

LC-MS/MS 法同时测定参芍胶囊中人参皂苷和芍药苷的含量

孙大赢, 赵文法, 李广华, 潘广洲, 张金龙

(聊城市食品药品检验检测中心, 聊城 252000)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法同时测定参芍胶囊中人参皂苷 Rb₂、Rd、Re、Rg₁ 和芍药苷的含量。方法: 采用 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱(0~10 min, 15% 乙腈→40% 乙腈; 10~13 min, 40% 乙腈→70% 乙腈), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 ℃; 采用电喷雾离子源(ESI), 多反应监测(MRM)模式, 负离子检测。结果: 人参皂苷 Rb₂、Rd、Re、Rg₁ 和芍药苷的线性范围分别为 0.01~12.66 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 7)、0.01~10.34 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 6)、0.02~17.44 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 1)、0.02~17.29 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 1)和 0.01~11.76 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), 平均加样回收率(*n*=6)均在 96.8%~100.1% 范围内。3 批样品中人参皂苷 Rb₂、Rd、Re、Rg₁ 和芍药苷的含量测定结果分别为 3.903~3.990、6.555~6.628、10.69~11.42、7.024~8.381 和 84.65~86.87 mg·g⁻¹。结论: 所建立的方法可用于参芍胶囊的质量控制。

关键词: 参芍胶囊; 人参茎叶总皂苷; 白芍; 人参皂苷 Rb₂; 人参皂苷 Rd; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rg₁; 芍药苷; 中药多组分含量测定; 液相色谱-质谱联用

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)01-0186-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.01.25

Simultaneous determination of ginsenosides and paeoniflorin in Shenshao capsules by LC-MS/MS

SUN Da-ying, ZHAO Wen-fa, LI Guang-hua, PAN Guang-zhou, ZHANG Jin-long

(Liaocheng Experimental Center for Drug and Food, Liaocheng 252000, China)

Abstract Objective: To establish an LC-MS/MS method for simultaneous determination of ginsenoside Rb₂, ginsenoside Rd, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁ and paeoniflorin in Shenshao capsules by LC-MS/MS. **Methods:** The chromatographic separation was performed on a Hypersil Gold C₁₈ column(2.1 mm×100 mm, 3 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% formic acid at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹(0-10 min, 15% acetonitrile→40% acetonitrile; 10-13 min, 40% acetonitrile→70% acetonitrile). The column temperature was 40 ℃. Negative electrospray ionization source(ESI) was used combined with multiple reaction monitoring(MRM). **Results:** Good linearity was obtained in the range of 0.01~12.66 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 7) for ginsenoside Rb₂, 0.01~10.34 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 6) for ginsenoside Rd, 0.02~17.44 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 1) for ginsenoside Re, 0.02~17.29 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 1) for ginsenoside Rg₁ and 0.01~11.76 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9) for paeoniflorin, respectively. The average recoveries of five components were 96.8%~100.1%. The contents of ginsenoside Rb₂,

第一作者 Tel: (0635) 8535536; E-mail: 15666359918@163.com

ginsenoside Rd, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁ and paeoniflorin in 3 batches of samples were 3.903–3.990 mg·g⁻¹, 6.555–6.628 mg·g⁻¹, 10.69–11.42 mg·g⁻¹, 7.024–8.381 mg·g⁻¹ and 84.65–86.87 mg·g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The established method can be used for the quality control of Shenshao capsules.

Keywords: Shenshao capsules; total ginsenosides of ginseng stems and leaves; Paeoniae Radix Alba; ginsenoside Rb₂; ginsenoside Rd; ginsenoside Re; ginsenoside Rg₁; paeoniflorin; multi-component determination of traditional Chinese medicine; LC-MS/MS

参芍胶囊是由人参茎叶总皂苷和白芍制成的复方制剂,具有活血化瘀、益气止痛的功效,临床上适用于气虚血瘀所致的胸闷、胸痛、心悸、气短,以及冠心病心绞痛见上述证候者^[1]。参芍胶囊以人参茎叶总皂苷为君药,用于补气;白芍为臣药,行瘀止痛,养阴和血;两药合用,共奏活血化瘀,益气止痛之功效^[2]。本研究参考相关文献,采用高效液相色谱-质谱(LC-MS/MS)联用技术,通过多反应离子监测对参芍胶囊中的人参皂苷 Rb₂、Rd、Re、Rg₁ 和芍药苷 5 个成分同时进行测定。本方法的建立可为参芍胶囊的质量控制提供参考,并大大提高现行标准(中国药典 2015 年版一部参芍胶囊)常规液相色谱方法的检测效率,缩短检测时间。

1 仪器与试药

1.1 仪器

U-3000 高效液相色谱仪(ThermoFisher 公司), TSQ Quantum ACCESS MAX 三重四极杆质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)(ThermoFisher 公司);Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶;ThermoFisher 公司);AE240 电子天平(Mettler Toledo 公司);Milli-Q Integral 超纯水仪(Millipore 公司)。

1.2 试药

对照品人参皂苷 Rb₂(批号 111715-200802,含量以 94.8% 计)、人参皂苷 Rd(批号 111828-201603,含量以 92.1% 计)、人参皂苷 Re(批号 110754-201626,供含量测定用)、人参皂苷 Rg₁(批号 110703-201128,含量以 93.4% 计)、芍药苷(批号 110736-201640,含量以 95.2% 计)均购于中国食品药品检定研究院。样品参芍胶囊(每粒装 0.25 g)购于山东华源天宏药业有限公司。甲醇、乙腈和甲酸(Thermo Fisher 公司)为色谱纯,水为超纯水,其他试剂(天津大茂化学试剂厂)均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品储备液 分别精密称取人参皂苷 Rg₁、Rb₂、Re、Rd 和芍药苷的对照品适量,用 70% 甲醇水

制成含人参皂苷 Rg₁ 172.9 μg·mL⁻¹, 人参皂苷 Rb₂ 126.6 μg·mL⁻¹, 人参皂苷 Re 174.4 μg·mL⁻¹, 人参皂苷 Rd 103.4 μg·mL⁻¹ 和芍药苷 123.6 μg·mL⁻¹ 的混合溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液 取样品内容物适量,混匀,取约 0.2 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加 70% 甲醇水适量,超声处理(功率 400 W,频率 40 kHz)30 min,放冷至室温,用 70% 甲醇水稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取 5 mL,置 100 mL 量瓶中,用 70% 甲醇水稀释至刻度,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按参芍胶囊制法,取辅料分别制备缺白芍和人参茎叶总皂苷的阴性样品。按照“2.1.2”项下方法制备溶液,即得。

2.2 色谱-质谱条件

色谱条件:采用 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm),柱温 40 ℃,以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 15% 乙腈→40% 乙腈;10~13 min, 40% 乙腈→70% 乙腈),流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),蒸发温度为 400 ℃,离子传输毛细管温度为 350 ℃,鞘气压力 276 kPa,辅助气压力 34 kPa,电压为 3 kV。选择负离子扫描方式,多反应监测(MRM)模式,5 个分析物的质谱参数见表 1。

在上述试验条件下,样品及阴性样品的提取离子流图谱见图 1-a、b。

2.3 线性关系考察及定量限测定

取混合对照品储备液适量,加 70% 甲醇水稀释制备成 5 个浓度的系列混合对照品溶液,按照“2.2”项下的条件进行测定。以对照品质量浓度(X)为横坐标,待测物质峰面积(Y)为纵坐标,进行线性回归计算,得到线性回归方程及相关系数,结果表明 5 个分析物在相应的范围内线性关系良好。采用混合对照品溶液逐级稀释,进样测定,以 S/N=10 时的对照品质量浓度为 5 个分析物各自的定量限,结果见表 2。

表 1 5 个分析物的质谱参数

Tab. 1 The MS/MS parameters of 5 analytes

分析物 (analyte)	保留时间 (retention time)/min	分子式 (formula)	离子对 (ion pair) m/z	管透镜补偿电压 (tube lens offset voltage)/V	碰撞能 (collision energy)/V
人参皂苷 R_{g_1} (ginsenoside R_{g_1})	5.98	$C_{42}H_{72}O_{14}$	$799.3 \rightarrow 637.6^*$ $799.3 \rightarrow 475.6$	138	26 33
人参皂苷 R_{b_2} (ginsenoside R_{b_2})	10.33	$C_{53}H_{90}O_{22}$	$1077.6 \rightarrow 783.6^*$ $1077.6 \rightarrow 945.6$	175	46 38
人参皂苷 Re (ginsenoside Re)	6.00	$C_{48}H_{82}O_{18}$	$945.5 \rightarrow 637.3^*$ $945.5 \rightarrow 475.2$	162	36 51
人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	11.14	$C_{48}H_{82}O_{18}$	$945.5 \rightarrow 621.3^*$ $945.5 \rightarrow 783.5$	164	40 36
芍药苷 (paeoniflorin)	2.71	$C_{23}H_{28}O_{11}$	$525.1 \rightarrow 327.0^*$ $525.1 \rightarrow 121.0$	65	23 33

注 (note): * 为定量离子对 (* means transition for quantification)

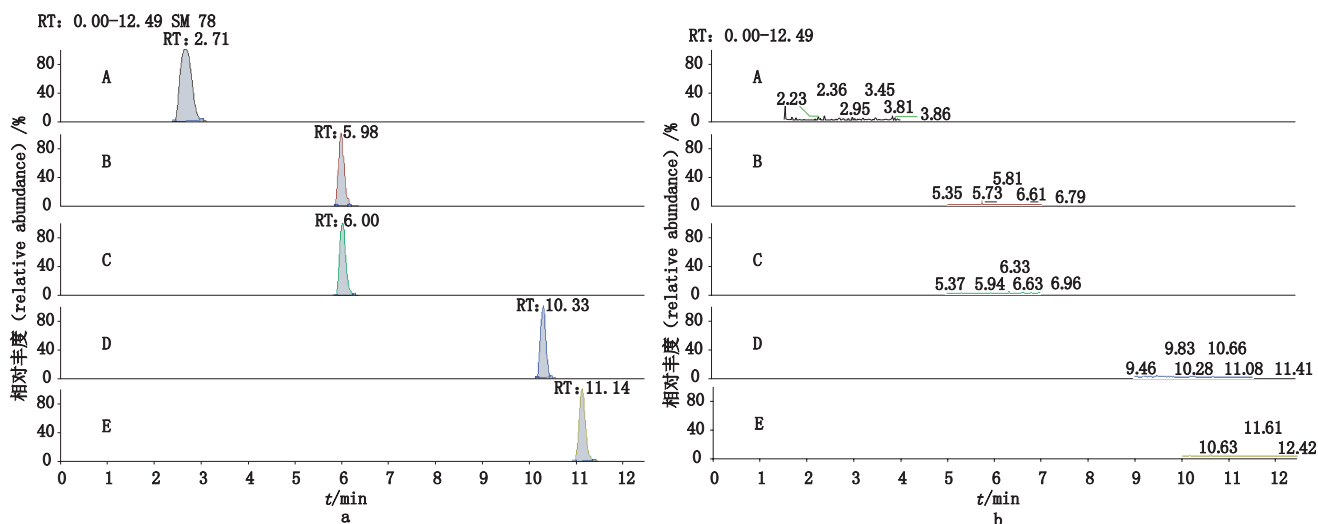
A. 芍药苷 (paeoniflorin) B. 人参皂苷 R_{g_1} (ginsenoside R_{g_1}) C. 人参皂苷 Re (ginsenoside Re) D. 人参皂苷 R_{b_2} (ginsenoside R_{b_2}) E. 人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)

图 1 样品 (a) 及阴性样品 (b) 中 5 个分析物提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of 5 analytes in sample (a) and negative sample (b)

表 2 线性关系结果及定量限

Tab. 2 Linearity and quantitation limits

成分 (component)	线性方程 (regression equation)	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	r	定量限 (quantitation limit)/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
人参皂苷 R_{g_1} (ginsenoside R_{g_1})	$Y=10\,016.6+46.137\,9X$	0.02~17.29	0.999 1	3.04
人参皂苷 R_{b_2} (ginsenoside R_{b_2})	$Y=7\,004.47+80.675\,9X$	0.01~12.66	0.999 7	1.29
人参皂苷 Re (ginsenoside Re)	$Y=62\,041.2+273.795X$	0.02~17.44	0.999 1	1.88
人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	$Y=25\,194.3+302.648X$	0.01~10.34	0.999 6	1.05
芍药苷 (paeoniflorin)	$Y=4\,893.14+331.666X$	0.01~11.76	0.999 9	1.22

2.4 精密度试验

取混合对照品溶液,连续进样 6 次,测得人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_2} 、Re、Rd 和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 2.2%、1.5%、1.8%、2.0%、1.7%,表明仪器的精密度良好。

2.5 重复性试验

按“2.1.2”项下方法制备同一批样品(批号 160701)

的供试品溶液 6 份,进样测定。结果人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_2} 、Re、Rd 和芍药苷的平均含量分别为 8.38、3.99、11.58、6.70、86.90 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.7%、2.7%、2.5%、1.8%、2.2%,表明本方法的重复性良好。

2.6 稳定性试验

取“2.1.2”项下同一份供试品溶液,分别于 0、2、

4、8、12、24 h 进样测定,测得人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b2} 、 R_e 、 R_d 和芍药苷峰面积的 RSD 分别为 2.5%、1.9%、1.8%、2.9%、2.4%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的参芍胶

囊(批号 160701)6 份,每份 0.1 g,分别置 100 mL 量瓶中,精密加入混合对照品储备液适量,按“2.1.2”项下方法制备供试溶液,进样测定,计算回收率。结果见表 3。

表 3 回收率结果 ($n=6$)

Tab. 3 Recoveries

成分 (component)	原有量 (original)/ μg	加入量 (added)/ μg	测得量 (found)/ μg	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside R_{g1})	838	864	1 703	100.1	2.3
人参皂苷 R_{b2} (ginsenoside R_{b2})	399	380	767	96.8	1.9
人参皂苷 R_e (ginsenoside R_e)	1 142	1 046	2 172	98.5	2.4
人参皂苷 R_d (ginsenoside R_d)	663	620	1 278	99.2	2.2
芍药苷 (paeoniflorin)	8 687	7 898	16 494	98.8	1.7

2.8 样品测定

取 3 批次参芍胶囊样品,按照“2.1.2”项下方法

制备供试品溶液,进样测定,通过回归方程计算含量,结果见表 4。

表 4 样品测定结果 ($X \pm SD$, $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 4 Results of sample analysis

批号 (batch No.)	人参皂苷 R_{g1} (ginsenoside R_{g1})	人参皂苷 R_{b2} (ginsenoside R_{b2})	人参皂苷 R_e (ginsenoside R_e)	人参皂苷 R_d (ginsenoside R_d)	芍药苷 (paeoniflorin)
160701	8.381 ± 0.152	3.990 ± 0.084	11.42 ± 0.251	6.628 ± 0.141	86.87 ± 1.825
160805	7.024 ± 0.109	3.903 ± 0.066	10.69 ± 0.224	6.555 ± 0.135	84.65 ± 1.644
160901	8.036 ± 0.144	3.952 ± 0.074	11.23 ± 0.249	6.582 ± 0.122	86.67 ± 1.583

3 讨论

3.1 检测方法的选择

人参皂苷 R_{g1} 与 人参皂苷 R_e 分离困难,用常规液相色谱方法实现分离造成每次进样时间很长。LC-MS/MS 法表现出的高选择性、高灵敏度,不要求人参皂苷 R_{g1} 与 人参皂苷 R_e 完全分离,大大缩短分析时间。另外人参皂苷类成分没有生色团,用紫外检测器测定时只能取末端吸收,干扰较大,采用质谱检测器,用 MRM 方式测定,可以有效避免干扰,专属性更强,可以准确测定样品中人参皂苷的含量。

3.2 提取条件的选择

实验中分别考察了 50% 甲醇水、70% 甲醇水和 100% 甲醇作为提取溶剂,超声与回流 2 种提取方式,结果发现选用 70% 甲醇水超声提取 30 min,各被测成分峰形较好,提取率较高。

3.3 流动相的选择

实验中分别考察了甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液等流动相体系。结果显示,采

用乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相,检测灵敏度较高。故选用乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为本实验的流动相。采用梯度洗脱方式,可有效缩短分析时间,改善峰形,提高灵敏度和分离能力等。

3.4 质谱条件的考察

质谱分析中,对各被测成分的质谱参数进行了优化,人参皂苷类成分在负离子模式下有较高的响应和较好的峰形^[4]。芍药苷在负离子检测模式下易产生加合离子峰 $[M+HCOO]^{-}$ ^[5],以 m/z 525.1 作为母离子进行优化,确定以 m/z 525.1 $\rightarrow$ 327.0 为芍药苷的定量离子对,故本实验选择负离子模式进行测定。

3.5 小结

本实验建立了 LC-MS/MS 法同时测定参芍胶囊中人参皂苷 R_{b2} 、 R_d 、 R_e 、 R_{g1} 和芍药苷 5 个有效成分的含量,该方法简便、快速,灵敏度高,专属性好,可用于参芍胶囊的质量控制。相较于现行标准(中国药典 2015 年版一部参芍胶囊),能很大程度提高检测效

率。LC-MS/MS 法具有高准确性、高灵敏度、高专属性以及检测限和定量限更低的优点,已逐渐成为中药多成分测定的有效方法。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 1127
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 1127
- [2] 郝朝霞, 柳青. 参芍胶囊治疗冠心病心绞痛 40 例临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(9): 841
HAO ZX, LIU Q. Clinical observation of 40 cases of Shenshao capsules in treatment of angina pectoris[J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis, 2005, 3(9): 841
- [3] 覃莎, 王锦, 朱平川, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定灯盏生脉胶囊中的 11 个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1336
QIN S, WANG J, ZHU PC, et al. Simultaneous determination of eleven active components in Dengzhanshengmai capsules by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(8): 1336
- [4] 赵振霞, 王敏, 王钰宁, 等. UPLC-MS/MS 法测定心可舒胶囊中 5 种皂苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 494
ZHAO ZX, WANG M, WANG YN, et al. Simultaneous determination of five saponins in Xinkeshu capsules by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(3): 494
- [5] 周芙琼, 夏崇才, 朱维娜, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定止痒乳膏中 10 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1207
ZHOU FQ, XIA CC, ZHU WN, et al. Simultaneous determination of ten compounds in Zhiyang cream by UPLC-MS/MS method[J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(7): 1207
- [6] 闫寒, 赵松岩, 刘运嘉, 等. LC-MS-MS 法测定参体和参须中人参皂苷 Rb₁、Rb₂ 和 Rc 含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 105
YAN H, ZHAO YS, LIU JY, et al. Simultaneous quantitation of Rb₁, Rb₂ and Rc in Ginseng tail and the main root of Ginseng by LC-MS-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2013, 19(6): 105
- [7] 杨钊, 张燕, 朱韵洁, 等. UPLC-MS/MS 测定康艾注射液 5 种主要成分含量[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(4): 297
YANG Z, ZHANG Y, ZHU YJ, et al. Determination of 5 components in Kangai injecton by UPLC-MS/MS[J]. Chin Pharm J, 2011, 46(4): 297
- [8] 蔡博, 董林毅, 王静, 等. 超高效液相色谱联用技术同时测定小金丸中 7 种成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(8): 718
CAI B, DONG LY, WANG J, et al. Simultaneous determination of seven components in Xiaojin pills by UPLC-MS[J]. Chin Pharm J, 2015, 50(8): 718
- [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
FU JZ, SONG SY, JIANG M, et al. Simultaneous determination of the content of astragaloside IV, Danshensu, protocatechualdehyde, ginsenosides Rg₁ and Rb₁ in Qishenyiqi dropping pills by LC-MS[J]. Chin Pharm J, 2012, 47(1): 61
- [10] 余健, 徐晓珍, 顾利强, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定参麦注射液中 9 种皂苷[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(1): 71
YU J, XU XZ, GU LQ, et al. Simultaneous quantification of ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rd, Rc, Rb₂, Rb₁, Ro and ophiopogonin D in Shenmai injection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(1): 71
- [11] 郑敏霞, 陈喆, 刘培, 等. 白芍中芍药苷及其衍生物的 UPLC-MS/MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1641
ZHENG MX, CHENG Z, LIU P, et al. Analysis and identification of glycosides in *Paeonia lactiflora* by UPLC-MS/MS[J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(12): 1641
- [12] 刘颖, 欧阳玥, 李松, 等. 芪蒺强心胶囊中 12 种成分的 UPLC-MS 测定[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1822
LIU Y, OU YY, LI S, et al. Determination of twelve active compounds in Qili Qiangxin capsules by UPLC-MS[J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(10): 1822
- [13] 方昱, 万丽丽, 朱金辉, 等. UPLC-MS/MS 测定同济 2 号颗粒剂中黄芪甲苷、绿原酸、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和三七皂苷 R₁[J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 394
FANG Y, WAN LL, ZHU JH, et al. Determination of astragaloside IV, chlorogenic acid, ginsenosides Rg₁, Rb₁ and notoginsenoside R₁ in Tongji No. 2 granules by HPLC-MS/MS[J]. Drug Eval Res, 2015, 38(4): 394
- [14] 张毅, 周慧. HPLC-MS/MS 法同时测定参乌健脑胶囊中 8 种成分[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2470
ZHANG Y, ZHOU H. Simultaneous determination of eight components in Shenwu Jiannao capsules by HPLC-MS/MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(14): 2470
- [15] 乔晓莉, 肖学风, 周大铮, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定注射用益气复脉(冻干)中 13 种成分[J]. 中草药, 2014, 45(23): 3402
QIAO XL, XIAO XF, ZHOU DZ, et al. Simultaneous analysis of 13 components in Yiqi Fumai injection (freeze-dried) by UPLC-MS/MS method[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(23): 3402

(本文于 2017 年 1 月 6 日收到)