

Semi-LC/MS 技术快速定量分析黄芪样品中黄芪甲苷含量

郑 重^{1,2}, 宋凤瑞¹, 刘 舒^{1,2}, 赵先恩¹, 刘志强¹, 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:为了测定黄芪中的黄芪甲苷含量,应用半高效液相色谱-质谱串联技术(Semi-LC/MS),以薯蓣皂苷为内标化合物,仅用一段色谱保护柱分离掉大部分干扰性成分,同时使目标化合物富集,采用 Waters 公司的多反应监测(MRM)扫描模式检测。结果表明:黄芪甲苷在 2.85~57.0 mg/L 的范围内线性关系良好,稳定性和重复性实验 RSD<3%,样品回收率达 98.9%。Semi-LC/MS 方法可以对黄芪样品中黄芪甲苷进行快速定量分析,是一种黄芪甲苷的简单、高效、灵敏的定量检测方法。

关键词:黄芪甲苷;半高效液相色谱-质谱串联技术(Semi-LC/MS);多反应监测(MRM);定量分析

中图分类号:O657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2012)04-0208-04

Rapid Quantitative Analysis of Astragaloside in the Astragalus Samples by Semi-LC/MS

ZHENG Zhong^{1,2}, SONG Feng-rui¹, LIU Shu^{1,2}, ZHAO Xian-en¹, LIU Zhi-qiang¹, LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to determinate the astragaloside in the astragalus by Semi-LC/MS, diosgenin is used as an internal standard compound, a chromatography guard column was used to remove most interference components and enrich the target compound which was subsequently determined by MS under multiple reaction monitoring (MRM) scanning-mode. The calibration curve is linear over the range of 2.85—57.0 mg/L of astragaloside. The RSDs for the stability and reproducibility experiments are less than 3%, and sample recovery rate is 98.9%. Semi-LC/MS is one simple, efficient, sensitive method for rapid quantitative analysis of astragaloside in astragalus samples.

Key words: Astragaloside; semi-high performance liquid chromatography - mass spectrometry (Semi-LC/MS); multiple reaction monitoring (MRM); quantitative analysis

黄芪为豆科草本植物蒙古黄芪 *Astragalus* (Bge.) Hsiao、膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Fisch.) Bge. 的根,具有补气固表、利水退肿、托

收稿日期:2012-03-31;修回日期:2012-06-13

基金项目:国家自然科学基金(20953001)、吉林省与中国科学院科技合作资金(2010SYHZ0052,2011CJT0015)项目资助

作者简介:郑 重(1978~),男(汉),吉林省长春人,助理研究员,从事天然药物化学与有机质谱学研究。E-mail: zhengzh@ciac.jl.cn

通信作者:刘志强(1962~),男(汉),研究员,从事天然药物化学与有机质谱学研究。E-mail: liuzq@ciac.jl.cn

毒排脓、生肌等功效^[1], 含皂甙、多糖、多种氨基酸及硒、锌、铜等多种微量元素。黄芪甲苷为黄芪的主要有效成分, 是其质量控制的主要指标。黄芪甲苷的分析方法已有比色法、荧光分光光度法、薄层扫描法、HPLC 法(含 UPLC 法)、HPLC-MS 法等^[2-9]。其中比色法、薄层扫描法存在定量不准确的缺点; 荧光分光光度法实验条件苛刻, 对实验者操作技能要求较高; 由于黄芪甲苷吸收波长在 200 nm 左右, 给常规 HPLC 分析带来挑战; 目前高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法是较为常用的黄芪甲苷的测定方法, 但其检测灵敏度受到蒸发光检测器的制约, 不适合微量样品分析。本工作采用半高效液相色谱-质谱串联技术(Semi-LC/MS)测定黄芪中的黄芪甲苷含量, 优化检测条件, 旨在建立一种简便、快速、准确的黄芪甲苷的定量检测方法。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

Acquity Ultra Performance LC 系统: 美国 Waters 公司产品; XEVO-TQ 三重四极杆质谱: 美国 Waters 公司产品, 配有 Waters Masslynx V4.1 数据工作站。

1.2 主要材料与试剂

黄芪甲苷对照品: 中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110781200613, 供含量测定用; 薯蓣皂苷标准品; 黄芪药材: 购自北京同仁堂药店、吉林大药房、益和大药房; 乙腈: 美国 Fisher 公司产品, 色谱纯; 甲醇、正丁醇、氨水: 分析纯, 均为北京化工厂产品; 实验用水为超纯水。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters XBridge C₁₈ 柱(2.5 μm, 4.6×20 mm); 流动相: V(乙腈): V(水)=55:45 的混合溶液; 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 室温; 进样体积: 3 μL。

1.3.2 质谱条件 以薯蓣皂苷为内标化合物, 负离子模式检测, 采用多反应监测(MRM)方式定量, 毛细管电压 2.50 kV, 离子源温度 350 °C, 脱溶剂气体流速 800 L/h, 锥孔气流速 50 L/h, 碰撞气流速 0.15 mL/min, 得到的质谱图示于图 1。

1.4 对照品储备液的制备

准确称取黄芪甲苷对照品 5.70 mg, 以甲醇溶解, 并定容到 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 即得

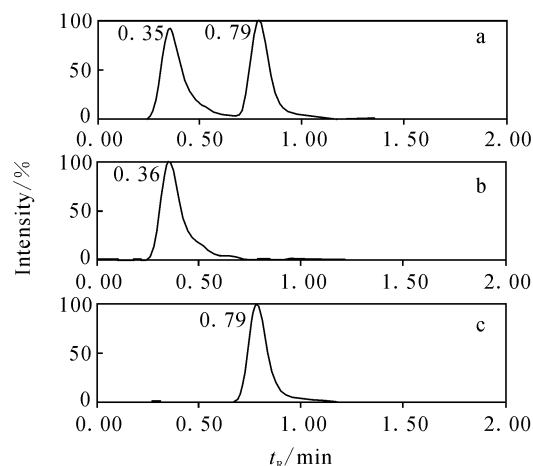


图 1 质谱总离子流图(a)、黄芪甲苷 MRM 离子流图(b)和薯蓣皂苷 MRM 离子流图(c)

Fig. 1 Total ion current chromatogram (a), MRM spectrum of Astragaloside (b) and MRM spectrum of Dioscin (c)

0.570 g/L 的黄芪甲苷对照品溶液。准确称取薯蓣皂苷标准品 10.01 mg, 以甲醇溶解, 并定容于 10 mL 容量瓶中, 摇匀, 即得 1.00 g/L 薯蓣皂苷对照品溶液。

1.5 样品溶液的制备

取黄芪药材粉末 4.089 2 g, 置索氏提取器中, 加甲醇 40 mL, 冷浸过夜, 再加甲醇适量, 加热回流 4 h, 提取液回收溶剂并浓缩至干, 加水 10 mL, 微热使残渣溶解, 用水饱和的正丁醇振荡提取 4 次, 每次 40 mL, 合并正丁醇液, 用氨试液充分洗涤 2 次, 每次 40 mL, 弃去氨液, 正丁醇液蒸干, 加水 5 mL 使残渣溶解, 放冷, 通过 D101 型大孔吸附树脂(内径 1.5 cm, 长 12 cm), 以 50 mL 水洗脱, 弃去水液, 再用 40% 乙醇 30 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 继续用 70% 乙醇 80 mL 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 用甲醇溶解, 并转移至 5 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得待测样品。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

分别采用电喷雾正离子模式与负离子模式对黄芪甲苷与薯蓣皂苷进行分析, 发现在负离子模式下两者均有很好的质谱信号响应, 所以最终确定采用负离子模式对这两种化合物进行分析,

并对其 MRM 条件进行了优化,其结果列于表 1。选择其中信号最强的离子对进行定量测定。

表 1 黄芪甲苷与薯蓣皂苷的 MRM 质谱条件

组分	母离子 [M-H] ⁻	子离子 [M-H] ⁻	锥孔电 压/V	碰撞能 量/V
黄芪甲苷	783.67	100.94	-38	46
	783.67	113.02	-38	34
薯蓣皂苷	867.67	721.66	-58	32
	867.67	101.01	-58	48

2.2 线性关系考察

分别准确吸取浓度为 2.85、5.70、11.4、14.25、28.5、42.75、57.0 mg/L 的黄芪甲苷对照品溶液(含 0.50 mg/L 的薯蓣皂苷对照品内标),按 1.3 色谱、质谱条件测定,以对照品溶液质量浓度为横坐标(x),黄芪甲苷峰面积与薯蓣皂苷峰面积比值为纵坐标(y)绘制校准曲线,计算回归方程为 $y=0.0115x+0.0136$, $r^2=0.9913$,样本含量 $n=7$, $F=661$,黄芪甲苷在 2.85~57.0 mg/L 的范围内线性关系良好,其线性曲线示于图 2。

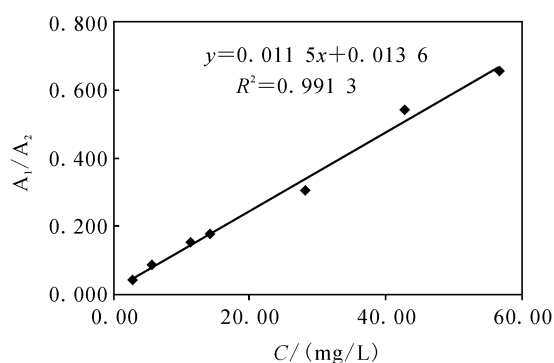


图 2 黄芪甲苷线性曲线

Fig. 2 The standard curve of Astragaloside

2.3 稳定性试验

取所制备的黄芪样品溶液,稀释 5 倍后,取 200 μ L,加入 50 μ L 薯蓣皂苷标准品,定容于 1mL 容量瓶中,分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定黄芪甲苷的峰面积与薯蓣皂苷峰面积,计算峰面积比值的 RSD 为 2.12%。结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 重复性试验

取同一样品按 1.5 项方法制备 6 份样品溶液,稀释 5 倍后,取 200 μ L,加入 50 μ L 薯蓣皂苷标准品,定容于 1 mL 容量瓶中,分别进样,测定黄芪甲苷峰面积与薯蓣皂苷峰面积,计算黄芪甲苷含量,RSD 为 2.41%。

2.5 回收率试验

准确称取已知含量(0.638 mg/g)的黄芪药材,共 6 份,分别准确加入黄芪甲苷对照品溶液(含黄芪甲苷 1.425 mg),按 1.5 项方法制备供试液,稀释 5 倍后,取 200 μ L,加入 50 μ L 薯蓣皂苷标准品,定容于 1 mL 容量瓶中,测定并计算平均回收率为 98.9%,RSD 为 1.77%。

2.6 样品含量测定

采用 1.5 项方法,对不同批次的黄芪药材进行处理,用 1.3 项色谱、质谱方法进行测定,各样品中的黄芪甲苷的含量测定结果列于表 2。

表 2 黄芪中黄芪甲苷的含量测定结果(mg/g)

样品名称	结果 1	结果 2	平均值
北京同仁堂药店	7.79	8.08	7.94
吉林大药房	6.44	6.32	6.38
益和大药房	9.89	10.12	10.01

2.7 结果讨论

由于质谱检测器的高灵敏度,使得 LC/MS 技术在药物定性定量分析领域有广泛的用途^[10-14]。但是由于常规 HPLC 消耗时间长,质谱检测器的信号稳定性不如紫外等常规检测器,中药复杂体系干扰因素较多,来自于溶剂中的噪音对信号产生干扰,这些都制约着 LC/MS 技术应用于药物定量领域的发展。本试验采用多反应监测(MRM)扫描模式^[15-21],以母离子-子离子反应通道作为定量手段,能够有效的排除存在于提取物中非目标化合物的干扰,因皂苷类成分在负离子模式下信噪比较高,而且碎裂能量低,故本试验采用负离子模式检测。试验中曾经尝试从自动进样器进样,不经过任何色谱柱,直接对待测样品进行 MRM 分析,但由于提取物含有复杂的干扰性成分,在离子化过程中存在电离竞争反应,导致目标化合物离子化效率不高且重现性差;并且从进样开始样品在流路中一直处于扩散状态,导致色谱峰型展宽,影响定量重现性;因此

从信噪比、峰型、定量效果等方面都不能得到满意的结果,于是采取了连接一段保护柱(Waters XBridge C₁₈柱,2.5 μm,4.6×20 mm)的方案,能够分离掉大部分干扰性成分,同时能够使目标化合物达到富集效果。试验中引入薯蓣皂苷作为内标化合物,进一步提升了定量稳定性,得到了令人满意的效果。虽然采用了 Waters XBridge C₁₈ 2.5 μm,4.6×20 mm 色谱柱,但是其作用仅仅为目标物富集与干扰物分离,并不需要高性能色谱柱来实现分离,同时与常规 LC 不同,目标物与内标化合物出峰时间均在 1 min 之内,检测时间可与 UPLC 相媲美。

3 结论

采用 Semi-LC/MS 技术,多反应监测模式,建立了黄芪药材中黄芪甲苷的快速、准确、高灵敏的分析方法。Semi-LC 法与常规 HPLC 法相比,能够显著提高分析效率、节省分析时间、减少溶剂损耗,并且质谱(MRM 模式)优秀的选择性,能避免实际分析中的假阳性结果。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会编. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010, 一部, 283-284.
- [2] 李永吉,管庆霞,关延彬,等. HPLC 与比色法测定复方黄芪注射液中总皂苷与黄芪甲苷含量[J]. 黑龙江医药,2004,17(1):1-3.
- [3] 杜鸣,刘养清,严志,等. 茴香酸荧光分析法测定血清中黄芪甲苷[J]. 北京大学学报(医学版),2001,33(3):274-276.
- [4] 张崇禧,王艳芳,蔡恩博,等. 薄层扫描法分析黄芪中黄芪甲苷含量[J]. 资源开发与市场,2010,26(9):769-772.
- [5] 马艳蓉,刘泓,柴国林,等. HPLC-ELSD 测定黄芪中黄芪甲苷含量及相关试验条件选择的探讨[J]. 现代中药研究与实践,2003,17(6):17-19.
- [6] 杨俊,王文辉,王齐,等. UPLC-ELSD 法测定黄芪中的黄芪甲苷含量[J]. 光谱实验室,2009,26(3):484-486.
- [7] 王铎,盛龙生,宋越,等. HPLC-MS 法测定步长脑心通中多种黄芪皂苷类成分[J]. 中国天然药物,2006,4(4):287-290.
- [8] 刘浩文,刘嘉仪,杨妙荣,等. 黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的两种方法的比较研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(6):659-662.
- [9] 欧阳春华. 黄芪甲苷含量测定几种常用方法的比较,黄芪甲苷含量测定几种常用方法的比较[J]. 中国现代医药应用,2009,3(15):139-141.
- [10] STAHNKE H, REEMTSMA T, ALDER L. Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue, analysis with LC-MS/MS[J]. Analytical Chemistry,2009,81(6):2185-2192.
- [11] TOKMANA N, SOLERA C, MARINEL F, et al. Determination of amitraz and its transformation products in pears by ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 3138-3145.
- [12] CRISTIANA C, LEANDRO, HANCOCK P, et al. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2006,94-101.
- [13] BRIAN K, STEVEN J. LEHOTAY, et al. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 196-207.
- [14] 单鸣秋,钱雯,高静,等. UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物[J]. 中国中药杂志,2011,36(12):1626-1629.
- [15] 朱瑞芝,王凯,吴新华,等. 超高效液相色谱-质谱法同时快速测定烟叶中的几种芳香酸和酚酸[J]. 分析实验室,2009,28(10):108-112.
- [16] 张健,桂新,章苏宁,等. 甜茶叶中甜茶苷的 UPLC-MS/MS 分析[J]. 光谱实验室,2011,28(5):2692-2696.
- [17] 李水军,刘罡一,印其友,等. 液相色谱-串联质谱法测定血清中 15 种胆汁酸[J]. 分析测试学报,2007,26(3):315-318.
- [18] 廖文娟,张虹,任一平. 液相色谱-串联四级杆质谱测定罂粟壳主要成分在止咳药中的含量[J]. 分析化学,2006,34(8):1175-1178.
- [19] 严忠红,李林,汪国权,等. UPLC-MS/MS 测定人源 Caco-2 细胞中人参炔醇的含量[J]. 上海交通大学学报(医学版),2011,31(10):1370-1374.
- [20] 李欣,王步军. 超高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定苦荞麦中黄酮类化合物[J]. 食品工业科技,2011,32(4):383-385.
- [21] 刘永福,贾小芳,腾珍林,等. 液质联用多反应监测法定量目标多肽或蛋白质[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2012,28(1):86-92.