

# 入口电离-高分辨质谱法分析 人参皂苷同分异构体

郭云龙<sup>1</sup>, 迟鸿悦<sup>1</sup>, 王 洋<sup>1</sup>, 郑 飞<sup>1</sup>, 戴雨霖<sup>1</sup>,  
黄 鑫<sup>1</sup>, 越 皓<sup>1</sup>, 刘淑莹<sup>1,2</sup>

(1. 长春中医药大学, 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117;

2. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022)

**摘要:** 本文建立了入口电离-高分辨质谱法快速区分人参皂苷同分异构体, 通过正、负离子模式及最佳入口温度, 对人参皂苷同分异构体进行敞开式质谱分析。结果表明, 在正、负离子全扫描模式及最佳实验温度下, 根据人参皂苷同分异构体所形成的聚体数目不同, 形成的离子峰类型不同, 可实现人参皂苷同分异构体的区分。该方法简单、快速, 仅需简单的样品前处理, 即可区分人参皂苷同分异构体。

**关键词:** 入口电离; 高分辨质谱; 人参皂苷; 同分异构体

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)03-0396-05

doi: 10.7538/zpxb.2023.0076

## Analysis of Ginsenoside Isomers by Inlet Ionization-High Resolution Mass Spectrometry

GUO Yun-long<sup>1</sup>, CHI Hong-yue<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>, ZHENG Fei<sup>1</sup>, DAI Yu-lin<sup>1</sup>,  
HUANG Xin<sup>1</sup>, YUE Hao<sup>1</sup>, LIU Shu-ying<sup>1,2</sup>

(1. Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry,

Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

**Abstract:** The ginsenoside isomers were analyzed and distinguished by using inlet ionization-high resolution mass spectrometry technology under positive and negative ion modes with optimum inlet temperatures. The results showed that under the full scanning mode of positive and negative ion modes with the optimum experimental temperature, different types of ions were formed according to the characteristics of different numbers of polymers formed by isomeric monomers of ginsenoside, and the identification of ginsenoside isomers was realized. For the identification of ginsenoside CK and Rh<sub>2</sub>, there was no obvious difference in their MS spectra under positive ion mode. However, under negative ion mode with the inlet temperature of 200 °C, ginsenoside CK tended to form polymers of [M+Cl]<sup>-</sup>, Rh<sub>2</sub> tended to form polymers of [M+COOH]<sup>-</sup>, and the number of polymers of CK was significantly higher than that of Rh<sub>2</sub>. For the identification of ginsenoside Rb<sub>2</sub> and Rc, under

positive ion mode with the inlet temperature of 200 °C, ginsenoside Rb<sub>2</sub> and Rc could produce polymers of  $[M+Na]^+$ , but the polymers peak intensity of Rb<sub>2</sub> was significantly higher than that of Rc. Under negative ion mode with the inlet temperature of 200 °C, Rb<sub>2</sub> tended to form polymers of  $[M+Cl]^-$ , and Rc tended to form polymers of  $[M+COOH]^-$ . For the identification of ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rf, there was no obvious difference in their MS spectra under the positive ion mode. Under negative ion mode with the inlet temperature of 200 °C, Rg<sub>1</sub> and Rf tended to form polymers of  $[M+Cl]^-$  and  $[M-H]^-$ , respectively. In this study, the three pairs of isomers in ginsenosides were basically identified by using the full MS scanning method and the control of the mass spectrometry inlet temperature. The experimental method is simple, fast, and has the characteristics of low consumption. This study confirms that the entrance ionization mass spectrometry technique can provide a theoretical reference for the rapid discrimination and identification of ginsenoside isomers.

**Key words:** inlet ionization; high resolution mass spectrometry; ginsenoside; isomer

人参皂苷是由皂苷元与糖取代基相连构成的一种四环三萜类糖苷化合物,根据苷元结构不同,可将其分为达玛烷型、齐敦果酸型及奥克梯隆型,其中达玛烷型又可分为原人参二醇和原人参三醇<sup>[1-2]</sup>。原人参二醇型皂苷 Rh<sub>2</sub> 和 CK 属于稀有人参皂苷同分异构体, Rh<sub>2</sub> 具有较好的抗肿瘤及抗疲劳作用, CK 是原人参二醇型皂苷肠道内的代谢产物,被认为是二醇型人参皂苷在体内发挥药理作用的主要活性成分<sup>[3-4]</sup>。原人参二醇型皂苷 Rb<sub>2</sub> 和 Rc 互为同分异构体,其中, Rb<sub>2</sub> 可促进合成 DNA 及 RNA、清除体内自由基,起到抗老、抗氧化等作用<sup>[5]</sup>; Rc 属于固醇类分子,可抑制体内癌细胞的生长、繁殖<sup>[6]</sup>。原人参三醇型皂苷的同分异构体则以 Rg<sub>1</sub> 和 Rf 为代表,其中, Rg<sub>1</sub> 可兴奋中枢神经,具有缓解疲劳、改善学习、增强记忆力等作用<sup>[7]</sup>; Rf 对血压具有双向作用<sup>[8]</sup>。鉴于人参皂苷同分异构体具有不同的药理活性,对其区分鉴定十分重要。

入口电离(inlet ionization)不需要激光、高压、超声波等电离手段,只需将分析物与基质化合物的混合物置于质谱仪的采样毛细管内,即可获得分析物的质谱信号。入口电离不仅具有较高的灵敏度,而且电离方式温和,对于有些分析物可生成多电荷离子,呈现特征性电荷分布<sup>[9]</sup>。

目前,通常采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术,在正、负离子模式下,根据二级特征质谱所需的碰撞能量不同或相对特征离子丰度不同对人参皂苷的同分异构体进行区分<sup>[10]</sup>。本研究将入口电离技术与高分辨质谱相结合,克服由人参皂苷同分异构体在高效液相色谱中保

留时间基本相近、电喷雾质谱母离子质荷比和碰撞裂解所产生的特征离子碎片基本相同而造成的不能准确识别的缺点。在正、负离子模式下,采用全扫描模式,根据人参皂苷同分异构体所形成的聚体数目不同,或形成不同类型离子峰的特点,实现人参皂苷同分异构体的确认,希望为人参皂苷及其他天然化合物同分异构体的快速和准确识别提供参考。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Q-Exactive Orbitrap 质谱仪: 美国 Thermo 公司产品; 数控超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司产品。

人参皂苷标准品 CK、Rh<sub>2</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc、Rg<sub>1</sub>、Rf: 纯度均大于 98%, 上海源叶生物科技有限公司产品; 甲醇: 色谱纯, 美国 Thermo 公司产品。

### 1.2 质谱条件

正、负离子模式, 全扫描模式, 质量扫描范围  $m/z$  500~5 000; 质谱入口电离温度 200 °C; 无需工作气体辅助。

### 1.3 样品制备

分别精密称取 10 mg 人参皂苷 CK、Rh<sub>2</sub>、Rb<sub>2</sub>、Rc、Rg<sub>1</sub> 和 Rf 标准品, 置于 25 mL 量瓶中, 用 0.1% 甲酸甲醇溶液定容至刻度。实验过程中, 精准移取 500 μL 标准品溶液, 置于 1 mL EP 管中, 加入 500 μL 0.1% 甲酸甲醇溶液, 超声振荡后使用。

### 1.4 实验方法

用移液枪吸取 5 μL 样品, 置于质谱离子传

输口,真空状态是入口电离技术电离样品的主要条件<sup>[11]</sup>。为保证实验结果的稳定性和准确性,移液枪尖端距质谱离子传输口2~5 mm左右<sup>[12-13]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 入口温度

质谱入口温度是影响样品各离子强度的主要因素,它有助于气化溶液,使溶质更容易暴露,辅助样品电离。以人参皂苷的离子强度和聚体数量为指标,在50~400℃范围内,每隔50℃设置1个温度,考察不同入口温度对样品电离的影响。结果表明,离子强度和聚体数量随温度的升高而升高,在200℃时离子强度相对较高,且聚体数量较多。当温度过低时,溶质分子遗留在入口处,离子强度相对较低,甚至没有出现目标信号;当温度过高时,虽然离子强度提高,但异构体数量减少,而且容易产生雷登弗罗斯特效应现象<sup>[14]</sup>,导致离子强度降低和聚体数量减少。

### 2.2 人参皂苷同分异构体离子峰的区分

正、负离子模式下,人参皂苷Rh<sub>2</sub>与CK的一级质谱图示于图1。在正离子模式,平均总离子强度相同的前提下,Rh<sub>2</sub>与CK都存在[M+Na]<sup>+</sup>、[2M+Na]<sup>+</sup>、[3M+Na]<sup>+</sup>、[4M+Na]<sup>+</sup>、[5M+Na]<sup>+</sup>、[6M+Na]<sup>+</sup>、[7M+Na]<sup>+</sup>离子峰,且各聚体的相对离子丰度没有显著差异,因此较难区分人参皂苷同分异构体Rh<sub>2</sub>和CK,示于图1a。在负离子模式,平均总离子强度相同的前提下,CK产生了[M+Cl]<sup>-</sup>、[2M+Cl]<sup>-</sup>、[3M+Cl]<sup>-</sup>、[4M+Cl]<sup>-</sup>、[5M+Cl]<sup>-</sup>、[6M+Cl]<sup>-</sup>、[7M+Cl]<sup>-</sup>、[8M+Cl]<sup>-</sup>离子峰,Rh<sub>2</sub>产生[M+COOH]<sup>-</sup>、[2M+COOH]<sup>-</sup>、[3M+COOH]<sup>-</sup>、[4M+COOH]<sup>-</sup>、[5M+COOH]<sup>-</sup>离子峰,离子强度均依次降低,示于图1b。在温度和平均总离子强度相同的条件下,负离子模式下的CK倾向于加和[Cl]<sup>-</sup>,可出现8聚体;Rh<sub>2</sub>倾向于加和[COOH]<sup>-</sup>,且只有5聚体。通过Rh<sub>2</sub>与CK加和离子及聚体情况的不同可区分二者。

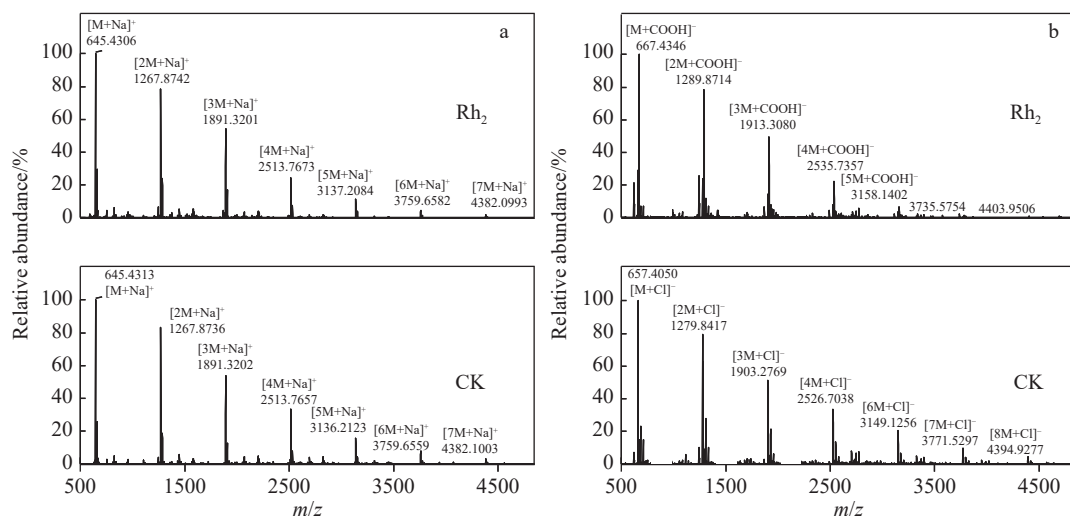
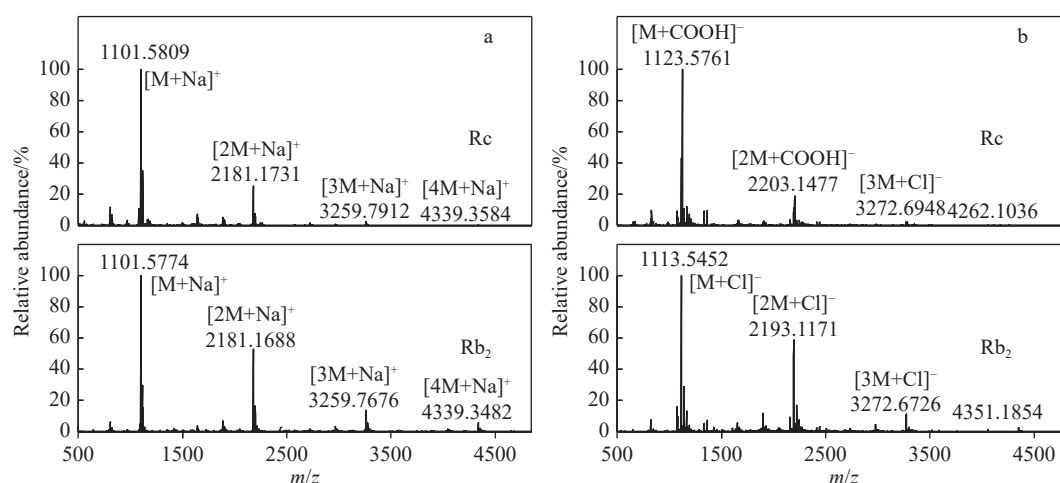


图1 人参皂苷Rh<sub>2</sub>与CK在正(a)、负(b)离子模式下的一级质谱图

Fig. 1 Mass spectra of ginsenoside Rh<sub>2</sub> and CK under positive (a) and negative (b) ion modes

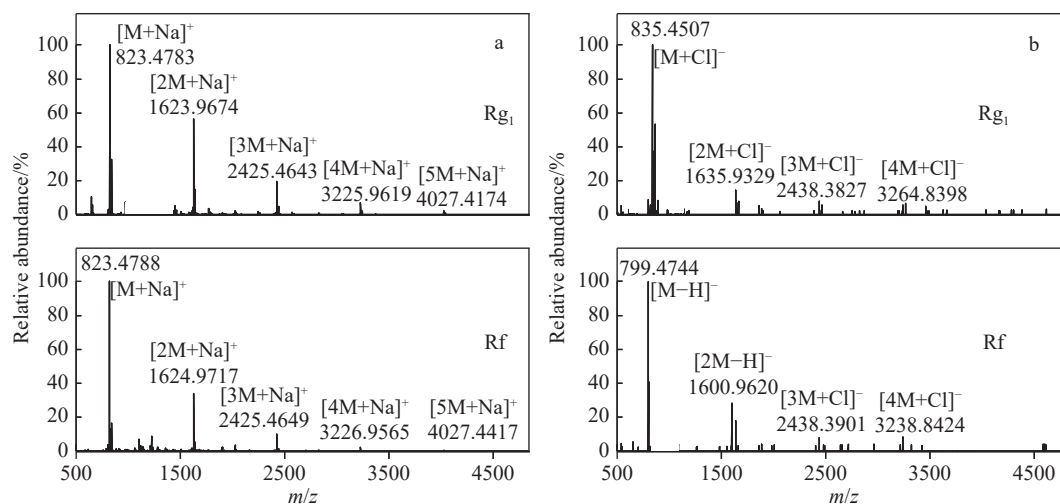
正、负离子模式下,人参皂苷Rc与Rb<sub>2</sub>的一级质谱图示于图2。在正离子模式、平均总离子强度相同的情况下,Rc与Rb<sub>2</sub>均产生了[M+Na]<sup>+</sup>、[2M+Na]<sup>+</sup>、[3M+Na]<sup>+</sup>、[4M+Na]<sup>+</sup>离子峰,Rb<sub>2</sub>的[2M+Na]<sup>+</sup>、[3M+Na]<sup>+</sup>、[4M+Na]<sup>+</sup>峰强度相对比值分别为50%、15%、5%,Rc的[2M+Na]<sup>+</sup>、[3M+Na]<sup>+</sup>、[4M+Na]<sup>+</sup>峰强度相对比值分别为25%、低于5%、基本与基线持平,示于图2a。Rc和Rb<sub>2</sub>形成聚

体的平均相对峰强度具有明显差异,据此可区分二者。在负离子模式、平均总离子强度相同的前提下,Rb<sub>2</sub>产生[M+Cl]<sup>-</sup>、[2M+Cl]<sup>-</sup>、[3M+Cl]<sup>-</sup>、[4M+Cl]<sup>-</sup>峰,Rc产生[M+COOH]<sup>-</sup>、[2M+COOH]<sup>-</sup>、[3M+COOH]<sup>-</sup>峰,离子强度均依次降低,示于图2b。通过比较可知,在温度相同、平均总离子强度相同的条件下,负离子模式下,Rb<sub>2</sub>倾向于加和[Cl]<sup>-</sup>,Rc倾向于加和[COOH]<sup>-</sup>,据此可区分二者。

图2 人参皂苷 Rc 与 Rb<sub>2</sub> 在正(a)、负(b)离子模式下的一级质谱图Fig. 2 Mass spectra of ginsenoside Rc and Rb<sub>2</sub> under positive (a) and negative (b) ion modes

正、负离子模式下, 人参皂苷 Rf 和 Rg<sub>1</sub> 的质谱图示于图3。在正离子模式、平均总离子强度相同的情况下, Rf 与 Rg<sub>1</sub> 均产生了[M+Na]<sup>+</sup>、[2M+Na]<sup>+</sup>、[3M+Na]<sup>+</sup>、[4M+Na]<sup>+</sup>和[5M+Na]<sup>+</sup>离子峰, 相对峰强度基本无区别, 示于图3a。在负离子模式、平均总离子强度相同的情况下,

Rg<sub>1</sub> 产生[M+Cl]<sup>-</sup>、[2M+Cl]<sup>-</sup>、[3M+Cl]<sup>-</sup>、[4M+Cl]<sup>-</sup>离子峰, Rf 产生[M-H]<sup>-</sup>、[2M-H]<sup>-</sup>离子峰, 离子强度均依次降低, 示于图3b。通过比较可知, 在温度和总离子强度相同的条件下, 负离子模式下 Rg<sub>1</sub> 倾向于加和[Cl]<sup>-</sup>, Rf 倾向于失去[H]<sup>+</sup>, 据此可区分二者。

图3 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 与 Rf 在正(a)、负(b)离子模式下的一级质谱图Fig. 3 Mass spectra of ginsenoside Rg<sub>1</sub> and Rf under positive (a) and negative (b) ion modes

由于入口电离质谱技术的电离过程在敞开式环境中进行, 受环境因素影响较大。研究发现<sup>[15]</sup>, 人参皂苷的各同分异构体在正离子模式下主要产生[M+Na]<sup>+</sup>峰, 可能由于空气中广泛分布钠、钾等碱金属离子, 样品与碱金属离子发生气相离子反应。通常情况下, 碱金属的亲和

力依次为 Li<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > Bb<sup>+</sup> > Cs<sup>+</sup>, 但最终的加和离子结果由样品结合碱金属离子的能力决定。在负离子模式下, 各皂苷的聚体离子加成情况较复杂, 会出现不同的加和离子, 这可能与皂苷的糖配体位置及种类有关, 有待进一步分析。

### 3 结论

本研究建立了入口电离结合四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法区分人参皂苷的同分异构体。样品经简单前处理后,用全扫描模式,根据形成的特征加和离子不同,可基本实现人参皂苷中3对同分异构体(CK/Rh<sub>2</sub>、Rb<sub>2</sub>/Rc、Rg<sub>1</sub>/Rf)的区分。本研究证实了入口电离质谱技术可为人参皂苷同分异构体的快速区分鉴定提供理论参考。

### 参考文献:

- [1] BAEK S H, BAE O N, PARK J H. Recent methodology in ginseng analysis[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2012, 36(2): 119-134.
- [2] 李雪, 赵幻希, 苗瑞, 李文影, 修洋, 刘淑莹. 基于HPLC-HRMS/MS<sup>n</sup>/QQQ技术的人参皂苷Rb<sub>1</sub>化学转化产物的结构与途径分析[J]. *高等学校化学学报*, 2017, 38(10): 1 730-1 736.  
LI Xue, ZHAO Huanxi, MIAO Rui, LI Wenyang, XIU Yang, LIU Shuying. Structure and pathway research on chemical transformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub> via HPLC-HRMS/MS<sup>n</sup>/QQQ technique[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2017, 38(10): 1 730-1 736(in Chinese).
- [3] 于雷, 李成龙, 于珊珊. 人参皂苷CK的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2013(1): 31-35.  
YU Lei, LI Chenglong, YU Shanshan. Advance on research of ginsenoside CK[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2013(1): 31-35(in Chinese).
- [4] 孙小单, 王天鸣, 李慧, 赵沛妍, 刘岩, 程颖. 人参皂苷Rh<sub>2</sub>抑制人非小细胞肺癌细胞增殖的机制研究[J]. *中草药*, 2022, 53(2): 441-448.  
SUN Xiaodan, WANG Tianming, LI Hui, ZHAO Peiyan, LIU Yan, CHENG Ying. Mechanism of ginsenoside Rh<sub>2</sub> on inhibiting proliferation of human non-small cell lung cancer cells[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(2): 441-448(in Chinese).
- [5] LIM H J, LEE H Y, LIM D Y. Inhibitory effects of ginsenoside-Rb<sub>2</sub> on nicotinic stimulation-evoked catecholamine secretion[J]. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 2014, 18(5): 431-439.
- [6] OH Y, LIM H W, PARK K H, HUANG Y H, YOON J Y, KIM K, LIM C J. Ginsenoside Rc protects against UVB-induced photooxidative damage in epidermal keratinocytes[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(3): 2 907-2 914.
- [7] 吕丽娜, 姜丽红. 人参皂苷Rg<sub>1</sub>对心血管系统的药理作用研究进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2020, 34(6): 83-86.
- [8] LYU Lina, JIANG Lihong. Pharmacological effects of ginsenoside Rg<sub>1</sub> on cardiovascular system[J]. *Research and Practice on Chinese Medicines*, 2020, 34(6): 83-86(in Chinese).
- [9] LEE S M, KIM S C, OH J, KIM J H, NA M. 20(R)-Ginsenoside Rf: a new ginsenoside from red ginseng extract[J]. *Phytochemistry Letters*, 2013, 6(4): 620-624.
- [10] 于湛. 原位电离质谱技术与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2017: 154.
- [11] XIU Y, MA L, ZHAO H, SUN X, LI X, LIU S. Differentiation and identification of ginsenoside structural isomers by two-dimensional mass spectrometry combined with statistical analysis[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2019, 43(3): 368-376.
- [12] LU I C, POPHRISTIC M, INUTAN E D, McKAY R G, McEWEN C N, TRIMPIN S. Simplifying the ion source for mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2016, 30(23): 2 568-2 572.
- [13] 郭云龙, 迟鸿悦, 王洋, 修洋, 越皓, 陈长宝, 黄鑫, 刘淑莹. 入口电离质谱法快速分析南、北五味子木质素化学成分及差异标志物的鉴定[J]. *分析试验室*, 2021, 40(5): 509-512.  
GUO Yunlong, CHI Hongyue, WANG Yang, XIU Yang, YUE Hao, CHEN Changbao, HUANG Xin, LIU Shuying. Rapid identification on chemical constituents of lignins in fruits of *Schisandra sphenanthera* and *Schisandra chinensis* and discrimination marker by inlet ionization[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2021, 40(5): 509-512(in Chinese).
- [14] 张朝辉, 谷陟欣, 刘婧靖, 陈应庄, 陈波, 马铭. 直喷离子化质谱简单快速鉴别关木通[J]. *分析化学*, 2017, 45(8): 1 143-1 148.  
ZHANG Zhaohui, GU Zhixin, LIU Jingjing, CHEN Yingzhuang, CHEN Bo, MA Ming. Simple and rapid differentiation of Mutong of Aristolochiaceae by direct spray mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(8): 1 143-1 148(in Chinese).
- [15] PEI J, YU K, WANG Y. Thermal bursting ionization for ambient mass spectrometry[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(3): 2 496-2 499.
- [16] FUJII T. Alkali-metal ion/molecule association reactions and their applications to mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2000, 19(3): 111-138.

(收稿日期: 2023-06-30; 修回日期: 2023-11-13)