华西药学杂志
W C J · P S 2009, 24(5): 503～505

# 三七三醇皂苷及制剂的 LC - MS指纹图谱研究

冷　静[1],杨华蓉[2],林大胜[2],傅超美[1],刘　婧[1],曹　科[2],万　方[2*]
(1.成都中医药大学药学院,四川 成都 611137; 2.成都华神集团股份有限责任公司制药厂,四川 成都 610225)

**摘要**: **目的**　通过 HPLC - MS法建立三七三醇皂苷 (PTS)及其制剂三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱。**方法**　采用梯度洗脱法,流动相为水和乙腈,检测波长为 203 nm,流速为 1.0 mg·ml$^{-1}$,对多批 PTS及其制剂进行 HPLC测定和方法学考察,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对测定结果进行相似度评价。采用对照品法和 LC - MS法对原料药指纹图谱中的主要色谱峰进行成分鉴定。**结果**　所建立的 HPLC指纹图谱条件能分离 PTS的各组分,具有较好的精密度、重复性和稳定性;各组分平均相似度大于 0.9。LC - MS鉴定表明, PTS中所含主要成分为三七皂苷 $R_1$ 和人参皂苷 $Rg_1$、Re、Rf、$Rb_1$。**结论**　采用LC - MS技术建立的 PTS及其制剂的指纹图谱能充分展示 PTS及其制剂的物质组成。

**关键词**: 三七三醇皂苷;三七通舒肠溶微丸胶囊;指纹图谱;LC - MS
**中图分类号**: R284.1　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1006 - 0103(2009)05 - 0503 - 03

## Study on fingerprints of PTS and its preparation by LC - MS

LENG Jing[1], YANG Hua - rong[2], LIN Da - sheng[2], FU Chao - mei[1], LIU Jing[1], CAO Ke[2], WAN Fang[2*]
(1. *College of Pharmacy, Chengdu University of Tranditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan,* 611137 *P. R. China;* 2. *Chengdu Huashen Pharmaceutical Factory of Co. Ltd, Chengdu, Sichuan,* 610225 *P. R. China*)

**Abstract: OBJECTIVE**　To investigate the chromatographic fingerprints of protoparaxotriol saponins (PTS) and its preparation by HPLC - MS. **METHODS**　Several batches of PTS and its preparation were determined by HPLC. The analysis was carried out on Waters Symetry Shield $C_{18}$ column (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) by gradient elution of acetonitrile and water. The detection wavelength was at 203 nm and the flow rate was 1.0 mg·ml$^{-1}$. The similarity was analyzed by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM. The main components of the fingerprints of PTS was confirmed by reference substance method and LC - MS. **RESULTS**　The components of PTS can be separated well using this method. This method is precise, reproducible and stable. By similarity calculation, the similarity of samples were less than 0.9. The main components of PTS including notoginsenoside $R_1$, ginsenoside $Rg_1$, ginsenoside Re, ginsenoside Rf and ginsenoside $Rb_1$ were confirmed by LC - MS. **CONCLUSION**　This method can fully demonstrate the components of PTS and its preparation and can be applied in the quality control of PTS and its preparation.

**Key words:** Protoparaxotriol saponins; Panax notoginseng tongshu intestinal solution micro - pill capsule; Fingerprints; LC - MS
**CLC number:** R284.1　　**Document code**: A　　**Article ID:** 1006 - 0103(2009)05 - 0503 - 03

三七三醇皂苷 (protoparaxotriol saponins, PTS)是三七有效部位类原料药,主要特征成分为人参皂苷 $Rg_1$、Re和三七皂苷 $R_1$ 等,占 PTS组成的 80%以上。PTS对心脑血管栓塞性疾病具有很强的针对性,能抗血小板聚集并有效地抑制血栓,促进血栓的溶解和血管的疏通;有较强地抑制脑缺血/再灌注后炎症因子分泌及神经细胞凋亡的活性,从而保护神经[1]。已有不少三七药材和三七总皂苷的指纹图谱的相关研究报道[2],但针对 PTS的指纹图谱研究尚未见报道。三七通舒肠溶微丸胶囊是以 PTS为原料药制成的现代中药口服制剂,其物质基础明确,药效成分清楚,作用机理确切,具有以药品形式走向欧盟市场的潜力。指纹图谱具有整体性特征,可定性、定量地控制中药材和中药制剂的各阶段质量,是国际公认的质控方法之一,是中药走向国际的前提条件。为此,特结合 PTS及其制剂的物质特点,对指纹图谱进行测定,建立了既符合中药多成分特性又符合欧盟国际药品注册要求的指纹图谱。实验证明,所建方法专属性强,操作简便,能满足欧盟药品注册的药物质控要求。

## 1　实验部分

### 1.1　仪器与试药

1100高效液相色谱仪系统 (美国安捷伦); BioTOF Q型质谱仪 (美国布鲁克)。15批 PTS、10批三七通舒肠溶微丸胶囊 (成都华神集团有限责任

**基金项目**:国家"十一五"科技支撑计划项目:三七通舒胶囊及糖脉康颗粒的评价研究 (编号: 2006BAI11B04); 2007年度成都市科技计划项目:三七通舒胶囊国际化 (欧盟)药品注册合作研究 (编号: 07GGYB074SF)

**作者简介**:冷静 (1979 - ),女,正攻读中药学专业的博士学位。Email: ljlengjing@sina.com
*通讯作者 (Correspondent author), Email: wanfanghoist@vip.tom.com

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

公司制药厂);三七皂苷 $R_1$ (批号: 110745 - 200415)、人参皂苷 $Rg_1$ (批号: 110703 - 200425)、人参皂苷 Re (批号: 110754 - 200421)、人参皂苷 Rb1 (批号: 11704 - 200318)、人参皂苷 Rf (批号: 111719 - 200502)对照品 (中国药品生物制品检定所);乙腈为色谱纯;超纯水 (自制)。

**1.2 方法与结果**

**1.2.1 色谱条件和质谱条件** 色谱柱为 Waters Symetry Shield $C_{18}$ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm);体积流量 1.0 mg·ml$^{-1}$;柱温 40℃;检测波长 203 nm。流动相为水 (A) - 乙腈 (B)梯度洗脱 (0 ~5 min:乙腈 20%、水 80%, 5~30 min:乙腈 20%→23%、水 80%→77%, 30 ~60 min:乙腈 23%→36%、水 77%→64%, 60 ~80 min:乙腈 36%→50%、水 64%→50%), 0.4 mg·ml$^{-1}$柱后分流进质谱仪。离子源为电喷雾离子源 (ESI),毛细管电压 3.5 kV;毛细管出口电压 120 V;雾化气压力为 30 Psi;离子源温度 300℃;负离子化模式。

**1.2.2 溶液的制备** 分别精密称取 5种对照品适量,加入初始流动相即 20%乙腈水溶液配制成约 0.5 mg·ml$^{-1}$对照品溶液;再精密称取各对照品适量,配制成混合对照品溶液,三七皂苷 $R_1$ 及人参皂苷 $Rg_1$、Re、$Rb_1$、Rf分别为 0.230、0.989、0.144、0.752、0.129 mg·ml$^{-1}$。

精密称取不同批次的 PTS粉末适量,置具塞锥形瓶中,精确加入 20%乙腈水溶液,配制成 0.5 mg·ml$^{-1}$的 PTS供试品溶液,临用前用 0.45 μm滤膜过滤;将不同批次的三七通舒肠溶微丸胶囊内容物研细粉,精密称取,置具塞锥形瓶中,精确加入 20%乙腈水溶液,配制成 0.5 mg·ml$^{-1}$的三七通舒肠溶微丸胶囊供试品溶液,临用前用 0.45 μm滤膜过滤。

**1.2.3 指纹图谱相似度计算方法** 采用国家药典委员会出版的"中药色谱指纹图谱相似度评价系统"软件 (2004A版)进行相似度评价。以 S1样品的指纹图谱为参照谱图,对照图谱的生成采用中位数法,时间窗宽度为 0.5。

**1.2.4 精密度试验** 按"1.2.2"项下制备 PTS供试品溶液,连续进样 6次。以人参皂苷 $Rg_1$ 为参照峰,分别以共有峰的相对保留时间和峰面积比进行统计。结果表明,供试品溶液主要色谱峰的相对峰面积的 *RSD* 均小于 2.0% ($n$ = 6),相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.9% ($n$ = 6)。按"1.2.3"项下方法计算指纹图谱的相似度,分别为 0.997、0.992、0.995、0.997、0.997、0.996 (图 1A),表明仪器精密度良好。

**1.2.5 重复性试验** 按"1.2.2"项制备 PTS供试品溶液各 5份,每份分别进样 1次,测定并记录色谱图。以人参皂苷 $Rg_1$ 为参照峰,分别以共有峰的相对保留时间和峰面积比进行统计。结果表明,主要色谱峰相对峰面积的 *RSD* 均小于 1.8% ($n$ = 5),相对保留时间的 *RSD* 均小于 0.9% ($n$ = 5)。按"1.2.3"项下方法计算指纹图谱的相似度,分别为 0.997、0.998、0.998、0.995、0.997 (图 1B),表明方法重复性好。

**1.2.6 稳定性考察** 按"1.2.2"项下制备 PTS供试品溶液,室温下保存,分别于 0、4、8、12、24、48 h测定并记录色谱图。以人参皂苷 $Rg_1$ 为参照峰,分别以共有峰的相对保留时间和峰面积比进行统计。结果表明,在 48 h内各色谱峰相对峰面积的 *RSD* 均小于 1.8% ($n$ = 6),相对保留时间的 *RSD* 均小于 1.9% ($n$ = 6),按"1.2.3"项下方法计算指纹图谱的相似度,分别为 0.993、0.987、0.997、0.994、0.996、0.997 (图 1C),表明供试品溶液 48 h内的指纹图谱稳定。

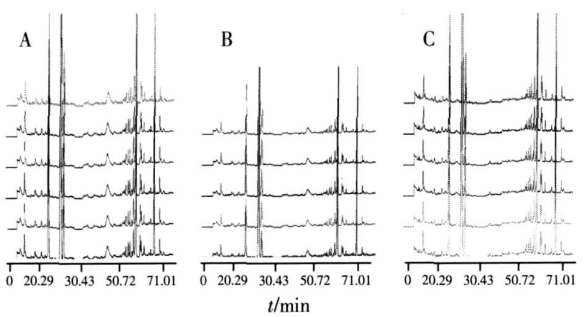


**图 1 指纹图谱法的精密度 (A)、重复性 (B)和稳定性 (C)考察**

**Fig 1 Chromatograms fingerprints of precision (A), repeatability (B) and stability (C)**

**1.2.7 指纹图谱的测定** 按 HPLC法[3],分别精密量取"1.2.2"项下 2种供试品溶液各 10 μl,进样,记录 80 min。以人参皂苷 $Rg_1$ 为参照峰,计算各批次样品色谱图中共有峰的相对保留时间和峰面积比值。PTS和三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱见图 2。

**1.2.8 相似度分析** 按"1.2.3"项下方法,计算 15批 PTS样品与对照图谱的相似度,分别为 0.963、0.952、0.998、0.967、0.988、0.999、0.947、0.974、0.960、0.998、0.989、0.992、0.977、0.987、0.991。计算 10批三七通舒肠溶微丸胶囊与对照图谱的相似度,分别为 0.989、0.998、0.991、0.995、0.995、0.989、0.997、0.997、0.997、0.995。均具有很高的相似度。

**1.2.9 LC - MS测定** 质谱检测器记录的 PTS图谱中的各主要色谱信号的质谱数据和结构归属定性见表 1。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

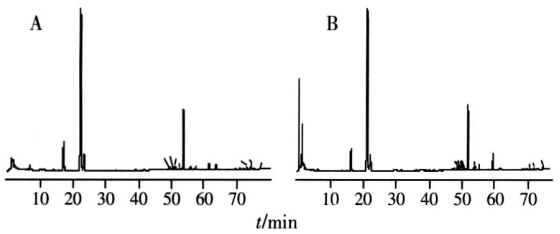


**图 2　三七三醇皂苷(A)和三七通舒肠溶微丸胶囊(B)的指纹图谱**

**Fig 2　Chromatograms fingerprints of PTS(A) and** Panax notoginseng **Tongshu intestinal solution micro - pill capsule (B)**

**表 1　三七三醇皂苷 ESI( - )LC/MS主要色谱峰**

**Table 1　Main chromatographic parameters of PTS by ESI( - ) LC/MS**

| Mark | $t_R$ | ESI - MS | Components |
|---|---|---|---|
| 2 | 21. 2 | 931. 9[M - H], 991. 9[M + CH3COO], 799. 8[M - H - xylc], 495. 5[M - xyl - gluo - gluc + Cl] | notoginsenoside $R_1$ |
| 3 | 26. 8 | 799. 8[M - H], 859. 8[M + $CH_3COO]^-$, 913. 8[M + TFA]$^-$ | ginsenoside $Rg_1$ |
| 4 | 28. 1 | 945. 9[M - H], 859. 9[M - rham + $CH_3COO]^-$, 1005. 9[M + $CH_3COO$], 502. 6[ppt + $CH_3COO$] or[M - H + $CH_3COO]^{2-}$) | ginsenoside Re |
| 5 | 51. 6 | 859. 9[M + $CH_3COO$], 619. 7[M - glu0 - H]$^-$ | ginsenoside Rf |
| 9 | 55. 9 | 553. 6[M - 2H]$^{2-}$, 583. 6 [M - H + $CH_3COO]^{2-}$ | ginsenoside $Rb_1$ |

## 2　讨论

采用梯度洗脱法使原料药 PTS及其制剂各成分得到了较好分离,方法准确可靠。通过 15批 PTS和 10批三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱的测定,均获得 14个共有色谱峰,其中 5个成分为已知物质,主要特征峰 $R_1$、$Rg_1$、Re、$Rb_1$均与 PTS原料和成品有极好的相关性,表明 PTS在肠溶微丸胶囊的制备过程中基本无变化,质量稳定,有效成分具有可追溯性。所用方法可用于 PTS及其制剂的质量控制。

据文献报道,三七类药材或总皂苷的指纹图谱研究,其参照峰大多数选择的是三七药材特征成分三七皂苷 $R_1$或三七中含量较高的人参二醇类皂苷人参皂苷 $Rb_1$[4,5]。未选择人参皂苷 $Rg_1$做参照峰,可能是因为人参皂苷 $Rg_1$与人参皂苷 Re的性质极为相近,要实现基线分离较困难。因人参皂苷 $Rg_1$为 PTS最主要的有效特征成分,含量达 60%以上,在色谱图中峰面积积分值最大,能够反映 PTS及其制剂指纹图谱特性,故文中通过梯度洗脱,使其与人参皂苷 Re达到基线分离,确定人参皂苷 $Rg_1$为参照物。

15批 PTS和 10批三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱的相似度均大于 0. 94,表明多批原料药和制剂的生产工艺稳定性良好,批间物质差异小。说明以标准指纹图谱法或标准提取物法建立原料及制剂的指纹图谱质量控制标准均具有较好的可行性。

通过 LC - MS的测定,获得 PTS 12个主要色谱峰的离子碎片图谱,结合对照图谱和相关资料已确定第 2、3、4、5、9号峰分别为三七皂苷 $R_1$、人参皂苷 $Rg_1$、Re、Rf和 $Rb_1$,为进一步确证 PTS及其制剂的物质基础提供了依据。其他的 9个峰由于缺少更多的研究数据,暂未能推测出其相应的成分,需结合制备液相色谱、二级裂解质谱及其他结构鉴定手段等进行深入研究。

文中仅研究了 PTS及其制剂的指纹图谱,关于三七药材 - PTS原料药 -制剂的指纹图谱及其相关性尚有待进一步深入研究。

**参考文献**:

[1]　刘宇超,吴官思,赵克建,等. 三七三醇皂苷对大鼠缺血再灌注脑损伤保护作用的实验研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(1): 38 - 40.

[2]　林喆,孙瑜,肖学凤,等. 三七药材、总皂苷及制剂 HPLC指纹图谱的研究[J]. 天津中医药, 2007, 24(3): 248 - 215.

[3]　中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京:化学工业出版社, 2005. 附录 ⅤD.

[4]　宋茹,袁继民,雷岚. 三七及制剂 HPLC指纹图谱的研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 47 - 48.

[5]　夏泉,李绍平,黄赵刚,等. 三七总皂苷注射液 HPLC指纹图谱 的比较分析[J]. 中成药, 2004, 26(5): 345 - 348.

**收稿日期**: 2008 - 10

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net