

高效液相色谱-质谱联用快速筛选并鉴定 黄芩甲醇提取物中抗氧化活性成分

杨思敏¹ 陈瑞战^{*1} 董航¹ 李元¹ 李世哲¹
李新龙¹ 宋凤瑞² 刘志强²

¹(长春师范学院化学学院, 长春 130032) ²(中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

摘 要 建立了高效液相色谱-质谱联用技术快速筛选和鉴定黄芩甲醇提取物中抗氧化活性成分的方法。在黄芩甲醇提取物中加入适量的二苯基三硝基苯肼(DPPH[·])作为实验组,避光室温反应 30 min 后直接经液相色谱分析,并与不加入 DPPH[·]的空白组进行比较。有抗氧化活性的成分因会与 DPPH[·]反应而使峰面积减少,而不具有抗氧化活性的成分峰面积则不变。基于色谱数据可以获得有抗氧化活性组分的相对活性强度,基于质谱数据可获得活性组分的结构信息用于结构鉴定。本方法成功地从黄芩甲醇提取物中筛选并鉴定出了黄芩苷、千层纸素 A-7-O-B-D-葡萄糖醛酸苷、汉黄芩苷和千层纸素 A4 种较强的抗氧化活性成分。本方法利用 HPLC-MS 技术对复杂体系(如中药提取物)中小分子的分离和鉴定优势,可以直接筛选出黄芩甲醇提取物中的抗氧化活性成分,而不需要繁琐的前期分离和纯化,并且不需要仪器改装工作,有利于实现复杂体系中抗氧化活性成分的高通量筛选。

关键词 高效液相色谱-质谱联用; 筛选; 二苯基三硝基苯肼; 抗氧化活性; 黄芩

1 引 言

自由基的存在非常广泛,其氧化反应可以引起食物腐败、细胞衰老和各种疾病,给人类的健康带来危害。因此,抗氧化剂的检测和筛选对于保障人类健康、提高食品安全具有深远意义。抗氧化剂除人工合成外,还可以从中草药中提取分离获得,这不仅利用了中草药这个天然的组合化学库,而且降低了人工合成抗氧化剂带来的毒副作用^[1]。由于中草药成分复杂,采用常规方法提取其中的抗氧化活性成分费时费力,并且在分离过程中可能导致微量活性组分丢失。因此,迫切需要发展一种快速、高效的抗氧化活性成分的筛选方法。目前,已建立了基于高效液相色谱-质谱联用的植物提取物中抗氧化活性成分的在线筛选方法^[2~8],成功筛选出了多种抗氧化活性成分,并对其结构进行了鉴定。这些方法需要改装仪器和增加柱后反应通道,并需要额外的检测器用于二苯基三硝基苯肼(DPPH[·])的检测(517 nm),限制了该方法的广泛应用。本研究采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)技术,不需要任何改进工作,建立了一种更为简单快捷的抗氧化活性成分的检测、筛选和结构鉴定方法。

DPPH[·]是一种人工合成的稳定的自由基,可以被抗氧化活性物质猝灭,是一种良好的体外抗氧化筛查剂,已经得到了广泛的应用^[9]。黄芩是常用的中药材之一,是唇形科植物黄芩的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效。黄芩具有很好的抗氧化能力,并且主要的抗氧化活性成分是易溶于醇类的黄酮类化合物,并已经对这类化合物的总抗氧化能力及有效成分的提取、分离、结构鉴定进行了研究^[10~12]。本研究利用黄芩建立了基于 HPLC-MS 联用的抗氧化活性成分的快速筛选方法。将黄芩甲醇提取物与 DPPH[·]混合反应后,直接用色谱分析。用等量的甲醇代替 DPPH[·]作为空白对照组,通过比较各组分的色谱峰面积的变化确定和评价各组分的抗氧化活性,从中筛选出 4 种有较强抗氧化活性的成分,并采用 HPLC-MS 对 4 种成分进行了鉴定,不仅证明了黄芩具有很好的抗氧化活性,而且表明本方法可以在中药提取物这种复杂体系中实现简单快捷的抗氧化活性的高通量筛选。

2011-06-27 收稿; 2012-01-13 接受

本文系吉林省自然科学基金项目(No. 2010105),吉林省教育厅“十一五”科学技术研究项目(吉教科合字[2010]第 373 号)资助

© 1994-2012 Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

2695HPLC-DAD 液相色谱仪(美国 Waters 公司); LTQ-XL 电喷雾质谱仪(美国 Thermo 公司), 配备电喷雾源, 超纯水处理系统(Milli-Q 美国 Millipore 公司)。

甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 二苯基三硝基苯肼(DPPH[·], 分析纯, Sigma 公司); 黄芩药材购于长春市某药店, 经长春中医药大学王淑敏教授鉴定为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis*)的干燥根。

2.2 样品制备

在 1 g 黄芩中加入 50 mL 甲醇, 超声提取 30 min, 抽滤后将滤液用 0.45 μm 滤膜过滤待用。二苯基三硝基苯肼(DPPH[·])用甲醇稀释到 5 mol/L, 作为贮备液备用。在 40 μL 黄芩甲醇提取物中加入 10 μL DPPH[·]贮备液, 混匀, 在室温下避光反应 30 min 后, 直接进行 HPLC-MS 分析。空白对照组中 DPPH[·]由等体积的甲醇代替。

2.3 色谱-质谱条件

高效液相色谱的流动相 A 为 0.5% 醋酸溶液, 流动相 B 为甲醇。线性梯度洗脱: 0~30 min 30%~80% B, 30~40 min 80% B。TC-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm×5 μm, Agilent 公司), 流速 1 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 10 μL。ESI 源为负离子模式, 喷雾电压为 -3.5 kV; 金属毛细管温度 260 °C; 鞘气(N₂)为 0.9 L/min; 辅助气(N₂)为 1.5 L/min, 透镜电压为 -137 V。

3 结果与讨论

3.1 实验条件的优化

通过多次调节溶剂系统的洗脱梯度等参数, 得到较好的流动相条件: 当采用甲醇和 0.5% 醋酸溶液两相溶剂, 在 30 min 内, 甲醇体积分数由 30% 线性变为 80%, 再等度洗脱 10 min。流速为 1 mL/min 时, 黄芩甲醇提取物中的主要成分得到了较好的分离。

调节 DPPH[·] 自由基与黄芩甲醇提取物的反应比例, 确保 DPPH[·] 在反应中是过量的, 同时尽量将谱图中过量的 DPPH[·] 的吸收峰控制在与其它主要成分的吸收峰相当的高度范围之内, 以减少由于 DPPH[·] 自由基的峰太高而导致黄芩甲醇提取物中的主要成分的峰过低所带来的误差。

在前期实验条件优化的阶段, 合适的质谱条件对于更好地质谱分析也是十分重要的。本实验采用了 2.3 节所述的质谱条件。

3.2 筛选结果分析

将实验组和空白组用液相色谱分析, 结果如图 1 所示。实验组的未反应的 DPPH[·] 在 38 min 时被分离, 说明 DPPH[·] 过量。若实验组中化合物与空白组进行比较峰面积有所减少, 则说明该化合物能与 DPPH[·] 反应, 即具有抗氧化活性。化合物 1~6 的峰面积均减少, 说明这几种化合物都可以与 DPPH[·] 发生反应, 都具有一定的抗氧化活性。

有抗氧化活性的组分与 DPPH[·] 反应后, 峰面积减少的程度取决于其与 DPPH[·] 的结合强度, 抗氧化活性越强, 与 DPPH[·] 的结合能力就越强, 该化合物的反应程度越大, 反应后峰面积的减少程度越大。因此, 定义活性组分与 DPPH[·] 的相对结合强度(RBA)为:

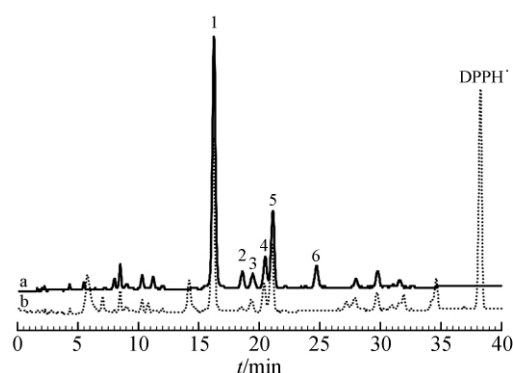


图1 黄芩甲醇提取物与 DPPH[·] 反应前后的高效液相色谱图

Fig. 1 Chromatograms of methanol extract of *Scutellariae radix* before and after reaction with diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH[·])

a. 黄芩甲醇提取物与 DPPH[·] 反应前的高效液相色谱图; b. 黄芩甲醇提取物与 DPPH[·] 反应后的高效液相色谱图。

a. Chromatograms of the methanol extract of *Scutellariae Radix* before reaction with DPPH[·]; b. Chromatograms of the methanol extract of *Scutellariae Radix* after reaction with DPPH[·].

$$\text{RBA} = 100\% \times (\text{PA}_0 - \text{PA}_1) / \text{PA}_0 \quad (1)$$

式中, PA_0 和 PA_1 分别为反应前后的峰面积。6 种化合物与 DPPH $\cdot$ 的相对结合强度见表 1。化合物 1, 2, 3 和 6 与 DPPH $\cdot$ 有一定的结合, 因此, 可以说明这 4 种化合物有一定的抗氧化活性。需要注意的是, 峰 4 的相对结合强度小于 1%, 既说明峰 4 不能和 DPPH $\cdot$ 反应, 也说明在本方法中不存在假阳性结果。结合强度越大, 抗氧化活性越强, 这 4 种化合物的基于 DPPH 自由基筛选系统的抗氧化活性依次为化合物 6 > 化合物 2 > 化合物 1 > 化合物 3。但是, 基于不同的抗氧化活性筛选系统测得的抗氧化活性有所区别。为进一步确定这 4 种具有较强抗氧化活性成分, 利用一级质谱和串联质谱获得其结构信息。

表 1 黄芩甲醇提取物中 6 个化合物与 DPPH $\cdot$ 自由基的相对结合强度

Table 1 Relative binding affinities of six compounds from methanol extract of *Scutellariae Radix* to DPPH $\cdot$

峰 Peak	峰 1 Peak 1	峰 2 Peak 2	峰 3 Peak 3	峰 4 Peak 4	峰 5 Peak 5	峰 6 Peak 6
相对结合强度 Relative binding affinities ($n=3$)	15.9% $\pm$ 1.2%	74.0% $\pm$ 0.8%	12.7% $\pm$ 1.5%	0.6% $\pm$ 2.2%	3.2% $\pm$ 1.9%	100% *

* 由于实验组中未检测到峰 6, 可以近似认为该化合物完全反应。* Peak 6 was thought to be reacted completely because it was not detected in the experiment group.

3.3 抗氧化活性物质的鉴定

用质谱直接检测峰 1, 2, 3 和 6 的结构信息, 所测得的 4 种化合物的一级质谱全扫描图如图 2 所示。对 4 种有抗氧化活性的化合物进行二级和三级质谱分析, 所得的碎片离子的信息列入表 2。

表 2 4 种具有抗氧化活性的化合物的结构鉴定

Table 2 Structure identification of four antioxidants

峰 Peak	保留时间 Retention time (min)	[M-H] $^-$	ESI-MS n		化合物 Compounds
			MS 2	MS 3	
1	15.8	445	269	241, 225, 197, 169	黄芩苷 Baicalin
2	18.1	459	283, 175	268	千层纸素 A-7-O-B-D-葡萄糖醛酸苷 Oroxylin A-7-O-glucuronide
3	19.1	459	283, 175	268	汉黄芩苷 Wogonoside
6	24.5	283	268	239, 240, 184, 163	千层纸素 A Oroxylin A

化合物 1 的全扫描一级质谱图如图 2a 所示。负离子扫描的 m/z 445 为 [M-H] $^-$ 峰; 对 m/z 445 离子进行二级质谱分析, 分子离子失去 1 分子葡萄糖醛酸 (-176), 得到 m/z 269 碎片离子; 对 m/z 269 的碎片离子进行三级质谱分析, 得到了 m/z 241, 225, 197, 169 碎片离子。通过查阅文献 [12~17], 该化合物的色谱出峰顺序及质谱行为与黄芩苷一致, 判断该化合物可能是黄芩苷。

化合物 2 的全扫描一级质谱图如图 2b 所示。负离子扫描的 m/z 459 为 [M-H] $^-$ 峰; 对 m/z 459 离子进行二级质谱分析, 得到 m/z 283 (失去 1 分子葡萄糖醛酸 -176) 和 m/z 175 的碎片离子; 对 m/z 283 的碎片离子进行三级质谱分析, 得到 m/z 268 碎片离子。该化合物与黄芩的主要成分汉黄芩苷和千层纸素 A-7-O-B-D-葡萄糖醛酸苷的质谱行为一致, 可以推断化合物 2 可能是两种化合物中的一种。此外, 这两种同分异构化合物在 C_{18} 柱中的出峰顺序不同, 根据文献 [12~17] 中的保留时间和出峰顺序, 可以推测化合物 2 可能是千层纸素 A-7-O-B-D-葡萄糖醛酸苷。

化合物 3 的全扫描一级质谱图如图 2c 所示。负离子扫描的 m/z 459 为 [M-H] $^-$ 峰; 对 m/z 459 离子进行二级质谱分析, 同样得到 m/z 283, 175 的碎片离子; 对 m/z 283 碎片离子进行三级质谱分析, 得到 m/z 268 碎片离子。该化合物与化合物 2 的质谱行为一致, 分子量和质谱行为一致的情况下, 推断化合物 3 与化合物 2 是同分异构体。化合物 2 已经推断出为千层纸素 A-7-O-B-D-葡萄糖醛酸苷, 则根据文献中的相关信息可推断化合物 3 为汉黄芩苷 [13~18]。

化合物 6 的全扫描一级质谱图如图 2d 所示, 负离子扫描的 m/z 283 为 [M-H] $^-$ 峰; 对 m/z 283 离子进行二级质谱分析, 得到 m/z 268 碎片离子; 对 m/z 268 碎片离子进行三级质谱分析, 得到了 m/z 240, 184, 163 和 239 的碎片离子。根据文献 [12~17], 在黄芩的主要成分中, 具有该质谱行为的化合物可能是汉黄芩素和千层纸素 A, 而化合物 5 的质谱行为与化合物 6 的一致, 二者可能是同分异构体, 根据二者在色谱中的保留时间和出峰顺序的差异, 可以推断化合物 6 为千层纸素 A。

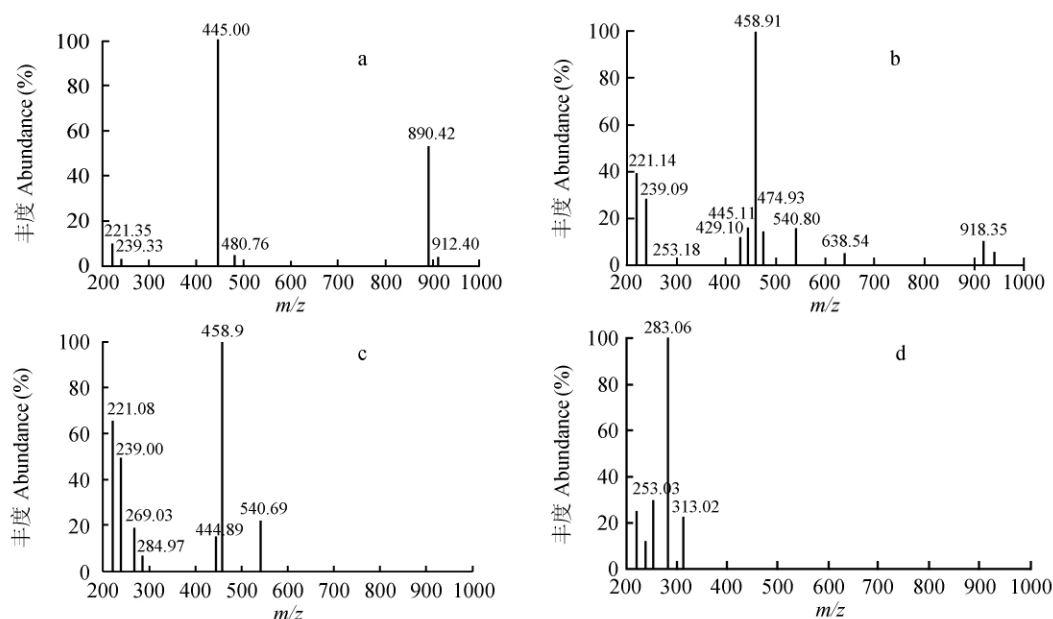


图2 4种具有抗氧化活性的化合物的负离子模式下的全扫描一级质谱

Fig. 2 Full-scan mass spectrum of four antioxidants in negative ion mode

a. 黄芩苷的全扫描一级质谱图; b. 千层纸素 A-7-O-B-D-葡萄糖醛酸苷; c. 汉黄芩苷; d. 千层纸素 A。a. Full-scan mass spectrum of baicalin; b. Full-scan mass spectrum of Oroxylin A-7-O-glucuronide; c. Full-scan mass spectrum of wogonoside; d. Full-scan mass spectrum of oroxylin A.

结果表明,本方法可高通量快速检测、筛选中药中具有抗氧化活性的多种组分,通过与 DPPH[·] 自由基的结合强度推断抗氧化活性的强弱,并借助高效液相色谱-质谱的定性分析鉴定手段对这些成分进行推断和鉴定。

References

- Koleva I I, Niederländer H A, van Beek T A. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(10): 2323 ~ 2328
- Chen J H, Zhao H Q, Shi Q, Zhang D L, Cheng H Y, Wang X R, Lee F S. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33(4-5): 672 ~ 677
- Sun C R, Fu J D, Chen J J, Jiang L Y, Pan Y J. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33(8): 1018 ~ 1023
- Tang D, Li H J, Chen J, Guo C W, Li P. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31(20): 3519 ~ 3526
- Liu E H, Qi L W, Peng Y B, Cheng X L, Wu Q, Li P, Li C Y. *Biomed. Chromatogr.*, **2009**, 23(8): 828 ~ 842
- WANG Xiao-Song, CHEN Bo, YAO Shou-Zhuo. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **2009**, 40(Suppl.): 224 ~ 227
王小淞, 陈波, 姚守拙. *中草药(增刊)*, **2009**, 40: 224 ~ 227
- WANG Hong, CHEN Jun-Hui, ZHAO Heng-Qiang, WANG Lei-Lei, ZHANG Dao-Lai, WANG Xiao-Ru, YANG Dong-Fang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(6): 795 ~ 800
王虹, 陈军辉, 赵恒强, 王磊磊, 张道来, 王小如, 杨东方. *分析化学*, **2009**, 37(6): 795 ~ 800
- DU Qin-Qin, ZHANG Xu, SONG Feng-Rui, LIU Zhi-Qiang, LIU Shu-Ying. *Chem. J. Chinese Universities*, **2010**, 31(7): 1332 ~ 1336
杜芹芹, 张旭, 宋凤瑞, 刘志强, 刘淑莹. *高等学校化学学报*, **2010**, 31(7): 1332 ~ 1336
- Hvattum E, Stenstrom Y, Ekeberg D. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39(12): 1570 ~ 1581
- LI Yun-Xia, SUO Quan-Ling, HE Wen-Zhi, LI Chun-Ping, HUANG Yan-Chun. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, **2008**, 28(8): 1895 ~ 1899
李云霞, 索全伶, 贺文智, 李春萍, 黄延春. *光谱学与光谱分析*, **2008**, 28(8): 1895 ~ 1899
- GAO Ping-Zhang, WU Hong, HUANG Jun-Lai, GAO Zhong-Hong. *Strait Pharmaceutical Journal*, **2009**, 21(16): 1 ~ 4
高平章, 吴洪, 黄俊来, 高中洪. *海峡药学*, **2009**, 21(16): 1 ~ 4
- GUO Ji-Fen, CHEN Si-Ping, QIAO Shan-Yi, YANG Ming, ZHAO Yi-Min. *Chin. J. Pharm. Anal.*, **2005**, 25(3): 267 ~ 269

- 郭继芬,陈四平,乔善义,杨明,赵毅民. 药物分析杂志, **2005**, 25(3): 267 ~ 269
- 13 Liu G Z, Rajesh N, Wang X S, Zhang M S, Wu Q, Li S J, Chen B, Yao S Z. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879: 1023 ~ 1028
- 14 Liu W Y, Xu X Z, Feng F, Wu C Y. *Chromatographia*, **2011**, 74: 75 ~ 81
- 15 SHEN Hong, DUAN Jin-Ao, QIAN Da-Wei, WU Jie, ZHANG Xiao-Ling. *Chin. J. Pharm. Anal.*, **2009**, 29(9): 1425 ~ 1428
- 沈红,段金廛,钱大玮,武洁,张晓玲. 药物分析杂志, **2009**, 29(9): 1425 ~ 1428
- 16 ZHANG Jian, XIAO Li-He, LI Fa-Mei. *J. Chin. Med. Mater.*, **2005**, 28(5): 389
- 张箭,肖丽和,李发美. 中药材, **2005**, 28(5): 389
- 17 LIU Shu, XING Jun-Peng, YAN Jun, SONG Feng-Rui, LIU Shu-Ying, LIU Zhi-Qiang. *Mass Spectrometry (Suppl.)*, **2009**, 30: 55 ~ 56
- 刘舒,邢俊鹏,闫俊,宋凤瑞,刘淑莹,刘志强. 质谱学报(增刊), **2009**, 30: 55 ~ 56
- 18 XIAO Li-He, WANG Hong-Yan, SONG Shao-Jiang. *J. Shenyang Pharm Univ.*, **2003**, 20(3): 181
- 肖丽和,王红燕,宋少江. 沈阳药科大学学报, **2003**, 20(3): 181

Rapid Screening and Structures Characterization of Antioxidants from Methanol Extract of Scutellariae Radix by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

YANG Si-Min¹, CHEN Rui-Zhan^{*1}, DONG Hang¹, LI Yuan¹, LI Shi-Zhe¹,
LI Xin-Long¹, SONG Feng-Rui², LIU Zhi-Qiang²

¹(College of Chemistry, Changchun Normal University, Changchun 130032, China)

²(Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

Abstract A new method based on HPLC-MS for the rapid screening and identification of antioxidants from methanol extract of Scutellariae Radix has been developed. An appropriate amount of diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH.) was added to the methanol extract of Scutellariae Radix and incubated in dark place at room temperature for half an hour while DPPH. was replaced by methanol in the control group. This two group samples were analyzed by HPLC-MS. Comparing the chromatograms of experiment and control group, the peak areas of antioxidants after the interaction with DPPH. had a decrease in the chromatogram while for those not responsible for DPPH. had no change in their peak areas. The relative binding affinities of antioxidants were calculated based on HPLC data while the structure identification was carried out based on MS data. Four antioxidants were screen out from methanol extract of Scutellariae Radix by this novel method and were identified as baicalin, Oroxylin A-7-O-glucuronide, wogonoside and oroxylin A based on HPLC and MS date. Because of the powerful ability of HPLC-MS for small molecule separation and identification, the method has the potential to be a high throughput tool for screening antioxidants from complicated systems such as herbal extracts while do not need laborious pre-separation and additional instrument improvement.

Keywords High performance liquid chromatography-mass spectrometry; Screening; Antioxidants; Diphenyl-1-picryl; Scutellariae Radix

(Received 27 June 2011; accepted 13 January 2012)