

# 高效液相色谱-质谱法测定亚贡叶中亚贡二萜酸 A 和 C 的含量

吴 振<sup>1,2\*</sup>, 陈 超<sup>2</sup>, 谢宝英<sup>2</sup>, 邱鹰昆<sup>2</sup>, 窦德强<sup>3</sup>, 董 锋<sup>4</sup>

(1. 厦门大学 化学化工学院, 化学生物学福建省重点实验室, 2. 厦门大学医学院, 福建 厦门 361005;

3. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 4. 珍奥集团股份有限公司, 辽宁 大连 116600)

**摘要:** 建立了同时测定亚贡 (*Smallanthus sonchifolius*) 叶中亚贡二萜酸 A 和 C 含量的方法. 采用高效液相色谱-质谱法, 多反应监测 (MRM) 模式, 大黄素为内标, 色谱柱: Ultimate™ XB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: V(甲醇): V(0.5% 醋酸水溶液) = 90:10; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C. 亚贡二萜酸 A 和 C 的线性范围均为 0.2~10.0 μg/mL ( $r \geq 0.999$ ), 平均加样回收率 ( $n=6$ ) 分别为 96.6% 和 92.4%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.9% 和 3.2%. 实验数据表明, 该方法操作简单、准确, 且重复性好, 可用于亚贡叶的质量控制.

**关键词:** 高效液相色谱-质谱法; 亚贡二萜酸 A; 亚贡二萜酸 C; 亚贡叶; 定量分析

中图分类号: R 284.2; R 931.6

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)01-0072-05

亚贡 (*Smallanthus sonchifolius*), 原名 *Polymnia sonchifolia*, 为菊科 (Compositae)、*Smallanthus* 属植物<sup>[1]</sup>. 亚贡原产于南美的安第斯地区, 从厄瓜多尔到西北的阿根廷均有分布, 现在台湾、云南、海南、湖南、辽宁等省市已引种成功. 亚贡根茎味甜, 可以作为水果生吃, 又称菊薯、雅龙果, 台湾称高山雪莲果, 含有大量多酚、果寡糖和纤维素类成分, 民间发现其具有抗氧化防衰老, 促进肠蠕动, 防止便秘等功能<sup>[2]</sup>. 亚贡叶可加工成茶饮用, 有降低高血压、抗糖尿病的功效. 另外, 它对消化道及循环系统疾病, 以及结肠癌都有一定的治疗作用<sup>[3]</sup>.

亚贡二萜酸 A 和 C 是亚贡中的主要成分<sup>[4]</sup>. 亚贡叶中还含有咖啡酸、绿原酸、异鼠李黄素、对映-贝壳杉烷-16β, 17-二醇-19-酸、3', 4', 5-三羟基-3, 7-二甲氧基黄酮等成分<sup>[5]</sup>. 亚贡叶提取物对四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的升高有一定的缓解作用, 亚贡二萜酸具有较强的抑制 α-葡萄糖苷酶的活性, 其活性强度与阳性药拜唐苹相近<sup>[6]</sup>, 是亚贡叶抗糖尿病的主要有效成分之一, 具有很好的开发潜力. 亚贡的质量控制方法通常采用总黄酮和总酚酸测定方法<sup>[7-9]</sup>, 该方法对亚贡二萜酸等主要成分分析检测有较大缺陷. 我们前期研究采用高

效液相色谱法紫外检测器分析亚贡二萜酸等成分的含量, 但该方法仍存在样品分析周期长, 需要梯度洗脱, 重现性较差等缺点, 通常一次分析时间大于 50 min, 并且, 由于不同产地成分有所不同, 一些样品杂质干扰严重, 不是质量控制的最佳选择. 因此, 本文采用高效液相色谱-质谱法 (HPLC-MS), 多反应监测 (MRM) 模式, 大黄素为内标, 同时测定亚贡叶中亚贡二萜酸 A 和 C 两种主要成分的含量, 得到了理想的结果, 该方法可用于亚贡叶及相关产品的质量控制.

## 1 实验材料

### 1.1 仪器

Applied Biosystems 3200Q TRAP LC/MS/MS System 四极杆质谱仪, 连接 Agilent 1200 (Agilent Corporation, MA, USA) 系列高效液相色谱, 配有 G1311A 四元泵, G1329A 自动进样器和 G1316A 柱温箱, 质谱界面操作软件 Analyst 1.4.1; 色谱柱: Ultimate™ XB-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温为 25 °C; 检测方式为负离子模式; 扫描方式为 MRM 模式.

3 号筛 (355 μm, 50 目, 上海东方药品科技实业有限公司).

### 1.2 原材料及试剂

亚贡叶于 2005 年 9 月采自辽宁省鞍山市岫岩新甸镇大山村, 由珍奥集团股份有限公司提供. 亚贡二萜

收稿日期: 2011-03-29

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2009J01192); 厦门市重大科技计划项目 (3502Z20100006)

\* 通信作者: wuzhen@xmu.edu.cn

酸 A 和 C(自制,由 NMR 鉴定结构,高效液相色谱分析后确定纯度大于 98%)。甲醇(色谱纯):Tedia Company,美国。甲醇(分析纯):汕头市达濠精细化学品有限公司。醋酸(分析纯):上海联合化工厂。盐酸(质量分数为 36%~38%,分析纯):汕头市西陇化工厂有限公司。水为重蒸水(自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱及质谱条件

离子喷射电压为-4 500 V,温度为 450 °C,扫描时间均为 400 ms。色谱柱:Ultimate™ XB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:V(甲醇):V(0.5%醋酸水溶液)=90:10;流速:1.0 mL/min;柱温:25 °C;进样量:30 μL。

亚贡二萜酸 A 和 C 对照品、大黄素的色谱分离见总离子流图(图 1)。结果表明亚贡二萜酸与大黄素可得到分离,亚贡二萜酸 A 和 C 没有完全分离,一次分析时间为 7 min。经质谱条件优化,确定亚贡二萜酸 A、C 和大黄素的二级质谱图和 MRM 离子对:亚贡二萜酸 A,335.1→255.4;亚贡二萜酸 C,349.1→269.1;大黄素(IS),269.1→240.5(图 2)。上述 HPLC-MS

条件下,亚贡二萜酸 A、C 和大黄素的保留时间分别是 3.46,3.52 和 5.58 min,待测化合物之间及与内标无干扰,MRM 色谱图可用于定量分析,亚贡二萜酸 A 和 C 的最低检出限均为 10 ng/mL,并适合于亚贡叶提取物的定量分析(图 3)。

### 2.2 对照品溶液的制备

取干燥的亚贡二萜酸 A 和 C 对照品各 2.4 mg,用甲醇配成质量浓度均为 0.24 mg/mL,并于 4 °C 保存。取干燥的大黄素对照品 1 mg,用甲醇配成质量浓度为 0.1 mg/mL 为内标,并于 4 °C 保存。

### 2.3 供试品溶液的制备

取亚贡叶,粉碎后过 3 号筛,称取药品粉末约 1.0 g,置 100 mL 圆底烧瓶中,加入 0.5 g 氢氧化钾和 70%(体积分数,下同)乙醇 50 mL,回流提取 2 h,共 2 次。合并提取液,加入 100 mL 蒸馏水,过滤。滤液用 100 mL 石油醚萃取 3 次,水相用 5% 盐酸调节 pH 至 4,用 100 mL 石油醚萃取 3 次,合并,无水硫酸镁干燥,过滤,减压浓缩,甲醇定容至 5 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

### 2.4 线性关系的考察

分别量取亚贡二萜酸 A 和 C 甲醇溶液,再依次用甲醇稀释配制成质量浓度分别为 2,3,6,12,20,50,75,

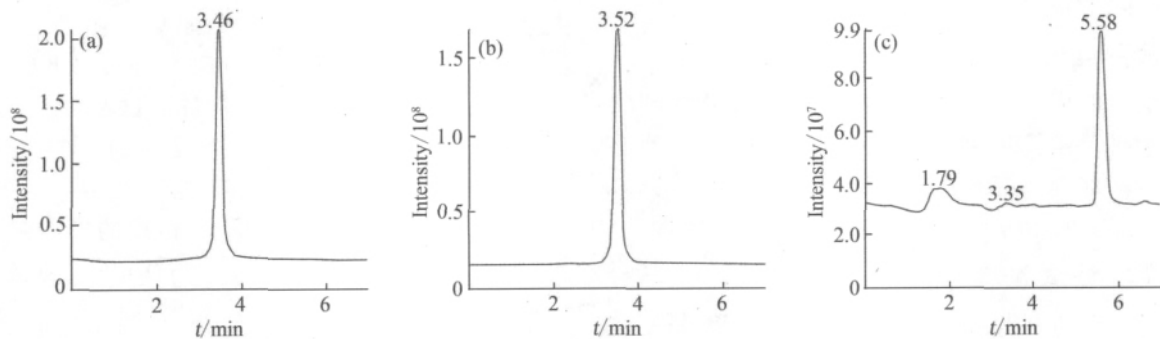


图 1 亚贡二萜酸 A(a)和 C(b)对照品、大黄素(c)的总离子流图

Fig. 1 TIC of smaditerpenic acid A(a), smaditerpenic acid C(b), and emodin(c)

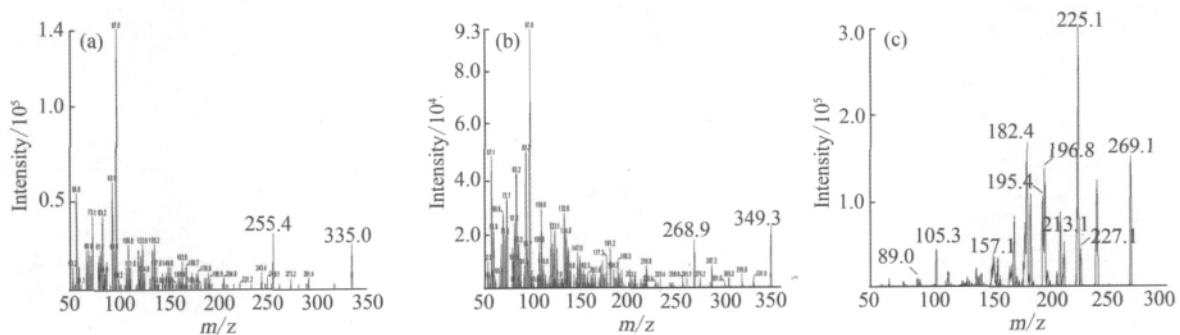


图 2 亚贡二萜酸 A(a)和 C(b)对照品、大黄素(c)的二级质谱图

Fig. 2 Product ion spectra of smaditerpenic acid A(a), smaditerpenic acid C(b), and emodin(c)

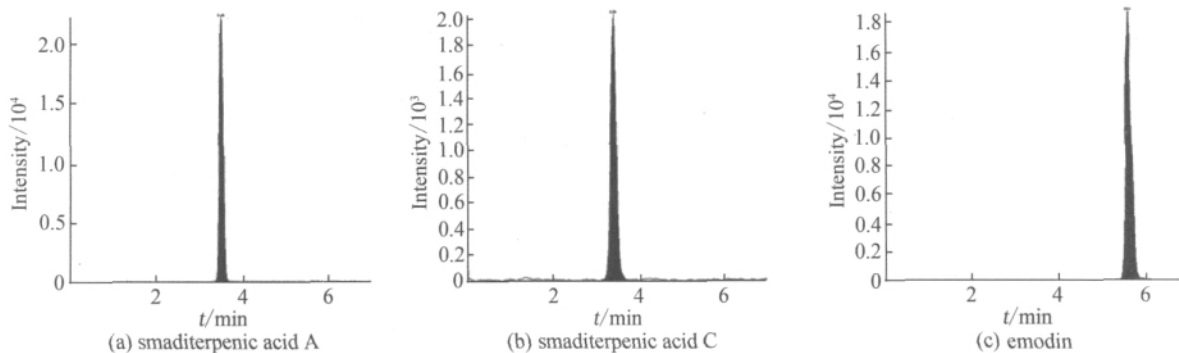


图3 亚贡叶 MRM 色谱图

Fig. 3 MRM chromatograms of leaves of *Smalanthus sonchi folius*

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  工作溶液. 形成质量浓度分别为 0.2, 0.3, 0.6, 1.2, 2.0, 5.0, 7.5, 10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  最终标准曲线. 内标工作溶液也以同样方式由 0.1  $\text{mg}/\text{mL}$  配制成 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . 进样 30  $\mu\text{L}$ , 记录色谱图; 以待测物质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线, 线性方程如下:

$$\text{亚贡二萜酸 A: } Y = 0.00233X + 0.0283 (r = 0.9995),$$

$$\text{亚贡二萜酸 C: } Y = 0.000294X - 0.044 (r = 0.9998).$$

结果表明亚贡二萜酸 A 和 C 均在 0.2~10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的范围内具有良好的线性关系.

2.5 精密度试验

分别吸取质量浓度为 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的亚贡二萜酸 A 和 C 对照品溶液各 30  $\mu\text{L}$ , 分别重复进样 6 次, 峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 0.46% 和 0.72%, 由以上数据表明本方法精密度良好.

2.6 重复性试验

取辽宁产同一批亚贡叶, 粉碎后过 3 号筛, 精密称定药品粉末 6 份, 每份约 1.0 g, 按 2.3 所述方法制备样品溶液, 进行亚贡二萜酸 A 和 C 的含量测定. 结果见表 1. 由表 1 数据得出亚贡二萜酸 A 和 C 含量的

RSD 分别为 3.0% 和 4.1%, 表明本方法具有较好的重复性.

2.7 稳定性试验

取同一批亚贡叶的供试品溶液, 每隔 1 h 进样 1 次, 连续进样 12 次, 每次 10  $\mu\text{L}$ . 结果表明, 亚贡二萜酸 A 和 C 在 12 h 内稳定, 其峰面积的 RSD 分别为 0.65% 和 0.97%.

2.8 回收率试验

取亚贡二萜酸 A 和 C 的含量分别为 292 和 61  $\mu\text{g}/\text{g}$  的亚贡叶, 粉碎后过 3 号筛, 精密称取 6 份, 每份约 0.5 g, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 分别加入亚贡二萜酸 A 对照品溶液(0.24  $\text{mg}/\text{mL}$ )0.5 mL 2 份, 0.7 mL 2 份, 0.9 mL 2 份; 亚贡二萜酸 C 对照品溶液(0.24  $\text{mg}/\text{mL}$ )0.1 mL 2 份, 0.2 mL 2 份, 0.3 mL 2 份, 水浴挥干, 按 2.3 所述方法制备供试品溶液, 按上述 HPLC-MS 条件测定亚贡二萜酸 A 和 C 的含量, 计算回收率, 详见表 2 和 3.

结果表明, 亚贡二萜酸 A 和 C 的平均回收率( $n=6$ )分别为 96.6% 和 92.4%; RSD 分别为 1.9% 和 3.2%, 本方法可以满足亚贡叶中两个指标含量测定的要求.

2.9 样品测定

按拟定的含量测定方法测定了中国辽宁、韩国和

表 1 重复性试验结果

Tab. 1 The results of the repeatability test

对照品	测出含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$						平均含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/ $\%$
	1	2	3	4	5	6		
亚贡二萜酸 A	289.1	276.2	281.2	270.4	291.6	290.3	283.1	3.0
亚贡二萜酸 C	65.01	61.66	63.01	67.33	61.12	60.59	63.12	4.1

表 2 亚贡二萜酸 A 回收率试验结果

Tab. 2 The results of the recovery experiments of smaditerpenic acid A

序号	称取样品/ g	样品中的 量/ $\mu\text{g}$	加入对照 品/ $\mu\text{g}$	总测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
1	0.5018	146.5	120.0	262.2	96.4		
2	0.5094	148.7	120.0	261.5	94.0		
3	0.5103	149.0	168.0	309.1	95.3	96.6	1.9
4	0.5075	148.2	168.0	312.6	97.9		
5	0.5097	148.8	216.0	358.8	97.2		
6	0.5121	149.5	216.0	363.4	99.0		

表 3 亚贡二萜酸 C 回收率试验结果

Tab. 3 The results of the recovery experiments of smaditerpenic acid C

序号	称取样品/ g	样品中的 量/ $\mu\text{g}$	加入对照 品/ $\mu\text{g}$	总测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
1	0.5018	30.61	24.00	51.75	88.1		
2	0.5094	31.07	24.00	53.14	92.0		
3	0.5103	31.13	48.00	74.56	90.5	92.4	3.2
4	0.5075	30.96	48.00	75.99	93.8		
5	0.5097	31.09	72.00	100.87	96.9		
6	0.5121	31.24	72.00	98.32	93.2		

日本产亚贡叶的亚贡二萜酸 A 和 C 的含量,按内标法计算,结果详见表 4.

### 3 讨 论

#### 3.1 液相色谱分离条件的选择

亚贡二萜酸 A 和 C 的结构相似,均为链状结构,分子中仅相差一个 $-\text{CH}_2-$ ,羧基和羟基官能团数目相同且存在位置相近,因此,两者的分离较为困难.实验中采用乙腈醋酸水梯度洗脱,约 50 min 可将两个化合物完全分开,但亚贡叶样品中,相关杂质干扰较为严重,采用甲醇乙腈混合溶剂洗脱,效果不明显.实验中尝试 0.5%(质量分数)三氟乙酸溶液或 10 mmol/L 醋酸铵溶液与乙腈洗脱,仍未达到最佳分离,色谱柱加长至 250 mm,仍不能消除干扰.考虑到检测方法将用于亚贡叶的质量控制,本实验采用 HPLC-MS 进行定量分析.

质谱中 MRM 模式用于定量分析,尤其是复杂体系的定量分析具有高效、准确、干扰少、速度快等优点,已成为当今定量分析的常规方法,目前还很少用于中草药的质量分析.

表 4 样品测定结果( $n=3$ )Tab. 4 The results of the samples detection( $n=3$ )

产地	亚贡二萜酸 A		亚贡二萜酸 C	
	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/%	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/%
辽宁	291.6	0.66	61.12	1.03
韩国	63.25	0.53	124.5	0.98
日本	37.57	0.78	62.11	0.93

#### 3.2 质谱条件的选择

采用正离子模式和负离子模式检测亚贡二萜酸 A 和 C,结果发现负离子模式灵敏度高,检出限更低,故实验采用负离子模式进行检测.经亚贡二萜酸 A 和 C 的二级质谱分析后确定亚贡二萜酸 A 采用 335.1 $\rightarrow$ 255.4 离子对,亚贡二萜酸 C 采用 349.1 $\rightarrow$ 269.1 离子对,进行定量分析,并对质谱条件进行优化,确定质谱分析条件.实验中采用亚贡叶中不含的大黄素作为内标,并进行质谱条件优化,内标与测试样品无干扰.

分析亚贡二萜酸 A 和 C 的一级质谱和二级质谱

碎片信息,确定 255.4 和 269.1 为定量分析的子离子,采用 335.1→255.4 和 349.1→269.1 离子对进行定量分析亚贡二萜酸 A 和 C,无论是母离子及子离子,都在相同保留时间无干扰,可用于亚贡二萜酸 A 和 C 的定量分析.因此,色谱条件可在不必完全分离条件下进行,采用甲醇醋酸水等度分离即可实现亚贡二萜酸 A 和 C 的定量分析,分析时间 7 min,该方法操作简单、速度快、重现性好、检出限低,可用于亚贡叶的质量控制.

### 3.3 样品提取分离方法的选择

实验中对提取方法进行筛选,选择超声波萃取法、冷浸法和回流提取法进行比较,发现回流提取的方法能获得较高的提取效率.经优化提取条件如回流提取时间、提取溶剂(乙醇、甲醇和石油醚)、提取次数等最终确定 70%乙醇提取.亚贡叶中含有亚贡二萜酸酯,包括亚贡二萜酸 A 和 C 的酯化合物,实验中研究了不同的碱水解条件,最后确定氢氧化钾和 70%乙醇回流提取两次,加水后用石油醚萃取 3 次,水相用 5%盐酸调节 pH 至 4,再用石油醚萃取的方法,得到比较好的效果.

综上所述,本文建立了一种快速、灵敏的 HPLC-ESI-MS/MS MRM 定量方法测定亚贡叶中亚贡二萜酸 A 和 C,该法操作简便、选择性高,亚贡二萜酸 A 和 C 质量浓度的线性范围均为 0.2~10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,定量下限为 10 ng/mL.该方法以大黄素为内标,流动相选择甲醇为有机相,0.5%醋酸水溶液为水相,采用等度洗脱( $V(\text{甲醇}):V(0.5\% \text{醋酸水溶液})=90:10$ ),色

谱柱为  $\text{C}_{18}$  反相柱,MRM 扫描负离子模式监测.经过灵敏度,检测限,精密度和稳定性确证,可用于亚贡叶的质量控制.

### 参考文献:

- [1] Inoue A, Tamogami S, Kato H, et al. Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(4): 845-848.
- [2] 马挺军,吕飞杰,台建详,等.亚贡叶中营养成分和功能性成分分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2004, 13(1): 56-57.
- [3] Lin F Q, Hasegawa M, Kodama O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(10): 2154-2159.
- [4] 邱鹰昆,田芳,窦德强,等.亚贡叶的化学成分研究[J]. *中草药*, 2008, 39(10): 1446-1448.
- [5] Simonovska B, Vovk I, Andrenšek S, et al. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers [J]. *J Chromatography A*, 2003, 1016(1): 89-98.
- [6] Xiang Z, He F, Kang T G, et al. Anti-diabetes constituents in leaves of *Smallanthus sonchifolius* [J]. *Natural Product Communications*, 2010, 5(1): 95-98.
- [7] 田芳,窦德强,迟玉新,等.亚贡叶中总黄酮及总酚酸的含量测定[J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(8): 2013-2014.
- [8] 盖阔,田芳,窦德强,等. HPLC 测定亚贡叶中绿原酸及咖啡酸含量[J]. *中国现代中药*, 2008, 10(1): 17-19.
- [9] 石玉媛,何凡,李莹莹,等.不同产地亚贡叶中总酚酸的含量测定[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(7): 1475-1477.

## Quantitative Determination of Smaditerpenic Acids A and C in Leaves of *Smallanthus sonchifolius* by HPLC-MS

WU Zhen<sup>1,2\*</sup>, CHEN Chao<sup>2</sup>, XIE Bao-ying<sup>2</sup>, QIU Ying-kun<sup>2</sup>, DOU De-qiang<sup>3</sup>, DONG Feng<sup>4</sup>

(1. The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry and Chemical Engineering,

Xiamen University, 2. Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

3. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

4. Zhen-Ao Group Co. Ltd., Dalian 116600, China)

**Abstract:** A new fast and sensitive high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) method was developed and validated for smaditerpenic acids A and C in leaves of *Smallanthus sonchifolius* using emodin as internal standard (IS). The calibration curves of smaditerpenic acids A and C were investigated with a good linear relationship within the ranges of 0.2-10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r \geq 0.999$ ), and the recoveries ( $n=6$ ) were 96.6% and 92.4% with RSD of 1.9% and 3.2%, respectively. The analytes were detected in negative ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). The method was validated and the specificity, linearity, lower limit of quantitation (LLOQ), precision, accuracy, recoveries and stability were determined.

**Key words:** HPLC-MS; smaditerpenic acid A; smaditerpenic acid C; *Smallanthus sonchifolius*; quantitative determination