

高效液相色谱-电喷雾质谱联用法测定 人参和西洋参的皂苷类成分

李 丽^{1,2} 刘春明² 吴 巍¹ 越 皓¹ 刘志强^{*1} 刘淑莹¹ 田 成³

¹(中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022) ²(长春师范学院化学系, 长春 130032)

³(满洲里检验检疫技术中心, 满洲里 021400)

摘 要 利用高效液相色谱 (LC-ELSD) 与电喷雾质谱 (ES/MS) 联用技术对人参和西洋参中的人参皂苷类成分进行了比较研究。通过液相色谱与质谱联用技术获得了相应化合物的分子量信息; 利用质谱的源内 CD 技术获得了相应化合物的结构信息。根据人参皂苷 Rf 和拟人参皂苷 F11 两种同分异构体在质谱中的源内 CD 裂解规律的不同, 建立了人参和西洋参药材的 LC-ES/MS 简便、准确的鉴别方法。

关键词 人参, 西洋参, 人参皂苷 Rf, 拟人参皂苷 F11, 高效液相色谱-电喷雾质谱联用, 源内 CD 质谱技术

1 引 言

人参和西洋参分别为五加科人参属植物的人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 和西洋参 (*Panax quinquefolium* L.) 的干燥根, 是我国名贵中药材。二者的外形相似, 主要的有效成分均为人参皂苷类化合物, 其中拟人参皂苷 F11 (Pseudoginsenoside F11) 为西洋参的特征性成分^[1,2]。人参和西洋参常用的鉴别方法主要有高效液相色谱法^[3]和液相色谱与质谱联用方法^[4,5]等。

高效液相色谱与电喷雾质谱联用技术 (LC-ES/MS) 是近年来发展起来的天然产物有效成分定性定量分析的强有力的工具^[4~7], 文献 [4, 5] 采用液相色谱与质谱联用技术, 在正离子模式下对人参和西洋参中皂苷类化合物进行了分析比较研究。本实验在 LC-ES/MS 负离子条件下, 对人参和西洋参中的皂苷类化合物进行了比较研究。利用人参皂苷 Rf 和拟人参皂苷 F11 两种同分异构体的源内 CD 的裂解规律的差异, 建立了人参和西洋参快速、准确的鉴别方法。

2 实验部分

2.1 试剂与材料

甲醇、乙腈为色谱纯试剂 (美国 Fisher 公司); 其它试剂为分析纯 (北京化工厂)。水为超纯水 (18.2 M \cdot cm)。人参药材粉末由吉林省药品检验所提供; 西洋参药材购于吉林大药房; 人参皂苷 Rg1、Re、Rb1、Rb2、Rc 和 Rd, 人参皂苷 Rf 和拟人参皂苷 Pseudoginsenoside F11 对照品购于吉林大学药学院。

2.2 样品溶液的制备

分别精密称取人参、西洋参药材粉末 (0.15 mm 粒径) 1.0703 g 和 1.0637 g, 用 50 mL 甲醇超声提取 1 h。将甲醇提取液过滤, 减压回收甲醇, 浓缩至干, 残渣用甲醇溶解过 0.45 μ m 滤膜, 定容于 10 mL 容量瓶中, 制得人参和西洋参样品溶液 (主要为人参皂苷类化合物)。

2.3 高效液相色谱分离条件

高效液相色谱实验采用美国 Waters 600 LC 系统, Alltech 2000 型 ELSD 检测器, 检测器条件为 Temp: 80 $^{\circ}$ C; Gas Flow: 2.0 L/min; Gain: 1; Inpactor: Off。Agilent 1100 Series 自动进样器; Capcell Pak C₁₈ 色谱柱 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m) (日本资生堂), 柱温 35 $^{\circ}$ C; 采用二元线性梯度洗脱: 流动相: (A) 0.2% 冰醋酸水溶液; (B) 乙腈。流动相梯度组成列于表 1。流速为 0.5 mL/min。样品进样量为 10 μ L。

2004-05-31 收稿; 2005-01-28 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 20173057)、中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KGCX2-SW-213-06) 和吉林省科技发展计划重大项目 (No. 20011109) 资助项目

2.4 高效液相色谱与电喷雾质谱分析条件

高效液相色谱与电喷雾质谱联用的液相色谱分析条件与 2.3 节所述的液相色谱的分离条件一致。实验采用美国 Finnigan MAT LQC™ 离子阱电喷雾质谱仪。分析条件采用负离子模式,扫描范围为: m/z 200 ~ 1300。离子阱的条件:喷雾电压 5 kV,壳气为氮气、辅助气为氦气,金属毛细管的温度为 280 °C,电压为 16 V。

表 1 高效液相色谱流动相梯度表

Table 1 Solvent composition of the gradient of the high performance liquid chromatographic analysis

时间 Time (min)	0.2%的冰醋酸 水溶液 (%) 0.2% CH ₃ COOH	乙腈 (%) Acetonitrile	梯度曲线 Curve
0.0	25	75	-
2	25	75	线性 Linear
50	50	50	线性 Linear

3 结果与讨论

3.1 人参和西洋参的液相色谱研究

在上述色谱条件下,人参和西洋参中的皂苷类化合物得到很好的分离,并且基线平稳。通过与对照品的保留时间比较,对图 1 中的色谱峰进行了归属,证实图 1 (A)和 (B)中的 1~8 色谱峰分别为人参皂苷 Rg1、Re、Rf、Rb1、Rc、Rb2、Rd 和拟人参皂苷 F11。

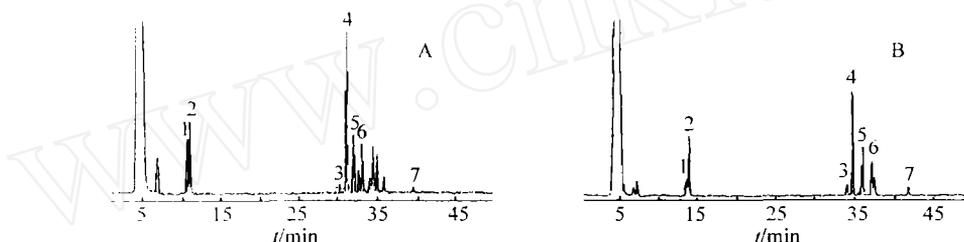


图 1 人参粗提物 (A)和西洋参粗提物 (B)的高效液相色谱图

Fig 1 LC-ELSD spectrum of *P. ginseng* root extract (A) and *P. quinquefolium* L. root extract (B)

3.2 人参和西洋参的液相色谱与电喷雾质谱联用研究

由于电喷雾质谱是一种软电离质谱技术,几乎不产生碎片离子。在 LC-MS 负离子条件下,皂苷类化合物以 $[M - H]^-$ 准分子离子形式存在,可以确定化合物 1~8 的分子量分别为 800、946、800、1108、1078、1078、946 和 800。为进一步获得上述化合物的结构信息,又进行了源内 CD 实验,实验数据列于表 2。

表 2 负离子模式下色谱峰 1~8 的源内 CD 碎裂数据 (质荷比)

Table 2 The in-source collision induced dissociation (CID) of LC peaks 1~8 in negative ion mode (m/z values)

谱峰 Peak	分子离子峰 [M - H] ⁻ (m/z)	源内 CD 质谱数据 The mass spectra of in source CID
1	Ginsenoside Rg1 799	637 [M - Glc - H] ⁻ , 475 [M - 2Glc - H] ⁻
2	Ginsenoside Re 945	799 [M - Rha - H] ⁻ , 783 [M - Glc - H] ⁻ , 637 [M - Glc - Rha - H] ⁻ , 475 [M - 2Glc - Rha - H] ⁻
3	Ginsenoside Rf 799	637 [M - Glc - H] ⁻ , 475 [M - 2Glc - H] ⁻
4	Ginsenoside Rb1 1107	945 [M - Glc - H] ⁻ , 783 [M - 2Glc - H] ⁻ , 621 [M - 3Glc - H] ⁻ , 459 [M - 4Glc - H] ⁻
5	Ginsenoside Rc 1077	945 [M - Ara(f) - H] ⁻ , 783 [M - Ara(f) - Glc - H] ⁻ , 621 [M - Ara(f) - 2Glc - H] ⁻ , 459 [M - Ara(f) - 3Glc - H] ⁻
6	Ginsenoside Rb2 1077	945 [M - Ara(p) - H] ⁻ , 783 [M - Ara(f) - Glc - H] ⁻ , 621 [M - Ara(f) - 2Glc - H] ⁻ , 459 [M - Ara(f) - 3Glc - H] ⁻
7	Ginsenoside Rd 945	783 [M - Glc - H] ⁻ , 621 [M - 2Glc - H] ⁻ , 459 [M - 3Glc - H] ⁻
8	Pseudoginsenoside F11 799	653 [M - Rha - H] ⁻ , 635 [M - Rha - H ₂ O - H] ⁻ , 491 [M - Rha - Glc - H] ⁻

实验结果表明, $[M - H]^-$ 离子在 CD 条件下发生碎裂,产生一系列由糖苷键断裂而产生的离子。通过这些碎片离子,可以获得化合物的结构信息。例化合物 2 在 LC-MS 一级谱中的准分子离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 945。根据液相色谱化合物保留时间和获得的分子量,初步推断其为人参皂苷 Re, 在源内 CD 谱中,观察到 m/z 799、783、637、621 和 475 等碎片离子。其中 m/z 783 离子是 m/z 945 离子丢失一个六碳糖基而产生的碎片离子, m/z 799 离子是 m/z 945 离子丢失一个脱氧六碳糖基产生的碎片离

子, m/z 637 离子是 m/z 945 离子丢失一个六碳糖基和脱氧六碳糖基产生的碎片离子, 而 m/z 475 离子则是 m/z 945 失去所有糖基后产生的碎片离子。 m/z 475 离子的生成表明该人参皂苷是人参三醇型皂苷。根据以上分析, 进一步确定该化合物为人参皂苷 R_e 。

LC-MS 研究表明, 化合物 5 和 6 为同分异构体 ($[M - H]^-$, m/z 1077), 且具有相同的 CD 碎片离子 (m/z 945、783、621、459)。在 CD 谱中, 均观察到 m/z 1077 离子首先丢失一个五碳糖基, 产生 m/z 945 离子, 而 m/z 783 离子是 m/z 1077 离子丢失一个五碳糖基和一个六碳糖基产生的碎片离子; m/z 621 离子是 m/z 1077 离子丢失一个五碳糖基, 再失去两个六碳糖基产生的碎片离子; 而 m/z 459 离子则是 m/z 1077 离子丢失所有的糖基后产生的。 m/z 459 离子的生成, 表明这两种人参皂苷都是人参二醇型皂苷。根据上述分析以及和标准化合物色谱保留时间比较, 进一步确定这两种人参皂苷分别为人参皂苷 R_c 和 R_b 。同样, 对其它色谱峰进行确定和指认, 其 CD 数据及其归属见表 2, 结果与文献 [8, 9] 一致。

3.3 人参中的人参皂苷 R_f 和西洋参中的拟人参皂苷 F_{11} 研究

通过上面的分析可以看出, 人参和西洋参所含有的皂苷类成分类似, 很难将两者简单地区分开来。在 LC-MS 实验中, 人参中的人参皂苷 R_f 和西洋参中的拟人参皂苷 F_{11} 在液相色谱中的保留时间相近, 且分子量均为 800, 但 CD 的碎裂方式完全不同 (图 2, 表 2)。在源内 CD 谱中, 人参皂苷 R_f 的准分子离子 $[M - H]^-$ m/z 799 主要产生 m/z 637、475 两种碎片离子。其中 m/z 637 离子是 m/z 799 离子失去 6 位上的一个葡萄糖基产生的碎片离子, m/z 475 离子则是 m/z 799 离子失去两个葡萄糖基产生的碎片离子; 而拟人参皂苷 F_{11} 的准分子离子 $[M - H]^-$ m/z 799 主要产生 m/z 653、491 两种碎片离子。 m/z 653 是 m/z 799 离子失去 6 位上的一个鼠李糖基 (146) 产生的碎片离子; m/z 491 是 m/z 799 离子连续失去两个糖基 (一个鼠李糖基和一个葡萄糖基) 产生的碎片离子; 另一个碎片离子 m/z 635 为 m/z 799 离子失去 6 位上的一个鼠李糖基 (146), 再失去一分子水产生的碎片离子。因此, 通过两者源内 CD 裂解规律的不同, 可简便、快速、准确地区分人参和西洋参。

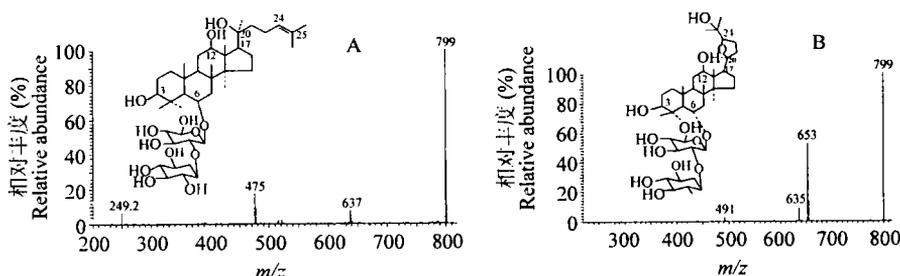


图 2 色谱峰 3 的源内 (人参皂苷 R_f) 的 CD 质谱图 (A) 和色谱峰 8 的源内 (拟人参皂苷 F_{11}) 的 CD 质谱图 (B)

Fig 2 The CD spectrum of the ion at m/z 800 (peak 3) of ginsenoside R_f (A) and the CD spectrum of the ion at m/z 800 (peak 8) of Pseudoginsenoside F_{11} (B)

4 结 论

本实验应用 LC-ESI-MS 联用技术, 详细分析比较了人参和西洋参药材粗提物中的皂苷类化合物, 并根据人参中的人参皂苷 R_f 和西洋参中的拟人参皂苷 F_{11} 两种同分异构体的源内 CD 裂解规律的不同, 建立了人参和西洋参鉴别的快速、准确的新方法。

References

- 1 Dou D Q, Hou W B, Chen Y J. *Planta Med*. **1998**, 64: 585 ~ 586
- 2 Tanaka O, Kasai R, Morita T. *Abstr Chin Med*, **1986**, 1(1): 130 ~ 152
- 3 Benishin C G, Liu H I, Wang L C H. *Recent Advances in Ginseng Studies*. Tokyo: Hirokawa Publishing Co, **1990**: 139 ~ 149
- 4 Li W, Gu C, Zhang H, Awang D V C, Fitzloff J F, Fong H H S, van Breemen R B. *Anal Chem.*, **2000**, 72: 5417 ~ 5422
- 5 Chan T W D, But P P H, Cheng S W, Kwok I M Y, Lau F W, Xu H X. *Anal Chem.*, **2000**, 72: 1281 ~ 1287

- 6 LiLi(李 丽), Dou Jianpeng(窦建鹏), Wu Wei(吴 巍), Liu Zhiqing(刘志强), Liu Shuying(刘淑莹). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(3): 317 ~ 320
- 7 Li Ming(李 明), Chen Jianmin(陈建民), Chen Jiakuan(陈家宽). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2005**, 33(3): 333 ~ 337
- 8 Fuzzati N, Gabetta B, Jayakar K, Pace R, Peterlongo F. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 854: 69 ~ 79
- 9 Cui M, Song F R, Zhou Y, Liu Z Q, Liu S Y. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **2000**, 14: 1280 ~ 1286

Analysis of Saponins in Extract of *Panax Ginseng* and *Panax quinquefolium* by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry

LiLi^{1,2}, Liu Chunming², Wu Wei¹, Yue Hao¹, Liu Zhiqiang^{*1}, Liu Shuying¹, Tian Cheng³

¹ (Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022)

² (Department of Chemistry, Changchun Teachers College, Changchun 130032)

³ (Manzhouli Inspection and Quarantine Technical Centre, Manzhouli 021400)

Abstract A Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI/MS) method was developed for the identification and differentiation of ginsenosides in crude extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* L. The $[M - H]^-$ ions of ginsenosides were observed in the negative mode, from which the molecular weights were obtained. The collision induced dissociation (CID) data of the $[M - H]^-$ ions provide detailed structural information of the ginsenosides. By performing CID experiments for the peaks 3 (ginsenoside Rf) and 8 (Pseudoginsenoside F11), these two ginsenosides had different CID behavior, and therefore the assignment of the structure for these two isomers was straightforward. The experimental results indicate that *P. ginseng* and *P. quinquefolium* can be differentiated rapidly and easily by the LC-ESI/MS experiment.

Keywords *P. ginseng*, *P. quinquefolium* L, ginsenoside Rf, pseudoginsenoside F11, liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, collision induced dissociation

(Received 31 May 2004; accepted 28 January 2005)

《单细胞分析》

单细胞分析是分析化学、生物学和医学多学科相互渗透发展形成的跨学科前沿领域。

分析化学新方法新技术丛书——《单细胞分析》，由武汉大学程介克教授等著。全书共分 15 章，全面系统地介绍了单细胞分析的各种方法，包括毛细管电泳、微流控芯片、多种光学显微镜（荧光显微镜、聚焦荧光显微镜、全内反射荧光显微镜、多光子荧光显微镜、荧光相关显微镜、近场扫描光学显微镜等）、扫描电化学显微镜、质谱成像、原子力显微镜、扫描隧道显微镜图像分析、阿达玛变换显微光谱及成像、肿瘤电化学及免疫分析、动力学分析、荧光及发光探针、纳米技术以及实时动态检测等新技术和新方法。

该书各章节的著作者结合本人承担的国家自然科学基金的课题研究的最新成果，反映了国内外在单细胞分析领域最新发展情况，充分体现了 21 世纪单细胞分析的先进性、创新性和代表性。

该书可供化学、生物、医学、药学、农业、环境科学等领域的研究人员参考，也可作为高等院校相关专业的教师和研究生的教学参考书。

《单细胞分析》一书于 2005 年 6 月由科学出版社出版（北京市东黄城根北街 16 号，邮编：100717），全书 44 万字，定价 50.00 元。