

UFLC/Q-TOF-MS 结合主成分分析法考察人参与 黄连共煎前后人参皂苷类成分的变化

单晨啸, 文红梅, 于生, 柴川, 崔小兵*
(南京中医药大学药学院, 南京 210043)

[摘要] 目的:利用超快速液相-四级杆-飞行时间串联质谱(UFLC/Q-TOF-MS)结合主成分分析法考察人参-黄连共煎前后人参皂苷类成分的变化。方法:采用UPLC T3 C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相0.3%甲酸-0.3%甲酸乙腈梯度洗脱,负离子模式下采集质谱数据,应用Markview 1.2.1等软件进行主成分分析(PCA),以黄连水煎液为空白,比较人参水煎液与人参-黄连共煎中人参皂苷类成分的变化。结果:3种溶液中发现10个差异性人参皂苷类化合物,其中齐墩果酸和2个未知化合物含量显著上升,20-葡萄糖 Rf 和人参皂苷 Rf, Ra₃, Rb₁, Ra₂, Rb₃, Rs₂ 含量显著下降。结论:负离子模式下方法能很好区分共煎前后人参皂苷类成分的变化,提示人参皂苷类成分水解生成的齐墩果酸型苷元可能是人参与黄连共煎后的物质基础。

[关键词] 超快速液相-四级杆-飞行时间串联质谱; 人参; 黄连; 人参皂苷类成分

[中图分类号] R283.6; R284.1; R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0024-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010024

Evaluation of Ginsenosides Change Before and After Co-decoction of Ginseng Radix et Rhizoma and Coptidis Rhizoma by UFLC/Q-TOF-MS and Principal Component Analysis SHAN Chen-xiao, WEN Hong-mei, YU Sheng, CHAI Chuan, CUI Xiao-bing* (School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210043, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate change of ginsenosides before and after co-decoction of Ginseng Radix et Rhizoma and Coptidis Rhizoma by ultra-flow liquid chromatography couple with quadrupole-time-of-flight mass-spectrometry (UFLC/Q-TOF-MS) and principal component analysis (PCA). **Method:** Chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC T3 C₁₈ column with a gradient elution of water-acetonitrile (containing 0.3% formic acid). Mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector under negative ion mode. Difference of co-decoction of Ginseng Radix et Rhizoma and Coptidis Rhizoma, Ginseng Radix et Rhizoma decoction, Coptidis Rhizoma decoction (blank) were classified by PCA with Markview 1.2.1 and other softwares. **Result:** Ten very different compound in three groups were found, contents of oleanolic acid and two unknown compounds significantly increased, while contents of 20-glucose-Rf, ginsenoside Rf, Ra₃, Rb₁, Ra₂, Rb₃, Rs₂ significantly decreased. **Conclusion:** Samples of three groups are well classified by PCA in negative ion mode, it indicates that deglycosylation of ginsenosides may be material basis of co-decoction of Ginseng Radix et Rhizoma and Coptidis Rhizoma.

[Key words] UFLC/Q-TOF-MS; Ginseng Radix et Rhizoma; Coptidis Rhizoma; ginsenosides

人参-黄连药对源自《万病回春》^[1],功效补气 血胰岛素等药理作用,被广泛用于治疗心衰、糖尿
养阴、清热燥湿,具有增强免疫、改善循环系统、调节 病^[2]。人参中主要成分为人参皂苷类,此类成分与

[收稿日期] 20140421(016)

[基金项目] 南京中医药大学青年自然科学基金项目(12XZR21);南京中医药大学中药学一级学科开放课题(2011ZYX2-004);南京中医药大学基础研究与重点培育专项(10XJC07)

[第一作者] 单晨啸, 硕士, 助理实验师, 从事药物代谢及其组学研究, Tel:13813986514, E-mail: thomastiger@163.com

[通讯作者] * 崔小兵, 博士, 高级实验师, 从事中药炮制及新药质量标准研究, Tel:025-85811838, E-mail: xiaobingcui@163.com

人参-黄连药对的疗效一致^[3-6]。超高速液相色谱(UFLC)-四极杆飞行时间串联质谱(Q-TOF-MS)联用技术集快速分离能力和高质量、高分辨定性能力为一体,已成为中药成分研究的有效手段之一^[7-9]。本实验以人参-黄连水煎液为研究对象,在尽量保留水煎液全组分的前提下,通过主成分分析法考察人参-黄连共煎液、人参水煎液及黄连水煎液中人参皂苷类成分的差异性,为人参-黄连共煎前后化学成分变化及该药对的药效物质研究提供参考。

1 材料

LC-20AD型快速液相(DGU-20A3型脱气装置,SIL-20A XR型自动进样器,CTO-20AC型柱温箱,日本岛津公司),Triple Q-TOF 5600型质谱仪(美国AB Sciex公司,配备电喷雾离子源系统,数据采集和处理分别采用Analyst TF 1.6和Markview 1.2.1软件)。人参(批号100410,120510,130310)、黄连(批号100910,120710,130810)均购自安徽丰源铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学王春根教授鉴定,分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根,毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎。人参皂苷 Re, Rb₁, Rg, Rf 对照品(批号分别为110703-200424, 110704-200217, 110754-200320, 110743-200421, 110731-200318, 中国食品药品检定研究院),乙腈、甲酸为质谱纯,水为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 提取液的制备 取人参、黄连饮片各25 g,混合,冷水浸泡30 min,加8.5倍量水提取2次,每次均保持沸腾30 min,过滤,浓缩,加水定容至250 mL,得人参-黄连水提液(生药量按人参计0.1 g·mL⁻¹),平行制备6份。人参水提液、黄连水提液同法各平行制备6份。经方法学验证^[7],该方法人参总皂苷提取率>95%。

2.2 色谱条件 ACQUITY UPLC T₃ C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm,美国Waters公司),流动相0.3%甲酸(A)-0.3%甲酸乙腈(B)梯度洗脱(0~5 min,10%~40% B;5~12 min,40% B;12~14 min,40%~80% B;14~18 min,80% B),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温40℃,进样量2 μL。

2.3 质谱条件 采用TOF MS-IDA-MS/MS模式,负离子检测模式,喷雾电压-4 500 eV,离子源温度(TEM)500℃,去簇电压(DP)-70 eV,雾化气(N₂)55 psi,辅助气(N₂)413.7 kPa,气帘气(N₂)275.8 kPa,TOF MS扫描范围 *m/z* 100~1 500,IDA条件下设置为碰撞电压-45 eV,碰撞电压差20 eV,开启动

态背景扣除。

2.4 供试品溶液的制备 取人参-黄连共煎液1 mL与乙腈按1:1涡旋3 min,于12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液进样。人参水提液、黄连水提液的供试品溶液同法制备。

2.5 数据分析 利用Analyst TF 1.6软件采集数据,运用Markview 1.2.1软件进行峰提取、峰对齐及归一化等处理,利用主成分分析(principal component analysis,PCA)找出人参-黄连共煎液与人参水提液、黄连水提液的差异化合物,结合对照品和质谱数据库检索,对潜在的化学标记物进行快速鉴定。在负离子模式下分别检测人参-黄连共煎液、人参水提液及黄连水提液动态背景扣除图谱,见图1,结果表明各色谱峰峰形对称,分离度良好。人参-黄连共煎液与人参水提液、黄连水提液图谱存在差异。

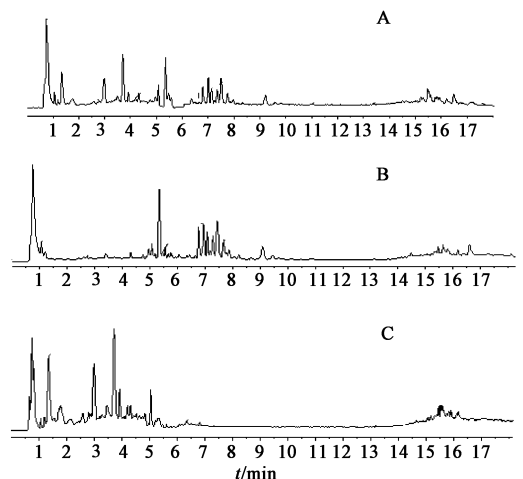


图1 负离子模式下人参-黄连共煎液(A)、人参水提液(B)和黄连水提液(C)总离子流

Fig. 1 Total ionic chromatograms of Ginseng Radix et Rhizoma-Coptidis Rhizoma co-decoction (A), Ginseng Radix et Rhizoma decoction (B) and Coptidis Rhizoma decoction (C)

由PCA(图2)及各样品的谱图信息(保留时间、一级、二级质谱等)可知,人参-黄连共煎液、人参水提液和黄连水提液能明显区分开,表明人参-黄连共煎液中人参的化学物质发生了较明显改变(人参皂苷类为主),且与黄连水提液存在明显区别。

通过对人参-黄连共煎液、人参水提液和黄连水提液的载荷矩阵图中各个变量进一步分析,以人参皂苷类成分为研究对象,寻找影响人参-黄连共煎前后的标记物。载荷矩阵图(图3)中各点表示保留时间和 *m/z* 质荷比的变量,其与中心点的距离远近表示该变量为样品组分型做出的贡献大小,偏离越远的点,其在不同样品中含量变化越大。结果显示人

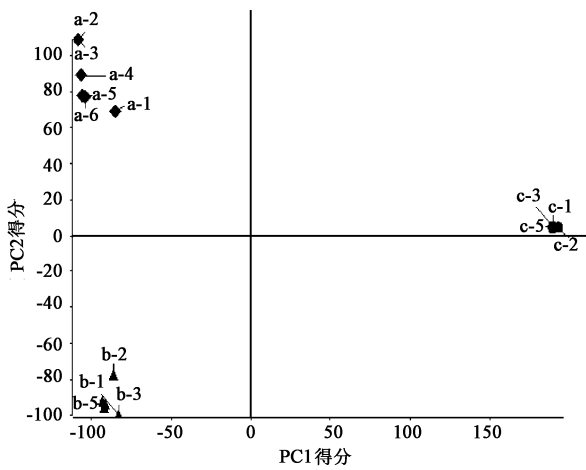


图 2 人参黄连共煎液(a)、人参水提液(b)和黄连水提液(c)的PCA得分

Fig. 2 PCA scores plot of Ginseng Radix et Rhizoma-Coptidis Rhizoma co-decoction (a), Ginseng Radix et Rhizoma decoction (b) and Coptidis Rhizoma decoction (c) under negative ion mode

参与黄连共煎前后相比(除去黄连水提液的干扰),差异显著的化合物有 10 个,见表 1。通过一级、二级高分辨质谱的数据分析,并结合对照品图谱和文献资料研究^[10-12],确定了 8 个具有显著差异性人参皂苷类化合物,齐墩果酸,20-葡萄糖 Rf,人参皂苷 Rf, Ra₃, Rb₁, Ra₂, Rb₃, Rs₂。

3 讨论

预试验对样品提取时间(30 min 和 1,2,3 h)、加水量(3,5,8,10 倍)和提取数(1,2,3 次)进行考察,最终选择加 8,5 倍量水提取 2 次,每次 30 min,该方法可使有效成分提取充分,保证了试验准确性。流动相考察时,采用不同酸度的甲酸甲醇-甲酸水和甲酸乙腈-甲酸水溶液,其中 0.3% 甲酸乙腈-0.3% 甲酸体系梯度洗脱样品分离度好,同时质谱离子化效率稳定。结合文献[13-14],综合人参皂苷类成分的性质考虑,负离子模式进行质谱扫描检测到的化

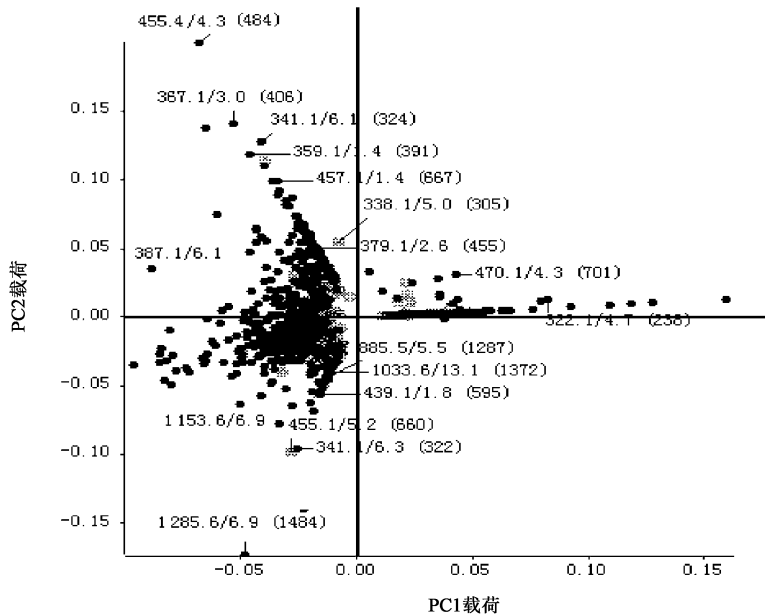


图 3 人参黄连共煎液、人参水提液和黄连水提液 PCA 载荷

Fig. 3 PCA loadings of Ginseng Radix et Rhizoma-Coptidis Rhizoma co-decoction, Ginseng Radix et Rhizoma decoction and Coptidis Rhizoma decoction under negative ion mode

合物数目远高于正离子模式,故采用负离子检测模式。

本文基于超高速液相色谱与飞行时间质谱联用技术提供的高选择性、高灵敏度、高质量质谱数据对人参-黄连共煎前后化学成分进行快速全面分析。结果表明人参-黄连共煎前后人参皂苷类成分

发生明显变化,齐墩果酸及 2 个未知化合物含量上升,20-葡萄糖基 Rf,人参皂苷 Rf, Ra₃, Rb₁, Ra₂, Rb₃, Rs₂ 含量下降,提示黄连提供的中碱性条件使人参皂苷类成分水解生成了齐墩果酸型苷元,该苷元可能是人参黄连共煎液发生药效的物质基础。

表 1 人参黄连共煎液负离子模式下分子离子峰鉴别

Table 1 Molecular ion peak identification of Ginseng Radix et Rhizoma-Coptidis Rhizoma co-decoction under negative ion mode

t_R/min	$[M-H]^-/m/z$			$[M-H+HCOOH]^-$ (相对分子质量偏差/ $\times 10^{-6}$)	分子式	化合物名称	趋势
	测得相对分子质量/Da	理论相对分子质量/Da	偏差/ppm				
1.4	359.099	359.098	2.1	-	$C_{15}H_{20}O_{10}$	未知化合物 I	↑
3.7	367.104	367.104	1.2	-	$C_{17}H_{20}O_9$	未知化合物 II	↑
4.3	455.352	455.352	0.3	-	$C_{30}H_{48}O_3$	齐墩果酸	↑
4.9	961.537	961.538	1.0	1 007.542(-0.1)	$C_{48}H_{82}O_{19}$	20-葡萄糖基 Rf	↓
6.8	799.483	799.485	-2.8	845.488(-1.2)	$C_{42}H_{72}O_{14}$	人参皂苷 Rf	↓
6.9	1 239.636	1 239.638	-1.5	1 285.630(-1.8)	$C_{59}H_{100}O_{27}$	人参皂苷 Ra ₃	↓
6.9	1 107.593	1 107.596	-2.4	1 153.599(-1.1)	$C_{54}H_{92}O_{23}$	人参皂苷 Rb ₁	↓
7.2	1 209.622	1 209.627	-4.3	1 255.628(-2.8)	$C_{58}H_{98}O_{26}$	人参皂苷 Ra ₂	↓
7.7	1 077.584	1 077.585	-0.7	1 123.588(-1.7)	$C_{53}H_{90}O_{22}$	人参皂苷 Rb ₃	↓
7.9	1 119.591	1 119.596	-3.9	1 165.597(-2.5)	$C_{55}H_{92}O_{23}$	人参皂苷 Rs ₂	↓

[参考文献]

[1] 谢文英,常学辉,张良芝,等.胃阴学说浅析[J].中国中医基础医学杂志,2008(7):483-484.

[2] 王翠娣,郭玉璞.实验性变态反应性神经炎动物模型的建立和病理特点[J].中华神经精神科杂志,1995,28(4):202-205.

[3] Yun T K, Lee Y S, Lee Y H, et al. Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C. A. Meyer and identification of active compounds[J]. J Korean Med Sci, 2001, 16 (Suppl):S6-18.

[4] Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds[J]. J Korean Med Sci, 2001, 16 (Suppl): S28-37.

[5] Kitagawa I, Yoshikawa M, Yoshihara M, et al. Chemical studies on crude drugs[J]. Yakugaku Zasshi, 1983, 103 (6):612-622.

[6] Liu W K, Xu S X, Che C T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line[J]. Life Sci, 2000, 67(11):1297-1306.

[7] Li S L, Lai S F, Song J Z, et al. Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(4):946-957.

[8] Li L, Luo G A, Liang Q L, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(1):66-72.

[9] Li S L, Song J Z, Qiao C, et al. UPLC-PDA-TOFMS based chemical profiling approach to rapidly evaluate chemical consistency between traditional and dispensing granule decoctions of traditional medicine combinatorial formulae[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(4):468-478.

[10] 王淑美,王瑞,梁生旺,等.胶束电动毛细管色谱法分离分析人参中人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Re[J].中药材, 2009, 32(7):1069-1071.

[11] Nah J J, Song J Y, Choi S, et al. Preparation of monoclonal antibody against ginsenoside Rf and its enzyme immunoassay [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (5):523-526.

[12] Fuzzati N. Analysis methods of ginsenosides [J]. J Chromatogr B, 2004, 8(1/2):119-133.

[13] 彭绪玲,付永慧,熊志立,等. HPLC 法测定石柱参药材及其片剂中 5 种人参皂苷的含量[J].沈阳药科大学学报, 2010, 27(1):48-51.

[14] 高俊杰,翟延君,王荣祥,等.石柱参中 8 种人参皂苷的含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8):989-991.

[责任编辑 刘德文]