

三七茎基总皂苷的提取及人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 的含量测定

于生兰, 秦枫, 陈毓(江苏畜牧兽医职业技术学院动物药学院, 江苏 泰州 225300)

摘要: 目的 利用 LC-MS/MS, 建立同时测定三七茎基总皂苷中人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 含量的分析方法。方法 色谱柱: BDS HYPERSUL C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(梯度洗脱); 柱温: 30 °C; 质谱条件: 采用负离子多反应监测方法(MRM)测试, 用于定量分析的对照品离子对分别为: 人参皂苷 Rg₁ m/z 799.6→475.5; 人参皂苷 Rb₁ m/z 1107.9→783.7; 内标物紫杉醇 m/z 852.5→525.3。结果 人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 的线性范围分别为 0.173~17.3 μg·mL⁻¹ 和 0.159~16.0 μg·mL⁻¹, 精密度和准确度等均符合样品分析的要求。结论 该法准确、灵敏、特异性强, 适用于三七茎

基金项目: 江苏省教育厅高校高新技术发展项目(JHZD06-48)

作者简介: 于生兰, 女, 副教授 Tel: (0523)86158187 E-mail: slyu70@126.com

基总皂苷及其制剂中人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 浓度的同时测定。

关键词: 液质联用; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Rb₁; 三七茎基总皂苷

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)02-0124-04

The Extract and the Determination of Ginsenoside Rg₁ and Rb₁ of Total Saponins of Stem Base of *Panax Notoginseng*

YU Shenglan, QIN Feng, CHEN Yu(*Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College Animal Pharmacy Department, Taizhou 225300, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS/MS method for simultaneous determination of ginsenosides Rg₁ and Rb₁ in total saponins of stem base of *Panax notoginseng*. **METHODS** BDS HYPERSUL C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution). The column temperature was 30 °C. The ginsenosides Rg₁ and Rb₁ were detected by the negative electrospray ionization mode (Rg₁ *m/z* 799.6→475.5; Rb₁ *m/z* 1107.9→783.7; paclitaxel *m/z* 852.5→525.3). **RESULTS** The calibration curves of ginsenosides Rg₁ and Rb₁ were linear in the range of 0.173–17.3 μg·mL⁻¹ and 0.159–16.0 μg·mL⁻¹ respectively. The precision and accuracy were accord with the requirements. **CONCLUSION** The results show that this method established in the present research is accurate, sensitive and specific. And it is suitable for simultaneous determination of ginsenosides Rg₁ and ginsenosides Rb₁ in total saponins of stem base of *Panax notoginseng*.

KEY WORDS: LC-MS/MS; ginsenosides Rg₁; ginsenosides Rb₁; total saponins of stem base of *Panax notoginseng*

三七为五加科植物 *Panax notoginseng* (Burk) F.H. 的干燥根, 具有散瘀止血、消肿定痛之功效, 是传统的名贵中药材。三七茎基含有与三七类似的皂苷类有效成分, 近年来为了充分利用三七资源, 它们已作为商品流通于医药市场, 但国家标准和地方标准尚未见对其质量进行监控, 其有效成分人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 的含量测定研究较少。人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 是三七的代表性成分, 利用 HPLC 分析测定 2 种成分非常耗时, 运行时间一般都在 20 min 以上, 且灵敏度和专属性较差^[1-2]。为此, 笔者参照中国药典 2005 年版(一部)及相关文献^[3], 对试验条件进行比较优化, 建立了 LC-MS/MS 方法, 用于人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 浓度的同时测定, 以期对三七茎基及其制品的质量控制提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

API4000 型串联四级杆质谱仪, 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Analyst 1.4.1 数据处理系统 (美国 ABI); Agilent 1100 色谱系统包括四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱 (美国 Agilent); BT25S 十万分之一电子天平 (德国赛多利斯); RE-3000 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SHZ-III 型循环水真空泵 (上海亚荣生化仪器厂) 等。

1.2 对照品与试剂

人参皂苷 Rg₁ (批号: 110703-200726, 纯度: 99%)、人参皂苷 Rb₁ (批号: 110704-200420, 纯度:

99%) 均购自中国药品生物制品检定所。紫杉醇 (批号: 100382-200301, 纯度: 98%) 购自昆明科翔生物科技有限公司。三七茎基药材, 由云南文山三七研究所提供, 经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥茎基。乙腈和甲醇均为色谱纯, 水为超纯水。

1.3 LC-MS/MS 分析条件

1.3.1 液相色谱条件 色谱柱: Thermo 电子公司 BDS HYPERSUL C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (B) 和水 (A) 按以下方式梯度洗脱: 20% B 洗脱 3 min 后用 30% B 洗脱, 5 min 后用 25% B 洗脱, 洗脱至 10 min 时 B 的浓度达到 90%。柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μL。

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI) 负离子模式进行检测, 检测模式为多反应离子监测模式 (MRM)。具体仪器参数: 离子喷雾电压 (IS) 均为 4 100 V; 离子源雾化温度 (TEM) 均为 450 °C; 去集簇电压 (额定电压) (DP) Rg₁ 为 -100 V, Rb₁ 为 -110 V; 激发碰撞电压 (CE) Rg₁ 为 -47 V, Rb₁ 为 -65 V。用于定量分析的对照品离子对分别为: 人参皂苷 Rg₁ *m/z* 799.6→475.5; 人参皂苷 Rb₁ *m/z* 1 107.9→783.7; 内标物紫杉醇 *m/z* 852.5→525.3。

1.4 样品处理

1.4.1 对照品及内标溶液的配制 精密称取人参皂苷 Rg₁ 3.99 mg、人参皂苷 Rb₁ 4.33 mg 于 10 mL

量瓶中,加入甲醇 10 mL,得该类对照品的对照品储备液。精密称取紫杉醇 1.01 mg 于 10 mL 量瓶中,加入甲醇至刻度,超声 30 min,重新定容至 10 mL,取上述溶液 100 μ L 至 10 mL 量瓶中,加入甲醇至刻度,涡旋震荡 1 min,即得内标溶液。

1.4.2 供试品溶液的制备 称取三七茎基药材 1 kg,粉碎,过 20 目筛,以 10 倍量 80%乙醇提取 3 次,每次 1.5 h。提取液浓缩后分别经乙醚、正丁醇萃取,正丁醇萃取物经大孔树脂纯化后得三七茎基总皂苷(total seponins of stem base of *Panax notoginseng*, SSPN)^[4]。

精密称取 SSPN 粉末 0.2 g 于 10 mL 量瓶中,加入甲醇至刻度,超声 30 min,重新定容至 10 mL,得供试品储备液。取供试品储备液 100 μ L 至

10 mL 量瓶中,加入甲醇至刻度,涡旋震荡 1 min。取上述溶液 100 μ L 和内标溶液 100 μ L,加甲醇稀释至 1 mL,涡旋震荡 2 min,经 0.45 μ m 有机滤膜过滤,即得供试品溶液。

2 结果与分析

2.1 方法专属性

所用的色谱条件使得被分析化合物在 5~10 min 内被洗脱出来,在选定色谱条件下,人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和内标物紫杉醇均能分离完全,峰形良好,内源性物质无干扰,其保留时间分别约为 6.76, 7.84 和 9.35 min,以保留时间和各对离子的响应强度作为分析标准,使方法的专属性更强,有效避免了其他结构相似的皂苷对这 2 种皂苷测定的干扰。色谱图见图 1。

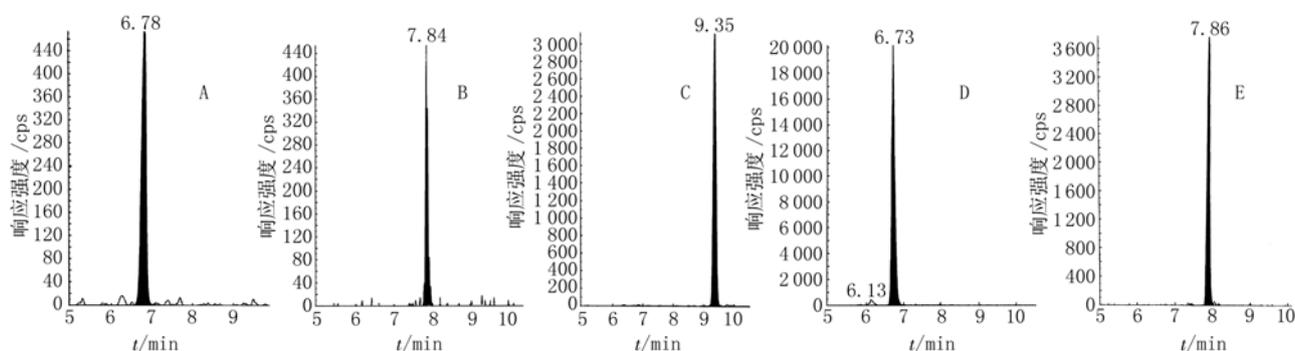


图 1 对照品、内标物紫杉醇和样品的色谱图

A-人参皂苷Rg₁(*m/z* 799.6→475.5); B-人参皂苷Rb₁(*m/z* 1107.9→783.7); C-内标物紫杉醇(*m/z* 852.5→525.3); D-样品(人参皂苷Rg₁的测定); E-样品(人参皂苷Rb₁的测定)

Fig 1 Chromatograms of standard, internal standard and sample

A-ginsenoside Rg₁(*m/z* 799.6→475.5); B-ginsenoside Rb₁(*m/z* 1107.9→783.7); C-docetaxel(internal standard) (*m/z* 852.5→525.3); D-sample(the determination of ginsenoside Rg₁); E-sample(the determination of ginsenoside Rb₁)

2.2 标准曲线与线性范围考查

精密量取标准品储备液适量,加入适量内标溶液,配制不同浓度的标准溶液,其中人参皂苷 Rg₁ 浓度分别为 0.173, 0.433, 1.73, 4.33, 17.3 μ g·mL⁻¹; 人参皂苷 Rb₁ 浓度分别为 0.159, 0.399, 1.60, 3.99, 16.0 μ g·mL⁻¹。分别取 5 μ L 注入质谱仪,以样品峰面积与内标峰面积之比为纵坐标,对照品浓度为横坐标,用加权($W=1/C^2$)最小二乘法进行回归,求得直线回归方程分别为:人参皂苷 Rg₁: $Y=1.84X+0.118(r=0.9999)$, 线性范围: 0.173~17.3 μ g·mL⁻¹; 人参皂苷 Rb₁: $Y=0.613X+0.068(r=0.9952)$, 线性范围: 0.159~16.0 μ g·mL⁻¹。

2.3 仪器精密度试验

精密吸取同一浓度对照品溶液 5 μ L,重复进样 5 次,结果人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 的峰面积和

内标峰面积比值的 RSD 分别为 2.4% 和 2.6%。表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验

精密吸取按“1.4.2”项下方法制备的同一浓度供试品溶液 5 μ L,将供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定,结果人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 的峰面积和内标峰面积比值的 RSD 分别为 1.6% 和 2.3%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验

取同一样品(批号: 20080206)按“1.4.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件测定样品中人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 的含量。结果,人参皂苷 Rg₁ 的平均含量为 331.4 mg·g⁻¹, RSD 为 1.1%; 人参皂苷 Rb₁ 的平均含量为 152.4 mg·g⁻¹, RSD 为

3.9%, 表明本方法重复性良好。

2.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号为20080206) 0.2 g, 平行6份。按“1.4.2”项下方法, 分别精密加入人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁对照品储备液和内标溶液适量, 制备供试品溶液, 按“1.3”项下方法操作, 求得供试品溶液中皂苷的含量, 计算回收率, 结果见表1。

表1 人参皂苷 Rg₁ 和人参皂苷 Rb₁ 的回收率测定结果(n=6)
Tab 1 Recovery rate of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁(n=6)

组分名称	样品含量/ μg·mL ⁻¹	加入量/ μg·mL ⁻¹	测得量/ μg·mL ⁻¹	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
人参皂苷 Rg ₁	6.36	6.38	12.48	97.96	97.61	1.89
	6.36	6.38	12.79	100.40		
	6.36	6.38	12.59	98.82		
	6.36	6.38	12.26	96.23		
	6.36	6.38	12.11	95.05		
	6.36	6.38	12.38	97.17		
人参皂苷 Rb ₁	3.05	3.03	5.92	97.37	97.09	3.44
	3.05	3.03	5.81	95.56		
	3.05	3.03	5.99	98.52		
	3.05	3.03	6.26	103.0		
	3.05	3.03	5.78	95.07		
	3.05	3.03	5.66	93.09		

2.7 样品含量测定

称取3份SSPN样品各0.2 g, 按“1.4.2”项下方法制备供试品溶液, 按“1.3”项下方法操作, 采用标准曲线计算含量, 结果见表2。

表2 三七茎基总皂苷中人参皂苷 Rg₁ 和 Rb₁ 的含量(n=3)
Tab 2 The content of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Rb₁ in SSPN(n=3)

SSPN	人参皂苷 Rg ₁ /%	人参皂苷 Rb ₁ /%
20080303	31.88	14.59
20080309	31.42	15.73
20080315	32.06	15.38

3 讨论

中药大多存在成分复杂的问题, 人参皂苷

Rg₁、人参皂苷Rb₁在紫外区203 nm有末端吸收, 但其紫外响应较低, 采用普通的HPLC紫外检测器难以进行高灵敏度的检测且专属性较差, 本试验建立了LC-MS/MS分析方法, 采用负离子多反应监测技术。对质量为m₁的待测组份做子离子谱, 从子离子谱中选择一个特征离子m₂。正式分析样品时, 第一级质谱选定m₁, 经碰撞活化后, 第二级质谱选定m₂。只有同时具有m₁和m₂特征质量的离子才被记录。这样得到的色谱图就进行了3次选择: LC选择了组份的保留时间, 第一级MS选择了m₁, 第二级MS选择了m₂, 这样得到的色谱峰可以认为不再有任何干扰。本试验所建立的方法灵敏度高、结果准确、重复性好、操作简便快速, 符合中药样品分析的要求, 较其他一些方法节省了时间和成本^[5-6], 可用于2种人参皂苷Rg₁和Rb₁的定量分析, 为不同的人参或三七类中药及制剂的质量控制提供方法学参考。

采用HPLC-MS/MS法对人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁含量测定的报道较少。笔者采用上述色谱条件, 为了减小定量误差, 并获得较好的重现性, 经过考察几种物质, 最终采用紫杉醇作为内标物, 与待测物质均能分离完全, 峰形良好, 内源性物质无干扰。

REFERENCES

- [1] WANG X, WU G Q, ZHANG X Q. Simultaneous determination of ginsenoside Rg₁ and Rb₁ in total saponins of American ginseng by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2004, 10(6): 27-29.
- [2] WU G S, DING Y F, YANG D, et al. Determination of ginsenoside Rg₁ and Rb₁ notoginsenoside R₁ in Tiaojing Yangyan capsule by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(12): 1734-1736.
- [3] Ch.P(2005)Vol I (中国药典2005年版.一部) [S]. 2005: 10-11.
- [4] SUN H X, YE Y P, PAN H J, et al. Adjuvant effect of *Panax notoginseng* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice [J]. Vaccine, 2004, 22(29): 3882-3889.
- [5] LIU J H, WANG X, CAI S Q, et al. Analysis of the constituents in the Chinese drug notoginseng by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. J Chin Pharm Sci(中国药学: 英文版), 2004, 13(4): 225-237.
- [6] HONG A H, LU D X, QI R B, et al. Simultaneous determination of ginsenosides Rg₁, Re and Rb₁ in mouse plasma by HPLC/MS/MS [J]. J Jinan Univ: Nat Sci Med Ed (暨南大学学报: 自然科学版), 2007, 28(5): 491-493.

收稿日期: 2010-05-17