

HPLC-MS在麝香酮分析中的应用

张皓冰¹, 陶奕¹, 洪筱坤², 王智华^{2*}

(1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 上海 200025; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 200032)

摘要: 目的 测定制剂中麝香酮含量。方法 标准加入法, 2,4-二硝基苯肼 (DNP) 衍生化法及高效液相/电喷雾-串联质谱法。结果 根据标准品麝香酮特有的质谱图对样品中的麝香酮进行了鉴别, 并在优化的高效液相及质谱条件下观察到了 $[M+H]^+$ 峰及其特征碎片峰。ESI 及 APCI 对 m/z 419 作 MS/MS 全扫描质谱图有相同的相对分子质量及断裂方式。回收率 102.5%, $RSD \leq 2.76\%$ ($n=5$)。结论 本方法可同时实现麝香酮的定性和定量分析。
关键词: 麝香酮; 标准加入法; 液相色谱-质谱联用法

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)11-0970-04

Application of HPLC-MS to analysis of muscone

ZHANG Hao-bing¹, TAO Yi¹, HONG Xiao-kun², WANG Zhi-hua²

(1. Institute for Parasitic Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025, China; 2. College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

Abstract **Object** To determine the content of muscone in preparation. **Methods** Standard addition, DNP derivatization and HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) were utilized. **Results** Identification of muscone hydrazone in the sample was based on the unique mass spectra of the standard. Under an optimum condition peak corresponding to $[M+H]^+$ ion and characteristic fragments for muscone hydrazone were observed. ESI and APCI full scan m/z 419 MS/MS had the same relative molecular mass and fragmentation pattern. The recovery was 102.5% with $RSD \leq 2.76\%$ ($n=5$). **Conclusion** The qualitative and quantitative determination on muscone could be fulfilled simultaneously.

Key words muscone; standard addition; HPLC-MS

麝香 (musk) 自古以来就是一种名贵的香料与中药。其芳香气味主要来源于其中所含的麝香酮 (muscone)。药理研究表明, 麝香酮是天然麝香中的重要生理活性成分^[1], 它的含量是评价主含麝香药品质量的重要指标之一。

关于麝香酮的含量测定方法, 文献报道采用 GC^[2,3], 也有柱前衍生化后进行 HPLC^[4], TLC^[5] 以及收集 HPLC 洗脱液作 EI-MS 分析。本研究以麝香醒脑液原液为样品, 利用 2,4-二硝基苯肼与样品中的麝香酮进行衍生化反应, 并通过标准加入法, 采用液相-质谱 (HPLC/MS) 联用技术, 测定样品中麝香酮的含量。本实验同时实现了麝香酮的定性与定量分析。

1 实验部分

1.1 药品与仪器: 麝香醒脑液原液, 成都市药物制

剂研究所; 麝香酮, 中国药品生物制品检定所; 乙腈 (AR) E. Merck 公司; 2,4-二硝基苯肼 (AR), 上海试剂三厂; Finigan LCQ 离子阱液相-质谱联用仪; TSP UV 6000 检测器; ESI 离子源; Inertsil ODS-3 (5 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 麝香酮标准储备液的配制: 取 200 mg 麝香酮对照品, 溶解于 50 mL 乙腈中, 配制成 4 mg/mL 的麝香酮标准储备液。

1.2.2 2,4-二硝基苯肼溶液的配制: 称取 500 mg 2,4-二硝基苯肼 (DNPH), 加入浓硫酸-水-乙醇 (2:3:10) 混合液 30 mL, 摇匀, 待溶解后滤过备用 (2 d 内使用)。

1.3 衍生物的制备及待测溶液的配制

1.3.1 标准品衍生物溶液的制备: 精密量取 0.5

* 收稿日期: 2002-02-16

作者简介: 张皓冰 (1962-), 女, 四川人, 副研究员, 上海中医药大学博士生, 研究方向为中药质量分析。

Tel (021) 64377008-2603 E-mail zhanghaobing@yahoo.com

mL麝香酮标准储备液(含 2 mg 麝香酮对照品),加入上述 2,4-二硝基苯肼溶液 1 mL,混匀后于室温静置 1 h,待结晶完全析出后,抽滤,沉淀在减压下水洗至中性,抽干并溶解于 5 mL 乙腈中(溶液 I),进行 MS、MS²、MS³ 及 HPLC/MS 分析。

1.3.2 样品衍生物的制备:精密量取 0.5 mL 麝香醒脑液原液,加入上述 2,4-二硝基苯肼溶液 1 mL,混匀后于室温静置 1 h,待固体完全析出后抽滤,沉淀在减压下水洗至中性,抽干后溶于 5 mL 乙腈中(溶液 II),进行 HPLC-MS 分析。

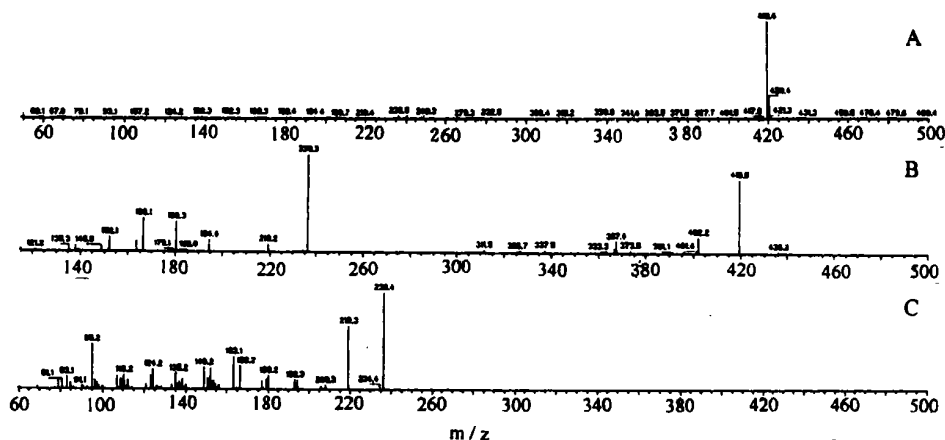
1.3.3 样品加标准品后衍生物的制备:精密量取 0.5 mL 麝香醒脑液原液,加入 0.5 mL 麝香酮标准储备液和 2 mL 2,4-二硝基苯肼溶液,混匀后于室温静置 1 h,待固体完全析出后抽滤,减压下沉淀水洗至中性,抽干后溶于 5 mL 乙腈中(溶液 III),进行 HPLC-MS 分析。

2 HPLC/MS 分析

2.1 标准品衍生物溶液(溶液 I)的 MS、MS² 及 MS³ 分析:进样方式: Syringe Pump;进样速度: 3 μ L/min;质谱条件:一级质谱: EIS 源,源电压 4.25 kV,正离子检测,毛细管温度 200 $^{\circ}$ C,鞘气(N₂),流速 60 au,辅助气(He),流速 10 au,二级、三级质谱相对碰撞能量 25%。

在本研究中,标准品进行衍生化后,通过简单的分离并配制成溶液 I,从其一级质谱图中 DNPH 的 [M+H]⁺(m/z 199)特征峰的存在与否来判断是否有 DNPH 残留。图 1-A 是对照品麝香酮脎一级质谱图。从谱图中基本上只能观察到 m/z 419,为麝香酮脎的 [M+H]⁺ 峰。图 1-A 从 m/z 50~250 局部放大(图 2),仍然观察不到 DNPH 的有关特征峰。从局部放大图还给出了规律性很强的碎片信息。

进一步作 m/z 419 全扫描二级质谱图(图 1-B),



A-麝香酮脎(溶液 I) ESI B-m/z 419 MS² C-m/z 236 MS³

图 1 全扫描质谱图

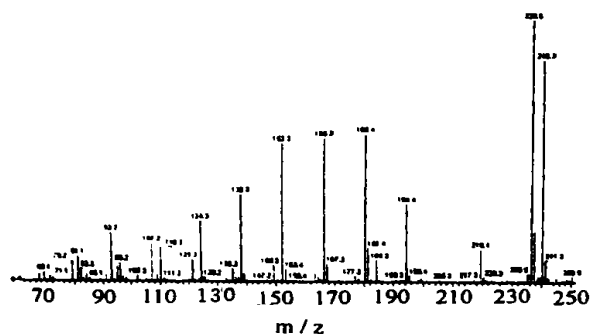


图 2 图 1-A(MS 一级全扫描图) m/z 50 至 250 放大图。基峰为 m/z 236,低质量区碎片离子与图 2 所给出的碎片模型相同,而 m/z 236 的三级质谱图更加清楚地表明了上述低质量碎片的产生过程,应该来自于 m/z 236 碎片离子。m/z 419 $\rightarrow$ 236 的可能断裂方式图 3 所示:

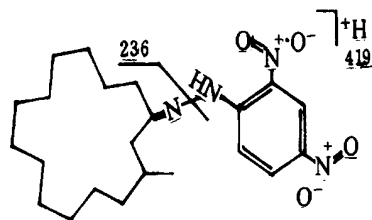


图 3 麝香酮脎的可能断裂方式

图 1-C 为 m/z 236 全扫描三级质谱图谱,其片段质荷比 m/z 194 $\rightarrow$ 180 $\rightarrow$ 166 $\rightarrow$ 152 $\rightarrow$ 138 $\rightarrow$ 124 $\rightarrow$ 110 之差等于 14 或其倍数,为 (-CH₂)_n 中性丢失,体现了脂环族化合物的裂解规律。

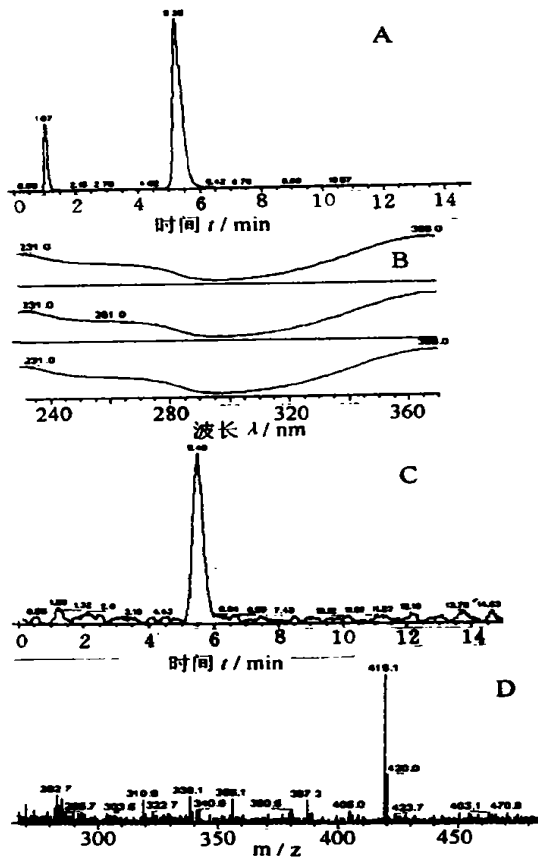
2.2 HPLC 分离效果及结构确证

2.2.1 分析条件: HPLC 分析条件: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 2.1 mm $\times$ 150 mm) 微型柱, 98% 乙腈-水为流动相,流速为 0.4 mL/min, 230~370 nm 扫描,进

样量 $20\mu\text{L}$

质谱条件: 正离子检测, 源电压 4.25 kV , 毛细管温度 200°C , 鞘气 (N_2) 流速 60 au , 辅助气 (He) 流速 10 au

2.2.2 HPLC/MS分析: 分别精密量取 $50\mu\text{L}$ 溶液 I、溶液 II 及溶液 III, 各加入 $150\mu\text{L}$ 乙腈, 混匀。HPLC/MS分析如图 4~6

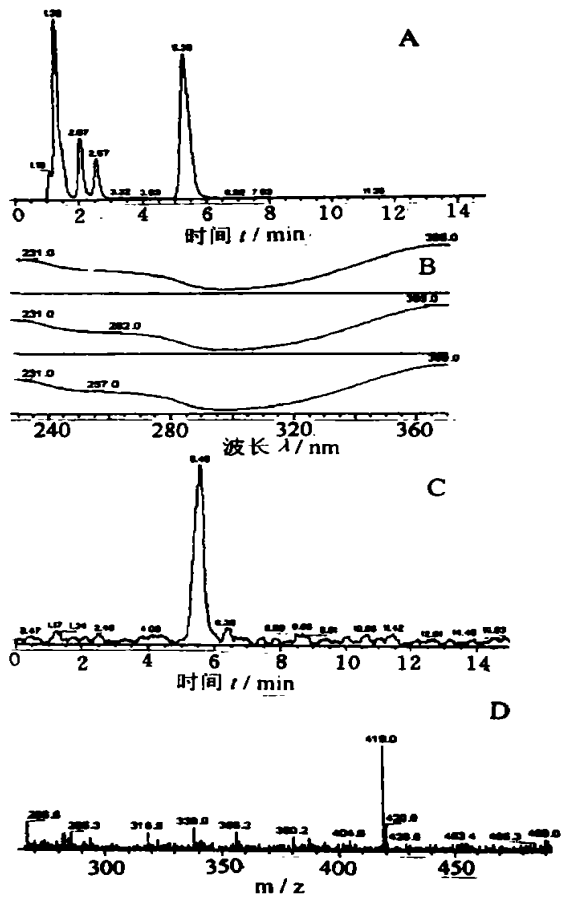


A 麝香酮醇 (溶液 I) HPLC 图 B-A 图 $t_{\text{R}} = 5.35, 5.05$ 及 5.65 min $230\sim 370\text{ nm}$ UV 全扫描图 C-E SI m/z 419 单离子监测色谱图 D-C 图相应的 ESI 全扫描质谱图

图 4 麝香酮醇 HPLC/UV 及 HPLC/ESI-MS 图谱

图 4~6 分别为溶液 I、II、III 的 HPLC 色谱图、相应的 UV 扫描图 $[M+H]^+$ (麝香酮醇准分子离子) 单离子监测 (single ionic monitoring, SIM) 色谱图及其相应的质谱图。在 HPLC 图中, 取 $t_{\text{R}} - 0.3, t_{\text{R}}, t_{\text{R}} + 0.3$ 3 个时间点的 UV 全扫描图。由于 ESI 离子源对该化合物的电离状况不佳, LC/MS/MS 难以观察到 m/z 419 片段的二级电离。但如采用 APCI 离子源, 则可获较为理想的 LC/MS/MS 图谱 (图 7)。标准溶液及样品溶液的 m/z 419 MS/MS 全扫描图谱与图 1-B 一致。说明标准溶液及样品溶液中的待分析组分为同一化合物麝香酮醇。

3 结果与讨论



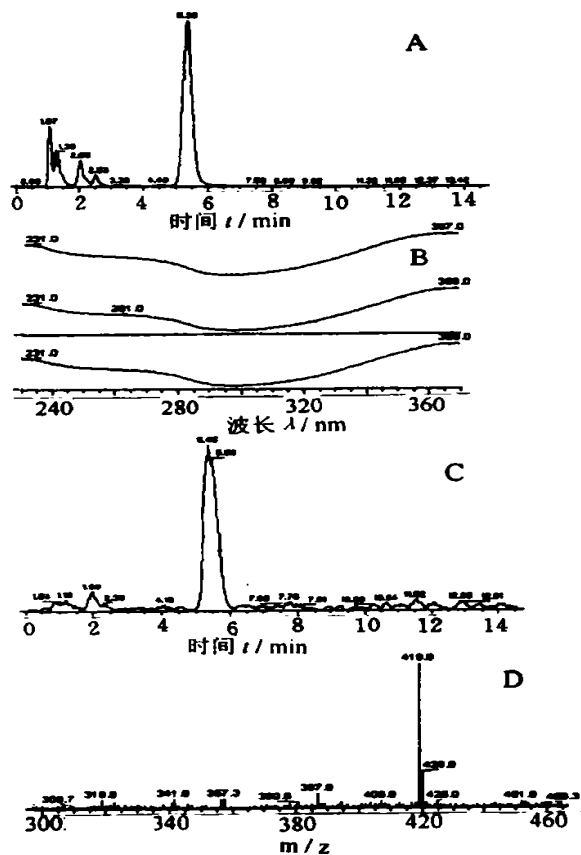
A 样品醇 HPLC 图 (溶液 II) B-A 图 $t_{\text{R}} = 5.35, 5.05$ 及 5.65 min $230\sim 370\text{ nm}$ UV 全扫描图 C-E SI m/z 419 单离子监测色谱图 D-C 图相应的 ESI 全扫描质谱图

图 5 样品醇 HPLC/UV 及 HPLC/ESI-MS 图谱

3.1 实验中所采用的衍生化学方法简单易行, 反应稳定。反应体系中麝香酮醇以沉淀析出, 而 2,4-二硝基苯肼仍存留于溶液中, 因而只需进行抽滤便可将二者完全分离, 无论对标准品还是样品均无需再采用重结晶或层析等其他分离手段。我们也曾经采用文献中所报道的方法^[3]进行麝香酮的衍生化实验, 但由于 DNPH 在此反应中溶解度较小, 随麝香酮醇的生成一起沉淀出来, 难以分离。在文献^[4]中所报道的样品 HPLC 谱图中 3 min 左右有明显的 DNPH 色谱峰, 本研究中 HPLC 色谱图或质谱图中均观察不到 DNPH 残留。

3.2 本实验采用标准加入法, 旨在补偿待测组分在衍生化过程中的损失。在 HPLC 图谱上, 可观察到溶液 I 与溶液 II 中待测组分峰面积之和与溶液 III 中待测组分峰面积基本相等 (回收率 102.5% , $n=5$), 说明用该法定量结论可信。

3.3 3 种溶液 HPLC 峰形规则, 保留时间相等或相近, 分别取其 $t_{\text{R}} - 0.3, t_{\text{R}}, t_{\text{R}} + 0.3$ 3 个时间点的 UV



A-加入麝香标准品的样品腺 HPLC图 (溶液Ⅲ) B-A图 $t_R=5.33, 5.03$ 及 5.63 min 230~370 nm UV全扫描图 C-ESI m/z 419单离子监测色谱图 D-C图相应的 ESI全扫描质谱图

图 6 加入麝香酮标准品的样品腺 HPLC/UV 及 HPLC/ESI-MS图谱

扫描图谱,峰形一致,峰纯度高。质谱图中 m/z 419 片段为麝香酮腺准分子离子峰。各待测液均连续 5 次进样, $RSD \leq 2.76\%$ ($n=5$)。

3.4 测定结果按下式计算^[6,7]:

$$W = \frac{\Delta W}{\Delta A} \times A$$

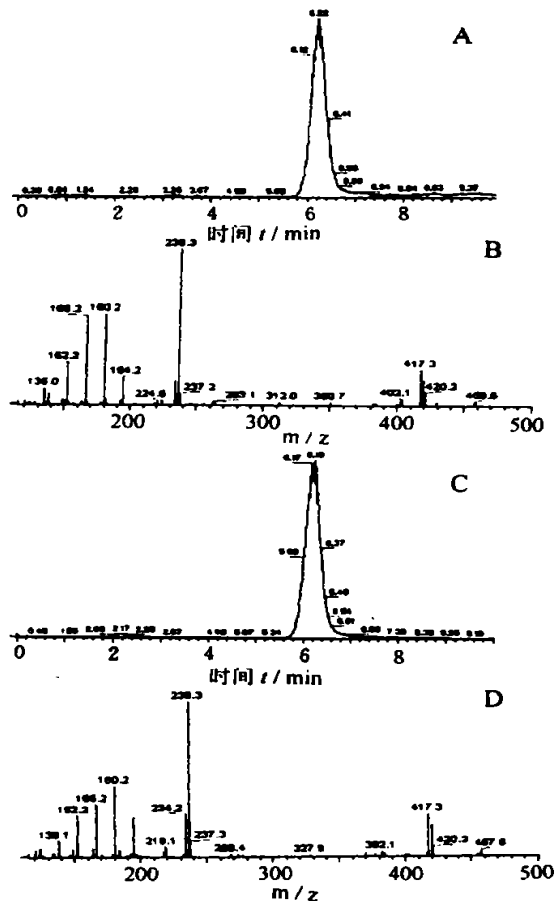
W 样品中待测组分的含量; ΔW 加入的待测组分量; ΔA 加入待测组分前后所测的峰面积之差; A 样品中待测组分的峰面积;

$$\text{即: } W = \frac{4 \text{ mg}}{478.7173 - 210.8228} \times 210.8228 \\ = 3.15 \text{ mg/mL}$$

麝香酮注射液原液中麝香酮含量为 3.15 mg/mL

3.5 本法用 MS 定量时,采用 ESI 离子源,麝香酮腺电离状况不佳,误差较大。采用 APCI 离子源,以 419→236 离子流峰面积定量,结果与本法相近。

3.6 流动相如采用 92% 乙腈-水, 95% 乙腈-水也可得到较好的分离效果,但 t_R 延长,峰形展宽,采用 98% 乙腈-水流动相峰形好,分析时间短。进样器、色



A-麝香酮腺 LC/APCI-MS² m/z 419 单离子监测色谱图 B-A图相应峰 m/z 419 MS/MS 全扫描质谱图

图 7 麝香酮腺 HPLC/APCI-MS² 图谱

谱柱、离子源及离子阱等均无明显残留。

3.7 采用标准曲线法时,麝香酮腺在 0.44~47.2 $\mu\text{g/mL}$ 峰面积与浓度呈线性关系,线性方程为 $Y = 35819.6 + 23371.5X$, $r = 0.9999$,有关方法学研究的具体实验数据本文不再详述。麝香酮衍生化后,分析体系简化, HPLC 分离条件亦相应简化。有 UV 吸收,最大吸收波长在 231 nm 及 367 nm。LC/MS 联用从定性及定量两方面证实该法的可靠性,由此可拓宽 HPLC 的分析范围。

参考文献:

- [1] 陈雪,高兆润.天然麝香研究概况[J].中草药,1981,12(5): 44-48.
- [2] 张正环,乐佩芳.天然麝香中麝香酮的气相色谱法测定[J].药学报,1982,17(12): 922-927.
- [3] 洪筱坤,王智华,朱孝云.麝香质量标准初探[J].中国中药杂志,1991,16(4): 230-232.
- [4] 吴悦,吴鹏,肖宣,等.天然麝香、养香和原香的 HPLC 分析[J].药学报,1989,24(4): 303-311.
- [5] 崔文花,金美花.薄层-分光光度法测定中成药中麝香酮的含量[J].延边医学院学报,1995,18(1): 28-30.
- [6] 汪正范.色谱技术丛书: 色谱定性及定量[M].北京: 化学工业出版社,2000.
- [7] 李发美.医用高效液相色谱技术[M].北京: 人民卫生出版社,1999.