

利用 HPLC-MS/MS 技术进行羟自由基检测的分析方法研究

杨 芬, 张瑞萍, 贺玖明, 再帕尔·阿不力孜*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

Determination of Hydroxyl Radical by Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

YANG Fen, ZHANG Rui-ping, HE Jiu-ming, ZEPER Abliz*

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences
and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

Abstract: Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) can cause severe damage to cells and tissues. However, its analysis is very difficult for its high reactivity and very short life. This paper present a HPLC-MS/MS method for indirectly detecting $\cdot\text{OH}$ by determining DMPO-OH, its adduct with spin trap DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide), with the N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP) used as internal standard. The ratio of the peak area of the DMPO-OH and NMP negatively correlate with the concentration of $\cdot\text{OH}$. The results show that the method is simple, rapid, precise in both the determination of $\cdot\text{OH}$ and evaluation of $\cdot\text{OH}$ scavenging activities of antioxidants.

Key words: hydroxyl radical; liquid chromatography; mass spectrometry

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)增刊-59-02

羟自由基($\cdot\text{OH}$)是活性最强的氧自由基,当其浓度过高时,能破坏细胞成分,使糖类、氨基酸、蛋白质、核酸和脂类等发生氧化,引起多种疾病,包括脑缺血、帕金森症、心血管疾病和癌症等^[1]。因此,羟自由基的定量检测对研究 $\cdot\text{OH}$ 的产生、筛选清除剂和研究相关的疾病等具有重要意义。目前,对于 $\cdot\text{OH}$ 的检测方法主要有ESR、化学发光法、荧光法、紫外(UV)或电化学(EC)检测法、气相色谱-质谱(GC/MS)联用方

法^[1]等。本实验以 Fenton 反应产生 $\cdot\text{OH}$, DMPO(5,5-二甲基-1-吡咯啉-氮氧化物)为 $\cdot\text{OH}$ 捕集剂,生成加合物 DMPO-OH。利用高效液相电喷雾串联质谱(HPLC-MS/MS),多反应监测扫描模式(MRM)通过对 DMPO-OH 的测定,实现对 $\cdot\text{OH}$ 的检测。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

基金项目:国家自然科学基金项目(30371671)

作者简介:杨 芬(1978~),女(汉族),山西人,博士研究生,药物分析专业。E-mail: yf7854@imm.ac.cn

* 通讯作者:再帕尔·阿不力孜(1961~),男(维吾尔族),新疆人,研究员,从事药物分析研究。E-mail: zeper@imm.ac.cn

美国惠普公司的 HP 1100 高效液相色谱系统。

美国 ABI 公司的 QtrapTM 型四极杆-线性离子阱串联质谱仪, 配有电喷雾离子源(ESI)及 Analyst 数据处理系统。

1.2 主要材料与试剂

5,5-二甲基-1-吡咯啉-氮氧化物(DMPO)、无水硫酸亚铁(FeSO_4)购自 sigma 公司。没食子酸、原儿茶酸、水杨酸由中国药品生物制品检定所提供。甲酸、乙腈均为 HPLC 级(Merck 公司)。其余试剂均为分析纯。

1.3 试验条件

1.3.1 反应条件 反应液包含 1 mmol/L Fe^{2+} , 1 mmol/L DMPO, 0.05% H_2O_2 , 醋酸盐缓冲液(pH5), 20 μL 样品或溶剂(作为空白对照)。

1.3.2 色谱条件 色谱柱为 YMC-Pack Pro C_{18} 柱 (150 \times 3 mm, 5 μm); 流动相为 v (乙腈): v (水) = 90 : 10, 流速 0.4 mL/min; 进样量 2 mL。反应液与内标 N-甲基-2-吡咯酮(NMP)混匀后进样。

1.3.3 质谱条件: 电喷雾(ES)离子源; 解簇电压(DP)40 V; 碰撞能(CE)20 V; 离子源温度 380 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.4 $\cdot\text{OH}$ 清除率 P 的计算 $P(\%) = (A_0/A_1 - A_s/A_1) / (A_0/A_1) \times 100$ 。其中, $P(\%)$ 表示清除百分率, A_0 、 A_s 分别表示加入溶剂或样品后的 DMPO-OH 峰面积, A_1 表示 NMP 的峰面积。 P 值的大小与化合物的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力呈正相关关系。

2 结果与讨论

以 A_0/A_1 为指标, 考察了反应的影响因素, 确定了最佳的反应条件。在此条件下, DMPO-OH 和 NMP 在 2.5 min 内实现分离和检测。

甘露醇、硫脲是典型的 $\cdot\text{OH}$ 清除剂, 用来评价本方法的可行性。由结果(图 1)可看出, 清除率与清除剂浓度之间呈正相关关系, 验证了此方法的可靠性。同时对等浓度(1 mmol/L)下, 考察酚酸类化合物(没食子酸、原儿茶酸、水杨酸)的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力, 其能力大小顺序为: 没食子酸 > 原儿茶酸 > 水杨酸。与文献[2]报道的清除 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 能力的结果一致。

此方法快速、简便、用样量少, 可用于检测 $\cdot\text{OH}$, 评价化合物的 $\cdot\text{OH}$ 清除能力, 对快速筛选抗氧化剂提供有益的帮助。

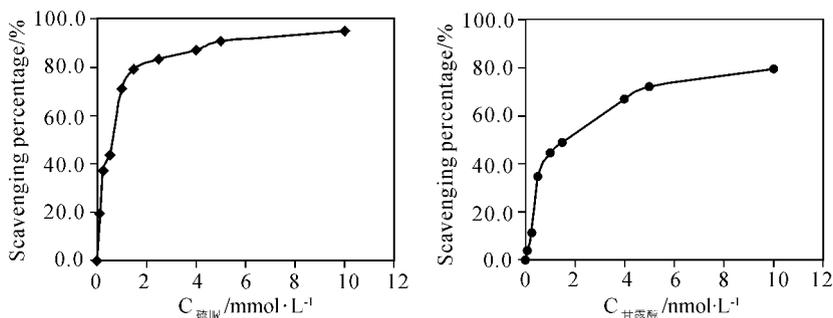


图 1 硫脲和甘露醇的 $\cdot\text{OH}$ 清除率

Fig. 1 The $\cdot\text{OH}$ scavenging percentage of thiourea and mannitol

参考文献:

[1] Cheng F C, Jen J F, Tsai T H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods[J]. J. Chromatogr. B, 2002, 781(1-2):481-496.

[2] Rice-Evans CA, Miller N J, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J]. Free Radic. Bio. Med., 1996, 20(7):933-956.