

$J=7.8\text{ Hz}$, $\text{H-1}'$), $3.17(1\text{H}, \text{dd}, J=7.8, 9.0\text{ Hz}$, $\text{H-2}'$), $3.37(1\text{H}, \text{m}, \text{H-3}')$, $3.28(1\text{H}, \text{m}, \text{H-4}')$, $3.42(1\text{H}, \text{m}, \text{H-5}')$, $3.62(1\text{H}, \text{m}, \text{H-6a})$, $3.99(1\text{H}, \text{m}, \text{H-6b})$, $5.02(1\text{H}, J=2.4\text{ Hz}, \text{H-1}'')$, $3.91(1\text{H}, \text{d}, J=2.4\text{ Hz}, \text{H-2}'')$, $3.78(2\text{H}, \text{d}, J=9.6\text{ Hz}, \text{H-4}'')$, $3.59(2\text{H}, \text{s}, \text{H-5}'')$ 。 $^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz , $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$) δ $37.2(\text{C-1})$, $44.7(\text{C-2})$, $72.9(\text{C-3})$, $40.1(\text{C-4})$, $125.3(\text{C-5})$, $135.8(\text{C-6})$, $21.5(\text{C-7})$, $43.6(\text{C-8})$, $210.1(\text{C-9})$, $28.3(\text{C-10})$, $27.2(\text{C-11})$, $28.6(\text{C-12})$, $18.5(\text{C-13})$, $101.3(\text{C-1}')$, $73.7(\text{C-2}')$, $76.7(\text{C-3}')$, $70.4(\text{C-4}')$, $75.4(\text{C-5}')$, $67.3(\text{C-6}')$, $109.5(\text{C-1}'')$, $76.7(\text{C-2}'')$, $79.1(\text{C-3}'')$, $73.7(\text{C-4}'')$, $64.3(\text{C-5}'')$ 。综合数据与文献对照^[7], 鉴定该化合物为 7, 8-二氢- β -紫罗兰酮-3-O- β -D-芹糖 (1 $\rightarrow$ 6)-O- β -D-葡萄糖苷(大血藤苷 E, cuneataside E)。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 许 枬, 王 冰, 康廷国, 等. 酸浆化学成分研究[J]. 中草药, 2009, 40(2): 175-178
- [3] 杨燕军, 林洁红. 陆英化学成分的研究(I)[J]. 中药材, 2004, 27(7): 491-492
- [4] Mitsuura T, Kawai M, Nakashima R, *et al*. Bitter principles of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: Structure of physalin A [J]. *Tetrahedron*, 1969, 14: 1083-1086
- [5] Kawai M, Mitsuura T, Kyuno S, *et al*. A new physalin from *Physalis alkekengi*: structure of physalin L [J]. *Phytochemistry*, 1987, 26(12): 3313-3317
- [6] Bunsho M, Masao K I, Toichi O, *et al*. Structural revision of physalin H isolated from *Physalis angulata* [J]. *J Nat Prod*, 1995, 58(11): 1668-1674
- [7] Chang J, Case R. Phenolic glycosides and ionone glycoside from the stem of *Sargentodoxa cuneata* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66: 2752-2758

LC-ESI-MSⁿ 法鉴定心悦胶囊中西洋参皂苷类成分

杨 琳, 缪 宇, 殷惠军, 史大卓*, 陈可冀

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

摘要:目的 建立 LC-MS 法确定心悦胶囊的主要组成成分。方法 采用 LC-ESI-MS 负离子检测模式对心悦胶囊中的皂苷类成分进行分析, 通过与胶囊辅料提取物比较, 筛选胶囊的主要成分, 对其进行多级质谱裂解分析。以对照品及文献数据为对照, 通过对各成分的 MS² 谱图和 MS³ 谱图的解析对各成分进行指认。结果 从心悦胶囊中发现包括原人参二醇型、原人参三醇型和奥寇梯木醇型皂苷在内的 18 种人参皂苷类成分, 采用对照品对其中的 10 种成分进行了结构确证。结论 所建立的 LC-MSⁿ 法可同时奥寇梯隆型人参皂苷、原人参二醇型和原人参三醇型人参皂苷进行分析, 方法灵敏、快速、简单, 适用于心悦胶囊和西洋参皂苷类成分的分析 and 结构鉴定。

关键词: 西洋参皂苷; 心悦胶囊; LC-ESI-MSⁿ

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-1942-06

Identification of ginsenosides from *Panax quinquefolius* in Xinyue Capsula by LC-ESI-MSⁿ

YANG Lin, MIAO Yu, YIN Hui-jun, SHI Da-zhuo, CHEN Ke-ji

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To establish an LC-MS method for identification of the main components in Xinyue Capsula. **Methods** The main components in Xinyue Capsula were detected with the LC-ESI-MS in negative monitoring mode. These components were further analyzed by LC-MS² and MS³ spectra, and by comparing to the corresponding standards and the references, these components were elucidated. **Results** Eighteen major ginsenosides, which were belonging to protopanaxadiol, protopanaxatriol, and ocotillol type saponin, were found in Xinyue Capsula. With the corresponding reference substances, ten of the 18 components were demonstrated as ginsenoside Re, Rg₁, pseudoginsenoside F₁₁, ginsenoside Rg₂, Rc, Rb₂, Rb₃, Rd, F₂, and 20(S)-ginsenoside Rg₃. **Conclusion** The LC-MSⁿ method established in the pre-

收稿日期: 2010-02-22

作者简介: 杨 琳 E-mail: yln16@126.com

* 通讯作者 史大卓 E-mail: heartmail@263.net

sent study could simultaneously analyze various kinds of ginsenosides, which include ocotillol, protopanaxadiol, and protopanaxtriol type ginsenoside. This method is sensitive, rapid, and simple for analyzing and identifying the ginsenosides in Xinyue Capsula and *Panax quinquefolius*.

Key words: ginsenosides; Xinyue Capsula; LC-ESI-MSⁿ

心悅膠囊是以西洋參莖葉總皂苷(*Panax quinquefolius* saponin, PQS) 為原料藥的上市中藥製劑, 具有益氣養陰、和血之功效, 臨床用於氣陰兩虛冠心病心絞痛患者的治療, 具有較好的療效^[1]。PQS 是從五加科植物西洋參的莖和葉中提取得到的皂苷成分, 主要為人參皂苷類物質, 包括達瑪烷型(dammarane)[又分為原人參二醇型(protopanaxadiol)和原人參三醇型(protopanaxatriol)]、齊墩果烷型(oleanane)和奧寇梯木醇型(ocotillol)3 種類型的皂苷^[2]。雖然已往對西洋參莖葉中提取的皂苷類成分進行了研究^[3], 但臨床常用藥心悅膠囊的具體組成成分和藥效物質目前並不清楚。為了深入探討心悅膠囊的作用機制, 有必要對其成分進行系統的研究。

目前關於人參皂苷類成分的分析方法主要有 HPLC-DAD^[4]、HPLC-ELSD^[5] 和 LC-MS^[6] 等, 其中 LC-MS 技術集液相的高效分離和質譜的高靈敏度、定性專屬性強的特點, 在該領域中尤為多用。在人參皂苷的 LC-MS 分析測定中, APCI 源^[7] 和 ESI 源^[3, 6, 8] 是兩種常見的離子源, 而以 LC-ESI-MSⁿ 正離子檢測模式的報道最多。人參皂苷類尤其是原人參二醇型和原人參三醇型皂苷在 ESI-MS 正離子檢測模式下易同時形成 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰, 這就降低了二級質譜分析時母離子的濃度, 在一定程度上降低分析的靈敏度。本實驗採用 LC-ESI-MSⁿ 負離子檢測模式, 對中成藥心悅膠囊中的人參皂苷類成分進行了系統的分析, 流動相採用乙腈-水系統, 獲得了較好的分析效果。

1 材料與方法

1.1 儀器和材料: Finnigan LCQ Classic 離子阱液相色譜質譜聯用儀(美國 Thermo-Finnigan 公司), 包括 Finnigan SpectraSystem P4000 泵; Xcalibre 2.0 數據處理系統; Millipore Biocel 超純水處理系統。

甲醇、乙腈為色譜純(美國 Fisher 公司); 水為自製超純水(18.2 MΩ)。心悅膠囊由吉林益盛藥業股份有限公司提供; 人參皂苷 Rg₁、Re 和擬人參皂苷 F₁₁(pseudoginsenoside F₁₁) 對照品購自中國藥品生物制品檢定所, 人參皂苷 Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Rg₃、Rg₂、F₂ 購自天津一方科技有限公司, 質量分數均大

於 98%。

1.2 樣品製備

1.2.1 供試品溶液的製備: 取心悅膠囊 3 粒, 取內容物混勻。精密稱取內容物 300.0 mg(相當於 1 粒膠囊內容物的量), 加甲醇 15 mL, 密封, 室溫浸泡 15 min, 超聲提取 30 min 後, 離心(10 000 r/min)6 min, 分取上清液。精密吸取該上清液 10 μL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 搖勻, 取適量, 離心(10 000 r/min)6 min, 上清液作為供試品溶液。

1.2.2 空白對照溶液的製備: 精密稱取心悅膠囊輔料 241.2 mg(相當於 1 粒膠囊的輔料量), 加甲醇 15 mL, 按“1.2.1”項下方法操作, 得空白對照溶液。

1.2.3 人參皂苷混合對照品溶液的製備: 分別精密稱取人參皂苷 Rb₂、Rb₃、Rc、Rd、Re、Rg₁、Rg₂、Rg₃、F₂ 和擬人參皂苷 F₁₁ 適量, 加甲醇製成 200 μg/mL 的對照品溶液, 分別精密吸取各對照品溶液 25 μL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 搖勻, 取適量, 離心(10 000 r/min)6 min, 上清液作為人參皂苷混合對照品溶液(相當於各對照品的質量濃度為 500 ng/mL)。

1.3 色譜與質譜條件

1.3.1 液相色譜條件: 色譜柱為 Waters symmetry C₁₈(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 流動相為 A: 乙腈, B: 20% 乙腈-水, 梯度洗脫程序: 0~4 min, 0~13% A; 3~14 min, 13%~15% A; 14~24 min, 15%~30% A; 24~27 min, 30%~31% A; 27~37 min, 31%~42% A; 37~50 min, 42%~88% A; 50~60 min, 88% A。體積流量: 0.3 mL/min; 柱溫: 室溫; 進樣量: 10 μL。

1.3.2 質譜條件: ESI 源, 負離子檢測模式。掃描範圍: m/z 300~2 000。離子阱條件為噴霧電壓: 3.5 kV; 鞘氣(N₂): 4.137×10^5 Pa; 輔助氣(He): 6.895×10^4 Pa; 離子傳輸管溫度: 250 ℃; 離子傳輸管電壓: -35 V; 套管鏡頭電壓: -15 V。

2 結果

電噴霧電離(ESI) 屬於軟電離, 人參皂苷類成分在 ESI 源作用下, 不發生結構裂解而給出準分子離子峰, 從而得到化合物相應的相對分子質量信息。ESI-MSⁿ 能夠得到化合物的多級裂解質譜, 為化

物的结构解析提供丰富的信息。人参皂苷类成分的多级质谱裂解规律表明,在碰撞能的作用下,人参皂苷主要发生糖苷键的断裂,质谱给出失去一个或多个糖的次级苷和苷元的碎片离子。西洋参中的皂苷类成分依据其母核的不同,裂解形成的皂苷元主要为原人参二醇、原人参三醇和奥寇梯木醇,在 ESI (负离子) 检测模式下分别给出 m/z 459、475 和 491 的特征苷元碎片离子,这些离子可以作为皂苷类型鉴定的有利证据。图 1 分别给出了人参皂苷 Rd (原人参二醇型)、Re (原人参三醇型) 和拟人参皂苷 F₁₁ (奥寇梯隆型) 的 MS 谱图。

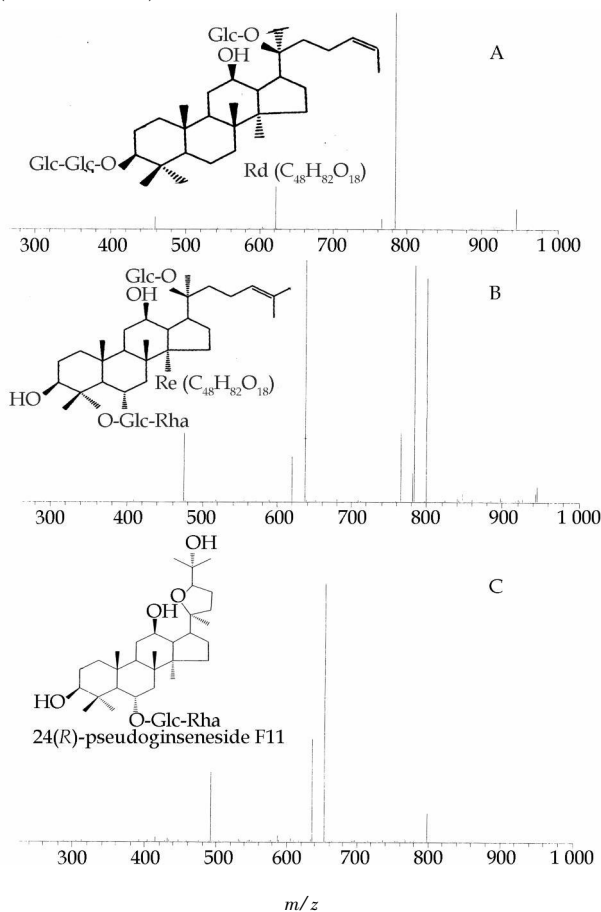


图 1 人参皂苷 Rd (A), 人参皂苷 Re (B) 和拟人参皂苷 F₁₁ (C) 的负离子质谱

Fig 1 Negative ion mass spectra of ginsenoside Rd (A), ginsenoside Re (B), and pseudoginsenoside F₁₁ (C)

2.1 样品的 LC-MS 分析: 取“1.2 样品制备”项下的空白、供试品及对照品溶液,按照上述液相和质谱条件分别进行 LG-MS 分析,得到各样品的总离子流色谱图 (TIC), 见图 2。与空白对照溶液相比,心悦胶囊供试品溶液的 TIC 谱图中出现了 16 个明显的色谱峰,按照出峰的先后顺序将其标示为 1~16, 保留时间见表 1。在 TIC 中,谱峰 1 给出 m/z 945

和 799 的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰,谱峰 12 给出 m/z 765、783 的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰,谱峰 2~11 和 13~16 依次给出 m/z 799、783、783、1 077、1 077、1 077、945、915、915、765、783、783、765 和 765 的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰。初步推断心悦胶囊中含有 18 个主要单体成分。

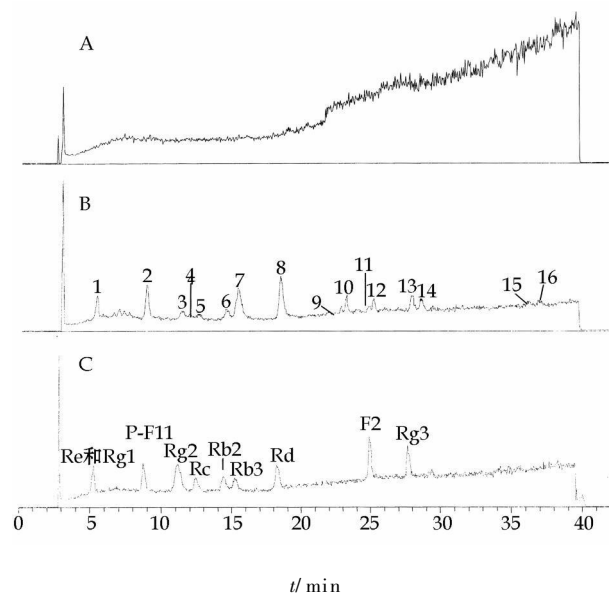


图 2 空白 (A), 心悦胶囊 (B) 和人参皂苷对照品混合物 (C) 在负离子模式下的总离子流色谱图

Fig 2 Total ion current chromatograms in negative from blank (A), Xinyue Capsule (B), and ginsenoside references mixture (C)

2.2 样品的 LG-MS² 及 LG-MS³ 分析: 为了确定各化合物的结构,对各准分子离子进行了 MS²,甚至 MS³ 裂解分析,表 1 中列出了各化合物 MS² 碎片离子。

保留时间为 5.27 min 的谱峰 1, 给出 $[M-H]^-$ 为 m/z 945 和 799 的准分子离子峰,表明谱峰 1 可能包含 2 个化合物。对 m/z 945 的 $[M-H]^-$ 准分子离子进行 MS 裂解分析,质谱给出了 m/z 799、783、765、637、619、475 的碎片离子; m/z 799 为母离子 m/z 945 失去 1 个脱水的鼠李糖基产生的碎片离子 $[M-(Rha-H_2O)-H]^-$, m/z 783 为 m/z 945 失去 1 个脱水的葡萄糖基得到的碎片离子 $[M-(Glc-H_2O)-H]^-$, m/z 765 为母离子失去 1 个脱水的葡萄糖基后再失去 1 个水得到的碎片离子 $[M-(Glc-H_2O)-H_2O-H]^-$, m/z 637 为母离子失去 1 个脱水的鼠李糖基和 1 个脱水的葡萄糖基产生的碎片离子 $[M-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)-H]^-$, m/z 619 对应于母离子失去 1 个脱水的鼠李糖基和 1 个脱水的葡萄糖基后再失去 1 个水产生的碎片离子 $[M-(Rha-H_2O)-(Glc-H_2O)-H_2O-H]^-$ 。

表 1 化合物 1~ 16 在 ESI 负离子检测模式中的 MS 光谱数据

Table 1 MS Spectra data of compounds 1– 16 in ESI negative ion monitoring mode

编号	t_R/min	化合物	$[M - H]^- (m/z)$		$MS^2 (m/z) (\%)$
1	5.27	人参皂苷 Re	945	945(8), 799(96), 783(100), 765(32), 637(94), 619(20), 475(38)	
		人参皂苷 R _{g1}	799	799(28), 637(100), 475(18)	
2	8.74	拟人参皂苷 F ₁₁	799	799(18), 653(100), 635(38), 491(22)	
3	11.21	G-R _{g2}	783	783(18), 637(100), 619(34), 475(70)	
4	11.81	G-R _{g2} 异构体	783	783(28), 637(100), 619(28), 475(64)	
5	12.37	G-Re	1 077	945(100), 915(70)	
6	14.38	Rb ₂	1 077	1 077(60), 945(100), 915(96), 783(68), 765(20)	
7	15.20	Rb ₃	1 077	1 077(22), 945(100), 915(32), 783(66), 765(14), 621(6), 603(4), 459(6)	
8	18.23	G-Rd	945	945(14), 783(100), 765(6), 621(20), 459(6)	
9	22.61	gypenoside IX	915	915(22), 783(100), 765(4), 753(8), 621(24), 603(2), 459(4)	
10	23.02	gypenoside IX isomer	915	915(2), 783(100), 765(2), 753(2), 621(32), 459(4)	
11	24.62	G-R _{g6}	765	765(10), 619(100), 601(32), 457(2)	
12	24.99	G-R _{g6} 异构体	765	765(6), 619(100), 601(24)	
		G-F ₂	783	783(10), 621(100), 459(26)	
13	27.73	G-R _{g3}	783	783(24), 621(100), 459(38)	
14	28.36	G-R _{g3} 异构体	783	783(24), 621(100), 459(44)	
15	35.88	Rk ₁	765	765(22), 603(100)	
16	36.61	R _{g5}	765	765(22), 603(100)	

$H_2O - H]^-$, m/z 475 对应于 m/z 945 失去 1 个脱水的鼠李糖基和 2 个脱水的葡萄糖基后生成的碎片离子 $[M - (Rha - H_2O) - 2(Glc - H_2O) - H]^-$, m/z 475 碎片离子的产生说明该人参皂苷为原人参三醇型皂苷。综合上述分析, m/z 945 的 $[M - H]^-$ 峰代表相对分子质量为 946、结构中含有 1 个鼠李糖和 2 个葡萄糖的原人参三醇型皂苷, 这与文献报道的人参皂苷 Re 的质谱数据相同^[7-8]。经与人参皂苷 Re 对照品质谱图(图 1-B)及 LC 保留时间(图 2-C)比较, 确定该化合物为人参皂苷 Re(G-Re)。

对谱峰 1 中 $[M - H]^-$ 为 m/z 799 的准分子离子进行 MS^2 裂解分析, 质谱给出了 m/z 637、475 的碎片离子峰, 分别对应于 $[M - (Glc - H_2O) - H]^-$ 和 $[M - 2(Glc - H_2O) - H]^-$, 说明该化合物为原人参三醇型皂苷, 结构中含有 2 个葡萄糖, 这与人参皂苷 R_{g1} 的结构相符^[7-8]。采用人参皂苷 R_{g1} 对照品在相同条件下进行分析, 结果与该化合物的 LC 保留时间及质谱数据一致, 故鉴定该化合物为人参皂苷 R_{g1}(G-R_{g1})。

保留时间为 8.74 min, $[M - H]^-$ 准分子离子为 m/z 799 的谱峰 2, MS 谱图给出 m/z 653、635、491 的碎片离子, 分别对应于 $[M - (Rha - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Rha - H_2O) - H_2O - H]^-$ 和 $[M - (Rha - H_2O) - (Glc - H_2O) - H]^-$, 说明化合物结构中含有 1 个鼠李糖和 1 个葡萄糖, 而 m/z 491 碎片的生成说明该化合物为奥寇梯木醇型皂苷。经与拟人参皂苷 F₁₁ 对照品质谱图(图 2-C)及 LC 保留时间比较, 确定该化合物为拟人参皂苷 F₁₁(P-F₁₁)。

保留时间为 11.21 和 11.81 min 的谱峰 3 和 4

均给出 m/z 783 的 $[M - H]^-$ 峰, MS 谱图也均给出 m/z 637、619 和 475 的碎片离子, 见表 1, 说明谱峰 3 和 4 代表的化合物互为同分异构体。 m/z 637 的碎片离子为母离子 m/z 783 失去 1 个脱水的鼠李糖基产生的碎片离子, 该离子进一步脱去 1 个 H_2O 后产生 m/z 619 的碎片离子。 m/z 475 的碎片离子为母离子 m/z 783 失去 1 个脱水的鼠李糖基和 1 个脱水的葡萄糖基产生的碎片离子, 该离子的产生说明谱峰 3 和 4 代表的化合物均为原人参三醇型皂苷。综上所述, 谱峰 3 和 4 代表相对分子质量为 784、结构中含有 1 个鼠李糖和 1 个葡萄糖的原人参三醇型皂苷。查阅相关文献, 迄今为止, 从西洋参(包含根、茎、叶、花、果实)中发现的人参皂苷类化合物相对分子质量为 784 的仅有 4 种, 分别为人参皂苷 R_{g2}、G-F₂、20(S)-R_{g3} 和 20(R)-R_{g3}^[9-10], 后 3 者均属于原人参二醇型皂苷, 仅有人参皂苷 R_{g2} 属于原人参三醇型皂苷, 且结构中含有 1 个葡萄糖和 1 个鼠李糖。采用人参皂苷 R_{g2} 对照品进行分析比较, 结果 G-R_{g2} 的 LC 保留时间及质谱数据与谱峰 3 一致, 故鉴定谱峰 3 为人参皂苷 R_{g2}(G-R_{g2})。谱峰 4 与谱峰 3 的 MS 谱图极为相似, 且 LC 保留时间非常接近, 无法完全分离, 与文献^[11]比较, 初步推测谱峰 4 为人参皂苷 R_{g2} 的异构体 20(R)-ginsenoside R_{g2}(G-R_{g2} isomer), 结构有待于进一步确证。

保留时间为 12.37、14.38 和 15.20 min 的谱峰 5、6 和 7, 均给出 m/z 1 077 的 $[M - H]^-$ 峰, 是互为同分异构体的 3 个化合物。谱峰 5 的 MS 谱图中碎片离子信号强度非常低, 仅给出 m/z 945 和 915 的

碎片离子,未能得到苷元的离子信息。 m/z 945 为母离子失去 1 个脱水的五碳糖基(Ara 或 Xyl)后生成的碎片离子, m/z 915 为母离子失去 1 个脱水的葡萄糖基所得到的碎片离子,数据说明该化合物分子中至少含有 1 个五碳糖和 1 个葡萄糖。谱峰 6 的 MS^2 谱图给出 m/z 945、915、783 和 765,分别对应于碎片离子 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Glc - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - (Glc - H_2O) - H]^-$ 和 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - (Glc - H_2O) - H_2O - H]^-$,说明该化合物是相对分子质量为 1 078,结构中含有 1 个五碳糖和至少 1 个葡萄糖的皂苷,但 MS 谱图未能得到苷元信息。谱峰 7 的 MS^2 谱图给出 m/z 945、915、783、765、621、603 和 459,分别对应于碎片离子 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Glc - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - (Glc - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - (Glc - H_2O) - H_2O - H]^-$ 、 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - 2(Glc - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - 2(Glc - H_2O) - H_2O - H]^-$ 和 $[M - (Ara/Xyl - H_2O) - 3(Glc - H_2O) - H]^-$, m/z 459 的苷元离子碎片的生成,说明该化合物为原人参二醇型皂苷,谱峰 7 代表相对分子质量为 1 078,结构中含有 1 个五碳糖和 3 个葡萄糖的原人参二醇型皂苷。虽然谱峰 5、6 和 7 的质谱数据相似,但由于它们的 LC 保留时间不同,它们的极性不同。与文献比较^{3,7]},推测谱峰 5、6 和 7 分别为人参皂苷 Rc、Rb₂ 和 Rb₃。采用人参皂苷 Rc、Rb₂ 和 Rb₃ 对照品相同条件下进行分析(见图 2 C),数据与推测结果一致。谱峰 5、6 和 7 分别为人参皂苷 Rc(G-Rc)、Rb₂(G-Rb₂)和 Rb₃(G-Rb₃)。

保留时间为 18.23 min 的谱峰 8,准分子离子峰 $[M - H]^-$ 为 m/z 945,MS 谱图给出 m/z 783、765、621 和 459 的碎片离子,分别对应于碎片离子 $[M - (Glc - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Glc - H_2O) - H_2O - H]^-$ 、 $[M - 2(Glc - H_2O) - H]^-$ 和 $[M - 3(Glc - H_2O) - H]^-$,说明该化合物为相对分子质量为 946,结构中含有 3 个葡萄糖的原人参二醇型皂苷。经与文献比较^{7]},推测其为人参皂苷 Rd。采用 Rd 对照品对照,质谱数据及 LC 保留时间与该化合物一致,鉴定谱峰 8 为人参皂苷 Rd(ginsenoside Rd)。

保留时间为 22.61 和 23.02 min 的谱峰 9 和 10,LC-MS 谱图给出 m/z 915 的 $[M - H]^-$ 峰,MS 谱图均给出 m/z 783、765、753、621、603 和 459 的碎片离子,分别对应于母离子失去 1 个脱水的五碳糖

基、失去 1 个脱水的五碳糖基和 1 个水、失去 1 个脱水的葡萄糖、失去 1 个脱水的五碳糖和 1 个脱水的葡萄糖、失去 1 个脱水的五碳糖和 1 个脱水的葡萄糖后再失去 1 个水、失去 1 个脱水的五碳糖和 2 个脱水的葡萄糖基产生的碎片离子,说明它们均为结构中含有 1 个五碳糖和 2 个葡萄糖的原人参二醇型皂苷。经与文献对照^[12],推测谱峰 9 和 10 为 gypenoside IX 和 gypenoside IX 的异构体。

保留时间为 24.62 min 的谱峰 11,LC-MS 谱图给出 m/z 765 的 $[M - H]^-$ 峰。谱峰 11 的 MS 谱图给出 m/z 619、601 和 457 的碎片离子,分别对应于碎片离子 $[M - (Rha - H_2O) - H]^-$ 、 $[M - (Rha - H_2O) - H_2O - H]^-$ 、 $[M - (Rha - H_2O) - (Glc - H_2O) - H]^-$,说明化合物结构中含有 1 个鼠李糖和 1 个葡萄糖, m/z 457 的碎片离子的产生,说明该化合物的母核比原人参二醇多 1 个不饱和度。为了进一步确证母核的碎片离子,对二级质谱中产生的 m/z 619 $[M - (Rha - H_2O) - H]^-$ 进行了 MS^3 裂解分析,并证实 m/z 619 进一步裂解后的子离子为 m/z 457。综合目前关于西洋参的化学成分研究结果,推测该化合物为人参皂苷 Rg₆(G-Rg₆)^[8,13]。

保留时间为 24.99 min 的谱峰 12,LC-MS 谱图给出 m/z 765 和 783 的 $[M - H]^-$ 峰,该谱峰中包含 2 个未分开的化合物。对 m/z 765 的准分子离子进行二级 MS 分析,结果 MS 谱图给出 m/z 619 和 601 的碎片离子,质谱数据与 G-Rg₆ 相似,以 m/z 619 为二级母离子对其进行 MS^3 裂解分析,但未得到满意的子离子碎片。与文献对照^[11],推测谱峰 12 为 G-Rg₆ 的同分异构体(G-Rg₆ isomer),结构有待于进一步确定。

对谱峰 12 中 $[M - H]^-$ 为 m/z 783 的化合物进行 MS^2 分析,在碰撞能的作用下, m/z 783 给出了 m/z 621 $[M - (Glc - H_2O) - H]^-$ 和 m/z 459 $[M - 2(Glc - H_2O) - H]^-$ 碎片离子,说明该化合物为结构中含有 2 个葡萄糖的原人参二醇型皂苷。目前关于西洋参化学成分的研究表明^[8,9],符合该质谱裂解规律的人参皂苷有 20(S)-Rg₃、20(R)-Rg₃ 和 G-F₂ 3 种,但这 3 种成分的极性不同,人参皂苷 F₂ 的极性较小^[9],通过分析比较,初步推测谱峰 12 中 m/z 783 的化合物可能为人参皂苷 F₂。采用人参皂苷 F₂ 对照品在相同条件下进行分析,结果表明 G-F₂ 与该化合物的 LC 保留时间及质谱数据一致,鉴定该化合物为人参皂苷 F₂(G-F₂)。

保留时间为 27.73 和 28.36 min 的谱峰 13 和

14, 准分子离子 $[M - H]^-$ 均为 m/z 783, 相应的 MS 谱图均给出 m/z 621 $[M - (Glc - H_2O) - H]^-$ 和 459 $[M - 2(Glc - H_2O) - H]^-$ 碎片离子, 质谱裂解规律均与 $G-F_2$ 相同, 经与文献比较^[7, 8, 14], 推测这两个化合物分别为 20(*S*)- $G-Rg_3$ 和 20(*R*)- $G-Rg_3$ 。采用 20(*S*)- $G-Rg_3$ 对照品进行比较, 20(*S*)- $G-Rg_3$ 与谱峰 13 代表的化合物的 LC 保留时间及 MS 谱图数据一致, 故鉴定 13 为 20(*S*)- $G-Rg_3$ 。谱峰 14 为其异构体 20(*R*)- $G-Rg_3$ 。

保留时间为 35.88 和 36.61 min 的谱峰 15 和 16 均给出 m/z 765 的 $[M - H]^-$ 准分子离子, 它们的 MS² 谱图均仅给出 m/z 603 $[M - (Glc - H_2O) - H]^-$ 碎片离子, 说明化合物结构中均含有 1 个葡萄糖, 与文献^[11] 对照, 初步推测其分别为人参皂苷 Rk_1 ($G-Rk_1$) 和 Rg_5 ($G-Rg_5$)。由于化合物在样品中的量较低, 未能得到满意的 MS³ 谱图数据, 这两个化合物的结构有待于进一步的确定。

3 讨论

本实验首次采用 LC-MSⁿ 联用技术分析了中成药心悅胶囊中主要的皂苷类成分。通过与胶囊辅料提取物的总离子流谱图比较, 发现了胶囊提取物中的 18 个主要的皂苷类成分, 与文献报道的质谱数据和液相保留时间比较, 将其依次鉴定为 $G-Re$ 、 $G-Rg_1$ 、 $P-F_{11}$ 、 $G-Rg_2$ 、 $G-Rg_2$ isomer、 $G-Rc$ 、 $G-Rb_2$ 、 $G-Rb_3$ 、 $G-Rd$ 、gypenoside IX、gypenoside IX isomer、 $G-Rg_6$ 、 $G-Rg_6$ isomer、 $G-F_2$ 、20(*S*)- $G-Rg_3$ 、20(*R*)- $G-Rg_3$ 、 $G-Rk_1$ 和 $G-Rg_5$, 并采用 $G-Re$ 、 $G-Rg_1$ 、 $P-F_{11}$ 等 10 个对照品对相应的成分进行了确证。本实验发现的这 18 个皂苷类成分为心悅胶囊的主要组成成分。

心悅胶囊中的皂苷类成分以原人参二醇型皂苷居多, 包括 $G-Rd$ 、 $G-Rb_2$ 、 $G-Rb_3$ 、 $G-Rg_3$ 、 $G-Rg_3$ isomer、 $G-F_2$ 、gypenoside IX 和 gypenoside IX isomer, 而 $G-Rd$ 、 $G-Rb_3$ 、 $G-Rb_2$ 和奥寇梯木醇型皂苷 $P-F_{11}$ 在胶囊中的量相对较高, 推测它们为心悅胶囊的主

要药效物质。人参皂苷 Rb_1 在胶囊中的量相对较少, 未能给出理想的 LG-MS 及 MS² 谱图, 这与文献报道的“ $G-Rb_1$ 在西洋参茎、叶中的含量低”的结果一致^[4]。

本研究建立了心悅胶囊中主要皂苷类成分的快速、准确的 LG-MSⁿ 分析方法, 首次阐明了胶囊中的主要皂苷类成分的结构, 为心悅胶囊的药效物质基础研究提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 王苏平. 二类新药产自废弃西洋参茎叶 [J]. 中国社区医师, 2005, 7(21): 83
- [2] 梦祥颖, 任跃英, 李向高, 等. 西洋参中皂苷类成分的研究综述 [J]. 特产研究, 2001, (3): 43-47
- [3] Ligor T, Ludwiczuk A, Wolski T, *et al*. Isolation and determination of ginsenosides in American Ginseng leaves and root extracts by LG-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383: 1098-1105
- [4] 许传莲, 郑毅勇, 崔淑玉, 等. RP-HPLC 法测定西洋参茎叶中 6 种人参皂苷的含量 [J]. 吉林农业大学学报, 2002, 24(3): 50-52
- [5] 赵岩, 刘金平, 卢丹, 等. 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定西洋参和西洋红参中人参皂苷的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1956-1958
- [6] Wan X M, Sakuma T, Asafu Adjaye E, *et al*. Determination of ginsenosides in plant extracts from *panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS [J]. *Analy Chem*, 1999, 71(8): 1579-1584
- [7] Ma X Q, Xiao H B, Liang X M. Identification of ginsenosides in *Panax quinquefolium* by LG-MS [J]. *Chromatographia*, 2006, 64(1-2): 31-36
- [8] 张海江, 蔡小军, 程翼宇. 高效液相色谱-电喷雾质谱法鉴别人参、西洋参和三七的皂苷提取物 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(5): 391-394
- [9] Besso H, Kasai R, Wei J X, *et al*. Further studies on dammarane saponins of American ginseng, roots of *Panax quinquefolium* L [J]. *Chem Pharm Bull*, 1982, 30(12): 4534-4538
- [10] 李亚萍, 郝秀华, 李钺. 西洋参果中配糖体成分的研究 [J]. 中草药, 1999, 30(8): 563-565
- [11] 王占良, 王弘, 陈世忠. 高效液相色谱-二极管阵列检测/质谱法分析生脉饮煎剂中的人参皂苷类成分 [J]. 色谱, 2006, 24(4): 325-330
- [12] 王金辉, 李钺. 加拿大产西洋参茎叶的化学研究(I) 十一种三萜皂苷的分离和鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 1997, 7(2): 130-132
- [13] Dou D Q, Li W, Guo N, *et al*. Ginsenoside Rg_8 , a new dammarane-type triterpenoid saponin from roots of *Panax quinquefolium* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(5): 751-753
- [14] 苏健, 李海舟, 杨崇仁. 吉林产西洋参的皂苷成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 830-833