

# pH 值对人参皂苷溶出影响规律的液质联用研究

张旭<sup>1,2</sup>, 宋凤瑞<sup>1</sup>, 刘志强<sup>1</sup>, 刘淑莹<sup>1</sup>

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 长春 130022; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要** 采用液质联用(HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>)技术, 对不同 pH 值(2.4 ~ 11.2)条件下人参皂苷的溶出变化规律进行了系统研究, 并提出了不同人参皂苷化合物的特征质谱裂解规律. 实验结果表明, 中性及碱性溶液对人参皂苷的溶出影响不大, 仅仅在溶出总量上有所差别; 而酸性是影响人参皂苷溶出的一个主要因素, 随着水溶液酸性的增强(pH < 4), 人参皂苷溶出的种类明显减少, 表明较强酸性条件下人参皂苷的溶出受到了抑制.

**关键词** 液质联用; 人参; 人参皂苷

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2006)09-1640-05

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)是我国传统的药材, 用药历史已有二千多年. 其中人参皂苷是其有效成分之一, 在抗肿瘤、抗衰老、益志、强心及造血等方面具有较强的药理活性<sup>[1~5]</sup>. 人参的药用范围很广, 与不同的中药配伍可以治疗多种疾病. 不同的中草药与其配伍时可以改变水溶液的 pH 值, 并且人参皂苷的含量和种类随着 pH 值的改变而发生变化.

近年来, HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>技术已被广泛用于皂苷类化合物的快速分析研究<sup>[6~9]</sup>. 该技术集液相色谱对复杂体系的高分离能力和质谱独特的选择性、灵敏度、相对分子质量及结构信息于一体, 特别是电喷雾(ESI)技术, 仅需要微量的样品, 并且在短时间内就能获取化合物结构和相对分子质量信息, 为研究热不稳定和极性较大的化合物提供了有利的分析方法<sup>[10~14]</sup>. 因此, 本文采用 HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>技术对不同 pH 值水溶液中人参皂苷的变化进行了系统研究.

## 1 实验部分

### 1.1 样品与试剂

人参购自吉林省白山市抚松县二参厂. 人参皂苷标准品 Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rg<sub>1</sub>, Rg<sub>2</sub>及 Rf 均购自吉林大学基础医学院. 所用试剂均为分析纯.

### 1.2 仪器及实验条件

Waters 600 液相色谱仪(美国 Waters 公司); 自动进样器(美国 Agilent 公司, 1100 系列); 2000 型 ELSD 检测器(美国 Alltech 公司,); LCQ<sup>TM</sup>型电喷雾多级串联质谱仪(美国 Finnigan 公司); 液相色谱条件: Capcell Pak C<sub>18</sub> 色谱柱 4.6 mm × 250 mm, 流动相 A: 水(含体积分数为 0.2% 的乙酸), 流动相 B: 乙腈(体积分数为 25% ~ 50%), 线性梯度洗脱 50 min, 进样量 10 μL.

电喷雾质谱条件: 采用电喷雾离子源, 喷雾电压 5 kV, 加热毛细管温度 240 °C, 鞘气为 N<sub>2</sub> 气 60 unit, 辅助气为 He 气 10 unit, 扫描质荷比范围  $m/z$  200 ~ 1 600. 其它条件同上.

### 1.3 样品制备

用醋酸和氨水调节蒸馏水的 pH 值为 2.4, 3.4, 4.4, 5.4, 6.8, 7.4, 8.4, 9.4, 10.4 及 11.2. 将

收稿日期: 2005-10-08.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20273067)、中国科学院知识创新工程重要方向项目(批准号: KGCX2-SW-213-06)和吉林省科技发展计划重大项目(批准号: 20011109)资助.

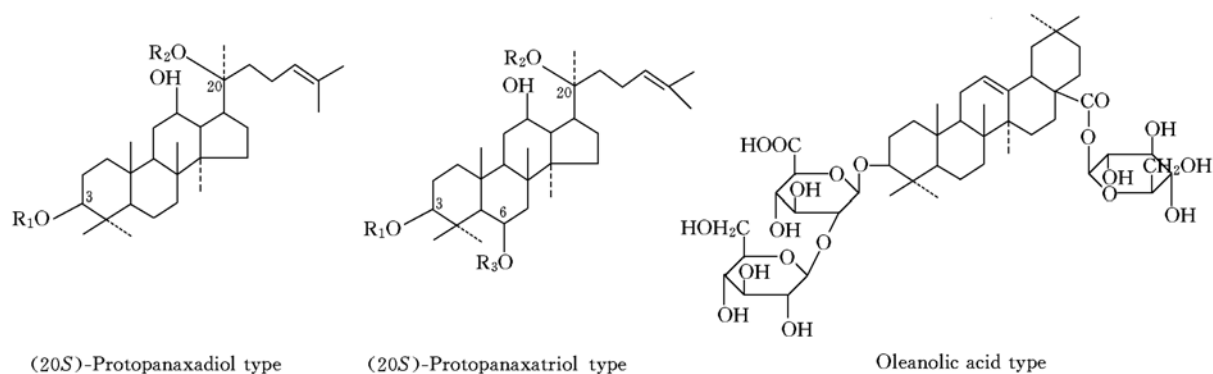
联系人简介: 刘淑莹(1943 年出生), 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事天然药物化学和有机质谱学研究.

E-mail: mslab@ciac.jl.cn

500 g 人参干燥根粉碎成颗粒状, 取 5 g 用氯仿低温脱脂 2 h, 将氯仿挥干后, 分别用 50 mL pH 值分别为 2.4, 3.4, 4.4, 5.4, 6.8, 7.4, 8.4, 9.4, 10.4 和 11.2 的蒸馏水回流 2 次, 每次 2 h. 合并 2 次提取液, 缓慢加入体积分数为 95% 的乙醇, 使乙醇的体积分数达到 80%. 静置过夜, 滤去沉淀, 经减压回流回收乙醇, 提取物用甲醇定容到 25 mL 备用.

## 2 结果与讨论

人参中含有 3 种不同类型的皂苷, 其结构示于 Scheme 1, 它们具有不同的苷元和糖链, 在电喷雾一级质谱图中, 可获得其分子量信息, 选择目标离子再通过多级碰撞, 可确定苷元类型、所连糖基的种类和数量.



Scheme 1 The structures of ginsenosides

分别对 pH 值为 2.4 ~ 11.2 的水溶液中人参皂苷的溶出变化规律进行了研究, 实验结果表明, 在 pH 值为 2.4, 3.4 及 4.4 的水溶液中, 人参皂苷的溶出明显不同, 利用液相色谱-电喷雾质谱联用技术, 在负离子模式下对其溶出规律进行了系统研究, 其液相色谱结果示于图 1.

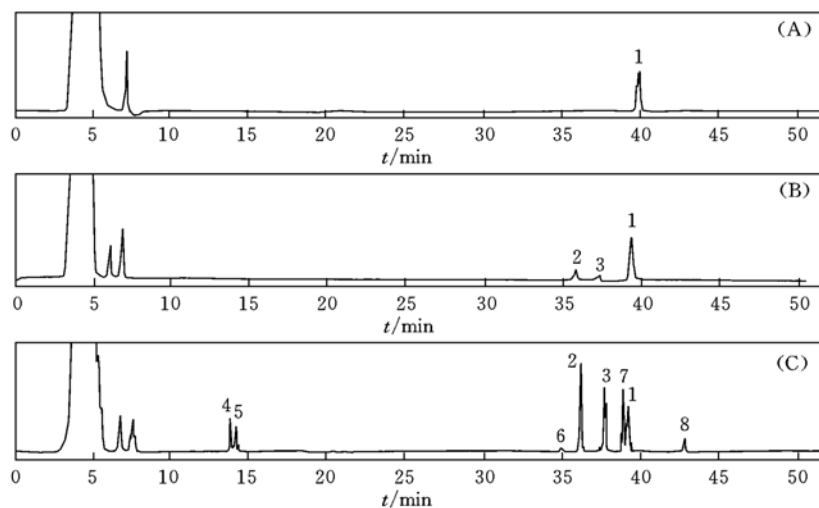


Fig. 1 HPLC profile of crude extracts of ginseng at pH 2.4(A), 3.4(B) and 4.4(C)

在 pH = 2.4 提取液的液相色谱图中[图 1(A)], 仅仅可以观察到一个人参皂苷峰. 通过负离子模式下 ESI-MS 分析发现, 其准分子离子  $[M - H]^-$  为  $m/z$  955, 可初步推测其分子量为 956. 此外, 还对  $m/z$  955 离子  $[M - H]^-$  进行了二级串联质谱研究, 实验结果示于图 2, 可观察到的子离子峰为  $m/z$  793,  $m/z$  731,  $m/z$  613 和  $m/z$  595, 它们分别对应于母离子  $m/z$  955 丢失一分子六碳糖基、一分子六碳糖基、一分子水和一分子二氧化碳、二分子六碳糖基和一分子水、二分子六碳糖基和二分子水. 结合文献的数据, 可以推断该化合物为齐墩果酸型皂苷 Ro.

pH = 3.4 提取液的液相色谱图见图 1(B), 与图 1(A) 相比, 人参皂苷的溶出种类增多, 可观察到 3 个峰, 分别对其进行了质谱分析, 数据结果表明, 峰 1 与图 1(A) 的峰 1 完全相同, 为 Ro; 在峰 2 的

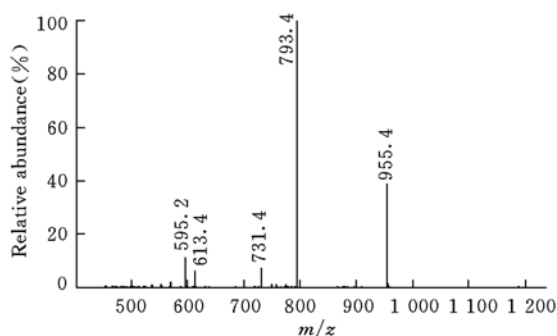


Fig. 2 ESI-MS<sup>2</sup> spectrum of ion at  $m/z$  955

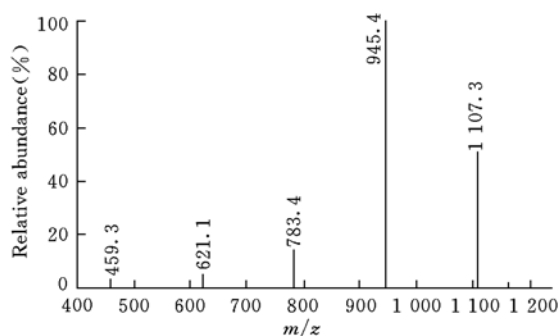


Fig. 3 ESI-MS<sup>2</sup> spectrum of ion at  $m/z$  1107

ESI-MS 图中观察到了  $m/z$  1107 离子, 对其进行 MS<sup>2</sup> 研究, 结果示于图 3, 谱图中观察到的子离子峰为  $m/z$  945,  $m/z$  783,  $m/z$  621 和  $m/z$  459, 分别对应于丢失 1~4 个六碳糖基, 其中  $m/z$  459 离子是二醇型皂苷的特征碎片离子, 与文献和标准品的数据相对照, 可以确定峰 2 所对应的化合物为 Rb<sub>1</sub>.

同样, 由 ESI-MS 数据可知, 峰 3 对应于  $m/z$  1077 离子, 在 MS<sup>2</sup> 谱中可以观察到 5 个子离子峰:  $m/z$  945,  $m/z$  915,  $m/z$  783,  $m/z$  621 和  $m/z$  459 (图 4), 分别对应于丢失一分子五碳糖基、一分子六碳糖基、一分子五碳糖基和一分子六碳糖基、一分子五碳糖基和二分子六碳糖基及一分子五碳糖基和三分子六碳糖基, 此外, 对  $m/z$  945 和  $m/z$  915 离子分别进行 ESI-MS<sup>3</sup> 研究, 谱图中都可观察到  $m/z$  783,  $m/z$  621 和  $m/z$  459 3 个离子峰. 根据质谱数据, 可初步推测峰 3 所对应的化合物分子量为 1078, 连有 2 个糖链、4 个糖基的二醇型皂苷, 其中五碳糖基为端基.

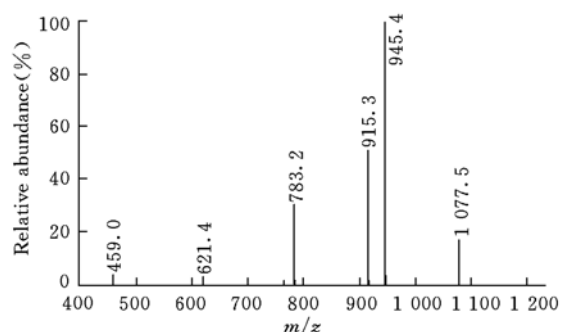


Fig. 4 ESI-MS<sup>2</sup> spectrum of ion at  $m/z$  1077

根据文献[10]数据可知, 人参皂苷中分子量为 1078 的皂苷有 3 个: Rb<sub>2</sub>, Rb<sub>3</sub> 和 Rc, 它们是同分异构体, 区别仅在于端基五碳糖结构不同, 在质谱中很难将它们区分, 结合液相色谱数据, 经标准品保留时间的对照可以确定, 峰 3 为 Rc.

从 pH = 4.4 提取液的液相色谱图中[图 1(C)]可以看出, 不仅人参皂苷溶出的种类增加, 而且 Ro(峰 1)、Rb<sub>1</sub>(峰 2) 和 Rc(峰 3) 的含量明显增加. 由 ESI-MS 数据可知, 峰 4 和峰 6 所代表的化合物为同分异构体, 其准分子离子  $[M - H]^-$  均为  $m/z$  799, 初步推断其可能为 Rg<sub>1</sub> 和 Rf, 两者均含有两个葡萄糖基团, 其中 Rg<sub>1</sub> 的两个葡萄糖分别连在 C6 位和 C20 位上, 而 Rf 的两个葡萄糖形成糖链连在 C20 位上. 据文献[15,16]报道, 人参皂苷 C20 位的糖苷键不如 C6 位上的糖苷键稳定, 所以 C20 位的糖基更容易失去.

对峰 4 和峰 6 所对应的准分子离子  $[M - H]^-$   $m/z$  799 分别进行了 MS<sup>2</sup> 研究, 均观察到了  $m/z$  637 和  $m/z$  475 两个子离子峰(如图 5 所示), 但峰 4 所对应的子离子  $m/z$  637 的相对丰度高于  $m/z$  475, 而峰 6 的子离子的相对丰度恰好相反, 说明前者所包含的两个葡萄糖分别连接在不同的碳位上, 而后者所包含的两个葡萄糖连在糖链 C20 位上. 其中  $m/z$  475 是二醇型人参皂苷的特征碎片离子, 与文献数据和标准品的保留时间相对照, 可以确定峰 4 所对应的化合物为 Rg<sub>1</sub>, 峰 6 所对应的化合物为 Rf.

质谱数据表明, 峰 5 和峰 8 所对应的化合物也为同分异构体, 它们的准分子离子  $[M - H]^-$  为  $m/z$  945. 但两者的 MS<sup>2</sup> 数据完全不同(见图 6).

峰 5 所对应的准分子离子产生 5 个子离子:  $m/z$  799,  $m/z$  783,  $m/z$  637,  $m/z$  621 和  $m/z$  475, 分别对应于丢失一分子脱氧六碳糖基、一分子六碳糖基、一分子脱氧六碳糖基和一分子六碳糖基、一分子脱氧六碳糖基、一分子六碳糖基和一分子水、一分子脱氧六碳糖基和二分子六碳糖基, 这些表明该化合物是连有两条糖链共 3 个糖, 其中脱氧六碳糖为端基的二醇型皂苷.

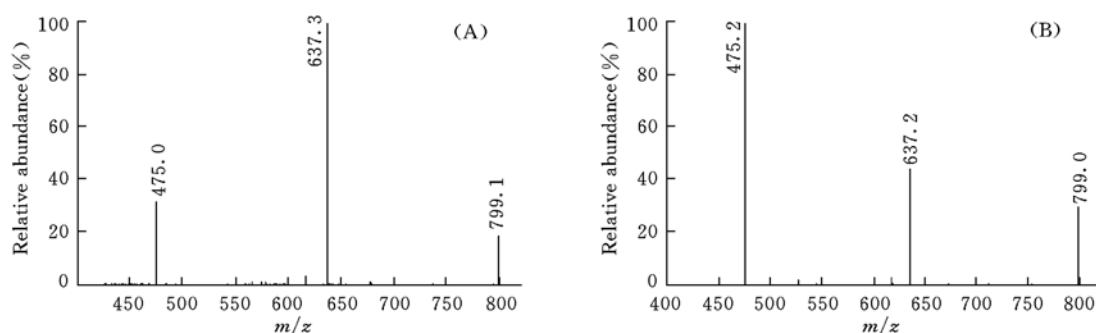


Fig. 5 ESI-MS<sup>2</sup> spectra of ions at  $m/z$  799 of peak 4(A) in Fig. 1(C) and peak 6(B) in Fig. 1(C)

而峰 8 所对应的准分子离子在 MS<sup>2</sup> 中产生  $m/z$  为 783, 621 和 459 的 3 个子离子, 表明其为连有 3 个六碳糖的二醇型皂苷. 通过与文献[10]数据相对照可以确定峰 5 所对应的化合物为 Re, 峰 8 所对应的化合物为 Rd. 峰 7 的准分子离子及其所产生的碎片离子与峰 3 极为相似, 经与标准品的保留时间对照可以确定其为 Rb<sub>2</sub>.

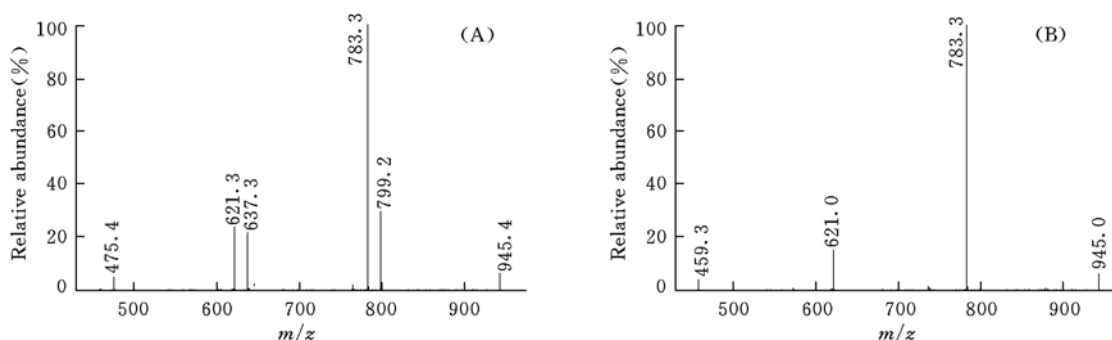


Fig. 6 ESI-MS<sup>2</sup> spectra of ions at  $m/z$  945 of peak 5(A) in Fig. 1(C) and peak 8(B) in Fig. 1(C)

继续增加水溶液的 pH 值, 人参皂苷的溶出相对于水溶液 pH 值等于 4.4 时仅在总量上有所改变, 没有发现新的皂苷. pH 为 4.4 时提取液中可观察到的人参皂苷及其 ESI-MS<sup>n</sup> 的碎片离子列于表 1. 不同 pH 值水溶液中各人参皂苷溶出的液相色谱峰面积的值列于表 2.

Table 1 Fragment ions observed in the ESI-MS<sup>n</sup> spectra of peaks 1—8 in HPLC profile \*

Peak No.	Peak identification	[M - H] ( $m/z$ )	ESI-MS <sup>n</sup> ( $m/z$ )
1	Ro	955	793 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 731 [M - H - Glc - H <sub>2</sub> O - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 613 [M - H - 2Glc - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 595 [M - H - 2Glc - 2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>
2	Rb <sub>1</sub>	1 077	945 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 783 [M - H - 2Glc] <sup>-</sup> , 621 [M - H - 3Glc] <sup>-</sup> , 459 [M - H - 4Glc] <sup>-</sup>
3	Re	1 077	945 [M - H - Ara(f)] <sup>-</sup> , 915 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 783 [M - H - Ara(f) - Glc] <sup>-</sup> , 621 [M - H - Ara(f) - 2Glc] <sup>-</sup> , 459 [M - H - Ara(f) - 3Glc] <sup>-</sup>
4	Rg1	799	637 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 475 [M - H - 3Glc] <sup>-</sup>
5	Re	945	799 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 783 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 637 [M - H - Glc - Rha] <sup>-</sup> , 475 [M - H - 2Glc - Rha] <sup>-</sup>
6	Rf	799	637 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 475 [M - H - 3Glc] <sup>-</sup>
7	Rb <sub>2</sub>	1 077	945 [M - H - Ara(p)] <sup>-</sup> , 915 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 783 [M - H - Ara(p) - Glc] <sup>-</sup> , 621 [M - H - Ara(p) - 2Glc] <sup>-</sup> , 459 [M - H - Ara(p) - 3Glc] <sup>-</sup>
8	Rd	945	783 [M - H - Glc] <sup>-</sup> , 621 [M - H - 2Glc] <sup>-</sup> , 459 [M - H - 3Glc] <sup>-</sup>

\* Glc =  $\beta$ -D-glucose; Ara(p) =  $\alpha$ -L-arabinose (pyranose); Araf = arabinose (furanose); Xyl =  $\beta$ -D-xylose; Rha =  $\alpha$ -L-rhamnose.

实验结果表明, 调节水溶液的 pH 值可影响人参皂苷的溶出, 酸性越强, 人参皂苷溶出的越少, 而适当增加溶液的碱性可以促进人参皂苷的溶出. 此外, HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> 是研究人参提取物中皂苷类化合物的快捷、准确的方法. 它不仅可将提取物中的各种皂苷类化合物很好地分离, 确定其相对含量, 还可以在线提供皂苷类化合物的分子量和结构信息.

**Table 2** The peaks area of ginsenosides in aqueous solutions with different pH values

Peak No.	Ginsenoside	$t_R/\text{min}$	$10^{-6}$ Peaks area									
			pH=2.4	pH=3.4	pH=4.4	pH=5.4	pH=6.8	pH=7.4	pH=8.4	pH=9.4	pH=10.4	pH=11.2
1	R <sub>0</sub>	39.90 ± 0.20	7.20	10.42	8.93	9.08	8.43	8.41	10.19	9.47	9.42	7.98
2	Rb <sub>1</sub>	37.02 ± 0.30		3.40	20.51	23.38	18.25	19.14	22.35	27.22	24.74	27.40
3	Rc	38.40 ± 0.10		1.41	12.85	11.76	11.01	10.59	10.32	11.39	14.10	17.31
4	Rg <sub>1</sub>	13.73 ± 0.20			6.99	4.97	3.58	3.97	4.42	4.56	5.17	6.00
5	Re	14.12 ± 0.20			5.34	3.75	3.25	3.26	3.96	3.88	4.10	5.28
6	Rf	35.05 ± 0.10			1.96	1.42	1.40	1.30	1.35	1.81	1.52	1.62
7	Rb <sub>2</sub>	39.42 ± 0.30			11.90	10.88	9.96	8.83	10.19	11.01	12.73	13.27
8	Rd	43.38 ± 0.20			3.91	4.31	4.02	3.74	4.75	5.12	4.25	5.33
Total			7.20	15.23	72.39	69.55	59.90	59.24	67.53	74.46	76.03	84.19

## 参 考 文 献

- [1] Yun Y. K., Choi S. Y.. *Int. J. Epidemiol*[J], 1998, **27**: 359—364
- [2] LIU Lian(刘 恋), ZHANG Jun-Tian(张均田). *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学报)[J], 1994, **30**(9): 674—678
- [3] DING Yu-Xiong(丁钰熊), QIAN Yong-Yi(钱永益), XU Jian-Zhong(徐建中) *et al.*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药)[J], 1986, **17**(5): 44—45
- [4] Hasegana H., Suzuki R., Nagaoka T. *et al.*. *Biol. Pharm. Bull.* [J], 2002, **25**: 861—866
- [5] Wakabayashi C., Hasegawa H., Murata J. *et al.*. *Dncol. Res.* [J], 1997, **9**: 411—417
- [6] Justesen U., Knuthesen P., Leth T.. *J. Chromatogr.* [J], 1998, **799A**: 101—110
- [7] Zhang Hai-jiang, Wu Yong-jiang, Cheng Yi-yu *et al.*. *Pharm. Biomed. Anal.* [J], 2003, **31**: 175—183
- [8] Wang X., Sakuma T., Asafu-Adjaye E. *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 1999, **71**: 1579—1584
- [9] Li Li, Dou Jiang-peng, Song Feng-rui *et al.*. *Analytica Chimica Acta*[J], 2005, **536**: 21—28
- [10] Cui M., Song F. R., Zhou Y. *et al.*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* [J], 2000, **14**: 1280—1286
- [11] CHEN Mao-Lian(陈貌连), SONG Feng-Rui(宋凤瑞), GUO Ming-Quan(郭明全) *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2002, **23**(5): 805—808
- [12] Wang Yong, Xu Qing-xuan, Song Feng-rui *et al.*. *Chem. Res. Chinese Universities*[J], 2004, **20**(1): 121—123
- [13] CUI Meng(崔 勳), LIU Zhi-Qiang(刘志强), SONG Feng-Rui(宋凤瑞) *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报)[J], 2001, **22**(8): 1323—1325
- [14] Gu Sheng, Shen Jin-can, Zhuang Zhi-xia *et al.*. *Chem. Res. Chinese Universities*[J], 2001, **17**(4): 386—373
- [15] Zhou K., Zhu S., Tohda C. *et al.*. *J. Nat. Prod.* [J], 2002, **65**: 346—351
- [16] Liu Shu-ying, Cui Meng, Liu Zhi-qiang *et al.*. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* [J], 2004, **15**: 133—141

## Studies on the Stripping Regularity of Ginsenosides in Aqueous Solutions with Different pH Values by HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>

ZHANG-Xu<sup>1,2</sup>, SONG Feng-Rui<sup>1</sup>, LIU Zhi-Qiang<sup>1</sup>, LIU Shu-Ying<sup>1\*</sup>

(1. *Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun 130022, China;*

2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

**Abstract** HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> was used for the analyses of the stripping of ginsenosides in values aqueous solutions with different pH (pH = 2.4—11.2). Using tandem mass spectrometry, the characteristics fragment ions of ginsenosides were obtained. The experimental results showed that the stripping of ginsenosides were different in aqueous solutions with different pH values. Acidity is a main factor for influencing the stripping of ginsenoside, and the stripping of ginsenosides are inhibited in a high acidity (pH < 4.4).

**Keywords** HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>; Ginseng; Ginsenoside

(Ed.: A, G)