

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01401

· 短篇论著 ·

LC-MS/MS 测定白及止血海绵中白及葡甘聚糖的含量

王巍¹,夏令强¹,陈君¹,张晓洁^{2*}

1. 解放军 455 医院药剂科,上海 200052

2. 总后丰台综合仓库药材供应站,北京 100071

[摘要] **目的** 建立 LC-MS/MS 方法测定白及止血海绵中白及葡甘聚糖含量。**方法** 采用 Waters X Bridge™ Amide (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm); 流动相为乙腈:5 mmol/L 醋酸铵(内含 0.1% 甲酸水溶液)=60:40; 流速为 0.3 mL/min; 柱温 35℃; 进样量 10 μL。**结果** D-甘露糖线性范围为 50.0~5 000.0 ng/mL($r=0.9995$), 方法学考察表明日内和日间精密密度、最低检测限和定量限均符合相关标准, 加样回收率为 98.4%($n=5$), RSD=1.03%。**结论** 本法操作简单, 选择性好, 灵敏度高, 适用于白及止血海绵中的白及葡甘聚糖的定量分析。

[关键词] 白及葡甘聚糖; 液相色谱-串联质谱法; 白及

[中图分类号] R 286.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2014)12-1401-03

LC-MS/MS in determination of *Bletilla striata* glucomannan in *Bletilla striata* hemostatic sponge

WANG Wei¹, XIA Ling-qiang¹, CHEN Jun¹, ZHANG Xiao-jie^{2*}

1. Department of Pharmacy, No. 455 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

2. Medical Supply Station, Fengtai Warehouse of PLA General Logistics Department, Beijing 100071, China

[Abstract] **Objective** To establish a LC-MS/MS system for the determination of *Bletilla striata* glucomannan in *Bletilla striata* hemostatic sponge. **Methods** The Waters X Bridge™ Amide(3.5 μm, 2.1 mm×100 mm) column was used at 35℃; acetonitrile and 5 mmol/L ammonium acetate (containing 0.1% formic acid) (60:40, V/V) were used as the mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min, with the injection volume being 10 μL. **Results** The linear range for D-mannose was 50.0-5 000.0 ng/mL ($r=0.9995$). The results of intra-day and inter-day precisions, limit of detection and limit of quantitation were all within the normal ranges. The recovery rate ($n=5$) was 98.4%, RSD=1.03%. **Conclusion** The method in this study is simple, selective and sensitive; it can be used for the quantitative determination and quality control of *Bletilla striata* glucomannan.

[Key words] *Bletilla striata* glucomannan; liquid chromatography-mass spectrometry; *Bletilla*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(12):1401-1403]

战创伤救治是军事医学科学发展的重中之重,特别是现代战争和重大突发事件所导致的大面积群死群伤,无法控制的大出血是战伤和平时创伤死亡的主要原因。因此,研制一种能将平时创伤救治与战时急救相结合,具有显著止血效果、优良生物相容性以及降解能力的生物医用材料产品成为我们追求的目标。

白及为兰科植物白及属 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎,又名连及草、甘根,多年生草本植物,有收敛止血、清热利湿、消肿生肌之功效^[1],主要用于咳血吐血、外伤出血、疮疡肿

毒、皮肤皴裂、肺结核咳血、溃疡病出血^[2]。用白及制成的止血海绵其来源广泛,成本低廉,无免疫原性,对创面的黏附速度快,黏附牢度强,物理止血效果显著,其性能柔软,无须预处理即可使用,性价比高,可取代现有的明胶止血海绵^[3]。白及葡甘聚糖为白及经提取得到的一种高分子黏性多糖,为白及止血海绵的主要成分,现代研究表明其具有收敛止血、抑菌、促进伤口愈合、抗肿瘤等药理作用^[4-6]。

目前,白及葡甘聚糖的测定主要以比色法为主,此法只能测定白及中的总糖含量。由于糖类在紫外

[收稿日期] 2014-04-11 **[接受日期]** 2014-05-27

[基金项目] 南京军区“十一五”医药卫生科研基金(12MA020)。Supported by Fund from “11th Five-Year Plan” for Medical Research of PLA Nanjing Military Area Command (12MA020).

[作者简介] 王巍, 硕士, 副主任药师。E-mail: wwysrsh@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 010-66945194, E-mail: zhangxiaojie1008@sina.cn

没有吸收,需要衍生化后才能检测,较为复杂;蒸发光散射检测器作为一种质量检测器,虽可检测无紫外吸收的化合物,可进行梯度洗脱,在糖类分析领域应用广泛,但操作过程烦琐,灵敏度低,分析时间长^[7-9]。本研究首次建立了快速测定白及葡甘聚糖的 LC-MS/MS 方法^[10],与其他分析方法相比,该方法灵敏度高、检测限低、分析时间短,分析一个样品仅需 2 min,能快速而简便地测定白及止血海绵中白及葡甘聚糖含量。

1 材料和试剂

1.1 仪器及药品 Agilent 1200 液相色谱-Agilent 6410 型三重四极杆串联质谱仪(Agilent, 美国); Agilent 6410 B.01.03 定量处理软件;台式高速冷冻离心机(Eppendorf, 德国);十万分之一天平(Sartorius CPA225D, 德国);旋涡振荡混和器 WL-901 Vortex (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 试剂 D-甘露糖(批号:20130803)购于中国食品药品检定研究院;白及止血海绵为实验室自制(已申请专利);乙腈、醋酸铵和甲酸为色谱纯(Merck, 德国),三氟乙酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱分离条件 色谱柱为 Waters X Bridge™ Amide (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm),流动相为乙腈-5 mmol/L 醋酸铵(内含 0.1% 甲酸水溶液)=60:40,流速为 0.3 mL/min,柱温为 35℃。

2.2 质谱分离条件 采用 ESI 离子源,负离子检测,选择 MRM 工作方式进行一/二级质谱分析。用于定量分析的检测离子为:D-甘露糖 $[M^-H]^-$ m/z 179→ m/z 59.1 (图 1),干燥气流速为 10 L/min,干燥气温度为 350℃,雾化气压力为 40 psi (1 psi = 6 894.8 Pa),毛细管电压为 4 000 V。

2.3 溶液配制 精密称取 D-甘露糖 5.02 mg 置于 5.0 mL 的容量瓶中,用水溶解并定容,作为对照品储备液。精密称取白及止血海绵 10.03 mg 置 5.0 mL 的容量瓶中,加入 4 mL 的 10 mol/L 三氟乙酸,在 100℃ 水浴中水解 12 h,水解完成后,用水定容,再用旋转蒸发器蒸干,用水溶解并定容置 5.0 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,置 4℃ 冰箱保存备用。

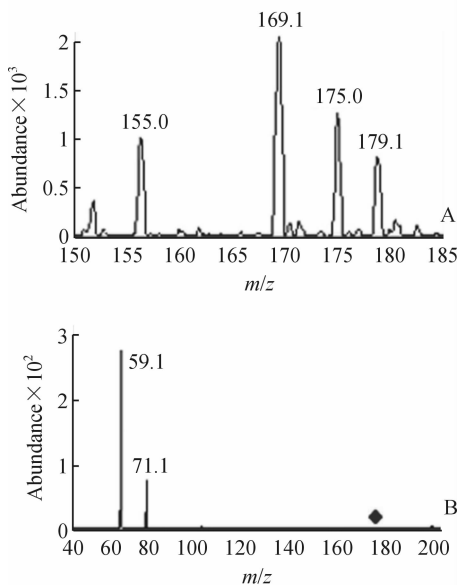


图 1 D-甘露糖的 ESI-MS 质谱图

A: D-甘露糖全扫描质谱图; B: D-甘露糖产物离子质谱图

2.4 方法学考察 在 2.1 项下色谱条件下白及峰形良好,保留时间为 1.2 min (图 2),样品中其他成分均不干扰白及的测定。

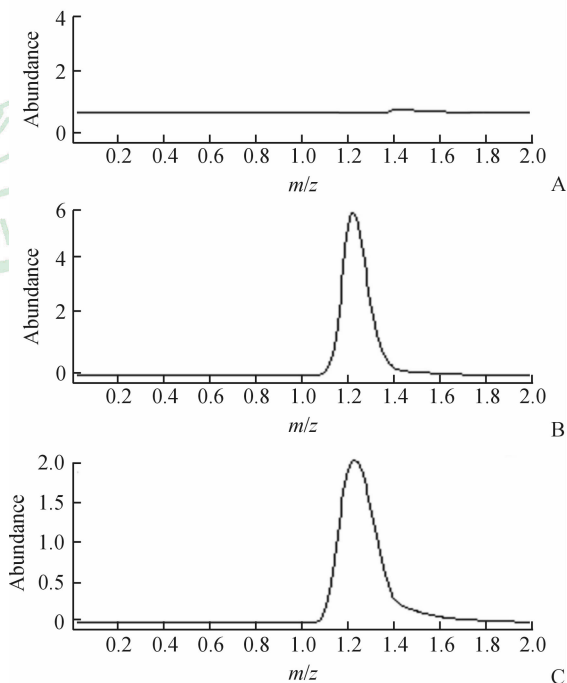


图 2 D-甘露糖的 MRM 质谱图

A: 空白溶剂; B: D-甘露糖标准品; C: 白及实测样品

精密吸取对照品储备液,分别配制浓度为 50.0、100.0、200.0、500.0、1 000.0、2 000.0 和 5 000.0 ng/mL 的对照品溶液,以对照品溶液的浓度(C, ng/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标作图,得甘露糖的线

性回归方程为: $Y=0.0027C+0.271$, $r=0.9995$ 。以3倍信噪比(S/N)计算,甘露糖的最低检出限为10.04 ng/mL。

取浓度为500.0 ng/mL的对照品溶液连续进样6次,记录色谱图,其日内精密度相对标准偏差(RSD)为0.46% ($n=6$)。取同一样品按2.3项下方法平行制备6份溶液,连续6d,每天进样1次,进行LC-MS/MS分析,测得甘露糖日间RSD为0.71% ($n=6$)。取已知含量的白及止血海绵溶液,向其加入对照品溶液,每组样品分别添加一定量的甘露糖对照品溶液,按所建立的方法进行处理和测定,计算加样回收率为 $(98.4 \pm 1.01)\%$, $RSD=1.03\%$ 。取同一份供试品溶液,分别放置0、2、4、6、8h后进样,进行稳定性考察。结果表明,在8h内甘露糖的峰面积无明显变化,RSD小于2.0%,说明供试品溶液在8h内稳定性良好。取三批白及止血海绵(批号:20130618,20130705,20130725)精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,每份样品制备3份,外标法计算3批白及止血海绵中白及甘聚糖的含量分别为 (179.1 ± 4.8) 、 (180.4 ± 3.6) 、 (181.7 ± 2.1) mg/mL。

3 讨论

3.1 实验方法的选择 对于白及中白及葡甘聚糖的含量测定方法2010版《中国药典》没有记载,目前多用比色法,但该方法不能测定单糖的含量。气相色谱和液相色谱都需要对样品进行复杂的衍生化后才能检测。高效液相-蒸发光散射法可用于检测无紫外吸收的化合物,但其受流动相组成的影响,灵敏度不够高,分析时间长。本研究采用LC-MS/MS法测定白及止血海绵中白及葡甘聚糖的含量,本法的灵敏能达到ng级,分析时间短,且方法简单、准确性好、重现性好,可为白及和白及止血海绵中白及葡甘聚糖的定量分析及质量评价提供依据。

3.2 色谱柱的选择 本实验选用不同厂家不同类型的色谱柱,如Agilent Zorbax C₁₈、Waters HILIC和Waters X Bridge™ Amide的色谱柱进行比较,最终选定X Bridge™ Amide色谱柱,因为它是基于杂化颗粒基质的酰胺基为填充剂的色谱柱,使用方便,结果良好,相对于氨基键合相的稳定性更高(柱流失减少),寿命更长。

3.3 温度和流速的优化 本实验温度对实验结果影响不大,柱温选择了35℃。分别考察了流速0.25、0.3、0.35 mL/min时对实验的影响,发现流速为0.3 mL/min时保留时间和峰形效果最好,因此选为最佳流速。

3.4 质谱条件的优化 本研究采用ESI负离子模式,对所测定的甘露糖电离条件进行优化, $[M-H]^-$ 峰容易生成有规律的碎片,便于质谱测定,经过优化电离和裂解条件并提高高能打拿极电压,最终可以满足甘露糖浓度的测定。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 韩丹,王艳萍,毕亚静,刘福强.白及多糖提取方法的优选及其理化性质研究[J].药学实践杂志,2013,31:35-37.
- [2] 雷震,常明泉,陈黎,徐旺.白及的临床应用研究进展[J].中国药师,2013,16:1240-1242.
- [3] 葛琴,刘同华,黄林清.中药白及作为血管栓塞剂及药物载体的研究概况[J].中国药房,2003,14:305-307.
- [4] 林福林,杨昌云,杨薇薇,黄美蓉,庞素秋.中药白及的现代研究概况[J].中国医院药学杂志,2013,33:571-573.
- [5] 张洁,张卫明,史劲松,孙达峰,朱昌玲.白及葡甘聚糖在医药中的研究进展[J].高分子通报,2010(9):52-57.
- [6] 赵艳霞,邓雁如,张晓静,陈芳.白及属药用植物化学成分及药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2013,25:1137-1145.
- [7] 彭芳,殷殷,张燕,刘江云,许琼明,李贺然,等.亲水作用色谱-蒸发光散射检测法测定白及葡甘聚糖的单糖含量[J].药物分析杂志,2010,30:2377-2380.
- [8] 杨兵勋,沈春香,王增,陈立钻,楼正家,吴人照,等.HPLC法测定铁皮石斛饮料中D-甘露糖的含量[J].食品科学,2011,32:275-277.
- [9] 洪涛.HPLC测定铁皮枫斗颗粒中甘露糖的含量[J].中国现代应用药学,2012,29:650-652.
- [10] Chen Y, Liu Q, Yong S, Lee T K. High accuracy analysis of glucose in human serum by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chim Acta,2012,413:808-813.