DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01657

生物合成咖啡酸苯乙酯体系的液相色谱-串联质谱快速分析

卢定强*[1,2] 蒋 奔[1] 王 俊[1,3] 赵 辉[1] 凌岫泉[1] 柴 宏[1] 夏 亭[3]
[1](南京工业大学药学院,南京 210009) [2](江苏省药物研究所,南京 210009)
[3](江苏科技大学生物与环境工程学院,镇江 212018)

摘 要 建立液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 检测生物合成咖啡酸苯乙酯体系中咖啡酸(Caffeic acid, CA) 和咖啡酸苯乙酯(Caffeic acid phenethylester, CAPE) 的方法。采用 LC-MS/MS 电喷雾电离(ESI) ,负离子选择反应监测(SRM) 模式检测。以 V(乙腈) ∶V(水) ∶V(冰醋酸) =55∶45∶0.5 为流动相,流速 1.0 mL/min,Hypersil C_{18}色谱柱分离并检测生物合成咖啡酸苯乙酯体系中的咖啡酸以及咖啡酸苯乙酯的含量,并对生物合成咖啡酸苯乙酯的收率进行了动力学分析。本方法在进样量为 0.2 ~ 20 μg 时具有良好的线性关系,咖啡酸和咖啡酸苯乙酯样品的加标回收率分别为 93.4% ~ 98.2% 和 90.3% ~ 97.8%,相对标准偏差分别为 1.79% ~ 2.56% 和 1.82% ~ 3.67%,咖啡酸苯乙酯收率在 3 d 内可以达到 15.54%,表明本方法简便、快速、可靠。

关键词 液相色谱-串联质谱法; 咖啡酸苯乙酯; 咖啡酸; 生物(酶) 合成体系

1 引 言

咖啡酸苯乙酯(Caffeic acid phenethyl ester,CAPE) ,化学名为 3-(3′,4′-二羟基苯基) -2-丙烯酸苯乙醇酯,是蜂胶中的主要有效成分,具有抗氧化[1]、抑制 DNA[2]、抗病毒、抗菌、消炎、抗动脉硬化及提高免疫力等多种药理活性,其中抗肿瘤活性最为显著,是当前新药研发的热点化合物。咖啡酸苯乙酯的制备方法大致包括: 植物提取法、化学合成法[3]和生物合成法[3]。生物合成法耗时,但具有合成条件温和、操作简单、成本低等优点,72 h 内咖啡酸苯乙酯转化率可以达到 15.54%,是广泛采用的制备方法。

有关咖啡酸(Caffeic acid, CA) 和咖啡酸苯乙酯测定已多有报道,包括不同样品来源,如蜂胶[4]、红景天(Rhodiola sacra)[5]、苹果汁[6]等,采用的测定方法主要有薄层色谱法[7]、毛细管电泳法[8]、气相色谱法[9]及高效液相色谱法[4]等。但是,已报道的检测方法多适用于包含咖啡酸及其衍生物等多组分的天然产物的分离检测,操作繁杂,不适于咖啡酸苯乙酯生物转化体系中咖啡酸和咖啡酸苯乙酯的分析。本研究对咖啡酸的生物转化进行了研究,建立了简单快速的测定生物合成咖啡酸苯乙酯体系中咖啡酸和咖啡酸苯乙酯的液相色谱-串联质谱方法。通过对咖啡酸苯乙酯生物合成体系中咖啡酸苯乙酯含量及其酶促反应动力学的测定和研究,以便于在化工设计和反应分离耦合的方向来提高生物法的工业化效率。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters2695 型高效液相色谱仪、Waters Micromass Quattro Micro API 型三重四级杆质谱仪,ESI 源,MassLynx 数据处理系统(美国 Waters 公司) ; DHZ-CA 恒温气浴摇床(太仓实验仪器设备厂) ; FA1104N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司) ; Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司) 。

咖啡酸(南京泽朗医药科技有限公司) ; 咖啡酸、咖啡酸苯乙酯标准品、诺维信脂肪酶 435(Sigma 公司) ; 乙腈、甲醇、丙酮、冰醋酸(色谱纯,Sigma 公司) ; 实验用水为经 Milli-Q 净化系统(0.22 μm 过滤膜) 过滤的去离子水; 氮气、氩气(>99.999%) ; 其它试剂均为分析纯。

2.2 色谱-质谱条件

(1) 液相色谱条件 Hypersil C_{18}分析柱(250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm, 大连依利特公司) ; 流动

2010-01-09 收稿; 2010-04-11 接受
本文系国家自然科学基金(No. 20876076) ,国家重点基础研究发展计划(No. 2009CB724700) ,江苏省自然科学基金(No. BK2009213) 资助项目
* E-mail: ludingqiang@njut.edu.cn

相: V(乙腈):V(水):V(冰醋酸)=55:45:0.5; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 紫外检测器; 检测波长: 325 nm; 柱温: 30 ℃。(2) 质谱条件　电喷雾离子源(ESI),负离子模式,选择反应检测(SRM),喷雾电压: 2800 V, 离子传输毛细管温度: 350 ℃,源内碰撞诱导解离电压: 20 V,锥孔气流速: 1.2 L/min,干燥气(N_2)流速: 10 L/min,碰撞气体为氩气。

2.3 对照品溶液的配制

准确称取咖啡酸苯乙酯和咖啡酸对照品各10 mg于10 mL容量瓶,用流动相溶液超声溶解并定容,作为母液。再将该母液配制成不同浓度的对照品溶液,备用。

2.4 酶促反应体系及样品处理

反应中各种组分的加入量及顺序如表1,反应温度70 ℃(水浴),取1 mL样品,加入1 mL丙酮溶液终止反应,挥干溶剂相,用甲醇定容至1 mL,测量样品中咖啡酸苯乙酯的浓度。

表1 反应体系组成成分

Table 1 Components of reaction system

组别 Group	异辛烷缓冲液 Reaction buffer (mL)	酶 Enzyme (mg)	咖啡酸 Caffeic acid (mg)	苯乙醇 Phenethyl alcohol (mg)	咖啡酸苯乙酯 Caffeic acid phenethyl ester (mL)
空白组 Blank	30	0	20	2500	1
酶对照组 Control group	30	600	20	2500	1

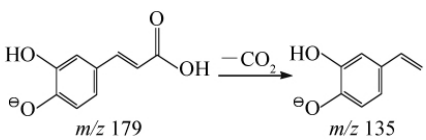
3 结果与讨论

3.1 色谱条件的优化

对流动相组成、比例、流速和柱温的优化的实验结果表明,乙腈含量在49% ~60%范围内,对样品的检测均有较好的分离效果。特别是乙腈含量在55%时,分离效果最佳,分离度可以达到1.5。当流速为1.3 mL/min时分离效果较差; 当流速为0.8 mL/min时分析时间较长,分离效果与1.0 mL/min时无明显差异,因而确定流速为1.0 mL/min。此外,为了防止检测过程中咖啡酸苯乙酯的解离,流动相中需加入少量酸。因此,本实验采用的流动相为V(乙腈):V(水):V(冰醋酸)=55:45:0.5。

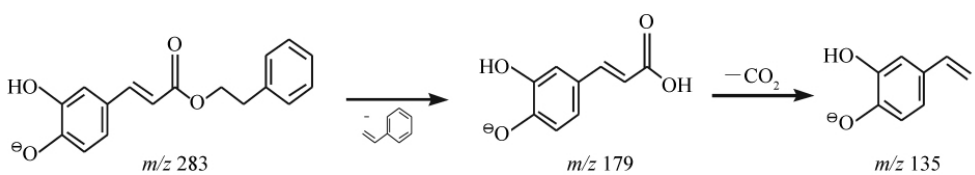
3.2 质谱条件的优化和咖啡酸以及咖啡酸苯乙酯定性信息的确定

在负离子模式下,对咖啡酸和咖啡酸苯乙酯标准溶液(1.0 mg/L)进行全扫描,找出咖啡酸分子和咖啡酸苯乙酯分子的$[M-1]^-$峰,以分子离子峰为母离子对离子源参数进行优化,使仪器灵敏度达到最高。参考文献[10],对两者的子离子进行全扫描,以确定它们的主要离子碎片。实验结果显示,咖啡酸可产生一个主要碎片离子m/z 135.1,因此将m/z 135.1作为咖啡酸定性离子; 咖啡酸苯乙酯可产生两个主要碎片离子m/z 179.2和135.1,因此将m/z 179.2和135.1作为咖啡酸苯乙酯定性离子。咖啡酸分子和咖啡酸苯乙酯分子的裂解过程分别见图1解和图解2。



图解1 咖啡酸分子裂解过程

Scheme 1 Fragmentation pathways of caffeic acid (CA)



图解2 咖啡酸苯乙酯分子裂解过程

Scheme 2 Fragmentation pathways of caffeic acid phenethyl ester(CAPE)

3.3 酶促反应产物的鉴定

按照2.4节方法进行酶促反应,反应72 h后取样,样品处理后待测。进样10 μL进行全扫描,其色

谱图和总离子图如图 1A 和 1B 所示。a 和 b 两峰的质谱图如图 2A 和 2B 所示。通过比较色谱保留时间及 a 和 b 两峰的特征性分子离子峰可知,a 和 b 两峰分别为咖啡酸和咖啡酸苯乙酯。

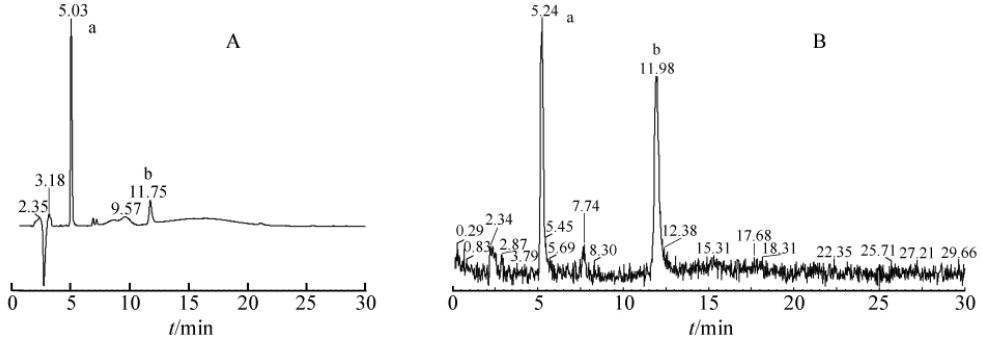


图 1　酶促反应产物的离子色谱图(UV 325 nm) (A) 和总离子图(B)

Fig. 1　Ion chromatogram (A) and total ion current (B) of enzymatic reaction products

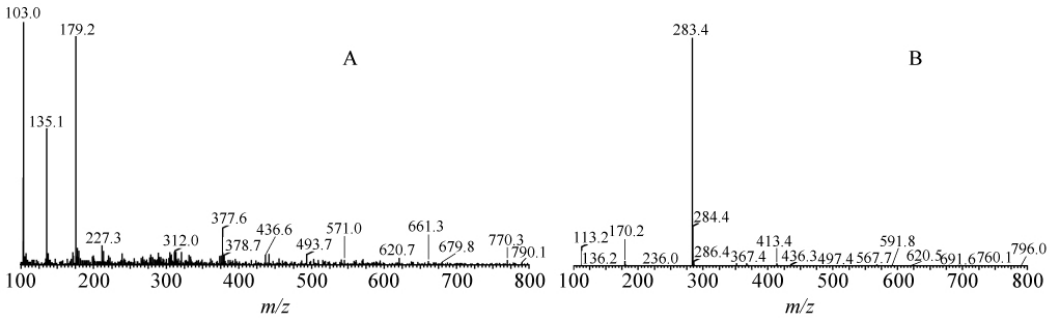


图 2　酶促反应产物体系中咖啡酸(A) 和咖啡酸苯乙酯(B) 的质谱图

Fig. 2　Mass spectrum of CA (A) and CAPE (B)

3.4　线性范围和检出限

配制浓度分别为 1, 5, 10, 50, 100, 500 和 1000 mg/L 的咖啡酸和咖啡酸苯乙酯的标准品混合溶液,在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定。结果显示,在 5 ~ 1000 mg/L 范围内时,咖啡酸的峰面积 Y 与浓度 c 呈良好的线性关系,线性回归方程为 $Y = 681042c + 1584.2$, $r = 0.9999$。在 1 ~ 1000 mg/L 范围内,咖啡酸苯乙酯的峰面积 Y 与浓度 c 呈良好的线性关系,线性回归方程为 $Y = 6.00 \times 10^6 c - 2293.5$, $r = 0.9996$。以信噪比为 3 估算检出限(LOD) ,咖啡酸和咖啡酸苯乙酯的检出限分别为 0.1 和 0.05 mg/L。

3.5　方法的回收率和精密度

按照 2.4 节方法进行酶促反应,反应 72 h 后取样,样品处理后分别进行添加回收率和精密度实验,样品添加不同浓度标准溶液,用超高效液相色谱-串联四级杆质谱进样测定。在低、中、高 3 个添加水平范围内的平均回收率(每个添加浓度平行测定 6 次) 结果见表 2。日内精密度均小于 4.5%,日间(7 d 内) 精密度均小于 8%。

表 2　咖啡酸和咖啡酸苯乙酯的添加回收率

Table 2　Fortified recoveries of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester

样品 Samples	加入量 Added (mg/L)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, n = 6)
咖啡酸 CA	10	93.4	1.79
	50	94.3	2.56
	100	98.2	2.32
咖啡酸苯乙酯 CAPE	10	90.3	2.49
	50	97.8	1.82
	100	91.4	3.67

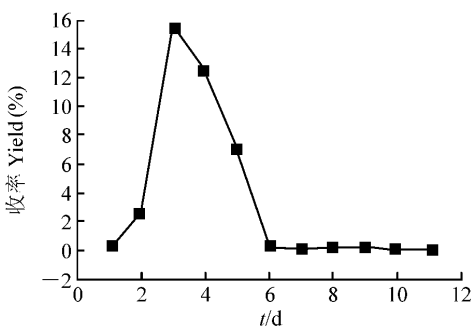


图 3　12 d 内咖啡酸苯乙酯的收率

Fig. 3　Yield of CAPE in 12 d

3.6 咖啡酸酶促转化动力学的初步研究

设空白组和酶对照组,酶对照组设处理12 d,每24 h处理一个样品,其它操作按2.4节。咖啡酸苯乙酯的收率如图3。从图3可见,CAPE的最高收率(15.54%)出现在第3 d。随着时间的延长,收率降低。其原因可能是:咖啡酸苯乙酯在室温下即不稳定,容易解离,在70℃的条件下,咖啡酸苯乙酯解离速率增大;产物和水及其它反应中间产物的积累会对整个反应起到抑制作用,这种物质的积累使化学平衡左移,不但消耗了底物,也降低产物的收率。有关抑制物结构分析及其作用机理有待于进一步研究。

References

1 Altug M E, Serarslan Y, Bal R, Kontas T, Ekici F, Aslan H, Duman T. *Brain Res.*, **2008**, 1201(27): 135 ~ 142

2 Wang T, Chen L X, Long Y, Wu W M, Wang R. *Cancer Lett.* (*Shannon*, *Irel*), **2008**, 263(1): 77 ~ 88

3 LU Ding-Qiang(卢定强), JIANG Ben(蒋 奔), WANG Jun(王 俊), ZHAO Hui(赵 辉), LING Xiu-Quan(凌岫泉), LIU Ji(刘 骥). *Modern Chemical Industry*(现代化工), **2009**, 29(4): 20 ~ 24

4 LI Yi(李 熠), ZHAO Jing(赵 静), XUE Xiao-Feng(薛晓锋), ZHOU Jin-Hui(周金慧). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2007**, 25(6): 857 ~ 860

5 Jung W K, Lee D Y, Kim J H, Choi I, Park S G, Seo S K, Lee S W, Lee C M, Park Y M, Jeon Y J, Lee C H, Jeon B T, Qian Z J, Kim S K, Choi I W. *Process Biochem.* (*Amsterdam*, *Neth.*), **2008**, 43(7): 783 ~ 787

6 LU Hai-Tao(吕海涛), SUN Hai-Feng(孙海峰), QU Bao-Han(曲宝涵), DAI Hong-Yi(戴洪义). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2007**, 35(10): 1425 ~ 1429

7 Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Damyanova B, Sabatini A G, Marcazzan G L, Bogdanov S. *Mitsubachi Kagaku*, **2003**, 24(2): 61 ~ 66

8 Andrade P, Ferreres F, Gil M I, Tomas B, Francisco A. *Food Chem.*, **1997**, 60(1): 79 ~ 84

9 Bankova V, Dyulgerov A, Popov S, Marekov N Z. *Naturforsch.*, *C*: *Biosci.*, **1987**, 42(1-2): 147 ~ 151

10 Medana C, Carbone F, Algotti R, Appendino G, Baiocchi C. *Phytochemical Analysis*, **2008**, (19): 32 ~ 39

Rapid Determination of Enzymatic Synthesis Caffeic Acid Phenethyl Ester in an Enzymecatalytic and Synthetic System by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LU Ding-Qiang*[1,2], JIANG Ben[1], WANG Jun[1,3], ZHAO Hui[1], LING Xiu-Quan[1], CHAI Hong[1], XIA Ting[3]

[1](*School of Pharmaceutical Sciences*, *Nanjing University of Technology*, *Nanjing* 210009)

[2](*Jiangsu Provincial Institute of Materia Medica*, *Nanjing* 210009)

[3](*College of Biological and Environmental Engineering*, *Jiangsu University of Science and Technology*, *Zhenjiang* 212018)

Abstract A liquid chromatography-tandem mass spectrometric method was established for the simultaneous determination of caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in enzymatic synthesis, and the biosynthesis kinetics of caffeic acid phenethyl ester was analyzed. Identification was carried out by electrospray ionization (ESI) in negative mode using selected reaction monitoring. CA and CAPE in enzymatic synthesis system were separated on a hypersil C_{18} column. The mobile phase consisted of acetonitrile-deionized water-acetic acid (55:45:0.5, *V*/*V*) at a flow-rate of 1.0 mL/min. The linear ranges of CA and CAPE were both between 0.2 and 20 μg. The recoveries of CA and CAPE were 93.4% -98.2% and 90.3% -97.8% with relative standard deviations of 1.8% -2.6% and 1.8% -3.7% respectively. The yield of CAPE was up to 15.54% in three days. The results indicated that the developed method is rapid, simple and reliable.

Keywords Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Caffeic acid phenethyl ester; Caffeic acid; Enzymatic synthesis

(Received 29 January 2010; accepted 11 April 2010)