

## 研究报告

## 液相色谱/电喷雾质谱联用法快速分析紫杉醇粗品中的组分

方东升

(福建省微生物研究所 福州 350007)

**摘要:** 应用液相色谱-电喷雾离子化质谱法快速分析紫杉醇粗品中各组分。方法:用 Nucleosil C18 (250 ×4.6mm, 5μm) 色谱柱; 甲醇/水 (65/35, V/V) 为流动相以 1mL/min 的流速洗脱; 检测波长 227nm; 柱温 40℃; 液相色谱出口分流 20% 进入离子阱质谱, 以电喷雾电离源正离子模式进行质谱数据采集。结果: 得到紫杉醇样品液相色谱图和质谱图, 对谱图进行分析归纳, 判断紫杉醇粗品中主要含有巴卡亭、10-去乙酰巴卡亭、三尖杉宁碱和 2", 3"-双氢还原三尖杉宁碱。结论: 本方法灵敏、可靠、快速, 对紫杉醇生产、质量监控具有指导意义。

**关键词:** 紫杉醇, 粗品, 电喷雾离子化质谱, 组分

## Analysis of crude taxol sample by LC - MS spectrometry

Fang Dongsheng

(Fujian Institute of Microbiology, Fuzhou, 350007)

**Abstract** objective: Crude taxol sample was analyzed by using liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry. Methods: column: Nucleosil C18 (250 ×4.6mm, 5μm); mobile phase: CH<sub>3</sub>OH - H<sub>2</sub>O (65/35, V/V); flow rate: 1ml/min; wavelength: 227nm; temperature: 40℃; 20% of the exit from liquid chromatography was pumped into the iontrap inside, the mass spectrometry and the mass spectral of components of the sample was analyzed Results: the crudetaxol sample contains baccatin, 10 - deacetyl baccatin, taxol, cephalomannine and dihydrocephalomannine according to LC/MS result Conclusion: LC - MS method is a sensitive, rapid and credible method for the analysis of crude taxol Sample

**Key words** taxol, crude sample, LC - MS spectrometry, components

## 1 前言

紫杉醇 (Paclitaxel, 商品名 Taxol) 是以红豆杉属植物为主要原料提取的一种二萜类化合物。自从美国化学家 Wani MC 和 Wau 首先从太平洋红豆杉中分离出紫杉醇并于 1971 年发表其化学结构以来, 美国和欧洲的科学家相继揭示出它的抗癌疗效<sup>[1,2]</sup>。临床细胞学研究表明, 紫杉醇具有促进微管双聚体装配成微管并使微管稳定, 从而阻碍细胞分裂, 抑制肿瘤生长的作用, 特别是二十世纪 80 年代以后, 临床报告还显示紫杉醇对抗药的人晚期卵巢癌、晚期乳腺癌及恶性黑色素癌等有显著的疗效<sup>[3]</sup>。

正因为紫杉醇独特的抗癌作用机理, 自面世以来保持着 20% 的年需求增长率。但由于紫杉醇是来源于植物的化学提取物, 而红豆杉属植物分布地域不同以及提取植物有效部位 (皮、叶、枝、根等) 不同, 分离出的除紫杉醇外的同类化合物已达百种以上, 大部分是与紫杉醇结构类似的紫杉烷类化合物<sup>[4-6]</sup>。目前对紫杉醇组分的主要检测方法有高效液相法和质谱法, 高效液相法<sup>[7]</sup>需要相应的标准品进行分析比较, 分析时间长, 灵敏度不高。质谱法是一种高灵敏度快速检测化合物的方法, 其中电喷雾离子化法的电离源属于 "软电离" 源, 样品分子

作者简介: 方东升 (1968 - ), 男, 工程师, 从事仪器分析和微生物新药筛选的研究。

靠带电液滴产生的库仑排斥力进入气相,不受到外部能量激发,因而样品分子一般不发生裂解,在一级质谱图上主要得到分子离子峰,通过对分子离子峰信息的归纳分析,可以直接得到化合物的分子量,从而推测出紫杉醇粗品中的杂质成分。本文主要介绍了液相色谱-电喷雾离子化质谱联用快速分析紫杉醇粗品中各组分的方法。

## 2 材料和方法

### 2.1 实验样品及试剂

紫杉醇粗品由福建省微生物研究所提供。试剂:甲醇(色谱纯,Merck产品);水为实验室制备的超纯水。

### 2.2 实验仪器

美国 Agilent公司 1100型高效液相色谱-离子阱质谱联用仪(LC/MSD Trap)。液相部分配有真空在线脱气机、双元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列(DAD)检测器,质谱仪配有电喷雾电离源(ESI源)和大气压化学电离源(APCI源)、直接进样注射泵,具有软电离和多级质谱功能。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 样品制备

取适量样品用甲醇溶解,稀释成浓度为 0.5mg/mL 样品溶液。

#### 2.3.2 液相色谱条件:

色谱柱: NucleosiC18 (5 $\mu$ m) 250mm  $\times$  4.6mm (id);流动相: 甲醇/水 = 65/35 (V/V);流速: 1mL/min;进样量: 10 $\mu$ L;检测波长: 227nm,柱温 40 $^{\circ}$ C。

#### 2.3.3 质谱扫描条件

液相色谱出口分流 20%进入质谱检测器 (0.2mL/min);离子化源:电喷雾离子化源(ESI源);极性检出模式:正模式( $MS^+$ );毛细管电压:4000V;雾化气压力 20psi,干燥气( $N_2$ )流速:6L/min;干燥气温度:300 $^{\circ}$ C;检测方式:一级全扫描。

## 3 结果与分析

### 3.1 实验结果

紫杉醇样品的 HPLC 色谱图见图 1,液相色谱主要分离出 5 个色谱峰,各组分保留时间和含量见表 1。

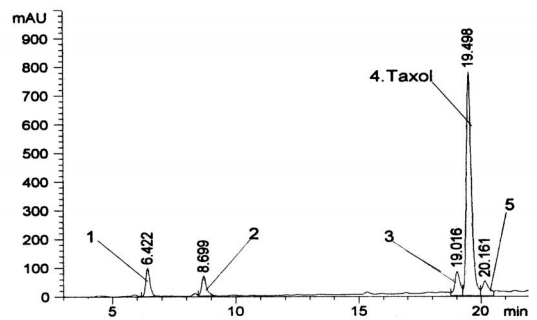


图 1 紫杉醇样品的 HPLC 图

表 1 液相色谱分离结果

组分	保留时间 (min)	含量 (Area%)
1	6.42	6.08
2	8.70	4.67
3	19.02	6.53
4	19.50	77.67
5	20.16	5.05

各组分对应的电喷雾离子化正离子检测模式一级质谱图见图 2、3、5、6、9。

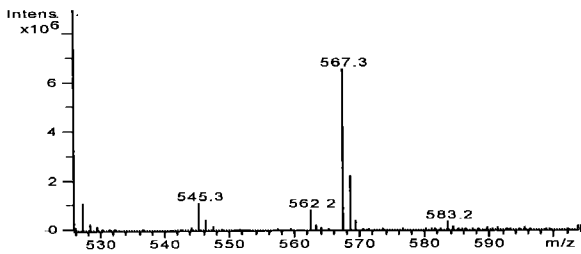


图 2 组分 1 质谱图 ( $MS^+$ )

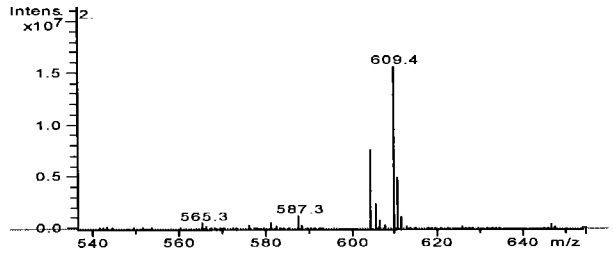
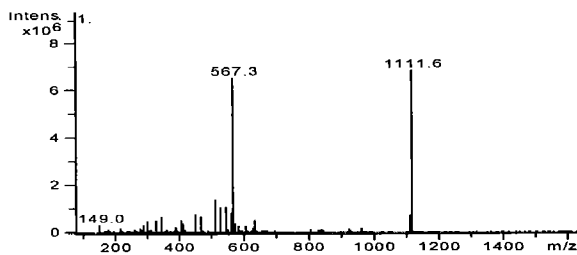
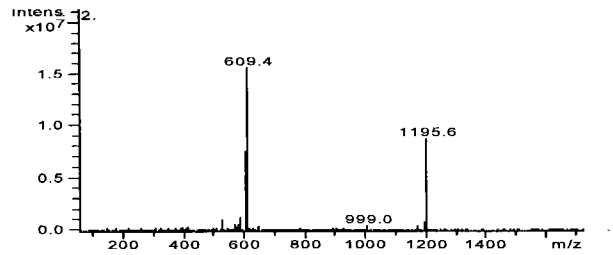


图 3 组分 2 质谱图 ( $MS^+$ )



### 3.2 结果分析与讨论

由图 2可以看出,组分 1 ( $t_r = 6.42\text{min}$ )所对应的准分子离子峰  $[M + H]^+$  为  $m/z = 545.3$ ,  $[M + Na]^+$  为  $m/z = 567.3$ ,  $[M + K]^+$  为  $m/z = 583.2$ ,  $[2M + Na]^+$  为  $m/z = 1111.6$ , 计算出组分 1 的分子量为 544.3, 应归属为巴卡亭<sup>[18]</sup> (分子量理论值为 544.60, 图 4)。

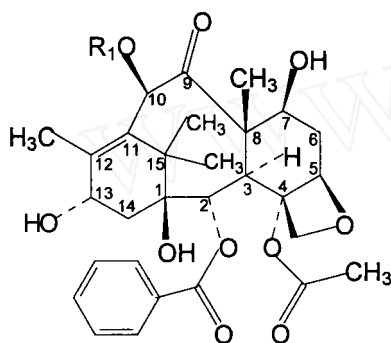


图 4 巴卡亭 和 10-去乙酰巴卡亭 结构式

由图 5可以看出,组分 3 ( $t_r = 19.02\text{min}$ )所对应的准分子离子峰  $[M + H]^+$  为  $m/z = 832.3$ ,  $[M + Na]^+$  为  $m/z = 854.4$ ,  $[2M + Na]^+$  为  $m/z = 1685.6$ , 计算出组分 3 的分子量为 831.3, 应归属为三尖杉宁碱<sup>[19]</sup> (分子量理论值为 831.91, 图 7)。

由图 6可以看出,含量最大的组分 4 ( $t_r = 19.50\text{min}$ )所对应的准分子离子峰  $[M + H]^+$  为  $m/z = 854.4$ ,  $[M + Na]^+$  为  $m/z = 876.4$ ,  $[M + K]^+$  为  $m/z = 892.3$ ,  $[2M + Na]^+$  为  $m/z = 1729.4$ , 计算出组分 4 的分子量为 853.4, 应归属为主要成分紫杉醇<sup>[6]</sup> (分子量理论值为 853.92, 图 8)。

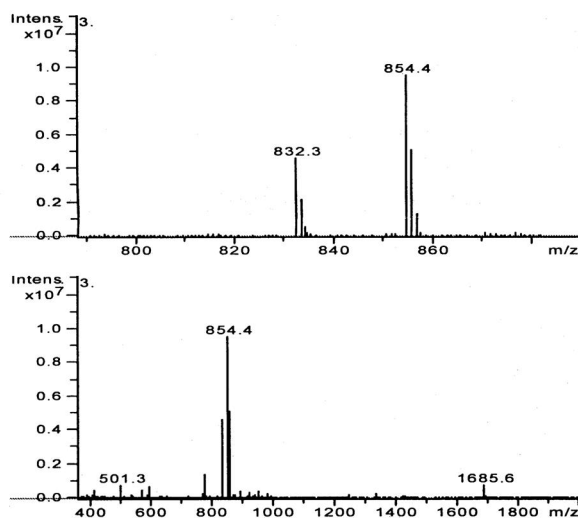


图 5 组分 3 质谱图 (MS+)

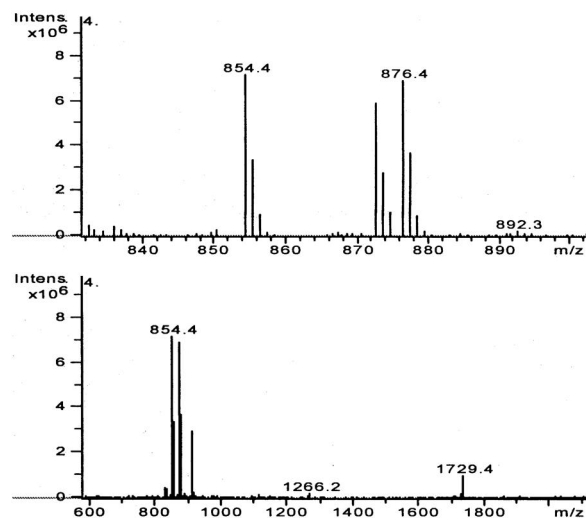


图 6 组分 4 质谱图 (MS+)

由图 3可以看出,组分 2 ( $t_r = 8.70\text{min}$ )所对应的准分子离子峰  $[M + H]^+$  为  $m/z = 587.3$ ,  $[M + Na]^+$  为  $m/z = 609.4$ ,  $[2M + Na]^+$  为  $m/z = 1195.6$ , 计算出组分 3 的分子量为 586.3, 应归属为 10-去乙酰巴卡亭<sup>[8]</sup> (分子量理论值为 586.64, 图 4)。

巴卡亭 (baccatin)  $R_1 = -COCH_3$

分子式:  $C_{31}H_{38}O_{11}$  分子量: 586.64

10-去乙酰巴卡亭 (10-deacetylbaccatin)  $R_1 = H$

分子式:  $C_{29}H_{36}O_{10}$  分子量: 544.60

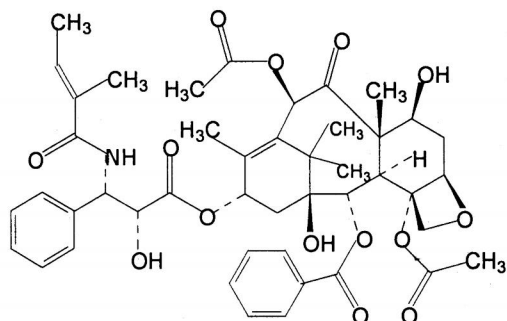
分子式:  $C_{45}H_{53}NO_{14}$  分子量: 831.91

图 7 三尖杉宁碱 (cephalomannine) 结构式

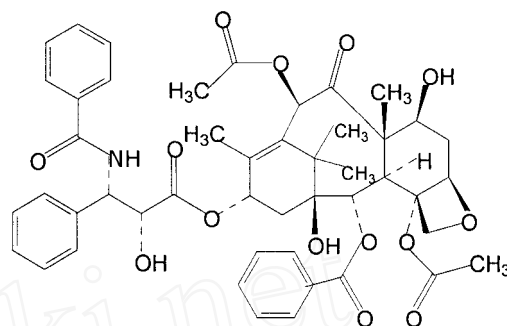
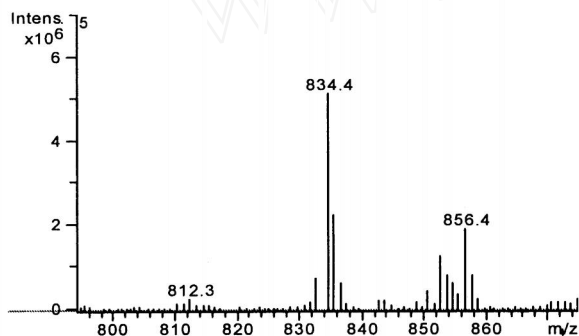
分子式:  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  分子量: 853.92

图 8 紫杉醇 (taxol) 结构式

图 9 组分 5 质谱图 (MS<sup>+</sup>)

由图 9 可以看出,组分 5 ( $t_r = 20.16 \text{ min}$ ) 所对应的准分子离子峰  $[M + H]^+$  为  $m/z = 834.4$ ,  $[M + Na]^+$  为  $m/z = 856.4$ , 由此计算出组分 5 的分子量为 833.4, 推测其可能归属为 2", 3" - 双氢还原三尖杉宁碱 (分子量理论值为 833.93, 图 10)。

## 4 结论

紫杉醇粗品中除含主要成分紫杉醇外, 还有巴卡亭、10-去乙酰巴卡亭、三尖杉宁碱和 2", 3" - 双氢还原三尖杉宁碱组分, 其中紫杉醇、巴卡亭、10-去乙酰巴卡亭、三尖杉宁碱组分均已经过标准品对照确认。巴卡亭、10-去乙酰巴卡亭、三尖杉宁碱可以作为合成抗癌药物紫杉醇的前体物, 他们主要存在于红豆杉植物的枝叶中, 目前已采用采集人工栽培的红豆杉枝叶并从中提取巴卡亭、10-去乙酰巴卡亭、三尖杉宁碱来人工合成紫杉醇的技术生产紫杉醇, 这有利于对红豆杉资源的保护性开发。而 2", 3" - 双氢还原三尖杉宁碱目前尚未见有文献报道其为天然产物, 仅在由三尖杉宁碱转化合成紫杉醇的文献中有报道三尖

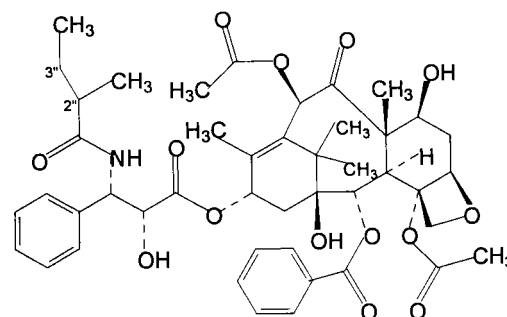
分子式:  $C_{45}H_{55}NO_{14}$  分子量: 833.93

图 10 2", 3" - 双氢还原三尖杉宁碱 (dihydrocephalomannine) 结构式  
杉宁碱双氢还原后产生 2", 3" - 双氢还原三尖杉宁碱产物 [9, 10], 因此在本文中对分子量为 833.4 的组分, 仅是推测其可能归属为 2", 3" - 双氢还原三尖杉宁碱。

应用液相色谱 - 电喷雾离子化质谱法分析紫杉醇粗品, 可以直接得到各组分的准分子离子峰  $[M + H]^+$ ,  $[M + Na]^+$  和  $[M + K]^+$ , 其中紫杉醇、巴卡亭、10-去乙酰巴卡亭、三尖杉宁碱还可以得到  $[2M + Na]^+$  峰, 从而得出各组分的分子量, 易于分析归属, 具有较高的可靠性和精密性。液相色谱 - 电喷雾离子化质谱法分离度好, 灵敏度高, 可快速分析紫杉醇样品中的各组分, 该方法对紫杉醇生产、质量监控具有指导意义。

## 参考文献

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME et al Plant antitumor agents VI The isolation and structure of taxol [J] Am Chem Soc 1971, 93 (9): 2325 ~ 2327.
- [2] 梅兴国, 鲁明波. 紫杉醇的抗癌作用及治疗其他疾病的潜力. 国外医学药学分册, 1996, 23 (3): 136 ~ 140.

(下转第 2151 页)

从表 1 中可以看出,单独加过量的硝酸银掩蔽效果不好。然而,在加了适量硝酸银硝酸铋联合掩蔽剂后,就可以比较好地消除氯离子干扰。当氯离子含量较高时,效果比用硫酸汞还要好。因此选定:当氯离子含量 < 500mg/L 时,硝酸银、硝酸铋溶液各加 1ml;当氯离子含量在 500 ~ 2000mg/L 时,硝酸银和硝酸铋溶液则各加 2ml,需要特别注意的是,不能采用滤去氯化银沉淀的方法测定,否则会使结果偏低。

### 3.1.4 样品测定:

用本法和重铬酸钾法分别测定了几种类型水样的 COD 值,见表 2。结果表明,两种方法测定结果有很好相关性。

表 2 两种方法测定水样 COD 比较

水样	标准法 (mg/L)	本法 (mg/L)	本法/标准法 (%)
西湖水	36.85	37.45	101.6
闽江水	9.53	9.76	102.4
本厂自来水	4.34	4.36	100.5
光明港污水	633.8	632.5	99.8

### 3.1.5 回收率试验:

取 COD 值不同的水样,加入一定量的邻苯二甲酸氢钾,测定回收率,见表 3。

表 3 水样回收率试验结果

水样	测得 COD (mg/L)	加理论 COD (mg/L)	测得总 COD (mg/L)	回收率 (%)
西湖水	37.45	26.88	64.13	99.7
闽江水	9.76	10.03	19.86	100.4
本厂自来水	4.36	18.14	22.45	99.8
去离子水	1.62	9.19	10.90	100.8

### 3.1.6 方法精密度:

取含理论 COD 100mg/L 的邻苯二甲酸氢钾标

准液作十次试验,测得平均值为 99.52mg/L 标准偏差 + 0.42mg/L,变动系数 0.42%。取含理论 COD 10mg/L 的邻苯二甲酸氢钾标准液作十次试验,测得平均值为 9.96mg/L,标准偏差 + 0.23mg/L,变动系数 2.36%。可见,无论对 COD 值较高或较低的水样,本法精确度都比较高,比标准法精确度高。标准法精密密度可参阅文献<sup>[1]</sup>。

## 4 结 论

与标准重铬酸钾法比,本法有以下几个特点:

1. 采用硝酸银和硝酸铋为联合掩蔽剂消除氯离子干扰,测定结果与使用硫酸汞一致,并避免剧毒硫酸汞对环境的污染。
2. 本法精密密度比标准法高,准确度可与标准法相媲美。
3. 仪器简单,操作方便,省时。

## 参 考 文 献

- [1] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会,水和废水化学分析方法手册 第三版 北京:中国环境科学出版社 1989 354 - 356 359 - 361.
- [2] J. S. Jeris, Water and Wastes Engineering, 1967, 4 (5): 89.
- [3] B. Fleet et al, The Analyst, 97, 321 (1972).
- [4] 北京环保监测站等编环境污染分析技术资料汇编 (第二集) 北京:中国环境科学出版社 1978 246.
- [5] 宋来洲 李健 运如艳 吴国菊 侯雅丽 紫外分光法测定污水厂出水中的 COD 中国给水排水, 2002 (12) 85 - 86.
- [6] 高甲友 常压微波消解法测定 COD 中国给水排水, 2002 18 (4): 83 - 84.
- [7] 董慧,赵春景. 高效液相色谱法测定人血浆中紫杉醇浓度. 第三军医大学学报, 1999, 21 (5): 379 ~ 381.
- [8] Gueritte - Voegeléin et al, Chemical Studies of 10 - Desacetylbaicatin. Hemisynthesis of Taxol Derivatives, Tetrahedron, 42, 4451 - 4460 (1986).
- [9] Kingston: David G I Method for the conversion of cephalomannine to taxol and for the preparation of n - acyl analogs of taxol US 5, 319, 112 (1994).
- [10] Kingston; David G I Method for the conversion of cephalomannine to taxol and for the preparation of n - acyl analogs of taxol US 5, 470, 866 (1995).

(上接第 2148 页)

- [3] 韩锐. 一种抗癌新药—紫杉醇研究的进展. 中国肿瘤临床, 1993, 20: 223 ~ 224.
- [4] 佟晓杰, 方唯硕. 东北红豆杉枝叶化学成分的研究. 药学学报, 1994, 29 (1): 55 ~ 60.
- [5] 陈未明, 红豆杉属 Taxus 植物的化学成分和生物活性. 药学学报, 1990, 25 (3): 227 ~ 240.
- [6] 陈未明, 张佩玲. 云南红豆杉抗肿瘤活性成分的研究. 药学学报, 1991, 26 (10): 747 ~ 754.
- [7] 董慧, 赵春景. 高效液相色谱法测定人血浆中紫杉醇浓