

5种贝母药材的电喷雾离子阱质谱特征图谱研究

韩凤梅,王新立,蔡敏,陈勇

(湖北大学生命科学学院,湖北武汉 430062)

摘要:目的 建立5种贝母药材的电喷雾离子阱质谱(ESI-MS)特征图谱,用于贝母药材的品种鉴别。方法 用18%氨水润湿贝母药材,乙醚-氯仿-乙醇(25:8:2.5)混合溶剂超声提取其中贝母生物碱,将提取物直接进样到电喷雾离子阱质谱检测器进行正离子全扫描分析。结果 在正离子一级质谱中,贝母生物碱易形成带一个正电荷的准分子离子,并且在中性醇溶液中,贝母生物碱易形成二聚体,在酸性介质中则无此现象;二级碰撞诱导解离易使贝母生物碱脱去一分子水;5种贝母对照药材的总生物碱提取液的一级电喷雾质谱图显示,主要分子离子峰基本相同,但因品种不同相对丰度差异较大。结论 5种贝母药材生物碱提取物的ESI-MS图谱特征性较强,重现性与精密度较好,可用于不同品种贝母类药材的鉴别。

关键词:贝母;生物碱;电喷雾质谱;特征图谱

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)07-1069-03

ESI-MS characteristic spectra of alkaloids in *Bulbus Fritillariae*

HAN Feng-mei, WANG Xin-li, CAI Min, CHEN Yong

(College of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract: Objective To develop the characteristic ESI-MS spectra of five *Bulbus Fritillariae* species and to be used for identification of *Bulbus Fritillariae* species. **Methods** The *Bulbus Fritillariae* medicinal materials were dipped in 18% ammonia solution, then the alkaloids were extracted by ultrasonic using the mixed solvent of ether-chloroform-ethanol (25:8:2.5). The extracts were analyzed directly by ESI-MS in positive ion mode. **Results** *Bulbus* alkaloids easily formed molecular ions ($[M+H]^+$) in MS and dimerized easily in alcohol solution, which did not dimerize in acidity solution. Collision induced dissociation (S-CID) made these alkaloids easily lose a molecule of H_2O . The MS spectra of the extracts of five *Bulbus Fritillariae* species indicated that the major molecular ions were similar to each other, but different varieties showed very different relative abundances of these molecular ions. **Conclusion** The total alkaloid extracts of five *Bulbus Fritillariae* species have strong characteristic ESI-MS spectra and these spectra are of good reproducibility and precision, respectively. These characteristic spectra are useful for the identification of *Bulbus Fritillariae* species.

Key words: *Bulbus Fritillariae*; alkaloid; ESI-MS; characteristic spectrum

贝母是临床常用药材,主要药效成分为生物碱。由于商品贝母植物来源复杂,外形较相似,品质评价较困难。文献报道贝母药材的品质鉴别方法有薄层色谱鉴别^[1]、紫外光谱鉴别^[2]、红外光谱鉴别^[3]、裂解气相色谱鉴别^[4]、示波极谱鉴别^[5]、一阶导数光谱法鉴别^[6]、贝母药材的基因分型和种类鉴别^[7]、聚类分析^[8]等。薄层色谱鉴别分辨率不高,特征性不强;光谱鉴别法和示波极谱法因基于化合物官能团理化特征而无法表征复杂体系的物质组成;DNA片段多

态性技术较复杂且分析成本较高;聚类分析仅是一种数学分析方法,这些方法都不能直观表征贝母生物碱的化学组成信息。运用电喷雾质谱技术研究贝母生物碱特征图谱还未见报道。

电喷雾离子化(electrospray ionization,ESI)是一种大气压电离技术,它能在大气压下从溶液里直接产生完整的溶质分子的分子离子,是一种软电离方式,通常不产生碎片离子,各样品(包括生物大分子)都可得到准分子离子和/或其多电荷离子峰,因

收稿日期:2004-09-15

基金项目:科技部十五攻关项目(2001BA701A01);湖北省青年杰出人才科学基金项目(2002AC004)

*通讯作者 陈勇 Tel/Fax:(027)88663590 E-mail:cy101610@npc.gov.cn

而可得到复杂样品的化学物质组成信息^[9]。笔者用离子阱电喷雾质谱(ESI-MS)研究了 5 种《中国药典》记载的贝母对照药材的 ESI-MS 图谱,为贝母药材的鉴别提供了一种新方法,并对其主要活性成分——贝母生物碱的质谱规律进行了初步探讨。

1 材料

美国 Finnigan 公司 LCQ^{DUO} 质谱仪, JY92—II 型超声细胞破碎机。川贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don、浙贝母 *F. thunbergii* Miq.、平贝母 *F. ussuriensis* Maxim.、伊贝母 *F. pallidiflora* Schrenk 和湖北贝母 *F. hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia 对照药材及贝母甲素对照品均购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 质谱条件:离子源喷雾电压:4.5 kV;毛细管温度:200 °C;毛细管电压:45 V;鞘气(N₂)流速:40 个单位;流动相:甲醇-水(50 : 50);体积流量:0.2 mL/min;正离子一级全扫描范围:*m/z* 100~1 200,二级质谱碰撞能量:40%。

2.2 供试液制备

2.2.1 贝母甲素对照品溶液制备:配制 54 μg/mL 贝母甲素甲醇溶液,取 1.0 mL 于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.5 mL 进行一级质谱正离子全扫描,源碰撞和二级质谱全扫描,得图谱(图 1、2)。

2.2.2 5 种对照药材总生物碱提取物供试液制备^[10]:各取 500 mg 对照药材于离心管中,以 18% 氨水 1.0 mL 润湿 1 h,加乙醚-氯仿-乙醇(25 : 8 : 2.5)混合溶剂 7.5 mL,超声提取 20 min(工作 2 s,间隙 4 s,功率

400 W,冰浴),8 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,重复提取 3 次,合并上清液并在 60 °C 水浴蒸干,用氯仿溶解并定容至 25 mL 容量瓶中。分别各取 1.0 mL,挥干氯仿,用甲醇溶解,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.5 mL 至进样瓶中,采用同上进行一级质谱正离子全扫描,得图谱(图 3)。

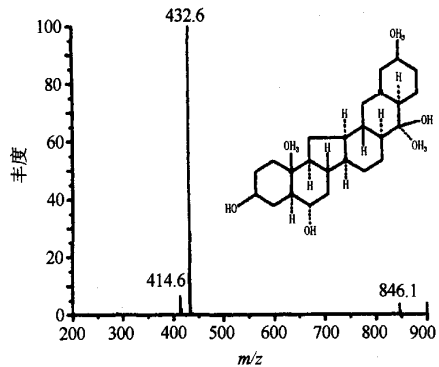


图 1 贝母甲素一次质谱正离子全扫描图(甲醇溶解)
Fig. 1 Full scan mass spectrum of peimine in positive mode (dissolved with methanol)

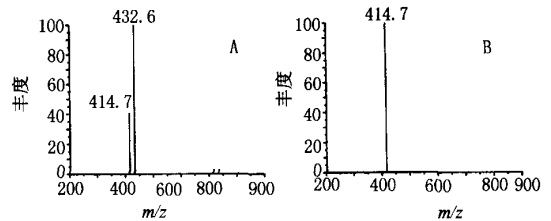
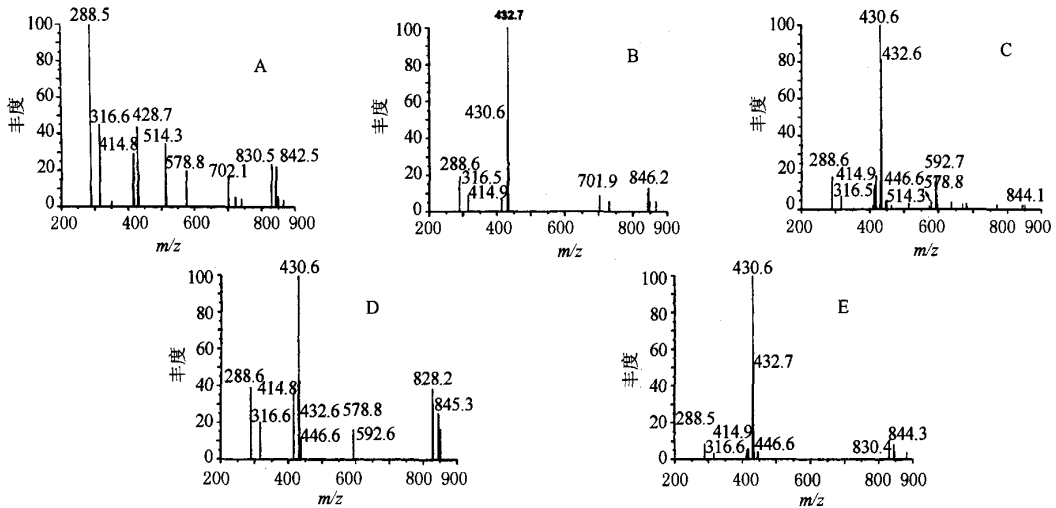


图 2 贝母甲素源碰撞(A)和二次质谱(B)图谱(甲醇溶解)

Fig. 2 S-CID mass spectrum (A) and MS² spectrum (B) of peimine (dissolved with methanol)



A-川贝母 B-浙贝母 C-平贝母 D-伊贝母 E-湖北贝母
A-*F. cirrhosa* B-*F. thunbergii* C-*F. ussuriensis* D-*F. pallidiflora* E-*F. hupehensis*

图 3 5 种贝母对照药材正离子电喷雾全扫描图

Fig. 3 Full scan mass spectra of five *Bulbus Fritillariae* species

2.3 精密度与重现性试验:贝母药材总生物碱供试液电喷雾质谱图的重现性与精密度较好(见表1),可用于贝母类药材的品种鉴别。

表1 精密度与重现性试验($n=3$)

Table 1 Precision and reproducibility test ($n=3$)

质荷比 m/z	精密度 RSD/%	重现性 RSD/%
414.7	1.6	2.5
416.8	1.7	5.4
428.6	6.8	9.8
430.6	2.4	8.7
432.6	2.5	6.4

3 讨论

3.1 贝母甲素电喷雾质谱规律研究:贝母甲素一级质谱正离子扫描表明,贝母甲素易生成带一个质子的准分子离子峰 m/z 432.6,此外还有较低丰度的 m/z 846.1 峰和 m/z 414.6 峰(图1),而在负离子全扫描图中则无相关信息峰。对贝母甲素甲醇供试液做源碰撞($sid=30$ V)显示, m/z 846.1 峰消失(图2-A),结合质荷比可推测 m/z 846.1 是贝母甲素脱水二聚体的分子离子峰 $[2M-H_2O+H]^+$ 。 m/z 417.7 是贝母甲素二级裂解的主要碎片,说明贝母甲素的准分子离子在离子阱中不稳定。另外,溶剂对贝母甲素的一级质谱亦有很大影响。在醇等中性介质中,贝母甲素一级质谱有二聚体存在,但在酸性介质中则无二聚体存在。

贝母甲素的二级裂解图谱(图2-B)中的基峰为 m/z 414.7,它是 m/z 432.6 的脱水碎片离子峰 $[M-H_2O+H]^+$,表明碰撞诱导解离易使贝母甲素失去一分子水。

3.2 5种贝母药材总生物碱供试液的质谱图:根据5种贝母对照药材总生物碱提取液的ESI-MS图谱,结合文献报道的贝母生物碱相对分子质量信息,可以看出5种对照药材的生物碱组成基本相同,都存在 m/z 414.7、416.7、430.6、432.7、446.6、448.7、578.8 和 592.8 等常见贝母生物碱的分子离子峰^[11],由于贝母生物碱组成中有许多同分异构体

存在,因此,上述图谱只是在物质组成的质荷比上具有较好的特征性。

通过对药材总生物碱供试液的ESI质谱研究发现,其他贝母生物碱与贝母甲素存在极为相似的质谱规律:即一级正离子质谱均形成带一个正电荷的准分子离子峰;在中性醇溶液中均有脱水二聚体存在,而在酸性介质中则无二聚体存在;二级碰撞诱导解离易使贝母生物碱脱去一分子水。

3.3 此外,值得注意的是在贝母对照药材总生物碱供试液的ESI-MS图中,均有丰度很高的 m/z 288.5 峰和 316.6 峰,背景分析表明,这些不是系统杂质峰,是贝母提取液中的未知成分。至于这些物质具有何种化学结构与生物作用,还有待进一步研究。

References:

- [1] Jiang A H. Identification of *Fritillaries* by thin-layer chromatography (TLC) [J]. *Heilongjiang J Tradit Chin Med* (黑龙江中医药), 1998 (2): 4.
- [2] Gu X Z, Shen G F. UV spectral identification of *Fritillaries walujewii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (7): 646-647.
- [3] Tian J G, Ren J, Lou H X, et al. IR spectral identification of five kinds of *Fritillaries* medical materials [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(6): 292-293.
- [4] Yan M, Song T L. Analyzation and identification of six kinds of wild *Bulbus Fritillariae* by schizolytic GC [J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med Pharm* (新疆中医药), 1997, 15(3): 30-32.
- [5] Liu Y H, Zhong S C, Li Y J. Oscillographic polarography identification of six kinds of *Bulbus Fritillariae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1990, 21(4): 33-34.
- [6] Wang Y L, Che X J, Wang S L. Identification of five kinds of *Bulbus Fritillariae* by first-derivative spectroscopy [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1994, 17(7): 19.
- [7] Tsoi P Y, Woo H S, Wong M S, et al. Genotyping and species identification of *Fritillaries* by DNA chips [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2003, 38(3): 185-190.
- [8] Wang J Q, Hu Q Y, Li S F. UV cluster analysis of *Fritillariae* TCM [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1997, 8(3): 235.
- [9] Pierluigi M, Piergiorgio P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000 (23): 61-68.
- [10] Wang S, Xu X P, Li T. Determination and contrastion of alkaloids and saponins in *Bulbus Fritillariae Cirrhosae* and in other *Beimus* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(5): 342-344.
- [11] Xu D M, Xu Y J. Advance in the study of alkaloids in *Fritillaries* plants [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22(3): 132-139.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821 传真:23006821 联系人:陈常青