

UPLC-MS-MS 同时测定中药活血益气方 KLW 中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 的含量

陈菲¹, 林晓兰^{1*}, 席海为², 庄伟¹, 李晓玲¹

(1. 首都医科大学宣武医院药剂科 100053; 2. 沃特世科技(上海)有限公司 100021)

[摘要] 目的:建立一种超高效液相色谱串联质谱分析方法,可同时测定中药活血益气方 KLW 中的三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的含量。方法:中药活血益气方 KLW 采用超声提取,离心取上清液过 0.2 μm 微孔滤膜后测试,采用 Waters ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm),以甲醇和水溶液梯度洗脱,流速 0.4 mL \cdot min⁻¹,多反应监测测试方法(MRM)三七皂苷 R_1 选择 1 007.2/423.3 m/z ;人参皂苷 R_{g_1} 选择 875.2/423.5 m/z ;人参皂苷 R_{b_1} 选择 1 183.3/487.3 m/z 定量。结果:三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 在 0.05 ~ 2.0 mg \cdot L⁻¹ 呈现良好的线性关系($r > 0.999$),平均加样回收率($n = 6$)分别为 97.7%, 96.3%, 97.1%。结论:方法简便、灵敏、快速、重复性好,适用于同时测定复杂复方 KLW 中 3 种皂苷类成分的含量,为该制剂的质量控制和临床药学研究提供了实用的检测方法。

[关键词] 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_{g_1} ; 人参皂苷 R_{b_1} ; 超高效液相色谱串联质谱; 中药活血益气方 KLW

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0156-04

[doi] 10.11653/syfy2013160156

Simultaneous Determination of Notoginsenoside R_1 , Ginsenoside R_{g_1} and Ginsenoside R_{b_1} in Chinese Formula KLW by UPLC-MS-MS

CHEN Fei¹, LIN Xiao-lan^{1*}, XI Hai-wei², ZHUANG Wei¹, LI Xiao-ling¹

(1. Department of Pharmacy, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China;

2. Waters Technology Company, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an ultra performance liquid chromatography tandem mass (UPLC-MS-MS) method for determination of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} , and ginsenoside R_{b_1} in Chinese formula KLW. **Method:** The Chinese formula KLW is extracted by ultrasonic and centrifugal, then filtered before test. The ultra performance liquid chromatographic separation was performed on a Waters ACQUITY BEH C_{18} column (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm) by gradient elution with methanol-water as the mobile phase at a flow rate of 0.4 mL \cdot min⁻¹. The analysis of 3 compounds was performed under ESI multiple reaction monitoring (MRM) mode, and the quantification was conducted by external calibration method. The monitoring ions for notoginsenoside R_1 were m/z 1 007.2/423.3 m/z ; ginsenoside R_{g_1} were 875.2/423.5 m/z ; ginsenoside R_{b_1} were 1 183.3/487.3 m/z . **Result:** The method showed a good linearity in the range of 0.05-2.0 mg \cdot L⁻¹, with the correlation coefficient above 0.999. The average recoveries ($n = 6$) of notoginsenoside R_1 , ginsenoside R_{g_1} and ginsenoside R_{b_1} were 97.7%, 96.3%, 97.1% respectively. **Conclusion:** This method is simple, rapid, accurate and sensitive, can also provide a reliable method for clinical research and can be used for the quality control of Chinese formula KLW.

[Key words] notoginsenoside R_1 ; ginsenoside R_{g_1} ; ginsenoside R_{b_1} ; UPLC-MS-MS; Chinese formula KLW

[收稿日期] 20120918(010)

[基金项目] 北京市中医管理局基金项目(JJ2010-12)

[第一作者] 陈菲, 硕士, 药师, 从事临床药学研究, Tel:010-83198354, E-mail: chenfeijill@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 林晓兰, 主任药师, 从事临床药学与医院药学研究, Tel:010-83198684, E-mail: xllin83@163.com

中药活血益气方KLW(简称KLW)具有扶正培本、清热解毒、活血化瘀的功效,是临床治疗脑胶质瘤、脑垂体瘤及其他肿瘤的经验中药复方。现代研究已经发现KLW中含有的3种皂苷类化学成分可能与药物的治疗作用紧密相关,也可能是中药血清药物化学以及中药复方物质基础研究的重要成分^[1-2]。同时三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁的药理活性也已经被国内外大量的文献报道所证实具有显著的促进肿瘤细胞凋亡、诱导肿瘤细胞分化,增强化疗药物的敏感性,抑制肿瘤血管形成,提高机体抗肿瘤免疫力以及拮抗肿瘤细胞黏附等作用^[1-7],因此建立检测KLW中的3种成分的方法,能够为KLW的深入研究搭建一个可靠的测试平台。

目前,国内对人参皂苷类成分的检测方法主要有高效液相色谱紫外检测法^[8-9]、高效液相色谱蒸发光检测法^[10]、近红外检测法^[11]、液相色谱质谱法^[12]以及液相色谱串联质谱法^[13-14]。其中早期使用的高效液相色谱法蒸发光检测法和紫外检测法,作为2种通用型的检测方法,在含有人参皂苷成分的药材及中成药的检测方面发挥了重要的作用^[15]。本文采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS-MS)检测方法对10多种中药材组成的复杂复方KLW中的三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁进行了含量测定,建立了相应的检测方法,为更好的控制KLW的质量提供了有力的技术保障,也为KLW的深入研究提供了可靠的技术手段。

1 材料

Acquity型UPLC超高效液相色谱仪、Xevo TQ MS三重四极杆质谱仪、Masslynx数据处理系统(均为美国Waters公司),Milli-Q型超纯水器(美国Milli-Q公司),KQ-600B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),CR 21G型高速冷冻离心机(日本Hitachi公司)。

甲醇(质谱纯,美国Fisher公司),乙腈、乙醇、二氯甲烷(色谱纯,美国Fisher公司),其他试剂均为分析纯。

三七皂苷R₁(批号110745-200415)、人参皂苷Rg₁(批号110703-200424)、人参皂苷Rb₁(批号110704-200420)(均购自中国药品生物制品检定所)。

中药活血益气方KLW(批号110111,110112,101234,均由首都医科大学宣武医院提供,京药制字Z20063103)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Acquity BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相甲醇(A)-水(B),梯度洗脱(0~6 min, 5%~90% A; 6~8 min, 5% A),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温40℃,进样量5 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺),毛细管电压为3.0 kV,射频透镜电压3 V,离子源温度150℃,脱溶剂气温度450℃,脱溶剂气流量800 L·h⁻¹,锥孔气流量50 L·h⁻¹,碰撞气为氩气,碰撞气压3.5 × 10⁻³ mbar,多反应监测模式(MRM)检测。MRM检测条件:三七皂苷R₁选择母离子m/z 1 007.2,定量离子m/z 423.3,定性离子m/z 162.5,碰撞能量19 eV;人参皂苷Rg₁选择母离子m/z 875.2,定量离子m/z 423.5,定性离子m/z 477.1,碰撞能量22 eV;人参皂苷Rb₁选择母离子m/z 1 183.3,定量离子m/z 487.3,定性离子m/z 789.1/365.3,碰撞能量18 eV。

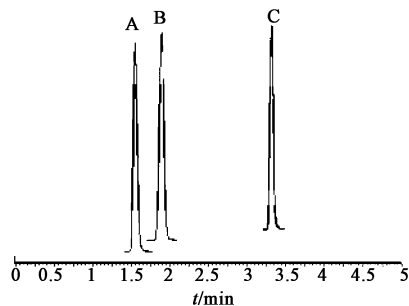


图1 三化合物混合对照品的多反应监测离子流

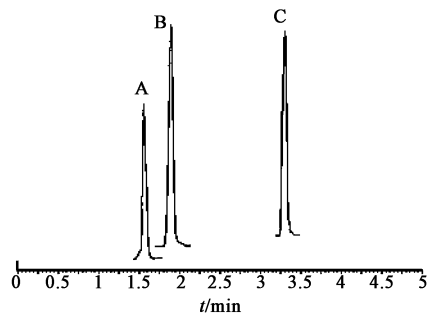


图2 供试品中三化合物的多反应监测离子流

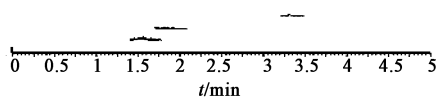


图3 阴性对照

2.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁和人参皂苷Rb₁对照品10 mg,置于10 mL量瓶中,甲醇溶解并定容,配置为

1 000 mg·L⁻¹ 的单一成分标准储备液。上述溶液置于冰箱中冷藏备用。分别精密量取 3 种单一成分标准储备液 0.5 mL, 置于同一 100 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品储备液。

2.4 供试品溶液及阴性对照溶液的制备 取 KLW 粉末, 准确称取 0.500 0 g, 置于 50 mL 三角瓶中, 准确量取 20 mL 甲醇作为提取溶剂。超声提取 30 min, 8 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清液用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤, 得到滤液供测试用。

依据处方中的比例, 分别自制不含有 3 种待测成分的阴性对照品, 按照制剂工艺制成空白制剂, 并按照上述方法制备阴性对照溶液。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取 3 种待测成分的质量浓度为 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 依次进样分析, 以质量浓度 (mg·L⁻¹) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $Y_{三七皂苷 R_1} = 1\ 859.2X + 109.1 (r = 0.999\ 1)$, $Y_{人参皂苷 R_{g_1}} = 1\ 531.2X + 214.3 (r = 0.999\ 2)$; $Y_{人参皂苷 R_{b_1}} = 1\ 869.2X + 52.3 (r = 0.999\ 1)$ 。表明 3

种成分在 0.05 ~ 2.0 mg·L⁻¹ 具有良好的线性关系。

2.6 精密度试验 取 3 种成分混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 按照上述液质联用条件操作, 测定峰保留时间 RSD 0.1% ~ 0.3%, 峰面积 RSD 0.34% ~ 0.87%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 9, 12, 19, 24 h 各进样 3 针, 取平均值进行测定。结果表明, 供试溶液在 24 h 内稳定, RSD 分别为 0.67%, 0.58%, 0.83%。

2.8 重复性试验 按照 2.4 所述方法平行称取同一批号 KLW 样品 6 份, 按照上述供试品溶液的方法测定, 结果 KLW 中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁} 含量的 RSD 分别为 2.3%, 2.6%, 2.0%, 表明本试验方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取 2.8 项下已测知含量的样品 6 份, 每份约 0.250 0 g, 分别依照表 1 精密添加 3 种化合物的对照品溶液, 按照上述供试品溶液的检测方法测定, 计算回收率, 结果见表 1, 表明方法的准确度较好。

表 1 KLW 中 3 种成分的加样回收率试验

成分	取样量/g	样品含量/μg	加入量/μg	实测量/μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
三七皂苷 R ₁	0.250 0	680.0	680.0	1 351.8	98.8	97.7	1.45
	0.250 7	681.9	680.0	1 345.6	97.6		
	0.250 2	680.5	680.0	1 348.3	98.2		
	0.250 7	681.9	680.0	1 357.8	99.4		
	0.249 9	679.7	680.0	1 339.3	97.0		
	0.250 3	680.8	680.0	1 329.5	95.4		
人参皂苷 R _{g₁}	0.250 0	1 230.0	1 230.0	2 413.3	96.2	96.3	1.57
	0.250 7	1 233.4	1 230.0	2 433.9	97.6		
	0.250 2	1 231.0	1 230.0	2 411.8	96.0		
	0.250 7	1 233.4	1 230.0	2 443.7	98.4		
	0.249 9	1 229.5	1 230.0	2 398.0	95.0		
	0.250 3	1 231.5	1 230.0	2 392.6	94.4		
人参皂苷 R _{b₁}	0.250 0	1 235.0	1 235.0	2 420.6	96.0	97.1	1.10
	0.250 7	1 238.5	1 235.0	2 456.1	98.6		
	0.250 2	1 236.0	1 235.0	2 426.5	96.4		
	0.250 7	1 238.5	1 235.0	2 426.5	96.2		
	0.249 9	1 234.5	1 235.0	2 439.9	97.6		
	0.250 3	1 236.5	1 235.0	2 446.8	98.0		

2.10 样品含量的测定 分别取不同批次的样品, 每批样品取 3 份, 依照本文建立的方法测定 3 批 KLW 的含量, 结果见表 2。

3 讨论

本研究采用单因素优化的方法, 对液相色谱条

件和质谱条件进行了优化。首先优化了对液相分离影响最大的因素色谱柱类型, 分别采用 Waters XBridge C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm) 和 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱对 KLW 进行测定。比较色谱图发现前者色

表2 KLW中的3种化合物的测定 mg·g⁻¹

批次	三七皂苷 R ₁	人参皂苷 R _{g₁}	人参皂苷 R _{b₁}
110111	1.139 ± 0.020	2.139 ± 0.027	2.182 ± 0.037
110112	1.317 ± 0.023	2.421 ± 0.029	2.200 ± 0.037
101234	1.350 ± 0.023	2.462 ± 0.031	2.471 ± 0.028
RSD/%	11.361 ± 0.321	5.288 ± 0.521	10.760 ± 0.613

谱分离时间长,峰较宽;后者分析快速,峰形对称,检测灵敏度提高。同时因亚2微米色谱填料的优势,已经得到许多研究的证实,因此选择先进的UPLC色谱柱代替HPLC色谱柱提高了分析方法的质量。其次针对3种成分的质谱方法开展了优选,对关键的锥孔能量和碰撞能量考察,分别考察了锥孔电压为10,20,30,40,50,60V时3种成分检测信号的强度。结果表明,随着锥孔能量的变化,信号强度呈现先升后降的变化趋势,选择30V获得最大信号值。分别考察了在30V锥孔电压下的碰撞能量5,10,20,30,40eV,得到的定量离子强度同样呈现先升后降的趋势,当选择20eV时,3种化合物的定量离子信号最强。进一步微调碰撞能量后确定为三七皂苷R₁,人参皂苷R_{g₁},人参皂苷R_{b₁}分别为19,20,18eV。

中药复方药物成分复杂,复杂的化学成分易对仪器测试造成干扰。因此本研究采用了20mL纯甲醇对药品进行提取,抑制了亲水性蛋白类和黏液质类物质的提取。同时优化了超声提取时间,分别考察了甲醇超声提取10,30,60,90min的提取回收率,结果表明,提取回收率呈现先升后降的趋势,超声提取30min的回收率值最高,考虑可能是因为过长的提取时间会降低皂苷成分提取效率,也或与样品的随甲醇挥发及发生化学反应有关。样品处理采用了高速离心除沉淀的方法,此方法与纯甲醇的沉淀作用共同为去除样品中的蛋白质发挥了重要的作用。因此本实验采用纯甲醇超声,高速离心,过滤的方法,方法简便有效。

[参考文献]

[1] 刘倩,喇万英.基于体内代谢-药效学相关性分析的中药复方药效物质基础研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):272.

[2] 黄臣虎,陆茵,高晓君,等.中药血清药理学研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):266.

[3] 李杰,宋淑霞,吕占军.人参皂苷抗肿瘤作用的研究

进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2004(1):61.

[4] H Hasegawa, R Suzuki, T Nagaoka, et al. Prevention of growth and metastasis of muine melanoma through enhanced natural-killer cytotoxicity by fatty acid-conjugate of protopanaxatriol [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(7):861.

[5] Park I H, Piao L Z, Kwon S W, et al. Cytotoxic dammarane glyco-sides from processed ginseng [J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50 (4):538.

[6] Liu W K, Xu S X, Che C T. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line [J]. Life Sci, 2000, 67 (11):1297.

[7] 马春涛,雷燕.中药复方效应物质基础的研究进展及展望[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(3):48.

[8] 闫彦芳,张壮,孙塑伦,等.三七总皂苷及其主要成分对血管内皮细胞缺氧损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2002,8(1):34.

[9] 杨佳,张毅,秦彩玲,等.丹参、三七的有效部位对正常大鼠血小板粘聚性及TXA₂、PGI₂的影响[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(5):21.

[10] 刘恩荔,张重远,梁泰刚,等. HPLC同时测定骨刺宁胶囊中人参皂苷R_{g₁}、三七皂苷R₁含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):111.

[11] 娄玉霞,李向阳,李振国. HPLC测定生血复元口服液中人参皂苷R_{g₁}和人参皂苷Re的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):51.

[12] 王健,李海燕. HPLC测定参杞杜仲丸中人参皂苷R_{g₁}、Re的含量[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(8):6.

[13] 毕晓黎,罗文汇,李素梅. HPLC-ELSD法测定三七止血胶囊中三七皂苷R₁、人参皂苷R_{g₁}和人参皂苷R_{b₁}的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):75.

[14] 黄亚伟,王加华, J. S Jacqueline,等.近红外光谱测定人参与西洋参的主要皂甙总量[J].分析化学,2011,39(3):377.

[15] 杜芹芹,张旭,宋凤瑞,等.液质联用技术研究人参与干姜或赤芍配伍前后人参皂苷及其抗氧化活性的变化[J].应用化学,2010,27(10):1209.

[16] 秦枫,于生兰,高彦慧,等. HPLC-MS/MS法同时测定三七须根总皂苷中人参皂苷R_{g₁}和Re的含量[J].中国药房,2010,21(31):2922.

[17] 王燕,柴程芝,朱丹妮. HPLC-ELSD测定GSSM颗粒中酸枣仁皂苷A和人参皂苷R_{b₁}[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):76.

[责任编辑 顾雪竹]