

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定药膏中皂苷类物质

LCMSMS-041

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用检测市售某中成药膏中 6 种有效成分物质的方法。使用外标法绘制 6 种有效成分物质的校准曲线，线性良好，相关系数为 0.999 以上；对不同浓度的标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.526 % 和 4.717 % 以下，系统精密度良好。

关键词：药膏 三重四极杆质谱 中药有效成分

市售某中成药对跌打损伤和创伤出血有很好的疗效。该中成药由名贵药材制成，具有化瘀止血、活血止痛、解毒消肿之功效。该药问世百年来，以其独特、神奇的功效被誉为“伤科圣药”，其药膏的主要成分有三七、麝香和草乌等。研究分析药膏中皂苷类等有效成分，对于保证药物安全有效和质量稳定具有重要意义。

高效液相色谱 - 串联质谱联用技术是近些年来发展很快的分析技术，具有很高的选择性和灵敏度，对复杂基质中的目标组分具有很强的定性能力，而且准确度高。本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统分析检测药膏中 6 种有效成分物质（重楼皂苷 II、草乌甲素 A、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 和重楼皂苷 I）的方法。该方法具有操作简单，分析速度快的优点。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器和 CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm

1.D. × 50 mm L., 1.6 μm

流动相：A - 10 mM 醋酸铵的水溶液；B - 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40℃

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，洗脱程序见表 1 质谱条件

离子源：ESI，正离子模式

离子源接口电压：5 kV

干燥气：氮气 15 L/min

雾化气：氮气 3.0 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：450℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.40	Pumps	Pump B Conc.	95
2.00	Pumps	Pump B Conc.	95
2.01	Pumps	Pump B Conc.	50
3.00	Controller	Stop	

1.3 标准品溶液的配制

标准物质：共 6 种，分别为重楼皂苷 II、草乌甲素 A、三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1} 和重楼皂苷 I。

标准工作溶液配制：用甲醇配制 20 mg/L 的混合标准中间溶液，用 50 % 甲醇水溶液稀释成 10、20、50、200、500、1000 μg/L 不同浓度的混合标准工作液。

1.4 样品前处理方法

准确称取药膏 0.10 g，用 50 % 甲醇水溶液配成 1.0 mg/mL 的样品溶液，经 0.22 μm 滤膜过滤后进样检测。

表2 MRM优化参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
重楼皂苷 II	877.60	731.50*	-22.0	-45.0	-28.0
		131.30	-22.0	-40.0	-25.0
草乌甲素 A	644.30	135.10*	-40.0	-50.0	-28.0
		584.30	-40.0	-35.0	-30.0
三七皂苷 R ₁	955.50	775.40*	-24.0	-45.0	-40.0
		203.05	-24.0	-50.0	-24.0
人参皂苷 R _{g1}	823.50	203.05*	-20.0	-50.0	-24.0
		643.35	-20.0	-45.0	-24.0
人参皂苷 R _{b1}	1132.60	365.05*	-30.0	-50.0	-26.0
		824.90	-30.0	-45.0	-15.0
重楼皂苷 I	723.40	85.15*	-22.0	-50.0	-18.0
		147.05	-22.0	-35.0	-17.0

注：*表示定量离子

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

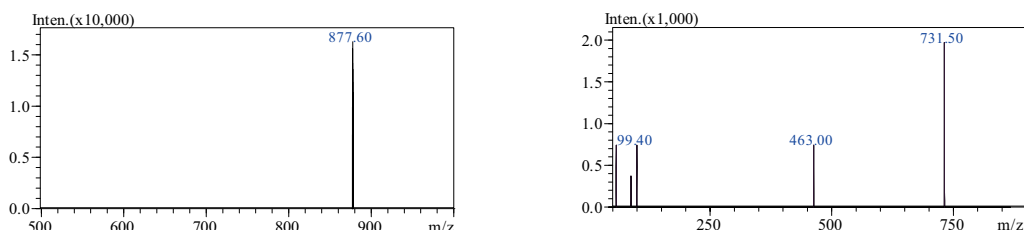


图1 重楼皂苷 II 的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-45V）（右图）

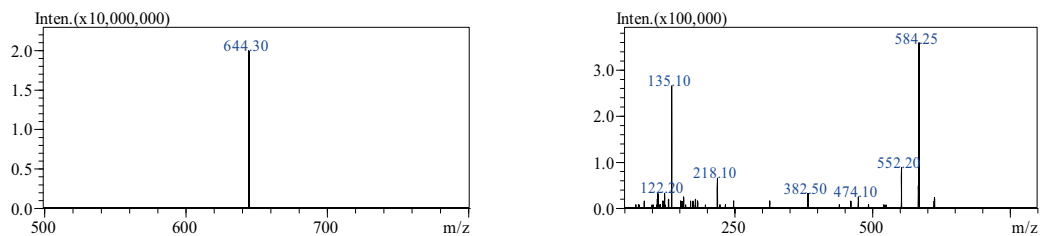


图2 草乌甲素 A 的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-20V) (右图)

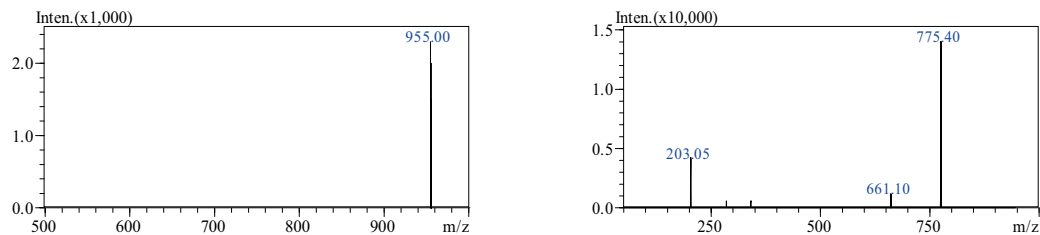


图3 三七皂苷R1的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-45V) (右图)

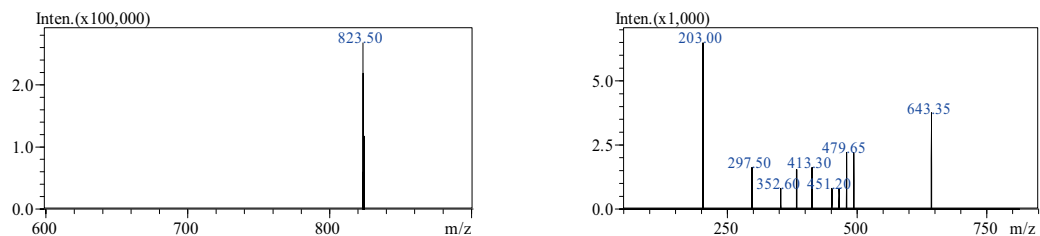


图4 人参皂苷Rg1的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-20V) (右图)

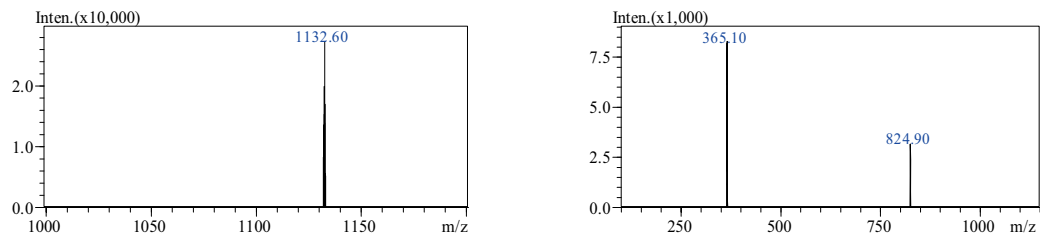


图5 人参皂苷Rb1的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-45V) (右图)

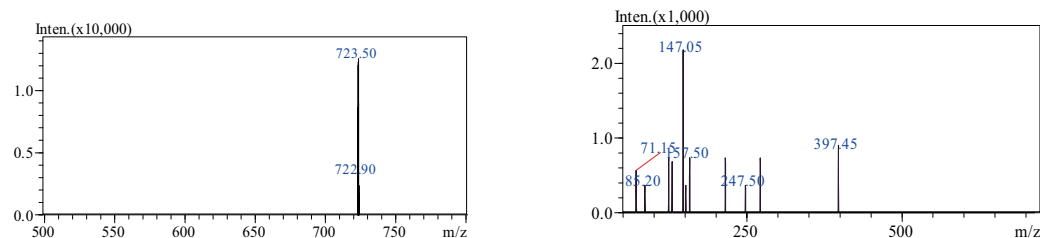


图6 重楼皂苷I的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-25V) (右图)

2.2 标准样品的标样色谱图

重楼皂苷 II、草乌甲素 A、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 和重楼皂苷 I 的标样 (200 ng/mL) 色谱图分别如图 7~12 所示。

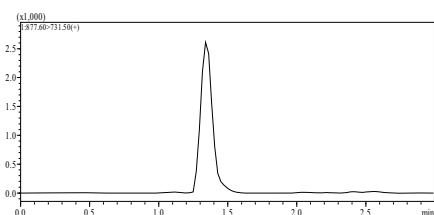


图7重楼皂苷 II 标准品的MRM色谱图
(877.60>731.50)

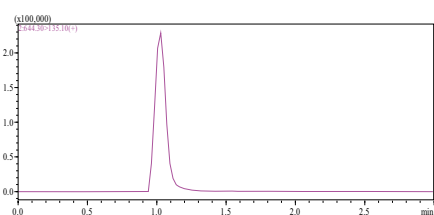


图8草乌甲素 A 标准品的MRM色谱图
(644.30>135.10)

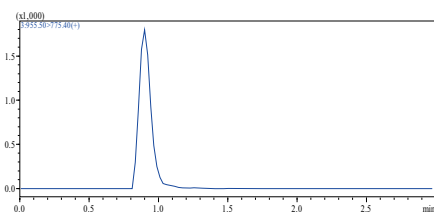


图9三七皂苷 R1 标准品的 MRM 色谱图
(955.50>775.40)

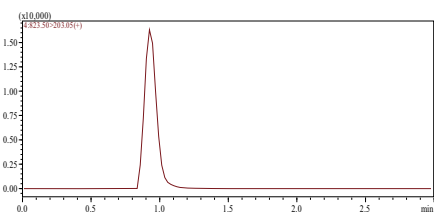


图10人参皂苷 Rg1 标准品的 MRM 色谱图
(823.50>203.05)

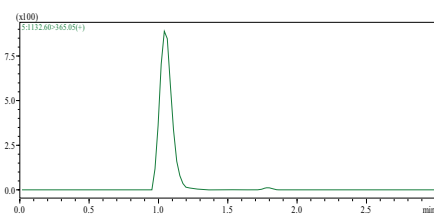


图 11 人参皂苷 Rb1 标准品的 MRM 色谱图
(1132.60>365.05)

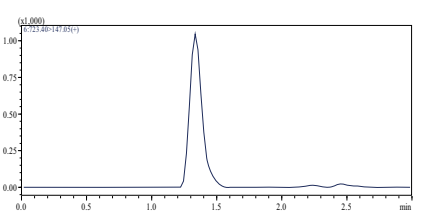


图12 重楼皂苷 I 标准品的MRM色谱图
(723.40>147.05)

2.3 线性范围

将不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 13~18 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

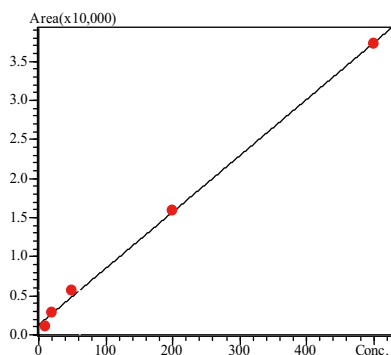


图 13 重楼皂苷 II 的校准曲线

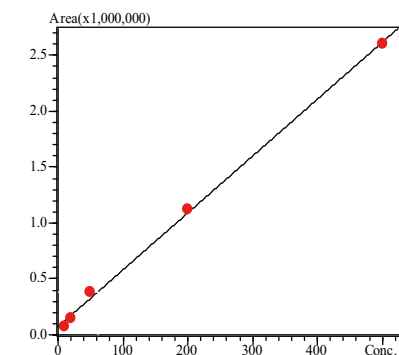


图 14 草乌甲素 A 的校准曲线

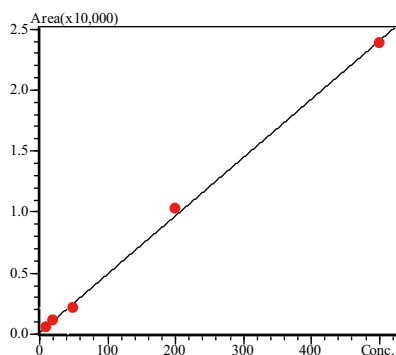


图 15 三七皂苷 R1 的校准曲线

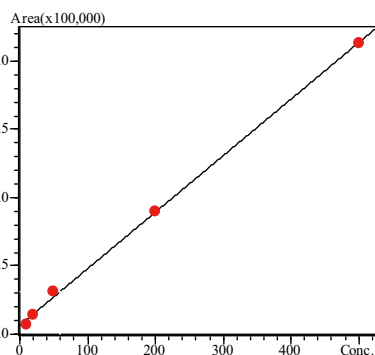


图 16 人参皂苷 Rg1 的校准曲线

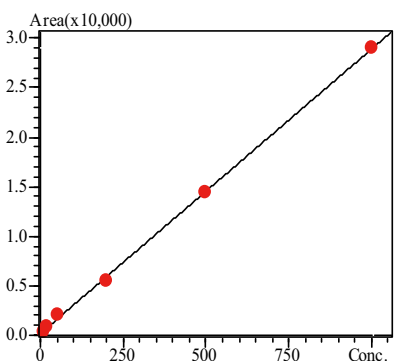


图 17 人参皂苷 Rb1 的校准曲线

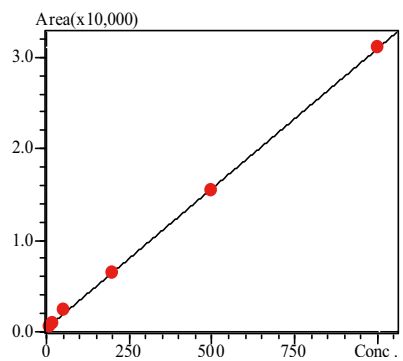


图 18 重楼皂苷 I 的校准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r
1	重楼皂苷 II	$Y = (72.0974)X + (1299.7)$	10~500	0.9991
2	草乌甲素 A	$Y = (5090.75)X + (72839.3)$	10~500	0.9991
3	三七皂苷 R1	$Y = (47.7157)X + (171.105)$	10~500	0.9993
4	人参皂苷 Rg1	$Y = (413.871)X + (6643.2)$	10~500	0.9995
5	人参皂苷 Rb1	$Y = (28.7153)X + (193.094)$	10~1000	0.9997
6	重楼皂苷 I	$Y = (30.5662)X + (374.311)$	10~1000	0.9997

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果表明，不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.032 % ~ 0.526 % 和 1.538 % ~ 4.717 % 之间，系统精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (50 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (100 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (200 $\mu\text{g/L}$)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
重楼皂苷 II	0.218	3.724	0.129	3.663	0.208	2.808
草乌甲素 A	0.032	3.606	0.048	3.475	0.051	1.732
三七皂苷 R1	0.526	4.448	0.300	2.726	0.055	2.877
人参皂苷 Rg1	0.068	4.717	0.093	2.827	0.131	2.886
人参皂苷 Rb1	0.394	4.398	0.340	3.810	0.137	2.063
重楼皂苷 I	0.186	4.373	0.234	3.713	0.137	1.538

2.5 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将 10 µg/L 混合标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过 LabSolutions Ver. 5.41 软件计算信噪比和检出限（以 3 倍信噪比计算），重楼皂苷 II、草乌甲素 A、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 和重楼皂苷 I 的信噪比和方法检出限如表 5 所示。

表 5 信噪比(S/N)和方法检出限(LOD)

名称	S/N	LOD(mg/kg)
重楼皂苷 II	12.45	2.65
草乌甲素 A	140.90	0.23
三七皂苷 R1	27.65	1.19
人参皂苷 Rg1	85.11	0.39
人参皂苷 Rb1	11.29	2.92
重楼皂苷 I	7.15	4.62

3. 样品的分析结果

使用标准品优化的 MRM 参数，检测药膏样品中的重楼皂苷 II、草乌甲素 A、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 和重楼皂苷 I，见图 19。样品中重楼皂苷 II、草乌甲素 A、三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1 和重楼皂苷 I 的定量结果如表 6 所示。

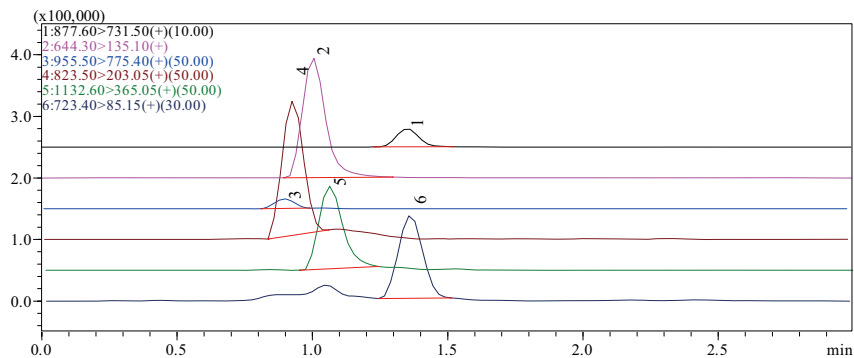


图 19 药膏样品的MRM色谱图

(1、重楼皂苷 II；2、草乌甲素 A；3、三七皂苷 R1；4、人参皂苷 Rg1；5、人参皂苷 Rb1；6、重楼皂苷 I)

表 6 药膏样品的定量结果

名称	检出浓度(µg/L)	含量(mg/kg)
重楼皂苷 II	233.3	233.3
草乌甲素 A	214.2	214.2
三七皂苷 R1	32.6	32.6
人参皂苷 Rg1	47.3	47.3
人参皂苷 Rb1	607.5	607.5
重楼皂苷 I	611.9	611.9

■ 结论

本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用检测市售某中成药膏中 6 种有效成分物质的方法。该方法在 3 min 之内完成 6 种目标物的分离分析。使用外标法绘制校准曲线，线性范围宽，相关系数在 0.999 以上。对不同浓度的标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.526 % 和 4.717 % 以下，系统精密度良好，且灵敏度高。检测药膏样品中的 6 种有效成分物质的结果为重楼皂苷 II 含量 233.3 mg/kg，草乌甲素 A 含量 214.2 mg/kg，三七皂苷 R1 含量 32.6 mg/kg，人参皂苷 Rg1 含量 47.3 mg/kg，人参皂苷 Rb1 含量 607.5 mg/kg，重楼皂苷 I 含量 611.9 mg/kg。