

陈玉勇,秦 枫,朱善元,等. 液相色谱-串联质谱检测田七花总皂苷中三七皂苷 R_1 的含量[J]. 江苏农业科学,2014,42(12):319-321.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.12.109

液相色谱-串联质谱检测田七花总皂苷中三七皂苷 R_1 的含量

陈玉勇^{1,2}, 秦 枫¹, 朱善元¹, 黄文强¹, 卞 欢³

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 南京农业大学,江苏南京 210095; 3. 江苏省农业科学院,江苏南京 210014)

摘要:建立了检测田七花总皂苷中三七皂苷 R_1 含量的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法。用 BDS HYPERSUL C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μ m) 色谱柱,以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱,流速 0.3 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C; 质谱分析采用三重四杆质谱仪,多反应检测(MRM)模式,电喷雾离子源(ESI)负离子检测,定量分析的离子为:三七皂苷 R_1 m/z 931.7→799.6,内标物紫杉醇 m/z 852.5→525.3。三七皂苷 R_1 标准曲线的线性范围为 0.0476~11.9 μ g/mL,平均加样回收率为 99.33%,RSD 为 1.65% ($n=6$)。精密度、稳定性、重现性均符合样品分析的要求。

关键词:田七花;三七皂苷 R_1 ;高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: Q946.83+8.4;O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)12-0319-03

田七花为五加科植物田七 [*Panax notoginseng* (Burk) F. H.] 的干燥花蕾,田七花作为云南文山州的传统生物资源,广泛应用于食品、保健品以及中药药材。例如,当地常用田七花泡茶^[1],制作点心,或与其他食材一起制成滋补品^[2],长期食用对于治疗高血压、咽痛音哑和养生都颇有裨益^[3-4]。田七花中含有皂苷、多糖、挥发油等多种化学成分^[5-6],其中,皂苷是其主要生理活性成分,杨明晶等发现田七花苷没有毒性作用^[7],故近年来,将田七花进一步开发为保健品的研究较为热门。Yang 等已经从田七花中鉴定出 170 种单体皂苷,发现三七皂苷 R_1 是皂苷中的一种主要成分^[8]。目前,关于田七花中三七皂苷 R_1 含量检测的方法有比色法^[9]和 HPLC 法^[10-11]等,但是比色法只能检测其中总皂苷的含量,HPLC 法运行时间一般在 15 min 以上,且灵敏度低、专属性差。因此,笔者参照文献[12]对试验条件进行优化,建立了 HPLC-MS/MS 分析方法,该法能够灵敏地检测田七花蕾中三七皂苷 R_1 的含量,可为三七花总皂苷(SFPN)和以其为主要成分的保健食品的含量检测提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

三重四杆质谱仪(API 4000 型),配有电喷雾离子源(ESI),采用美国 ABI 公司的 Analyst 1.4.1 数据分析系统;高效液相色谱仪(美国 Agilent 1100);KQ2200B 型超声波清洗

器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);HH-S 数显恒温水浴锅(浙江省金华市文华科教实验仪器厂);RE-3000 旋转蒸发仪(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);Direct-Q3 型超纯水机(江苏省苏州塞恩斯仪器有限公司)。

1.2 对照品与试剂

三七皂苷 R_1 (批号:110745-201318),由中国药品生物制品检定所提供。紫杉醇(批号:100382-201201),购自云南省昆明科翔生物科技有限公司。田七干燥花蕾,由云南省文山壮族苗族自治州文山三七研究院提供。

D101 大孔树脂购自江苏省泰州医药公司。乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余均为分析纯试剂。

1.3 HPLC-MS/MS 分析条件

1.3.1 高效液相色谱条件 色谱柱为 BDS HYPERSUL C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 5 μ m);流动相为水(A)和乙腈(B),流速为 0.3 mL/min,柱温为 30 $^{\circ}$ C,进样量为 10 μ L。梯度洗脱方式为流动相 B:20% $\xrightarrow{2\text{ min}}$ 30% $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 75% $\xrightarrow{10\text{ min}}$ 90%。

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI)负离子检测,多反应检测模式(MRM)。设制离子喷雾电压(IS)为 4 100 V;离子源雾化温度(TEM)为 450 $^{\circ}$ C;去集簇电压(DP)为 -105 V;激发碰撞电压(CE)为 -47 V。采用的定量分析离子为:三七皂苷 R_1 m/z 931.7→799.6;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 称取三七皂苷 R_1 1.19 mg,以甲醇定容至 10 mL,得到对照品储备液。称取紫杉醇 1.01 mg,以甲醇超声溶解,定容至 10 mL,再取该溶液 100 μ L 以甲醇定容至 10 mL,涡旋振荡溶解,即得内标溶液。

1.4.2 供试品溶液的制备 参照 Sun 等的方法^[13],制备田七花总皂苷(SFPN)。将田七干燥花蕾 1 kg 粉碎,过 20 目筛,

收稿日期:2014-07-07

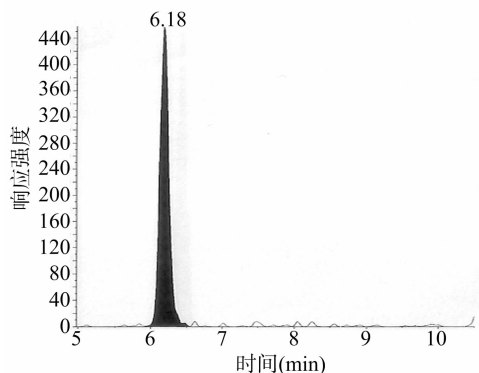
基金项目:江苏省高校“青蓝工程”科技创新团队资助项目;江苏省泰州市科技支撑(农业)计划(编号:TL0719)。

作者简介:陈玉勇(1978—),男,江苏泰州人,博士研究生,讲师,主要从事食品生物技术、食品分析等研究。E-mail:chenyuyong@tom.com。

通信作者:秦 枫,硕士,副教授,从事天然药物及食品新资源开发等方向研究。E-mail:qinancy922@tom.com。

以 10 倍质量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次提取 1.5 h。合并提取液,减压浓缩,并以适量水混悬,再分别以乙醚、正丁醇萃取,弃去醚层,收集正丁醇层,减压浓缩,抽干溶剂。将正丁醇萃取物经 D101 大孔树脂先以水洗脱,弃去洗脱液,再以 90% 乙醇洗脱,收集洗脱液,于 45 ℃ 左右减压浓缩至干燥固态,即为田七花总皂苷(SFPN)。共制备了 5 个批次的 SFPN(批号分别为 20130502、20130816、20130902、20131011、20131112)。

称取对应批号的 SFPN 粉末 0.2 g,加甲醇定容至 10 mL,超声辅助溶解,得供试品储备液。取内标溶液 100 μL 和供试品储备液 100 μL ,加甲醇定容至 1 mL,涡旋振荡溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得供试品溶液。

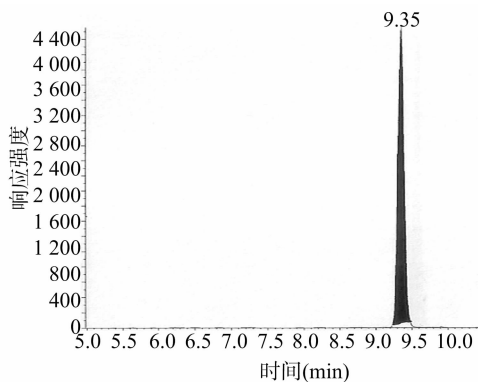


A. 三七皂苷 R_1 (m/z 931.7 \rightarrow 799.6)

2 结果与分析

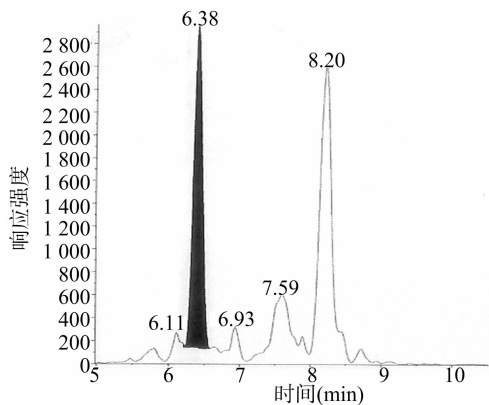
2.1 方法的专属性和特异性

按“1.3”节中液相色谱和质谱条件对 SFPN 中三七皂苷 R_1 进行测定,记录色谱图。图 1 为对照品和内标物总离子流图,图 2 为 SFPN 和内标物的总离子流图。在选定色谱条件下,被分析的化合物三七皂苷 R_1 和内标物紫杉醇分别在约 6.18 min 和 9.35 min 时出峰,对照品和内标物的峰形和分离度较好,灵敏度强;同时采用保留时间和离子对的响应强度来进行分析,更有效避免了其他物质对这种皂苷测定的干扰,具有较好的专属性和特异性。

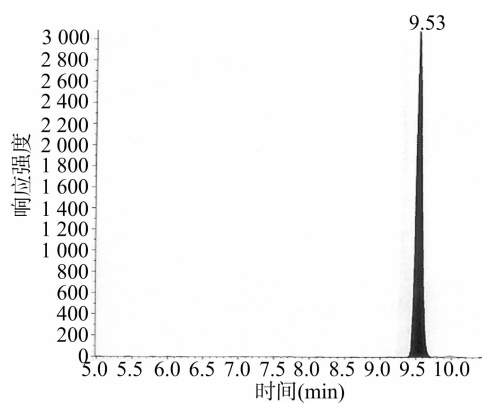


B. 内标物紫杉醇(m/z 852.5 \rightarrow 525.3)

图1 三七皂苷 R_1 和内标物紫杉醇的总离子色谱图



A. SFPN (三七皂苷 R_1 : m/z 931.7 \rightarrow 799.6)



B. 内标物紫杉醇(m/z 852.5 \rightarrow 525.3)

图2 SFPN 和内标物紫杉醇的总离子色谱图

2.2 标准曲线与线性范围考察

以对照品储备液和内标溶液来配制不同浓度对照品溶液,将三七皂苷 R_1 的浓度分别调至 0.047、0.119、0.476、1.19、4.76、11.9 $\mu\text{g/mL}$,进样量为 10 μL 。以对照品浓度为横坐标,以样品峰和内标峰面积之比为纵坐标,制作回归曲线,用加权($W=1/C^2$)最小二乘法进行回归分析^[14],求得直线回归方程为 $y=3.3x+0.0278$,相关系数(r)为 0.9998,线性范围为 0.047 ~ 11.9 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 精密度试验

对照品溶液连续六针进样,每次进样 10 μL ,进行精密度试验。计算对照品的峰面积和内标峰面积的比值,并统计出比值的 RSD 为 1.85%,表明仪器精密度较好。

2.4 稳定性试验

量取供试品溶液 10 μL ,分别在 0、8、16、24 h 时进样测定,计算对照品峰面积和内标峰面积的比值,并统计出比值的 RSD 为 1.93%,表明在 24 h 之内供试品溶液的稳定性较好。

2.5 重现性试验

取批号为 20130902 的 SFPN 样品,制备 6 份供试品溶液,按“1.3”节的条件对样品中三七皂苷 R_1 的含量进行检测。计算出样品的峰面积和内标峰面积的比值,并代入“2.2”节的回归方程,计算出三七皂苷 R_1 的平均含量为 0.56 mg/g,并统计出含量的 RSD 为 1.59%,表明本方法具有较好的重现性。

2.6 加样回收率试验

称取批号为 20131011 的已知含量的 SFPN 样品 6 份,每

份 0.2 g,按上述方法,制备样品储备液,取 100 μL 内标溶液和 100 μL 的供试品储备液,加入适量的对照品储备液,加甲醇定容至 1 mL,溶解后,过 0.45 μm 微孔滤膜,得到供试品溶液,按上述方法操作,计算供试品溶液中三七皂苷 R_1 的含量,计算回收率和 RSD ,结果见表 1。

表 1 三七皂苷 R_1 的回收率测定结果 ($n=6$)

样品号	称样量 (mg)	样品含量 (μg/mL)	加入量 (μg/mL)	测得量 (μg/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
1	200.11	1.12	1.12	2.20	98.21	
2	200.06	1.12	1.12	2.28	101.79	
3	200.26	1.12	1.12	2.2	98.21	
4	200.15	1.12	1.12	2.22	99.11	
5	199.92	1.12	1.12	2.26	100.89	
6	199.79	1.12	1.12	2.19	97.77	
平均					99.33	1.65

2.7 样品含量测定

称取不同批号的 SFPN 样品 3 份,每份 0.2 g,制备供试品溶液,按“1.3”节色谱条件进行操作,计算出样品的峰面积和内标峰面积的比值,并代入“2.2”节的回归方程,计算三七皂苷 R_1 含量,结果见表 2。

表 2 田七花总皂苷中三七皂苷 R_1 的含量 ($n=3$)

SFPN 批号	三七皂苷 R_1 (mg/g)
20130502	0.57
20130816	0.55
20131112	0.51

3 讨论

田七花的组成成分复杂,含有大量色素,在测定三七皂苷 R_1 时,必须排除主要基质成分或色素成分的干扰。本研究参照 Sun 等所述方法^[13],以乙醚萃取去除叶绿素等脂溶性物质,以正丁醇萃取出大部分的皂苷类物质,再选用 D101 型大孔树脂进行柱层析,用水洗去多糖,最后收集 90% 乙醇洗脱液,此法可较好地 对田七花皂苷类成分进行富集和纯化。

三七皂苷 R_1 的最大吸收波长为 203 nm,由于 SFPN 含有多种成分,紫外末端吸收多,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。皂苷类化学成分极性大、难挥发、热不稳定,经典的电子轰击电离 (EI) 对其进行结构分析也很困难。使用 ESI 同时结合二级质谱分析,可以较快地获得结构信息。在选定内标物时,发现紫杉醇纯度高、易保存,与被测成分的化学性质相似,有较好的质谱响应,稳

定性好,内源物质无干扰。本研究建立的采用负离子多反应监测技术的 HPLC – MS/MS 分析方法,灵敏度高、重现性好,符合食品样品分析的要求,较其他方法节省了大量的时间和成本^[14],可用于三七皂苷 R_1 的定量分析,为不同田七花及其保健食品、药品的含量测定提供方法学参考。

参考文献:

[1] 蒋细旺. 花草茶的种类、保健功能及使用[J]. 长江大学学报:自然科学版石油/农学中旬刊,2013,10(6):62 – 66.

[2] 周家明,崔秀明,张文斌,等. 三七茎叶和花的食用考证[J]. 现代中药研究与实践,2009,23(5):39 – 40.

[3] 高明菊,崔秀明,曾江,等. 田七花的研究进展[J]. 人参研究,2009(2):5 – 8.

[4] Jung H W, Seo U K, Kim J H, et al. Flower extract of *Panax notoginseng* attenuates lipopolysaccharide – induced inflammatory response via blocking of NF – kappaB signaling pathway in murine macrophages[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2009, 122(2):313 – 319.

[5] 殷勤红,朱艳琴,虞泓,等. 三七花化学成分和药理作用的研究进展[J]. 光谱实验室,2011,28(3):1194 – 1197.

[6] 朱艳琴,殷勤红,杨俊,等. 超声醇溶 – 紫外分光光度法测定不同产地三七花中总黄酮含量[J]. 食品与发酵工业,2013,39(1):187 – 189.

[7] 杨明品,俞萍,陆罗定,等. 三七花苷毒理安全性研究[J]. 江苏预防医学,2010,21(6):12 – 14.

[8] Yang W Z, Bo T, Ji S, et al. Rapid chemical profiling of saponins in the flower buds of *Panax notoginseng* by integrating MCI gel column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1/2/3/4):762 – 769.

[9] 沈岚,冯怡,徐德生,等. 比色法测定三七花中总皂苷的含量[J]. 中成药,2007,29(9):1368 – 1370.

[10] 朱艳琴,殷勤红,虞泓,等. HPLC 法同时测定三七花中 3 种皂苷[J]. 中成药,2013,35(2):339 – 341.

[11] 沈岚,冯怡,徐德生,等. 反相高效液相色谱法测定田七花中三七皂苷 R_1 的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(6):1482 – 1483.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 2010 版. 北京:化学工业出版社,2010:11 – 12.

[13] 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(29/30):3882 – 3889.

[14] 秦枫,于生兰,高彦慧,等. HPLC – MS/MS 法同时测定三七须根总皂苷中人参皂苷 R_g 和 R_e 的含量[J]. 中国药房,2010,21(31):2922 – 2924.