

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术分析 三七和海兔神经连索内的皂甙组分

冯丽剑¹ 黄琳^{1,3} 卓慧钦¹ 黄河清^{*1,2,3}

(厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术学系¹, 近海海洋环境科学国家重点实验室²,
化学化工学院化学生物学系³, 厦门 361005)

摘要 基质辅助激光解吸电离飞行时间 (MALD FTOF) 质谱技术能高效解吸三七提取液 (Panax notoginseng Extraction, PNE) 中的混合皂甙分子为皂甙离子, 并供质量分析器检测与分析。选用 MALD FTOF 质谱技术直接分析色谱纯皂甙样品的纯度, 其检测灵敏度优于反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)。优化提取中药三七 (Panax notoginseng, PN) 的混合皂甙, 选用 MALD FTOF 质谱技术直接分析 PNE 中的皂甙种类和相对含量, 发现 PNE 至少含有 20 种不同分子结构的皂甙组分, 其中人参皂甙 (Ginsenoside) Rg1 和三七皂甙 (Notoginsenoside) R1 含量相对较高。选用薄板层析法 (TLC) 制备 PNE 中的 R1 皂甙。MALD FTOF 质谱技术研究蓝斑背肛海兔 (Notarcus leachiicirrosus Stimpson, NLCS) 神经连索内的超微量 R1 的组成与分布。建立 PNE 皂甙的指纹图谱, 并适合于评价中药三七的品质和分析体内超微量皂甙的代谢过程与机理。

关键词 三七, 皂甙, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱, 指纹图谱

1 引言

人参 (Ginsenoside) 和三七 (Panax notoginseng) 是常用的名贵中药材之一, 主要用于治疗各种出血瘀血之症以及跌打损伤, 瘀滞肿痛, 具有止血不留瘀和增强免疫力等独特功效^[1,2]。皂甙是三七药材中的重要活性成分, 由人参皂甙 Rb1, Rg1, Re 和三七皂甙 R1 组成^[2]。近年来, PNS 在神经系统疾病治疗方面和药理学研究已引起重视。三七皂甙 (Panax notoginseng saponins, PNS) 不仅具有增强记忆功能^[3], 而且还是治疗许多神经退行性疾病相关的神经元死亡和记忆衰退等有效阻断剂^[4]。有关 PNS 的药理尚不清楚, 仅有少量的研究报道^[3,5], 推测与目前尚未建立高效、高灵敏度且能连续监测的皂甙成分的分析技术有关。

目前, 已从三七的不同部位中分离出二十几种皂甙, 其中多数皂甙与人参皂甙的成分相同, 即为达玛烷型的 20(S) 原人参二醇型 [20(S) protopanaxadiol], 如: Rb1, Rb2, Rc, Rd 等组分; 20(S) 原人参三醇型 [20(S) protopanaxatriol], 如: Re, Rf, Rg1, Rg1, Rh1 等组分, 其中 Rg1 和 Rb1 含量最高^[6,7]。除人参皂甙组分以外, PNS 也含有三七皂甙, 如: R1, R2, R4, R6, Fa, Fc, Fe 等组分^[8,9], 其中 R1 的含量相对较高。有关皂甙 R1 的药效和药理学的研究也甚少。

采用柱层析法、高效液相色谱-蒸发光散射法^[10]、薄层层析法、液滴逆流层析法、气相色谱、高效液相色谱^[11]和液质联用技术^[12], 分离与鉴定色谱纯的人参和三七皂甙的分子结构与组成已见报道, 但对制备质谱纯的皂甙单体且用于药物疗效的研究甚少, 从而限制了深入研究皂甙药理学和皂甙免疫增强机理。

MALD FTOF 质谱分析技术具有快速、简单、高灵敏度和高分辨率等特点, 但用于直接分析皂甙分子结构与组成的研究报道也甚少。本研究采用 MALD FTOF 质谱技术直接分析 PNE 和海兔神经连索内的皂甙组成和相对含量, 本方法适合评价三七的药材品质、皂甙药效和体内代谢途径与机理。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

REFLEX 型 MALD FTOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 1100 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); GEN-

2009-05-11 收稿; 2009-07-24 接受

本文系“973”项目 (No. 2010CB12640) 和国家自然科学基金 (No. 40776060) 资助项目

* E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

ESYSZ型紫外-可见分光光度计(美国 Water公司); LABCONCO Fzone 18冻干机(美国 Labconco公司)。

三氟乙酸(TFA)和乙腈(HPLC级,德国 Merck公司); 胰蛋白酶(V5111, Promega公司); 基质: 氟-4羟肉桂酸(HCCA,美国 CN 生物医学公司)。

2.2 标准人参皂甙和三七皂甙提取与分离

用超纯水分别配制 0.1 g/L 人参皂甙 Rg1, Rb1, Re 标准溶液。以 0.1 mg 三七皂甙 R1 混合溶液, 作为标准品。取三七粉末 0.6 g, 加入乙醇 50 mL, 放置过夜, 置 80 °C 水浴上保持微沸至乙醇挥发干净, 再加入 50 mL 超纯水溶解样品。按照文献 [1, 5] 的 HPLC 方法分离与鉴定三七提取液中的皂甙成分与含量, 制备色谱纯的皂甙单体。以乙腈为流动相 A, 以水为流动相 B, 在 0~12 min, 以 0~19% A 进行梯度分离; 在 12~60 min, 以 19%~36% A 进行梯度分离。检测波长为 203 nm。

2.3 薄层层析分离板制备

取三七粉末 0.5 g, 加水 5 滴, 搅匀。再加以水饱和的正丁醇 5 mL, 振摇 10 min, 放置 2 h, 离心, 取上清液。加用正丁醇饱和的水 3 倍量, 摇匀, 放置使分层。取正丁醇层, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试液。取人参皂甙 Rb1, Rg1, Re 和三七皂甙 R1 加甲醇制成 2.5 g/L 的混合液, 作为对照液。分别取供试品和对照液 10 μ L, 点于同一硅胶 G 薄层板上, 冷风吹干。置于盛有展开剂的层析缸内展开, 待展开剂的前沿距离硅胶板底部约 1 cm, 取出, 挥干溶剂, 均匀喷 H₂SO₄ 乙醇显色剂后, 在 105 °C 加热 10 min 显色鉴定。

TLC 展开剂为 V(氯仿) : V(甲醇) : V(水) = 55 : 35 : 10 混合溶液; H₂SO₄ 乙醇显色剂为 V(H₂SO₄) : V(乙醇) = 1 : 9 混合溶液; 水饱和的正丁醇: 取过量水加入正丁醇溶液中充分振荡, 静置使其分层, 取上层; 正丁醇饱和的水: 取过量水加入正丁醇溶液中充分振荡, 静置使其分层, 取下层。

2.4 海兔神经连索中的内含物提取

按 2.3 节描述的方法制备三七的 R1 组分。海兔给药 (R1) 方式和海兔神经连索分离的方法均参见文献 [1]。海兔神经连索内的多肽与皂甙组分均参见文献 [13, 14]。

2.5 质谱分析

2.5.1 质谱基质配制 50 mmol/L 氟-4羟肉桂酸(HCCA)/40%乙腈/60%的 0.1%三氟乙酸水溶液: 40 μ L ACN + 60 μ L 0.1% TFA, 加入足量的 氟-4羟肉桂酸, 配成 HCCA 饱和溶液, 然后超声处理 5 min, 8000 g 离心 5 min, 取上清液使用, 每次新鲜配制。

2.5.2 MALD FTOF 质谱分析 吸取待分析样品 0.8 μ L 与等体积基质均匀混合、点样, 作质谱分析。质谱条件: 脉冲氮激光 (337 nm) 作为离子解吸电离源。选用反射模式, 离子源加速电压 1 为 20 kV, 加速电压 2 为 23 kV, 脉冲 3 ns, 离子延迟 2000 ns, 真空度 114×10^{-7} Torr 为分析基本条件。平均每次测定样品的激光脉冲次数约 120 次。采用外标法标定多肽质谱峰峰位 [13]。

2.5.3 HPLC-Q-TOF 质谱分析 选用 HPLC-Q-TOF 质谱仪测定三七皂甙提取液中的混合样品组分, 佐证 MALD FTOF 质谱技术鉴定 PNE 皂甙组成。

3 结果与讨论

3.1 RP-HPLC 技术鉴定皂甙标样的纯度

选用 RP-HPLC 技术分离皂甙标样 Rb1, R1, Re 和 Rg1, 拟了解皂甙标样是否已达到色谱纯纯度的要求, 并获得图 1 结果。由图 1 可见, 皂甙标样 Rb1, R1 和 Re 均达到较高的色谱纯度, 而 Rg1 含有微量的杂皂甙 (图 1a-1)。收集色谱纯皂甙标样, 供定性和半定量分析中药三七内的皂甙组成和相对含量。

3.2 MALD FTOF 质谱技术分析皂甙标样的纯度

若液质联用仪中的液相色谱无法分离混合皂甙为单一的皂甙单体, 就难以用质谱检测器对不同皂甙种类、组成、结构进行逐一分析与鉴定。图 2 是采用 MALD FTOF 质谱分析技术直接分别测定色谱纯的人参和三七皂甙质谱图。由图 2 可见, 皂甙标准品 Rb1, Rg1, Re 和 R1 样品中, 除了 Rg1 外, 其余样品均混含有其它皂甙杂质, 均属于非质谱纯皂甙样品。Rb1 皂甙标样 (图 2a) 中有 4 个不同质荷比的质谱峰, 即 m/z 788.72, 858.37, 1130.50 和 1146.50。通过皂甙标准分子量和相关文献资料对比后, 推测

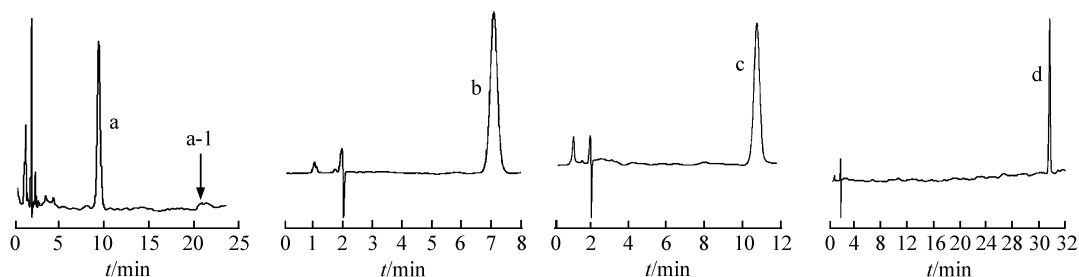


图 1 RP-HPLC技术分离皂甙标样的色谱图

Fig 1 Chromatogram maps of standard saponin samples separated with RP-HPLC

a Rg1样品 (Samples); b R1样品 (Sample); c Re样品 (Sample); d Rb1样品 (Sample)。

对应的分子式为 $[Rg3 + Li - H]^+$, $[Rg1 + FA + OH - 3H]^+$ (FA为甲酸根, $M_w: 45$ Da), $[Rb1 + Na]^+$, $[Rb1 + Cl + 3H]^+$, Rb1皂甙标样主要以 Rb1为主,含有少量 Rg3和 Rg1杂质。图 2b是 Rg1标样的质谱图,其 m/z 822.75的单一质谱峰,标样纯度已达到质谱纯,推算出分子式为 $[Rg1 + Na]^+$ 。类似图 2a结果, Re标样中也含有少量皂甙杂质,有 3个质谱峰,即 m/z 788.87, 817.95和 968.81,推算出分子式为 $[Rg3 + 4H]^+$, $[Rg3 + Cl]^+$, $[Re + Na]^+$ 。比较图 2c中质谱绝对强度,可获悉 Re相对含量最高。在 R1标样中(图 2d)有 6个质谱峰, m/z 774.89, 804.13, 828.61, 860.39, 876.29和 954.76;经推算它们的分子式为 $[R2 + 5H]^+$, $[Rg1 + 4H]^+$, $[Rg1 + Na + 5H]^+$, $[Rg1 + FA + OH - H]^+$, $[Notoginsenoside Fc - FA + 5H]^+$, $[R1 + Na]^+$ 。比较图 1d相对质谱峰强度,可获悉,类似 Rb1标样(图 2a)的纯度,R1标样中同样含有较高的其它皂甙杂质,但 R1含量相对最高。显然,选用色谱纯的皂甙用于药理学和代谢过程的研究,可能因纯度不够,而影响实验结果的可信度,尤其推算的皂甙降解过程。选用 MALD FTOF质谱技术评价皂甙的纯度优于高效液相色谱法或其它 HPLC-MS法,适合于分析生物体内中微量或超微量皂甙组成、相对含量和分子结构。

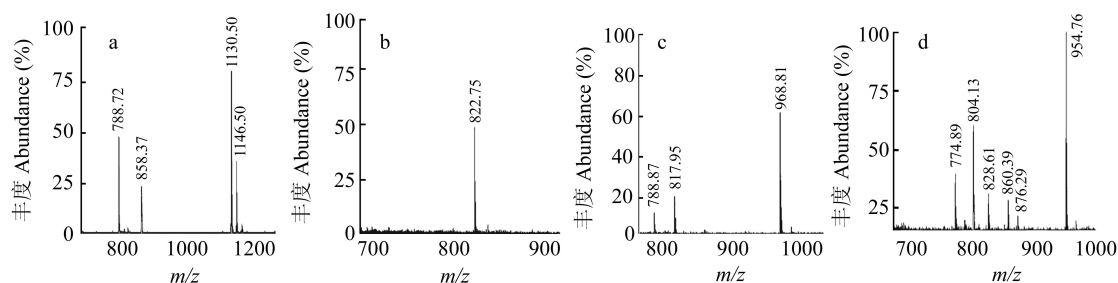


图 2 MALD FTOFMS技术分析皂甙标样的质谱图

Fig 2 Mass spectra of standard saponins samples analyzed with MALD FTOFMS

a Rg1样品 (sample); b R1样品 (sample); c Re样品 (sample); d Rb1样品 (sample)。

3.3 MALD FTOF质谱技术分析 PNE皂甙组成

来自 MALD FTOF质谱仪的激光和在基质辅助下能将混合皂甙分子转化成皂甙离子,并被 TOF质量分析器分离与检测,显示对应的质谱峰(图 2)。选用相同的分析技术,可获得三七皂甙提取液(PNE)内的混合皂甙质谱图(图 3)。从图 3显示的总质谱峰数可初步推算 PNE样品中至少含有 20种不同分子结构或组分的皂甙。根据皂甙的质荷比值不同和质谱峰簇涵盖质荷比范围,可将图 3中显示的皂甙质谱峰划分为 a, b, c和 d区域,并进行逐一解释。图 3a区由 6个质谱峰组成,其 m/z 为 789.64, 805.58, 823.61, 839.56和 859.49,推算所对应的皂甙分子式为 $[Rg1 - OH + 7H]^+$, $[Rg1 + 6H]^+$, $[Rg1 + Na]^+$, $[Rg1 + K]^+$, $[Rg1 + FA + OH]^+$,显然图 3a中的质谱峰均为 Rg1组分。图 3b区由 m/z 为 905.53, 920.72, 955.78, 969.62和 985.60的皂甙质谱峰组成。推算所对应的分子式为 $[Gypenoside - FA]^+$, $[Gypenoside Fc + 5H]^+$, $[R1 + Na]^+$, $[R1 + Cl + 2H]^+$ 和 $[Rd + K]^+$,以 R1和 Re为主的皂甙样品。图 3c区域由 5个质谱峰组成, m/z 为 1072.71, 1080.09, 1131.67, 1147.65和 1163.67,推算所对应的皂甙分子式为 $[Rb2 - 5H]^+$, $[Rb2 + 2H]^+$, $[Rb1 + Na]^+$, $[Rb1 + FA + Na + 2H]^+$ 和

$[\text{Rb1} + 2\text{FA} - 5\text{H}]^+$ 。图 3d 也是由 5 个质谱峰组成, m/z 为 1217.70, 1233.69, 1263.71, 1279.73 和 1320.73, 推算所对应的皂甙分子式为 $[\text{Ra2} + 7\text{H}]^+$, $[\text{Ra2} + \text{Na}]^+$, $[\text{Ra3} + \text{Na}]^+$, $[\text{Notoginsenoside Fa} + \text{Cl} + 3\text{H}]^+$ 和 $[\text{Notoginsenoside Fa} + \text{FA} + \text{Cl}]^+$, 但含量相对较低。

参考图 3 中总皂甙各组分所对应的质谱峰绝对强度, 其中 m/z 789.64 $[\text{Rg1-OH} + 7\text{H}]^+$, m/z 823.61 $[\text{Rg1} + \text{Na}]^+$, m/z 969.62 $[\text{R1} + \text{Cl} + 2\text{H}]^+$, m/z 1131.67 $[\text{Rb1} + \text{Na}]^+$, m/z 1147.65 $[\text{Rb1} + \text{FA} + \text{Na} + 2\text{H}]^+$ 对应的 5 个质谱峰的绝对强度明显高于其它皂甙组分, 即 Rg1, Rb1 和 R1 含量明显高于其它皂甙组成, 认为三七皂甙中的皂甙相对浓度可能为 $C_{\text{Rb1}} > C_{\text{Rg1}} > C_{\text{R1}}$ 。Rg1, Rb1 和 R1 总皂甙含量是中药三七的主要皂甙组成, 这一结论与采用 RP-HPLC 分离并鉴定 Rg1, Rb1 和 R1 皂甙含量占 PNE 总皂甙 80% 的结论是一致的。为了佐证这些论点和实验结果, 选用 HPLC-Q-TOF 分析技术, 进一步分析部分皂甙分子结构, 进一步揭示选用 MALDI-TOF 质谱技术分析中药三七皂甙的组成和分子结构的可行性。

3.4 MALDI-TOF 质谱技术分析由薄层色谱法制备 R1 皂甙的纯度

TLC 属于经典色谱法之一。由于 TLC 操作简便、色谱结果直观、显色方式可选性大以及兼分离鉴定双重功能和分离设备廉价等优点, 故应用广泛。对于成分复杂不明, 或含无挥发性、低紫外光吸收的中药的分离与鉴定, TLC 显示出独特的优势。但 TLC 作为一种开放式的色谱分离系统, 其色谱行为极易受外界因素的影响, 其精度比 HPLC 低。根据色谱纯皂甙标样在硅胶层析板 (TLC 法) 上显示 Rf 值, 分离与制备 PNE 样品中的 R1 皂甙组分, 并用于研究 R1 皂甙在海兔神经连索中的诱导、代谢和分布情况。图 4 是从三七中分离出的 R1 皂甙质谱图, 显示了 3 个质谱峰, 其质谱峰的数目少于 R1 标样, 说明了选用 TLC 技术制备纯度较高的 R1 皂甙标样, 所对应的皂甙质 m/z 为 789.48, 818.58 和 955.54, 推算皂甙的基本分子式为 $[\text{Rg1} + 4\text{H}]^+$, $[\text{Rg1} + \text{OH} + 2\text{H}]^+$ 和 $[\text{R1} + \text{Na}]^+$ 。RP-HPLC 实验结果已指出, PNE 中的 R1 和 Rg1 之间的出峰保留时间相当靠近, 显示出较低的分辨率^[1], 因而选用 TLC 分离 PNE 皂甙样品过程中, R1 和 Rg1 组分之间也显示出较低的分辨率, 造成 R1 样品中含有微量 Rg3 皂甙, 非质谱纯样品, 但属于色谱纯 R1 皂甙样品, 并用于研究生物体内 R1 皂甙的代谢途径和机理。

3.5 MALDI-TOF 质谱技术分析海兔神经连索中的 R1 皂甙

海兔 (*Aplysia*) 中枢神经系统 (Central nervous system, CNS) 结构很简单, 并具有易分离和细胞定位的特点, 因而它的 CNS 一直是神经分子生物学的经典分析模型^[15,16]。海兔神经连索起着神经节之间参与信号传导物质传递的通道, 分析神经连索内的有机小分子、多肽、蛋白质组分, 有利研究神经节之间的信号传导和海兔的行为表达机理。选用直接注射法, 将色谱纯 R1 皂甙注入海兔体内, 研究 R1 在神经节内的代谢途径, 了解 R1 在神经连索内的传递情况。图 5a (对照) 是海兔神经连索的多肽质谱图。从图 5a 可见, 海兔神经连索含有丰富的神经多肽和有机小分子, 但多数组分含量均极低, 难以采用现有萃取和富集技术获得足够量供质谱分析。图 5b 是海兔经 R1 诱导后的神经连索质谱图。图 5b 显示神经

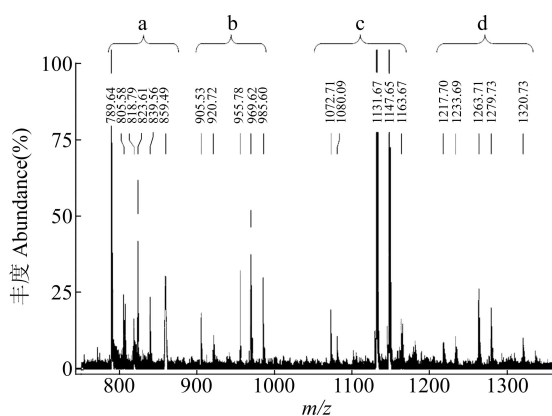


图 3 MALDI-TOF 质谱技术测定 PNE 皂甙组分的质谱图
Fig 3 Mass spectrometry of panax notoginseng (PNE) saponins measured with MALDI-TOF mass spectrometry
a m/z 760 ~ 860; b m/z 890 ~ 990; c m/z 1000 ~ 1200; d m/z 1200 ~ 1350

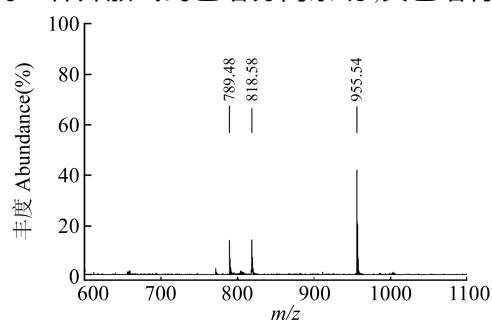


图 4 TLC 法制备三七 R1 皂甙的质谱图
Fig 4 Mass spectrometry of R1 saponin prepared with TLC method in Panax notoginseng

连索内不仅含有丰富的多肽,而且还发现 R1 和 Rg1 皂甙质谱峰,这意味着 R1 和它的杂皂甙 Rg1 借助神经连索为通道,在神经节之间进行传递与诱导,使海兔神经连索表达出差异蛋白质^[1]。MALD FTOF 质谱技术适合于研究海兔神经节及连索内超微量的多肽、酶蛋白。

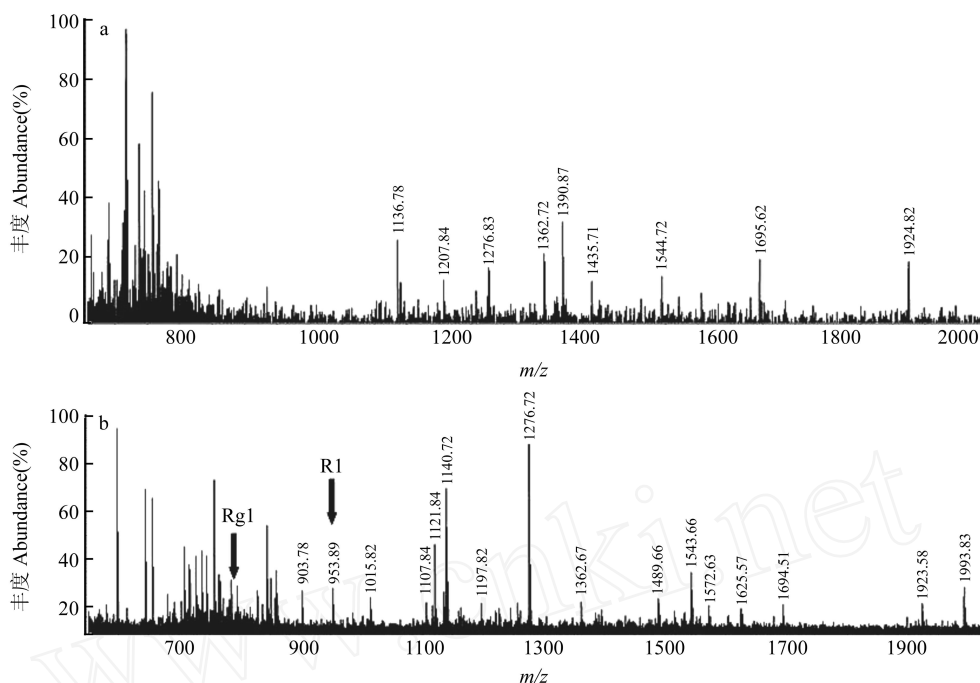


图 5 MALD FTOF 质谱技术分析 R1 皂甙在海兔神经连索中的代谢与分布情况

Fig 5 Metabolism and distribution of R1 saponin analyzed with MALD FTOF mass spectrometry in the neural connective of *Aplysia*

a 对照 (Control); b R1 诱导的神经连索 (Neural connective under the stress of R1)。

3.6 结论

RP-HPLC 和 TLC 分离技术难以制备质谱纯的三七皂甙单体,以满足皂甙单体药理学和免疫增强途径与机理的研究。MALD FTOF 质谱技术能高效地将三七单味中药的混合皂甙分子转化成皂甙离子,供质量分析器进行分析与监控,不需要进行预分离,弥补现有 RP-HPLC 和 LC-MS 的不足,并具有高灵敏度,是目前用于鉴定人参和三气中药中的皂甙组成、相对含量和分子结构的最佳分析技术。

MALD FTOF 质谱技术适合于建立中药三七皂甙的指纹图谱,并能为评价三七或人参的品质提供更加科学与合理的评价指标。MALD FTOF 质谱技术适合直接分析体内或神经节内的超微量皂甙含量和分布,为研究皂甙代谢途径和药理学研究提供简单且快速的新颖分析技术,弥补现已建立的 RP-HPLC 和 LC-MS 分析技术的不足。

由于不同分子结构的皂甙在 MALD 样品靶上形成的离子化程度可能相似或不同,因而造成在相同皂甙浓度的条件下,不同结构的皂甙所产生的质谱峰强度可能有所差异,此结果直接影响到选用质谱峰强度定量分析皂甙含量的可信度。不同分子结构的皂甙所产生的质谱峰强度只能作为评估皂甙之间的相对含量,不能作为定量分析的依据。本方法也适合半定量分析铁蛋白 H 和 L 亚基之间的相对含量^[17,18]。

References

- 1 Sun H X, Yang Z H, Ye Y P. *Intem Immunopharmacol*, **2006**, 6(1): 14 ~ 25
- 2 Feng Li-Jian (冯丽剑), Huang Lin (黄琳), Zhuo Hui-Qin (卓慧钦), Huang He-Qing (黄河清). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2008**, 36(5): 557 ~ 582
- 3 Zhong YM, Nishijo H, Uwano T. *Physiol Behav*, **2000**, 69(4-5): 511 ~ 525
- 4 Zhu Y Z, Huang S H, Tan B K. *Bat Prod Rep*, **2004**, 21(4): 478 ~ 489
- 5 Wang H, Wu X J, Cui Y Y, Zhu L, Lu Y, Chen H Z. *Neurosci Lett*, **2005**, 383(1-2): 121 ~ 126

- 6 Sun K, Wang C S, Guo J, Horie Y, Fang S P, Wang F, Liu Y Y, Liu L Y, Yang J Y, Fan J Y, Han J Y. *Life Sci*, **2007**, 81(6): 509 ~ 518
- 7 Li L, Zhang J L, Sheng Y X, Sheng Y X, Guo D A, Wang Q, Guo H Z. *J. Pharmaceutic Biochem. Anal*, **2005**, 38(1): 45 ~ 51
- 8 Wan J B, Yang F Q, Li S P, Wang Y T, Cui X N. *J. Pharmaceutic Biochem. Anal*, **2006**, 41(5): 1596 ~ 1601
- 9 Qian Z M, Wan J B, Zhang Q W, Li S P. *J. Pharmaceutic Biochem. Anal*, **2008**, 48(5): 1361 ~ 1367
- 10 Shi Wei(石威), Wang Yu-Tang(王玉堂), Quan Xin-Jun(权新军), Bai Li-Fei(白立飞), Zhang Hua-Rong(张华蓉), Chen Xiao-Dong(陈晓东), Ding Lan(丁兰), Zhang Han-Qi(张寒琦). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2006**, 34(2): 243 ~ 246
- 11 Pan Jian-Yang(潘坚扬), Cheng Yi-Yu(程翼宇), Wang Yi(王毅), Xiao Xin-Yue(肖新月), Lin Rui-Chao(林瑞超). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2005**, 33(11): 1565 ~ 1568
- 12 Ma Xiao-Qiong(马小琼), Xiao Hong-Bin(肖红斌), Liang Xin-Miao(梁鑫淼). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2006**, 34(9): 1273 ~ 1277
- 13 Huang He-Qing(黄河清), Lu Yong-Jin(陆永进), Lin Qing-Mei(林庆梅), Zhou Hui-Qin(卓慧钦), Huang Hui-Ying(黄慧英). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2007**, 35(8): 1105 ~ 1110
- 14 Rubakhin S S, Garden R W, Fuller G R, Sweedler J V. *Nature Biotechnology*, **2000**, 18(2): 172 ~ 175
- 15 Hummon A B, Huang H Q, Kelley P, Sweedler V J. *J. Neurochem.*, **2002**, 82(6): 1398 ~ 1405
- 16 Moroz L L, Edwards J R, Puthanveetil S V, Kohn A B, Hla T, Heyland A, Knudsen L, Sahni A, Yu F H, Liu L, Jezzini S, Lovell P, Iannuccilli W, Chen M C, Nguyen T, Sheng H T, Shaw R, Kalachikov S, Panchin Y V, Famerie W, Russo J J, Ju J Y, Kandel E R. *Cell*, **2006**, 127(7): 1453 ~ 1467
- 17 Huang L, Lin Z C, Lin Q, Lou L Z, Huang H Q. *Chem. Res Chinese Universities*, **2008**, 24(5): 550 ~ 560
- 18 Lin Zhi-Cao(林志超), Lin Qing(林青), Zhu Feng(朱峰), Huang He-Qing(黄河清). *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), **2009**, 27(1): 102 ~ 106

Saponins Composition of Both *Panax notoginseng* and *Aplysia Neural Connective* Analyzed with Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry

FENG Li-Jian¹, HUANG Lin^{1,3}, ZHUO Hui-Qin^{1,2}, HUANG He-Qing^{*1,2,3}

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences¹, State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science², The Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry & Chemical Engineering³, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Mixed saponin molecules in the extraction of *Panax notoginseng* (PNE) can be effectively desorbed into the molecular ionization for measurement and analysis by mass analyzer from matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS). The saponin samples with chromatography purity were directly analyzed by MALDI-TOFMS, which indicated that the sensitivity of the method was higher than that of RP-HPLC. A technology of MALDI-TOFMS was directly employed to analyze the saponin kinds and their relative contents in *Panax notoginseng* (PN) while the saponins were perfectly extracted from the Chinese traditional medicine of PN. It was indicated that there were at least 20 saponins consisting of different molecular structure and that the content of both ginsenoside Rg1 and notoginsenoside R1 in PNE was relative high. R1 saponin was extracted and identified to follow its metabolism pathway by both thin layer chromatography and MALDI-TOFMS, respectively. The saponin fingerprinting maps in PNE can be established to evaluate the quality of PE and to study both metabolism pathway and mechanism of extra-minim saponins in vivo.

Keywords *Panax notoginseng*, saponin, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, fingerprinting maps, identification

(Received 11 May 2009; accepted 24 July 2009)