

UPLC-Q-TOF/MS 法快速分析血塞通、血栓通注射液化学成分

赵一懿， 郭洪祝^{*}， 陈有根， 傅欣彤

(北京市药品检验所，北京 102206)

摘要：目的 通过超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 法快速分析血塞通、血栓通注射液化学成分。方法 这些药物 20% 乙腈提取液的分析采用 Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)；以水-乙腈为流动相，梯度洗脱；柱温 40 °C；体积流量 0.2 mL/min。结果 共鉴定出 46 种皂苷类成分，并首次检测到以人参二醇脱氢产物为苷元母核的新型皂苷。结论 该方法快速准确，可用于血塞通、血栓通注射液的质量控制。

关键词：血塞通注射液；血栓通注射液；化学成分；UPLC-Q-TOF/MS

中图分类号：R284.1

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2017)06-1217-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.023

Rapid analysis of chemical constituents in Xuesaitong Injection and Xueshuantong Injection by UPLC-Q-TOF/MS

ZHAO Yi-yi, GUO Hong-zhu^{*}, CHEN You-gen, FU Xin-tong

(Beijing Municipal Institute for Drug Control, Beijing 102206, China)

KEY WORDS: Xuesaitong Injection; Xueshuantong Injection; chemical constituents; UPLC-Q-TOF/MS

血塞通注射液是以三七根茎中三七总皂苷为原料经加工制成的灭菌水溶液，具有活血祛瘀，通脉活络的功效，用于中风偏瘫、淤血阻络证，以及动脉粥样硬化性血栓性脑梗塞、脑栓塞、视网膜中央静脉阻塞属淤血阻络证者^[1]；血栓通注射液是以三七主根中该成分为原料配制成的灭菌水溶液，具有扩张脑血管、增强脑血管流量、活血祛瘀、改善血液循环等作用，临床用于治疗心脑血管类疾病^[2]。两者均为三七制成的中药注射剂，其现行质量标准均为国家药品监督管理局国家药品标准^[3]，通过 HPLC 指纹图谱定性定量分析其中的皂苷类成分，但该方法选用 UV 检测器测定，只在 203 nm 末端吸收有响应信号，致使指纹图谱中只有 5 种成分（三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁、Rd）信号较强，制剂间成分差异难以体现。

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的根和根茎，皂苷为其主要有效成分^[4]，目前对其中化学成分的基础研

究已有诸多报道^[5-9]，但对血塞通、血栓通注射液化学成分的组成却鲜有关注。

UPLC-Q-TOF/MS 法作为高分辨串联质谱，其灵敏度高、专属性强、分析速度快、能得到高质量质谱图和化合物精确相对分子质量，而 TOF/MS 是在一次色谱进样中于 2 个扫描功能（预设定的低、高碰撞能扫描）之间快速切换，从而同时完成两者的数据采集，故该方法已成为中药活性成分快速分离和鉴别的有力手段^[10-11]。本实验首次应用 UPLC-Q-TOF/MS 技术，对血塞通、血栓通注射液中的皂苷类成分进行分析，根据色谱保留时间、精确相对分子质量、分子碎片峰、对照品信息和相关文献对主要色谱峰进行鉴定，可有助于该类制剂的药效物质基础及化学成分体内代谢与作用机制的深入研究。

1 仪器与试药

Waters Acquity UPLC 色谱仪，配置 Synapt G2-S Q-TOF/MS 质谱仪、MassLynx V4.1 质谱工作站

收稿日期：2016-11-05

作者简介：赵一懿（1984—），女，硕士，主管药师，从事中药成分分析与质量控制。Tel: 18600784265, E-mail: zhaoyiyi410@163.com

*通信作者：郭洪祝（1969—），男，博士，主任药师，从事中药成分分析与质量控制。Tel: 13911788378, E-mail: guohz@bidc.org.cn

(美国 Waters 公司); 电子天平(十万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司)。三七总皂苷对照提取物、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁、Rg₂、Rd、Rg₃ 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 人参皂苷 Rf、Rh₁、Rb₂、Rb₃、Rh₂、F₂、七叶胆苷 VI-IX 对照品均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。血塞通注射液(云南植物药业有限公司); 血栓通注射液(广西梧州制药有限公司)。乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司); 其他试剂均为分析纯; 水为 Milli-Q 超纯水仪制备(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 色谱条件 Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0→6 min, 20% B; 6→15 min, 20%→25% B; 15→20 min, 25%→30% B; 20→25 min, 30%→35% B; 25→35 min, 35%→45% B; 35→40 min, 45%→20% B); 柱温40 °C; 体积流量0.2 mL/min; 进样量2 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾电离离子源, 以亮氨酸脑啡肽为校正液。负离子模式检测, m/z 100~1 500; 毛细管电压2.5 kV; 锥孔电压40 kV; 离子源温度120 °C; 脱溶剂气温度450 °C, 体积流量800 L/h; 锥孔气体积流量30 L/h, 碰撞能量15~40 eV。

2.3 溶液制备

2.3.1 对照提取物溶液 精密称取三七总皂苷对照提取物50 mg, 置于10 mL量瓶中, 甲醇溶解稀释至刻度, 摆匀, 吸取200 μL, 20%乙腈稀释至2 mL, 即得。

2.3.2 供试品溶液 精密吸取血塞通、血栓通注射液适量, 20%乙腈稀释成含总皂苷约5 μg/mL的溶液, 即得。

2.3.3 对照品溶液 精密称取各皂苷对照品, 20%乙腈溶解定容, 配制成每1 mL约含5 μg相应对照品的溶液。

3 结果

3.1 总离子流特征图谱分析 血塞通注射液 UPLC-PDA-MS 色谱图见图1, 可知皂苷类成分只在210 nm 波长处有末端吸收, 故 PDA 图中的峰信息远少于总离子流图。该类成分的质谱响应信号与其离子化程度有关, 而离子化程度又取决于其分子结构, 因而从总离子流图中可以明显看出, 有些成分紫外吸收弱, 但质谱响应信号却很强, 表明质谱检测手段能更好地分析样品中皂苷类成分的组成, 信息丰富, 有助于全面比较血塞通、血栓通注射液中化学成分的质量差异。

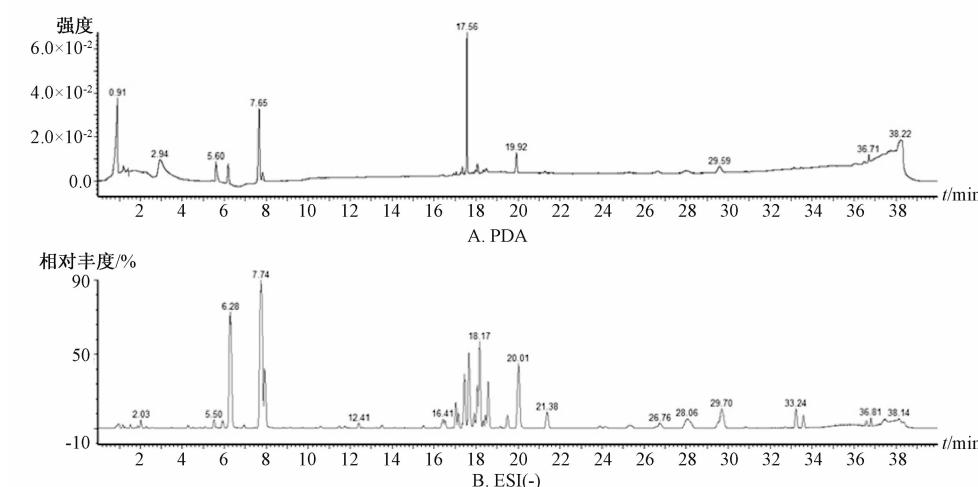


图1 血塞通注射液 UPLC-PDA-MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-PDA-MS chromatograms of Xuesaitong Injection

由于三七提取物中的皂苷类成分有多个同分异构体, 而且可能几种成分以混合物形式存在, 故仅根据质谱碎片信息不能确定同分异构体皂苷。本实验建立的 UPLC 法适当延长了分析时间, 可保证分离度, 有利于成分鉴别。同时还发现, 血塞通、血

栓通注射液中该类成分在正、负离子模式下均有响应信号, 而样品在负离子模式下的碎片信息比正离子模式下更丰富, 并且苷元母核不易破坏, 一级质谱容易形成 $[M-H]^-$ 和 $[M+HCOO]^-$ 准分子离子峰, 故选用负离子检测模式进行定性分析。

各样品总离子流图见图2, 可知三七总皂苷对照提取物及血栓通注射液中极性小的成分较少, 保留时间25 min后的峰信号不明显; 血塞通注射液中极性小的成分较多, 故成分组成信息更丰富, 从

中可以鉴定出更多化合物。另外, 血栓通、血塞通注射液中成分有所差异, 可能时由于选取三七药材不同部位为原料提取, 或者各厂家提取总皂苷工艺不同所致, 具体还需进一步分析研究。

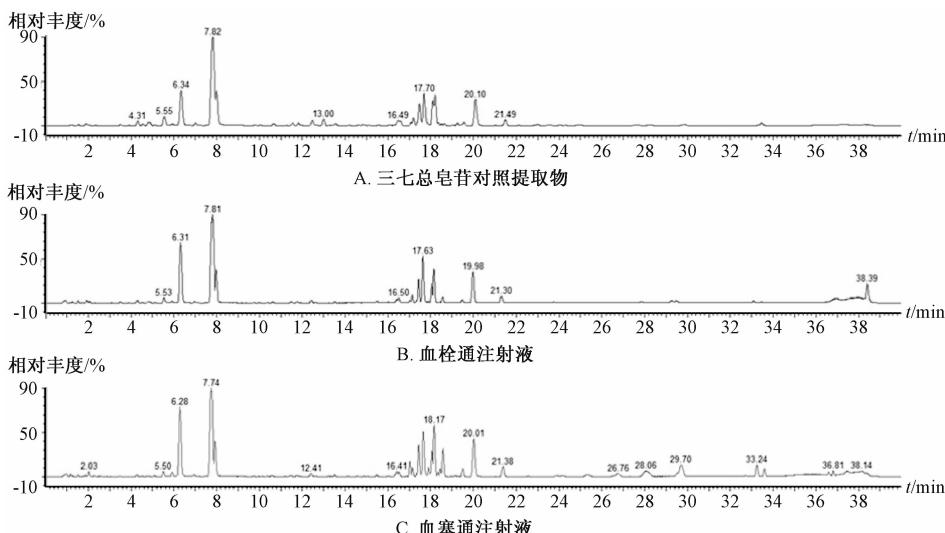


图2 样品总离子流图

Fig. 2 Total ion current chromatograms of samples

3.2 皂苷类成分质谱分析

3.2.1 常见皂苷 目前, 已从三七中分离得到60余种单体皂苷成分, 大部分为达玛烷型的20S-原人参二醇型和20S-原人参三醇型^[9]。血塞通注射液总离子流图中共显示出55个流出峰(图3), 再对其中较为明显的46个峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 母离子进行了MS/MS多级裂解, 并将其进行归属, 结果见表1。

号峰)为例, 低能量质谱出现 m/z 1 209.626 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 分子离子峰, 对其进行高能量质谱分析, 得到 m/z 1 077.497 7、945.461 6、783.418 0、621.370 1、459.321 3, 分别为脱去1分子木糖 $[\text{M}-\text{H-Xyl}]^-$ 、2分子木糖 $[\text{M}-\text{H-2Xyl}]^-$ 、2分子木糖与1分子葡萄糖 $[\text{M}-\text{H-2Xyl-Glc}]^-$ 、2分子木糖与2分子葡萄糖 $[\text{M}-\text{H-2Xyl-2Glc}]^-$ 及人参三醇昔元的碎片。

三七提取物中的皂苷类成分存在较多同分异构体, 其分子组成完全一样, 故高分辨质谱无法有效分辨, 有些分属于不同的昔元母核类型, 通过多级质谱能加以区分; 有些昔元母核及糖基组成均一样, 多级质谱碎片无差别, 则需要通过与对照品保留时间和质谱行为比较加以鉴别。以人参皂昔Rd、Re为例, 两者的低能量质谱无显著区别, 均出现 m/z 945.5 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的基峰, 但通过高能量质谱图比较发现, 其分别属于人参二醇、人参三醇母核, 可将其区分开; 人参皂昔Rf、Rg₁的低能量质谱均出现 m/z 799.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、845.5 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 的峰, 而高能量质谱均有 m/z 637.4 $[\text{M}-\text{H-Glc}]^-$ 、475.3 AgI的碎片信息, 故需要以对照品保留时间进行鉴别。

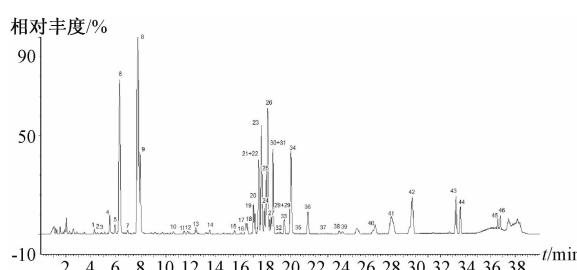


图3 血塞通注射液 UPLC-Q-TOF/MS 色谱图

Fig. 3 UPLC-Q-TOF/MS chromatogram of Xuesaitong Injection

在负离子模式下, 成分低能量质谱均出现 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (基峰)、 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 、 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ 等主要质谱信号, 而高能量质谱一般出现脱去不同糖基后碎片和皂昔昔元碎片峰信号。以三七皂昔Fc(25

表1 血塞通注射液中皂苷类成分分析结果

Tab. 1 Analysis results of saponins in Xuesaitong Injection

编号	成分	t _R /min	分子式	MS[M-H] ⁻	MS m/z
1	三七皂苷 R ₃ /R ₆ /20-O-glucoginsenoside Rf/异构体	4.30	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961.565 7	1 007.573 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 439.452 9 [M-H-3Glc] ⁻ , 421.427 3 [M-H-3Glc-H ₂ O] ⁻
2	yesanchinoside E	4.54	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 107.503 8	1 153.507 8 [M + HCOOH-H] ⁻ , 945.460 9 [M-H-Glc] ⁻ , 783.406 7 [M-H-2Glc] ⁻ , 621.370 1 [M-H-3Glc] ⁻ , 459.325 8 Agl
3	三七皂苷 R ₃ /R ₆ /20-O-glucoginsenoside Rf/异构体	4.88	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961.564 8	1 007.571 0 [M + HCOOH-H] ⁻ , 439.452 9 [M-H-3Glc] ⁻ , 421.427 3 [M-H-3Glc-H ₂ O] ⁻
4	三七皂苷 R ₃ /R ₆ /20-O-glucoginsenoside Rf/异构体	5.55	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961.563 6	1 007.578 3 [M + HCOOH-H] ⁻ , 439.452 9 [M-H-3Glc] ⁻ , 421.427 3 [M-H-3Glc-H ₂ O] ⁻
5	三七皂苷 quinquenoside L ₁₇ /人参皂苷 Re ₄ /异构体	5.97	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	931.445 5	977.529 5 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.363 8 [M-Glc-Xyl-H] ⁻ , 475.323 9 [M-2Glc-Xyl-H] ⁻
6	三七皂苷 R ₁	6.24	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	931.452 1	977.530 5 [M + HCOOH-H] ⁻ , 799.410 3 [M-H-Xyl] ⁻ , 637.365 9 [M-Glc-Xyl-H] ⁻ , 475.321 3 Agl
7	三七皂苷 quinquenoside L ₁₇ /人参皂苷 Re ₄ /异构体	6.99	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	931.445 5	977.529 5 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.363 8 [M-Glc-Xyl-H] ⁻ , 475.323 9 Agl
8	人参皂苷 Rg ₁	7.81	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799.486 4	845.514 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.360 8 [M-H-Glc] ⁻ , 619.351 1 [M-H-H ₂ O-Glc] ⁻ , 475.318 0 Agl
9	人参皂苷 Re	7.99	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.461 5	991.575 0 [M + HCOOH-H] ⁻ , 783.413 5 [M-H-Glc] ⁻ , 637.360 2 [M-H-Glc-Rha] ⁻ , 475.321 3 Agl
10	三七皂苷 G	10.59	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₉	959.546 4	1 005.554 3 [M + HCOOH-H] ⁻ , 797.485 8 [M-H-Glc] ⁻ , 635.428 8 [M-H-2Glc] ⁻ , 473.362 4 Agl
11	25-hydroxy-(E)-20(22)-enenotog-	11.56	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769.398 6	
12	insenoside R ₂ /人参皂苷 F ₃	11.83	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769.398 6	815.479 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.364 7 [M-H-Xyl] ⁻ , 475.313 8 Agl
13	20(S)-三七皂苷 R ₂	12.47	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769.403 9	
14	三七皂苷 R ₃ /R ₆ /20-O-glucoginsenoside Rf/异构体	13.57	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961.583 2	1 007.572 9 [M + HCOOH-H] ⁻ , 439.452 9 [M-H-3Glc] ⁻ , 421.427 3 [M-H-3Glc-H ₂ O] ⁻
15	三七皂苷 T/D	15.55	C ₆₄ H ₁₀₈ O ₃₁	1 371.733 4	1 417.775 3 [M + HCOOH-H] ⁻ , 1 239.682 7 [M-H-Xyl] ⁻ , 1 107.628 4 [M-H-2Xyl] ⁻ , 945.565 1 [M-H-2Xyl-Glc] ⁻ , 783.508 5 [M-H-2Xyl-2Glc] ⁻
16	人参皂苷 Rao /quinquenoside V	16.13	C ₆₀ H ₁₀₂ O ₂₈	1 269.696 3	1 305.674 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 1 107.633 2 [M-H-Glc] ⁻ , 945.566 5 [M-H-2Glc] ⁻ , 783.512 9 [M-H-3Glc] ⁻ , 621.458 9 [M-H-4Glc] ⁻
17	人参皂苷 Rf	16.49	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799.812 0	845.507 0 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.366 1 [M-H-Glc] ⁻ , 475.323 3 Agl
18	三七皂苷 R ₄ /Fa/异构体	16.59	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1 239.684 1	1 275.653 9 [M + HCOOH-H] ⁻ , 1 107.632 4 [M-H-Xyl] ⁻ , 1 077.619 1 [M-H-Glc] ⁻ , 945.568 0 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ ,
19	三七皂苷 T/D	17.13	C ₆₄ H ₁₀₈ O ₃₁	1 371.734 1	1 417.775 3 [M + HCOOH-H] ⁻ , 1 239.693 6 [M-H-Xyl] ⁻ , 1 107.634 5 [M-H-2Xyl] ⁻ , 945.565 1 [M-H-2Xyl-Glc] ⁻ , 783.485 9 [M-H-2Xyl-2Glc] ⁻
20	三七皂苷 R ₄ /Fa/异构体	17.19	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1 239.681 4	1 275.696 3 [M + HCOOH-H] ⁻ , 1 107.633 8 [M-H-Xyl] ⁻ , 1 077.615 2 [M-H-Glc] ⁻ , 945.568 4 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ ,
21	三七皂苷 I/yesanchinoside G	17.43	C ₅₃ H ₈₈ O ₂₃	1 091.635 5	1 137.662 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 929.571 5 [M-H-Glc] ⁻ , 767.506 2 [M-H-2Glc] ⁻
22	20(R)-三七皂苷 R ₂	17.48	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769.403 9	815.478 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.364 7 [M-H-Xyl] ⁻ , 475.321 7 Agl
23	三七皂苷 R ₄ /Fa/异构体	17.62	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	1 239.680 4	1 275.687 6 [M + HCOOH-H] ⁻ , 1 107.646 5 [M-H-Xyl] ⁻ , 1 077.615 2 [M-H-Glc] ⁻ , 945.569 6 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ ,
24	人参皂苷 Rb ₁	17.69	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 107.515 9	1 153.516 6 [M + HCOOH-H] ⁻ , 945.460 9 [M-H-Glc] ⁻ , 783.415 5 [M-H-2Glc] ⁻ , 621.370 1 [M-H-3Glc] ⁻ , 459.321 3 Agl
25	三七皂苷 Fc	18.02	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1 209.626 0	1 077.497 7 [M-H-Xyl] ⁻ , 945.461 6 [M-H-2Xyl] ⁻ , 783.418 0 [M-H-2Xyl-Glc] ⁻ , 621.370 1 [M-H-2Xyl-2Glc] ⁻ , 459.321 3 Agl
26	20(S)-人参皂苷 Rg ₂	18.10	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.510 5	829.511 8 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.438 3 [M-H-Rha] ⁻ , 475.378 1 Agl
27	20(S)-人参皂苷 Rh ₁	18.22	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	637.368 5	683.445 8 [M + HCOOH-H] ⁻ , 475.324 0 [M-H-Glc] ⁻ ,
28	20(R)-人参皂苷 Rg ₂	18.39	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.510 5	829.512 1 [M + HCOOH-H] ⁻ , 637.438 3 [M-H-Rha] ⁻ , 475.378 1 Agl
29	人参皂苷 Rb ₂	18.49	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.583 0	945.460 4 [M-H-Xyl] ⁻ , 915.452 5 [M-H-Glc] ⁻ , 783.413 6 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ , 621.372 1 [M-H-Xyl-2Glc] ⁻
30	人参皂苷 Rb ₃	18.63	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.585 2	945.462 0 [M-H-Xyl] ⁻ , 915.450 3 [M-H-Glc] ⁻ , 783.418 0 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ , 621.374 3 [M-H-Xyl-2Glc] ⁻

续表1

编号	成分	t _R /min	分子式	MS (M-H) ⁻	MS m/z
31	20(R)-人参皂苷 Rh ₁	18.64	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	637.368 5	683.446 5 [M + HCOOH-H] ⁻ , 475.324 0 [M-H-Glc] ⁻ ,
32	三七皂苷 L/R ₇	19.04	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.583 5	945.462 0 [M-H-Xyl] ⁻ , 915.450 3 [M-H-Glc] ⁻ , 783.418 0 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ , 621.374 3 [M-H-Xyl-2Glc] ⁻
33	人参皂苷 F ₁	19.55	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	637.368 5	683.444 9 [M + HCOOH-H] ⁻ , 475.324 0 [M-H-Glc] ⁻ ,
34	人参皂苷 Rd	20.04	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.464 2	991.576 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 783.411 3 [M-H-Glc] ⁻ , 621.367 9 [M-H-2Glc] ⁻ , 459.320 1 Agl
35	人参皂苷 Re	21.13	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	1 077.581 3	945.462 0 [M-H-Xyl] ⁻ , 915.450 3 [M-H-Glc] ⁻ , 783.418 0 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ , 621.374 3 [M-H-Xyl-2Glc] ⁻
36	七叶胆苷 XV II	21.48	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.464 2	991.547 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 783.411 3 [M-H-Glc] ⁻ , 621.367 9 [M-H-2Glc] ⁻ , 459.320 1 Agl
37		22.55	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.552 9	961.564 7 [M + HCOOH-H] ⁻ , 783.505 4 [M-H-Xyl] ⁻ , 621.443 4 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ ,
38	三七皂苷 Fe/Fd/vinaginsenoside R18	23.93	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.555 3	961.564 7 [M + HCOOH-H] ⁻ , 783.505 4 [M-H-Xyl] ⁻ , 621.443 4 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ , 961.564 7 [M + HCOOH-H] ⁻ , 783.505 4 [M-H-Xyl] ⁻ , 621.443 4 [M-H-Xyl-Glc] ⁻
39		24.18	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.555 1	961.564 7 [M-H-Xyl-Glc] ⁻ ,
40	新型皂苷 I	26.60	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.491 7	619.427 9 [M-H-Rha] ⁻ , 457.381 8 Agl
41	新型皂苷 II	28.13	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.490 7	619.426 5 [M-H-Rha] ⁻ , 457.317 4 Agl
42	人参皂苷 F ₂	29.58	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.529 2	829.516 2 [M + HCOOH-H] ⁻ , 621.439 8 [M-H-Glc] ⁻ , 459.385 2 Agl
43	20(S)-人参皂苷 Rg ₃	33.29	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.504 9	829.515 2 [M + HCOOH-H] ⁻ , 621.388 2 [M-H-Glc] ⁻ , 459.385 2 Agl
44	20(R)-人参皂苷 Rg ₃	33.65	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.504 9	829.511 7 [M + HCOOH-H] ⁻ , 621.388 2 [M-H-Glc] ⁻ , 459.385 2 Agl
45	人参皂苷 Rk ₁	36.64	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.397 0	811.483 2 [M + HCOOH-H] ⁻ , 603.349 0 [M-H-Glc] ⁻ , 441.234 5 Agl
46	人参皂苷 Rg ₅	36.84	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.397 0	811.482 4 [M + HCOOH-H] ⁻ , 441.236 5 Agl

通过选择性提取离子流图 (SIM)，对以 m/z 783.5 [M-H]⁻ 为基峰的离子流图进行提取，主要出现了 5 个峰，分别属于 25、27、39、40、41 号峰，高分辨质谱均得出 m/z 783.5 (C₄₂H₇₂O₁₃) 的 [M-H]⁻ 峰和 m/z 829.5 (C₄₃H₇₄O₁₅) 的 [M + HCOO]⁻ 加酸离子峰，25、27 号峰昔元母核为 m/z 475.378 1，多级质谱碎片信息一致；39、40、41 号峰昔元母核为 m/z 459.385 2，多级质谱碎片信息也一致。通过比较对照品保留时间和质谱信息，5 个峰分别鉴定为 20 (S) - 人参皂苷 Rg₂、20 (R) - 人参皂苷 Rg₂、人参皂苷 F₂、20 (S) - 人参皂苷 Rg₃、20 (R) - 人参皂苷 Rg₃。

9 号峰的低能量质谱图显示，有着 m/z 959.546 4 [M-H]⁻ 分子离子峰和 m/z 1 005.554 3 [M + HCOO]⁻ 加酸峰；在高能量质谱图中，可清晰看到脱去 1 分子葡萄糖 [M-H-Glc]⁻、2 分子葡萄糖 [M-H-2Glc]⁻、昔元母核碎片离子 m/z 797.485 8、635.428 8、473.362 4，通过文献比较，鉴定其为三七皂苷 G^[12]。据文献报道，目前从三七中发现的 m/z 473 昔元母核-H 的皂苷类化合物并不多见，在人参属植物中也较为罕见^[13-15]。本实验发现，在三七总皂苷提取物制成的血塞通、

血栓通注射液中均能检测到三七皂苷 G，说明该类成分可以作为三七类制剂中的特征成分。

3.2.2 新型皂苷分析 通过该方法，从血塞通、血栓通注射液中还发现一些极性较小的皂苷类成分。保留时间 36.64、36.84 min 的 45、46 号峰，其低能量质谱给出 m/z 765.397 0 (C₄₂H₆₉O₁₂) 的 [M-H]⁻ 峰和 m/z 811.482 4 (C₄₃H₇₁O₁₄) 的 [M + HCOO]⁻ 离子峰；在高能量质谱图中，可以清晰地看到脱去 1 分子葡萄糖 [M-H-Glc]⁻ 及昔元母核碎片离子 m/z 603.349 0、473.201 3，通过比较对照品保留时间和质谱信息，两者分别鉴定为人参皂苷 Rk₁、Rg₅^[16-17]，其在三七药材和相关制剂中的含有量分布及药理活性有待进一步研究。

通过高分辨质谱和多级质谱信息，还发现血塞通、血栓通注射液中的新型昔元母核皂苷及其糖苷类成分。对以 m/z 765.492 0 [M-H]⁻ 为基峰的离子流图进行提取，出现 4 个母离子为 m/z 765.49 的峰，分别为 40、41、45、46 号（图 4A），其中 45、46 号峰为人参皂苷 Rk₁、Rg₅，其余 2 个均出现 m/z 765.49 [M-H]⁻ 的分子离子峰，而且高能量质谱可以看到脱去 1 分子鼠李糖 m/z 619.426 5 [M-H-Rha]⁻ 的碎片离子峰，以及脱去 1 分子鼠李

糖和1分子葡萄糖 m/z 457.3174 [$M-H-Rha-Glc$]⁻(即苷元)的碎片离子峰(图4B、C)。文献[10]报道,该苷元为人参二醇的脱氢产物,存在于人参属植物中,而在三七中未见报道,故40、41号峰可能为这类苷元的鼠李糖葡萄糖苷类成分,为首次从三七提取物制剂中发现。

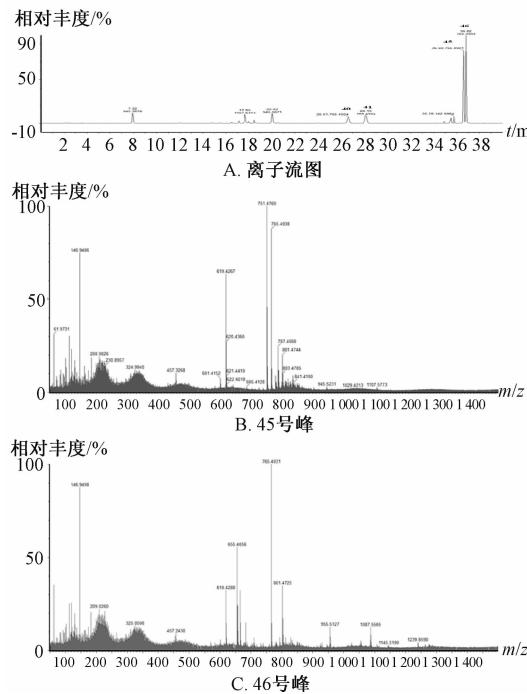


图4 样品质谱图

Fig. 4 Mass spectra of samples

4 讨论

本实验比较了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸等流动相,发现乙腈-水检测信号最丰富,优化后的梯度比例使基线平稳,各成分色谱峰分离度良好。再考察了乙腈、甲醇、初始流动相(20%乙腈)等溶剂制备供试品、对照品溶液,考虑到皂苷类成分的溶解性,以及对照品色谱峰与样品中相应成分色谱峰保留时间的一致,最终选择初始流动相(20%乙腈)作为溶剂配制溶液。

本实验首次应用UPLC-Q-TOF/MS技术,对血塞通、血栓通注射液中的皂苷类成分进行了分析,通过条件优化,得到了较好的分离和质谱响应,可为血塞通、血栓通注射液中化学成分的全面定性鉴别提供了一种快速、高效的分析方法。根据精确相对分子质量和多级质谱碎片信息,结合对照品定位指认及文献比对,从中鉴定出46种皂苷类成分,并首次从中检测到以人参二醇的脱氢产物为苷元母

核的新型皂苷。综上所述,该方法可为后续工作奠定基础,也为完善该类制剂的质量控制方法提供理论依据。

参考文献:

- [1] 廖名龙,李鹏,赵俊. 血塞通临床应用新进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2002, 1(5): 369.
- [2] 曹辉, 卢长虹, 聂广邻. 血栓通治疗冠心病心绞痛的临床观察[J]. 中国医药导报, 2011, 8(21): 72-73.
- [3] WS3-B-3829-98-2011, 国家药品标准[S].
- [4] 曾江, 崔秀明, 周家明, 等. 三七根茎的化学成分研究[J]. 中药材, 2007, 30(11): 1388-1391.
- [5] 肖盛元, 罗国安, 王文明, 等. LC/MS 鉴定中药三七及其复方制剂[J]. 药学学报, 2004, 39(2): 127-131.
- [6] 万建波, 黎畅明, 李绍平, 等. 加压溶剂提取与液相色谱-电喷雾质谱联用技术分析三七中皂苷类成分[J]. 中药材, 2005, 28(10): 885-891.
- [7] 鲍建才, 刘刚, 丛登立, 等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 246-253.
- [8] 周家明, 崔秀明, 曾江, 等. 三七根茎的微量成分研究[J]. 中成药, 2008, 30(10): 1509-1511.
- [9] 费毅琴, 杨萍, 肖凌, 等. HPLC 法快速筛查中成药中三七/人参茎叶代替根和根茎[J]. 中成药, 2015, 37(8): 130-1733.
- [10] Li L, Luo G A, Liang Q L, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(1): 66-72.
- [11] 马增春, 周思思, 梁乾德, 等. 基于UPLC-TOF/MS分析人参附子配伍减毒的物质基础[J]. 药学学报, 2011, 46(12): 1488-1492.
- [12] 夏鹏国, 张顺仓, 梁宗锁, 等. 三七化学成分的研究历程和概况[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2564-2570.
- [13] 徐文, 丘小惠, 张靖, 等. 超高压液相/电喷雾-LTQ-Orbitrap质谱联用技术分析三七根中皂苷类成分[J]. 药学学报, 2012, 47(6): 773-778.
- [14] 刘利民, 张晓琦, 汪豪, 等. 三七主根的微量皂苷类成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2011, 42(2): 115-118.
- [15] Yang W Z, Ye M, Qiao X, et al. A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides[J]. Anal Chim Acta, 2012, 739(5): 56-66.
- [16] Yao H, Shi P Y, Shao Q, et al. Chemical fingerprinting and quantitative analysis of a *Panax notoginseng* preparation using HPLC-UV and HPLC-MS[J]. Chin Med, 2011, 6(9): 1-8.
- [17] 孙玉琴, 陈中坚, 黄天卫, 等. 三七不同变异类型中皂苷的差异研究[J]. 中草药, 2010, 41(6): 993-996.