

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00812

HPLC-APCI-TOF/MS 鉴别人参中的化学成分

庄江能¹, 张海², 刘晓帆³, 赵亮², 朱臻宇³, 张国庆², 柴逸峰^{3*}

1. 解放军第62医院医务处, 普洱 665000
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药剂科, 上海 200438
3. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 采用 HPLC-TOF/MS 对人参中化学成分进行分析鉴别。 **方法:** 色谱柱 Agilent Zorbax XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 乙腈与水梯度洗脱, 梯度如下: 1~35 min, 19% A; 35~55 min, 19%~29% A; 55~70 min, 29% A; 70~110 min, 29%~40% A; 110~150 min, 95% A。柱温为 20℃, 进样量 20 μl, 流速 1 ml/min, 飞行时间质谱配有 APCI 离子源, 质量数扫描范围 m/z 100~1 350。 **结果:** 共鉴别出人参药材中 39 个化学成分。 **结论:** 采用 HPLC-TOF/MS 方法一次性在一张图谱上表征出人参中的 39 个化学成分, 为人参的药效物质基础及体内化学成分代谢与作用机制的深入研究奠定基础。

[关键词] 人参; HPLC-TOF/MS; 中药化学成分**[中图分类号]** R 284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0812-05

HPLC-TOF/MS in identification of chemical components in *Ginseng*

ZHUANG Jiang-neng¹, ZHANG Hai², LIU Xiao-fan³, ZHAO Liang², ZHU Zhen-yu³, ZHANG Guo-qing², CHAI Yi-feng^{3*}

1. Department of Medical Administration, No. 62 Hospital of PLA, Puer 665000, China
2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438
3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To identify the chemical components in traditional Chinese herbal medicine *Ginseng* by high performance liquid chromatography diode array detector (HPLC-DAD) and High performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS). **Methods:** An Agilent Zorbax XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for isolation and identification of chemical components in *Ginseng* with a mobile phase of acetonitrile and water in gradient elution. A gradient program was used as follows: 1-35 min, 19% A; 35-55 min, 19%-29% A; 55-70 min, 29% A; 70-110 min, 29%-40% A; 110-150 min, 95% A. The flow rate was set at 1.0 ml/min, the injection volume was 20 μl, and the column temperature was set at 20℃. The time-of-flight mass spectrometer was equipped with an ESI ion source. Scanning mass range was between m/z 100-1 350. **Results:** Thirty-nine chemical compounds in *Ginseng* were identified unequivocally. **Conclusion:** Chromatographic demonstration of 39 chemical compounds of *Ginseng* in one run is achieved by HPLC-TOF/MS, which provides a foundation for further study on the metabolism and action mechanism of traditional Chinese herbal medicine.

[KEY WORDS] *Ginseng*; HPLC-TOF/MS; chemical principles(TCD)

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7):812-816]

人参为五加科人参属植物人参 *Panax Ginseng* C. A. Mey 的根。中医认为, 人参味甘, 微苦, 性微温, 具有大补元气, 复脉固脱, 补脾益肺, 生津安神, 益智等功效, 在《神农本草经》中被列为上品, 是常用的滋补强壮药^[1-2]。

人参具有多种化学成分, 每种成分在药理方面

又有其各自的特点^[3-4]。人参皂苷按苷元的结构可分为 3 类: (1) 齐墩果酸型, 如人参皂苷 Ro, 主要有抗炎、抗血小板释放作用; (2) 原人参二醇型, 如人参皂苷 Rb₁ 和 Rb₂, 表现为中枢神经抑制、降低细胞内钙、抗氧化、清除自由基和改善心肌缺血再灌注损伤等作用, 原人参二醇型皂苷无溶血活性; (3) 原人参

[收稿日期] 2008-11-28 **[接受日期]** 2009-03-03**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAI08B03-07). Supported by National “11th 5-Year-Plan” Science and Technology Supporting Program(2006BAI08B03-07).**[作者简介]** 庄江能, 主任药师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81871203, E-mail:yfchai@smmu.edu.cn

三醇型皂苷,有溶血活性,原人参三醇型皂苷如-Rg₁则表现为中枢神经兴奋,促智,促进蛋白质、DNA 和 RNA 的合成等^[5-8]。20 世纪 90 年代初我国学者在国内外研究基础上,从植物人参中已分离并确定了结构的皂苷成分计 60 余种,原人参二醇类(母核为达玛烷 dammarane)有人参皂苷 Ra₁、Ra₂、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd,此外,尚有乙酰人参皂苷(acetyl-ginsenosides)Rb₁、Rb₂、Rc,丙二酰基人参皂苷(malonyl-ginsenosides)Rb₁、Rb₂、Rc、Rd^[9-19]。

现代分析技术的发展,特别是液质联用分析技术,为中药化学成分的分析鉴别提供了简便、准确、可靠的方法。高分辨飞行时间质谱是一种新兴且发展比较迅速的质谱技术,具有检测灵敏度高、测定化合物质荷比精确、离子扫描范围宽且增大扫描范围不损失检测灵敏度的优点,现已广泛用于中药及生物样品的分离分析。采用 HPLC-TOF/MS 方法可以在线获取分析样品中各化合物离子的精确质荷比和其分子式,通过对比自建化学成分数据库,迅速对中药复方中化学成分进行分析鉴别。

本文采用 HPLC-TOF/MS 联用技术,对人参中各化学成分进行了快速分析鉴别,共鉴别出人参药材中 39 个化学成分,为进一步进行化学成分的代谢和作用机制研究奠定了基础。

1 仪器和试剂

安捷伦 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括在线脱气机,二元泵,高性能自动进样器,二极管阵列检测器;安捷伦 6210 高分辨飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司),配有标准电喷雾离子源(ESI)和大气压化学电离离子源(APCI),Masshunter 工作站及 Analyst QS 质谱分析软件;KUDOS SK2200H 型超声器,上海科导超声仪器公司;METYLER AE240 型电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司。

人参皂苷 Rg₁、Rb₁、Re 购自中国药品生物制品检定所。Rf、Ro 由人参提取物中分离得到,其结构已经 NMR 和 MS 鉴定,且纯度均大于 99%。人参药材购自上海华宇药业有限公司,经第二军医大学长征医院药材科陈万生教授鉴定为五加科植物人参 *Panax Ginseng* C. A. Mey. 的干燥根。

乙腈和甲醇(美国 Fisher 公司)均为色谱纯,实验用水均为二次重蒸水。甲酸为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax XDB-C₁₈ 柱(4.6

mm × 250 mm, 5 μm)。柱温 20℃,流速 1.0 ml/min。流动相为:乙腈(A)和水(B)。梯度如下:1~35 min,19% A;35~55 min,19%~29% A;55~70 min,29% A;70~110 min,29%~40% A;110~150 min,95% A。柱平衡时间为 15 min。进样量:20 μl。

2.2 HPLC-TOF/MS 质谱条件 采用大气压化学电离(atmospheric pressure chemical Ionization, APCI)离子源,正离子模式下:毛细管电压 4 000 V,雾化气压力 275.8 kPa,干燥气流速 10 L/min(温度 350℃),碎片电压 160 V;参比离子 m/z 121.050 873 和 922.009 798。负离子模式下:毛细管电压 3 500 V,雾化气压力 263.92 kPa,干燥气流速 8 L/min,干燥气温度 350℃,碎片电压 160 V,参比离子 119.036 320 和 966.000 725,质量数扫描范围 m/z 100~1 350。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 分别精密称取人参皂苷对照品 Rg₁ 和 Re 9.73、9.16 mg,置 25 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度分别为 0.389 2、0.366 4 mg/ml 的人参皂苷 Rg 和 Re 的对照品溶液。

分别精密称取人参皂苷对照品 Rb₁、Rf、Ro 各 5.13、6.34、4.93 mg,置 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得 Rb₁、Rf、Ro 的对照品溶液。

再分别精密量取人参皂苷 Rg、Re、Rb、Rf、Ro 的混合对照品溶液适量至量瓶中,加甲醇稀释并定容,即得 Rg、Re、Rb₁、Rf、Ro 的混合对照品溶液。

2.3.2 样品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷加热回流 3 h,弃去三氯甲烷液,药渣挥干溶剂,连同滤纸筒移入 100 ml 锥形瓶中,精密加入水饱和正丁醇 50 ml,密塞,放置过夜,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz) 30 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 25 ml,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 5 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 人参药材化学成分数据库的建立 根据人参药材的化学成分研究文献,收集了人参皂苷类化学成分信息,建立相应的化学成分数据库。

2.5 人参中 5 个成分对照品的 HPLC-APCI-TOF-MS 质谱分析 按 2.2 项下的高效液相色谱条件进行 HPLC-APCI-TOF-MS 分析, Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Ro 在负离子模式下的 TOF-MS 图谱如图 1 所示。

从各对照品的质谱图可看出,负离子模式下的 $[M-H]^-$ 分子离子出现在 TOF-MS 图谱中,几乎没有碎片离子出现,且分子离子的质量数测定误差都在 5 以内。因此利用 TOF-MS 对分子离子质荷比的高分辨性能,根据质谱图中各物质的精确分子量可反向推断出各物质的分子式。

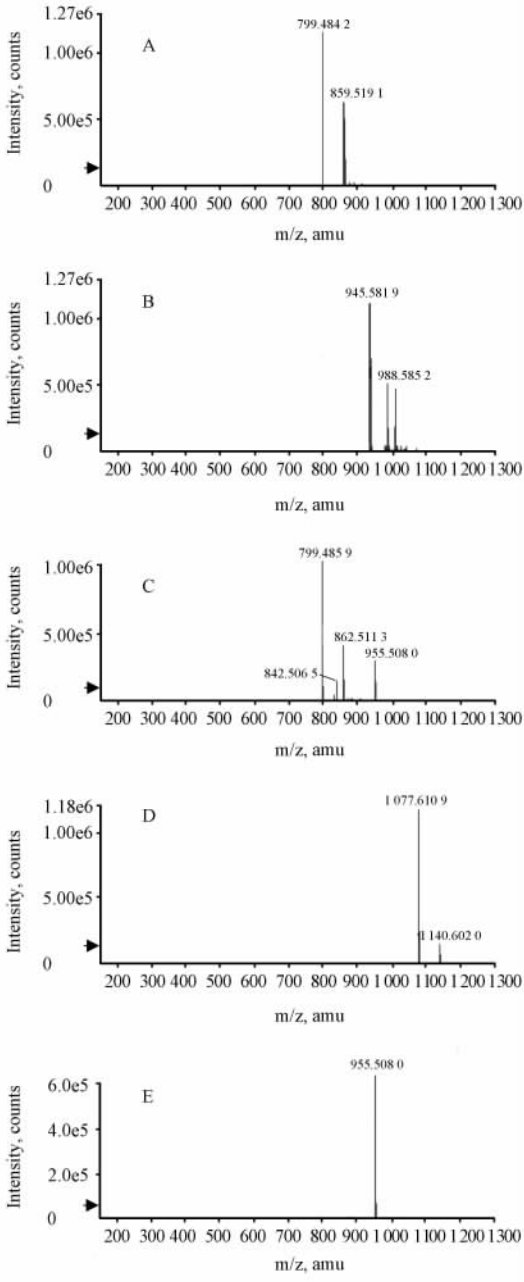


图 1 人参中 5 个对照品的 APCI-TOF-MS 图谱分析
Fig 1 APCI-TOF-MS spectra of five reference of Ginseng samples

A: Ginsenoside Rg₁; B: Ginsenoside Re; C: Ginsenoside Rf; D: Ginsenoside Rb₁; E: Ginsenoside Ro

2.6 人参中各成分 HPLC-APCI-TOF/MS 质谱分析 在现有 TOF-MS 条件下,所得人参药材样品溶液的 TOF-MS 图谱与 HPLC 色谱图具有良好的重

现性。除了利用在 TOF/MS 上得到的准分子离子的精确质量数与数据库中已知化合物的理论相对分子质量对比进行定性外,还利用了 Analyst QS 数据分析软件的计算工具(calculator)进行验证。当得到一个色谱峰的精确质量数后,通过设置质谱测量误差(< 3),可以计算出该质荷比所代表化合物可能的元素组成,然后将此分子式的理论同位素分布与实测值比对来验证推导结果。研究发现计算出的理论值与实测值能很好地吻合。

由于没有现成的人参中化学成分数据库可用,现采用 Agilent 提供的“formula_database_generator”软件建立人参中皂苷类化学成分分子式与精确相对分子质量数据库。在人参的 TOF-MS 图谱上可看出至少有 42 个色谱峰被检测出来,其中有 39 个色谱峰通过对比分子式与精确相对分子质量数据库鉴定出来。人参中的皂苷类化学成分的 HPLC-APCI-TOF-MS 总离子流图如图 2 所示。所有目标化合物分子离子的精确质量数误差都在 5 以内。人参中皂苷类化学成分的精确实分子量计算结果如表 1 所示。

3 讨论

实验中发现人参中含有大量的同分异构体,根据飞行时间质谱的原理,仅通过 TOF/MS 并不能将其区分开。除用少量对照品区分同分异构体外,实验中采用 ACD/ChemSketch 软件计算化合物的 logP 值判断保留时间的方法区分同分异构体。

以人参皂苷 Rf 为例说明人参中色谱峰的鉴定过程,可以看出保留时间为 68.72 min 色谱图中的准分子离子为 799.4859。计算准确质量数的可能元素组成,并根据准分子离子之间的相互联系,确定元素组成为 C₄₂H₇₁O₁₄。计算 C₄₂H₇₁O₁₄ 的核素分布情况,并与实际情况进行比对,从图 3 可以看出核素分布的理论值与实际值基本符合,可以确定此色谱峰为人参皂苷 Rf。

从人参总离子流图可以看出,有一些响应较好的色谱峰其质量数未能在已有数据库中找到,证明人参中还有大量的未知成分,有待于进一步研究。从人参整个鉴别过程中可以看出,飞行时间质谱法虽然能够提供化合物的准确相对分子质量,但由于其本身原理所致,不能有效地区分同分异构体。另外由于飞行时间质谱的高灵敏度以及中药复方的复杂性,中药复方中含量极低的化合物信号与噪声难以辨别,即信号有可能淹没在噪声中而难以区分出来。

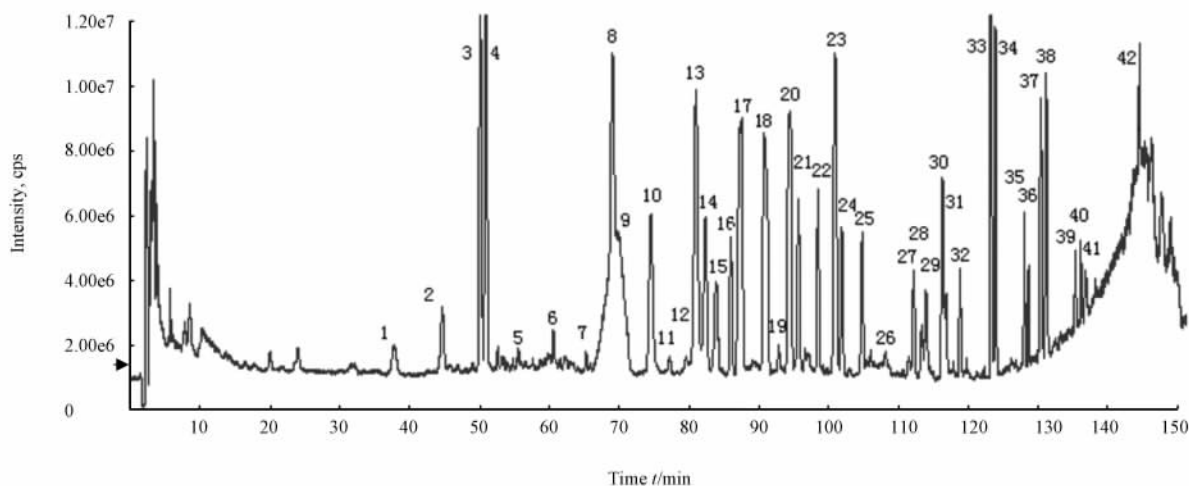


图2 人参中人参皂苷类成分的 HPLC-APCI-TOF-MS 总离子流图谱

Fig 2 TIC from HPLC-ESI-TOF-MS of ginsenosides in Ginseng

表1 人参中各化学成分的 TOF/MS 质谱分析结果(负离子)

Tab 1 TOF/MS analysis result of chemical contents in Ginseng (negative ions)

No.	Compound	Measured ion	Expected m/z	Experimental TOF-MS	Error
1	20-Glc-Rf	$[C_{48}H_{81}O_{19}]^-$	961.537 2	961.538 9	1.762 4
2	Notoginsenoside R ₁	$[C_{47}H_{79}O_{18}]^-$	931.526 6	931.528 5	1.996 0
3	Rg ₁	$[C_{43}H_{73}O_{14}]^-$	799.484 4	799.486 5	2.649 2
4	Re	$[C_{48}H_{81}O_{18}]^-$	945.542 3	945.545 9	3.817 1
5	-	-	-	979.563 7	-
6	Malonyl-Rg ₁	$[C_{45}H_{73}O_{17}]^-$	884.477 0	884.476 8	-0.170 6
7	-	-	-	987.576 8	-
8	Rf	$[C_{42}H_{71}O_{14}]^-$	799.484 4	799.485 9	1.898 7
9	Ro	$[C_{49}H_{79}O_{18}]^-$	955.526 6	955.528 0	1.422 6
10	Notoginsenoside R ₂	$[C_{41}H_{69}O_{13}]^-$	769.473 8	769.473 2	-0.802 2
11	Ra ₃	$[C_{59}H_{99}O_{27}]^-$	1 239.637 4	1 239.642 1	3.791 4
12	20(S)-Rh ₁	$[C_{36}H_{61}O_9]^-$	637.431 6	637.526 3	1.163 1
13	20(S)-Rg ₂	$[C_{42}H_{71}O_{13}]^-$	783.489 5	783.526 3	-4.042 7
14	20(R)-Rg ₂	$[C_{43}H_{73}O_{13}]^-$	783.489 5	783.526 3	-4.042 7
15	20(R)-Rh ₁	$[C_{36}H_{62}O_9]^-$	637.431 6	637.526 3	1.163 1
16	Ra ₁ /Ra ₂ /isomer	$[C_{58}H_{97}O_{26}]^-$	1 209.626 8	1 209.622 3	-3.726 8
17	Rb ₁	$[C_{54}H_{91}O_{23}]^-$	1 107.595 1	1 107.600 1	4.501 6
18	Rc	$[C_{53}H_{89}O_{22}]^-$	1 077.584 6	1 077.580 9	-3.387 2
19	Ra ₁ /Ra ₂ /isomer	$[C_{58}H_{97}O_{24}]^-$	1 209.626 8	1 209.622 3	-3.726 8
20	Rb ₂	$[C_{53}H_{89}O_{22}]^-$	1 077.584 6	1 077.580 9	-3.387 2
21	Rb ₃	$[C_{53}H_{89}O_{22}]^-$	1 077.584 6	1 077.610 9	-3.387 2
22	Malonyl-Rb ₁	$[C_{57}H_{92}O_{27}]^-$	1 192.587 7	1 192.590 1	2.012 4
23	Rd	$[C_{48}H_{81}O_{18}]^-$	945.542 3	945.541 9	-0.413 3
24	Malonyl-Rc/Rb ₂ /Rb ₃	$[C_{56}H_{90}O_{25}]^-$	1 162.577 1	1 162.575 7	-1.204 2
25	Malonyl-Rc/Rb ₂ /Rb ₃	$[C_{56}H_{90}O_{25}]^-$	1 162.577 1	1 162.581 7	3.956 7
26	Malonyl-Rc/Rb ₂ /Rb ₃	$[C_{56}H_{90}O_{25}]^-$	1 162.577 1	1 162.577 8	0.602 1
27	Malonyl-Rd	$[C_{51}H_{83}O_{21}]^-$	1 031.542 7	1 031.539 4	-3.199 1
28	Rg ₆ /F4	$[C_{42}H_{69}O_{12}]^-$	765.478 9	765.478 8	-0.130 6
29	Rg ₆ /F4	$[C_{42}H_{69}O_{12}]^-$	765.478 9	765.478 1	-1.045 1
30	Rg ₆ /F4	$[C_{42}H_{69}O_{12}]^-$	765.478 9	765.478 6	-0.391 9

(转下页)

(接上页)

No.	Compound	Measured ion	Expected m/z	Experimental TOF-MS	Error
31	-	-	-	987.580 7	-
32	Rh ₄	[C ₃₆ H ₅₉ O ₈] ⁻	619.421 0	619.423 2	3.551 7
33	Rg ₃ /isomer	[C ₄₂ H ₇₁ O ₁₃] ⁻	783.489 5	783.488 6	-1.148 7
34	Rg ₃ /isomer	[C ₄₂ H ₇₁ O ₁₃] ⁻	783.489 5	783.489 9	0.510 5
35	Rs ₃ /isomer	[C ₄₄ H ₇₅ O ₁₄] ⁻	825.500 0	825.500 8	0.969 1
36	Rs ₃ /isomer	[C ₄₄ H ₇₅ O ₁₄] ⁻	825.500 0	825.501 2	1.453 7
37	Rg ₅ /Rk ₁	[C ₄₂ H ₆₉ O ₁₂] ⁻	765.478 9	765.479 3	0.522 5
38	Rg ₅ /Rk ₁	[C ₄₂ H ₆₉ O ₁₂] ⁻	765.478 9	765.480 3	1.828 9
39	Ro isomer	[C ₄₉ H ₇₉ O ₁₈] ⁻	955.526 6	955.528	1.422 6
40	Ro isomer	[C ₄₉ H ₇₉ O ₁₈] ⁻	955.526 6	955.523	-3.767 6
41	20(S)-Rg ₃	[C ₄₂ H ₇₁ O ₁₃] ⁻	783.489 5	783.488 1	-1.786 9
42	Rh ₃	[C ₃₆ H ₅₉ O ₇] ⁻	603.426 1	603.035 5	-0.994 3

-: Unknown component

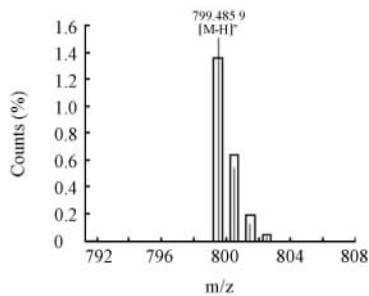


图3 人参皂苷 Rf 的准确质量及核素分布图

Fig 3 Accurate mass and isotopic distribution mass-spectrogram

[参考文献]

[1] 窦德强,任杰,陈颖,裴玉萍,陈英杰. 商品人参根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2003,28:522-524.

[2] 张萍,张南平,肖新月,林瑞超. 人参皂苷类成分的化学分析[J]. 药物分析杂志,2004,24:229-237.

[3] 孙玉岭,薛维政. 人参主要化学成分分析方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11:555-556.

[4] 曲婷婷. 人参有效成分抗肿瘤的研究进展[J]. 中医学杂志,2005,23:2275-2277.

[5] 李丽,刘春明,吴巍,越皓,刘志强,刘淑莹,等. 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[J]. 分析化学,2005,8:1087-1090.

[6] 袁湘林,张玉奎,邹汉法. 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱用于人参皂甙 Rg 的定量分析[J]. 分析化学,2001,29:11-14.

[7] 贾晓斌,施亚芳,黄一平,陈彦,王晓雷. 人参皂苷类成分的 HPLC 指纹谱研究[J]. 中药材,2001,24:722-723.

[8] Carr M N, Bekku N, Yoshimura H. Identification of anxiolytic ingredients in ginseng root using the elevated plus-maze test in mice[J]. Eur J Pharmacol,2006,531(1-3):160-165.

[9] Chan E C, Yap S L, Lau A J, Leow P C, Toh D F, Koh H L. Ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics of raw and steamed *Panax notoginseng* [J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2007,21:519-528.

[10] Chan S, Kong M F, Wong Y C, Wong S K, Sin D W. Application of isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in analysis of organochlorine pesticide residues in ginseng root [J]. J Agric Food Chem,2007,55:3339-3345.

[11] Kang K S, Yokozawa T, Yamabe N, Kim H Y, Park J H. ESR study on the structure and hydroxyl radical-scavenging activity relationships of ginsenosides isolated from *Panax ginseng* C A Meyer [J]. Biol Pharm Bull,2007,30:917-921.

[12] Lee B H, Lee J H, Lee S M, Jeong S M, Yoon I S, Lee J H, et al. Identification of ginsenoside interaction sites in 5-HT_{3A} receptors [J]. Neuropharmacology,2007,52:1139-1150.

[13] Leung K S, Chan K, Bensoussan A, Munroe M J. Application of atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry in the identification and differentiation of *Panax* species [J]. Phytochem Anal,2007,18:146-150.

[14] Liu Y, Yang J, Cai Z. Chemical investigation on Sijunzi decoction and its two major herbs *Panax ginseng* and *Glycyrrhiza uralensis* by LC/MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal,2006,41:1642-1647.

[15] Mao J, Xu J. Discrimination of herbal medicines by molecular spectroscopy and chemical pattern recognition [J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc,2006,65:497-500.

[16] Tanaka H, Fukuda N, Shoyama Y. Identification and differentiation of *Panax* species using ELISA, RAPD and eastern blotting [J]. Phytochem Anal,2006,17:46-55.

[17] Tanaka H, Fukuda N, Shoyama Y. Eastern blotting and immunoaffinity concentration using monoclonal antibody for ginseng saponins in the field of traditional chinese medicines [J]. J Agric Food Chem,2007,55:3783-3787.

[18] Xie P, Chen S, Liang Y Z, Wang X, Tian R, Upton R. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine [J]. J Chromatogr A,2006,1112(1-2):171-180.

[19] Yang S Y, Kim H K, Lefeber A W, Erkelens C, Angelova N, Choi Y H, et al. Application of two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to quality control of ginseng commercial products [J]. Planta Med,2006,72:364-369.