783
- 2 XIE Cai-juan (谢彩娟),ZHANG Zhi-qi (张志琪),ZHANG Fu-qiang (张富强), *et al.* RP-HPLC simultaneous determination of tetrahydropalmatine and protopine in Rhizoma Corydalis (RP-HPLC 法同时测定延胡索药材中延胡索乙素和原阿片碱). *J Shaanxi Norm Univ (Nat Sci Ed)* (陕西师范大学学报 自然科学版), 2005 33(1):82
- 3 LUO Yue-hua (罗跃华),XIONG Wei (熊蔚),XU Yan (许妍), *et al.* TLC-scanning determination of protopine in *Corydalis decumbens* (薄层扫描法测定夏天无中原阿片碱的含量). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) 2000 31(9):669
- 4 LUO Yue-hua (罗跃华),XIONG Wei (熊蔚),WU Chao-yang (吴朝阳). Determination of protopine in *Corydalis decumbens* tablet using TLC (薄层扫描法测定夏天无片中原阿片碱的含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药) 1999 21(10):531
- 5 WEN Huai-xiu (文怀秀),SHAO Yun (邵赟),TAO Yan-duo (陶燕铎), *et al.* RP-HPLC determination of protopine in Tibet medicine *Hypocoum leptocarpum* Hook. f. *et Thoms* (RP-HPLC 法测定藏药细果角茴香中原阿片碱的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2009 29(1):137
- 6 JIANG Shun-yao (姜舜尧),SONG Jing-zheng (宋景政),ZHOU Ming-hao (周明昊), *et al.* Determination of tetrahydropalmatine in *Corydalis decumbens* using high-performance capillary-electrophoresis (高效毛细管电泳测定夏天无药材中延胡索乙素的含量). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志) 2000 35(5):336
- 7 XU Fa-hong (徐发红),LUO Yue-hua (罗跃华),CHEN Wei-kang (陈伟康), *et al.* HPLC determination of three effective ingredients in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. injection (HPLC 法同时测定夏天无注射液中 3 个有效成份的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2008 28(9):1494
- 8 SUN Ming-qian (孙明谦),LU Jian-qiu (卢建秋),ZHANG Hong-gui (张宏桂). Fragmentation pathways of the flurocoumarins in electrospray ionization mass spectrometry (呋喃香豆素类化合物电喷雾质谱裂解途径). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009 29(1):82

(本文于 2011 年 1 月 26 日收到)

《金少鸿论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《金少鸿论文集》由中国人口出版社于 2010 年 9 月出版。2010 年中国药品生物制品检定所(中检所)迎来了她 60 华诞。在中检所 60 华诞之际,编辑出版老一代中检人的论著文集,让人们了解中国药检人的奋斗历程,从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业,前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富,系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作,以体现专业性为主线,反映团队成就为宗旨,并以年代代表人物冠以书名编辑成册。《金少鸿论文集》以金少鸿研究员为核心,收集了金少鸿研究员本人及与其他作者合著论文 228 篇。论文以全文刊载,著作刊载前言或序、著者、目录或摘要等。对论文有贡献的中检所老专家还有郑昌亮、赵建西、汪开敏、吴铨、毕汝仁、张治锁、周玉、吴秉琴、张雪梅、朱燕、伍仪洵、王素兰、唐秋瑾、胡昌勤、马越等,以及西安药检所的付燕芳、邹熔魁、南博汉、徐帼倩等。本论著集的编辑出版更蕴涵了对老一代专家们为中检所发展所作贡献的由衷敬重。

本书定价 288.00 元。联系人:刘小帅;电话:010-67095201;地址:100050 北京市东城区天坛西里 2 号中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部