

基于微萃取-纳喷雾质谱技术的纳升脑脊液中咖啡多酚的检测

闫勇杰³, 高文博³, 鲁晨辉³, 杨成^{1,2,3}, 徐姝婷^{1,2,3}

- (1. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,
2. 国际食品安全联合实验室,
3. 食品学院, 分析食品安全学研究所, 无锡 214122)

摘要 设计并建立了一种适用于纳升脑脊液中多酚类物质原位萃取及快速定性定量分析的方法. 通过制备具有较好生物兼容性和稳定性的聚吡咯微萃取探针, 实现了脑脊液中多酚的快速高效富集, 降低了基质干扰; 将其与纳喷雾离子化质谱联用, 实现了对微量体积小鼠脑脊液中多酚的高通量快速检测. 利用微萃取-纳喷雾质谱技术建立了同时检测脑脊液中4种酚酸(咖啡酸、3-羟基苯乙酸、高香草酸和阿魏酸)和2种黄酮(表儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯)的方法. 该方法检测的线性范围为0.1/0.5/1~20 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.994\sim0.999$), 检出限为0.027~0.39 $\mu\text{g/mL}$ (0.014~0.20 ng), 在脑脊液基质中的加标回收率为96.9%~108%. 该方法具有样品量小、线性范围宽、检出限低和定量准确的优点. 此外, 该方法可用于小鼠摄食多酚咖啡后脑脊液中多酚含量及动态变化分析, 对了解多酚在脑脊液中的分布和代谢以及探究其在神经保护方面的作用机理等具有潜在的应用价值.

关键词 多酚; 微萃取; 纳喷雾质谱; 脑脊液

中图分类号 O657.63

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240327

Detection of Coffee Polyphenols in Nanoliter Cerebrospinal Fluid by Microextraction Coupled to Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry

YAN Yongjie³, GAO Wenbo³, LU Chenhui³, YANG Cheng^{1,2,3}, XU Shuting^{1,2,3*}

- (1. State Key Laboratory of Food Science and Resources,
2. International Joint Laboratory on Food Safety,
3. Institute of Analytical Food Safety, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract An analytical technique was designed and constructed for the *in situ* extraction and rapid qualitative and quantitative detection of polyphenols in nanoliter cerebrospinal fluid. By preparing polypyrrole microextraction probes with good biocompatibility and stability, the rapid and efficient enrichment of polyphenols in cerebrospinal fluid was achieved, and the matrix interference was reduced. Combined with nanoelectrospray ionization mass spectrometry (nESI-MS), high-throughput rapid detection of polyphenols in micro-volume mice cerebrospinal fluid was realized.

收稿日期: 2024-07-01. 网络首发日期: 2024-07-30.

联系人简介: 徐姝婷, 女, 博士, 副研究员, 主要从事食品安全分析和高灵敏质谱分析新技术新方法方面的研究.

E-mail: shutingxu@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22104044)、江苏省自然科学基金(批准号: BK20210448)和江南大学基本科研计划青年基金(批准号: JUSRP123049)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22104044), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China(No. BK20210448) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities, China(No.JUSRP123049)

The method for simultaneous detection of four phenolic acids (caffeic acid, 3-hydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid and ferulic acid) and two flavonoids (epicatechin and epigallocatechin gallate) was established based on microextraction coupled to nESI-MS. The linear ranges were 0.1/0.5/1—20 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.994\text{—}0.999$) with recovery rates in the cerebrospinal fluid matrix of 96.9%—108%, and the detection limits were 0.027—0.39 $\mu\text{g/mL}$ (0.014—0.20 ng), which took the advantages of low sample consumption, wide linear range, low detection limit and accurate quantification. In addition, the new method was utilized to analyze the content and dynamic changes of polyphenols in mice cerebrospinal fluid after polyphenol ingestion, which showed high potential application value in understanding the distribution and metabolism of polyphenols in cerebrospinal fluid and exploring their mechanism in neuroprotection.

Keywords Polyphenol; Microextraction; Nanoelectrospray ionization mass spectrometry; Cerebrospinal fluid

膳食多酚是一类广泛存在于植物性食物中的生物活性化合物,以酚酸类、黄酮类和异黄酮结构为主^[1,2]。多种多酚类化合物被证明在人体健康方面发挥重要作用,其通过抗氧化保护、抗炎作用、神经保护和调节神经递质等多种途径对大脑产生积极作用^[3,4]。因此,天然多酚被广泛应用于食品、功能食品和特殊膳食等领域,以增强产品的营养价值和健康效益。然而,由于多酚的结构多样性、个体差异及测定方法的局限性等问题,多酚的生物利用率尚不明确,摄入后被人体吸收并发挥作用的比例未知^[5]。咖啡是一种富含多酚的食品,其中多种多酚的生物利用率均未知,成为制约膳食多酚营养干预以及多酚机制与药效学等研究的重要因素^[6,7]。建立多酚多类别、准确和高效的测定方法是膳食多酚研究的关键。

多酚类物质主要通过穿透血脑屏障(BBB)在大脑中发挥其生理作用^[8]。脑脊液是反映脑内环境变化的重要窗口,通常作为多酚研究的重要生理基质^[9,10]。在脑脊液中检测到膳食多酚,是证明其能够穿越BBB的直接证据,检测脑脊液中多酚的种类、浓度及其变化规律有助于揭示多酚在脑内的分布模式、动态变化规律及其可能的代谢途径。由于脑脊液样本量少(在常用的小鼠模型中,若要保证小鼠存活,单次小鼠的脑脊液安全取用量约为3 μL)^[11]、多酚含量低、种类多、多酚稳定性和内源性物质的干扰,致使检测脑脊液中的多酚十分困难,因此对检测方法的灵敏度、分析时效、分析通量及定性定量能力均要求极高。

微电极法已被用于小鼠的原位实时脑化学研究^[12,13],常被用于pH值、特定离子及其它电活性物质的检测,难以进行全面的化学成分分析。微透析技术是脑脊液取样的常用技术,通过对大脑特性区域精确定位,微透析技术可使用特定的透析膜实现目标物的连续取样^[14]。然而,由于多酚的种类多且分子尺寸范围大,多酚的微透析采集难以实现特异性采集,会出现大量基质干扰,因此,在后续检测中,通常需采用串联色谱-质谱联用等分离检测技术^[15],取样技术要求高且分析耗时多。采用微量玻璃吸管抽取小鼠脑脊液是简便易行的新方法^[16],玻璃管能够获取微升及亚微升脑脊液样品,可保障小鼠存活,且获取的样品具有脑脊液完整成分。针对复杂样品,色谱-质谱技术在成分分析与检测中不可或缺,如纳升液相色谱-高分辨串联质谱,通常可进行复杂微量生物样品中多组分的定性定量分析^[17],然而其存在前处理复杂和分离过程耗时多的缺点,难以解决脑脊液中多酚测定的时效性和通量等问题。

基于微纳喷针的纳升电喷雾直接质谱检测技术(nESI)的分析快速、分析通量高^[18,19],且可与微量玻璃吸管的脑脊液取样技术兼容,有望成为检测微量脑脊液中多酚的新技术。但是,脑脊液中高浓度非挥发性盐等基质会对低含量的目标多酚物质产生信号抑制,导致多酚检测困难。固相微萃取是一种能够从少量复杂样品中富集目标物,降低基质干扰的有效策略,常用聚合物、碳材料、金属有机/共价有机框架材料和纳米材料等实现目标物的特异性富集^[20,21]。然而,在微升及亚微升的超微量脑脊液体系中,对固相微萃取技术的萃取效率、均一性、微型化与适应性要求更高。同时,对于痕量目标物的解吸条件、解吸效率及检测仪器的匹配度也需做出特异性设计,以保障目标物检测的高灵敏度和满足条件的检测限。

基于此,本文建立了一种可与微纳取样针脑脊液取样技术兼容,同时能够高效消除脑脊液基质干

扰并快速检测的微萃取-纳喷雾质谱技术(图1),实现了对脑脊液中多种多酚的高灵敏、快速、高通量的同时定性定量分析.利用酸腐蚀和恒电位电镀聚吡咯策略,制备了外径约为30 μm 的微萃取探针[图1(B)],可将其插入微纳脑脊液取样针中以富集多酚类物质(基于 π - π 相互作用和静电相互作用等)[图1(A)],通过实验室构建的原位解吸-纳喷雾离子源实现对多酚类物质的快速测定[图1(C)].该方法以脑脊液中多种多酚,如酚酸类物质(3-羟基苯乙酸、高香草酸、咖啡酸和阿魏酸)和黄酮类物质(表儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯)为目标物,采用多反应监测(MRM)模式构建了准确、快速且灵敏的多种多酚同时定量方法.该方法可用于小鼠多酚咖啡灌胃后脑脊液中多种关键多酚的血脑屏障穿透及动态变化研究.

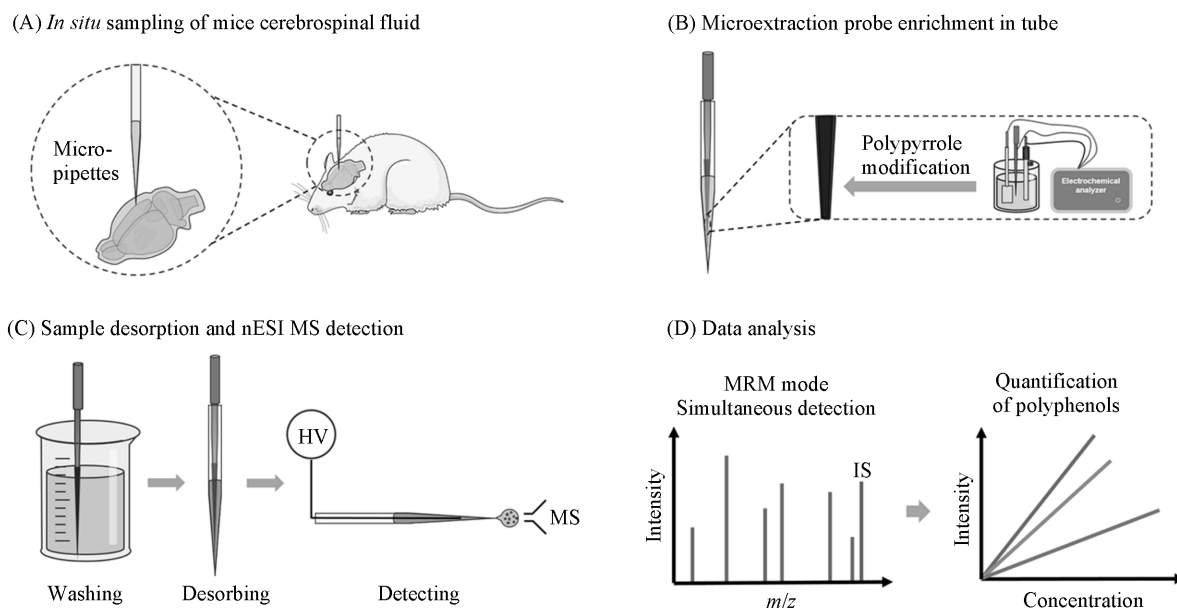


Fig. 1 Schematic of the detection of coffee polyphenols in nanoliter mice cerebrospinal fluid (CSF) based on microextraction-nano electrospray ionization mass spectrometry (nESI-MS)

(A) *In situ* sampling of mice CSF using a micro-glass pipette; (B) polypyrrole modified microextraction probe enrichment of polyphenols in trace amounts of CSF inside the micro-glass pipette; (C) washing of the microextraction probe followed by nESI MS detection; (D) simultaneous acquisition and quantification of multiple polyphenols.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

盐酸、硫酸、葡萄糖和维生素C均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;吡咯(分析纯),上海麦克林生化科技有限公司;甲醇(HPLC级)、乙腈(HPLC级)和乳酸(纯度98%),赛默飞世尔科技公司;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司;咖啡酸(纯度99%)、表没食子儿茶素没食子酸酯(纯度98%)、表儿茶素(纯度97%)和3-羟基苯乙酸(纯度98%),上海迈瑞尔生化科技有限公司;高香草酸(纯度98%),上海阿达玛斯试剂有限公司;阿魏酸(纯度 $\geq 98\%$)和卡托普利(纯度 $\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司;丙氨酸(纯度99%),阿拉丁试剂(上海)有限公司;苯丙氨酸(纯度99%),北京百灵威科技有限公司;亚麻酸(纯度99%),北京伊诺凯科技有限公司.

AB SCIEX QTRAP 4500型三重四级杆/离子阱串联质谱仪,美国AB SCIEX公司;CHI800D型电化学分析仪,上海辰华仪表有限公司;P-2000/G型激光微电极控制仪,美国Sutter公司;IX53型倒置显微镜,日本Olympus公司;SU8100型冷场发射扫描电子显微镜,日本日立高新技术株式会社;不锈钢针灸针(外径120 μm),乐灸医疗器械有限公司;硼硅酸盐毛细玻璃管(B150-86-10),美国Sutter公司;232饱和甘汞电极,上海华宇仪表厂;铂片电极(5 mm \times 10 mm \times 0.1 mm),上海华宇仪表厂;铜丝电极

(直径0.05 mm), 深圳市杨盛泰科技有限公司.

1.2 实验过程

1.2.1 聚吡咯微萃取探针的制备 微萃取探针以120 μm 外径不锈钢针灸针作为基材. 先将不锈钢针用质量分数为9%的盐酸溶液于70 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡120 min, 再水清洗2遍, 晾干; 采用恒电位法在浸泡后的不锈钢针表面电沉积聚吡咯, 采用0.35 mol/L 吡咯和0.5 mol/L 硫酸水溶液作为电沉积液, 电沉积条件如下: 三电极体系, 沉积电位1.2 V, 沉积时间60 s, 滞后0 s. 电沉积后的不锈钢针用水清洗2遍, 晾干备用.

1.2.2 原位解吸-纳喷雾离子源的构建 样品测定均利用实验室自行搭建的原位解吸-纳喷雾离子源联用AB SCIEX QTRAP 4500三重四级杆/离子阱串联质谱检测器. 原位解吸-纳喷雾离子源[图1(C)]主要包括微萃取探针/铜丝电极和玻璃喷针. 首先, 将微萃取探针插入玻璃喷针尖端溶剂中进行样品解吸, 然后, 取出微萃取探针, 向玻璃喷针中插入铜丝电极, 施加喷雾电压. 优化后的离子源参数如下: 负模式检测, 电压为-2.6 kV, 探针尖端与质谱入口的水平距离为6 mm, 探针尖端与质谱入口的垂直高度为3 mm, 气帘气为10 psi(1 psi \approx 6895 Pa), 雾化气为10 psi, 雾化气为20 psi.

1.2.3 6种多酚同时富集及测定方法的建立与验证 首先, 利用微量玻璃吸管取样, 微量玻璃吸管及玻璃喷针均使用激光微电极拉制仪制备, 拉制参数为HEAT: 450, FIL: 4, VEL: 50, DEL: 145, PUL: 0, 获得的吸管/喷针的尖端尺寸约为1~2 μm . 将500 nL标准溶液及脑脊液样品吸取至微量玻璃吸管中, 通过调节取样时间控制取样量, 再使用分析天平称重. 取样后将微萃取探针插入微量玻璃吸管尖端, 静置富集10 min, 取出微萃取探针, 用水清洗2次, 插入预先装了解吸溶剂(含内标: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡托普利)的玻璃喷针尖端, 优化后的解吸溶剂为乙醇, 并安装在质谱入口前, 解吸4 min后, 取出萃取探针, 插入铜丝电极, 并施加电压进行质谱测试. 样品测定采用MRM模式, 同时检测7种物质(3-羟基苯乙酸、高香草酸、咖啡酸、阿魏酸、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯和卡托普利), 其定量/定性离子对及碎裂能等信息列于表S1(见本文支持信息). 质谱数据利用Analyst软件(版本1.6.3)进行处理.

1.2.4 咖啡灌胃小鼠脑脊液中6种多酚的同时测定 小鼠实验中灌胃及脑脊液取样由北京中研子创生物科技有限公司完成. 实验使用2月龄C57BL/6J雄性小鼠, 适应性喂养2 d后, 随机分为实验组(1 h组, 2 h组, 4 h组, 6 h组和8 h组)和对照组, 每组3只小鼠. 实验组灌胃0.3 mL多酚咖啡溶液, 对照组给予0.3 mL蒸馏水灌胃. 灌胃后, 分别在1 h, 2 h, 4 h, 6 h和8 h时用微量玻璃吸管取小鼠脑脊液, 对照组在蒸馏水灌胃1 h后取脑脊液. 吸管中的脑脊液样品按照1.2.3节流程进行微萃取探针富集与原位解吸-纳喷雾质谱检测.

2 结果与讨论

2.1 聚吡咯微萃取探针的优化与表征

采用恒电位法在微萃取探针表面沉积聚吡咯^[22,23], 该方法操作简便、制备快速且可控性强. 通过盐酸刻蚀使不锈钢针直径减小, 同时提高了其表面的粗糙度(图S1, 见本文支持信息), 有利于电沉积. 实验中选择硫酸作为掺杂剂并提供反离子, 在负离子测试模式下, 硫酸根离子的干扰性比三氟乙酸根离子小, 据文献[22]报道, 采用硫酸电沉积获得的镀层稳定性与三氟乙酸相当. 对恒电位法制备探针时表面聚吡咯的沉积电位和沉积时间2个重要参数进行了优化. 沉积电位对表面聚吡咯的厚度及形貌均会产生影响[图2(A)], 在1.1~1.2 V电位下, 电极表面的聚吡咯层略微增厚, 表面呈菜花状[图2(B)], 且随着电位提高, 菜花状面积增大, 比表面积提高, 有利于后续的富集; 当沉积电位>1.2 V时, 沉积厚度显著减小, 其形貌呈表面均匀的薄膜状(图S2, 见本文支持信息). 沉积时间的优化范围为20~100 s, 结果表明在60 s时可获得厚度最佳和稳定性最高的镀层厚度[图2(C)]. 综合考虑聚吡咯的形貌、厚度和稳定性等因素, 选择沉积电位为1.2 V, 沉积时间为60 s, 探针制备方法简便且快速.

对聚吡咯修饰后探针的稳定性及重复使用性进行了研究, 聚吡咯的包裹可有效降低刻蚀后不锈钢

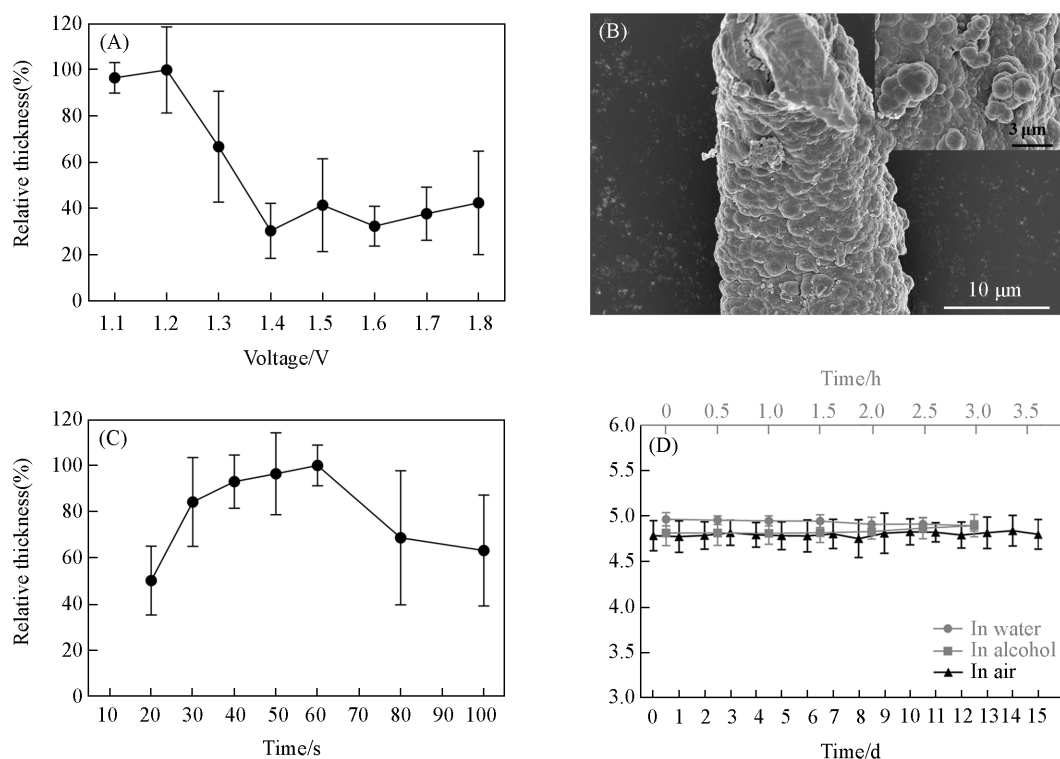


Fig. 2 Optimization and characterization of polypyrrole modified microextraction probe

(A) optimization of electrodeposition potential; (B) scanning electron microscope (SEM) image of polypyrrole modified stainless steel probe prepared by 1.2 V potentiostatic electrodeposition; (C) optimization of electrodeposition time; (D) stability testing of polypyrrole modified probe in air, water and alcohol.

表面的腐蚀速度, 制备的探针在空气中静置 15 d, 其厚度未发生显著变化[相对标准偏差(RSD) $<$ 1.2%][图 2(D)], 能够长期存放, 表明修饰的探针具有实用性. 将修饰后的探针在剧烈搅拌的水溶液及醇溶液中浸泡 3 h, 均未发现其修饰厚度的显著变化(水中 RSD $<$ 0.7%, 醇中 RSD $<$ 0.8%)[图 2(D)], 说明聚吡咯沉积层的稳定性良好, 为后续探针在萃取、洗涤及解吸中的高效使用奠定了基础. 对聚吡咯探针的重复利用性进行了测试, 发现制备的探针在使用 5 次后仍能保持 85% 以上的富集效率(图 S4, 见本文支持信息), 进一步表明聚吡咯微萃取探针的稳定性良好且具有实际使用价值.

2.2 原位解吸-纳喷雾离子源的构建与优化

纳喷雾离子化技术(nESI)采用了一种高度灵敏的电喷雾离子化方式, 适用于处理微升及纳升微小体积的液体样本分析^[24,25], 其能够在低流速下(通常为几十~几百 nL/min)工作. nESI 在离子化过程中的液滴损耗小于常规电喷雾技术, 因此, 极少的样品量即可产生高强度的质谱信号, 灵敏度高, 适用于有限样品的分析. nESI 技术产生的初始液滴较小, 因而其耐盐性较好, 在 0.1 mol/L NaCl 溶液中仍能检出目标物^[24]. 然而, 由于实际脑脊液样品成分复杂且含盐量高, 采用 nESI 技术直接检测实际脑脊液样品较困难, 实际脑脊液样品中的非挥发性盐在喷雾和去溶剂化过程中可能沉积在喷嘴口周围形成结晶或残留固体, 从而堵塞喷嘴(图 S3, 见本文支持信息).

本实验采用微萃取探针富集取样法结合 nESI 技术, 微萃取探针可在脑脊液中富集目标物, 降低基质干扰, 随后在 nESI 喷嘴的纯溶剂中解吸目标物, 保障了 nESI 喷雾及目标物检测的顺利进行. 实验室自行搭建的 nESI 离子源如图 3(A)所示, 其装置简单、成本低且操作简便, 通过更换喷嘴, 单个样品的质谱检测能够在 1 min 内完成[图 3(A)插图]. 对该装置的喷雾电压及喷嘴位置进行了优化, 在负模式下优化后的喷雾电压为 -2.6 kV[图 3(B)], 优化后的喷嘴出口距离质谱入口的水平距离为 6 mm, 垂直高度为 2 mm[图 3(C)], 在优化的条件下能够获得最高的质谱信号响应, 有利于目标物的高灵敏检测.

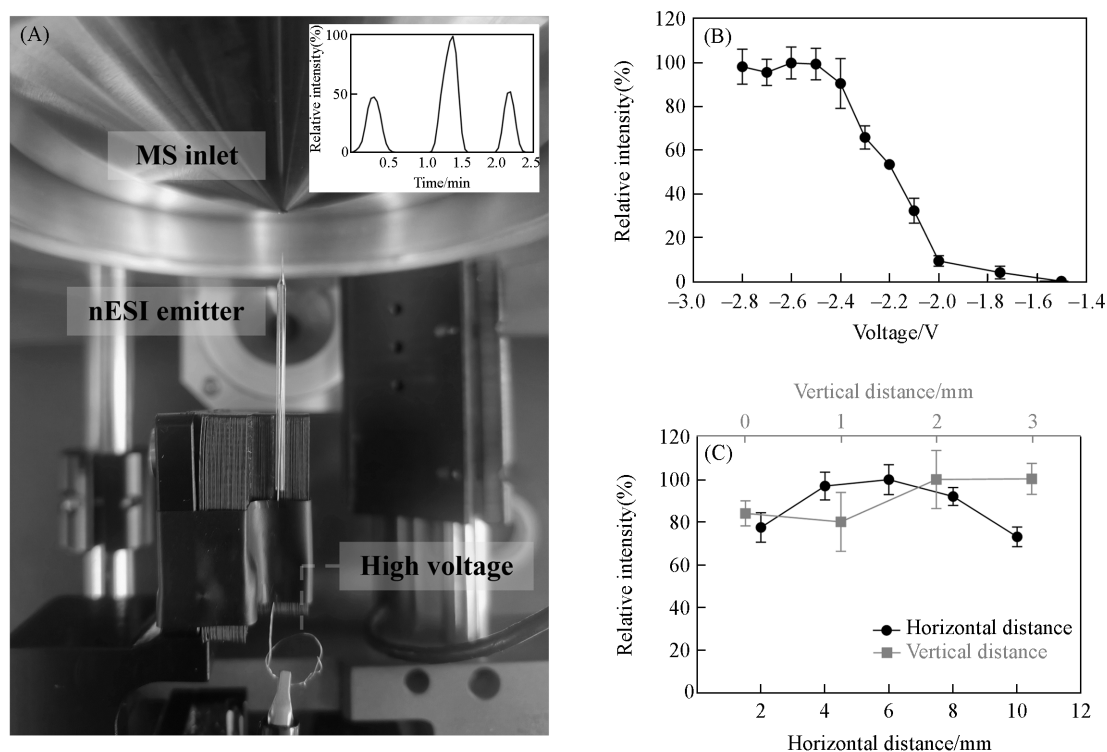


Fig. 3 Optimization of *in situ* desorption-nESI source

(A) Photo of lab-made ionization source (inset: total ion chromatogram of three sample tests); (B) optimization of spray voltage; (C) optimization of emitter position.

2.3 6种多酚的快速萃取及同时测定

将微萃取探针富集取样结合 nESI 技术用于 6 种多酚(4 种酚酸: 3-羟基苯乙酸、高香草酸、咖啡酸和阿魏酸; 2 种黄酮: 表儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯)的快速测定. 聚吡咯修饰的微探针可用于高效富集微量体积样品中的多酚. 聚吡咯分子由吡咯环单元组成, 是一个高度共轭的 π 电子体系, 且质子酸的掺杂使聚吡咯带正电荷^[26]. 聚吡咯结构与多酚结构之间的 π - π 相互作用、静电作用和氢键作用使聚吡咯修饰探针有望高效地从复杂基质体系中分离并富集多酚, 目前, 已有多种聚吡咯与酚类相互作用的报道^[27,28]. 富集多酚后的探针经洗涤, 插入至 nESI 喷针的解吸液中进行解吸, 随即进行快速质谱检测.

微探针富集方法的关键条件包括富集时间、解吸体积、解吸时间和解吸液种类等, 上述条件对分析方法的时效性和检测灵敏度等至关重要. 考虑到小鼠脑脊液约 500 nL 的安全取样体积, 且富集过程只能静态进行, 因此, 保障富集材料与样品溶液的充分接触十分重要. 腐蚀后的微探针具有微米尺寸的尖端, 便于其深入至取样针的尖端部分, 与极少量的样品溶液充分接触. 在静置富集下, 充分的富集时间十分必要. 考察了 2~15 min 富集时间下的多酚富集量变化情况[图 4(A)], 发现过短的富集时间无法高效富集多酚目标物, 随着富集时间的延长, 富集的多酚量逐渐增加, 综合考虑富集效率和分析时效, 选择 10 min 作为富集时间. 在解吸过程中, 主要考虑解吸体积、解吸时间和解吸液种类的影响. 其中, 解吸体积对检测灵敏度具有较大影响, 较小的解吸体积可起到样品浓缩的作用, 但会影响解吸效率, 较大的解吸体积可提高解吸效率, 但会稀释样品, 降低检测灵敏度. 测试了 200~800 nL 不同解吸体积的多酚富集量[图 4(B)], 解吸体积为 400 nL 可获得较优的检测强度, 且与样品体积接近, 便于富集微针与解吸液的充分接触, 因此选择 400 nL 作为解吸体积. 测试了不同解吸时间(1~6 min)的多酚富集量[图 4(C)], 发现在 4 min 时可达解吸平衡. 测试了使用 4 种不同解吸溶剂时的多酚富集量[图 4(D)], 溶剂的极性大小顺序为甲醇>乙腈>乙醇>丙酮, 对于聚吡咯表面富集的多酚类物质, 乙醇表现出更好的解吸能力, 其也是质谱兼容溶剂, 有利于高效电喷雾离子化, 因此选择乙醇作为解吸溶

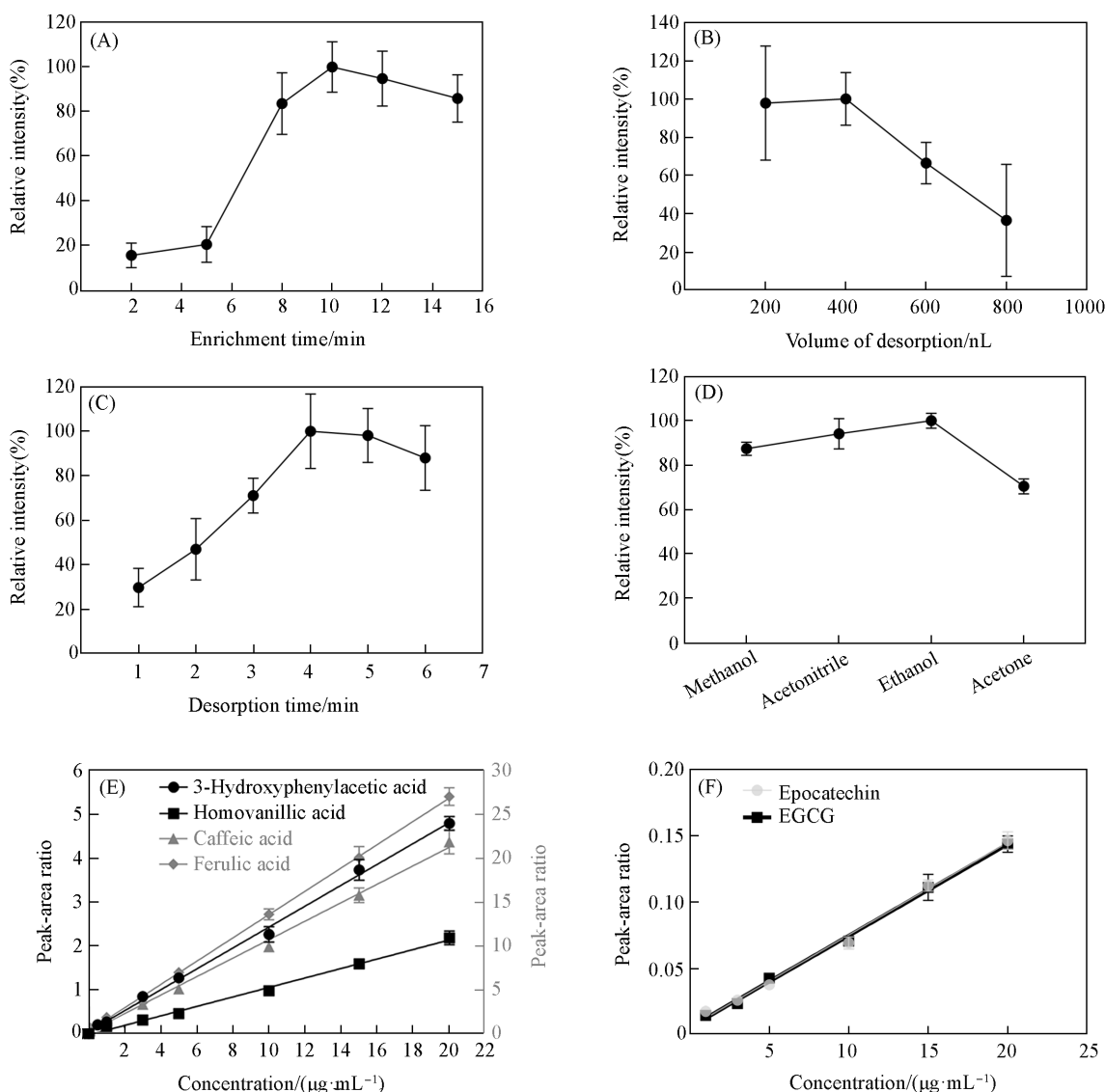


Fig. 4 Rapid enrichment and simultaneous detection of six polyphenols

(A) Optimization of enrichment time; (B) optimization of desorption volume; (C) optimization of desorption time; (D) optimization of desorption solution; (E) calibration curves of four phenolic acids; (F) calibration curves of two flavones.

剂. 整个富集及解吸过程持续约 15 min, 在脑脊液多酚分析中, 该富集方法能够较好地兼容脑脊液的原位取样并保障多酚物质的活性及分析结果的真实性. 解吸后, 喷针中的解吸液可直接进行质谱检测.

将该方法用于 6 种多酚的同时检测, 采用 MRM 模式, 可实现多种物质的同时定性检测, 利用外源性物质卡托普利 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) 作为内标, 用于校准质谱检测过程中的系统误差, 保障目标物的定量分析. 以目标物定量离子对与内标物定量离子对的峰面积之比作为定量依据, 该方法对 6 种多酚均表现出较好的定量检测结果 [图 4(E) 和 (F)]: 检测 3-羟基苯乙酸的线性范围为 $0.5\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($Y=0.2365X+0.0668$, $R^2=0.997$), 绝对量为 $0.25\sim 10 \text{ ng}$, 检出限为 $0.13 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0.06 ng); 检测高香草酸的线性范围为 $1\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($Y=0.1087X-0.0372$, $R^2=0.996$), 绝对量为 $0.5\sim 10 \text{ ng}$, 检出限为 $0.39 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0.20 ng); 检测咖啡酸的线性范围为 $0.1\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($Y=1.050X+0.188$, $R^2=0.997$), 绝对量为 $0.05\sim 10 \text{ ng}$, 检出限为 $0.031 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0.016 ng); 检测阿魏酸的线性范围为 $0.1\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($Y=1.325X+0.292$, $R^2=0.999$), 绝对量为 $0.05\sim 10 \text{ ng}$, 检出限为 $0.027 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0.014 ng); 检测表儿茶素的线性范围为 $1\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($Y=0.006979X+0.00542$, $R^2=0.994$), 绝对量为 $0.5\sim 10 \text{ ng}$, 检出限为 $0.35 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0.18 ng); 检测表没

食子儿茶素没食子酸酯的线性范围为1~20 $\mu\text{g/mL}$ ($Y=0.007013X+0.00411$, $R^2=0.997$), 绝对量为0.5~10 ng, 检出限为0.28 $\mu\text{g/mL}$ (0.14 ng). 目前, 用于脑脊液多种多酚的分析方法十分有限, 表S2(见本文支持信息)数据将本文方法与代表性复杂基质中多酚检测方法进行了对比. 可见, 与电化学和荧光光谱等方法相比, 色谱和质谱类技术在多物质定性定量分析上具有较大优势; 该方法的线性范围及检出限与常用的液相色谱方法相当, 如岛津LC-30A液相色谱仪建立的7种酚类化合物检测方法, 其线性范围为0.5~10 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为0.01 $\mu\text{g/mL}$ ^[29]; 与超高效液相色谱-串联质谱方法相比(0.003~0.06 $\mu\text{g/mL}$)^[30,31], 本实验的检出限略低, 但本文方法适用于纳升至微升级小体积样品中多酚的实时快速定量分析, 具备低于ng级的绝对检测量, 对极微量的脑脊液分析体系的检测具有明显优势.

将该方法用于模拟脑脊液基质中多酚的测定, 研究了其准确性与精密度. 聚吡咯对多酚类的特异性富集保障了该方法在实际样品分析中的应用效果. 聚吡咯微探针对多酚的富集率(咖啡酸为89.22%, 表儿茶素为79.96%)远高于脑脊液中高浓度干扰性物质的富集率(葡萄糖为8.24%, 丙氨酸为9.37%, 乳酸为13.47%)(图S5, 见本文支持信息). 聚吡咯对其它干扰物, 如维生素C和苯丙氨酸具有一定的吸附能力, 后续的质谱MRM方法进一步降低了信号干扰, 保障了多酚检测的特异性. 在模拟小鼠脑脊液基质中, 6种多酚在不同加标浓度(2和8 $\mu\text{g/mL}$)下均表现出合格的加标回收率(96.9%~108%)(表1), 表明探针富集可有效降低基质干扰, 该方法可用于实际脑脊液样品的分析. 多次加标回收实验表明, 该方法具有较高的精密度($RSD < 8.8\%$, $n=6$), 为该方法的实际应用奠定了基础.

Table 1 Results of recovery and stability test

Sample	Added/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Found/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Recovery(%)	RSD(%) ($n=6$)
3-Hydroxyphenylacetic acid	2.00	2.17	108	2.2
	8.00	8.34	104	1.5
Homovanillic acid	2.00	2.16	108	0.8
	8.00	7.84	98.0	3.4
Caffeic acid	2.00	1.94	96.9	4.9
	8.00	7.90	98.8	1.5
Ferulic acid	2.00	1.97	98.7	4.5
	8.00	7.97	99.6	5.1
Epicatechin	2.00	2.08	104	4.4
	8.00	7.98	99.8	2.1
Epigallocatechin gallate	2.00	2.16	108	8.8
	8.00	8.05	100	2.5

2.4 咖啡中多酚在脑脊液中的摄入及动态变化研究

多酚是一种脑活性物质, 目前, 哪些多酚能够穿透血脑屏障并作用于脑仍在研究中. 多酚穿越血脑屏障是一个复杂过程, 其穿透能力取决于多酚的结构、极性、分子大小及血脑屏障状态等因素^[32]. 研究发现, 某些分子量小且具有适当亲脂性或特殊功能基团的多酚有可能穿透屏障^[33,34]. 此外, 疾病状态或特定传输机制可能影响多酚的脑内分布^[35], 表明脑脊液中多酚种类及含量的研究十分重要.

基于微萃取结合nESI技术及检测方法, 本文以摄入多酚咖啡的小鼠为模型, 研究了小鼠摄食多酚咖啡后脑脊液中6种多酚的检出情况. 多酚咖啡是指富含多酚类化合物的咖啡. 普通咖啡含有一定量的多酚, 如咖啡酸和阿魏酸等, 这些多酚化合物具有抗氧化、抗炎、抗病毒和潜在的抗癌特性. 多酚咖啡通过特定加工工艺或原料选择, 使其中的多酚含量提高, 从而加强其健康效益. 小鼠摄食多酚咖啡后, 在其脑脊液中检出高香草酸、3-羟基苯乙酸及表儿茶素, 并显示出其在脑脊液中的代谢规律(图5). 高香草酸已被证实可穿透血脑屏障, 是研究中枢神经系统功能和开发相关疾病(如抑郁症)治疗策略的重要物质^[10]. 小鼠在摄食多酚咖啡后, 其脑脊液中的高香草酸在1~6 h内显著升高, 在6 h达到峰值[图5(A)]. 3-羟基苯乙酸作为一种分子量较小且极性较大的多酚化合物, 其能否穿透血脑屏障尚未见报道. 本文在脑脊液中检测到了少量3-羟基苯乙酸[图5(A)], 初步表明其具有穿透血脑屏障进入脑脊液的能力, 其结构中的脂溶性部分可能有助于其穿透血脑屏障. 与高香草酸相比, 3-羟基苯乙

酸穿透血脑屏障能力较弱,在摄食2~6 h后,在脑脊液中保持稳定的低浓度水平.表儿茶素及其衍生物是一类黄烷醇化合物,具有潜在的神经保护作用,研究表明表儿茶素的血脑屏障渗透性较低,这说明其难以穿过血脑屏障进入大脑^[36].本文在小鼠脑脊液中检测出较高浓度的表儿茶素[图5(B)],在摄食1~6 h内其含量显著升高,在6 h达到峰值,这可能与多酚咖啡摄食有关.其与目前研究结果不一致的原因如下:(1)由于表儿茶素具有较小的分子量和良好的脂溶性,可能会通过血脑屏障中的转运机制或多酚咖啡中的特定递送系统进入脑脊液;(2)其它易进入脑脊液的黄烷醇化合物,如表没食子儿茶素等^[36]代谢产生了表儿茶素.上述结果初步证明了新方法在多酚-脑相关作用机理研究中的应用能力.

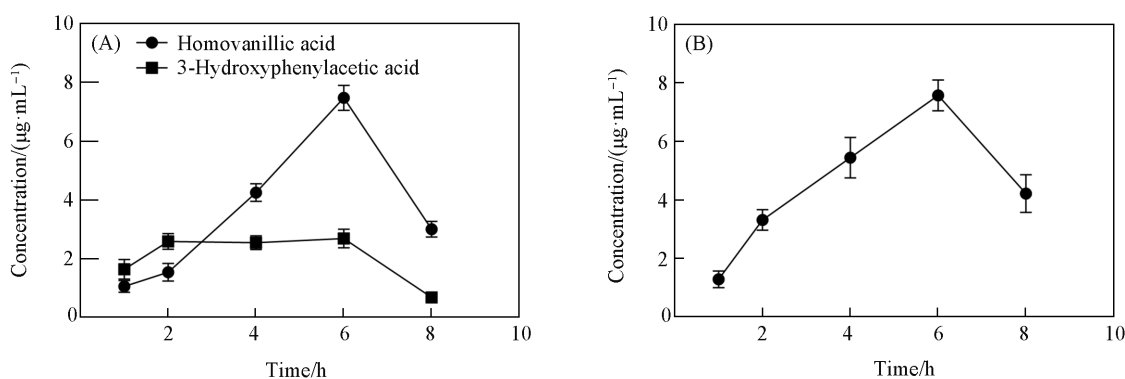


Fig. 5 Variation curves of polyphenol content in mice CSF after ingestion of polyphenol coffee
(A) 3-Hydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid; (B) epicatechin.

3 结 论

针对脑脊液中多酚检测时样本量有限、多酚种类多、多酚稳定性较差和内源性物质干扰等问题,设计并建立了一种表面电沉积聚吡咯的微萃取探针方法,用于纳升小鼠脑脊液中多酚的富集及基质的高效去除,结合纳升电喷雾直接质谱检测手段建立了一种样本消耗少、灵敏度高和操作快速的多酚检测技术.实验结果表明,该方法对500 nL脑脊液中多种多酚(3-羟基苯乙酸、高香草酸、咖啡酸、阿魏酸、表儿茶素和表没食子儿茶素没食子酸酯)具有高灵敏(检出限0.014~0.20 ng)、快速(10 min富集及<1 min检测)、高通量和同时定性定量分析能力.利用该方法初步研究了6种咖啡中的多酚在脑脊液中的动态变化规律,为研究多酚穿过血脑屏障的机理和多酚在脑中的分布与代谢提供了新方法,有利于理解多酚在神经保护和信号传导等方面的作用机理,对评估膳食补充和药物治疗对脑内环境的影响具有潜在应用价值.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240327>.

参 考 文 献

- [1] Tresserra-Rimbau A., *Nutrients*, **2020**, *12*(9), 2893
- [2] Luca S. V., Macovei I., Bujor A., Miron A., Skalicka-Woźniak K., Aprotosoaie A. C., Trifan A., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2020**, *60*(4), 626—659
- [3] Goya L., Román R. S., de Pascual-Teresa S., *Curr. Med. Chem.*, **2022**, *29*(6), 1029—1044
- [4] Caruso G., Godos J., Privitera A., Lanza G., Castellano S., Chillemi A., Bruni O., Ferri R., Caraci F., Grosso G., *Nutrients*, **2022**, *14*(4), 819
- [5] Mitra S., Tareq A. M., Das R., Emran T. B., Nainu F., Chakraborty A. J., Ahmad I., Tallei T. E., Idris A. M., Simal-Gandara J., *Food Rev. Int.*, **2023**, *39*(7), 4419—4441
- [6] Lliczbiński P., Bukowska B., *Ind. Crops Prod.*, **2022**, *175*, 114265
- [7] Kamiloglu S., Ozdal T., Bakir S., Capanoglu E., *Food Chem.*, **2022**, *374*, 131728
- [8] Zhang Y., Lv C., Zhao G., *Food Rev. Int.*, **2022**, *38*(sup1), 812—828
- [9] le Sayec M., Carregosa D., Khalifa K., de Lucia C., Aarsland D., Santos C. N., Rodriguez-Mateos A., *Food Funct.*, **2023**, *14*(19), 8893—8902

- [10] Grabska-Kobylecka I., Kaczmarek-Bak J., Figlus M., Prymont-Przyminska A., Zwolinska A., Sarniak A., Wlodarczyk A., Glabinski A., Nowak D., *Nutrients*, **2020**, *12*(5), 1531
- [11] Santandrea E., Aliakbari F., Truscott E., McCaig L., Donison N. S., Graham D., Strong M. J., Volkening K., *Sci. Rep.*, **2024**, *14*(1), 5171
- [12] Wightman R. M., *ECS Meeting Abstracts*, **2017**, MA2017-02(55), 2302
- [13] Zhou Q., Zhang L. M., Tian Y., *J. Electrochem.*, **2019**, *25*(2), 160—171(周奇, 张立敏, 田阳. 电化学, **2019**, *25*(2), 160—171)
- [14] Stangler L. A., Kouzani A., Bennet K. E., Dumeé L., Berk M., Worrell G. A., Steele S., Burns T. C., Howe C. L., *Fluids Barriers CNS*, **2021**, *18*(1), 52
- [15] Becker S., Schulz A., Kreyer S., Dreßler J., Richter A., Helmschrodt C., *Talanta*, **2023**, *253*, 123965
- [16] Gui Q., Chen B. Y., Liu H. C., Huang N. L., Chen Z. L., Lin S. H., Zhou C. W., *Lab. Anim. Sci.*, **2019**, *36*(4), 68—70(桂青, 陈碧玉, 刘翰琛, 黄念来, 陈贞磊, 林昭华, 周常文. 实验动物科学, **2019**, *36*(4), 68—70)
- [17] Bridel C., Koel-Simmelink M. J. A., Peferoen L., Derada Troletti C., Durieux S., Gorter R., Nutma E., Gami, P., Iacobaeus E., Brundin L., Kuhle J., Vrenken H., Killestein J., Piersma S. R., Pham T. V., de Vries H. E., Amor S., Jimenez C. R., Teunissen C. E., *Neuropath. Appl. Neuro.*, **2018**, *44*(4), 404—416
- [18] Huang G., Li G., Cooks R. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*(42), 9907—9910
- [19] Huang G., Li G., Ducan J., Ouyang Z., Cooks R. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*(11), 2503—2506
- [20] Peng S., Huang X., Huang Y., Huang Y., Zheng J., Zhu F., Xu J., Ouyang G., *J. Sep. Sci.*, **2022**, *45*(1), 282—304
- [21] Queiroz M. E. C., de Souza I. D., de Oliveira I. G., Grecco C. F., *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2022**, *153*, 116656
- [22] Piri-Moghadam H., Ahmadi F., Gómez-Ríos G. A., Boyacı E., Reyes-Garcés N., Aghakhani A., Bojko B., Pawliszyn J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*(26), 7510—7514
- [23] Lim Y. S., Tan Y. P., Lim H. N., Tan W. T., Mahnaz M. A., Talib Z. A., Huang N. M., Kassim A., Yarmo M. A., *J. Appl. Polym. Sci.*, **2013**, *128*(1), 224—229
- [24] Wilm M., Mann M., *Anal. Chem.*, **1996**, *68*(1), 1—8
- [25] Juraschek R., Dülcks T., Karas M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, *10*(4), 300—308
- [26] Wang J., Wu C., Wu P., Li X., Zhang M., Zhu J., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2017**, *19*(31), 21165—21173
- [27] Majumdar S., Nath J., Mahanta D., *J. Environ. Chem. Eng.*, **2018**, *6*(2), 2588—2596
- [28] Wang F., Li S., Feng H., Yang Y., Xiao B., Chen D., *Food Chem.*, **2019**, *275*, 530—538
- [29] Shimadzu, *Ultrafast Liquid Chromatography Analysis of 7 Phenolic Compounds*, **2017**(岛津, 7种酚类化合物的超快速液相色谱分析, **2017**). <https://support.shimadzu.com.cn/node/24507>
- [30] Tao Y., Xu X., Yan J., Cai B., *Biomed. Chromatogr.*, **2019**, *33*(7), e4534
- [31] Wang L., Yan T., Zhang K., Li F., Jia J., Hu G., *Biomed. Chromatogr.*, **2019**, *33*(4), e4470
- [32] Wu X., Zhou Y., Xi Y., Zhou H., Tang Z., Xiong L., Qin D., *Pharmaceuticals*, **2024**, *17*(6), 775
- [33] Liu Y., Yan N., Chen Q., Dong L., Li Y., Weng P., Wu Z., Pan D., Liu L., Farag M. A., Wang L., Liu L., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2023**, doi: 10/1080/10408398.2023.2239350
- [34] Figueira I., Garcia G., Pimpão R. C., Terrasso A. P., Costa I., Almeida A. F., Tavares L., Pais T. F., Pinto P., Ventura M. R., Filipe A., McDougall G. J., Stewart D., Kim K. S., Palmela I., Brites D., Brito M. A., Brito C., Santos C. N., *Sci. Rep.*, **2017**, *7*(1), 11456
- [35] Reddy V. P., Aryal P., Robinson S., Rafiu R., Obrenovich M., Perry G., *Microorganisms*, **2020**, *8*(2), 199
- [36] Shimazu R., Anada M., Miyaguchi A., Nomi Y., Matsumoto H., *J. Agric. Food Chem.*, **2021**, *69*(39), 11676—11686

(Ed.: X, N, K)