

柱前衍生结合 HPLC-FLD 法检测小叶金露梅叶中 三种三萜酸成分

马筱^{1,3}, 曾阳², 王洪伦^{1*}

¹中国科学院藏药研究重点实验室 中国科学院西北高原生物研究所; ²青海师范大学, 西宁 810001;

³中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 本文通过柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法 (HPLC-FLD), 建立了小叶金露梅叶中 3 种三萜酸成分的定量分析方法。实验选择苯并咪唑并[2,1-b]喹唑啉-12(6H)-酮-5-乙基对甲苯磺酸盐 (BQETS) 作为三萜酸的荧光衍生试剂, 采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 × 250 mm, 5 μm), 5% 乙腈 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长为 λ_{ex} = 247 nm, λ_{em} = 401 nm 对三萜酸成分衍生物进行分析。结果显示, 建立的分析方法具有较好的线性 ($r > 0.9975$), 检测限在 0.003 6 ~ 0.015 2 μg/g, 小叶金露梅叶样品中蔷薇酸和坡模酸的含量分别为 2.28 mg/g 和 1.12 mg/g。该方法简便、可靠、灵敏, 可成功应用于植物样品中三萜酸含量的分析。

关键词: 小叶金露梅; 三萜酸; 柱前衍生; 高效液相色谱-荧光检测

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019) Suppl-0059-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.S.011

Pre-column derivatization combined with HPLC-FLD method for detection of three triterpenoids in *Potentilla parvifolia*

MA Xiao^{1,3}, ZENG Yang², WANG Hong-lun^{1*}

¹Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences;

²Qinghai Normal University, Xining 810001, China;

³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: *Potentilla parvifolia*, a kind of medicinal plant, was widely distributed in various regions of China with great potential for development and utilization. In this study, a pre-column derivatization high performance liquid chromatography-fluorescence detection method (HPLC-FLD) was developed for the quantitative analysis of three triterpenic acids in the leaves of *Potentilla parvifolia* with an fluorescence derivatization reagent of benzimidazo [2,1-b] quinazolin-12(6H)-one-5-ethyl-p-toluenesulfonate (BQETS). In experiment, an Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was composed of 5% acetonitrile (A)-acetonitrile (B), the flow rate was maintained at 1.0 mL/min, the column temperature was set at 30 °C, the injection volume was 10 μL, and the detection wavelength was λ_{ex} = 247 nm and λ_{em} = 401 nm. The experimental results showed that the proposed analytical method had good linearity ($r > 0.9975$), and the limits of detection were 0.003 6 ~ 0.015 2 μg/g. The contents of Rosolic Acid and Pomolic Acid in the leaves of *Potentilla parvifolia* were 2.28 mg/g and 1.12 mg/g, respectively. Due to its simple, reliable and sensitive, the method might be successfully applied to the quantitative analysis of triterpenic acid content in plant samples.

Key words: *Potentilla parvifolia*; triterpenic acid; pre-column derivatization; HPLC-FLD

小叶金露梅 (*Potentilla parvifolia* Fisch.) 是蔷薇科委陵菜属一种常见的落叶灌木, 分布于黑龙江、内

蒙古、甘肃、青海、四川、西藏等地。小叶金露梅是一种传统的藏药——班玛, 主要以叶和花入药, 藏药典籍《晶珠本草》记载班玛主治消化不良和肺病^[1,2]。现代医药研究表明, 小叶金露梅具有清暑热、益脑清心、调经、健胃、固齿、治疗妇女病等多方面的功

收稿日期: 2019-03-15 接受日期: 2019-04-10

基金项目: 青海省科技厅科技成果转化专项 (2018-SF-144)

* 通信作者 E-mail: hlwang@nwipb.cas.cn

效^[3]。据文献报道^[4,5],从小叶金露梅中分离得到的天然产物主要包括黄酮类、三萜类和鞣质类等。其中三萜酸类是一种具有较高药用价值的天然产物,它的生物活性主要包括抗氧化、抗炎、抗病毒、降血糖等^[6-10]。因此,小叶金露梅中三萜酸含量的检测对小叶金露梅的进一步开发利用具有重要意义。

三萜酸类化合物本身没有共轭体系,紫外吸收较低,自身更没有荧光特性,其含量的检测方法主要有比色法、分光光度法、高效液相色谱法和气相色谱法等^[6]。但是,比色法和分光光度法的灵敏度有限且实验中影响因素较多^[11,12];气相色谱法衍生反应繁琐,耗时长,而且仪器设备昂贵^[13]。高效液相色谱直接检测方法的灵敏性有限,易受样品复杂程度的干扰^[14]。因此,本实验采用苯并咪唑并[2,1-b]喹唑啉-12(6H)-酮-5-乙基对甲苯磺酸盐(BQETS)作为衍生试剂,建立了植物中三萜酸含量的高灵敏度柱前衍生高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FLD)的分析方法,实现了对小叶金露梅中三萜酸含量的快速检测。本方法具有快速、简便、灵敏度高等特点。

1 实验材料

1.1 仪器

Agilent 系列 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);Agilent FLD 检测器(G 1321A 型,美国安捷伦公司)。

1.2 试剂

苯并咪唑并[2,1-b]喹唑啉-12(6H)-酮-5-乙基对甲苯磺酸盐(BQETS,参照文献合成^[15],由曲阜师范大学化学与化工学院生命有机分析实验室尤进茂教授提供);3种三萜酸标准品(Sigma);小叶金露梅叶于2018年8月采于青海省海北州门源县;水为超纯水;乙腈为色谱纯;实验中使用的其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 制备溶液

2.1.1 衍生试剂溶液的制备

称取 22.9 mg BQETS 溶解在 10 mL 无水二甲基甲酰胺(DMF)中,得到浓度为 5.29×10^{-3} mol/L 的 BQETS 溶液,4 °C 冰箱保存备用。

2.1.2 标准品溶液的制备

取 3 种三萜酸标准品分别用二甲基亚砷(DMSO)配成 100 mmol/L 的标准储备溶液,不同浓度的三萜酸的工作溶液均由色谱纯乙腈稀释其标准储备

溶液而得。将各标准品储备液混合后得到 3 种三萜酸混合标准品溶液,并用色谱纯乙腈稀释至所需浓度。所有溶液均储存在 4 °C 冰箱备用。

2.1.3 样品溶液的制备

将小叶金露梅叶子干燥粉碎后过 40 目筛,取 50 mg 样品置于小烧杯中,加入 5 mL 乙酸乙酯,超声提取 2 次,每次 30 min,室温 2 000 rpm 离心 5 min,合并提取液,氮气流吹干,用乙腈定容至 1 mL,得到小叶金露梅样品溶液,4 °C 冰箱中储存备用。

2.2 衍生反应

三萜酸与 BQETS 的衍生反应如图 1 所示。依次向 2 mL 安剖瓶中加入 10 mg K₂CO₃、200 μL BQETS 溶液、150 μL DMF、50 μL 混合标准品溶液或者小叶金露梅样品溶液,封口,在 90 °C 水浴中反应 20 min。冷却至室温后,用 0.22 μm 的过滤膜进行过滤,取 10 μL 反应溶液进行 HPLC-FLD 分析。

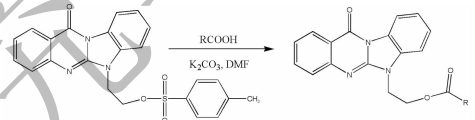


图 1 BQETS 与三萜酸的衍生过程

Fig. 1 Derivation of BQETS and triterpene acid

2.3 色谱条件

采用 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),5% 乙腈(A)-乙腈(B)为流动相,洗脱梯度:0 ~ 15 min 30% B,15 ~ 25 min 100% B,流速 1.0 mL/min,进样量 10 μL,柱温 30 °C,检测波长为 $\lambda_{ex} = 247$ nm, $\lambda_{em} = 401$ nm。空白溶液、混合标准品溶液和样品溶液的色谱图如图 2 所示。

2.4 实验方法验证

实验中通过对线性、检测限(limit of detections, LOD_s)、定量限(limit of quantifications, LOQ_s)、精密度及回收率等一系列实验的考察,对实验方法进行了评价。

2.4.1 线性关系、LOD_s 和 LOQ_s

取混合标准品溶液用乙腈逐级稀释,得到 0.026、0.052、0.104、0.416、0.832、3.33 mmol/L 系列浓度的标准品溶液,进行线性关系的考察。以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线,如表 1 所示,3 种三萜酸的线性关系较好,线性相关系数均大于 0.997 5。以 S/N = 3 确定 LOD_s,S/N = 10 确定 LOQ_s,计算得到 LOD_s 在 0.003 6 ~ 0.015 2 μg/g 范围内,LOQ_s 在 0.012 ~ 0.050 7 μg/g 范围内。

2.4.2 方法重现性

实验中取3种标准品溶液各3份,按“2.2”的步骤进行衍生处理,按“2.3”的色谱条件进行分析,测得保留时间和峰面积值,分别计算相对标准偏差

(RSD%)。结果显示,保留时间的RSD为0.1%~0.4%,峰面积的RSD为0.25%~0.3%,表明方法重现性良好。

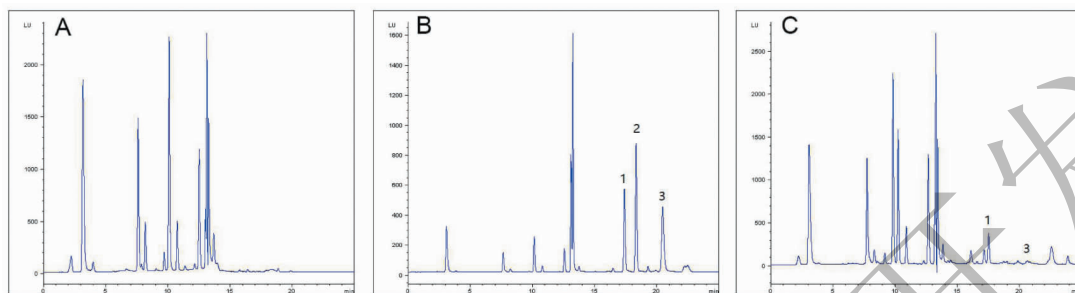


图2 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram

注:A. 空白溶液;B. 混合标准品溶液;C. 样品溶液。

Note: A. Blank solution; B. Mixed standard solution; C. Sample solution.

表1 三萜酸衍生物的线性方程、线性相关系数、检测限、定量限和方法重现性

Table 1 Linear equation, linear correlation coefficient, detection limit, limit of quantitation and method reproducibility of triterpenic acid derivatives

编号 No.	分析物 Analyte	线性方程 Linear equation		LOD _s (μg/g)	LOQ _s (μg/g)	重现性 Reproducibility (RSD%) (n=3)	
		$Y = AX + B$	r			保留时间 Retention time	色谱峰面积 Peak area
1	蔷薇酸 Rosolic acid	$Y = 30.038X - 2.360.4$	0.997 5	0.004 5	0.015	0.1	0.3
2	3β-羟基-30-降羽扇豆烷-20-酮-28-酸 Platanic acid	$Y = 13.755X + 648.4$	0.998 7	0.015 2	0.050 7	0.3	0.3
3	坡模酸 Pomolic acid	$Y = 34.204X - 2.346.0$	0.998 2	0.003 6	0.012	0.4	0.25

2.4.3 回收率和精密度

实验中用BQETS分别衍生处理混合标准品溶液,添加3种标准品的小叶金露梅样品溶液和小叶金露梅样品溶液,进样检测后将其峰面积的测定值分别定义为 C_{spike} 、 $C_{\text{post-spike}}$ 、 $C_{\text{endogenous}}$,回收率通过公式:回收率(%) = $(C_{\text{post-spike}} - C_{\text{endogenous}}) \times C_{\text{spike}} \times 100$

求得。结果如表2所示,各三萜酸衍生物的回收率在92.7%~98.2%之间。同时,一天内进行三次平行混合标准品的检测得到日内RSD_s,连续三天对混合标准品进行检测得到日间RSD_s。结果如表2所示,日内与日间RSD_s分别在2.9%~3.5%与5.5%~5.7%之间,表明方法精密度良好。

表2 三萜酸衍生方法回收率和精密度

Table 2 Triterpenic acid derivatization method recovery and precision

编号 No.	分析物 Analyte	回收率 Recovery (%)	精密度 Precision (RSD%)	
			日内 Intra-day	日间 Inter-day
1	蔷薇酸 Rosolic acid	98.2	3.5	5.7
2	3β-羟基-30-降羽扇豆烷-20-酮-28-酸 Platanic acid	92.7	2.9	5.5
3	坡模酸 Pomolic acid	97.8	3.3	5.6

2.5 样品含量测定

按“2.2”的步骤制备衍生后的样品溶液,并按“2.3”的方法进行检测,计算出样品溶液中三萜酸的含量。如图2、表3所示,在上述实验条件下,3种

三萜酸标准品被成功检出,且达到基线分离,测得小叶金露梅叶中蔷薇酸和坡模酸含量分别为2.28 mg/g和1.12 mg/g,而3 β 羟基-30-降羽扇豆烷-20-酮-28-酸未被检出。

表3 小叶金露梅中3种三萜酸类化合物的含量(mg/g, n=3)

Table 3 Contents of three triterpenoids in *Potentilla parvifolia* Fisch(mg/g, n=3)

样品 Sample	蔷薇酸 Rosolic acid	3 β 羟基-30-降羽扇豆 烷-20-酮-28-酸 Platanic acid	坡模酸 Pomolic acid
小叶金露梅 <i>Potentilla parvifolia</i>	2.28 \pm 0.11	ND*	1.12 \pm 0.13

注: * 未检出。

Note: * not detected.

3 讨论

小叶金露梅作为我国传统中药,资源丰富,药用历史悠久。但查阅文献发现,目前对小叶金露梅的研究报道较少,尚未见对其中三萜酸含量的研究报道。检测三萜酸含量常用的HPLC法的分析波长为210 nm,接近紫外吸收边缘,易造成较大误差^[16];质谱(MS)技术虽然可以准确定量分析,但是操作方法要求高以及设备普及程度低,不利于三萜酸类化合物的常规快速分析^[16-18]。三萜酸类化合物本身不具备荧光基团,可通过在三萜酸的羧基上引入荧光基团有效提高HPLC的灵敏度。本实验采用BQETS作为荧光衍生试剂,提高了植物中三萜酸类成分分析的灵敏度。方法学考察表明,本方法比上述方法灵敏度高(LOD_s < 0.004 5 μ g/g)、重现性好(RSD < 0.4%),并且操作简便,衍生时间短,易于推广使用。应用此方法成功测定了小叶金露梅叶中三萜酸的含量,为小叶金露梅的进一步开发研究提供了一定的参考。

致谢:感谢曲阜师范大学尤进茂教授课题组提供实验中所用衍生试剂BQETS。

参考文献

- Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Qinghai Flora (青海植物志) [M]. Qinghai People's Publishing House, 1987, 160.
- Yang YC. Tibetan medicine (藏药志) [M]. Qinghai People's Publishing House, 1991.
- Sun YX, Zeng Y, Zhang QR, et al. Inhibition of *Potentilla parvifolia* on alpha-glucosidase and aldose reductase [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2016, 7: 586-589.
- Murata T, Selenge E, Sugauma K, et al. Chromone acyl glucosides and an ayanin glucoside from *Dasiphora parvifolia*

- [J]. Phytochem Lett, 2013, 6: 552-555.
- Yuan ZZ, Suo YR, Hao XY, et al. Triterpenic acids from *Potentilla parvifolia* and their protective effects against okadaic acid induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y cells [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41: 885-890.
- Li FX, Sun DD, Yan XS. Research progress on triterpenic acid components in traditional Chinese medicine [J]. Chin Med Guide (中国医药指南), 2016, 14(34): 22-23.
- De Tommasi N, De Simone F, Pizza C, et al. Constituents of *Eriobotrya japonica*. A study of their antiviral properties [J]. J Nat Prod, 1992, 55: 1067-1073.
- Banno N, Akihisa T, Tokuda H, et al. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica* [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28: 1995-1999.
- Lü H, Chen J, Li WL, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the total triterpene acid fraction from *Folium Eriobotryae* [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 122: 486-491.
- Huang Y, Li J, Cao Q, et al. Anti-oxidative effect of triterpene acids of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf in chronic bronchitis rats [J]. Life Sci, 2006, 78: 2749-2757.
- Zhang T, Bi XP, Kong JN, et al. Content determination of total triterpenic acid in *Crataegi Fructus* concentrated pills by UV [J]. China Pharm (中国药房), 2012, 23: 3721-3723.
- Ren L, Feng HY, Yang XH, et al. Determination of the content of triterpenoidic acid in *Kaki Calyx* [J]. J Shijiazhuang Univ (石家庄学院学报), 2014, 16(6): 28-30.
- Yang M, Kuang ZP, Fang WT, et al. Effects of sample pre-treatment methods on detection of fatty acids in fruit drugs of Rosaceae by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Anhui Univ Chin Med (安徽中医药大学学报), 2018, 37(5): 78-82.
- Chen H, Lin FF. Comparative study on the content of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese trumpet vine from different habitats [J]. J New Chin Med (新中医), 2019, 51(2): 1-3.