

纳升电喷雾萃取电离质谱快速测定人参皂苷

胡斌¹, 越皓², 黄科科³, 姜翠翠¹, 刘淑莹², 费强³, 陈焕文¹

(1. 东华理工大学, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 南昌 330013;

2. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 长春 130117; 3. 吉林大学化学学院, 长春 130012)

摘要 以自行研制的纳升电喷雾萃取电离源(NanoEESI)为基础,建立了无需色谱分离的快速测定人参皂苷的质谱分析方法. 用 NanoEESI 串联质谱分析鉴定了人参中的多种人参皂苷,并将该方法用于人参、桔梗和商陆的快速鉴定. 实验结果表明,人参皂苷在正离子模式下易于结合钠离子,形成 $[M + Na]^+$ 离子而被检测,而桔梗和商陆等样品中不含人参皂苷成分,在串联质谱中无相应的特征碎片离子,从而达到鉴别中药材真伪的目的. 本方法简便、快速、灵敏、特征性强且重现性好,为道地中药材的快速鉴定提供了思路,具有很好的实用价值.

关键词 纳升电喷雾萃取电离; 质谱; 人参皂苷; 快速分析

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2011)06-1289-06

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科人参属植物人参的干燥根,是我国名贵的中药材. 人参皂苷是其主要的有效成分,适用于调养多种疾病,具有延年益寿、增强体力和抑制衰老等作用. 桔梗、商陆等干燥根与人参的药理作用不同,但在形态上却非常相似,因此常有不法商贩将桔梗、商陆冒充人参或掺杂于人参中出售^[1]. 这些伪劣品不仅不能起到人参应有的作用,反而可能导致人体中毒^[2]. 人参及其制品成分复杂,对其鉴定时需要一系列的提取和分离处理后再分析^[3-5]. 测定人参皂苷的常用方法有薄层色谱法^[6]、气相色谱法^[7]、高效液相色谱法^[8,9]、电喷雾质谱法^[10]及液相色谱-质谱联用法^[11]等,这些方法需要复杂的样品预处理过程,给快速检测带来了不便. 因此,建立快速、准确的定性和定量人参皂苷检测方法非常重要.

纳升电喷雾萃取电离质谱法(NanoEESI-MS)^[12-14]是基于电喷雾萃取电离质谱法(EESI-MS)^[15,16]发展起来的新型离子化技术^[17]. 其离子源独特的空间萃取电离方式^[18]使得 NanoEESI 成为目前用于复杂基体液体样品快速分析的有效技术之一. NanoEESI 与线性离子阱质谱仪联用后具有灵敏度高、特异性好及通量高的特点. 对于各种复杂基体样品,例如牛奶^[12]、药物^[12,13]、饮料^[12,14]、牙膏粗提物^[19]及农田水中的残留农药^[12]等均可直接快速分析,无明显的基体效应或灵敏度的降低. 本文在简单的样品预处理情况下,采用 NanoEESI 质谱法分析了人参提取液中的人参皂苷,并对桔梗和商陆进行检测,建立了快速分析鉴定人参的方法. 结果表明,该方法对人参及其制品的鉴定具有重要的实用价值,也为大量中药材的快速质谱分析和安全评价提供了依据.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

NanoEESI 离子源为本实验室自制^[12-14],装置如图 1 所示,在纳升级的电喷雾毛细管中,微量萃取剂(10 nL/min)在高压下产生喷雾,形成初级离子束,样品溶液通过手动挤压喷雾瓶产生样品雾束,

收稿日期: 2010-07-09.

基金项目: 国际科技合作项目(批准号: 2009DFA30800)和江西省科技支撑计划项目(批准号: 105)资助.

联系人简介: 黄科科,男,博士,主要从事无机合成与分析研究. E-mail: huangkeke_79@yahoo.com.cn

陈焕文,男,博士,教授,博士生导师,主要从事质谱分析研究. E-mail: chw8868@gmail.com

并与离子束在空间进行萃取电离,形成待测物离子进入质谱分析. LTQ 线性离子阱质谱仪(美国热电公司);喷雾瓶由山东京卫制药有限公司生产,容量 5 mL,每次喷雾 0.1 mL.

甲醇(色谱纯)和氯化钠(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;人参样品为市售吉林新开河生晒参;桔梗与商陆样品由吉林省人参科学研究院提供;实验用水为自制二次去离子水.

1.2 样品处理

分别将人参、桔梗和商陆粉碎成粒径为 1~5 mm 的不规则颗粒,分别称取 2.0 g 置于 10 mL 甲醇-水溶液(体积比 1:1)中浸泡 3 min,并分别加入浓度为 1.0×10^{-3} mg/mL 的 NaCl 溶液 10 μ L,各取上层清液 2.0 mL 装入喷雾瓶中备用.

1.3 质谱条件

设置 NanoEESI 为正离子检测模式,电离电压 3.5 kV,离子传输管温度 200 $^{\circ}$ C,萃取剂甲醇-水混合溶液(体积比 1:1)通过注射泵进样,流速 1.0 μ L/min. 纳升喷雾口与水平面夹角(α)为 38 $^{\circ}$,与质谱进样口距离(a)为 3.5 cm;样品喷雾和甲醇水喷雾离子束夹角(β)为 120 $^{\circ}$,样品喷雾口与质谱口距离(b)为 13 cm,使样品得到最佳的雾化和电离. 多级串联质谱通过碰撞诱导解离(CID)反应获得,母离子选择的窗口宽度为 1.6 Da,碰撞时间为 30 ms,碰撞能量为 15%~25%. 其它仪器参数采用 LTQ-MS 推荐的缺省参数,实验时进行自动优化.

2 结果与讨论

2.1 NanoEESI 离子化技术

实验采用的 NanoEESI 源是在电喷雾萃取电离(EESI)技术基础上发展起来的一种可用于现场直接质谱分析的新型离子化技术^[12-14]. 以无辅助气体条件下产生的带电液滴作为试剂离子,而中性复杂基质样品则通过手动挤压喷雾器产生样品喷雾,从质谱仪入口的反方向导入(如图 1 所示),避免了样品污染或质谱仪的损伤. 采用 NaCl 溶液浸泡的人参、桔梗和商陆样品溶液直接喷雾,在相对较大的三维空间进行快速的萃取/电离和去溶剂化过程,形成的待测物离子进入质谱仪进行检测. 本方法具有直接分析检测复杂样品的能力,大大降低了对样品预处理的要求,串联质谱直接分析结果给出了各组分的分子量和较丰富的离子结构信息. 由于 NanoEESI 电离技术无需辅助气体设备,易于集成和小型化,与小型质谱仪结合后适用于复杂基质样品的现场分析.

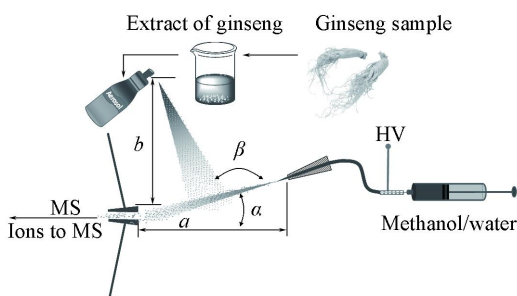


Fig. 1 Schematic of the NanoEESI

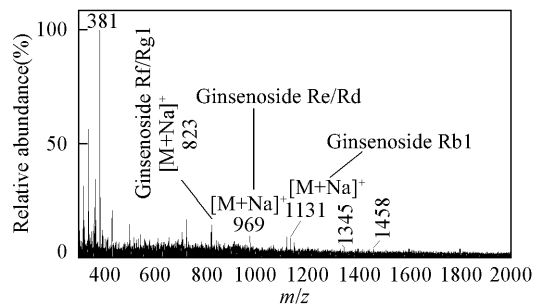


Fig. 2 NanoEESI-MS mass spectra of extraction

2.2 人参皂苷的一级质谱分析

EESI 是比 ESI 更软的软电离技术^[15],一般仅通过质子化或去质子化即可形成待测物离子. 实验发现,在负离子模式下 NanoEESI 难以获得人参皂苷的信号. 从分子结构上看,人参皂苷没有很强的去质子化部位,所以在负离子模式下难以获得理想信号;亦没有明显的碱性基团,因此难以在正离子模式下获得理想的质子化分子离子. 由于皂苷类物质具有糖苷的性质,对碱金属离子具有较强的亲和性,在盐(NaCl)溶液中容易与钠离子结合形成钠化离子. 研究^[20]表明,适量金属离子可提高检测的灵敏度和丰度,因此人参皂苷在 NanoEESI-MS 中主要得到 $[M + Na]^+$ 离子峰(如图 2 所示). 图 2 中 m/z 823 为人参皂苷 Rg 或 Rf 与钠离子结合后的离子峰; m/z 969 是人参皂苷 Rd 或 Re($M_w = 947$)形成的加钠的离子峰,而 m/z 1131 是人参皂苷 Rb1 的离子峰,这与文献^[20]研究结果一致. 由于萃取溶液具有复杂的基体,在一级质谱中尚有很多皂苷峰未显示出来,但是这些低丰度的离子可用串联质谱进行分

析和鉴定. 在正 NanoEESI 模式中, 人参皂苷分子首先在亲核性高的部位(即具有孤对电子的氧原子部位)结合具有空轨道的离子或者离子基团. 糖基上羟基氧的亲核性比骨架上的氧更弱, 骨架上的羟基氧与钠离子结合形成离子. 在空间萃取电离区域, 溶液中的人参皂苷被初级离子束萃取并通过电荷转移进行离子化.

2.3 多级串联质谱分析

为排除假阳性信号, 需要对一级质谱中人参皂苷正离子进行串联质谱研究. 选择 m/z 1131 为母离子, 获得二级质谱图[图 3(A)]. 在二级质谱中, 母离子 m/z 1131 的糖苷键断裂丢失 2 个六碳糖基和一分子水后得到基峰 m/z 789, m/z 789 离子进一步丢失 1 个六碳糖基和脱氧六碳糖得到 m/z 365 骨架离子, 说明母离子 m/z 1131 易脱去糖基产生两个相对稳定的碎片离子. 在三级质谱[图 3(A)插图]中, 离子 m/z 789 首先脱去皂苷元得到基峰 m/z 365 的糖基离子 $[2\text{Glc} + \text{Na}]^+$, 由于多级质谱中母离子的能量较高, 可进行深度裂解, m/z 365 离子可继续裂解糖基上的六元环得到 m/z 245 的离子, 其丰度低于 5%; 而离子 m/z 789 还可脱去侧链 2-甲基-2-戊烯得到低丰度 m/z 705 离子, 丰度约为 2%. 这些串联质谱的解析与文献[11, 21]一致.

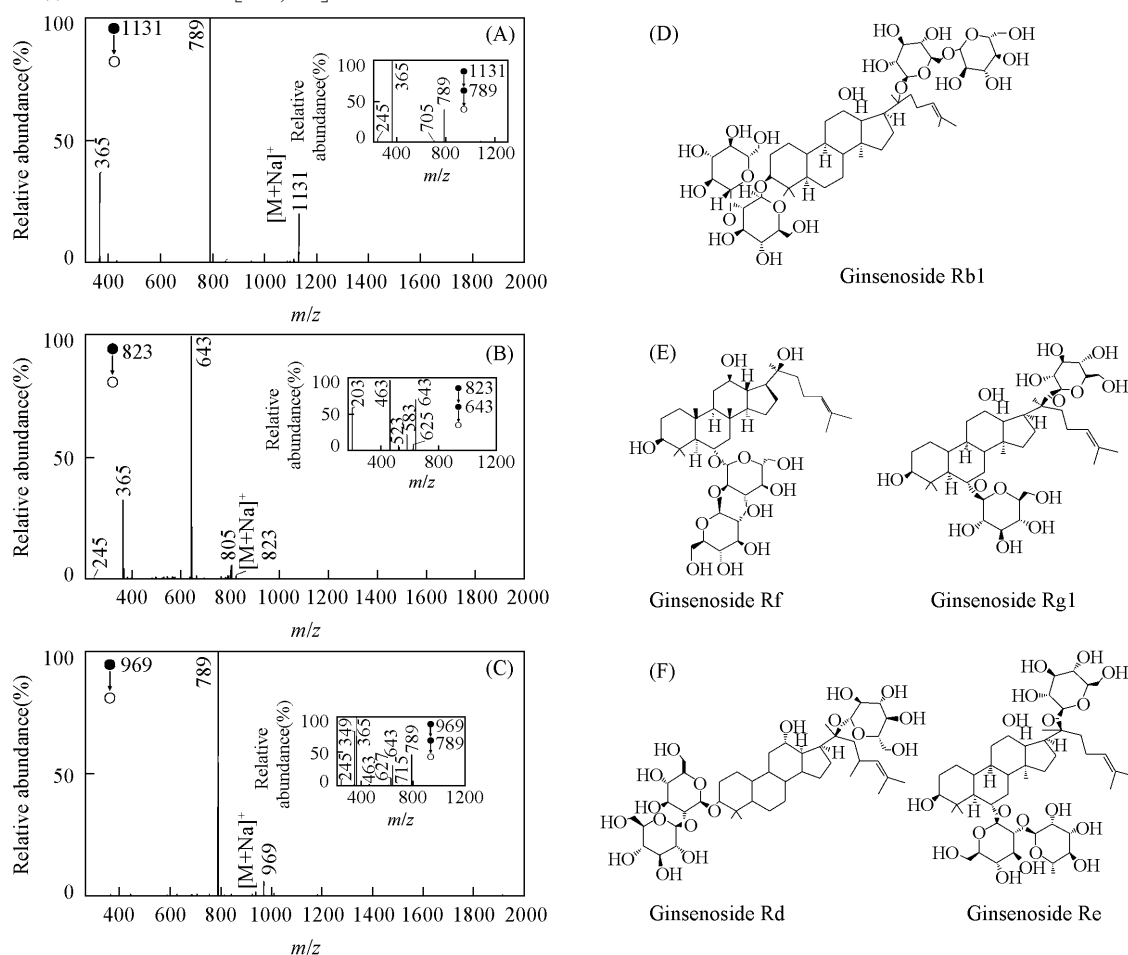


Fig. 3 MS/MS spectra (A—C) and molecular structures (D—F) of the ginsenosides

(A) Sodiated ginsenoside Rb1 (m/z 1131); (B) sodiated ginsenoside Rf/Rg1 (m/z 823); (C) sodiated ginsenoside Rd/Re (m/z 969). The insets show MS³ mass spectra of ginsenosides, respectively.

实验表明, 皂苷离子在串联质谱条件下发生碎裂, 产生一系列由糖苷键断裂而产生的离子. 通过这些碎片离子可获得化合物的结构信息. 同分异构体 Rf 和 Rg1 具有相同质荷比的离子 m/z 823, 在二级质谱有相同的 CID 碎片离子如 m/z 643 和 m/z 365 等[图 3(B)]. 选择离子 m/z 643 进行三级质谱[图 3(B)插图]分析, 观测到 m/z 643 离子首先脱去一个六碳糖基和一分子水, 产生 m/z 463 离子, 而 m/z 203 离子为 m/z 643 离子脱去其它碎片离子得到的糖基离子 $[\text{Glc} + \text{Na}]^+$. 根据上述分析及文献

[11,21]报道,确定这种人参皂苷为 Rf 或 Rg1. 同样,对 m/z 969 离子进行了串联质谱分析[图 3 (C)]. 在二级质谱中主要得到的基峰 m/z 789 离子是由母离子 m/z 969 脱去 1 个六碳糖基得到的,其它碎片离子的相对丰度均低于 2%; 在 m/z 789 离子的三级质谱[图 3 (C)插图]中观察到一系列脱去单糖基或多糖基的碎片离子峰,说明离子 m/z 969 为皂苷 Rd 或 Re.

以上实验表明,人参皂苷易与钠离子结合形成 $[M + Na]^+$ 离子,并且在二级质谱中主要脱去糖基得到特征离子. 在一级质谱中不明显的质谱峰可通过选择特征离子进行二级质谱分析来鉴定,所得结果(见表 1)与文献[11,20~22]一致.

Table 1 Ginsenosides detected from extract of Ginseng sample by NanoEESI-MS/MS

| Ginsenoside | $[M + Na]^+$ ions species, m/z | MS/MS product ions and species, m/z |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Ra1, Ra2 | 1233 | 891 $[M + Na - H_2O - Glc - Glc]^+$ |
| Rb1 | 1131 | 789 $[M + Na - H_2O - Glc - Glc]^+$ |
| Rb2, Rc | 1101 | 1083 $[M + Na - H_2O]^+$ |
| Rd, Re | 969 | 789 $[M + Na - H_2O - Glc]^+$ |
| Rf, Rg1 | 823 | 643 $[M + Na - H_2O - Glc]^+$ |
| Rg2 | 807 | 627 $[M + Na - H_2O - Glc]^+$ |
| Ro | 979 | 817 $[M + Na - Glc]^+$ |

2.4 假劣人参的质谱分析

桔梗和商陆在外形上与人参十分相似,用普通的感官方法难以区分,因而常用以充作人参. 实验表明,这些假冒品可以用 NanoEESI 准确快速地鉴定. 桔梗与商陆样品的一级质谱分别如图 4 (A) 和 (B) 所示,显示了桔梗和商陆样品提取液丰富的质谱信息,但观测不到人参皂苷的特征信号峰.

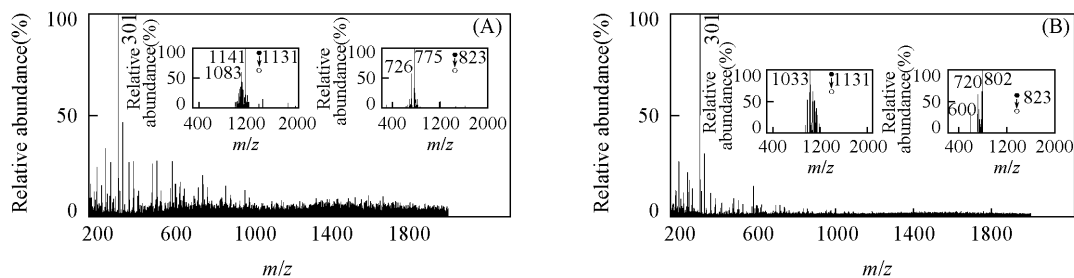


Fig. 4 NanoEESI-MS mass spectra of extract from *Platycodon Grandiflorum* (A) and *Phytolacca acinosa* Roxb (B) samples

Insets show the MS/MS spectra of the ions at m/z 1131 and 823, respectively.

对桔梗和商陆的一级质谱中对应皂苷的特征质荷比的离子进行了串联质谱分析,以验证样品中是否含有人参皂苷. 分别选择 m/z 1131 和 m/z 823 离子进行二级串联质谱分析,得到的质谱数据与人参皂苷中得到的二级质谱信息不吻合,从而确定了桔梗和商陆中不含皂苷 Rb1, Rf 或 Rg1 成份. 用相同的方法也排除了桔梗和商陆中含有其它几种人参皂苷成分的可能,达到了鉴别人参真伪的目的. 此外,为考察方法区分不同含量人参皂苷的可能性,配制了不同质量比的桔梗/人参(总质量为 1 g)与 5 mL 水的混合物进行提取,再进行人参皂苷的检测,发现人参皂苷信号的强弱与混合物中人参的含量具有良好的相关性,结果如图 5 所示. 以上结果表明, NanoEESI-MS 可以快速检测人参的真假和品质的优劣.

2.5 分析速度与精密度

每次人参样品提取液喷雾量仅为 0.1 mL,样品的离子信号即时出现. 在不到 0.3 s 的时间内,样品的信号强度达到最大强度的 80% 以上,当停止进样时,信号强度减弱到背景值,而且在分析过程中无拖尾现象(如图 6 所示). 在所测定的溶液中人参样品的总离子流图中,选择人参皂苷的特征信号得到 22 次净响应信号强度,相对标准偏差 RSD 为 6.19% ($n=22$),显示了良好的重现性和稳定性. 每个样品的分析时间为 1.5 s,具有 8 个扫描谱图,满足了进一步串联质谱分析的要求. 高通量分析方法主要受样品导入装置的限制,本方法的手动操作对单个样品的一级和二级质谱测定仅需要 5 s. 此外,本方法设备制造工艺简单,操作简便,维护简易,适合耦合到小型质谱仪上对样品进行现场分析.

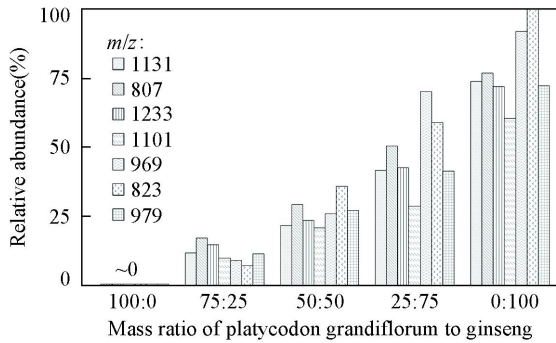


Fig. 5 Ginsenosides detected from different mass ratios of platycodon grandiflorum and ginseng

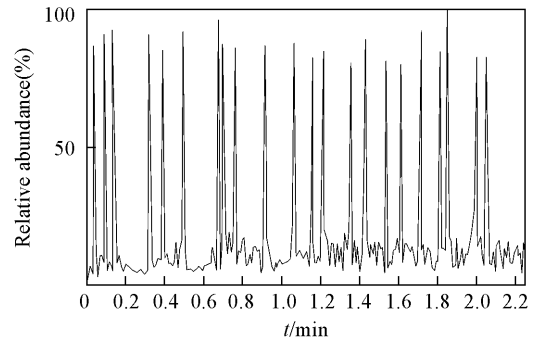


Fig. 6 Chromatogram of sodiated ginsenoside Rb1 (m/z 1131) recorded from extract of Ginseng sample

2.6 灵敏度与样品耗量

将人参皂苷喷雾母液稀释 1000 倍后再喷雾进样, 得到的皂苷选择离子流图的信噪比仍较高 ($S/N=7$). 在一级质谱中, 由于人参皂苷的特征峰包含了大量假阳性信号, 需要进一步进行二级质谱分析, 获得的结果与扣除背景的二级质谱一致, 表明此法具有较高的灵敏度. 实验结果还表明, 即使在短时间内浸泡的人参提取液经过稀释, 对于含有复杂基体的人参皂苷仍能满足质谱分析的要求.

每次样品的喷雾量仅为 0.1 mL, 适合微量液体样品的分析. 在固定实验条件下, 多次进样 ($n=11$) 所得信号的 RSD 为 6.19%, 对于直接质谱方法是在可接受范围内的. 前期研究^[12-14]表明, NanoEESI-MS 源保留了 EESI-MS 的高灵敏度的特点, 并且在定量分析中具有较低的检出限 (fg 级), 良好的动态范围和线性关系. 由于假冒人参中人参皂苷的含量远低于其在真品人参中的含量, 对人参和人参制品进行快速分析鉴定时, 对比分析人参皂苷的含量即可判断真伪. 因此, 在实际样品的快速鉴定中, 无需进行精确的定量分析. 此外, 对于超微量样品的检测, 可以采用王姜等^[23]研制的纳升取样表面解吸常压化学电离质谱 (NanoDAPCI-MS) 技术实现微量样品的现场快速分析鉴定. 该方法的取样量仅为 0.11 nL, 对名贵药材的快速质谱分析具有一定的意义.

3 结 论

应用 NanoEESI 质谱技术, 在对样品进行简单的预处理后, 实现了对人参药材中皂苷化合物的快速分析检测, 同时能够快速准确地提供糖苷类化合物的分子质量信息, 通过人参皂苷的多级串联质谱可以获得人参皂苷的碎片离子信息; 可以对人参皂苷的结构进行很好的定性检测, 从而建立了快速、准确鉴别人参的新方法, 结合小型质谱仪还适合于现场的快速鉴定分析.

参 考 文 献

- [1] ZHANG Yu-Chi (张语迟), LIU Zhi-Qiang (刘志强), SONG Feng-Rui (宋凤瑞), WANG Shu-Min (王淑敏), LIU Shu-Ying (刘淑莹). J. Chinese Mass Spectrom. Soc. (质谱学报) [J], 2008, 4: 203—208
- [2] WU Zhao-Meng (吴兆盟), LI Yan (李燕). China Pharm. (中国药业) [J], 2008, 17: 60—61
- [3] SUN Shuo (孙硕), ZHAI Yu-Juan (翟玉娟), SUN Yue (孙烨), ZHANG Yu-Pu (张玉璞), LIU He (刘贺), WANG Xing-Hua (王兴华), YU Ai-Ming (于爱民), ZHANG Han-Qi (张寒琦). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2010, 31(3): 468—472
- [4] WANG Yu-Tang (王玉堂), LI Xu-Wen (李绪文), JIN Hai-Yan (金海燕), YU Yong (于永), YOU Jing-Yan (游景艳), ZHANG Kun (张昆), DING Lan (丁兰), ZHANG Han-Qi (张寒琦). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2007, 28(12): 2264—2269
- [5] ZHANG Xu (张旭), SONG Feng-Rui (宋凤瑞), LIU Zhi-Qiang (刘志强), LIU Shu-Ying (刘淑莹). Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报) [J], 2006, 27(9): 1640—1644
- [6] ZHOU Xuan (周漩), LIN Le-Ming (林乐明), ZHANG Jun (张军), CHEN Ji-Ping (陈吉平), WANG Long-Xing (王龙星). Chinese J. Chromatogr. (色谱) [J], 2000, 18: 206—211
- [7] Nicola F. J. Chromatogr. B [J], 2004, 812: 119—133

- [8] Liu G. Y. , Zhou H. Y. , Lu J. , Zhu N. , Gui M. Y. , Jin Y. R. , Zhang Y. H. , Wang X. , Li X. W. . Chem. Res. Chinese Universities[J], 2009, **25**(2) : 297—301
- [9] Zhang K. , Wang X. , Ding L. , Li J. , Qu C. L. , Chen L. G. , Jin H. Y. , Zhang H. Q. . Chem. Res. Chinese Universities[J], 2008, **24**(6) : 707—711
- [10] ZHANG Hua-Rong(张华蓉), ZHANG Han-Qi(张寒琦), WANG Yu-Tang(王玉堂), LI Dan(李丹), DING Lan(丁兰). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(11) : 2061—2065
- [11] LI Li(李丽), LIU Chun-Ming(刘春明), WU Wei(吴巍), YUE Hao(越皓), LIU Zhi-Qiang(刘志强), LIU Shu-Ying(刘淑莹), TIAN Cheng(田成). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)[J], 2005, **33**: 1087—1090
- [12] Li M. , Hu B. , Li J. Q. , Chen R. , Zhang X. , Chen H. W. . Anal. Chem. [J], 2009, **81**: 7724—7731
- [13] Gu H. W. , Hu B. , Li J. Q. , Yang S. P. , Han J. , Chen H. W. . Analyst. [J], 2010, **135**: 1259—1267
- [14] Hu B. , Peng X. J. , Yang S. P. , Gu H. W. , Chen H. W. , Huan Y. F. , Zhang T. T. , Qiao X. L. . J. Am. Soc. Mass Spectrom. [J], 2010, **21**: 290—293
- [15] Chen H. W. , Yang S. P. , Li M. , Hu B. , Li J. Q. , Wang J. . Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2010, **49**: 3053—3056
- [16] Chen H. W. , Venter A. , Cooks R. G. . Chem. Commun. [J], 2006, **2006**: 2042—2044
- [17] CHEN Huan-Wen(陈焕文), HU Bin(胡斌), ZHANG Xie(张燮). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)[J], 2010, **38**: 1069—1088
- [18] Law W. S. , Wang R. , Hu B. , Christian B. , Lukas M. , Chen H. W. , Renato Z. . Anal. Chem. [J], 2010, **82**: 4494—4500
- [19] DING Jian-Hua(丁健桦), YANG Shui-Ping(杨水平), LIU Qing(刘清), WU Zhuan-Zhang(吴转璋), CHEN Huan-Wen(陈焕文), REN Yu-Lin(任玉林), ZHENG Jian(郑健), LIU Qing-Jun(刘清珺). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2009, **30**(8) : 1533—1537
- [20] Wang X. M. , Sakuma T. , Ebenezer A. A. , Shiu G. K. . Anal. Chem. [J], 1999, **71**: 1579—1584
- [21] Chan T. W. D. , But P. P. H. , Cheng S. W. , Kwok I. M. Y. , Lau F. W. , Xu H. X. . Anal. Chem. [J], 2000, **72**: 1281—1287
- [22] Ma X. Q. , Xiao H. B. , Liang X. M. . Chromatographia. [J], 2006, **64**: 31—36
- [23] WANG Jiang(王姜), YANG Shui-Ping(杨水平), YAN Fei-Yan(鄢飞燕), LIU Yan(刘艳), LI Ming(李明), SONG Yu-Hang(宋宇航), ZHAN Ye-Bing(占叶兵), CHEN Huan-Wen(陈焕文). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学)[J], 2010, **38**: 353—357

Rapid Detection of Ginsenosides Using NanoEESI-MS

HU Bin¹, YUE Hao², HUANG Ke-Ke^{3*}, JIANG Cui-Cui¹, LIU Shu-Ying²,
FEI Qiang³, CHEN Huan-Wen^{1*}

(1. Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation, East China Institute of Technology,
Nanchang 330013, China;

2. Ginseng Science Academy of Jilin Province, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

3. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract A novel method for rapidly detecting ginsenosides was developed based on nano electrospray extractive ionization(NanoEESI) tandem mass spectrometry. Without any chromatographic separation, the raw extract of ginseng roots were directly introduced to the gasless NanoEESI source for production of sodiated ions of ginsenosides. The signals of ginsenosides $[M + Na]^+$ were identified by tandem mass spectrometry. The characteristic fragmentation patterns were therefore used as molecular markers to differentiate ginseng roots from platycodon grandiflorum and phytolacca acinosa rox, which are two typical plant roots illicitly used as ginseng roots in the herb medicine market. Acceptable sensitivity, reproducibility and fast speed were obtained for the tested samples, showing that nano extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry is a useful technique for fast screening ginseng products or other traditional Chinese medicinal materials.

Keywords NanoEESI; Mass spectrometry; Ginsenosides; Rapid analysis

(Ed. : I, K)