

北五味子的超临界萃取及产物的 HPLC-APCI-MS/MS 分析

宋明杰¹, 邢俊鹏², 宋凤瑞², 包海鹰¹, 刘志强², 刘淑莹²

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022)

摘要:优化超临界流体萃取北五味子中木脂素类成分的提取工艺,对萃取物中所含有效成分的归属进行分析鉴定。以五味子总木脂素为评价指标,采用正交实验法和不同影响因素系统考察法对 CO₂-SFE 萃取北五味子中木脂素类成分提取工艺进行优化,利用液相色谱-大气压化学电离质谱联用法(HPLC-APCI-MS/MS)分析鉴定产物结构。确定了最佳的超临界提取工艺,即压力为 25 MPa,温度为 45 °C,提携剂浓度为 90%乙醇,并对萃取产物中所含的 10 种木脂素类化合物进行归属鉴别。证明优化的工艺与其他常规提取工艺相比较科学合理,具有较强的稳定性和有一定的实用价值。

关键词:北五味子;木脂素;正交实验法;超临界二氧化碳流体萃取法;HPLC-APCI-MS/MS

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2011)05-0283-05

CO₂-SFE Extraction of the Lignans in *Schisandra chinensis* Fruits and Analysis of Extracting Products by HPLC-APCI-MS/MS

SONG Ming-jie¹, XING Jun-peng², SONG Feng-rui², BAO Hai-ying¹,
LIU Zhi-qiang², LIU Shu-ying²

(1. Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China;

2. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China)

Abstract: The orthogonal test was used to optimize CO₂-SFE process of the lignans in *Schisandra chinensis* fruits with content of total lignan as index, and the extraction products were analyzed by HPLC-APCI-MS/MS. The optimal extraction procedure is as follows: the extraction pressure is 25 MPa, the extraction temperature is 45 °C, and the concentration alcohol is 90%. Ten structures of extraction products are confirmed by HPLC-APCI-MS/MS. The optimum extraction procedure is reasonable and stable. Compared SFE with traditional methods, the optimum extraction procedure is excellent and valuable.

Key words: *Schisandra chinensis*; lignin; orthogonal test; CO₂-supercritical fluid extraction; HPLC-APCI-MS/MS

收稿日期:2011-01-14;修回日期:2011-05-06

基金项目:长春市科技发展项目(No. 2008256),吉林省科技发展重点项目(No. 20090908),省院合作项目(No. 2009SYHZ0026)资助

作者简介:宋明杰(1986~),女(汉族),内蒙古鄂伦春人,硕士研究生,生药学专业。E-mail: mjs2011@126.com

通信作者:包海鹰(1965~),女(蒙古族),内蒙古通辽人,教授,生药学研究。E-mail: baohaiying2008@126.com

北五味子为木兰科植物,干燥成熟果实入药,始载于《神农本草经》,列为上品,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心等多种功效^[1-2]。临床用于治疗久咳虚喘、梦遗滑精、遗尿尿频、久泻不止、自汗、盗汗、神经衰弱、肝炎等疾病^[3],是著名的滋补性中药。因其果实甘、酸、辛、苦、咸五味俱全,故名五味子^[4]。五味子含活性成分木脂素 5%~22%,北五味子中的木脂素成分属于联苯环辛烯类,主要有五味子醇甲(Schisandrin)、五味子甲素(Deoxyschisandrin)、五味子乙素(Schisandrin B)、五味子丙素(Schisandrin C)、五味子醇乙(Schizandrol B)、五味子酯甲、乙、丙、丁、戊(Schisantherin A, B, C, D, E)、 γ -五味子素(γ -Schisandrin)、前五味子素(Pregomisin)、五味子酚(Schisanhenol)、戈米辛(Gomisin)等^[5]。

超临界流体萃取(supercritical fluid extraction technique, SCFE)是近几十年来迅速发展起来的一种新型物质分离、精制技术^[6-7],CO₂是最常用的一种超临界流体。超临界提取技术具有提取率高、产品纯度好、流程简单、能耗低、过程无有机溶剂残留等优点^[8]。为了测定五味子中木脂素类成分的含量,本研究以五味子总木脂素为考察指标,采用二氧化碳超临界流体萃取技术提取五味子中木脂素类成分,考察超临界 CO₂ 流体萃取工艺,以确定最佳萃取操作工艺条件,并利用液相色谱-大气压化学电离质谱(HPLC-APCI-MSⁿ)^[9-10]法对北五味子超临界萃取产物中的木脂素类成分进行分析。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

HA221-50-06 超临界萃取装置;LCQ 离子阱质谱仪,配有大气压化学电离源;Waters 2695 高效液相色谱仪,配有 Waters 2996 diode array detector 检测器;UV-2401 型紫外可见分光光度计。

北五味子:采自吉林省通化地区;五味子醇甲标准品:购于中国药品生物制品检定所;乙醇为分析纯;液相用甲醇为色谱纯。

1.2 SFE-CO₂ 萃取方法

称取一定量干燥的五味子果实粗粉,以不同浓度的乙醇为提携剂。取乙醇浓度、提取压力、提取温度 3 个因素,每个因素取 3 个水平,列于

表 1。按 L₉(3³) 正交实验设计对提取物总木脂素含量进行考察,确定最佳实验条件。萃取产物以五味子酯甲为标准对照品,采用变色酸水法^[11]测定产物中总木脂素的含量。

表 1 水平因素表

Table 1 The table of factor level

水平	因素		
	A 提取压力/MPa	B 提取温度/°C	C 携带剂(乙醇/%)
1	20	40	75
2	25	45	80
3	30	50	90

1.3 不同参数对超临界萃取的影响

参照 CO₂-SFE 正交实验确定的最佳萃取方法,称取一定量干燥的五味子果实粗粉,取提携剂浓度、提取压力、提取温度、提取时间 4 个因素,每个因素取 5 个水平,列于表 2。考察不同参数对超临界萃取总木脂素含量的影响,确定每个因素的最佳实验条件。按上述方法测定五味子中总木脂素的含量。

表 2 超临界萃取不同影响因素的实验设计

Table 2 The design of different factors to CO₂-SFE

序号	因素			
	压力/MPa	温度/°C	提携剂(乙醇/%)	时间/h
1	15	35	70	0.5
2	20	40	75	1.0
3	25	45	80	1.5
4	30	50	85	2.0
5	35	55	90	2.5
6				3.0

1.4 常规提取方法

精密称取 2 份干燥的五味子粗粉各 500 mg,分别进行回流提取和超声提取。以 CO₂-SFE 确定的最佳萃取条件为依据,回流提取法以一定浓度的乙醇溶液为提取溶剂,在 80~100 °C 进行常规提取 3 h(每次提取 1.5 h,提取 2 次)。超声波提取法以一定浓度的乙醇溶液为提取溶剂,在 30 °C 提取 60 min。按上述方法测定五味子中总木脂素的含量。

1.5 HPLC-APCI-MS/MS 条件

1.5.1 色谱条件 Dikma Diamonsil C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm×5 μm);柱温 35 °C;二元线性梯度洗脱;流动相:(A)水,(B)甲醇;流动相梯度组成:0~45 min,25%~0 A,75%~100% B,45~60 min,100% B;流速 0.5 mL/min;样品进样量 10 μL。

1.5.2 大气压化学电离质谱条件 采用正离子模式,质量扫描范围 m/z 150~600,放电电流 5 μA,加热管温度 450 °C,金属加热毛细管温度 200 °C,毛细管电压 16 V。

2 结果与讨论

SFE-CO₂ 提取北五味子中总木脂素的萃取物为黄白色乳状物质,静置后分层,上层为黄色透明油状物质,下层为白色沉淀。通过紫外-可见分光光度法对 SFE-CO₂ 正交实验设计和不同影响参数的系统考察进行结果分析,得出最佳萃取工艺组合为 A₂B₂C₃(即提取压力为 25 MPa,提取温度为 45 °C,提携剂是浓度为 90%乙醇),此条件下的提取率达到 7.92%。利用方差分析法,根据 K 值和 R 值进行直观分析正交实验。结果表明:A 因素为显著性因素,3 个因素对提取率的影响为 A>C>B。追加实验结果表明,按萃取工艺 A₂B₂C₃ 所提取的五味子总木脂素含量与正交实验的最大值相接近,表明此工艺稳

定,具有重复性和可操作性。

表 3 为 SFE-CO₂ 最优工艺、常规回流提取和超声波提取的提取率对比分析。

表 3 SFE-CO₂ 与常规提取方法的比较

Table 3 Comparison of SFE-CO₂ with conventional methods

序号	提取率/%		
	超声提取	回流提取	SFE 提取
1	5.76	7.53	7.92
2	5.69	7.26	7.48
3	5.63	7.71	7.79
平均值	5.69	7.50	7.73

从表 3 可以看出,超临界 CO₂ 萃取法的提取率与回流提取法接近,超声方法的提取率较低。但是常规回流提取方法的有机溶剂残留比较严重、操作繁琐,而二氧化碳超临界方法具有污染少、操作简单、溶剂无残留等绿色环保的优点,故二氧化碳超临界提取方法较优。

利用 HPLC-APCI-MS/MS(源内 CID)联用技术对北五味子的超临界萃取物进行分析,得到北五味子的总离子流图,示于图 1。1~10 号色谱峰所对应的串联质谱数据列于表 4。通过色谱保留时间以及化合物的特征质谱行为确定所提取化合物的归属。

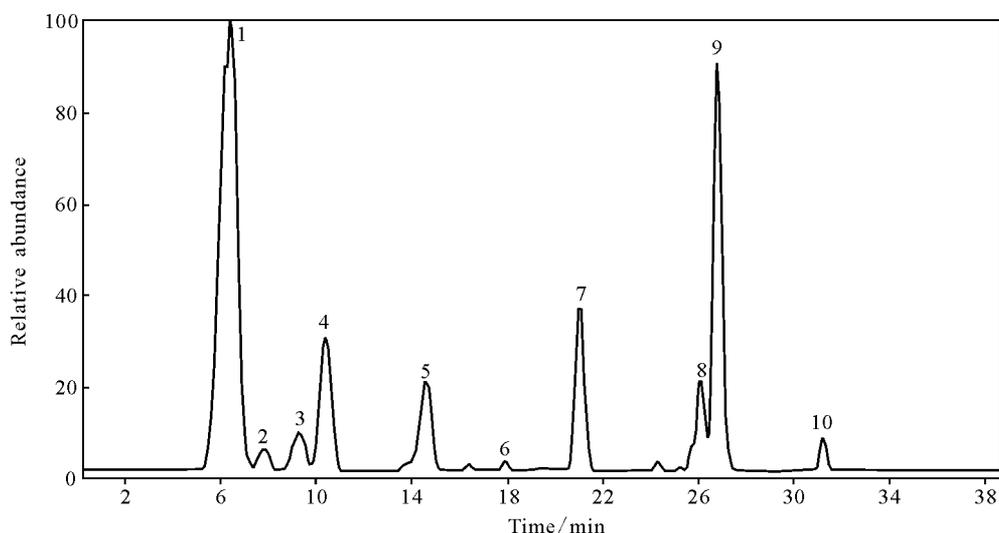


图 1 北五味子提取物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram in extracting product of *Schisandra chinensis* fruits

表 4 北五味子提取物的 HPLC-APCI-MS/MS 分析结果

Table 4 The HPLC-APCI-MS/MS data of the lignans in extracting product of *Schisandra chinensis* fruits

峰号	t/ min	准分子离子峰 及主要碎片	多级串联质谱数据	归属鉴别
1	6.5	415(100), 416(20)	MS ² [415]: 384(100), 400(26), 373(19), 359(24)	五味子醇甲
2	7.7	389(100), 415(30), 390(25)	MS ² [389]: 357(100), 325(67), 319(48), 287(28), 389(27), 301(12)	戈米辛 J
3	9.3	501(100), 483(64)	MS ² [501]: 383(100), 369(47), 341(38), 357(22), 400(21), 337(19)	Angeloygomisin H 或 Tigloylgomisin H
4	10.4	417(100), 399(22)	MS ² [417]: 399(100), 400(22), 415(20)	五味子醇乙
5	14.5	537(100), 415(22)	MS ³ [399]: 369(100), 368(63), 357(25), 343(15), 337(12)	五味子醇乙
6	17.9	515(100), 387(47)	MS ⁴ [369]: 337(100), 353(60), 369(32)	五味子醇乙
7	20.9	417(100), 418(22)	MS ² [537]: 415(100), 403(26)	五味子酯甲
8	26.1	401(100), 402(25)	MS ³ [415]: 371(100), 385(26), 373(24), 397(12)	五味子酯甲
9	26.8	401(100), 402(23)	MS ² [515]: 385(100), 355(15), 469(11)	五味子酯乙或丙
10	31.2	385(100), 386(20)	MS ³ [515]: 355(100), 323(58), 343(32), 385(22), 302(21), 316(17)	五味子酯乙或丙
			MS ² [417]: 347(100), 402(62), 316(43), 386(13)	
			MS ³ [402]: 347(100)	五味子甲素
			MS ³ [347]: 316(100)	五味子甲素
			MS ² [401]: 331(100), 371(53), 300(38), 370(35), 386(39)	γ-五味子素
			MS ³ [401]: 300(100), 301(32), 273(11)	γ-五味子素
			MS ² [401]: 331(100), 371(45), 386(41), 300(36), 370(35),	五味子乙素
			MS ² [385]: 355(100), 315(60), 284(41), 325(18)	五味子丙素

峰 1 的准分子离子为 $[M+H]^+$ (m/z 433), m/z 433 离子在串联质谱中丢失 18 u 的碎片产生 $[M+H-H_2O]^+$ (m/z 415) 离子, 脱水后分别失去甲基, 甲氧基生成 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ (m/z 400), $[M+H-H_2O-OCH_3]^+$ (m/z 384) 离子, 联苯环断裂分别失去 C_3H_6 和 C_4H_8 碎片, 产生 m/z 373 和 m/z 359 离子。根据此化合物离子的多级串联质谱裂解规律, 可判断其所对应的化合物为五味子醇甲。

峰 2 的准分子离子为 $[M+H]^+$ (m/z 389)。 m/z 389 离子联苯环断裂失去中性碎片 C_5H_{10} 产生 m/z 319 离子, 并且 m/z 389 离子的碎裂途径与五味子甲素相似, 因此推测 m/z 389 离子所对应的化合物为戈米辛 J。

峰 3 的准分子离子为 $[M+H]^+$ (m/z 501)。 m/z 501 离子失去一分子 H_2O 产生 m/z 483 离

子, 表明结构中羟基的存在。 m/z 483 离子在串联质谱中丢失 100 u 中性碎片产生 m/z 383 离子, 表明结构中酯基的存在, 在 m/z 501 离子结构中羟基和酯基不是处于相邻位置的。推测 m/z 501 离子所对应的化合物为 Angeloygomisin H 或 Tigloylgomisin H。

峰 4 的准分子离子为 $[M+H]^+$ (m/z 417)。 m/z 417 离子在串联质谱中丢失一分子 H_2O 产生 m/z 399 的碎片离子。 $[M+H-H_2O]^+$ 离子分别失去甲氧基和甲基产生 m/z 368 和 m/z 384, m/z 357 和 m/z 343 是联苯环断裂失去 C_3H_6 和 C_4H_8 碎片产生的。峰 4 产生的碎片离子与对照品五味子醇乙相同, 因此确定该化合物为五味子醇乙。

峰 5 的准分子离子为 $[M+H]^+$ (m/z 537) 和 (m/z 415)。 m/z 537 离子在二级串联质谱

中丢失 122 u 中性碎片产生 $[M+H-C_6H_5COOH]^+$ (m/z 415) 离子。并且此离子的多级串联质谱裂解规律与对照品五味子酯甲一致, m/z 415 离子失去一分子乙醛产生 m/z 371, 失水产生 m/z 397, 失去一分子甲醛产生 m/z 385, 联苯环断裂失去 C_3H_6 碎片产生 m/z 373, 可判断其所对应的为五味子酯甲。

峰 7 的准分子离子为 $[M+H]^+$ (m/z 417), 在串联质谱中发生碎裂产生一系列碎片离子, 其中 m/z 347 离子是 m/z 417 离子联苯环断裂失去 C_5H_{10} 碎片产生的; m/z 316 离子是 m/z 417 离子联苯环断裂失去 C_5H_{10} 碎片后再失去一个甲氧基产生的; m/z 386 和 m/z 402 离子是 m/z 417 离子分别失去一个甲氧基和甲基产生的。根据其串联质谱裂解规律判断为五味子甲素。

峰 9 的准分子离子为 $[M+H]^+$ (m/z 401)。 m/z 401 离子在串联质谱中丢失 70 u 的碎片产生 m/z 331 离子, 判断是 m/z 401 离子联苯环断裂失去 C_5H_{10} 碎片产生的; m/z 300 是 m/z 401 离子联苯环断裂失去 C_5H_{10} 碎片后再失去一个甲氧基产生的; m/z 370 和 m/z 386 是 m/z 401 离子分别失去一个甲氧基和甲基产生的; m/z 371 是 m/z 401 离子丢失一分子甲醛产生的。根据此化合物离子的串联质谱裂解规律, 可判断其所对应的化合物为五味子酯乙。

同理, 判断 10 号色谱峰可能为五味子丙素^[9-10]。

本实验以五味子总木脂素为评价指标, 通过正交实验设计优化了北五味子中木脂素类成分的超临界提取工艺, 并对压力、温度、提携剂、萃取时间等影响超临界 CO_2 流体萃取提取北五味子中总木脂素的主要因素进行系统的考察, 确定了最佳的工艺, 即提取压力为 25 MPa, 提取温度

为 45 °C, 提携剂是浓度为 90% 乙醇。并且利用 HPLC-APCI-MS/MS 技术对萃取产物中的木脂素成分进行了结构鉴定。此方法较稳定, 与常规提取方法相比, 其提取效率相当, 木脂素成分基本相同, 并无有机溶剂残留, 操作简单, 有一定的实用价值。

参考文献:

- [1] 李时珍(明). 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社, 1975:1 238-1 241.
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典, 2005 版[M]. 北京:化学工业出版社, 2005: 44-45.
- [3] LEE I S, JUNG K Y, OH S R, et al. Arch Pharmacol Res, 1997, 2(6): 633-636.
- [4] 王明中, 唐桂荣. 五味子的采集与加工[J]. 中国林副特产, 1994, 31(4): 30.
- [5] 陈业高, 秦国伟, 谢毓元. 五味子科植物的木脂素成分[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(2): 158-168.
- [6] 沈国良. 超临界 CO_2 萃取的研究与应用[J]. 化工时刊, 2001, 12: 10.
- [7] 杨涛, 李静海. 超临界流体萃取天然药物的研究现状及发展趋势[J]. 化工冶金, 1997, 18(4): 377-383.
- [8] 高福成. 现代食品工程高新技术[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1997: 378-390.
- [9] 黄鑫, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 五味子中木脂素类成分的高效液相色谱-电喷雾质谱研究[J]. 化学学报, 2008, 66(9): 1 059-1 066.
- [10] 黄鑫, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 五味子中木脂素类化合物的电喷雾质谱分析[J]. 质谱学报. 2006, 27: 68-69.
- [11] 刘旭, 林森, 赵余庆. 北五味子不同部位总木脂素的含量测定[J]. 中国现代中药. 2009, 11(5): 39-40.