

超高效液相色谱-高分辨质谱法同时测定类叶牡丹中9种三萜皂苷类成分

梁 军, 夏永刚, 郭信东, 王天龙, 匡海学*

黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 目的 建立超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-FT/MS)同时测定类叶牡丹 *Caulorhynchium robustum* 中9种三萜皂苷类成分的方法。方法 采用正离子模式; 色谱柱: ACE Excel 3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3.0 μm); 保护柱: ACE Excel 3 C₁₈ (12.5 mm×4.6 mm, 3.0 μm); 流动相为0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)溶液, 梯度洗脱, 体积流量0.40 mL/min, 柱温35 ℃。结果 定量分析的类叶牡丹中三萜皂苷类成分在考察的浓度范围内呈良好的线性关系($r>0.996$); 加样回收率和RSD分别在98.49%~107.03%和1.00%~3.33%。结论 本研究建立的同时测定类叶牡丹中9种三萜皂苷类成分的UPLC-FT/MS定量分析方法灵敏度高、分辨率高、质量稳定并且简便、准确, 可为综合评价类叶牡丹的质量提供参考。

关键词: 类叶牡丹; 超高效液相色谱-高分辨质谱法; 三萜皂苷; 质量控制; 葎草皂苷 H; 葎草皂苷 G; 葎草皂苷 B; 葎草皂苷 C

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)20-4323-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.029

Rapid simultaneous determination of nine triterpene saponins constituents of *Caulorhynchium robustum* by UPLC-FT/MS

LIANG Jun, XIA Yong-gang, GUO Xin-dong, WANG Tian-long, KUANG Hai-xue

Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To establish a rapid simultaneously determination of nine triterpene saponins of *Caulorhynchium robustum* by UPLC-FT/MS. **Methods** UPLC-MS/MS assay in positive ion mode was performed on a ACE Excel 3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3.0 μm) with the mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous (A) and 0.1% formic acid acetonitrile (B) in gradient elution at a flow rate of 0.40 mL/min and the column temperature was set at 35 ℃. **Results** Satisfactory linearity was achieved with wide linear range and fine linear relationship ($r>0.996$), the recoveries were ranged from 98.49% to 107.03% with the RSD ranging from 1.00% to 3.33%. **Conclusion** It is the first report about simultaneous analysis of nine triterpene saponins of *Caulorhynchium robustum* by UPLC-FT/MS method, which affords highly sensitive, resolution, simple, accurate, and speedy efficient method for quality control of *Caulorhynchium robustum*.

Key words: *Caulorhynchium robustum* Maxim.; UPLC-MS/MS; triterpene saponins constituents; quality control; Cauliside H; Cauliside G; Cauliside B; Cauliside C

类叶牡丹为小檗科红毛七属植物类叶牡丹 *Caulorhynchium robustum* Maxim. 的根及根茎^[1]。类叶牡丹又名红毛七, 生长在中国的东北、西北、西南地区。作为一种民间常用药材, 具有理气止痛、祛风活血的

功效, 药理作用和化学成分研究表明^[1-3], 类叶牡丹中的三萜皂苷具有抗炎活性, 为抗风湿有效部位中的有效成分, 并且量较大, 因此以类叶牡丹三萜皂苷为指标, 探索合适的定量测定方法已迫在眉睫。

收稿日期: 2017-04-13

基金项目: 国家科技部国家重大新药创制专项(2013ZX09102019); 黑龙江省自然科学基金面上项目(H2017063); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才项目(2016209); 黑龙江省博士后基金(LBH-Q13158, LBH-Z10019, LBH-Z15209); 教育部重点实验室——北药基础与应用研究开放课题基金资助(2015bs06)

作者简介: 梁 军(1984—), 女, 博士, 副研究员, 黑龙江中医药大学博士后科研流动站在站工作人员, 主要从事中药、天然药物药效物质基础及其质量控制方法研究。E-mail: lliangjun@163.com

***通信作者** 匡海学 E-mail: hxkuang56@163.com

目前对类叶牡丹三萜皂苷的质量评价没有一种可靠的方法,针对类叶牡丹中三萜皂苷分子缺少发色团、紫外为末端吸收、不具挥发性的特点,项目组前期利用了蒸发光散射检测器进行了类叶牡丹中三萜皂苷的定量研究^[4],但该方法只定量了 5 个皂苷类化合物,且检测时间较长,灵敏度较低。本实验首次采用超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-FT-MS)质谱,同时测定类叶牡丹中 9 种三萜皂苷类成分,为类叶牡丹质量控制提供理论依据。

1 仪器与材料

Thermo 超高效液相(美国 Thermo Fisher 公司); Thermo Scientific Exactive 质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); Millipore Milli-Q 纯水器(美国 Millipore 公司); Mettler Toledo 万分之一电子天平(美国 Mettler Toledo 公司);水为超纯水(美国 Millipore 公司),乙腈为色谱纯(美国 Thermo Fisher 公司),甲酸为分析纯(天津科密欧化学试剂公司);对照品葎草皂苷 H(1)、leonticin D(2)、3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-α-L-arabinopyranosyl-hederagenin-28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester(3)、葎草皂苷 G(4)、3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranosyl-echinocystic acid-28-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl ester(5)、葎草皂苷 D(6)、葎草皂苷 B(7)、echinocystic acid-3-O-β-D-Glucopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside(8)和葎草皂苷 C(9)为课题组分离制备得到(质量分数>99%)。植物样本于 2012 年 9 月采集于黑龙江绥棱地区(编号分别为 20120901、20120902、20120903),并由黑龙江中医药大学吕邵娃教授鉴定为小檗科葎草属植物类叶牡丹 *Cauorlhyllum robustum* Maxim.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: ACE Excel 3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 3.0 μm); 保护柱: ACE Excel 3 C₁₈ (12.5 mm×4.6 mm, 3.0 μm); 柱温 35 ℃; 样品室温度 4 ℃; 体积流量 0.40 mL/min; 进样量 2.0 μL; 流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)溶液,梯度洗脱,0~6 min, 25%~31% B, 0.40 mL/min; 6.0~6.1 min, 31% B, 0.4~0.3 mL/min; 6.1~8.1 min, 31% B, 0.3 mL/min; 8.1~8.2 min, 31%~35% B, 0.3~0.4 mL/min; 8.2~

15.0 min, 35%~62% B, 0.40 mL/min; 15.0~15.1 min, 62~25% B, 0.40 mL/min; 15.1~18.0 min, 25% B, 0.40 mL/min。

2.2 质谱条件

Thermo Scientific Exactive (FT-MS) 质谱仪; ESI 测定条件: 源电压 3.0 kV; 源电流 100.0 μA; 毛细管温度 275 ℃; 源加热温度 250 ℃; 保护气体体积流量 5.0 mL/min; 扫描气体体积流量 10.0 mL/min。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品储备液的制备 精密称取对照品 1~9 适量,加甲醇溶液制成对照品 1~9 终质量浓度分别为 13.5、19.0、4.9、50.0、17.5、22.5、6.5、6.0、10.0 μg/mL 的对照品储备液,放于 4 ℃冰箱保存。

2.3.2 供试品溶液的制备 干燥的类叶牡丹毛发根粉末(0.515 g, 40 目筛)称定质量。在室温下用 20 mL 色谱甲醇溶液浸渍 48 h,并用色谱甲醇补足缺失的质量,滤过,滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,作为初始供试品溶液。由于样品中待测各个皂苷类化合物量差异迥异,故将初始质量浓度分别用色谱甲醇稀释至 50、500、5 000 倍得到样品溶液,进行 UPLC-MS 分析,以保证所有的待测皂苷类化合物在样品中的峰面积处于标准曲线的线性范围内。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项的对照品储备液,对照品 1~9 分别稀释成 0.007 8~13.500 0、0.018 5~19.000 0、0.004 9~4.900 0、0.058 8~50.000 0、0.056 0~17.500 0、0.018 3~22.500 0、0.025 0~6.500 0、0.004 0~6.000 0、0.0060~10.000 0 μg/mL 不同质量浓度的对照品溶液,按照“2.1”项色谱条件进行测定,进样体积为 2 μL。

由于 Thermo Scientific Exactive 质谱仪具有高分辨的性质和具有非常好的重现性,所以对对照品 1~9 在负离子模式以 m/z 差值 20 分别提取 1 251.59~1 251.61、1 089.53~1 089.55、1 235.59~1 235.61、1 235.59~1 235.61、1 235.59~1 235.61、1 073.54~1 073.56、619.37~619.39、765.43~765.45 和 765.43~765.45 (图 1); 在正离子模式以 m/z 差值 20 分别提取 1 253.60~1 253.62、1 091.55~1 091.57、1 237.61~1 237.63、1 237.61~1 237.63、1 254.63~1 254.65、1 075.55~1 075.57、621.39~621.41、784.47~784.49 和 767.44~767.46 (图 2)。值得注意的是化合物 4 和 5 在负离子模式下没有完全分离,但在正离子

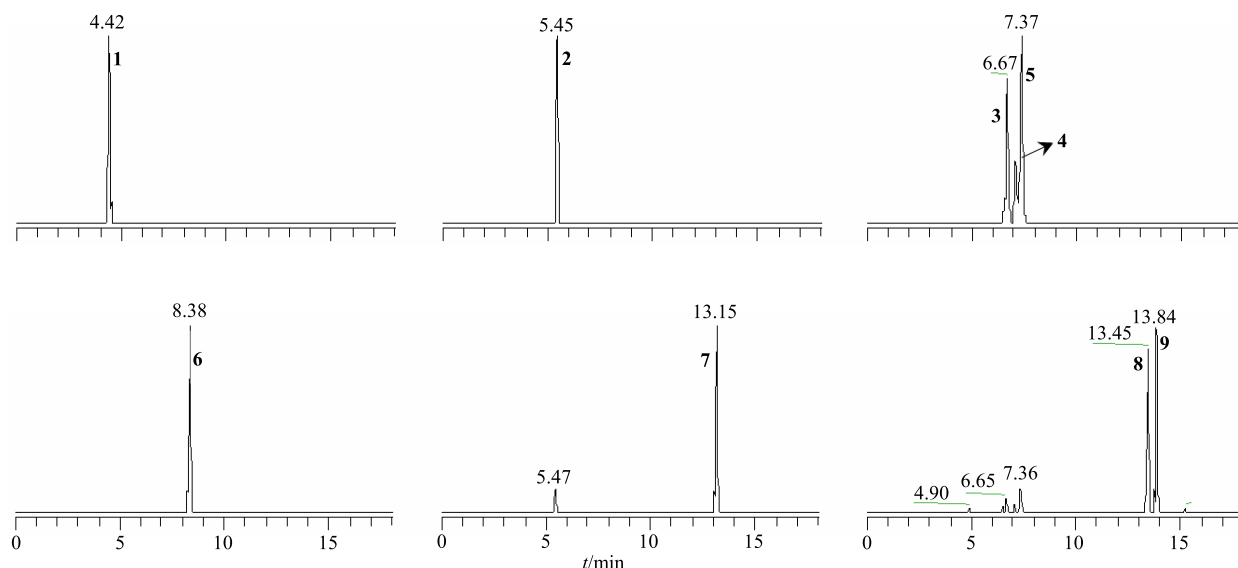


图 1 对照品 1~9 在负离子模式以 m/z 差值 20 的质量范围分别提取的离子流图

Fig. 1 Representative narrow window extracted ion chromatograms (nwXICs) (20) of each reference (1—9) in negative mode

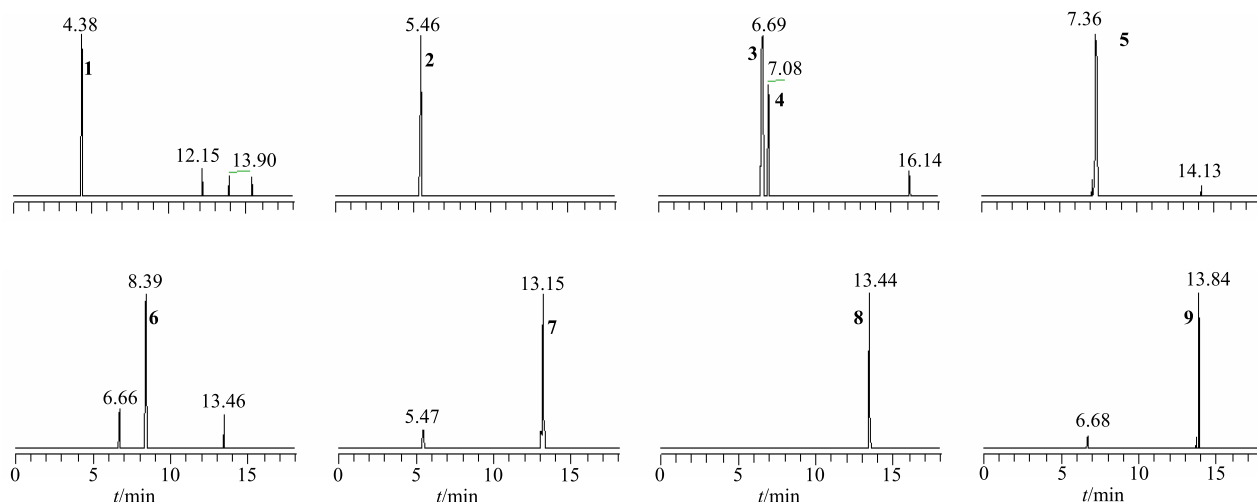


图 2 对照品 1~9 在正离子模式以 m/z 差值 20 的质量范围分别提取的离子流图

Fig. 2 Representative nwXICs (20) of each reference (1—9) in positive mode

模式下由于所形成的加成离子不同,通过提取质荷比差值 20 的窗口色谱图,已完全基线分离,此结果完全可以作为定量分析。

正离子模式以对照品浓度为横坐标 (X),以质荷比差值 20 的质量范围提取的峰面积的百万分之一为纵坐标 (Y) 进行线性回归。通过连续稀释法对对照品储备液进行稀释,以 S/N 为 3 和 10,作为本方法的最低检测限 (LOQ) 和最低定量限 (LOD),结果见表 1。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品储备液,按“2.1”及“2.2”项下色谱质谱条件,平行测定 6 次,分别记录保留时间和峰面积,利用正

离子标准曲线计算质量分数,保留时间的 RSD 值均小于 0.915%,质量分数的 RSD 值均小于 3.483%。混合对照品储备液连续 3 d 重复进样 3 次,同样以保留时间和质量分数进行评价,保留时间的 RSD 值均小于 0.815%,质量分数的 RSD 值均小于 4.839%。结果表明仪器日内和日间精密度均较好。

2.4.3 重复性试验 精密称取类叶牡丹 (编号 20120901) 样品 6 份,按“2.3.2”项下操作,并按“2.1”及“2.2”项下色谱质谱条件进样,记录峰面积,利用正离子标准曲线计算质量分数,结果 9 种成分的 RSD 值在 0.12%~1.05%,表明该方法稳定可行。

表 1 9 种三萜皂苷正离子模式下回归方程、线性范围、LOQ、LOD 及相对分子质量偏差

Table 1 Calibration curves, linear ranges, LOQ, LOD, and Apm of different saponins by UPLC-FT-MS method in positive mode

化合物	线性回归方程	R^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	模式	质量提取范围 m/z	LOQ/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	理论相对分子质量	测定相对分子质量	相对分子质量偏差
1	$Y=329X+0.467$	0.998	0.078~2.340	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1 237.61~1 237.63	7.80	2.60	1 253.616 6	1 253.616 8	-0.159 6
2	$Y=73.62X+0.868$	0.997	0.185~5.550	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1 091.55~1 091.57	18.50	6.17	1 091.563 8	1 091.563 6	0.183 3
3	$Y=964.9X+8.222$	0.997	0.050~1.500	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1 237.61~1 237.63	4.98	1.66	1 237.621 7	1 237.621 1	0.485 0
4	$Y=49.7X+4.834$	0.998	0.580~17.40	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1 237.61~1 237.63	58.80	19.60	1 237.621 7	1 237.621 1	0.485 0
5	$Y=504.3X+18.86$	0.996	0.057~1.710	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	1 254.63~1 254.65	5.68	1.89	1 254.648 3	1 254.647 5	0.638 0
6	$Y=98.17X-0.371$	0.998	0.184~5.520	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1 075.55~1 075.57	18.35	6.12	1 075.568 9	1 075.569 5	-0.558 1
7	$Y=22.81X-0.31$	0.999	0.250~6.500	$[\text{M}+\text{H}]^+$	621.39~621.41	25.00	8.33	621.400 3	621.399 8	0.805 2
8	$Y=523.1X+2.77$	0.999	0.040~1.200	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	784.47~784.49	4.02	1.34	784.484 7	784.484 7	0.000 0
9	$Y=294.6X+1.67$	0.998	0.060~1.800	$[\text{M}+\text{H}]^+$	767.44~767.46	6.00	2.00	767.458 2	767.458 3	-0.130 4

2.4.4 稳定性试验 取类叶牡丹(编号 20120901)样品供试品溶液,按“2.1”及“2.2”项下色谱质谱条件,每隔 4 h 测定 1 次,记录其峰面积,利用正离子标准曲线计算质量分数。结果 9 种成分的 RSD 均小于 2.02%。结果表明,供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取已测定的类叶牡丹样品,分别加入对照品化合物 1~9,按“2.3.2”项下方法制得供试品溶液,按照“2.1”项色谱进样,根据表 1 中各回归方程计算化合物 1~9 回收率分别为 99.54%、101.32%、98.49%、107.03%、105.70%、99.79%、104.95%、102.28%和 101.05%,RSD 分别为 2.00%、1.00%、3.22%、2.12%、2.04%、2.15%、2.93%、3.33%和 2.09%。

2.5 样品分析

建立的质谱定量方法,成功应用于 3 批类叶牡丹样品中(图 3),各成分质量分数见表 2。以样品

20120901 为例,实验结果表明(正离子模式),9 个皂苷类成分的总量为 323.14 mg/g,其中葎草皂苷 G 的质量分数高达 241.71 mg/g,占总皂苷量的 74.80%。其他 8 个皂苷量由高到低的顺序依次为葎草皂苷 B (29.06 mg/g)、葎草皂苷 C (27.59 mg/g)、葎草皂苷 D (11.92 mg/g)、leonticin D (8.11 mg/g)、3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- α -*L*-arabinopyranosyl-hederagenin-28-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -*D*-glucopyranosyl ester (2.21 $\mu\text{g}/\text{mg}$)、echinocystic acid-3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-arabinopyranoside (2.10 mg/g)、葎草皂苷 H (0.25 mg/g) 和 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -*L*-arabinopyranosyl-echinocystic acid-28-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -*D*-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -*D*-glucopyranosyl ester (0.19 mg/g)。

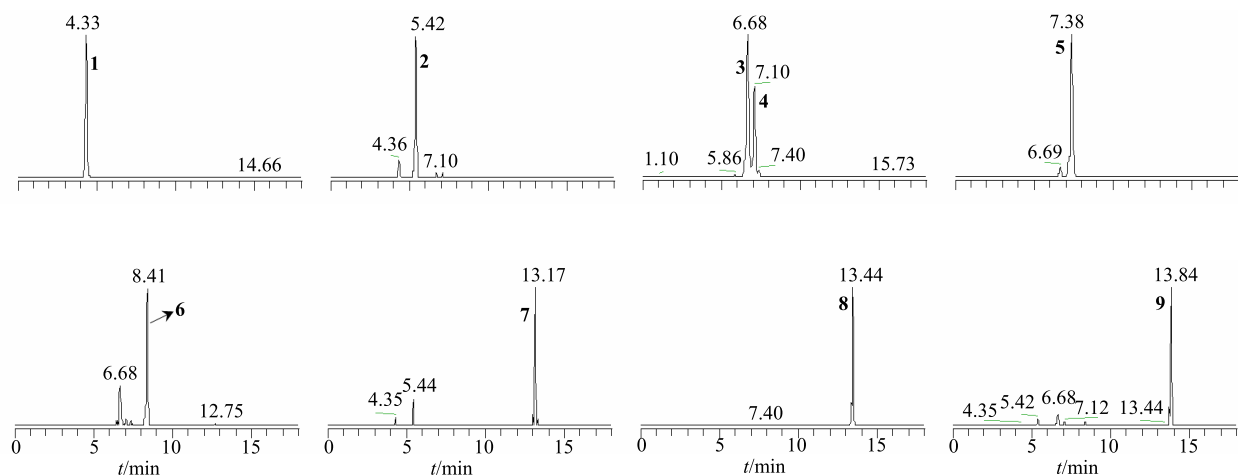
图 3 类叶牡丹样品中化合物 1~9 在正离子模式以 m/z 差值 20 的质量范围分别提取的离子流图Fig. 3 Representative nwXICs (20) of compounds 1—9 of *C. robustum* hairy roots samples in positive mode

表2 类叶牡丹样品正离子模式下9种三萜皂苷的质量分数

Table 2 Contents of 9 saponins in samples by FT-MS in positive mode

样品编号	化合物/(mg·g ⁻¹)									总量
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
20120901	0.25	8.11	2.21	241.71	0.19	11.92	29.06	2.10	27.59	323.14
20120902	0.26	7.84	1.65	245.31	0.19	12.08	29.74	2.05	28.42	327.54
20120903	0.27	6.82	1.35	239.34	0.20	11.56	29.69	2.03	29.98	321.23

3 讨论

皂苷类成分缺少发色团、紫外为末端吸收、不具有挥发性,一般采用紫外检测器末端吸收(203 nm)或者蒸发光散射检测器进行检测^[5-8],使用紫外末端吸收(203 nm)进行检测,容易受到流动相等各种试剂的干扰,使基线不稳,影响定量。使用蒸发光散射检测器对皂苷类成分进行定量研究,ELSD在梯度洗脱时能提供稳定的基线,但该方法检测限和定量限较差,线性范围也较窄。

本实验采用UPLC-FT/MS法对类叶牡丹三萜皂苷进行定量研究。Thermo Scientific Exactive (FT/MS)质谱具有高灵敏度,在 $-0.807\ 8\times 10^{-6}\sim 0.809\ 7\times 10^{-6}$ 内,偏差均小于 2×10^{-6} ,而且实测分子式和理论分子式的同位素比例,亦完全匹配。根据高分辨质谱信息,在类叶牡丹根中共定量检测了9个三萜皂苷,该结果为类叶牡丹的质量评价及加工提供了科学依据。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 李国玉. 类叶牡丹抗风湿有效部位的化学成分研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2006.
- [3] 李国玉, 徐娜, 刘晓燕, 等. 类叶牡丹化学成分的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1431-1436.
- [4] 张艳海. 类叶牡丹皂苷类成分及其含量测定方法研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2006.
- [5] 胡静, 张铁军, 许浚. RP-HPLC法测定三七总皂苷中3种皂苷 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 218-219.
- [6] 陈碧莲, 祝明, 郭增喜, 等. 反相高效液相色谱法测定三七药材5种皂苷含量 [J]. 医药导报, 2010, 29(11): 1485-1486.
- [7] 沙东旭, 张满来. HPLC-ELSD测定三七药材及其制剂中三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁及Rb₁的含量 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 112-114.
- [8] 应弘梅, 戚中杰, 郭达伟, 等. HPLC-ELSD测定细梗香草皂苷B与皂苷C的含量 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(9): 704-706.