

高效液相色谱-电喷雾质谱联用分析红参与五味子配伍机制

张宪臣^{1,2}, 张旭¹, 陈光³, 刘志强^{1*}, 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022; 2. 中山市出入境检验检疫局, 广东 中山 528400;

3. 吉林农业大学生物技术学院, 吉林 长春 130118)

摘要:目的 研究红参与五味子配伍过程中人参皂苷类化合物的变化机制。方法 采用高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术对红参与五味子5种配伍比例水煎液中人参皂苷的变化进行了研究。结果 在五味子量较少的条件下,红参与五味子水煎液中人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 发生水解。随着五味子量的增加,人参皂苷 R_o 的量发生减少,而人参微量次级皂苷 F₂ 的量显著增加。结论 红参与五味子配伍后产生的特殊药效可能与两者配伍过程中人参皂苷 F₂ 的量显著增加有关。

关键词:红参; 五味子; 人参皂苷; 高效液相色谱-电喷雾质谱

中图分类号:R286.02 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2007)01-0041-03

Analysis of compatibility mechanism of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis* by HPLC-ESI-MS

ZHANG Xian-chen^{1,2}, ZHANG Xu¹, CHEN Guang³, LIU Zhi-qiang¹, LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;

2. Zhongshan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhongshan 528400, China;

3. College of Biotechnology, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China)

Abstract: Objective To study the reaction mechanism of ginsenosides in compatibility of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis*. **Methods** Five different compound decoctions of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis* were analyzed by HPLC-ESI-MS. **Results** Ginsenoside Rg₁, Re, Rb₁, Rc, Rb₂, and Rd in water decoction of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis* were hydrolyzed at a little content of *Fructus Schisandrae Chinensis* added. With the increasing content of *Fructus Schisandrae Chinensis*, the content of ginsenoside R_o decreased but the content of ginsenoside F₂ increased significantly. **Conclusion** The obvious increasing of ginsenoside F₂ could be responsible for the special effect of compatibility of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis*.

Key words: *Radix Ginseng Rubra*; *Fructus Schisandrae Chinensis*; ginsenoside; high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS)

红参是鲜人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根及根茎经蒸制加工而成,有滋补强壮之功效,同人参相比其药效比较缓和。人参皂苷为红参中主要的有效成分。五味子是木兰科五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的果实,具有补气、肺,养心、肝之功效。传统的中医理论多把红参与五味子配伍使用。二者合用对心神不安,惊悸失眠、健忘均有作用^[1]。目前文献多从药理方面对二者配伍机制进行研究^[2]。高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术(HPLC-ESI-MS)是近年来发展起来的天然产物有效成分定性定量分析的强有力的工具。其既具备了

高效分离性能又具备强大的结构解析能力,能够快速地对混合物成分进行定性和定量分析^[3~7]。本实验以人参皂苷类化合物为研究对象,采用 HPLC-ESI-MS 方法,在负离子条件下对红参与五味子配伍导致红参中皂苷类化合物的变化进行了深入研究^[2~5]。

1 仪器与试剂

美国 Waters600LC 高效液相色谱系统, ALLtech2000 型 ELSD 检测器, Agilent 1100 Series 自动进样器; FinniganMAT 公司 LCQTM 离子阱多级串联质谱仪,配有 ESI 源及 LCQ1.2 数据处理系

收稿日期:2006-06-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20173057);中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213-06);吉林省科学技术厅科技发展计划项目(20011109);长春市科学技术局科技计划项目(2004233)

* 通讯作者 刘志强 E-mail:liuzq@ciac.jl.cn

统;MODEL E-900 型酸度仪(上海理达仪器厂)。

红参是五加科植物人参 *P. ginseng* C. A. Mey. 根的炮制品,购自吉林抚松参场,人参皂苷 Rg₁ 和 Re 总量不少于 0.25%,粉碎过 100 目筛;五味子为木兰科植物五味子 *S. chinensis* (Tur-cz.) Baill. 的干燥成熟果实,产自内蒙古,五味子乙素的量不少于 0.125%,捣碎过 40 目筛;均经长春中医药大学王淑敏教授鉴定。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),水为超纯水(18.2 MΩ·cm),其他试剂均为分析纯,人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd、Ro、F₂ 对照品质量分数均在 95%以上,由吉林大学药学院提供。

2 方法与结果

2.1 红参单煎液的制备:精密称取红参 5 g,加 100 mL 水浸泡 30 min,回流提取两次,每次 2 h,上清液在 3 000 r/min 的条件下离心 10 min,合并离心后的上清液,浓缩至 100 mL,加 95%乙醇使浓缩液含乙醇达到 80%,静置过夜,滤过,滤液浓缩,定容至 15 mL 量瓶中,即得。

2.2 红参与五味子共煎液的制备:精密称取红参 5 g,分别加入不同配伍剂量(2、4、8、11、15 g)的五味子,加 100 mL 水浸泡 30 min,同 2.1 项下方法操作,即得。

2.3 色谱条件:Diamondsil™ C₁₈不锈钢色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);检测器条件设为 Temp: 90 °C;Gas flow:2.1 L;Gain:1;Impactor:Off,进样量:10.0 μL;流动相:乙腈-0.2%醋酸水溶液线性梯度洗脱:0~2 min(25:75),3~50 min(50:50);体积流量:0.5 mL/min;柱温:35 °C。理论塔板数以人参皂苷 Rb₁ 计,应不低于 10 000。

2.4 质谱条件:喷雾电压 4.3 kV,金属毛细管温度 260 °C,金属毛细管电压为-20 V,鞘气为 N₂,其压力为 680 kPa,辅助气体为 He,其压力为 100 kPa。分析条件采用负离子模式,扫描范围为:m/z 200~1 500。

2.5 红参单煎液的 HPLC-ESI-MS 分析结果:未加

入五味子的红参单煎液的色谱图见图 1。通过液质联机鉴定人参皂苷峰。以峰 6 为例,m/z 955 离子是峰 6 所代表的人参皂苷的准分子离子[M-H]⁻,可以初步推测它的相对分子质量为 956,进行 ESI-MS² 研究,见图 2。可以观察到 m/z 793 的碎片离子峰,对应 m/z 955 离子丢失一分子六碳糖基。人参中只有齐墩果酸型人参皂苷 Ro 与以上数据相符,用对照品相对照可以确定峰 6 是人参皂苷 Ro。用相同的方法通过液质联机分析各峰相对应的人参皂苷,结果见表 1。结果显示,峰 1 表示两种人参皂苷,相对分子质量分别为 800、946,通过源内 CID 产生的碎片离子分析,两种皂苷均产生了 m/z 475 的碎片离子,因此初步判断这两种人参皂苷为人参三醇型皂苷。通过液相色谱化合物的保留时间和相对分子质量可证实这两种皂苷为人参皂苷 Rg₁、Re。

2.6 红参与五味子配伍的 HPLC-ESI-MS 分析结果:红参单独煎煮和加入五味子共同煎煮,水溶液的 pH 值有明显的变化,见表 2。结果表明,随着五味子

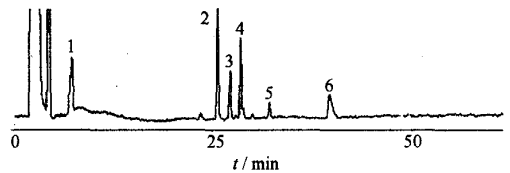


图 1 红参单煎液的 LC-ELSD 色谱图

Fig. 1 LC-ELSD Chromatogram of Radix Ginseng Rubra single decoction

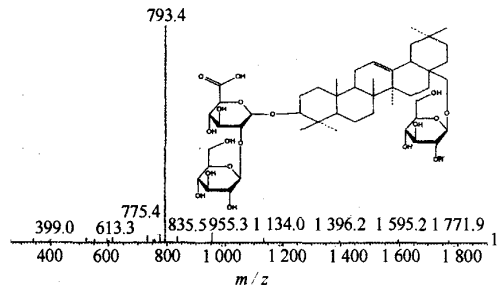


图 2 色谱峰 6 的 ESI-MS² 质谱图

Fig. 2 ESI-MS² Spectrum of peak 6

表 1 人参皂苷的液质联机数据

Table 1 Data of ginsenosides by HPLC-ESI-MS

色谱峰序号	t _R /min	峰面积	分子离子峰 m/z 数据	源内 CID m/z 数据
1	7.433	2 0989 75	799 945	637[M-Glc-H] ⁻ , 475[M-Glc-H] ⁻ , 799[M-Rha-H] ⁻ , 783[M-Glc-H] ⁻ , 637[M-Glc-Rha-H] ⁻ , 475[M-2Glc-Rha-H] ⁻
2	25.667	2 018 870	1 107	945[M-Glc-H] ⁻ , 783[M-2Glc-H] ⁻ , 621[M-3Glc-H] ⁻ , 459[M-4Glc-H] ⁻
3	27.233	1 048 905	1 077	945[M-Ara(f)-H] ⁻ , 783[M-Ara(f)-Glc-H] ⁻ , 621[M-Ara(f)-2Glc-H] ⁻ , 459 [M-Ara(f)-3Glc-H] ⁻
4	28.409	1 416 567	1 077	945[M-Ara(f)-H] ⁻ , 783[M-Ara(f)-Glc-H] ⁻ , 621[M-Ara(f)-2Glc-H] ⁻ , 459 [M-Ara(f)-3Glc-H] ⁻
5	32.250	377 928	945	783[M-Glc-H] ⁻ , 621[M-Glc-H] ⁻ , 459[M-3Glc-H] ⁻
6	39.767	1 136 799	955	793[M-Glc-H] ⁻

量的增加,红参与五味子共煎液的 pH 值呈下降趋势。与红参单独煎煮不同,加入五味子后溶液中的人参皂苷种类减少,且有新的人参皂苷生成,见图 3。由液质联机数据可知,峰 1 是齐墩果酸型人参皂苷 Ro,峰 2 是一种新出现的皂苷。峰 2 化合物在 HPLC-MS 一级谱中的准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 783, MS² 谱图(图 4)中,产生两个碎片离子 m/z 621、459。其中 m/z 621 碎片离子是 m/z 783 离子丢失一个六碳糖基而产生的, m/z 459 碎片离子是 m/z 783 离子丢失两个六碳糖基而产生的, m/z 459 碎片离子的生成表明峰 2 化合物是人参二醇型皂苷。通过液相色谱化合物的保留时间和相对分子量可证实这种皂苷为人参皂苷 F₂。不同比例的红参与五味子共煎液的 HPLC 参数见表 3。

表 2 红参单煎液及红参与五味子共煎液的 pH 值

Table 2 pH Value of *Radix Ginseng Rubra* single decoction and compound decoction of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis*

样品	pH 值
红参单煎液	5.61
红参-五味子(5:2)	4.40
红参-五味子(5:4)	4.11
红参-五味子(5:8)	3.79
红参-五味子(5:11)	3.61
红参-五味子(5:15)	3.50

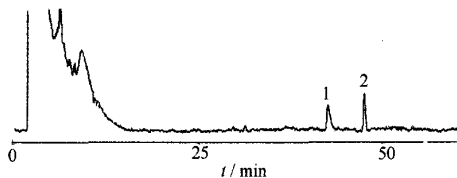


图 3 红参与五味子共煎液(5g:15g)的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 3 HPLC-ELSD Chromatogram of compound decoction of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis*

3 讨论

五味子对红参与五味子共煎液的 pH 值有显著影响,随着五味子质量的增加,共煎液的 pH 值呈下降趋势,酸性逐步增强。在五味子质量较少的条件下(红参与五味子的质量比为 5:2),人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 全部消失,人参皂苷 Ro 的量也有所减少,与此同时有少量次级人参皂苷 F₂ 出现;随着五味子质量的进一步增加,人参皂苷 Ro 的量进一步减少,而次级人参皂苷 F₂ 的量显著增加。红参与五味子所产生的特殊药效可能与人参皂苷 F₂ 的量显著增加有关。

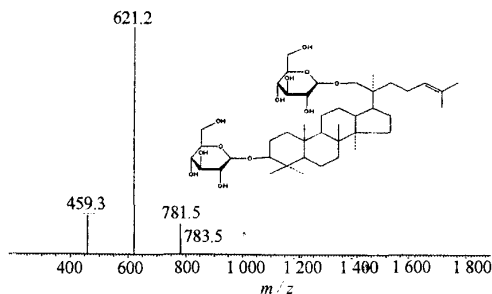


图 4 色谱峰 2 的 ESI-MS² 质谱图
Fig. 4 ESI-MS² Spectrum of peak 2

表 3 不同比例的红参与五味子共煎液 LC-ELSD 色谱参数
Table 3 LC-ELSD Parameters of compound decoction of *Radix Ginseng Rubra* with *Fructus Schisandrae Chinensis* in various proportions

红参与五味子 质量比	峰 1		峰 2	
	t _R /min	峰面积	t _R /min	峰面积
5:2	43.56	1 066 120	47.65	237 343
5:4	42.40	797 285	47.3	697 151
5:8	43.60	685 332	47.4	1 568 213
5:11	43.15	580 058	48.00	21 152 219
5:15	42.11	104 959	47.27	26 348 020

初步分析认为红参中的人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd 的消失,可能与溶液酸性较强有关,加入五味子后溶液的 pH 值呈酸性,人参皂苷在酸性条件下易水解生成小分子的皂苷,人参皂苷 F₂ 可能就是相对分子质量较大的二醇型皂苷的水解产物。其他二醇型和三醇型相对分子质量较小的皂苷没有在 HPLC 图谱中显现出来,可能是因为一般相对分子质量较小的皂苷的水溶性不好,在水溶液中生成沉淀,这些需要进一步的实验证明。

References:

- [1] Huang T K, Shi C. *Chinese Patent Medicine* (中成药学)[M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1994.
- [2] Wang P J, Zheng Q S. Influence of combination of *Schisandra chinensis* with ginseng on brain protein and nucleic acid in mice and analysis of compatibility [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2000, 6(3): 19-22.
- [3] Liu S Y, Cui M. Structural analysis of saponins from medicinal herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Articles*, 2004, 15: 133-141.
- [4] Guo J F, Zhong D F, Qiao S Y. Analysis of ginsenosides by Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc* (质谱学报), 2003, 24(4): 477-481.
- [5] Qin C, Harkey M R, Henderson G L. Quantitative determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2001, 12: 320-326.
- [6] Li L, Liu C M, Wu W, et al. Analysis of saponins in extract of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33(3): 1087-1090.
- [7] Xiao S Y, Luo G A. Chemical reaction of ginsenosides in red ginseng processing by HPLC/MS/MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(1): 40-43.