

电喷雾萃取电离质谱法分析莲子中的生物碱

方菲菲¹, 杜尚广¹, 戴喜未¹, 郭夏丽¹, 陈焕文², 罗丽萍¹

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 生命科学与食品工程学院, 南昌 330047;

2. 东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室, 南昌 330013)

摘要 在无需样品预处理的前提下, 直接对莲子醇提液进行电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)检测, 并对其中可能存在的生物碱母离子进行串联质谱分析确认, 通过主成分分析(PCA)对不同贮藏时间莲子的醇提液进行区分. 研究表明, 电离电压、离子传输管温度和样品进样流速的最佳条件分别为 3.5 kV, 250 °C 和 5 $\mu\text{L}/\text{min}$; 串联质谱结果表明莲子醇提液中存在莲心碱、甲基莲心碱、莲心季铵碱、荷叶碱及 *O*-去甲基荷叶碱等生物碱. PCA 可将不同贮藏时间的莲子明显区分在二维平面的不同区域. 本方法无需样品预处理, 可用于复杂基体样品中生物碱的快速鉴定, 与化学计量学结合可对不同新陈度的莲子样品进行有效区分.

关键词 电喷雾萃取电离质谱; 莲子; 主成分分析; 生物碱

中图分类号 O657

文献标志码 A

莲子是莲的种子, 含有丰富的多糖、磷脂、生物碱和类黄酮等营养保健成分, 是一种食疗佳品及著名的药食同源食物. 生物碱为莲的主要生物活性成分, 在莲的各部位均可检测到. 传统的生物碱鉴定方法是化学降解法, 近年来已应用光谱、色谱、质谱和核磁分析等现代分析手段来鉴定生物碱的结构. 王嘉陵等^[1]从莲心中分离出莲心碱、异莲心碱、甲基莲心碱、前荷叶碱、荷叶碱和莲心季铵碱等; Luo 等^[2]采用高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-DAD)从莲叶中鉴定出多种生物碱. 目前, 莲心生物碱已被用于临床制剂^[3-5]. 然而, 基于直接质谱分析对莲生物碱进行快速分析及鉴定目前鲜见报道^[6]. 电喷雾萃取电离(EESI)技术是一种新兴的离子化技术, 可在无需样品预处理的条件下对复杂基体样品进行直接质谱分析, 可用于分析液体、气溶胶、固体表面和黏性样品等不同形态的样品^[7]. 潘素素等^[8]分析了马尾松根际土壤溶液中的尿素衍生物; Zhou 等^[9]采用 EESI 技术建立了尿液中阿特拉津及其代谢产物的快速分析方法; 许柠等^[10]采用 EESI-MS 快速标靶分析氨基酸, 将 EESI 和 LTQ-XL 质谱仪耦合, 在无需样品预处理情况下, 建立了多种不同极性氨基酸的快速检测方法. 本文利用 EESI-MS 技术, 对不同贮藏时间莲子中的生物碱进行了直接质谱分析, 对其中的 5 种生物碱进行确认; 基于正离子模式下获得的 EESI-MS 指纹谱图的差异, 采用主成分分析法(PCA)实现了对不同贮藏时间莲子的快速甄别. 本方法分析速度快、信息提取准确且识别精度高, 对不同贮藏时间的莲子样品质谱数据具有较好的识别效果, 为生物碱的直接快速分析提供了参考.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

EESI 电离源(东华理工大学研制)^[11,12]; LTQ-XL 为线性离子阱质谱仪和 Xcalibur 型数据处理系统(美国 Finnigan 公司); 乙醇(分析纯, 上海化工试剂有限公司).

莲子品种为太空莲 3 号, 均为去除胚芽(莲心)的通心莲子, 由江西省广昌县白莲科学研究所所提供. 当年新鲜莲子为 2012 年 8 月收获, 贮藏的陈年莲子分别于 2011, 2010 和 2009 年 8 月收获, 均产

收稿日期: 2013-11-20.

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题项目(批准号: 2012BDA29B01)、江西省主要学科学术和技术带头人培养对象项目(批准号: 20123BCB22004)和江西省高等学校科技落地计划项目(批准号: KJLD12051)资助.

联系人简介: 罗丽萍, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物代谢产物的研究. E-mail: lluo2@126.com

陈焕文, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事有机质谱分析和仪器的研究. E-mail: chw8868@gmail.com

于广昌县同一种植基地,去种皮、胚芽,烘干后真空包装,避光室温 $[(23\pm 2)^\circ\text{C}]$ 下保存。

1.2 莲子醇溶液的制备

分别将4年收获的莲子粉碎,过80目筛,称取莲子粉末0.01 g于1.5 mL离心管中,加入1 mL 80% (体积分数)的乙醇溶液,超声提取10 min,以4000 r/min 转速离心5 min,取上清液直接进行质谱检测,每种样品平行测试6次。

1.3 EESI-MS 实验参数

线性离子阱质谱(LTQ-MS)在正离子检测模式下工作,质谱扫描范围 m/z 50~1000;电离电压3.0 kV;离子传输管温度 250°C ;ESI溶剂为甲醇;雾化气为氮气(纯度99.999%),压力为1.2 MPa;EESI溶剂和样品溶液流速分别为3和5 $\mu\text{L}/\text{min}$;2个毛细管喷雾口之间的距离 $a=1$ mm,夹角为 60° ,到质谱进样口的距离为5 mm,角度为 150° ;在进行串联质谱分析时,母离子的隔离窗口宽度设定为1.5 Da,碰撞时间为30 ms,碰撞能量为17%~25%,其它参数由LTQ-MS软件系统自动优化。

1.4 主成分分析

利用7.0版Matlab软件(美国Mathworks公司)对4个年份的莲子(每年各取60个样本,共240个)进行PCA分析,通过计算特征值、特征向量及累计贡献率,获得少数几个主成分,尽可能完整地保留原始变量的信息,且彼此间不相关,达到简化数据的目的。

2 结果与讨论

2.1 EESI-MS 质谱条件的优化

莲子生物碱具有比较相似的性质,实验选择甲基莲心碱 m/z 625作为目标信号物质,对电离电压、离子传输管和样品进样速率等EESI-MS质谱条件进行优化。

2.1.1 离子源电压的优化 在实验所用离子源中,带电的喷雾溶剂与样品喷雾在离子传输管空间内碰撞,样品中的目标分子被带电喷雾溶剂萃取,进行电荷传递,样品目标分子形成带电离子在检测器中被检测,因此离子源电压对样品目标分子的电离效率有直接影响,对质谱信号的强弱起关键作用。实验考察了离子管温度为 250°C ,样品流速为 $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 时,不同离子源电压对 m/z 625信号强度的影响(如图1所示),可见,电压为3.5 kV时, m/z 625信号强度较大;电压低于3.5 kV时,因为带电初级离子数目较少,难以使生物碱电离;而电压大于3.5 kV时, m/z 625信号有所下降,其原因可能是高喷雾电压加大了对其它杂质的电离,使目标分析物 m/z 625的信号受到干扰,因此选择3.5 kV作为离子源电压。

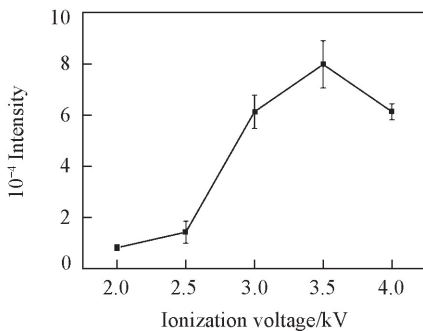


Fig. 1 Effect of ionization voltage on the signal intensity of m/z 625

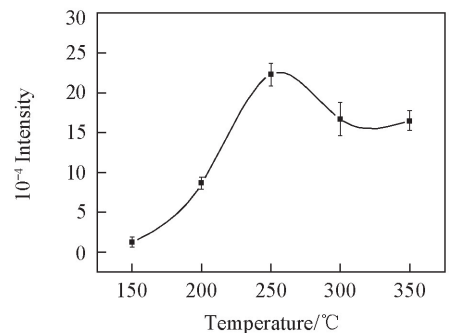


Fig. 2 Effect of ion tube temperature on the signal intensity of m/z 625

2.1.2 离子传输管温度的优化 在电离电压为3.5 kV,样品流速为 $0.5 \mu\text{L}/\text{min}$ 条件下,离子传输管温度优化结果(图2)表明,当离子传输管温度低于 250°C 时, m/z 625的信号强度随着温度的上升而增大,说明在 250°C 以下,升高温度不仅可去除小液滴中的溶剂,还可加快样品中目标分子的运动,获得更多的电离电荷,导致信号强度增大;在 250°C 以上时, m/z 625的信号强度下降,这可能是由于温度升高导致生物碱分解,或是反应环境的温度较高,生物碱在溶剂喷雾碰撞过程中挥发并扩散到外界环境中,造成目标信号的下降。故选择离子传输管温度为 250°C 。

2.1.3 样品进样速率的优化 实验中样品在高压气流(N_2)作用下形成喷雾,在电离电压为 3.5 kV,离子管温度为 250 °C 的条件下,考察了电喷雾溶剂流速为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,样品进样速率对质谱信号的影响(见图 3). 结果表明,样品的最佳速率为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$; 速率较低时,目标物质进入质谱的量相应减少,使信号强度降低;而进样速率大于 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时,可能是因为氮气压力一定的情况下,样品溶液不易雾化而影响电离效果, m/z 625 的信号强度下降. 因此选择样品进样速率为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

经过优化,确定了质谱和离子源的条件为:离子源电压为 3.5 kV,离子传输管温度为 250 °C,样品进样速率为 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. 其它参数设置为默认值.

2.2 莲子醇提物的 EESI-MS 离子流图

在优化的实验条件下获得了莲子醇提物的 EESI-MS 谱图(图 4), m/z 611, 625, 314, 282 和 296 为总离子流(TIC)中的选择离子. 由图 4 可见,选择的离子流与总离子流图的走势一致,离子的丰度随着进样而明显增强,说明样品中存在该质量分数的物质. 与文献[13~15]对比发现,选择的 5 种离子流的质荷比分别与质子化的莲心碱(异莲心碱)、甲基莲心碱、*O*-去甲基荷叶碱、莲心季铵碱和荷叶碱的质荷比相同,为了确认该系列离子是否为莲子的生物碱,进一步通过串联质谱分析进行验证.

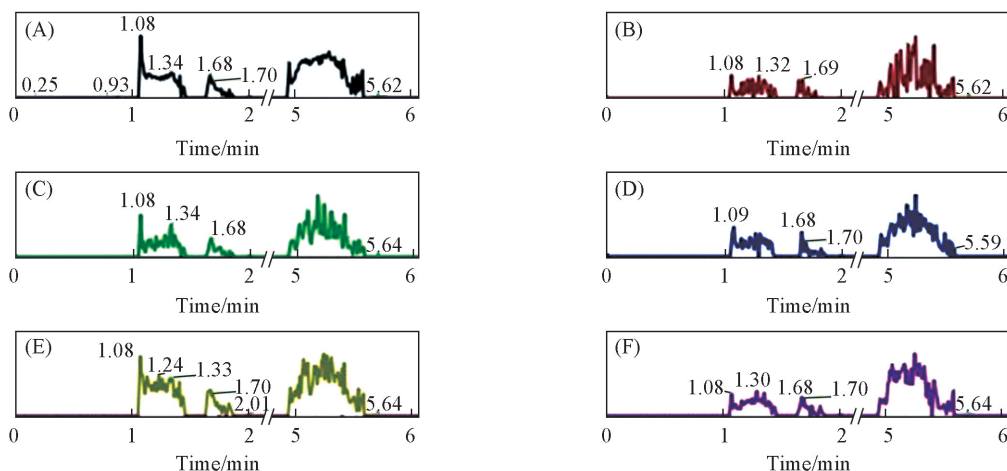


Fig. 4 Total ion chromatogram (TIC) (A) and selected ion diagrams of m/z 611 (B), m/z 625 (C), m/z 314 (D), m/z 282 (E) and m/z 296 (F)

2.3 莲子醇提液的 EESI-MS 串联质谱分析

选择 m/z 611 进行碰撞诱导解离(CID)实验,获得二级质谱图[图 5(A)],其中 m/z 593, 579, 503 和 489 等离子峰是母体离子分别丢失 H_2O , CH_3OH , $CH_3-C_6H_5O$ 和 $CH_3-CH_2-C_6H_5O$ 基团所致,这与文献[5]报道的莲心碱二级质谱碎片一致,故可确认 m/z 611 是质子化莲心碱分子的信号. 另外,在二级质谱上还有一定丰度的 m/z 192 的碎片离子峰,而 m/z 192 是莲心碱的同分异构体异莲心碱二级质谱的特征碎片^[5],因此莲子醇提取液中可能含有一定量的异莲心碱,但其信号强度要小于莲心碱的特征碎片强度. 因而,在莲子醇提取液 m/z 611 的物质中,莲心碱占有较大比例. 不同贮藏时间莲子样品的 m/z 611 二级质谱图中都含有图 5(A)中所示的各种特征离子峰. m/z 625 离子的二级质谱[图 5(B)]中出现了 m/z 607, 593, 580, 489, 297 和 206 等离子碎片,其中 m/z 607, 593, 580 和 489 主要由 m/z 625 分别丢失 1 个 H_2O , CH_3OH , C_2H_5O 和 $CH_3-CH_2-CH_2-C_6H_5O$ 形成,对比文献[5]可以确认 m/z 625 为甲基莲心碱. 甲基莲心碱 m/z 625 的碎片特征与莲心碱 m/z 611 较相似,其原因是甲基莲心碱仅在莲心碱羟基位点($-OH$)替换成了甲基($-CH_3$),相似的结构决定了两者相似的离子断

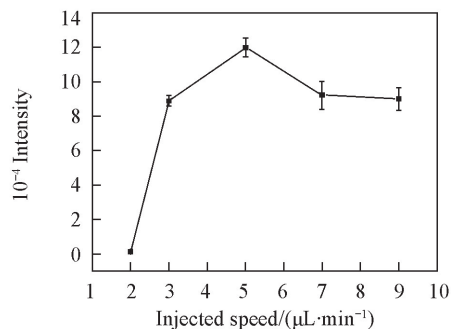


Fig. 3 Effect of sample injected speed on the signal intensity of m/z 625

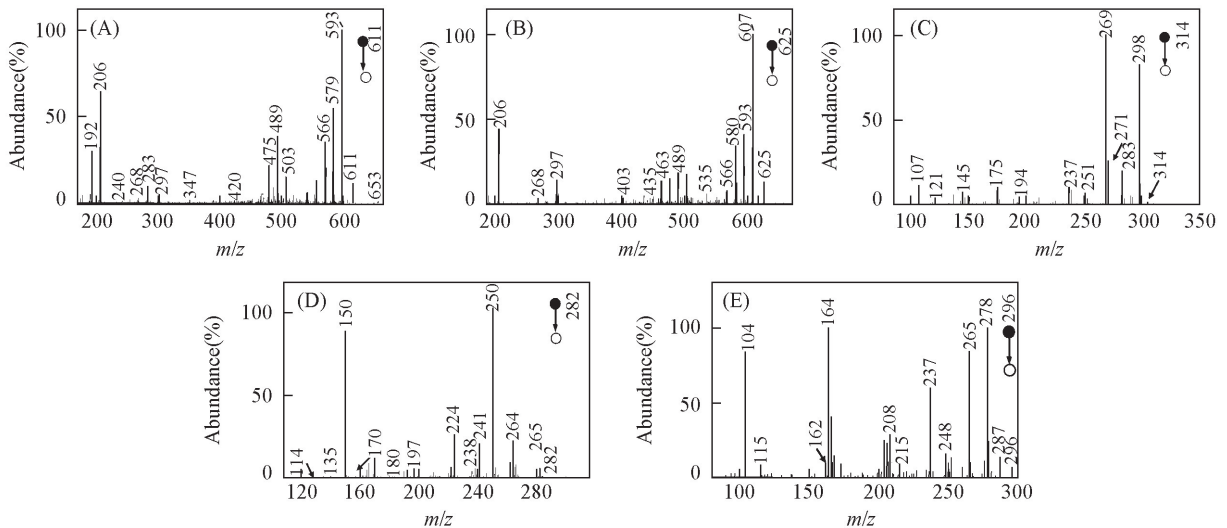


Fig. 5 MS/MS spectra (A—E) of five alkaloids in ethanol extract of lotus seeds

(A) Liensinine m/z 611; (B) neferine m/z 625; (C) lotusine m/z 314; (D) *O*-demethylation m/z 282; (E) nuciferine m/z 296.

裂方式. 母体离子 m/z 314 的二级质谱图[图 5(C)]中最主要的碎片离子峰为 m/z 269($M-45$)⁺, 由母离子丢失 1 个 H_2O 形成的 m/z 298 含量也较高; 此外, m/z 107 和 251 与电子轰击质谱(EI-MS)碎片离子及 NMR 结果一致^[15], 因此, 推断 m/z 314 为莲心季铵碱. 母体离子 m/z 282 的二级质谱图[图 5(D)]表明, 特征碎片离子 m/z 264 和 250 分别是母体离子丢失 H_2O 和 CH_3OH 基团所形成的, 根据文献^[11]由 HPLC-MS 对荷叶中生物碱的鉴定, 可以推断母体离子主要为 *O*-去甲基荷叶碱. 母体离子 m/z 296 的二级质谱图[图 5(E)]中有较强的离子特征碎片为 m/z 265 和 104, 相似的离子断裂方式已经在荷叶中荷叶碱的检测中得到验证^[13], 因此推断 m/z 296 为荷叶碱. 5 种生物碱的结构如图 6 所示. 以上结果表明, 通心莲子中生物碱种类丰富, 不仅含有莲心中的莲心碱、甲基莲心碱及莲心季铵碱, 还含有在荷叶中较常见的荷叶碱及 *O*-去甲基荷叶碱等. 丰富的生物碱组成是莲子作为药用食物的重要因素.

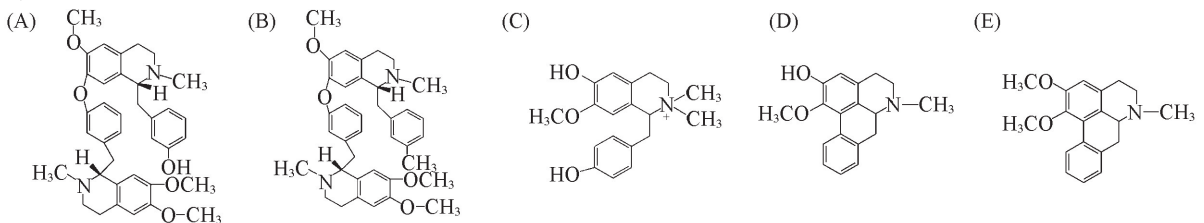


Fig. 6 Structures of five alkaloids in ethanol extract of lotus seeds

(A) Liensinine m/z 611; (B) neferine m/z 625; (C) lotusine m/z 314; (D) *O*-demethylation m/z 282; (E) nuciferine m/z 296.

2.4 不同贮藏时间的莲子生物碱组成的差异

对不同贮藏时间莲子的醇提取液进行 EESI-MS 分析发现, 莲子醇提液中 5 种生物碱含量依次为: *O*-去甲基荷叶碱 < 莲心碱 < 甲基莲心碱 < 莲心季铵碱 < 荷叶碱. 各种生物碱的质谱信号在不同年份的样品中存在差异, 表明不同陈化度莲子的生物碱含量不同. 图 7 分别为 2009 ~ 2012 年莲子中 m/z 611, 625, 282, 314 和 296 等 5 种离子峰的强度变化趋势图, 在一定程度上表示了莲心碱、甲基莲心碱、莲心季铵碱、*O*-去甲基荷叶碱和荷叶碱的含量变化. 由图 7 可见, 莲心碱、甲基莲心碱和 *O*-去甲基荷叶碱在储藏过程中信号强度变化较小; 莲心季铵

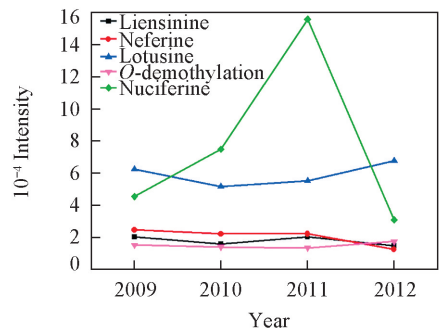


Fig. 7 Signal intensity changes of five alkaloids in the ethanol extracts from lotus seeds with different storage time

碱的信号强度随储藏时间延长先下降后上升；荷叶碱信号强度差异较大，先上升后下降。

2.5 不同贮藏时间的莲子醇提物 EESI-MS 谱图的 PCA 分析

将 4 个年份的莲子共 32 个样本(每个年份 8 个样品)在正离子模式下所获得的 EESI-MS 指纹谱图信息导入 Matlab 中进行 PCA 数据处理与分析,分别得到二维的 PCA 得分结果.由 PCA 的二维平面图[图 8(A)]可见,4 种莲子被明显区分;由图 8(B)可见,能用于区分不同年份莲子的物质较多,主要为 m/z 705 和 176 等在莲子中含量较多的物质.为了验证生物碱的质谱特征信息对不同年份莲子的区分有无贡献,对 m/z 611, 625, 282, 314 和 296 等生物碱质谱特征信息再次进行 PCA 分析,结果如图 8(C, D)所示.由图 8(C)可见,通过对生物碱信息进行 PCA 分析,不同年份的莲子被明显区分,区分效果贡献率最大的为 m/z 314.

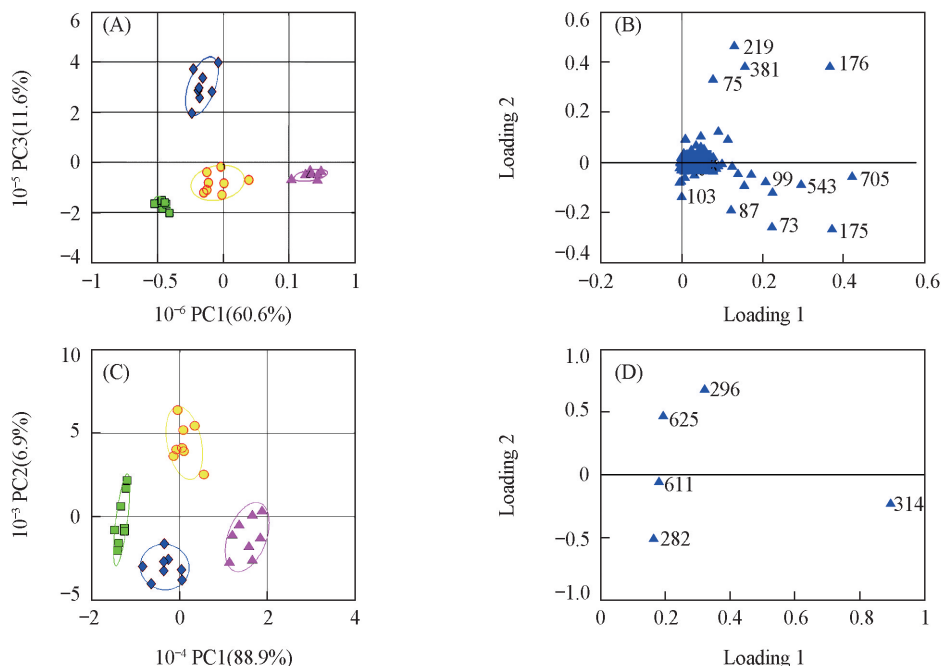


Fig. 8 2D plot of PCA score results for the ethanol extract from lotus seeds with different storage time by EESI-MS(A), loading 1 vs. loading 2 plot (B), 2D plot of PCA score results for m/z 611, 625, 314, 282 and 296 (C) and loading 1 vs. loading 2 plot (D)

▲ 2009; ■ 2010; ● 2011; ◆ 2012.

综上所述,在优化条件下对未经样品预处理的莲子醇提液进行了 EESI-MS 分析.结果表明,通心莲子中含有莲心碱、甲基莲心碱、*O*-去甲基荷叶碱、莲心季铵碱和荷叶碱等生物碱.不同贮藏时间的莲子生物碱的信号强度变化趋势表明,莲心碱和甲基莲心碱含量较稳定,而荷叶碱的含量变化较大,且先上升后下降,可能在储存初期逐步积累,然后随着莲子的陈化逐步降解.采用 PCA 分析不同贮藏时间莲子醇提液的 EESI-MS 谱图发现,莲子在贮藏过程中醇提液部分物质发生显著变化,不同年份的莲子可被明显区分在 PCA 二维平面图的不同区域.本文首次采用 EESI-MS 对通心莲子样品中的生物碱进行多级串联质谱鉴定,该方法快速、准确且无需复杂的样品预处理,不仅可用于复杂基体样品中生物碱的快速鉴定,结合化学计量学还可对不同陈化度的莲子样品进行有效区分.

参 考 文 献

- [1] Wang J. L., Hu X. M., Yin W. H., Cai H. S., *Journal of Chinese Medicinal Materials*, **1991**, 14(6), 36—38(王嘉陵, 胡学民, 尹武华, 蔡鸿生. 中药材, **1991**, 14(6), 36—38)
- [2] Luo X. B., Chen B., Liu J. J., Yao S. Z., *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 538(1), 129—133
- [3] Chen W. Z., Ling X. Z., Ding G. S., *Acta Pharmaceutica Sinica*, **1962**, 9, 277—279(陈维洲, 凌秀珍, 丁光生. 药学报, **1962**, 9, 277—279)
- [4] Pan Y., Cai B. C., Yang G. M., Cao L., Shen A. Q., *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine*, **2005**, 21(4),

- 243—244(潘扬,蔡宝昌,杨光明,曹亮,沈爱琴. 南京中医药大学学报, **2005**, 21(4), 243—244)
- [5] Wu S. H. , Sun C. R. , Cao X. J. , Zhou H. , Hong Z. , Pan Y. J. , *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1041(1), 153—162
- [6] Luo L. P. , Zhao Z. F. , Dai X. M. , Zhang X. , Liu Y. L. , Zhang X. L. , Zhang W. J. , Ouyang Y. Z. , *Trans. Chin. Soc. Agri. Engi.*, **2013**, 29(7), 261—266(罗丽萍, 赵占锋, 戴喜未, 张茜, 刘亚丽, 张兴磊, 章文军, 欧阳永中. 农业工程学报, **2013**, 29(7), 261—266)
- [7] Jia B. , Zhang X. L. , Ding J. H. , Yang S. P. , Chen H. W. , *Chin. Sci. Bull.*, **2012**, 57, 1918—1927(贾滨, 张兴磊, 丁健桦, 杨水平, 陈焕文. 科学通报, **2012**, 57, 1918—1927)
- [8] Pang S. S. , Zhao N. , Ouyang Y. Z. , Huang K. K. , Ding J. H. , Chen H. W. , Yuan L. , Wang X. X. , *Chem. J. Chinese Universities*, **2013**, 34(6), 1379—1384(潘素素, 赵娜, 欧阳永中, 黄科科, 丁健桦, 陈焕文, 袁龙, 王兴祥. 高等学校化学学报, **2013**, 34(6), 1379—1384)
- [9] Zhou Z. Q. , Jin M. , Ding J. H. , Zhou Y. M. , Zheng J. , Chen H. W. , *Metabolomics*, **2007**, 3(2), 101—104
- [10] Xu N. , Zhu Z. Q. , Yang S. P. , Wang J. , Gu H. W. , Zhou Z. , Chen H. W. , *Chin. J. Anal. Chem.*, **2013**, 4, 523—528(许柠, 朱志强, 杨水平, 王姜, 顾海巍, 周振, 陈焕文. 分析化学, **2013**, 4, 523—528)
- [11] Chen H. , Zenobi R. , *Nature Protocols*, **2008**, 3(9), 1467—1475
- [12] Zhu L. , Hu Z. , Gamez G. , Law W. S. , Chen H. W. , Yang S. P. , Chingin K. , Balabin R. , Wang R. , Zhang T. T. , Zenobi R. , *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398(1), 405—413
- [13] Kunitomo J. , *Journal of Pharmacy(Japanese)*, **1964**, 84(11), 1141—1142(国友顺一. 药学杂志(日), **1964**, 84(11), 1141—1142)
- [14] Kunitomo J. , Yoshikawa Y. , Tanaka S. , Imori Y. , Isoi K. , *Phytochem.*, **1973**, 12(3), 699—701
- [15] Pan Y. , Yang G. M. , Cai B. C. , Ding G. , *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **2004**, 35(5), 501—503(潘扬, 杨光明, 蔡宝昌, 丁岗. 中草药, **2004**, 35(5), 501—503)

Rapid Analysis Alkaloids in Lotus Seeds by Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry[†]

FANG Feifei¹, DU Shangguang¹, DAI Ximo¹, GUO Xiali¹, CHEN Huanwen^{2*}, LUO Liping^{1*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract To identify alkaloids in lotus seeds rapidly and to distinguish fresh and aged lotus seeds, using self-developed extractive electrospray ionization source, ethanol extracts of lotus seeds were directly analyzed by mass spectrometry without any sample pretreatment. The MS were further analyzed using principal component analysis(PCA). The results showed that optimum conditions of ionization voltage, capillary temperature and sample flow rate were 3.5 kV, 250 °C, and 5 μL/min, respectively. Liensinine, neferine, lotusine, nuciferine and *O*-demethylation nuciferine were found in the ethanol extracts by tandem mass spectrometry, of which signal intensities showed special change trends. Lotus seeds of different storage time and aging degree were clearly distinguishable from each other by PCA. This method is of high sensitivity and high analytical speed, without complex sample pretreatment. The method in this paper is fast and effective to identify alkaloids in real samples with complicated matrix, and combined with chemometrics, it is also used to distinguish fresh and aged lotus seeds.

Keywords Extractive electrospray ionization mass spectrometry; Lotus seed; Principal component analysis; Alkaloid

(Ed.: I, K)

[†] Supported by the “Twelve Five” Issues in Rural Areas of National Science and Technology Plan Project, China(No. 2012BDA29B01), the Jiangxi Major Disciplines of Academic and Technical Leader of Cultivation Project, China(No. 20123BCB22004) and the Floor Plan of Scientific and Technological Projects in Jiangxi Province, China(No. KJLD12051).