

高效液相色谱-串联质谱法同时测定水溶性迷迭香提取物中迷迭香酸、阿魏酸和咖啡酸的含量

许高燕*, 刘莹雯, 银董红

(湖南师范大学化学化工学院, 长沙 410081)

摘 要:本文建立了一种同时快速测定水溶性迷迭香提取物中迷迭香酸、阿魏酸和咖啡酸含量的高效液相色谱-串联质谱(HPLC/MS/MS)分析方法。以甲醇和 0.1% 乙酸铵溶液为 HPLC 的流动相;MS/MS 使用多反应监测(MRM)扫描方式,在 3 min 内可完成迷迭香酸、阿魏酸和咖啡酸三种化合物的分离分析。上述三种分析物在 5~500 ng/mL 范围内线性良好($r > 0.999$);检出限均低于 5.0 ng/mL。本法操作简便、分析速度快、灵敏度高,可用于水溶性迷迭香提取物中迷迭香酸、阿魏酸和咖啡酸含量的测定。

关键词:迷迭香酸;阿魏酸;咖啡酸;液相色谱-质谱;迷迭香提取物

中图分类号:O657.63

文献标识码:A

1 前言

迷迭香系唇形科迷迭香属常绿小灌木植物。目前,有关迷迭香的研究主要集中于挥发性精油的研究^[1-3],而对迷迭香的水溶性成分的研究相对较少。据报道,迷迭香水溶性成分中含有迷迭香酸等多种活性物质^[4],其中的迷迭香酸在抗炎、抗氧化、抗花生四烯酸代谢、抗血栓及增强纤溶性等方面都有明显作用^[5]。因此,对迷迭香酸等迷迭香水溶性成分进行定量测定具有重要意义。文献报道的定量检测迷迭香酸的方法有:分光光度法^[6]、高效液相色谱法^[7,8]等,但迄今尚未见有对迷迭香水溶性成分进行同时定量检测的报道。

本文利用串联质谱(MS/MS)可同时快速测定多种物质的特性,使其作为高效液相色谱(HPLC)的检测器,建立了快速、同时测定迷迭香酸及阿魏酸和咖啡酸的 HPLC-MS/MS 分析法,并应用于水溶性迷迭香提取物中有效成分迷迭香酸及阿魏酸和咖啡酸含量的测定。方法具有操作简便、分析速度快及灵敏度高的特点。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪;API3000 三重四极杆质谱仪(美国,应用生物系统公司),配有电喷雾离子源;Analyst 1.3.2 数据处理系统和 WinZip1.1 定量软件。

迷迭香酸对照品为美国 Sigma 公司产品(纯度 99.8%);咖啡酸和阿魏酸对照品由中国药品生物制品检定所提供;水杨酸(内标,上海三浦化工有限公司);甲醇(色谱纯,DIMA Tech,USA);乙酸铵(色谱纯,DIMA Tech,USA)。实验用水为二次蒸馏水并经 Milli-Q 系统纯化。

水溶性迷迭香提取物为海南舒普生物科技公司产品(批号:W-031201)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备 准确称取水溶性迷迭香提取物粉末 10 mg,超声溶解于甲醇(含 10 μ g/L 水杨酸),定

收稿日期:2005-07-19

修回日期:2005-09-28

通讯联系人:许高燕,硕士研究生。

容至 100 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤,用甲醇(含 10 μg/L 水杨酸)稀释至含水溶性迷迭香提取物 1 μg/mL,待测。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 ODS C₁₈ 柱(50 ×2.1 mm i. d., 5 μm,日本);流动相为甲醇-0.1 %乙酸铵水溶液(95 5,V/V),流速为 0.2 mL/min,柱温为 20 ,进样体积为 3 μL。以水杨酸为内标物进行测定。

2.2.3 质谱条件 离子源为 Turbo Ion spray(ESI 源),雾化气为 8 mL/min,气帘气为 9 mL/min,辅助加热气为 7 mL/min,辅助加热气温度为 425 ,碰撞气为 9 mL/min,碰撞气压力 1.9 Pa。除碰撞气为氩气外,其它三种气体均为氮气;电离电压为 - 4.5 kV。碰撞诱导解离(CID)电压为 25 V;采用负离子模式检测;扫描方式为多级反应监测(MRM)。

3 结果与讨论

3.1 质谱分析条件的优化

将迷迭香酸、咖啡酸、阿魏酸和内标水杨酸标准品分别溶于甲醇,制成 100 ng/mL 溶液。通过注射泵连续进样,采用负离子模式,三种化合物的子离子见图 1。优化其它质谱条件,目标分析物和内标物的准分子离子(Q1)及定性或定量离子(Q3),最佳去簇电压(Declustering Potential,DP)及碰撞能量(Collision Energy,CE)见表 1。

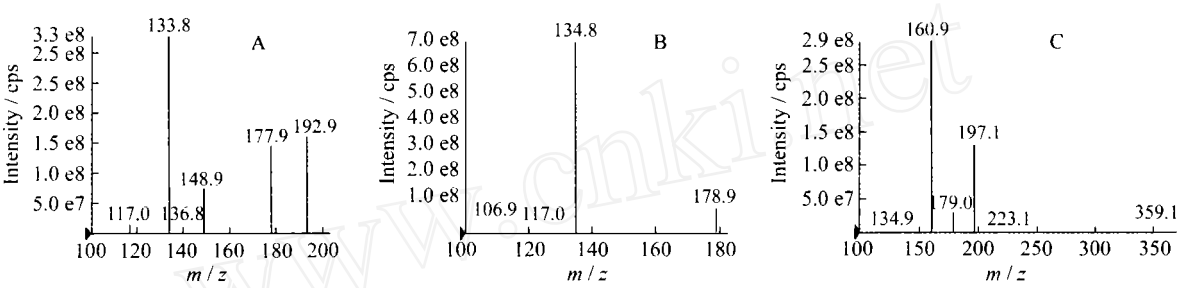


Fig. 1 Productions of ferulic acid(A) , caffeic acid(B) and rosmarinic acid(C)

Table 1 Table 1 Characteristic parameters of the compounds analyzed by LC-MS

Compounds	Q1(m/ z)	Q3(m/ z)	DP(V)	CE(V)
Ferulic acid	192.9	177.9	- 55.0	- 21.0
	192.9	133.8 ^a	- 55.0	- 18.0
Caffeic acid	178.9	134.8 ^a	- 55.0	- 22.0
Rosmarinic acid	359.1	197.1	- 55.0	- 25.0
	359.1	160.9 ^a	- 55.0	- 25.0
Salicylic acid	136.9	93.1 ^a	- 55.0	- 27.0

^aQuantifier ions.

3.2 流动相的选择

采用 MS-MS 进行定性及定量分析时,通过选定目标物对应的离子对,可以单独分析一种物质,共流动物对单一组分分析没有干扰。实验从分析的选择性及灵敏度的角度考虑,采用甲醇-水(含 0.1 %乙酸铵)体系为流动相。在水中添加乙酸铵,目的是在电喷雾离子源条件下促进几种酸化合物的离子化。通过改变流动相的配比来优化色谱洗脱条件。实验结果说明,随着流动相中水的比例增加,分析时间变长,峰形变宽,并出现严重的拖尾现象,且灵敏度降低;而水含量过低时,峰形变窄、对称性好,但灵敏度降低;当流动相甲醇-水的比例为 95 5(V/V)时洗脱最佳。因此,最后选择甲醇-水(含 0.1 %乙酸铵)的配比 95 5(V/V)为流动相。

3.3 线性范围、检出限及重现性

将标准储备液(1 mg/mL)用甲醇(含 10 μg/L 水杨酸)稀释,配成 5、10、20、50、100、200、500 ng/mL 的标准溶液,依次进样 3 μL,在上述色谱、质谱条件下分析检测。用加权 1/ C² 最小二乘法进行回归运算,得线性回归方程分别为:迷迭香酸 Y = 0.0104 X + 0.0034(r = 0.9990),咖啡酸 Y = 0.034 X + 0.026(r =

0.9995),阿魏酸 $Y = 0.031X + 0.002$ ($r = 0.9992$)。结果表明,待测物在 $5 \sim 500 \text{ ng/mL}$ 浓度范围线性良好,方法的检出限均在 5 ng/mL 以内。对 50 ng/mL 的迷迭香酸、咖啡酸和阿魏酸溶液进行 11 次平行测定,相对标准偏差(RSD)分别为 2.7%、3.5%和 4.8%。

3.4 加标回收实验及样品分析

取 2 mg 同一提取物样品粉末 6 份,其中 3 份作为对照,另外 3 份分别加入含迷迭香酸、咖啡酸和阿魏酸均为 60、100、200 μg 的标准品溶液(含 $10 \mu\text{g/L}$ 水杨酸),按 2.2.1 方法制备样品溶液并稀释至含迷迭香提取物的浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 用以测定。重复此实验过程三次,迷迭香酸的回收率为 84.4%~93.4%,咖啡酸为 91.1%~97.2%,阿魏酸为 86%~91.4%。

取水溶性迷迭香提取物样品溶液 $3 \mu\text{L}$ 进样,连续 5 次测定,水溶性迷迭香提取物中迷迭香酸、咖啡酸、阿魏酸的含量分别为 6.86%、3.42%、3.93%。

参考文献:

- [1] TU Peng-fei(屠鹏飞),XU Zhi-hong(徐志宏). Research and Development of Natural Products(天然产物研究与开发) [J],1998,10(3):62.
- [2] Paris. A,Strukel. J. B, Renko. M, et al. J. Nat. Prod. [J],1993,56(8):426.
- [3] Richheimer. S. L, Bernart. M. W, King. G. A, et al. J. Am. Oil Chem. Soc. [J],1996,73(4):507.
- [4] HAN Hong-xin(韩宏星),SONG Zhi-hong(宋志宏),TU Peng-fei(屠鹏飞). Chinese Herbal Medicine(中草药) [J],2001,32(10):877.
- [5] LI Wei-gang(李伟刚),LIANG Jing-yu(梁敬钰). Strait Pharmaceutical Journal(海峡药学) [J],2004,16(1):1.
- [6] DU Gui-cai(杜桂彩),WANG Su-jun(王素君),YANG Hong(杨宏). Journal of Qindao University(青岛大学学报) [J],2003,18(4):67.
- [7] CHEN Fai-kui(陈发奎). Determination of Effective Component in Common Use Medicinal Herbs(常用中草药有效成分含量测定) [M]. Beijing(北京):The People's Health Press(人民卫生出版社),1997:738.
- [8] Señor áns. F. J, Ibañez. E, Caverro. S, et al. J. Chromatogr. A [J],2000,870(2):491.
- [9] Rashed. M. S, Ozand. P. T, Harrison. M. E, et al. Rapid Commun Mass Spectrom. [J],1994,8(1):129.

Simultaneous Determination of Rosmarinic Acid, Caffeic Acid and Ferulic Acid in Water-soluble Extract of Rosemary by LC/MS/MS

XU Gao-yan, LIU Ying-wen, YIN Dong-hong*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: A rapid LC/MS/MS method was developed for the simultaneous determination of rosmarinic acid, caffeic acid and ferulic acid. The mobile phase of HPLC was methanol-0.1% ammonium acetate aqueous solution. As to MS/MS, multi-reaction monitoring (MRM) scan was employed, and a complete analysis can finished in three minutes. The calibration curves for three analytes were linear in the range from $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ to $500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The developed method was rapid, accurate, robust and convenient, and it was applied to the measurement of rosmarinic acid, caffeic acid and ferulic acid concentrations in water-soluble extract of rosemary with satisfactory results.

Keywords: Rosmarinic acid; Caffeic acid; Ferulic acid; Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; Water-soluble extract of rosemary