

红参加工过程中人参皂苷化学反应 HPLC/MS/MS 研究

肖盛元, 罗国安*

(清华大学 化学系, 北京 100084)

摘要: 目的 研究红参加工过程中人参皂苷的变化机制。方法 采用 HPLC/MS/MS 方法对生晒人参中主要皂苷类成分进行结构推测。用 HPLC/MS 方法对生晒人参和红参中的二醇型、三醇型和齐墩果酸型人参皂苷进行比较。结果 在红参加工过程中丙二酸单酯人参皂苷酯键水解产生相应的人参皂苷, 脱羧产生相应的糖乙酰化人参皂苷。在加工过程中达玛烷型人参皂苷主要发生 20 位糖苷键水解和异构化。齐墩果酸型皂苷发生酯苷键和醚苷键的水解。结论 人参加工成红参后皂苷类成分发生较大的变化, 人参加工可能产生红参的特异成分。

关键词: 人参; 炮制; 人参皂苷

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0040-04

Chemical reactions of ginsenosides in red ginseng processing by HPLC/MS/MS

XIAO Sheng-yuan, LUO Guo-an

(Center of Analysis, Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **Objective** To study the reaction mechanism of ginsenosides in red ginseng processing. **Methods** The major constituents of ginsenosides were assigned by HPLC/MS/MS data. Ginsenosides (including protopanaxadiol, protopanaxatriol, and oleanolic acid type) of white ginseng and red ginseng were compared by HPLC/MS data. **Results** Ginsenosides were produced from esterolysis of corresponding malonyl ginsenosides in red ginseng processing. Another reaction of malonyl ginsenosides in red ginseng processing was decarboxylated to produce corresponding acetyl ginsenosides. Hydrolysis of glycosidic bond at C₂₀ and isomeric reaction of C₂₀ were the main reaction of dammarane type ginsenoside. High degree of esterolysis and glycosidic bond hydrolysis of oleanolic acid type ginsenosides all occurred during the red ginseng processing. **Conclusion** Great changes of ginsenosides have been obviously found in processing ginseng to red ginseng. Special constituents of red ginseng could be produced in ginseng processing.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey; processing; ginsenosides

人参是五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 的干燥根, 其性温、味甘, 大补元气、强心固脱、安神生津。现代医学和药理学证明, 人参具有提高机体免疫力、消除疲劳、抗癌^[1]、护肝^[2,3]等活性。人参皂苷是人参的主要活性成分之一。人参经洗净, 自然阴干、晒干或烘干制成的人参商品称为“生晒人参”。经蒸制而成的人参商品则称为“红参”。生晒人参“性温, 大补”, 而红参的作用较生晒人参缓和。所以, 中医临床上广泛应用红参对虚脱病人进行补益而不用生晒人参。人参炮制的过程中化学成分会发生相应变化。红参中麦芽酚^[4]、焦谷氨酸^[5]、甾醇脂肪酸酯和甘油糖酯均高于生晒人参。皂苷类成分在加工过程中会发生酯键和糖苷键的降解^[6-8]。本实验采用 HPLC/MS 方法对红参和生晒参的皂苷类成分进行

了比较, 对加工过程中皂苷类成分的变化途径进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器: 生晒人参和红参均购自吉林农业大学院内参茸市场, 经清华大学肖盛元博士鉴定。色谱纯甲醇, 醋酸铵为分析纯。Agilent 1100 LC/MSD Trap, 操作系统为 Agilent Chem station, 数据处理系统为 Agilent LC/MSD Data analysis 4.2。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件: 色谱柱: phenomenex Prodigy C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.1 mmol/L 醋酸铵水溶液(加氨水调至 pH 8.0), B 相为乙腈。梯度条件: 0~15 min 维持 B 相为 40%, 15~60 min 维持 B 相为 40%, 60~75 min 在 B

* 收稿日期: 2004-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(90209035)

* 通讯作者 Tel: (010) 62781685 E-mail: luoga@mail.tsinghua.edu.cn

相上升为 100% ; 进样量: 20 μ L。

1.2.2 质谱条件: 调谐: 雾化气 30 Psi, 干燥气 8 L / min, 干燥气温度 350 ; 目标质量 900, 化合物稳定性 50% , 离子阱驱动水平 100%。

Icc: 目标 30 000, 最大累积时间 50 μ s, 扫描范围: 全扫描, m/z 700~ 1 250; 质谱/质谱, 400~ 1 250。

自动质谱/质谱参数: 强度阈值 5 000, 母离子数 2, 分离宽度 2.0, 碰撞能量 1.00 eV , 能量自动调整范围 30% ~ 200%。

1.2.3 样品处理: 分别取生晒人参与红参, 40 烘干, 粉碎, 过 100 目筛, 备用; 分别称取生晒人参、红参粉末 0.499 2 g 和 0.483 0 g, 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇 3.5 mL , 超声振荡 5 min, 过夜, 再用超声波处理两次, 每次 10 min, 中间间隔 1 h, 加甲醇至刻度, 放置 1 h 后, 取上清液, 4 000 r/min 离心, 取上清液备用。

2 结果与讨论

2.1 主要信号的 HPLC/MS/MS 二级质谱归属与定性: 生晒人参 HPLC/MS/MS 数据及归属见表 1。

表 1 生晒人参中主要皂苷类成分的 HPLC/MS/MS 数据分析

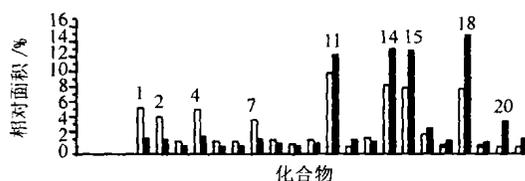
Table 1 HPLC/MS/MS data of major ginsenosides in white ginseng

保留时间 /min	相对分子质量	MS/MS	鉴定
16.0	988	987/945/927/799	mRe
18.3	962	961/799/783/637/619/475	N-R ₃
19.4	932	931/799/783/637/619/475	N-R ₁
21.5	946	945/799/783/637/619/475/391	Re
21.6	800	799/637	Rg ₁
28.2	956	955/835/793/613/569/523	Ro
31.1	1 194	1 193/1 150/1 107/945/783	mRb ₁
33.3	1 164	1 163/1 119/1 119/1 077/1 059	mRc
33.4	1 194	1 194/1 149/945; 1 149/1 107/1 089	
33.6	794	793/673/631/613/569	
36.1	1 164	1 163/1 119; 1 119/1 059	mRb ₂
37.4	1 164	1 163/1 119/1 059	mRb ₂ [9]
38.3	800	799/631/475	Rf
39.4	1 032	1 031/1 009/987/945/927; 945/783/621	mRd
40.7	1 032	1 031/987; 987/945/927/783	
41.4	770	769/637/619/475	N-R ₂
43.1	1 108	1 107/945	Rb ₁
44.3	784	783/637/619/475/391	Rg ₂
45.5	1 078	1 077/945	Rc
48.0	1 078	1 077/945	Rb ₂
48.6	1 078	1 077/945	Rb ₃ [10]
50.7	1 150	1 149/1 107/1 089	aRb ₁
53.5	946	945/783/621/459	Rd
55.9	1 120	1 119/1 077/1 059	aRc/R _{s1}
62.8	988	987/945/927/799	aRe
69.1	988	987/945/927/783	aRd

m-丙二酰基, a-乙酰基, N-三七

m-malonyl, a-acetyl, N-notoginseng

2.2 生晒人参与红参中二醇型人参皂苷相对响应值比较: 分别以生晒人参与红参的提取离子流色谱(extracted ion chromatogram, EIC)的各色谱峰积分面积占总面积的百分比作为相对响应值。生晒人参与红参的二醇型皂苷相对响应值比较见图 1。



白色-生晒人参 黑色-红参
white-white ginseng black-red ginseng
1-mRb₁ 2-mRc 4-mRb₂ 7-mRd 11-Rb₁
14-Rc 15-Rb₂ 16-Rb₃ 18-Rd 20-Rg₃

图 1 生晒人参与红参中二醇型皂苷相对响应值的比较

Fig. 1 Comparison of relative response value in panaxadiol type ginsenosides of white and red ginsengs

2.2.1 丙二酸单酯人参皂苷在加工过程中的变化: 从图 1 可以看出, 二醇型人参皂苷的糖衍生物在加工过程中有较大的变化。丙二酸单酯人参皂苷 Rb₁ (1)、丙二酸单酯人参皂苷 Rc (2)、丙二酸单酯人参皂苷 Rb₂ (4)、丙二酸单酯人参皂苷 Rd (7) 的相对响应值分别为生晒人参相应皂苷的 22.1%、26.1%、28.1% 和 28.5%。上述皂苷的同分异构体在红参中的相对响应值与生晒人参中相应成分相对响应值的比值分别为: 33.4 min, 相对分子质量为 1 194, 22.4% (3); 36.1 min, 相对分子质量 1 164, 11.1% (5); 37.4 min, 相对分子质量 1 164, 15.1% (6); 40.7 min, 相对分子质量 1 032, 47.9% (8); 41.6 min, 相对分子质量 1 032, 31.9% (10)。丙二酸单酯人参皂苷 1、2、3、4、7、10 的降解反应产率接近, 说明上述 6 种皂苷的丙二酸单酯基的连接位置相似, 均在 3-O-糖链末端葡萄糖 6 位形成酯键。与实验结果对 1、2、4、7 归属的结果一致。从加工过程中的降解反应产率推测, 化合物 5、6 的丙二酸单酯基的连接相似。丙二酸单酯人参皂苷在生晒人参与红参中均存在, 这一结果与文献^[8]的实验结果一致。

2.2.2 非糖衍生二醇型皂苷在加工过程中的变化: 除 42.0 min 和 45.3 min 处, 相对分子质量 1 210 的一对同分异构体(可能为人参皂苷 Ra₁ 和 Ra₂) 在加工过程中相对响应值降低外(分别为生晒人参与红参的相对响应值的 47.6% 和 66.3%), 其余糖链未被衍生化的二醇型皂苷的相对响应值均升高。与生晒人参与红参中相应成分的相对响应值比较, 43.1 min, Rb₁ 为

125.3%; 45.5 m in, R_c 为 160.0%; 48.0 m in, R_{b2} 为 164.1%, 48.6 m in, R_{b3} 为 152.5%, 53.5 m in, R_d 为 193.0%, 74.2 m in R_{g3} 和 75.0 m in, 相对分子质量 784 化合物(可能是 20R-R_{g3}) 在生晒人参中未检测到, 在红参中相对响应值分别升高至 3.43% 和 1.10%。在人参加工过程中, 人参皂苷 R_b 可由 mR_d 产生; 同时, R_{b1}、R_c、R_{b2} 和 R_{b3} 的 20 位糖链末端的糖基水解均可能产生 R_d, 所以在红参中, R_d 的相对响应值增加较多。在加工过程中, 上述皂苷的 20 位糖链完全水解产生 R_{g3} 和 20R-R_{g3}, 其中后者可能是加工产生的成分。在红参中没有检测到人参皂苷 F₂(3, 20-葡萄糖原人参二醇苷), 说明在加工过程中, 20 位糖苷键比 3 位二糖的糖苷键更容易水解。

2.2.3 糖乙酰化二醇型人参皂苷: 53.5、59.5 和 62.8 m in 出现的相对分子质量分别为 1 150, 1 120 和 988 的 3 种成分, 在生晒人参中的相对响应值分别为 0.27%、0.23% 和 0.03%。在红参中分别增加至 0.83%、0.62% 和 0.67%。二级质谱分别与 mR_{b1}、mR_c 和 mR_d 一致, 但从保留时间看, 3 者的保留时间较 R_{b1}、R_c 和 R_d 的保留时间长; 从加工过程中的反应看, 3 者在加工过程中的反应行为与丙二酸单酯人参皂苷不一致, 所以推测这 3 种化合物可能是糖乙酰化二醇型人参皂苷, 加工过程中由相应的丙二酸单酯人参皂苷脱羧基产生, 所以相对响应值升高。结果与文献^[9]一致。mR_c 水解产生的糖乙酰化 R_c 的结构与人参皂苷 R_{s1} 一致。

2.3 生晒人参与红参中三醇型人参皂苷相对响应值比较: 生晒人参与红参中三醇型人参皂苷相对响应值比较见表 2。在人参的三醇型皂苷中, 人参皂苷 R_e 降解可能产生 R_{g1} 和 R_{g2}; 三七人参皂苷 R₃ 降解可产生 R_{g1} 和 R_f; 三七人参皂苷 R₁ 降解可能产生 R_{g1} 和三七人参皂苷 R₂。与生晒人参相比, 红参中丙二酸单酯人参皂苷 R_e 没有检测到, R_e 的相对响应值有所上升, 说明其酯键降解较彻底。三醇型人参皂苷 6 位糖链的末端糖基降解均可产生人参皂苷 R_{g1}, 但 R_{g1} 在红参中的相对响应值却降低, 而相应的 20 位糖链水解产生的皂苷的相对响应值却升高, 说明三醇型人参皂苷在加工过程中, 20 位糖苷键容易发生水解反应。N-R₃ 降解主要产生 R_f; N-R₁ 降解主要产生 N-R₂; R_e 降解主要产生 R_{g2} 及 20R-R_{g2}, 而后者在生晒人参中没有检测到。与二醇型丙二酸单酯人参皂苷脱羧反应类似, mR_e 在加工过程中脱羧产生糖乙酰化 R_e(aR_e)。后者在生晒人参中

的相对响应值为 0.16%, 在红参中则为 0.83%。

表 2 生晒人参与红参中三醇型人参皂苷相对响应值比较
Table 2 Comparison of relative response value in panaxatriol type ginsenosides and red ginsengs

保留时间 /m in	相对分 子质量	生晒人参/%	红参/%	鉴定
16.0	988	0.84	0.00	mRe
18.3	962	1.25	0.02	N-R ₃
19.4	932	1.28	0.64	N-R ₁
21.5	946	9.99	10.8	Re
21.6	800	2.52	0.92	Rg ₁
41.4	770	2.00	3.29	N-R ₂
44.3	784	2.31	2.61	Rg ₂
44.9	784	0.00	1.00	20R-Rg ₂
38.3	800	5.83	7.09	Rf
62.8	988	0.16	0.83	aRe

a, m, N 同表 1

a, m, and N are same to Table 1

2.4 生晒人参与红参中齐墩果酸型人参皂苷相对响应值比较: 齐墩果酸型皂苷的结构与达玛烷型皂苷不同, 其 28 位为葡萄糖形成的酯苷键, 在加工过程中容易降解。生晒人参中人参皂苷 R_o 的相对响应值为 12.4%, 而在红参中降低至 2.95%。人参皂苷 R_o 的 3 位糖链为 1 分子的葡萄糖残基和 1 分子的葡萄糖残基组成的二糖链, 此糖链在加工过程中容易降解。证据在于 R_o 降解的次级皂苷在红参中并没有像达玛烷型皂苷一样相对响应值升高, 相反, 33.6 m in 和 37.2 m in 的相对分子质量 794 (R_o-glucose) 的一对同分异构体在红参中相对响应值由生晒人参中 0.96% 和 0.56% 降至 0.40% 和 0.00%。

3 结论

在人参加工制成红参的过程中各种皂苷类成分发生不同程度的降解反应。丙二酸单酯人参皂苷的降解存在两种形式: 酯键水解产生丙二酸和相应的人参皂苷; 脱羧产生相应的糖乙酰化人参皂苷。但在红参加工过程中丙二酸单酯人参皂苷没有完全降解。在红参中, 糖乙酰化人参皂苷 aR_{b1}、aR_c、aR_d 和 aR_e 的相对含量均高于生晒人参。由于丙二酸单酯人参皂苷降解产生相应的人参皂苷, 所以在红参中人参皂苷 R_{b1}、R_c、R_{b2}、R_{b3}、R_e 以及 R_d 等的相对含量高于在生晒人参中的相对含量。达玛烷型人参皂苷在加工过程中的糖链降解反应主要发生在 20 位糖苷键的水解。20 位异构化 R_{g2} 和 R_{g3} 可能是加工过程中产生的红参特异成分。红参中齐墩果酸型人参皂苷的相对水平显著降低。

References

- [1] Li T P. Progress in studies on activities of ginsenosides [J]. *Teach Biol* (生物学教学), 2003, 18(3): 1-3.

- [2] Jiao G Y, Shang D W. Infection of ginseng process on bioactivities [J]. *J Handan Med Coll* (邯郸医学院学报), 2001, 14(6): 510.
- [3] Dong W C. Proceeding of studies on hepatic damages protection of ginsenosides [J]. *Spec Wild Econ Animal Plant Res* (特产研究), 1996, (3): 30-33.
- [4] Li X G, Zheng Y N, Cui Y L. Studies on the mechanism of forming maltol on processing red ginseng separating [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 1994, 16(4): 57-65.
- [5] Li X G, Qing B, Zeng Y N, et al. The isolated of pyroglutamic from ginseng and transforming mechanism in processing [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 1994, 16(2): 1-8.
- [6] Zhu D N, Yang L, Yan Y Q. Comparison of ginsenosides content between *Panax quinquefolius* and *Panax ginseng* [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2000, 9 (3): 1-4.
- [7] Li X G, Fu L, Lu Q. Studies on the hydrolysis reaction of ginsenosides and their products in red ginseng processing [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2000, 22(2): 1-9.
- [8] Li X G, Park H S. Decarboxylic degradation reaction of ginsenosides and their products in red ginseng processing [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2000, 18(5): 355.
- [9] Kite G C, Howes M J R, Leon C J, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry of malony-ginsenosides in the authentication of ginseng [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 238-244.
- [10] Fuzzati N, Gabetta B, Jayakar K, et al. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric identification of ginsenosides in *Panax ginseng* roots [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 854: 69-79.

正交试验优选白芨多糖硫酸酯化工艺的研究

陈景耀^{1,2}, 吴国荣^{2*}, 王建安², 陆长梅², 张卫明³, 蒋继宏^{1*}

(1. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116; 2. 南京师范大学生命科学院, 江苏 南京 210097; 3. 南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

摘要: 目的 优选白芨多糖硫酸酯化的最佳工艺。方法 采用氯磺酸-吡啶法合成白芨多糖硫酸酯, 以取代度和产物量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计对试剂比例、反应温度和反应时间进行优选。结果 吡啶和氯磺酸比例 6 : 1, 反应温度 85 ℃, 反应时间 2 h 为比较适宜的工艺条件。结论 白芨多糖硫酸酯化优化的工艺条件方法可行, 为进一步扩大试验提供了有价值的参数。

关键词: 白芨多糖; 硫酸酯化; 正交设计

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0043-04

Sulfation techniques of *Bletilla striata* polysaccharide by orthogonal design

CHEN Jing-yao^{1,2}, WU Guo-rong², WANG Jian-an², LU Chang-mei², ZHANG Weiming³, JIANG Jihong¹

(1. Provincial Key Laboratory of Biotechnology on Medicinal Plants, Xuzhou 221116, China; 2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 3. Nanjing Institute for Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

Abstract Objective To optimize the sulfation-conditions of *Bletilla striata* polysaccharide (BSPS). **Methods** BSPS was sulfated with chlorosulfonic acid-pyridine. Reagent proportion, reaction temperature, and reaction time were selected with substitution degree and yield as index by $L_9(3^4)$ orthogonal design. **Results** Results showed that the condition with 6 : 1 volume ratio of pyridine and chlorine sulfonic acid, reaction temperature of 85 ℃, reaction time of 2 h was the optimum. **Conclusion** The optimal method for sulfation of BSPS is feasible, and it provides valuable parameters for further enlarged test.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f polysaccharide (BSPS); sulfation; orthogonal design

许多植物多糖具有提高免疫能力、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗凝血等生物学活性, 因此对植物多糖的研究越来越受到人们的重视, 其中带有酸性基团的多糖, 特别是带有硫酸基的硫酸酯多糖由于其具

有抗 HIV 等多种病毒的作用, 尤为受到关注^[1,2]。硫酸酯多糖中硫酸基的取代度对其活性的影响较大, 通常取代度较大的抗病毒活性更强。研究植物多糖包括硫酸酯化在内的化学修饰以增强和拓展其生物

* 收稿日期: 2004-04-06

基金项目: 国家科技部科研院所科技开发专项资金(2002EG163191); 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放基金(KJS02118)

作者简介: 陈景耀(1974—), 男, 江苏泗阳人, 硕士研究生, 主要从事植物化学及天然活性物质的研究、新药开发。

Tel: (025) 83598216 E-mail: musiclike@163.com

* 通讯作者