

UPLC-MS/MS 检测乌鸡白凤丸中非法添加西洋参

赵振霞, 王晓蕾, 雷蓉, 王敏, 刘永利* (河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要: 目的 建立 UPLC-MS/MS 测定乌鸡白凤丸中非法添加的西洋参。方法 使用 Waters ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 以乙腈和水为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.35 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 电喷雾电离源 (ESI⁻), 多反应离子监测 (MRM) 扫描方式进行检测。结果 拟人参皂苷 F₁₁ 在 0.113 0~451.9 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=0.999$), 重复性的相对标准偏差为 3.5%, 拟人参皂苷 F₁₁ 平均加样回收率 ($n=9$) 为 96.9%, 检出限为 0.1 ng·mL⁻¹, 定量限为 0.4 ng·mL⁻¹。结论 所建立的方法快速准确、灵敏度高, 可用于乌鸡白凤丸中非法添加西洋参的筛选和检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 乌鸡白凤丸; 西洋参; 拟人参皂苷 F₁₁; 非法添加

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)04-0420-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.007

引用本文: 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.

Determination of *Panax quinquefolium* Illegally Added in Wuji Baifeng Pills by UPLC-MS/MS

ZHAO Zhenxia, WANG Xiaolei, LEI Rong, WANG Min, LIU Yongli* (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a detection method for *Panax quinquefolium* illegally added in Wuji Baifeng pills by UPLC-MS/MS. **METHODS** The analysis was performed on Waters ACQUITY BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), with acetonitrile-water as the mobile phase with gradient elution and the flow rate of 0.35 mL·min⁻¹. The column temperature was 40 °C. The analytes were detected by tandem mass spectrometry with the electrospray ionization (ESI⁻) source combined with multiple reaction monitoring (MRM) mode. **RESULTS** Pseudo-ginsenoside F₁₁ showed good linear relationship within the ranges of 0.113 0–451.9 ng·mL⁻¹ ($r=0.999$), and the RSD of repeatability test was 3.5%. The average recovery ($n=9$) of pseudo-ginsenoside F₁₁ was 96.9%. The limit of detection was 0.1 ng·mL⁻¹ and the limit of quantitation was 0.4 ng·mL⁻¹. **CONCLUSION** The established method is fast and accurate with a high sensitivity and a high degree of separation. It can be used for the screening and detection of *Panax quinquefolium* illegally added in Wuji Baifeng pills.

KEYWORDS: UPLC-MS/MS; Wuji Baifeng pills; *Panax quinquefolium*; pseudo-ginsenoside F₁₁; illegally added

乌鸡白凤丸由乌鸡、鹿角胶、醋鳖甲、煅牡蛎、人参、黄芪、当归、白芍等 20 味药组成, 收载于中国药典 2015 年版一部^[1]。它是中医妇科常用的良药, 被誉为妇科“三大圣药”之一, 其原方为乌鸡丸, 历经明清发展, 至近代医家参考明《寿世保元》乌鸡丸方加减而成, 广泛为医家病患使用^[2]。方中人参、黄芪、山药补气健脾, 共为臣药^[3]。人参为临床常用的贵细中药材, 入药部位为根及根茎, 是一味古老的中草药, 在中国已有几千年的使用历史^[4], 主要分布在中国东北部的长白山区。西洋参为五加科植物西洋参的干燥根, 原产于加拿大和美国等北美地区, 现主要在山东、

东北等地区有栽培^[5-6]。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。从化学成分来看, 人参和西洋参的化学成分基本相似, 均以人参皂苷为主要代表性有效成分, 且人参皂苷的种类大体相同, 但两者所含皂苷种类与含量及比例各有不同, 且有些皂苷类成分又是它们所特有的, 西洋参的特征性成分拟人参皂苷 F₁₁, 在人参中未发现, 人参的特征性成分人参皂苷 Rf, 在西洋参中亦未发现^[7-12]。因此本实验以拟人参皂苷 F₁₁ 作为非法添加的依据, 进行方法研究。

随着现代分析技术的发展, UPLC-MS/MS 以

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项(2014ZX09304307-002)

作者简介: 赵振霞, 女, 副主任药师 Tel: 13833163670 E-mail: 347749757@qq.com *通信作者: 刘永利, 男, 主任药师 Tel: (0311)69086006 E-mail: liuyongli2008@126.com

其快速、简便,专属性强等优势在中药分析中日益得到广泛应用^[13-15]。因此笔者参考相关文献^[16-17],采用 UPLC-MS/MS,建立了乌鸡白凤丸中拟人参皂苷 F₁₁ 的检测方法,提高了方法的灵敏度与专属性,为乌鸡白凤丸的质量控制提供了依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity UPLC/XEVO TQ-S 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(美国 Waters 公司); AE240 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

拟人参皂苷 F₁₁ 对照品(批号:110841-201406)、人参对照药材(批号:120917-201110)、西洋参对照药材(批号:120997-201309)均由中国食品药品检定研究院提供;4 批乌鸡白凤丸样品购自药店(批号分别为企业 I:140901,160501;企业 II:150616;企业 III:151102); 甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱选用 Water BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm,); 以乙腈为流动相 A, 水为流动相 B, 梯度洗脱:0~2 min, 20%→50%A; 2~4.5 min, 50%→80%A; 柱温:40 °C, 流速:0.35 mL·min⁻¹; 进样量:5 μL。

2.2 质谱条件

离子源:ESI; 扫描方式:负离子扫描; 监测模式:多反应监测模式(MRM); 毛细管电压:3.0 kV; 锥孔电压:20 V; 脱溶剂气温度:500 °C; 定量离子 799.6→653.6(碰撞能量:30 V), 定性离子 799.6→491.6(碰撞能量:35 V)。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取拟人参皂苷 F₁₁ 对照品 15.98 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL 至 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液, 精密量取 0.25 mL 至 100 mL 量瓶中, 以 20% 乙腈水溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 取乌鸡白凤丸样品(批号:160501)适量, 研细, 取约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 密

塞, 称定质量, 置水浴锅中加热回流 75 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液; 再精密量取续滤液 1 mL, 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 微孔滤膜过滤后, 滤液作为供试品溶液。

2.3.3 西洋参对照溶液的制备 取西洋参适量, 研细(过 4 号筛), 取约 0.05 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 按“2.3.2”项下方法制备西洋参对照溶液。

2.3.4 人参对照溶液的制备 取人参适量, 研细(过 4 号筛), 取约 0.05 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 按“2.3.2”项下方法制备人参对照溶液。

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”项的色谱条件和“2.2”项的质谱条件进样分析。结果特征性成分拟人参皂苷 F₁₁ 峰形良好, 人参中基本不含此成分, 乌鸡白凤丸中其他成分不干扰拟人参皂苷 F₁₁ 的检出, 专属性较好; 部分乌鸡白凤丸存在掺伪现象, 有拟人参皂苷 F₁₁ 的检出, 见图 1。

2.4.2 基质效应对检测灵敏度的影响 通常情况下, 在 UPLC-MS/MS 测定中, 样品中的基质对待测成分的电离有影响, 乌鸡白凤丸中除了含人参药材, 尚含有其他药材, 因此, 分别以相应浓度的人参、乌鸡白凤丸提取液为基质, 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, 见图 2。20% 乙腈水溶液、人参基质溶液、乌鸡白凤丸基质溶液的峰面积值依次为 63.771, 92.008, 95.317。表明人参基质和乌鸡白凤丸样品基质对待测成分的电离响应较小, 故可忽略基质效应的影响。

2.4.3 线性关系考察 分别精密吸取浓度为 0.113 0, 0.564 9, 5.649, 22.60, 226.0, 451.9 ng·mL⁻¹ 的拟人参皂苷 F₁₁ 对照品溶液 5 μL 分别注入超高效液相色谱-质谱联用仪, 按“2.1”项的色谱条件和“2.2”项的质谱条件进样测定, 以对照品进样浓度(ng·mL⁻¹)为横坐标(x), 峰面积积分为纵坐标(y), 进行线性回归, 建立标准曲线。拟人参皂苷 F₁₁ 在 0.113 0~451.9 ng·mL⁻¹ 之间呈良好的线性关系, 回归方程为 $y=1.84 \times 10^3 x + 7.87 \times 10^3$ ($r=0.999$)。

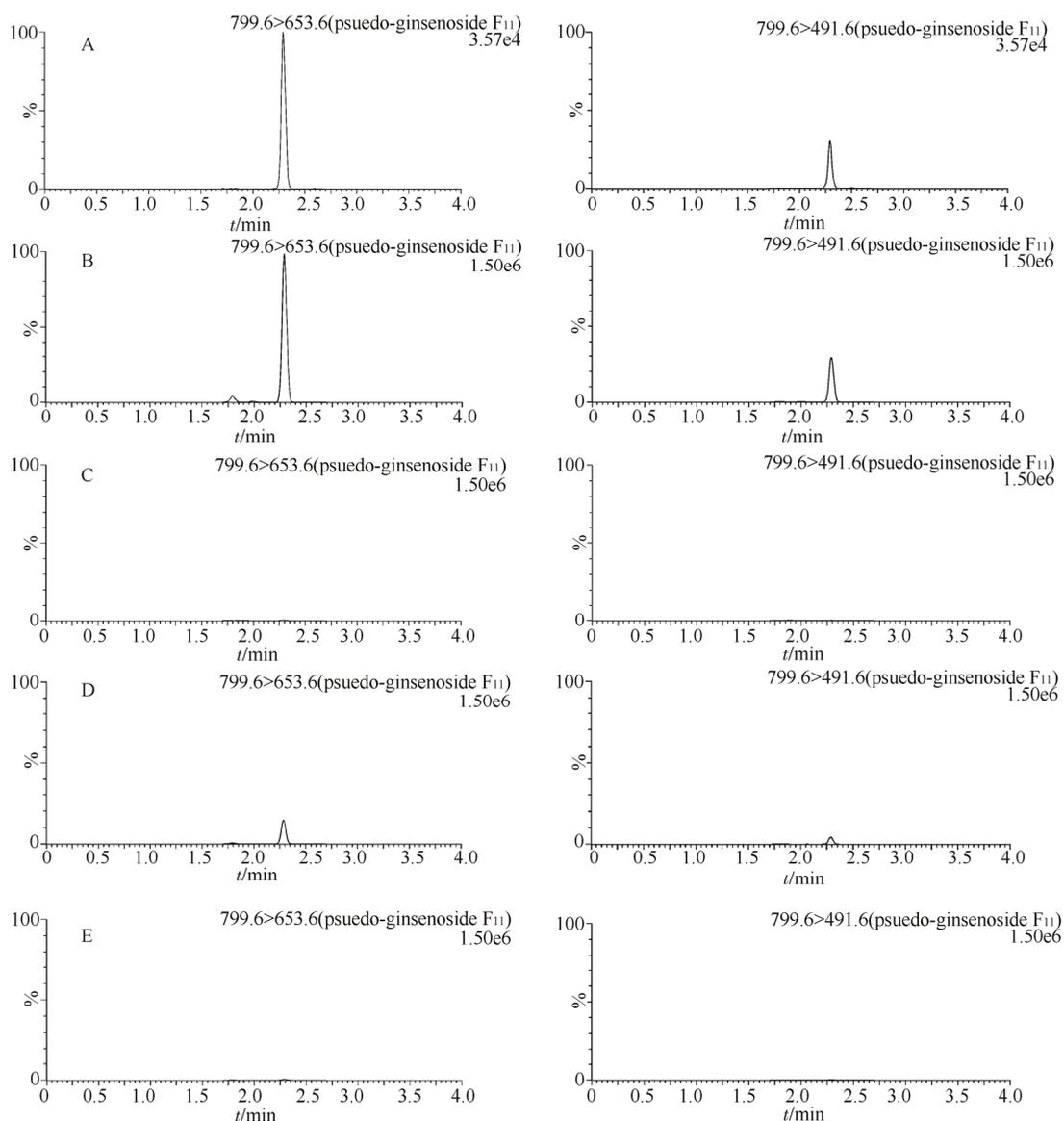


图1 乌鸡白凤丸专属性二级质谱图

A-拟人参皂苷 F₁₁; B-西洋参; C-人参; D-添加有西洋参的乌鸡白凤丸(批号: 160501); E-未检出西洋参的乌鸡白凤丸(批号: 151102)。

Fig. 1 Specificity MS/MS-chromatogram of Wuji Baifeng pills

A-pseudo-ginsenoside F₁₁; B-*Panax quinquefolium*; C-ginseng; D-Wuji Baifeng pill with *Panax quinquefolium*(Batch No.160501); E-Wuji Baifeng pill without *Panax quinquefolium*(Batch No.151102).

2.4.4 检出限与定量限测定结果 取未添加有西洋参的乌鸡白凤丸样品溶液 2 份, 分别加入适量对照品溶液。以 3 倍信噪比为检出限最低响应值, 计算检出限为 $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 以 10 倍信噪比为定量限最低响应值, 计算定量限为 $0.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.4.5 重复性试验 取添加有西洋参的乌鸡白凤丸样品(批号: 160501)适量, 研细, 分别取 1.0, 2.0, 3.0 g 各 3 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 按“2.3.2”项下方法分别制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件进

样测定, 记录各成分峰面积积分值, 计算含量及其 RSD, 平均含量为 $29.04 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 3.5%, 表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取未添加有西洋参的乌鸡白凤丸样品(批号: 151102)适量, 研细, 取 1.5 g, 共 6 份, 精密称定, 每 3 份 1 组, 分别加入用 80% 甲醇溶液配制的低、高 2 个浓度的对照品溶液 25 mL, 按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件进样测定, 计算回收率。结果表明回收率良好, 见表 1。

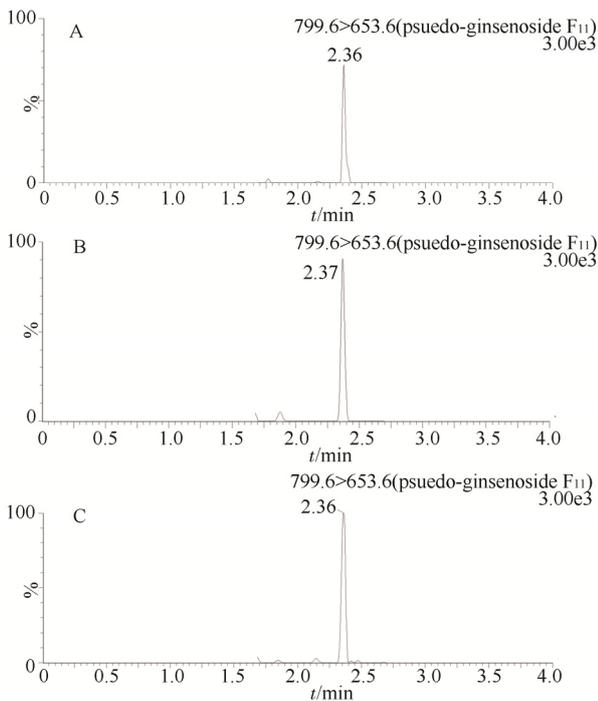


图2 基质效应考察
A-20%乙腈水溶液；B-人参基质溶液；C-乌鸡白凤丸溶液。

Fig. 2 Consideration of matrix effect

A-solution of 20% acetonitrile; B-solution of ginseng; C-solution of Wuji Baifeng pills.

表1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery test

编号	称样量/ g	样品含 量/ μg	对照品加 入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均/ %	RSD/ %
1	1.501 1	0	0.876	0.846	96.54	96.9	3.2
2	1.502 0	0	0.876	0.811	92.59		
3	1.500 9	0	0.876	0.830	94.72		
4	1.501 5	0	9.325	8.859	95.00		
5	1.500 7	0	9.325	8.912	95.57		
6	1.501 6	0	9.325	8.963	96.12		

2.5 样品测定

以本研究建立的方法对收集到的 4 批乌鸡白凤丸进行检验，结果 2 批检出拟人参皂苷 F_{11} ，提示掺加了西洋参，2 批未检出拟人参皂苷 F_{11} 。实验过程中，笔者亦对乌鸡白凤丸中人参皂苷 R_f 的含量进行了测定，结果见表 2。

表2 样品测定结果

Tab. 2 Determination results of sample

厂家	批号	结果	拟人参皂苷 $F_{11}/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	人参皂苷 $R_f/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
企业 I	140901	+	17.13	6.1
	160501	+	29.04	0.3
企业 II	150616	-	-	26.2
企业 III	151102	-	-	13.9

3 讨论

在“十二五”课题研究中发现，在含人参的

中成药中有拟人参皂苷 F_{11} 的检出，经调研，可能是由于含西洋参的中成药较少，西洋参主要以饮片形式销售，而含人参中成药较多，现在法定标准中多以人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 、 R_e 等两者的共有成分进行鉴别或含量测定^[18-19]，西洋参中皂苷的总量相当于人参中皂苷总量的 2 倍多，因此，个别企业就将西洋参下脚料、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，故一开始采用蒸发光检测器进行测定，由于干扰较多，且灵敏度较低，无法测定；实验初期，笔者也对薄层鉴别方法进行研究，试验了多种供试品溶液的制备方法，同时采用不同的展开系统，在优化供试品溶液制备方法的基础上，试验了多种展开剂，仍无法达到良好的分离，杂质斑点干扰严重，故最终选择了 UPLC-MS/MS 进行测定。

目前西洋参与人参多采用性状、薄层鉴别、指纹图谱、PCR 等方法进行区分^[20-22]，但对于中成药性状鉴别显然不可行，指纹图谱、PCR 也多用于中药材的鉴别，薄层鉴别由于灵敏度低、杂质斑点干扰严重，也无法用于乌鸡白凤丸中西洋参的检出，本研究采用 UPLC-MS/MS 技术，充分体现了质谱分析技术的高选择性优势，所建立的方法，简便、快速、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，可用于乌鸡白凤丸的质量控制，是法定标准检验的有益补充，可以为监管部门有效打击非法添加行为提供技术支持。

皂苷类化合物是基本母核为四环三萜的一系列化合物，母核上有 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_3$ 等不同的取代基，实验初期，笔者选用 ESI^+ 与 ESI^- 分别进行扫描，结果正离子模式易得 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 分子离子峰，二级碎片不稳定，且基线噪音较大；负离子模式易得 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 子离子峰，基线噪音较小，故本实验选用 ESI^- 作为离子化模式。对母离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 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、基线噪音低的 2 对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；在此基础上对锥孔电压与碰撞能量进行优化。

本实验过程中，笔者亦对收集到的 30 批人参参与 4 批乌鸡白凤丸样品中人参皂苷 R_f 的含量进行了测定，以人参中 R_f 最低含量 $0.30 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 折算乌

鸡白凤丸中人参皂苷 Rf 的限量为水蜜丸每 1 g 不得 $<9.9 \mu\text{g}$; 小蜜丸与大蜜丸每 1 g 不得 $<6.5 \mu\text{g}$ 。4 批乌鸡白凤丸中人参皂苷 Rf 的含量结果分别为 140901(水蜜丸) $6.1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 160501(水蜜丸) $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 150616(水蜜丸) $26.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 151102(大蜜丸) $13.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。测定结果显示, 人参皂苷 Rf 的含量测定结果不符合规定的 2 批样品中均检出了拟人参皂苷 F₁₁, 提示非法添加了西洋参, 两者结果相符。

利用本研究所建立的方法对其他一些含人参的中成药也可进行检测, 可以作为一个通用的检测方法, 具有广泛的适用性。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 694-695.
- [2] LIU G, YANG J, NING Z P, et al. Summary and analysis of Wuji pill in ancient books [J]. J Changchun Univ Chin Med(长春中医药大学学报), 2017, 33(3): 502-504.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典临床用药须知中药成方制剂卷[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 784-785.
- [4] 胡世林. 古代人参名实考[J]. 中国医药学报, 1987, 2(4): 42-43.
- [5] YU C, 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(10): 8-15.
- [6] 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.
- [7] LI Y, ZHANG T J, LIU S X, et al. A review on the ginseng chemical constituents and pharmacological [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40(1): 26-27.
- [8] SHI J J, CHEN S Y, ZOU L S, et al. Comparative analysis of ginsenosides in ginseng Radix et Rhizoma and ginseng radix et rhizoma rubra by UPLC-QTRAP-MS/MS [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2018, 53(22): 1944-1951.
- [9] WU Y T. Research on the comparison of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* [J]. Mod Food(现代食品), 2016, 15(25): 57-60.
- [10] 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.
- [11] LU J X, SHI B, DONG T, et al. Simultaneous determination of four constituents in imported *Panax quinquefolium* L. by UHPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(10): 1443-1446.
- [12] LI X G, ZHANG L X, MENG X Y, et al. Isolation, identification and content determination of pseudoginsenoside F₁₁ in American ginseng [J]. J Jilin Agric Univ(吉林农业大学学报), 2005, 27(6): 645-648.
- [13] FANG X Q, HUANG C H. Quantitative determination of 4 alkaloids in compound glycyrrhiza oral solution by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1127-1130.
- [14] WANG S N, HUA Y J, ZOU L S, et al. Simultaneous QTRAP-UPLC-MS/MS quantitation of 10 kinds of nucleosides and nucleobases in *Scrophulariae Radix* from different areas and commercial herbs [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2016, 25(2): 232-237.
- [15] ZHAO J L, OU B L, ZHOU Y. Simultaneous determination of 11 chemicals added in itching agents traditional Chinese medicines by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(12): 1558-1562.
- [16] WANG Y, JIA L, ZHU L N, et al. Simultaneous determination of 11 illegally added drugs in healthcare foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci Technol(食品科技), 2018, 43(5): 327-331.
- [17] ZHAO Y, XIE H L, WANG D X, et al. Quantitative analysis of 8 major ginsenosides in *Panax quinquefolium* by UPLC-MS/MS [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 29(9): 1529-1534.
- [18] YE Y H. Determination of ginsenoside Rg₁ and ginsenoside Re in Renshen Guben pills by HPLC [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2017, 29(2): 62-64.
- [19] LIU C J, ZHU Q. Study on HPLC characteristic fingerprint of Shenlingbaizhu powder and simultaneous determination of its five indicative components [J]. China Pharm(中国药业), 2018, 27(15): 12-16.
- [20] LI J H, CHEN C N, GU C M, et al. Identification of different ginsengs and producing areas of *Panax quinquefolium* using non-linear chemical fingerprint [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2017, 52(7): 1150-1156.
- [21] LIU L, XIAO B Y, LUO H M, et al. Identification of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* by multiplex PCR assay [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(4): 668-677.
- [22] CUI Z H, YUAN Y, ZHANG J J, et al. Application of rapid PCR technology on authentication of species in *Panax genus* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2015, 38(8): 1634-1638.

收稿日期: 2019-03-22

(本文责编: 李艳芳)