

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)08-0071-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.08.017



参麦颗粒中红参掺伪研究*

雷 蓉¹, 刘亚茹^{1,2}, 王晓蕾¹, 刘永利^{1△}

(1. 河北省药品医疗器械检验研究院·河北省中药质量评价与标准研究重点实验室, 河北 石家庄 050227;
2. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立参麦颗粒中红参掺伪的检查方法。方法 采用固相萃取-超高效液相色谱串联质谱(SPE-UPLC-MS/MS)法, 色谱柱为 Shimadzu Shim-pack GIST C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 2 μm), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为 0.35 mL/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 5 μL。电喷雾离子源、负离子模式(ESI⁻), 多反应监测(MRM)模式。结果 拟人参皂苷 F₁₁ 质量浓度在 9.030~344.0 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 2, n=5$), 检测限和定量限分别为 1.128 8, 22.8 ng/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 4.0%; 平均加样回收率为 108.17%, RSD 为 4.24% ($n=6$)。以 0.051 μg/g 为掺伪判定限度, 3 家企业的 85 批样品中有 9 批超出限度(检出率为 10.59%)。结论 所建立的方法简便快速、准确度高、专属性强, 可作为参麦颗粒中红参掺伪的检查方法。

关键词: 参麦颗粒; 红参; 西洋参; 掺伪; 拟人参皂苷 F₁₁; 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法

Study on the Adulteration of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra in Shenmai Granules

LEI Rong¹, LIU Yaru^{1,2}, WANG Xiaolei¹, LIU Yongli¹

(1. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control · Hebei Key Laboratory of Quality Evaluation and Standard of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei, China 050227; 2. Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050017)

Abstract: Objective To establish a method for adulteration detection of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra in Shenmai Granules. **Methods** The solid-phase extraction ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (SPE-UPLC-MS/MS) was adopted. The chromatographic column was Shimadzu Shim-pack GIST C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 2 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (gradient elution), the flow rate was 0.35 mL/min, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 μL. Multiple reaction monitoring (MRM) was adopted with electrospray negative ion source (ESI⁻). **Results** The linear range of pseudoginsenoside F₁₁ was 9.030-344.0 ng/mL ($r=0.999\ 2, n=5$). The limit of detection and the limit of quantitation was 1.128 8, 22.8 ng/mL respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 4.0%. The average recovery rate of pseudoginsenoside F₁₁ was 108.17%, with the RSD of 4.24% ($n=6$). Taking 0.051 μg/g as the determination limit for adulteration, the concentration of pseudoginsenoside F₁₁ in nine out of eighty-five batches of samples from three enterprises was over the limit, with the detection rate of 10.59%. **Conclusion** The established method is simple, fast, accurate and specific, which can be used for adulteration detection of Ginseng Radix et Rhizoma Rubra in Shenmai Granules.

Key words: Shenmai Granules; Ginseng Radix et Rhizoma Rubra; Panax Quinquefolii Radix; adulteration; pseudoginsenoside F₁₁; solid-phase extraction ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

参麦颗粒由红参、南沙参、麦冬、黄精、山药、枸杞子等中药组方, 具有养阴生津功效, 主要用于治疗面黄肌瘦、津少口渴、腰膝酸软、食欲不振、头晕眼花、心悸气短、神经衰弱等症^[1]。方中红参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的栽培品经蒸制后的干燥根和根茎, 具有大补元气、复脉固脱、益气摄血等功效。西洋参为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根, 具有补气养阴、清热生津等功效, 原产于加拿大、美国等北美地区, 现主要栽培于我国山东、东北等地^[1-2]。人参、西洋参主要含皂苷类成分, 但两者所含皂苷种类与含量及比例有一定差异, 特别是拟人参皂苷 F₁₁, 其

在西洋参中含量较高, 而人参中基本不含, 因此以其作为判断非法添加的依据^[3-9]。近年来, 西洋参冒充人参或西洋参掺入人参进行含人参制剂投料生产屡有发生, 而乌鸡白凤丸、消糜栓、人参养荣丸(大蜜丸、小蜜丸、水蜜丸)中拟人参皂苷 F₁₁ 检查项补充检验方法也相继颁布, 用于西洋参掺伪人参投料的监督检验。考虑到红参是由人参经蒸制所得, 为进一步筛查红参中是否存在西洋参掺伪的投料情况, 本研究中结合参麦颗粒中红参用量少(仅 0.2%)、辅料蔗糖用量大(占 92%)、基质效应复杂的处方特点, 建立了固相萃取(SPE)^[10-19]-超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法检查制

*基金项目: 中国药品监管科学行动计划第二批重点项目[NMPAJGKX-2023-024]; 河北省重点研发计划项目[21372502D]。

第一作者: 雷蓉, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为中药质量控制, (电子信箱) honaaa@126.com。

△通信作者: 刘永利, 男, 硕士, 主任药师, 研究方向为中药质量评价与标准, (电子信箱) liuyongli2008@126.com。

剂中是否含有拟人参皂苷 F_{11} ,为其中红参的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

AB SCIEX Triple Quad 6500 + 高效液相色谱 - 质谱联用仪(配置SCIEX OS软件、电喷雾离子源,美国AB SCIEX公司);XPE26型电子天平、XS105DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度分别为0.001 mg和0.01 mg);KQ - 500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli - Q超纯水制备系统(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

参麦颗粒(厂家A,B,C,编号分别为S1 - S28,S29 - S51,S52 - S85;为2022年国家药品抽检样品);拟人参皂苷 F_{11} 对照品(中国食品药品检定研究院,批号为110841 - 201406,含量测定用);甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,水为超纯水。红参、西洋参药材均购自河北安国中药材市场,经河北省医疗器械检验研究院段吉平主任药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Shimadzu Shim - pack GIST C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm,2 μ m);流动相为乙腈(A) - 水(B),梯度洗脱(0 ~ 2 min时20%A $\rightarrow$ 50%A,2 ~ 4.5 min时50%A $\rightarrow$ 80%A);流速为0.35 mL/min;柱温为40 $^{\circ}$ C;进样量为5 μ L。

质谱条件:电喷雾离子源、负离子模式(ESI $^{-}$),多反应监测(MRM)模式;电喷雾电压5 500 V;离子源温度500 $^{\circ}$ C;气帘气(CUR)压15.0 psi;碰撞气(CAD)压

10.0 psi;雾化气(氮气)压50.0 psi;辅助气压50.0 psi;射入电压(EP)10 V;射出电压(CXP)15 V。拟人参皂苷 F_{11} 的母离子 m/z 799.6,子离子 m/z 653.7(定量离子), m/z 491.6(定性离子),去簇电压(V) - 20 V,碰撞能量 - 50 V。

2.2 溶液制备

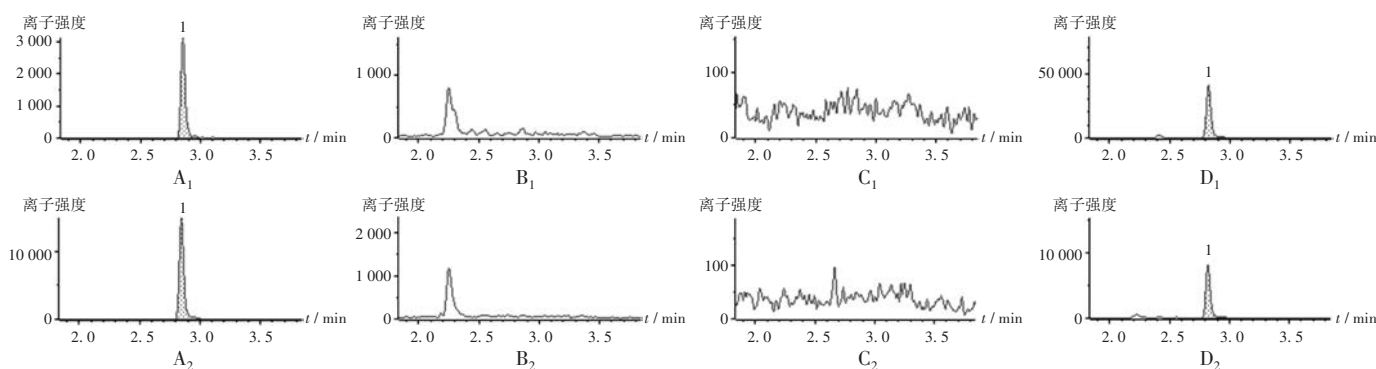
对照品溶液:取拟人参皂苷 F_{11} 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含拟人参皂苷 F_{11} 10 ng的溶液,即得。

供试品溶液:取样品细粉约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入20 mL水,密塞,超声(功率700 W,频率80 kHz)处理30 min,取出,冷却至室温,滤过,取续滤液10 mL,经 C_{18} 固相萃取小柱(500 mg,容量为6 mL,预先用甲醇、水各6 mL洗脱)层析,用水15 mL洗脱,放置5 min,继续用甲醇15 mL洗脱;收集洗脱液,置蒸发皿中蒸干,残渣加甲醇溶解,置5 mL容量瓶中,加甲醇稀释并定容,经0.22 μ m滤膜滤过,取续滤液,即得。

参比溶液、阴性对照品溶液和阳性对照品溶液:按参麦颗粒处方工艺及比例制得参比样品,缺红参的阴性样品,以及将红参换为西洋参的阳性样品,按供试品溶液制备方法分别制备参比溶液、阴性对照品溶液和阳性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性考察:分别取2.2项下对照品溶液、参比溶液、阴性对照品溶液、阳性对照品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录图谱。结果显示,除阳性对照品溶液外,阴性对照品溶液和参比溶液均未检出拟人参皂苷 F_{11} ,说明参麦颗粒中其他药味对测定无干扰,表明方法的专属性良好。详见图1。



1. 拟人参皂苷 F_{11}

$A_1 - D_1. m/z$ 799.6 $\rightarrow$ 653.7 $A_2 - D_2. m/z$ 799.6 $\rightarrow$ 491.6

A_1, A_2 . 对照品溶液 B_1, B_2 . 阴性对照品溶液 C_1, C_2 . 参比溶液 D_1, D_2 . 阳性对照品溶液

图1 MRM图

1. Pseudoginsenoside F_{11}

$A_1 - D_1. m/z$ 799.6 $\rightarrow$ 653.7 $A_2 - D_2. m/z$ 799.6 $\rightarrow$ 491.6

A_1, A_2 . Reference solution of pseudoginsenoside F_{11} B_1, B_2 . Negative reference solution of Shenmai Granules C_1, C_2 . Reference solution Negative reference solution of Shenmai Granules D_1, D_2 . Positive reference solution of Shenmai Granules

Fig. 1 MRM diagrams

线性关系考察:取拟人参皂苷 F_{11} 对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为344.0, 103.2, 51.60, 25.80, 9.030 ng/mL系列对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录离子强度,以待测成分质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、离子强度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_1 = 916.18 X_1 + 6193.91 (r = 0.9992, n = 5)$ 。结果表明,拟人参皂苷 F_{11} 质量浓度在9.030~344.0 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好。

基质效应考察:取2.2项下参比溶液(为基质),配制质量浓度为68.80 ng/mL的对照品溶液,并取2.2项下对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果表明,以参比溶液为基质对照品溶液的峰面积(14346.9→3090.4)较以甲醇为基质的峰面积(75026.3→12035.1)明显降低,基质效应明显,故以参比溶液为基质制备系列对照品溶液(待测成分质量浓度分别为344.0, 103.2, 51.60, 25.80, 9.030 ng/mL),按2.1项下试验条件进样测定,记录离子强度,以待测成分质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、离子强度(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y_2 = 160.91 X_2 + 1354.05 (r = 0.9993, n = 5)$ 。结果表明,拟人参皂苷 F_{11} 质量浓度在9.030~344.0 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限考察:取“基质效应”项下以参比溶液为基质的对照品溶液适量,逐步稀释,并按2.1项下试验条件进样测定,对离子强度相对较低的定性离子对进行检测,以信噪比(S/N)为3和10时待测成分质量浓度分别作为检测限和定量限,结果分别为1.1288 ng/mL和22.8 ng/mL。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录离子强度。结果拟人参皂苷 F_{11} 峰面积的 RSD 为1.94%($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(编号S55)适量,分别于室温下放置0, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录离子强度。结果拟人参皂苷 F_{11} 峰面积的 RSD 为1.32%($n = 5$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取同一样品(编号S55)适量,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录离子强度,带入上述基质效应线性方程,计算含量。结果拟人参皂苷 F_{11} 含量为312.05 ng/g, RSD 为3.61%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一供试品溶液(编号S55)约1.0 g,共6份,精密称定,分别加入一定量的对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录离子强度,带入上述基质效应线性

表1 加样回收试验结果($n = 6$)

Tab.1 Results of the recovery test ($n = 6$)

取样量(g)	样品含量(ng)	加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	$\bar{X}$ (ng/g)	RSD (%)
1.1470	357.92	275.2	645.31	104.43	108.17	4.24
1.0036	313.17	275.2	610.81	108.15		
1.1654	363.66	275.2	677.05	113.88		
1.0264	320.29	275.2	599.22	101.36		
1.1350	354.18	275.2	656.83	109.98		
1.1122	347.06	275.2	653.16	111.23		

方程计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取各批样品适量,均平行3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录离子强度,并计算样品含量,结果见表2(其中, - 为低于检测限)。

表2 样品含量测定结果($\mu\text{g/g}$, $n = 3$)

Tab.2 Results of the content determination of pseudoginsenoside F_{11} in samples ($\mu\text{g/g}$, $n = 3$)

编号	拟人参皂苷 F_{11}	编号	拟人参皂苷 F_{11}	编号	拟人参皂苷 F_{11}	编号	拟人参皂苷 F_{11}
S1	-	S23	-	S45	0.0085	S67	0.0553 [*]
S2	-	S24	-	S46	0.0151	S68	0.0502
S3	-	S25	-	S47	0.0372	S69	0.0359
S4	0.0092	S26	-	S48	0.0502	S70	0.0504
S5	0.0199	S27	-	S49	0.0315	S71	0.0279
S6	-	S28	-	S50	0.0501	S72	0.0574
S7	-	S29	-	S51	0.0162	S73	0.0509
S8	0.0209	S30	0.0153	S52	0.0474	S74	0.0359
S9	-	S31	0.0133	S53	0.0215	S75	0.0504
S10	-	S32	0.0416	S54	0.0553	S76	0.0500
S11	-	S33	-	S55	0.0638	S77	0.0501
S12	-	S34	0.0159	S56	0.0278	S78	0.0222
S13	-	S35	0.0262	S57	0.0555	S79	0.0501
S14	-	S36	0.0297	S58	0.0256	S80	0.0731
S15	0.0180	S37	0.0251	S59	0.0233	S81	0.0373
S16	0.0178	S38	0.0176	S60	0.0594	S82	0.0490
S17	-	S39	0.0130	S61	0.0375	S83	0.0668
S18	0.0180	S40	0.0265	S62	0.0479	S84	0.0439
S19	0.0254	S41	0.0212	S63	0.0454	S85	0.0344
S20	-	S42	0.0175	S64	0.0190		
S21	-	S43	0.0233	S65	0.0583		
S22	-	S44	0.0385	S66	0.0306		

掺伪比例及转移率考察:取已知含量的红参、西洋参,按样品处方工艺和比例分别制成5%西洋参阳性样品、10%西洋参阳性样品、西洋参阳性样品各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定。结果各样品中拟人参皂苷 F_{11} 的转移率分别为

33.21%, 33.70%, 28.22%, 平均转移率为31.71%。

限度确定:结合掺伪比例及转移率考察结果,且5%掺伪样品溶液中拟人参皂苷 F_{11} 的 $S/N=239$,满足定量限要求,以红参中添加有5%以上的西洋参作为非法添加的判定依据,拟人参皂苷 F_{11} 的质量浓度为 10 ng/mL ,折合参麦颗粒中的量为 $0.051\text{ }\mu\text{g/g}$ 。故9批样品(S54, S55, S57, S60, S65, S67, S72, S80, S83)超出拟订限度,检出率为10.59%,均来自厂家C。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法考察

样品处方中,红参仅占0.2%,蔗糖占92%,且各成分含量较低,基质复杂,易造成色谱系统污染。SPE小柱目前常用于样品前处理,是一项结合了选择性保留、选择性洗脱等过程的分离技术,可实现从复杂样品中提取净化或富集微量目标化合物,降低样品基质干扰,提高检测灵敏度的目的,且操作简便、回收率和重复性好。预试验中考察了 C_{18} 柱、硅胶柱、 C_8 柱、反相亲水亲脂平衡柱HLB、氨基SPE小柱,结果显示, C_{18} 柱固相萃取柱可有效除去处方中的蔗糖,且回收率最高,操作简便,可有效减少有机试剂的使用和废物产生,故选择 C_{18} 固相萃取柱用于供试品溶液提取。

3.2 试验条件考察

预试验中流动相考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液,并进行梯度洗脱,分别监测 $m/z\ 799.6\rightarrow 653.6, 491.6$ 和 $m/z\ 845.5\rightarrow 653.6, 491.6$ 离子对,后者总体响应相对较低,而前者在4种体系中差异不大,但乙腈-水的流动相柱压较低,配制简单,故选择乙腈-水为流动相,选择 $m/z\ 799.6\rightarrow 653.6, 491.6$ 为监测离子对。

3.3 拟人参皂苷 F_{11} 检出判定原则

以拟人参皂苷 F_{11} 的质量浓度 10 ng/mL 为西洋参非法添加判定依据,即供试品溶液的提取离子流色谱中,同时出现与对照品溶液色谱相应的色谱峰,且供试品溶液色谱中 $m/z\ 799.6\rightarrow 653.6$ 的色谱峰面积值大于对照品溶液中相应的峰面积值,视为检出。

3.4 结果分析

85批参麦颗粒中有9批样品拟人参皂苷 F_{11} 含量超出拟订限度,掺伪比例在5.41%~7.23%,推断投料用红参可能存在西洋参掺伪现象,须引起企业重视。在市场上收集红参药材时发现一些不法商贩将采收加工中产生的“下脚料”、个小的西洋参掺入人参药材或饮片加工成“红参”,不易区分,借此提高利润。部分企业贪图便宜,选用价格较低的掺杂部分伪品的红参。故企业需提高药材鉴定人员的技术水平,从源头上控制饮片质量。

3.5 方法评价

本研究中建立了UPLC-MS/MS法对参麦颗粒中

红参中拟人参皂苷 F_{11} 的检查方法,前处理中采用的SPE技术能有效从复杂基质样品中富集、净化特征成分,提高检测灵敏度、节省溶剂。该方法专属性强、准确度高、简单快速,可对制剂的质量控制和监督提供有力的技术支持。

参考文献

- [1] 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颁药品标准:中药成方制剂第十三册[M]. 北京:人民卫生出版社,1997:119.
- [2] 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,2020:136,160.
- [3] 张凡,张诗雯,李金昱,等. UPLC-QTOF-MS结合主成分分析法考察生晒参与红参的化学成分差异[J]. 中华中医药学刊,2022,40(2):75-81.
- [4] 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.
- [5] 姚宝林,王然然,张森,等. 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[J]. 中国现代中药,2023,25(1):150-156.
- [6] 王玉方,金春爱,赵卉,等. UPLC-ESI-MS/MS法测定人参、红参和西洋参中多种皂苷含量[J]. 特产研究,2019,41(3):58-66.
- [7] 穆向荣,徐兴燕,焦阳,等. 基于HPLC-MS/MS法的脑灵素制剂中人参掺伪检查研究[J]. 药学研究,2022,41(8):521-524.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 侯倩煜,贾愉波,王德立,等. 固相萃取超高效液相色谱测定牛大力中4个黄酮的含量[J]. 药物分析杂志,2022,42(11):1909-1916.
- [11] 黄博,姚力,张慧,等. 高分离度快速液相色谱-三重串联四极杆质谱快速检查消渴灵片中山麦冬[J]. 药物分析杂志,2021,41(2):320-328.
- [12] 胡青,孙健,于泓,等. 混合型固相萃取-亲水作用色谱串联质谱法测定熊胆粉中7种氨基糖苷类抗生素残留量[J]. 药学报,2022,57(12):3621-3625.
- [13] 唐哲,戴胜云,王蔚,等. 固相萃取结合薄层色谱法鉴别滋肾育胎丸中的何首乌、续断、巴戟天和白术[J]. 药物分析杂志,2022,42(8):1306-1311.
- [14] 樊轻亚,白泽方,汪学猛,等. 分散固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定药用狗牙花中6种生物碱[J]. 分析测试学报,2022,41(8):1235-1241.
- [15] 庞小莲,刘吉成,林生,等. 超高效液相色谱串联质谱法同时测定走川骨刺酊中3种乌头类生物碱含量[J]. 中国