

· 药剂与工艺 ·

# 液相色谱质谱联用 (LC-MS/MS)在天然化学成分分析中的应用

## I . 音喷离子化 (SSI)与大气压化学离子化 (APCI)对利血平的比较分析

天津药物研究院,天津药代与临床药理研究室 (300193)

刘昌孝\* 李全胜 魏广力 高连用 葛惠清 原田芳文\*\*

**摘要** 报道应用 LC-MS/MS,采用音喷离子化 (SSI)与大气压化学离子化 (APCI)对利血平的比较分析,应用这两种离子化方法比较所得的利血平的标准质谱 (MS)和二级质谱 (MS<sup>2</sup>),实验证明两种离子化方法所得结果完全一致。

**关键词** 音喷离子化 大气压化学离子化 利血平 液相色谱质谱联用技术

### Application of LC-MS in the Analysis of Natural Products

#### I . Comparative Study for the Analysis of Reserpine by Sonic Spray Ionization and Atmospheric Pressure Chemical Ionization

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research (Tianjin 300193) Liu Changxiao, Li Quansheng, Wei Guangli, Gao Lianying and Ge Huiqiang

Hitachi Ltd., Kokubunji, Tokyo, 185-8601, Japan. Yoshifumi Harada

**Abstract** The use of sonic spray ionization (SSI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) methods in liquid chromatography /mass spectrometry (LC-MS/MS) was compared for the analysis of reserpine. The analytical results showed that the standard MS and the second-order MS (MS<sup>2</sup>) of reserpine were completely identical in LC-MS/MS analysis using the two ionization methods.

**Key words** sonic spray ionization (SSI) atmospheric pressure chemical ionization (APCI) reserpine liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

利血平 (reserpine)是存在于萝芙木 *Rauwolfia verticillata* (Lour.) Bail. 云南萝芙木 *R. yunnanensis* Tsiang 和鸡骨常山 *Alstonia yunnanensis* Diels. 根中生物碱,具有降压和安定作用<sup>[1]</sup>。在药理模型中这一生物碱可用作实验模型的工具药,在 LC-MS 仪器检测中也用来实验仪器的性能和参数的检验。本文报告应用 LC-MS/MS,采用音喷离子化 (SSI)与大气压化学离子化 (APCI)对利血平的比较分析,以比较两种离子化方式所得结果的一致性。为今后天然产物化学成分的研究中推广应用液相色谱-质谱联用技术起点作用。

#### 1 材料和方法

**仪器:** 日立 LM-8000型 LC-3QDMS系统,配以音喷离子化 (SSI)与大气压化学离子化 (APCI)接口以及 LC-MS分析软件系统。图 1, 2分别为 SSI接口 APCI接口的示意图。

离子化方式: SSI和 APCI

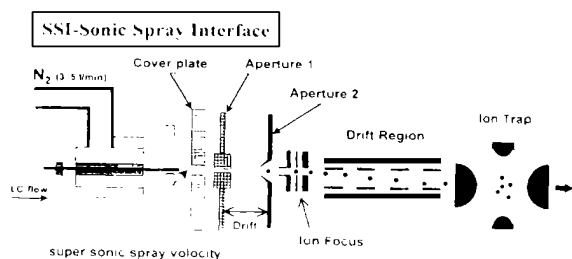


图 1 音喷离子化 (SSI)接口

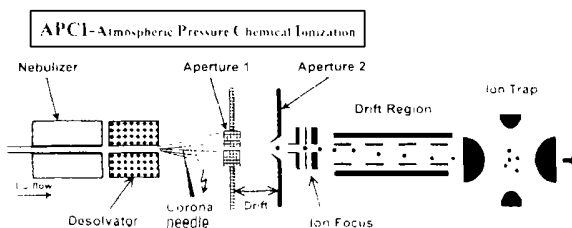


图 2 大气压化学离子化 (APCI)接口

\* Address: Liu Changxiao, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin

\*\* 日本日立公司 LC-MS技术部

离子检测: 正离子检测。

液相系统: C<sub>18</sub>色谱柱,溶剂系统: 甲醇,流速: 0.2

mL/min,总离子流 (TIC)检测

质谱条件:

SSI方式:

标准 MS 扫描范围: 100~ 650;累积电压: 0 V;累积时间: 100 ms

二级 MS( $MS^2$ ) 离子累积 离子累积范围: 584~ 635;累积时间: 200 ms;扫描范围: 100~ 650;分离电压: 0.01 V。离子分离 ( $MS^1$ ) 分离范围: 608~ 610;分离时间: 10 ms; 0.04 V;离子流检测: 588~ 631;电压: 0.2 V;扫描范围: 68~ 709 撞击解离 MS(CID- $MS$ ) 撞击范围: 588~ 631;撞击解离电压 (CIDV): 0.2 V;撞击解离时间: 50 ms;扫描范围: 68~ 709

## 2 结果

如图 3和图 4所示,SSI和 APCI两种离子化方式对利血平进行 LC-MS/MS分析,以正离子检测,所得标准 MS完全一致。标准 MS所得母离子  $m/z$  为 609,与 Na形成的母离子  $m/z$  为 631,证实该化合物的分子量为 608,与理论分子量 608一致。

对  $m/z$  为 609的母离子进行二级 MS( $MS^2$ )分析,两种离子化方式得到完全相同的二级 MS( $MS^2$ )结果,如图 5和 6所示。主要离子碎片有  $m/z$  为 448, 397, 577(578), 365和 195。利血平的二级 MS( $MS^2$ )的裂解成离子碎片的途径如图 7进行二级 MS分析时所得总离子流 (TIC)检测的液相色谱图,显示的色谱峰含有  $m/z$  为 448和 397的离子流的测定效应。

本实验所得结果证明:对利血平采用 SSI和 APCI两种方式离子化,以正离子检测,标准 MS和二级 MS均能得到一致的结果。

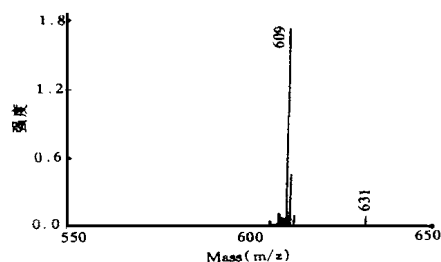


图 3 SSI方式所得利血平的标准 MS图

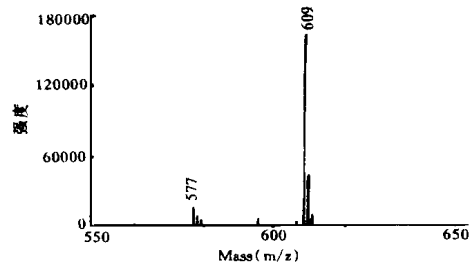


图 4 APCI方式所得利血平的标准 MS图

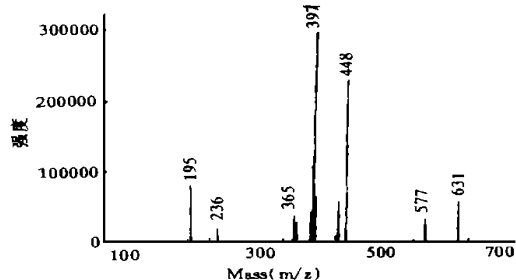


图 5 SSI方式所得利血平的二级 MS( $MS^2$ )图

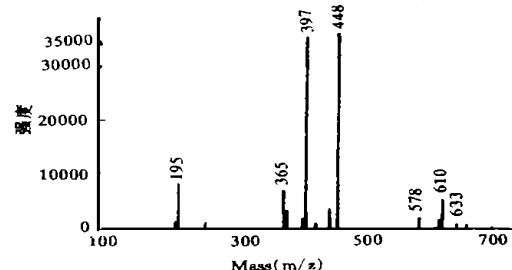


图 6 APCI方式所得利血平的二级 MS( $MS^2$ )图

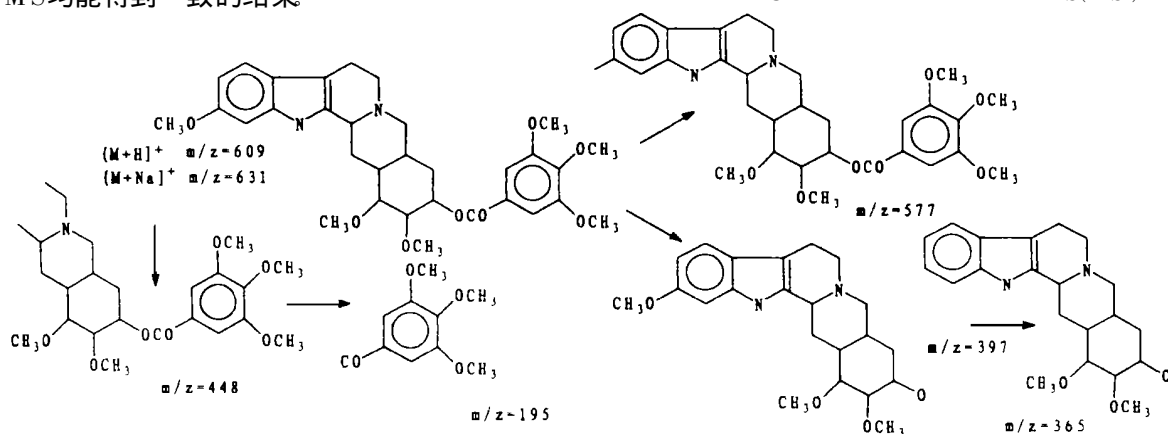


图 7 二级 MS分析中的利血平的离子碎片裂解途径

### 3 讨论

液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)在近 10 年中发展很快,由于它可分析难以挥发的化合物、热不稳定化合物和大分子化合物(如多肽、蛋白、多糖和多聚物),分析范围广,因而极受分析工作者重视。液相色谱-质谱-质谱联用技术(LC-MS/MS)具有比 LC-MS 更优越的性能,通过 LC 分离,应用 MS/MS 可分析在大量杂质的混合物中分析待测物质,提高分析的特异性和灵敏性,可以获得更多的化学结构信息。

在研究者关注的 LC-MS/MS 的发展中,接口技术的发展为研究应用提供了更广泛应用的可能性,其中 APCI、SSI 和 ESI 离子化技术为我们提供

了多种离子化方式,可满足多种分析的需要<sup>[2~4]</sup>。ESI 对不同极性和稳定性的化合物的使用范围能完全被 SSI 所覆盖,同时还能覆盖部分 APCI 的使用范围。

#### 参考文献

- 1 江纪武,肖庆祥. 植物药有效成分手册. 北京:人民卫生出版社, 1986: 888
- 2 Hirabayashi A, Sanokairi M and Koizumi H. Anal Chem, 1994, 65 (2): 4557
- 3 Hirabayashi A, Hirabayashi Y, Sanokairi M, *et al.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1996, 10: 1703
- 4 Hirabayashi Y, Hirabayashi A, Takada Y, Sanokairi M and Koizumi H. Anal Chem, 1995, 67(17): 2878

(2000-04-05 收稿)

## 黄芩素的化学发光测定

汕头大学医学院化学教研室(515031) 方冶\* 张鲁勉 何小英 梁友竹

**摘要** 以黄芩素进行试验,建立了黄芩素的化学发光测定法,并应用于市售制剂中有效成分的检测, $RSD = 0.65\%$  ( $n = 10$ ),回收率为  $(98 \pm 3)\%$  ( $n = 6$ );本法可用于其它多羟基黄酮化合物的检测,检测结果从本质上反映多羟基黄酮化合物生物活性和药理作用的强弱。

**关键词** 多羟基黄酮 黄芩素 化学发光法

### Detection of Scutellarein Derivative by Chemiluminescent Analysis

Department of Chemistry, Medical College of Shantou University (Shantou 515031) Fang Ye, Zhang Lumian, He Xiaoying and Liang Youzhu

**Abstract** A chemiluminescent analysis (CLA) for the detection of scutellarein derivatives was established. Results showed that the  $RSD = 0.65\%$  ( $n = 10$ ), the average rate of recovery was  $(98 \pm 3)\%$  ( $n = 6$ ). The CLA method may be applicable to other poly-hydroxy flavones, and to predict their biological and pharmacological potentials.

**Key words** poly-hydroxy flavone scutellarein chemiluminescent analysis

多羟基黄酮化合物是植物界分布最广泛的黄酮类化合物,具有多种生物活性和药理作用;如槲皮素是抗癌成分之一<sup>[1]</sup>。传统上多羟基黄酮化合物用比色法检测<sup>[2]</sup>;该法基于酚羟基的颜色反应,特异性差,干扰因素多,且多羟基黄酮化合物的多种生物活性和药理作用与其抗自由基氧化的作用密切相关<sup>[1,3,4]</sup>,比色法根本无法揭示这一作用的强弱。化学发光法因其灵敏度高,准确性好,重现性强,操作简便,近年来已在生物样品的检测中有较广泛的应用。本文以黄芩素进行试验,提出多羟基黄酮化合物

的化学发光检测法,测定样品抗自由基氧化作用的能力,测定结果在本质上反映样品的生物活性和药理作用的强弱。

#### 1 材料和方法

1.1 仪器和试剂: HF-1 化学发光仪;黄嘌呤氧化酶(XOD,东风公司,1.938 U/mL,0.313 U/mL),超氧化物歧化酶(SOD,华东理工大学,6000 U/mg),次黄嘌呤(HX,Fluka),鲁米诺(Luminol,Merck-Schuchardt),黄芩素(SD,从市售黄芩中提取,重结晶法纯化后为黄褐色粉末),其它试剂均为

\* Address Fang Ye, Medical College of Shantou University, Shantou