

Screening Antioxidants from *Salvia prattii* Based on Chromatography-Efficacy Relationship

Xiaofeng Chi

Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining Qinghai
Email: xfchi@nwipb.cas.cn

Received: Jul. 7th, 2019; accepted: Jul. 24th, 2019; published: Jul. 31st, 2019

Abstract

In this study, based on the rapid screening platform of ASE-online SPE-HPLC/MS, a rapid screening method based on chromatography-efficacy relationship was established to screen antioxidants from *Salvia prattii*. Five compounds with antioxidant activity were screened, which were identified as tanshinol, protocatechualdehyde, caffeic acid, salviaflaside and rosmarinic acid by mass spectrometry data. The conditions of ASE, on-line SPE and MS were optimized. This method combines the activity test with mass spectrometry identification, and has the advantages of high pre-treatment efficiency, simple operation and good reproducibility. It is suitable for the rapid screening and identification of antioxidant active components from medicinal plants with complex substrates, and meanwhile greatly improving the efficiency.

Keywords

Chromatography-Efficacy Relationship, *Salvia prattii*, Antioxidant

基于谱效关系快速筛选康定鼠尾草中抗氧化活性成分

迟晓峰

中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁
Email: xfchi@nwipb.cas.cn

收稿日期: 2019年7月7日; 录用日期: 2019年7月24日; 发布日期: 2019年7月31日

摘要

本研究依托ASE-online SPE-HPLC/MS快速筛选平台,建立了基于谱效关系快速筛选康定鼠尾草中抗氧化活性成分的方法,并筛选出5个具有抗氧化活性的化合物,通过质谱数据鉴别为丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸。针对实验过程中的快速溶剂萃取条件、在线固相萃取条件以及质谱检测条件进行了优化。该方法将活性测试与质谱鉴别相结合,具有前处理高效、操作简单、重现性良好等优势,适合从复杂基质的中藏药材中快速筛选并鉴别抗氧化活性成分,大大提高了效率。

关键词

谱效关系, 康定鼠尾草, 抗氧化

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

人体在正常的生理代谢过程中会产生少量的含氧自由基,如超氧阴离子、羟自由基、单线态氧等[1]。在正常的生理条件下,身体产生和消除氧自由基处于动态平衡状态,但当身体的形成和自由基的消除被打破时,当体内自由基水平增加时,由于自由基具有活性并具有强氧化能力,它们可以通过一系列氧化反应。破坏细胞的结构和功能,在体内造成不可逆的氧化损伤,从而诱发各种病理损害,如动脉粥样硬化,心血管疾病,糖尿病,肿瘤等[2] [3] [4]。如果可以消除太多的氧自由基,则可以防止由自由基引起的许多疾病。因此,人体适当地补充外源性抗氧化剂并从体内除去过量的氧自由基,这将产生有益效果。

人工合成抗氧化剂已经广泛用于食品、饮料等消费品中,但已有证据表明合成抗氧化剂对健康有负面影响[5]。因此,近年来对天然抗氧化剂的研究已成为研究趋势。目前已有许多天然抗氧化剂从各种植物材料如油料作物种子、谷物、蔬菜、水果、树叶、树皮和各种中药材中获得[6] [7] [8]。分离活性化合物的传统方法是分离纯化植物提取物中所有化合物,然后逐一进行活性测试。这种方法不仅消耗大量的人力、物力(大量溶剂、分离用填料和样品)和时间(几个月),而且样品在分离过程中可能发生氧化反应等变化,且分离的许多化合物通常主要是无活性或活性较低的化合物。即使在活性跟踪下分离纯化也同样存在流程长、人力物力消耗大、效率较低的弊病[9] [10]。

本实验室自行搭建了 ASE-online SPE-HPLC/MS 快速筛选平台,该平台不仅可以对快速溶剂萃取仪萃取样品进行净化前处理,缩短样品前处理流程,富集痕量化学成分,减少复杂基质对质谱的污染;同时可以对未知天然成分同时分别进行质谱定性研究和馏分收集开展活性测试,为确定天然成分的种类与活性奠定基础。本文利用该平台对康定鼠尾草中的天然抗氧化活性成分开展了筛选工作,以为该药材的开发利用提供基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

康定鼠尾草(*Salvia prattii*)采自青海省玉树藏族自治州玉树市小苏莽乡(图1)。甲醇、乙腈(色谱纯)购自云南新蓝景化学工业有限公司。



Figure 1. *Salvia prattii*
图 1. 康定鼠尾草

2.2. 仪器与设备

Agilent 1100-MSD 液相色谱 - 离子阱质谱联用仪(美国安捷伦公司); ASE-350 快速溶剂萃取仪(美国戴安公司); Foxy R2 馏分收集器(德国 Knauer 公司)在线 SPE 系统(实验室自行研制); PL203 型电子分析天平(瑞士梅特勒 - 托利多公司); UPT-II-10T 型超纯水机(四川优普超纯科技有限公司)。实验室自行搭建的 ASE-online SPE-HPLC/MS 活性筛选平台装置如图 2 所示。

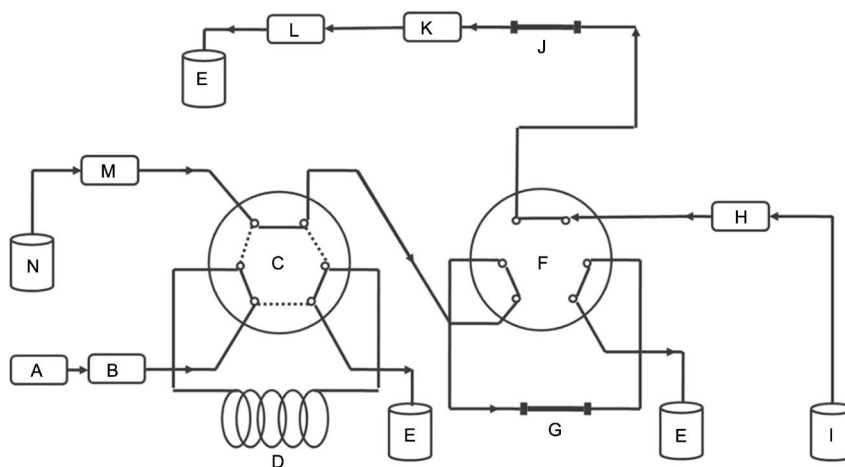


Figure 2. Schematic diagram of the apparatus (A: ASE-350 accelerated solvent extraction instrument, B: peristaltic pump, C: changeover valve 1, D: quantitative ring, E: waste liquid bottle, F: changeover valve 2, G: solid phase extraction column, H: Agilent 1100 chromatographic pump, I: mobile phase liquid storage bottle, J: chromatographic column, K: detector, L: mass spectrometer, M: plunger pump, N: elution liquid storage bottle)

图 2. 设备流程图(A: ASE-350 快速溶剂萃取仪, B: 蠕动泵, C: 切换阀 1, D: 定量环, E: 废液瓶, F: 切换阀 2, G: 固相萃取柱, H: Agilent 1100 色谱泵, I: 流动相储液瓶, J: 色谱柱, K: 检测器, L: 质谱仪, M: 柱塞泵, N: 洗脱液储液瓶)

2.3. 实验方法

2.3.1. 实验流程

称取约 1.0 g 康定鼠尾草样品置于 ASE-350 快速溶剂萃取仪中萃取; 萃取完成后, 将萃取液泵入在线

固相萃取装置,开展样品洗脱除杂;利用 Agilent 1100 液相色谱仪对在线固相萃取完成的样品开展分离;通过定比分流阀,40%流动相进入离子阱质谱检测,60%流动相收集到 96 孔板中,开展抗氧化活性测试。

2.3.2. 快速溶剂萃取条件

准确称取 1.0 g 康定鼠尾草样品,置于 34 mL 不锈钢萃取池中,以 60%的甲醇溶液为提取溶剂,提取两次,提取时间 6 min,提取温度 75℃,压力 10 MPa。

2.3.3. 在线固相萃取条件

Megres Si SPE 柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司);进样量 2 mL;洗脱剂乙腈,洗脱时间 3 min,流速 0.5 mL/min。

2.3.4. 色谱条件

CAPCELL PAK C18 MG II 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 日本资生堂公司);流动相 A: 乙腈-B: 水(0.2% H₃PO₄)梯度洗脱: 0~10 min, 5%~10% A; 10~13 min, 10%~18% A; 13~30 min, 18%~25% A。紫外检测波长: 330 nm;流速: 1 mL/min;进样量 10 μL,柱温: 30℃。

2.3.5. 质谱条件

ESI 离子源;负离子模式;雾化气 N₂;雾化气压力 30 psi;干燥气体流速 11 L/min;干燥气体温度 350℃。

2.3.6. DPPH 抗氧化活性筛选条件

将 96 孔板馏分收集器收集的馏分置于氮吹仪下吹干,加入 100 μL 水和 100 μL DPPH 储备液(50 μg/mL),摇匀后,置于暗处反应 10 min,在酶标仪上于 517 nm 比色,测其吸光度值计算其清除率。

3. 结果与讨论

3.1. 快速溶剂萃取条件优化

快速溶剂萃取(ASE)是样品在高温和高压条件下,用有机溶剂短时间提取目标产物的一种新型样品前处理方法。与传统方法相比,ASE 提取时间短、萃取效率高,有机溶剂用量少,操作简单、自动化程度高等优势。

Table 1. Results of orthogonal test

表 1. 正交试验结果

序号	甲醇浓度(%)	萃取时间(min)	萃取温度(℃)	萃取次数	迷迭香酸含量(mg/g)
1	40	5	50	1	6.53
2	40	10	75	2	10.05
3	40	15	100	3	9.85
4	60	5	75	3	9.93
5	60	10	100	1	7.03
6	60	15	50	2	10.54
7	80	5	100	2	9.23
8	80	10	50	3	9.94
9	80	15	75	1	8.76
K ₁	8.810	8.563	9.003	7.440	
K ₂	9.167	9.007	9.580	9.940	
K ₃	9.310	9.717	8.703	9.907	
Delta	0.500	1.153	0.877	2.500	

在该实验中, 通过正交试验优化了快速溶剂萃取中的甲醇浓度, 萃取时间, 萃取温度和萃取时间等参数(表 1)。以康定鼠尾草中等代表性成分迷迭香酸为指标, 确定快速溶剂萃取的适宜工艺条件。由表 2 可知, 影响康定鼠尾草中迷迭香酸萃取率的各因素主次顺序为: 萃取次数 > 萃取时间 > 萃取温度 > 甲醇浓度。选定最佳提取工艺为: 萃取次数 2 次, 萃取时间 15 min, 萃取温度 75℃, 甲醇浓度 80%。

3.2. 在线固相萃取条件优化

本实验中比较了 5 种填料(Megres C18、Megres Si、Hedera C18、Hedera Si 和 Nucifera C18H)的固相萃取小柱(100 mm × 4.6 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司)的除杂效果。结果显示, 采用 Megres Si 固相萃取小柱时, 萃取液中的小极性成分脱除效果理想, 且保持了较好的色谱峰型(图 3), 因此选择 Megres Si (100 mm × 4.6 mm, 5 μm)的固相萃取柱。

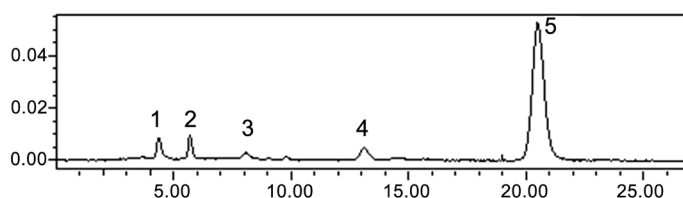


Figure 3. HPLC chromatogram of *S. prattii*
图 3. 康定鼠尾草 HPLC 色谱图

实验比较了采用 60%乙腈水溶液洗脱时, 不同洗脱时间(3、5 和 7 min)的洗脱效果。结果显示, 在 3 种洗脱时间下, 萃取液中酚酸类成分的色谱峰信号响应没有显著差异, 说明经过 3 min 的洗脱, 酚酸类成分已从固相萃取小柱上完全洗脱。因此选择洗脱时间为 3 min。

3.3. 抗氧化活性成分筛选与 ESI-MS 辨识

在 ESI 负离子模式中, 针对雾化器压力, 干燥气体流量和干燥气体温度等条件开展优化。随着雾化压力的增加, 酚酸化合物的质谱检测信号变强, 噪声变小; 当干燥空气流量太小时, 样品溶剂可能不会充分干燥, 而气流太大会导致检测灵敏度降低, 选择 11 l/min 时可获得更好的质谱信号; 同时, 还研究了干燥气体温度对质谱信号的影响, 在 350℃下, 质谱响应值较好(图 4)。

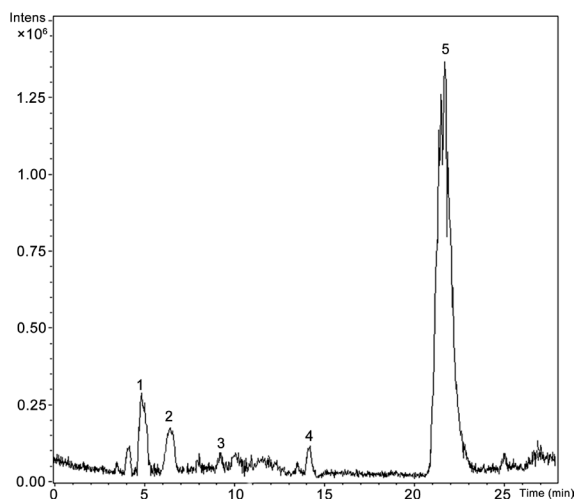


Figure 4. Total ion chromatogram of *S. prattii*
图 4. 康定鼠尾草总离子流图

96 孔板收集的馏分 DPPH 抗氧化活性测试结果显示, 康定鼠尾草中有 5 个成分显示出一定的抗氧化活性(图 5)。根据 1~5 号色谱峰的准分子离子峰、二级质谱碎片离子以及 DAD 光谱图信息, 参考相关文献将 1~5 号化合物鉴定为丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸(表 2, 图 6)。

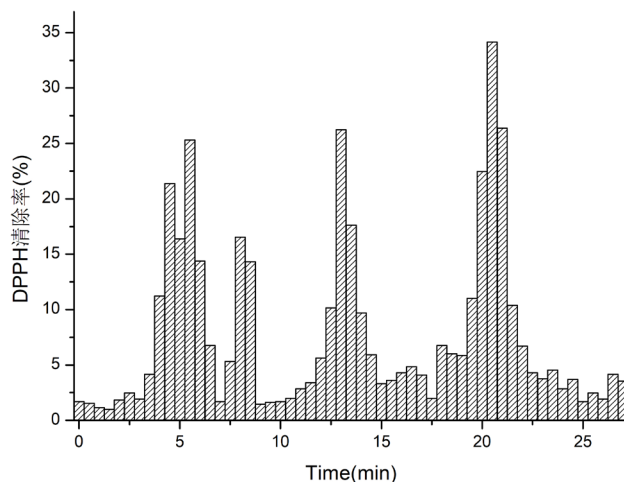


Figure 5. DPPH inhibits activity of *S. prattii*
图 5. 康定鼠尾草 DPPH 抑制活性图

Table 2. Mass spectrometry information of antioxidants in *S. prattii*
表 2. 康定鼠尾草中抗氧化活性成分的质谱信息

序号	MS(m/z)	MS ² (m/z)	化合物	参考文献
1	197.0	179.0, 153.0	丹参素	[11][12][13]
2	137.4	119.0, 108.3	原儿茶醛	[12][14]
3	179.0	135.0	咖啡酸	[13][14][15]
4	521.1	359.0, 197.0, 179.0, 161.0	异迷迭香酸苷	[16]
5	359.0	197.0, 179.0, 161.0	迷迭香酸	[13][14][15][16]

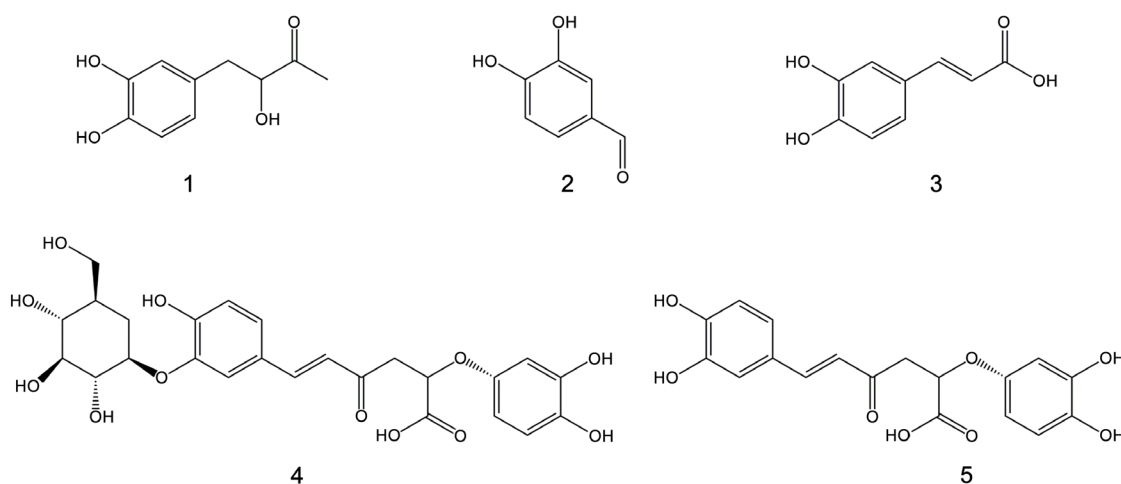


Figure 6. Structure of the antioxidants (1: tanshinol, 2: protocatechualdehyde, 3: caffeic acid, 4: salviaflaside, 5: rosmarinic acid)

图 6. 抗氧化活性成分结构式(1: 丹参素, 2: 原儿茶醛, 3: 咖啡酸, 4: 异迷迭香酸苷, 5: 迷迭香酸)

4. 结论

本研究基于 ASE-online SPE-HPLC/MS 快速筛选平台, 建立了快速筛选康定鼠尾草中抗氧化活性成分的方法。基于谱效关系, 筛选出康定鼠尾草中 5 个具有抗氧化活性的化合物, 并通过质谱数据鉴定为丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸。该方法与传统抗氧化活性成分筛选方法相比, 具有前处理高效、操作简单、重现性良好等优势。该模式将活性测试与质谱鉴别相结合, 更适用于从复杂基质的中藏药材中快速筛选并鉴别抗氧化活性成分, 大大提高了筛选效率。

基金项目

中国科学院兰州区域中心 2017 年度仪器功能开发项目: 基于 ASE 与 HPLC-MSD 天然活性成分筛选系统的开发(No. 2019gl09)。

参考文献

- [1] 李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88.
- [2] 张昊, 任发政. 羟基和超氧自由基的检测研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4): 1093-1099.
- [3] 黄进, 杨国宇, 李宏基, 等. 动物体内氧自由基的产生及危害[J]. 黄牛杂志, 2004, 30(5): 44-47.
- [4] 张洁, 袁东亚, 李文华. 氧自由基与高原病研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(22): 3384-3386.
- [5] 刘德良, 鲁国平. 氧自由基与其抗氧化剂研究进展[J]. 哈尔滨医药, 1994, 14(3): 55-56.
- [6] 赵保路, 编著. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 140-152.
- [7] 郝婕, 董金皋. 天然抗氧化剂的提取分离及功能研究[J]. 河北林果研究, 2006, 20(4): 369-372.
- [8] 杨洋, 阮征. 国内外天然食品抗氧化剂的研究进展[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 137-138.
- [9] 顾铭. 天然产物分离纯化技术[J]. 医药化工, 2007(9): 18-22.
- [10] 冯会, 任小丹, 尹小英. 天然抗肿瘤活性成分靶向筛选和分离方法研究进展[J]. 江西中医药大学学报, 2015(5): 103-107.
- [11] 裴渭静, 赵新锋, 胡震, 等. 采用柱切换色谱-离子阱质谱联用法研究复方丹参滴丸中丹参素及其代谢产物[J]. 分析化学, 2005, 33(4): 505-508.
- [12] 陈勇, 张玲, 王世敏. 丹参水溶性成分的电喷雾质谱行为及其特征图谱的初步研究[J]. 分析化学, 2004, 32(11): 1485-1488.
- [13] 王红蕾, 齐崴, 吴小东, 等. 丹参水溶性多酚酸的多级串联电喷雾离子阱质谱断裂机理解析[J]. 质谱学报, 2008, 29(3): 129-136.
- [14] 郭增军, 龙丽辉, 徐颖, 等. UPLC-ESI-MS 分析丹参药材、脂溶性及水溶性提取物的色谱、质谱行为及相关性[J]. 中药材, 2010, 33(6): 925-929.
- [15] 董昕, 徐立, 娄子洋. 丹参药材中水溶性及脂溶性成分的电喷雾离子阱质谱研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(14): 1048-1053.
- [16] 耿丹丹, 董琦, 谭亮, 等. HPLC-DAD-ESI/MSⁿ-DPPH 在线筛选与鉴别丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分[J]. 分析测试学报, 2015, 34(3): 314-320.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网首页：<http://cnki.net/>，点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”，跳转至：<http://scholar.cnki.net/new>，搜索框内直接输入文章标题，即可查询；
或点击“高级检索”，下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2163-1557，即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版：<http://www.cnki.net/old/>，左侧选择“国际文献总库”进入，搜索框直接输入文章标题，即可查询。

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：aac@hanspub.org