

作者:

Njies Pedjie

Avinash Dalmia

PerkinElmer, Inc.

Shelton, CT USA

## 使用FlexarLC/PDA与 FlexarSQ300质谱联用仪 检测人参根粉末中 的皂苷

### 简介

在亚洲，人参属植物的根用作草药已有超过2000年的历史，据说其具有抗氧化、抗癌、抗炎症、抗高血压、抗糖尿病的作用。支持人参药理活性的

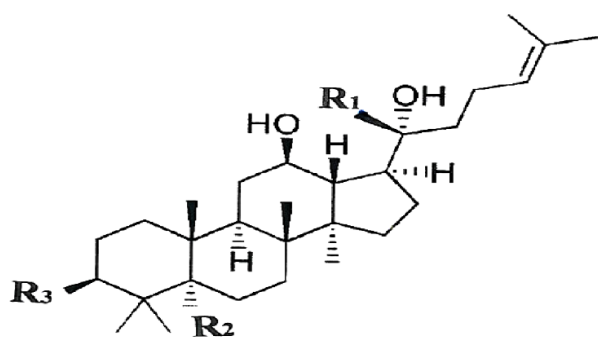
化合物是皂苷。虽然皂苷潜在的作用机理尚未完全阐明，但其作用类似于类固醇激素。人参的品种数目繁多，且每个品种都有其自身特定的皂苷。皂苷是一个多样组的甾体皂苷，该甾体皂苷由四个环状甾体及糖基构成（结构式见图1所示），且主要存在于根部。皂苷有两个主要的基团：一个主要基团是，人参二醇基团或者Rb1基团包括Rb1,Rb2,Rc,Rd,Rg3,Rh2和Rh3；另一个主要基团是人参三醇基团或者Rg基团包括Rg1,Re,Rf,Rg2和Rh1。在人参属植物中，美国 and 韩国的人参使用较多。虽然这两种人参有类似的皂苷，但是美国的人参（Panaxquinquefolius）据说含有更多具有Rb1基团的皂苷，而韩国的人参含有更多具有Rg1基团的皂苷。需要注明的是，这些化合物的含量取决于人参收获时根的生长年龄，储存的条件和储存过程。

本应用文献介绍了一种耐用的高效液相色谱法，可同时测定七种常见的皂苷。该分析使用配有PDA检测器的PerkinElmer®Flexar™ FX-15系统来实现；该分析还可扩展至使用Flexar SQ 300MS检测器。质谱检测器具有较高的灵敏度和根据质量分离化合物的能力，较低的检测限，并且能够将共流出的Rg1和Re两种化合物分开。

## LC/PDA分析

### 试验

分别称取7中皂苷单体 (Rg1, Rf, Rg2, Rb1, Rc, Rd, Rb2) 的固体纯物质适量，70:30的甲醇/水溶液（稀释溶液）溶解，涡旋1min，从而制备1mg/mL皂苷标准储备溶液。分别移取7种皂苷单体的标准储备溶液各0.5mL，混匀，制备浓度为0.14mg/mL的工作标准。工作标准连续进样5次以评估精密度。线性范围为7?g/mL-140?g/mL。为了评价方法的准确度，在纯水中加入适量的工作标准，制备各皂苷单体浓度均为7?g/mL的溶液，测定回收率。从一种人参胶囊中称取大约3g的粉末于50mL的容量瓶中，加入30mL的稀释溶液，涡旋1min后超声30min，然后5000rpm离心10min，收集上层的离心溶液于一个50mL的容量瓶中，待用。继续在沉淀物中加入15mL的稀释溶液，重复上述涡旋、超声、离心的步骤。收集第二次的上层离心溶液，与第一次的上层离心溶液合并后，稀释溶液定容至50mL。充分混匀，进样之前用0.2?m尼龙滤膜过滤。



Ginsenoside	R3	R2	R1
Rb1 group	-O-Glc(6-1)Glc	-H	-O-Glc(2-1)Glc
Rg1 group	-OH	-O-Glc	O-Glc

图1 皂苷的分子结构

## LC/PDA色谱条件

自动进样器	Flexar FX UHPLC												
	50 $\mu$ L定量环和15 $\mu$ L进样针，部分定量环模式												
进样清洗液	水												
进样体积	2 $\mu$ L												
样品稀释	70:30甲醇/水												
PDA检测器	分析波长203nm												
UHPLC色谱柱	PerkinElmer Brownlee™ SPP C-18, 150 x 2.1 mm, 2.7 $\mu$ m 柱温45°C, 部件号: N9308402												
流动相	A: 水 B: 乙腈												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>流速 (ml/min)</th> <th>B%</th> <th>curve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2.5</td> <td>0.4</td> <td>30-35</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>0.4</td> <td>35-50</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	流速 (ml/min)	B%	curve	2.5	0.4	30-35	1	3.5	0.4	35-50	1
时间 (min)	流速 (ml/min)	B%	curve										
2.5	0.4	30-35	1										
3.5	0.4	35-50	1										
	每个梯度运行完成，平衡3min												
采样率:	5pt/s												
软件:	Chromera® Version 3.0												

## 结果与讨论

该方法的最佳测定流速为0.4mL/min，45°C，平衡压力约为5150psi(355bar)，所有的化合物在6min内流出色谱柱。皂苷标准溶液及高丽参的测定色谱图分别见图2和图3所示。方法获得优越的性能：每种皂苷的线性相关系数不小于0.998，精密度范围在0.6%至1.2%之间（相对标准偏差RSD%）。纯水的加标回收率范围从91.2%-108.0%，平均值为99.9%。详细的方法性能、人参样品测定结果和样品分析结果见表1所示。

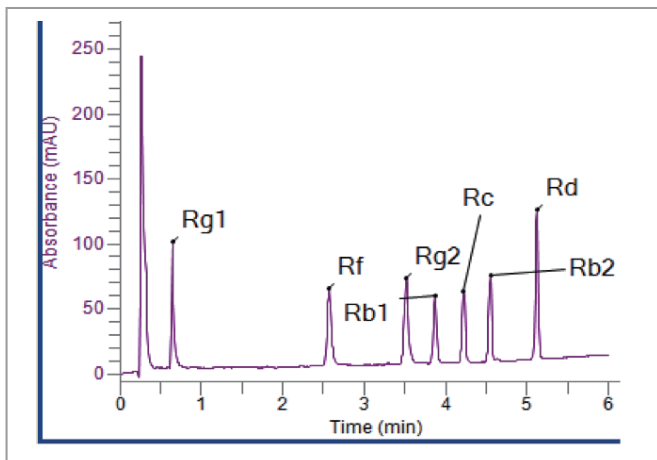


图2 标准溶液的分析色谱图

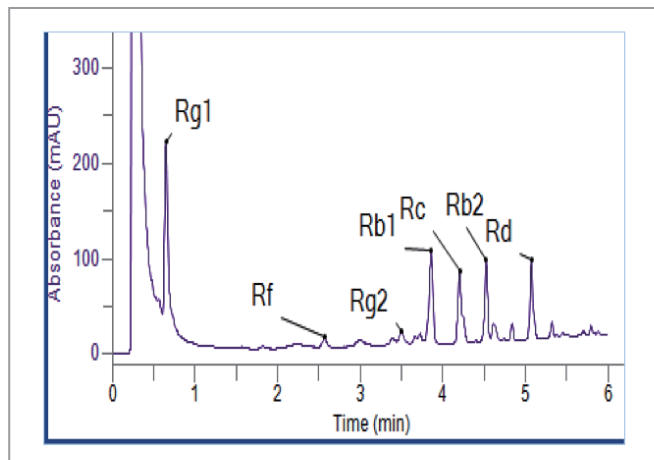


图3 人参样品的分析色谱图

表1 精密度, 线性, 准确度和样品测定含量

化合物	RSD% (n=8)	r <sup>2</sup>	范围 (µg/mL)	高丽参 (mg/g)	7ppm水加标
Rg1	0.9	0.9997	7 - 140	13	97.5
Rf	0.6	0.9971	7 - 140	1	91.2
Rg2	1.2	0.9983	7 - 140	1	98.7
Rb1	1.1	1	7 - 140	10	102.1
Rc	1.2	0.9994	7 - 140	10	100.3
Rb2	1.0	0.9996	7 - 140	7	101.4
Rd	1.2	0.9997	7 - 140	4	108.0
<b>Average/Total</b>	<b>1.0/-</b>	<b>0.9988/-</b>		<b>-/46</b>	<b>99.9/-</b>

## MS分析

在利用PDA检测器分析过程中, 有Rg1与Re共流出的担心, 为了获得该两种化合物的分离, 使用了MS检测器。重新制备了包括Re的工作标准溶液, 人参的萃取溶液被用于后续分析。

## LC/MS分析

### 试验

按照PDA分析的方法, 从含有六种(Rg1, Re, Rb1, Rc, Rd, Rb2)化合物的储备溶液制备七个浓度水平的工作标准, 浓度范围为0.1 µg/mL-100 µg/mL (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µg/mL), 稀释剂与PDA中使用的相同, 且在其中加入了0.5%乙酸。用于质谱分析的样品溶液比LC/PDA分析时又稀释了50倍, 即移取人参样品的萃取溶液0.2mL至10mL的容量瓶中, 使用含有1%乙酸的70/30甲醇/水溶液稀释。

## LC条件

自动进样器	50 µL 定量环和 15 µL 进样针, 部分定量环模式		
进样清洗	水		
进样体积	5 µL		
UHPLC色谱柱	Brownlee? SPP C-18, 150 x 2.1 mm, 2.7 µm 柱温45°C, 部件号: N 9 3 0 8 4 0 2		
样品稀释	含有0.5%甲酸的70:30甲醇/水		
流动相	A: 0.4mM醋酸铵的0.1%乙酸溶液 B: 0.1%乙酸的乙腈		
时间 (min)	流速 (mL/min)	B %	curve
0.5	0.5	20	1
1.0	0.5	30-35	1
3.5	0.5	35-50	1

## MS条件

离子源	ESI 负离子模式
干燥气温度和流速	350°C and 15 L/min
雾化气压力	80psi
SIM驻留时间	50ms
SIM质量	Rg1为799.5, Rd, Re为945.6, Rb2, Rc为 1077.6 , Rb1为1107.6
毛细管电压	Rg1, Rd, Re为-150 V, Rb2,Rc, Rb1为-165 V
m/z扫描范围	100-1200Da
扫描速率	4000Da/s
毛细管出口电压	扫描模式为180V

该方法的最佳测定流速为0.4mL/min, 45°C, 所有的化合物在6min内流出色谱柱。校准曲线的r2从0.9971-0.9997 (图4)。虽然Re和Rg1从色谱柱中同时流出, 但是由于其质量不同, 故MS可以鉴定和定性该两种化合物。SIM扫描标准溶液和人参萃取溶液中的Rg1和Re的谱图见图5-8所示。MS分析Rg1和Re的结果见表2所示。

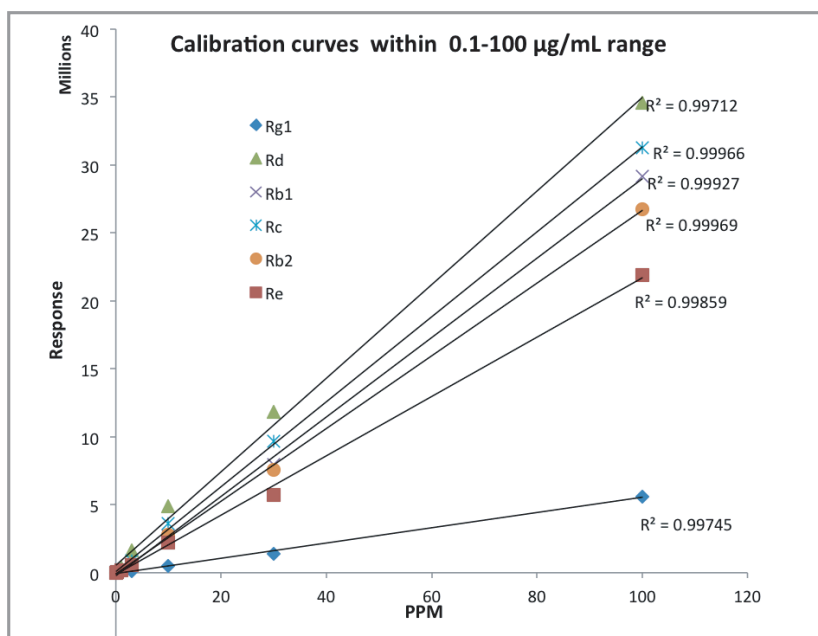


图4 校准曲线

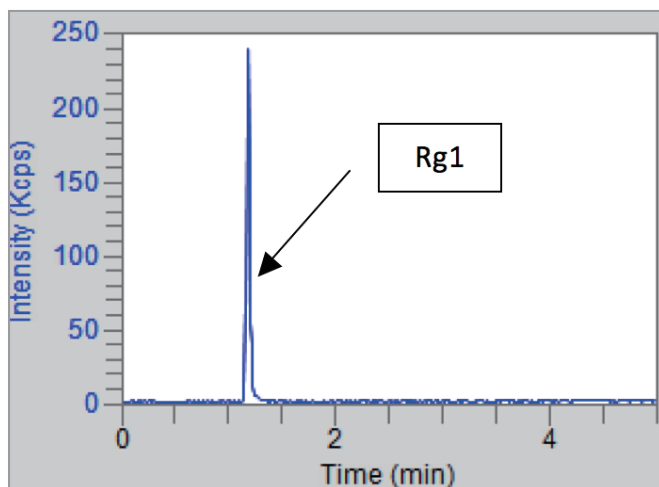


图5 10ppm标准溶液的Rg1谱图

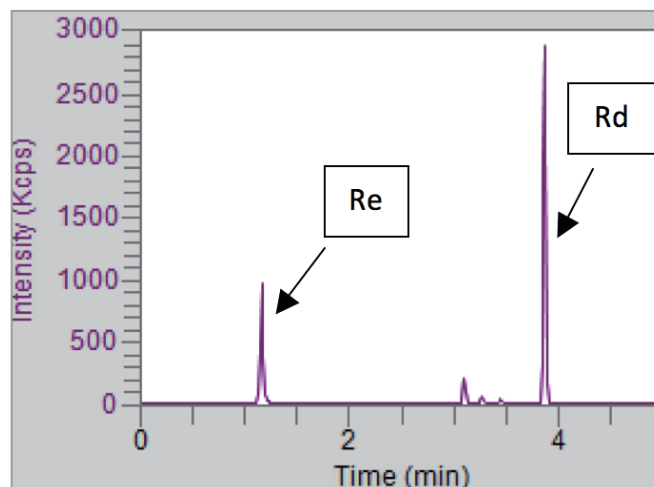


图6 10ppm标准溶液的Re和Rd谱图

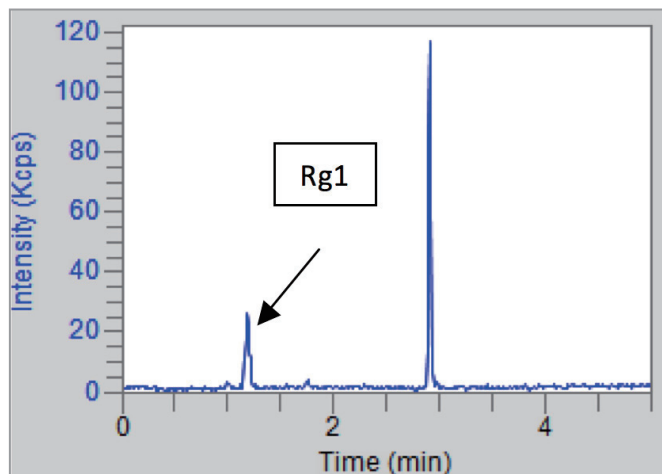


图7 高丽参的提取离子质谱图

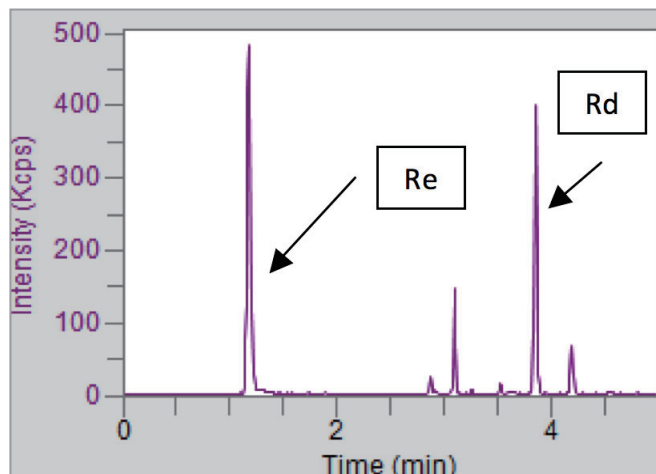


图8 高丽参的提取离子质谱图

表2 Rg1和Re的测定结果

化合物	高丽参萃取溶液 (mg/g)
Rg1	2.2
Re	11.3
<b>总量</b>	<b>13.5</b>

## 结论

利用PDA检测器，7种皂苷在6min内被很好的分离，方法的线性相关系数 $R^2 \geq 0.998$ ，精密度 $RSD\% \leq 1.2\%$ ，回收率的平均值为99%。韩国人参胶囊测定结果其皂苷含量为46mg/g。利用MS进一步进行分析，结果显示，PDA测定Rg1（13mg/g），实际为Rg1（2.2mg/g）和Re（11.3mg/g）的共流出。

## 参考文献

1. Rebecca M. Corbit, Jorge F. S. Ferreira, Stephen D. Ebbs, and Laura L. Murphy. Simplified Extraction of Ginsenosides from American Ginseng for High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Analysis, *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 9867-9873 9867.
2. Attele, A. S.; Wu, J. A.; Yuan, C.-S. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* 1999, 58, 1685-1693.  
<http://mend.endojournals.org/content/22/1/186.full>  
<http://www.cmjournal.org/content/pdf/1749-8546-7-2.pdf>

注：本应用文献如有更改，恕不另行通知。

珀金埃尔默仪器（上海）有限公司  
 地址：上海 张江高科技园区 张衡路1670号  
 邮编：201203  
 电话：021-60645888  
 传真：021-60645999  
[www.perkinelmer.com.cn](http://www.perkinelmer.com.cn)



要获取全球办事处的完整列表，请访问<http://www.perkinelmer.com.cn/AboutUs/ContactUs/ContactUs>

版权所有 ©2013, PerkinElmer, Inc. 保留所有权利。PerkinElmer® 是PerkinElmer, Inc. 的注册商标。其它所有商标均为其各自所有者或所有者的财产。