

罗丹明 B 衍生化超高效液相色谱 三重四极杆质谱高灵敏测定人参二醇

赵先恩*¹ 吕涛¹ 魏娜¹ 朱树芸¹ 尤进茂*^{1,2}

¹(山东省生命有机分析重点实验室, 山东省绿色天然产物与医药中间体高校重点实验室,
曲阜师范大学化学与化工学院, 曲阜 273165)

²(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘要 以罗丹明 B 为质谱增敏衍生化试剂, 标记羟基化合物, 通过超声波辅助-分散液液微萃取(Ultrasonic assisted-dispersive liquid-liquid microextraction, UA-DLLME) 和罗丹明 B 衍生化联合的策略, 建立了超高效液相色谱三重四极杆质谱检测人参二醇(Panaxadiol, PD) 的分析方法。化妆品和人参药材中 PD 经 UA-DLLME 进行萃取富集(150 μ L 氯仿作为萃取剂, 500 μ L 乙醇作为分散剂, 3 min), 以罗丹明 B 为衍生试剂, 在 *N,N*-羰基二咪唑(*N,N*-Carbonyldiimidazole, CDI) 和 4-二甲氨基吡啶(4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 的催化作用下, 70 $^{\circ}$ C 微波辅助衍生反应 30 min 得到稳定的衍生产物。PD 衍生物的多反应监测(Multiple reaction monitoring, MRM) 模式质谱测定 3 min 内完成, 方法检出限 4.0 ng/L, 定量限 15.0 ng/L, 线性、精密度和回收率良好, 与以往报道的方法相比, 本方法具有灵敏度高和基质效应低的特点。

关键词 超声辅助-分散液液微萃取; 罗丹明 B; 衍生化; 质谱增敏; 人参二醇

1 引言

人参二醇(Panaxadiol, PD) 是原人参二醇类人参皂苷共同的水解产物, 具有多种重要的药理活性, 是多种药品、食品和化妆品的功能性成分^[1], 但它无明显的特征紫外吸收, 也缺乏能带来高效质谱离子化效率的化学结构, 因此, 直接检测的光谱法^[2]、色谱法^[2,3]、质谱法^[4-6]等分析方法在灵敏度和分离度等方面都不尽人意, 往往难以满足实际需求。

目前, 对于缺乏色谱/质谱灵敏检测响应基团的含羟基化合物, 采用衍生化提高检测灵敏度是一种行之有效的手段^[7]。罗丹明 B 是常用的荧光染料, 主要用于生化分析中的传感分析和细胞染色, 鉴于罗丹明 B 分子结构中含有一个季铵型的正电荷, 其 PD 衍生产物呈现正离子状态, 这符合衍生化质谱增敏的原理^[8,9], 因此, 本研究提出以罗丹明 B 为衍生试剂对 PD 分子中的羟基进行衍生化和质谱增敏检测。同时, 结合超声辅助-分散液液微萃取(UA-DLLME) 的样品处理技术^[10], 显著提高分析灵敏度、降低基质效应, 建立了 PD 高效萃取和高灵敏分析方法, 实现了化妆品和人参中 PD 的准确、快速、测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1290 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(Agilent 公司) 配备四元梯度泵, 在线真空脱气机, 自动进样器, 恒温柱温箱, 电喷雾电离源; 超声波清洗器(浙江昆山超声仪器有限公司); 微波催化萃取/合成仪(北京祥鹤科技有限公司); 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂) 等。

PD 标准品(中国药品检定所); 乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯, Sigma 公司); 罗丹明 B(99%, 阿拉丁试剂公司); 其它试剂均为分析纯, 水为 Millipore 纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制 称取适量 PD 标准品及罗丹明 B, 分别溶于乙腈, 配制 1.2×10^{-4} mol/L PD 标准溶液及

2014-06-25 收稿; 2014-08-27 接受

本文系国家自然科学基金资助项目(No. 81303179), 曲阜师范大学科研启动基金(BSQD2012019) 资助

* E-mail: xianenZhao@163.com; jmyou@6304@163.com

5×10^{-3} mol/L 罗丹明 B 溶液 相应低浓度用乙腈稀释而成。 7.5×10^{-2} mol/L *N,N*-羰基二咪唑 (*N,N*-Carbonyldiimidazole, CDI) 和 0.16 mol/L 4-二甲氨基吡啶 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 同法配制。

2.2.2 衍生化方法 按照羧酸类试剂标记氨基或羟基的反应机理^[11], 本研究采用微波辅助的两步法, 从而快速制备衍生物, 如图 1 所示。

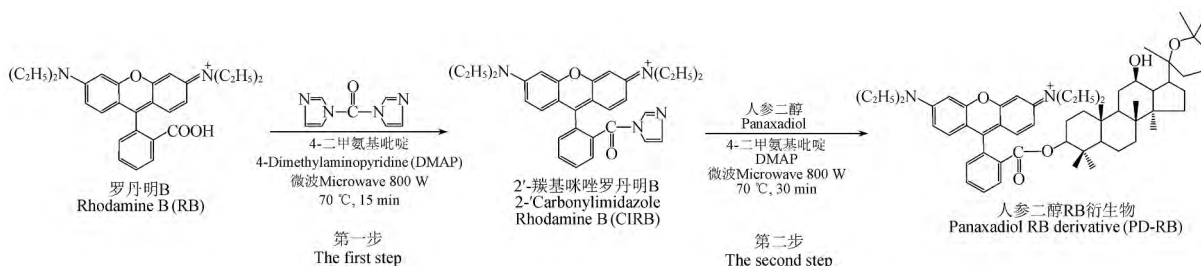


图 1 罗丹明 B (RB) 与人参二醇 (PD) 衍生化反应示意图

Fig.1 Scheme of derivatization reaction between Rhodamine B (RB) and Panaxadiol (PD)

第一步: 一次性大量制备衍生试剂中间体 2'-羰基咪唑罗丹明 B (2'-Carbonylimidazole rhodamine B, CIRB, 密封保存使用至少一周内稳定), 方法如下: 向圆底烧瓶中加入 5 mL 罗丹明 B, 300 μ L DMAP, 305 μ L CDI 溶液, 于微波反应器中 70 $^{\circ}$ C、800 W 反应 15 min, 使罗丹明 B 与 CDI 反应生成活性中间体 CIRB; **第二步:** 安培瓶中加入适量 PD 标液或实际样品 DLLME 萃取液氮吹干后乙腈复溶物、300 μ L 上述活性中间体 CIRB 溶液和 100 μ L DMAP 溶液, 密封后, 于 70 $^{\circ}$ C、微波 800 W 反应 30 min 衍生完成, 过滤膜后即可进样分析。

2.2.3 样品前处理方法 分别称取 1.0 g 人参药材粉末和某人参类化妆品, 按照文献[12]方法提取处理和酸水解, 使原人参二醇类人参皂苷转化为 PD, 之后进行 UA-DLLME: 吸取 5 mL 上述样品溶液于尖底离心试管中, 加入 500 μ L 乙醇作为分散剂, 150 μ L 氯仿作为萃取剂, 再加入适量纯净水定容至 10 mL, 室温下 UA-DLLME 3 min, 离心 2 min (12000 r/min), 吸取下层有机相氮吹干, 乙腈复溶后进行衍生化。

2.2.4 色谱-质谱条件 色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse C₁₈ (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)。流动相 A (5% 乙腈溶液, 含 0.3% 甲酸) -B (乙腈, 含 0.3% 甲酸) 洗脱程序: 保持 25% A + 75% B 等度洗脱 3 min, 流速 0.2 mL/min, 进样量 5 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C。Agilent 6460 三重四极杆质谱, 电喷雾电离源, 干燥气温度 300 $^{\circ}$ C, 干燥气流速 9 L/min, 雾化气压力 40 psi, 鞘气温度 300 $^{\circ}$ C, 鞘气流速 8 L/min, 毛细管电压 3.5 kV。PD 罗丹明 B 单取代衍生物质谱 MRM 检测参数: 定量离子对 m/z 885.4 \rightarrow 443.1, 碎裂电压 280 V, 碰撞能 76 eV; 定性离子对 m/z 885.4 \rightarrow 399.1, 碎裂电压 280 V, 碰撞能 82 eV。

3 结果与讨论

3.1 衍生条件优化

本研究用羧酸类衍生试剂在 CDI 和 DMAP 催化作用下标记羟基的衍生反应机理与本研究组已报道的方法相同^[11], 如图 1。研究表明, 采用常规水浴加热法进行衍生化, 第一步需要在 80 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 第二步需要在 80 $^{\circ}$ C 反应 2 h。为了提高反应速度, 本研究使用了微波辅助衍生, 第一步反应在微波反应器中 70 $^{\circ}$ C、800 W 反应 15 min, 即可使罗丹明 B 与 CDI 充分反应形成中间体 CIRB; 第二步在微波反应器中 70 $^{\circ}$ C、800 W 反应 30 min, 过量的活性中间体 CIRB 即可使 PD 被完全衍生化。微波辅助衍生化反应大大提高了衍生化速度。

3.2 UA-DLLME 条件优化

萃取剂和分散剂的种类及用量是影响萃取效率的重要因素。对 5 种萃取剂 (二氯甲烷、氯仿、三氯乙烯、四氯乙烯和氯苯) 和 4 种分散剂 (乙腈、甲醇、乙醇和丙酮) 进行分别组合考察。结果表明, 氯仿与乙醇组合时, 萃取效率最高, 仪器的响应值最高。因此, 实验选定氯仿作为萃取剂 (图 2A), 乙醇作为分散剂 (图 2C)。考察了萃取剂和分散剂的用量。以氯仿用量 150 μ L (图 2B)、乙醇用量为

500 μL (图 2D) 时, 萃取效率最高。在上述最佳条件下优化了超声辅助萃取时间, 在室温下超声波处理 3 min 即可获得最高的检测器响应值。

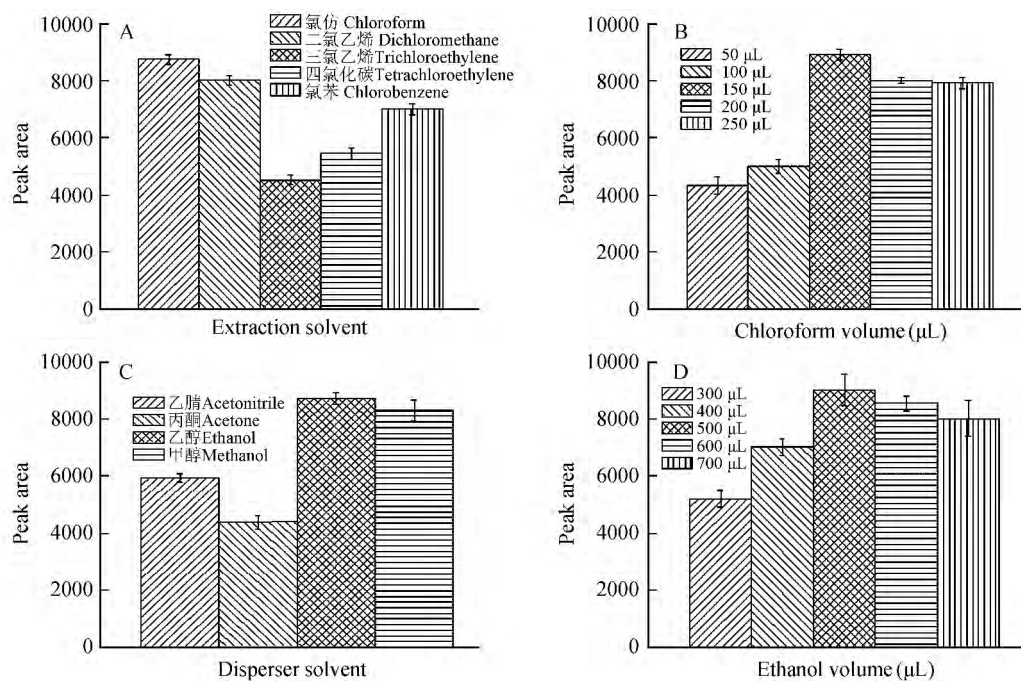


图 2 (A) 萃取剂种类、(B) 萃取剂氯仿用量、(C) 分散剂种类和 (D) 分散剂乙醇用量对人参二醇衍生物峰面积的影响

Fig.2 Effect of extraction solvent type (A), volume of chloroform (B), disperser solvent (C) and volume of ethanol on the peak area of panaxadiol derivative (D)

3.3 方法评价

3.3.1 PD-RB 衍生物光谱性质 考察了 PD-RB 衍生物的光谱性质。经半制备液相色谱仪制得 PD-RB 的 50% 乙腈/水溶液 (5×10^{-5} mol/L) 经扫描得到 PD-RB 衍生物的最大可见吸收波长为 554 nm, 该波长下摩尔吸光系数 ε 为 6.5×10^5 L/(mol·cm)。最大荧光激发和发射波长分别为 $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 577$ nm。质谱正离子模式下母离子 m/z 885.4, 在 280 V 碎裂电压、76 eV 碰撞能下, 产生两个特异性的产物离子 m/z 443.1 和 399.1 (分别对应的化学结构为 RB 和失去一分子二氧化碳的 RB, 碎片离子归属见图 3)。

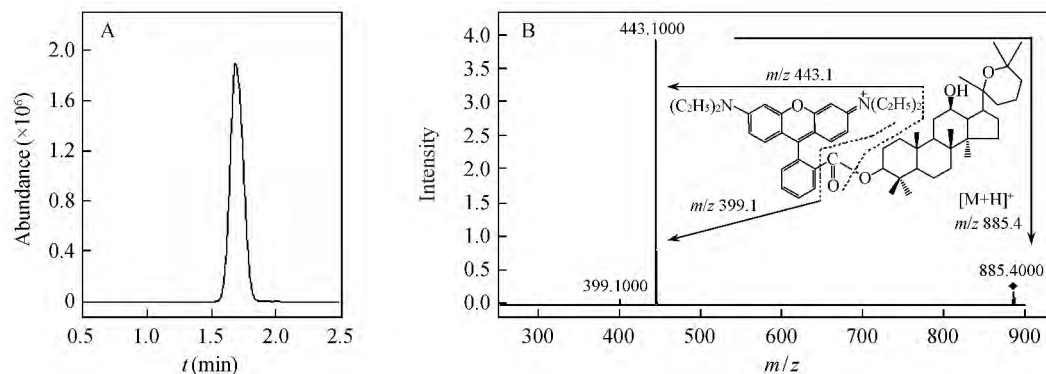


图 3 人参二醇衍生物质谱离子流图 (A) 和二级质谱裂解图 (B)

Fig.3 Ion current chromatogram (A) and MS/MS (B) of Panaxadiol derivative

3.3.2 UHPLC-MS/MS 条件 优化在 Agilent 1.8 μm 粒径色谱柱上, 对比优化了不同流动相及洗脱条件。结果表明, 水-乙腈体系中需添加 0.3% 甲酸, 才能得到良好的峰形 (图 3A), 无酸或低于 0.3% 甲酸会导致峰拖尾, 这是因为罗丹明 B 分子底环上 2' 位的羧基容易与氧杂蒽环上相连接的碳原子发生环

化,整个分子异构化为不带正电荷的分子结构。

PD 罗丹明 B 衍生物按照实验部分优化的 MRM 质谱参数检测时,母离子能够碎裂生成两个特异性的产物离子:罗丹明 B 和失去一分子 CO_2 的罗丹明 B (如图 3B)。因罗丹明 B 结构带有一个天然的正电荷,具有极高的质谱离子化效率和灵敏度,将这两个特异性的产物离子分别作为质谱 MRM 检测的离子通道,大大提高了分析方法的选择性和灵敏度。

3.3.3 线性回归方程、检出限及定量限 按照上述实验条件,进样浓度在 20~500 ng/L 范围内,依据峰面积和实际进样浓度进行线性回归,所得 PD 衍生物的线性回归方程为 $Y=458.4X+161.5$ (Y 为峰面积, X 为进样浓度 (ng/L)),相关系数为 0.998,检出限 ($S/N=3$) 为 4.0 ng/L,定量限 ($S/N=10$) 为 15.0 ng/L。

3.3.4 精密度和回收率 在相同实验条件下,同一份 PD 衍生物溶液,平行 6 次进样分析,保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 1.8% 和 4.6%,精密度良好。按照本研究前处理条件测定化妆品和人参药材样品加标回收率,结果在 81.3%~114.6% 之间,能够满足实际检测需求。

3.3.5 与其它分析方法的比较 在衍生化方法方面,与以往的苯甲酰氯(衍生耗时 2 h)和 9-甲基苄甲酰肼(衍生耗时 4 h)衍生化方法^[12~14]相比,本研究使用微波辅助能够大大加快衍生化反应的速度,由于本方法第一步衍生反应溶液可以大体积制备且至少一周内稳定使用,因此,批量分析过程中每个样品的衍生化时间由第二步决定,耗时 30 min 衍生化反应即可完成。

针对人参药材中 PD 的检测,本研究建立的 UA-DLLME 联合衍生化 UHPLC-MS/MS (MRM) 法 PD 的 LOD 为 0.004 $\mu\text{g/L}$,苯甲酰氯类衍生 HPLC-UV (230 nm) 检测法 PD 的 LOD 为 70 $\mu\text{g/L}$ ^[12] 或 2.4 $\mu\text{g/L}$ ^[13]。除此之外,文献报道 9-甲基苄甲酰肼衍生 HPLC 荧光检测人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 的 LOD 为 100~200 $\mu\text{g/L}$ ^[14],不经衍生化的 HPLC-MS/MS 直接检测人参皂苷 Rg_1 的 LOD 为 1.02 $\mu\text{g/L}$ ^[15]。本方法灵敏度比上述文献方法提高至少 250 倍以上。

3.4 样品分析应用

按照实验部分方法,分别测定人参药材(购自济南同仁堂药店)和某人参化妆品(上海某化妆品公司)中 PD 含量。平行测定 3 次取平均值,人参药材和某人参化妆品中 PD 含量分别为 9.2 mg/g 和 35.8 $\mu\text{g/g}$ 。

虽然在实际样品分析中罗丹明 B 也能够与三醇型皂苷的水解产物人参三醇 (Panaxotriol, PT) 进行衍生化反应,但由于 PD 和 PT 分子量不同,衍生化产物在进行质谱分析时,它们的多反应监测母离子与产物离子不同且色谱分离出峰时间不同,因此,检测不会有干扰。只测定 PD 用于人参药材及产品的质量控制在两方面原因,一方面,二醇型皂苷和三醇型皂苷在人参生长过程中是协同产生的,每一类都能反映其皂苷含量水平;另一方面,只测定 PD 能够缩短分析时间、提高分析通量,在大批量样品分析中具有优势。

References

- 1 ZHANG Gui-Ming, ZHAO Yu-Qing. *Modern Chinese Medicine*, **2008**, 10(10): 8-11
张贵明,赵余庆. 中国现代中药, **2008**, 10(10): 8-11
- 2 Nicola F. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 812(1-2): 119-133
- 3 Shi Y, Sun C J, Zheng B, Li Y, Wang Y. *Food Chem.*, **2010**, 123(4): 1322-1327
- 4 GUO Ji-Fen, ZHONG Da-Fan, QIAO Shan-Yi, ZHAO Yi-Min. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, **2003**, 24(4): 477-481
郭继芬,钟大放,乔善义,赵毅民. 质谱学报, **2003**, 24(4): 477-481
- 5 Angelova N, Kong H W, Heijden R V D, Yang S Y, Choi Y H, Kim H K, Wang M, Hankemeier T, Greef J V D, Xu G W, Verpoorte R. *Phytochem. Anal.*, **2008**, 19(1): 2-16
- 6 Lei L, Huang J Q, Hua X, Li K X, Sun C H. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(22): 2011-2017
- 7 Escrig-Doménech A, Simó-Alfonso E F, Herrero-Martínez J M, Ramis-Ramos G. *J. Chromatogr. A*, **2013**, 1296: 140-156
- 8 Iwasaki Y, Nakano Y, Mochizuki K, Nomoto M, Takahashi Y, Ito R, Saito K, Nakazawa H. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879

- (17-18): 1159-1165
- 9 Deng P, Zhan Y, Chen X Y, Zhong D F. *Bioanalysis*, **2012**, 4(1): 49-69
- 10 Parrilla Vazquez M M, Parrilla Vazquez P, Martinez Galera M, Gil Garcia M D, Ucles A. *J. chromatogr. A*, **2013**, 1291: 19-26
- 11 FU Yan-Yan, LI Xiao-Yan, SUN Zhi-Wei, QIN Xue-Qin, XIA Lian, SUO You-Rui, LI Yu-Lin, YOU Jin-Mao. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(1): 8-12
付艳艳, 李肖燕, 孙志伟, 秦雪芹, 夏莲, 索有瑞, 李玉林, 尤进茂. *分析化学*, **2010**, 38(1): 8-12
- 12 SHI Li-Liang, QIN Wei-Min, ZHU Zhi-Jia, LIN Miao, WANG Gai-Xiang. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, **2010**, 46(5): 482-484
石李梁, 钦维民, 朱智甲, 林苗, 王改香. *理化检验-化学分册*, **2010**, 46(5): 482-484
- 13 LI Zhang-Wan, XU Xiu-Rong, FENG Chun-Qiong, LIU San-Kang, QIAN Guang-Sheng. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1999**, 14(4): 271-273
李章万, 徐秀荣, 冯春琼, 刘三康, 钱广生. *华西药学杂志*, **1999**, 14(4): 271-273
- 14 Shangguan D H, Han H W, Zhao R, Zhao Y X, Xiong S X, Liu G Q. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 910(2): 367-372
- 15 YANG Liu, LIU Yi-Ming, ZENG Xing, DENG Yuan-Hui, FENG Yi, LIANG Wei-Xiong. *Chin. J. Pharm. Anal.*, **2005**, 25(8): 905-908
杨柳, 刘奕明, 曾星, 邓远辉, 冯怡, 梁伟雄. *药物分析杂志*, **2005**, 25(8): 905-908

Sensitive Determination of Panaxadiol Using Rhodamine B as Sensitizing Derivatization-Reagent by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry

ZHAO Xian-En^{*1}, LÜ Tao¹, WEI Na¹, ZHU Shu-Yun¹, YOU Jin-Mao^{*1,2}

¹ Shandong Provincial Key Laboratory of Life-organic Analysis, Key Laboratory of Pharmaceutical Intermediates and Analysis of Natural Medicine, College of Chemistry and Chemical Engineering, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

²(Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

Abstract In virtue of the strategy of ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (UA-DLLME) combined with Rhodamine B derivatization, a new ultrahigh performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method was developed for the sensitive determination of Panaxadiol (PD). UA-DLLME and derivatization conditions were investigated. PD in cosmetics and ginseng was extracted by UA-DLLME (150 μ L of chloroform as extraction solvent and 500 μ L ethanol as disperser solvent, 3 min). Using Rhodamine B as precolumn derivatization reagent, the stable derivative of PD was obtained in acetonitrile at 70 $^{\circ}$ C for 30 min under microwave radiation (800 W) with the catalyst of *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI) and 4-dimethylaminopyridine (DMAP). And then the PD derivative was separated and detected within 3 min by multiple reaction monitoring (MRM) mode of UHPLC-MS/MS. LOD was 4.0 ng/L, and the LOQ was 15.0 ng/L. This method had good linearity, precision and recovery, and showed obvious advantages such as sensitivity and low matrix effect comparing to the previously reported methods.

Keywords Ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; Rhodamine B; Derivatization; Mass spectrometry sensitization; Panaxadiol

(Received 25 June 2014; accepted 27 August 2014)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81303179), and the Foundation of Qufu Normal University (No. BSQD2012019)