

Q-TOF LC/MS 技术分析乙醇体积分数对人参单体皂苷提取率的影响^Δ

杨宗林^{1*}, 李 慧¹, 王 冰¹, 刘淑莹^{1,2#} (1. 吉林省人参科学研究院/长春中医药大学, 长春 130117; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4834-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.27

摘要 目的: 研究乙醇体积分数对不同的人参皂苷单体提取率的影响。方法: 采用不同体积分数的乙醇为溶剂[0%(水)、20%、50%、70%、95%, V/V]对人参进行回流提取, 经四极杆-飞行时间液相色谱/质谱(Q-TOF LC/MS)技术鉴定各峰的成分归属, 并对其中的16种主要皂苷进行分析。结果: 乙醇体积分数对人参药材中总皂苷的提取率存在较大影响, 当乙醇体积分数为70%时总皂苷的提取率最高, 此差别主要由三醇型皂苷引起, 二醇型皂苷在不同体积分数乙醇溶液中的提取率基本相似。结论: 乙醇体积分数不同时, 得到提取物中的皂苷不仅在总量上存在差异, 在单体比例上亦存在差异。

关键词 乙醇体积分数; 人参; 四极杆-飞行时间液相色谱/质谱; 皂苷单体; 提取率

Analysis of the Impact of Ethanol Volume Fraction on Extract Rate of Ginsenoside Monomer by Q-TOF LC/MS

YANG Zong-lin¹, LI Hui¹, WANG Bing¹, LIU Shu-ying^{1,2} (1. Jilin Ginseng Academy/Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the impact of ethanol volume fraction on the extract rate of ginsenoside monomer. METHODS: Water and different volume fraction of ethanol solution (20%, 50%, 70%, 95%, V/V) were used for ginseng extract. High performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (Q-TOF LC/MS) was applied to identify components attributable of each peak. Especially 16 kinds of main saponins were analyzed. RESULTS: The volume fraction of ethanol had a significant impact on extract rate of ginsenoside. When the volume fraction of ethanol was 70%, extract rate of ginsenoside was the highest; however, the differences were mainly caused by protopanaxatriol saponins. The yield of protopanaxadiol ginsenosides was similar in different volume fraction of ethanol solution. CONCLUSIONS: When the volume fraction of ethanol is different, result is not only different in the total saponin, but also different in the proportion of the monomers.

KEYWORDS Ethanol volume fraction; *Panax ginseng*; Q-TOF-LC/MS; Saponin monomer; Extract rate

人参是五加科(*Araliaceae*)植物人参(*Panax ginseng* C.A. Meyer.)的干燥根, 具有大补元气的功效^[1], 临床上常用于各种虚证的治疗^[2]。人参中的主要有效成分是皂苷, 其常以人参类植物为主要原料经不同体积分数的乙醇(甲醇)煎煮或浸泡后获得。人参皂苷是一类四环三萜化合物, 在甾体母核上连接糖基侧链而得, 提取溶剂极性的差异对皂苷的提取率影响较大。

研究^[3-5]表明, 溶剂不同时, 相同提取工艺所得皂苷含量存在差异; 诸多研究均以总皂苷为指标, 且研究结果各不相同, 由于皂苷单体性质各不相同, 不同乙醇体积分数提取所得到的皂苷单体含量理论上也应存在一定的差异。但却未见乙醇

体积分数对皂苷单体提取率差异的相关文献报道。

高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)技术可以对复杂体系进行定性定量分析^[6-7], 近年来在天然药物中的应用越来越普遍^[8]。四极杆-飞行时间MS(Q-TOF MS)技术具有分辨率高、稳定性好、精密度高的优点, 在化合物定性分析方面应用较广。本文采用Q-TOF液相色谱(LC)/MS技术鉴定了不同体积分数乙醇所得提取物中主要的人参皂苷单体, 并对其含量进行比较, 研究了乙醇体积分数对皂苷提取率的影响。

1 材料

1.1 仪器

体的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10): 1 383.

Δ 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No.20130206059YY)

* 硕士研究生。研究方向: 中药有效成分与应用开发。E-mail: zonglin17@sina.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 质谱分析。电话: 0431-86045155。E-mail: sylccucm@163.com

[10] Janssens S, de Armas HN, Remon JP, *et al.* The use of a new hydrophilic polymer, kollicoat IR, in the formulation of solid dispersions of itraconazole[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 30(3/4): 288.

(收稿日期: 2015-01-12 修回日期: 2015-03-05)

(编辑: 邹丽娟)

1200型液相色谱系统、6520 Accurate Q-TOF 仪(美国 Agilent 公司);Sigma-Aldrich C₁₈ 色谱柱(美国 Sigma 公司);TU-1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

四年生全须生晒参(吉林省紫鑫药业有限公司,批号:131120,经长春中医药大学姜大成教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A. Meyer);人参皂苷 Re 对照品(以下简称 Re,南京泽朗医药科技有限公司,批号:20130770,纯度: > 98%);甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

将生晒参粉碎成 60 目粗粉,每份约 15 g,料液比设为 1:10 (g/ml),分别采用水和 20%、50%、70%、95% (V/V) 乙醇溶液回流提取 3 次,趁热过滤,合并,减压浓缩定容至 50 ml,得人参提取液。

精确量取提取液 1 ml,加蒸馏水 9 ml 混匀,置于分液漏斗中,加 20 ml 乙醚脱脂 3 次,弃去乙醚层。向水层中加入 20 ml 水饱和正丁醇萃取 3 次,合并正丁醇层,水浴挥干,用适量的甲醇将其溶解,并定容至 10 ml,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2 总皂苷的测定

样品溶液中总皂苷参照国家标准(GB/T19506-2009)^[9]方法,以 Re 为对照品测定,香草醛-冰醋酸显色,紫外-可见分光光度法测定总皂苷含量。结果得标准曲线方程为 $y=64\ 709x-94\ 015$ (y 为峰面积, x 为质量浓度, $r=0.999\ 8$),线性范围为 1.6~50 μg/ml。经方法学考察,精密度(RSD=1.07%, $n=5$)和准确度(平均回收率为 101.9%, RSD=0.89%, $n=6$)均符合相关要求。

精密量取“2.1”项下制得的供试品溶液 100 μl,至具塞刻度试管中,置于氮气流中吹干,加入 5% 的香草醛冰醋酸溶液 0.2 ml、高氯酸 0.8 ml,摇匀,60 °C 水浴加热 10 min,冰水浴冷却 10 min,加入 5 ml 冰醋酸终止反应,于 550 nm 波长处测定吸光度并计算含量。结果,以水(0)和 20%、50%、70%、95% 乙醇溶液提取所得提取液中总皂苷含量分别为 1.177、1.220、1.513、1.687、0.451 mg/ml。当乙醇体积分数低于 70% 时,随着乙醇体积分数的增加,总皂苷含量增加;当乙醇体积分数增加至 95% 时,总皂苷含量降低。在水提取液中的总皂苷含量与 20% 乙醇提取液中的总皂苷含量接近,是 70% 乙醇提取液中总皂苷含量的 69%,是 95% 乙醇提取液中总皂苷含量的 2.6 倍。

2.3 皂苷单体的检测条件^[10]

样品中皂苷单体采用 Q-TOF LC/MS 分析检测。

色谱条件:色谱柱为 Sigma-Aldrich C₁₈ (50 mm×3.0 mm, 2.7 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱(0→5 min, 15%→19% B; 5→10 min, 19% B; 10→28 min, 19%→26% B; 28→38 min, 26%→60% B; 38→42 min, 60%→100% B);流速为 0.5 ml/min;进样量为 5 μl;柱温为 35 °C。

质谱条件:采用电喷雾电离源(ESI),负离子模式,扫描范围 m/z 200~1 500;雾化器温度为 300 °C;干燥气(N₂)流速为 9 L/min;干燥气温度为 350 °C;雾化器压力为 45 psi。

2.4 MS²法确定各物质的峰归属

选取 70% 乙醇溶液的人参提取液,以负离子模式对总皂苷进行检测,得提取物总离子流色谱图(TIC),详见图 1。

由图 1 可见,通过 HPLC 可以很好地分离溶液中的皂苷化合物,并由 MS² 获取化合物分子质量和结构信息,从而确定皂苷单体的种类和名称。以 Re 的 ESI-MS² 为例,说明图 1 中所标

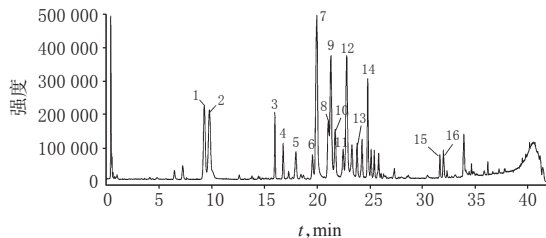


图 1 提取物的总离子流色谱图

1. Rg₁; 2. Re; 3. Rf; 4. F₃; 5. Rg₂; 6. Ra₁; 7. Rb₁; 8. Ro; 9. Rc; 10. Ra₂; 11. mRc; 12. Rb₂; 13. mRb₂; 14. Rd; 15. 20(S)-Rg₃; 16. 20(R)-Rg₃

Fig 1 TIC of extract

1. Rg₁; 2. Re; 3. Rf; 4. F₃; 5. Rg₂; 6. Ra₁; 7. Rb₁; 8. Ro; 9. Rc; 10. Ra₂; 11. mRc; 12. Rb₂; 13. mRb₂; 14. Rd; 15. 20(S)-Rg₃; 16. 20(R)-Rg₃

记的 16 种人参皂苷单体的碎裂规律,即提取液中皂苷的鉴定依据。图 2 所示即是在负离子模式下峰 2 的 ESI-MS 图,图 3 是 m/z 945.54 离子的 ESI-MS² 图。

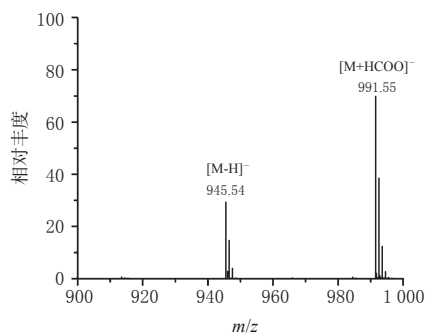


图 2 Re 的 ESI-MS 图

Fig 2 ESI-MS spectrum of Re

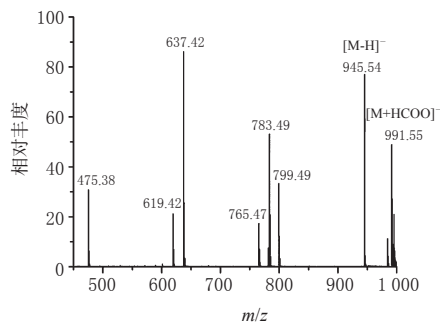


图 3 m/z 945.54 离子的 ESI-MS² 图

Fig 3 ESI-MS² spectrum of m/z 945.54 ion

m/z 991.55 与 m/z 945.54 相差 45 Da,由于采用负离子模式检测,推测 m/z 991.55 可能是 $[M+HCOO]^-$ 峰, m/z 945.54 离子是准分子离子 $[M-H]^-$,可以初步推测其分子质量为 946 Da。从图 3 中观察到了 m/z 945.54、783.49、637.42 和 475.38 的子离子峰,分别对应于丢失 1~3 个六碳糖基。其中 m/z 475.38 离子是三醇型皂苷的特征碎片离子,与文献[11-12]和标准品的数据对照,可以确定峰 2 所对应的化合物为 Re。以相同的方法测定其他峰,可以鉴定出图 1 中 1~16 号色谱峰分别为 Rg₁、Re、Rf、F₃、Rg₂、Ra₁、Rb₁、Ro、Rc、Ra₂、mRc、Rb₂、mRb₂、Rd、20(S)-Rg₃ 和 20(R)-Rg₃。

在鉴定得到的 16 种皂苷单体中, Rg₁、Rf、Re、F₃、Rg₂ 是三醇型皂苷, Ra₁、Rb₁、Rc、Ra₂、Rb₂、Rd、Rg₃ 是二醇型皂苷, Ro 是齐墩果烷型皂苷, mRc 和 mRb₂ 是二醇型丙二酰基人参皂苷。

可以确定的人参皂苷有 16 个,与 70% 乙醇的人参提取液

相比,不同体积分数的乙醇提取液中各单体皂苷的含量有所变化,即色谱峰面积有所改变,在对TIC进行提取得到的提取离子色谱进行积分,得到不同体积分数乙醇提取液中各皂苷的峰面积,详见表1。

表1 人参皂苷结构式及不同提取溶剂中各皂苷的峰面积
Tab 1 Construction of ginsenoside and peak area of saponin monomer in different extract solvent

编号	皂苷单体	[M-H] ⁻ 或 [M+HCOO] ⁻	不同提取溶剂中的峰面积(×10 ⁴)							
			R ₁	R ₂	R ₃	水	20% 乙醇	50% 乙醇	70% 乙醇	95% 乙醇
1	R _{g₁}	845.49	OH	-O-glc	glc	4.18	4.29	4.73	6.85	1.68
2	R _e	945.54	OH	-O-glc-glc	glc	3.27	3.53	4.06	4.12	1.05
3	R _f	845.48	OH	-O-glc-glc	OH	1.00	0.92	1.14	1.45	0.35
4	F ₃	845.48	OH	-OH	-glc-rha	0.23	0.22	0.26	0.29	0.07
5	R _{g₂}	829.50	OH	-O-glc-glc	OH	0.60	0.59	0.62	0.69	0.18
6	R _{a₁}	1 209.62	-O-glc-glc	H	-glc-ara-xylyl	0.22	0.22	0.24	0.22	0.02
7	R _{b₁}	1 107.59	-O-glc-glc	H	-glc-glc	1.06	1.03	1.16	1.27	0.30
8	R _o	955.48	-glc-glc	H	-glc-glc	0.64	1.33	1.89	1.83	0.15
9	R _c	1 077.57	-O-glc-glc	H	-glc-ara	0.92	0.70	0.74	0.81	0.17
10	R _{a₂}	1 209.62	-O-glc-glc	H	-glc-ara-xylyl	0.59	0.53	0.57	0.54	0.06
11	mRc	1 163.59	-O-glc-glc (C ₃ H ₇ O ₃)	H	-glc-ara	0.62	1.35	2.46	1.78	0.15
12	R _{b₂}	1 077.57	-O-glc-glc	H	-glc-ara	0.66	0.64	0.64	0.73	0.16
13	mRb ₂	1 163.59	-O-glc-glc (C ₃ H ₇ O ₃)	H	-glc-ara	0.62	1.24	2.23	1.64	0.16
14	R _d	991.54	-O-glc-glc	H	-glc	1.32	1.33	1.42	1.32	0.40
15	20(S)-R _{g₃}	829.49	-O-glc-glc	H	OH	0.21	0.04	0.02	0.03	0.07
16	20(R)-R _{g₃}	829.49	-O-glc-glc	H	OH	0.57	0.09	0.06	0.13	0.24

由表2可知,当乙醇体积分数低于70%时,根据“相似相溶”原则,大多数皂苷在提取液中的含量^[13]随着乙醇体积分数的增加而增加;而当乙醇体积分数增加到95%时,皂苷含量降低,这与总皂苷的测定结果一致。

R_{g₁}、R_f、R_e、F₃、R_{g₂}为三醇型皂苷,在提取溶液中乙醇体积分数由水(0)增加到70%时,其含量逐渐增加,当乙醇体积分数增加至95%时含量又有所降低。其中R_{g₁}在70%的乙醇溶液中的含量增加最明显,而其余3种虽有增加但变化不大。原因可能是5种皂苷在C₃、C₆、C₂₀位均存在羟基,而R_e、F₃和R_{g₂}均存在葡萄糖和鼠李糖连接的基团,R_{g₁}却是在C₆和C₂₀位分别连接了2个葡萄糖,可能这种2个葡萄糖分在两端的连接方式对皂苷的极性影响较大,从而影响其含量的变化。

二醇型皂苷的含量变化跟乙醇体积分数变化关系并不呈一定的规律性。其中,R_{b₁}、R_{b₂}在70%乙醇中含量最高,初步分析应该是与结构中2个葡萄糖链接的基团有关;而R_{g₃}、R_{a₂}、R_c在水中含量最高,原因可能是C₃位均存在glc(2-1)glc的结构,此结构对皂苷的极性影响导致其极性较大而在水中的含量最高。R_{a₁}、R_{a₂}、R_{b₂}、R_d在不同的溶剂中其含量变化却不大,四者均含有2个葡萄糖链接基团的结构,根据“相似相溶”原理,可能是这4种化合物在其他位置上连接的不同糖基导致其溶解性不同而致使含量变化也不同。

Ro、mRb₂、mRc 3种皂苷在乙醇体积分数为50%时的含量最高,其中Ro为齐墩果烷型皂苷,而mRb₂、mRc均为丙二酰二醇型皂苷,推测其溶解行为一致可能源于丙二酰基的贡献。

3 讨论

谢丽玲等^[9]以75%乙醇为最优提取工艺得到的皂苷含量

最高;刘继菊^[4]在优化人参总皂苷的提取条件时考察乙醇体积分数为40%~100%的提取效果,结果显示60%乙醇时效果最好;毛祖林等^[5]则以70%乙醇溶液为提取溶剂时人参皂苷提取率高。上述的研究结果表明,总皂苷含量在不同体积分数乙醇中的含量有差异。由于皂苷种类不同生物间活性可能存在较大的差异,仅以提取到的总皂苷量对提取过程进行评价可能具有一定的片面性。此外,各皂苷单体在体内的吸收不同,若以皂苷单体进行评价会相对科学。本研究还就各单体结构分析了其可能存在的原因,这对于不同的试验需求提供了可靠的乙醇体积分数依据。

大多数皂苷单体在70%乙醇中含量最高,原因可能为“相似相溶”原理。70%乙醇与皂苷单体极性最接近。水提取液中所含有的皂苷虽然总量相对70%的乙醇提取液有所减少,但个别皂苷(如R_{g₃})的含量却有所增加,而这部分的皂苷可能具有较高的生物活性,也可能是在提取过程中由于长时间的加热使得某些皂苷单体不稳定而降解使其含量有所升高。

二醇型皂苷跟三醇型皂苷在不同体积分数乙醇间提取率相差较大,可能是醇羟基的影响,但二醇型皂苷中各单体的提取率变化却没有呈现一定的规律,对于其具体的原因还有待再作考察。

通过Q-TOF LC/MS技术,各皂苷单体能够得到很好的定性定量分析;提取其分子离子峰得到峰面积进行相对定量分析,可为以后的试验提供便利条件。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:8.
- [2] 李慧,刘淑莹,王冰. 人参皂苷对HPA轴作用的研究进展[J]. 药学学报, 2014, 49(5):569.
- [3] 谢丽玲,任理,赖县生,等. 红参中人参总皂苷的提取纯化工艺研究[J]. 中药材, 2009, 32(10):1 602.
- [4] 刘继菊. 人参总皂苷提取工艺条件优化研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(14):200.
- [5] 毛祖林,李晓波,龚文明. 人参皂苷提取工艺优选[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11):2 762.
- [6] 蒋瑶,褚燕斌,孔荔,等. RP-HPLC法测定含银杏化妆品中槲皮素的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(9):1 243.
- [7] 越皓,皮子凤,赵宇峰. 电喷雾串联质谱分析附子炮制中的化学成分变化[J]. 分析化学, 2007, 35(7):959.
- [8] 杜芹芹,张旭,宋凤瑞. 人参与附子、黄连配伍的HPLC-ESI-MS研究及抗氧化活性测定[J]. 高等学校化学学报, 2010, 31(7):1 332.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局. 地理标志产品 吉林长白山人参 GB/T19506-2009[S]. 北京:中国标准出版社, 2009:37-38.
- [10] 郭迎迎,吴巍,秦秋杰,等. 人参皂苷Rd酸水解产物的RRLC-Q-TOF MS研究[J]. 质谱学报, 2014, 35(1):79.
- [11] 王宇光,王超,梁乾德,等. 十八反中藜芦与人参配伍化学成分变化的UPLC/Q-TOF MS研究[J]. 中国科学, 2011, 41(10):925.
- [12] Sun J, Wu W, Guo Y, et al. Pharmacokinetic study of ginsenoside Rc and simultaneous determination of its metabolites in rats using RRLC-Q-TOF-MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2013.08.015.
- [13] 张旭,王丽娜,宋凤瑞,等. 液质联用测定人参五灵脂、莱菔子配伍的人参皂苷[J]. 分析化学, 2007, 35(4):559.

(收稿日期:2015-02-26 修回日期:2015-05-15)

(编辑:刘 萍)