

西洋参花蕾中人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd 的含量测定

刘 鹏, 王士伟, 夏广萍*

天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 建立运用超高效液相色谱-串联四级杆质谱联用技术同时测定西洋参花蕾中 4 种皂苷类成分 (人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd) 含量的分析方法。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 以乙腈和 0.05% 氨水为流动相进行梯度洗脱; 体积流量为 0.45 mL/min; 柱温 35 °C; 采用电喷雾离子源 (ESI) 负离子检测方式, 多反应监测模式 (MRM)。**结果** 该分析方法的精密度、稳定性、重复性和加样回收率考察结果均符合要求, 各对照品在相应的浓度范围内, 线性关系良好。**结论** 建立的方法快速, 简便, 准确度高, 可靠性强, 可用于西洋参花蕾中皂苷类成分的分析。

关键词: 西洋参; 花蕾; 人参皂苷 Re; 拟人参皂苷 F₁₁; 人参皂苷 Rb₃; 人参皂苷 Rd; 超高效液相色谱-串联四级杆质谱
中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)17-4144-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.027

Determination of ginsenoside Re, pseudo-ginsenoside F₁₁, ginsenoside Rb₃, and ginsenoside Rd from flower buds of *Panax quinquefolium*

LIU Peng, WANG Shi-wei, XIA Guang-ping

Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish the determination method of four ginsenosides from flower buds of *Panax quinquefolium* by Waters Acquity UPLC H-Class with Xevo TQD. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1mm, 1.7 μm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water containing 0.05% ammonium hydroxide with gradient elution; The flow rate was 0.45 mL/min, and the column temperature was 35 °C; Multiple reaction monitoring (MRM) acquisition under negative ion scan mode by ESI was also performed. **Results** The method was established with good precision, stability, repeatability, and accuracy. Ginsenoside Re, pseudo-ginsenoside F₁₁, ginsenoside Rb₃, and ginsenoside Rd showed a good linearity in the range of corresponding concentrations. **Conclusion** The UPLC-MS/MS method is rapid, simple, accurate, reliable, which can be used for the analysis of ginsenosides from flower buds of *P. quinquefolium*.

Key words: *Panax quinquefolium* L.; flower buds; ginsenoside Re; pseudo-ginsenoside F₁₁; ginsenoside Rb₃; ginsenoside Rd; UPLC-MS/MS

西洋参 *Panax quinquefolium* L. 为五加科人参属多年生草本植物, 主产于美国、加拿大, 我国自 20 世纪 80 年代开始引种并获得成功^[1]。西洋参具有补气养阴, 清热生津的功效。临床主要用于气虚阴亏、虚热烦倦、消渴和口燥咽干等症^[2-3]。目前, 国内外学者对其根、茎叶的研究比较多, 而关于西洋参花蕾的报道则相对较少。为了综合利用西洋参资源, 本课题组对西洋参花蕾中的化学成分进行了研究。本实验采用 UPLC-MS/Ms 联用的方法, 对其中 4 种主要皂苷类化

合物人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃ 和人参皂苷 Rd 的含量进行了测定。为进一步开发利用西洋参资源, 更好地控制西洋参花蕾的质量提供依据。

1 仪器与材料

Waters Acquity H-class UPLC bio Quaternary Solvent Manager、Waters Acquity UPLC bio Sample Manager-FTN、Xevo TQD 串联四级杆质谱仪 (Waters 公司); METTLER TOLEDO XS 105 Dual Range 电子天平 (梅特勒公司)。

收稿日期: 2018-02-03

作者简介: 刘 鹏 (1976—), 男, 副研究员, 研究方向为药物分析及新药研发。Tel: (022)23006859 E-mail: liup@tjipr.com

*通信作者: 夏广萍 (1976—), 女, 副研究员, 研究方向为药物分析及新药研发。Tel: (022)23006959 E-mail: xiagp@tjipr.com

人参皂苷 Re (批号 110754-201123)、拟人参皂苷 F₁₁ (批号 110841-200404)、人参皂苷 Rb₃ (批号 111686-201002) 和人参皂苷 Rd (批号 111818-201302) 对照品均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数均大于 98%; 环黄芪醇-6-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 (CMG, 批号 20070816) 对照品由天津药物研究院有限公司药物创新研究中心韩英梅研究员提供, 经 NMR 确证结构, HPLC-ELSD 测定质量分数 > 99.5%; 西洋参花蕾分别购自吉林修正药业保健品有限公司 (批号 110901)、吉林长白山回客多旗舰店 (批号 180314)、吉林长白山人参鹿茸批发中心 (批号 180319), 经天津药物研究院药物创新研究中心韩英梅研究员鉴定为西洋参 *Panax quinque folium* L. 干燥花蕾; 乙腈 (色谱纯, Fisher Scientific 公司); 氨水 (ACS 级, 北京百灵威

科技有限公司); 超纯水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.05% 氨水 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~4.00 min, 10%~90% B; 4.00~5.00 min, 90% B; 5.00~5.01 min, 90%~10% B; 5.01~6.00 min, 10% B; 体积流量 0.45 mL/min; 柱温 35 °C; 自动采样器温度 15 °C; 样品进样体积 5 μL

2.2 质谱条件

电喷雾离子源负离子检测 (ESI⁻); 毛细管电压 2.5 kV; 脱溶剂气温度 450 °C; 脱溶剂气流量 800 L/h; 锥孔气流量 50 L/h, 碰撞气为氩气; 多反应监测模式 (MRM)。5 种皂苷单体的通道反应参数见表 1。

表 1 5 种皂苷单体的通道反应参数

Table 1 Multiple reaction monitoring conditions for five saponins

化合物	[M-H] ⁻	通道反应 (MRM)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
人参皂苷 Re	945.58	945.58 > 637.44	90	52
拟人参皂苷 F ₁₁	799.46	799.46 > 653.45	80	46
人参皂苷 Rb ₃	1 077.56	1 077.56 > 945.62	96	50
人参皂苷 Rd	945.58	945.58 > 621.44	98	44
CMG (内标)	651.39	651.39 > 489.38	80	48

2.3 溶液的配制

2.3.1 内标工作液的配制 精密称取 CMG 对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 配成 1 mg/mL 的储备液。取适量储备液, 用甲醇稀释定容, 配制成 100 μg/mL 的内标工作液。

2.3.2 标准曲线工作液的配制 精密称取人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rd 对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 配成 1 mg/mL 的混合对照品储备液。分别取适量储备液, 用甲醇逐级稀释定容, 配制成 100、50、25、12.5、6.25、3.125 和 1.562 5 μg/mL 的混合对照品溶液。分别精密量取各质量浓度混合对照品溶液 100 μL, 加入内标工作液 100 μL, 加 20% 乙腈稀释并定容, 配制成质量浓度分别为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 μg/mL 的标准曲线工作液。

2.3.3 样品溶液的配制 称取西洋参花蕾适量, 加水煎煮 2 次, 第 1 次加 10 倍量水, 煎煮 60 min; 第 2 次加 8 倍量水, 煎煮 40 min。合并 2 次煎煮液, 过滤, 滤液通过 D101 型大孔吸附树脂柱, 水洗脱 2 倍柱体积, 70% 乙醇洗脱 2 倍柱体积, 收集 70% 乙醇洗脱液, 蒸干, 加甲醇溶解并稀释至质量

浓度为 250 μg/mL 的溶液。取此稀释液 100 μL, 加入内标工作液 100 μL, 加 20% 乙腈稀释成质量浓度为 25 μg/mL 的溶液, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 吸取“2.3.2”项标准曲线工作液各 5 μL 依次进样, 以各对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积比值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 得线性回归方程, 结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃ 和人参皂苷 Rd 峰面积与内标峰面积比值的 RSD (n=6) 值, 结果均小于 1.95%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取样品 (批号 110901) 溶液分别于 0、1、2、4、8 h 进样分析, 计算人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃ 和人参皂苷 Rd 峰面积与内标峰面积比值的 RSD 值, 结果均小于 2.58%, 说明各被测成分在 8 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取样品 (批号 110901) 6 份制备样品溶液, 进样, 计算人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、

表 2 各皂苷单体对照品线性关系考察结果
Table 2 Results of linearity of four ginsenosides

化合物	线性关系方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
人参皂苷 Re	$Y=2.992\ 89\ X+0.533\ 767$	0.995 492	0.316~10.12
拟人参皂苷 F ₁₁	$Y=4.356\ 54\ X+0.092\ 163\ 3$	0.998 958	0.159~2.54
人参皂苷 Rb ₃	$Y=0.979\ 946\ X+0.061\ 324$	0.992 988	0.159~5.09
人参皂苷 Rd	$Y=2.635\ 19\ X+0.277\ 958$	0.990 254	0.159~5.09

人参皂苷 Rb₃ 和人参皂苷 Rd 含量的 RSD ($n=6$) 值, 结果均小于 1.92%, 说明测定方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定的样品 (批号 110901) 6 份, 分别加入人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃ 和人参皂苷 Rd 对照品适量, 按样品溶液的制备方法操作, 制备加样样品溶液, 进样测定并计算回收率, 人参皂苷 Re、拟人参

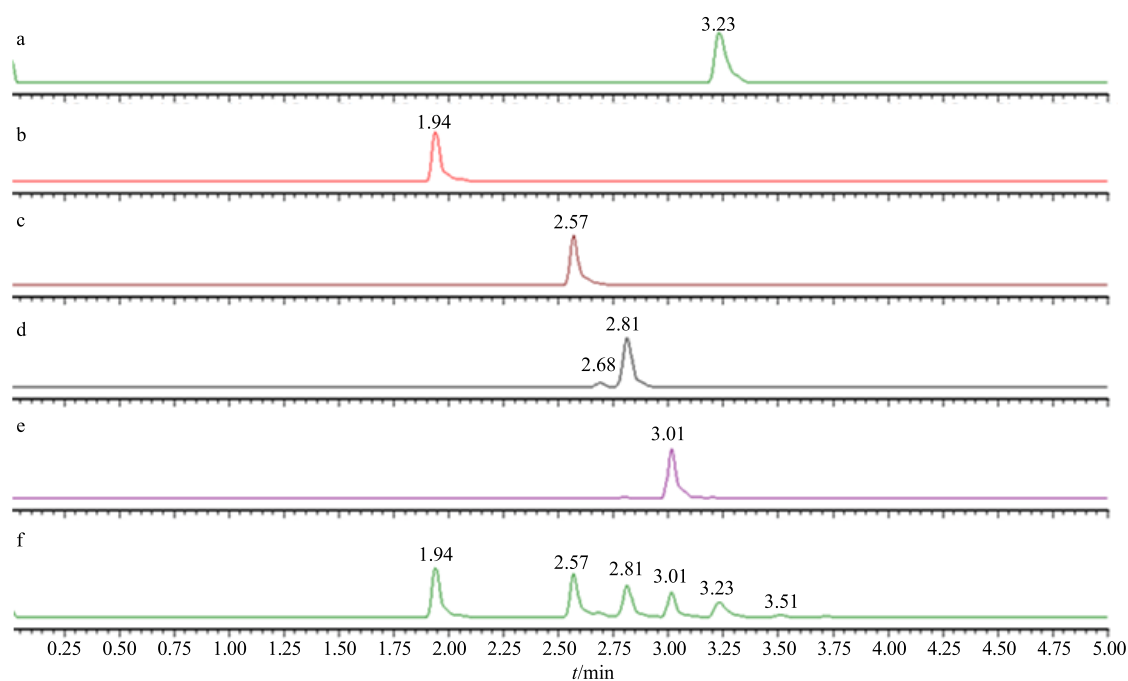
皂苷 F₁₁、人参皂苷 Rb₃ 和人参皂苷 Rd 的回收率分别为 95.56%、95.08%、96.11%、95.23%, RSD 分别为 1.87%、1.93%、1.82%、1.95%。

2.5 样品测定

取供试品溶液, 进样 5 μL , 分析结果见表 3, 样品的总离子流 (TIC) 图及各成分 MRM 模式下的色谱图见图 1。

表 3 西洋参花蕾中各皂苷成分的含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 3 Contents of four ginsenosides from flower buds of *P. quinquefolium* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	人参皂苷 Re	拟人参皂苷 F ₁₁	人参皂苷 Rb ₃	人参皂苷 Rd
110901	32.23 ± 0.71	17.27 ± 0.35	71.73 ± 0.93	21.40 ± 0.66
180314	27.98 ± 0.59	45.57 ± 0.91	45.39 ± 0.76	10.03 ± 0.84
180319	30.16 ± 0.63	47.67 ± 0.57	45.41 ± 0.69	8.92 ± 0.98



a-内标 CMG b-人参皂苷 Re c-拟人参皂苷 F₁₁ d-人参皂苷 Rb₃ e-人参皂苷 Rd f-总离子流
a-CMG b-ginsenoside Re c-pseudo-ginsenoside F₁₁ d-ginsenoside Rb₃ e-ginsenoside Rd f-total ion current

图 1 西洋参花蕾中各成分 MRM 模式下的色谱图及各成分 TIC 图

Fig. 1 MRM and TIC chromatograms of components from flower buds of *P. quinquefolium*

3 讨论

3.1 检测方法的选择

目前, 人参皂苷类成分的分析方法一般采用高效液相色谱法, 梯度洗脱的方式。由于该类成分极性相差较大, 单针运行时间可长达 100 min, 因此难以在短时间内得到有效的分离。本实验采用 UPLC 法对西洋参花蕾中的皂苷类成分进行测定, 单针运行时间缩短至 6 min, 且各有效成分均得到了较好的分离, 既节省了分析时间, 又减少了溶剂使用量。

由于人参皂苷类成分多为紫外 (UV) 末端吸收, 特别是西洋参中的特征性成分拟人参皂苷 F_{11} 无 UV 吸收, 因此常规 UV 检测器不能满足分析需要。与之相比, 质谱检测器具有快速, 准确, 灵敏度高, 干扰少, 样品用量少, 处理方法简单等优点。因此选择 UPLC-MS/MS 作为西洋参花蕾中皂苷类成分的检测方法。

3.2 电离模式的选择

在人参皂苷的液质分析测定中, APCI 源^[4]和 ESI 源^[5]是 2 种常见的离子源。文献报道^[6], 人参皂苷类尤其是原人参二醇型和原人参三醇型皂苷在 ESI-MS 正离子检测模式下, 易同时形成 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰, 降低了二级质谱分析时母离子的浓度, 在一定程度上降低分析的灵敏度。本实验研究中发现, 在正离子检测模式下, 主要形成 $[M+Na]^+$ 峰, 且信号响应不稳定, $[M+H]^+$ 峰信号较弱, 无法用于样品的检测。改用负离子检测模式后, 能形成 $[M-H]^-$ 峰且信号响应稳定, 因此选择负

离子模式对西洋参花蕾中的皂苷类成分进行分析。

3.3 快速鉴别、合理开发和利用西洋参资源

人参、西洋参均为常用名贵中药材, 其化学成分基本相似, 二者容易造成混淆。通过建立检测西洋参药材中特有成分拟人参皂苷 F_{11} 的分析方法, 可以对人参和西洋参类药材进行快速鉴别; 通过含量测定结果发现, 西洋参花蕾中人参皂苷 Re、拟人参皂苷 F_{11} 、人参皂苷 Rb_3 和人参皂苷 Rd 这 4 种皂苷的含量远高于《中国药典》2015 年版规定的西洋参药材中所含 3 种人参皂苷的量。因此可以考虑对西洋参花蕾进行合理开发和利用, 将其作为人参皂苷类成分的重要来源之一。

参考文献

- [1] 邱楠楠, 刘金平, 艾 民, 等. 西洋参茎叶化学成分及生物利用度的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1393-1397.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 王 欢, 曾凡琳, 谢彩香. 西洋参 UPLC-UV-ELSD 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 143-148.
- [4] Ma X Q, Xiao H B, Liang H M. Identification of ginsenosides in *Panax quinquefolium* by LC-MS [J]. *Chromatographia*, 2006, 64(1/2): 31-36.
- [5] 郭继芬, 钟大放, 乔善义, 等. 液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析人参皂苷 [J]. 质谱学报, 2003, 24(4): 477-481.
- [6] 杨 琳, 缪 宇, 殷惠军, 等. LC-ESI-MSⁿ 法鉴定心悦胶囊中西洋参皂苷类成分 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1942-1947.