·中药工业·

UPLC-MS/MS 同时检测人参健脾丸和人参归脾丸中非法添加西洋参△

姚宝林[1]，王然然[1]，张淼[2]，韦晶晶[3]，尹贻珍[3]，韩慧琴[3*]
1. 承德市食品药品检验检测中心，河北　承德　067000；
2. 石家庄市食品药品检验中心，河北　石家庄　050011；
3. 张家口市食品药品检验中心，河北　张家口　075000

[摘要]　**目的：**建立一种可同时测定人参归脾丸和人参健脾丸中非法添加西洋参的超高效液相色谱串联质谱法（UPLC-MS/MS）检测方法。**方法：**用 80% 甲醇回流提取制备供试品溶液，使用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} 色谱柱（100 mm×2. 1 mm，1. 8 μm），乙腈-水为流动相进行梯度洗脱，流速为 0. 35 mL·min^{-1}，柱温为 40 ℃，采用电喷雾离子源、多反应监测模式、负离子方式进行扫描。**结果：**拟人参皂苷 F_{11} 在 5. 025~100. 500 ng·mL^{-1} 线性关系良好（r=0. 998 5），重复性 RSD 为 1. 4%，拟人参皂苷 F_{11} 在人参归脾丸和人参健脾丸中的回收率分别为 97. 71%、97. 64%，检出限为 1 ng·mL^{-1}，定量限为 3 ng·mL^{-1}。**结论：**建立的方法灵敏度高、实用性强，可作为人参归脾丸和人参健脾丸中非法投入西洋参的补充检验方法。

［关键词］　超高效液相色谱串联质谱法；人参健脾丸；人参归脾丸；西洋参；拟人参皂苷 F_{11}
［中图分类号］　R286　　［文献标识码］　A　　［文章编号］　1673-4890(2023)01-0150-07
doi：10. 13313/j. issn. 1673-4890. 20220127004

Simultaneous Determination of *Panax quinquefolium* Illegally Added in Renshen Jianpi Pills and Renshen Guipi Pills by UPLC-MS/MS

YAO Bao-lin[1], WANG Ran-ran[1], ZHANG Miao[2], WEI Jing-jing[3], YIN Yi-zhen[3], HAN Hui-qin[3*]
1. *Chengde City Institute for Food and Drug Control*, *Chengde* 067000, *China*;
2. *Shijiazhuang Institute for Food and Drug Control*, *Shijiazhuang* 050011, *China*;
3. *Zhangjiakou City Institute for Food and Drug Control*, *Zhangjiakou* 075000, *China*

[**Abstract**]　**Objective**: To establish a UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of *Panax quinquefolium* illegally added in Renshen Jianpi Pills and Renshen Guipi Pills. **Methods**: The chromatographic separation was performed on Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) with acetonitrile and water as the mobile phases for gradient elution at a flow rate of 0.35 mL·min^{-1}. The column temperature was 40 ℃, and the scanning was performed using electrospray ionization (ESI) source in multiple reaction monitoring (MRM) mode and negative ion mode. **Results**: Pseudo-ginsenoside F_{11} showed a good linearity in the concentration range of 5.025-100.500 ng·mL^{-1} (r=0.998 5), and the relative standard deviation (RSD) of the repeatability test was 1.4%. The average recovery of pseudo-ginsenoside F_{11} was 97.71% in Renshen Guipi Pills and 97.64% in Renshen Jianpi Pills. The detection limit and the quantification limit was 1 ng·mL^{-1}and 3 ng·mL^{-1}, respectively. **Conclusion**: The established method was highly sensitive and practical, and could be used as a supplementary test method for the illegal input of *P. quinquefolium* in Renshen Guipi Pills and Renshen Jianpi Pills.

[**Keywords**]　UPLC-MS/MS; Renshen Jianpi Pills; Renshen Guipi Pills; *Panax quinquefolium*; pseudo-ginsenoside F_{11}

人参健脾丸由人参、麸炒白术、茯苓、山药、陈皮、木香、砂仁、炙黄芪、当归、炒酸枣仁、制远志 11 味中药组成，收载于《中华人民共和国药典》2020 年版（一部）[1]，主治脾胃虚弱、运化失

△［基金项目］　张家口市重点研发计划项目（2121037D）
*［通信作者］　韩慧琴，副主任中药师，研究方向：中药质量标准；E-mail：2205006550@qq.com

司、升降不调之食欲不振、泄泻、痞积。人参健脾丸方中人参、白术有健脾益气的作用，为君药，起主要治疗作用。人参归脾丸来源于《济生方》，收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂》第四册[2]，由人参、麸炒白术、茯苓、蜜炙甘草、蜜炙黄芪、当归、木香、炙远志、龙眼肉、炒酸枣仁10味中药组成，益气补血、健脾养心。人参归脾丸方中人参为君药，起主要的治疗作用。

中成药中有用西洋参代替人参投料的情况，人参具有大补元气、强心固脱、补脾益肺、安神生津的功效，而西洋参苦寒清泄、甘寒凉补，入心、肺、肾经，为寒补之品[3]。人参为临床常用的贵细中药，入药部位为根及根茎，是1味古老的名贵中药，在中国已有几千年的药用历史[4]，主要分布在中国东北部的长白山区。西洋参原产于加拿大和美国等地，现主要在我国山东、东北等地区栽培[5-6]。君药人参一旦被替代，则功能主治将会改变，患者服用后药不对症，影响疗效甚至会起到反作用，加重病情，影响用药安全，风险很大。人参健脾丸和人参归脾丸都是常用药，因此本研究对这2种药中非法添加西洋参的情况进行研究，建立有效的检验检测方法。从化学成分看，西洋参的特征性成分拟人参皂苷F_{11}未在人参中发现，人参的特征性成分人参皂苷Rf亦未在西洋参中发现[7-11]。随着现代分析技术的发展，超高效液相色谱串联质谱法（UPLC-MS/MS）以快速、简便、专属性强等优势在中药分析中得到广泛应用[12-13]。因此，笔者参考文献[14]，采用UPLC-MS/MS建立人参健脾丸和人参归脾丸中拟人参皂苷F_{11}的检测方法，提高了方法的灵敏度与专属性，可为人参健脾丸和人参归脾丸的质量控制提供参考。

1　材料

1.1　仪器

UPLC-API5500型三重四极杆质谱联用仪（美国Applied Biosystems公司）；AUW120D型电子天平（日本岛津公司）；HK-UP-Ⅲ-20型超纯水仪（成都浩康科技有限公司）。

1.2　试药

对照品拟人参皂苷F_{11}（批号：110841-202108，纯度：99.5%）、人参对照药材（批号：120917-201712）、西洋参对照药材（批号：120997-201810）均购于中国食品药品检定研究院；5批人参归脾丸样品购自药店[企业A（水蜜丸），批号分别为190815、200506；企业B（大蜜丸），批号分别为201126、200405；企业C（水蜜丸），批号：21009218]；5批人参健脾丸样品购自药店[企业D（小蜜丸），批号分别为20112822、21081610；企业E（大蜜丸），批号分别为201013、210701；企业F（大蜜丸），批号：21010249]；甲醇和乙腈均为色谱纯；水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18}色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；乙腈（A）-水（B）流动相梯度洗脱（0~2.0 min，80%~50%B；2.0~4.5 min，50%~20%B）；柱温为38 ℃；流速为0.35 mL·min^{-1}；进样量为5 μL。

2.2　质谱条件

离子源为电喷雾离子源（ESI）；扫描方式为负离子扫描，多反应监测（MRM）模式，毛细管电压为3.0 kV，锥孔电压为20 V，定量离子对m/z为799.50→653.50（碰撞能量电压为30 V），定性离子对m/z为799.50→491.60（碰撞能量电压为35 V）。辅助气为氮气（N_2），离子源温度为500 ℃，离子喷雾电压为－4500 V，雾化气（GAS1）压力为344.5 kPa、辅助气（GAS2）压力为310.05 kPa。

2.3　溶液的制备

2.3.1　对照品溶液的制备　取对照品拟人参皂苷F_{11} 0.010 05 g，置于100 mL量瓶中，用甲醇溶解定容，摇匀，制成质量浓度为100.5 μg·mL^{-1}的溶液。精密吸取溶液200 μL置100 mL量瓶中，用20%乙腈水溶液稀释至刻度，制成质量浓度为201 ng·mL^{-1}的溶液，即得。

2.3.2　供试品溶液的制备　分别取人参归脾丸和人参健脾丸样品适量，大蜜丸和小蜜丸剪碎，水蜜丸研细，称取约2.0 g，置回流瓶中，精密加入80%甲醇25 mL，回流80 min，取出，放冷，用80%甲醇补足质量，摇匀；再精密量取续滤液500 μL，置100 mL量瓶中，以20%乙腈水溶液稀释并定容至刻度，经0.22 μm有机膜滤过，即得。并自制未添加西洋

参的人参健脾丸和人参归脾丸的阴性样品溶液。

2.3.3 西洋参对照溶液的制备 称取西洋参对照药材约1.0 g，置50 mL回流瓶中，精密加入80%甲醇25 mL，按**2.3.2**项下方法制备，即得。

2.3.4 人参对照溶液的制备 称取人参对照药材约1.0 g，置50 mL回流瓶中，精密加入80%甲醇25 mL，按**2.3.2**项下方法制备，即得。

2.3.5 阴性样品溶液的制备 取**2.3.2**项下阴性样品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 精密量取**2.3**项下的各溶液适量，按**2.1**和**2.2**项下的方法检测分析。结果西洋参特征性成分拟人参皂苷F_{11}峰形良好，人参中未出现，人参归脾丸和人参健脾丸中其他成分不干扰拟人参皂苷F_{11}的检出，专属性好（图1）。

2.4.2 基质效应对检测灵敏度的影响 基质效应是被测定试样中除被测物以外的其他组分对待测组分的检测所造成的干扰，UPLC-MS/MS的基质干扰更容易发生[15-16]。因此，采用UPLC-MS/MS分析样品时，需要验证基质效应的影响，从而保证数据的准确。通常通过优化检测条件和提取方法、添加内标等可消除基质效应。实验表明，待测样品在进行多倍稀释后，可有效减少基质效应[17]。本研究将样品稀释5000倍后可很好地避免基质效应的干扰。人参归脾丸和人参健脾丸中除了含人参外，还含有其他中药，因此，分别以相应质量浓度的人参提取液、人参归脾丸提取液和人参健脾丸提取液为基质，配制对照品溶液，与以20%乙腈水溶液为溶剂配制的对照品溶液进行比较（图2）。20%乙腈水溶液、人参基质溶液、人参归脾丸基质溶液和人参健脾丸基质溶液的峰面积分别为7792、7804、7787、7769，峰面积的RSD为0.2%。表明人参基质、人参归脾丸基质和人参健脾丸基质对待测成分的抑制效应较小，故可不考虑基质效应的影响。

2.4.3 线性关系考察 取**2.3.1**项下的对照品储备液（质量浓度为201 ng·mL^{-1}），分别稀释成质量浓度为5.025、10.050、20.100、25.125、50.250、100.500 ng·mL^{-1}的系列对照品溶液，设置自动进样体积为5 μL，分别注入UPLC-MS/MS仪，按**2.1**项下色谱条件和**2.2**项下质谱条件进样测定，以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积值为纵坐标（Y），得回归方程：Y=323.711 74X - 717.164 52（r=0.998 5）。拟人参皂苷F_{11}在5.025~100.500 ng·mL^{-1}与峰面积线性关系良好。

2.4.4 检出限与定量限测定结果 分别取未添加西洋参的人参归脾丸和人参健脾丸样品溶液2份，分别加入适量对照品溶液。以信噪比（S/N）为3时对应的值为检出下限，计算检出限为1 ng·mL^{-1}；以S/N为10时对应的值为定量限，计算定量限为3 ng·mL^{-1}。

2.4.5 重复性试验 分别取添加西洋参的人参归脾丸（批号：201126）和人参健脾丸样（批号：20112822）适量，研细，分别称取1.0、2.0、3.0 g各3份，置回流瓶中，分别按**2.3.2**、**2.1**和**2.2**项下方法及条件进样测定，计算拟人参皂苷F_{11}含量的RSD，结果人参归脾丸和人参健脾丸样品中拟人参皂苷F_{11}含量的RSD分别为1.7%、1.8%，说明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 分别取添加西洋参的人参归脾丸（批号：201126）和人参健脾丸样品（批号：20112822）适量，研细，取1.0 g，共9份，精密称定，每3份1组，分别加入**2.3.1**项下质量浓度为100.5 μg·mL^{-1}的对照品溶液200、260、300 μL，再分别加入80%甲醇25 mL，分别按**2.3.2**、**2.1**和**2.2**项下方法及条件进样测定，计算回收率。结果表明回收率良好（表1）。

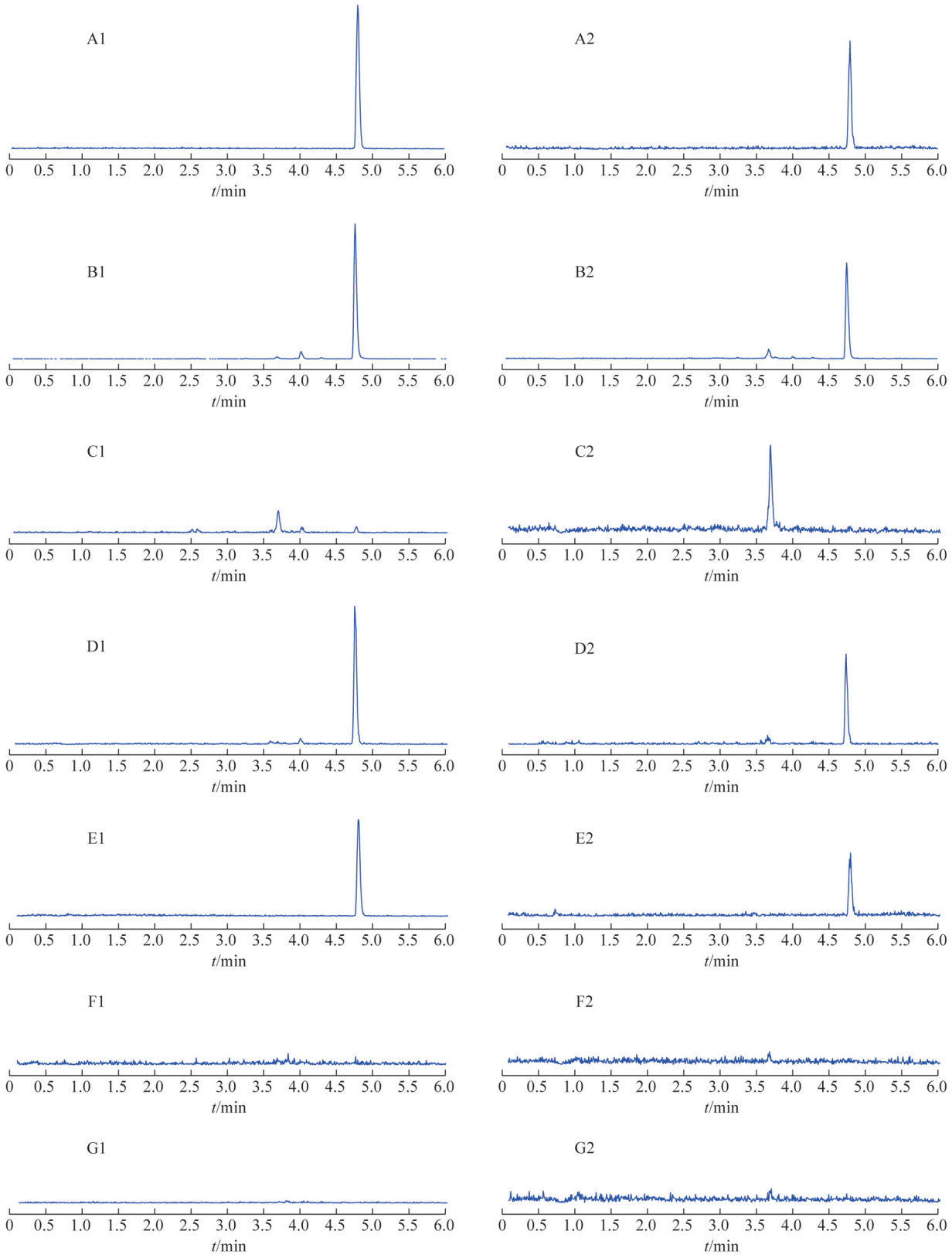
2.5 样品测定结果

按照上述的方法对收集到的5批人参归脾丸和5批人参健脾丸进行检验，其中检出拟人参皂苷F_{11}的人参归脾丸有1批，人参健脾丸有2批，表明掺有西洋参，笔者亦对人参归脾丸和人参健脾丸中人参所含特有成分人参皂苷Rf的含量进行测定，进一步佐证该方法的可靠性（表2）。

3 讨论

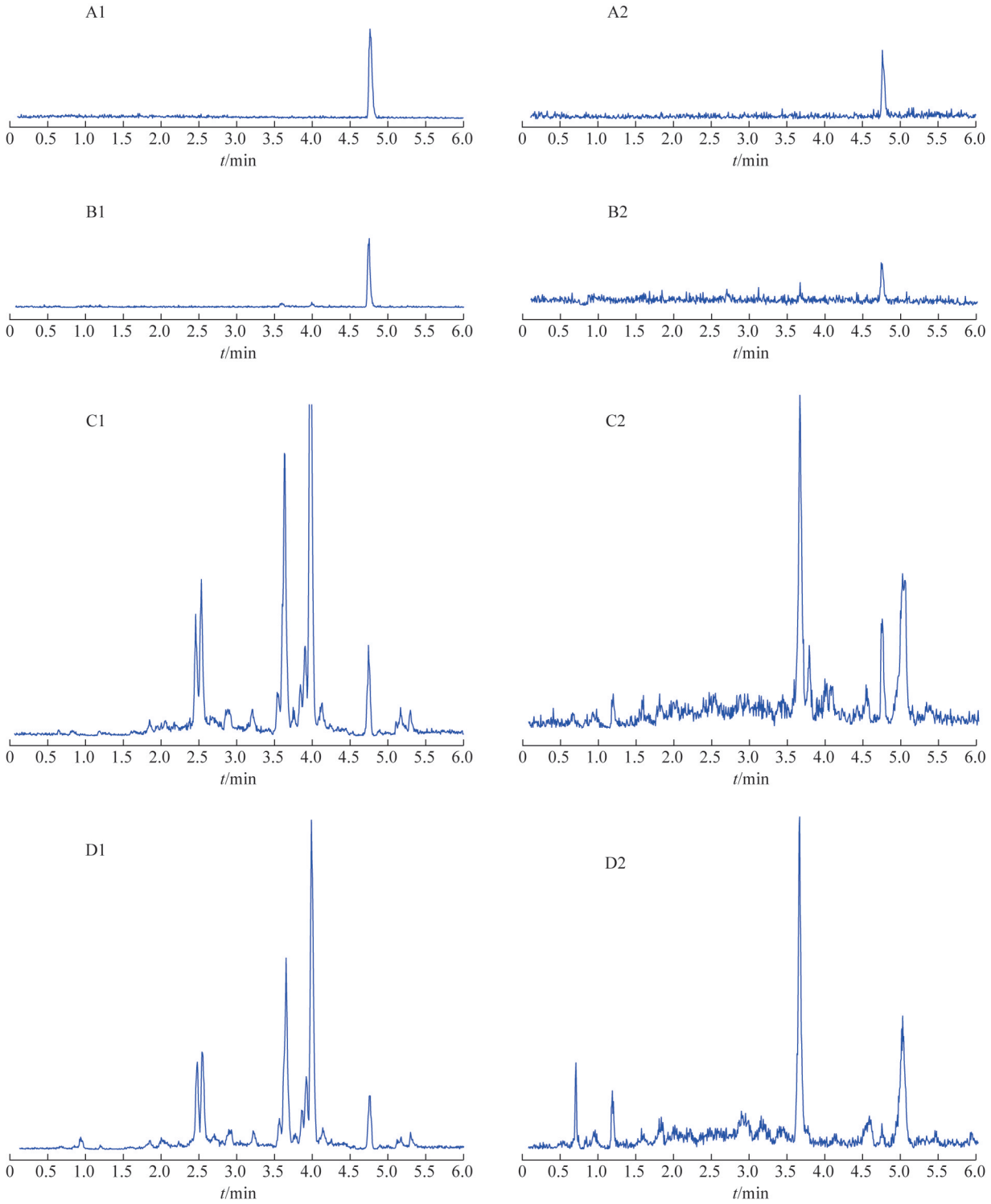
3.1 检测成分及检测方法的选择

市面上西洋参主要以饮片及保健品的形式销售，中成药的处方中很少含有西洋参。人参作为中药中的上品，被历代医家所重用，现代很多中成药含有人参。西洋参中皂苷的总量是人参中的4倍，而西洋参在加工成饮片的过程中会产生很多的下脚料和品相差的废料，个别企业可能将西洋参下脚料和劣质西洋参等冒充人参投料。由于拟人参皂苷F_{11}无紫外吸收[17]，采用蒸发光检测器测定干扰较多、灵敏度低，



注：图中 A1、B1、C1、D1、E1、F1、G1 为定量离子对 *m/z*（799. 50/653. 50）质谱图；A2、B2、C2、D2、E2、F2、G2 为定性离子对 *m/z*（799. 50/491. 60）质谱图；A. 拟人参皂苷 F_{11} 对照品；B. 西洋参对照药材；C. 人参对照药材；D. 添加西洋参的人参归脾丸；E. 添加西洋参的人参健脾丸；F. 未添加西洋参的人参归脾丸；G. 未添加西洋参的人参健脾丸。

图 1　人参健脾丸和人参归脾丸中非法添加西洋参的专属试验的 UPLC-MS/MS 二级离子流图



注：图中A1、B1、C1、D1为拟人参皂苷F_{11}定量离子对*m/z*（799. 50/653. 50）；A2、B2、C2、D2为拟人参皂苷F_{11}定性离子对*m/z*（799. 50/491. 60）；A. 20%乙腈；B. 人参；C. 人参归脾丸；D. 人参健脾丸。

图2　人参健脾丸和人参归脾丸中非法添加西洋参的UPLC-MS/MS基质效应色谱图

测定效果欠佳，故选择了分离能力强、定性分析结果可靠、检测限低、分析时间快、自动化程度高的UPLC-MS/MS进行测定，实现了对复杂混合物更准确的定量和定性分析。

3. 2　电离模式的选择

人参皂苷类化合物绝大多数属于四环三萜类，其母核上有羟基、甲基等不同的取代基，在前期摸索拟人参皂苷F_{11}的UPLC-MS/MS检测条件时选用ESI^+

表 1　人参归脾丸和人参健脾丸样品中人参皂苷 F_{11} 加样回收率试验

样品名称	取样量/g	样品中含量/μg	对照品加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
人参归脾丸	1.003 6	26.77	20.10	46.51	98.21	97.71	0.84
	0.999 8	26.67	20.10	46.23	97.31		
	1.001 2	26.71	20.10	46.43	98.11		
	1.002 2	26.74	26.13	51.99	96.63		
	1.000 5	26.69	26.13	52.01	96.90		
	1.003 2	26.77	26.13	52.19	97.28		
	1.003 0	26.76	30.15	56.08	97.25		
	1.000 9	26.70	30.15	56.45	98.67		
	1.001 8	26.73	30.15	56.58	99.00		
人参健脾丸	1.002 1	41.07	30.15	69.91	95.66	97.64	1.21
	0.999 1	40.94	30.15	70.00	96.38		
	0.999 5	40.96	30.15	70.20	96.98		
	1.002 0	41.06	40.20	80.14	97.21		
	1.004 1	41.15	40.20	80.71	98.41		
	1.005 2	41.19	40.20	80.64	98.13		
	1.003 8	41.14	50.25	91.09	99.40		
	1.002 4	41.08	50.25	90.27	97.89		
	1.002 8	41.09	50.25	90.67	98.67		

表 2　人参归脾丸和人参健脾丸样品测定结果（n=3）

$\mu g \cdot g^{-1}$

样品名称	生产厂家	批号	拟人参皂苷 F_{11} 质量分数	人参皂苷 Rf 质量分数
人参归脾丸	A	190815	26.68	3.85
	A	200506	—	23.56
	B	201126	—	27.87
	B	200405	—	26.54
	C	21009218	—	26.43
人参健脾丸	D	20112822	40.98	8.32
	D	21081610	36.52	6.65
	E	201013	—	43.23
	E	210701	—	42.87
	F	21010249	—	38.97

注：—表示未检出。

与 ESI^- 分别进行扫描，结果 ESI^+ 同时出现了 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰，导致二级质谱分析时母离子的浓度降低，灵敏度较差。本研究发现，形成的 $[M+Na]^+$ 峰信号不稳定，$[M+H]^+$ 峰信号较弱，无法用于样品的检测。改用负离子检测模式后，可以形成 $[M-H]^-$ 峰且信号响应稳定，因此选用 ESI^- 作为离子化模式。对母离子 $[M-H]^-$ 准分子离子峰进行碰撞诱导解离，以获得 2 次碎裂产生的子离子，分别选择离子丰度高、基线噪声低的离子对作为定性离子对，选择离子丰度最高的离子对作为定量离子对，在此基础上对碰撞能量与锥孔电压进行优化。

3.3　质谱参数的优化

研究中笔者发现拟人参皂苷 F_{11} 的母离子响应值较低，因此不仅按常规的思路优化去簇电压和碰撞能量，对其他参数包括离子源温度、电压、GAS1、GAS2、碰撞气、碰撞室出口电压等都进行优化，使得响应值达到最高。

3.4　样品测定结果分析

对收集到的 5 批人参、5 批人参归脾丸和 5 批人参健脾丸样品中人参皂苷 Rf 的含量进行测定，结果显示，人参皂苷 Rf 的含量测定结果低的样品中均检出了拟人参皂苷 F_{11}，且含量较高，表明添加了西洋参。

3.5　讨论

分别对甲醇、50% 甲醇、80% 甲醇、乙醇、50% 乙醇和 80% 乙醇 6 种提取溶剂进行考察，结果 80% 甲醇提取效率最高，故选择 80% 甲醇作为提取溶剂。供试品溶液制备过程中采用 20% 乙腈-水进行稀释，可以很好地避免溶剂效应，从而得到好的色谱峰。提取方法考察了超声波提取和回流提取 2 种方法，结果回流提取法的提取率大于超声波的提取率，故选择回流提取法进行提取。

4　结论

本研究所建立的方法简便、快速、准确、灵敏度高，被测成分色谱峰峰形良好、分离度好、相互之间无干扰，可作为人参归脾丸和人参健脾丸中非法添加西洋参的质量控制方法，从安全性方面可以有效地对法定标准检验的项目进行补充。

参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:491-492.

[2]　中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂:第4册[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:6.

[3]　赵振霞,王晓蕾,雷蓉,等. UPLC-MS/MS检测乌鸡白凤丸中非法添加西洋参[J]. 中国现代应用药学,2020,37(4):420-424.

[4]　胡世林. 古代人参名实考[J]. 中国医药学报,1987,2(4):42-43.

[5]　刘立鹏. 西洋参HPLC质量控制方法的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2009.

[6]　YU C H, WANG C Z, ZHOU C J, et al. Adulteration and cultivation region identification of American ginseng using HPLC coupled with multivariate analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 99: 8-15.

[7]　刘永利,雷蓉,王晓蕾,等. 基于中药质量标志物的人参、西洋参、三七及相关中成药质量控制方法研究[J]. 中国药学杂志,2019,54(17):1402-1410.

[8]　黎阳,张铁军,刘素香,等. 人参化学成分和药理研究进展[J]. 中草药,2009,40(1):164-166.

[9]　陈莉莉,崔宁. 西洋参化学成分研究进展[J]. 时珍国医国药,2002,13(10):632-633.

[10]　李向高,张连学,孟祥颖,等. 西洋参特有成分:拟人参皂苷F_{11}的分离、鉴定与含量测定[J]. 吉林农业大学学报,2005,27(6):645-648.

[11]　鲁静,汤俊. 应用HPLC/ELSD法测定西洋参中拟人参皂苷F_{11}的含量[J]. 药物分析杂志,1999,19(4):241-243.

[12]　方雪其,黄朝辉. UPLC-MS/MS测定复方甘草口服溶液中4种生物碱含量[J]. 中国现代应用药学,2015,32(9):1127-1130.

[13]　王胜男,华愉教,邹立思,等. QTRAP-UPLC-MS/MS同时测定玄参不同产地及商品药材中10种核苷类成分的含量[J]. 中国新药杂志,2016,25(2):232-237.

[14]　赵瑛,谢海龙,王冬雪,等. 西洋参中8种人参皂苷类成分的UPLC-MS/MS定量分析[J]. 天然产物研究与开发,2017,29(9):1529-1534.

[15]　刘晓云,陈笑艳,钟大放. 液相色谱-串联质谱生物分析方法的基质效应和对策[J]. 质谱学报,2017,38(4):388-399.

[16]　张建平,黄朝章,余志强,等. 超高效液相色谱串联质谱法测定烟草中的噁霉灵残留[J]. 中国烟草科学,2020,41(4):66-71.

[17]　王小乔,邱国玉,杨志敏,等. 液质联用高通量检测技术基质效应评价与消除[J]. 现代食品,2020,17(12):44-46.

（收稿日期：2022-01-27　编辑：王笑辉）