

超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法检测牡丹根皮中抗氧化活性成分及其抗氧化能力

谢炎福, 押辉远, 李月佳, 刘 沛

(洛阳师范学院 食品与药品学院, 洛阳 471934)

摘要: 为能准确检测复杂基质牡丹根皮样品中的抗氧化活性成分及其抗氧化能力, 进行了题示研究, 并推测了1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除过程的反应机理。采用70%(体积分数, 下同)乙醇溶液超声提取样品2次, 过滤后合并滤液, 浓缩、离心、稀释, 配制成 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液, 并进一步稀释成质量浓度为8, 40, 100, 200, 500, 1 000, 5 000, 10 000, 25 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品溶液系列。取上述配制好的样品溶液系列各300 μL (不添加样品的为样品对照组)和无水乙醇600 μL , 再加入 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DPPH溶液600 μL , 涡旋1 min, 避光反应30 min。用70%乙醇溶液稀释200倍, 过0.22 μm 滤膜, 采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS)测量样品加入前后DPPH准分子离子峰面积 P_0 和 P , 利用 $100\%\times(P_0-P)/P_0$ 计算DPPH自由基清除率。结合自身谱库、标准品谱图以及牡丹根皮相关文献鉴定各抗氧化活性成分。结果显示: 样品的质量浓度在 $8\sim 1\,000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内与DPPH自由基清除率呈线性关系, 较酶标仪法受样品基质和颜色干扰小, 且DPPH自由基清除率结果和酶标仪法的基本一致; 从牡丹根皮中显著识别出18种抗氧化活性成分, 包括15种可鉴定成分(包含两对同分异构体)和3种未知成分, 其中氧化芍药苷、丹皮酚、牡丹皮苷H、没食子酰芍药苷、没食子酸甲酯、牡丹皮苷F、对羟基苯甲酸是牡丹根皮中主要的抗氧化活性成分。

关键词: 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH); 超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS); 牡丹根皮; 抗氧化

中图分类号: O657. 63; R285. 5; R282. 71

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2024)07-0660-08

自由基是具有不成对电子的原子或基团, 快速评价天然产物的自由基清除能力和筛选、鉴定天然产物中的自由基清除活性成分(即抗氧化活性成分)^[1], 对于疾病预防、功能食品开发、化妆品研发等具有重要的理论研究意义和实践应用价值。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)能产生稳定的自由基, 其醇溶液呈紫色, 在515~520 nm处有吸收峰, 自由基清除剂和DPPH进行自由基单电子配对后溶液紫色消退, 从而根据自由基清除剂清除自由基能力和紫色消退程度关系进行定量计算。分光光度法或酶标仪法是定性定量分析抗氧化剂的抗氧化能力的常用方法, 具有简单、灵敏、快速、操作简单、仪器

设备要求低等优点。这两种方法在单一无色化合物抗氧化剂的测定方面表现良好, 但在测定含有多种抗氧化活性成分的样品或自身带有颜色样品时, 常常受到有机酸、无机盐、样品本身颜色、缓冲液底物颜色和基质的干扰, 影响测定结果的准确度^[2-5]。液相色谱法可通过测量加入样品前后DPPH峰面积的变化来检测样品中抗氧化成分的DPPH清除活性, 能有效排除底物和颜色的干扰^[6-7]。液相色谱法的缺点是单次检测的时间较长(10~60 min), 对无发色基团的化合物难以检测, 且不能对未知化合物进行准确定性。基于液相色谱法, 再结合液相色谱-质谱法或质谱法对这些成分进行定性, 可以确定DPPH自由基清除率和判断清除DPPH自由基的具体成分^[8-10], 但是这种方法需要进行色谱和质谱2次采样, 并且不同仪器的色谱、质谱出峰时间往往存在差异, 方法摸索时间较长。本工作以牡丹根皮样品作为待测样品, 采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间

收稿日期: 2022-07-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(21801110); 河南省高等学校重点科研项目(24B550011)

作者简介: 谢炎福, 实验师, 硕士, 主要从事微生物和天然产物的教学和科研工作, xieyanfu1234@163.com



质谱法(UHPLC-Q-TOF-MS)一次采样,不仅得到牡丹根皮DPPH自由基清除能力,还对牡丹根皮提取物中多种抗氧化活性成分进行了快速筛选及鉴定,并推测了DPPH自由基清除过程的反应机理,可为DPPH的准确检测及抗氧化活性成分的快速筛选提供一种新的检测方法。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

X500R型液相色谱-质谱联用仪,配质谱自动校准调谐系统和Sciex os数据处理软件;PE Victor Nivo型多功能酶标仪;Precisa HA 125SM型电子天平。

DPPH溶液:称取5 mg DPPH,加入适量乙醇,超声5 min,再用乙醇定容至100 mL,配制成 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH溶液,现配现用,避光保存。

单标准储备溶液:取没食子酸、氧化芍药苷、丹皮酚、对羟基苯甲酸、没食子酸甲酯、没食子酰芍药苷、苯甲酰氧化芍药苷标准品各5 mg,用70%(体积分数,下同)乙醇溶液溶解和定容至100 mL,配制成 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单标准储备溶液。使用时,用5%(体积分数)乙醇溶液稀释,配制成 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的单标准中间液。

DPPH的纯度不小于98%;没食子酸、氧化芍药苷、丹皮酚、对羟基苯甲酸、没食子酸甲酯、没食子酰芍药苷、苯甲酰氧化芍药苷标准品纯度均不小于99%;试验用水为娃哈哈纯净水(UHPLC-Q-TOF-MS用)和双蒸水(其他分析中用);牡丹根皮(Moutan Cortex)于2022年4月16日采自洛阳师范学院牡丹园,为牡丹品种“赵粉”开花初期根部新鲜外皮。

1.2 仪器工作条件

1.2.1 色谱条件

Agilent Eclipse Plus C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流动相A为0.01%(体积分数,下同)甲酸溶液,B为含0.01%甲酸的乙腈溶液;流量 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样量3 μL 。梯度洗脱程序:0~3 min,B为5%;3~33 min,B由5%升至60%;33~43 min,B由60%升至95%,保持4 min;47~48 min,B由95%降至5%,保持2 min。

1.2.2 质谱条件

电喷雾离子(ESI)源,负离子(ESI⁻)模式;离子化温度500 $^{\circ}\text{C}$;雾化气压力344.5 kPa;辅助加热气压力344.5 kPa;气帘气压力206.7 kPa;去簇电压-80 V;碰撞能量(CE)-7 eV;喷雾电压(ISVF)-4 500 V。子离子扫描参数,信息关联采集模式:扫

描范围质荷比(m/z)50~1 000;CE-(35 ± 15) eV。采用调谐液传递系统对质量数进行自动校准,使用Sciex os软件控制仪器操作和数据采集。

1.3 试验方法

1.3.1 牡丹根皮样品的提取

将牡丹根皮样品用水清洗干净,放置阴凉处自然干燥至表面无水分,用实验室小型粉碎机粉碎成浆状,按照样品量(g)和70%乙醇溶液(提取剂)体积(mL)比1:8添加样品和提取剂,于50 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取40 min,用6层纱布过滤。重复提取1次,合并2次滤液,置于50 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中,蒸发浓缩至30 mL,以转速 $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,将上清液用70%乙醇溶液稀释至50 mL,配制成 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (以鲜质量计,下同)样品溶液,冷藏备用。

1.3.2 DPPH自由基清除率的测定(酶标仪法)

参考文献[11]测定DPPH自由基清除率。用70%乙醇溶液稀释 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 样品溶液,配制成8, 40, 100, 200, 500, 1 000, 5 000, 10 000, 25 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品溶液系列。在1.5 mL离心管中分别加入上述稀释好的样品溶液系列各300 μL 和无水乙醇600 μL ,再加入 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH溶液600 μL ,涡旋1 min,避光反应30 min,取250 μL 加入96孔板中,用酶标仪采集517 nm波长处的吸光度,每个样品做3个平行,取结果的平均值(A)。添加无水乙醇1 200 μL ,不添加DPPH,其他步骤同测量 A 的,用于测量样品对照的吸光度 A_{x0} ;不添加样品溶液系列,加入无水乙醇900 μL ,其他步骤同测量 A 的,用于测量乙醇空白的吸光度 A_0 。用公式(1)计算DPPH自由基清除率 B_1 (单位%)。

$$B_1 = \frac{A_0 - (A - A_{x0})}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.3 DPPH自由基清除率的测定(UHPLC-Q-TOF-MS)

取1.3.2节避光反应30 min后的溶液,用70%乙醇溶液稀释200倍,用0.22 μm 滤膜过滤后装入进样瓶,按照仪器工作条件测定,测量加入样品后DPPH准分子离子峰面积 P ;不添加样品溶液系列,其他步骤同上,测量未加样品的DPPH准分子离子峰面积 P_0 。用公式(2)计算DPPH自由基清除率 B_2 (单位%)。

$$B_2 = \frac{P_0 - P}{P_0} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.4 牡丹根皮中活性成分的鉴别

对于有标准品的化合物,将化合物的保留时间、



精确质量数和一、二级质谱图与标准品的进行比对来鉴定该化合物;对于无标准品的化合物,利用质谱自带的Sciex os软件提取化合物准分子离子峰及其对应的一、二级质谱图,结合软件自带谱库、二级碎片离子、裂解规律以及查阅文献[12-17],来推测和鉴别该化合物;对于存在同分异构体的活性成分,二级碎片离子有差异的参照文献[12-17]或标准品裂解规律进行解谱,二级碎片离子也相同的参照上述文献[12-17]或通过比对极性、出峰时间进行分辨。

2 结果与讨论

2.1 牡丹根皮的抗氧化活性

2.1.1 UHPLC-Q-TOF-MS 定量检测 DPPH 的可行性

取适量 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DPPH 溶液,用乙醇稀释成1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DPPH 溶液系列,按照仪器工作条件测定,以 DPPH 的质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标进行线性回归。结果显示, DPPH 标准曲线在线性范围 $1\sim 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内的相关系数为0.999 7, $1\sim 200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内的相关系数为0.997 9, $1\sim 300\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内的相关系数为0.992 9,其中 $1\sim 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内的线性关系更好。在 $1\sim 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,线性回归方程为 $y=2.362\times 10^4x-0.429\ 0\times 10^4$,说明 DPPH 质量浓度与 DPPH 峰面积存在线性定量关系,可以用 DPPH 峰面积来计算 DPPH 自由基清除率。

2.1.2 酶标仪法和 UHPLC-Q-TOF-MS 的比较

将酶标仪法和 UHPLC-Q-TOF-MS 所得的 DPPH 自由基清除率进行比对,结果见表1。

由表1可知:不同质量浓度样品溶液下,酶标

仪法所得 DPPH 自由基清除率波动较大,低浓度水平8, 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下出现了异常负值,高浓度水平10 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下 DPPH 自由基清除率出现随样品质量浓度的增大而降低的异常情况,可能因为样品基质、颜色等对测定产生了严重干扰,10 000, 25 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下 DPPH 自由基清除率基本不变,说明 DPPH 自由基清除基本达到饱和;以 UHPLC-Q-TOF-MS 测定时, $8\sim 1\ 000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 下 DPPH 自由基清除率随着样品质量浓度的增大呈线性增大,以稀释200倍后样品的质量浓度($40\sim 5\ 000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标, DPPH 自由基清除率为纵坐标进行线性回归,所得标准曲线在 $40\sim 5\ 000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内的线性回归方程为 $y=76.58x+1.514$,相关系数为0.998 4,说明 UHPLC-Q-TOF-MS 能有效避免样品基质和颜色对 DPPH 自由基清除率测定的干扰。

2.1.3 精密度和稳定性试验

按照1.3.3节试验方法制备200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液并连续进样6次,所得 DPPH 自由基清除率的相对标准偏差(RSD)为0.51%,说明仪器精密度良好。

按照1.3.3节试验方法制备6份200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液并测定,所得 DPPH 自由基清除率的RSD为0.94%,说明方法的重复性良好。

按照1.3.3节试验方法制备200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 样品溶液,避光反应30 min后分别于0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h用70%乙醇溶液稀释200倍,过滤后进样。结果显示,5 h内 DPPH 自由基清除率的RSD为2.1%,说明制备的样品溶液在5 h内稳定性良好。

2.2 牡丹根皮中抗氧化活性成分的筛选

和 DPPH 反应前后样品溶液的总离子流色谱图见图1。

由图1可知:对比和 DPPH 反应前后样品溶液的总离子流色谱图,峰面积显著降低的化合物有18种(峰序号1~18);新增了3种化合物(序号19~21),可能为 DPPH 及其反应产物。

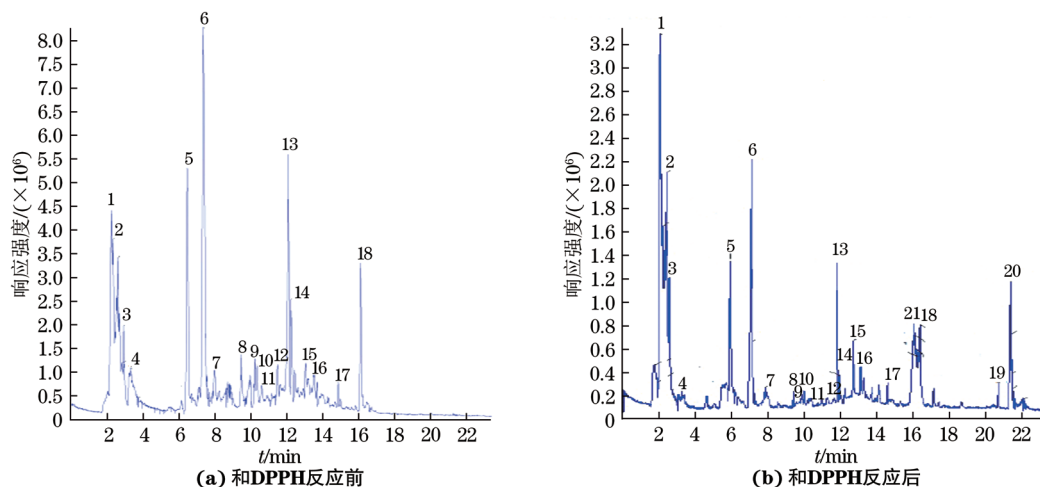
2.3 牡丹根皮中抗氧化活性成分的鉴定

按照1.3.4节方法鉴定各活性成分,鉴定出的15种化合物为氧化芍药苷、丹皮酚、没食子酰芍药苷、没食子酸甲酯、牡丹皮苷H、牡丹皮苷F、对羟基苯甲酸、牡丹皮苷E、丹皮酚新苷、丹皮酚原苷、苯甲酰氧化芍药苷、苯甲酰氧化芍药苷同分异构体、丹皮酚同分异构体、没食子酸、丹皮酚原苷B,有3种化合物未被鉴别出。其中,氧化芍药苷、丹皮酚、没食子酰芍药苷、没食子酸甲酯、牡丹皮苷H、牡丹皮

表1 方法比较结果

Tab. 1 Results of method comparison

$\rho_{\text{样品溶液}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	DPPH 自由基清除率/%	
	酶标仪法	UHPLC-Q-TOF-MS
8	-12.59 ± 2.52	1.14 ± 0.07
40	-8.75 ± 3.82	4.65 ± 0.06
100	5.68 ± 1.07	9.68 ± 0.04
200	8.76 ± 1.78	17.76 ± 0.12
500	37.25 ± 2.09	42.25 ± 1.28
1 000	62.81 ± 1.61	76.64 ± 2.74
5 000	81.75 ± 2.37	85.56 ± 2.81
10 000	71.94 ± 3.75	95.09 ± 3.07
25 000	72.56 ± 5.13	96.46 ± 2.97



各峰序号对应的化合物见表2

图1 和DPPH反应前后样品溶液的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatograms of the sample solution before and after reacting with DPPH

昔F、对羟基苯甲酸是牡丹根皮中主要的抗氧化活性成分。18种活性成分以及3种DPPH及其反应产物[DPPH的分解产物2, 4, 6-三硝基环己-2, 5-二烯-1-亚胺(TCDI), 还原产物1,1-二苯基-2-(2,4,6-三硝基苯)肼(DPPH₂)]的信息见表2, 其中“*”代表化合物通过标准品鉴定。

鉴定出的15种活性成分的二级质谱图及主要碎片的可能裂解途径见图2和图3。

2.4 DPPH的可能反应机理

DPPH与抗氧化活性成分反应后, DPPH及其反应产物的质谱图及相应结构见图4。

由图4可知: DPPH和DPPH₂质谱图中出现2个丰度较高 m/z 226, 196的离子峰, 为DPPH和DPPH₂

的主要二级碎片离子; DPPH在ESI⁻模式下和抗氧化活性成分反应形成相对稳定的还原产物DPPH₂, 相较DPPH得到了一个质子和电子, 并在 m/z 394处形成其脱质子分子离子峰, DPPH₂极性增强, 在DPPH前出峰, 在 m/z 392, 439处分别形成丰度较高和较低的2个离子峰, 前者可能由DPPH₂脱掉夹在2个硝基中间的2个氢形成, 后者可能由DPPH₂脱掉2个氢被2个钠取代形成; m/z 227处的离子可能是DPPH被过量抗氧化活性成分还原后生成的分解产物TCDI。以上结果说明, 在清除DPPH自由基过程中, DPPH的变化包括形成还原态的DPPH₂、分解产生的DPPH⁺和分解产物TCDI, 这和文献[18]的研究结果一致。总结上述反应机理, 如图5所示。

表2 和DPPH反应前后样品溶液中18种活性成分、DPPH及其反应产物的信息

Tab. 2 Information of 18 active ingredients as well as DPPH and its reaction products in sample solution before and after reacting with DPPH

序号	中文名称	英文名称	化学式	准分子离子 m/z	特征碎片离子 m/z	保留时间/min	峰面积	
							反应前	反应后
1	没食子酸*	gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	169.01	125.02	2.27	2.14×10 ⁴	1.02×10 ⁴
2	丹皮酚原苷B	mudanosiide B	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₄	463.09	300.03	2.60	3.47×10 ⁴	2.04×10 ⁴
3	牡丹皮昔F	mudanpioside F	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	343.14	181.09	2.93	1.06×10 ⁴	0.75×10 ²
4	对羟基苯甲酸*	4-hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	137.02	93.03	3.30	1.97×10 ⁴	3.83×10 ²
5	没食子酸甲酯*	methyl gallate	C ₈ H ₆ O ₅	183.03	125.99	6.41	7.35×10 ⁶	4.91×10 ⁵
6	氧化芍药苷*	oxypaeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	495.14	465.13	7.38	4.08×10 ⁷	9.07×10 ⁶
7	牡丹皮昔E	mudanpioside E	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	525.15	363.11	7.98	2.99×10 ⁶	4.74×10 ⁵
8	丹皮酚新苷	apiopaeonoside	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	459.18	293.09	9.49	4.79×10 ⁶	6.15×10 ⁵
9	丹皮酚原苷	paeonolide	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	459.15	293.09	10.20	3.21×10 ⁶	5.36×10 ⁵
10	未知			581.18	459.15	10.36	2.05×10 ⁵	6.45×10 ³

表2(续)

序号	中文名称	英文名称	化学式	准分子离子 m/z	特征碎片离子 m/z	保留时间/min	峰面积	
							反应前	反应后
11	未知			479.15	311.07	10.51	1.23×10^4	2.24×10^3
12	未知			509.16	463.22	11.45	5.47×10^5	3.22×10^4
13	没食子酰芍药苷*	galloyl-paeoniflorin	$C_{30}H_{32}O_{15}$	631.16	449.14	12.11	7.59×10^4	3.31×10^3
14	牡丹皮苷H	mudanpioside H	$C_{30}H_{32}O_{14}$	615.16	477.14	12.29	5.69×10^6	3.18×10^5
15	苯甲酰氧化芍药苷 同分异构体	benzoyloxypaeoniflorin isomer	$C_{30}H_{32}O_{13}$	599.17	477.14	13.23	3.95×10^4	1.05×10^4
16	苯甲酰氧化芍药苷*	benzoyloxypaeoniflorin	$C_{30}H_{32}O_{13}$	599.17	447.14	13.44	7.42×10^4	1.86×10^4
17	丹皮酚同分异构体	paeonol isomer	$C_9H_{10}O_3$	165.05	137.02	14.90	2.79×10^6	7.41×10^5
18	丹皮酚*	paeonol	$C_9H_{10}O_3$	165.05	122.03	16.14	1.28×10^7	9.59×10^6
19	DPPH ₂	1,1-diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazine	$C_{18}H_{13}N_5O_6$	439.06	225.99	21.39		3.62×10^3
20	DPPH*	1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	394.08	225.99	20.89		5.52×10^6
21	TCDI	2,4,6-trinitrocyclohexa-2,5-dien-1-imine	$C_6H_3N_4O_6$	227.00	180.00	15.93		1.25×10^3

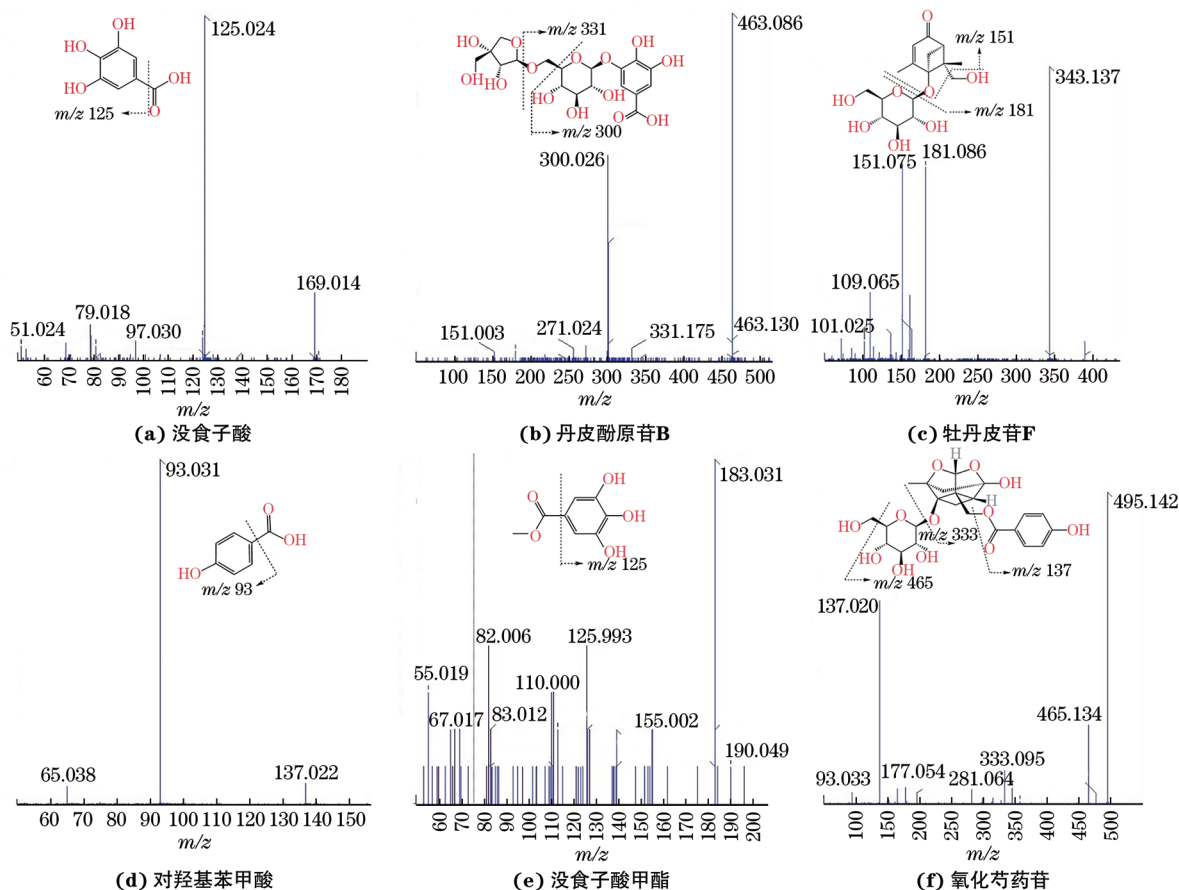


图2 序号1~6对应化合物的二级质谱图和可能裂解途径

Fig. 2 Secondary mass spectra and possible fragmentation patterns of compounds corresponding to No. 1-6

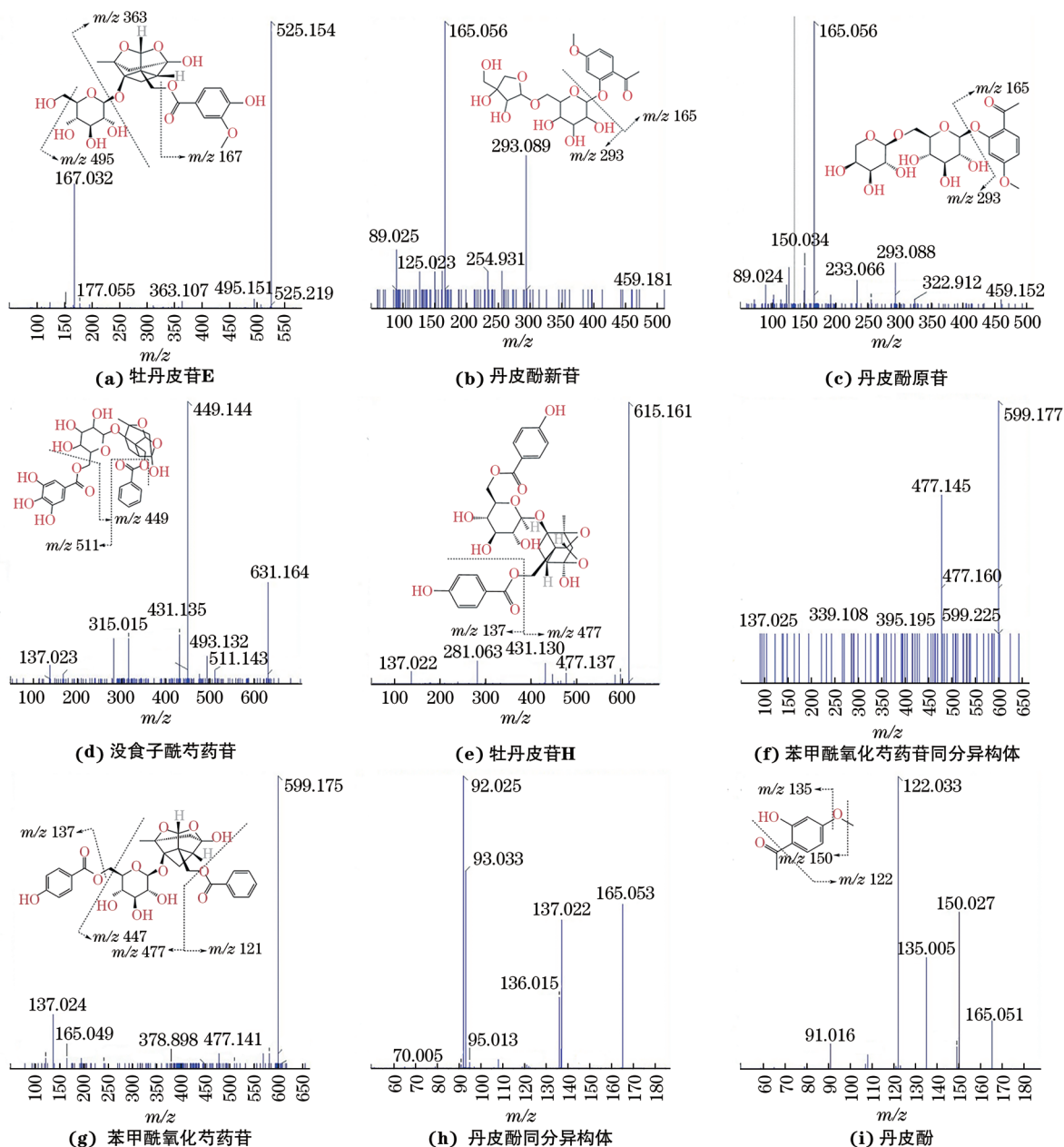


图3 序号7~9和序号13~18对应化合物的二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 3 Secondary mass spectra and possible fragmentation patterns of compounds corresponding to No. 7-9 and No. 13-18

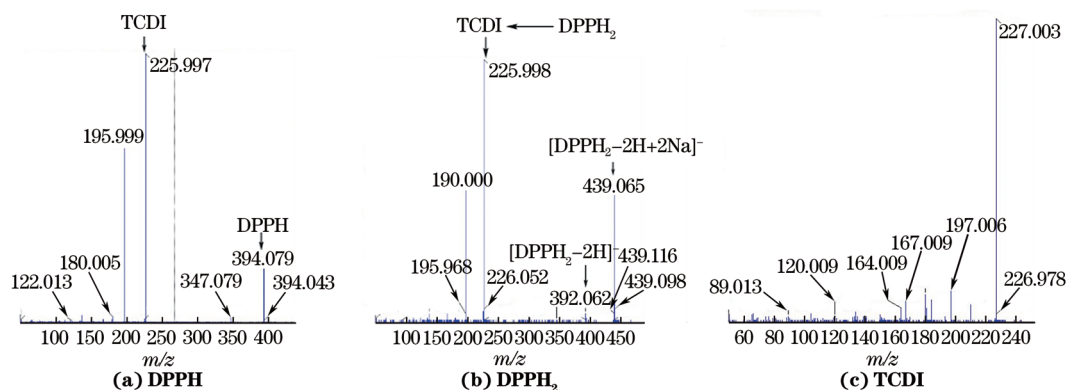


图4 DPPH及其反应产物的质谱图

Fig. 4 Mass spectra of DPPH and its reaction products

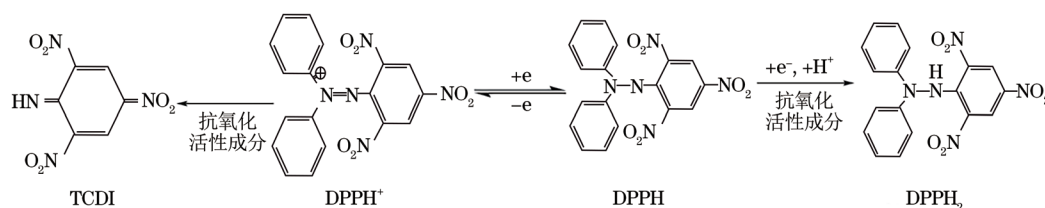


图 5 清除 DPPH 自由基的可能反应机理

Fig. 5 Possible reaction mechanism of scavenging DPPH free radical

目前研究中药生物转化的方法大多将中药中的某一特定有效成分提取出来,测定其抗氧化活性,过程费时、费力,本工作采用的UHPLC-Q-TOF-MS不经分离即可直接确定中药材中的抗氧化活性成分及其活性的高低。方法效率高、快速、抗基质干扰强、精密度高,可用于抗氧化活性成分的高效筛选。

参考文献:

- [1] 邓清平, 侯光荫. DPPH-HPLC-QTOF-MS/MS快速筛选和鉴定臭牡丹中抗氧化活性成分[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2018, 52(6):816-821.
- [2] CHANDRASEKAR D, MADHUSUDHANA K, RAMAKRISHNA S, et al. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 40(2):460-464.
- [3] LO SCALZO R. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid[J]. Food Chemistry, 2008, 107(1):40-43.
- [4] AL-DABBAS M M, AL-ISMAIL K, KITAHARA K, et al. The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of *Varthemia* crude water extract on DPPH radical scavenging activity[J]. Food Chemistry, 2007, 104(2):734-739.
- [5] CHAT O A, NAJAR M H, MIR M A, et al. Effects of surfactant micelles on solubilization and DPPH radical scavenging activity of Rutin[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2011, 355(1):140-149.
- [6] YAMAGUCHI T, TAKAMURA H, MATOBA T, et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(6):1201-1204.
- [7] BANDONIENÈ D, MURKOVIC M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(9):2482-2487.
- [11] 张岩松, 刘向慧, 牛江秀, 等. 护肤功效原料牡丹花和牡丹叶提取物的提取工艺和性能研究[J]. 精细与专用化学品, 2020, 28(12): 27-34.
- [12] HE Q, GE Z W, SONG Y, et al. Quality evaluation of cortex moutan by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 54(9):1271-1275.
- [13] XU S J, YANG L, ZENG X, et al. Characterization of compounds in the Chinese herbal drug Mu-Dan-Pi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006, 20(22):3275-3288.
- [14] LI X Y, XU J D, ZHOU S S, et al. Time segment scanning-based quasi-multiple reaction monitoring mode by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole/time-of-flight mass spectrometry for quantitative determination of herbal medicines: Moutan Cortex, a case study[J]. Journal of Chromatography A, 2018, 1581/1582:33-42.
- [15] 许舜军, 杨柳, 张勉, 等. 牡丹皮化学成分的液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. 药学学报, 2006, 41(9):852-856.
- [16] LIU J H, SUN H, ZHANG A H, et al. Serum pharmacochimistry combined with multiple data processing approach to screen the bioactive components and their metabolites in Mutan Cortex by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Biomedical Chromatography, 2014, 28(4):500-510.
- [17] 李娴, 卫向龙, 赵学龙, 等. 比较牡丹皮炒炭前后的化



学成分变化[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):32-35.

[18] 李铨军,崔胜云.抗坏血酸清除DPPH自由基的作用机理[J].食品科学,2011,32(1):86-90.

Detection of Antioxidant Active Components and Their Antioxidant Ability from Moutan Cortex by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry

XIE Yanfu, YA Huiyuan, LI Yuejia, LIU Pei

(School of Food and Drug, Luoyang Normal University, Luoyang 471934, China)

Abstract: In order to accurately detect the antioxidant active components and their antioxidant ability in Moutan Cortex samples with complex matrix, the title study was conducted, and the reaction mechanism of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) free radical elimination process was speculated. Extraction was conducted twice on the sample by ultrasound with 70% (volume fraction, the same below) ethanol solution. After filtration, the filtrate was collected, concentrated, and centrifuged. The supernatant was diluted to prepare $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sample solution, and further diluted to prepare sample solution series with mass concentrations of 8, 40, 100, 200, 500, 1 000, 5 000, 10 000, 25 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. 300 μL of the prepared sample solution series mentioned above (sample control group without sample addition) and 600 μL of anhydrous ethanol, together with 600 μL of 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH solution were added. The mixed solution was vortexed for 1 min, reacted in dark for 30 min, and diluted 200 times with 70% ethanol solution. The solution obtained was passed through a 0.22 μm filtrate membrane, and the filtrate was analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS), to measure the peak areas P_0 and P of DPPH reference molecule ions before and after sample addition, and calculate the DPPH free radical scavenging rate using $100\% \times (P_0 - P)/P_0$. Various antioxidant active components were identified by combining their own spectrum library, reference substance spectra, and relevant literatures on Moutan Cortex. It was shown that linear relationship between values of the mass concentration of the sample and the DPPH free radical scavenging rate was kept in the range of 8—1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The proposed method was less affected by the interference of the sample matrix and color compared to the enzyme-linked immunosorbent assay method. The results of the DPPH free radical scavenging rate were consistent with those given by the enzyme-linked immunosorbent assay method. 18 antioxidant active components were significantly identified from Moutan Cortex, including 15 identifiable components (containing two pairs of isomers) and 3 unknown components. Among them, oxypaeoniflorin, paeonol, mudanpioside H, galloyl-paeoniflorin, methyl gallate, mudanpioside F, and 4-hydroxybenzoic acid were the main antioxidant active components in Moutan cortex.

Keywords: 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine(DPPH); ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS); Moutan Cortex; antioxidation