

实时直接分析-串联质谱法快速分析乳香中多种乳香酸

孙磊, 胡晓茹, 金红宇, 林瑞超

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 应用实时直接分析-串联质谱法(DART-MS/MS)在未经前处理和色谱分离的情况下快速鉴别乳香中乳香酸类成分。方法 使用全扫描采集乳香的DART-MS特征图谱,并对乳香酸类成分进行二级质谱确证。结果 药材和提取液的负模式全扫描质谱图中可见11-羧基- β -乙酰乳香酸(m/z 511)、11-羧基- β -乳香酸(m/z 469)、 α 及 β -乳香酸(m/z 455)、 α 及 β -乙酰乳香酸(m/z 497)等成分的 $[M-H]^-$ 离子,正模式质谱图中可见11-羧基- β -乙酰乳香酸(m/z 513)和11-羧基- β -乳香酸(m/z 471)的 $[M+H]^+$ 离子,提取液中的正离子 m/z 513和 m/z 471的CID二级图谱分别与11-羧基- β -乙酰乳香酸和11-羧基- β -乳香酸对照品的一致。结论 本法简便、专属性强,为药材、饮片的快速鉴别提供了新思路,具有实用价值。

关键词: 实时直接分析; 串联质谱; 乳香; 11-羧基- β -乙酰乳香酸; 11-羧基- β -乳香酸

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1320-04

Fast detection of boswellic acids in *Olibanum* by direct analysis in real time-tandem mass spectrometry

SUN Lei, HU Xiao-ru, JIN Hong-yu, LIN Rui-chao

National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish a method for rapid detection of boswellic acids in *Olibanum* without sample pretreatment and liquid chromatography separation by direct analysis in real time-tandem mass spectrometry (DART-MS/MS). **Methods** The samples were analyzed using DART-MS with full scan. **Results** The full scan MS of both *Olibanum* and its extracting solution gave $[M-H]^-$ signals at m/z 511, 469, 455, and 497 under negative ion mode, which were corresponding to acetyl-11-keto- β -boswellic acid, 11-keto- β -boswellic acid, β -boswellic acid (α -boswellic acid), and acetyl- β -boswellic acid (acetyl- α -boswellic acid). Under positive ion mode, the boswellic acids showed $[M+H]^+$ signals at m/z 513 and 471 which were corresponding to acetyl-11-keto- β -boswellic acid and 11-keto- β -boswellic acid. The CID secondary spectrum of acetyl-11-keto- β -boswellic acid and 11-keto- β -boswellic acid in positive ion mode of extract and references substances were the same. **Conclusion** The method is simple, specific, and can be used for rapid identification of Chinese materia medica and prepared slices of *Olibanum*.

Key words: direct analysis in real time (DART); tandem mass spectrometry (MS/MS); *Olibanum*; acetyl-11-keto- β -boswellic acid; 11-keto- β -boswellic acid

乳香为常用进口药材,具活血定痛、消肿生肌之功效。我国习用品的原植物主要为橄榄科乳香属植物乳香树 *Boswellia sacra* Flück., 异名 *B. carterii* Birdw. 和纸乳香树 *B. papyrifera* (Del.) Hochst.^[1], 印度习用品与《欧洲药典》收载品的原植物为齿叶乳香树 *B. serrata* Roxb.^[1-2]。乳香的有效成分乳香酸类(boswellic acid, BAs)^[3-4]主要有 α -乳香酸、 α -乙酰乳香酸、 β -乳香酸、 β -乙酰乳香酸、11-羧基- β -乳香

酸、11-羧基- β -乙酰乳香酸。BAs的检测方法有薄层色谱法^[2,5]、高效液相色谱法^[2,6-8]和液质联用法^[9-10]等,这些方法均需对样品进行前处理和色谱分离,不够简便快捷。

直接离子化质谱技术能在未经前处理和色谱分离的情况下实现对样品的分析,是近年分析技术的研究热点之一,目前商品化的有电喷雾解吸电离(DESI)^[11]和实时直接分析(DART)^[12]两种。其

收稿日期: 2011-12-01

基金项目:《中国药典》2010版项目(YZ-215)

作者简介: 孙磊(1981—),男,助理研究员,研究方向为中药、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

网络出版时间: 2012-05-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120516.1409.001.html>

中, DART 无需溶剂辅助离子化, 操作更简便, 在药品非法添加检测^[13]、植物药成分分析^[14-15]和食品中农药残留快速筛选^[16]等方面均有应用。本研究首次建立了 DART-MS/MS 快速检测乳香中 BAs 的方法, 为乳香的快速质谱分析和 DART 在中药材中的应用提供了参考。

1 仪器与材料

DART SVP 离子源(美国 Ion Sense 公司); Agilent 6410B 串联四极杆质谱仪(美国 Agilent 公司)。甲醇为分析纯, 购于北京化工厂。 β -乳香酸(β -BA)、 β -乙酰乳香酸(β -ABA)和 11-羧基- β -乳香酸(KBA)购自美国 Chromadex 公司, 11-羧基- β -乙酰乳香酸(AKBA, 批号 111710-200601)来自中国食品药品检定研究院, 乳香由国家药典委员会提供, 产自埃塞俄比亚, 由中国食品药品检定研究院张南平副主任药师鉴定为 *Boswellia papyrifera* (Del.) Hochst. 的树脂。

2 方法与结果

2.1 DART 及质谱仪参数

DART 参数: 离子源、传送管间距 25 mm; 电晕针电压 4 000 V; 氦气体积流量 4 L/min; 气流温度 400 °C; 出口电极偏转电压分别为 +100 V 或 -100 V。串联质谱仪参数: 毛细管电压 4 000 V; 锥孔电压 100 V; 相对分子质量范围 150~700; 采用正、负离子模式分别扫描。

2.2 样品制备

取 AKBA、KBA、 β -BA 和 β -ABA 制成各含 200 μ g/mL 的对照品溶液。取直径约 1 cm 的乳香, 水洗去表面粉尘, 晾干备用。另取乳香约 50 g, 粉碎, 称取 0.1 g, 加甲醇 10 mL, 超声 10 min, 过 0.45 μ m 滤膜备用。

2.3 DART 质谱法

用 DART 离子源替换质谱仪的 ESI 源, 分析时将乳香药材或提取液(置玻片上)置于 DART 源与传送管中间。离子源先通过电晕针高压放电将氦气流变为等离子体, 加热过滤后的粒子流与空气中的水分子或氧气分子作用产生质子化的水分子簇(正模式)或负离子簇(负模式), 质子化的水分子簇或负离子簇使样品表面的待测物解吸并离子化, 最后待测离子经传送管引入质谱仪分析, 由于该过程不使用溶剂, 在正模式下不产生 ESI 或 DESI 中常出现的钾、钠加合离子, 主要为 $[M+H]^+$ 离子, 负模式下主要为 $[M-H]^-$ 离子, 质谱图简明, 易于解析。

2.4 BAs 的 DART-MS 分析

空气中的某些成分也产生质谱响应, 为与样品信号区分, 进行了空白试验。结果表明, 负模式下主要离子为 m/z 297, 正模式下主要离子为 m/z 199、217、245 和 279。BAs 为三萜酸类成分, 易失去质子, 文献方法^[5,10]均采用 ESI-模式检测, 本实验亦先进行 DART 源的负模式分析。在乳香药材的负模式特征图谱中, 可见 m/z 455、469、497 和 511, 与 β -BA、KBA、 β -ABA 和 AKBA 对照品产生的 $[M-H]^-$ 峰一致, 此外尚有 m/z 367、383 和 399 等离子, 因缺少文献和对照品支持, 未作解析, 见图 1-A。另据文献^[4-5,10,17], 乳香尚含 α -乳香酸(α -BA)、 α -乙酰乳香酸(α -ABA)和 3-acetyl-8, 24-diene-tirucallic acid (ATA), 而 DART 质谱分析未经色谱分离, 因此 m/z 455 离子对应 α -BA 和 β -BA, m/z 497 对应 α -ABA、 β -ABA 和 ATA。考虑到气流温度较高, 乳香又富含挥发性成分, 长时间直接分析药材或对质谱仪有污染, 后续试验使用提取液来替代。由图 1-B 可见, 提取液与药材的质谱图基本一致, 但 BAs 的响应相对更高。

本研究还进行了 BAs 对照品和乳香提取液的正模式分析, 由图 1-C 可见, 提取液质谱图中可见与 KBA 和 AKBA 对照品相应的 $[M+H]^+$ 峰 m/z 471 与 513, 与文献报道的 ESI 源结果一致^[9], 产生加氢峰的原因是两者的结构中含有羰基, 相对容易结合质子。 β -ABA 对照品在正模式下无 $[M+H]^+$ 峰, 而是产生 m/z 453 和 439 的碎片离子, 分别对应 $[M-COOH]^+$ 和 $[M-CH_3COO]^+$, 这两个碎片离子在图 1-C 提取液的质谱图中也明显可见, 同样的, 提取液中的两个特征峰还对应 α -ABA。 β -BA 对照品在正模式下不产生 $[M+H]^+$ 离子或明显的特征碎片离子, 不适合正模式分析。

2.5 BAs 的 DART-MS/MS 分析

考虑到一级质谱或有假阳性, 进行了正模式的子离子扫描确认。结果表明, 提取液中的 m/z 513 和 m/z 471 准分子离子峰的 CID 图谱与 AKBA 和 KBA 对照品的一致, 提取液中的碎片离子 m/z 453 和 m/z 439 的质谱图与 β -ABA 对照品对应碎片离子一致。图 2-A 即 m/z 513 的子离子扫描图(碰撞能量 40 V), 其中 m/z 453 由 m/z 513 脱去 CH_3COOH 获得, m/z 453 丢失 $HCOOH$ 形成 m/z 407, 其余大部分碎片由 AKBA 骨架开裂所得, 这些碎片离子的相对分子质量差 12 或 14, 即相差一个 C 或 CH_2 , 该

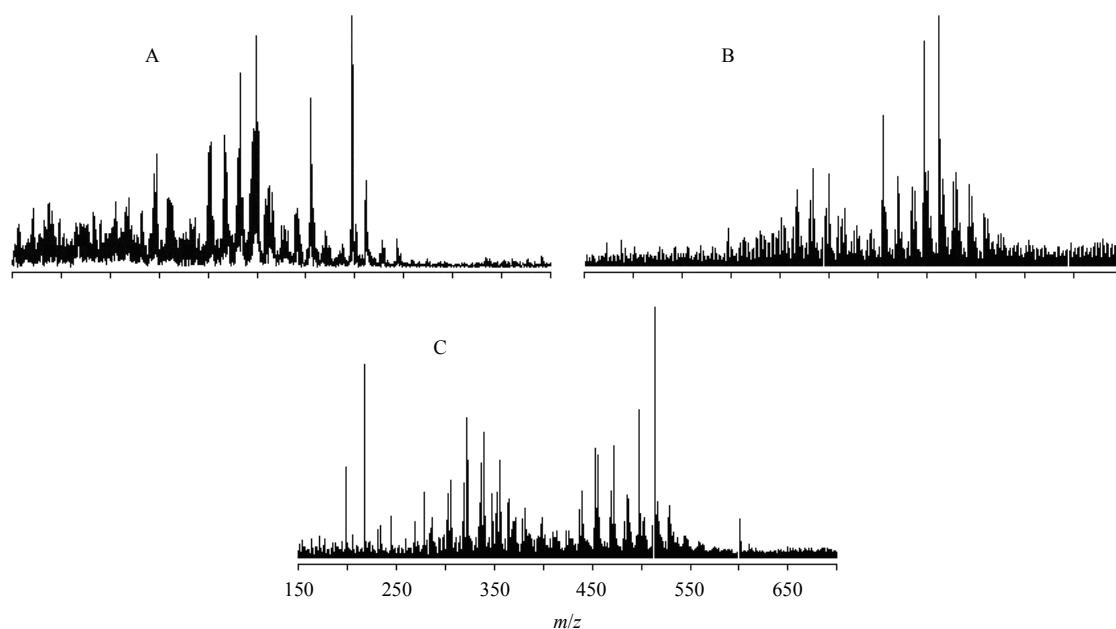


图1 乳香 (A, 负模式) 和提取液 (B, 负模式; C, 正模式) 的 DART-MS 质谱图

Fig. 1 DART-MS (A, negative mode) and extracting solution of *Olibanum* (B, negative mode; C, positive mode)

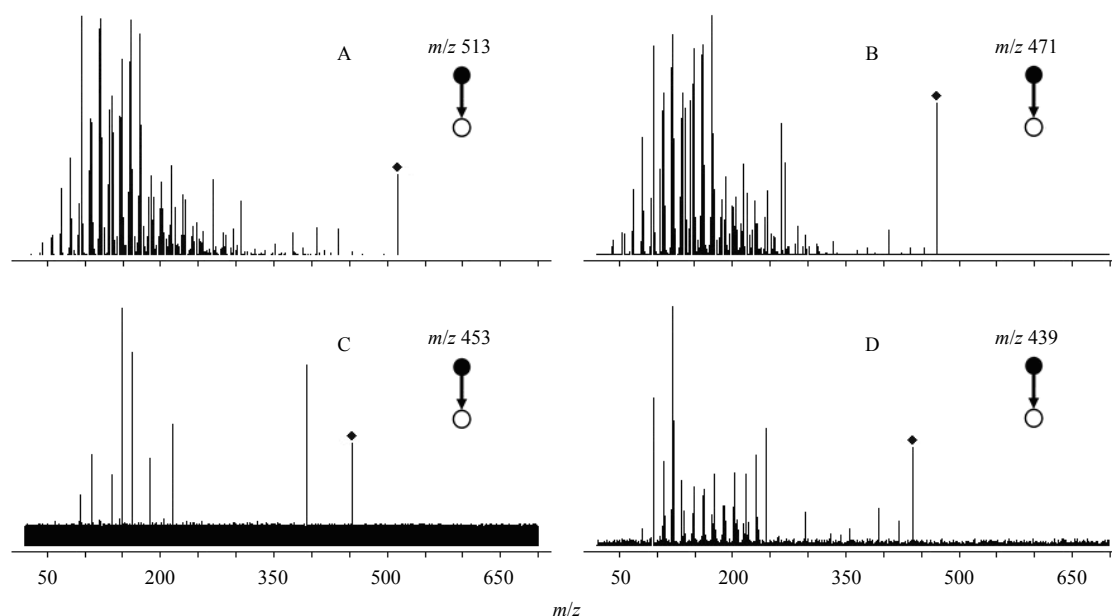


图2 AKBA (A), KBA (B), 碎片离子 m/z 453 (C) 和 439 (D) 的 DART-CID 质谱图

Fig. 2 DART-CID-MS of AKBA (A), KBA (B), fragments m/z 453 (C) and 439 (D)

质谱图与文献中的 ESI 源二级质谱图基本一致^[9], 与文献中的 EI 源一级质谱图也极其类似^[17], 均有 m/z 43、55、81、95、135、173 等骨架开裂产生的碎片离子。图 2-B 为 m/z 471 的子离子扫描图 (碰撞能量 40 V), 其中 m/z 453 由 m/z 471 的羟基断裂脱 H_2O 所得, 它的结构与 AKBA 中的 m/z 453 相同, 其他碎片离子如 m/z 407 和骨架开裂所得一系列碎片的结构也与 AKBA 的一致。图 2-C 为 m/z 453 的子离

子扫描图 (碰撞能量 15 V), 其中 m/z 393 由 m/z 453 脱去 CH_3COOH 形成, 其余碎片由 β -ABA 骨架开裂获得, 裂解规律类似 AKBA。图 2-D 为 m/z 439 的子离子扫描图 (碰撞能量 20 V), 其中 m/z 393 由 m/z 439 丢失 $HCOOH$ 所得, 其余碎片类似 β -ABA。

3 讨论

气流温度会影响待测物的离子化效率, 是 DART 源的关键参数, 本实验的优化方法为: 取对

照品溶液 5 μL 滴于条形玻片上并吹干, 在不同的气流温度下置滑轨上进行全扫描, 选择信号强且稳定时的参数, 由于 BAs 挥发性差, 在较高温度下才能解吸电离, 气流温度最终选择 400 $^{\circ}\text{C}$ 。

本研究应用 DART 技术建立了快速、专属鉴别乳香的新方法, 分析过程无需样品处理(或简单制备)和色谱分离即可检测乳香的 BAs 成分, 其中一级的 DART-MS 特征图谱包含了多种 BAs 的 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ 及 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 的离子信息, 具有明显的指纹特征, 二级质谱获得了相应成分的碎片信息。对乳香等树脂类药材, 已粉碎的药粉、提取物等较难依靠外观性状和显微鉴别等快速鉴别手段, 使用 DART-MS/MS 法可以迅速准确地识别, 且无需对照品。但由于未经色谱分离, 在分析同分异构体时有一定缺憾。总体来说, 该法具有原位、直接、无损、快速、高通量的独特优势, 在中药分析和质量控制等领域具有较好的应用前景。

参考文献

- [1] 孙磊, 徐纪民, 金红宇, 等. 乳香基原的本草学、植物学和成分分析研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(2): 112-116.
- [2] EP 7.0 [S]. 2010.
- [3] 常允平, 韩英梅, 张俊艳. 乳香的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 52-59.
- [4] 王峰, 华会明, 王淑美, 等. 乳香的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1293-1296.
- [5] 费毅琴, 孙磊, 程显隆, 等. 四级杆飞行时间串联质谱 (QToFMS) 辅助高效薄层色谱 (HPTLC) 鉴别乳香中乳香酸 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(20): 1601-1604.
- [6] 孔静, 于海云, 耿桂霞, 等. HPLC 法测定乳香药材中 11-羧基- β -乙酰乳香酸的含量 [J]. 齐鲁药事, 2007, 26(7): 403-404.
- [7] 孙磊, 刘丽娜, 金红宇, 等. 乳香、制乳香含量测定研究 [J]. 中国药事, 2010, 24(10): 972-974.
- [8] 王淳, 夏磊, 宋志前, 等. 乳香中 5 种乳香酸成分含量分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1330-1333.
- [9] Reising K, Meins J, Bastian B, et al. Determination of boswellic acids in brain and plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(20): 6640-6645.
- [10] Frank A, Unger M. Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1112(1/2): 255-262.
- [11] Takáts Z, Wiseman J M, Gologan B, et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization [J]. *Science*, 2004, 306(5695): 471-473.
- [12] 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): 2297-2302.
- [13] 程显隆, 李文杰, 李卫健, 等. DART-MS/MS 法直接实时检测保健食品中非法添加的 6 个 PDE5 抑制剂的应用研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 438-442.
- [14] 孙磊, 胡晓茹, 刘丽娜, 等. 实时直接分析-串联质谱法 (DART-MS/MS) 快速检测吐根中生物碱 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1426-1430.
- [15] Bajpai V, Sharma D, Kumar B, et al. Profiling of *Piper betle* Linn. cultivars by direct analysis in real time mass spectrometric technique [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(12): 1283-1286.
- [16] Edison S E, Lin L A, Gamble B M, et al. Surface swabbing technique for the rapid screening for pesticides using ambient pressure desorption ionization with high-resolution mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(1): 127-139.
- [17] Basar S. Phytochemical investigations on *Boswellia* species: Comparative studies on the essential oils, pyrolysates and boswellic acids of *Boswellia carterii* Birdw., *Boswellia serrata* Roxb., *Boswellia frereana* Birdw., *Boswellia neglecta* S. Moore and *Boswellia rivae* Engl. [D]. Istanbul: University of Hamburg, 2005.