

基于静电场轨道阱质谱技术对绞股蓝总皂苷 提取物化学成分的分析

何芋岐^{1,2}, 鲁艳柳^{1*}, 邱敏¹, 汪敏¹, 汪巍², 杨莉³, 王峥涛³

(1. 遵义医学院 基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州 遵义 563099;
2. 遵义医学院 药学院, 贵州 遵义 563099; 3. 上海中医药大学 中药研究所, 上海 201203)

[摘要] 目的:通过 UPLC-ESI-Orbitrap-MS 技术对绞股蓝总皂苷提取物的主要化学成分进行分析。方法:采用 Thermo Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱-色谱联用系统分析,以 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.9 μm)为固定相,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~2 min, 5% B; 2~15 min, 5%~95% B; 15~17 min, 95% B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 °C;质谱条件采用电喷雾离子化(ESI)方式,在负离子模式下,以 Full Scan/Targeted-ddMS² 扫描模式检测,研究绞股蓝总皂苷提取物的主要皂苷类化学成分。结果:通过与对照品比对、结合参考文献,分析多级质谱数据,根据化学成分的质谱碎片,推测色谱峰对应的化学结构,共归属 8 种具有原人参二醇型母核结构的绞股蓝皂苷,分别是绞股蓝皂苷 III, IV, VIII, XII, R_{G3}, R_{B2}, R_C, R_F。结论:该研究采用的方法简单、快速、灵敏,对绞股蓝总皂苷提取物中具有原人参二醇型母核结构的主要皂苷类进行了高分辨质谱分析,这一方法可以从定性分析的角度,对市售绞股蓝总皂苷提取物的质量进行初步快速鉴别。

[关键词] 绞股蓝; 总皂苷; 静电场轨道阱高分辨质谱系统

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0077-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190077

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1416.066.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 14:16

Qualitatively Analysis of Gypenosides with UPLC-ESI-Orbitrap-MS

HE Yu-qi^{1,2}, LU Yan-liu^{1*}, QIU Min¹, WANG Min¹, WANG Wei², YANG Li³, WANG Zheng-tao³

(1. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China;
2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China; 3. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the main chemical components in gypenosides extracts with UPLC-ESI-Orbitrap-MS technology. **Method:** Thermo Q Exactive quadrupole-rod - electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry - MS system was used and the chromatography separation was performed on Hypersil Gold C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 1.9 μm) with 0.1% formic acid solution (A) - acetonitrile (B) as the mobile phase for gradient elution (0-2 min, 5% B; 2-15 min, 5%-95% B; 15-17 min, 95% B). The flow rate was set at 0.3 mL·min⁻¹ and the column temperature was 40 °C. Electrospray ionization (ESI) source was applied and

[收稿日期] 20170322(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81402985, 81560673);上海市复方中药重点实验室(上海中医药大学)开放基金项目(2014OP01);贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字[2015]2158 号, 黔科合 JZ 字[2015]2010 号);贵州省留学人员择优资助项目[黔人项目资助合同(2015)03]

[第一作者] 何芋岐, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事药物分析与系统生物学研究工作, Tel: 0851-28642303, E-mail: HyqJeff@hotmail.com

[通讯作者] * 鲁艳柳, 博士, 副教授, 从事药物代谢与毒理学研究工作, Tel: 0851-28642303, E-mail: Yanliu.lu@foxmail.com

operated in Full Scan/Targeted-dd MS²/negative ion mode. **Result:** Eight gypenosides were identified based on the reference compounds, high resolution mass number and comparison between experimental data and published data. These compounds included gypenoside III, IV, VIII, XII, Rg₃, Rb₂, Rc, and Rf. **Conclusion:** The established method would be used to qualitatively and rapidly compare the quality of extract from *Gynostemma pentaphyllum* on sale.

[**Key words**] *Gynostemma pentaphyllum*; total saponins; UPLC-ESI-Orbitrap/MS

绞股蓝始载于《救荒草本》，味苦、微甘，性凉，主要分布在陕西、甘肃和长江以南各地，海拔 100 ~ 3 200 m 的山谷密林中、山坡疏林下或灌丛中^[1]。具有化痰止咳、健脾理气、益气活血、生津止渴、解毒利湿等功效，有“南方人参”的美誉^[2]。化学研究结果显示，绞股蓝含有皂苷类、黄酮类、氨基酸、糖类、维生素、无机元素等多种成分^[3-4]。其中，绞股蓝皂苷具有与人参皂苷相同的四环三萜达玛烷型结构，目前有报道称从绞股蓝中分离出的绞股蓝皂苷已达到 136 种之多^[5]，绞股蓝皂苷 III, IV, VIII, XII 结构分别与人参皂苷 Rb₁, Rb₃, Rd 和 F₂ 一致^[5]。药理学研究表明，绞股蓝皂苷是绞股蓝的主要有效成分，具有降血脂、保肝抗炎、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤及保护心脑血管等药理活性^[6-12]。随着研究的深入，对绞股蓝皂苷的关注越来越多，市场需求量也日益增加，绞股蓝总皂苷提取物的质量标准也急需建立。虽然有文献对绞股蓝总皂苷的指纹图谱进行研究^[13]，但是对于特征峰的化合物归属研究较少。本实验采用 Q Exactive 高分辨质谱系统，针对市场上出售的绞股蓝总皂苷，对其主要成分进行了高分辨质谱分析，这一方法可以从定性分析的角度进行市售绞股蓝总皂苷提取物质量的初步快速鉴别，为绞股蓝总皂苷提取物质量标准的建立和开发提供进一步的参考。

1 材料

Thermo Scientific Q Exactive 型四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统，Thermo Ultramate 3000 型超高效液相色谱系统，Mass Frontier 7.0 软件分析系统（美国 Thermo Fisher 公司）；Milli-Q 系列超纯水系统（美国 Millipore 公司）；XS205 型 1/10 万电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；KQ-500DV 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

对照品人参皂苷 Rb₁（批号 PCS0759）购自上海融禾医药科技发展有限公司，纯度 ≥ 98.0%。绞股蓝对照药材（批号 DZYC-0443，葫芦科绞股蓝植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 的干燥根状茎）购自贵州迪大科技有限责任公司。绞股蓝总皂苷提取物

（批号 ZL20150624, 150522, CY150620）分别购至江苏南京泽朗生物科技有限公司、陕西中鑫生物技术有限公司以及广东康美（普宁）中药材专业市场。乙腈、甲醇、甲酸（质谱纯，美国 Sigma-Aldrich 公司）。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Rb₁ 对照品 1.151 mg 置于 100 mL 量瓶中，加入适量甲醇溶解，定容至刻度，摇匀，得到质量浓度为 0.011 51 g·L⁻¹ 对照品储备液溶液。

2.2 提取物供试品溶液的制备 称取绞股蓝总皂苷提取物约 0.1 g，置于具塞锥形瓶内，加入 80% 甲醇 10 mL，超声（功率 100 W，频率 40 kHz）40 min，冷却至室温，补足质量，离心，取上清液过 0.22 μm 滤膜，即得。

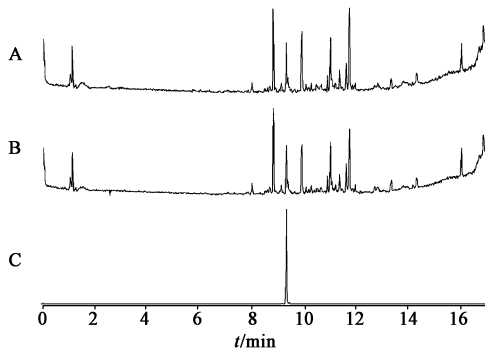
2.3 对照药材样品溶液制备 称取绞股蓝对照药材 1 g，用 8 倍量的 80% 乙醇加热回流提取 3 次，每次 3 h，合并后浓缩至无醇味，加适量水混悬，再用二氯甲烷、正丁醇分别萃取。取绞股蓝正丁醇部分浓缩、冻干，加入适量甲醇超声溶解，过 0.22 μm 滤膜，即得。

2.4 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统的分析条件 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱（2.1 mm × 150 mm, 1.9 μm），流动相 0.1% 甲酸水溶液（A）-乙腈（B）梯度洗脱（0 ~ 2 min, 5% B；2 ~ 15 min, 5% ~ 95% B；15 ~ 17 min, 95% B），流速 0.3 mL·min⁻¹，柱温 40 °C，进样量 2 μL。

采用 ESI 离子化方式，雾化温度 300 °C，离子传输管温度 350 °C，鞘气 35 arb，辅助气 10 arb，扫描模式 Full Scan/Targeted-ddMS²/负离子扫描，分辨率采用 MS Full Scan 1/70 000，MS/MS Full Scan 1/15 000。

采用 UPLC-ESI-Orbitrap-MS 技术对绞股蓝总皂苷提取物样品溶液、人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液和绞股蓝对照药材样品溶液，分别进行分析，负离子模式下总离子流图见图 1，并通过比较绞股蓝总皂苷提取物样品溶液（图 1-B）与对照药材正丁醇

萃取部位(图 1-A)的总离子流图,进行特征峰来源归属研究。



A. 对照药材; B. 提取物; C. 人参皂苷 Rb₁

图 1 绞股蓝对照药材、绞股蓝总皂苷提取物和人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液负离子模式下总离子流

Fig. 1 Total ion chromatogram of control herb, extract from *Gynostemma pentaphyllum* rhizome and ginsenoside Rb₁ in negative ion mode

具有原人参二醇型母核结构的绞股蓝皂苷 III, IV, VIII 等 8 种皂苷的结构见图 2 和表 1。根据化合物精确相对分子质量、碎片信息、对照品及参考相关文献,指认此 8 个具有原人参二醇型母核结构的绞股蓝皂苷特征峰归属,具体结果见图 3 和表 2。

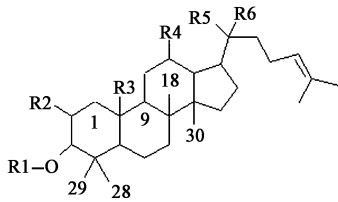


图 2 原人参二醇型绞股蓝皂苷的母核结构

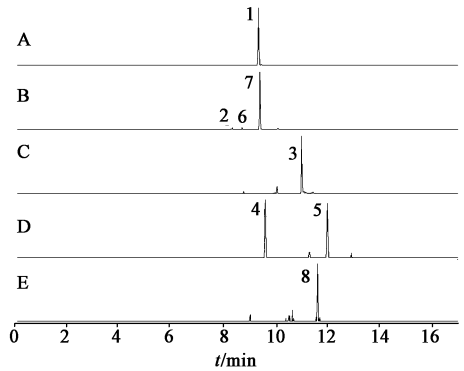
Fig. 2 Protopanaxadiol-type skeleton of gypenoside from *Gynostemma pentaphyllum* rhizome

表 1 原人参二醇型绞股蓝皂苷的结构

Table 1 Saponin structures of the protopanaxadiol type in *Gynostemma pentaphyllum* rhizome

名称	分子式	R1	R5	R6	参考文献
Rb ₁ (Gyp III)	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	glu(2→1)	glu O-glu(6→1)	glu CH ₃	[14]
Rb ₃ (Gyp IV)	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	glu(2→1)	glu O-glu(6→1)	xyl CH ₃	[14]
Rd (Gyp VIII)	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	glu(2→1)	glu O-glu	CH ₃	[14]
F ₂ (Gyp XII)	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	glu	O-glu	CH ₃	[14]
Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	glu(2→1)	glu OH	CH ₃	[15]
Rb ₂	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	glu(2→1)	glu O-glu(6→1)	ara CH ₃	[16]
Rc(F)	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	glu(2→1)	glu O-glu(6→1)	ara CH ₃	[17]
Rf	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄ *	H	OH	CH ₃	[17]

注:() 中为别名;Gyp 表示绞股蓝皂苷;F 表示呋喃糖;* 表示 C-6 O-glu(2→1)glu;R2 均为 H,R3 均为 CH₃,R4 均为 OH。



A. *m/z* 1 107.595 7; B. *m/z* 1 077.585 9; C. *m/z* 945.544 1; D. *m/z* 783.490 8; E. *m/z* 799.486 6; 1. C₅₄H₉₂O₂₃; 2. C₅₃H₉₀O₂₂; 3. C₄₈H₈₂O₁₈; 4. C₄₂H₇₂O₁₃; 5. C₄₂H₇₂O₁₃; 6. C₅₃H₉₀O₂₂; 7. C₅₃H₉₀O₂₂; 8. C₄₂H₇₂O₁₄

图 3 绞股蓝总皂苷提取物选择离子

Fig. 3 Selective ion chromatogram of extract from *Gynostemma pentaphyllum* in negative ion mode

表 2 绞股蓝总皂苷提取物的 UPLC-ESI-Orbitrap-MS 负离子模式下的数据及化合物归属

Table 2 Data and compounds attribution of extract from *Gynostemma pentaphyllum* by UPLC-ESI-Orbitrap-MS

No.	<i>t_R</i> /min	分子式	<i>m/z</i>			名称	参考文献
			测得值	理论值	δ		
1*	9.35	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 107.595 7	1 107.594 6	0.993 1	Rb ₁	[14]
2	8.34	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.585 8	1 077.584 0	1.670 4	Rb ₃	[14]
3	11.01	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.544 1	945.541 7	2.538 2	Rd	[14]
4	9.61	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.490 2	783.488 9	1.659 2	F ₂	[14]
5	11.99	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.490 8	783.488 9	2.425 1	Rg ₃	[15]
6	8.73	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.583 9	1 077.584 0	-0.092 80	Rb ₂	[16,18]
7	9.40	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.585 9	1 077.584 0	1.763 2	Rc	[17-18]
8	11.61	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799.486 6	799.483 8	3.502 3	Rf	[17]

注:* 表示与对照品比对。

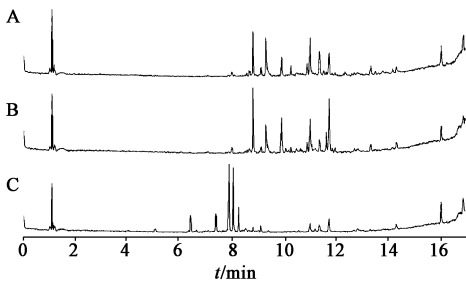
1 号峰(t_R 9.35 min)在绞股蓝对照药材和绞股蓝总皂苷提取物中均存在,有 m/z 1 107 $[M - H]^-$ 峰,通过比较对照品以及参考文献[14],推测 1 号峰为人参皂苷 Rb₁。

3 号峰(t_R 11.01 min),8 号峰(t_R 11.61 min)在绞股蓝对照药材和绞股蓝总皂苷提取物中均存在,分别有 m/z 945 $[M - H]^-$ 峰和 m/z 799 $[M - H]^-$ 峰,通过对比精确相对分子质量、碎片离子以及参考文献[14, 17],推测 3 号峰为人参皂苷 Rd,8 号峰为人参皂苷 Rf。

4 号峰(t_R 9.61 min)和 5 号峰(t_R 11.99 min)在绞股蓝对照药材和绞股蓝总皂苷提取物中均存在,且都有 m/z 783 $[M - H]^-$ 峰,二者属于同分异构体,根据二者的离子碎片以及参考文献[14-15],推测 4 号峰为人参皂苷 F₂(碎片离子 m/z 458.862 4),5 号峰为人参皂苷 Rg₃(碎片离子 m/z 459.883 9)。

2 号峰(t_R 8.34 min),6 号峰(t_R 8.73 min)和 7 号峰(t_R 9.40 min)在绞股蓝对照药材和绞股蓝总皂苷提取物中均存在,且都有 m/z 1 077 $[M - H]^-$ 峰,三者属于同分异构体,根据三者的离子碎片、极性以及参考文献[14, 16-18],推测 2 号峰为人参皂苷 Rb₃,6 号峰为人参皂苷 Rb₂,7 号峰为人参皂苷 Rc。

将从市场上收购的 3 批绞股蓝总皂苷提取物分别制备样品溶液,并进行样品分析,所得总离子流图见图 4。如图所示,市场上购买的绞股蓝总皂苷提取物的化学成分差异较大。



A. 提取物 I; B. 提取物 II; C. 提取物 III

图 4 各绞股蓝总皂苷提取物负离子模式下总离子流

Fig. 4 Total ion chromatogram of extract from *Gynostemma pentaphyllum* in negative ion mode

3 讨论

本研究分别考察了不同的提取方法、提取溶剂和不同的流动相,最终确定绞股蓝对照药材和总皂苷提取物的样品制备方法,以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相各色谱峰峰形及分离度最好。绞股蓝皂苷类成分在负离子模式下响应较好,因此采用负离

子模式进行检测,从而获得绞股蓝皂苷类化学成分全面的质谱信息。

由图 4 可以发现,市场上购买的绞股蓝总皂苷提取物的化学成分差异较大,建立针对绞股蓝总皂苷提取物的质量标准十分必要。目前有报道称从绞股蓝中分离出的绞股蓝皂苷已达到 136 种之多^[5],加上对照品价格昂贵,很难建立对绞股蓝总皂苷提取物全面的定性定量质量控制标准。然而,绞股蓝中含有的 8 种具有原人参二萜型母核结构的绞股蓝皂苷 III, IV, VIII, XII, Rg₃, Rb₂, Rc, Rf 占绞股蓝总皂苷含量的 25%,而且是首次在五加科植物以外的植物中被发现^[19],若能针对这 8 种皂苷建立质控方法,将能有效的评价和控制绞股蓝总皂苷提取物的质量。本研究采用 UPLC-ESI-Orbitrap/MS 可以获得化学成分的多级质谱碎片,从而推测其化学组成,为绞股蓝总皂苷提取物的化学成分分析和质量标准建立提供了一种快速有效的方法。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 5 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999: 532.
- [2] 秦双双,李海涛,汪周勇,等. 绞股蓝属植物亲缘关系初步分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1681-1687.
- [3] 朴香兰,吴倩. 绞股蓝研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1758-1760.
- [4] 张钊,李鹏婧,杨洋. 绞股蓝研究综述[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 193-196.
- [5] 沈宏伟,肖彦春,车仁国,等. 绞股蓝化学成分研究的现状[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1561-1564.
- [6] HUANG T H, Tran V H, Roufogalis B D, et al. A naturally occurring gynosaponin, PPAR-alpha dependently inhibits LPS-induced tissue factor expression and activity in human THP-1 monocytic cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 218(1): 30-36.
- [7] CHEN M H, CHEN S H, WANG Q F, et al. The molecular mechanism of gypenosides-induced G₁ growth arrest of rat hepatic stellate cells [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117(2): 309-317.
- [8] Circostac C, De P R, Occhiuto F. Cardiovascular effects of the aqueous extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino [J]. Phytomedicine, 2005, 12(9): 638-643.
- [9] HUI C, LIANG Q L, GE G Q. Gypenoside attenuates β amyloid-induced inflammation in N9 microglial cells via SOCS1 signaling [J]. Neural Plasticity, 2016, 2016(3): 636-707.
- [10] YE Q, ZHU Y, YE S, et al. Gypenoside attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice by inhibition of ERK

- signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11 (4): 1499-1505.
- [11] ZHENG K, LIAO C, LI Y, et al. Gypenoside L, isolated from *Gynostemma pentaphyllum*, induces cytoplasmic vacuolation death in Hepatocellular Carcinoma Cells through ROS mediated unfolded protein response [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(8):1702-1711.
- [12] LIU Y H, LIU Y F, GUO X X. Current studies on anti-endotoxic chemical components of traditional Chinese medicine in China [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22 (12):1071-1077.
- [13] 辛祎, 李山姗, 王淼, 等. 绞股蓝总苷片的指纹图谱及含量测定 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33 (3): 208-214.
- [14] Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, et al. Studies on the constituents of *Gynostemma pentaphyllum* MAKINO. I. structures of gypenoside I -X IV [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1983, 103(2):173-185.
- [15] QIN Z, ZHAO L, BI S, et al. Saponin constituents and resource of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Nat Prod Res Develop*, 1992, 4(1):83-98.
- [16] HU L H, CHEN Z L, XIE Y Y. Dammarane-type glycosides from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 44(4):667-670.
- [17] MA Y C, ZHU J, Benkrima L, et al. A comparative evaluation of ginsenosides in commercial ginseng products and tissue culture samples using HPLC [J]. *J Herbs Spices Med Plants*, 1995, 3(4):41-50.
- [18] 郑培和, 王英平, 肖盛元. 人参皂苷高效液相-质谱测试条件优化 [J]. *人参研究*, 2010, (4):5-6, 15.
- [19] LIU X, YE W, MO Z, et al. Five new ocotillone-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *J Nat Prod*, 2004, (67):1147-1151.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊,创刊于 1995 年 10 月,目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴,在中医药事业蓬勃发展的进程中,《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段。以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

①中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016 年版):影响力指数(CI)学科排序 3/122(中医药类 122 本期刊中排第 3 名);复合影响因子 1.319,学科排序 9/122;

②万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》: H 指标为 16, 总被引频次 15 664, 复合影响因子 1.620, 在中医药类 122 本期刊中排序分别为第 2, 2, 11 名;

③入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014 年版);

⑤入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊 2016 年版);

⑥被评为“RCCSE 中国权威学术期刊(A+)”(《中国学术期刊评价研究报告(武大版)(2017—2018)》)。