

液相色谱-电喷雾离子阱质谱对芥子碱的测定方法

陈天文

(福州大学测试中心, 福州 350002)

摘要: 探讨了采用液相色谱-电喷雾串联质谱法检测小鼠前列腺中芥子碱硫氰酸盐的方法。流动相为 $V(\text{乙腈}) : V(0.5\% \text{乙酸}) = 20 : 80$, 色谱柱为 Zorbax XDB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm), 流速为 0.6 mL/min。芥子碱硫氰酸盐的准分子离子和二级碎片离子分别为 m/z 304 和 m/z 251, 方法的检出限为 0.7 $\mu\text{g/L}$, 线性范围为 2.7 ~ 80.5 $\mu\text{g/L}$, r 为 0.9934, 相对标准偏差为 7.5% ~ 12.9%, 样品的回收率为 81.2% ~ 102.5%。

关键词: 液相色谱-电喷雾离子阱质谱; 前列腺; 芥子碱

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2008)05-115-03

前列腺具有生理屏障^[1], 患前列腺炎的腺体由于腺体组织发生了纤维化变化并出现了纤维化样硬结, 同时前列腺液的 pH 升高, 碱性增强再加上前列腺本身拥有一层致密的外膜, 这样就导致了药物很难进入腺体内发挥作用。白芥子为我国药典收载品种, 白芥子中主含白芥子甙, 白芥子甙在芥子酶的作用下水解为芥子碱和异硫氰酸对羟基苯酯, 芥子碱据报道有降压作用。研究发现, 白芥子中芥子碱多以芥子碱硫氰酸盐的形式存在。因此, 测定前列腺组织中芥子碱硫氰酸盐的含量对于研究药效物质芥子碱是否能跨越前列腺屏障具有重要的意义。目前, 芥子碱的分析方法主要用高效液相色谱法 (HPLC)^[2~5], 但 HPLC 法灵敏度低, 其检出限为 0.1 mg/L, 而本文用液相色谱串联质谱法 (LC-MS-MS) 测定芥子碱, 灵敏度高, 选择性好, 其检出限为 0.7 $\mu\text{g/L}$, 该法国内外尚未见报道。芥子碱硫氰酸盐的结构式见图 1。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series HPLC-MSD Trap XCT 液相色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水处理系统; TCL-16G 离心机 (上海安亭科学仪器厂); KQ-100 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器

厂); ZW-A 微量振荡器 (常州市国华电器有限公司)。

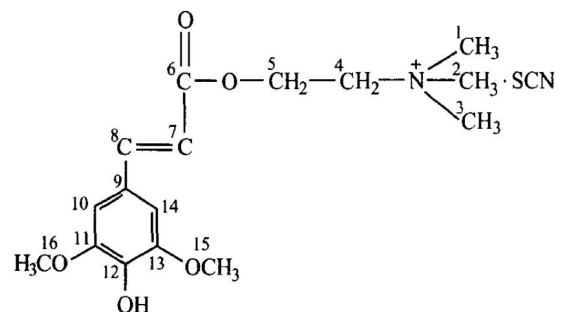


图 1 芥子碱硫氰酸盐的结构式

Fig. 1 Structure of sinapine

芥子碱硫氰酸盐标准样品 (中国药品生物制品检定所); 乙腈为色谱纯, 购自德国 Merck 公司; 其它试剂为分析纯。

1.2 仪器工作条件

HPLC 条件: 色谱柱: Zorbax XDB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm i. d., 5 μm); 流动相: $V(\text{乙腈}) : V(0.5\% \text{乙酸}) = 20 : 80$; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 20 μL 。

MS 条件: 电离源: 电喷雾 (ESI); 离子化方式: 正离子模式; 接口参数: 雾化器: 0.28 MPa; 干燥气: 10 L/min; 干燥气温度: 350 ; 毛细管电压:

* 收稿日期: 2007-04-18; 修订日期: 2007-07-20

作者简介: 陈天文 (1974 -), 男, 工程师; E-mail: ctianwen@fzu.edu.cn

3500 V。

1.4 样品预处理

将雄性小鼠灌胃浓度为 30 mg/L 的芥子碱 5 mL，每日两次，连续 7 天，于第 8 天处死小鼠，剥离前列腺。然后用生理盐水洗净前列腺，再加入 2 mL 生理盐水匀浆，离心，取上清液 1 mL，加入 2 mol/L NaOH 溶液 50 μ L，CHCl₃ 2 mL 振摇，离心，取出 CHCl₃ 层，挥干，加入 2 mL 乙醚，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，所得样品进行 LC-MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相的选择

对 LC-MS 来说，比较合适的流动相体系应该是不含有缓冲体系的一些有机溶剂和水的组合，可以采用乙酸或甲酸来调节所需要的酸度。本实验选用了甲醇-水、乙腈-水体系作流动相，结果发现，乙腈-水体系作流动相，色谱峰形对称，出峰时间快。而且，随着流动相中乙腈含量的减少，分析物的保留时间随着增大，峰形拖尾现象渐转好，考虑到峰形、保留时间和灵敏度，选择流动相中乙腈的体积分数 20 %。

2.1.2 流动相酸度的选择

考虑到 LC-MS 的特点，流动相酸度的调节，不采用常用的缓冲溶液或者无机酸如 H₃PO₄ 等。试验了两种有机酸即乙酸和甲酸来调节酸度，结果发现，流动相中加乙酸后，色谱峰形更加理想。同时考虑到被分析物在质谱上的响应，选择流动相中含有 0.5 % 的乙酸，即 $v(\text{乙腈}) : v(0.5\% \text{乙酸}) = 20 : 80$ 。

2.2 质谱条件的选择

用 0.1 mg/L 芥子碱硫氰酸盐标样采用流动注射分析对质谱条件进行优化，对影响质谱响应的 3 个重要参数：碎裂电压、锥孔电压、二级质谱电压进行了优化。

碎裂电压作用于毛细管出口，一般来讲，碎裂电压越高，碎裂越厉害。在 70 ~ 150 V 范围内对碎裂电压进行优化，当碎裂电压为 100 V 时有最大离子强度。

锥孔电压用于样品离子的聚焦和传输，在 15 ~ 50 V 范围内对其进行优化，最终选定锥孔电压为 30 V。

采用已经优化好的一级质谱条件，选择为母离子研究二级质谱条件，在 0.2 ~ 1.2 V 范围内对二级质谱碎裂电压进行优化。实验表明，随着二

级质谱碎裂电压的增大， m/z 251 的峰强度逐渐减弱，而其特征碎片的峰强度之和逐渐增大，电压增大到 0.8 V 时，母离子全部消失，全部以碎片离子形式存在。采用其二级质谱的特征离子进行定量，故二级质谱碎裂电压选定为 0.8 V。

2.3 芥子碱硫氰酸盐的质谱分析

芥子碱硫氰酸盐的正离子一级质谱以分子离子峰 m/z 310 为基峰，没有聚合及其它加合现象。(图 2a) 芥子碱硫氰酸盐在水中离解失去硫氰酸根离子产生离子 m/z 310 $[\text{M}-\text{SCN}]^+$ 。对芥子碱硫氰酸盐的离子 m/z 310 进行二级质谱分析，其二级质谱见图 2b，母离子 m/z 310 的二级质谱中主要的碎片离子为 m/z 251 $[\text{M}-\text{SCN}-\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+$ 。对二级质谱中的离子 m/z 251 进行三级质谱分析，其三级质谱见图 2c， m/z 251 离子的三级质谱中主要的碎片离子为 m/z 207 $[\text{M}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]^+$ 和 m/z 175 $[\text{M}-\text{O}-\text{OCH}_2-\text{OCH}_2]^+$ 。

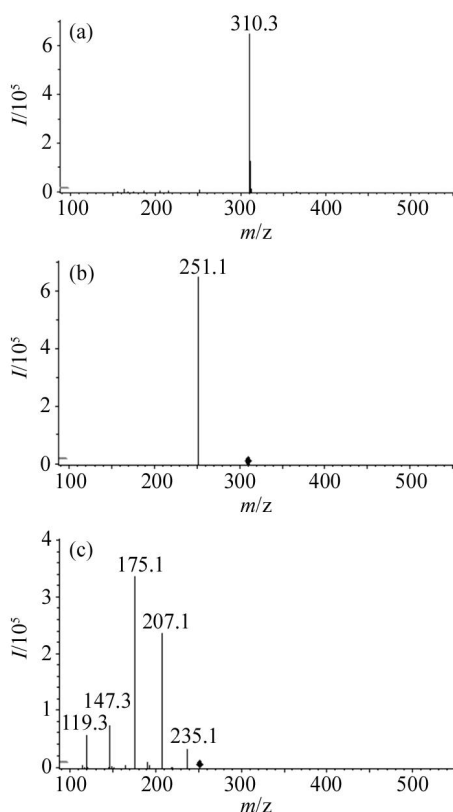


图 2 1.0 mg/L 芥子碱硫氰酸盐标准溶液一级质谱图 (a)、二级质谱图 (b) 和三级质谱图 (c)

Fig. 2 The full scan MS (a), MS2 (b) and MS3 (c) spectra of 1.0 mg/L standard sinapine solution

2.4 MS 的校准曲线

本文利用二级质谱的碎片离子 m/z 251 对芥子碱硫氰酸盐进行定量检测。对 0.1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 芥子碱硫氰酸盐标样按 1.4 处理后进样 20 μL 分析, 以质量浓度为横坐标, 以 m/z 251 的峰面积为纵坐标, 得到它的线性回归方程, $Y = 59.668 + 423.52x$, 芥子碱硫氰酸盐在 2.7 ~ 80.5 $\mu\text{g/L}$ 范围内质量浓度与峰面积有良好的线性关系, $r = 0.9934$, 方法的检出限为 0.7 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 精密度和回收率实验

对不同浓度的芥子碱硫氰酸盐标样按 1.4 处理后均分析 5 次, 其相对标准偏差 (RSD) 在 7.5 % ~ 12.9 % 范围内。样品中加入不同量的芥子碱硫氰酸盐标样, 用上述方法测定, 其回收率为 81.2 % ~ 102.5 %。

2.6 样品测定

将 5 个样品按 1.4 处理后, 取 20 μL 进 LC-MS 分析, 连续 5 次测定。通过对比样品和标样的二级质谱和三级质谱, 证实样品中含有芥子碱硫氰酸盐。根据样品二级质谱的碎片离子 m/z 251 的峰面积测定结果为 3.1 ~ 4.5 $\mu\text{g/L}$, 其相对标准偏差 (RSD) 为 5.6 % ~ 9.5 %。

3 结论

本文用液相色谱-电喷雾离子阱质谱法测定小鼠中的芥子碱硫氰酸盐, 结果表明, 经过处理后的小鼠前列腺组织液中含有极少量的芥子碱硫氰酸盐, 说明药效物质芥子碱能跨越前列腺屏障, 进入前列腺组织内部。本方法具有快速、准确、灵敏度高的特点。

致谢: 本工作内容得到了福建师范大学生命科学学院吴国欣教授的大力支持, 提供了标准样品溶液以及实际测定的样品, 在此感谢。

参考文献

- [1] 钟惟德, 何慧婵, 陈玉祥等. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(5): 340
- [2] Juan Li, Ziad El Rassi. J Agric Food Chem, 2002, 50(6): 1368
- [3] 刘丽芳, 王宇新, 李海燕等. 色谱, 2006, 24(1): 49
- [4] 刘丽芳, 王宇新, 张新勇等. 中成药, 2002, 24(1): 52
- [5] 刘丽芳, 王宇新, 刘雪芳等. 中国野生植物资源, 2001, 20(5): 49

Determination of sinapine by liquid chromatography-electrospray ion-trap mass spectrometry

CHEN Tian-wen (Analytical and Testing center, Fuzhou University, Fuzhou 350002), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(5): 115 ~ 117

Abstract: In this paper, we developed a reversed-phase high performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of sinapine in rat plasma. The mixtures were successfully isolated on a Zorbax C_{18} column (150 \times 4.6 mm i. d., 5 μm), using acetonitrile - 0.5 % acetic acid (20/80, V/V) as the mobile phase at a flow rate of 0.6 mL/min. It showed the quasimolecular ion and MS^2 fragment ion of sinapine are m/z 304 and m/z 251. The limit of detection (LOD) was 0.7 $\mu\text{g/L}$. The linear plots were obtained between 2.7 and 80.5 $\mu\text{g/L}$ and CV is 0.9934. Overall recoveries were between 81.2 % ~ 102.5 %. It is a rapid, sensitive and reproducible method.

Key words: Electrospray; Ion-trap mass spectrometry; Sinapine