

HPLC-ESI-MS/MS 法同时测定珠子参中 15 种皂苷类化合物

刘妍如¹, 史鑫波¹, 陈永琴², 黄文静¹, 李智成², 吴景涛², 葛秋萍², 宋忠兴¹, 宋小妹¹, 唐志书^{1*}

1. 陕西中医药大学 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712083

2. 陕西省咸阳市实验中学, 陕西 咸阳 712000

摘要: 目的 建立了高效液相色谱-电喷雾三重四极杆质谱法(HPLC-ESI-MS/MS)同时测定珠子参中 15 种皂苷类化合物(人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Re、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₃、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rh₂、人参皂苷 F₂、人参皂苷 Rg₃、人参皂苷 Rf、三七皂苷 R₁、姜状三七皂苷 R₁、竹节参皂苷 IVa)的检测方法。方法 采用 Waters Sunfire™ C₁₈ 色谱柱(150 mm×1.5 mm, 5 μm), 以含 0.05% 甲酸的乙腈-水(10:90)为流动相, 梯度洗脱分离, HPLC-ESI-MS/MS 多反应监测模式(MRM)检测, 外标法定量。优化了色谱分离条件、质谱去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)和碰撞池出口电压(CXP)等参数, 并考察了浓缩温度、提取时间等对提取率的影响。结果 15 种皂苷类化合物在 0.000 9~2 952.592 3 μg/mL 线性关系良好, $r=0.999 6$, 检出限范围为 0.003~626.554 ng/mL, 定量限为 0.075~1 762.150 ng/mL, 平均加样回收率在 98.15%~101.12%, RSD 为 0.82%~2.15%。结论 该方法操作简便、快速、准确、灵敏度高, 可以对珠子参中多种皂苷类化合物进行分析鉴定。

关键词: 珠子参; 高效液相色谱-串联质谱法; 人参皂苷 Rb₂; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Ro; 人参皂苷 Rd; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₃; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rc; 人参皂苷 Rh₂; 人参皂苷 F₂; 人参皂苷 Rg₃; 人参皂苷 Rf; 三七皂苷 R₁; 姜状三七皂苷 R₁; 竹节参皂苷 IVa

中图分类号: R286.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)19-3502-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.19.024

Simultaneous determination of 15 ginsenosides from *Panacis Majoris Rhizoma* by HPLC-ESI-MS/MS method

LIU Yan-ru¹, SHI Xin-bo¹, CHEN Yong-qin², HUANG Wen-jing¹, LI Zhi-cheng², WU Jing-tao², GE Qiu-ping², SONG Zhong-xing¹, SONG Xiao-mei¹, TANG Zhi-shu¹

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi Province Key Laboratory of New Drugs and Chinese Medicine Foundation Research, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. Xianyang Shiyan Middle School, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective A high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of 15 ginsenoside compounds from *Panacis Majoris Rhizoma* (PMR) was developed. **Methods** A Waters Sunfire™ C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for the separation. The mobile phase consisted of A (H₂O + 0.05% HCOOH) and B (CH₃CN + 0.05% HCOOH) using a gradient elution. For the quantification of ginsenosides, the multiple reaction monitoring (MRM) mode of the mass spectrometer was applied and the declustering potential (DP), collision energy (CE), and collision cell exit potential (CXP) were optimized to perform automatic on-line MS/MS experiments during the chromatographic separation. **Results** By using the optimized method, the linearity range of 15 analytes was 0.000 9 to 2 952.592 3 μg/mL with more than 0.999 determination coefficient (r) of linear regressions, the detection limits of the 15 ginsenosides ranged from 0.003 to 626.554 ng/mL, the limits of quantitation ranged from 0.075 to 1 762.150 ng/mL, the recoveries of 15 ginsenosides in the samples were 98.15%—101.12% with relative standard deviation (RSD) that ranged from 0.82% to 2.15%. **Conclusion** The proposed LC-MS/MS method is accurate and reproducible in accordance with TCM guidelines, showing high sensitivity, rapidness, and recovery. This method allows the assessment of various ginsenosides in a single analytical run providing an innovative tool to control *Panacis Majoris Rhizoma* materials quantification.

Key words: *Panacis Majoris Rhizoma*; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; ginsenoside Rb₂; ginsenoside Re; ginsenoside Ro; ginsenoside Rd; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₃; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rc; ginsenoside Rh₂; ginsenoside F₂; ginsenoside Rg₃; ginsenoside Rf; *Panax notoginseng* saponins R₁; *Panax zingiberensis* saponins R₁; chikusetsusaponin IVa

收稿日期: 2016-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373978, 81501229); 陕西省科学技术厅协同创新计划项目(2015XT-35); 陕西省教育厅“春笋计划”项目(2011K16-03-02); 陕西省教育厅专项计划项目(320104-203010012)

作者简介: 刘妍如(1985—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为药物分析。Tel: (029)38182207 E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

*通信作者 唐志书(1972—), 男, 硕士生导师, 博士, 研究方向为中药制剂制备技术。Tel: (029)38185060 E-mail: tzs6565@163.com

珠子参 *Panax Majoris Rhizoma* (PMR) 系五加科植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Meg var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et Feng ex C. Chow 的干燥根茎, 别名扣子七、钮子七、竹鞭三七、疙瘩七等。民间习用其干燥根状茎入药。珠子参味苦、甘, 微寒, 归肝、肺、胃经, 具有补肺养阴、祛瘀止痛、止血等功效, 主治气阴两虚、烦热口渴、虚劳咳嗽、关节痹痛、咯血、吐血、衄血、崩漏及外伤出血等^[1]。主要化学成分为皂苷类化合物, 主要为齐墩果烷型皂苷, 如竹节参皂苷 IVa; 以及达玛烷型皂苷, 如人参皂苷 Rb₁、Rd (原人参二醇型), 人参皂苷 Re、Rg₁ (原人参三醇型), 珠子参皂 R₁、R₂ (奥可提罗型)^[2]。现代药理学研究显示, 珠子参具有较广泛的药理作用, 表现在抗炎 (抑制生物及化学炎症)、中枢神经系统抑制 (镇痛)、抗肿瘤、增强免疫功能、保护心血管系统以及增强造血功能等^[3-8]。尤其在抗肿瘤作用方面, 相关研究表明, 珠子参中的皂苷成分能够显著抑制体外肿瘤株 (如 HL-60 细胞) 的增殖。同时, 珠子参提取物还具有诱导人肝癌细胞凋亡, 增加抑癌基因 p53 和 p21 表达的作用^[9-10]。因此, 对于珠子参中皂苷类成分的测定有助于今后珠子参制剂的进一步开发与利用。本研究采用高效液相色谱-电喷雾-三重四级杆质谱联用 (HPLC-ESI-MS/MS) 的方法, 同时测定了珠子参中 15 种主要皂苷类成分 (人参皂苷 Rb₂、Re、Ro、Rd、Rg₁、Rb₃、Rb₁、Rc、Rh₂、F₂、Rg₃、Rf, 三七皂苷 R₁, 姜状三七皂苷 R₁, 竹节参皂苷 IVa) 的量, 有利于全面、有效地控制珠子参药材的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱串联 AB SCIEX 4500 Qtrap 三重四级杆线性离子阱质谱仪 (美国 Agilent 公司, 美国 AB SCIEX 公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); GeneVac miVac 低温离心浓缩仪 (英国 GeneVac 公司); Sartorius CPA225D 十万分之一电子分析天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

皂苷对照品人参皂苷 Re (批号 110754-200320), 三七皂苷 R₁ (批号 110745-200109), 人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-200322), 人参皂苷 Rb₁ (批号 110704-200921) 购自中国食品药品检定研究院; 人参皂苷 Rb₂ (批号 A0235)、人参皂苷 Ro (批号 A0522)、

人参皂苷 Rd (批号 A0245)、人参皂苷 Rb₃ (批号 A0236)、人参皂苷 Rc (批号 A0243)、人参皂苷 F₂ (批号 A0449)、人参皂苷 Rh₂ (批号 A0241)、人参皂苷 Rg₃ (批号 A0239)、人参皂苷 Rf (批号 A0522) 购自成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。竹节参皂苷 IVa (批号 20140518, 质量分数 98%) 购自宝鸡市辰光生物科技有限公司。姜状三七皂苷 R₁ 为实验室自制, 质量分数大于 97%。乙腈 (色谱纯, Fisher 公司), 甲酸 (色谱纯, Fluka 公司), 其他试剂均为分析纯。实验用水为娃哈哈纯净水。珠子参药材采自陕西省太白县, 经陕西中医药大学陕西省中药资源产业化协同创新中心刘世军副教授鉴定为珠子参 *Panax japonicus* C. A. Meg var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et Feng ex C. Chow 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Sunfire™ C₁₈ 柱 (150 mm×1.5 mm, 5 μm), 流动相为 0.05% 甲酸-水溶液 (A)-0.05% 甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0~5 min, 10%~23% B; 5~15 min, 23%~35% B; 15~20 min, 35%~48% B; 20~25 min, 48%~96% B; 25~28 min, 96%~10% B; 28~30 min, 10% B。柱温 30 °C; 体积流量为 0.8 mL/min, 进样量 5 μL。

2.2 质谱条件

质谱采用 ESI 负离子模式进行扫描, 检测模式为多反应检测 (MRM)。离子化参数为离子喷雾电压, 负离子模式-4 500 V; 雾化气和辅助气为氮气; 辅助气温度 650 °C, 气帘气温度 35 °C, 化合物离子对, 优化后的采集参数去簇电压 (DP)、碎裂能量 (CE) 和碰撞池出口电压 (CXP) 等信息见表 1, 样品、对照品 MRM 提取离子流谱图见图 1。

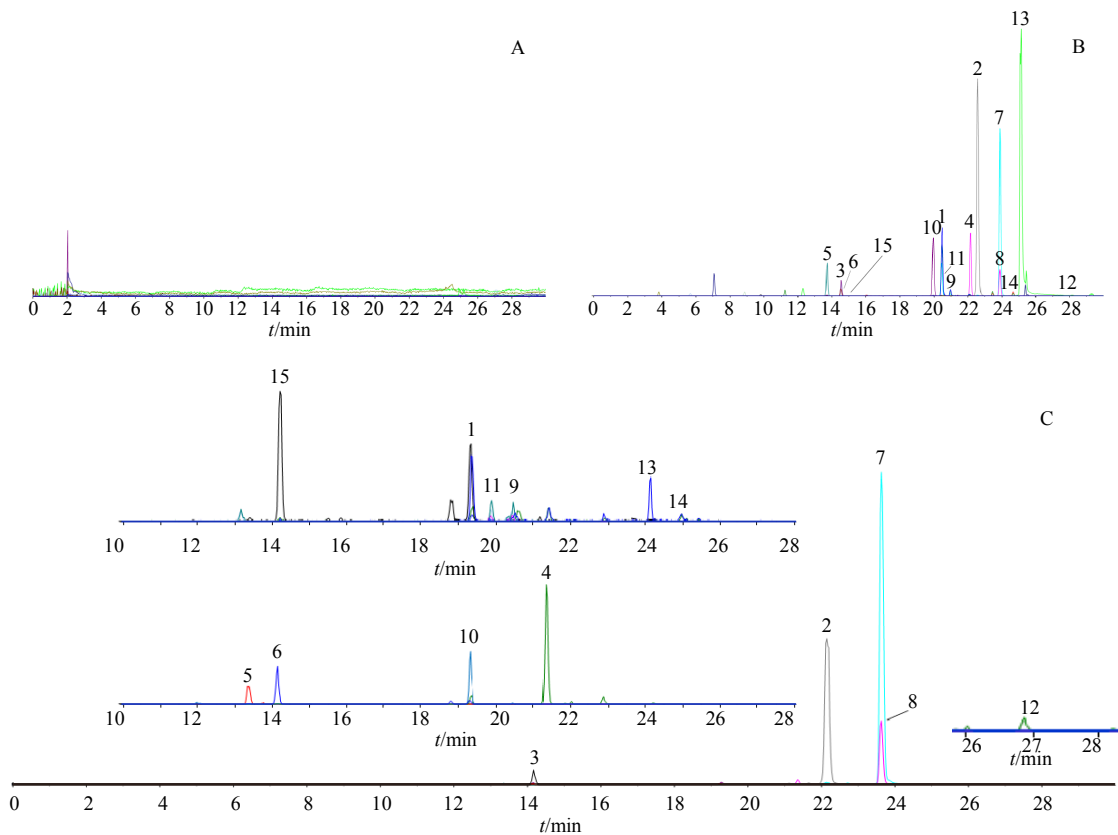
2.3 对照品溶液制备

分别取 15 种皂苷类成分对照品适量, 精密称定, 加 90% 甲醇溶液制成每毫升含人参皂苷 Rb₂ 1.08 mg、人参皂苷 Ro 8.86 mg、人参皂苷 Re 0.08 mg、人参皂苷 Rd 0.05 mg、三七皂苷 R₁ 0.44 mg、人参皂苷 Rg₁ 0.47 mg、姜状三七皂苷 R₁ 4.98 mg、竹节参皂苷 IVa 0.19 mg、人参皂苷 Rb₃ 1.22 mg、人参皂苷 Rb₁ 0.16 mg、人参皂苷 Rc 1.17 mg、人参皂苷 Rh₂ 0.06 mg、人参皂苷 F₂ 0.27 mg、人参皂苷 Rg₃ 0.41 mg、人参皂苷 Rf 0.36 mg 的对照品储备液, 于 4 °C 保存。分别取不同体积上述对照品储备液, 转移至 10 mL 棕色量瓶中, 以 10% 甲醇水溶液制成含

表 1 15 种皂苷类化合物多反应检测参数

Table 1 Optimized MS parameters for 15 ginsenosides

编号	化合物	保留时间/min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	DP/V	CE/V	CXP/V
1	人参皂苷 Rb ₂	20.48	1 077.6	783.6	120	63	9
2	人参皂苷 Ro	22.59	955.5	793.3	120	63	15
3	人参皂苷 Re	14.57	945.5	637.2	125	56	9
4	人参皂苷 Rd	22.17	945.5	621.3	100	59	7
5	三七皂苷 R ₁	13.71	931.3	637.3	140	54	16
6	人参皂苷 Rg ₁	14.56	799.3	637.2	100	34	14
7	姜状三七皂苷 R ₁	23.88	793.3	569.3	150	65	15
8	竹节参皂苷 IVa	23.84	793.2	631.4	130	77	14
9	人参皂苷 Rb ₃	20.46	1 077.5	783.3	160	67	15
10	人参皂苷 Rb ₁	19.95	1 107.5	945.5	160	61	11
11	人参皂苷 Rc	20.40	1 077.5	621.6	150	69	10
12	人参皂苷 F ₂	25.43	783.4	621.5	127	32	15
13	人参皂苷 Rh ₂	27.83	621.4	375.4	142	55	13
14	人参皂苷 Rg ₃	25.43	783.4	459.4	180	57	17
15	人参皂苷 Rf	14.54	799.4	475.3	150	56	18



1-人参皂苷 Rb₂ 2-人参皂苷 Ro 3-人参皂苷 Re 4-人参皂苷 Rd 5-三七皂苷 R₁ 6-人参皂苷 Rg₁ 7-姜状三七皂苷 R₁ 8-竹节参皂苷 IVa
 9-人参皂苷 Rb₃ 10-人参皂苷 Rb₁ 11-人参皂苷 Rc 12-人参皂苷 Rh₂ 13-人参皂苷 F₂ 14-人参皂苷 Rg₃ 15-人参皂苷 Rf

1-ginsenoside Rb₂ 2-ginsenoside Ro 3-ginsenoside Re 4-ginsenoside Rd 5-*Panax notoginseng* saponins R₁ 6-ginsenoside Rg₁ 7-*Panax zingiberensis* saponins R₁ 8-chikusetsusaponin IVa 9-ginsenoside Rb₃ 10-ginsenoside Rb₁ 11-ginsenoside Rc 12-ginsenoside Rh₂ 13-ginsenoside F₂ 14-ginsenoside Rg₃ 15-ginsenoside Rf

图 1 空白溶液 (A)、混合对照品溶液 (B) 和珠子参样品溶液 (C) 的 MRM 提取离子流图

Fig. 1 MRM chromatograms of blank solution (A), mixed reference solution (B), and PMR sample solution (C)

人参皂苷 Rb₂ 81.381 1 μg/mL、人参皂苷 Ro 2 952.592 3 μg/mL、人参皂苷 Re 6.123 9 μg/mL、人参皂苷 Rd 26.402 0 μg/mL、三七皂苷 R₁ 34.137 6 μg/mL、人参皂苷 Rg₁ 37.602 3 μg/mL、姜状三七皂苷 R₁ 1 652.511 9 μg/mL、竹节参皂苷 IVa 13.725 9 μg/mL、人参皂苷 Rb₃ 94.027 0 μg/mL、人参皂苷 Rb₁ 12.226 5 μg/mL、

人参皂苷 Rc 90.695 2 $\mu\text{g/mL}$ 、人参皂苷 Rh₂ 0.887 2 $\mu\text{g/mL}$ 、人参皂苷 F₂ 20.856 7 $\mu\text{g/mL}$ 、人参皂苷 Rg₃ 31.558 6 $\mu\text{g/mL}$ 、人参皂苷 Rf 27.841 6 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.4 供试品溶液制备

参考《中国药典》2015 年版一部对珠子参样品溶液的制备方法，称取珠子参药材适量，研细，取本品粉末（过 2 号筛）约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 60%乙醇 25 mL，称定质量，35 $^{\circ}\text{C}$ 超声处理（功率 180 W，频率 40 kHz）45 min，放冷，再称定质量，用 60%乙醇补足缺失的质量。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 用低温离心浓缩仪浓缩至近干，残渣用 10%乙腈水溶液溶解，制成 4 mg/mL 的样品溶液。溶液移入离心管中，以 12 000 r/min 离心 5 min，0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液，作为待

测供试品溶液。

2.5 标准曲线、检出限和定量限

以空白样品为检测对象，添加不同体积的混合对照品溶液，按照选定的最优分析条件进行测定并分别计算检出限（LOD， $S/N \geq 3$ ）和定量限（LOQ， $S/N \geq 10$ ）。结果表明 LOD 范围为 0.003~626.554 ng/mL，LOQ 为 0.075~1 762.150 ng/mL。

精密吸取“2.3”项下混合对照品溶液，按 7 个梯度体积稀释，同体积进样，进样量为 5 μL ，按照选定的最优分析条件进行测定，以峰面积为纵坐标（Y），化合物质量浓度为横坐标（X）绘制标准曲线，得到各成分的标准曲线方程和线性范围。结果表明，15 种皂苷在质量浓度 0.000 9~2 952.592 3 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内， $r > 0.999 6$ 。15 种皂苷的线性方程、 r 、方法检出限及定量限见表 2。

表 2 珠子参 15 种皂苷同时测定方法线性方程、检出限和定量限

Table 2 Linearity equation, range of determination with detection and quantitation limits results of 15 ginsenosides from PMR

编号	化合物	线性方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	人参皂苷 Rb ₂	$Y=121\ 990 X-19\ 973$	0.999 8	0.008 1~1.627 6	0.055	0.172
2	人参皂苷 Ro	$Y=139\ 110 X+332\ 815$	0.999 0	29.525 9~2 952.592 3	626.554	1 762.150
3	人参皂苷 Re	$Y=254\ 091 X-1\ 680.1$	0.999 6	0.061 2~6.123 9	0.126	0.373
4	人参皂苷 Rd	$Y=2.0 \times 10^6 X+9\ 345.2$	0.999 4	0.528 0~13.201 0	0.025	0.075
5	三七皂苷 R ₁	$Y=133\ 150 X+493.2$	0.999 8	0.341 4~17.068 8	0.042	0.083
6	人参皂苷 Rg ₁	$Y=20\ 304 X+560.3$	0.999 8	0.752 0~18.801 2	0.703	2.110
7	姜状三七皂苷 R ₁	$Y=154\ 850 X-85\ 310$	0.999 5	82.625 6~1 652.511 8	0.595	1.785
8	竹节参皂苷 IVa	$Y=292\ 362 X+10\ 399$	0.999 5	0.686 3~13.725 9	0.357	1.030
9	人参皂苷 Rb ₃	$Y=74\ 009 X+6\ 583.4$	0.999 7	0.009 4~9.402 7	0.075	0.215
10	人参皂苷 Rb ₁	$Y=875\ 336 X-12\ 176$	0.999 5	0.244 5~12.226 5	0.003	0.101
11	人参皂苷 Rc	$Y=55\ 513 X+1\ 471$	0.999 8	0.090 7~29.022 8	0.038	0.212
12	人参皂苷 F ₂	$Y=45\ 735 X+8\ 389.6$	0.999 6	0.020 9~4.171 3	0.054	5.400
13	人参皂苷 Rh ₂	$Y=10\ 677 X+78.8$	0.999 2	0.000 9~0.177 4	0.035	3.500
14	人参皂苷 Rg ₃	$Y=62\ 082 X-2\ 616.2$	0.999 0	0.031 6~3.155 8	0.075	0.188
15	人参皂苷 R _f	$Y=20\ 300 X+504.63$	0.999 8	0.556 8~27.841 6	0.088	0.369

2.6 精密度试验

精密移取“2.3”项下混合对照品溶液，连续进样 6 次，按照本方法所确定的实验条件，进行精密度试验。15 种皂苷类化合物响应信号的 RSD 在 0.91%~7.94%，保留时间的 RSD 在 0.07%~0.12%。

2.7 稳定性试验

取同一批供试品（批号 20150602），分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h，按照本方法所确定的实验条件进行测定，不同皂苷相应峰面积 RSD 在 3.46%~5.55%，保留时间 RSD 在 0.04%~0.12%。

2.8 重复性试验

取同一供试品 6 份（批号 20150602），按“2.4”项下方法分别制备供试品溶液，按照本方法所确定的实验条件进样，记录不同皂苷相应信号强度，计算质量分数。结果表明，各成分信号响应面积 RSD 1.24%~2.71%，保留时间 RSD 在 0.19%~0.30%。

2.9 加样回收率试验

精密称取已测定的珠子参药材 0.1 g，平行称定 9 份。分别精密加入相当于 80%、100%和 120%混标含量的对照品溶液，按照本方法所确定的实验条件进样，记录不同皂苷相应信号强度。结果表明，

各成分平均加样回收率在 98.15%~101.12%，RSD 为 0.83%~2.15%，表明方法准确度较好。

2.10 样品测定

采用上述建立的方法，对 3 批珠子参药材进行

测定。按照“2.4”项下方法分别制备供试品溶液，按照本方法所确定的实验条件进样，记录不同皂苷相应信号强度，按照外标法计算各成分质量分数，结果见表 3。

表 3 3 批珠子参药材中 15 种皂苷类成分测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination for target 15 ginsenosides in three batches of PMR samples ($n=3$)

批号	质量分数/%							
	人参皂苷 Rb ₂	人参皂苷 Ro	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rd	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Rb ₃	人参皂苷 Rb ₁	人参皂苷 Rc
20150601	0.06	26.16	1.53	0.35	0.12	0.05	0.16	0.01
20150602	0.06	25.58	1.47	0.36	0.11	0.04	0.15	0.01
20150603	0.06	25.40	1.56	0.39	0.12	0.04	0.14	0.01

批号	质量分数/%						
	人参皂苷 Rh ₂	人参皂苷 F ₂	人参皂苷 Rg ₃	人参皂苷 Rf	三七皂苷 R ₁	姜状三七皂苷 R ₁	竹节皂苷 IVa
20150601	检测限下	0.14	检测限下	0.99	0.06	44.14	10.84
20150602	检测限下	0.14	检测限下	0.98	0.06	44.53	10.84
20150603	检测限下	0.13	检测限下	0.94	0.06	44.39	10.84

3 讨论

3.1 超声提取方法的选择

为了保证样品中的多种皂苷成分得到充分的提取，试验考察了不同超声提取时间、对成分提取率的影响，分别为 15、25、35、45 和 55 min，结果显示 15 种皂苷类化合物中多数化合物在 45 min 时的提取率最高，因此选择超声提取时间为 45 min。此外，还比较了提取温度和提取次数对提取率的影响，结果表明，超声池温度 35 °C 时，药材中目标化合物提取效率较高，且单次提取率与重复提取率没有明显差别。因此，实验将提取时间和温度定为 45 min 和 35 °C。

3.2 浓缩方式优化

提取液浓缩处理是样品前处理的重要步骤，常用低温离心浓缩、氮气吹干、旋转蒸发等方法，实验比较了上述 3 种方法对多种皂苷提取效果的影响。结果显示，低温离心浓缩与其他 2 种浓缩方式对大部分目标物的富集效果相差较为明显，采用氮气吹干和旋转蒸发方法，对于个别皂苷如姜状三七皂苷 R₁ 提取率下降，原因可能为加热温度较高，导致其在吹干或旋转蒸发过程中发生损失。因此，实验采用低温离心浓缩的方式进行样品溶液预浓缩。

3.3 色谱柱对分离效果的影响

珠子参中 15 种皂苷混合物具有多种结构且性质相似，虽然 MRM 模式对化合物分离度不做要求，但仍要求化合物的基线分离和充分洗脱。实验比较

了不同品牌不同类型色谱柱对这些化合物的分离情况：Thermo BDS hypersil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent 5 TC-C₁₈ (2) 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Sunfire™ C₁₈ 柱 (150 mm×1.5 mm, 5 μm) 和岛津 Inert Sustain C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 等色谱柱对 15 种皂苷类化合物的分离效果，4 种色谱柱对化合物的分离效果均较好，但 Waters 柱对分离人参皂苷，尤其是 R₁ 和 Re 效率较高，且峰形较好，能够提供较好的色谱峰形，因此实验选用 Waters Sunfire™ C₁₈ 柱。

3.4 流动相对分离效果的影响

采用 Waters Sunfire™ C₁₈ 柱，考察了初始比例相同的甲醇-水、乙腈-水等流动相体系对皂苷化合物的分离效果，结果表明，乙腈洗脱皂苷的能力优于甲醇，且色谱峰形较好。另外，在质谱条件优化过程中发现，加入 0.01%~0.05% 甲酸能增强皂苷化合物的响应信号。因此，在乙腈-水流动相体系的水相中分别添加 0.01%~0.05% 的甲酸。结果显示，加入甲酸后，部分皂苷信号增强，洗脱能力和峰形都有不同程度的提高。优化结果表明，加入 0.05% 比例甲酸能获得更好的洗脱能力和信号强度，因此，确定采用 0.05% 甲酸/水-乙腈溶液作为流动相。在此基础上，进一步优化流动相初始比例，将初始梯度比例由 5% 乙腈逐步增加至 15%，最终确定 10% 乙腈作为初始的有机-无机流动相比例。

3.5 质谱条件优化

实验采用多反应检测方法进行质谱信号采集,能够通过对化合物母离子进行碰撞诱导,去除其他子离子干扰,只采集选定特异子离子的质谱信号。因此,得到化合物的信息特异性、灵敏度和准确度都很高。实验采用50%乙腈水溶液配置适当浓度的标准溶液,采用单质谱针泵,以ESI正负2种离子模式,恒流方式进样。根据皂苷化合物母离子质荷比采集二级质谱信号,找到子离子,选择丰度较高子离子作为特异性子离子,然后进行MRM采集参数DP、CE、CXP的优化,一般平行优化两次后得到确切结果。

4 结论

本研究建立了同时检测珠子参中15种皂苷类化合物的液质联用方法。采用Waters Sunfire™ C₁₈色谱柱,以含0.05%甲酸的水-乙腈溶液为流动相,负离子MRM模式采集化合物离子对信号,对目标化合物同时进行定性定量分析。本实验建立的检测方法前处理简单,结果灵敏度、准确度高、检测快捷,各项指标均可满足珠子参中多种皂苷的检测要求。

参考文献

- [1] 许苗苗, 宋 蓓, 杨新杰, 等. 高效液相色谱法同时测定珠子参中4种化学成分的含量 [J]. 中南药学, 2014, 12(8): 796-799.
- [2] Chan H H, Hwang T L, Reddy M V, *et al.* Bioactive constituents from the roots of *Panax japonicus* var. *major* and development of a LC-MS/MS method for distinguishing between natural and artifactual compounds [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4): 796-802.
- [3] 陈 涛, 胡 卫, 崔帮平, 等. 珠子参对小鼠 H₂₂ 肝癌抑制作用及机制 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(24): 2597-2601.
- [4] 贺海波, 石孟琼, 陈 涛, 等. 珠子参水提物抗炎镇痛作用的实验研究 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2224-2227.
- [5] 王 薇, 刘 超, 崔九成, 等. 珠子参种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2525-2529.
- [6] 杨 扬, 余汶静, 光梦凯, 等. 珠子参有效止血部位探究及其对内源性凝血因子的作用 [J]. 现代预防医学, 2011, 38(20): 4235-4237.
- [7] 张继红, 邓 为, 石孟琼, 等. 珠子参皂苷对四氯化碳致大鼠肝纤维化的保护作用 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(5): 73-78.
- [8] 包中文, 覃慧林, 石孟琼, 等. 珠子参总皂苷对心肌梗死保护作用机制研究 [J]. 中药材, 2015, 38(6): 1230-1236.
- [9] 陈 涛, 龚张斌. 珠子参对人早幼粒白血病 HL-60 细胞增殖的抑制和诱导分化作用的研究 [J]. 中国中医药科技, 2009, 16(4): 278-279.
- [10] Song X, Wang W, Zhang X, *et al.* Deglucose chikusetsusaponin IVa isolated from *Rhizoma Panacis Majoris* induces apoptosis in human HepG2 hepatoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5494-5500.