

LC/ MS/ MS 的多反应监测方法定量测定灯盏乙素

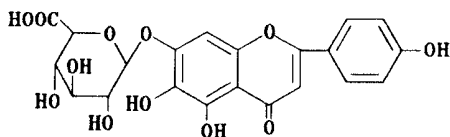
曲 峻, 王义明, 罗国安*, 吴筑平

(清华大学生命科学与工程研究院, 北京 100084)

摘要 目的:建立一种可靠的灯盏乙素定量分析方法。方法:用三级四级串联质谱(MS/MS)作为 HPLC 的检测器,其中 MS/MS 使用了多反应监测(MRM)扫描方式。选择母-子离子对 $m/z - 461 \rightarrow m/z - 285$ 作为 MRM 监测的离子对;HPLC 流动相为 100% 甲醇,流速 $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,色谱柱 Beckman ODS-1。以测定短葶飞蓬提取物的灯盏乙素含量为例,对此方法进行了应用。结果:灯盏乙素在短葶飞蓬提取物中含量为 6.98%。方法线性范围 $20 \sim 160 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($\gamma = 0.999$);加入灯盏乙素标准品 20,60 和 160 ng 的加样回收率分别为:96.5%,97.4%和 97.3%。检测限为 1 ng,每个样品的分析时间为 4 min。结论:此法灵敏、快速、准确,可应用于灯盏乙素的各种药剂、药代的研究。

关键词 高效液相色谱;串联质谱;灯盏乙素

短葶飞蓬(*Eriaron breviscapus*) 俗称灯盏花,是我国云南特有的中药品种,民间常用于跌打损伤、风湿疼痛的治疗。在临床实验中发现对治疗瘫痪有特殊效果^[1]。经临床证明^[2],其中的成分灯盏乙素(scutellarin)有增加脑血流量、降低脑血管阻力、提高血脑屏障的通透性以及对抗由二磷酸腺苷引起的小板凝集作用。灯盏乙素分子式为 $\text{C}_{21} \text{H}_{18} \text{O}_{12}$,分子量 462.35,结构式如下:



目前未见关于灯盏乙素精确定量方法的报道。一般中药多采取 HPLC 作为定量手段,但使用常规的 HPLC 方法分析灯盏乙素比较复杂且耗时较长,目前多是关于其半定量的报道^[2]。本文采取 HPLC 与 MS/MS 联机的方法,将 MS/MS 作为检测灯盏乙素的高选择性的检测器,通过多反应监测(multi reactions monitoring, MRM)的扫描方式监测色谱流出的灯盏乙素信号,实现了对灯盏乙素的精确定量,本文中测定短葶飞蓬提取物中灯盏乙素含量为例,对此方法进行了应用。

实验部分

1 试剂及仪器

API3000 LC/MS/MS 系统,(PE 公司,含四极

杆 MS/MS 谱仪、在线真空脱气机、PE200 型高压泵)。甲醇(HPLC 级,美国 Fisher 公司),灯盏乙素标准品(Delta,香港天然有机化合物信息中心提供),灯盏花总黄酮粗品(云南个旧制药厂提供)。

2 色谱条件

流动相:100% 纯甲醇,色谱柱:Beckman ODS-1, $5 \mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$,流速: $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

3 质谱条件的优化

灯盏乙素标准品溶于甲醇,得 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 灯盏乙素溶液,通过注射进样泵连续进入质谱。采取负离子方式,首先使用一级质谱优化灯盏乙素的分子离子峰 $m/z - 461$,使其强度最大;然后打开碰撞气(N_2)使其分子离子被碰撞活化解离(CAD),使用二级质谱扫描 $m/z - 461$ 的子离子,其子离子图见图 1。

灯盏乙素是一种葡萄糖酸黄酮苷,其糖苷键在质谱条件下很易断裂而形成 $m/z - 285$ 的子离子。由图 1 可见,灯盏乙素的子离子中, $m/z - 285$ 的峰强度占绝对优势;扫描方式改为 MRM 扫描,监测 $m/z - 461 \rightarrow m/z - 285$ 离子对,调节各质谱参数使信号最强,得最佳质谱条件:

Ion spray 离子源,与 LC 接口采取分流方式,电离电压: -3400 V ,聚焦孔电压: -46 V ,第一级四极杆电压: 10 V ,聚焦透镜电压: 10 V ,第二级四极杆电压(碰撞电压): 38 V ,第三级四极杆电压: 40 V ,偏转电压: 200 V ,电子倍增器电压: 2000 V 。

将 HPLC 与 MS/MS 的离子源相连接,使用以上参数对 LC 的流出物进行监测,以灯盏乙素的离子流峰面积作为定量的依据。

收稿日期: 1999-08-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(692350220)

* 联系人 Tel: (010) 62781688, Fax: (010) 62784764,

E-mail: galuo@sam.chem.tsinghua.edu.cn

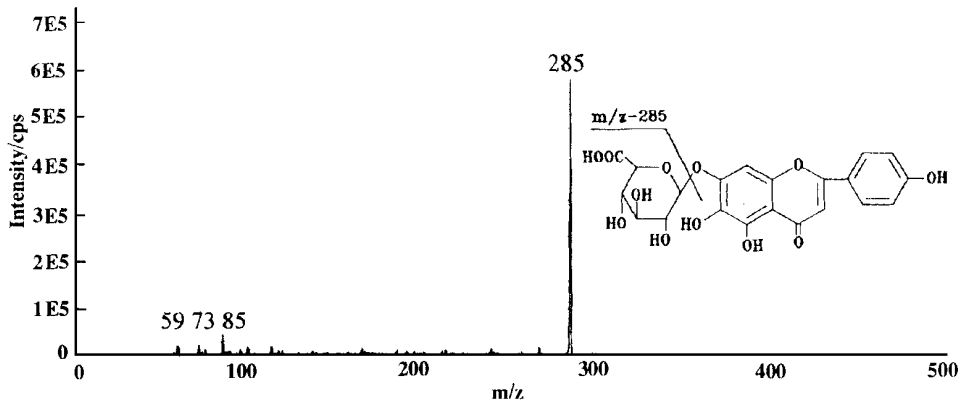


Fig 1 Product ions of scutellarin.

4 灯盏乙素定量分析

4.1 色谱行为 采取 MRM 方式监测 461 → 285 离子对的离子流, 质谱信号强, 与 UV 检测器相比, 提高选择性的同时提高了信噪比和灵敏度。灯盏乙素的保留时间为 1.7 min(图 2)。图 2A, B 分别是: 常

规 HPLC 紫外检测器的总黄酮谱图、LC/ MS/ MS MRM 方式监测 m/z - 461 → - 285 的离子流图。由图 2A 可见, 在此条件下色谱图的分辨率很低, 而使用 LC/ MS/ MS 可在无需色谱分离的情况下选择性地定量灯盏乙素(图 2B)。

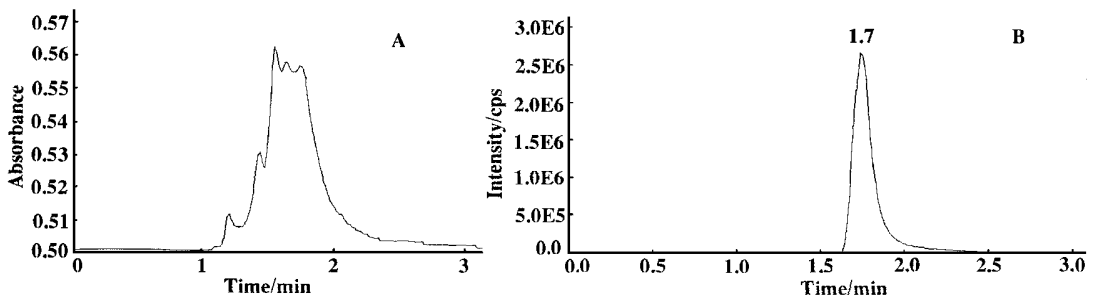


Fig 2 LC/ UV chromatogram (A) and LC/ MS/ MS Chromatogram (B) of scutellarin in *Erigeron breviscapus* extract.

4.2 标准曲线 精密称量灯盏乙素标准品 5 mg, 配制含灯盏乙素 1 mg·mL⁻¹ 的甲醇溶液。稀释得 20, 40, 80, 120 和 160 ng·mL⁻¹ 的标准溶液, 依次进样 20 μL, 在上述色谱、质谱条件下检测, 以 MRM 离子流峰面积(Y) 为纵坐标、灯盏乙素浓度(X) 为横坐标, 得线性回归方程: $Y = 8.1 \times 10^3 X + 68.95$ ($r = 0.999$), 线性范围 20 ~ 160 ng·mL⁻¹。方法的检测限为 1 ng。

4.3 待测样品制备 将总黄酮磨成粉末, 取 5 mg 超声溶解于甲醇, 定容为 50 mL, 然后用甲醇稀释至含总黄酮 1 μg·mL⁻¹ 用以测定。

4.4 方法精密测定 取相同的样品, 按上述方法间隔 2 d 重复测定, 测日内精密度为 1.7% ($n = 5$), 日间精密度为 4.1% ($n = 5$)。

4.5 加样回收实验 取同一样品粉末 2 mg 6 份, 其中 3 份作为对照, 另外 3 份分别加入含灯盏乙素 20, 60 和 120 ng 的标准品溶液, 挥干后按上述方法

测定, 计算加样回收率分别为: 96.5%, 97.4% 和 97.3%。

4.6 测定结果 取总黄酮溶液 20 μL 进样, 连续 5 次测定, 总黄酮中灯盏乙素的含量为 6.98% ± 0.11%。

讨 论

灯盏乙素在纯水、甲醇: 水混合溶剂及乙腈中溶解度很小, 只在纯甲醇中才有较好的溶解度。因此调整流动相的选择较少, 且在短葶飞蓬的提取物中, 有多种黄酮类的结构与灯盏乙素类似, 紫外吸收波长相近, 往往在使用常规 HPLC 分析时与灯盏乙素在同一保留时间出峰而计算了多种黄酮的总含量。本文采用 LC/ MS/ MS 的方法, 建立了灯盏乙素的准确定量方法, 为其剂型、临床研究提供了必要手段。

MS/MS 技术于 80 年代中期开始走向成熟^[3], 由于天然提取物成分比较复杂, 可能有其他物质的质荷比与灯盏乙素相同, 只用单级质谱作为检测器单一性不够好。采用 MS/MS 的 MRM 扫描方式监测 LC 流出的灯盏乙素, 选择性大大优于紫外检测器; MS/MS 的 MRM 方法检测灯盏乙素的原理是: 样品经 HPLC 分离、富集后在离子源被离子化, 然后进入第一级质谱, 调整质量扫描参数, 只允许 $m/z - 461$ 进入碰撞区, 这样就除去了其他分子量的物质; 在碰撞区中 $m/z - 461$ 被碰撞活化解离 (CAD) 产生子离子, 然后进入第二级质谱, 使第二级质谱只允许灯盏乙素的特征子离子 $m/z - 285$ 通过并进入计数器, 而其他物质即使质荷比也为 -461 仍不会产生响应。这样就使 MS/MS 成为一个专一检测灯盏乙素的 LC 检测器, 能消除其他结构相近的黄酮对定量的干扰; 故 HPLC 不必将灯盏乙素与其他黄酮分离, 就能达到精确定量灯盏乙素的目的。

本方法采用的 IS 离子源是电喷雾离子源的改进类型, 使用了雾化气技术, 从而提高了离子化效率, 稳定了质谱输出信号, 是外标曲线有良好的线性的原因之一。

此外, 此方法的灵敏度较高。检测限只有 1 ng, 适合低浓度的分析, 如血药浓度测定等。本方法分析一个样品只需 4 min, 适合于药剂和药理研究中的快速、大量分析。

参 考 文 献

- 1 云南药品研究所. 灯盏细辛化学成分的研究. 云南药品标准通讯, 1977, 23: 5
- 2 孙文基, 绳金房主编. 天然活性成分简明手册. 北京: 中国医药科技出版社, 1997. 509
- 3 Rashed MS, Ozand PT, Harrison ME, *et al.* Electrospray tandem mass spectrometry in the diagnosis of organic acidemias. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1994, 8: 129

DETERMINATION OF SCUTELLARIN BY LC/MS/MS

Qu Jun, Wang Yiming, Luo Guoan and Wu Zhuping

(School of Life Science and Technology, Tsinghua University, Beijing, 100084)

ABSTRACT **AIM:** To establish a reliable method for quantitative analysis of scutellarin. **METHODS:** A triple-quadrupole tandem mass spectrometer was used as a detector for HPLC to determine scutellarin. As to MS/MS, multi-reactions monitoring (MRM) scan mode was employed. Among the product ions of scutellarin, $m/z - 285$ is the most abundant in intensity, thus the parent-daughter ion pair of $m/z - 461$ and $m/z - 285$ was selected as MRM ions pair. MS/MS conditions were optimized to achieve highest sensitivity. The mobile phase of HPLC was 100% methanol and the analytical column was Beckman ODS-1. The flow rate of HPLC was $0.9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The areas of ion flow peaks were used to determine the quantity of scutellarin. To give an example of its applications, this method was used to determine the amount of scutellarin in *Eriaron breviscapus* extract. **RESULTS:** The amount of scutellarin accounted for $6.98\% \pm 0.11\%$ in *Eriaron breviscapus* extract. The standard curve for scutellarin showed good linearity over the concentration range of $20 \sim 160 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($\gamma = 0.999$); the recoveries of scutellarin at added amount of 20, 60 and 160 ng are 96.5%, 97.4% and 97.3% respectively; the limit of detection is 1 ng, and the analysis time of each sample was 4 minutes. **CONCLUSION:** This method is highly sensitive, fast, and very accurate. Therefore, it is possible to be applied to study the metabolism of scutellarin.

KEY WORDS HPLC; MS/MS; scutellarin