

与质量浓度比值的平方根成负相关($P < 0.05$); 原儿茶醛的含量与 480 nm 处吸光度与质量浓度比值的平方根成正相关, 450 nm 吸光度与质量浓度比值的平方根成负相关($P < 0.05$)。而丹参酚酸 B、丹参酚酸 A、丹参素、咖啡酸、迷迭香酸与吸光度之间的相关性不明显($P > 0.05$)。

3 讨论

本试验采用色彩色差计法测量丹参药材颜色, 10 次测定的色度值 $L^*a^*b^*$ 值的 RSD 在 1.1 % 至 1.9 % 之间, 表明多次测量偏差很小, 方法稳定。应用色彩色差计的 $L^*a^*b^*$ 系统, 表明丹参药材表面颜色的色度值 a^* 与丹参酮类成分具有正相关性, 而断面的颜色变化和丹参活性成分的含量未见相关性。说明传统的“皮丹肉紫”的评价方式中“皮”比“肉”的颜色特征更重要, 皮的颜色差异与药材的品质差异相关, 证明用色彩色差计法在量化药材颜色上具有可行性, 与传统经验鉴别相比, 本方法还具有测量方法简便, 数据客观、稳定等优点。

本试验测定了丹参药材的醇提取液在 450 nm 和 480 nm 处吸光度与质量浓度比值, 结果显示丹参酮类成分与 450 nm 处吸光度与质量浓度比值的平方根成正相关, 而与 480 nm 处吸光度与质量浓度的平方根成负相关; 当吸光度与质量浓度比值接近时, 表明丹参酮 II A 含量低。本法能有效反映丹参酮类成分的含量, 可作为丹参药材质量快速评价的一种方法。

本实验采用色彩色差计法和比色法均获得了丹参酮类成分的相关性模型, 为探索丹参质量的快速评价奠定了基础, 但 R^2 值均低。在本研究的基础

上, 相关方法学的研究和规范的丹参药材质量快速评价方法的探究工作值得进一步深入开展。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(1 部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 52.
- [2] 明·李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 322.
- [3] 万德光. 中药品质研究—理论、方法与实践[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 79–87.
- [4] 曹明成, 沈善, 潘纯发. 丹参提取工艺的实验研究[J]. 中成药, 1996, 18(3): 4–6.
- [5] 王介明, 周宇, 李洪, 等. 中药丹参制剂提取新工艺的研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2002, 10(6): 334–336.
- [6] 杨新杰, 万德光, 刘敏, 等. 丹参水溶性成分的地域分布特点分析[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23: 684–68.
- [7] 杨新杰, 万德光, 林贵兵, 等. 丹参脂溶性成分的地域分布特点分析[J]. 中草药, 2010, 41(5): 809–812.
- [8] 林蔚兰, 罗杰. 丹参药材外观性状与丹参酮含量的关系[J]. 中华现代中西医杂志, 2004, 2(7): 653.
- [9] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 586.
- [10] Tian G, Zhang Y, Zhang T, et al. Separation of lanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high speed counter-current chromatography using stepwise elution[J]. J Chromatogr A, 2000, 904(1): 107–111.
- [11] Pan X, Niu G, Liu H. Microwave-assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* Bunge with analysis by high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2001, 922(1–2): 371–375.
- [12] 杨新杰. 环境因子对丹参质量的影响研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.

(编辑: 邓响潮)

毛细管电泳和质谱联用在线预浓缩酚酸类化合物及其抗氧化活性评价

王文明, 段 启(广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520)

摘要: 目的 建立一种新型高效的毛细管电泳和质谱联用(CE-MS)在线预浓缩方法, 用于检测丹参样品中酚酸类化合物中 4 种亲水活性成分(丹参素、丹酚酸 B、咖啡酸和紫草酸), 并对其抗氧化活性作出评价。方法 利用 CE-MS 在线预浓缩技术, 采用未涂层石英毛细管柱(90 cm × 50 μm), 电压: 27 kV。样品的进样压力: 50 mbar, 进样时间: 3 ~ 300 s, 毛细管温度: 25 °C。鞘液: 5 mmol·L⁻¹ 的乙酸氨溶液(甲醇溶解), 流速: 4 mL·min⁻¹。结果 该技术灵敏度比通常的流体注射提高了 30 ~ 50 倍。结论 该方法可用于分析丹参药材中丹

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 王文明, 男, 副教授, 副主任中药师, 研究方向: 中药质量标准研究。Email: wwm5711@163.com。

参素、丹酚酸、咖啡酸、紫草酸等酚酸类化合物,也可以用于评价丹参样品中酚酸类化合物的抗氧化成分。

关键词: 毛细管电泳-质谱联用技术;在线预浓缩;酚酸类化合物;抗氧化活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)03-0338-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.03.025

Analysis of Phenolic Acids and Their Antioxidant Activity by Capillary Electrophoresis-mass Spectrometry with Field-amplified Sample Injection

WANG Wenming, DUAN Qi(Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520 Guangdong, China)

Abstract: Objective A capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) method with field-amplified sample stacking was developed to analyze and detect four hydrophilic active components(danshensu, salvianolic acid B, caffeic acid and lithospermic acid) presented in Radix Salviae Miltiorrhizae samples, and to evaluate their antioxidant activity.

Methods The assay was performed on an uncoated fused-silica capillary of 95 cm × 50 μm, and a positive voltage of 27 kv was applied. The sample was injected under pressure of 50 mbar for 3-300 s and the temperature of capillary was kept at 25 °C. Sheath liquid consisted of 5 mmol · L⁻¹ ammonium acetate in methanol solution, flowing at 4 mL · min⁻¹. **Results** By utilizing the preconcentration technique, the sensitivity of CE-MS was enhanced by approximately 30-50 folds in terms of detection limit compared to common hydrodynamic injection. **Conclusion** The established method can be used in the analysis of components(danshensu, salvianolic acid B, caffeic acid and lithospermic acid) in Radix Salviae Miltiorrhizae, and can also be applied to evaluate the antioxidant activity of phenolic acid.

Keywords: Capillary electrophoresis-mass spectrometry(CE-MS); Field-amplified sample stacking; Phenolic acid; Antioxidant activity

近年对酚酸类化合物的研究引起广泛的关注,主要因其对氧化应激能产生防御作用^[1-3]。毛细管电泳和质谱检测器联用(CE-MS)已成为一种有效的分离工具,可用于分离中性和带电荷的化合物,具有定性分析物结构信息的独特优势^[4-5]。本品为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根及根茎,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效,主要用于治疗心脑血管疾病^[6-7]。本研究采用 CE-MS 在线预浓缩方法,测定丹参中酚酸类化合物中 4 种亲水活性成分的含量,并评价其抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 丹参素、丹酚酸 B、咖啡酸、紫草酸从丹参的根和根茎中分离获得;丹参药材购自北京同仁堂药业有限公司,经我院梁永枢副主任中药师鉴定为唇形科植物丹参的根及根茎。5-O-dicaffeoyl quinic acid 作为内标溶液,从忍冬属植物中分离制备;色谱级的甲醇(批号: B9093-68)和

乙腈(批号: B9012-03),德国 Merck 公司。1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH,批号: 095K1452)、甲酸氨(批号: K736010)、乙酸氨(批号: 11668-019)、甲酸(批号: 64-18-6)、乙酸(批号: N1661-1),美国 Sigma 公司;超纯水制备:美国 Millipore 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Milli-Q 超纯水系统,美国 Millipore 公司; Agilent 3D CE 系统与 Trap XCT 质谱联用仪,配备 CE-ESI-MS sprayer kit (G1607A),美国安捷伦科技公司;未涂层石英毛细管柱(95 cm × 50 μm),河北永年锐丰仪器配件公司。

1.3 方法

1.3.1 标准品溶液制备 准确称取丹参素、丹酚酸 B、咖啡酸、紫草酸、5-O-dicaffeoyl quinic acid 分别溶解在 50 % 的甲醇中制成 2.5, 5, 100 μg · mL⁻¹ 及 10, 5 mg · mL⁻¹ 的溶液。

1.3.2 丹参提取物的制备 丹参药材收集于浙江省,取大约 0.3 g 的药材粉末(过 60 目筛)浸入 10 mL 甲

醇中,在暗处超声 60 min,溶液经 0.22 μm 膜过滤,立即使用或保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.3.3 CE-MS 条件 电泳条件:未涂层石英毛细管柱 (95 cm $\times$ 50 μm) 经过紫外检测器用于电泳的分离。缓冲液:10 mmol·L⁻¹ 乙酸氨,用乙酸调节 pH。分离电压:27 kV;柱温:25℃;样品的进样压力:50 mbar,进样时间:3~300 s。在使用前,毛细管依次用 1 mol·L⁻¹ NaOH、0.1 mol·L⁻¹ NaOH、纯水和缓冲液各冲洗 10 min。每次进样前,毛细管用水冲洗 10 min,分离缓冲液洗 5 min。为保持结果的重现性,运行 3 次后,电极缓冲液被更换 1 次。质谱条件:在负离子模式下,运行电喷雾质谱分析;喷雾压力 12 psi;干燥气流速 6 L·min⁻¹;干燥气温度 150℃;裂解电压 75 V;毛细管电压 4000 V;选择离子监控模式 (SIM), $[M-H]^-$ 为加和离子;鞘液组成:5 mmol·L⁻¹ 乙酸氨溶解在甲醇中,流速 4 mL·min⁻¹,同时配备 1:100 分流器。

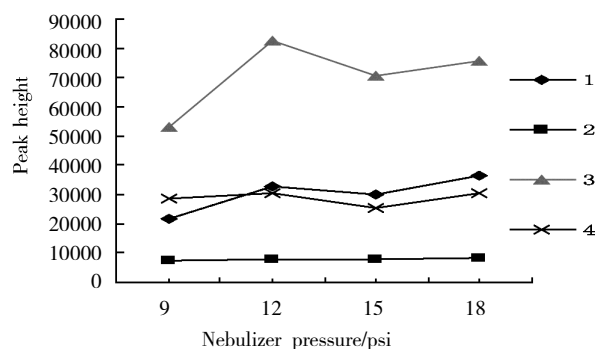
1.3.4 丹参提取物的抗氧化活性测定 250 μL 不同浓度的丹参提取物加入 150 μL DPPH (终浓度为 0.3 mmol·L⁻¹)。反应溶液涡旋几秒钟,在室温下暗处静置 20 min。样品溶液过 0.22 μm 膜过滤,3 s (50 mbar) 样品进样 CE-MS。250 μL 甲醇加入 150 μL DPPH (终浓度为 0.3 mmol·L⁻¹) 中得到空白溶液。DPPH,含奇电子的顺磁化合物,在甲醇中具有很强的吸收光谱。抗氧化剂和自由基的反应会使抗氧化剂氧化,被还原成 DPPH-H,吸光度降低。在酚酸抗氧化剂中,颜色从紫色变为黄色,表示一个或多个氢原子从抗氧化剂中转移到自由基上。无抗氧化剂的样品在加入 DPPH 后,峰面积几乎没有变化。

2 结果

2.1 喷雾气压的作用 见图 1。结果显示随着电压的增加,化合物峰高增加,但分离度降低。此外,随着雾化压力的降低,样品的迁移时间也会延长。

2.2 干燥气流速及干燥温度的作用 见图 2。图 2A 中,干燥气的流速在 6 L·min⁻¹ 以上时,峰高和 MS 信号有所降低。图 2B 中,当温度变化时,流速在相应范围内时,峰高有相反的变化。

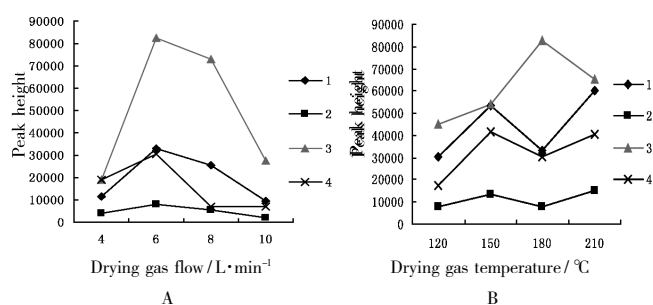
2.3 鞘液组成和流速的作用 见图 3。结果显示了含有不同浓度的甲醇溶液 (40%~100%) 的酚酸标准品的表观淌度。此外,鞘液中甲醇浓度的增加会引起化合物的迁移率显著降低。当鞘液组成为 5 mmol·L⁻¹



1. 丹参素; 2. 丹酚酸 B; 3. 咖啡酸; 4. 紫草酸

图 1 喷雾压力对 4 种酚酸峰高的影响

Figure 1 Effects of nebulizer pressure on peak height of four phenolic acids



1. 丹参素; 2. 丹酚酸 B; 3. 咖啡酸; 4. 紫草酸

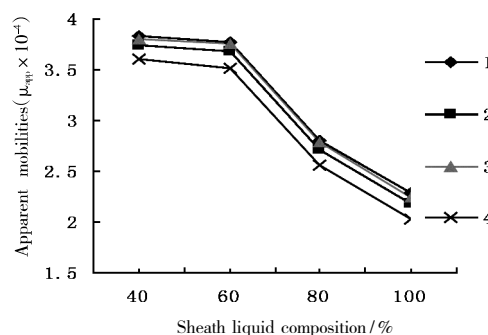
A. 干燥气流, 4~10 L·min⁻¹; B. 干燥温度, 120℃~210℃

图 2 干燥气流速及干燥温度对 4 种酚酸类化合物峰高的影响

Figure 2 Effects of drying gas flow rate and drying gas temperature on peak height of four phenolic acids

的乙酸氨溶液 (甲醇溶解) 时,鞘液流速对化合物分离度和灵敏度的影响也被优化。随着流速的增加 (2~4 mL·min⁻¹), MS 的灵敏度也增加了,但是当流速大于 4 mL·min⁻¹ 时,信号强度也随之降低。

2.4 样品长度对预浓缩效率的作用 见图 4。在 300 s 时的注射长度有最大的峰面积。而且,在注射长度由 50~300 s 的变化中,堆积区域的增加值几乎是 5

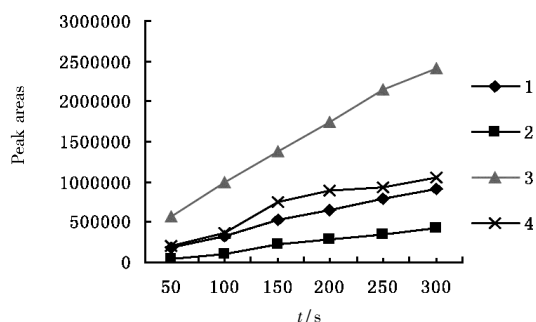


1. 丹参素; 2. 丹酚酸 B; 3. 咖啡酸; 4. 紫草酸

图 3 鞘液组成对 4 种酚酸表现迁移率的影响

Figure 3 Effects of sheath liquid composition on apparent mobilities (μ_{app}) of four phenolic acids

倍,但是分辨率相应有所下降。酸性较强的物质(丹参素、丹酚酸 B 和紫草酸)峰面积逐渐变大,而酸性弱的咖啡酸峰面积显著增加。这是由于丹参素、丹酚酸 B 和紫草酸含有更多的酚羟基基团,在样品区域的堆积能力大大降低。

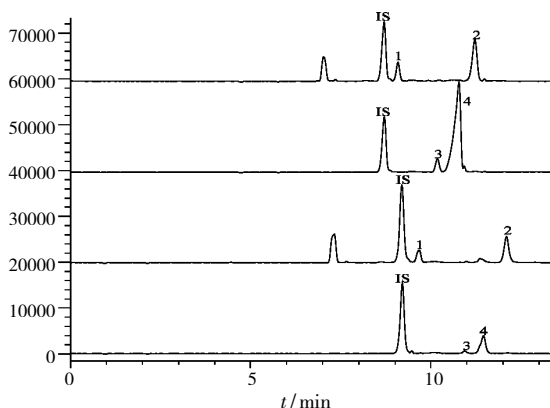


1. 丹参素; 2. 丹酚酸 B; 3. 咖啡酸; 4. 紫草酸

图 4 样品注射柱长对 CE-MS 预浓缩效率的影响

Figure 4 Effects of sample plug length on preconcentration efficiency

2.5 基于 CE-MS 总抗氧化能力分析 见图 5。可以看到丹参提取物的色谱图中有 4 个峰,在加入 DPPH 后峰面积明显减小。丹参素、丹酚酸 B、咖啡酸和紫草酸的峰面积被 DPPH 氧化后分别减少了 19.3 %, 14.2 %, 77.0 %和 61.1 %。咖啡酸的抗氧化能力最强。



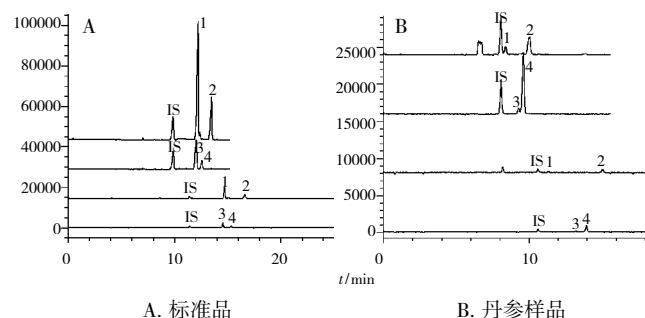
1. 丹参素; 2. 丹酚酸 B; 3. 咖啡酸; 4. 紫草酸

图 5 丹参提取物与 DPPH 自由基反应前后的 CE-MS 色谱图

Figure 5 Electropherograms of *Danshen* extract before and after reaction with DPPH free radicals

2.6 方法验证和应用 见图 6。本试验中,线性范围在 $0.05 \sim 4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $r > 0.990 (n=6)$, 4 种分析物的检测限小于 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 精密度测定结果显示,迁移次数和峰面积的 RSD 分别小于 2.41 %和 5.26 % ($n=6$)。图 6A 显示的是酚酸标准品大体积进样(50

mbar, 50 s)的电泳图,与常规进样相比,所有峰的灵敏度和形状都大大改善。在 CE-MS 在线预浓缩方法中使用低传导样品时,分析物的检测限(LOD)能够提高 30~50 倍(其灵敏度较通常流体注射高)。此外,我们用此方法测定丹参中 4 种酚酸的含量(图 6B),尽管浓度只有通常进样注射的 1/20,但是在大批进样条件下,还是能得到较好的峰。



1. 丹参素; 2. 丹酚酸 B; 3. 咖啡酸; 4. 紫草酸

图 6 常规和 CE-MS 堆积方法分析丹参素、丹酚酸、咖啡酸、紫草酸(A)和丹参样品的色谱图(B)

Figure 6 Electropherograms of *Danshen* standard(A) and sample (B) determined by the conventional and stacking CE-MS methods

3 讨论

尽管 CE-MS 在分析领域已获得广泛的应用,但与高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)相比较,由于吸光路径短($25 \sim 100 \mu\text{m}$)和纳升级进样,CE-MS 仍然存在检测灵敏度偏低的缺陷。因此,建立 CE-MS 在线预浓缩技术,降低检测限的方法已成为研究重点。现在,已有少数几种改进 CE-MS 灵敏度的方法^[8-10],其中样品堆积技术是应用最广泛的一种。有研究^[11-12]报道了酸性化合物 CE-MS 的测定方法,但这些方法显示出较高的检测限,通常认为对酸性物质的分析是不合适的。近年的研究证明了在线联用 HPLC 的分离,以及清除自由基活性评价的方法^[13-14],但国内未见 CE-MS 测定酚酸类抗氧化活性的方法。

通常, SIM 模式下对电喷雾参数的优化会使酚酸在 MS 中得到较好的检测。为了研究喷雾气压对 MS 信号强度和酚酸分离度的作用,我们设计电压在 9 ~ 18 psi 范围内变化的试验。为了达到较好的信号强度和分离效果,我们选择了 12 psi 的压力。本实验中,干燥气(N_2)的流速和温度能很大程度地影响电喷雾信号的强度,但不同于喷雾气压,这两个参数对迁移

时间和化合物的分离度没有影响。因此,我们选择干燥气流速为 $6\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 温度为 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。鞘液的流速对分离的化合物的迁移时间有较大的影响, 较低的流速会导致不稳定的喷雾, 较高的流速会导致较低的信噪比, 综合分辨率和 MS 响应考虑, 本研究选择鞘液流速为 $4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。CE-MS 的界面需要加入鞘液确保毛细管出口和电喷雾器的电接触, 以便获得稳定的电喷雾。鞘液组成和流速的选择对 CE-ESI-MS 方法分析酚酸类化合物也极为重要。结果显示, 当鞘液组成为 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酸氨溶液(甲醇溶解)时能够提供分析酚酸的最高灵敏度。

本研究选择去离子水作为样品基质来评价上样长度对分析物预浓缩效果的影响。结果表明, 在线浓缩 CE-MS 中, 化合物的结构(含有酚羟基的数量, 见 2.4 项下)是提高灵敏度的一个重要参数。

DPPH, 含奇电子的顺磁化合物, 在甲醇中具有很强的吸收光谱。抗氧化剂与自由基的反应会使抗氧化剂氧化, 被还原成 DPPH-H, 吸光度降低。没有抗氧化剂的样品在加入 DPPH 后, 峰面积几乎没有变化, 而丹参提取物在加入 DPPH 后峰面积明显缩小。

本研究通过优化质谱的喷雾压力、干燥气温度和流速、鞘液组成和流速、样品的注射长度等因素, 建立一种独特和高效的 CE-MS 在线预浓缩方法, 灵敏度比通常的流体注射提高了 30~50 倍, 我们认为优化的 CE-MS 方法可用于分析丹参药材中丹参素、丹酚酸、咖啡酸、紫草酸等酚酸类化合物, 也可以用于评价丹参样品中酚酸类化合物的抗氧化成分。

参考文献:

- [1] Scampicchio M, Wang J, Blasco AJ, et al. Nanoparticle-based assays of antioxidant activity[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(6): 2060-2063.
- [2] Shi S, Zhao Y, Zhou H, et al. Identification of antioxidants from *Taraxacum mongolicum* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-radical-scavenging detection-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1209(1-2): 145-152.
- [3] Niederländer HA, van Beek TA, Bartasiute A, et al. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1210(2): 121-134.
- [4] Graham RL, McClean S, O'Kane EJ, et al. Adenosine in the venoms from viperinae snakes of the genus *Bitis*: identification and quantitation using LC/MS and CE/MS[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(1): 88-94.
- [5] Poleć-Pawlak K, Abramski JK, Ferenc J, et al. Application of capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry to comparative studying of the reactivity of antitumor ruthenium(III) complexes differing in the nature of counter-ion toward human serum proteins[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1192(2): 323-326.
- [6] Cao J, Chen J, Yi L, et al. Comparison of oil-in-water and water-in-oil microemulsion electrokinetic chromatography as methods for the analysis of eight phenolic acids and five diterpenoids[J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(11): 2310-2320.
- [7] Cao J, Wei YJ, Qi LW, et al. Determination of fifteen bioactive components in *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection[J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(2): 164-172.
- [8] Imami K, Ishihama Y, Terabe S. On-line selective enrichment and ion-pair reaction for structural determination of sulfated glycopeptides by capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1194(2): 237-242.
- [9] Bermudo E, Núñez O, Moyano E, et al. Field amplified sample injection-capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in foodstuffs[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1159(1-2): 225-232.
- [10] Imami K, Monton MR, Ishihama Y, et al. Simple on-line sample preconcentration technique for peptides based on dynamic pH junction in capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1148(2): 250-255.
- [11] García-Villalba R, Cortacero-Ramírez S, Segura-Carretero A, et al. Analysis of hop acids and their oxidized derivatives and iso- α -acids in beer by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(15): 5400-5409.
- [12] Backofen U, Matysik FM, Lunte CE. Determination of cannabinoids in hair using high-pH non-aqueous electrolytes and electrochemical detection. Some aspects of sensitivity and selectivity[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 942(1-2): 259-269.
- [13] Shui G, Leong LP. Analysis of polyphenolic antioxidants in star fruit using liquid chromatography and mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1022(1-2): 67-75.
- [14] Pukalskas A, Van Beek TA, De Waard P. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection-DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1074(1-2): 81-88.

(编辑: 邓响潮)