

液相色谱-电喷雾电离质谱与电子轰击质谱联用 筛选百合中的甾体皂甙

吉宏武¹, 丁霄霖¹, 陶冠军²

(1. 无锡轻工大学食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 无锡轻工大学测试中心, 江苏 无锡 214036)

摘要 利用高效液相色谱-电喷雾电离质谱联用仪(HPLC/ESI-MS)、电子轰击质谱(EI-MS)和半制备型高效液相色谱,从卷丹百合中筛选出了两种甾体皂甙,其中一种为含有 3 个糖基与提果皂甙元的甾体皂甙,另一种为含有 3 个糖基和薯蓣皂甙元的甾体皂甙。结果表明:在线的 HPLC/ESI-MS 能够准确快速地提供糖甙类化合物的分子质量和糖链部分的有益信息,但对甙元部分提供的信息极少;离线的 EI-MS 只需极少量(1 mg~2 mg)的纯品就能准确地提供甙元部分的有益信息,但很难获得糖甙的分子离子峰与糖链部分的信息,两者有机地结合起来能快速地从植物中筛选甾体皂甙。

关键词 高效液相色谱-电喷雾电离质谱;电子轰击质谱;甾体皂甙;百合

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-871X(2001)05-0403-04

1 前言

根据分子中所含甙元的性质,将皂甙分为甾体皂甙与萜类皂甙。甾体皂甙的甙元部分常含有一个螺旋甾烷的结构,所以它在质谱的断裂过程中有一些共同的规律。根据这一共同规律即可用质谱法快速地从植物中筛选出甾体皂甙。

百合是卫生部首批颁布的药食兼用植物之一,它不仅营养丰富,而且具有镇咳祛痰、宁心安神、补中益气 and 滋阴润肺等保健作用,因而开发出更多更好的百合保健食品是完全可行的。国家卫生部对第 3 代保健食品提出了“必须阐明其功能因子的实质”的要求,而百合的功能因子是什么,到目前为止,国内外报道极少。根据百合科富含甾体皂甙^[1]以及从百合中已分离出一些甾体皂甙的事实^[2~7],同时,结合近年来人们对皂甙生理功能认识的逐渐深入^[8~10]及药食百合与甾体皂甙均为苦味的特点,推测百合的保健功能可能与其中的甾体皂甙有密切关系。为了证实这一结论,从百合中分离出纯皂甙是此项工作的前提与基础。我们采用乙醇提取,一系列液-液萃取和 AB-8 大孔吸附树脂柱分离等方法,最后利用高效液相色谱-电喷雾电离质谱联用仪(HPLC/ESI-MS)、电子轰击质谱(EI-MS)和半制备 HPLC 等对卷丹百合的甾体皂甙进行了筛选,得到了两种甾体皂甙。

2 实验部分

2.1 实验材料

卷丹百合(购自江苏省宜兴市新庄镇)。将新鲜

百合清洗剥瓣,用 100 °C 的高压蒸汽在灭菌锅中处理 6 min~7 min,取出并摊开,室温下自然干燥至含水量约为 7%,然后用锤击式粉碎机粉碎,过 60 目筛,保存于双层塑料袋中,备用。

2.2 实验药品与仪器

提取所用的溶剂除乙醇为工业乙醇外,其他溶剂均为分析纯,用于 HPLC 流动相的溶剂均为色谱纯;AB-8 大孔吸附树脂(南开大学化工厂产品);GF₂₅₄硅胶(青岛海洋化工厂产品)。半制备 HPLC 仪包括 740 型数据处理器,2410 型折光指数检测器,510 型泵,所用的色谱柱为 Waters μ BondapakTM C₁₈柱(7.8 mm i. d. × 350 mm);Waters 公司的 Platform LCZ2000 HPLC/ESI-MS 仪;Finnigan MAT 公司的 MAT4610 EI-MS 仪。

2.3 皂甙提取物的制备

百合皂甙提取物的制备包括了乙醇抽提,石油醚、三氯甲烷和正丁醇等液-液萃取和柱色谱分离等一系列过程。正丁醇萃取液经真空浓缩至无醇味后,加适量的水并以 0.5 mol/L NaOH 调 pH 至 8,经 AB-8 大孔吸附树脂,先用水洗去糖分与部分色素,然后用乙醇解吸甾体皂甙。柱后流出物用薄层色谱法进行检测,硫酸-乙醇溶液(体积比为 9:1)作显色剂。柱后皂甙流出物经减压浓缩后,用乙醚-丙酮(体积比为 1:1)作沉淀剂,采用分步沉淀法获得皂甙提取物^[1~5]。

2.4 甾体皂甙元的制备

利用半制备型 HPLC 制备少许甾体皂甙。制备用的流动相为甲醇-水-甲酸(体积比为 55:45:0.15)

混合溶液,流速为 1.5 mL/min,进样量为 150 μ L。真空浓缩 HPLC 柱后的流出物至其原体积的 1/5 时,用 1.0 mol/L 的甲酸调 pH 至 2.5,然后回流 12 h。用 0.5 mol/L NaOH 调 pH 至中性,用等体积的乙醚萃取 3 次,合并乙醚相。乙醚相经氮气吹干即得甙体皂甙元。水相用于糖链组成的测定。

2.5 HPLC/ESI-MS 分析皂甙提取物

采用 Waters 公司的反相 C_8 色谱柱(150 mm \times 3.9 mm i.d., 5 μ m),流动相为乙腈和水,采用线性梯度洗脱,其程序为:15% 乙腈 $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 85% 乙腈,流速为 0.5 mL/min。进样量为 10 μ L。高效液相色谱的柱后流出物以 5 μ L/min 的速率经一个不锈钢的分流头导入电喷雾离子源,质谱仪以正离子状态采样,质谱条件依据采集的 $[M+H]^+$ 信号强度的稳定性来进行优化。

2.6 EI-MS 分析甙体皂甙元

采用直接爆破进样方式,即将样品直接点在探头上,探头电流的上升速度为 50 mA/s,最大允许电流为 1000 mA;电子倍增器电压为 1500 V;离子源电压为 40 eV;灯丝电流为 0.25 mA。

3 结果与讨论

3.1 HPLC/ESI-MS 分析中质谱条件的确定

HPLC/ESI-MS 分析甙体皂甙以反相 C_8 作固定相,乙腈和水作流动相,采用梯度洗脱能使百合的醇提取物中的甙体皂甙得到基线分离(如图 1 所示)。分析中所使用的离子源来自一根作为脱残留溶剂用的不锈钢毛细管。毛细管的温度设在 120 $^{\circ}$ C,这个温度不会使甙体皂甙分子发生热裂解,易得到分子离子峰,便于确定分子的分子质量。作为检测正离子用的离子源电压设在 3.88 kV,这个电压能使电喷雾质谱仪给出稳定的喷雾,且产生最丰富的 $[M+H]^+$ 信号。

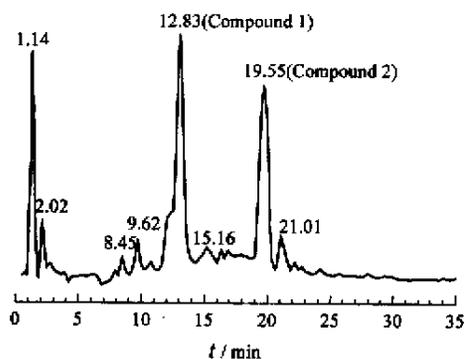


图 1 HPLC/ESI-MS 分析皂甙提取物的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of saponin extract by using HPLC/ESI-MS

3.2 两种主要化合物的鉴别

图 2 为图 1 中两种主要化合物所对应的正离子质谱图。化合物 1 的正离子质谱图(图 2-a)给出了 m/z 为 887.3 的 $[M+H]^+$ 分子离子峰,所以化合物 1 的相对分子质量应为 886,除此之外,在图 2-a 中还看到 m/z 为 725.4, 579.3, 417.3, 273.4 和 255.3 的离子峰。化合物 2 的正离子质谱图(图 2-b)给出了 m/z 为 885.4 的 $[M+H]^+$ 分子离子峰,所以它的相对分子质量应为 884;除此之外,在图 2-b 中还看到 m/z 为 723.4, 577.3, 415.4, 271.3 和 253.3 的离子峰。从两种化合物的正离子质谱图可以看出,在 887.3 与 417.3 之间(图 2-a)及 885.4 与 415.4 (图 2-b)之间断裂的 3 个碎片,有两个碎片的相对分子质量为 162,一个碎片的相对分子质量为 146。162 正好为六碳糖脱水的碎片,而 146 正好为鼠李糖脱水后的碎片,由此可以说明这两种化合物可能均为糖甙类化合物。根据百合科植物中发现的甙体皂甙的相对分子质量均在 700 ~ 1500^[2~7,10],甙体皂甙元的相对分子质量在 400 ~ 450 的规律^[11],这两种化合物非常像甙体皂甙化合物。

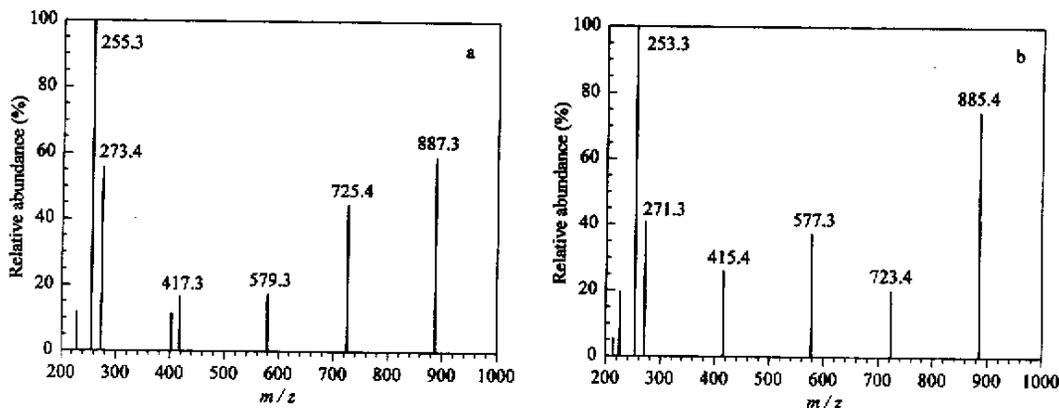


图 2 图 1 中化合物 1 (a) 和化合物 2 (b) 的 ESI-MS 图

Fig. 2 ESI-MS spectra of compound 1 (a) and compound 2 (b) in Fig. 1

为了证实推断的正确性,按“2.4”节的方法由化合物 1 与化合物 2 制备了少许皂甙元。图 3 与图 4 分别为由化合物 1 与化合物 2 制得的皂甙元的 EI-MS 图。从图 3 和 4 可看出,由化合物 1 制得的皂甙元分子离子峰的 m/z 是 416,由化合物 2 制得的皂甙元分子离子峰的 m/z 为 414,这两种甙元的离子基峰均是 m/z 为 139,这在其他化合物中是非常少见的^[11]。在离子基峰 m/z 139 与分子离子峰 m/z 416 或 414 之间,看到了 m/z 273 或 271,

m/z 302 或 300, m/z 255 或 253 几个中等强度的离子峰,这些碎片都是甾体皂甙元 EI-MS 裂解的突出特征^[11]。此外,这两种甾体皂甙元的 EI-MS 图分别与谱库中的提果皂甙元和薯蓣皂甙元相一致。

化合物酸解得到的水相以 0.5 mol/L 调 pH 至中性,通过分析型 HPLC 测定其糖的组成。结果表明:两种化合物糖链部分组成相同,均为葡萄糖与鼠李糖,且葡萄糖与鼠李糖两者的质量比均为 2:1,这一结论与电喷雾质谱断裂的碎片分析完全一致。

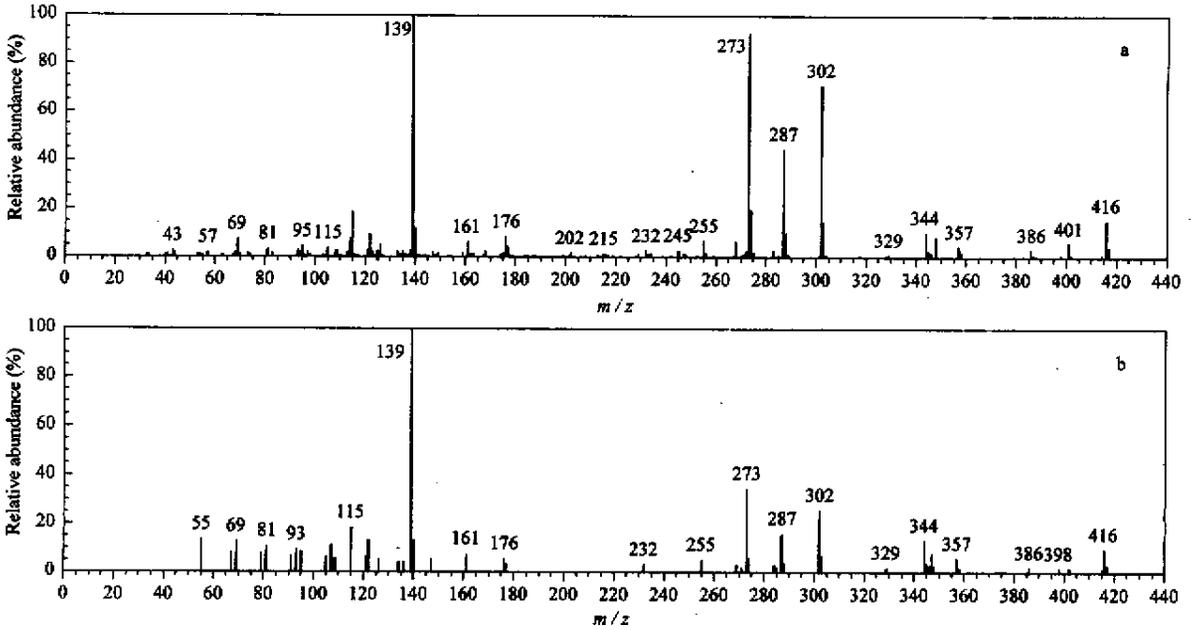


图 3 由化合物 1 制得的皂甙元的 EI-MS 图(a)及谱图库中相应物质的谱图(b)

Fig.3 EI-MS spectrum of the steroidal sapogenin from compound 1(a) and EI-MS spectrum of tigogenin from data base (b)

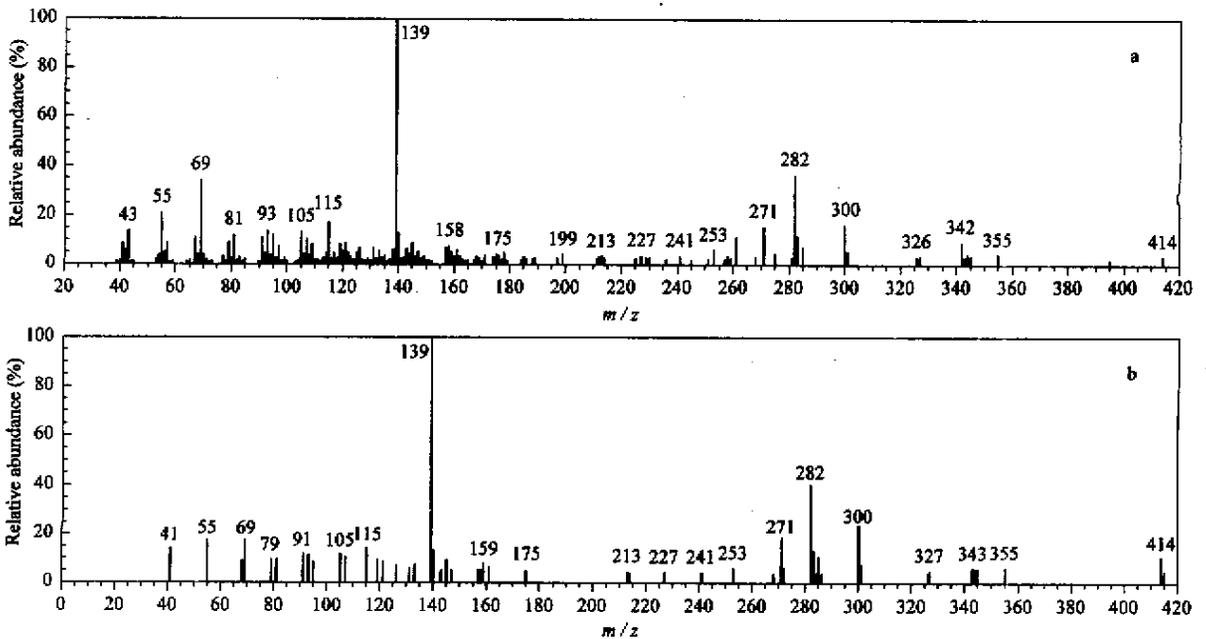


图 4 由化合物 2 制得的皂甙元的 EI-MS 图(a)及谱图库中相应物质的谱图(b)

Fig.4 EI-MS spectrum of the steroidal sapogenin from compound 2(a) and EI-MS spectrum of diosgenin from data base (b)

4 结论

运用 HPLC/ESI-MS 和 EI-MS 相结合成功地从卷丹百合中筛选出了两种甾体皂甙,其中一种为含有 3 个糖基与提果皂甙元的甾体皂甙,另一种为含有 3 个糖基与薯蓣皂甙元的甾体皂甙。本文证实了 HPLC/ESI-MS 和 EI-MS 相结合用来筛选甾体皂甙化合物的可行性,结果表明:在线的 HPLC/ESI-MS 能够直接地为我们提供糖甙类化合物的相对分子质量和糖链的许多有益信息,而不需要分离单个的化合物,但对甙元部分提供的信息却极少,离线的 EI-MS 只需要极少量(1 mg ~ 2 mg)的纯品即可快速地为我們提供大量甙元部分的信息,但是它极难获得糖甙的分子离子峰。所以两者结合起来非常适合从天然植物中快速筛选甾体皂甙。

参考文献:

- [1] WANG Qiang. Analytics of Chinese traditional medicine. Fuzhou :Fujian Science Press ,1966. 208-222
王 强. 中药分析学. 福州 :福建科学出版社,1966. 208-222
- [2] Mimaki Y, Sashida Y. Phytochemistry ,1990 ,29(7): 2 267-2 271
- [3] Mimaki Y, Sashida Y. Chem Pharm Bull ,1990 ,38 (11) 3 055-3 059

- [4] HOU Xiu-yun , CHEN Fa-kui , WU Li-jun. Chinese Journal of Medicinal Chemistry ,1998 2(1) 49
侯秀云 陈发奎 ,吴立军. 中国药物化学杂志 ,1998 ,8 (1) 49
- [5] HOU Xiu-yun , CHEN Fa-kui. Acta Pharmaceutica Sinica ,1998 33(12) 923-926
侯秀云 陈发奎. 药学报 ,1998 33(12) 923-926
- [6] Shimomura H, Sashida Y, Mimaki Y. Phytochemistry ,1989 28(11) 3 163-3 170
- [7] Shimomura H, Sashida Y, Mimaki Y. Chem Pharm Bull ,1988 36(8) 3 226-3 229
- [8] LIU Mei-zheng , GUO Zhong-wu , HUI Yong-zheng. Natural Product Research and Development ,1997 2(2): 81-84
刘美正 郭忠武 惠永正. 天然产物研究与开发 ,1997 , 2(2) 81-84
- [9] WU Shou-jin ,ZHANG Xiao-wen. World Notes on Plant Medicine ,1994 2(6) 246-252
吴寿金 张晓闻. 国外医药·植物药分册 ,1994 ,2(6): 246-252
- [10] Sashida Y. Stud Plant Sci ,1999 (6) 201-211
- [11] CONG Pu-zhu. Mass spectrometry application in natural organic chemistry. Beijing :Science Press ,1987. 777-794
丛浦珠. 质谱在天然有机化学中的应用. 北京 :科学出版社 ,1987. 777-794

Screening of Steroidal Saponins from the Bulbs of *Lilium Brownii* var. *colchesteri* by Combination of High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Electron Impact Mass Spectrometry

JI Hong-wu¹ , DING Xiao-lin¹ , TAO GUAN-jun²

(1. School of Food Science , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036 , China ;

2. Analysis center , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036 , China)

Abstract: With the combination of high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/ESI-MS) and electron impact mass spectrometry (EI-MS) , two steroidal saponins , one compound containing three glycosyls and tigogenin and the other one containing three glycosyls and diosgenin , from the bulbs of *Lilium brownii* var. *colchesteri* in China have been screened. In the method , on-line HPLC/ESI-MS allows us to obtain rapidly useful information about the molecular weight and the glycosyl chain of glycoside without the necessity of isolating individual compounds , but little information about steroidal saponin. Just with 1 mg to 2 mg of pure sample , off-line EI-MS allows us to acquire useful information about a steroidal saponin of saponins , but it is difficult to obtain the molecular ion peak. The combination of HPLC/ESI-MS and EI-MS is well suitable for rapidly screening steroidal saponins from plants.

Key words high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry ; electron impact mass spectrometry ; steroidal saponin ; bulb of *Lilium brownii* var. *colchesteri*