

## 白背三七叶中吡咯里西啶生物碱的 LC-MS<sup>n</sup> 检测

李丽梅<sup>1</sup>, 张涵庆<sup>1</sup>, 吕寒<sup>1</sup>, 李维林<sup>1,①</sup>, 徐德然<sup>2</sup>, 郭巧生<sup>3</sup>

[1. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014;

2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038; 3. 南京农业大学中药材研究所, 江苏 南京 210095]

**Detection of pyrrolizidine alkaloids from leaf of *Gynura divaricata* by LC-MS<sup>n</sup>** LI Li-mei<sup>1</sup>, ZHANG Han-qing<sup>1</sup>, LÜ Han<sup>1</sup>, LI Wei-lin<sup>1,①</sup>, XU De-ran<sup>2</sup>, GUO Qiao-sheng<sup>3</sup> (1. Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 3. Institute of Traditional Chinese Materials, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2008, 17(2): 79-80

**Abstract:** The pyrrolizidine alkaloids (PAs) in leaf of *Gynura divaricata* (L.) DC. was analyzed by LC-MS<sup>n</sup> technique. The result shows that two hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids (HPAs) are detected from the methanol extract of *G. divaricata* leaf, with relative molecular weight of 335 and 365, respectively and lower content. The constituent with relative molecular weight 335 is a retronecine-type alkaloid, and identified as integerrimine; another constituent with relative molecular weight 365 is an otonecine-type alkaloid, speculated to be isomer of usaramine or 18-hydroxyintegerrimine.

**关键词:** 白背三七; 吡咯里西啶生物碱; 全缘千里光碱; 液相色谱与多级质谱联用法(LC-MS<sup>n</sup>)

**Key words:** *Gynura divaricata* (L.) DC.; pyrrolizidine alkaloids; integerrimine; LC-MS<sup>n</sup>

中图分类号: Q946.88; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2008)02-0079-02

广泛分布于植物中的吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs)由具有双稠吡咯啉环的氨基醇与不同有机酸缩合而成,醇部分为裂碱(necine),酸部分为裂酸(necic acid)。以裂碱的结构可划分为2种类型,即倒千里光裂碱型(retronecine-type, RET型)和奥托千里光裂碱型(otonecine-type, OTO型)。肝毒性吡咯里西啶生物碱(hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids, HPAs)是吡咯里西啶生物碱中的一大类,急性中毒症状表现为肝脏细胞的静脉闭塞症,慢性中毒的临床表现为肝巨红细胞症和肝的纤维化坏死,吡咯里西啶生物碱由于上述毒性而受到国际医药界的广泛关注<sup>[1]</sup>。

吡咯里西啶生物碱的紫外吸收不强,用HPLC-UV法检测的灵敏度低,若缺乏对照品则难以准确判断样品中是否含有该成分。液相色谱与多级质谱联用技术(LC-MS<sup>n</sup>)将高效的色谱分离技术与高灵敏度的质谱检测技术相结合,对液相色谱系统分离的成分进行定性检测和分子量测定,并经过碰撞诱导解离过程得到分子离子(或称产物离子)。离子阱质谱可重复此过程,实现多级质谱(MS<sup>n</sup>),利用其提供的特征碎片离子信息,可获得供试成分的结构信息<sup>[1]</sup>。

白背三七 [*Gynura divaricata* (L.) DC.] 为菊科(Compositae)三七草属(*Gynura* Cass.)植物<sup>[2]</sup>,民间取其叶片治疗糖尿病。白背三七在某些地区有栽培,嫩茎叶可作蔬菜食用。有文献报道白背三七中主要含有黄酮、三萜、甾醇及核苷类化学成分<sup>[3]</sup>。此外,还含有肝毒性吡咯里西啶生物碱<sup>[4]</sup>,因而对白背三七中的肝毒性吡咯里西啶生物碱类成分进行分离和测定具有一定的理论意义和应用意义。为了进

一步确定白背三七叶片中HPAs的结构类型,并为进一步的毒理和药理实验提供依据,作者运用LC-MS<sup>n</sup>技术对白背三七叶中的HPAs的结构进行了检测和分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试的白背三七引种自广东省,种植于南京中山植物园实验苗圃,由江苏省·中国科学院植物研究所郭荣麟研究员鉴定,凭证标本保存于江苏省·中国科学院植物研究所。采集种植3a的植株叶片备用。

所用仪器为Agilent 1100 series LC-MSD Trap联用系统,包括二元溶剂泵、真空脱气机、自动进样器、内置柱切换阀的柱温箱、光电二极管阵列检测器(DAD);ESI接口的离子阱质谱检测器;Agilent Rev. A.0901化学工作站。

#### 1.2 方法

1.2.1 生物碱的提取方法 称取白背三七叶片60.0g,干燥粉碎,用适量甲醇在60℃下超声提取3次,每次30min,合并提取液,减压浓缩得浸膏;浸膏用适量体积分数2.5%

收稿日期: 2008-02-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470190);南京市科学技术局现代农业项目(200501015)

作者简介: 李丽梅(1980—),女,广西南宁人,硕士研究生,研究方向为中药资源与化学。

① 通讯作者 E-mail: lwlcnbg@mail.cnbg.net

的 HCl 溶液提取 3 次,合并酸提液;酸提液用适量二氯甲烷萃取 3 次,经氨水碱化(pH 9 ~ pH 10)后,再用适量二氯甲烷萃取 3 次,合并萃取液,减压浓缩至干,用甲醇溶解并定容至 2 mL,得到白背三七叶片的生物碱提取液,备用。

1.2.2 LC-MS<sup>n</sup> 检测条件 色谱条件:实验用色谱柱为岛津 Shim-pack VP-ODS 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相 A 为体积分数 0.1% 醋酸,流动相 B 为乙腈,5% 至 50% 梯度洗脱 60 min;进样量 10 μL;流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。分流后进入质谱的流速为 0.3 mL · min<sup>-1</sup>。

质谱条件:雾化气压力为 344.5 kPa,干燥气流速为 10 L · min<sup>-1</sup>,干燥气温度 350 °C,电离电压 3 000 V,电喷雾离子化(ESI),正离子方式检测,Auto MS<sup>n</sup>,扫描范围( $m/z$ ) 50 ~ 1 000。

## 2 结果和分析

据文献[5]报道,倒千里光裂碱型(RET 型)HPAs 的特征碎片离子的质荷比( $m/z$ )为 138、120 和 94;奥托千里光裂碱型(OTO 型)HPAs 的特征碎片离子的质荷比( $m/z$ )为 168、150 和 122。特征碎片离子可以反映这 2 类肝毒性吡咯里西

啶生物碱的结构。

据文献报道<sup>[1,6]</sup>,通过光二极管阵列监测器全波长扫描,发现吡咯里西啶生物碱仅在 218 nm 附近有较弱吸收,检测的灵敏度不够,因而,作者使用 MS 作为检测器,经多级 MS 对各个色谱峰进行进一步的检测,并对照文献[5]中的质谱裂解规律判断 HPAs 的类型。

在生物碱提取液经 HPLC 分离和 MS 检测的总离子流色谱(total ion chromatogram, TIC)图上未发现吡咯里西啶生物碱峰,说明其在白背三七中含量较低,HPLC 法无法检出。

白背三七生物碱提取液经 LC-MS<sup>n</sup> 共检测到 2 个质荷比( $m/z$ )分别为 336 和 366 的分子离子  $[M+H]^+$ ,其多级质谱(MS<sup>n</sup>)主要碎片离子见表 1。结果表明,LC-MS<sup>n</sup> 可以检测出白背三七叶中的肝毒性吡咯里西啶生物碱。

表 1 数据表明,质荷比( $m/z$ )336 的分子离子  $[M+H]^+$  在 ESI-MS<sup>n</sup> 谱上出峰时间为 17.5 ~ 17.7 min,与其 TIC 谱上的出峰时间一致。ESI-MS<sup>n</sup> 检测出特征碎片离子的质荷比( $m/z$ )为 138、120 和 95,结合文献[5]的质谱裂解规律,判断该成分为倒千里光裂碱型 HPAs。该成分的质谱裂解特征碎片与文献[4]报道的全缘千里光碱(integerrimine)一致,进一步确定该成分为全缘千里光碱。

表 1 白背三七叶片生物碱提取液的碎片离子数据  
Table 1 Fragment ions' datums of alkaloid extract from *Gynura divaricata* (L.) DC. leaf

保留时间/min Retention time	相对分子质量 MW	MS <sup>1</sup>	MS <sup>2</sup>	生物碱类型 Type of alkaloid
17.5 - 17.7	335	$[M+H]^+$ ( $m/z$ )336	( $m/z$ )336→308, 290, 138, 120, 94	倒千里光裂碱型 Retronecine-type
18.8	365	$[M+H]^+$ ( $m/z$ )366	( $m/z$ )366→168, 150, 122	奥托千里光裂碱型 Otonecine-type

由表 1 的数据还可以看出,质荷比( $m/z$ )366 的分子离子  $[M+H]^+$  在 ESI-MS<sup>n</sup> 谱上的出峰时间为 18.8 min,与其 TIC 谱的出峰时间相一致。ESI-MS<sup>n</sup> 检测出特征碎片离子质荷比( $m/z$ )为 168、150 和 122,结合文献[5]的质谱裂解规律,判断该成分为奥托千里光裂碱型 HPAs。该成分的相对分子质量与文献[4]报道的 usaramine 和 18-hydroxyinterrimine 一致,但质谱裂解的特征碎片离子峰不一致,推测可能为其同分异构体。

## 3 结 论

运用 LC-MS<sup>n</sup> 技术,从白背三七叶片的生物碱提取物中检测出的 2 个吡咯里西啶生物碱成分均为肝毒性吡咯里西啶生物碱,其中相对分子质量为 335 的成分确定为全缘千里光碱,相对分子质量为 365 的成分推测可能为 usaramine 或 18-hydroxyinterrimine 的同分异构体,具体结构有待进一步确定。白背三七叶片中上述 2 种成分的含量较低,它们在白背三七叶片药理方面的作用还需进一步探讨和分析。

## 参考文献:

- [1] 濮社班,徐德然,张 勉,等. 中药款冬中肝毒吡咯里西啶生物碱的 LC/MS<sup>n</sup> 检测[J]. 中国天然药物, 2004, 2(5): 293 - 297.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第七十七卷 第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [3] 胡 勇,李维林,林厚文,等. 白背三七地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 156 - 158.
- [4] Roeder E, Eckert A, Wiedenfeld H. Pyrrolizidine alkaloids from *Gynura divaricata*[J]. Planta Med, 1996, 62(4): 386.
- [5] Lin G, Zhou K Y, Zhao X G, et al. Determination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids by on-line high performance liquid chromatography mass spectrometry with an electrospray interface [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1998, 12(20): 1445 - 1456.
- [6] 濮社班,徐德然,张 勉,等. 橐吾属植物中肝毒性吡咯里西啶生物碱的 LC/MS<sup>n</sup> 检测[J]. 药学学报, 2004, 39(10): 831 - 835.