

LC-MS-MS 法测定参体和参须中 人参皂苷 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 含量

闫寒¹, 赵松岩², 刘运嘉³, 吴睿凡⁴, 范斌¹, 郭娜¹, 彭娟^{1*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016;
3. 沈阳市药品不良反应和医疗器械不良事件监测中心, 沈阳 110013;
4. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 建立检测参体和参须中人参皂苷 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 的 LC-MS-MS 方法。方法: 应用液质联用, C₁₈ 色谱柱系统, 采用梯度洗脱方法, A-水(0.05% FA), B-乙腈, A-B = 65:35, 梯度洗脱(0~3 min, 65% B; 3~4 min, 100% B), 流速 0.35 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 建立了参体和参须中人参皂苷 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 含量测定方法并进行了方法学考察。结果: 建立了同时检测参体和参须中人参皂苷 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 含量测定方法。结论: 该方法准确、简便、快速, 可用于参体和参须的质量控制。

[关键词] 参体和参须; 含量测定; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rc; 人参皂苷 Rb₂

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0105-03

Simultaneous Quantitation of Rb₁, Rb₂ and Rc in Ginseng Tail and the Main Root of Ginseng by LC-MS-MS

YAN Han¹, ZHAO Song-yan², LIU Yun-jia³, WU Rui-fan⁴, FAN Bin¹, GUO Na¹, PENG Juan^{1*}

(1. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Shenyang Monitoring Center for
Adverse Drug Reaction and Medical Device Adverse Event, Shenyang 110013, China;

[收稿日期] 20120110(120)

[基金项目] 中国中医科学院医学实验中心自主课题项目(zz2007002)

[第一作者] 闫寒, 从事中药质量控制研究, Tel: 010-64014411-3324, E-mail: yanhanarrow@163.com

[通讯作者] * 彭娟, 助理研究员, 硕士, 从事药物分析及药代动力学研究, Tel: 010-64014411-3324, Email: lillejuan@163.com

3 结论

本文采用 DPPH, ABTS, FRAP 3 种方法对疏花假地豆不同溶剂提取物进行了体外抗氧化活性研究, 结果表明疏花假地豆不同溶剂提取物均有一定的抗氧化活性。但是因为溶剂极性不同, 其中提取物极性也不同, 这可能导致了不同溶剂提取物其抗氧化活性有很大差别的根本原因。3 种抗氧化体系结果表明其乙酸乙酯抗氧化活性高于总醇提物的抗氧化活性, 这可能是因为醇提物中含有的其他杂质较多, 在相同浓度时其抗氧化有效成分少于乙酸乙酯提取物。综合上述结果可得出疏花假地豆乙酸乙酯提取部位的抗氧化活性最好。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第4册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 448.
- [2] 黄钟碧, 张前军, 康文艺, 等. 假地豆化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 93.
- [3] Kang W Y, Li C F, Liu Y X. Antioxidant phenolic compounds and flavonoids of *Mitragyna rotundifolia* (Roxb.) Kuntze *in vitro* [J]. Med. Chem. Res, 2010, 19: 1222.
- [4] Kang W Y, Wang J M. *In vitro* antioxidant properties and *in vivo* lowering blood lipid of Forsythia suspense leaves [J]. Med Chem Res, 2010, 19: 617.
- [5] 尹震花, 顾雪竹, 张一冰, 等. 三白草体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 99.

[责任编辑 顾雪竹]

4. Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, China)

[Abstract] Objective: To develop a method to determine the content-of ginsenoside Rb₁, Rb₂ and Rc in ginseng tail and the main root of ginseng by using HPLC-MS-MS. **Method:** C₁₈ HPLC column was used in the system including HPLC-MS-MS with a gradient elution program. The mobile phase was consisted of: A for water (0.05% FA), B for acetonitrile, A: B = 65:35; gradient elution program was as follows: 0-3 min, 65% (B); 3-4 min, 100% (B). The flow rate was 0.35 mL · min⁻¹; column temperature was kept at 40 °C. **Result:** Simultaneous quantitation of ginsenoside Rb₁, Rb₂ and Rc in ginseng tail and the main root of ginseng by HPLC-MS-MS was developed. **Conclusion:** The method is accurate, convenient and rapid, which can be applied for the quality control of ginseng tail and the main root of ginseng.

[Key words] ginseng tail and ginseng main root; content determination; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rc; ginsenoside Rb₂

人参具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智之功效^[1-3]。人参中的皂苷为重要的活性成分,对人参皂苷的测定方法,主要采用高效液相色谱法,高效液相色谱-蒸发光散射检测法等^[4-6]。本文建立了检测参体和参须中人参皂苷^[7-9] Rb₁, Rb₂ 和 Rc 含量的 LC-MS-MS 快速灵敏的方法,并对参体和参须中这 3 种成分进行了定量比较。

1 材料

1.1 药物及试剂 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 均购于中国药品生物制品检定所,人参产地吉林,批号 0090410,由中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根。参体取人参除去芦头及参须的部分;参须取人参的须状根。正丁醇(分析纯),乙腈(色谱纯),甲酸(色谱纯)均购于北京迪科马科技有限公司。

1.2 仪器 Agilent 6410 型 QQQ LC-MS 分析系统(美国 Agilent RRLC 液相色谱仪;Agilent 6410 QQQ 三重四级杆质谱检测器;Masshunter 工作站),赛多利斯 arium® 61316/611VF 型超纯水处理器,赛多利斯 BT25S 型分析天平,多功能提取罐。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX C₁₈ SB 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm),流动相 A. 水(0.05% FA)A,乙腈 B,(65:35),梯度洗脱:0~3 min, 65% B;3~4 min, 100% B,流速 0.35 mL · min⁻¹,柱温 40 °C。

质谱条件:正离子模式,MRM,Rb₁ m/z 1 131.6 → 365, Rb₂ m/z 1 101.7 → 335 和 Rc m/z 1 101.6 → 334.8。利用以上色谱条件分析得到 Rb₁, Rb₂, Rc 的混合对照品的总离子流图见图 1 和各自的提取离子流图(EIC)及各成分在参体和参须中的见图 2~3。

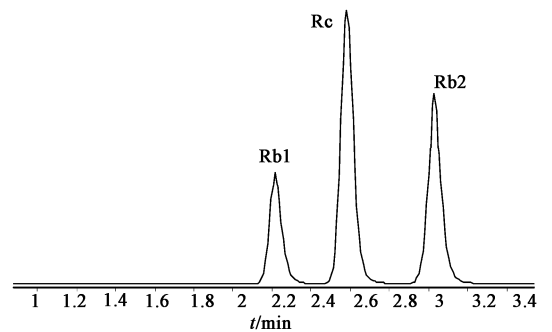


图 1 人参 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 对照品的 TIC

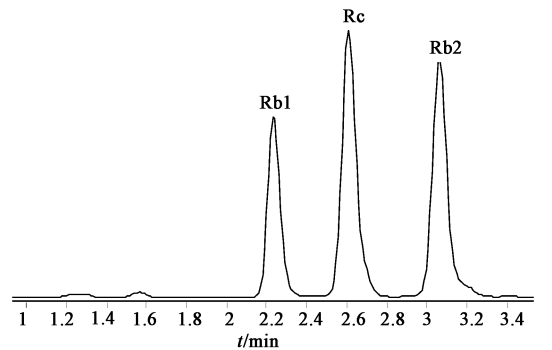


图 2 参体样品中 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 的 TIC 图

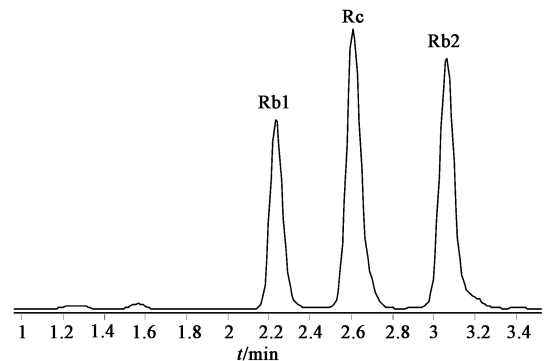


图 3 参须样品中 Rb₁, Rb₂ 和 Rc 的 TIC 图

2.2 供试品溶液的制备 参体,参须干燥后,粉碎,

过40目筛。取参体粉末0.1g(参须同操作),精密称定,精密加入水饱和的正丁醇5mL,密塞,放置过夜,超声(功率250W,频率50kHz)处理30min,两次,合并滤液,精密量取滤液0.5mL,氮气吹干,残渣加甲醇1mL超声溶解,0.22μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3 线性关系考察 精密称取Rb₁,Rb₂,Rc对照品,Rb₁的质量浓度依次为3.0,6.0,12,24,48,96,192 μg·L⁻¹;Rb₂的质量浓度分别为1.75,3.5,7.0,14,28,56,112 μg·L⁻¹,Rc的质量浓度1.75,3.5,7.0,14,28,56,112 μg·L⁻¹。按2.1的色谱条件进样分析。以峰面积(Y)对浓度(X)进行回归处理得到Rb₁、Rb₂和Rc的回归方程分别为Y=48.3828X-191.5490(r=0.9980),Y=79.6553X-259.1176(r=0.9988)和Y=78.1685X-146.9929

(r=0.9992),说明Rb₁,Rb₂和Rc分别在3~192,1.75~112,1.75~112 μg·L⁻¹线性关系良好。

2.4 精密度试验 按2.3制得的对照品溶液连续进样6次,记录各组分的峰面积,计算6次的标准偏差(RSD),得到人参皂苷Rb₁,Rb₂,Rc峰面积的RSD分别为2.6%,4.4%,3.0%。

2.5 重复性试验 按2.2平行制备6份样品,按2.1的色谱条件进样分析,记录人参皂苷Rb₁,Rb₂和Rc的峰面积,计算6份平行样品间的RSD分别为5.9%,4.7%和5.2%,表明方法重复性良好。

2.6 方法回收率的考察 向甲醇中加入已知量的Rb₁,Rb₂,Rc对照品,制成已知质量浓度的质控样品(标示浓度),进行液相质谱分析。进样峰面积代入标准曲线,由实测浓度与质控样品标示浓度之比为方法回收率,以该值评价方法的准确性。

表1 人参皂苷Rb₁、Rb₂和Rc的方法回收率考察(n=6)

对照品	标示浓度		方法回收率/%				回收率		RSD/%
	/μg·L ⁻¹						平均值		
人参皂苷 Rb ₁	24	92.6	91.1	94.9	90.7	106.1	89.9	94.2	6.5
人参皂苷 Rb ₂	14	93.4	101.3	97.1	98.1	95.1	90.5	95.9	3.9
人参皂苷 Rc	14	101.5	95.3	102.7	95.4	101.3	90.2	97.7	5.0

2.7 样品稳定性 将制备好的供试品溶液于0,2,4,6,8,10,12,24h进样分析,考察供试品溶液的稳定性,考察表明供试品溶液在24h内稳定。

2.8 按2.2项下制备样品,测得参体和参须中人参皂苷Rb₁,Rb₂和Rc含量分别见表2。

表2 参体和参须中人参皂苷Rb₁、Rb₂和Rc含量测定

样品	/mg·g ⁻¹		
	Rb ₁	Rb ₂	Rc
参体	0.11	0.04	0.02
参须	1.12	0.98	0.59

3 讨论

考察了供试品制备的溶剂种类正丁醇和乙醇,结果表明正丁醇提取效率较好;考察了超声时间15,30min,结果表明30min提取较完全,最终确定了供试品制备方法^[7]。

本方法利用LC-MS/MS方法对参体和参须中人参皂苷Rb₁,Rb₂和Rc进行了含量测定,在4min内完成检测,色谱峰峰形对称,分离较好,比传统方法快速、准确且灵敏,另外,从结果可以看出,参须中的Rb₁,Rb₂,Rc都明显高于参体。

[参考文献]

[1] 张前进. 人参化学成分和药理活性[J]. 光明中医, 2011,26(2):368.

[2] 刘洁,刘芬,王秋静,等. 人参二醇组皂苷对心肌梗死犬血清一氧化氮、一氧化氮合酶水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(4):46.

[3] 刘敏. 人参药性及功效探析[J]. 山东中医药大学学报,2012,36(2):110.

[4] 徐晖,曾元儿. 薄层扫描法测定人参及其制剂中人参皂苷Rg₁的含量[J]. 中药新药与临床药理,1998,9(2):106.

[5] 潘坚扬,程翼宇,王毅,等. 9种人参皂苷同时测定方法及在人参质量鉴别中的应用[J]. 分析化学,2005,33(11):1565.

[6] 徐静,贾力,赵余庆. 人参的化学成分与参产品的质量评价[J]. 药物评价研究,2011,34(3):199.

[7] 陈英红,姜瑞芝,罗浩铭,等. 人参总皂苷提取指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):12.

[8] 武艳红,郑翌,张凌怡,等. 高效液相色谱结合主成分分析研究人参不同部位的差异性[J]. 计算机与应用化学,2011,28(2):161.

[9] 傅俊曾,宋生有,姜民,等. 液相色谱-质谱联用同时测定芪参益气滴丸中黄芪甲苷、丹参素、原儿茶醛、人参皂苷Rg₁和Rb₁含量[J]. 中国药理学杂志,2012,47(1):61.

[10] 李海军,刘金平,卢丹,等. 林下参化学成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):38.

[责任编辑 顾雪竹]