

固相萃取-快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱联用分析荷叶中的生物碱

郑振佳^{1,2}, 王 晓^{2*}, 王明林¹, 王珊珊², 赵先恩²

1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018

2. 山东省科学院 中药过程控制研究中心, 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

摘要: 目的 建立固相萃取-快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱 (SPE-RRLC-Q-TOF) 联用技术分析荷叶中的生物碱类化合物的方法。方法 样品采用 1% 盐酸超声提取, 经固相萃取 (SPE) 小柱净化, 再用氨水-甲醇进行洗脱, 洗脱液浓缩后用甲醇定容。选用 Welch Materials C₁₈ 柱, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 在正离子模式下, 经快速分离液相-飞行时间质谱 (RRLC-Q-TOF) 分析。结果 分离并检测了 9 种生物碱。结论 快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱结合阳离子交换固相萃取柱前处理技术, 可以快速准确鉴定荷叶中的生物碱成分。

关键词: 固相萃取; 快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱; 荷叶; 生物碱; 阳离子交换

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1066-03

Analysis of alkaloids in *Nelumbo nucifera* leaves by solid phase extraction-rapid resolution liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry

ZHENG Zhen-jia^{1,2}, WANG Xiao², WANG Ming-lin¹, WANG Shan-shan², ZHAO Xian-en²

1. College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

2. Process Control Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shandong Analysis and Test Center, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China

Abstract: Objective A novel method for the analysis of alkaloids in *Nelumbo nucifera* leaves was established by SPE-RRLC-Q-TOF mass spectrometry. **Methods** The crude sample was extracted by 1% HCl with ultrasound-assisted extraction, then purified by SPE column, and eluted with ammonia-methanol (5:95). After concentration, the residue was dissolved by methanol solution. The real sample was analyzed by RRLC-Q-TOF. A Welch Materials C₁₈ column was applied in the RRLC separation using acetonitrile and water as mobile phase. The elutes were detected by Q-TOF to obtain the MS spectra with extract molecular weights under positive ion mode. **Results** Nine alkaloids were identified. **Conclusion** This method can be used to rapidly determine the alkaloids of *N. nucifera* leaves.

Key words: solid phase extraction (SPE); rapid resolution liquid chromatography-quadrupole-time of flight (RRLC-Q-TOF) mass spectrometry; *Nelumbo nucifera* Gaertn. leaves; alkaloids; cation exchange

荷叶为睡莲科莲属植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的叶, 药食两用^[1]。生物碱是荷叶的主要活性成分之一, 传统的分析方法耗时费力, 纯化效果和灵敏度的不理想^[2-3]。飞行时间质谱具有高分辨率, 能够不降低灵敏度而测定化合物精确的相对分子质量, 在天然产物分析方面越来越受到重视^[4-5]。固相萃取 (SPE) 是对样品富集的一种有效方法, 具有很高的选择性, 被广泛应用于药物、生物、食品等样品的分析^[6-7]。本实验采用 SPE 技术富集生物碱类成分,

消除部分干扰, 然后利用快速分离液相-飞行时间 (RRLC-Q-TOF) 质谱对荷叶中的生物碱进行快速的分析鉴定。该分析方法对荷叶提取物指纹图谱的建立、荷叶生物碱的分析检测具有重要意义。

1 仪器与试剂

Agilent 6520 四极杆-飞行时间串联液质联用仪 (美国安捷伦公司); Waters 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); ProElut PXC 固相萃取柱、ProElut C₁₈ 固相萃取柱 (迪马科技)。乙腈为色谱纯, 甲醇为分

收稿日期: 2010-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20872083); 山东省科技攻关项目 (2009GG2001021-16); 山东省科学院博士基金项目 (科基合字 2010 第 22 号); 济南市高校院所自主创新计划 (201004010)

作者简介: 郑振佳 (1985—), 山东省烟台市人, 在读硕士研究生, 主要从事天然产物分离纯化与活性研究。

Tel: 13615487552 E-mail: pengyou-jia@163.com

*通讯作者 王 晓 Tel: (0531)82605319 Fax: (0531)82964889 E-mail: wangx@keylab.net

析纯,实验用水为去离子超纯水;荷叶购于山东中医药大学中鲁医院,经山东中医药大学张永清教授鉴定为莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的叶。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 提取 精密称取荷叶粉末 1.0 g,放入 100 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 1%盐酸,室温下超声提取 15 min,滤过。

2.1.2 净化 依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化固相萃取柱,准确移取 10 mL 滤液上柱,再用 3 mL 水和 3 mL 甲醇洗涤固相萃取柱,抽干,用 5 mL 5% 氨化甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,抽干,洗脱液经旋转蒸发仪浓缩至干,1 mL 甲醇定容,过 0.45 μm 滤膜后作为供试样品溶液。

2.2 液质联用分析条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Welch Materials C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水;梯度洗脱:0~25 min, 15% $\rightarrow$ 50%(乙腈);体积流量 1 mL/min;进样量 20 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 270 nm。

2.2.2 质谱条件 离子源 ESI,四极杆温度 100 $^{\circ}\text{C}$,雾化压力 3.4×10^5 Pa,碎裂电压 175 V,干燥器温度 350 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流量 10 L,毛细管电压 4 000 V,正离子模式扫描, m/z 扫描范围 100~1 000。

2.3 荷叶中生物碱类化合物的分析

经 Agilent 6520 四极杆-飞行时间串联液质联用仪分析,荷叶提取物的液相色谱图和总离子流图见图 1。本实验所采用的高分辨率飞行时间质谱能够得到待测组分的分子离子峰及其精确相对分子质量,根据得到化合物的精确相对分子质量,对各化合物进行鉴别。

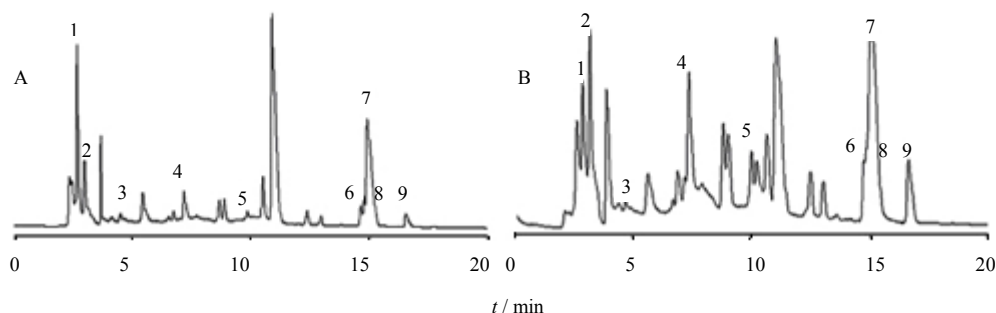


图 1 荷叶提取液的液相图 (A) 和总离子流图 (B)

Fig. 1 Liquid chromatogram (A) and total ion chromatogram (B) of extract from *N. nucifera* leaves

根据其主要生物碱的质谱,由文献及相应生物碱在反相柱上的保留值可知:峰 1 获得 m/z 293.147 09 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[8]推断其为去氢荷叶碱 (dehydronuciferine, $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}$);峰 2 获得 m/z 610.309 51 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[8]推断其为莲心碱 (liensinine, $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{N}_2$);峰 3 获得 m/z 271.119 58 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[8]推断其为 *dl*-去甲基衡州乌药碱 (*dl*-demethylcoclaurine, $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}$);峰 4 获得 m/z 610.309 48 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[9]推断其为异莲心碱 (isoliensinine, $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{N}_2$);峰 5 获得 m/z 624.319 43 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 质谱信号,根据文献数据^[9]推断其为甲基莲心碱 (neferine, $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_6\text{N}_2$);峰 6 获得 m/z 281.140 85 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[8]推断其为 *N*-去甲荷叶碱 (*N*-nomuciferine, $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_2\text{N}$);峰 7 获得 m/z 279.125 62 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[8]推断其为莲碱 (roemerine, $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}$);峰

8 获得 m/z 296.163 67 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[9]推断其为荷叶碱 (nuciferine, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}$);峰 9 获得 m/z 312.159 19 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质谱信号,根据文献数据^[8]推断其为前荷叶碱 (pronuciferine, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_3\text{N}$)。

荷叶中生物碱类成分液相保留时间、质谱分子离子峰、相对分子质量实验测定值和理论值见表 1,通过比较可以看出相对分子质量测定值和理论值相差很小。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

分别研究了以甲醇-水、甲醇-0.1%乙酸、乙腈-水等作为 HPLC 流动相时荷叶提取物中各组分的分离效果,结果发现以甲醇为流动相时峰形重叠而且拖尾现象。选择乙腈-水体系进行梯度洗脱 (0~25 min, 15% $\rightarrow$ 50%乙腈),流动相体积流量为 1 mL/min 时分离效果较好。

表 1 荷叶提取液中生物碱类化合物的 RRLC-Q-TOF 分析
Table 1 RRLC-Q-TOF analysis of alkaloids in extract of *N. nucifera*

化合物	分子式	t_R /min	选择离子	实验值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差
去氢荷叶碱	$C_{19}H_{19}O_2N$	3.062	$[M+H]^+$	293.147 09	293.141 58	-1.88
莲心碱	$C_{37}H_{42}O_6N_2$	3.368	$[M+H]^+$	610.309 51	610.304 29	8.55
<i>dl</i> -去甲基衡州乌药碱	$C_{16}H_{17}O_3N$	4.884	$[M+H]^+$	271.119 58	271.120 84	-4.65
异莲心碱	$C_{37}H_{42}O_6N_2$	7.524	$[M+H]^+$	610.309 48	610.304 29	8.50
甲基莲心碱	$C_{38}H_{44}O_6N_2$	10.090	$[M+2H]^{2+}$	624.319 43	624.319 94	-8.17
<i>N</i> -去甲荷叶碱	$C_{18}H_{19}O_2N$	14.861	$[M+H]^+$	281.140 85	281.141 58	-1.40
莲碱	$C_{18}H_{17}O_2N$	15.372	$[M+H]^+$	279.125 62	279.125 93	-4.17
荷叶碱	$C_{19}H_{21}O_2N$	15.919	$[M+H]^+$	296.163 67	296.157 23	2.14
前荷叶碱	$C_{19}H_{21}O_3N$	16.758	$[M+H]^+$	312.159 19	312.152 14	-0.75

3.2 固相萃取柱的选择

利用 HPLC 分析比较了酸水直接提取样品、经 PXC 固相萃取柱和 C_{18} 固相萃取柱净化后的样品，富集净化效果见图 2。结果显示，PXC 固相萃取柱使生物碱成分在酸水直接提取基础上的富集净化效果非常明显； C_{18} 固相萃取柱生物碱损失量较大，生物碱量明显低于酸水直接提取，因此不宜采用。本实验最后采用 PXC 固相萃取柱作为净化方式。

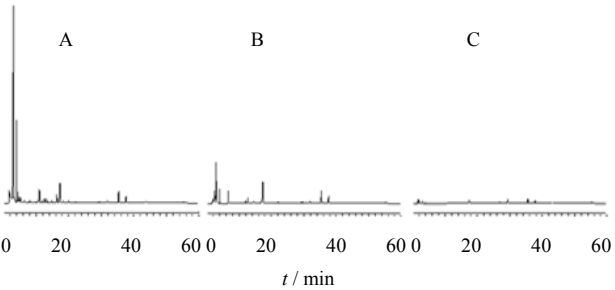


图 2 酸水直接提取 (A)、PXC 固相萃取 (B) 和 C_{18} 固相萃取 (C) 富集净化效果比较

Fig. 2 Comparison enrichment of acid-water (A), PXC solid (B), and C_{18} solid (C) extraction

本实验采用固相萃取-快速分离液相-四级杆串联飞行时间质谱联用，利用分子离子的精确相对质量分数，无需对照品，快速分析鉴定荷叶中的生物碱类化合物。所建方法对植物中生物碱的分析检测

提供了新的参考依据，对天然产物有效成分的定性分析具有重要的意义。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
[2] 单 斌, 邓泽元, 熊冬梅, 等. 荷叶中生物碱的提取及组成成分的分析 [J]. 食品科技, 2008(10): 163-166.
[3] 罗金波, 肖文军, 刘仲华. 荷叶生物碱类成分的研究进展 [J]. 今日药学, 2008, 18(3): 9-12.
[4] 韩 超, 陈军辉, 刘 劼, 等. 高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱分析太子参中环肽类化合物 [J]. 分析化学, 2006, 34(12): 1719-1722.
[5] 芮 雯, 冯毅凡, 吴 妍, 等. 干姜油中姜酚类成分的 UPLC/Q-TOFMS 分析 [J]. 中草药, 2008, 39(5): 667-668.
[6] 何忠梅, 孙佳明, 张 辉, 等. 固相萃取-高效液相色谱-电喷雾串联质谱法分析芍药和酒芍药的水溶性化学成分 [J]. 分析化学, 2009, 37(8): 1021-1025.
[7] 韦寿莲, 麦文敏, 严子军. 固相萃取-毛细管电泳法测定兔血清中的山莨菪碱对映体 [J]. 化学学报, 2009, 67(8): 801-807.
[8] 张 弦, 潘 扬. 植物莲中生物碱类成分的研究概况 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2002, 18(6): 382-384.
[9] 李文龙, 陈军辉, 殷月芬, 等. 加速溶剂提取-高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱联用分析莲子心中生物碱 [J]. 分析化学, 2008, 36(1): 79-82.