

· 化学与分析 ·

HPLC-MS/MS 快速测定远志中远志吡酮Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量

杨改红¹, 程昊², 黄群¹, 严志宏¹, 杨武亮¹, 陈海芳¹, 袁金斌^{1*}

(1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西中医药大学 基础医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立一种远志中远志吡酮Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖含量的HPLC-MS/MS分析方法。方法:采用ZORBAX Eclipse plus C₁₈色谱柱,(4.6 mm×100 mm, 3.5 μm),流动相乙腈-0.1%甲酸水(28:72),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量10 μL,柱温20℃。质谱条件:电喷雾负离子化模式,多反应监测模式(MRM),检测离子对分别为m/z 567.2~345.1(远志吡酮Ⅲ),m/z 753.3~205.1(3,6'-二芥子酰基蔗糖)。结果:两种成分的线性关系良好,分析过程只需6 min。远志吡酮Ⅲ的日内精密度和日间精密度的RSD分别为2.2%,2.5%,回收率为96.1%~101.7%(RSD 2.4%);3,6'-二芥子酰基蔗糖的日内精密度和日间精密度的RSD分别为2.3%,2.4%,回收率为95.7%~101.4%(RSD 2.0%)。结论:该方法快速、灵敏、选择性好,适合远志中远志吡酮Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖的定量分析。

[关键词] 远志吡酮Ⅲ; 3,6'-二芥子酰基蔗糖; 远志; 高效液相色谱-质谱联用

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)24-0039-04

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2014240039

Determination of Polygalaxanthone III and 3, 6'-Disinapoyl Sucrose in *Polygala tenuifolia* by HPLC-MS/MS

YANG Gai-hong¹, CHENG Hao², HUANG Qun¹, YAN Zhi-hong¹,

YANG Wu-liang¹, CHEN Hai-fang¹, YUAN Jin-bin^{1*}

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. College of Basic Medicine, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study was to develop a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the determination of the contents of polygalaxanthone III and 3, 6'-disinapoyl sucrose. **Method:** Separation was performed on ZORBAX Eclipse plus C₁₈ column (4.6 mm×100 mm, 3.5 μm) with the following settings: mobile phase acetonitrile-0.1% formic acid (28:72); flow rate 0.3 mL·min⁻¹; the injection volume 10 μL; column temperature 20℃. MS condition, electrospray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) were adopted. The most abundant precursor/product pairs were m/z 567.2-345.1 for polygalaxanthone III, and m/z 753.3-205.1 for 3, 6'-disinapoyl sucrose. **Result:** The two components showed good linearity and the analyzing process was just within 6 min. The intra-day precision and inter-day precision for polygalaxanthone III were 2.2% and 2.5% respectively;

[收稿日期] 20140403(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260605)

[第一作者] 杨改红,在读硕士,从事中药物质基础与质量控制研究,E-mail:gaihongyang0201@163.com

[通讯作者] *袁金斌,副教授,博士,从事中药物质基础与质量控制研究,Tel:0791-87118658,E-mail:kings2008@163.com

the recoveries were between 96.1% and 101.7% with RSD 2.4%. While the intra-day precision and inter-day precision for 3, 6'-disinapoyl sucrose were 2.3% and 2.4%; the average recoveries were in the range of 95.7% - 101.4% with RSD 2.0%. **Conclusion:** The method is rapid, sensitive, selective and suitable for the quantitative analysis of polygalaxanthone III and 3, 6'-disinapoyl sucrose in polygala tenuifolia.

[**Key words**] polygalaxanthone III; 3, 6'-disinapoyl sucrose; *Polygala tenuifolia*; HPLC-MS/MS

远志功能宁心安神、祛痰开窍、解毒消肿^[1], 主治心神不安、惊悸失眠、健忘、惊痫、咳嗽痰多、痲疽发背、乳房肿痛^[2]。远志是传统的益智药,早在《神农本草经》中就记载其有益智、聪耳明目、抗健忘等作用。现代药理研究也证实了远志对中枢神经系统(CNS)具有多种作用^[3]。远志化学成分比较复杂,主要包括皂苷类、甾酮类和糖酯类成分。研究发现,远志皂苷类成分具有神经细胞保护作用^[4-5];早期研究表明远志糖酯和甾酮类成分也具有很好的神经细胞保护、抗抑郁等作用^[6-7]。已有文献报道了测定远志总皂苷^[8]、远志甾酮^[9]和 3,6'-二芥子酰基蔗糖含量^[9]的 HPLC 方法,但它们的分析时间较长,选择性和灵敏度不够高。HPLC-MS 由于专属性强、灵敏度高,已经越来越多地应用于中药及其制剂的质量控制研究^[10-12]。本文建立了一种远志中远志甾酮 III 和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的 HPLC-MS/MS 分析方法,并进行了方法学验证。

1 材料

1290 系列色谱系统(美国安捷伦科技有限公司,包括二元梯度泵,自动进样器,柱温箱), AB SCIEX Q-TRAP 4500 系列质谱系统(工作站为 Analyst 1.6.1AB, 美国 SCIEX 公司)。

远志甾酮 III 对照品(批号 20127-201209)购自南昌贝塔生物科技有限公司,3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品(批号 111848-201001)购自天津士兰科技有限公司,经 HPLC 检测,纯度符合中药对照品的要求。甲醇、乙腈、甲酸(西陇化工股份有限公司),娃娃哈纯净水。陕西产药材购自河北省安国市瑞琪中药材有限公司,山西产药材为野外采集,所有药材经江西中医药大学教育部重点实验室杨武亮教授鉴定,均为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 的干燥根皮。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取远志甾酮 III, 3, 6'-二芥子酰基蔗糖对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解,定容,得 0.149, 0.228 g·L⁻¹ 对照品贮备液。

2.2 供试品溶液的制备^[1] 取药材粉末(过三号

筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 1.5 h,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀。滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件 采用 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm),流动相乙腈-0.1% 甲酸水(28:72),流速 300 μL·min⁻¹,柱温 20 °C,进样量 10 μL。

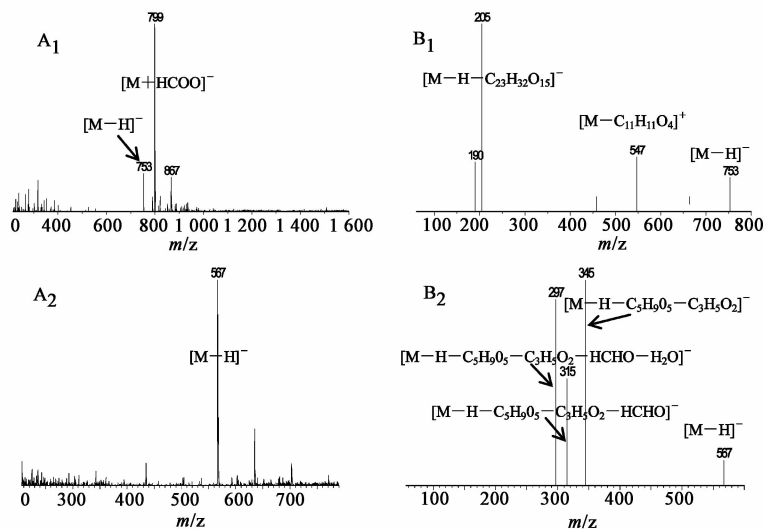
2.4 质谱条件的优化 离子源条件:气帘气 30 psi, 喷雾气中等,离子化电压 -4 500 V,温度 350.0 °C, 喷雾气 60 psi,辅助加热气 40 psi。

将对照品溶液稀释,得到 100 μg·L⁻¹ 的溶液,通过注射进样泵连续进入质谱。采取负离子方式,在 Q1MS(Q1)模式下,调整去簇电压(DP),选取丰度较大的母离子 567.2(远志甾酮 III);在 Product Ion(MS2)模式下,调整碰撞能量(CE),选取响应值较大的子离子 345.1, 296.9;在 MRM 模式下优化 DP, CE, 碰撞池出口电压(CXP)。以同样的方式确定 3,6'-二芥子酰基蔗糖的母子离子对 753.3 ~ 205.1, 753.3 ~ 189.9, DP, CE, CXP,得到的优化参数见表 1,两种化合物的一级、二级质谱见图 1。

表 1 远志中两种化合物的质谱优化条件

化合物	母离子	子离子	DP	CE	CXP
			/V	/V	/V
远志甾酮 III	567.2	345.1	-8	-50	-16
		296.9	-8	-42	-12
3,6'-二芥子酰基蔗糖	753.3	205.1	-35	-41	-6
		189.9	-35	-81	-10

2.5 线性关系的考察 分别精密吸取两种对照品贮备溶液,用甲醇将其分别稀释至适当的 6 个浓度,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,回归方程、线性范围和相关系数见表 2。根据质谱优化过程和标准曲线的相关参数,远志甾酮 III 选用 567.2 ~ 345.1, 3,6'-二芥子酰基蔗糖选用 753.3 ~ 205.1。



A₁. 3,6'-二芥子酰基蔗糖的一级质谱; B₁. 3,6'-二芥子酰基蔗糖的二级质谱; A₂. 远志吡啶Ⅲ的一级质谱; B₂. 远志吡啶Ⅲ的二级质谱

图1 两种化合物的一级、二级质谱

表2 两种远志成分的回归方程、线性范围和相关系数

化合物	MRM 离子对	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	r
远志吡啶Ⅲ	567.2 ~ 345.1	$Y = 473X - 3.27 \times 10^3$	37 ~ 248	0.998 2
	567.2 ~ 296.9	$Y = 508X - 3.54 \times 10^3$	37 ~ 248	0.997 7
3,6'-二芥子酰基蔗糖	753.3 ~ 205.1	$Y = 743X - 4.52 \times 10^3$	57 ~ 380	0.997 0
	753.3 ~ 189.9	$Y = 693X - 3.77 \times 10^3$	57 ~ 380	0.996 5

2.6 精密度试验 精密量取对照品贮备溶液,用甲醇稀释得到质量浓度为 74.5 (远志吡啶Ⅲ), 114 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (3,6'-二芥子酰基蔗糖)的混合对照品溶液。取该混合对照品溶液每 3 h 测定 1 次,共 6 次,计算日内精密度;隔日测定 1 次,共 6 次,计算日间精密度。测得远志吡啶Ⅲ的日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 2.2% ,2.5% ;3,6'-二芥子酰基蔗糖的日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 2.3% ,2.4% 。

2.7 加样回收率试验 取远志药材粉末 1 g 共 12 份,6 份作为对照,另外 6 份分别加入一定浓度的两种对照品溶液,挥干,按样品的制备方法提取并测定。远志吡啶Ⅲ的平均回收率为 98.5% ,RSD 2.4% ;3,6'-二芥子酰基蔗糖的平均回收率为 97.9% ,RSD 2.0% ,见表 3。

2.8 样品测定 精密称取陕西、山西远志药材粉末 1 g 各 5 份,按 2.2 项提取制备药材溶液,以甲醇稀释后进样分析。远志吡啶Ⅲ,3,6'-二芥子酰基蔗糖两种成分的含量测定结果见表 4。

3 讨论

远志的化学成分多,样品基质复杂,为获得合适

表3 远志药材提取物中 2 种指标成分加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
远志吡啶Ⅲ	1.001 8	4.938	4.705	9.615	99.4	98.5	2.4
	1.001 2	4.906	4.705	9.427	96.1		
	1.000 3	4.850	4.705	9.423	97.2		
	1.000 5	4.852	4.705	9.581	100.5		
	1.001 2	4.906	4.705	9.427	96.1		
	1.000 1	4.782	4.705	9.567	101.7		
3,6'-二芥子酰基蔗糖	1.001 8	5.535	5.412	10.71	95.7	97.9	2.0
	1.001 2	5.842	5.412	11.12	97.6		
	1.000 3	5.886	5.412	11.17	97.6		
	1.000 5	5.672	5.412	11.16	101.4		
	1.001 2	5.735	5.412	11.07	98.5		
	1.000 1	5.610	5.412	10.84	96.7		

的色谱分离效果,多对样品进行前处理^[1],并采用梯度洗脱以改善色谱分离^[9]。采用 MS/MS 的 MRM 扫描模式选择性地监测化合物的特征离子,可以大大提高分析方法的选择性,见图 2。当设定提取 m/z

表4 两个批次远志药材中2种成分的含量测定($\bar{x} \pm s, n=5$) %

药材	远志吡啶Ⅲ		3,6'-二芥子酰基蔗糖	
	质量分数	RSD	质量分数	RSD
陕西(统货)	0.26 ± 0.01	3.8	0.55 ± 0.01	1.9
山西(野生)	0.38 ± 0.02	5.0	0.71 ± 0.02	2.8

567.2~345.1 色谱图时,仅有远志吡啶Ⅲ有响应(见图2的B_s和B_i),其他化合物不干扰检测。同

样, m/z 753.3~205.1 为3,6'-二芥子酰基蔗糖的特征母-子离子对,可实现C_s和C_i的专属检测,见图2。其中,在选择3,6'-二芥子酰基蔗糖的母离子时, m/z 799.0的响应明显高于 m/z 753.3,但是对照品浓度和甲酸量会明显影响到该离子的响应,故选择响应较低,但较稳定的 m/z 753.3 离子作为母离子。

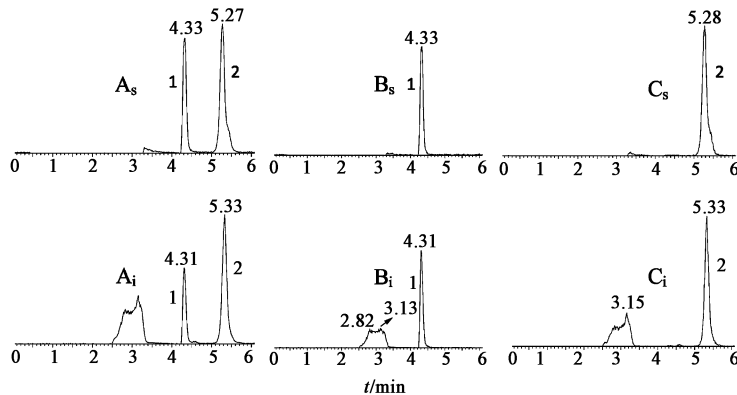


图2 典型的远志样品不同类型色谱
A. TIC 色谱(针对两种化合物); B. MRM m/z 567.200~345.100
C. MRM m/z 753.300~205.100; 下标 s. 对照品; 下标 i. 远志样品; 1. 远志吡啶Ⅲ; 2. 3,6'-二芥子酰基蔗糖

高的选择性同时也带来了高的灵敏度,本实验发现3,6'-二芥子酰基蔗糖的检测限为 $6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限为 $18 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,远志吡啶Ⅲ的检测限可达到 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限为 $4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本方法采用等度洗脱,完成一次色谱进行分析只需6 min,大大缩短了分析时间。

2010年版《中国药典》规定,远志中远志吡啶Ⅲ的含量不得低于0.15%,3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量不得少于0.50%。本文测定的两批药材中远志吡啶Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量均大于《中国药典》标准,为合格药材。本实验方法与药典方法比较,灵敏度更高,短时间、低含量就可以达到含量测定的目的。

与文献方法相比,本文所开发的HPLC-MS/MS法快速、灵敏、专属性好,适用于远志中远志吡啶Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量测定,可作为远志药材的质量控制方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:146.
[2] 《中华本草》编委会. 中华本草. 第五册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:62
[3] 姜勇,屠鹏飞. 远志研究进展[J]. 中草药,2001, 32

(8):759.

[4] 王君. 远志皂苷碱水解产物的化学成分及神经细胞保护作用研究[D]. 北京:北京协和医学院,2011.
[5] 张晶,戚仁斌,汪志刚,等. 远志皂苷元对 H_2O_2 诱导的大鼠海马神经元损伤的影响及其机制[J]. 中国病理生理杂志,2011, 27(6):1059.
[6] 杨学东,徐丽珍,杨世林. 远志属植物中吡啶类成分及其药理研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2000, 12(5):88.
[7] 刘屏,王东晓,郭代红,等. 远志3,6'-二芥子酰基蔗糖在药物诱发抑郁模型上的药效评价[J]. 中国药学杂志,2008, 43(18):1391.
[8] 李军,董晓兵,姜勇,等. HPLC法测定远志中总皂苷的含量[J]. 药物分析杂志,2007, 27(9):1329.
[9] 刘艳芳,杨晓娟,田昕,等. HPLC法同时测定远志中2种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2010, 30(5):806.
[10] 郝晓霞,靳元鹏,轧霖,等. HPLC-DAD-MS/MS用于养血清脑颗粒蒽醌类成分分析[J]. 中成药,2012, 34(1):66.
[11] 刘姗,杨涛,刘成海,等. UPLC-MS/MS法同时测定扶正化痰胶囊中12种成分[J]. 中草药,2014, 45(2):214.
[12] 郑林,牟景丽,黄勇,等. UPLC-MS/MS法同时测定注射辛芍中7种指标成分的含量[J]. 中国新药杂志,2014, 23(1):105.

[责任编辑 顾雪竹]