

# Study on Fingerprints of PTS and its Preparation by LC-MS

LENG Jing<sup>1</sup>, YANG Hua-rong<sup>2</sup>, LIN Da-sheng<sup>2</sup>, FU Chao-mei<sup>1</sup>, CAO Ke<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, WAN Fang<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Chengdu Huashen pharmaceutical factory of Co. Ltd, Chengdu 610225, China)

**ABSTRACT:** **OBJECTIVE** Investigating the chromatographic fingerprints of PTS and its preparation by LC-MS to reach the technical requirements of Quality Control of EU Drug Registration. **METHODS** Several batches of PTS and its preparation were determined by HPLC. The analysis was carried out on Waters Symetry Shield C18 column (4.6 mm×250 mm, Φ 5 μm) by gradient elution of acetonitrile-water. The detection wavelength was at 203 nm, the flow rate was 1.0 mg · mL<sup>-1</sup>. The similarity was analyzed by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004 A). The main components of the Fingerprints of PTS was confirmed by reference substance and LC-MS. **RESULTS** The components of PTS can be separated well using this method. This method is precise, reproducible and stability. **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:** PTS; panax notoginseng tongshu intestinal solution micro-pill capsule; fingerprints; LC-MS

**CLC number:** R284.1 **Document code:** A

## 三七三醇皂苷及制剂的 LC-MS 指纹图谱研究

冷静<sup>1</sup>, 杨华蓉<sup>2</sup>, 林大胜<sup>2</sup>, 傅超美<sup>1</sup>, 曹科<sup>2</sup>, 刘婧<sup>1</sup>, 万方<sup>2\*</sup>

(1 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 成都华神集团股份有限责任公司制药厂, 610225; ★通讯作者)

**摘要:**目的 建立三七三醇皂苷(PTS)及其制剂三七通舒肠溶微丸胶囊的 HPLC 指纹图谱,同时对其进行 LC-MS 测定,以满足欧盟药品注册的药物质量控制研究技术要求。方法 采用梯度洗脱法,流动相为水-乙腈,检测波长为 203 nm,流速为 1.0mg · mL<sup>-1</sup>,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 2004 A 版对测定

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了成分确证。结果 所建立的 LC-MS 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。结论 采用 LC-MS 指纹图谱能充分展示 PTS 及其制剂的物质组成, 控制产品质量。

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

三七三醇皂苷 (protopanaxotriol saponins, PTS) 是三七有效部位类原料药, 主要成分为人参皂苷  $R_{g_1}$ 、 $R_e$  和三七皂苷  $R_1$  等。在药效学方面, 对于心脑血管栓塞性疾病的病理生理过程具有很强的针对性, 能够抗血小板聚集并有效的抑制血栓的形成和发展, 促进血栓的溶解和血管的疏通<sup>[1]</sup>; 具有较强的抑制脑缺血/再灌注后炎症因子分泌及神经细胞凋亡的活性<sup>[2]</sup>, 从而起到神经保护作用。近年来关于三七药材和三七皂苷的指纹图谱研究较多<sup>[3, 4]</sup>, 但重点针对 PTS 的指纹图谱研究尚未见报道。本文对 PTS 及其制剂三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱进行测定, 实验证明, 该方法专属性强, 操作简便, 可作为 PTS 及制剂的质量控制依据。

## 1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪, VWD-DAD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站, 四元泵在线脱气系统(美国安捷伦科技有限公司); BioTOF Q 型质谱仪(美国布鲁克分析仪器公司); Mettler AE240 电子分析天平(十万分之一, 德国 Mettler 公司)。

PTS 共 15 批, 三七通舒肠溶微丸胶囊共 10 批, 均为成都华神集团有限责任公司制药厂生产。三七皂苷  $R_1$ (批号 110745-200415)、人参皂苷  $R_{g_1}$ (批号 110703-200425)、人参皂苷  $R_e$ (批号 110754-200421)、人参皂苷  $R_{b_1}$ (批号 11704-200318)、人参皂苷  $R_f$ (批号 111719-200502), 以上对照品购自中国药品生物制品检定所。

乙腈(色谱纯, 美国 fisher 公司出品); 超纯水(自制)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件:**采用 Waters Symetry Shield C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m); 体积流量 1.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 检测波长 203 nm; 流动相:水(A)-乙腈(B)梯度洗脱; 具体为: 0 min→5min, 乙腈 20%, 水 80%; 5min→30min, 乙腈 20%→23%, 水 80%→77%; 30min→60min, 乙腈 23%→36%, 水 77%→64%; 60min→80min, 乙腈 36%→50%, 水 64%→50%; 柱后分流: 0.4  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  进质谱仪; 采用 ESI 负离子化方式进行质谱测定。

**2.2 对照品溶液制备:**精密称取五种对照品适量, 加入初始流动相, 即 20%乙腈水溶液配制成约 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的单个对照品溶液; 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  $R_1$ 、人参皂苷  $R_{g_1}$ 、 $R_e$ 、 $R_{b_1}$  和  $R_f$  的浓度分别为: 0.23  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.989  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.144  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.752  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.129  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.3 供试品溶液制备:**PTS 供试品的制备: 精密称取不同批次 PTS 粉末适量, 置于具塞锥形瓶中, 精确加入 20%乙腈水溶液, 配制成 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 临用前 0.45  $\mu$ m 滤膜滤过。

三七通舒肠溶微丸胶囊供试品的制备：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，置于具塞锥形瓶中，精确加入 20% 乙腈水溶液，配制成  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液，临用前  $0.45 \mu\text{m}$  滤膜滤过。

## 2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验:按 2.3 项下制备 PTS 供试品溶液 1 份，连续进样 6 次，以人参皂苷  $\text{Rg}_1(\text{S})$  为参照峰，分别以共有峰的相对保留时间(RPT)和峰面积比(RPA)进行统计。结果表明，供试品溶液主要色谱峰的相对峰面积 RSD 均小于 2.0% ( $n=6$ )，相对保留时间 RSD 均小于 0.9% ( $n=6$ )，图谱相似度（中位数相关系数法）分别为 0.997、0.992、0.995、0.997、0.997、0.996，见图 1-a，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验:按 2.3 项制备 PTS 供试品溶液各 5 份，每份分别进样 1 次，进行测定并记录色谱图。以人参皂苷  $\text{Rg}_1(\text{S})$  为参照峰，分别以共有峰的相对保留时间(RPT)和峰面积比(RPA)进行统计。结果表明，主要色谱峰的相对峰面积 RSD 均小于 1.8% ( $n=5$ )，相对保留时间 RSD 均小于 0.9% ( $n=5$ )，图谱相似度（中位数相关系数法）为 0.997、0.998、0.998、0.995、0.997，见图 1-b，表明方法重复性好。

2.4.3 稳定性考察:按 2.3 项下制备 PTS 供试品溶液，室温下保存，分别于 0h、4h、8h、12h、24h、48h 进行测定并记录色谱图。以人参皂苷  $\text{Rg}_1(\text{S})$  为参照峰，分别以共有峰的相对保留时间(RPT)和峰面积比(RPA)进行统计。结果表明，在 48h 内各色谱峰的相对峰面积 RSD 均小于 1.8% ( $n=6$ )，相对保留时间 RSD 均小于 1.9% ( $n=6$ )，图谱相似度（中位数相关系数法）0.993、0.987、0.997、0.994、0.996、0.997，见图 1-c，表明供试品溶液 48 小时内指纹图谱稳定。

2.5 指纹图谱的测定：按照高效液相色谱法（中国药典 2005 年版一部附录 VID）<sup>[5]</sup>，分别精密量取上述 2 种供试品溶液各  $10 \mu\text{L}$  注入液相色谱仪，记录 80 min。以人参皂苷  $\text{Rg}_1(\text{S})$  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（RPT）和峰面积比值(RPA)，结果见表 1。PTS 和三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱见图 2。

2.6 相似度分析：采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(国家药典委员会，2004A)，利用对峰面积、峰高以及全谱进行匹配，以 S1 样品的 HPLC 图谱为参照图谱，生成对照图谱 R（见图 3），采用中位数相关系数法计算 S1-S15 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 S1-S10 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。结果表明 15 批 PTS 和 10 批三七通舒肠溶微丸胶囊均具有很高的相似度。

2.7 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 2。

## 3 讨论

3.1 PTS 的主要特征成分为  $\text{R}_1$ 、 $\text{Rg}_1$ 、 $\text{Re}$ 、 $\text{Rb}_1$ ，其中  $\text{R}_1$ 、 $\text{Rg}_1$ 、 $\text{Re}$  是 PTS 的特征有效成分，对多批样品的测定表明，它们占组成的 80% 以上。本文用梯度洗脱法使原料药 PTS 各

成分得到了较好的分离，方法学考察实验结果证明该方法准确可靠。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，两者相似度均大于 0.95，主要特征峰  $R_1$ 、 $R_{g1}$ 、 $Re$ 、 $R_{b1}$  均在 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，本方法可用于 PTS 及其制剂的质量控制。PTS 为已批准上市的中药原料药，已建立了相应的质量标准，本文对其进行指纹图谱研究，将进一步提升其质量控制水平，满足植物药进入欧盟市场的技术要求。

**3.2** 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(S)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  $R_{b1}$ <sup>[6-7]</sup>。其未选择人参皂苷  $R_{g1}$  做参照峰，可能是因为人参皂苷  $R_{g1}$  与人参皂苷  $Re$  性质极为相近，要实现基线分离比较困难。因人参皂苷  $R_{g1}$  为 PTS 最主要有效特征成分，含量达 60% 以上，在色谱图中峰面积积分值最大、且保留时间较三七皂苷  $R_1$  居中，能够反映 PTS 及其制剂指纹图谱特性，故本研究通过梯度洗脱，使其与人参皂苷  $Re$  达到基线分离，确定人参皂苷  $R_{g1}$  为参照物。

**3.3** 对 15 批 PTS 和 10 批三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱的测定结果，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(国家药典委员会，2004A)进行相似度评价，两者相似度均大于 0.95，表明多批原料和制剂的工艺稳定性良好，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。

**3.4** 通过 LC-MS 的测定，获得 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  $R_{g1}$ 、 $Re$ 、 $R_f$  和  $R_{b1}$ 。其他的 9 个峰裂解情况分别为：tR 8.2 min, 595.4、709, 4; tR 47.8 min, 574.6、604.6; tR 53.3 min, 553.6、574.6、619.7、649.7、679.7、716.2; tR 54.2 min, 552.6、582.6、631.2、766.5; tR 54.5 min, 545.6、575.6、629.1、1650.2; tR 58.2 min, 637.8、697.8、751.8; tR 51.6 min, 538.6, 537.8、697.8、751.8，由于缺少更多的研究数据，暂未能推测出其相应的成分，尚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。

**3.5** PTS 为三七药材(剪口)的提取物，也是三七通舒肠溶微丸胶囊的原料药，本文仅对 PTS 及其制剂的指纹图谱进行了研究，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。

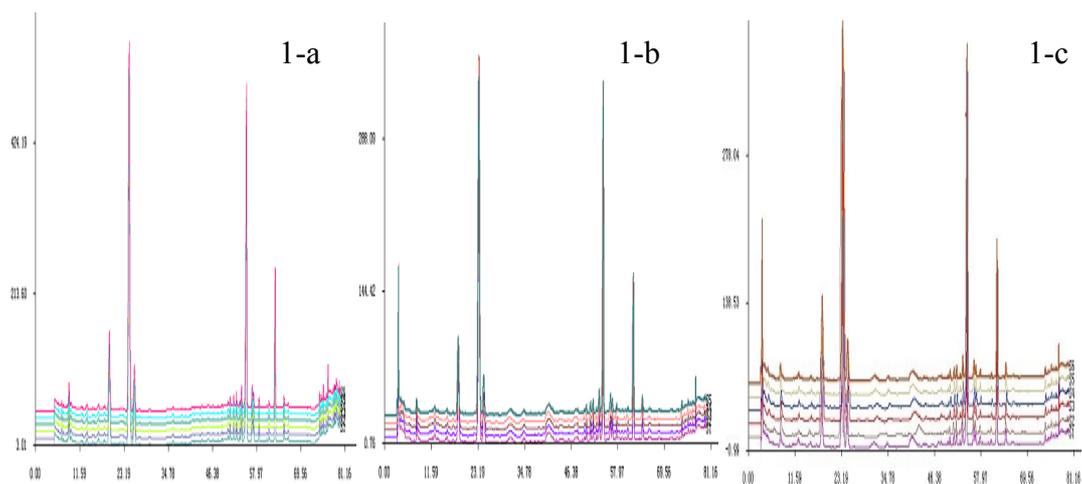


图 1 指纹图谱方法学考察(1-a. 精密度; 1-b. 重复性; 1-c. 稳定性)

Fig.1 Methodology of Fingerprints chromatographic(1-a. Precision; 1-b. Repeatability; 1-c. Stability)

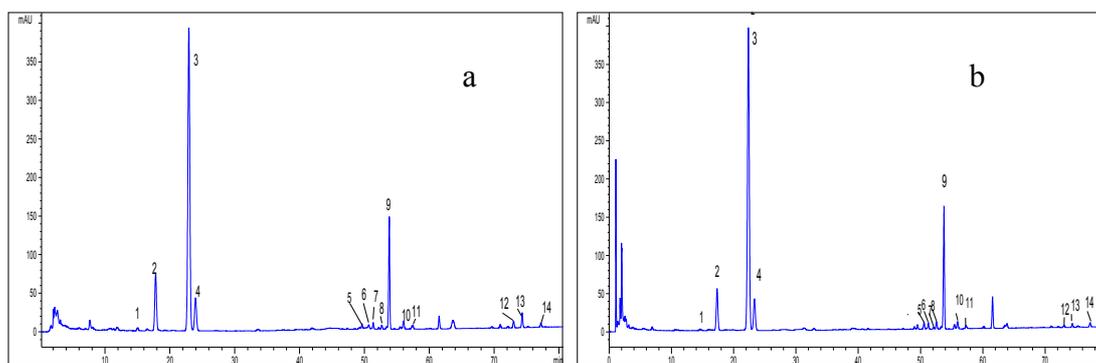


图 2 三七三醇皂苷(a)、三七通舒肠溶微丸胶囊(b)指纹图谱

Fig.2 Fingerprints chromatographic of PTS(a) and panax notoginseng tongshu intestinal solution micro-pill capsule (b)

表 1 三七三醇皂苷及三七通舒肠溶微丸胶囊的指纹图谱研究结果

Tab.1 Research results of fingerprints chromatographic of PTS and panax notoginseng tongshu intestinal solution micro-pill capsule

Mark	PTS		capsule	
	RPT	RPA	RPT	RPA
1	0.651±0.0011	0.011±0.0041	0.652±0.0007	0.013±0.0001
2 (R <sub>1</sub> )	0.774±0.0016	0.196±0.0015	0.775±0.0013	0.187±0.0015
S (R <sub>g1</sub> )	1.000	1.000	1.000	1.000
4 (R <sub>e</sub> )	1.044±0.0005	0.117±0.0011	1.044±0.0001	0.118±0.0020
5(R <sub>f</sub> )	2.227±0.0009	0.010±0.0069	2.194±0.0011	0.010±0.0009
6	2.274±0.0018	0.013±0.0017	2.271±0.0032	0.017±0.0014
7	2.306±0.0100	0.015±0.0087	2.309±0.0056	0.014±0.00032

8	2.364±0.0023	0.019±0.0099	2.367±0.0034	0.017±0.00026
9 (Rb <sub>1</sub> )	2.419±0.0017	0.281±0.0001	2.420±0.0028	0.280±0.0005
10	2.516±0.0006	0.051±0.0014	2.515±0.0011	0.065±0.0007
11	2.580±0.0012	0.033±0.0000	2.581±0.0041	0.031±0.0011
12	3.284±0.0019	0.065±0.0001	3.230±0.0017	0.055±0.0023
13	3.345±0.0027	0.079±0.0030	3.348±0.0023	0.061±0.0007
14	3.473±0.0004	0.014±0.0034	3.473±0.0044	0.011±0.0017

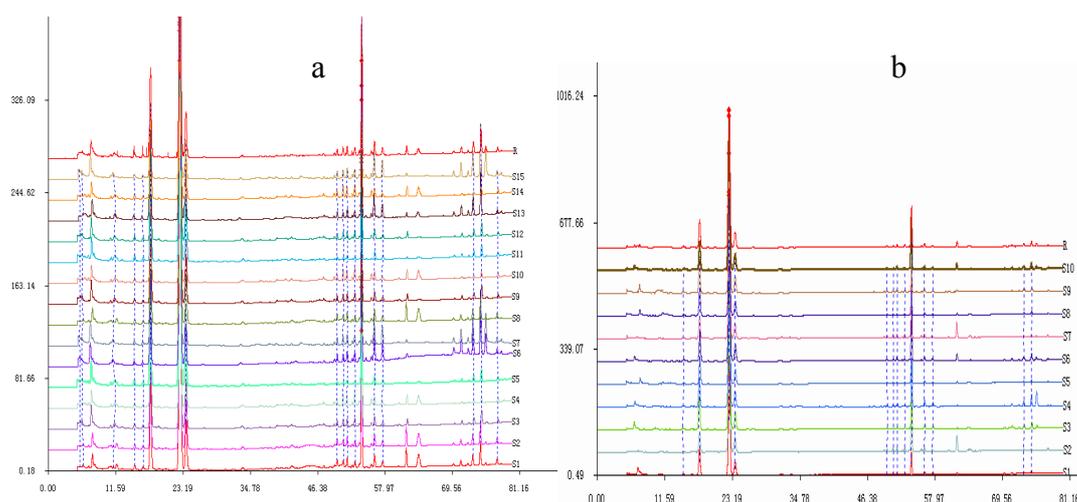


图 3 15 批三七三醇皂苷 (a) 和 10 批三七通舒肠溶微丸胶囊 (b) 相似度图谱

Fig.3 The similar degree chromatographic of PTS(a) and panax notoginseng tongshu intestinal solution micro-pill capsule (b)

表 2 三七三醇皂苷 ESI(-)LC/MS 主要色谱峰

Tab.2 Main chromatographic of PTS by ESI(-)LC/MS

Mark	Remain Time (min)	ESI-MS	Components
2	21.2	931.9[M-H] <sup>-</sup>	Notoginsenoside R <sub>1</sub>
		991.9[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	
		799.8[M-H-xylc] <sup>-</sup>	
		495.5[M-xyl-gluo-gluo+Cl] <sup>-</sup>	
3	26.8	799.8[M-H] <sup>-</sup>	Ginsenoside Rg <sub>1</sub>
		859.8[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	
		913.8[M+TFA] <sup>-</sup>	
4	28.1	945.9[M-H] <sup>-</sup>	Ginsenoside Re
		859.9[M-rham+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	
		1005.9[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	
		502.6[人参皂苷元+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup> (或[M-H+CH <sub>3</sub> COO] <sup>2-</sup> )	
5	51.6	859.9[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	Ginsenoside Rf
		619.7[M-glu0-H] <sup>-</sup>	
9	55.9	553.6[M-2H] <sup>2-</sup>	Ginsenoside Rb <sub>1</sub>
		583.6[M-H+CH <sub>3</sub> COO] <sup>2-</sup>	

## 参考文献

- [1] LIU Z C, ZHOU G E, ZHAO K J, et al. Protective effects of PTS on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J].J Apoplexy and Nervous Disease(中风与神经疾病杂志), 2007, 24 (1): 38-40.
- [2] LI H, ZHANG H M, PENG F, et al. Protective effect of Tongshu capsule on cerebral ischemia[J].Chinese J of new drugs (中国新药杂志), 2002, 11 (9): 689-700.
- [3] SUN Y, XIAO X F, ZHANG J P, et al.Study on fingerprints of radix notoginseng, total saponins and its preparation by HPLC method[J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine(天津中医药), 2007, 24 (3): 248-215
- [4] LAI Y H, CHEN H A, OU Z Y, et al.The Robustness Test for the HPLC Conditions of the Fingerprint of Notoginsenosides[J]. Chin. J Nat Med(中国天然药物), 2006, 4(2): 107-110
- [5] Ch P (2005) Vol I (中国药典 2005 年版.一部) [S].2005: Appendix 33
- [6] SONG R, YUAN J M, LEI L. Study on Fingerprints of Radix Notoginseng and its Preparation by HPLC[J].Chin.J of Information on TCM(中国中医药信息杂志), 2005, 12(6):47-48
- [7] XIA Q, LI S P, HUANG Z G, et al.Study on HPLC fingerprinting of Radix Notoginseng Injections[J].Chinese Traditional Patent Medicine(中成药), 2004, 26 (5): 345-348

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：第一作者：冷静（1979-），女，中药学博士研究生，研究方向为中药新制剂与新剂型。E-mail:ljlengjing@sina.com。

\*通讯作者：万方（1968-），男，高级工程师，E-mail:wanfangoist@vip.tom.com。