活血止痛胶囊/片中5种皂苷类成分含量测定及确证非法添加方法的建立Δ

陈　洁[1*]，史　达[2]，曹　玉[2]，张　玲[1,2#]（1.南京医科大学药学院，南京　211112；2.南京市食品药品监督检验院，南京　211198）

中图分类号　R917；R927.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）18-2240-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.18.13

摘　要　目的　建立同时测定活血止痛胶囊/片中5种指标性皂苷类成分的含量和确证人参、西洋参、三七茎叶非法添加的方法。**方法**　采用超高效液相色谱-串联质谱法。以Agilent RRHD Eclipse Plus C_{18}为色谱柱，以水（含0.1%甲酸）-乙腈为流动相进行梯度洗脱，流速为0.35 mL/min，柱温为35 ℃，进样量为2 μL；采用电喷雾离子源，以多反应监测模式进行负离子扫描。**结果**　三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rd、人参皂苷Re、人参皂苷Rf（人参特有成分）、人参皂苷Rb_3（三七茎叶特有成分）、拟人参皂苷F_{11}（西洋参特有成分）检测质量浓度的线性范围分别为9.99～1 499.50、9.99～1 499.50、10.01～1 500.80、9.99～1 499.10、10.00～1 500.20、9.99～1 499.50、10.01～1 500.80、9.99～1 499.00 ng/mL（R^2＞0.997）；检测限、定量限分别不高于2.64、8.06 ng/mL；精密度、重复性、稳定性（24 h）试验的RSD均小于6%；胶囊和片剂中各皂苷类成分的平均加样回收率分别为98.72%～102.40%、95.18%～106.47%（RSD均小于5%，n＝6）。18批活血止痛胶囊中，三七指标性成分人参皂苷Re、人参皂苷Rd、人参皂苷Rg_1、三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1的含量分别为291.79～426.89、427.71～677.49、2 294.28～3 371.43、571.22～848.19、1 841.33～2 959.12 μg/g，人参皂苷Rb_3的含量均不高于45.02 μg/g；22批活血止痛片中，三七指标性成分的含量分别为44.11～393.83、80.48～549.55、393.36～3 548.57、79.83～872.60、288.64～2 912.66 μg/g，人参皂苷Rb_3的含量不高于44.79 μg/g；2种制剂均未检出人参皂苷Rf、拟人参皂苷F_{11}。**结论**　该方法可用于测定活血止痛制剂中主要指标性皂苷类成分的含量。40批制剂均未见人参、西洋参非法添加现象，但部分批次片剂样品的三七药材投料量较少。

关键词　活血止痛胶囊；活血止痛片；皂苷类成分；三七；人参；西洋参；三七茎叶提取物；非法添加；超高效液相色谱-串联质谱法

Establishment of content determination of 5 saponins in Huoxue zhitong capsules/tablets and confirmation of illegal addition

CHEN Jie[1], SHI Da[2], CAO Yu[2], ZHANG Ling[1, 2]（1. School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211112, China; 2. Nanjing Institute for Food and Drug Control, Nanjing 211198, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish a method for simultaneous determination of 5 saponins in Huoxue zhitong capsules/tablets and to confirm the illegal addition of *Panax ginseng*, *Panax quiquefolium* and stems and leaves of *Panax notoginseng*. **METHODS** Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was used. The Agilent RRHD Eclipse Plus C_{18} column was used with mobile phase of water (containing 0.1% formic acid)-acetonitrile for gradient elution at a flow rate of 0.35 mL/min. The column temperature was 35 ℃ and the sample size was 2 μL. Using electrospray ionization source, negative ion scanning was carried out in multi-reaction monitoring mode. **RESULTS** The linear ranges of notoginsenoside R_1, ginsenoside Rb_1, ginsenoside Rg_1, ginsenoside Rd, ginsenoside Re, ginsenoside Rf (an unique ingredient of *P. ginseng*), ginsenoside Rb_3 (an unique ingredient of stems and leaves of *P. notoginseng*) and pseudo-ginsenoside F_{11} (an unique ingredient of *P. quiquefolium*) were 9.99-1 499.50, 9.99-1 499.50, 10.01-1 500.80, 9.99-1 499.10, 10.00-1 500.20, 9.99-1 499.50, 10.01-1 500.80, 9.99-1 499.00 ng/mL (R^2＞0.997); the detection limits and the quantitative limits were not higher than 2.64 and 8.06 ng/mL, respectively. RSDs of precision, repeatability and stability (24 h) tests were all less than 6%. The average recoveries of saponins in capsules and tablets were 98.72%-102.40% and 95.18%-106.47%, respectively (all RSDs＜5%, n＝6). In 18 batches of Huoxue zhitong capsules, the contents of ginsenoside Re, ginsenoside Rd, ginsenoside Rg_1, notoginsenoside R_1 and ginsenoside Rb_1 were 291.79-426.89, 427.71-677.49, 2 294.28-3 371.43, 571.22-848.19 and 1 841.33-2 959.12 μg/g, respectively; the contents of ginsenoside Rb_3 were no more than 45.02 μg/g. In 22 batches of Huoxue zhitong tablets, the contents of above indicators of *P. notoginseng* were 44.11-393.83, 80.48-549.55, 393.36-3 548.57, 79.83-872.60, and 288.64-2 912.66 μg/g, respectively; the contents of ginsenoside Rb_3 were no more than 44.79 μg/g. Ginsenoside Rf and pseudo-ginsenoside F_{11} were not detected in the two

Δ **基金项目**　江苏省市场监督管理局2020年度科技计划项目（No.KJ207564）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药分析及质量评价。电话：025-89636150。E-mail：2322660686@qq.com

＃ **通信作者**　主任药师，硕士生导师，硕士。研究方向：中药分析及质量评价。电话：025-89636103。E-mail：2459437556@qq.com

preparations. **CONCLUSIONS** The method can be used to determine the contents of saponins in Huoxue zhitong preparations. No illegal addition of *P. ginseng* and *P. quiquefolium* are found in 40 batches of preparations, but the input of *P. notoginseng* in some batches of tablet samples is less.

KEYWORDS Huoxue zhitong capsules; Huoxue zhitong tablets; saponins; *Panax notoginseng*; *Panax ginseng*; *Panax quiquefolium*; stems and leaves extract of *Panax notoginseng*; illegal addition; ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry;

活血止痛胶囊、活血止痛片均由当归、三七、乳香（制）、冰片、土鳖虫、煅自然铜6味药材组成，具有活血散瘀、消肿止痛的功效，主治跌打损伤、瘀血肿痛，临床多用于治疗急慢性软组织损伤类疾病[1]。现行国家标准2020年版《中国药典》（一部）（以下简称“药典”）仅要求采用高效液相色谱（HPLC）法对活血止痛胶囊中三七药材的质量标志性成分三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1的含量进行测定，并对3种成分的总含量进行了限定[1]；而国家药品标准YBZ25062005-2010Z并未对活血止痛片中上述标志性成分的含量进行限定[2]。可见，活血止痛胶囊/片的质控指标有限，其内在质量难以得到全面评价。

人参、西洋参、三七均为五加科人参属植物，均以皂苷类化合物为主要活性成分，三者化学成分相近，且西洋参中人参皂苷Rb_1和人参皂苷Re的含量远高于三七[3]，若以西洋参投料则较易满足药典标准中皂苷总含量的相关规定。有报道指出，活血止痛胶囊/片等中药复方制剂中可能存在人参、西洋参边角料及三七茎叶非法添加的现象[4－7]。鉴于常规液相色谱方法灵敏度低、分离效果不佳，难以满足复方制剂中非法添加的检测要求，故建立统一的定量分析方法以同时检测活血止痛胶囊/片中多种质量标志性皂苷类成分的含量并确证其非法添加现象，对全面控制制剂的质量具有重要意义。为此，本研究拟采用超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）法同时检测活血止痛胶囊/片中三七指标性皂苷类成分三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rd、人参皂苷Re的含量，并通过检测人参特征性指标成分人参皂苷Rf、三七茎叶特征性指标成分人参皂苷Rb_3、西洋参特征性指标成分拟人参皂苷F_{11}来确证上述制剂的非法添加现象[8－12]。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ACQUITY UPLC-H-CLASS型超高效液相色谱仪、Xevo TQ-S Micro型三重四极杆质谱仪（美国Waters公司），CPA225D型十万分之一电子天平（德国Sartorius公司），Milli-Q型纯水仪（美国Merck Millipore公司）等。

1.2 主要药品与试剂

三七皂苷R_1对照品（批号110745-201921，纯度90.4%）、人参皂苷Rg_1对照品（批号110703-202034，纯度94.0%）、人参皂苷Rb_1对照品（批号110704-202028，纯度93.1%）、人参皂苷Re对照品（批号110754-202129，纯度96.0%）、人参皂苷Rd对照品（批号111818-202104，纯度97.3%）、人参皂苷Rf对照品（批号111719-201806，供鉴别用）、人参皂苷Rb_3对照品（批号111686-202005，纯度96.5%）、拟人参皂苷F_{11}对照品（批号110841-200404，纯度99.5%）、三七对照药材（批号120941-201409）、人参对照药材（批号120917-201712）、西洋参对照药材（批号120997-201810）、三七茎叶皂苷对照提取物（批号110871-202102）均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈为色谱纯，正丁醇等其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

活血止痛胶囊/片均为市售产品，分别购自南京中山制药有限公司、珠海安生凤凰制药有限公司、江西百神昌诺药业股份有限公司等6家企业，共计40个批次，具体来源信息见表1。

表1 活血止痛胶囊/片的来源信息

序号	产品名称	生产厂家	批号	规格
1～5	活血止痛胶囊	南京中山制药有限公司	190506、190915、201008、200622、18040110	每粒装0.25 g
6	活血止痛胶囊	南京中山制药有限公司	190328	每粒装0.5 g
7～10	活血止痛胶囊	珠海安生凤凰制药有限公司	18120129、19060116、19060118、19080120	每粒装0.25 g
11～12	活血止痛胶囊	珠海安生凤凰制药有限公司	181207、20080123	每粒装0.5 g
13	活血止痛胶囊	江西百神昌诺药业有限公司	181204	每粒装0.25 g
14	活血止痛胶囊	江西百神昌诺药业有限公司	210101	每粒装0.37 g
15～18	活血止痛胶囊	江西百神昌诺药业有限公司	200502、200604、200804、200504	每粒装0.5 g
19～25	活血止痛片	江西桔王药业有限公司	2011026、200605、200810、200807、201201、2009123、190228	每片重0.8 g
26～31	活血止痛片	合肥今越制药有限公司	190603、181009、201004、190403、210305、201202	每片重0.4 g
32～40	活血止痛片	江苏万高药业股份有限公司	2003233、2010073、2008074、1902241、1906111、1906061、1811101、2101234、2008064	每片重0.4 g

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

以Agilent RRHD Eclipse Plus C_{18}（2.1 mm×50 mm，1.8 μm）为色谱柱，以水（含0.1%甲酸）为流动相A、乙腈为流动相B进行梯度洗脱（0～10 min，80%A→70%A；10～15 min，70%A→40%A；15～15.5 min，40%A→80%A；15.5→20 min，80%A）；流速为0.35 mL/min；柱温为35 ℃；进样量为2 μL。

离子源为电喷雾离子源（electrospray ionization，ESI），采用多反应监测（multi-reaction monitoring，MRM）模式进行负离子扫描；毛细管电压为3 500 V；脱溶剂气为氮气，脱溶剂气温度为500 ℃。8种待测皂苷类成分的质谱检测参数见表2。

表2　8种待测皂苷类成分的质谱检测参数

待测成分	保留时间/min	母离子*m/z*	定量子离子*m/z*	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
三七皂苷R_1	2.87	931.5	637.4	100	30
人参皂苷Rg_1	3.66	799.5	637.4	100	18
人参皂苷Re	3.73	945.5	475.4	100	35
人参皂苷Rf	8.47	799.5	475.4	100	38
拟人参皂苷F_{11}	8.60	799.5	653.4	100	23
人参皂苷Rb_1	11.64	1 107.6	945.5	100	35
人参皂苷Rb_3	12.32	1 077.5	945.5	110	38
人参皂苷Rd	12.65	945.5	621.4	100	35

2.2　溶液的制备

2.2.1　对照品储备液和三七茎叶提取物对照溶液　取三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd、人参皂苷Rf、人参皂苷Rb_3、拟人参皂苷F_{11}对照品各约10 mg，精密称定，分别置于10 mL棕色量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，混匀，制得上述8种成分质量浓度分别为1.065、1.068、1.069、1.147、1.017、1.053、1.120、1.336 mg/mL的对照品储备液。另取三七茎叶皂苷对照提取物适量，同法制得质量浓度为1.216 mg/mL（以提取物质量计）的三七茎叶提取物对照溶液。

2.2.2　混合对照品溶液　分别精密吸取“2.2.1”项下三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd、人参皂苷Rf、人参皂苷Rb_3、拟人参皂苷F_{11}对照品储备液适量，置于同一10 mL棕色量瓶中，用20%乙腈稀释至刻度，混匀，制得各成分质量浓度分别为149.95、149.95、150.08、150.02、149.91、149.95、150.08、149.90 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3　供试品溶液　取活血止痛胶囊内容物约0.1 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入80%甲醇25 mL，密塞，称定质量，加热回流2.5 h，放冷，再次称定质量，用80%甲醇补足减失的质量，摇匀，以10 000 r/min离心5 min，取上清液0.5 mL至10 mL量瓶中，用20%乙腈定容，经0.22 μm微孔滤膜滤过，即得。取活血止痛片样品，研磨成粉，同法操作。

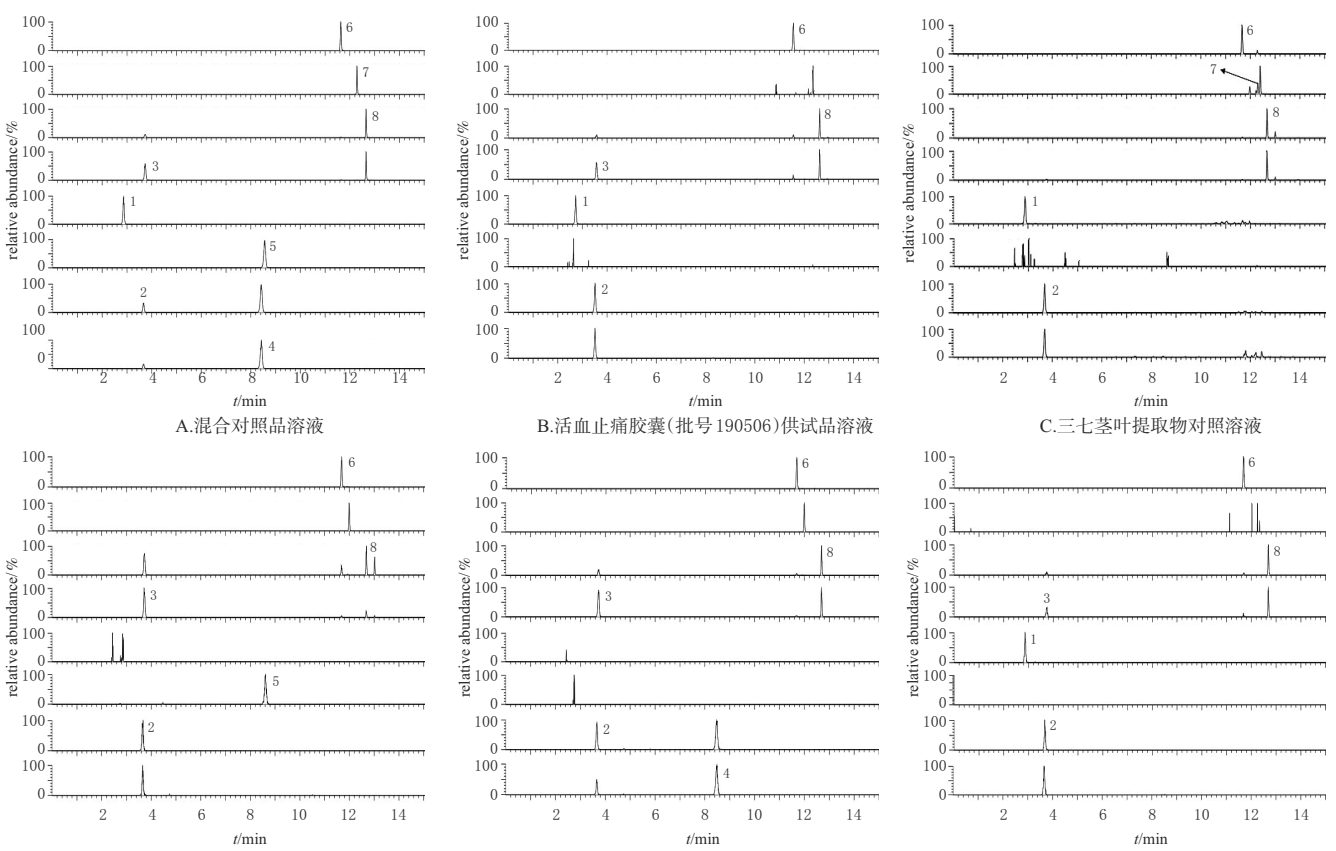
2.2.4　对照药材溶液　取西洋参、人参、三七对照药材各约0.1 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入80%甲醇25 mL，照“2.2.3”项下方法操作，制得各对照药材溶液。

2.2.5　空白溶液　取80%甲醇适量，作为空白溶液。

2.3　方法学考察

2.3.1　系统适用性试验　取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液及空白溶液各适量，按照“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析，记录总离子流图（图1A～图1B，片剂和空白溶液的色谱图略）。由图1可知，各成分色谱峰峰形良好，空白溶液对各成分的测定无干扰。

在参考相关文献的基础上[8－12]，本研究通过比对含拟人参皂苷F_{11}、人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rf混合对照品和各对照药材、三七茎叶提取物对照溶液的总离子流图



1：三七皂苷R_1；2：人参皂苷Rg_1；3：人参皂苷Re；4：人参皂苷Rf；5：拟人参皂苷F_{11}；6：人参皂苷Rb_1；7：人参皂苷Rb_3；8：人参皂苷Rd

图1　8种待测皂苷类成分定量分析的总离子流图

（图1A和图1C～图1F）可知，三七中含有三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rd；拟人参皂苷F_{11}为西洋参特有成分，人参皂苷Rb_3为三七茎叶特有成分，人参皂苷Rf为人参特有成分，三七药材中基本不含有以上3种成分，故前述5种成分可作为三七质量评价的考察指标。

2.3.2　线性关系考察　精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液1 mL，用20%乙腈逐级稀释，制成不同质量浓度（含8个浓度点）的混合对照品标准工作溶液，按照“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，记录峰面积。以各待测成分的质量浓度为横坐标（X）、对应峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归。结果显示，各待测成分在各自的检测质量浓度范围内与峰面积成良好的线性关系（R^2>0.997），详见表3。

表3　8种待测皂苷类成分的回归方程、线性范围和检测限、定量限

待测成分	回归方程	R^2	线性范围/(ng/mL)	检测限/(ng/mL)	定量限/(ng/mL)
三七皂苷R_1	Y=17.573 3X−14.144 7	0.999 6	9.99～1 499.50	1.83	5.42
人参皂苷Rg_1	Y=13.505 8X+0.037 6	0.998 8	10.01～1 500.80	1.44	3.68
人参皂苷Re	Y=11.877 1X−22.182 7	0.999 5	10.00～1 500.20	2.62	7.41
人参皂苷Rf	Y=48.384 1X+9.248 7	0.999 2	9.99～1 499.50	1.28	3.45
拟人参皂苷F_{11}	Y=17.365 3X−20.719 4	0.998 9	9.99～1 499.00	2.33	6.44
人参皂苷Rb_1	Y=4.882 7X−24.383 1	0.998 3	9.99～1 499.50	1.04	3.01
人参皂苷Rb_3	Y=7.385 3X−13.823 2	0.998 7	10.01～1 500.80	2.12	6.21
人参皂苷Rd	Y=12.754 2X+26.001 5	0.997 9	9.99～1 499.10	2.64	8.06

2.3.3　检出限与定量限考察　精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液，用20%乙腈逐级稀释，按照“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析，以信噪比3∶1计算检出限，以信噪比10∶1计算定量限，结果见表3。

2.3.4　精密度试验　按照“2.3.2”项下方法制备三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd、人参皂苷Rf、人参皂苷Rb_3、拟人参皂苷F_{11}质量浓度分别为19.99、19.99、20.01、20.00、19.98、19.99、20.01、19.99 ng/mL的另一混合对照品溶液，按照“2.1”项下色谱与质谱条件连续进样分析6次，记录峰面积。结果显示，上述成分峰面积的RSD分别为3.52%、4.32%、4.06%、3.47%、3.16%、4.57%、5.40%、4.24%（n=6），表明仪器精密度良好。

2.3.5　重复性试验　取同一活血止痛制剂样品（胶囊：批号190328；片剂：批号201004），精密称定，各平行6份，分别加入人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rf、拟人参皂苷F_{11}对照品储备液89.2、95.0、74.8 μL，按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，再按照“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析，记录峰面积并按标准曲线法计算含量。结果显示，胶囊中三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd、人参皂苷Rf、人参皂苷Rb_3、拟人参皂苷F_{11}含量的RSD分别为2.69%、2.22%、2.86%、2.89%、4.81%、1.09%、1.17%、1.83%（n=6），片剂中上述成分含量的RSD分别为2.91%、2.17%、3.04%、2.67%、3.58%、1.24%、1.32%、1.56%（n=6），表明方法重复性良好。

2.3.6　稳定性试验　取“2.3.5”项下同一供试品溶液（胶囊：批号190328），分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按照“2.1”项下色谱与质谱条件进样分析，记录峰面积。结果显示，三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd、人参皂苷Rf、人参皂苷Rb_3、拟人参皂苷F_{11}峰面积的RSD均不高于4.79%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.7　加样回收率试验　精密称取已知含量的活血止痛胶囊（批号190328）、活血止痛片（批号201004）样品适量，各平行6份，分别精密加入与活血止痛胶囊已知量相当的三七皂苷R_1、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd对照品储备液28.2、93.6、117.0、14.2、21.8 μL，或者与活血止痛片已知量相当的上述各对照品储备液24.4、88.2、105.0、12.4、28.0 μL，同时加入人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rf、拟人参皂苷F_{11}对照品储备液89.2、95.0、74.8 μL。按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，再按照“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果显示，胶囊中三七皂苷R_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rf、拟人参皂苷F_{11}的平均加样回收率分别为101.71%、102.40%、100.40%、101.37%、98.72%、100.00%、98.98%、98.84%，RSD分别为4.64%、3.52%、4.30%、4.21%、3.23%、1.17%、1.09%、1.83%（n=6）；片剂中上述成分的平均加样回收率分别为106.47%、106.10%、100.17%、102.39%、95.18%、96.22%、99.98%、98.92%，RSD分别为4.29%、3.58%、3.86%、2.81%、4.04%、2.15%、1.29%、1.71%（n=6）。

2.3.8　样品含量测定　取不同批次的活血止痛胶囊和活血止痛片，按照“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液各2份，按照“2.1”项下色谱与质谱条件进样测定，记录峰面积，再按标准曲线法计算样品中各皂苷类成分的含量并进行人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rf、拟人参皂苷F_{11}的确证分析。不同厂家样品的具体检测结果见表4。

表4　不同厂家活血止痛胶囊/片中8种皂苷类成分的含量测定结果（n=2，μg/g）

制剂	企业	人参皂苷Re	人参皂苷Rd	人参皂苷Rg_1	三七皂苷R_1	人参皂苷Rb_1	人参皂苷Rb_3[a]	人参皂苷Rf	拟人参皂苷F_{11}
活血止痛胶囊	南京中山制药有限公司	291.79～368.70	427.71～565.56	2 294.28～2 874.97	571.22～729.48	1 841.33～2 339.99	≤45.02	/	/
	珠海安生凤凰制药有限公司	388.88～426.89	606.92～677.49	2 975.60～3 371.43	748.70～848.19	2 486.35～2 959.12	≤43.10	/	/
	江西百神昌诺药业有限公司	313.03～403.29	532.89～586.66	2 644.32～2 936.10	666.59～731.88	2 199.72～2 604.85	≤39.24	/	/
活血止痛片	江西桔王药业有限公司	44.11～72.25	80.48～135.15	393.36～622.46	79.83～150.12	288.64～552.65	/	/	/
	合肥今越制药有限公司	281.30～381.39	404.88～549.55	2 118.90～2 583.34	453.21～629.07	1 300.93～2 312.83	≤42.03	/	/
	江苏万高药业股份有限公司	262.42～393.83	311.75～449.21	1 911.67～3 548.57	419.97～872.60	1 542.42～2 912.66	≤44.79	/	/

a：部分批次样品检测结果低于定量限，以“≤”表示；/：所有批次样品均未检出或均低于检出限

3 讨论

3.1 提取溶剂与提取方式考察

本课题组前期考察了不同体积分数（70%、80%、100%）甲醇以及水饱和正丁醇对活血止痛制剂中皂苷类成分的提取效果，同时考察了加热回流提取和超声提取对皂苷类成分提取率的影响，结果表明，80%甲醇加热回流提取的效果最优，经提取时间（1.5、2、2.5、3 h）优化后，最终确定选用80%甲醇加热回流提取2.5 h。

3.2 色谱与质谱条件优化

本课题组前期对水-甲醇、水-乙腈等流动相的组成进行了考察，结果表明，水-乙腈流动相体系的分离效果优于水-甲醇体系；同时，在水相中加入0.1%甲酸可提高各待测成分的色谱响应值，改善其色谱峰峰形，提高离子化效率。本课题组前期对不同皂苷类成分对照品溶液进行了质谱分析，在调节锥孔电压和碰撞能量的同时优化了待测成分的定量离子对，结果表明，在MRM、ESI负离子扫描模式下，各待测成分的分子离子峰均较稳定且响应较强。

3.3 检测方法的选择

HPLC法虽在皂苷类成分的检测中运用广泛[13]，但该类成分的紫外响应较弱，且拟人参皂苷F_{11}、人参皂苷Rb_3等分子内并无共轭体系，仅在紫外检测器中呈末端吸收；而蒸发光散射检测器存在灵敏度低、专属性有限的不足[14]。由此可见，将常规HPLC法作为非法添加指标性成分的筛查手段，存在检测灵敏度和选择性不高的缺点。UPLC-MS/MS法具有检测灵敏度高、选择性强、假阳性少等优点[15]，故本研究选择该法快速检测活血止痛胶囊/片中的皂苷类指标性成分。

3.4 含量检测结果分析

本研究从各批次活血止痛胶囊/片中均检出人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rd、三七皂苷R_1，其中胶囊中人参皂苷Rg_1、人参皂苷Rb_1、三七皂苷R_1总含量均符合药典的含量限度要求[1]。有研究表明，西洋参、人参、三七共有峰峰面积比值存在一定关系：在西洋参、人参、三七中，人参皂苷Rg_1与人参皂苷Re比值分别为0.13±0.08、1.20±0.60、8.30±3.00[16]。本课题组根据皂苷峰面积比值关系并结合特征性指标成分对活血止痛制剂中的三七药材质量进行了评价分析，结果显示，制剂中人参皂苷Rg_1与人参皂苷Re的峰面积比值为7.79～8.62，与文献[16]基本一致。各批产品中均未检出人参皂苷Rf、拟人参皂苷F_{11}，部分样品检出了人参皂苷Rb_3，经与三七对照药材溶液（未经稀释）及人参皂苷Rb_3对照品溶液色谱图对比，初步判断人参皂苷Rb_3可能与三七药材有关；所测批次样本中均未发现西洋参、人参非法添加现象。此外本研究还发现，按照片剂规格及日服用量等量折算，江西桔王药业有限公司的活血止痛片中5种皂苷类成分的含量普遍低于其他生产厂家样品，考虑可能存在三七投料量偏低的现象。

综上所述，本文以UPLC-MS/MS法为手段，建立了同时测定活血止痛胶囊/片中5种指标性皂苷类成分含量和确证西洋参、人参、三七茎叶非法添加的检测方法，可为活血止痛制剂的质量控制提供参考，为打击非法添加行为提供技术支撑。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：一部[S].2020年版.北京：中国医药科技出版社，2020：1392-1395.

[2] 国家药品监督管理局.国家药品标准：YBZ25062005-2010Z[S].2019版.北京：中国标准出版社，2019：1-2.

[3] 王晶，张勇，毕萌菲，等.RP-HPLC法分析测定人参、西洋参、三七中的皂苷类化合物[J].食品研究与开发，2020，41(7)：172-176.

[4] 王峰，聂黎行，于健东，等.活血止痛制剂中三七的专属性鉴别方法研究[J].中国药事，2019，33(7)：760-766.

[5] 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.

[6] 赵振霞，王敏，王晓蕾，等.心可舒胶囊中非法添加三七茎叶的UPLC/MS/MS法检测[J].时珍国医国药，2019，30(3)：619-622.

[7] 刘永利，赵振霞，苏建，等.三七粉质量评价研究[J].中国药事，2017，31(4)：407-411.

[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] 李丽，刘春明，吴巍，等.高效液相色谱-电喷雾质谱联用法测定人参和西洋参的皂苷类成分[J].分析化学，2005，33(8)：1087-1090.

[10] 刘鹏，王士伟，夏广萍.西洋参花蕾中人参皂苷Re、拟人参皂苷F_{11}、人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rd的含量测定[J].中草药，2018，49(17)：4144-4147.

[11] 刘翀，韩金玉，常贺英，等.三七茎叶提取物中人参皂苷Rb_3的分离及指纹图谱[J].天津大学学报，2006，39(10)：1151-1156.

[12] 费毅琴，杨萍，肖凌，等.HPLC法快速筛查中成药中三七/人参茎叶代替根和根茎[J].中成药，2015，37(8)：1730-1733.

[13] 袁铭铭，周国平，熊晓丽，等.高效液相色谱法测定虎力散片中三七皂苷R_1、人参皂苷Rg_1和Rb_1的含量[J].药品评价，2021，18(21)：1289-1292.

[14] 罗艳，杨柳，涂晓琴，等.高效液相色谱-蒸发光散射法同时测定山银花提取物中5种皂苷的含量[J].食品安全质量检测学报，2019，10(7)：1914-1919.

[15] 洪艳，文晓霞，李莎，等.LC-MS/MS法同时测定复方丹参颗粒和复方丹参滴丸中6种成分[J].中成药，2019，41(2)：270-274.

[16] 严华，张慧秀，白宗利，等.基于特征图谱的人参属药材西洋参、人参、三七的比较[J].世界中医药，2021，16(6)：887-895.

（收稿日期：2022-03-08　修回日期：2022-07-06）
（编辑：张元媛）