

利用高效液相色谱和电喷雾质谱指纹图谱鉴别人参与桔梗

张语迟^{1,2}, 刘志强¹, 宋凤瑞¹, 王淑敏², 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022; 2. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117)

摘要: 利用高效液相色谱和电喷雾质谱建立人参、桔梗的色谱和质谱指纹图谱, 通过两种中药材指纹图谱的差异, 达到鉴别中药材真伪的目的。建立的质谱指纹图谱方法简捷、快速、灵敏、特征性强、重现性好, 具有很好的实用价值。

关键词: 人参; 桔梗; 指纹图谱; 高效液相色谱; 电喷雾质谱

中图分类号: O 657. 7+2; O 657. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2008)04-203-06

Identification of *Panax Ginseng* and *Platycodon Grandiflorum* by the Fingerprint of HPLC and ESI-MS

ZHANG Yu-chi^{1,2}, LIU Zhi-qiang¹, SONG Feng-rui¹, WANG Shu-min², LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China;
2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

Abstract: The fingerprint of *Panax ginseng* and *Platycodon grandiflorum* were established using HPLC and ESI-MS. By comparing the fingerprint difference between two Chinese herbs, *Panax ginseng* and *Platycodon grandiflorum* are identified. The method of ESI-MS fingerprint is simple, fast, sensitive, stable and accurate. So the ESI-MS fingerprint has wider practical value.

Key words: *Panax ginseng*; *Platycodon grandiflorum*; fingerprint; HPLC; ESI-MS

中药人参为五加科人参属植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)的干燥根, 具有滋补强壮、抗疲劳等多方面的功效^[1]。中药桔梗为桔梗科植物桔梗(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.)的干燥根, 具有宣肺祛痰、利咽排脓等作用, 用于治疗咳嗽痰多、胸闷不畅、咽痛等症^[2]。由于两者形状、颜色、质地大致相同, 因此市场上出现许多用桔梗冒充中药人参的情况。中药的色谱指纹图谱已有广泛的应用^[3-5], 文献

[6-7]报道了应用高效液相色谱(HPLC)指纹图谱对不同中药, 尤其是掺假中药进行鉴别。电喷雾质谱(ESI-MS)是一种先进的软电离质谱技术, 具有离子化条件温和、谱图简单、灵敏度高等特点^[8]。一级全扫描质谱中主要是准分子离子峰, 能直观地反映被测物组成的相对分子质量信息, 且样品前处理简单、分析时间短, 为中药材中主要成分的分析提供了一种简单、快速、灵敏的方法。随着质谱技术的成熟和普及, 它已应用到

收稿日期: 2007-09-28; 修回日期: 2008-01-18

基金项目: 中国科学院东北振兴科技行动计划重点项目(2005SYHZ0017); 吉林省重点科技发展计划(No. 20060902)

作者简介: 张语迟(1984~), 男(汉族), 吉林人, 硕士研究生, 从事中药质量控制及标准化研究。E-mail: zhangyuchi2001@163.com

通信作者: 宋凤瑞(1962~), 女(汉族), 吉林人, 博士, 从事中药质量标准及药物质谱研究。E-mail: songfr@ciac.jl.cn

中医药行业中^[9]。本工作旨在建立人参与桔梗的 HPLC 和 ESI-MS 指纹图谱,并应用于人参与的真伪鉴别中。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪,配有 2996 UV 检测器;美国 Waters 公司产品;Finigan LCQ™电喷雾质谱仪;美国 Thermo 公司产品;SanoriusBS110S 十万分之一分析天平;北京赛多利斯有限公司产品。

9 种人参与 4 种桔梗分别来源于不同产地不同批号(人参:吉林省抚松县 rsfs0701~0703、吉林省集安市 rsja0701~0704、吉林省延吉市 rsyj0701~0702;桔梗:河北省沧州市 jgcz0701~0702、辽宁省葫芦岛市 jghld0701~0702);由吉林省食品药品检定所提供,并经长春中医药大学王淑敏教授鉴定;甲醇与磷酸均为色谱纯;美国 Fisher 公司产品;正丁醇、氯仿、甲醇均为分析纯;北京化工厂产品。

1.2 样品溶液的制备

将人参与桔梗药材粉碎,均过 100 目筛,各取 2 g 粉末置于索氏提取器中,加入氯仿脱脂 3 h,冷却后取出,挥干溶剂,置于 100 mL 锥形瓶中。残留固体加入 50 mL 饱和正丁醇溶液,超声提取 1 h,过滤,滤液蒸干,蒸干物用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,备用。

1.3 仪器条件

日本资生堂 Shiseido-CAPCELL, C₁₈-ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 μm)。流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.05%磷酸水溶液。时间程序为 0~50 min:25%~50%A、75%~50%B;50~60 min:50%~100%A、50%~0%B。流速 0.5 mL·min⁻¹;检测波长 203 nm;柱温 25 ℃。

ESI 离子源,负离子电离方式;质量扫描范围: m/z 100~1 500;离子喷雾电压:4.5 kV;毛细管电压:47 V;毛细管温度:200 ℃;药材粗提物用甲醇稀释,经自动进样器直接进样。

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱指纹图谱鉴别人参与桔梗

2.1.1 方法学考察 精密度试验:取人参皂苷 Re 标准品溶液,连续进样 5 次,测定指纹图谱。5 次色谱图中各色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0.11%,相对峰面积的 RSD 为 0.25%,仪器精密密度符合规定。

重现性试验:取同一批人参药材按 1.2 方法制备供试液 5 份,进行测定。各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.11%,相对峰面积的 RSD 均小于 1.94%,重现性较好。

稳定性试验:取同一人参样品试液,分别于第 0、4、8、12、16 h 测定。各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.08%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.54%,说明样品至少 16 h 内稳定。

2.1.2 人参与桔梗 HPLC 指纹图谱的建立

取 1.2 项下制得的人参与桔梗样品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜后进高效液相色谱仪,得到人参与桔梗的高效液相色谱图示于图 1~3。图 1 为 1 份人参样品的色谱图,1~16 号峰均为已知的人参皂苷类成分;图 2 为 9 份人参样品色谱图,自下而上分别为 rsfs0701~0703、rsja0701~0704、rsyj0701~0702;图 3 为 4 份桔梗样品色谱图(1~3 号峰均为桔梗皂苷),自下而上分别为 jgcz0701~0702、jghld0701~0702。

2.1.3 人参与桔梗的 HPLC 色谱峰归属 从高效液相色谱指纹图谱可以明显看出,人参与桔梗的色谱指纹图谱完全不同。根据高效液相色谱与电喷雾质谱联用技术,并结合二级质谱实验(HPLC-MS/MS)确定人参色谱图(图 1)中 1~16 号色谱峰分别为 1:人参皂苷 Rg1; 2:人参皂苷 Re; 3:乙酰化人参皂苷 Rb2; 4:乙酰化人参皂苷 Rb3; 5:人参皂苷 Ra3; 6:人参皂苷 Rf; 7:人参皂苷 Rb1; 8:人参皂苷 Rg2; 9:人参皂苷 Ra1; 10:人参皂苷 Rc; 11:人参皂苷 Ro; 12:人参皂苷 Ra2; 13:人参皂苷 Rb2; 14:人参皂苷 Rb3; 15:乙酰化人参皂苷 Rb1; 16:人参皂苷 Rd。通过 HPLC-MS/MS 分析确认桔梗色谱图中(图 3)的 3 个主要色谱峰分别为 1:桔梗皂苷 A; 2:桔梗皂苷 D; 3:桔梗皂苷 C。

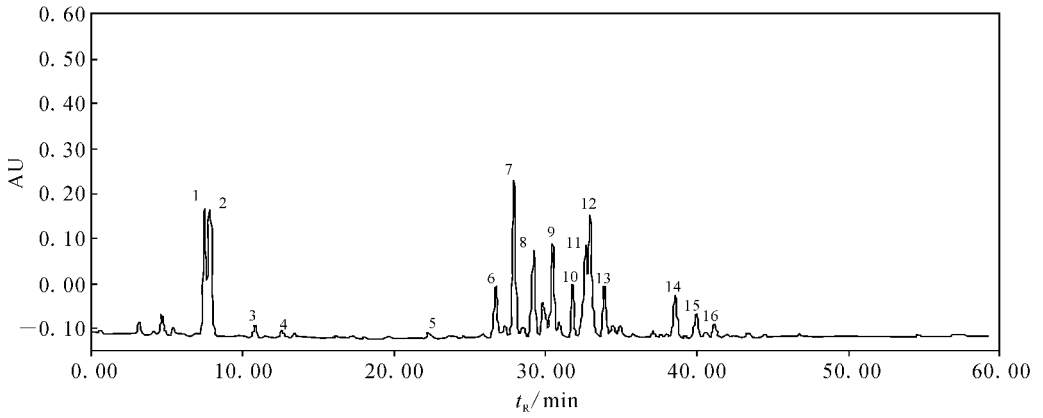


图 1 人参药材的高效液相色谱图

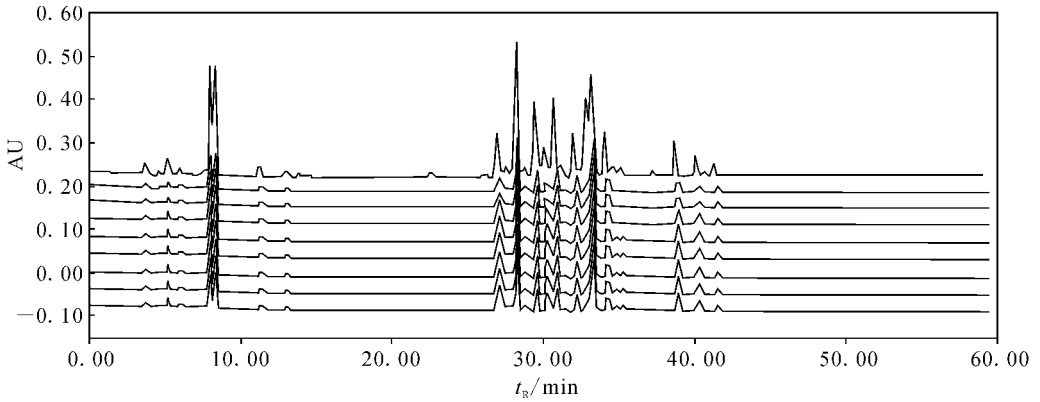
Fig. 1 HPLC chromatogram of *Panax ginseng*

图 2 9 种人参药材的高效液相色谱图

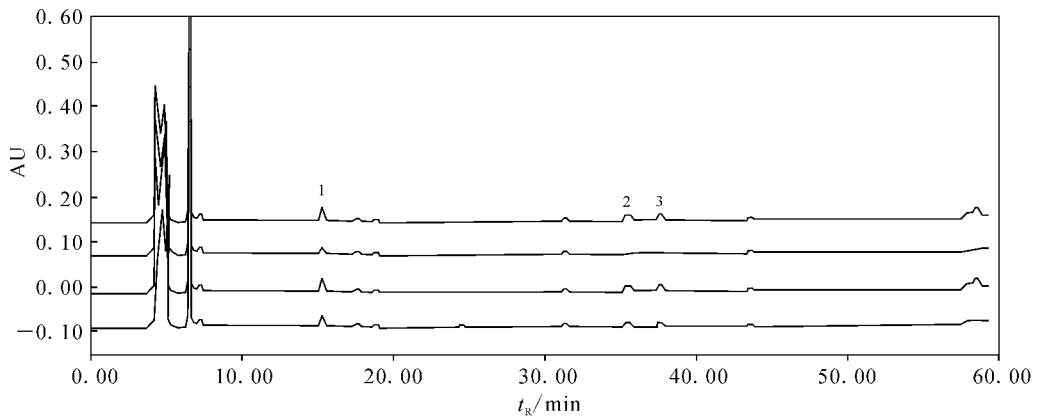
Fig. 2 HPLC chromatogram of 9 kinds of *Panax ginseng* samples

图 3 4 种桔梗药材的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of 4 kinds of *Platycodon grandiflorum* samples

2.1.4 人参与桔梗 HPLC 指纹图谱相似度比较 运用夹角余弦法对 9 种人参药材与 4 种桔梗药材 HPLC 指纹图谱进行相似度计算,其计

算公式为: $\cos\theta = \frac{\sum_{k=1}^m X_{ik} X_{jk}}{\sqrt{\sum_{k=1}^m X_{ik}^2 \sum_{k=1}^m X_{jk}^2}}$, 其中 m 代表共

有峰数, X_{ik} 、 X_{jk} 代表第 i 个样品和第 j 个样品的特征峰值。

9 种人参中所有药材之间的相似度达到 0.950, 4 种桔梗药材之间的相似度达到 0.968。对相同产地与不同产地间的人参与桔梗药材进行单独的相似度比较, 结果列于表 1、表 2。由表中数据可以看出, 所有人参药材与桔梗药材 HPLC 指纹图谱的相似度均较高, 药材之间表现出极好的一致性。由于二者之间具有完全不同的色谱峰, 人参色谱峰中可以鉴别出 16 个相应的皂苷色谱峰, 桔梗中可以鉴别出 3 个主要的皂苷色谱峰, 因此通过人参与桔梗的指纹图谱可以完全地鉴别出二者的真伪, 也可以通过二者色谱峰的出峰时间来判断中药人参中是否掺杂了桔梗。

表 1 相同产地与不同产地的人参色谱图相似性

Table 1 Similarity comparison of the chromatographic pattern of *Panax ginseng*

样品	rsfs	rsja	rsyj
rsfs	0.994 ^a	0.921 ^b	0.932 ^b
rsja		0.988 ^a	0.911 ^b
rsyj			0.996 ^a

注 rsfs: 吉林省抚松市 0701~0703; rsja: 吉林省集安市 0701~0704; rsyj: 吉林省延吉市 0701~0702

a: 同一产地不同批号样品间相似性; b: 不同产地不同批号样品间相似性

表 2 相同产地与不同产地的桔梗色谱图相似性

Table 2 Similarity comparison of the chromatographic pattern of *Platycodon grandiflorum*

样品	jgcz	jghld
jgcz	0.978 ^a	0.908 ^b
jghld		0.942 ^a

注 jgcz: 河北省沧州市 0701~0702; jghld: 辽宁省葫芦岛市 0701~0702

a: 同一产地不同批号样品间相似性; b: 不同产地不同批号样品间相似性

2.2 ESI-MS 指纹图谱鉴别人参参与桔梗

2.2.1 方法学考察 精密度试验: 取人参皂苷 Re、Rb1、Rg1 混合标准品溶液, 连续进样 5 次, 测定质谱指纹图谱。5 次质谱图中 3 个质谱峰相对丰度的 RSD 为 0.02%, TIC 图中离子流强度 RSD 小于 0.03%, 仪器精密度符合规定。

重现性试验: 取同一批人参药材按 1.2 方法制备供试液 5 份, 进行测定, 选择人参质谱图中相对丰度高于 30% 且均为人参中常见的质谱峰为参考指标进行试验。这些质谱准分子离子峰包括图 4 中的 m/z 1 149、1 107、1 077、945、955(图 4 中用①、②、③、④、⑤表示), 其对应的物质分别为丙二酰基人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rb2/Rb3/Rc、人参皂苷 Re/Rd、人参皂苷 Ro。以上质谱峰的相对丰度 RSD 均小于 0.07%, TIC 图中离子流强度的 RSD 小于 0.11%, 重现性较好。

稳定性试验: 取同一人参样品试液, 分别于第 0、4、8、12、16 h 测定, 同重现性试验一样, 选择图 4 中的①、②、③、④、⑤号准分子离子峰。以上质谱峰相对丰度 RSD 均小于 0.08%, TIC 图中离子流强度 RSD 小于 0.09%, 说明样品至少 16 h 内稳定。

2.2.2 人参与桔梗 ESI-MS 指纹图谱的建立

取 2.1 项制得的 9 份人参与 4 份桔梗样品溶液, 过 0.45 μm 微孔滤膜后进质谱仪, 得到人参与桔梗粗提物的电喷雾质谱图于图 4、图 5。9 份人参样品与 4 份桔梗样品均表现出极高的相似性。ESI-MS 谱图中主要准分子离子峰相对丰度均相同, 各选出一张人参与桔梗的质谱图作为标准谱图。

2.2.3 人参与桔梗提取物的 ESI-MS 指纹图谱分析 在电喷雾质谱负离子电离模式下, 中药材中主要成分的准分子离子峰为 $[M-H]^-$, 可以看出人参(图 4)与桔梗(图 5)的主要离子峰完全不同。在人参的 ESI-MS 图谱中, 明显看出的准分子离子峰包括 m/z 1 149、1 107、1 077、945、955(图 4 中①、②、③、④、⑤表示), 将其作为人参的质谱指纹图谱的特征峰, 其可能对应的物质分别为丙二酰基人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rb2/Rb3/Rc、人参皂苷 Re/Rd、人参皂苷 Ro。在桔梗的 ESI-MS 图谱中, 明显的准分子离子峰包括 m/z 1 223、1 265、1 385、1 427(图 5 中①、②、③、④表示), 将其作为桔梗药材的质

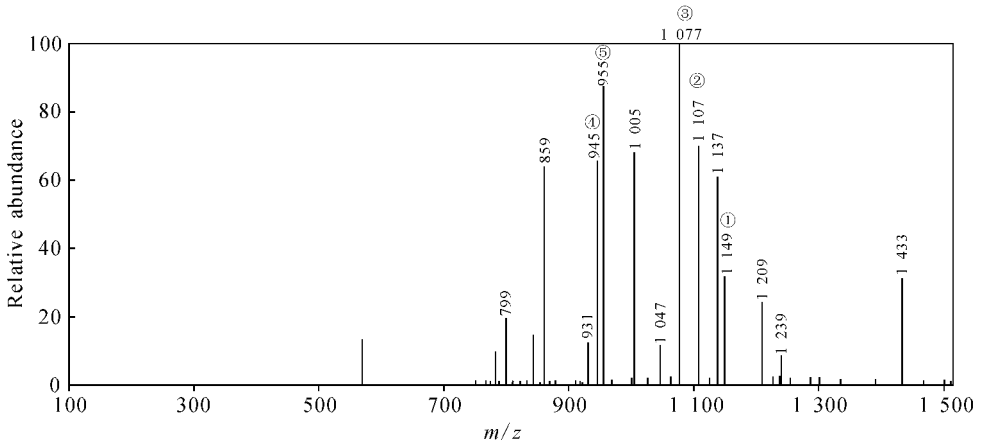


图 4 人参质谱指纹图谱

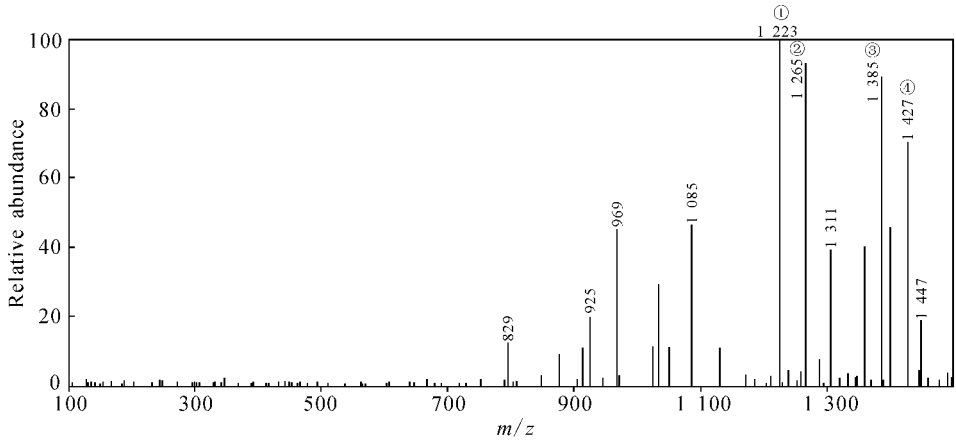
Fig. 4 Mass spectral fingerprint of *Panax ginseng*

图 5 桔梗质谱指纹图谱

Fig. 5 Mass spectral fingerprint of *Platycodon grandiflorum*

谱指纹图谱的特征峰,其可能对应的物质分别为桔梗皂苷 D、桔梗皂 A/C、桔梗皂苷 D2/D3、桔梗皂苷 V/VI。同时 9 种人参药材与 4 种桔梗药材的质谱图均表现出一致性,各主要准分子离子峰相对丰度也表现出极高的相似性。

2.1.4 人参参与桔梗 ESI-MS 指纹图谱相似度比较 同 HPLC 相同,运用夹角余弦法对 9 种人参药材与 4 种桔梗药材质谱指纹图谱中主要相关特征峰进行相对丰度的相似度计算,结果列于表 3、表 4。对主要药材人参做 9 份样品累加图,示于图 6,9 种人参中所有药材之间的相似度达到了 0.940,4 种桔梗各药材之间的相似度达到了 0.921。从表 3、表 4 可以看出,二者同样具有较高的相似性,对于同一产地的药材,相似度极高,不同产地同一药材相似度略低。原因是不同产地的同一种药材中的化学成分比例不同所致,

导致质谱图中相对丰度略有差异,但总体相似度较高。通过人参与桔梗的指纹图谱可以完全地鉴别出二者的真伪,也可以通过二者色谱峰出峰时间来判断中药人参中是否掺杂了桔梗。

3 结论

实验结果表明,人参与桔梗具有完全不同的 HPLC 与 ESI-MS 指纹特征,而且各自的相似度很好,完全可以对人参参与桔梗的主要皂苷类成分进行归属,可以准确地区分人参、桔梗药材的真伪,也可以鉴别名贵中药人参中是否掺有桔梗。

特别是质谱指纹图谱,由于其具有样品前处理简单,分析方法简捷快速、灵敏、特征性强等特点,在中药材的真伪鉴别中具有更大的应用前景。

表 3 相同产地与不同产地间人参质谱图相似性

Table 3 Similarity comparison of the Mass spectra pattern of *panax ginseng*

样品	rsfs	rsja	rsyj
rsfs	0.972 ^a	0.891 ^b	0.882 ^b
rsja		0.948 ^a	0.901 ^b
rsyj			0.926 ^a

注:同表 1

表 4 相同产地与不同产地间桔梗质谱图相似性

Tab 4 Similarity comparison of the mass spectra pattern of *Platycodon grandiflorum*

样品	jgcz	jghld
jgcz	0.924 ^a	0.894 ^b
jghld		0.942 ^a

注:同表 2

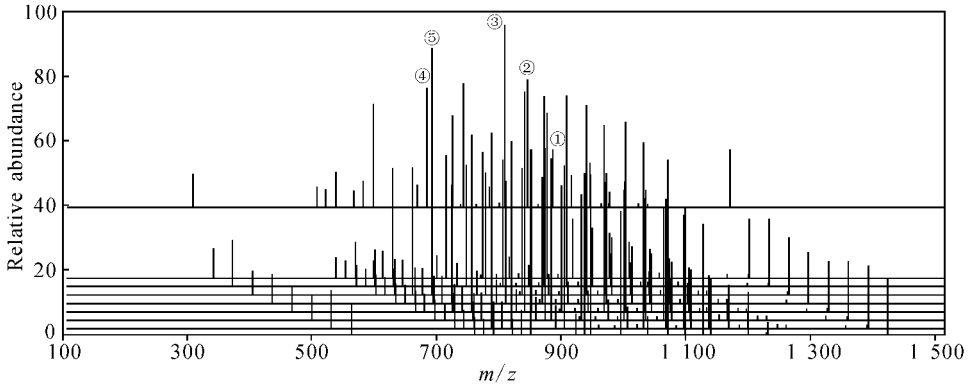


图 6 9 种人参药材质谱指纹图谱

Fig. 6 Mass spectral fingerprints of 9 kinds of *Panax ginseng* samples

参考文献:

- [1] 李 丽, 刘志强, 许庆轩, 等. 人参中皂苷类化合物的 HPLC-ESI MS 研究[J]. 分析测试学报, 2006, 25(1): 45-48.
- [2] 张贵君. 中药鉴定学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 178.
- [3] LIU C Z, ZHOU H Y, YAN Q. Fingerprint analysis of *Dioscorea nipponica* by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 582(1): 61-68.
- [4] YU R M, YE B, YAN C Y, et al. Fingerprint analysis of fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 44 (3): 818-823.
- [5] YAN S K, XIN W F, LUO G A, et al. An approach to develop two-dimensional fingerprint for the quality control of *Qingkailing injection* by

high-performance liquid chromatography with diode array detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1 090(1/2): 90-97.

- [6] XIE P S, CHEN S B, LIANG Y Z. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1 112(1/2): 171-180.
- [7] CHEN C, ZHANG H, XIAO W, et al. High-performance liquid chromatographic fingerprint analysis for different origins of sea buckthorn berries [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1 154: 250-259.
- [8] 吴 巍. 天然产物及相关复方配伍的质谱及液相色谱研究[D]. 长春: 中国科学院长春应用化学研究所, 2005.
- [9] ZHAO L H, HUANG C Y, SHAN Z, et al. Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 821: 67-74.