

HPLC-MS/MS 测定同济 2 号颗粒剂中黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁

方 昱¹, 万丽丽², 朱金辉², 祝德秋^{1*}

1. 上海市同济医院药剂科, 上海 200065

2. 上海市第六人民医院药剂科, 上海 200233

摘要: 目的 建立 HPLC-MS/MS 同时测定同济 2 号颗粒中 5 个主要活性成分黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 及三七皂苷 R₁ 的方法。方法 以水 (0.1%甲酸)-乙腈 (0.1%甲酸) 为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.4 mL/min。YMC-Pack Pro C₈ 色谱柱分离, 采用电喷雾离子源 (ESI 源), 负离子模式, 以选择性离子监测模式 (SIM) 进行测定。监测离子分别是 m/z 829 (黄芪甲苷)、 m/z 353 (绿原酸)、 m/z 845 (人参皂苷 R_{g1})、 m/z 1 108 (人参皂苷 R_{b1})、 m/z 932 (三七皂苷 R₁)。结果 黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和三七皂苷 R₁ 分别在 0.075~2.4、0.95~30.3、1.71~54.72、1.12~35.92、0.45~14.28 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系。结论 该方法专属性好, 灵敏度高, 准确快捷, 适用于同济 2 号颗粒的快速检测, 为该药的质量标准提供依据。

关键词: 同济 2 号颗粒; 液相色谱串联质谱; 黄芪甲苷; 绿原酸; 人参皂苷 R_{g1}; 人参皂苷 R_{b1}; 三七皂苷 R₁

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)04-0394-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.04.010

Determination of astragaloside IV, chlorogenic acid, ginsenosides R_{g1}, R_{b1}, and notoginsenoside R₁ in Tongji No. 2 granules by HPLC-MS/MS

FANG Yu¹, WAN Li-li², ZHU Jin-hui², ZHU De-qi¹

1. Department of Pharmacy, Shanghai Tongji Hospital, Shanghai 200065, China

2. Department of Pharmacy, The Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Abstract: Objective To establish an LC-MS/MS method for simultaneous determination of five compounds (astragaloside IV, chlorogenic acid, ginsenosides R_{g1}, R_{b1}, and notoginsenoside R₁) in Tongji No. 2 granules. **Methods** The chromatographic separation was carried out on a YMC-Pack Pro C₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted in a gradient program. The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid-acetonitrile containing 0.1% formic acid. The mass spectra were obtained by Agilent QQQ triple quad mass spectrometer with electrospray ionization source in negative ion mode. Monitoring ions are m/z 829 (astragaloside IV), m/z 353 (chlorogenic acid), m/z 845 (ginsenosides R_{g1}), m/z 1 108 (ginsenosides R_{b1}), and m/z 932 (notoginsenoside R₁). **Results** The linear ranges for astragaloside IV, chlorogenic acid, ginsenosides R_{g1}, ginsenosides R_{b1}, and notoginsenoside R₁ were 0.075–2.4, 0.95–30.3, 1.71–54.72, 1.12–35.92, and 0.45–14.28 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion** The established method is convenient, sensitive, and accurate. It can be used for the determination of the contents of the main active ingredients in Tongji No. 2 granules for quality control.

Key words: Tongji No. 2 granules; LC-MS/MS; astragaloside IV; chlorogenic acid; ginsenosides R_{g1}; ginsenosides R_{b1}; notoginsenoside R₁

静脉血栓栓塞症 (venous thromboembolism, VTE) 是肺血栓栓塞症 (pulmonary thromboembolism, PTE) 和深静脉血栓形成 (deep venous thrombosis,

DVT) 的总称, 其中 PTE 的高发病率、高死亡率和高误诊率已成为全球性的医疗保健问题^[1]。目前国际上, 对急性期和稳定期的 VTE 只有溶栓和抗凝治

收稿日期: 2015-03-24

基金项目: 上海市中西医结合重点病种建设项目 (zxbz2012-15)

作者简介: 方 昱, 男, 主管药师, 研究方向为中草药药药物分析。Tel: (021)66111223 E-mail: fangyu0907@aliyun.com

*通信作者 祝德秋, 主任药师。研究方向为中药制剂与质量控制。E-mail: zdq_0726@163.com

疗,原因是疾病机制不明,同时也无其他药物治疗。中药作为中医的重要组成部分,用于VTE的防治在国内已有研究,但均仅取其活血化瘀、清热利湿之功效,尚未涉及疾病的本质。本研究通过探讨中药免疫调节、抗炎、抗病毒作用而达到防治VTE的目的,同时将免疫学指标纳入临床疗效评价标准,在国际属前沿研究。并在前期研究基础上,优化中药组方,最终选择同济2号颗粒剂(处方由黄芪提取物颗粒、三七提取物颗粒、金银花提取物颗粒组成)。本文建立了一种高效液相色谱串联质谱电喷雾法同时测定同济2号颗粒中5个主要活性成分黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}以及三七皂苷R₁的方法,为全面评价同济2号颗粒剂的质量提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent QQQ 液相色谱/质谱联用仪,包括G1311A型四元输液泵,G1322A型脱气机,G1367B型自动进样器,G1316A型柱温箱;G6410B型三重串联四级杆质谱,配有电喷雾源和MassHunter工作站(美国Agilent公司);Millipore Simplicity 185型超纯水系统(法国Millipore公司);Sartorius BP211D天平(德国Sartorius公司)。Vortex Genie 2型漩涡混悬器(美国Vortex公司);TG16-WS台式高速离心机(中国湘仪公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号110753-201314,质量分数96.6%)、三七皂苷R₁对照品(批号110745-200617,纯度未标明,以100%计)、人参皂苷R_{g1}对照品(批号110703-201128,质量分数93.4%)、人参皂苷R_{b1}对照品(批号110704-201223,质量分数95.9%),黄芪甲苷对照品(批号110781-200613,纯度未标明,以100%计)均购自中国食品药品检定研究院,乙腈、甲酸为色谱纯(美国TEDIA公司),水为自制双蒸水,其余试剂为分析纯。同济2号颗粒由同济医院药剂科提供,批号LOT1305384、LOT1311302、LOT1402307。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC-Pack Pro C₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相组成为A-0.1%甲酸水溶液,B-0.1%甲酸乙腈,采用梯度洗脱,梯度见表1。体积流量0.4 mL/min,柱温32 °C,进样量1 μL。

2.2 质谱条件

离子化方式为ESI;离子极性为负离子模式;毛细管电压为4 000 V;干燥器温度350 °C;干燥气体积流量9 L/min;雾化器(N₂)压力241.32 kPa;扫描方式为单离子检测扫描(SIM),参数见表2。

表1 流动相梯度组成
Table 1 Gradient of mobile phase

时间/min	B/%
0	20
5	40
10	60
15	80
20	20
28	20

表2 MRM检测参数
Table 2 MRM parameters for detection

待测物	m/z	裂解电压/V	ΔEMV/V
绿原酸	353	105	200
三七皂苷R ₁	932	135	200
人参皂苷R _{g1}	845	145	200
人参皂苷R _{b1}	1 108	135	200
黄芪甲苷	829	115	200

2.3 溶液制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密量取绿原酸5.05 mg、三七皂苷4.76 mg、人参皂苷R_{g1}4.56 mg、人参皂苷R_{b1}4.49 mg、黄芪甲苷4.80 mg对照品置10 mL量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,既得绿原酸、三七皂苷R₁、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷R_{b1}、黄芪甲苷质量浓度分别为0.505、0.476、0.456、0.449、0.480 mg/mL的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取同济2号颗粒约0.5 g,研匀,置10 mL量瓶中,加50%甲醇至刻度,摇匀后超声提取30 min,冷却至室温。补足损失的溶剂,摇匀后取1 mL置离心管中,13 000 r/min离心10 min,取上清5 μL,加流动相至1 mL,离心后进样(200倍稀释)。

2.3.3 阴性样品溶液的制备 按处方比例制备不含对照品的阴性对照样品,制成阴性对照溶液。

2.4 系统适应性试验

分别取对照品、供试品及阴性样品溶液进样,记录图谱(图1)。结果分离良好,阴性样品无干扰。

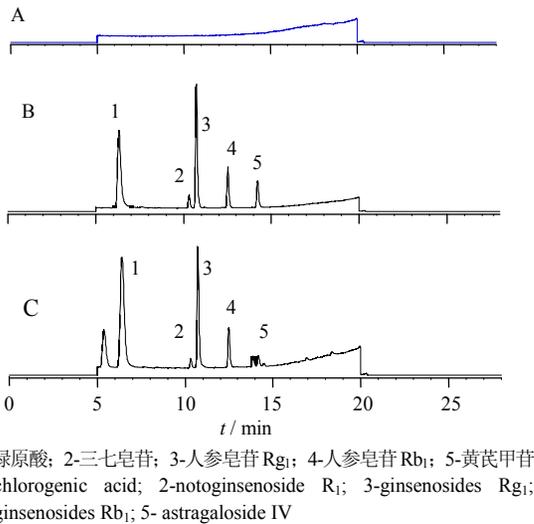


图1 阴性对照(A)、对照品(B)和供试品(C)质谱图
Fig. 1 Mass chromatogram of negative sample (A), references (B), and test sample (C)

2.5 标准曲线

精密量取绿原酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、黄芪甲苷储备液 60、30、120、80 和 5 μL 至 1 mL 量瓶中, 加流动相 (0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液=1:1) 至刻度。等比稀释, 制备系列浓度对照品溶液。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归, 得到回归方程。结果见表 3, 各个成分在线性范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验

5 种对照品溶液, 取高中低 3 个浓度, 重复进样 6 次, RSD 值分别是绿原酸 (2.22%、1.95%、4.85%)、三七皂苷 R₁ (3.22%、2.51%、1.88%)、人参皂苷 R_{g1} (5.44%、3.22%、6.49%)、人参皂苷 R_{b1} (4.26%、2.15%、4.16%)、黄芪甲苷 (3.88%、6.44%、8.55%), 满足精密测定的要求。

表3 标准曲线与线性范围
Table 3 Standard Curve and linear range

化合物	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	线性方程	r
绿原酸	0.95~30.3	Y=24 442.01X-15047.6	0.999 66
三七皂苷 R ₁	0.45~14.28	Y=4 300.18X-839.20	0.999 55
人参皂苷 R _{g1}	1.71~54.72	Y=11 129.93X-8 069.29	0.999 65
人参皂苷 R _{b1}	1.12~35.92	Y=5 735.89.01X-12 833.37	0.999 59
黄芪甲苷	0.075~2.4	Y=57 863.99X-1 778.32	0.999 82

2.7 稳定性

取同一批次 (LOT1305384) 样品, 按“2.3”方法制备样品溶液, 于室温下分别放置 0、4 h 后取样, 在优化条件下测定, 结果显示 5 种目标物的平均质量浓度的 RSD 分别为 9.30%、2.64%、12.34%、8.95%、9.22%。表明供试品溶液在 4 h 内稳定。

2.8 重复性

取同一批次 (LOT1305384) 样品 6 份, 按“2.3”方法制备样品溶液, 在优化条件下测定峰面积, 计算各成分含量及 RSD 值。结果 RSD 值分别是绿原酸 1.95%、三七皂苷 R₁ 2.51%、人参皂苷 R_{g1} 3.22%、人参皂苷 R_{b1} 2.15%、黄芪甲苷 6.44%。

2.9 加样回收率和精密度试验

精密称定同一批号 (LOT1305384) 样品 3 份, 分别精密加入低中高 3 个浓度的对照品溶液, 按“2.2”项下操作。每份连续进样 3 次, 计算回收率, 结果见表 4。

2.10 样品含量测定

取 3 批同济 2 号颗粒样品, 每批 3 份, 分别按

表4 回收率试验结果

Table 4 Results of recovery test

化合物	样品量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	RSD/%
绿原酸	6.36	3.03	9.55	105.28	2.59
		6.06	14.13	117.09	1.83
		12.12	19.02	104.46	1.98
三七皂苷 R ₁	1.23	1.43	2.58	94.41	3.59
		2.86	3.75	96.29	4.48
		5.71	7.23	105.08	5.45
人参皂苷 R _{g1}	7.06	5.47	13.01	108.78	1.56
		10.94	19.37	110.87	2.73
		21.89	29.52	102.60	4.34
人参皂苷 R _{b1}	4.35	3.59	8.03	102.51	4.64
		7.18	12.00	106.64	2.89
		14.37	19.55	105.78	3.62
黄芪甲苷	0.12	0.24	0.38	108.33	3.98
		0.48	0.62	103.75	3.35
		0.96	1.06	97.92	2.64

“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”色谱条件测定,结果(表5)表明,3个批次的颗粒稳定性良好。

3 讨论

3.1 流动相的选择

在质谱条件摸索中,结合参考文献^[2-6],分别采

用乙腈-甲酸铵缓冲液、甲醇-甲酸铵水溶液、甲酸乙腈溶液-甲酸水溶液等。结果显示,在以水(0.1%甲酸)-乙腈(0.1%甲酸)为流动相的条件下,梯度洗脱5种成分分离效果好,可显著改善峰前伸和拖尾现象,提高灵敏度,缩短不同极性化合物之间的分离时间,故选定其为流动相。

表5 样品测定结果 (n=3)
Table 5 Contents of samples (n=3)

批号	绿原酸		三七皂苷 R ₁		人参皂苷 R _{g₁}	
	质量分数/(μg·g ⁻¹)	RSD/%	质量分数/(μg·g ⁻¹)	RSD/%	质量分数/(μg·g ⁻¹)	RSD/%
LOT1305384	2 373.84±18.86	0.79	497.76±12.64	2.54	2 678.84±44.21	1.65
LOT1311302	2 754.07±134.58	4.89	515.90± 3.92	0.76	2 467.11±86.15	3.49
LOT1402307	1 961.78±8.10	0.41	512.08±9.84	1.92	3 135.15±14.72	0.47

批号	人参皂苷 R _{b₁}		黄芪甲苷	
	质量分数/(μg·g ⁻¹)	RSD/%	质量分数/(μg·g ⁻¹)	RSD/%
LOT1305384	1 657.46±19.12	1.15	48.75±2.19	4.50
LOT1311302	1 516.22±74.11	4.89	42.87±0.37	0.87
LOT1402307	1 987.42±34.17	1.72	1 961.78±8.10	0.41

3.2 色谱柱选择

本实验中前期采用的是 Agilent XDB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),但是预实验的结果并不理想,5种成分的分度度不佳,尤其是人参皂苷 R_{g₁}、R_b与三七皂苷的保留时间几乎一致,亦无法通过调整流动相来进行有效分离。因此更换了色谱柱,以 YMC-Pack Pro 的 C₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)进行试验,得到了较好的分离度。

3.3 供试品提取方法

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。因此本研究对提取溶剂及提取时间进行优化和筛选。溶剂考察了100%甲醇、50%甲醇、水3种溶剂。超声提取时间考察了10、20、30、45、60 min 5个时间段,以 LC-MS 检测滴丸中5种成分总量。结果表明,以50%甲醇为提取溶剂,超声提取30 min 的回收率值最高。

3.4 监测离子的选择

本方法主要采用的是负离子模式,5个待测物中绿原酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{b₁} 的一级质谱表现出强的[M-H]⁻准分子离子峰,而人参皂苷 R_{g₁} 和黄芪甲苷产生的准分子离子峰均为[M+45]⁻峰,推测其可能是[M+HCOO]⁻或[M+2Na-H]⁻等离子^[7]。

本实验建立的 HPLC-MS/MS 法可在短时间内快速分离同济2号颗粒中的5种主要药效成分,快速、灵敏、准确,可用于同济2号颗粒中绿原酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁}、黄芪

甲苷的定量测定,为该药的全面质量控制提供依据。

参考文献

- [1] Heit J A. The epidemiology of venous thromboembolism in the community [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28: 370-372.
- [2] 傅俊曾. 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 R_{g₁} 和 R_{b₁} 含量 [J]. *中国药学杂志*, 2012, 47(1): 61-64.
- [3] 吴茵, 魏欣, 张黎媛, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定参麦注射液7种主要有效成分 [J]. *中草药*, 2014, 45(18): 2625-2630.
- [4] Wang J, Na W, Zhao H Z, et al. Global chemome study by LC coupled with DAD and ESI-Q-TOF MS of a comosite traditional Chinese medicine Qishenyiqi Dropping Pills [J]. *Chromatographia*, 2010, 72(3): 431-440.
- [5] Song M, Zhang S Y, Xu X Y, et al. Simultaneous determination of three *Panax notoginseng* saponins at sub-nanograms by LCMS /MS in dog plasma for pharmacokinetics of compound Danshen tablets [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(32): 3331-3337.
- [6] Dong X, Xu L, Lou Z Y. Determination of chemical components from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by electrospray ion-trap mass spectrometry [J]. *Chin Pharm J*, 2010, 45(14): 1048-1054.
- [7] 郭继芬. 液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析人参皂苷 [J]. *质谱学报*, 2003, 24(4): 5-7.