

SCIEX LC-MS/MS系统定量检测大鼠血浆中人参皂苷Rg1、绿原酸和山奈酚

Quantitative Analysis of Ginsenoside Rg1, Chlorogenic acid and Kaempferol in Rat Plasma by SCIEX LC-MS/MS System

史晓媛, 钟晨春, 龙志敏, 郭立海

Xiaoyuan Shi, Chenchun Zhong, Zhimin Long, Lihai Guo

SCIEX 应用支持中心, 中国

Keywords: LC-MS/MS, Ginsenoside Rg1, Chlorogenic acid, Kaempferol, Quantitative Analysis

引言

人参皂苷 Rg1 (Ginsenoside Rg1) 是从人参根茎中提取的主要活性成分之一, 是属于原人参三醇型皂苷, 它在维持血液循环、改善心肌缺血、抗心律失常、抗休克、镇静、提高智力、抗衰老、抗氧化、抗细胞增殖和抗肿瘤等方面均显示出一定的药理作用。绿原酸 (Chlorogenic acid) 是由咖啡酸与奎尼酸生成的缩酚酸, 广泛存在于多种植物的根、茎、叶和果实中, 具有调节糖脂代谢、保肝、抗肿瘤、抗炎、抑菌等多种生物学功能。山奈酚 (Kaempferol) 属于天然黄酮类化合物, 广泛存在于植物根、叶和果实中, 具有抗氧化、抗炎、抗癌和预防心血管疾病等多种药理活性。本文采用高效液相色谱串联质谱建立了同时测定人参皂苷Rg1、绿原酸和山奈酚在大鼠血浆中的定量方法。在获得优异灵敏度的同时, 出色的分析重现性、准确性和定量线性使得整个分析流程更加可靠。

前处理方法

取100 μ L血浆样品, 精密加入200 μ L 0.2%甲酸甲醇, 涡旋混匀1 min, 15000 rpm离心10 min, 取上清液供仪器分析。

实验设备

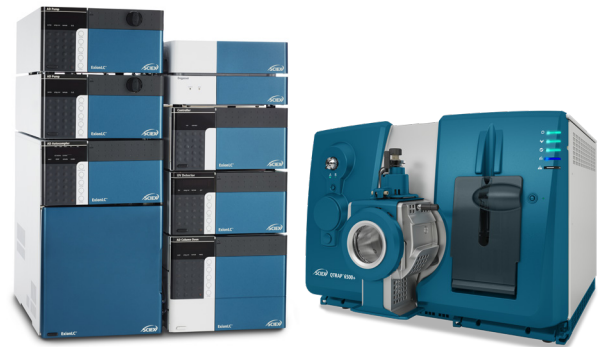


图1. ExionLC™ AD系统和SCIEX MS/MS系统

液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18 (2.6 μ m 100 \times 2.1mm)

流动相: A: 水 (含0.1%甲酸, 10 μ M乙酸钠);

B: 乙腈+甲醇 (v:v=1:1, 含0.1%甲酸, 10 μ M乙酸钠)

流速: 0.4 mL/min;

进样体积: 3 μ L

梯度洗脱

表1. 液相梯度条件

时间 (min)	A%	B%
0	90	10
1.0	90	10
5.0	0	100
6.0	0	100
6.1	90	10
8.0	90	10

质谱方法

数据采集方法: MRM (多反应监测)

离子源: ESI源正模式/负模式

气帘气CUR: 35psi IS电压: +5500V/-4500V

源温度 TEM: 550°C 雾化气Gas1: 60psi

辅助气Gas2: 50psi 碰撞气 CAD: Medium

多反应监测离子通道如表2

表2. MRM离子对信息

Compound ID	Q1 mass	Q3 mass	DP	CE
Chlorogenic acid 1	353.1	191.0	-24	-23
Chlorogenic acid 2	353.1	179.1	-24	-23
Kaempferol 1	287.0	153.1	109	43
Kaempferol 2	287.0	120.9	109	42
Ginsenoside Rg1 1	823.4	643.4	58	51
Ginsenoside Rg1 2	823.4	203.1	58	56

实验结果

1. 灵敏度和线性

本实验配制大鼠血浆标准工作溶液至0.02 ng/mL, 0.05 ng/mL, 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL和20 ng/mL, 经过蛋白沉淀, 离心上机分析。血浆基质人参皂苷Rg1的定量下限 (LOQ) 为0.02ng/mL, 绿原酸和山奈酚的LOQ为0.2ng/mL, 空白干净无干扰, 方法特异性好、灵敏度高 (图2)。人参皂苷Rg1、

绿原酸和山奈酚化合物线性范围和回归方程 (图3), 人参皂苷Rg1、绿原酸和山奈酚在0.02~20 ng/mL的浓度范围内线性良好。

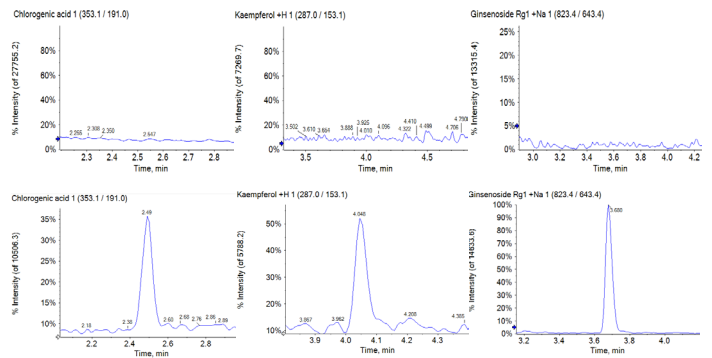


图2. 典型色谱图 (上图为空白血浆基质提取离子色谱图, 下图为0.2ng/mL 基质加标样品提取离子色谱图)

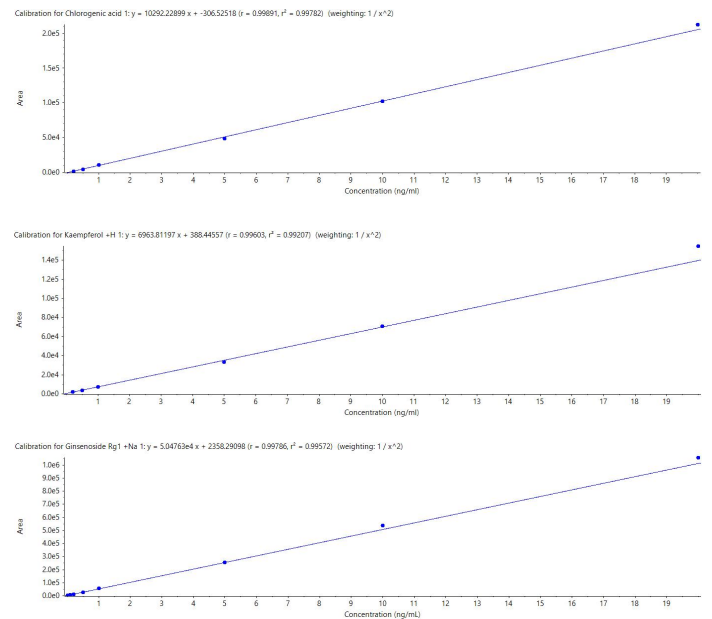


图3. Semaglutide和Tirzepatide标准曲线和线性回归方程, 线性相关系数 $r > 0.995$

2. 重现性

为考察方法的重现性和准确性, 分别将处理好的LOQ浓度点样本进行重复性考察。6针样品(图4)连续采集, 精密度 (RSD) 分别为4.45%、4.27%和1.68%, 准确度在92.25%~111.77%之间。

Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Actual Concentration	Area	Retention Time	Us	Calculated Concentration	Accuracy
465	0.2ng/ml	Quality Control	Chlorogenic acid 1	Quantifiers	0.20	1.948e3	2.49	<input checked="" type="checkbox"/>	0.219	109.54
473	0.2ng/ml	Quality Control	Chlorogenic acid 1	Quantifiers	0.20	1.913e3	2.49	<input checked="" type="checkbox"/>	0.216	107.85
481	0.2ng/ml	Quality Control	Chlorogenic acid 1	Quantifiers	0.20	1.947e3	2.49	<input checked="" type="checkbox"/>	0.219	109.46
489	0.2ng/ml	Quality Control	Chlorogenic acid 1	Quantifiers	0.20	1.736e3	2.50	<input checked="" type="checkbox"/>	0.198	99.20
497	0.2ng/ml	Quality Control	Chlorogenic acid 1	Quantifiers	0.20	1.942e3	2.50	<input checked="" type="checkbox"/>	0.218	109.24
505	0.2ng/ml	Quality Control	Chlorogenic acid 1	Quantifiers	0.20	1.850e3	2.50	<input checked="" type="checkbox"/>	0.210	104.78

Row	Component Name	Act...	Num. Val...	Mean	Stand...	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	Chlorogenic acid 1	0.20	6 of 6	1.899e3	0.406e1	4.45	1.948e3	1.913e3	1.947e3	1.736e3	1.942e3	1.850e3



Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Actual Concentration	Area	Retention Time	Us	Calculated Concentration	Accuracy
492	0.2ng/ml	Quality Control	Kaempferol +H 1	Quantifiers	0.20	1.804e3	4.05	<input checked="" type="checkbox"/>	0.203	101.63
500	0.2ng/ml	Quality Control	Kaempferol +H 1	Quantifiers	0.20	1.895e3	4.05	<input checked="" type="checkbox"/>	0.216	108.21
508	0.2ng/ml	Quality Control	Kaempferol +H 1	Quantifiers	0.20	1.945e3	4.05	<input checked="" type="checkbox"/>	0.224	111.77
516	0.2ng/ml	Quality Control	Kaempferol +H 1	Quantifiers	0.20	1.883e3	4.05	<input checked="" type="checkbox"/>	0.215	107.32
524	0.2ng/ml	Quality Control	Kaempferol +H 1	Quantifiers	0.20	1.868e3	4.05	<input checked="" type="checkbox"/>	0.212	106.21
532	0.2ng/ml	Quality Control	Kaempferol +H 1	Quantifiers	0.20	1.721e3	4.05	<input checked="" type="checkbox"/>	0.191	95.68

Row	Component Name	Act...	Num. Val...	Mean	Stand...	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	Kaempferol +H 1	0.20	6 of 6	1.853e3	7.906e1	4.27	1.804e3	1.895e3	1.945e3	1.883e3	1.868e3	1.721e3



Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Component Type	Component Group Name	Actual Concentration	Area	Retention Time	Us	Calculated Concentration	Accuracy
351	0.02ng/ml	Quality Control	Ginsenoside Rg1 +Na 1	Quantifiers	Ginsenoside...	0.02	3.418e3	2.87	<input checked="" type="checkbox"/>	0.021	104.95
359	0.02ng/ml	Quality Control	Ginsenoside Rg1 +Na 1	Quantifiers	Ginsenoside...	0.02	3.445e3	2.87	<input checked="" type="checkbox"/>	0.022	107.66
367	0.02ng/ml	Quality Control	Ginsenoside Rg1 +Na 1	Quantifiers	Ginsenoside...	0.02	3.384e3	2.87	<input checked="" type="checkbox"/>	0.020	101.63
375	0.02ng/ml	Quality Control	Ginsenoside Rg1 +Na 1	Quantifiers	Ginsenoside...	0.02	3.380e3	2.87	<input checked="" type="checkbox"/>	0.020	101.16
383	0.02ng/ml	Quality Control	Ginsenoside Rg1 +Na 1	Quantifiers	Ginsenoside...	0.02	3.290e3	2.87	<input checked="" type="checkbox"/>	0.018	92.25
391	0.02ng/ml	Quality Control	Ginsenoside Rg1 +Na 1	Quantifiers	Ginsenoside...	0.02	3.437e3	2.87	<input checked="" type="checkbox"/>	0.021	106.89

Row	Component Name	Act...	Num. Val...	Mean	Stand...	Percent CV	Value #1	Value #2	Value #3	Value #4	Value #5	Value #6
1	Ginsenoside Rg1 +Na...	0.02	6 of 6	3.392e3	5.702e1	1.68	3.418e3	3.445e3	3.384e3	3.380e3	3.290e3	3.437e3



图4. LOQ标点连续进样6针色谱图，峰面积、保留时间、准确率列表

3. 回收率

取9份大鼠空白血浆，平行制备三份加标溶液，浓度分别在LQC和HQC作为质控样品，净化液上机检测。测定结果请见表3。加标样品的准确度均在95.89-111.74%，平行样品的RSD% < 5%，准确度和重现性均满足测试要求，测试结果良好。

表3. 3种化合物不同添加浓度样本回收率表

化合物	质控点	理论浓度 (ng/mL)	实测浓度平均值 (ng/mL)	相对标准偏差 RSD(%)	准确度 (%)
绿原酸	LQC	0.7	0.773	2.22	103.26
	HQC	9	9.429	0.54	104.27
山奈酚	LQC	0.7	0.738	4.42	105.44
	HQC	9	9.479	2.91	105.32
人参皂苷 Rg1	LQC	0.7	0.741	3.78	105.79
	HQC	9	9.502	0.93	105.86

总结

本文使用SCIEX LC-MS/MS系统建立了LC-MS/MS方法测定大鼠血浆中绿原酸、山奈酚和人参皂苷Rg1的含量。结果表明，该方法的特异性好，无干扰；线性范围为0.02 ng/mL-20 ng/mL，在线性范围内线性关系良好，相关系数大于0.995；低、高浓度的QC加标准确度以及重现性良好，满足方法学要求。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美利和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-33349-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)