

UHPLC-Q-TOF/MS 对藜芦药材化学成分的快速分离与鉴别

章 斌,董 昕,娄子洋

第二军医大学药学院分析测试中心,上海 200433

[摘要] **目的** 采用超高效液相色谱仪与四极杆飞行时间串联质谱仪联用技术(UHPLC-Q-TOF/MS)对藜芦中化学成分进行分析鉴别。**方法** 应用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),以 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱,电喷雾离子源,正离子模式下采集数据。**结果** 共鉴别出藜芦药材中 32 个化学成分,通过比较碎片离子对其中的 3 对同分异构体进行了结构解析。**结论** 采用 UHPLC-Q-TOF/MS 方法能快速地在一图谱上表征出藜芦中的主要化学成分,为藜芦的药效物质基础及化学成分体内代谢与作用机制的深入研究奠定了基础。

[关键词] 藜芦;UHPLC-Q-TOF/MS;化学成分鉴别

[中图分类号] R 917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0536-04

UHPLC-Q-TOF/MS in rapid separation and identification of chemical components in *Veratrum nigrum* L.

ZHANG Bin, DONG Xin, LOU Zi-yang*

Department of Analysis and Testing Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To identify the chemical components in traditional Chinese herbal medicine *Veratrum nigrum* L. using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF/MS). **Methods** An Agilent Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used for isolation and identification of the chemical components in *Veratrum nigrum* L., with a mobile phase using 0.1% formic acid aqueous solvent (A) and ACN (B) for gradient elution. The data were collected by the positive ion mode using ESI ion source. **Results** Thirty-two chemical compounds were identified from *Veratrum nigrum* L.. The chemical structures of three pairs of steroidal alkaloid isomers were deduced by comparing their fragment ions. **Conclusion** Chromatographic characters of 32 chemical compounds in *Veratrum nigrum* L. can be achieved in single run by UHPLC-Q-TOF/MS, which paves a way for further studying the metabolism and action mechanism of *Veratrum nigrum* L.

[Key words] *Veratrum nigrum* L.; UHPLC-Q-TOF/MS; identification of constituents

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5): 536-539]

藜芦为百合科藜芦属,中医用藜芦的根及根茎入药的历史可追溯到《神农本草经》,通常认为藜芦有涌吐风痰、杀虫疗疮的功效,主要用于治疗高血压、中风、癫痫等疾病^[1]。然而,藜芦的治疗剂量和中毒剂量非常接近。西藜芦碱类是藜芦中种类最多、含量最高的一类甾体生物碱。

超高效液相色谱仪与四极杆飞行时间串联质谱仪联用技术(UHPLC-Q-TOF/MS)是一种新兴且发展比较迅速的液质联用技术,具有速度快、选择性强、检测限低、定性和定量能力强等优点,现已广泛用于中药及生物样品的分离分析。采用 UHPLC-Q-TOF/MS 方法可以在线获取分析样品中各化合物离子的精确质荷比和分子式,通过对比自建化学成分数

据库,可对中药复方中化学成分进行快速分析鉴别。

目前有文献报道采用离子阱技术鉴别藜芦中西藜芦碱类成分^[2-5],但尚未见应用 UHPLC-Q-TOF/MS 联用技术对藜芦药材提取液中化学成分进行分析的报道。本研究采用 UHPLC-Q-TOF/MS 联用技术对藜芦中各化学成分进行分析鉴别,为进一步研究其代谢和作用机制奠定基础。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 6538 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS; 十万分之一电子天平(梅特勒,美国);高速离心机(ABBORT,美国);上海淀久 DJ-04 药材粉碎机。

1.2 试剂 藜芦药材购于河北安国药材市场,经第

[收稿日期] 2012-03-01 [接受日期] 2012-04-23

[作者简介] 章 斌,硕士, E-mail: zhb.1211@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871335, E-mail: louziyang@126.com

二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定为百合科藜芦属藜芦(*Veratrum nigrum* L.)的根茎。乙腈、甲酸为色谱纯(Fisher,美国),实验用水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),柱温为40℃。流动相0.1%甲酸溶液(A)和乙腈(B),洗脱梯度如下:0~3 min,5%→15% B;3~6 min,15%→23% B;6~11 min,23% B;11~13 min,23%→35% B;13~16 min,35%→80% B;16~17 min,80%→90% B。流速为0.35 ml/min,进样量为2 μl。

2.2 质谱条件 采用电喷雾电离(ESI)离子源,在正离子模式下采集数据。数据采集范围m/z 100~1 100。离子源参数:毛细管电压4 000 V,雾化气压力344.75 MPa(50 psi),干燥气流速11 L/min(温度350℃),碎片电压150 V。

2.3 供试样品的配制 藜芦药材粉碎,过2号筛,精密称取粉末5 g,加入10倍量的水,浸泡30 min后煎煮,煮沸60 min提取煎液,3层纱布过滤取上清100 μl,加入900 μl甲醇,涡旋,经4 500×g离心5 min,取上清200 μl待测。

2.4 藜芦药材化学成分数据库的建立 根据藜芦

药材的化学成分研究文献,收集藜芦化学成分信息,通过Agilent提供的“formula-database-generator”软件建立藜芦中化学成分的分子式与理论相对分子质量数据库。

2.5 藜芦中成分 UHPLC-Q-TOF/MS 质谱分析 利用Q-TOF/MS获取的目标化合物的精确质量数与数据库中已知化合物的理论相对分子质量进行对比,确定潜在的目标物质,通过Analyst QS数据分析软件设置质谱测量误差(<5),可以计算出该质荷比所代表化合物可能的元素组成,并将此分子式的理论同位素分布与实测值比来验证推导结果。研究发现计算出来的理论值与实际值能很好地吻合。

从藜芦的Q-TOF/MS图谱中检测出了35个化合物,通过对比分子式与理论相对分子质量数据库对其中32个化合物进行了鉴定。藜芦中的化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS总离子流图如图1所示。所有目标化合物准分子离子的精确质量数误差都在5以内。藜芦中生物碱类化学成分的鉴别结果如表1所示。其中,编号为11、20和26;23和27;9、18和22的化合物是同分异构体,在正离子模式下,它们的MS/MS信息有所不同。结合文献资料^[5-7],推测各自的裂解规律,再根据正离子模式二级质谱碎片信息,对这三对同分异构体进行解析,推断出其可能的结构,结果如图2~4所示。

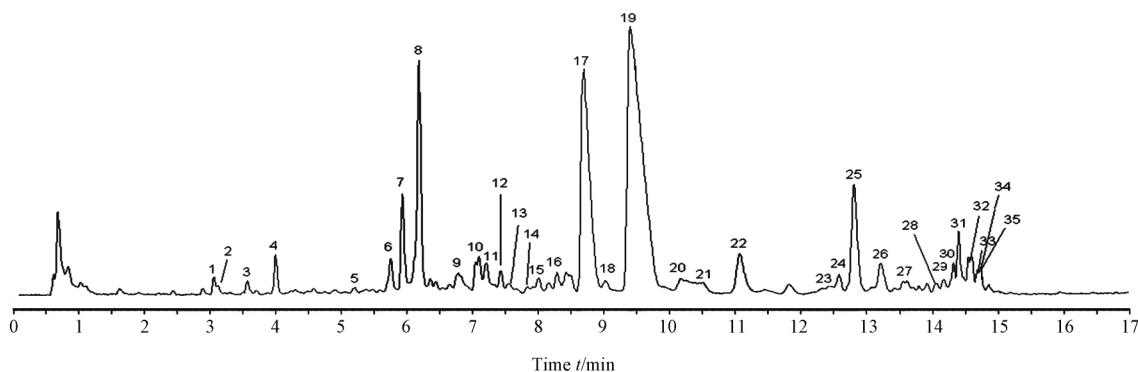


图1 藜芦中生物碱类成分的UHPLC-Q-TOF/MS总离子流图

Fig 1 Total ion chromatogram from UHPLC-Q-TOF/MS of alkaloids in *Veratrum nigrum* L.

3 讨论

3.1 化合物的确定 Q-TOF/MS是高分辨串联质谱,可以测得经UHPLC快速分离之后的化合物准确相对分子质量。利用Q-TOF/MS确定精确相对分子质量以及可能分子式之后,为进一步验证这些色谱峰对应的化合物,在相同条件下做了质谱的碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)实验,即可通过MS/MS状态下,二级质谱选取目标

离子送入碰撞活化室,与惰性气体发生CID后,到达飞行时间质谱的加速器中,在推斥极的作用下,进行质量分离,从而实现母离子和碎片离子的精确相对分子质量测定^[8]。根据碎片的精确相对分子质量和参考文献的信息,可得到32个化学成分。从藜芦总离子流图可以看出,有一些响应较好的色谱峰其质量数未能在已有数据库中找到,证明藜芦中还有一些未知成分,有待进一步研究。

表 1 藜芦中各化学成分的 Q-TOF/MS 质谱分析结果(正离子)

Tab 1 Q-TOF/MS analysis result for chemical contents in *Veratrum nigrum* L. (positive ions)

No.	Retention time t/min	Name	Formula	M+X	Expected m/z	Experimental m/z	Error
1	3.060	Protoverine	C ₂₇ H ₄₃ NO ₉	M+H	526.3016	526.3010	-0.70
2	3.126	Germine	C ₂₇ H ₄₃ NO ₈	M+H	510.3067	510.3057	-0.64
3	3.576	Zygadenine	C ₂₇ H ₄₃ NO ₇	M+H	494.3118	494.3110	-1.50
4	4.001	Verdine	C ₂₇ H ₄₁ NO ₅	M+H	460.3063	460.3059	-2.46
5	5.170	Germinalinine	C ₃₉ H ₅₉ NO ₁₃	M+H	750.4065	750.4063	-0.51
6	5.759	-	C ₂₇ H ₃₉ NO ₄	M+H	442.2957	442.2967	-2.77
7	5.930	Pseudojervine	C ₃₃ H ₄₉ NO ₈	M+H	588.3536	588.3547	-2.74
8	6.184	Veratrosine	C ₃₃ H ₄₉ NO ₇	M+H	572.3587	572.3578	-3.80
9	6.789	3-Veratroylgermine	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₁	M+H	674.3540	674.3533	-0.82
10	7.100	Veratroylzygadenine	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₀	M+H	658.3591	658.3582	-3.03
11	7.198	Veralosidine	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	M+H	414.3372	414.3367	-1.97
12	7.427	Germidine	C ₃₄ H ₅₃ NO ₁₀	M+H	636.3748	636.3735	-3.58
13	7.525	Zygacine	C ₃₀ H ₄₇ NO ₈	M+H	550.3380	550.3364	-0.84
14	7.950	Veralosine	C ₃₅ H ₅₅ NO ₈	M+H	618.4006	618.4004	-1.89
15	7.999	-	C ₂₉ H ₄₅ NO ₄	M+H	472.3427	472.3430	-0.78
16	8.285	-	C ₃₅ H ₅₁ NO ₈	M+H	614.3693	614.3703	-1.34
17	8.694	Jervine	C ₂₇ H ₃₉ NO ₃	M+H	426.3008	426.3013	-4.63
18	9.144	Stenophylline A	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₁	M+H	674.3540	674.3526	-0.27
19	9.414	Veratramine	C ₂₇ H ₃₉ NO ₂	M+H	410.3059	410.3068	-4.61
20	10.166	Isorubijervine	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	M+H	414.3372	414.3377	-2.15
21	10.517	Veralomine	C ₃₃ H ₅₃ NO ₆	M+H	560.3951	560.3953	-0.79
22	11.319	Veratridine	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₁	M+H	674.3540	674.3533	-1.32
23	12.439	Cyclopamine	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	M+H	412.3216	412.3216	-1.98
24	12.578	Cevadine	C ₃₂ H ₄₉ NO ₉	M+H	592.3486	592.3484	-0.47
25	12.807	Angeloylzygadenine	C ₃₂ H ₄₉ NO ₈	M+H	576.3536	576.3533	-3.81
26	13.248	Rubijervine	C ₂₇ H ₄₃ NO ₂	M+H	414.3372	414.3374	-1.46
27	13.633	Veralobine	C ₂₇ H ₄₁ NO ₂	M+H	412.3216	412.3212	-0.60
28	14.042	7-Deacetylprotoveratrine A	C ₃₉ H ₆₁ NO ₁₃	M+Na	774.4041	774.4070	-4.42
29	14.164	(+)Verbenzamine	C ₄₁ H ₅₉ NO ₁₂	M+H	758.4116	758.4097	-0.61
30	14.328	Muldamine	C ₂₉ H ₄₇ NO ₃	M+H	458.3634	458.3626	-2.25
31	14.393	Verazine	C ₂₇ H ₄₃ NO	M+H	398.3423	398.3421	-2.09
32	14.598	(+)Verussurine	C ₄₃ H ₆₁ NO ₁₃	M+H	800.4221	800.4206	-2.23
33	14.679	Maackinine	C ₃₉ H ₅₇ NO ₁₁	M+H	716.4010	716.3995	-1.30
34	14.720	Germanitrine	C ₃₉ H ₅₉ NO ₁₁	M+H	718.4166	718.4155	-0.64
35	14.737	Protoveratrine A	C ₄₁ H ₆₃ NO ₁₄	M+Na	816.4146	816.4167	-4.47

3.2 同分异构体的鉴定 实验中发现藜芦中含有大量的同分异构体,仅根据飞行时间质谱的碎片电压功能并不能达到明确辨析,因此,对同分异构体的二级质谱进行研究,这也正是 Q-TOF/MS 在定性分析方面的优势所在。

藜芦药材中的甾体生物碱在 ESI 正离子模式下形成准分子离子峰 [M+H]⁺ 或离子加合物 [M+Na]⁺, 可确定其相对分子质量, 根据一级质谱的准分子离子峰得到精确相对分子质量计算出其元素组成, 与相关化合物精确分子质量比较确定其分子式。有文献报道藜芦中西藜芦碱类的质谱数据和裂解规律^[5-7], 本研究首次通过 UHPLC-Q-TOF/MS 技术, 根据精确元素分析和二级质谱信息, 结合相关文献鉴定出藜芦中的甾体生物碱类成分, 并解析其同分异构体。以 m/z 412 为例, 编号 23 和 27 的化合物

相对分子质量均是 412, 而其中 cyclopamine 的结构式中含有四氢呋喃环, 有四氢呋喃环者有特征离子 m/z 125、124 和 110^[6], 质谱裂解规律如图 2。根据二级质谱碎片信息, 可以判断 12.439 min 出峰的为 cyclopamine, 13.633 min 出峰的则是 veralobine。以 m/z 674 为例, 编号 9、18 和 22 的化合物相对分子质量均是 674, 而其中 stenophylline A 的质谱裂解规律可参照文献^[3]得到(图 3), 根据二级质谱碎片信息推断 9.144 min 出峰的是 stenophylline A; 其中 veratridine 的一级质谱存在碎片离子 m/z 660, 推测可能为 veratridine 的去甲氧基产物, 结合二级质谱碎片信息推断 11.319 min 出峰的是 veratridine。以 m/z 414 为例, 编号 11、22 和 26 的化合物相对分子质量均是 414, 其中 veralosidine 的结构式明显区别于 isorubijervine 和 rubijervine(图 5),

结合二级质谱碎片信息 m/z 98 推断 7.198 min 出峰的是 veralosidine(图4),而 isorubijervine 和 rubijervine 的结构式非常相似,二级质谱获得碎片图谱也十分相似,暂时无法通过 Q-TOF/MS 进行区分,需借助其他手段进一步研究。

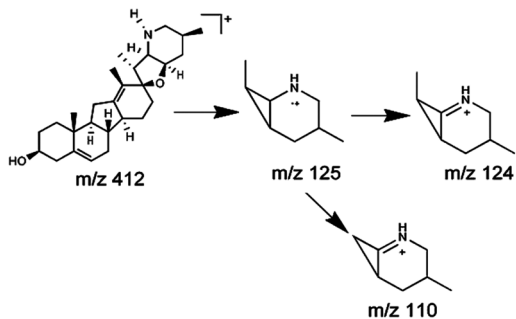


图2 化合物 cyclopamine 可能的裂解规律

Fig 2 The proposed fragmentation pathway of cyclopamine

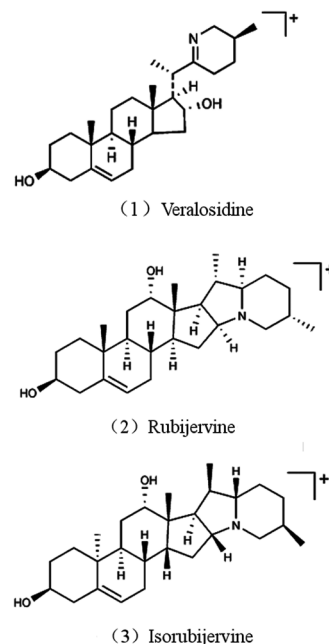


图5 相对分子质量均为 414 的三个化合物的结构式

Fig 5 Chemical structure of 3 compounds with m/z of 414

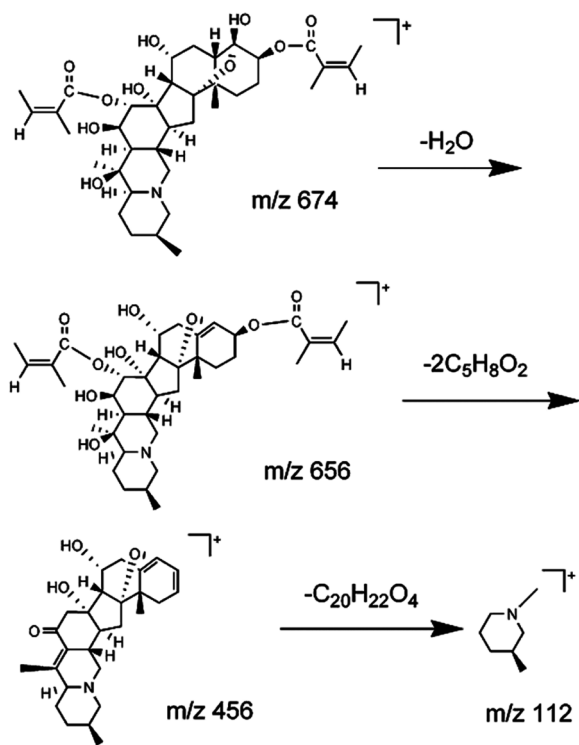


图3 化合物 stenophylline A 可能的裂解规律

Fig 3 The proposed fragmentation pathway of stenophylline A

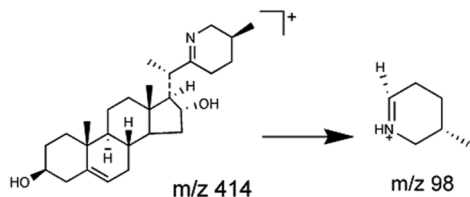


图4 化合物 veralosidine 可能的裂解规律

Fig 4 The proposed fragmentation pathway of veralosidine

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 林娜,高晓山. 藜芦反“诸参”考[J]. 中国中药杂志,1989,14: 48-50.
- [2] Li H, Gao G Y, Li S Y, Zhao W J, Guo Y T, Liang Z J. Effects of *Veratrum nigrum* alkaloids on central catecholaminergic neurons of renal hypertensive rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21: 23-28.
- [3] 王隶书,赵大庆,陶华明,刘永宏. 藜芦中藜芦胺的 HPLC-ELSD 测定方法研究 [J]. 中国中药杂志,2008,33: 791-792.
- [4] 潘浪胜,吕秀阳,吴平东. 反相高效液相色谱法测定藜芦混碱中藜芦定的含量[J]. 分析化学实验室,2003,22(增刊): 117-119.
- [5] Li H L, Tang J, Liu R H, Lin M, Wang B, Lu Y F, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in the Chinese herb *Veratrum nigrum* L. by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multi-stage mass spectrometry[J]. *RCM*, 2007, 21: 869-879.
- [6] 丛浦珠,李笋玉. 天然有机质谱学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 514-540, 536-537.
- [7] Zhou J L, Xin G Z, Shi Z Q, Ren M T, Qi L W, Li H J, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 7109-7122.
- [8] Van Boclaer J F, Vande Cas teele S R, Van Poucke C J, Van Peteghem C H. Confirmation of the identity of residues using time-of-flight mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 529(1-2): 65-73.

[本文编辑] 尹 茶