

· 论 著 ·

应用色谱-质谱联用法快速鉴别人参和西洋参须根

陈邦元¹, 徐金娣², 丁 妍¹, 朱玲英², 李松林²

[摘要] **目的** 研究快速鉴别人参须根和西洋参须根的方法。**方法** 采用超高效液相色谱串联三重四级杆质谱(Ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry, UPLC-TQ-MS/MS)法又称色谱-质谱联用法进行快速分离和鉴定,采用 ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 色谱柱,柱温 40 ℃,以乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱,流速 0.5 ml/min;质谱采用电喷雾(ESI)离子源,全扫描和子离子扫描,负离子模式下采集数据。**结果** 在西洋参须根中检测到西洋参特征成分 24(R)-拟人参皂苷 F11,未检测到人参的特征成分人参皂苷 Rf,而在人参须根中检测到人参的特征成分人参皂苷 Rf,未检测到西洋参特征成分 24(R)-拟人参皂苷 F11。**结论** 所建立的色谱-质谱联用法能快速区分人参和西洋参须根。

[关键词] 色谱-质谱联用;人参须根;西洋参须根;鉴别

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.02.011

Differentiation of fibrousroots of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius* by UPLC-TQ-MS/MS

CHEN Bang-yuan¹, XU Jin-di², DING Yan¹, ZHU Ling-ying², LI Song-lin². 1. Department of Drugs and Instruments, 359 Hospital of PLA, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China; 2. Department of Pharmaceutical Analysis & Metabolomics, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210028, China

[Abstract] **Objective** To develop a rapid method for differentiation of fibrousroots of *Panax ginseng* and *P. quinquefolius*. **Methods** Samples wereseparated by UPLC with a waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) column, the temperature of which was maintained at 40 ℃. The mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in ACN (B) was applied for gradient elution. The flow rate was at 0.5 ml/min. Mass spectrometry with electrosprayionization (ESI) source was operated in negative mode. Full scan and daughter ions scan were used to monitor the analytes. **Results** GinsenosideRf, the characteristic components of Rhizoma Ginseng, wasdetected in the fibrousroot of *P. ginseng*, whereas 24(R)-pesudoginsenoside F11, the chanracteristic components of Radix Panacis Quinquefolii, was not. On the otherhand, 24(R)-pesudoginsenoside F11 was detected in fibrousroot of *P. quinqueolius*, but ginsenosideRf was not. **Conclusion** The established UPLC-TQ-MS/MS methodusingginsenosideRf and 24(R)-pesudoginsenoside F11 as characteristic markers couldbeused as a rapid method for differentiation of fibrousroots of *P. ginseng* and *P. quinqueolius*.

[Key words] UPLC-TQ-MS/MS; *Panax ginseng* fibrousroot; *Panax quinqueolius* fibrousroot; differentiation

西洋参为五加科植物西洋参(*Panax quinquefolium* L)的干燥根,能补气养阴,清热生津^[1]。人参为五加科植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)的干燥根,能滋补脾益肺、生津止渴、安神益智、调荣养卫、大补元气、复脉固脱,是常用的滋补强壮药^[2]。西洋参和人参在中国均有栽培,其须根是西洋参和人参生产过程中的副产品,因皂苷含量高,且价格分别比西洋参和人参低廉,近年来被用来作为开发保健产品的原料或直接应用。但西洋参须根和人参须根在形态学上无明显区别,文献亦没有鉴别方法的报道,因此迫切需要一种快速方法对其予以准确鉴定。

1 材料与方法

作者单位: 1. 212001 江苏镇江,解放军 359 医院药械科; 2. 210028 江苏南京,江苏省中医药研究院中药分析和代谢组研究室

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 仪器 Waters UPLC H-Class/TQD 色谱-质谱联用仪(美国 Waters 公司);梅特勒十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 纯水器(美国 Milli-Q 公司)。

1.1.2 试剂和药材 西洋参须根(JSPACM-03-64-1),2012 年 10 月采自山东文登;人参须根(JSPACM-03-63-1),2011 年 10 月采自吉林通化,标本存江苏省中医药研究院中药分析和代谢组研究室。人参皂苷 Rf(Ginsenoside Rf)和 24(R)-拟人参皂苷 F11(24(R)-pseudoginsenoside F11)分别从人参和西洋参中分离纯化制得,结构经 NMR 和 MS 分析确证,纯度经高效液相分析大于 95%,结构见

图 1。乙腈(色谱纯,美国,Tedia 公司)、甲酸(色谱纯,日本,东京化成工业株式会社)、甲醇(分析纯,南京,汉邦科技公司)。

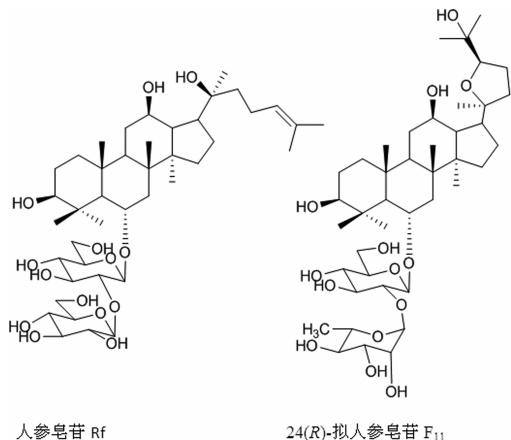


图 1 人参皂苷 Rf 和 24(R)-拟人参皂苷 F11 结构式

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱;采用乙腈(B)-0.1% 甲酸水溶液(A)为流动相进行梯度洗脱,梯度如下:0 ~ 1 min, 5% ~ 15% B; 1 ~ 10 min, 15% ~ 35% B; 10 ~ 14 min, 35% ~ 42% B; 14 ~ 24 min, 42% ~ 80% B; 24 ~ 25 min, 80% ~ 5% B; 25 ~ 27 min, 5% B; 柱温 40℃;流速 0.5 ml/min;进样量 4 μl。

1.2.2 质谱检测条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式,毛细管电压为 2.5 kV,锥孔电压 40 V,离子源温度为 120℃,脱溶剂气温度 400℃,脱溶剂气流量 600 L/h,锥孔气流量 50 L/h,扫描范围质荷比(m/z) 300 ~ 2000。子离子扫描,母离子 799,碰撞能量 30 V,锥孔电压 30 V。

1.2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取人参皂苷 Rf(A)和 24(R)-拟人参皂苷 F11(B)适量,用甲醇配制成浓度为 10 μg/ml 的对照品标准溶液(Std) A 和 B,于 4℃ 存放备用。

1.2.4 供试品溶液的制备 将人参须根和西洋参须根粉碎成细粉,精密称取两种粉末各 5.0 g 分置具塞锥形瓶中,加入 50 ml 70% 甲醇溶液超声(500 W, 40 kHz)处理 45 min 取出,以半径 8 cm、10 000 rpm,离心 10 min,取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得滤液,色谱-质谱联用技术分析。

2 结果

2.1 对照品溶液的超高效液相分离和质谱检测 人参皂苷 Rf (tR 7.77 min) 和 24(R)-拟人参皂苷 F11 (tR 7.92 min) 能达到基线分离,总离子流色谱图见图 2。

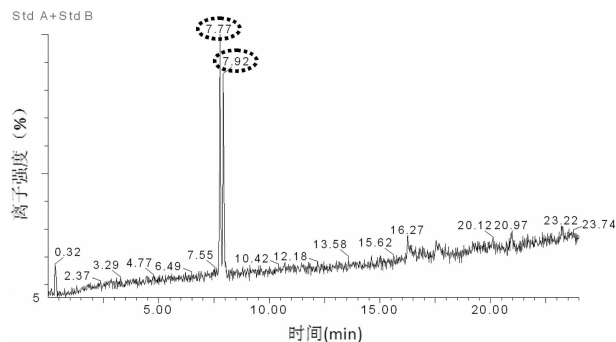


图 2 人参皂苷 Rf (tR 7.77 min) 和 24(R)-拟人参皂苷 F11 (tR 7.92 min) 总离子色谱图

2.2 对照品溶液的质谱全扫描及子离子扫描 分别对人参皂苷 Rf 和 24(R)-拟人参皂苷 F11 进行质谱全扫描并对分子离子峰进行子离子扫描(全扫描质谱图见图 3,二级裂解图见图 4)。由图 3 可见,二者均有 m/z 799 $[M-H]^-$ 的分子离子峰和 m/z 845 $[M-H + HCOOH]^-$ 加合离子峰,但人参皂苷 Rf 的分子离子峰强度大于加合离子峰(A),而 24(R)-拟人参皂苷 F11 的分子离子峰强度要比加合离子峰弱(B)。由图 4 可见,二者均有 m/z 799 $[M-H]^-$ 的分子离子峰,但人参皂苷 Rf 具有 m/z 475 $[M-H-2(Glu-H_2O)]^-$ 碎片离子峰(图 4A),24(R)-拟人参皂苷 F11 具有 m/z 653 $[M-H-(Rha-H_2O)]^-$ 碎片离子(图 4B)。

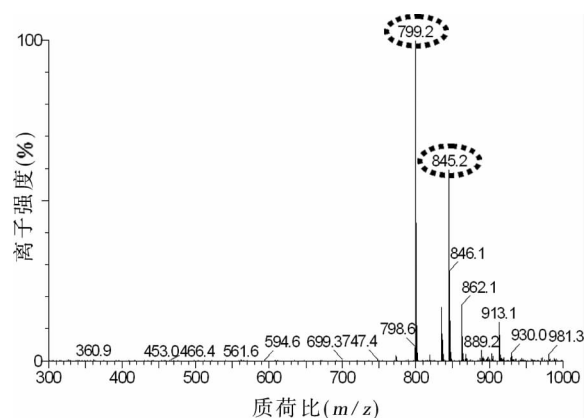


图 3A 人参皂苷 Rf 质谱全扫描图

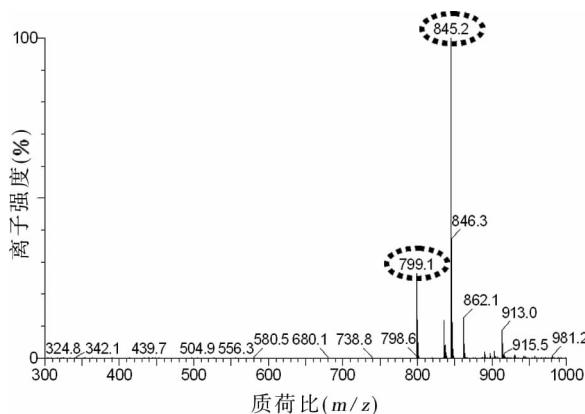


图 3B 24(R)-拟人参皂苷 F11 质谱全扫描图

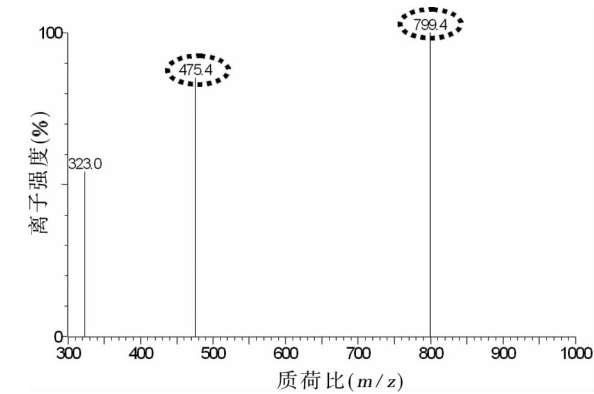


图 4A 人参皂苷 Rf 子离子扫描图

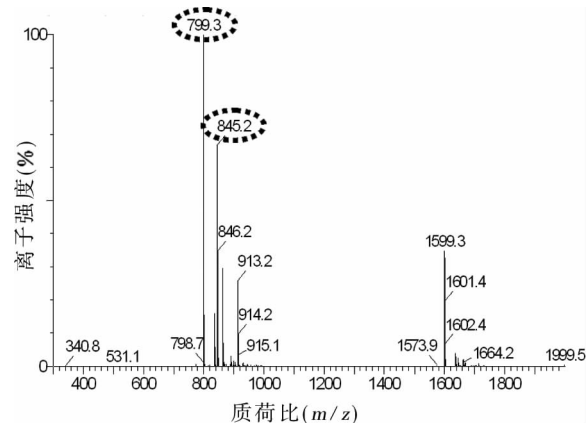


图 5B 人参须根样品峰 tR7.78min 全扫描质谱图

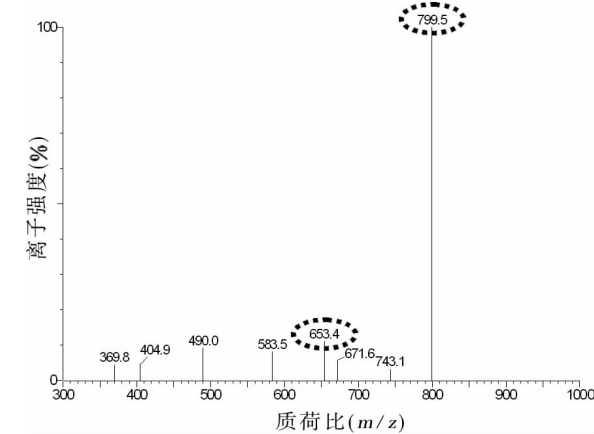


图 4B 24(R)-拟人参皂苷 F11 子离子扫描图

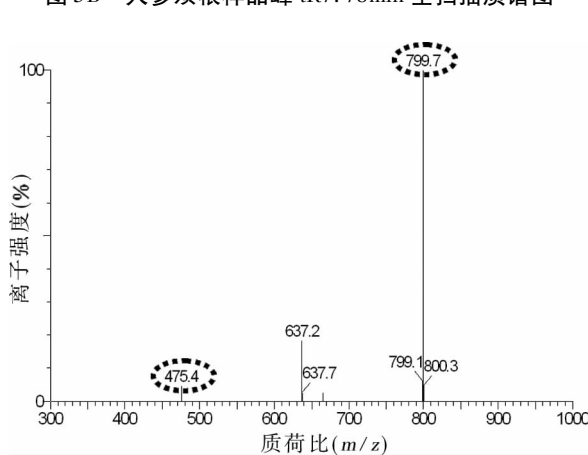


图 5C 人参须根样品峰 tR7.78min 子离子扫描质谱图

2.3 样品鉴定分析 在同样条件下分别对人参须根样品和西洋参须根样品进行分析,总离子流图、全扫描质谱图和二级质谱图见图 5 和图 6。在人参须根样品中有 tR 7.78 的峰出现(图 5A)并且具有 m/z 799 $[M-H]^-$ 的分子离子峰和 m/z 845 $[M-H + HCOOH]^-$ 加合离子峰(图 5B),且前者强度比后者强,子离子扫描中,检测到 m/z 475 $[M-H-2(Glu-H_2O)]^-$ (图 5C);在西洋参须根样品中有 tR 7.90 的峰出现(图 6A),且具有 m/z 799 $[M-H]^-$ 的分子离子峰和 m/z 845 $[M-H + HCOOH]^-$ 加合离子峰(图 6B),前者强度比后者弱,进一步对其进行质谱分析发现了 24(R)-拟人参皂苷 F11 的碎片离子峰 653 $[M-H-(Rha-H_2O)]^-$ (图 6C)。

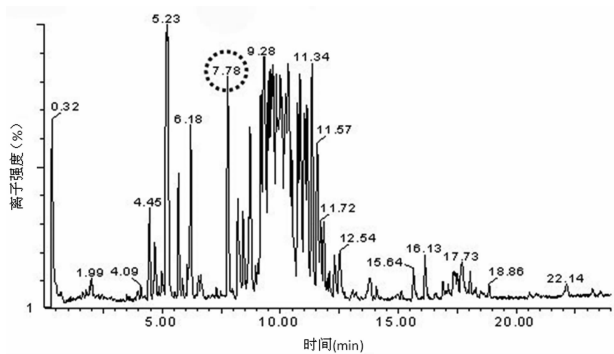


图 5A 人参须根样品总离子流图

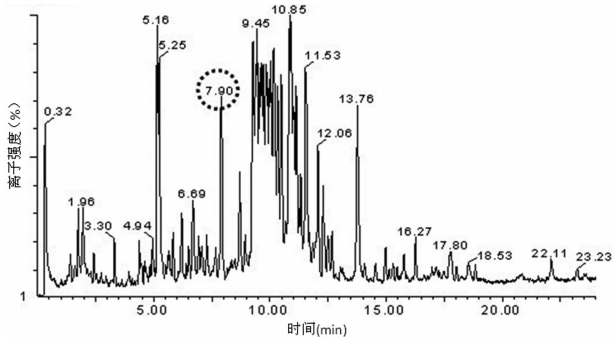


图 6A 西洋参须根样品总离子流图

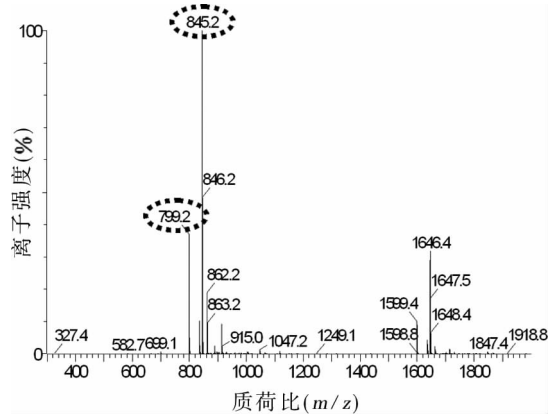


图 6B 西洋参须根样品峰全扫描质谱图

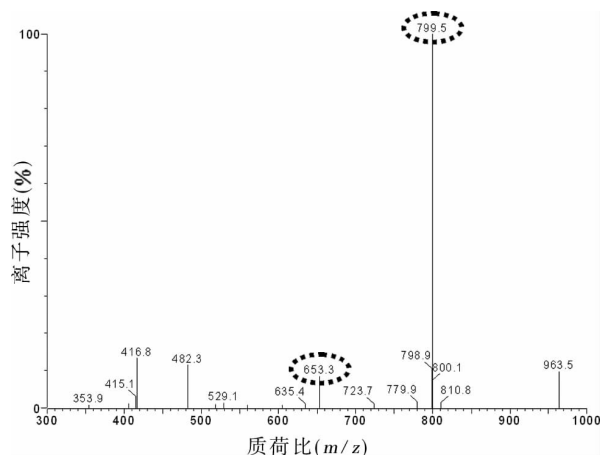


图 6C 西洋参须根样品峰离子扫描质谱图

3 讨论

传统的药材鉴别方法有形态学鉴别、显微鉴定等,现代手段有 DNA 条形码技术^[3,4]、色谱^[5]和色谱-质谱联用手段^[6-8]等。由于药材发挥药效的物质基础是其所含有的化学成分,因此,从保证药材的有效性和安全性角度看,色谱-质谱联用技术鉴别是更能体现药材有效性和安全性的方法。

人参中主要成分是人参皂苷,分为人参二醇型人参皂苷和人参三醇型人参皂苷^[9];而西洋参中也主要含人参皂苷,其中人参皂苷 Rb1、Re、Rd、Rc、Rg1 和 Rb3 是其六个主要皂苷,占总皂苷的 70% 左右^[10]。虽然二者主要成分大部分类似,但有学者^[11-12]对人参和西洋参进行分析研究发现,人参皂苷 Rf 只在人参中存在,而 24(R)-拟人参皂苷 F11 只存在于西洋参中,因此这两种皂苷可作为特征性成分区分西洋参和人参。也有学者^[13]研究发现 Rg1/Rb1 与 Rb2/Rb1 的比值在西洋参中小于 0.4,而在人参中大于 0.4。但 Schlag 等^[14]指出在野生西洋参中,Rg1/Rb1 值较高,大于 0.4。可见这种鉴别方法存在一定局限性。人参和西洋参可以通过特征成分的存在进行区别,但人参须根和西洋参须根中是否也同样分别含有这两种特征性皂苷成分,能否通过这两种特征成分区分人参须根和西洋参须根则未见文献报道。

本研究通过对人参皂苷 Rf 和 24(R)-拟人参皂苷 F11 的色谱-质谱联用法进行分析,发现虽然二者均可见 m/z 799 $[M-H]^-$ 的分子离子峰和 m/z 845 $[M-H + HCOOH]^-$ 加合离子峰,但二者的这两种离子的离子强度和分子离子峰的二级裂解行为存在差异。对于人参皂苷 Rf,其分子离子峰强度要比加合离子峰强,并且在二级质谱中可见 m/z 475 $[M-H-2(Glu-H_2O)]^-$ 的特征碎片离子,而对于 24(R)-拟人参皂苷 F11,其分子离子峰强度要比加合离子

峰弱,并且其二级质谱中可见 m/z 653 $[M-H-(Rha-H_2O)]^-$ 的特征碎片离子。本研究中,在同样条件下,利用所建立的分子离子峰与加合离子峰强度差异和特征碎片离子鉴别法对人参须根和西洋参须根进行色谱-质谱分析,人参须根样品中出现了人参皂苷 Rf 的质谱特征,而未见 24(R)-拟人参皂苷 F11 的质谱特征;在西洋参样品中出现了 24(R)-拟人参皂苷 F11 的质谱特征,而未见人参皂苷 Rf 的质谱特征。

综上所述,本研究所建立的以 24(R)-拟人参皂苷 F11 和人参皂苷 Rf 为特征成分的色谱-质谱联用法具有快速和高选择性特点,是快速鉴别商品西洋参须根和人参须根的有效分析方法。

【参考文献】

- [1] 李 勉,刘广河,乔改枝. 西洋参产品与进口品的质量鉴别[J]. 河南大学学报,2005,2(4):26-28.
- [2] 曹 智,张燕妮,许永华,等. 人参有效成分及其药理作用研究新进展[J]. 人参研究,2012,24(2):39-43.
- [3] Yao H, Song J, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals[J]. Plo Sone,2010,5(10):e13102.
- [4] Zuo YJ, Chen ZJ, Kondo K, et al. DNA barcoding of panax species[J]. Planta Med,2011,77:182-187.
- [5] 邢旺兴,郑筱祥,马炬明,等. 通光藤苷 J 的 HPLC 分析方法及应用[J]. 东南国防医药,2006,8(1):12-14.
- [6] Li SL, Shen H, Zhu LY, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight mass spectrometry based chemical profiling approach to rapidly reveal chemical transformation of sulfur-fumigated medicinal herbs, a case study on white ginseng[J]. J Chromatogr A,2012,1231:31-45.
- [7] Zhang HM, Li SL, Zhang H, et al. Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach[J]. J Pharm Biomed Anal,2012,62:258-273.
- [8] Li SL, Song JZ, Qiao CF, et al. A novel strategy to rapidly explore potential chemical markers for the discrimination between raw and processed Radix Rehmanniae by UHPLC-TOFMS with multivariate statistical analysis[J]. J Pharm Biomed Anal,2010,51:812-823.
- [9] Qi LW, Wang CZ, Yuan CS. Isolation and analysis of ginseng: Advance and challenges[J]. Nat Prod Rep,2011,28(3):467-495.
- [10] Yuan CS, Wang CZ, Qi LW, et al. Chemical and pharmacological studies of saponins with a focus on American ginseng[J]. J Ginseng Res,2010,34(1):160-167.
- [11] Li WK, Gu CG, Zhang HJ, et al. 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(21):5417-5422.
- [12] Chan TWD, But PPH, Cheng SW, et al. Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and *Ginseng* products by using HPLC/MS[J]. Anal Chem,2000,72(6):1281-1287.
- [13] Nakamura S, Sugimoto S, Matsuda H, et al. New dammarane-type triterpene glycosides from flower buds of American ginseng, *Panax quinquefolium* L.[J]. Chem Pharm Bull,2007,55(9):1342-1348.
- [14] Schlag EM, McIntosh MS. Ginsenoside content and variation among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) populations[J]. Phytochemistry,2006,67(14):1510-1519.

(收稿日期:2012-11-27;修回日期:2012-12-31)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)