

· 综述 ·

天然产物中五环三萜类化合物检测方法的研究进展

孙燕¹, 葛斐林¹, 薛春苗², 曹俊岭^{1,2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学 东直门医院, 北京 100700

[摘要] 综述了存在于天然产物中的五环三萜类化合物的色谱分离和波谱检测技术, 分析了各种色谱分离和波谱检测技术的优缺点, 并对其发展趋势进行了展望。以期为天然产物中五环三萜类化合物高选择性分离和高灵敏检测技术提供技术支持和理论参考。

[关键词] 天然产物; 五环三萜; 色谱分离; 波谱检测技术

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)04-0552-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20181212001

Advances in Determination Method of Pentacyclic Triterpenoids in Natural Products

SUN Yan¹, GE Fei-lin¹, XUE Chun-miao², CAO Jun-ling^{1,2*}

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China

[Abstract] The chromatographic separation and spectral detection techniques for the detection of pentacyclic triterpenoids in natural products were reviewed. The advantages and disadvantages of various chromatographic separation and spectral detection techniques were analyzed and the development trend was prospected. It aims at providing technical support and theoretical basis for the high selective separation and sensitive detection of pentacyclic triterpenoids in natural products.

[Keywords] natural products; pentacyclic triterpenoids; chromatographic separation; spectroscopic detection technique

五环三萜类(Pentacyclic Triterpenoids, PT)是一类分布广泛的天然活性物质,有六个异戊二烯单元联结而成,由5个闭合环作为母体,并以游离或苷类形式存在于自然界中,尤其是存在于一些中国的传统天然药物中^[12-13]。PT按其核心结构分为:齐墩果烷型、熊果烷型、羽扇豆烷型、何帕烷型和木栓烷型五大类;并根据它们的羟基和羧酸基团的数目、位置进一步分类为三萜单醇、三萜二醇、三萜酸等。这类化合物有着广泛的药理活性,包括抗炎、肝保护、抗肿瘤、抗病毒、抗微生物、抗真菌、胃保护和抗高血脂作用等,其抗肿瘤活性一直是国内外研究的热点^[1-11]。PT类化合物具有低挥发性和低极性,在早期的一些研究中,由于有限的检测方法或对照品,这些化合物通常被检测为复合物。而PT是一类具有相同骨架但取代基不同的类似物,不同取代基的生物活性会有很大差异,生物合成属于同步合成

但合成量不同,更难以检测^[14]。随着分析技术日益发展,将这些技术应用到PT的分离分析中是大势所趋,不仅有利于更好地提取传统中药的活性物质,而且针对PT中含量少但生物活性较高的成分,发掘来源相对丰富的天然产物例如药食同源产品,是理想、经济的解决途径。所以一个高选择分离和高灵敏检测技术是药食产品中PT准确测定的关键点。为此本文在总结前人研究成果的基础上,结合最新研究动态,对PT的检测方法及其在天然产物分析中的应用等方面进行综述。

1 PT的色谱分离方法

1.1 薄层色谱法(TLC)

Shiojima等^[15]在最初进行PT类化合物的分离时,是先用硝酸银浸渍硅胶柱,之后在制备过的硅胶柱上上样。Martelanc等^[16]则第一次使用C₁₈反相

* [通信作者] 曹俊岭,主任药师,研究方向:中药合理使用;Tel:(010)84013381,E-mail:caojunling72@163.com

高效薄层色谱板分离鉴定出 α -香树脂醇、 β -香树脂醇、羽扇豆醇、羽扇豆醇乙酸酯、熊果酸、齐墩果酸等几种常见PT异构体化合物。因为没有样品预处理,故植物提取物中PT的筛选分析快速、简单。Sethiya等^[17]在前人的基础上,使用了高性能薄层色谱法(HPTLC),用于分析印度一种阿育吠陀药用植物 *Shankhapushpi* 中熊果酸、白桦酸、豆甾醇和羽扇豆醇,可以将三萜酸和植物甾醇进行分离,证明高性能薄层色谱法是分析大量复杂自然样本的有效工具。

综上 TLC 优势:分离效率高,特别适用于各种复杂化合物的快速筛选;同时样品纯化步骤是最少的。缺陷:需要大量的样品,在硅胶薄层色谱板的分离最低检出限(LOD)在 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 水平;需要有毒的碘衍生和甲基化,耗时。

1.2 气相色谱法(GC)

Macías 等^[18]早在研究清漆中的苔藓树脂时,运用裂解气相色谱-质谱法(GLC),提出用氯甲酸甲酯为衍生化试剂。建立了作为主要PT化合物的 α -香树脂醇和 β -香树脂醇检测方法,同时发现,在树脂中,何帕-22(29)-烯与两个香树脂醇一起存在。然而,何帕-22(29)-烯属于何帕烷型五环三萜,是树脂的标记化合物。Pérez-Camino 等^[19]先用键合的氨丙基试剂提取植物油,提取液经硅烷化后用固相法分离出酸性组分,后用GC分析,定量测定植物油中的痕量五环三萜酸:齐墩果酸、山楂酸和熊果酸,深入挖掘了植物油中的酸性组分。之后 Janicsák 等^[20]针对药用植物中三萜酸:齐墩果酸和熊果酸,同样使用GC进行分离与含量测定。Sousa 等^[21]用气相色谱-质谱法(GC-MS)研究了整个工业过程软木和软木副产物中亲脂性萃取物的化学组成。发现软木提取物中除了有脂肪族、酚类,还有PT,主要包含木栓酮、桦木素、白桦脂醇、桦木酸,且工业副产物可被认为是PT类或有望合成PT的中间体的来源。Silveira 等^[22]在药用植物大叶锦鸡儿叶、果、茎和树皮提取物中发现PT次生物质,包括羽扇豆醇、羽扇豆酮、桦木酸、桦木素、木栓酮和木栓醇,并用GC-MS定量定性。先将干燥的己烷提取物悬浮在甲醇中,之后进行衍生化:60℃下加入100 μL 双(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺试剂(BSTFA)反应30 min,将衍生后的样品注入气相色谱仪,用Agilent HP 5-ms 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm)实现分析物的分离。Pereira 等^[23]用GC-MS同时定量定性海洋生物

海参中几类代谢产物,其中包含3种羽扇豆烷型三萜:白桦脂醇、羽扇豆醇、羽扇豆醇乙酸酯。Jemmali 等^[24]先用GC-MS对11种标准混合物: α -香树脂醇、 β -香树脂醇、羽扇豆醇、高根二醇、熊果醇、桦木素、齐墩果酸、桦木酸、熊果酸、山楂酸和科索罗酸进行衍生化试验,然后用于分析4种植物:苹果、鼠尾草、沙棘和树脂的提取物。混合物通过硅烷化或乙酰化衍生,且PT化合物的衍生化只发生在母环上的一类或两类官能团结构,而不是全部。该衍生化方案仅适用于含羧酸PT:齐墩果酸、科索罗酸、桦木酸、山楂酸和熊果酸,以及二羟基衍生物:高根二醇和熊果醇;而含单羟基的PT类化合物: α -香树脂醇、 β -香树脂醇、桦木素、羽扇豆醇无需衍生。

综上 GC 优势:适用于非极性生物活性组分,也适用于分离位置异构体。缺陷:由于PT的挥发性低,在上样测定之前需要耗时的样品预处理,即不可缺少的衍生化步骤,而衍生化过程是定量中潜在的不确定性因素;此外由于过长的保留时间,样品可能降解。

1.3 液相色谱法(LC)

Martelanc 等^[25]用高效液相色谱法分离PT几个三萜醇异构体:羽扇豆醇、 α -香树脂醇和 β -香树脂醇,方法是通过使用ODS柱,用乙腈-水(95:5)在40℃下等温洗脱32 min。Zhao 等^[26]用HPLC建立了白桦树皮中桦木素和桦木酸同时提取和测定的方法。优化了不同提取溶剂:二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、三氯甲烷、甲醇和95%乙醇对桦木素和桦木酸提取率。结果表明,95%乙醇是一种较好的提取溶剂,可提取高含量的PT。通过在反相 C_{18} 柱上用乙腈-水(86:14)实现白桦脂素和白桦脂酸的分离,同时也比较了中国生长在不同地点的白桦树皮中桦木素和桦木酸含量的显著变化。Jin 等^[27]为了实现LC系统的最大灵敏度和选择性,优化了色谱条件。UPLC测定酸性化合物时,流动相经常酸化,以改善色谱峰的形状和保留时间。因此,对含有0.05%、0.1%、0.5%甲酸的水,或0.05%、1.5%、3%乙酸水溶液进行评价,结果表明,用0.05%乙酸酸化效果最好,可以观察到色谱图中山楂酸保留时间为20.9 min,并有良好的峰形和面积。相反,用较高浓度的乙酸时,观察到山楂酸没有色谱峰。而没有选择甲酸,是因为它将山楂酸的保留时间延迟到29 min。此外

对有机溶剂甲醇和乙腈进行了评价,因为甲醇的紫外吸收低于 183 nm,不适合 PT 类化合物的紫外检测,而且甲醇也总是观察到遗留效应。故有机溶剂采用乙腈。为获得最佳提取效率对液-液萃取不同的提取溶剂进行了评价,在各种溶剂中,筛选出甲醇、乙醇、乙腈和乙酸乙酯。其中乙腈和乙醇回收率小于 75%,甲醇回收率为 $(89.3 \pm 1.4)\%$,而乙酸乙酯回收率大于 95%,并有较少的干扰峰,故选乙酸乙酯做萃取溶剂。

综上 LC 优势:比 GC 有更大的承载量,无需衍生化;对于定量来说,HPLC 更具有可重复性,且 UPLC 与传统 HPLC 相比分辨率更大、灵敏度提高、分析速度快。缺陷:因 PT 同分异构体众多,HPLC 也不能实现完全分离。

1.4 毛细管电泳色谱法(CZE)

CZE 分析 PT 早在几年前被人们所研究利用。Qi 等^[28]用简单的非水毛细管电泳(NACE)实现了中药中 3 种 PT 化合物熊果酸、齐墩果酸和 2 α , 3 β , 24-三羟基-熊果-12-烯-28-羧酸的同时分离。采用甲醇-乙腈(65:35)对混合物进行电泳,获得了良好的分离和相关系数。因 NACE 工作原理是基于电解质溶液的使用,故有机溶剂的改变使它们在物理和化学性质上有很大不同(如黏度、介电常数、与水之间的导电性等),从而有利于 PT 在 NACE 中进行选择性分离。同时,该方法用于 5 种中草药:石楠叶、泽兰、夏枯草、女贞子、马鞭草提取物中这 3 种组分的分离和测定。胶束电动毛细管色谱法(MEKC)是最常用的,之前也有用 MEKC 对硅烷基化的 PT 进行分离,但对于熊果酸和齐墩果酸,因为结构非常相似,即使是 MEKC 也没有获得很好的分辨率。Cheung 等^[29]建立了环糊精修饰的 CZE 分离夏枯草中 PT 的 3 种三萜酸异构体:熊果酸、齐墩果酸和桦木酸的方法。用硼砂缓冲液,包含 40 mm 硼砂、2 mm 环糊精和 4% 甲醇, pH 9.4, 在 25 kV 电压、25 °C 温度下运行, 20 min 内彼此很好地分离, 迁移时间的 RSD 为 0.16% ~ 0.74%。期间为了改善 CZE 的分辨率,向背景缓冲液中加入添加剂环糊精(CD),原理是溶质与 CD、溶质和毛细管壁、CD 和毛细管壁的相互作用,特别是手性分子分离的相互作用,增加的分离效率可以归因于降低手性分离中的相互作用。但由于修饰后对毛细管壁的吸附减少,且齐墩果酸和熊果酸的结构相似,没有像 NACE 和 MEKC 一样

获得基线分离。Ren 等^[30]之后也用 CZE 方法来识别连翘中以上 3 个微量三萜酸组分,在背景电解质丁基缩水甘油醚(BGE)中最终实现了 CZE 对 3 个三萜酸组分的基线分离。

综上 CZE 优势:具有分离效率高、样品和溶剂消耗少等优点。缺陷:需衍生化,分离时间长;由于存在非挥发性缓冲液,该方法不能与质谱联用。

1.5 超临界流体色谱法(SFC)

Tavares 等^[31]最早用毛细管超临界流体色谱法分离一些无需衍生的三萜酸:桦木酸、齐墩果酸、山楂酸和熊果酸。因之前 SFC 研究仅集中在 PT 馏分的表征上,没有评价超临界流体提取过程参数的影响,故 Mossi 等^[32]用马尾藤做了优化提取。用高压二氧化碳(CO₂)萃取,从提取物的液体产量和化学成分来看,分析条件结果表明:CO₂颗粒大小和流率不影响提取物产量,而萃取温度和溶剂密度对提取物液体产率和化学性质都有显著影响。Lesellier 等^[33]将超临界流体色谱/蒸发光散射检测器(SFC/ELSD)联用,为快速分析 PT 类化合物提供了高分辨率和高响应性,其优化的分析条件:改性剂(10% ~ 3%);背压(12 ~ 18 MPa)和温度(15 ~ 25 °C),从而提高了分离,该方法检测了苹果渣中 8 种 PT 类化合物:齐墩果酸、高根二醇、 β -香树脂醇、熊果酸、熊果醇、桦木酸、桦木素、羽扇豆醇。在等度洗脱条件,不到 20 min 即可分离。然而,由于没有质谱定性,仍然有难以识别的同分异构体存在。此外,因为流动相中没有水,化合物与固定相的相互作用与反相液相比,流体粘度低、流速大、效率高,使用 SFC/ELSD 能在相当短的分析时间内得到较满意的分辨率。

综上 SFC 优势:CO₂在食品和医药工业内被用作超临界萃取溶剂,因为它无毒,不易燃,非爆炸性,容易获得,并具有低临界温度,可避免热敏化合物的降解;SFC 适用于中极性或低极性化合物中,且无需衍生化、分离时间短、分离效率高。缺陷:由于流动相为气体,与质谱联用的仪器贵且少,其余的检测器对定性来说不够精准。

1.6 多孔石墨碳(PGC)

Rhourirfih 等^[34]首次研究了 PGC 固定相分离 PT 异构体。考察了不同参数:温度、甲酸浓度及流动相组成对保留率的影响。PGC 工作原理是主要由石墨的可极化表面引起,具有高疏水性、极性和离子相互作用,特别适合分离异构体。研究表明,随着

温度的升高, PT 的保留量降低, 因此, 在 25 ℃ 下选择乙腈-异丙醇混合物作为梯度洗脱的流动相, 进行树脂中 PT 的分离。Bérangère 等^[35] 同样使用 PGC 快速分析了三种三萜酸: 桦木酸、齐墩果酸、熊果酸、18 α -和 18 β -甘草次酸。

综上 PGC 优势: PGC 具有平面结构, 这对于分离结构紧密相关的分子非常有用, 包括异构体、微极性、极性和离子化合物, 都得到了广泛的应用。缺陷: 机械性能差, 难以承受 HPLC 的高压操作, 实际应用范围窄。

2 PT 的波谱检测技术

2.1 紫外(UV)与荧光(FLD)检测器

Zhao 等^[26] 用 HPLC-UV 法同时测定桦木素、桦木酸, 而这两种 PT 分子具有相似的分子结构, 且大多数 PT 类化合物缺乏发色团, 通常在 200 nm 波长直接进行 UV 检测。故 UV 检测器不利于低浓度的定量, 而 UV 测定 PT 的前提是含量足, 才能增强使用 UV 的检测信号。Wu 等^[36] 用 HPLC-FLD 测定了 6 种三萜酸: 熊果酸、齐墩果酸、桦木酸、山楂酸、白桦脂酮酸和科罗索酸, 三氯甲烷和丙酮做提取与分散溶剂。然而, 因为缺乏合适的荧光部分, 需采用柱前衍生来增强三萜酸分子的选择性、灵敏度。

综上 UV 与 FLD 优势: 价格相对便宜。缺陷: PT 化合物缺乏发色团和荧光部分, 这限制了流动相的选择并减少了 UV 与 FLD 检测的灵敏度; 目前耦合 UV/FLD 检测提供的 LOD 仅在 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 水平。

2.2 蒸发光散射检测器(ELSD)

Tian 等^[37] 用 HPLC-ELSD 测定紫菀中的三大类 PT 化合物: 紫菀酮、木栓酮和表木栓酮并同时进行定量, 在反向 C₁₈ 柱上用乙腈梯度洗脱获得最佳色谱条件, 并在 ELSD 设定 0.05% 乙酸在 40 ℃ 蒸发。同时比较了 HPLC-UV 和 HPLC-ELSD 下三大类 PT 化合物和样品紫菀的色谱图, 发现 UV 检测在 200 nm 处虽然可以检测到紫菀酮和木栓酮, 但信号比在相同浓度下由 ELSD 检测产生的信号弱得多, 所以 HPLC-ELSD 灵敏度比 HPLC-UV 大得多。

综上 ELSD 优势: 避免衍生步骤而导致的样品减少, ELSD 也越来越多地被用于非发色物质分析的通用检测器; 使用 ELSD 响应显著高于 UV 检测所提供的响应。缺陷: 基线噪声大, 灵敏度低。

2.3 火焰离子化检测器(FID)

Stiti 等^[38] 使用 GC 结合 FID 分析了欧洲橄榄果实发育过程中 PT 的形成, 并对 PT 定性和定量。从橄榄树开花后的不同阶段到果实发育, 分析橄榄果实的游离甾醇和 PT 含量。甾醇和 PT 是通过乙酸/异戊二羧酸途径合成的, 由共同的前体氧化鲨烯形成。在果实发育开始时, 发现橄榄果含有大量的 α -香树脂醇和 β -香树脂醇, 以及更多的含氧化合物, 如三萜二醇(高根二醇和熊果醇)和三萜酸(齐墩果酸、熊果酸和山楂酸)。当橄榄果达到了最后成熟, 开始从绿色变成红色到紫色, α -香树脂醇和 β -香树脂醇不再存在。

综上 FID 优势: 有利于分离鉴定 PT 的位置异构体。缺陷: 需要色谱衍生, 化合物的非挥发性又延长了分析时间。

2.4 PT 的质谱检测技术

质谱作为一种重要的分析方法, 已经广泛应用于化学、生物、食品科学、制药行业等领域^[39], 特别适合于分析植物复杂基质中的三萜成分, 以克服基质抑制效应。由于 PT 化合物类似的结构, 导致分离效果很差。而检测器中光谱仅有一些峰相对强度的差异, 无法很好地识别同分异构体; 质谱却可以在 PT 鉴定中可分析出位置异构体, 能够很好地识别和量化实际样品中的化合物, 并有助于对未知化合物的结构鉴定。这表明, 良好的质谱分析法对于明确鉴定含相同的分子量或碎片的 PT 类化合物是必需的。

2.4.1 飞行时间质谱(QTOF) Mcghie 等^[40] 研究了 7 个品种的苹果皮中三萜酸组成, 并测定其抑制脂肪酶的活性, 利用高效液相色谱-飞行时间质谱法(HPLC-QTOF-HRMS)获得了 43 种化合物的准确质量信息, 包括元素组成, 片段质量。这 43 种化合物被鉴定为三萜酸并初步鉴定为含有羟基、羧基的熊果酸(或齐墩果酸)及其衍生物。但这里质谱给出的信息没有确定羟基、羧基位置以及同分异构体组的结构(α vs β , 顺式 vs 反式)。研究表明, PT 类化合物的质谱碎裂为 diels-alder 反应, 环 C 断裂产生两个双环片段, 这两个片段的识别证实了 PT 类化合物 19 位羟基的位置可作为分子断裂的识别点。而苹果提取物中的三萜酸对于化学修饰, 集中在 C-3 羟基, C-12、C-13 双键和 C-28 羧酸上, 这些修饰可以产生更有效的化合物, 或提高它们的生物利用度。

2.4.2 三重四极杆质谱(QQQ) Sánchezavila 等^[41] 在高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-QQQ-MS)的多重

反应监测下,快速、选择性地测定微波辅助提取后橄榄叶中PT类化合物:三萜酸(齐墩果酸、熊果酸和山楂酸);三萜二醇(熊果醇、高根二醇)。由于三萜酸和二醇为中等极性,使用乙醇作为微波辅助萃取剂在5 min内完成了橄榄叶的提取。相比以往通常需要至少5 h的浸渍,在微波辅助下显著缩短了浸出时间。萃取后,用HPLC-QQQ-MS,通过多反应监测(MRM)证实了PT类的选择性鉴定,在25 min内完成成分表征。此外超声波辅助浸出技术、加压液体萃取和超临界流体提取均可供浸出辅助应用,可以大大减少提取体积和缩短加工时间。虽然QQQ适合于定性分析,对于定量不够精确,但可以初步阐明每个PT类化合物的指纹特征。

2.4.3 四极杆-轨道质谱(Orbitrap) Sánchez-González等^[42]用高效液相色谱-四极杆轨道质谱法(HPLC-Orbitrap-MS)鉴别橄榄内山楂酸在大鼠血浆和尿液中的代谢,以更好地了解这种三萜酸化合物的生物效应。因橄榄经生物利用后,代谢物属于生物体内的微量小分子,故用高分辨质谱法进行定量分析。结果发现,山楂酸在血浆(81.8%)和尿(73.9%)中均高浓度存在,这表明山楂酸代谢较低。而山楂酸已被评估为未来营养药物,是可以在膳食干预中进食的天然分子,能从可食用植物中分离出来,如新鲜蔬菜水果、豆类。为此,检测山楂酸在体内生物转化后的代谢产物,也有利于作为含PT成分植物的生物标志物。

2.4.4 质谱离子源比较

2.4.4.1 电子轰击离子源(EI) Razboršek等^[43]采用气相色谱-质谱联用(GC-EI)对唇形科不同药用植物迷迭香、山茱萸、丹参等提取物中三萜酸进行了分离、鉴别和定量,研究主要集中在齐墩果酸、桦木酸和熊果酸,都可以通过气相色谱的洗脱顺序和质谱中碎片离子信号的强度得以区分,其中主要观察到质谱裂解行为中diels-alder反应。

2.4.4.2 大气压化学电离(APCI) Martelanc等^[16]用HPLC-MS首次发现并检测出甘蓝叶表蜡质中3种三萜醇化合物:羽扇豆醇、 α -香树脂醇、 β -香树脂醇。经APCI电离后,质谱图上这3个同分异构体给出了母离子峰及少量特征碎片离子峰的相对强度。因此,MS/MS质谱应用APCI离子源可以为色谱法分离的PT异构体的母核鉴别提供可靠数据。

2.4.4.3 电喷雾电离源(ESI) Olmo-García等^[44]用两种不同电离源的探测器,对橄榄皮和树叶提取物中PT次生植物代谢物进行测定,包括:高二根醇、

熊果醇、山楂酸、桦木酸、齐墩果酸和熊果酸。PT可以作为植物代谢保护剂,环绕在植物表面(叶、茎、花和果实),作为表皮蜡的一部分。研究使用ESI和APCI作为检测系统的电离源对这些微量物质进行准确测定,并检查这两个电离源的结果吻合度。结果表明,ESI最低检测极限:3~455 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,其次为APCI:22~408 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;ESI有最宽的动态范围,且这两种探测器的定量结果差异无统计学意义。

2.4.4.4 大气压光学电离源(APPI) Rhourirfih等^[45]用APPI和APCI研究了天然树脂材料中PT类化合物组成,因PT种类多,其中还存在大量的同分异构体。故用软电离APPI可防止化合物碎裂后碎片多、信息杂,有助于化合物鉴定。并研究了3种掺杂剂:甲苯、丙酮和茴香醚对APPI-MS(包括:MS谱的灵敏度和定性离子)的影响。在选定的离子监测条件下,线性范围在0.005~0.015 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内定量测定,而APPI和APCI检测范围均为0.002~0.84 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,范围的广度是由所研究PT的种类决定的。结论是在正离子模式下,APPI比APCI更敏感,而APCI对酸性三萜的敏感性最高。

综上几个离子源的优势:EI、APCI、APPI、ESI除了提供分子质量信息外,也提供了关于分子中功能基团的存在结构信息;研究证明APCI与APPI相比,APCI特别适用于非极性小分子的电离;APPI特别适合于中性小分子的电离。缺陷:EI硬电离使PT碎裂后碎片多、信息杂,不利于识别;LC-ESI/MS方法目前只涉及酸性三萜类化合物,而中性三萜类化合物,则不能很容易被ESI离子化。

3 结论

近年来,PT类功效成分研究已成为食品、药品以及药食同源产品研究的热点。随着检测技术的不断提高,色谱和波谱技术也越来越多地运用到PT的分离分析中,各实验室采用不同的分析方法,如TLC-UV、GC-FID、GC-MS、HPLC-UV、HPLC-FLD、HPLC-MS、SFC-ELSD、SFC-UV、CZE-UV以及PGC-UV等对PT类化合物进行确证分析。其中气相、薄层法、光谱法操作简单,但灵敏度低;液相法、超临界流体、质谱法灵敏度高,但由于PT五环不易碎裂,不能形成定性碎片离子。随着科技的发展,色谱和质谱检测技术逐渐趋向成熟化,而质谱联用以及更换不同的电离源可以解决目标物定性和定量问题,使检测结果更加准确、可靠。PT类功效成分的

检测对人体健康至关重要,在今后的研究过程中还应不断开发新的色谱和波谱检测法,以便尽可能快速、便捷检测天然产物中PT成分,为今后充分开发营养药物及膳食添加产品发挥重要作用。

参考文献

- [1] NADINIC E, GORZALCZANY S, ROJO A, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Gentianella achalensis* [J]. Fitoterapia, 1999, 70(2):166-171.
- [2] 王艺玮,徐盛涛,徐进宜. 五环三萜羽扇豆烷型天然产物抗肿瘤活性研究进展[J]. 药学与临床研究, 2017, 25(4):336-342.
- [3] DAZ LANZA A M, ABAD MARTÍNEZ M J, FERNÁNDEZ M L, et al. Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their *in vitro* anti-inflammatory activity. [J]. Plant Med, 2001, 67(03):219-223.
- [4] 孟艳秋,李思竹. 熊果酸衍生物的合成及抗肿瘤活性的研究[J]. 药学研究, 2011, 35(10):1215-1220.
- [5] 李晶,靳晓婷,张丽颖. 五环三萜含氮衍生物的合成及糖原磷酸化酶抑制活性[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4):422-428.
- [6] 肖苏龙,王晗,王琪,等. 基于五环三萜先导结构的抗病毒抑制剂研究进展[J]. 中国科学:化学, 2015, 45(9):865-883.
- [7] RICHARDS R M, DURHAM D G, LIU X. Antibacterial activity of compounds from *Rubus pinfaensis*. [J]. Plant Med, 1994, 60(5):471.
- [8] CHIANG L C, NG L T, CHIANG W, et al. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago species* [J]. Plant Med, 2003, 69(7):600-604.
- [9] JEONG H G. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury [J]. Toxicol Lett, 1999, 105(3):215-222.
- [10] FARINA C, PINZA M, PIFFERI G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids [J]. Farmaco, 1998, 53(1):22.
- [11] YOU H J, CHOI C Y, JI Y K, et al. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages [J]. Febs Lett, 2001, 509(2):156-160.
- [12] 杨秀伟. 人参中三萜类化学成分的研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(1):7-15, 55.
- [13] 郑云枫,魏娟花,冷康,等. 甘草属 *Glycyrrhiza L.* 植物资源化学及利用研究进展[J]. 中国现代中药, 2015, 17(10):1096-1108.
- [14] QING Z X, LIU X B, WU H M, et al. An improved separation method for classification of *Macleaya cordata* from different geographical origins [J]. Anal Methods, 2015, 7(5):1866-1871.
- [15] SHIOJIMA K, SUZUKI H, KODERA N, et al. Composite constituents: Thirty-nine triterpenoids including two novel compounds from *Ixeris chinensis* [J]. Chem Pharm Bull, 2010, 27(34):509-514.
- [16] MARTELANC M, VOVK I, SIMONOVSKA B. Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(38):6662-6670.
- [17] SETHIYA N K, MISHRA S. Simultaneous HPTLC analysis of ursolic acid, betulinic acid, stigmasterol and lupeol for the identification of four medicinal plants commonly available in the Indian market as shankhpushpi [J]. J Chromatogr Sci, 2015, 53(5):816-823.
- [18] MACIAS F A, SIMONET A M, ESTEBAN M D. Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of *Melilotus messanensis*. [J]. Phytochemistry, 1994, 36(6):1369-1379.
- [19] PREZ-CAMINO M C, MOREDA W, CERT A. Effects of olive fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerol content of virgin olive oils [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(2):699-704.
- [20] Janicsák G, Veres, Kállai, et al. Gas chromatographic method for routine determination of oleanolic and ursolic acids in medicinal plants [J]. Chromatographia, 2003, 58(5/6):295-299.
- [21] SOUSA A F, PINTO P C, SILVESTRE A J, et al. Triterpenic and other lipophilic components from industrial cork byproducts. [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(18):6888-6893.
- [22] SILVEIRA C V D, TREVISAN M T S, RIOS J B, et al. Secondary plant substances in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia Mart.* [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(6):1597-1606.
- [23] PEREIRA D M, VINHOLES J, PINHO P G D, et al. A gas chromatography-mass spectrometry multi-target method for the simultaneous analysis of three classes of metabolites in marine organisms [J]. Talanta, 2012, 100(20):391-400.
- [24] JEMMALI Z, CHARTIER A, DUFRESNE C, et al. Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography-mass spectrometry analysis in plant extracts [J]. Talanta, 2016, 147(15):35-43.
- [25] MARTELANC M, VOVK I, SIMONOVSKA B. Separation and identification of some common isomeric plant triterpe-

- noids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216 (38): 6662-6670.
- [26] ZHAO G, YAN W, CAO D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43 (3): 959-962.
- [27] JIN M M, ZHANG W D, SONG G S, et al. Discrimination and chemical phylogenetic study of four pulsatilla herbs using UPLC-ESI-MS/MS combined with hierarchical cluster analysis. [J]. J Chromatogr Sci, 2018, 56 (3): 216-224.
- [28] QI S, DING L, TIAN K, et al. Novel and simple nonaqueous capillary electrophoresis separation and determination bioactive triterpens in Chinese herbs [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40 (1): 35-41.
- [29] CHEUNG H Y, ZHANG Q F. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers [J]. J Chromatogr A, 2008, 1213 (2): 231-238.
- [30] REN T, XU Z. Study of isomeric pentacyclic triterpene acids in traditional Chinese medicine of *Forsythiae Fructus* and their binding constants with β -cyclodextrin by capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2018, 19 (7): 529-532.
- [31] TAVARES M C H, VILEGAS J H Y, LANÇAS F M. Separation of underivatized triterpene acids by capillary supercritical fluid chromatography [J]. Phytochem Anal, 2001, 12 (2): 134-137.
- [32] MOSSI A J, CANSIAN R L, CARVALHO A Z, et al. Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO₂ [J]. Fitoterapia, 2004, 75 (2): 168-178.
- [33] LESELLIER E, DESTANDAU E, GRIGORAS C, et al. Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector [J]. J Chromatogr A, 2012, 1268 (23): 157-165.
- [34] RHOURLI-FRIH B, CHAIMBAULT P, DEQUERAL D, et al. Investigation of porous graphitic carbon for triterpenoids and natural resinous materials analysis by high performance liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2012, 1240 (6): 140-146.
- [35] BÉRANGÈRE C, CAUSSARIEU N, MORIN P, et al. Rapid analysis of triterpenic acids by liquid chromatography using porous graphitic carbon and evaporative light scattering detection. [J]. J Sep Sci, 2015, 27 (12): 964-970.
- [36] WU H, LI G, LIU S, et al. Simultaneous determination of six triterpenic acids in some Chinese medicinal herbs using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 107 (7): 98-107.
- [37] TIAN Y, WANG Q, WANG Y, et al. Simultaneous quantification of three major triterpenoids in radix asteris by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. Phytochem Anal, 2010, 20 (3): 191-196.
- [38] STITI N, HARTMANN M A. Nonsterol triterpenoids as major constituents of *Olea europaea* [J]. J Lipids, 2012, 2012 (7): 1-13.
- [39] COX K A, WILLIAMS J D, COOKS R G, et al. Quadrupole ion trap mass spectrometry: Current applications and future directions for peptide analysis [J]. Biol Mass Spectrom, 2010, 21 (5): 226-241.
- [40] MCGHIE T K, HUDAULT S, LUNKEN R C, et al. Apple peels, from seven cultivars, have lipase-inhibitory activity and contain numerous ursenoic acids as identified by LC-ESI-QTOF-HRMS. [J]. J Agric Food Chem, 2011, 60 (1): 482-491.
- [41] Sánchez-Avila N, Priego-Capote F, Ruiz-Jiménez J, et al. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave-assisted extraction [J]. Talanta, 2009, 78 (1): 40-48.
- [42] Sánchez-González M, Lozano-Mena G, Parra A, et al. Identification in rat plasma and urine by linear trap Quadrupole-Orbitrap mass spectrometry of the metabolites of maslinic acid, a triterpene from olives [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63 (4): 1126-1132.
- [43] Razboršek M I, Vončina D B, Doleček V, et al. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in *Lamiaceae*, and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives [J]. Chromatographia, 2008, 67 (5/6): 433-440.
- [44] Olmogarcía L, Bajoub A, Fernándezgutiérrez A, et al. Evaluating the potential of LC coupled to three alternative detection systems (ESI-IT, APCI-TOF and DAD) for the targeted determination of triterpenic acids and dialcohols in olive tissues. [J]. Talanta, 2016, 150 (11): 355-366.
- [45] RHOURLI-FRIH B, CHAIMBAULT P, CLAUDE B, et al. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. [J]. J Mass Spectrom, 2010, 44 (1): 71-80.