

西洋参中 8 种人参皂苷类成分的 UPLC-MS/MS 定量分析

赵 瑛^{1*}, 谢海龙^{1,2}, 王冬雪¹, 张文君¹, 阎新佳¹¹ 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076; ² 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040

摘要: 建立超高效液相色谱串联三重四级杆质谱法 (UPLC-MS/MS) 同时测定西洋参中 8 种人参皂苷类成分 (人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₁ 和拟人参皂苷 F₁₁) 的定量分析方法。采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 流速 0.25 mL/min, 柱温 35 °C。电喷雾电离源 (ESI), 采用多反应检测模式 (MRM), 以保留时间及定性离子对之间的相对丰度定性, 以定量离子对峰面积进行定量。定量分析西洋参中 8 种人参皂苷类成分在考察的浓度范围内呈良好的线性关系 ($r > 0.99$); 回收率和 RSD 分别在 95.65% ~ 103.34%, 0.38% ~ 4.33%。本研究建立的同时测定西洋参中 8 种皂苷类成分的 UPLC-MS/MS 定量分析方法简便、快捷、准确, 可为综合评价西洋参的质量提供参考。

关键词: 西洋参; UPLC-MS/MS; 人参皂苷; 质量控制

中图分类号: R927.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.013

Quantitative Analysis of 8 Major Ginsenosides in *Panax quinquefolium* by UPLC-MS/MS

ZHAO Ying^{1*}, XIE Hai-long^{1,2}, WANG Dong-xue¹, ZHANG Wen-jun¹, YAN Xin-jia¹¹ School of Pharmaceutical, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;² School of Pharmaceutical, Heilongjiang University Of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: To establish an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of 8 major compounds (Ginsenoside Rb₃, Ginsenoside Rc, Ginsenoside Rb₁, Ginsenoside Rb₂, Ginsenoside Rd, Ginsenoside Re, Ginsenoside Rg₂, Pseudoginsenoside F₁₁) in *Panax quinquefolium*. Using Waters BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with a gradient solvent system of acetonitrile-0.1% formic acid in water as mobile phases, flow rate: 0.25 mL/min, column temperature: 35 °C. Multiple reactions monitoring (MRM) mode was used as detection mode with electro-spray ionization (ESI) source. The retention time and detected relative abundance of ion pairs were used for qualitative determination, the detected peak areas of ion pairs were used for quantitative determination. Under the optimized chromatographic conditions, good separation for 8 targeted compounds were obtained. Satisfactory linearity was achieved with wide linear range and fine determination coefficient ($r > 0.999$), the over-all recoveries were ranged from 95.65% -103.34% with the RSD ranging from 0.38% ~ 4.33%. It is the report about simultaneous analysis of 8 major ginsenosides components in *P. quinquefolium* by using UPLC-MS/MS method, which affords highly sensitive, specific, speedy and efficient method for quality control of *P. quinquefolium*.

Key words: *Panax quinquefolium*; UPLC-MS/MS; ginsenosides; quality control

西洋参 (*Panax quinquefolius* L.), 别名洋参花旗参, 为五加科植物西洋参的根, 原产于北美, 我国亦有栽培。西洋参性凉, 味甘苦, 补肺阴, 清火, 养胃生津, 含人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rb₂、

人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rg₂ 以及拟人参皂苷 F₁₁ 等, 另外还含精氨酸、天冬氨酸等氨基酸。研究表明, 西洋参中主要成分人参总皂苷具有抗氧化、抗肿瘤、保护心脑血管、保护神经细胞、减缓记忆衰退、调节血糖、调节免疫功能等生物活性^[1-3]。西洋参中的化学成分研究已有报道^[4,5], 但由富集纯化分离得到的成分为指标的质量控制报道较少。近年来, 随着分析技术的

收稿日期: 2017-05-16 接受日期: 2017-07-18

基金项目: 国家自然科学基金 (81373548); 国家自然科学基金 (81673871); 2016 哈尔滨商业大学研究团队支持项目 (2016TD009)

* 通信作者 Tel: 86-451-84838207; E-mail: zhaoy0204@163.com

发展,超高效液相色谱串联三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS)由于其分离速度快、灵敏度高、测定准确性强而被广泛运用于中药及复方的分析中^[6-10],并且目前关于西洋参药材质量控制的研究报道也较少,并且相关研究报道对其特有成分拟人参皂苷 F₁₁ 的评价与分析较少^[11,12]。因此,本实验针对其 8 种皂苷类成分包括其特有成分拟人参皂苷 F₁₁ 进行同时定量研究,为西洋参的质量控制提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC-I-CLASS 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);XevoTQD-三重四级杆质谱(美国 Waters 公司);MS105 型十万分之一分析天平(德国 METTLER TOLEDO 公司);KQ2200B 型台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料

甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、甲酸(质谱级)购自 Fisher Scientific Co(美国 Santa Clara 公司);水为屈臣氏蒸馏水;其他试剂为分析纯。

对照品:人参皂苷 Rb₁(批号 MUST-15011610)、人参皂苷 Rb₂(批号 MUST-14072210)、人参皂苷 Rb₃(批号 MUST-14072211)、人参皂苷 Re(批号 MUST-14091710)、人参皂苷 Rc(批号 MUST-15011912)、人参皂苷 Rd(批号 MUST-15020910)、人参皂苷 Rg₁(批号 MUST-15042215)、拟人参皂苷 F₁₁(批号 MUST-14041212)购自成都曼思特生物科技有限公司。西洋参(*Panax quinquefolius* L.)购自哈尔滨瑞祥医药有限公司,由哈尔滨商业大学药学院张德连教授鉴定为五加科植物西洋参的根。

2 实验方法

2.1 色谱条件

Waters Acquity BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.1% 甲酸水(A)与乙腈(B),梯度洗脱:(0~0.5 min, 25%~25% A;0.5~2.0 min, 25%~50% A;2.0~5.0 min, 50%~60% A;5.0~5.5 min, 60%~25% A;5.5~7.0 min, 25%~25% A),流速:0.25 mL/min,柱温:35 °C,进样量:10 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),毛细管电压:2.8 kV;脱溶剂气流:N₂,流速:500 L/h,溶剂温度:650 °C;锥孔气流:N₂,流速 50 L/h;离子源温度:350 °C;碰撞气体:氩气。多反应离子监测(MRM)模式进行正负离子同步监测;8 种成分用于定量分析的监测离子见表 1。8 种检测化合物的母离子,子离子质谱图、典型提取离子流图,见图 1。

2.3 供试品溶液的制备

取西洋参药材,粉碎,过 40 目筛得西洋参药材粉末。精密称定 100 g,加入 70% 乙醇 80 mL,加热回流提取 3 h,提取 2 次,过滤,收集滤液,60 °C 回收溶剂至无醇味,后用 D101 大孔树脂富集后,富集液 60 °C 回收溶剂至无醇味后,提取富集液共 316.8 mL,取 1 mL 富集液用甲醇定容至 50 mL 容量瓶,制备成供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备

取人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₁、拟人参皂苷 F₁₁ 对照品适量,精密称定,加入甲

表 1 8 种人参皂苷的质谱采集参数

Table 1 LC-MS/MS parameters for 8 targeted compounds

化合物 Compound	保留时间 Retention time	电离模式 Ion source	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	定量离子 Daughter ion (<i>m/z</i>)	锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞能量 Collision energy (eV)
Ginsenoside Rb ₁	2.64	ESI ⁺	1109.5	325.1	25	22
Ginsenoside Rb ₂	2.79	ESI ⁻	1077.5	459.5	80	50
Ginsenoside Rb ₃	2.79	ESI ⁻	1077.5	945.5	80	45
Ginsenoside Re	2.07	ESI ⁻	945.5	475.5	80	40
Ginsenoside Rc	2.79	ESI ⁻	1077.7	783.7	80	45
Ginsenoside Rd	3	ESI ⁻	945.5	621.5	85	45
Ginsenoside Rg ₁	2.08	ESI ⁻	799.4	637.4	70	22
Pseudoginsenoside F ₁₁	2.8	ESI ⁻	799.4	653.4	75	40

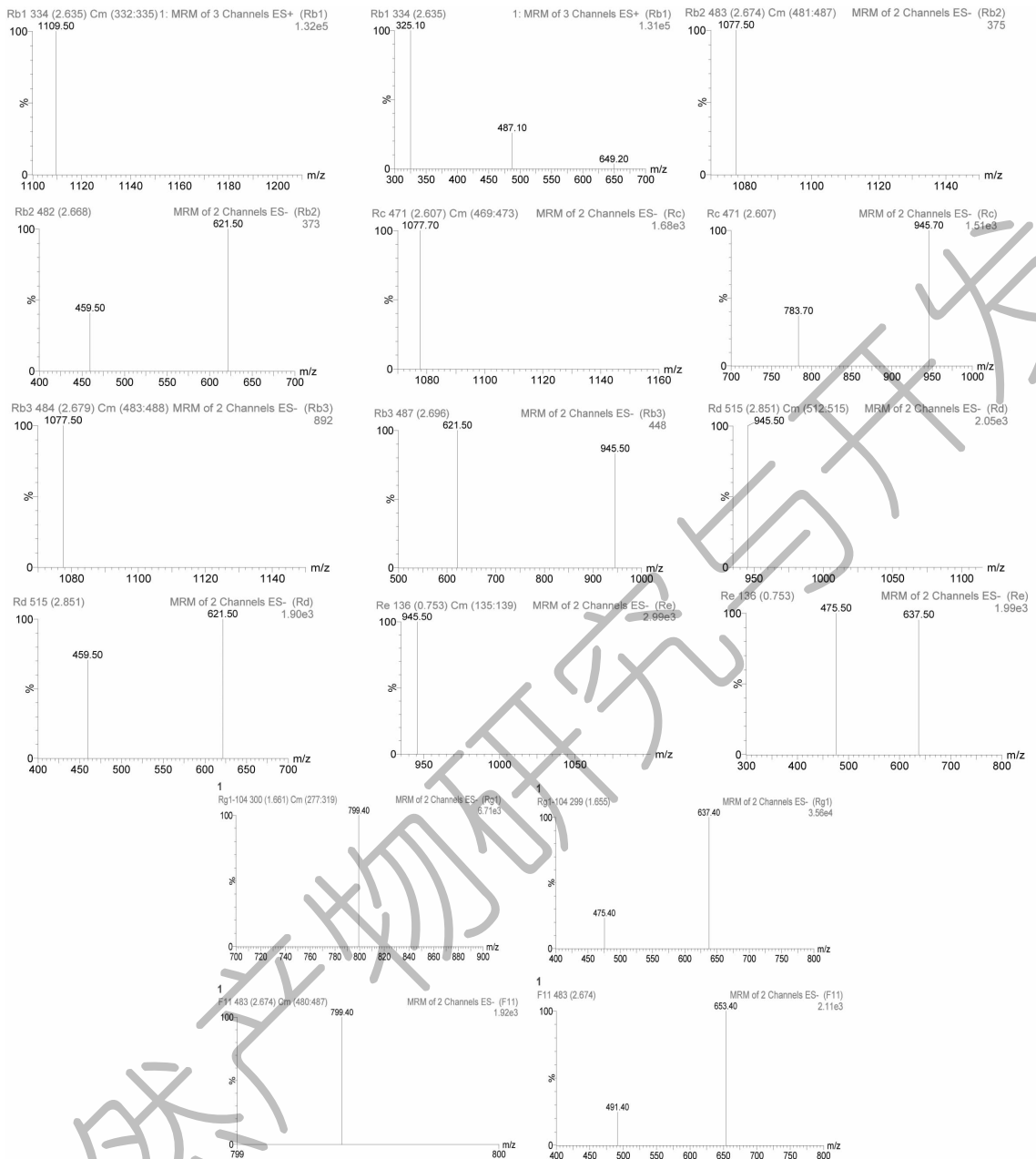


图 1 8 种检测化合物的母离子、子离子质谱图

Fig. 1 Representative extracted mass spectrum of multiple-reaction monitoring (MRM) chromatograms of 8 targeted compounds

醇分别制备含 2.14、1.10、1.32、1.19、1.13、1.29、1.08、1.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液。分别取不同体积的各储备液置于 10 mL 量瓶中逐级加甲醇溶液稀释,得到不同质量浓度的混合对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察

取 Re、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Rg₁、PF₁₁ 系列 QC 混合对照溶液。在上述分析条件下,进样 10 μL 测定。在选定的色谱及质谱条件下进样分析,以各物

质特征碎片离子峰面积为纵坐标,被测组分的浓度 (ng/mL) 为横坐标,得出线性方程,检测限的标准以信噪比 (s/n) 等于 3。

2.5.2 精密度试验

取 Re、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Rg₁、PF₁₁ 系列 QC 混合对照品溶液的低、中、高 3 种浓度的质控样品,按上述分析条件,每个浓度进行 5 样本分析,进样 10 μL ,在 1 d 内每间隔 2 h 测定一次此标准品以及在 3 d 内每间隔 24 h 测定一次此标准品。记录峰面

积,计算日间精密度的 RSD 值。

2.5.3 回收率试验

取 Re、Rb₁、Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Rg₁、PF₁₁ 系列 QC 样品的混合对照品溶液的低、中、高 3 种浓度的质控样品,每个浓度平行分 5 份测定,在上述分析条件下,进样 10 μL,以标准曲线计算 QC 样品的实测值,回收率 = C 实测/C 理论 × 100%。

2.5.4 重复性试验

取西洋参样品 5 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按上述测定条件测定各人参皂苷的含量,计算各人参皂苷的 RSD,考察方法的重复性。

2.5.5 稳定性试验

取同一批西洋参样品,按“供试品溶液的制备”

表 2 8 种检测化合物的校准曲线、线性范围和 LOD

Table 2 Calibration curves, linear ranges, LOQ and LOD of 8 targeted compounds

Analyte	Regression equation	Linear range (ng/mL)	r	LOD (ng/mL)
Ginsenoside Rb ₁	Y = 12.248X + 8.895	33.44 ~ 2140.0	0.9997	10.83
Ginsenoside Rb ₂	Y = 0.158X - 7.875	68.75 ~ 1100.0	0.9997	34.83
Ginsenoside Rb ₃	Y = 0.483X - 14.73	41.25 ~ 1320.0	0.9995	36.70
Ginsenoside Re	Y = 1.022X + 4.994	37.19 ~ 1190.0	0.9996	3.91
Ginsenoside Rc	Y = 0.879X - 2.463	35.31 ~ 1130.0	0.9997	6.55
Ginsenoside Rd	Y = 1.346X - 10.12	40.31 ~ 1290.0	0.9996	9.62
Ginsenoside Rg ₁	Y = 0.995X - 5.472	33.75 ~ 1080.0	0.9998	8.51
Pseudoginsenoside F ₁₁	Y = 1.425X - 0.791	32.19 ~ 1030.0	0.9996	2.66

3.2 精密度考察

一天内连续进样 5 次,及连续 3 d 测定,根据标准曲线计算浓度,其日内精密度和日间精密度 RSD 范围均在 0.21% ~ 4.77%,表明仪器精密度良好,见表 3。

3.3 稳定性试验

取本品按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、6、10、12 和 24 h 依法测定,根据标准曲线计算浓度,其 RSD 范围均在 1.04% ~ 3.35%,表明样品在 24 h 内稳定。

3.4 重复性试验

精密称取同一批西洋参样品 5 份,按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液 5 份,依法测定,计算 8 种分析物的含量,其 RSD 范围均在 1.78% ~ 3.21%,表明方法重复性良好。

3.5 回收率试验

精密吸取对照品高、中、低浓度的混合对照品溶液,按上述分析条件下,进样 10 μL,进行分析,以标

准曲线计算人参皂苷的实测值。8 种被测成分低、中、高 3 种浓度的加样回收率范围为 95.65% ~ 103.34%,RSD 为 0.38% ~ 4.33%,结果表明方法回收率良好,见表 3。

2.6 样品测定

精密称取西洋参药材粉末,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”、“2.2”项下测定条件下分别测定各人参皂苷成分的含量。

3 实验结果

3.1 线性关系的考察

标准曲线的制备以对照品进样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制曲线并进行线性回归,得回归方程。相关系数为 $r > 0.9995$,线性关系良好。

准曲线计算人参皂苷的实测值。8 种被测成分低、中、高 3 种浓度的加样回收率范围为 95.65% ~ 103.34%,RSD 为 0.38% ~ 4.33%,结果表明方法回收率良好,见表 3。

3.6 样品含量测定

精密称取同一批西洋参样品 5 份,按“供试品溶液的制备”项下方法制备供试品溶液。按上述分析条件测定,计算人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₁、拟人参皂苷 F₁₁ 含量,结果见表 4。

4 讨论与结论

根据 8 种分析物间的分离度和待测物的离子化程度,本试验对甲醇-水和乙腈-水两种流动相组成系统进行了考察,结果表明乙腈-水系统优于甲醇-水系统。为了提高各待测组分的分离度和检测灵敏度,分别考察了包括醋酸铵、甲酸、乙酸在内的流动相添加剂来选择最佳的流动相条件,结果表明,在流

表 3 8 种人参皂苷日内 ($n=5$) 和日间 ($n=9$) 精密度和回收率Table 3 Intra-day accuracy ($n=5$), inter-day accuracy ($n=9$) and recoveries of 8 targeted compounds

样品 Sample	检测浓度 Concentration (ng/mL)	日内 Intra-day RSD (%)	日间 Inter-day RSD (%)	回收率 Recovery (%)
人参皂苷 Rb ₁ Ginsenoside Rb ₁	33.44	3.13	2.82	100.35
	1070	2.49	2.2	102.58
	1712	2.11	1.69	98.15
人参皂苷 Rb ₂ Ginsenoside Rb ₂	68.75	4.77	4.23	104.78
	550	1.28	2.05	100.91
	880	2.66	2.32	103.09
人参皂苷 Rb ₃ Ginsenoside Rb ₃	41.25	2.56	4.13	102.24
	660	2.63	4.29	99.88
	1056	3.04	2.74	95.95
人参皂苷 Re Ginsenoside Re	37.19	2.19	2.85	100.88
	595	2.5	3.16	95.65
	952	0.21	2.43	103.05
人参皂苷 Rc Ginsenoside Rc	35.31	3.28	3.2	102.31
	565	3.33	4.55	96.35
	904	1.97	1.84	99.67
人参皂苷 Rd Ginsenoside Rd	40.31	4.28	3.93	98.49
	645	2.35	2.63	99.21
	1032	3	3.25	97.11
人参皂苷 Rg ₁ Ginsenoside Rg ₁	33.75	4.63	4.06	98.56
	540	0.86	0.79	102.17
	864	2.6	2.39	100.79
人参皂苷 Rg ₂ Ginsenoside Rg ₂	33.13	3.79	3.29	103.34
	530	3.57	2.9	99.35
	848	3.57	3.11	99.64
拟人参皂苷 F ₁₁ Pseudoginsenoside F ₁₁	32.19	4.11	3.62	98.96
	515	3.07	3.03	101.84
	824	0.56	0.51	99.57

表 4 西洋参中 8 种人参皂苷的平均含量 (Mesn ± SD, $n=5$)Table 4 Determination of 8 targeted compounds in *P. quinquefolium* (Mesn ± SD, $n=5$)

化合物 Compound	平均含量 Content (mg/g)
GinsenosideRe	14.54 ± 0.87
GinsenosideRd	7.71 ± 0.50
GinsenosideRb ₁	43.90 ± 1.23
GinsenosideRb ₂	6.24 ± 1.80
GinsenosideRb ₃	4.34 ± 0.65
GinsenosideRg ₁	1.71 ± 0.25
GinsenosideRc	2.72 ± 0.36
PseudoginsenosideF ₁₁	2.03 ± 0.28

动相中加入甲酸(0.1%)可以改善各待测组分的色谱峰形并提高各待测组分的灵敏度。故最终选择在流动相的水相中加入 0.1% 的甲酸,以提高各待测组分的灵敏度和离子化效率。

质谱条件的优化方面,分别将 8 种待测成分的对照品溶液以 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速通过针泵注入质谱仪中,通过调节解簇电压(DP)和碰撞能量(CE)值,根据离子的稳定性和灵敏度,选择分子离子峰和碎片离子峰。选择用于 MRM 模式监测的最佳离子对。同时优化待测物的母离子和子离子,大部分待测物的分子离子峰较稳定,分别在 ESI 正负模式检测 8 种待测物,人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₂、人参皂

苷 Rb₃、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₁、拟人参皂苷 F₁₁ 等 7 种皂苷类化合物在负离子模式下较灵敏,而人参皂苷 Rb₁ 适用于正离子模式。在 MRM 模式中,通过与对照品比较保留时间和监测离子对的信息,可以对各待测成分进行准确的色谱峰确证。

西洋参中主要的皂苷类成分为人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₁、拟人参皂苷 F₁₁。大量的研究表明,上述 8 种化合物为药材主要的功效成分,因此,本研究建立 UPLC-MS/MS 法同时测定西洋参中 8 种皂苷类成分,包括其特有成分拟人参皂苷 F₁₁ 的定量分析方法简便、快捷、准确,为综合评价西洋参的质量提供参考。

参考文献

- Li S L, Shen H, Zhu L Y, *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 Chromatogr A*, 2012, 1231:31-45.
- Liu Z, Li W, Li X, *et al.* Antidiabetic effects of malonylginsenosides from *Panax ginseng* on type 2 diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145:233-240.
- Wang W, Zhang X, Qin JJ, *et al.* Natural product ginsenoside 25-OCH₃-PPD inhibits breast cancer growth and metastasis through down-regulating MDM2. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41586.
- Zhang CX(张崇喜). Study ginseng on the chemical constituents from ginseng and American ginseng and Notoginseng. Changchun: Jilin Agricultural University(吉林农业大学), MSc. 2004.
- Park HW, In G, Kim JH, *et al.* Metabolomic approach for discrimination of processed ginseng genus (*Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*) using UPLC-QTOF MS. *J Ginseng Res*, 2014, 38(1):59-65.
- Mei CY(梅朝叶), Xiang WY(向文英), Yang W(杨武), *et al.* Simultaneous determination of six components in *Bletilla striata* by UPLC-MS/MS. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2016, 28:1233-1237.
- Hou JY(侯靖宇), Lu Y(陆苑), Pan J(潘洁), *et al.* Simultaneous determination of six components in *Inula cappa* by UPLC-MS. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2015, 27:1917-1921.
- Han HB(韩寒冰), Wang MY(王明阳), Ma C(马超), *et al.* Simultaneous determination of stilbene compounds in *Arachis duranensis* by HPLC-DAD and UPLC-MS/MS. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:699-703.
- Liu T(刘廷), Deng LQ(狄留庆), Peng LX(彭琳秀), *et al.* Simultaneous determination of 17 major components of Shuang-Huang-Lian Oral Liquid by UPLC-MS/MS. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2015, 22:3357-3363.
- Zhang CN(张晨宁), Yang GY(杨光义), Wei JB(魏晋宝), *et al.* Simultaneous determination of four lignans components in *Diphylleia sinensis* H. L. Li and *Dysosma versipellis* by UPLC-MS/MS. *J Chin Med Mater*(中药材), 2015, 12:2550-2553.
- Wang X, Sakuma T, Asafuadjaye E, *et al.* Determination of ginsenosides in plant extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS. *J Chin Mass*(质谱学报), 1999, 71:1579-1584.
- Ji QC, Harkey MR, Henderson GL, *et al.* Quantitative determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 2001, 12:320-326.
- (上接第 1491 页)
- Yin HS(殷海森), Zhao XY(赵新颖). Tumor treatment strategy based on Survivin. *J Second Milit Med Univ*(第二军医大学学报), 2016, 37:342-348.
- Xiong HX(熊辉霞), Chen BA(陈宝安), Ding JH(丁家华). Survivin in hematopoietic malignancies. *Chin J Exp Hematol*(中国实验血液学杂志), 2004, 12:866-869.
- Shehata HH, Abou Ghalia AH, Elsayed EK, *et al.* Detection of survivin protein in aqueous humor and serum of retinoblastoma patients and its clinical significance. *Clin Biochem*, 2010, 43:362-366.
- Carmthers KH, Metzger G, Choi E, *et al.* A therapeutic role for survivin in mitigating the harmful effects of ionizing radiation. *Sarcoma*, 2016:1830849.
- Vequaud E, Seveno C, Loussouarn D, *et al.* YM155 potentially triggers cell death in breast cancer cells through autophagy-NF-κB network. *Oncotarget*, 2015, 15:13476-13486.