

# UPLC-MS/MS法同时测定通关藤药材中3种皂苷的含量<sup>Δ</sup>

王祁民<sup>1\*</sup>, 安静<sup>1</sup>, 李颖<sup>2</sup>, 马银玲<sup>1</sup>, 董占军<sup>1#</sup> (1. 河北省人民医院药学部, 石家庄 050051; 2. 河北医科大学研究生学院, 石家庄 050017)

中图分类号 R28 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)08-1048-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.08.09

**摘要** 目的: 建立同时测定通关藤药材中通关藤苷A、H、I含量的方法。方法: 采用超高效液相色谱-串联质谱法, 色谱柱为Phenomenex Kinetex XB-C<sub>18</sub>, 流动相为0.1%甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为0.2 mL/min, 柱温为40 ℃, 进样量为5 μL, 离子源为电喷雾离子源, 多反应离子监测模式, 正离子扫描, 离子源喷射电压为5 500 V, 雾化气压力为60 psi, 加热气压力为60 psi, 帘气压力为20 psi, 去溶剂温度为600 ℃。结果: 通关藤苷A、H、I检测质量浓度线性范围分别为0.1~10 ng/mL ( $r=0.999\ 7$ )、0.025~10 ng/mL ( $r=0.999\ 5$ )、0.025~10 ng/mL ( $r=0.998\ 9$ ); 定量限分别为0.1、0.025、0.025 ng/mL, 检测限分别为0.05、0.012 5、0.012 5 ng/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于4.0%; 加样回收率分别为97.67%~99.00% (RSD=0.47%,  $n=6$ )、95.00%~101.67% (RSD=2.59%,  $n=6$ )、96.67%~103.33% (RSD=2.83%,  $n=6$ )。结论: 该方法操作简便, 精密性、稳定性、重复性好, 可用于通关藤药材中通关藤苷A、H、I含量的同时测定。

**关键词** 通关藤; 通关藤苷A; 通关藤苷H; 通关藤苷I; 超高效液相色谱-串联质谱法

## Simultaneous Determination of 3 Kinds of Saponins in *Marsdenia tenacissima* by UPLC-MS/MS

WANG Qimin<sup>1</sup>, AN Jing<sup>1</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, MA Yinling<sup>1</sup>, DONG Zhanjun<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2. Graduate School, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of tenacissoside A, tenacissoside H and tenacissoside I in *Marsdenia tenacissima*. METHODS: UPLC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on a Phenomenex Kinetex XB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was set at 40 ℃, and sample size was 5 μL. Multiple reaction monitoring (MRM) mode was adopted with electrospray ion source as ion source, using positive ion scanning. Source jet voltage was 5 500 V, nebulizer pressure was 60 psi, heating pressure was 60 psi, curtain pressure was 20 psi and cone temp was set at 600 ℃. RESULTS: The linear ranges of tenacissoside A, tenacissoside H and tenacissoside I were 0.1-10 ng/mL ( $r=0.999\ 7$ ), 0.025-10 ng/mL ( $r=0.999\ 5$ ), 0.025-10 ng/mL ( $r=0.998\ 9$ ), respectively; limited of quantation were 0.1, 0.025, 0.025 ng/mL, limited of detection were 0.05, 0.012 5, 0.012 5 ng/mL, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were <4.0%. The recoveries were 97.67%-99.00% (RSD=0.47%,  $n=6$ ), 95.00%-101.67% (RSD=2.59%,  $n=6$ ), 96.67%-103.33% (RSD=2.83%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of tenacissoside A, tenacissoside H and tenacissoside I in *M. tenacissima*.

**KEYWORDS** *Marsdenia tenacissima*; Tenacissoside A; Tenacissoside H; Tenacissoside I; UPLC-MS/MS

通关藤 [*Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn.] 又名乌骨藤、通光藤、通关散、奶浆藤等, 收载于2015年版《中国药典》(一部), 分布于我国云南、贵州等地, 入药部位为其干燥藤茎, 有止咳平喘、祛痰、通乳、清热解毒等功效<sup>[1-3]</sup>。现有文献报道多集中于通关藤药材

中酚酸类物质<sup>[4-7]</sup>, 近期研究显示通关藤药材主要活性成分为甾体皂苷类化合物<sup>[3]</sup>。2015年版《中国药典》(一部) 中通关藤药材的含量测定项是以通关藤苷H为指标成分, 采用高效液相色谱法(HPLC)进行检测的。随着对该药材研究的不断深入, 鉴定分离的通关藤苷种数不断

[10] 白雁, 李磊, 雷敬卫, 等. 近红外技术应用于药厂丹参药

Δ 基金项目: 河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(No. 冀中医药[2017]67号-2018073)

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 医院药学。电话: 0311-85988076。E-mail: littlebear\_chao@sina.com

# 通信作者: 主任药师。研究方向: 医院药事管理。电话: 0311-85988604。E-mail: 13313213656@126.com

材质量检测[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(3): 222-225.

[11] 闫研, 殷果, 刘凯双, 等. 近红外光谱法快速鉴别三九胃泰颗粒及其水分的定量分析[J]. 中国药房, 2016, 27(18): 2551-2554.

(收稿日期: 2017-07-04 修回日期: 2017-08-17)

(编辑: 张静)

增加<sup>[2-3]</sup>,有文献报道了采用HPLC法测定通关藤药材及其制剂中通关藤苷的方法<sup>[8-10]</sup>。本试验采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立同时测定通关藤药材中通关藤苷A、H、I含量的方法,以期为更好地对该药材进行质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

UPLC-30A型UPLC系统(日本Shimadzu公司);AB Sciex Triple Quad™ 5500型串联四极杆线性离子阱MS仪(美国Sciex公司);AB204-S型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ3200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

通关藤苷A对照品(山西省中医药研究院,批号:20130513,纯度:>98.3%);通关藤苷H对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111913-201202,纯度:>98%);通关藤苷I对照品(深圳远扬生物技术有限公司,批号:20160311,纯度:>98%);乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

### 1.3 药材

通关藤药材(国药乐仁堂石家庄药材有限公司,批号:160132、160320、160521,产地:云南)经河北省人民医院药学部董占军主任药师鉴定为真品。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Kinetex XB-C<sub>18</sub>(50 mm×2.1 mm, 2.6 μm);流动相:0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~1 min, 40%B; 1~2 min, 40%B→90%B; 2~4 min, 90%B; 4~4.01 min, 90%B→40%B; 4.01~6 min, 40%B);流速:0.2 mL/min;柱温:40℃;进样量:5 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI);多反应离子监测模式(MRM),正离子扫描;离子源喷射电压:5 500 V;雾化气(gas 1)压力:60 psi;加热气(gas 2)压力:60 psi;帘气压力:20 psi;去溶剂温度:600℃;其余质谱分析参数见表1(表中DP为解簇电压,CE为碰撞能量)。

表1 质谱参数

Tab 1 Parameters of MS

待测成分	母离子[M+H] <sup>+</sup>	子离子(m/z)	驻留时间,ms	DP,V	CE,eV
通关藤苷A	977.6	917.6	100	20	70
通关藤苷H	817.5	757.5	100	20	54
通关藤苷I	815.5	755.5	100	20	57

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取待测成分对照品各适量,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,得通关藤苷A、H、I质量浓度均为1 mg/mL的单一对照品贮备液,于4℃贮藏,备用。精密量取上述单一对照品贮备液各10 μL,分别置于量瓶中,加甲醇定容至1 mL,得通关藤苷A、H、I质量浓度均为10 μg/mL的单一对照品

溶液。精密量取上述单一对照品溶液各适量,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇定容,得通关藤苷A、H、I质量浓度均为100 ng/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品粉末(过3号筛)1.006 g,置于锥形瓶中,加甲醇40 mL,称定质量,密塞,超声(功率:120 W,频率:40 kHz)处理25 min,冷却,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,得供试品溶液I;精密量取上述供试品溶液I 10 μL,置于量瓶中,加甲醇稀释并定容至200 mL,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 缺药材样品,按“2.2.2”项下方法操作,得阴性对照溶液。

### 2.3 专属性试验

精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各5 μL,按“2.1”项下试验条件进样测定。结果表明,各待测成分出峰时间稳定,峰形良好,阴性对照无干扰,色谱见图1。

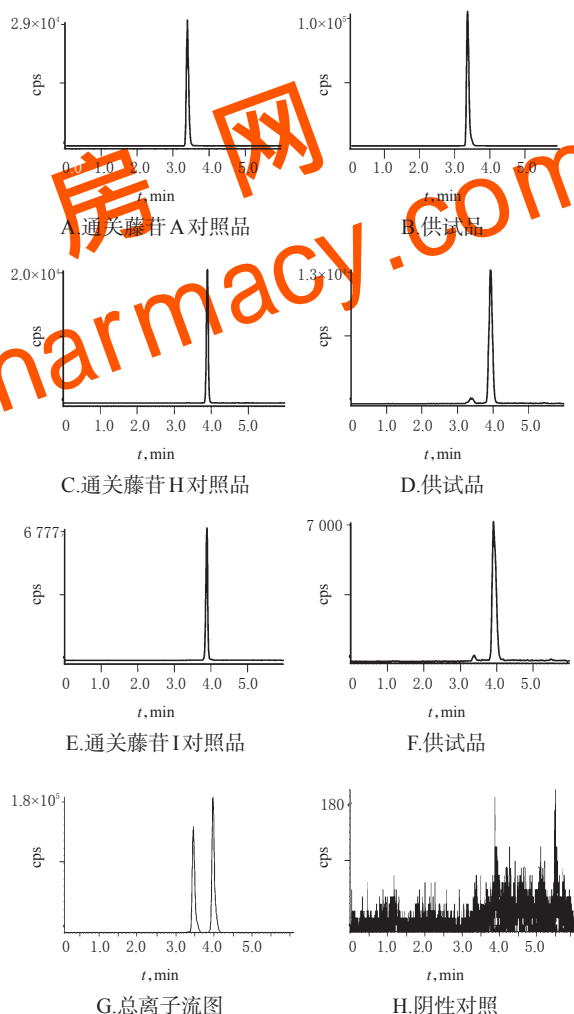


图1 提取离子流图与总离子流图

Fig 1 Extraction ion flow diagram and total ion flow diagram

### 2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液各适量,分别

置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,制成通关藤苷A、H、I质量浓度均为10、8、4、2、1、0.5、0.2、0.1、0.05、0.025 ng/mL的系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各5  $\mu$ L,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。以通关藤苷A、H、I质量浓度( $x$ , ng/mL)为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程、线性范围与定量限、检测限

Tab 2 Regression equations, linear ranges, LOQs and LODs

待测成分	回归方程	$r$	线性范围,ng/mL	定量限,ng/mL	检测限,ng/mL
通关藤苷 A	$y=1.44 \times 10^5 x + 1.67 \times 10^5$	0.999 7	0.1~10	0.1	0.05
通关藤苷 H	$y=2.44 \times 10^5 x + 3.26 \times 10^5$	0.999 5	0.025~10	0.025	0.012 5
通关藤苷 I	$y=1.3 \times 10^5 x + 625$	0.998 9	0.025~10	0.025	0.012 5

## 2.5 定量限与检测限考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下试验条件进样测定,当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限,详见表2。

## 2.6 精密度试验

取“2.4”项下质量浓度为1 ng/mL混合对照品溶液适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,通关藤苷A、H、I峰面积的RSD分别为2.46%、1.53%、3.22% ( $n=6$ ),表明日内精密度良好。按“2.1”项下试验条件连续测定3 d,记录峰面积。结果,通关藤苷A、H、I峰面积的RSD分别为3.26%、2.67%、3.81% ( $n=6$ ),表明日间精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:160132)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,通关藤苷A、H、I峰面积的RSD分别为3.83%、1.51%、2.85% ( $n=6$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

## 2.8 重复性试验

精密称取药材样品(批号:160132)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下试验

条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,通关藤苷A、H、I含量平均值分别为6.35、1.27、0.62 mg/g, RSD分别为3.16%、3.74%、2.71% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:160132)适量,每份0.5 g,共6份,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 3 Result of recovery tests( $n=6$ )

待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
通关藤苷 A	3.16	3.0	6.12	98.67	98.50	0.47
	3.15	3.0	6.11	98.67		
	3.15	3.0	6.10	98.33		
	3.17	3.0	6.10	97.67		
	3.16	3.0	6.12	98.67		
	3.14	3.0	6.11	99.00		
通关藤苷 H	0.63	0.6	1.22	101.67	97.50	2.59
	0.61	0.6	1.20	98.33		
	0.62	0.6	1.19	95.00		
	0.64	0.6	1.22	96.67		
	0.64	0.6	1.23	98.33		
	0.63	0.6	1.20	95.00		
通关藤苷 I	0.31	0.3	0.60	96.67	98.36	2.83
	0.32	0.3	0.62	96.67		
	0.31	0.3	0.61	100.00		
	0.32	0.3	0.63	103.33		
	0.33	0.3	0.62	96.67		
	0.31	0.3	0.60	96.67		

## 2.10 耐用性试验

2.10.1 色谱柱考察 取药材药品(批号:160132)质量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件[色谱柱分别为Phenomenex Kinetex XB-C<sub>18</sub>(50 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6  $\mu$ m)、Accucore C<sub>18</sub>(50 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6  $\mu$ m)、Cosmocore C<sub>18</sub>(50 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6  $\mu$ m)]进样测定,记录峰面积并计算样品含量,详见表4。结果表明,本试验条件在一定色谱柱变动情况下耐用。

表4 耐用性试验结果

Tab 4 Results of durability tests

试验条件	通关藤苷 A			通关藤苷 H			通关藤苷 I			
	含量,mg/g	平均值,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	平均值,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	平均值,mg/g	RSD,%	
色谱柱	Phenomenex Kinetex XB-C <sub>18</sub>	6.30	6.36	1.22	1.23	1.26	2.42	0.62	0.62	3.23
	Accucore C <sub>18</sub>	6.34			1.27			0.60		
	Cosmocore C <sub>18</sub>	6.45			1.29			0.64		
流动相	0.05%甲酸溶液-乙腈	6.32	6.35	0.48	1.22	1.25	1.85	0.61	0.61	2.49
	0.15%甲酸溶液-乙腈	6.38			1.26			0.63		
	0.20%甲酸溶液-乙腈	6.34			1.26			0.60		
流速	0.15 mL/min	6.41	6.36	0.88	1.25	1.26	2.86	0.65	0.63	2.75
	0.20 mL/min	6.37			1.23			0.62		
	0.25 mL/min	6.30			1.30			0.62		
柱温	25 $^{\circ}$ C	6.38	6.38	0.78	1.26	1.25	1.23	0.63	0.63	0.92
	30 $^{\circ}$ C	6.43			1.23			0.63		
	35 $^{\circ}$ C	6.33			1.25			0.62		

2.10.2 流动相考察 取药材药品(批号:160132)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件(流动相中甲酸溶液体积分数分别为0.05%、0.15%、0.20%)进样测定,记录峰面积并计算样品含量,详见表4。结果表明,本试验条件在一定流动相变动情况下耐用。

2.10.3 流速考察 取药材药品(批号:160132)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件(流速分别为0.15、0.20、0.25 mL/min)进样测定,记录峰面积并计算样品含量,详见表4。结果表明,本试验条件在一定流速变动情况下耐用。

2.10.4 柱温考察 取药材药品(批号:160132)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件(柱温别为25、30、35℃)进样测定,记录峰面积并计算样品含量,详见表4。结果表明,本试验条件在一定柱温变动情况下耐用。

### 2.11 药材样品含量测定

取3批药材样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算药材样品含量,结果见表5。

表5 药材样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 5 Results of content determination of samples (n=3,mg/g)

批号	通关藤苷 A	通关藤苷 H	通关藤苷 I
20160208	6.32	1.26	0.61
20160311	6.41	1.33	0.64
20160521	6.37	1.20	0.62

### 3 讨论

通关藤药材及其制剂在临床上应用日益广泛,但缺乏其质量控制的相关标准,通关藤药材含多种成分,包括酚酸类、C<sub>21</sub>甾体皂苷类、甾醇/环醇类、多糖类、三萜类化合物等<sup>[3]</sup>。以前文献多报道其酚酸类成分<sup>[4-7]</sup>,但酚酸类物质存在于多种中药材中,特异性不强;近年研究显示,C<sub>21</sub>甾体皂苷是通关藤的主要活性成分,目前从通关藤药材中提取的通关藤苷就超过50种<sup>[11-12]</sup>。因此,有必要建立以多种通关藤苷含量为指标的质量控制标准,本研究在2015年版《中国药典》(一部)基础上,又选择了含量较高的通关藤苷A和I<sup>[9-10]</sup>作为检测指标。

通关藤苷A、I属于甾体皂苷类,是一类苷元为孕甾烷衍生物与2-脱氧糖等形成的苷,在紫外光谱末端有吸收,因此多数文献<sup>[8-10]</sup>报道采用HPLC法对甾体皂苷类进

行测定,但是采用末端吸收波长会受到较大干扰;且由于通关藤苷H没有紫外吸收,所以不能和其他成分同时检测。另一方面,中药成分复杂,采用HPLC法分析干扰较大,为达到合格的分离度,往往分析时间很长(>0.5h)。本研究采用UPLC-MS/MS技术,MRM模式,通过对色谱条件及质谱条件的优化,6min内完成了对通关藤苷A、H、I的同时测定,操作简便,精密度、稳定性、重复性好,为通关藤药材的质量控制提供了一定借鉴。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:296-297.
- [2] YANG M, WANG WL, WANG XL, et al. Pregnane glycosides from stems of *Marsdenia tenacissima*[J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(1):1-4.
- [3] 白爽,李奕诺,徐鑫,等.通关藤化学成分及药理活性研究进展[J].解放军药学学报,2015,31(3):260-264.
- [4] 谢丽艳,徐洁,戴国梁,等. HPLC同时测定消癌平注射液中7种主要成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(21):86-89.
- [5] 温瑞卿,李东辉,王鑫. HPLC法和聚类分析法探讨不同厂家消癌平片中绿原酸[J].中成药,2011,33(11):2021-2023.
- [6] 王云峰,陆兔林,毛春芹.通关藤浸膏中绿原酸的稳定性考察[J].中国药房,2008,19(12):916-918.
- [7] 张阿琴,张仑,梁敏钰. HPLC法测定消癌平注射液中5种酚酸的含量[J].药学与临床研究,2011,19(6):498-500.
- [8] 薛敏强,刘显锋. HPLC-ELSD法检测消癌平丸中通关藤苷H的含量及稳定性考察[J].中国药房,2014,25(19):1777-1779.
- [9] 徐凯,乔佳,韩丽,等. HPLC法测定不同产地通关藤中通关藤苷G和I的含量[J].药物分析杂志,2016,36(4):607-610.
- [10] 张慧,裴志东,姜欢,等. HPLC法同时测定乌骨藤中通关藤苷A和D的含量[J].药物分析杂志,2013,33(6):1037-1040.
- [11] 谢丽艳,居文政,周玲,等.通关藤及其制剂的药理作用和临床应用进展[J].现代药物与临床,2011,26(6):439-443.
- [12] 方奕奇,孙雪梅.通关藤化学成分及抗肿瘤作用的研究进展[J].中国生化药物杂志,2011,32(2):165-167.

(收稿日期:2017-07-05 修回日期:2017-09-12)

(编辑:张静)