

LC/MS 鉴定中药三七及其复方制剂

肖盛元, 罗国安*, 王义明, 杨学东, 梁琼麟

(清华大学 分析中心, 北京 100084)

摘要: 目的 建立中药三七及其在复方丹参制剂中的特征图谱。方法 用 LC/MS 分析方法, 采集三七、人参和西洋参的 LC/MS 总离子流色谱, 从总离子流色谱中提取三七主要化学组分的提取离子流色谱, 选择相对稳定 3 种药材间差异显著的提取离子流色谱作为三七药材的特征图谱。在相同条件下对比复方丹参的提取离子流色谱与三七的特征图谱; 同时用 LC/MS/MS 对三七中的主要组分进行定性分析。结果 与人参皂苷 Rg1 (m/z 800) 和 Re (m/z 946) 具有相同 m/z 的提取离子流色谱在 3 种药材间差异显著, 稳定可靠, 在复方中有较好的重现性, 复方丹参中其他共有成分对其无显著影响。结论 三七的 LC/MS 特征图谱可作为鉴定复方丹参中三七的特征, 也可作为鉴别三七和同属其他药材的特征。

关键词: 特征图谱; 生药鉴定; 人参属; 三七

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)02-0127-05

Identification of *Panax notoginseng* and its preparations by LC/MS

XIAO Sheng-yuan, LUO Guo-an*, WANG Yi-ming, YANG Xue-dong, LIANG Qiong-lin

(Analysis Center, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: **Aim** To develop a method of identifying the existing of *Panax notoginseng* in products of traditional Chinese medicine compound Danshen. **Methods** Total ion chromatograms (TIC) of *Panax notoginseng*, *P. ginseng*, and *P. quinquefolius* were obtained by means of LC/MS. Extracted ion chromatograms (EIC) possess m/z of 770, 800, 932, 946 and 1108 of above-mentioned three herbs was compared between species. EIC 800 and 946 were selected as differentiation marks to distinguish *P. notoginseng* from the other two species. The EIC 800 and 946 of *P. notoginseng* were also compared to the EICs obtained by the same method from Chinese patent medicines of compound Danshen pellet, compound Danshen tablet, and compound Danshen injection. EIC 800 and 946 of *P. notoginseng* and its products possess similar peaks, relative retention time, and relative integral areas. Main chemical constitutes of *P. notoginseng* were also identified by using LC/MS/MS. **Results** EIC 800 and 946 were obviously different between *P. notoginseng*, *P. ginseng*, and *P. quinquefolius*. Patent medicines of compound Danshen pellet, compound Danshen tablet, which consist of extractions from *P. notoginseng*, possess the characteristic EICs. The selected EICs were stable and reproductive. **Conclusion** EIC 800 and 946, which correspond to ginsenoside Rg1, Re, and their isomers, can be used as identifying mark of *P. notoginseng* to differentiate it from other herbs, and also can be used to tell apart *P. notoginseng* from other herb extractions in Chinese patent medicines of compound Danshen.

Key words: characteristic-mark; herb identify; *Panax*; *Panax notoginseng*

中药的品种鉴定和品质评价一直是中药鉴定学

领域的主要研究内容。随着中药的入药形式、给药方式不断改变,传统的性状鉴别和经典的组织显微鉴别对现代方法生产的中药的鉴别已经失去应用价值。以分子生物学技术为基础的分子遗传标记鉴别虽然在生药鉴定方面具有快速、特异性强、受样品

收稿日期: 2003-03-14.

基金项目: 973 基金项目 (G1999054403); 国家科技攻关项目 (2002BA906A29).

* 通讯作者 Tel: 86-10-62772263,

E-mail: shyxiao@tsinghua.edu.cn

采集的影响因素较小的特点,但对经过提取精制的中成药,尤其是中药注射剂不能起到鉴定作用。建立在化学成分多态性基础上的化学指纹图谱为现代中药的鉴定和品质评价提供了方法学基础。质谱可以区分复杂体系的不同 m/z 的物质,串联质谱仪还可以进一步区分具有不同裂解碎片的同分异构体,目前此类工作尚处于探索阶段。国外使用质谱鉴定生药大多用液相色谱与质谱联用,检测不同单一药材的一个和几个特异性成分作为鉴定指标^[1-3]。但对于中药而言,能作为同属种间鉴别标志的生物标志物很难找到,很多生药化学成分研究不够深入。

本文通过对三七和 3 种复方丹参制剂的液相色谱质谱联用分析,发现检测三七中分别为 m/z 800 和 946 的同分异构体可得到能区分三七和同属的人参和西洋参的特征图谱,并且这种图谱在含有三七的复方丹参制剂中能稳定地重现,可用于对复方丹参中三七进行鉴定。

材料与方法

仪器、试剂与药品 液相色谱质谱联用仪: Agilent 1100 Series LC/MSD Trap; ESI 源。色谱柱: Phenomenex Prodigy C_8 柱(250 mm × 4.6 mm ID, 5 μ m), Agilent Zorbax Eclipse XDB- C_8 柱(150 mm × 4.6 mm ID, 5 μ m)。

三七(1) (*Panax notoginseng*) 对照药材,由香港政府化验所提供;三七(2),采自云南文山州平坝;三七(3),采自云南文山州杨柳井。人参 (*P. ginseng*),采自吉林省左家;西洋参 (*P. quinquefolius*),采自北京怀柔。上述药材均经肖盛元博士鉴定。

复方丹参滴丸(compound Danshen pellet),天津天士力集团产品;复方丹参片(compound Danshen tablet),北京北培制药厂生产;复方丹参注射液(compound Danshen injection),贵州神奇制药厂生产。

色谱条件 进样量:20 μ L;流动相:A相,0.1 mmol·L⁻¹的醋酸铵水溶液加氨水调 pH 8.0;B相,乙腈。梯度条件:0~15 min, B相线性梯度上升到 40%;15~60 min, B相为 40%。

质谱条件 调谐:雾化气 288 kPa,干燥气 8 L·min⁻¹,干燥气温度 350 °C;目标质量 900,化合物稳定性 50%,离子阱驱动水平 100%。

自动质谱/质谱参数:强度阈值 5 000,母离子数 2,分离宽度 2.0,碰撞能量 1.00, m/z 700~1 250。

ICC:目标 30 000,最大累积时间 50 μ s,扫描范围:全扫描,700~1 250;质谱/质谱:400~1 250。

样品处理 分别取上述药材,40 °C 烘干,粉碎,过 100 目筛,备用。分别称取三七对照药材(1)、平坝三七(2)、杨柳井三七(3)、人参、西洋参药材粉末 0.403 1, 0.399 3, 0.398 5, 0.402 4, 0.398 1 g,于 5 mL 量瓶中,加甲醇 3.5 mL,超声振荡 5 min 后放置过夜,再用超声波处理两次,每次 10 min,中间间隔 1 h,定容,放置 1 h 后,取上清液,4 000 r·min⁻¹ 离心,再取上清液备用;复方丹参滴丸 2 丸(0.050 1 g),加甲醇定容至 5 mL;复方丹参片 1.003 2 g,加甲醇定容至 100 mL;复方丹参注射液 20 mL,加甲醇定容至 100 mL,摇匀后静置过夜。上述溶液过 0.45 μ m 微孔滤膜,滤液备用。

结果与讨论

1 液相色谱质谱条件选择

流动相的选择既要保证液相色谱的柱效和分离度;又要满足电喷雾离子化对基质的要求。对人参皂苷类物质的 ESI/MS 分析使用较多的是正离子模式^[1-8],但考虑到正离子模式可能同时出现 $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 等一系列准分子离子而干扰认定。本实验选用负离子模式,用挥发性的醋酸铵-氨水缓冲体系保证了色谱分离效果,将流动相调至碱性提高了负离子模式下人参皂苷类化合物的响应度,使化学成分的认定简单明确。质谱扫描范围选择在 700~1 250,包括主要的皂苷类成分,又保证质谱的扫描速度和 m/z 的精确性。上述条件下人参、三七和西洋参的 LC/MS 分析总离子流色谱图(TIC),见图 1。

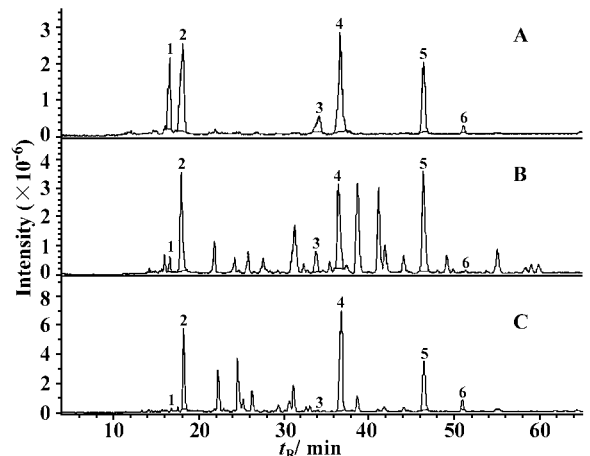


Figure 1 Total ion chromatograms of *Panax notoginseng* (A), *P. ginseng* (B) and *P. quinquefolius* (C). Method 1: C_8 150 mm × 4.6 mm; flow rate: 0.5 mL·min⁻¹

2 三七特征图谱提取

由图 1 可见 6 个主要色谱峰,其主要成分的 m/z 分别是 932(1),800 和 946(2),770(3),1 108(4),946(5),946(6)。在提取三七的这几种 m/z 的离子流色谱时对比了人参和西洋参相同 m/z 的提取离子流色谱(EIC;或称选择离子流色谱,SIC or XIC)。其中 m/z 770 和 1 108 的提取离子流色谱中,由于相同 m/z 的其他成分的相对离子丰度较低,在提取离子流色谱图中看不到其存在,表观上三七、人参和西洋参的这 3 种离子流色谱只有 1 个信号峰,且保留时间相同,三者没有显著区别。 m/z 932(16.9 min,三七人参皂苷 R1)的物质在三七中为主要成分之一,三七的提取离子流色谱与同条件西洋参的离子流色谱有较大的差异,但与人参差异不显著。不选作鉴定依据。 m/z 800 和 946 的组分中包括了人参皂苷 Rg1 和 Re(18.4 min),均为 3 种药材的主要成分,其提取离子流色谱差异显著,故作为鉴定该 3 种药材的依据(图 2)。

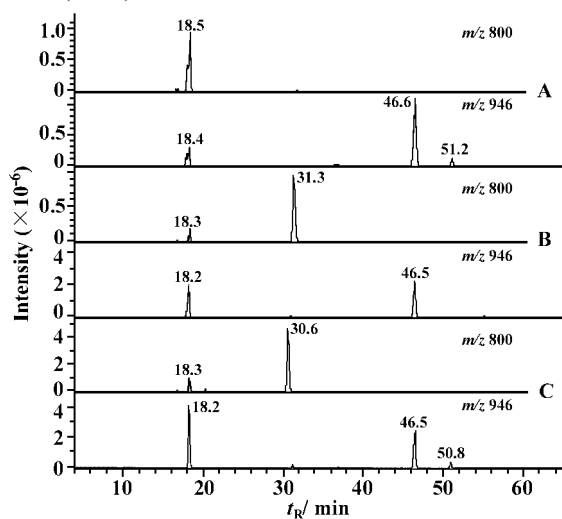


Figure 2 Extracted ion chromatograms possessed m/z 800 and 946 of *Panax notoginseng* (A), *P. ginseng* (B) and *P. quinquefolius* (C) by method 1

三七、人参和西洋参 m/z 800 的提取离子流色谱(EIC 800)图的比较:三七的 EIC 800 图的主要峰为 t_R 18.4 min(Rg1),20.3 min 处无离子峰,30.6 min 处信号强度也很低,与 t_R 18.4 min(Rg1)的相对积分面积为 0.02 左右,而人参和西洋参在 30.6 min 处的离子峰相对峰面积分别为 2.09 和 5.48。

三七、人参和西洋参 m/z 946 的提取离子流色谱(EIC 946)图的比较:三七的 EIC 946 图可见 4 个峰,相对积分面积为 1:0.04:3.58:0.33,但 36.8 min

处的离子峰强度很低。人参和西洋参分别为 1:0:1.4:0 和 1:0:0.9:0.14。

结果表明,三七、人参和西洋参的 m/z 800 和 946 的 EIC 图可作为区别这 3 种药材的依据。

3 方法的精密度

文山三七提取液,用方法 1(C_8 短柱:150 mm × 4.6 mm;流速:0.5 mL·min⁻¹)连续进样 5 次。结果表明本法可重复。强度较高的成分信号较稳定,重复性较好(RSD 为 1%~4%);信号弱的成分重复性稍差(RSD 为 6%)。

4 方法的适用性

为了确定本法的实用性,对比了色谱分析中常用的色谱条件下 m/z 800 和 946 的提取离子流色谱图的稳定性。用方法 2(C_{18} 长柱:250 mm × 4.6 mm;流速:0.8 mL·min⁻¹)对人参、西洋参和三七进行了分析,其分析的结果与前基本一致,三七和西洋参的两种 EIC 图的峰形和相对保留时间及相对比例基本相似。方法 2 的 m/z 946 色谱图中,与第 1 个峰相对保留时间为 2.00 左右的信号因强度太小而没有进行积分。人参的 EIC 图中,EIC 800 与方法 1 的结果基本一致。EIC 946 与方法 1 的结果相比,峰形一致,比例有所变化。但与西洋参和三七对比,差异仍然显著。前两者具有 3 个峰,而人参只有 2 个峰,比例在 1:1 左右,所以仍然具有鉴定意义。

C_8 和 C_{18} 键合硅胶的极性差别较大,被分析的化学成分在这两种固定相上的色谱行为有较大的差异。但本方法在这两种色谱柱条件下有较好的重现性,说明本方法有较大的适用范围。

5 系统适用性实验

以色谱图 1 中的 2 号峰(人参皂苷 Rg1 和 Re 的混合峰)计,塔板数不低于 60 000。

6 几种不同来源的三七的分析

三七对照药材、平坝三七、杨柳井三七的 m/z 800 和 946 的提取离子流色谱的比较,3 种不同来源三七的两种特征图谱具有明确的共同特征:三七 m/z 800 的离子流色谱主要有 1 个峰(18.4 min),30.6 min 处的离子信号较弱,甚至看不到。3 种三七的上述色谱信号相对峰面积分别是 1/0.02(对照),1/0.00(平坝),1/0.04(杨柳井);而人参和西洋参同条件的离子流色谱有明显的两个峰,且 t_R 30.6 min 处的峰面积大于 t_R 18.4 min 的峰面积。

三七 EIC 946 图的主要特点是有 3 个较稳定的色谱信号, t_R 分别是 18.4(a),46.5(b)和 51.2 min

(c)。相对峰面积的关系分别是 $b > a > c$ 。人参相同条件的 EIC 图只有两个峰 a 和 b, 相对积分面积接近 1:1, t_R 51.2 min 的信号不明显。西洋参相同条件的 EIC 图的峰数和保留时间与三七一致, 但比例关系为 $a > b > c$ 。

7 主要信号的 LC/MS/MS 二级质谱归属与定性

三七人参皂苷 R1 负离子裂解行为见图 3。三七的主要皂苷类组分裂解行为是从糖苷键的糖端断裂丢失 162 (gluc), 146 (rhac) 和 132 (xylc) 的单糖及 324 (glu-gluc), 308 (rha-gluc), 298 (xyl-gluc) 等二糖; 从糖苷键的配基端断裂, 产生 180 (gluo), 164 (rho) 和 150 (xylo) 的单糖及 342 (glu-gluo), 326 (rha-gluo), 316 (xyl-gluo) 等二糖的中性碎片丢失, 最后出现苷原的离子。三七中主要色谱信号的二级质谱数据及结构归属如下:

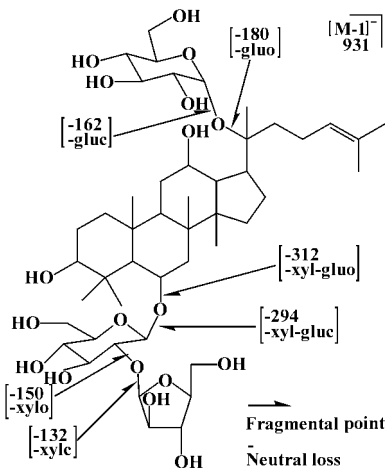


Figure 3 Scheme for fragmentation of notoginsenoside R1 “gluc” means break the C-O bond of glucose when a fragmentation occurred; “gluo” means break the C-O bond of aglycon; “xylc” and “xylo” and other similar symbols in this text have parallel meanings

t_R 16.9 min, m/z 931, 二级离子 m/z 799/637/475; 与三七人参皂苷 R1 的结构一致。

t_R 18.4 min, m/z 799, 二级离子 m/z 637/475; 与人参皂苷 Rg1 结构相符。与 Rg1 标准品对照, 确定为人参皂苷 Rg1 的信号。

t_R 18.4 min, m/z 945, 二级离子 m/z 800/783/781/765/637/621/475; 质谱数据和 t_R 与人参皂苷 Re 一致, 推断该组分为人参皂苷 Re。

t_R 34.2 min, m/z 769, 二级离子 m/z 637/475; 符合此结构的有三七人参皂苷 R2 的结构。

t_R 36.8 min, m/z 553 为双负离子。二级离子

m/z 945/783/765/475; 质谱数据与 t_R 值与人参皂苷 Rb1 一致。

t_R 36.8 min, m/z 1107 (M-1, single charged)。二级离子 m/z 1107/945; 为 Rb1 的单电荷离子。

t_R 36.8 min, m/z 945, 二级离子 m/z 945/783/621; 结构上比 Rb1 少 1 个六碳糖, t_R 值却与人参皂苷 Rb1 一致; 质谱数据也与 Rb1 的子离子一致; 所以此离子极有可能是 Rb1 在源内和传输过程中产生的碎片。

t_R 46.6 min, m/z 945, 二级离子 m/z 945/783/765/621/459; 符合该结构的人参皂苷类成分有人参皂苷 Rd 的结构。

t_R 51.2 min, m/z 945, 二级离子 m/z 621/459; 二级质谱因为含量较低, 信号不够明确, 但基本可以确定该组分为原人参二醇型皂苷。

8 复方丹参制剂中三七特征谱图的分析

分别对复方丹参滴丸, 复方丹参片和复方丹参注射液的 TIC, m/z 717 (丹酚酸 B) 的 EIC, 三七的特征 EIC 图进行了分析。复方丹参注射液不含三七, 因此其 EIC 图不存在三七的特征。复方丹参滴丸和复方丹参片组方中含有三七, 其 m/z 800 和 946 的 EIC 图显示明显的三七药材相同条件下的特征谱图, 复方丹参滴丸的特征谱图见图 4。两种中成药 m/z 946 的特征谱图的 3 个主要色谱信号的相对积分面积分别是: 1.00: 2.16: 0.15 和 1.00: 1.79: 0.14。表明三七的 LC/MS 特征 EIC 在复方制剂中存在一定的稳定性, 可作为鉴定复方制剂中三七的依据。由于本实验中未知上述复方丹参制剂的生产工艺, 三七药材的特征图谱是在常规条件下获得的, 难免与

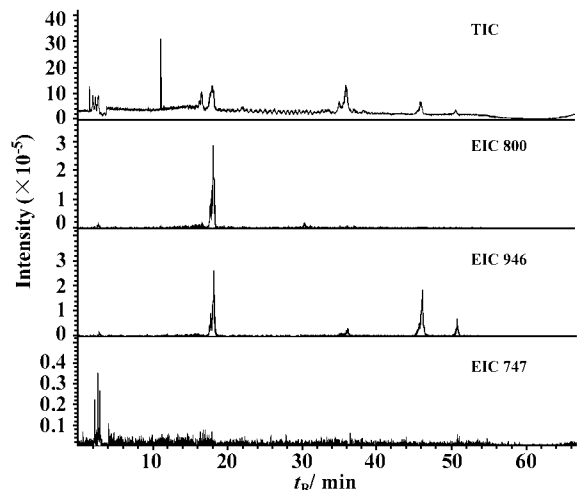


Figure 4 Analysis of compound Danshen pellet (method 1)

复方制剂的生产工艺有些出入,但三七的特征仍然保存,可用于区分三七与其同属的其他药材。同时从复方丹参滴丸、复方丹参片和复方丹参注射液的 m/z 717 的 EIC 可看出,在相同条件下,丹参的 EIC 也存在一定的稳定性。在丹参的成分共存时,三七的特征图谱有较好的重现性。

三七、人参和西洋参 3 种药材的 EIC 800 和 946 彼此间有较显著的差异。不同色谱条件下这种差异具重现性。不同来源的三七在相同条件下的提取离子流色谱无显著差异。由于西洋参 EIC 800 中, t_R 24.8 min 的信号强度较低,所以可能会出现与人参相似的图谱,但人参与西洋参的 EIC 946 差异较大。三七与西洋参 EIC 946 的图谱峰形一致,可能会造成误判,但二者的 EIC 800 差异较大。所以,上述两种提取离子流色谱在 3 种药材的鉴别上相互佐证,互为补充。配伍中含有三七的复方丹参制剂能较好地保留三七的上述特征,共存成分干扰小。本法具有较好的重现性和特异性,较大的适应范围,可作为中成药中三七及其药材的鉴别方法。

致谢:中国医学科学院药用植物研究所刘江云博士惠赠三七药材;中国农业科学院特产研究所王英平教授惠赠人参药材。

References:

- [1] Chan TWD, But PPH, Cheng SW, *et al.* Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *P. quinquefolius*, and ginseng products by using HPLC/MS [J]. *Anal Chem*, 2000, **72**(10):2329 - 2329.
- [2] Chan TWD, But PPH, Cheng SW, *et al.* Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *P. quinquefolius*, and ginseng products by using HPLC/MS [J]. *Anal Chem*, 2000, **72**(6):1281 - 1287.
- [3] Li WK, Gu CG, Zhang HJ, *et al.* Use of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to distinguish *Panax ginseng* C.A. Meycer (Asian ginseng) and *Panax quinquefolius* L. (North American ginseng) [J]. *Anal Chem*, 2000, **72**(21):5417 - 5422.
- [4] Mauri P, Pietta P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, **23**(1):61 - 68.
- [5] Tawab MA, Bahr U, Danieli B, *et al.* Electrospray mass spectrometry with consecutive fragmentation steps (ESI-MS) as a tool for rapid and sensitive analysis of ginsenosides and their galatosyl derivatives [J]. *Helv Chim Acta*, 2000, **83**(4):739 - 747.
- [6] Wang XM, Sakuma T, Asafur Adjaye E, *et al.* Determination of ginsenosides in plant extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS [J]. *Anal Chem*, 1999, **71**(8):1579 - 1584.
- [7] Vanbree men RB, Huang CR, Lu ZZ, *et al.* Electrospray liquid chromatography mass spectrometry of ginsenosides [J]. *Anal Chem*, 1995, **67**(21):3985 - 3989.
- [8] Miao XS, Metcalfe CD, Hao CY, *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry of ginsenosides [J]. *J Mass Spectrom*, 2002, **37**(5):495 - 506.

[1] Chan TWD, But PPH, Cheng SW, *et al.* Differentiation and