



实时直接分析-串联质谱法(DART-MS/MS) 快速检测吐根中生物碱

孙磊, 胡晓茹, 刘丽娜, 金红宇, 林瑞超*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的:在未经前处理和色谱分离的情况下应用实时直接分析-串联质谱法检测吐根生物碱。方法:在优化的条件下全扫描采集药材,茎及叶的 DART-MS(direct analysis in real time, DART)特征图谱,并对生物碱进行二级质谱确证,采用多反应监测模式通过测定样品表面待测物的质谱峰强度来计算其在样品中的平均含量。结果:药材和茎的图谱中均有明显的吐根碱和吐根酚碱的质子化离子峰 m/z 481, 467, 叶中 m/z 479, 465 为其他生物碱的质子化离子峰,定量方法的重复性和线性良好。结论:该模式或在药材、饮片的快速鉴别及实时对中间体或成品的快速定量分析中发挥作用。

[关键词] 实时直接分析;串联质谱;吐根;生物碱;直接离子化(常压离子化)

吐根为茜草科植物 *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich. 或 *C. acuminata* Karsten 的干燥根及根茎,用于祛痰或催吐,多国药典^[1-3]均有收载,主要有效成分为生物碱^[1-4],其中吐根碱和吐根酚碱占 90% 以上^[2],分析其生物碱对吐根及其制剂的鉴别和质量控制有重要意义。国内有许多药企生产吐根酊,吐根糖浆,小儿化痰止咳冲剂(或糖浆)等含吐根的制剂,原料以前全部依靠进口浸膏,近年也开始进口药材。但国内未制订药材标准,相关制剂标准不对吐根进行质控或仅采用薄层色谱法、滴定法对吐根进行质控,造成药检机构和药企质检部门对吐根及其制剂的检验能力缺乏,因此探讨准确、专属、高效的分析方法对进口检验监管和生产质量的控制大有裨益。目前,吐根生物碱的检测方法有滴定法、薄层色谱法^[1]、紫外分光光度法^[2]、高效液相色谱法^[3,5-7],这些方法均需对样品进行较复杂的前处理,专属性也不强。

直接离子化质谱技术能在未经前处理的情况下实现对固、液、气态样品的分析,兼具质谱技术强大的定性能力。最早直接离子化方式电喷雾解吸电离(desorption electrospray ionization, DESI)由 Cooks

等^[8]在 2004 年提出,实现了常压下对固体表面痕量待测物的直接分析,该技术还应用于药品中非法添加物分析^[9]和天然植物产物分析^[10]等。Cody 等^[11]2005 年报道的实时直接分析(direct analysis in real time, DART)是另一种直接离子化技术,与 DESI 相比,因无需化学溶剂辅助离子化,对样品和环境均无污染,离子化效率更高,操作更简便,也是近年分析技术的研究热点之一,在包装材料中禁限用成分检测^[12]和谷物中霉菌毒素分析^[13]等方面均有应用。本研究使用 DART 离子源和串联四极杆质谱仪建立了快速检测吐根生物碱的新方法,首次报道了吐根碱和吐根酚碱的串联质谱裂解行为,提出了用已知含量样品作为对照物并通过改变采集时间绘制回归曲线对固体样品进行定量的模式。

1 仪器与试剂

DART SVP 离子源(自动滑轨,10 孔载片器,工作站,美国 Ion Sense 公司);Agilent 6410B 串联四极杆质谱仪(Mass Hunter 工作站,美国 Agilent 公司)。甲醇(分析纯,北京化工厂)。盐酸吐根碱、盐酸吐根酚碱对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司)。吐根药材及原植物来自哥斯达黎加,经中国食品药品检定研究院张南平副主任药师鉴定为吐根,原植物为 *C. ipecacuanha*。

2 方法

2.1 DART 及质谱仪参数

DART 离子源、传送管间距 25 mm,样品居中;离子源下倾角 α 10°;电晕针电压 4 000 V;氦气流速 4 L

[稿件编号] 20110904003

[通信作者] * 林瑞超,研究员, Tel: (010) 67095307, E-mail: linrch307@sina.com

[作者简介] 孙磊,助理研究员,主要从事中药,民族药,天然药物质量控制及有害残留物分析, Tel: (010) 67095424, E-mail: dasunlei@sina.com



· min⁻¹; 气流温度 350 ℃; 出口电极偏转电压 100 V。串联质谱仪正离子模式; 扫描范围 *m/z* 100 ~ 600; 毛细管电压 4 000 V; 锥孔电压 100 V; 碰撞能量 33 V。

2.2 对照品溶液制备

取盐酸吐根碱和盐酸吐根酚碱对照品适量, 加甲醇溶解制成各 100 mg · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 样品制备

取直径 4 mm 的药材, 切为长 5 mm 的段。另取药材 50 g 粉碎, 过 60 目筛并混匀, 用红外光谱制样器压成药片, 切为 3 mm × 4 mm × 5 mm 的块。取直径 4 mm 的茎, 切为长 5 mm 的段。叶片切为 10 mm × 20 mm 的片。

3 结果与讨论

3.1 仪器参数的优化

DART 检测示意图 1, 样品表面的待测物经离子源解吸并离子化后, 在真空泵产生的负压作用下由传送接口引入质谱仪分析, 原理详见文献 [11]。本实验的待测物为生物碱, 易结合质子, 故设定为正离子模式。取对照品溶液 5 μL 滴于条形载玻片上, 挥干后置滑轨上进行 DART 全扫描, 质谱图中可见吐根碱 *m/z* 481 [M + H]⁺ 和吐根酚碱 *m/z* 467 [M + H]⁺, 比较不同条件下信号的强弱, 选择信号强且稳定时的参数。试验发现, 氦气 (He) 的灵敏度明显高于氮气 (N₂), 故选择 He; He 流速固定为 4 L · min⁻¹; 比较气流温度时发现待测物在 100, 200 ℃ 几乎没有信号, 300 ℃ 时信号较高, 至 350 ℃ 时信号达到最高, 升到 400 ℃ 又有下降, 故选 350 ℃; 离子源与传送管距离为 25 mm, 兼顾信号强度和滑轨的运行。

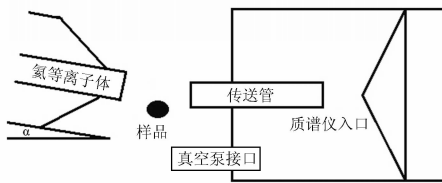
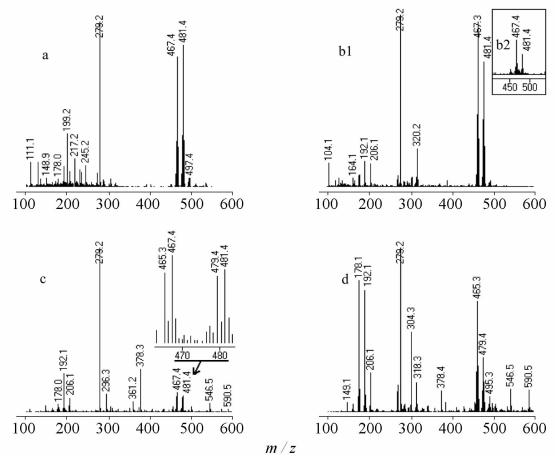


图 1 DART 离子源示意图
Fig. 1 Schematic of DART ion source

3.2 吐根 DART-MS (SCAN) 分析

按 2.1 项条件分别采集对照品溶液, 药材, 药粉片, 茎, 叶的 DART-MS 特征图谱, 见图 2。对照品, 药材, 药粉片的质谱图中均可见与吐根碱和吐根酚碱对应的质子化离子峰; 而叶的质谱图则主要为 *m/z* 479,

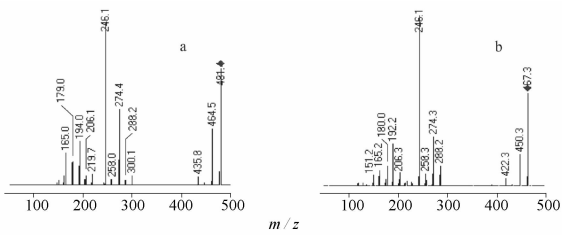
尚有 *m/z* 378, 546, 590 等药材中没有的峰; 茎的质谱图中除 *m/z* 481, 467 较高外, *m/z* 479, 465 也很高, 亦出现了叶中的 *m/z* 378, 546, 590。药材和药粉片的质谱图与对照品类似, 与其中 90% 以上的生物碱为吐根碱和吐根酚碱相吻合; 而茎、叶的成分则相对复杂。由此可见, DART-MS 特征图谱具有明显的指纹性特征, 可以用来鉴别药材甚至区分不同的部位, 尤其当药材被粉碎, 制成浸膏或者制成配方颗粒等形态难以进行性状鉴定或显微鉴别时, 借助 DART 能够进行快速、直观地真伪识别和全面鉴定。此外, DART 不使用喷雾溶剂辅助离子化, 在正离子模式下不产生 ESI 或 DESI 中常出现的钾、钠加合离子, 而主要为 [M + H]⁺ 离子, 质谱图更简明, 易于解析, 同时提高了灵敏度。图 2 显示当吐根碱和吐根酚碱含量相同时两质谱峰的强度比为 85:78; 结合图 2 药粉片中两质谱峰强度比 25:42 推算药材中两者的平均质量比为 1:1.83。作者另采用日本药局方的方法 [3] 测得药材中吐根碱和吐根酚碱的平均质量分数为 7.36, 16.04 g · kg⁻¹, 即质量比为 1:2.18, 与上述推测值较接近, 说明 DART-MS 图谱中各成分的质谱峰强度反映了它们在样品中的比例。另取 5 份药粉片置于自动滑轨上的载片器中, 滑轨速度 0.4 mm · s⁻¹, 进行全扫描, 5 份吐根碱质子化离子峰强度的 RSD 6.7%, 吐根酚碱 RSD 7.8%, 表明 DART-MS 指纹图谱具有较好的重复性, 则不同样品间成分质量的差异可以进行量化的比较, 数据借助主成分分析、相似度计算等化学计量学方法可进行进一步的统计分析。



a. 对照品; b1. 吐根药材; b2. 吐根粉片; c. 吐根茎; d. 吐根叶。
图 2 对照品及样品的 DART-MS 谱图
Fig. 2 DART-MS of references and samples

3.3 吐根生物碱质谱峰的确证

由于一级质谱可能存在假阳性,需进行二级质谱确认。结果表明药材中 m/z 481 和 m/z 467 准分子离子峰的 CID 图谱与吐根碱和吐根酚碱对照品一致。吐根碱的 CID 质谱图和裂解示意,见图 3~4,其中离子 m/z 464 由准分子离子 m/z 481 邻位甲氧基环合后产生;该离子继续丢失乙烯基生成 m/z 436 离子;碎片 m/z 274,206,194,288 为准分子离子在亚甲基两端断裂形成;碎片 m/z 258 由 m/z 274 邻位甲氧基环合后产生;碎片 m/z 246 由 m/z 274 丢失乙烯基形成。吐根酚碱裂解方式与吐根碱基本一致,见图 3~4。吐根茎,叶中的 m/z 479,465 离子的 CID 质谱图主要碎片均有 m/z 272,258,165,推测与吐根碱和吐根酚碱有相似的结构,由于缺乏文献和对照品支持,未做进一步分析。



a. 吐根碱;b. 吐根酚碱(图 4 同)。

图 3 吐根碱和吐根酚碱的 DART-CID-MS 谱图

Fig. 3 DART-CID-MS of emetine and cephaeline

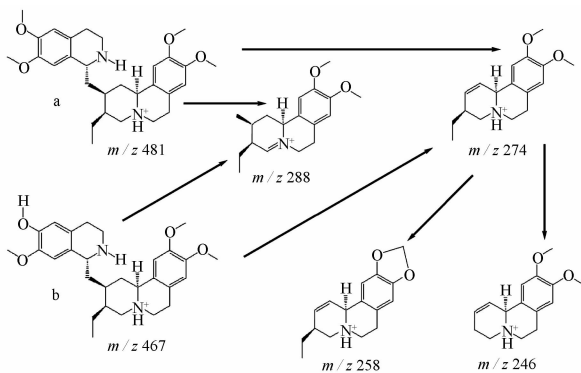


图 4 吐根碱和吐根酚碱的主要碎片

Fig. 4 Main fragments of emetine and cephaeline

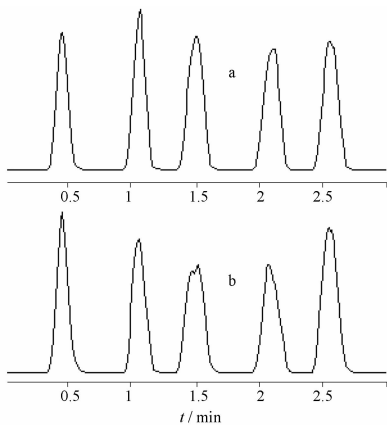
3.4 吐根 DART-MS/MS(MRM) 定量分析

3.4.1 MRM 参数和方法设计 SCAN 定性信息更丰富,但灵敏度低、易受干扰,采用 MRM 定量可兼

顾灵敏度和专属性。优化的 MRM 参数,吐根碱的锥孔电压 140 V,母离子 m/z 481.4,子离子 m/z 246.1,274.3(CE 40 V);吐根酚碱的锥孔电压 100 V,母离子 m/z 467.4,子离子 m/z 246.1,274.3(CE 40 V)。直接分析固体样品是直接离子化技术的优势,但只能测得表面待测成分质谱峰强度。实际上表面平坦、形状大小一致、含量均匀的固体可看作数个厚度很薄的平面层叠加而成,任意平面层待测物的含量与样品本身含量相同,而表面层待测物的含量显然与其质谱峰强度存在数学关系(线性、二次线性或对数等),那么使用含不同浓度待测成分的已知含量的一系列样品作对照物,绘制标准曲线便可定量。需注意样品和对照物大小,形状,质量(即密度)应尽可能保持一致,标准曲线计算的含量结果才能正确的传递给样品。

3.4.2 重复性 取 5 份药粉片置自动滑轨上的载片器中,滑轨速度 $0.4 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$,测定 5 次。图 5 为 1 次测定 5 份样品的质谱时间轮廓图,图中的轮廓峰与色谱-质谱联用法中的色谱峰类似,峰面积也是质谱峰强度对时间的积分,可用于定量。计算 5 份样品 $481.4 \rightarrow 246.1, 467.4 \rightarrow 246.1$ 通道的峰面积 RSD 评价重复性。吐根碱 5 次测定重复性的 RSD 为 16%,5.0%,9.8%,9.6%,13%,将每份样品 5 次测定的峰面积求平均后再计算 RSD 为 6.8%;吐根酚碱 5 次测定的 RSD 为 6.1%,14%,14%,11%,9.0%,平均峰面积的 RSD 为 7.0%。试验表明,样品形状、大小以及样品在载片器上的相对位置是影响重复性的关键因素,测定时应保持不同样品间的一致;虽然单次测定的重复性的变异可能较高,但测定 3~5 次时重复性基本满足定量要求。

3.4.3 回归方程 色谱法中绘制标准曲线可以进样相同体积的不同浓度的对照品溶液或者进样不同体积的同一浓度的对照品溶液,两者等效。对 DART 也可以采用类似的方式,使用 1 个已知质量分数的样品做对照物,通过线性调整自动滑轨的速度(即线性改变质谱仪采样时间)来模拟对照物中待测成分质量分数的线性变化,从而绘制标准曲线进行定量。取 3 份药粉片置于自动滑轨上的载片器中,滑轨速度设定为 $1.2, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$,每个速度测定 3 次。已知药粉片中吐根碱和吐根酚碱的质量分数分别为 $7.36, 16.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,



a. 吐根碱,通道481.4→246.1;b. 吐根酚碱,通道467.4→246.1。

图5 吐根碱和吐根酚碱的DART离子流时间轮廓图

Fig. 5 DART-ion chromatograms of emetine and cephaeline

以 $0.4 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 为测定标准,则 $1.2, 0.8, 0.6, 0.2 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 对应吐根碱和吐根酚碱的质量分数为 2.453 和 $5.347 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 3.68 和 $8.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 4.907 和 $10.693 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 14.72 和 $32.08 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以待测物质量分数 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得吐根碱回归方程 $y = 9243.13x - 5608.54, r = 0.9979$;吐根酚碱回归方程 $y = 2409.73x + 2776.76, r = 0.9964$ 。以上表明,表面待测成分质谱峰强度与其平均质量分数存在良好的线性关系,确保样品形状、大小和测定位置与对照物一致的情况下记录 $0.4 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时的样品峰面积,代入方程即得质量分数。但该方式的线性范围较小,不到一个数量级,一方面受到仪器设定的限制,另一方面滑轨速度过快会导致采集不到稳定的质谱信号,速度过慢会导致峰形的劣化。

3.4.4 样品分析 按 3.4.2 项下,测定药材表层、栓内层(刮去木栓层以下约 2 mm)和茎中2种生物碱的质量分数,三者含吐根碱和吐根酚碱依次为 3.72 和 $11.11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 8.60 和 $22.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 2.24 和 $1.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。可见吐根碱和吐根酚碱主要在根中,在地上部分质量分数较少,这与该药材的药用部位为根与根茎是吻合的,也提示地上部分或有药用价值。对吐根表层及其栓内层的含量测定显示了DART技术直接、原位检测的优势和简便性,为分析和评价药材同一药用部位细微位置的差异提供了一种简便有效的方法和手段。此外,这种固体样品快速含量测定模式精度稍逊,但它的开放式自动滑轨采样系统可以被生产线的传送系统所代替实现实时

分析,因此不失为一种有潜力的过程分析技术,或可用于制药企业生产现场的质量控制,如对混合、干燥、压片、包衣等过程在线或离线检测。

4 结论

本文建立的方法无需前处理和色谱分离,减少了试剂的耗费,单个样品分析(测定3次)约 30 s ,检测速度快。SCAN模式的DART-MS特征图谱包含丰富的定性信息,能对传统中药或天然植物药等复杂基质进行专属性、全面地表征从而用来鉴别不同的药材甚至药用部位,同时该图谱具有较好的重复性,可借助化学计量学方法对数据进一步处理。报道了吐根碱和吐根酚碱在DART-MS中的裂解行为,与文献[14]报道的EI源标准条件下裂解方式和碎片不尽相同,研究结果对不使用对照品进行吐根的质谱鉴别提供了依据和参考。还对DART直接测定固体样品的定量方法进行了探讨和试验,提出了将表面待测成分质谱峰强度与其在样品中的平均含量相关联的思路。该法在定量的准确度和重复性方面较常规色谱法或色谱-质谱联用法尚有不足,因具有原位、直接、快速检测的优势并兼有强大的定性能力,在快速真伪定性鉴别、高通量筛查或快速定量分析时具有优势和应用前景,若能结合小型质谱仪亦能在现场快检中发挥作用。

[参考文献]

- [1] European Pharmacopoeia 7.0[S]. 2010:1155.
- [2] The United States Pharmacopoeia 32. The National Formulary 27[S]. 2009:2682.
- [3] The Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition[S]. 2006:1303.
- [4] Itoh A, Ikuta Y, Baba Y, et al. Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*[J]. Phytochemistry, 1999, 52(6):1169.
- [5] Yoshimatsu K, Shimomura K. Improved analysis of emetic alkaloids in tissue cultures and regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* by ion pair high performance liquid chromatography[J]. Phytochem Anal, 1993, 4(5):217.
- [6] Asano T, Sadakane C, Ishihara K, et al. High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the determination of cephaeline and emetine in human plasma and urine[J]. J Chromatogr B, 2001, 757(2):197.
- [7] Eldawy M A, Mabrouk M M, El-Barbary F A. Determination of chlorpheniramine maleate and tincture ipecac in dosage form by liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J AOAC Int, 2003, 86(4):675.
- [8] Takats Z, Wiseman J M, Gologan B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization[J]. Science, 2004, 306(5695):471.



- [9] Leuthold L A, Mandscheff J F, Fathi M, et al. Desorption electrospray ionization mass spectrometry: direct toxicological screening and analysis of illicit ecstasy tablets[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(2): 103.
- [10] 陈焕文, 郑健, 王伟萍, 等. 电喷雾解吸电离质谱快速测定吴茱萸中生物碱[J]. *分析化学*, 2009, 37(2): 237.
- [11] Cody R B, Laramée J A, Durst H D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(8): 2297.
- [12] Ackerman L K, Noonan G O, Begley T H. Assessing direct analysis in real-time-mass spectrometry (DART-MS) for the rapid identification of additives in food packaging[J]. *Food Addit Contam*, 2009, 26(12): 1611.
- [13] Vaclavik L, Zachariasova M, Hrbek V, et al. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time(DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2010, 82(5): 1950.
- [14] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 307.

Rapid detection of alkaloids in ipecac by direct analysis in real time tandem mass spectrometry(DART-MS/MS)

SUN Lei, HU Xiaoru, LIU Lina, JIN Hongyu, LIN Ruichao*
(*National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To detect alkaloids in Ipecac by direct analysis in real time tandem mass spectrometry(DART-MS) without pre-treatment and chromatographic separation. **Method:** Under the optimum conditions, DART-MS characteristic spectra were collected for tablet of Ipecac powder, Ipecac stems and leaves by full scanning, and secondary spectra were adopted for identifying alkaloids. The multiple reaction monitoring mode was adopted to determine the mass spectrum peak intensity of determinands on the surface of determined samples, in order to calculate their average content in samples. **Result:** Spectra of tablet of Ipecac powder and Ipecac stems showed remarkable ionized ion peaks of emetine and cephaeline at m/z 481 and 467, while spectra of leaves showed ionized ion peaks of other alkaloids at m/z 479 and 465. Furthermore, the quantitative analysis was also demonstrated with good reproducibility and linear relationship. **Conclusion:** The mode can play a role in rapid determination of medicinal materials and prepared herbal medicines and real-time rapid quantitative analysis on intermediates and preparations.

[**Key words**] direct analysis in real time(DART); tandem mass spectrometry; ipecac; alkaloids; ambient ionization

doi:10.4268/cjmm20121017

[责任编辑 孔晶晶]