

柱前衍生高效液相色谱 – 荧光检测 / 质谱联用测定青藏高原产沙棘果实中的 5 种三萜酸成分

周武^{1,2,3}, 胡娜¹, 王煜伟^{1,3}, 王洪伦¹, 白波¹, 索有瑞^{1,2*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 中国科学院藏药研究重点实验室 & 青海省藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810008; 2. 青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 目的 采用柱前衍生高效液相色谱 – 荧光检测 / 质谱联用 (HPLC – FLD – APCI/MS) 分析青藏高原沙棘果实中的三萜酸。方法 选择 2 – (7H – 二苯并 [a, g] 咪唑) 乙基对甲苯磺酸酯作为 HPLC 柱前荧光衍生标记试剂, 采用 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为 5% 乙腈 (A) – 乙腈 (B), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 检测波长为 λ_{ex} = 300 nm, λ_{em} = 395 nm。结果 5 种三萜酸衍生物均具有较好的线性、精密度、回收率和较低检测限, 其 r 均大于 0.9994, 检测限为 1.21 ~ 1.54 ng · mL⁻¹。结论 青藏高原产沙棘果实中富含三萜酸, 尤其是熊果酸和齐墩果酸, 还含有少量的桦木酸; 不同产地沙棘果实中所含三萜酸的种类相同, 但含量存在一定的差异。

关键词: 沙棘; 果实; 青藏高原; 三萜酸; 高效液相色谱; 荧光检测; 柱前衍生; 质谱

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 – 0103 (2018) 05 – 0535 – 04

DOI: 10.13375/j.cnki.wjps.2018.05.020

Determination of five kinds of triterpene acid in the fruits of seabuckthorn in Qinghai – Tibet plateau by HPLC – FLD – APCI/MS

ZHOU Wu^{1,2,3}, HU Na¹, WANG Yuwei^{1,3}, WANG Honglun¹, BAI Bo¹, SUO Yourui^{1,2*}

(1. Qinghai Provincial Key Laboratory of Tibetan Medicine Research & Key Laboratory of Tibetan Medicine Research, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810008 P. R. China; 2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016 P. R. China; 3. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100490 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To analyze the triterpene acids in the fruits of seabuckthorn in Qinghai – Tibet plateau by HPLC – FLD – APCI/MS. **METHOD** 2 – (7H – dibenzo [a, g] carbazol – 7 – yl) ethyl – 4 – methylbenzenesulfonate was used as the pre – column derivatization labeling reagent. Hypersil BDS C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm 5 μm) was used with the mobile phase of 5% acetonitrile (A) and acetonitrile (B) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 35 °C and the injected volume was 10 μL. The detection wavelength was set to λ_{ex} 300 nm and λ_{em} 395 nm, respectively. **RESULT** The results showed that five triterpene acid derivatives all had good linearity, precision, excellent accuracy and low limits of detection. The linear correlation coefficients were all greater than 0.9994, and the LODs were between 1.21 – 1.54 ng · mL⁻¹. **CONCLUSION** The fruits of seabuckthorn in Qinghai – Tibet plateau is rich in triterpene acids, especially for oleanolic and ursolic acids. In addition, there exists a trace amount of betulinic acid. The kinds of triterpene acids are the same in seabuckthorn fruits from different origins, however, the contents of triterpene acids varies across origins.

Key words: Seabuckthorn; Fruit; Qinghai – Tibet plateau; Triterpene acids; HPLC; Fluorescence detection; Pre – column labelling; MS

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 – 0103 (2018) 05 – 0535 – 04

胡颓子科沙棘属植物沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. 为一种多刺固氮落叶灌木植物, 分布于亚洲和欧洲地区^[1], 在中国主要分布在青藏高原地区。沙棘是一种药食同源植物, 不仅能够抵抗干旱、寒冷、固

土、保护农庄, 还具有显著的药用及营养价值^[2-3]。在西藏、蒙古和中亚地区, 几乎沙棘的所有部位包含叶子、花、种子、果实等均被广泛入药。沙棘中含有多种生物活性物质, 如黄酮、脂肪酸、胡萝卜素、植物

基金项目: 青海省科技厅项目 (2015 – NK – 509; 2017 – SF – A8; 2017 – ZJ – Y11); 中国科学院西部之光青年学者 B 类项目 (2016)

作者简介: 周武 (1987 –) 男, 博士, 从事青藏高原特色生物资源的研究与开发工作。Email: zhouwu870624@163.com

甾醇、酚酸、氨基酸、有机酸等^[4],具有抗动脉粥样硬化、抗菌、抗氧化、抗肿瘤、保肝、免疫调节、组织修复等作用^[5]。三萜酸广泛存在于药用植物中,并具有多种生物活性,如抗 HIV、抗肿瘤、降血脂、抗氧化和抗菌等^[6-7]。沙棘分布在青藏高原不同地区,由于气候和地理条件的不同,药材中化学成分的含量差异较大,目前未见不同地区沙棘中三萜酸的研究报道。现采用柱前衍生高效液相色谱-荧光检测/质谱联用(HPLC-FLD-APCI/MS)法对青藏高原不同产地沙棘中的三萜酸含量进行了分析,可为其质量研究及应用提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1100 型离子阱液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent)。2-(7H-二苯并[a,g]呋唑)乙基对甲苯磺酸酯(DBCETS,自制,参照文献合成^[8]);5种三萜酸对照品(美国 Sigma);沙棘果实采集于青海省的4个地区(表1),经鉴定为沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. 的果实,果实自然干燥并分为种子和果皮、果肉两部分,果皮、果肉被粉碎并过 60 目筛;乙腈为色谱纯;水为纯净水;其余试剂为分析纯。

表1 沙棘样品的信息

Table 1 Information of seabuckthorn samples

采集地	海拔/km	经度	纬度
大通	2.895	101°42.544	37°01.381'
互助	3.029	102°06.089'	36°47.358'
平安	2.772	101°57.723'	36°28.872'
湟中	2.792	101°21.098'	36°35.367'

1.2 方法与结果

1.2.1 溶液的制备 取5种三萜酸对照品,分别用乙腈配制成 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液后,取适量混合,得混合对照品贮备液,使用时用乙腈稀释至 $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot$

mL^{-1} ,得混合对照品溶液。称取 58.125 mg DBCETS 置 25 mL 量瓶中,加入 25 mL 乙腈定容,得 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 衍生试剂溶液,于 $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。取 50 mg 沙棘样品置 10 mL 玻璃刻度试管中,加入 5 mL 乙醇,水浴中超声提取 30 min 后,取上清液,再加入 2 mL 乙醇第 2 次提取残渣,合并提取液并浓缩,氮气流下吹干,用乙腈复溶,得沙棘供试品溶液。

1.2.2 柱前衍生化反应 向 2 mL 安瓿瓶中加入 15 mg K_2CO_3 、50 μL 混合对照品或沙棘样品溶液,120 μL 二甲基甲酰胺(DMF)、150 μL 衍生试剂,封口后于 $90 \text{ } ^\circ\text{C}$ 水浴中反应 30 min,取出,冷却至室温,加入 200 μL 乙腈稀释,过 0.22 μm 尼龙膜,取 10 μL 样品溶液进行液相色谱-质谱联用分析。衍生试剂与三萜酸的反应示意图见图 1。

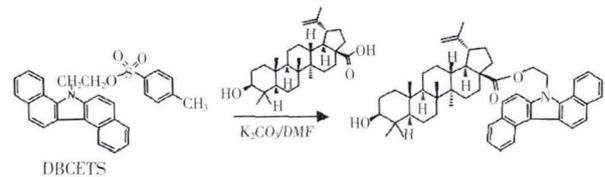


图1 DBCETS 与三萜酸的衍生化反应

Figure 1 Derivatization scheme of DBCETS with fatty acid

1.2.3 色谱条件 采用 Hypersil C_{18} 色谱柱(200 mm \times 4.6 mm 5 μm) 流动相为 5% 乙腈(A)-乙腈(B) 梯度洗脱(0~15 min、60%~75% B,15~30 min、75%~90% B,30~35 min、90%~100% B,35~41 min、100% B) 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 柱温 $35 \text{ } ^\circ\text{C}$ 检测波长分别为荧光激发 $\lambda_{\text{ex}} 300 \text{ nm}$ 、发射波长 $\lambda_{\text{em}} 395 \text{ nm}$ 进样量 10 μL 。在上述色谱条件下,空白溶剂、混合对照品溶液和供试品溶液的色谱图见图 2。质谱采用离子化电喷雾电离源(ESI),正离子模式,喷雾压力 60 psi,干燥气流量为 $9 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,干燥气温度 $350 \text{ } ^\circ\text{C}$, V_{ap} 温度 $450 \text{ } ^\circ\text{C}$ 毛细管电压 $3.5 \times 10^3 \text{ V}$ 。

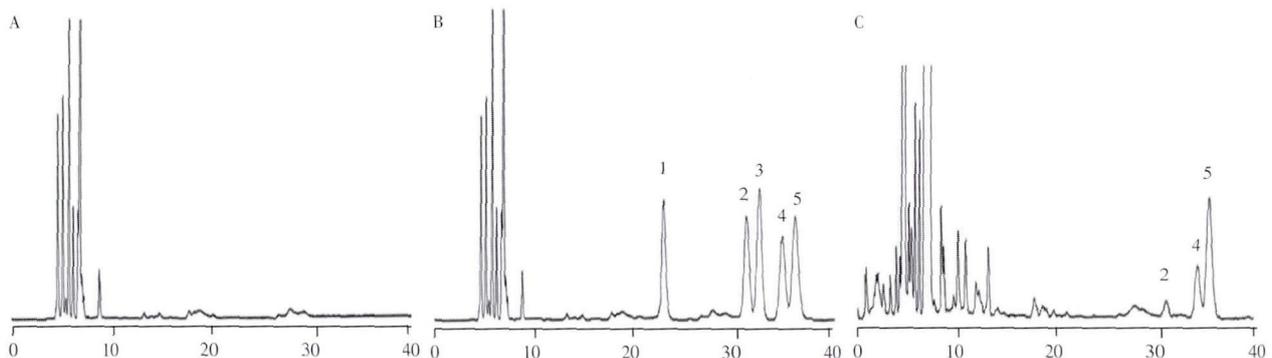


图2 空白溶剂(A)、混合对照品溶液(B)和供试品溶液(C)的色谱图

Figure 2 Chromatograms of the blank solvent(A), mixed control solution(B) and sample solution(C)

在此质谱条件下,沙棘果实中5种三萜酸衍生物分子离子峰见表2,代表性的三萜酸衍生物(DBCETS-齐墩果酸)的一、二级质谱图及相关裂解模式见图3。

表2 三萜酸衍生物的质谱数据、线性方程、相关系数、线性范围、检测限、定量限、回收率和精密度

Table 2 MS data, linear equation, correlation coefficient, limit of detection, limit of quantification, precision, and recoveries of triterpene acid derivatives

No.	三萜酸	[M + H] ⁺	线性方程	r	LODs/ng·mL ⁻¹	LOQs/ng·mL ⁻¹	回收率/%	RSD/%
1	科罗素酸	763.8	Y = 24.48X - 0.86	0.9996	1.28	4.42	97.20	3.46
2	桦木酸	747.8	Y = 30.21X + 1.52	0.9994	1.32	4.55	98.60	3.12
3	路路通酸	745.4	Y = 27.46X + 0.96	0.9997	1.54	5.53	91.50	4.36
4	齐墩果酸	747.8	Y = 26.31X + 3.26	0.9995	1.24	4.39	102.70	2.48
5	熊果酸	747.8	Y = 31.25X + 1.93	0.9998	1.21	4.36	96.90	1.78

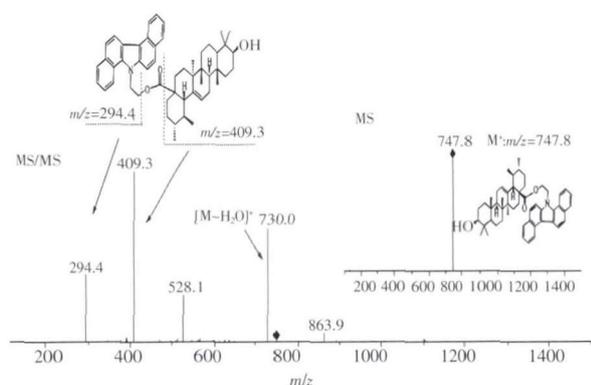


图3 齐墩果酸衍生物的MS/MS图谱及其裂解模式
Figure 3 MS spectra of the representative oleanolic acid derivative

1.2.4 线性关系、检测限、定量限、精密度与加样回收率的考察 取“1.2.1”项下的混合对照品贮备液,用乙腈逐级稀释,得0.025、0.1、0.4、1.6、6.4 μg·mL⁻¹系列浓度对照品溶液,取上述溶液分别进样,记录色谱图。以峰面积为纵坐标、进样量为横坐标进行线性回归,得线性方程(表2)。逐级稀释混合对照品贮备液,分别进样,以S/N = 3来确定检测限, S/N = 10来确定定量限。计算得各三萜酸衍生物的检测限、定量限分别为1.21 ~ 1.54 ng·mL⁻¹、4.36 ~ 5.53 ng·mL⁻¹。加入8 μg·mL⁻¹的对照品溶

表3 不同产地沙棘中三萜酸的含量(μg·mL⁻¹ n = 3)

Table 3 Content of triterpene acid in Seabuckthorn samples from different origins(μg·mL⁻¹ n = 3)

采集地	科罗素酸	桦木酸	路路通酸	齐墩果酸	熊果酸	总三萜酸
大通	-	5.236 ± 0.120	-	42.567 ± 5.260	39.268 ± 4.860	87.071
互助	-	3.968 ± 0.090	-	33.658 ± 4.620	36.897 ± 3.950	74.523
平安	-	4.589 ± 0.140	-	27.698 ± 2.560	32.589 ± 4.230	64.876
湟中	-	6.358 ± 0.170	-	45.327 ± 4.220	52.369 ± 6.210	104.054

“-”表示未检出

2 讨论

三萜酸类化合物本身并无共轭体系,紫外吸收较低,采用一般的分光光度法很难准确地测定其含量。此外,多数三萜酸如熊果酸、齐墩果酸、桦木酸

液至样品中,测定方法的精密度,实验重复3次,记录色谱图,计算得各三萜酸衍生物峰面积的RSD为1.78% - 4.36%。配制4、8、12 μg·mL⁻¹对照品溶液,加入沙棘样品中,按“1.2.1”项方法制备样品溶液,并按“1.2.2”项方法进行衍生化处理,分别进样测定,每个样品重复3次,记录色谱图。计算得加样回收率为91.5% ~ 102.7%。

1.2.5 样品的含量测定 取4个产地的沙棘样品,按“1.2.1”“1.2.2”项方法制备衍生化后的供试品溶液,并按“1.2.3”项所方法进样检测,计算沙棘中三萜酸的含量(表3)。由图2、表3可见:沙棘中含有的三萜酸主要为齐墩果酸、熊果酸和桦木酸,而科罗素酸和路路通酸在试验条件下则未被检出。沙棘中的三萜酸主要以熊果酸和齐墩果酸为主,还含有少量桦木酸。大通、互助、平安、湟中产沙棘样品中总三萜酸的含量分别为87.071、74.523、64.876、104.054 μg·g⁻¹。4个产地中,湟中产的沙棘样品中三萜酸的含量最高,大通产的次之,互助和平安产的含量相对较低,尤以平安产的含量最低。可见不同产地沙棘果实中所含三萜酸的种类相同,但含量存在一定的差异。

等为同分异构体,采用一般的色谱方法很难实现该类化合物的快速分离。而气相色谱法分析三萜酸也存在如衍生反应繁琐且时间较长、极性化合物的挥发性低、分析准确性低等缺点。柱前衍生荧光标记技术可以在很大程度上提高三萜酸分析的选择性和

灵敏度。文中采用了柱前衍生 HPLC 荧光检测及在线质谱鉴定的方法对沙棘中的三萜酸成分进行了分析。文中选择的 5 种三萜酸类成分中,熊果酸和齐墩果酸为同分异构体,这两种酸在普通的色谱柱上经常会被共洗脱出来,增加了分离的难度。曾分别考察了 Hypersil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Hypersil BDS C₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Hypersil BDS C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Spherisorb C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 等色谱柱的分离效果,结果显示: Hypersil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱的分离度最好。甲醇作流动相时的柱压较高,基线偏移较大,因此采用乙腈作流动相。经过多次试验,最终采用文中的流动相系统。在提取沙棘三萜酸的过程中,有些内源性物质会同待测物一起被提取出来。因此,不仅需要从保留时间的角度来确定三萜酸的衍生物,还需通过质谱对其进行了进一步确认。文中测定结果可为沙棘的药理应用及质量标准研究提供参考。

参考文献:

- [1] 刘振山,史文彬. 沙棘[J]. 生物学通报, 1995, 30(6): 48.
- [2] 于德德,廉永善. 中国沙棘属植物的起源、分类、群落和资源[J]. 沙棘, 1993, 6(1): 19-24.
- [3] 刘震. 中国水土保持生态建设模式[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [4] 李晓花,孔令学,刘洪章. 沙棘有效成分研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(2): 162-167.
- [5] 顾清萍. 沙棘药用价值的开发和利用[J]. 国际沙棘研究与开发, 2003, 1(2): 28-31.
- [6] Baglin I, Nour M, Tan K, et al. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents[J]. Mini Rev Med Chem, 2003, 3: 525-539.
- [7] Allouche Y, Beltrán G, Gaforio JJ, et al. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclotriterpenediols and acids[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48: 2885-2890.
- [8] 李国梁. 几种獐牙菜属植物主要化学成分的分离与分析[D]. 中国科学院硕士学位论文, 2012.

收稿日期: 2018-01-20

基于 K₂Cr₂O₇ 选择性氧化自动电位滴定法测定过氧化氢酶的活性

董娜,戴兴德,张爱菊,白莹,张小林*

(甘肃医学院,甘肃平凉 744000)

摘要: 目的 采用自动电位滴定法测定过氧化氢酶(CAT)的活性。方法 采用 K₂Cr₂O₇ 滴定酶促反应前、后剩余的 Fe²⁺, 从而求得 CAT 的活度。结果 CAT 加入前、后的 ΔV 决定 CAT 的活度,且活度测定不受 Fe²⁺、H₂O₂ 浓度准确性的影响;硫酸的加入既终结了酶促反应,又有利于后续的 H₂O₂ 氧化和 K₂Cr₂O₇ 滴定;0~3 g·L⁻¹ CAT 与滴定体积具有良好的线性关系,标准曲线为: Y=0.8840X+13.42 (r=0.9982)。结论 酶样品分析的 RSD=3.98%,测定结果与碘量法的基本一致。

关键词: 过氧化氢酶;过氧化氢;重铬酸钾;自动电位滴定法;活度;酶促反应;碘量法

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2018)05-0538-03

DOI: 10.13375/j.cnki.wcjs.2018.05.021

Determination of the activity of catalase by Automatic potentiometric titration based on K₂Cr₂O₇ selective oxidation

DONG Na, DAI Xingde, ZHANG Aijü, BAI Ying, ZHANG Xiaolin*

(Gansu Medical College Pingliang, Gansu, 744000 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To determine the activity of catalase (CAT) by Automatic potentiometric titration. **METHOD** The

基金项目: 甘肃省高等学校科研项目(2018A-145)

作者简介: 董娜(1981—),女,博士,从事仪器分析的教学与科研工作。Email: dongna886@163.com

* 通信作者(Correspondent author), Email: zxlplyz2005@126.com