

应用纪要

使用ACQUITY RDa检测器进行人参化合物 筛查

Lisa Reid, Lauren Mullin, Giorgis Isaac, Robert S. Plumb, Jayne Kirk

Waters Corporation



摘要

利用Waters ACQUITY RDa检测器（一种高分辨率LC-MS飞行时间(ToF)质量分析器）对人参进行快速、准确的筛查。这款紧凑型台式飞行时间质谱仪的动态范围高达3个数量级，对离子和碎片离子的质量精度高（始终在±5 ppm以内），非常适合用作天然产物筛查和真伪试验的主力分析工具。

将ACQUITY RDa检测器与waters_connect软件平台和UNIFI应用程序结合使用，数据采集和处理可在一套系统上一并执行。结合轻松定制的工作流程与谱库搜索功能，简化并加快了分析和处理过程，产生清晰显示的结果，这些结果可轻松转换为报告格式。

优势

- 全面的筛查谱库可同时在正极性和负极性模式下快速处理数据
- 先进的数据可视化、处理和报告工具
- 利用精确质量数和碎片离子匹配鉴定人参基质中的化合物
- 系统性能稳定、可重现，质量精度高，对人参皂甙的动态范围高达3个数量级

简介

几千年来，人参根经炮制后被用于各种治疗目的，其作用归因于活性化合物人参皂甙。如今，市售天然治疗产品中存在许多种类的人参，例如：亚洲人参(*Panax ginseng*)、日本人参(*Panax japonicus*)、西洋参(*Panax quinquefolium*)和三七(*Panax notoginseng*)。据信，不同种类人参的治疗特性各不相同，有时甚至截然相反，这可能是由于人参皂甙特征因人参品种不同而存在很大差异¹。

人参皂甙主要包含两组化合物：原人参二醇(PPD)组包括Rb1、Rb2、Rc、Rd、Rg3、Rh2和Rh3；原人参三醇(PPT)包括Rg1、Re、Rf、Rg2和Rh1²。据报道，西洋参富含原人参二醇(PPD)组中的某些人参皂甙，例如Rb1和Rd；而高丽参富含原人参三醇(PPT)组中的某些人参皂甙，例如Rf，其不存在于西洋参中。除不同物种之间的人参皂甙特征存在差异外，植物化学特征还可能受到以下因素的影响：根龄、收获时间、储存条件或炮制过程；特别值得注意的是，某些人参皂甙以热不稳定的丙二酰形式天然存在（如Rg1和Rd），经蒸煮后可能转化为对应的人参皂甙³。

在欧盟和美国，市面上任何声称具有治疗特性的天然产物都必须遵守严格的法规要求。这些地区只允许销售经英国药品和健康产品管理局(MHRA)或美国食品药品监督管理局(FDA)等机构评估的产品。这些机构强制要求制造商必须遵守严格的质量控制程序，证明产品按照严格的标准生产，并确保其所含活性成分的剂量一致且清晰标注。法规指出，制造商和合同检测机构必须明确证明其产品中所含天然材料的来源、纯度和数量。

本文所述方法根据色谱保留时间、精确质量数和碎片离子谱图（基于理论谱图和分析推导得出）来鉴定已知的人参成分。本研究重点关注活性成分人参皂甙，证明了所述方法的选择性和动态范围。ACQUITY RDa检测器是一种飞行时间质量分析器，相比传统的选择离子监测模式定量分析具有明显优势，因为所有数据均在“全扫描”模式下采集，意味着无需在检测前预选离子。该仪器非常适合在生产之前对原料进行纯度和污染评估。与UNIFI软件包结合使用，谱库搜索、数据处理和报告生成过程简单又快速，并且全都集中在一个平台上完成，无需导出结果或数据，不会影响数据完整性。

实验

样品描述

用70:30 v/v甲醇:水将人参USP提取物（部件号：Y0001029，Sigma，英国多塞特）稀释为浓度2.5 mg/mL的溶液，涡旋混合，超声处理30 min，然后在4 °C下以13,000 g离心10 min以除去颗粒。

用70:30甲醇:水稀释人参皂甙标准品（部件号：G-015-1ML，Sigma，英国多塞特），绘制人参皂甙标准曲线。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-ClassFTN
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) (部件号：186003539)
柱温：	40 °C
进样体积：	10 μL
流速：	0.6 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度：流动相A在0~3 min从95%降至70%，3~7 min保持在70%，7~12 min从70%降至55%，12~18 min从55%降至5%，18~20 min保持1%，20~22 min重新平衡至初始条件

质谱条件

质谱系统：ACQUITY RDa检测器

电离模式：同时采用正离子和负离子模式

采集范围：50-2000

扫描速度：10 Hz

毛细管电压：0.7 kV（负离子模式），1.5 kV（正离子模式）

锥孔电压：30 V（负离子模式），40 V（正离子模式）

碎裂锥孔电压：120-170V

IDC：开

软件：搭载UNIFI 1.9.12的waters_connect

ACQUITY RDa检测器采用SmartMS技术，可自动执行系统设置。因此，所有校准、调谐和实时质量校正优化均在分析之前由仪器执行，并在每次进样间隙进行检查，无需手动操作。需要采用以下溶液：

实时校正标准液：ACQUITY RDa检测器实时校正标准液试剂盒（沃特世部件号：186009298）

校准液：ACQUITY RDa检测器校准和清洗套件（沃特世部件号：186009183）

清洗溶液：

ACQUITY RDa检测器校准和清洗套件（沃特世部
件号：186009183）

结果与讨论

本分析所用样品为市售人参基质和人参皂甙混标，样品制备方法是：先简单稀释液体标准品或复溶冻干基质，然后离心以除去颗粒。未对人参基质进行净化。

使用ACQUITY UPLC I-Class色谱系统和ACQUITY RDa检测器，在正离子和负离子采集模式下分析进样体积为10 μ L的2.5 mg/mL人参基质标准品。对照UNIFI信息学平台中的人参谱库进行组分匹配。该谱库根据色谱保留时间（对于给定方法）、质量精度以及相比理论碎片离子谱图存在的碎片离子来辅助化合物鉴定。通过人参皂甙筛选后的UNIFI谱库（包含22种人参皂甙化合物）对分析产生的数据进行处理，在负极性模式下得到18个匹配的鉴定结果（利用标准品确认了8个，仅利用质量数和理论碎片匹配即推断出10个），在正极性模式下得到17个匹配的鉴定结果（利用标准品确认了8个，仅利用质量数和理论碎片匹配即推断出9个）。

图1所示为UNIFI的典型审查窗格，其中清楚显示了鉴定出的化合物（在本例中为Rg1）、色谱峰的XIC、低能量谱图和高能量谱图以及在样品中鉴定出的其他化合物的导航表。高能量谱图中的母离子和碎片离子可能在外观上与低能量谱图（显示在高能量谱图上方）匹配。高能量谱图中显示了鉴定结果呈阳性的碎片离子，可展开这些碎片离子以显示拟定的相应化学结构（如图所示）。

UNIFI处理工具还能够对“不明”组分制表。筛选出不明化合物，将其纳入处理部分或从中排除，具体取决于需要确认已知成分还是进行全面筛查。

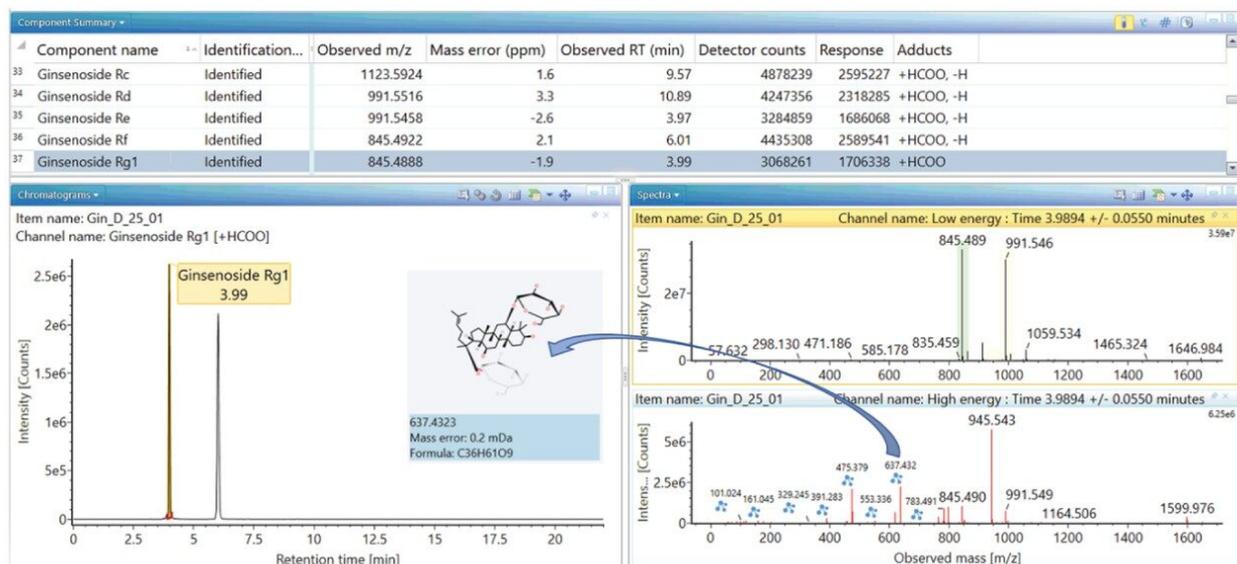


图1. UNIFI软件界面，展示了一次选定进样的鉴定结果表，其中包括各种化合物汇总、选定化合物的XIC（在本例中为人参皂甙Rg1）以及选定化合物的低能量谱图和高能量谱图。高能量谱图显示了鉴定出的碎片离子，可展开这些碎片离子以查看碎片离子质量数信息和结构，如图所示。

除谱库搜索以外，本研究还测试了系统适用性动态范围，以确保典型分析浓度下的数据可信度。在该评估中，我们使用市售人参皂甙标准品制备一系列稀释液，浓度范围0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；每个浓度进样10 μL ，得到的柱上进样量范围为10 pg (0.01 ng)~500 ng。在负离子模式下执行分析，结果表明这些化合物在ACQUITY RDa检测器上的线性范围达到2~3个数量级。柱上进样量为1 ng时，所有8种人参皂甙化合物的信噪比均大于400，重复进样的重现性良好，RSD小于1.4%。柱上进样量为0.01 ng时，可以看到所得峰的信噪比(S/N)均大于5；柱上进样量为0.1 ng时，可以看到所得峰的信噪比均大于70；但这两种浓度重复进样所得到的响应重现性RSD均大于10%，此变化过大，不符合可靠的统计分析的要求。研究确定，混标中所有人参皂甙化合物的柱上进样量为250 ng时，系统性能即达上限。柱上进样量为500 ng时，色谱柱表现出过载迹象，导致峰展宽，但是所有化合物重复进样的重现性仍然很好，响应%RSD均小于4.3%。

除市售混标以外，本研究还分析了五种浓度的人参测试基质，这些基质的颗粒前浓度相当于0.25 mg/mL、2.5 mg/mL、6.3 mg/mL、12.5 mg/mL和25 mg/mL（柱上载样量为2.5 μg ~250 μg ），以证明该系统适用于检测各种浓度的内源性人参皂甙。在2.5 mg/mL的典型分析浓度下，所有化合物均处于确定的动态范围内，即小于25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （或各种人参皂甙化合物的单独柱上进样量为250 ng）。表1列出了在各种人参浓度下，在确定的系统动态范围内观察到的人参皂甙化合物的详细信息。在较高浓度的基质中，某些人参皂甙信号超出确定的动态范围，但是重复进样得到的响应%RSD仍然很出色。

人参皂甙鉴定	人参基质的浓度(mg/mL)				
	0.25	2.5	6.3	12.5	25
人参皂甙Rb1			0.1 % RSD		
人参皂甙Rb2				1.2 % RSD	
人参皂甙Rc				1.1 % RSD	
人参皂甙Rd					1.1 % RSD
人参皂甙Re					1.0 % RSD
人参皂甙Rf					0.7 % RSD
人参皂甙Rg1			1.1 % RSD		
人参皂甙Rg2					0.4 % RSD

表1.不同人参浓度下处于仪器动态范围内的化合物。绿色框表示处于确定的动态范围内，蓝色表示超出确定的动态范围。框内数字表示两次重复进样之间的差异（按响应的百分比偏差计算）。

表1中的绿色框表示处于确定的动态范围内（基于响应值），蓝色框表示超出确定的动态范围，框内数字表示该浓度水平的化合物重复进样两次所得到的响应%RSD。

图2所示数据为整个分析过程中选定组分的响应（显示的化合物为人参皂甙Rg2），在显示谱图前先提供一张表格，详细列出所选的已鉴定化合物的所有分析数据、选定样品和选定组分的XIC色谱图，还有一张清晰显示分析过程中每次进样得到的化合物响应的柱形图。用户可以利用这些视图对整个分析进行直观比较，从而快速评估模式、异常或批效应。

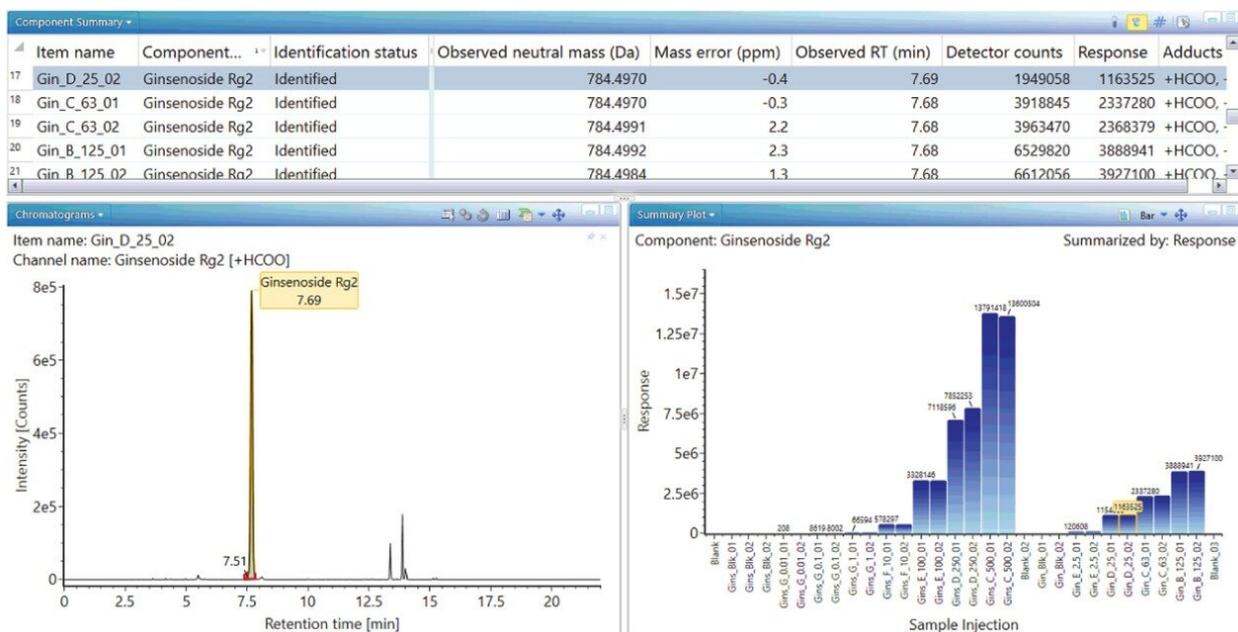


图2.UNIFI软件界面，显示了包含每个样品的总进样表、选定化合物的XIC以及汇总图，该汇总图直观地显示了分析过程中每次进样所得到的选定化合物（本例中为人参皂甙Rg2）的响应。

通过一次连续分析来分析标准品稀释系列和基质进样，系统可轻松实现超过24小时的不间断分析。在整个分析中，8种人参皂甙标准品的色谱保留时间偏差上限为0.05分钟（3秒），RSD上限为0.2%。

评估每个标准品的质量精度，得到整个分析中的偏差上限为 ± 4.7 ppm，平均ppm误差为 ± 1.3 。对每个样品重复进样两次，评估两次进样之间的信号强度和峰面积，所得结果在确定的仪器动态范围内，两次进样之间的变异上限为4.6%，响应的平均变异为1.5%（包括纯标准品和人参基质进样）。在分析的开始和结束时，使用100 ng（柱上进样量）人参皂甙标准品进样，评估整个分析过程的信号强度和峰面积稳定性。结果表明，在第1次进样和第80次进样之间（分析时间>27 h），在所有人参皂甙化合物中仅观察到信号计数发生7.8%（平均值）的变化，计算出的响应差异仅为8.0%（平均值）。

结论

ACQUITY RDa检测器为天然产物筛查应用（包括但不限于人参分析）提供了一种稳定且有效的工具。

该LC-MS系统具有优异的信号重现性、出色的质量精度和宽泛的动态范围，其体积小巧，非常适合作天然产物分析实验室的主力分析工具。将UNIFI与waters_connect联用，在同一个软件平台上集中完成数据采集和

处理工作，可确保整个工作流程快速、简化，并完全符合启用审计追踪的要求。

参考资料

1. Sengupta, S, Toh, SA, Sellers, LA, Skepper, JN, Koolwijk, P, Leung, HW, Yeung, HW, Wong, RN, Sasisekharan, R, Fan, TP. Modulating Angiogenesis: The Yin and the Yang in Ginseng. *Circulation*. 2004, 110, 1219–1225. doi: 10.1161/01.CIR.0000140676.88412.CF. Epub 2004 Aug 30. PMID: 15337705.
2. Zhu, J, Liang, Y, Yue, S, Fan, G, Zhang H, Zhang M. Combination of Panaxadiol and Panaxatriol Type Saponins and Ophioponins From Shenmai Formula Attenuates Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Injury in Cardiac Microvascular Endothelial Cells by Blocking NF-kappa B Pathway, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2017, 69(3), 140–146. doi: 10.1097/FJC.0000000000000450
3. Wang, C; Ni, M; Sun, S; Li, X; He, H; Mehendale, S; Yuan, C. Detection of Adulteration of Notoginseng Root Extract with Other *Panax* Species by Quantitative HPLC Coupled with PCA. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 2363–2367.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

UNIFI天然产物解决方案 <<https://www.waters.com/134777097>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007139ZH, 2021年2月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.