

固相萃取 – 气质联用结合同位素峰形校正检索技术 分析钩吻中的钩吻碱和钩吻碱子

罗达龙

(广西梧州食品药品检验所, 梧州 543002)

摘要 目的: 建立固相萃取 – 气质联用并结合同位素峰形检索技术 (SPE-GC/MS-CLIPS) 分析钩吻中的钩吻碱和钩吻碱子的方法。**方法:** 样品采用 1% 盐酸超声提取, 经 PCX 固相萃取小柱净化, 再用氯化甲醇进行洗脱, 洗脱液浓缩后用丙酮定容。供试液通过气相色谱质谱联用仪结合毛细管柱 (HP-5MS 0.25 mm × 30 m × 0.25 μm), 用全扫描模式 (m/z 40~500) 采集数据后, 利用同位素 -C 峰形检索技术对目标峰进行校正分析。**结果:** 根据钩吻植物的生物碱提取物所得到的质谱谱图, 通过与 NIST 标准库的匹配与同位素峰形检索技术推算的分子式, 确定了钩吻中的钩吻碱和钩吻碱子。该方法成功应用于钩吻中毒司法鉴定案例 2 例, 共 10 批样品。**结论:** 固相萃取 – 气质联用结合同位素峰形校正检索技术可以准确分析钩吻中的钩吻碱和钩吻碱子, 能应用于钩吻的植物鉴定和钩吻中毒司法鉴定工作。

关键词: 固相萃取; 气质联用; 同位素峰形校正检索技术; 钩吻中毒鉴定; 钩吻碱和钩吻碱子; 阳离子交换; 植物鉴定; 司法鉴定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2016) 01-0000-00

doi: 10.16155/j.0254-1793.2016

Analysis of gelsemine and koumine in *Gelsemium elegans* by SPE-GC/MS-CLIPS

LUO Da-long

(Wuzhou Institutes for Food and Drug Control, Wuzhou 543002, China)

Abstract Objective: To establish a method for the analysis of gelsemine and koumine in *Gelsemium elegans* by solid phase extraction (SPE) – gas chromatography – mass spectrometry (GC/MS) – calibrated lineshape isotope profile search (CLIPS). **Methods:** The crude sample was extracted by 1% hydrochloric acid with ultrasound-assisted extraction, then purified by PCX-SPE column, and eluted with ammonia-methanol (5:95). After concentration, the residue was dissolved by acetone solution and analyzed by GC/MS. With the conditions of capillary chromatographic column (HP-5MS 0.25 mm × 30 m × 0.25 μm), SCAN acquired mode from m/z 40–500. The target peaks were calibrated by CLIPS. **Results:** By combining analysis of the mass spectrogram matching with NIST mass spectrogram database and molecular structure prediction with CLIPS, the gelsemine and koumine contained in *Gelsemium elegans* were identified. The method has been applied successfully for 2 suspected *Gelsemium elegans* poisoning cases, with 10 samples involved. **Conclusion:** This method can be used to determine the gelsemine and koumine in *Gelsemium elegans*, which can be applied in plant identification and

* 作者 Tel: 13877402365; E-mail: 364634386@qq.com

poisoning judicial authentication of *Gelsemium elegans*.

Keywords: solid phase extraction (SPE); gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS); calibrated lineshape isotope profile search (CLIPS); identification of *Gelsemium elegans* poisoning; gelsemine and koumine; cation exchange; identification of plant; judicial expertise

钩吻(*Gelsemium elegans* (Gardn.et Champ.) Benth.)^[1] 又名野葛、胡蔓藤、断肠草,是马钱科、钩吻属植物胡蔓藤多年生常绿藤本植物。钩吻是一种重要的中药药材,含有钩吻碱、钩吻碱子等多种生物碱,有抗炎、散瞳、抗肿瘤、破积拔毒、祛瘀止痛、杀虫止痒、镇痛、镇静的功效,主要用于医治疥癩、湿疹、瘰癧、痈肿、疔疮、跌打损伤、风湿痹痛、神经痛等病症^[2]。钩吻主要分布于浙江、福建、湖南、广东、广西、贵州、云南等省。钩吻的毒性很大,被认为是世界上最毒的植物之一,近年来,两广地区时会发生因误食钩吻而中毒致死的事件,呈逐年攀升趋势。因此,研究用于钩吻植物鉴定和司法鉴定的分析方法有其必要性。钩吻的分析方法目前有快速试剂检测法^[3]、液液萃取-薄层鉴别法^[4]和超声提取气质联用法^[5-6],但其分析方法耗时费力,纯化效果和分析的灵敏度不够理想,为分析工作带来一定的难度。

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^[7-8]。气相色谱-质谱联用技术,能对气化后的目标物进行分离,并获得其质谱谱图,起到一定的定性作用^[9-10]。同位素峰形校正检索技术能通过已知的校正物质,对未知物的精确质量数和同位素峰形进行校正匹配^[11],在低分辨率质谱上实现对分子式的识别^[12-15]。基于此设计的Massworks™软件,与气相色谱-低分辨质谱结合,能拓展后者的应用范围。

本实验采用PCX-SPE技术富集生物碱类成分,消除部分干扰,再利用气相色谱-质谱采集质谱谱图,然后用Massworks™软件的同位素峰形校正检索技术推算得到精确质量数和分子式,从而分析鉴定钩吻中的钩吻碱和钩吻碱子。该方法可应用于钩吻的植物鉴定和钩吻中毒司法鉴定工作。

1 仪器与试剂

GC7890A/5975C 气质联用仪(美国 Agilent 公司产品,自带调谐液全氟三丁胺),配有 NIST 08 质谱解析软件;Masswork™ 质谱解析软件(美国 Cerno BioScience 公司产品);LC1290/QTOF6550 液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司产

品);DL-280B 超声波清洗器(上海之信仪器有限公司)。

钩吻生药采自梧州市郊外,经梧州食品药品检验所鉴定为马钱科胡蔓藤植物钩吻(*Gelsemium elegans* (Gardn.et Champ.) Benth.);PCX 固相萃取小柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司,60 mg,3 mL);丙酮(HPLC 级,美国 Fisher 公司),其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。实验用水为经 ELGA PURELAB ClassicUVF 净化系统过滤的去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 HP-5MS 0.25 mm × 30 m × 0.25 μm 石英毛细管柱,载气为高纯 He,流速 1.2 mL · min⁻¹,柱温为程序升温(初始温度为 150 °C,保持 2 min,然后 10 °C · min⁻¹ 升至 280 °C,保持 4 min),进样口温度 280 °C,分流进样,分流比为 50:1,进样量为 1.0 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电子轰击源(EI)70 eV,离子源温度 230 °C,接口温度 280 °C,四极杆温度 150 °C,质量范围 *m/z* 40~350,采样模式为原始扫描。以全氟三丁胺调谐液为外标对质谱进行校正。

2.3 供试液的制备

2.3.1 提取 称取粉碎(过 3 号筛)后样品 1.0 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入 1% 盐酸 20 mL,超声(100 W,4 kHz)提取 20 min,过滤。

2.3.2 净化 依次用甲醇 3 mL 和水 3 mL 活化 PCX 固相萃取柱,准确移取“2.3.1”项下的滤液 5 mL 上柱,再用水 3 mL 和甲醇 3 mL 淋洗固相萃取柱,抽干,用 5% 氨化甲醇溶液 5 mL 洗脱,收集洗脱液,并于 40 °C 下氮吹至干,用丙酮 1 mL 定容,作为供试液。

2.4 测定结果

供试液上气质联用仪进行测定,钩吻碱子和钩吻碱的保留时间分别是 15 min 和 17 min。其总离子流图(TIC)见图 1,2 个目标峰的质谱谱图见图 2。

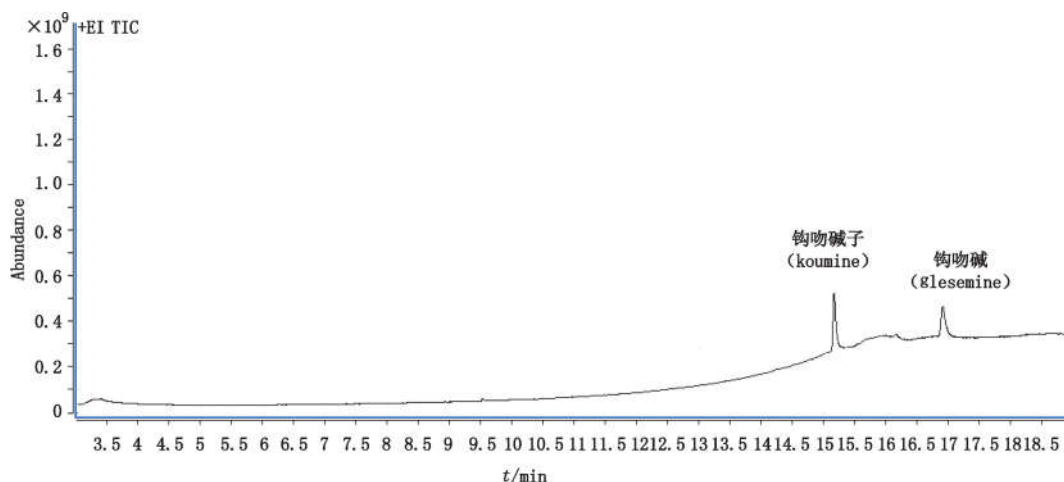


图1 钩吻供试液的总离子流图

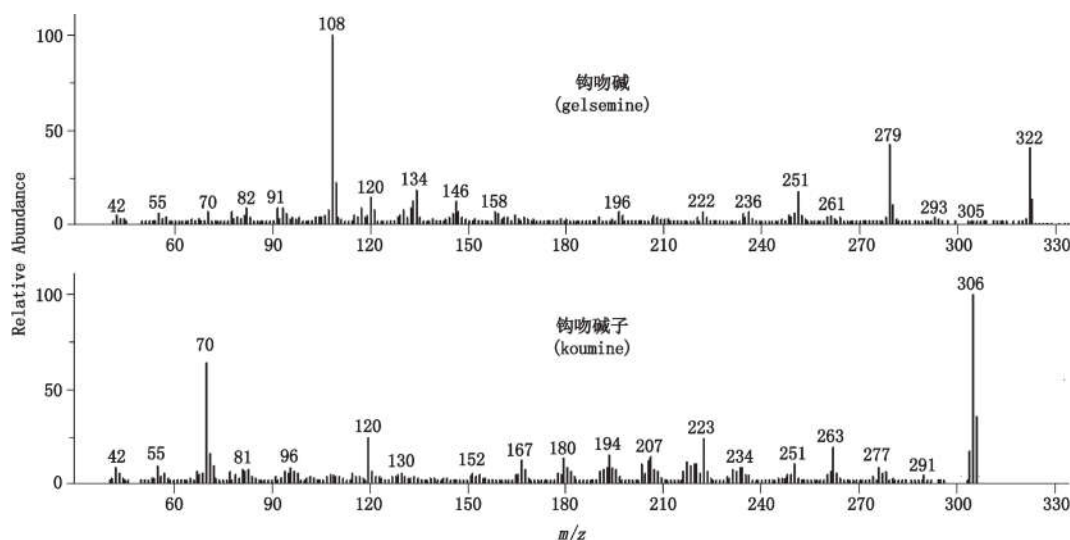
Fig.1 Total ion chromatogram of extract from *Gelsemium elegans*

图2 钩吻碱和钩吻碱子的质谱图

Fig.2 Mass spectrometry of gelsemine and koumine

2.5 与标准谱图的匹配结果

钩吻碱与 NIST 08 标准谱库中钩吻碱 (gelsemine) 匹配度为 94.4%, 相对分子质量为 322.2, CAS 号为 509-15-9; 而因 NIST 08 标准谱库中未收录钩吻碱子该物质的标准谱图, 故钩吻碱子未能与 NIST 08 标准谱库匹配结果。但钩吻碱子的质谱谱图能与文献 [2] 中钩吻碱子的质谱谱图高度相似。

2.6 同位素峰形校正检索技术识别目标物的精确相对分子质量

Masswork™ 的 CLIPS 技术首先需要选取气质联用仪所用的校正液—全氟三丁胺的已知离子生成校正函数, 再利用该校正函数校正目标物精确相对分子质量和同位素峰形^[16], 从而获得其分子式。

本实验利用 Masswork™ 软件对保留时间为 15 min 和 17 min 的 2 个目标物进行校正, 并检索出头三位有可能的分子式见表 1、2, 其中保留时间为 15 min 的目标物分子式检索首位为 $C_{20}H_{22}N_2O$, 与钩吻碱子的分子式一致; 保留时间为 17 min 的目标物分子式检索首位为 $C_{20}H_{22}N_2O_2$, 与钩吻碱的分子式一致。2 个目标物的原始谱图与校正后谱图对比结果见图 3。

2.7 小结

综合上述结果, 表明采用固相萃取方法作为前处理, GC-MS 进行分析, 其钩吻碱子和钩吻碱的质谱谱图与标准谱图有极高的匹配度, 且利用同位素峰形校正检索技术进行校正也可进一步确证匹配结果。

表 1 钩吻碱子的 CLIPS 检索匹配结果

Tab.1 CLIPS results of the koumine

分子式 (formula)	单同位素 (monoisotope)	质量误差 (mass error)/mDa	图谱准确度 (spectral accuracy)/%	不饱和度 (DBE)	排名 (rank)
C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O	306.172 7	0.612 7	98.898 2	11.0	1
C ₁₉ H ₂₂ N ₄	306.173 9	-0.629 4	97.291 7	11.0	2
C ₁₄ H ₂₈ NO ₆	306.191 1	-17.792 1	95.861 2	8.5	3

表 2 钩吻碱的 CLIPS 检索匹配结果

Tab.2 CLIPS results of the gelsemine

分子式 (formula)	单同位素 (monoisotope)	质量误差 (mass error) /mDa	图谱准确度 (spectral accuracy)/%	不饱和度 (DBE)	排名 (rank)
C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.167 6	1.211 5	99.548 8	8.5	1
C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O	322.178 8	-9.712 8	98.574 2	3.5	2
C ₂₁ H ₂₂ O ₃	322.156 3	12.754 0	97.512 4	11.0	3

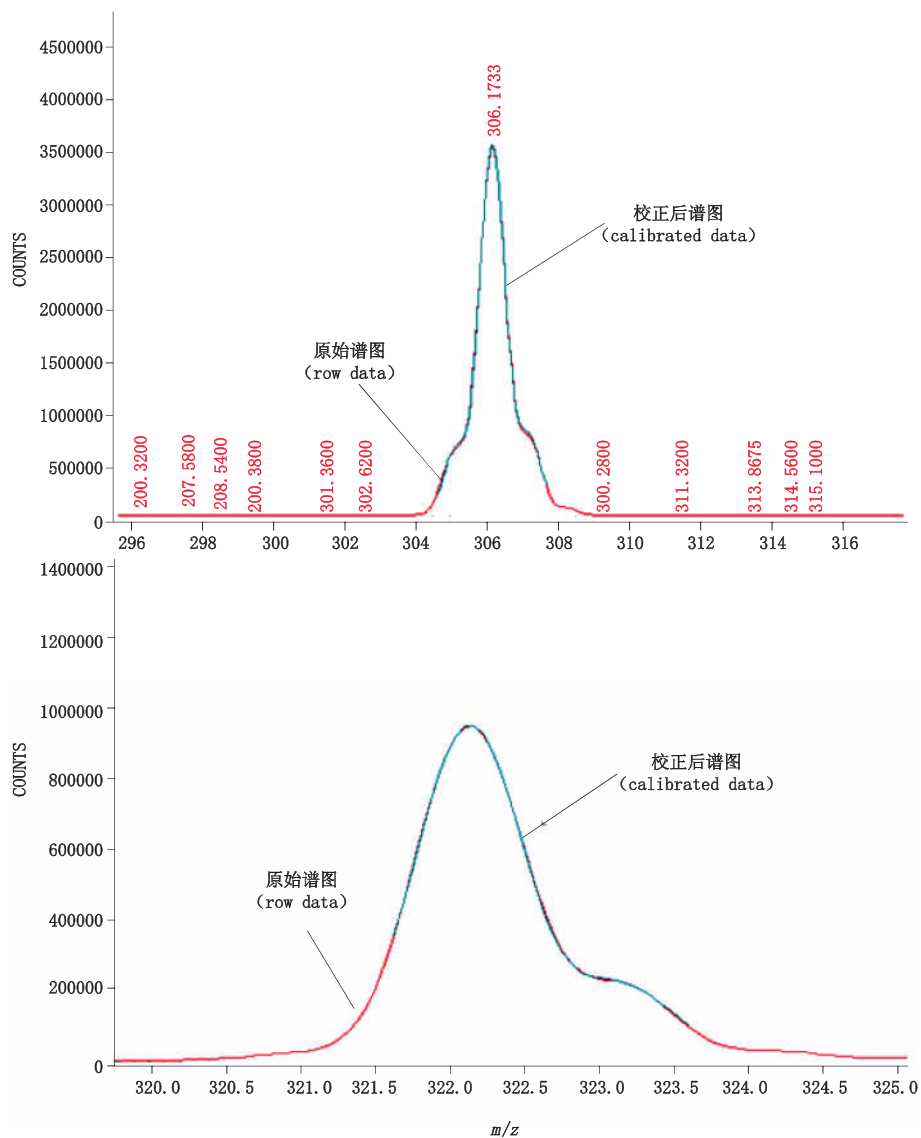


图 3 2 个目标物的同位素峰形校正检索结果

Fig.3 Isotope profile calibration results of two targets

3 讨论与结论

3.1 检测仪器的选择

本实验选用气质联用仪作为检测仪器,是因其既可利用 NIST 08 标准谱库作为检索工具,也可利用全氟三丁胺作为同位素峰形校正检索技术的外标校正物质。

3.2 固相萃取柱的选择

利用气质联用仪采集总离子流图分析比较了酸

水直接提取样品、经 PCX 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 4。结果显示,PCX 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 PCX 净化;而酸水直接提取样品,则干扰物质较多,且酸水作为溶剂对气相用毛细管色谱柱损伤较大,因此不宜采用。本实验最后采用 PCX 固相萃取柱作为净化方式。

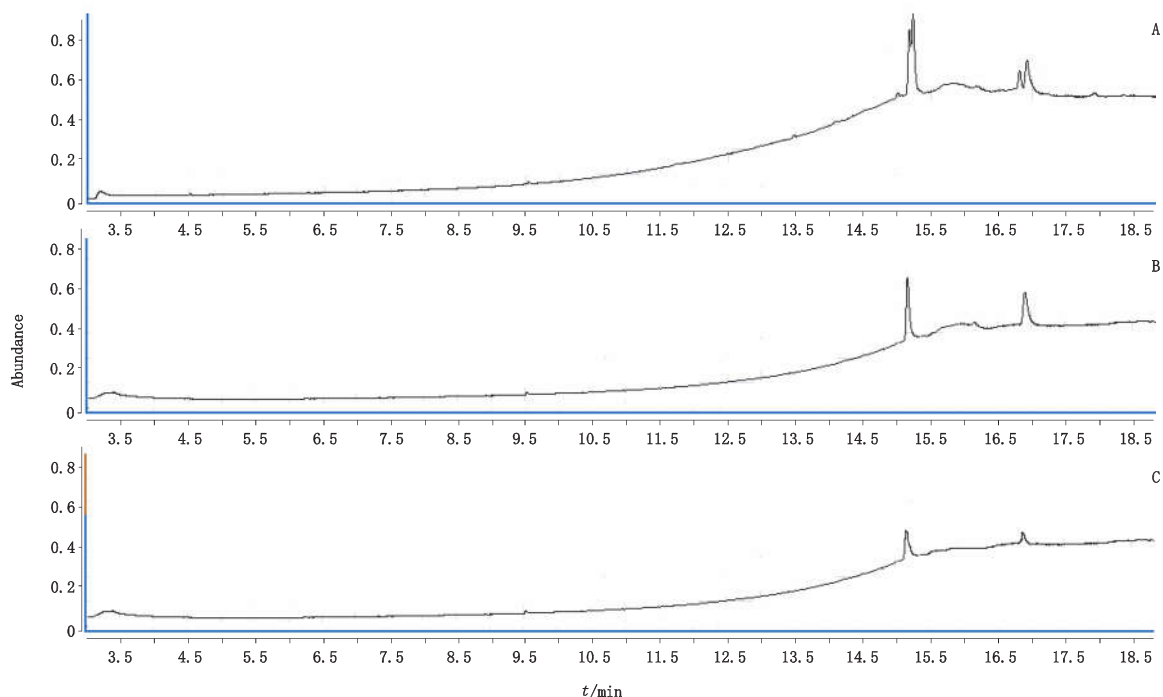


图 4 酸水直接提取 (A)、PCX 固相萃取 (B) 和 C_{18} 固相萃取 (C) 富集净化效果比较

Fig.4 Comparison enrichment of acid-water (A), PCX solid (B) and C_{18} solid (C) extraction

3.3 钩吻碱子的高分辨质谱验证

利用液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪 (LC-QTOF/MS) 对供试液进行精确相对分子质量测定,其总离子流图见图 5。对色谱图中目标物 1.566 min 的

色谱峰提取质谱图,见图 6,所得的 $[M+H]^+$ 精确相对分子质量为 307.180 5,则 M 峰精确相对分子质量为 306.173 2,分子式为 $C_{20}H_{22}N_2O$ 。钩吻碱子的精确相对分子质量验证结果与 MassworkTM 软件推算结果一致。

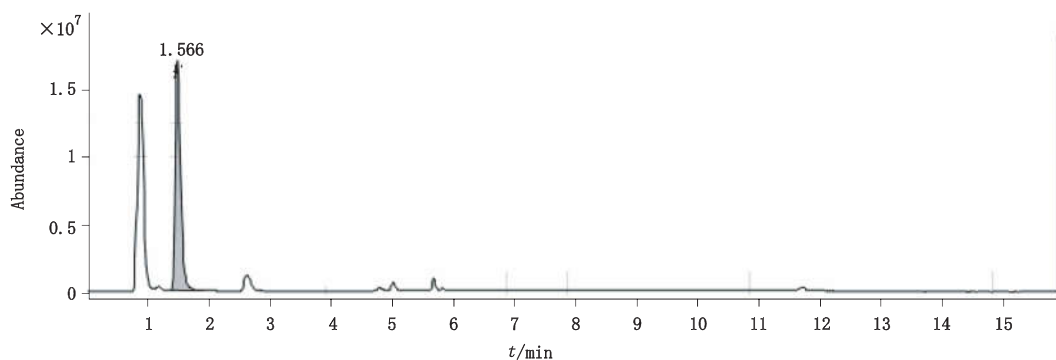


图 5 液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪采集的总离子流图

Fig.5 TIC by LC-QTOF/MS

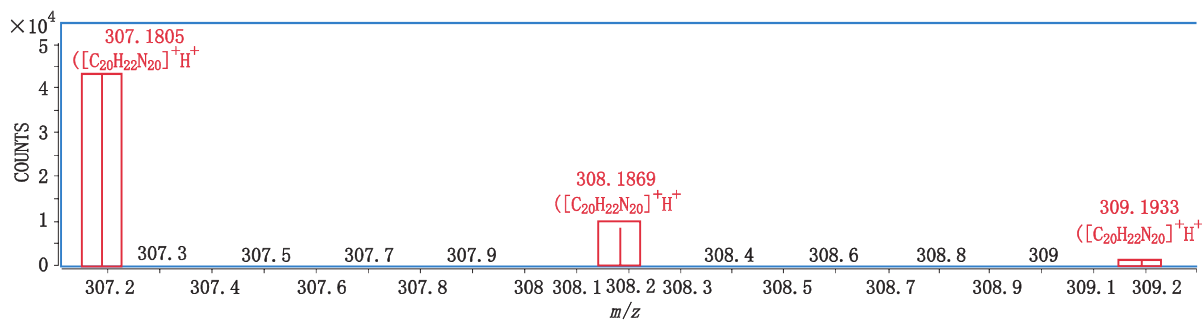


图6 目标物的质谱图

Fig.6 Mass spectrogram of the targets

3.4 结论

MassworkTM 利用 CLIPS 技术可同时得到钩吻碱子和钩吻碱的精确相对质量数和同位素峰形,在低分辨率的单四极杆质谱仪上实现了对精确质量数的测定,其质量精度已经接近了普通的高分辨质谱,与固相萃取-气质联用结合所得到的质谱谱图,可相互印证确证结果。为钩吻的植物鉴定和钩吻中毒司法鉴定工作提供了有力的支持。

参考文献

- [1] 陈卫琳,杨樱,吴水生,等. 闽产钩吻根茎叶中钩吻碱甲和钩吻素子及胡蔓藤碱甲的含量测定[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(5): 48
CHEN WL, YANG Y, WU SS, et al. Determination of gelsemine, koumine and humantenmine from roots, stems and leaves of *Gelsemium elegans* from Fujian Province [J]. J Fujian Univ TCM, 2011, 21(5): 48
- [2] 张兰兰. 钩吻化学成分与药理研究进展[J]. 中药材, 2006, 26(6): 451
ZHANG LL. Chemical components and pharmacological research progress of *Gelsemium elegans* [J]. J Chin Med Mater, 2006, 26(6): 451
- [3] 黄伟雄,李汴生,范山湖,等. 应用 TLC 法鉴定断肠草中的钩吻碱. 华南预防医学, 2008, 34(1): 60
HUANG WX, LI BS, FAN SH, et al. Identification of gelsemine in *Gelsemium elegans* by TLC [J]. South China J Prev Med, 2008, 34(1): 60
- [4] 桑向玲,赵楚云,施文兵,等. 超声波萃取气相色谱-质谱法测定胃内容物中的钩吻碱[J]. 广东公安科技, 2006(3): 26
SANG XL, ZHAO CY, SHI WB, et al. Ultrasonic extraction gas chromatography-mass spectrometry determination of *Gelsemium elegans* in the gastric contents [J]. Guangdong Gong'an Keji, 2006(3): 26
- [5] 黄玉玲,王志城. 大茶药中毒样品中钩吻生物碱的快速检测[J]. 中

国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 135

HUANG YL, WANG ZC. Quick test of *Gelsemium elegans* Benth in poisoned samples [J]. Chin J Food Hyg, 2006, 18(2): 135

- [6] 黄伟雄,李汴生,梁春梅,等. GC/MS 测定断肠草中钩吻碱方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(2): 59
HUANG WX, LI BS, LIANG CM, et al. Determination of gelsemine in graceful jessamine herb by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2008, 20(2): 59
- [7] 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
HE ZM, SUN JM, ZHANG H, et al. Analysis of components in aqueous of *Paeonia lactiflora* Pall. and *Paeonia lactiflora* Pall. Preparation with wine by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2009, 37(8): 1021
- [8] 韦寿莲,麦文敏,严子军,等. 固相萃取-毛细管电泳法测定兔血清中的山茛菪碱对映体[J]. 化学学报, 2009, 67(8): 801
WEI SL, MAI WM, YAN ZJ, et al. Determination of anisodamine enantiomers in rabbit plasma samples by solid-phase extraction with capillary electrophoresis [J]. Acta Chim Sin, 2009, 67(8): 801
- [9] 杨元,譙斌宗,高玲,等. 气相色谱-质谱技术在卫生检验中的应用(I)-在食品卫生检验中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(5): 552
YANG Y, QIAO BZ, GAO L, et al. Application of gas chromatography-mass spectrography in laboratory tests (I)- application in food hygiene inspection [J]. Chin J Health Lab Technol, 2003, 13(5): 552
- [10] 杨玉林,温忆敏,芮振荣,等. 气相色谱-质谱联用技术分析中毒样品中四种生物碱[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(3): 272
YANG YL, WEN YM, RUI ZR, et al. Determination of 4 alkaloids in poisoning samples by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2004, 14(3): 272
- [11] 王永东,顾鸣. 质谱的谱图准确度概念[J]. 分析化学, 2010, 82(17): 7055

- WANG YD, GU M. The concept of spectral accuracy for MS[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(17): 7055
- [12] 李雪生, 李子昂, 王正全, 等. 精确质量数在单四极杆质谱定性分析农药中的应用[J]. *高等学校化学学报*, 2010, 31(12): 2383
- LI XS, LI ZA, WANG ZQ, et al. Application of accurate mass and elemental composition determination for pesticides identification using a unit mass resolution gas chromatography / mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ*, 2010, 31(12): 2383
- [13] 刘可, 马彬, 王永东, 等. 一种新软件方法用于单位分辨质谱仪上药物相对分子量的准确测定[J]. *药学报*, 2007, 42(10): 1112
- LIU K, MA B, WANG YD, et al. A new software method for accurate mass measurements of drugson unit mass resolution mass spectrometer [J]. *Acta Pharm Sin*, 2007, 42(10): 1112
- [14] HO HP, LEE RJ, CHEN SR, et al. Identification of new minor metabolites of penicillin G in human serum by multiple – stage tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(1): 25
- [15] ZHOU W, ZHANG YH, HU HL, et al. Determination of elemental composition of volatile organic compounds from Chinese rose oil by spectral accuracy and mass accuracy [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(20): 3097
- [16] 顾鸣, 王永东. 通过精确质量确定元素组成: 从四极杆到傅立叶变换离子回旋共振质谱仪 [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(26): 106
- GU M, WANG YD. Elemental composition determination through accurate mass: from quadrupole to FT ICR MS [J]. *J Instrum Anal*, 2007, 26(26): 106

(本文于2015年2月22日收到)