

液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析人参皂苷

郭继芬¹, 钟大放², 乔善义¹, 赵毅民¹

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850;

2 沈阳药科大学药物代谢与药物动力学实验室, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 应用液相色谱-电喷雾质谱(LCMS)联用技术,对8种人参皂苷单体进行了探讨。发现在电喷雾负离子检测方式下,在离子阱和四极杆这两种不同质量分析器的质谱仪中,8种皂苷分子所产生的准分子离子峰均为[M+45]⁻峰;并根据离子阱多级质谱扫描功能产生的碰撞诱导裂解(CID)谱,研究了该类化合物分子在电喷雾质谱、负离子检测方式下的裂解特征,有助于该类化合物的分子量确定和结构鉴定;同时建立了液相色谱-质谱联用法,可用于该类化合物的定性分析。

关键词: 质谱学;人参皂苷研究;液相色谱-电喷雾质谱联用法(LCMS);人参

中图分类号: O 657. 63; R 278. 71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2003)04-477-05

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)是一种著名中药,具有多种独特而重要的生物活性,临床应用广泛。人参皂苷是人参中的主要有效成分,代表了人参的大部分生物活性。现已分得数十种皂苷类化合物,而新的皂苷成分还在不断地被分离;这些成分的药理作用各有差异,有的甚至截然相反^[1]。因此深入细致地研究各单体的化学性质、药理作用以及临床用途,对于深入阐明人参功效,开发人参应用价值,寻找新的先导化合物均有重要意义。

据文献报道,目前用于此类化合物的分析方法很多,例如免疫分析法^[2]、气相色谱法(GC)^[3]、高效液相色谱法(HPTLC)^[4]、高效液相-紫外分光光度法(HPLC-UV)^[5]、HPLC-荧光法^[6]及多种质谱法^[7-11]。本研究拟应用液相色谱-离子阱质谱和液相色谱-三级四极杆质谱,分析8种人参皂苷单体(Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rd、Rg₃、Re、Rg₁、Rh₁),探讨该类化合物分子在电喷雾质谱、负离子检测方式下的裂解特点,以确定该类化合物的分子量、糖连接情况及鉴定母核结构,

同时对该类化合物进行定性分析。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

离子阱质谱:LCQ型液相色谱-质谱联用仪,美国Finnigan公司产品,配有ESI源及LCQ 1.2数据处理系统;三级四极杆质谱:API 3000液相色谱-质谱联用仪,美国ABI公司产品,配有Turbo IonSpray源及Analyst 1.1数据处理系统;高效液相色谱仪(包括LC-10AD泵,Rheodyne 7125进样阀):日本岛津公司产品;色谱柱:Hypersil ODS2 C18不锈钢柱,150×2.0 mm(内径),5 μm粒径,大连依利特公司产品;流动相:甲醇/水(V(甲醇)/V(水)=80/20),流速0.2 mL·min⁻¹;柱温为室温;进样量50 μL。

1.2 主要材料与试剂

人参皂苷Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rd、Rg₃、Re、Rg₁、Rh₁由沈阳药科大学天然药物研究室王金辉博士提供,结构式示于图1,其分子量列于表1。其中Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rd、Rg₃属于原人参二醇类,

收稿日期:2003-08-20;修回日期:2003-09-28

作者简介:郭继芬(1975~),女(汉族),内蒙赤峰人,助理研究员,从事质谱在药物研究与开发方面的应用研究

E-mail: guojifen@sohu.com



Rh₁, Rg₁, Re 属于原人参三醇类; 甲醇: 色谱纯, 山东禹王公司产品。

1.3 实验步骤

精密称取各人参皂苷单体制成 1 g/L 的甲醇储备液, 再用流动相稀释成 20、5、1 mg/L 的待测溶液。

1.4 质谱条件

1.4.1 离子阱质谱 ESI源: 负离子检测; 鞘气柱前压 6 MPa; 辅助气柱前压 0.5 MPa; 源电压 4.25 kV; 毛细管温度 180 °C; 毛细管电压 -15.50 V; 管透镜补偿电压 -27.00 V。

1.4.2 三级四极杆质谱 Turbo IonSpray 源负离子检测; 喷射电压 -4000 V; NEB 6; CUR 10; DP: -50 V。

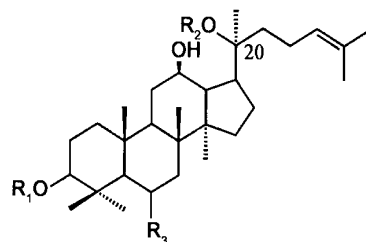


图 1 八种人参皂苷单体的结构式

Fig 1 Geometric structure of eight Ginsenosides

表 1 八种人参皂苷单体的分子量

Table 1 Molecular weight of eight Ginsenosides

人参皂苷	R ₁	R ₂	R ₃	分子式(Formula)	分子量(M _r)
Rb ₁	-glc ² -glc	-glc ⁶ -glc	H	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1108
Rb ₂	-glc ² -glc	-glc ⁶ -ara(p)	H	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1078
Rb ₃	-glc ² -glc	-glc ⁶ -xy1	H	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1078
Rd	-glc ² -glc	-glc	H	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	946
Rg ₃	-glc ² -glc	H	H	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	784
Re	H	-glc	-O-glc ² -rha	C ₄₈ H ₈₂ O ¹⁸	946
Rg ₁	H	-glc	-O-glc	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	800
Rh ₁	H	H	-O-glc	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	638

2 结果与讨论

2.1 人参皂苷单体的一级质谱分析结果

分别在正、负离子检测方式下, 将样品溶液经注射泵注入质谱仪, 获得了 8 种人参皂苷单体的一级全扫描质谱图。由于人参皂苷分子对阳离子具有较强的亲合性, 在正离子检测图谱中, 可观察到 $[M + NH_4]^+$ 、 $[M + H]^+$ 、 $[M + Na]^+$ 和 $[M - H_2O + H]^+$ 等准分子离子峰, 但不同的皂苷分子加合离子情况有所差别, 基峰为 $[M + NH_4]^+$ 或 $[M + H]^+$ 等离子; 而在负离子检测图谱中, 在离子阱和四极杆两种质谱仪中, 8 种皂苷分子的基峰均为 $[M + 45]^-$, 推测其为 $[M + HCOO]^-$ 或 $[M + 2Na - H]^-$ 等离子。人参皂苷 Rb₁, Re 在电喷雾-离子阱质谱正、负离子检测方式下的一级质谱图示于图 2。

2.2 人参皂苷单体的多级质谱(MSⁿ)分析结果

利用离子阱技术进行多级质谱分析时, 8 种皂苷分子的负离子碰撞诱导解离(CID)谱中产生系列脱糖碎片离子, 人参皂苷 Re 在(-)-ESI/

MSⁿ 检测方式下的二至六级质谱图示于图 3, 推测 m/z 945, 799, 783, 637, 475 和 391 分别代表 Re 的 $[M - H]^-$, $[M - H - rha]^-$, $[M - H - glc]^-$, $[M - H - rha - glc]^-$, $[M - H - rha - 2glc]^-$, $[M - H - rha - 2glc - 84]^-$ 离子, 其中 $[M - H - rha - 2glc - 84]^-$ 为进一步脱去 20 位侧链的产物离子。

8 种皂苷分子的 CD 谱列于表 2。

2.3 人参皂苷单体的 LCMSⁿ 分析结果

8 种人参皂苷经色谱分离后, 在(-)-ESI 检测方式下所得的三级全扫描色谱图示于图 4。原人参三醇系列(即 Rh₁, Rg₁ 和 Re)比原人参二醇系列(Rb₁, Rb₂, Rd 和 Rg₃)的母核上多一个 -OH, 极性大于后者, 因此在反相柱上的保留能力弱于后者, 使得保留时间短于后者。另外, 对于含有相同母核的皂苷分子, 所连糖数越多, 极性越大, 在反相柱上的保留时间越短, 如

$$t_r(Re) < t_r(Rg_1) < t_r(Rh_1), t_r(Rb_1) < t_r(Rb_2, Rb_3) < t_r(Rd) < t_r(Rg_3).$$

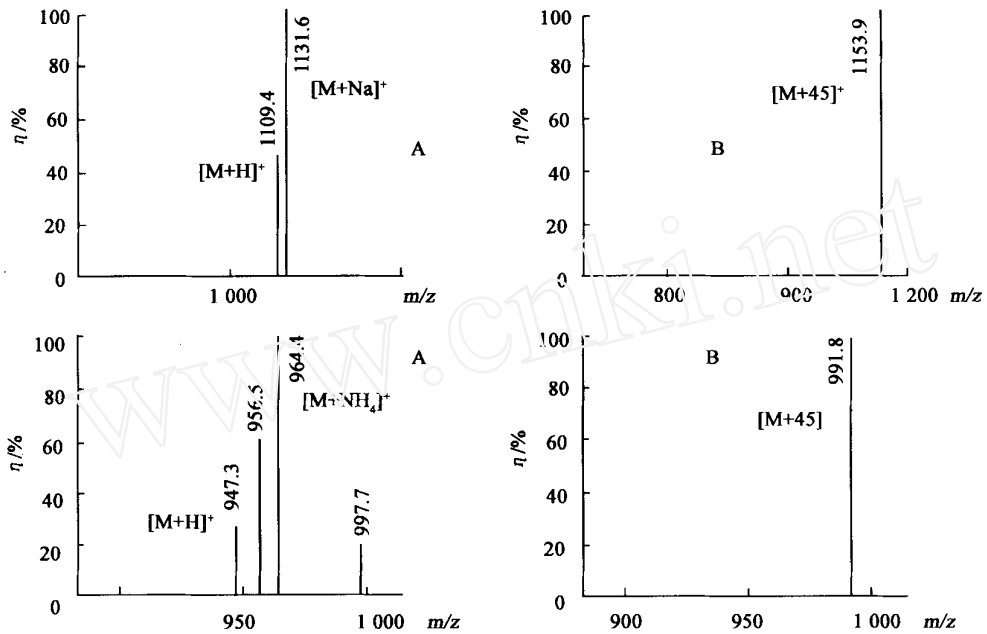


图 2 人参皂苷 Rb₁, Re 在电喷雾—离子阱质谱正(A)、负(B)离子检测方式下的一级质谱图

Fig 2 Positive(A)and negativ(B) ion full scan mass spectra of Ginsenoside Rb₁ and Re

表 2 八种人参皂苷分子在电喷雾-离子阱质谱负离子检测方式下的准分子离子和各级碎片离子
Table 2 Pseudomolecular ions [M + 45]⁻ and their fragment ions observed in negative ion full scan MSⁿ spectra for eight Ginsenosides

人参皂苷	m/z						
	[M + 45] ⁻	碎片离子(Fragment ions)					
Rb ₁	m/z 1 153	1 107	945	783	621	459	
Rb ₂	m/z 1 123	1 077	945 (和 915)	783	621	459	
Rb ₃	m/z 1 123	1 077	945 (和 915)	783	621	459	
Rd	m/z 991	945	783	621	459	375	
Rg ₃	m/z 829	783	621	459	375		
Re	m/z 991	945	799 (和 783)	637	475	391	
Rg ₁	m/z 845	799	637	475	391		
Rh ₁	m/z 683	637	475	391			

量时具有重要意义。有文献报道^[7],该类化合物在电喷雾质谱、负离子检测方式下产生[M + Na-H]⁻准分子离子。在实验中发现,Rb₂和Rb₃的二级质谱产生[M + 22]⁻离子,故推测[M + 45]⁻离子为[M + HCOO]⁻或[M + 2Na-H]⁻等离子。分析多级质谱检测结果,可得出如下结论:在(-)-ESI/MSⁿ检测方式下,人参皂苷的CD谱中如有较强的[M-H-162]⁻峰,则表明结构中含有位于端基的六碳糖;如出现[M-H-146]⁻峰,表明结构中含有位于端基的甲基五碳糖;如出现[M-H-132]⁻峰,表明结构中含有端基五碳糖。若同时出现[M-H-162]⁻和[M-H-132]⁻峰,表明分子中同时含有六碳糖和五碳糖,且两种糖均为末端糖。参照以上结果,在分析该类化合物时,除可准确获得未知物的分子量信息外,还可了解到糖的连接情况及母核结构。

当采用LC-MSⁿ法分析人参皂苷类化合物时,通过色谱保留时间和质谱特征两方面信息能够提供更加准确可靠的定性结果。

3 讨论

研究发现在电喷雾质谱、负离子检测方式下,8种人参皂苷分子产生的准分子离子峰均为[M + 45]⁻峰,这一点在确定未知化合物的分子

致谢:感谢沈阳药科大学天然药物研究室王金辉博士在提供药品方面所给予的帮助和支持。

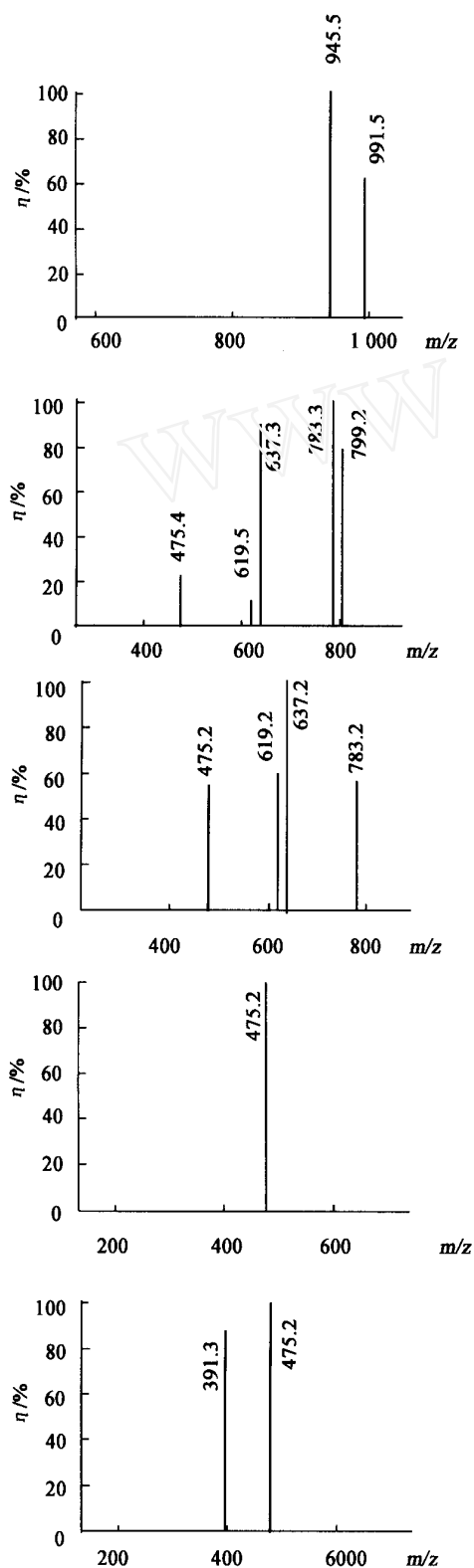


图 3 人参皂苷 Re 在(-)-ESI/MSⁿ 检测方式下的二至六级质谱图

Fig 3 C/D spectra of Ginsenoside Re obtained from negative ion full scan MSⁿ

参考文献:

- [1] 张均田 人参研究的回顾和展望[J]. 药学学报, 1995, 30: 321.
- [2] Yoon SR, Nah JJ, Kim SK. Determination of Ginsenoside Rf and Rg2 From Panax Ginseng Using Enzyme Immunoassay [J]. Chem Pharm Bull, 1998, 46: 1144.
- [3] Cui JF. Identification and Quantification of Ginsenosides in Various Commercial Ginseng Preparations [J]. Europ J Phar Sci, 1995, 3: 77.
- [4] Vanhaelen-F RJ, Faes ML, Vanhaelen MH. High-performance Thin-layer Chromatographic Determination of Six Major Ginsenosides in Panax Ginseng [J]. J Chromatogr A, 2000, 868: 269.
- [5] Bonfill M, Casals I, Palazón J. Improved High Performance Liquid Chromatographic Determination of Ginsenosides in Panax Ginseng-based Pharmaceuticals Using a Diol Column [J]. Biomed Chromatogr, 2002, 16: 68.
- [6] Shanguan DH, Han HW, Zhao R. New Method for High-performance Liquid Chromatographic Separation and Fluorescence Detection of Ginsenosides [J]. J Chromatogr A, 2001, 910: 367.
- [7] Wang XM, Sakuma T, Asafu-AE. Determination of Ginsenosides in Plant Extracts From Panax Ginseng and Panax Quinquefolius L by LC/MS/MS [J]. Anal Chem, 1999, 71: 1579.
- [8] Fuzzati N, Gabetta B, Jayakar K. Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometric Identification of Ginsenosides in Panax Ginseng Roots [J]. J Chromatogr A, 1999, 854: 69.
- [9] Li WK, Gu CG, Zhang HJ. Use of High-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Distinguish Panax Ginseng C. A. Meyer (Asian Ginseng) and Panax Quinquefolius L (North American Ginseng) [J]. Anal Chem, 2000, 72: 5417.
- [10] Ackloo SZ, Smith RW, Terlouw JK. Characterization of Ginseng Saponins Using Electrospray Mass Spectrometry and Collision-induced Dissociation Experiments of Metal-attachment Ions [J]. Analst, 2000, 125: 591.
- [11] Cui M, Song FR, Liu ZQ. Metal Ion Adducts in the Structural Analysis of Ginsenosides by Electrospray Ionization With Multi-stage Mass Spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001, 15: 586.

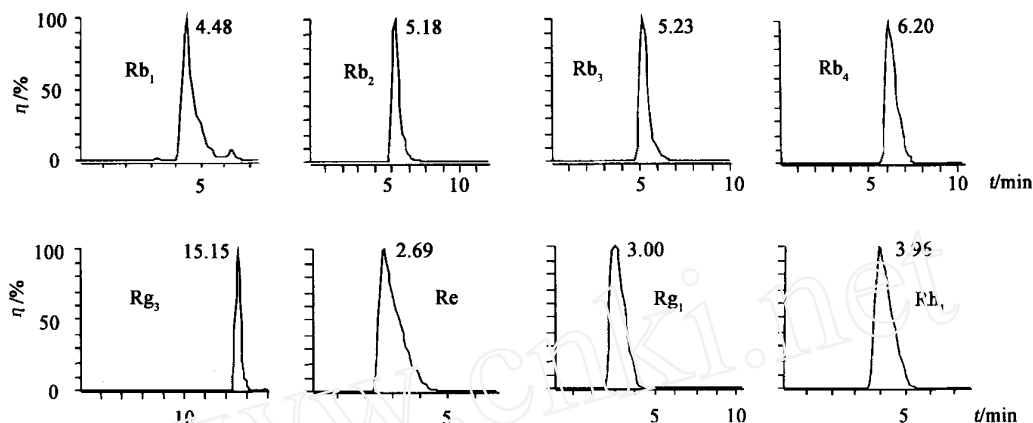


图 4 八种人参皂苷在(-)-ESI检测方式下所得的三级全扫描色谱图

Fig 4 Negative ion LC-MS³ chromatograms of eight Ginsenosides

Analysis of Ginsenosides by Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry

GUO Ji-fen¹, ZHONG Da-fang², QIAO Shan-yi¹, ZHAO Yin-in¹

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,

Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Eight ginsenosides (Rb₁, Rb₂, Rb₃, Rb₄, Rg₃, Rh₁, Rg₁, Re) were analyzed in negative ion scan mode by Electrospray Ion Trap Mass Spectrometer (LCQ) and Triple Quadrupole Mass Spectrometer (API 3000). The pseudomolecular ion ($[M + 45]^-$) was observed in full scan negative ion ESI mass spectrum of ginsenosides, which was very characteristic to determine the molecular weights of this family of compounds. The glycosidic linkages, the aglycone, and the attached sugar (s) of the ginsenosides could be determined from the collision-induced dissociation (CID) spectra of $[M - H]^-$ in multi-stage full scan mode (ES/MSⁿ). Moreover, an LC-MSⁿ method was established for the analysis of ginsenosides.

Key words: mass spectrometry; study on ginsenosides; liquid chromatography electrospray mass spectrometry (LC-MS); *Panax ginseng*

(上接第 504 页)

Measurement of Trace Pb in Red Wine With Thermal Ionization Isotope Dilution Mass Spectrometry

WANG Jun, ZHAO Mo-tian

(National Research Center for Certified Reference Materials, Beijing 100013, China)

Abstract: The trace Pb in red wine was determined by thermal ionization isotope dilution mass spectrometry in the international comparison organized by CCQM. Some problems related with trace level Pb in wine, sample preparation and blank pollution were discussed. The uncertainty of the measurement results was also analyzed and evaluated.

Key words: mass spectrometry; measurement of trace Pb; thermal ionization isotope dilution mass spectrometry (TIDMS); red wine; international comparison