

## 成分分析

## UPLC – MS/MS 法同时测定红五参胶囊中 11 个成分的含量\*

孙帅<sup>1</sup>, 王相<sup>1</sup>, 高乐<sup>1</sup>, 谢文超<sup>2</sup>, 刘宸男<sup>1</sup>, 牛丽颖<sup>1</sup>, 王鑫国<sup>1\*\*</sup>

(1. 河北中医药大学 河北省中药配方颗粒技术创新中心 中药材品质评价与标准化河北省工程研究中心, 石家庄 050091;

2. 华北制药河北华维健康产业有限公司, 石家庄 052165)

**摘要 目的:**建立 UPLC – MS/MS 同时测定红五参胶囊中 11 个成分(咖啡酸、阿福豆苷、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、红景天苷、紫丁香苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rd)含量的方法。

**方法:**采用 Shim – pack GIST C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 2 μm) 色谱柱, 以乙腈 – 0.1% 乙酸 – 1 mmol · L<sup>-1</sup> 乙酸铵水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量为 1 μL; 采用电喷雾电离源 (ESI 源), 多反应监测 (MRM) 模式进行正负离子检测。**结果:**11 个成分在测定浓度范围内线性关系良好, 线性相关系数 *r* 均 > 0.999 0; 精密度 RSD 均 < 3%; 重复性和稳定性良好, RSD 值均 < 5%; 平均加样回收率为 97.1% ~ 101.5%, RSD ≤ 3.7%。10 批红五参胶囊中咖啡酸、阿福豆苷、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、红景天苷、紫丁香苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rd 含量分别为 0.010 ~ 0.013、0.000 7 ~ 0.001 4、0.035 ~ 0.038、0.312 ~ 0.315、0.413 ~ 0.417、0.411 ~ 0.416、4.355 ~ 4.358、0.030 ~ 0.032、0.993 ~ 0.999、1.120 ~ 1.124、2.536 ~ 2.538 mg · g<sup>-1</sup>。**结论:**本方法准确灵敏, 稳定性和重复性良好, 可用于红五参胶囊的质量控制。

**关键词:**红五参胶囊; 红景天; 刺五加; 人参; 大健康产品; 红景天苷; 人参皂苷 Rd; 超高效液相色谱 – 串联质谱; 多重反应监测; 多成分含量测定; 质量控制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793 (2024) 04 – 0567 – 10

doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024.04.03

## Simultaneous determination of 11 components in Hongwushen capsules by UPLC – MS/MS\*

SUN Shuai<sup>1</sup>, WANG Xiang<sup>1</sup>, GAO Le<sup>1</sup>, XIE Wen – chao<sup>2</sup>,  
LIU Chen – nan<sup>1</sup>, NIU Li – ying<sup>1</sup>, WANG Xin – guo<sup>1\*\*</sup>

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Hebei Traditional Chinese Medicine Formula Granule Engineering &amp; Technology Innovate Center, Quality Evaluation &amp; Standardization Hebei Province Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China;

2. NCPC Hebei Huawei Health Industry Co., Ltd., Shijiazhuang 052165, China)

**Abstract Objective:** To establish an UPLC – MS/MS method for simultaneous determination of 11 components (caffeic acid, afzelin, gallic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, salidroside, eleutheroside B, ginsenoside Re, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rd) in Hongwushen capsules. **Methods:** A Shim – pack

\* 河北省省级科技计划项目资助 (23372502D); 河北省自然科学基金项目资助 (H2022423341, H2022423335); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202214432020); 河北中医药管理局项目 (2022107)

\*\* 通信作者 Tel: (0311) 89926548; E – mail: wangxinguozy@126.com

第一作者 Tel: (0311) 89926890; E – mail: 2596397487@qq.com

GIST C<sub>18</sub> chromatographic column(100 mm × 2.1 mm, 2 μm) was used. The mobile phase was composed of acetonitrile - 0.1% acetic acid - 1 mmol · L<sup>-1</sup> ammonium acetate aqueous solution and the gradient elution was applied. The flow rate was 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 1 μL. Electrospray ionization (ESI) source and multiple reaction monitoring (MRM) mode in both positive and negative were used for ion detections. **Results:** The linear relationship of 11 components was good in the concentration range, and the linear correlation coefficients were all above 0.999 0. The RSD values of precision were less than 3%. The repeatability and stability were good, and the RSD values were less than 5%. The average recoveries were in the range of 97.1% - 101.5% with RSDs ≤ 3.7%. The contents of caffeic acid, afzelin, gallic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, salidroside, eleutheroside B, ginsenoside Re, ginsenoside Rg<sub>1</sub> and ginsenoside Rd in 10 batches of Hongwushen capsules were 0.010 - 0.013 mg · g<sup>-1</sup>, 0.000 7 - 0.001 4 mg · g<sup>-1</sup>, 0.035 - 0.038 mg · g<sup>-1</sup>, 0.312 - 0.315 mg · g<sup>-1</sup>, 0.413 - 0.417 mg · g<sup>-1</sup>, 0.411 - 0.416 mg · g<sup>-1</sup>, 4.355 - 4.358 mg · g<sup>-1</sup>, 0.030 - 0.032 mg · g<sup>-1</sup>, 0.993 - 0.999 mg · g<sup>-1</sup>, 1.120 - 1.124 mg · g<sup>-1</sup> and 2.536 - 2.538 mg · g<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusions:** The method is accurate, sensitive, stable and reproducible, and can be used for the quality control of Hongwushen capsules.

**Keywords:** Hongwushen capsule; *Rhodiola crenulata*; *Acanthopanax senticosus*; ginseng; big health products; salidroside; ginsenoside Rd; UPLC - MS/MS; multiple reaction monitoring; multi - component content determination; quality control

红五参胶囊是一款大健康产品,由红景天、刺五加、人参茎叶 3 味中药组成。红景天,景天科植物大花红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et Thoms.) H. Ohba 的干燥根和根茎,是亚洲地区公认滋补食材,素有“高原人参”和“雪山仙草”之称,可益气活血、通脉平喘;刺五加,五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎,又名“五加参”,可益气健脾、补肾安神,具有免疫调节、抗疲劳、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳等作用<sup>[1-2]</sup>;人参茎叶,五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥茎叶,可补气、益肺、祛暑、生津。3 味中药合用能益气活血、补肺安中,缓解体力疲劳。

红五参胶囊质量控制中仅对红景天苷及总皂苷进行限度规定,其他药效成分暂未涉及,难以体现其质量控制的整体性。因此,建立一个高效、准确且能同时满足制剂中所有药味的质量控制方法尤为重要。试验前期已采用超高效液相色谱法对红五参胶囊中的成分进行含量测定,发现检测灵敏度较低,分析时间较长,多成分分离困难,且人参茎叶中的皂苷类成分难以被检测到,不能满足分析要求,难以对红五参胶囊进行质量控制。UPLC - MS/MS 法专属性

强,灵敏度高,可在短时间内完成多种成分的含量测定,也可以检出和测定含量较低的成分<sup>[3-6]</sup>。因此,本实验建立了 UPLC - MS/MS 方法同时测定红五参胶囊中红景天(红景天苷、阿福豆苷、没食子酸、咖啡酸)、刺五加(紫丁香苷、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸)和人参茎叶(人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rd)中 11 个成分的含量,为红五参胶囊的质量控制提升提供依据。

## 1 仪器与试剂

Shimadzu LC - 30A 型超高效液相色谱仪(岛津公司),4500 QTRAP 三重四极杆线性离子阱质谱仪(SCIEX 公司,ESI 离子源),Analyst® TF 1.6.3 数据采集软件(SCIEX 公司),BSA224S - CW 型万分之一、CPA225D 型十万分之一电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),KQ - 250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),KD - 98 - IIA 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

对照品红景天苷(批号 15120801,纯度 ≥ 97%)、人参皂苷 Rd(批 121115,纯度 98%),成都普菲德生物技术有限公司;没食子酸(批号 110831 - 201906,纯度 ≥ 89.9%)、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>(批号 110703 - 202235,纯度 ≥ 93.4%)、人参皂苷 Re(批号 110754 -

202330, 纯度  $\geq 93.4\%$ )、绿原酸(批号 110753 - 202119, 纯度  $\geq 98\%$ )、咖啡酸(批号 10885 - 201703, 纯度  $\geq 95\%$ )、中国食品药品检研究院; 隐绿原酸(批号 PS001110, 纯度  $\geq 98\%$ )、阿福豆苷(批号 PS011206, 纯度  $\geq 98\%$ )、紫丁香苷(批号 PS010261, 纯度  $\geq 98\%$ )、成都普思生物科技股份有限公司; 新绿原酸(批号 MUST - 12113001, 纯度  $\geq 98\%$ )、成都曼思特生物科技有限公司。乙腈、甲醇为色谱纯, Merck 公司; 其他试剂均为分析纯, 实验用水为屈臣氏蒸馏水。

红五参胶囊(批号 20211001 - 20211010)由华北制药河北华维健康产业有限公司提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱-质谱条件

**2.1.1 色谱条件** 采用 Shim-pack GIST C<sub>18</sub> (100 mm  $\times$  2.1 mm, 2  $\mu$ m) 色谱柱, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 以 0.1% 乙酸 - 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 乙酸铵水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 4 min, 5% B  $\rightarrow$  10% B; 4 ~ 8

min, 10% B  $\rightarrow$  13% B; 8 ~ 12 min, 13% B  $\rightarrow$  17% B; 12 ~ 15 min, 17% B  $\rightarrow$  30% B; 15 ~ 17 min, 30% B  $\rightarrow$  34% B; 17 ~ 19 min, 34% B; 19 ~ 20 min, 34% B  $\rightarrow$  35% B; 20 ~ 21 min, 35% B  $\rightarrow$  37% B; 21 ~ 23 min, 37% B; 23 ~ 25 min, 37% B  $\rightarrow$  50% B; 25 ~ 30 min, 50% B  $\rightarrow$  60% B; 30 ~ 32 min, 60% B  $\rightarrow$  75% B; 32 ~ 36 min, 75% B), 每次进样前预平衡 5 min, 再进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 进样量 1  $\mu$ L。

**2.1.2 质谱条件** 采用多重反应监测 (MRM) 的扫描方式在正、负离子模式下同时监测, 离子源为电喷雾离子源 (ESI), 离子化电压 (IS) 为 5 500 V 和 -4 500 V, 离子源温度 (TEM) 为 550  $^{\circ}$ C, 喷雾气 (GS1, N<sub>2</sub>) 为 380 kPa, 辅助气 (GS2, N<sub>2</sub>) 为 380 kPa, 接口持续加热, 全程通入氮气, 气帘气 (CUR, N<sub>2</sub>) 为 242 kPa, 碰撞气 (CAD) 压力为 medium, 每个离子对的滞留时间 (dwelltime) 为 50 ms。每个待测化合物的监测离子对、解簇电压 (DP) 及碰撞能量 (CE) 见表 1。

表 1 五参胶囊中 11 个成分的质谱参数

Tab. 1 Mass spectrometric parameters of 11 components in Hongwushen capsules

成分 (component)	相对分子质量 (relative molecular mass)	母离子 (parent ion) $m/z$	子离子 (daughter ion) $m/z$	解簇电压 (declustering potential)/V	碰撞能量 (collision energy)/eV
咖啡酸 (caffeic acid)	180.16	179.0	134.9	-53.15	-20.99
没食子酸 (gallic acid)	170.12	168.8	124.8	-74.08	-17.11
新绿原酸 (neochlorogenic acid)	354.31	353.2	190.9	-41.02	-30.44
绿原酸 (chlorogenic acid)	354.31	353.2	190.9	-40.00	-27.00
隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	354.31	353.3	190.9	-73.88	-27.33
红景天苷 (salidroside)	300.30	299.0	119.0	-92.41	-19.26
人参皂苷 Rg <sub>1</sub> (ginsenoside Rg <sub>1</sub> )	801.01	823.3	643.5	172.09	66.30
人参皂苷 Re (ginsenoside Re)	947.17	969.4	789.6	152.33	57.87
人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)	947.15	969.5	789.7	157.36	67.21
紫丁香苷 (eleutheraside B)	372.37	374.4	312.3	93.18	36.41
阿福豆苷 (afzelin)	432.38	431.1	285.0	99.26	25.99

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 混合对照品溶液** 分别精密称取对照品咖啡酸 1.323 mg、阿福豆苷 7.056 mg、没食子酸 7.224 mg、新绿原酸 1.553 mg、绿原酸 2.071 mg、紫丁香苷 1.189 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解、稀释并定容, 得上述 6 个成分的对照品储备液; 分别精密称取对照品隐绿原酸 3.688 mg、红景天苷 27.876 mg、人参皂苷 Re 9.104 mg、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 5.827 mg、人参皂苷

Rd 15.893 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解、稀释并定容, 得上述 5 个成分的对照品储备液。分别精密吸取各对照品储备液适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 含咖啡酸 0.002 6 mg、阿福豆苷 0.000 1 mg、没食子酸 0.014 4 mg、新绿原酸 0.031 1 mg、绿原酸 0.041 42 mg、隐绿原酸 0.036 9 mg、红景天苷 0.278 8 mg、紫丁香苷 0.023 8 mg、人参皂苷 Re 0.045 5 mg、人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 0.029 1 mg 和人参

皂苷 Rd 0.158 9 mg 的混合对照品溶液。

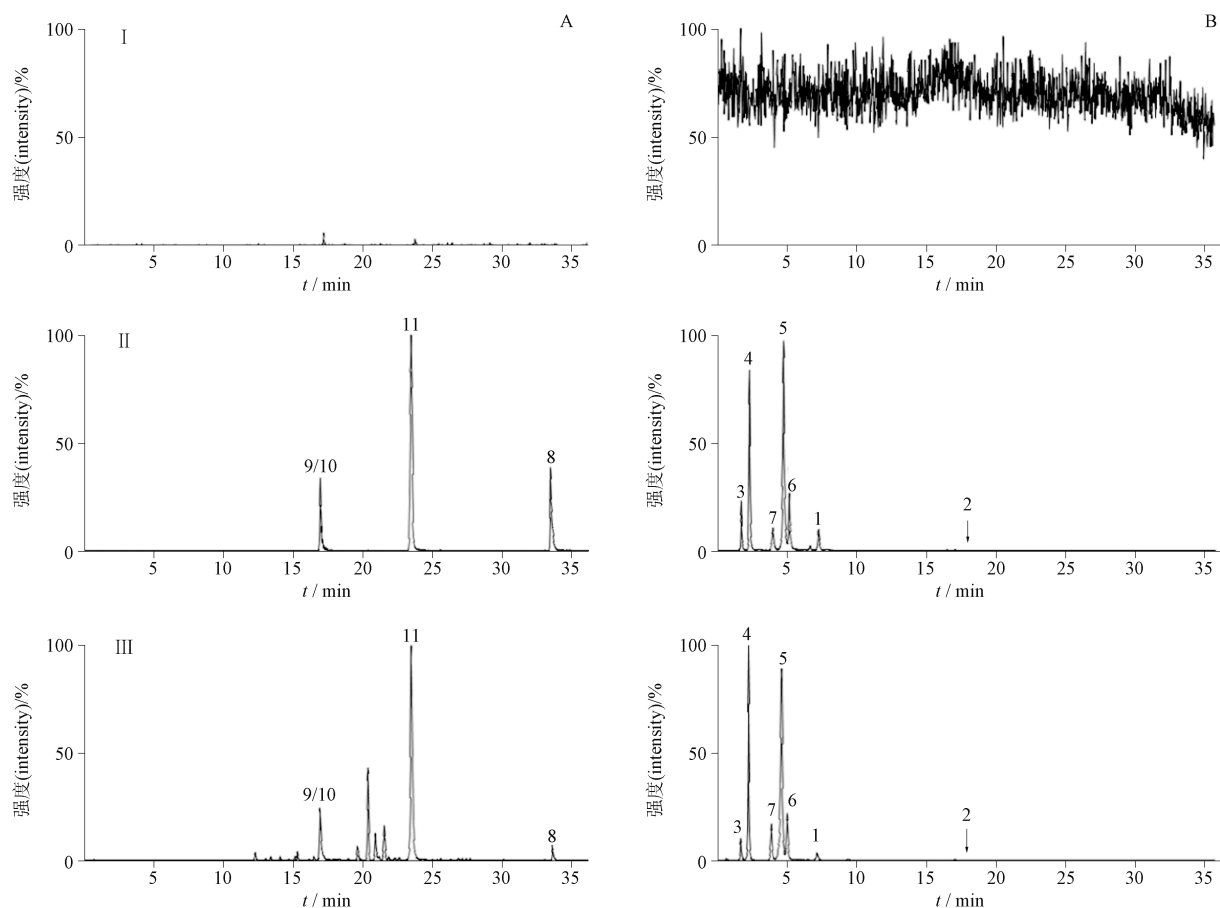
**2.2.2 供试品溶液** 取胶囊内容物适量,研磨至细粉,精密称取 1.5 g,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,精密称量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 30 min,取出放冷,再称量,用 70% 甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,精密量取上清液 10 mL 至蒸发皿中,水浴加热(100 ℃)至干,放冷,用 70% 甲醇复溶,定容至 5 mL,摇匀,取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

**2.2.3 阴性溶液** 取聚维酮 K30 和乳糖的混合物

(1:3)1.5 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,按“2.2.2”项方法操作,即得。

**2.3 方法学考察**

**2.3.1 专属性考察** 分别精密吸取阴性溶液、混合对照品溶液和供试品溶液各 1 μL,按“2.1”项下条件进样分析得到正、负离子流图见图 1。供试品溶液中待测的 11 个成分与 11 个对照品的保留时间相同,被测定成分分离效果良好,无阴性干扰,比较各对照品与样品的色谱图,见图 2,二者一致,表明本法专属性良好。



1. 咖啡酸 (caffeic acid) 2. 阿福豆苷 (afzelin) 3. 没食子酸 (gallic acid) 4. 新绿原酸 (neochlorogenic acid) 5. 绿原酸 (chlorogenic acid)  
6. 隐绿原酸 (xyrytochlorogenic acid) 7. 红景天苷 (salidroside) 8. 紫丁香苷 (eleutheroside B) 9. 人参皂苷 Re (ginsenoside Re) 10. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (ginsenoside Rg<sub>1</sub>) 11. 人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)

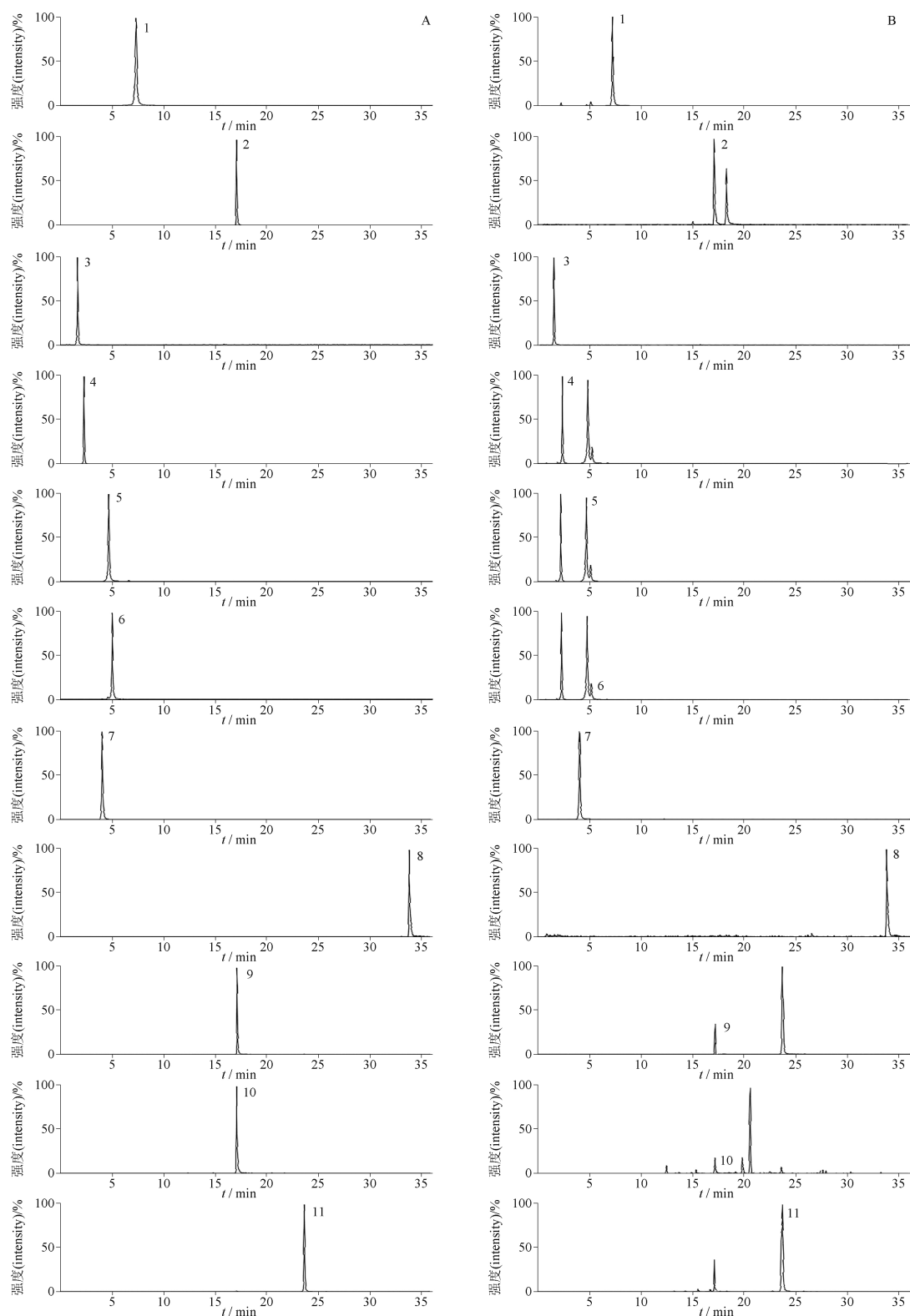
I. 阴性溶液正、负离子流图 (negative solution positive and negative ion flow chart) II. 对照品正、负离子流图 (positive and negative ion current diagram of reference substance) III. 样品正、负离子流图 (positive and negative ion flow diagram of the sample)

图 1 正离子模式下离子流图 (A) 和负离子模式下离子流图 (B)

Fig. 1 Ion chromatograms in positive ion mode (A) and ion chromatograms in negative ion mode (B)

**2.3.2 线性关系考察及定量限和检测限测定** 精密量取“2.2.1”项混合对照品溶液适量,用甲醇稀释

2.5、5、10、12.5、16.6、50 倍,得到 11 个成分的系列混合对照品溶液。分别精密吸取上述溶液 1 μL,



1. 咖啡酸 (caffeic acid) 2. 阿福豆苷 (afzelin) 3. 没食子酸 (gallic acid) 4. 新绿原酸 (neochlorogenic acid) 5. 绿原酸 (chlorogenic acid) 6. 隐绿原酸 (xyrythochlorogenic acid) 7. 红景天苷 (salidroside) 8. 紫丁香苷 (eleutheroside B) 9. 人参皂苷 Re (ginsenoside Re) 10. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (ginsenoside Rg<sub>1</sub>) 11. 人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)

图 2 混合对照品 (A) 和红五参胶囊供试品 (B) 的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of mixed reference substances (A) and Hongwushen capsules (B)

按“2.1”项下条件进样分析。以对照品进样浓度( $X$ )为横坐标,以峰面积( $Y$ )为纵坐标,绘制坐标曲线,计算得到各成分的回归方程和线性范围,见表2。结果显示,11个成分在各自的范围内呈良好的

线性关系,表明本方法线性良好。将混合对照品溶液逐步稀释,以信噪比  $S/N = 3$  和  $S/N = 10$  分别计算11个成分的检测限(LOD)和定量限(LOQ),结果见表2。

表2 回归方程、LOD和LOQ  
Tab. 2 Results of regression equation, LOD and LOQ

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	$r$	线性范围 (linear range)/(ng · $\mu\text{L}^{-1}$ )	LOD/ (ng · $\mu\text{L}^{-1}$ )	LOQ/ (ng · $\mu\text{L}^{-1}$ )
咖啡酸(caffeic acid)	$Y = 2.51 \times 10^9 X + 9.01 \times 10^5$	0.999 5	0.529 ~ 10.587	0.11	0.33
阿福豆苷(afzelin)	$Y = 5.29 \times 10^8 X + 3.58 \times 10^4$	0.999 0	0.028 ~ 0.564	0.01	0.02
没食子酸(gallic acid)	$Y = 6.07 \times 10^8 X + 4.09 \times 10^6$	0.999 1	2.890 ~ 57.792	0.40	0.80
新绿原酸(neochlorogenic acid)	$Y = 4.36 \times 10^8 X + 1.68 \times 10^6$	0.999 1	6.212 ~ 124.236	3.79	4.38
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 5.86 \times 10^5 X + 4.45 \times 10^6$	0.999 4	8.283 ~ 165.668	1.29	5.16
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	$Y = 1.19 \times 10^8 X + 6.50 \times 10^5$	0.999 1	7.377 ~ 147.533	3.42	6.84
红景天苷(salidroside)	$Y = 2.70 \times 10^7 X + 1.38 \times 10^6$	0.999 2	55.751 ~ 1 115.024	4.36	17.44
紫丁香苷(eleutheroside B)	$Y = 1.38 \times 10^7 X + 2.54 \times 10^5$	0.999 8	4.754 ~ 95.090	1.06	3.18
人参皂苷 Re(ginsenoside Re)	$Y = 2.39 \times 10^6 X + 7.07 \times 10^4$	0.999 5	9.104 ~ 182.074	0.84	2.52
人参皂苷 Rg <sub>1</sub> (ginsenoside Rg <sub>1</sub> )	$Y = 8.05 \times 10^5 X + 2.76 \times 10^4$	0.999 4	5.827 ~ 116.538	0.46	0.92
人参皂苷 Rd(ginsenoside Rd)	$Y = 3.21 \times 10^6 X + 3.88 \times 10^5$	0.999 1	31.786 ~ 635.712	15.35	23.03

**2.3.3 精密度试验** 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下条件,连续进样6次,测定峰面积,计算咖啡酸、阿福豆苷、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、红景天苷、紫丁香苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rd 峰面积的 RSD 分别为 2.0%、2.5%、2.5%、2.9%、1.8%、1.5%、1.8%、2.0%、2.8%、2.5%、2.5%,均 < 3%,表明仪器精密度良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一批次红五参胶囊样品(批号 20211001),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、6、12、18、24 h 按“2.1”项下条件进样分析,测定峰面积。所得咖啡酸、阿福豆苷、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、红景天苷、紫丁香苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rd 峰面积的 RSD( $n = 6$ )分别为 1.6%、1.6%、1.0%、4.7%、2.0%、0.77%、4.5%、1.0%、2.8%、1.5%、1.8%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.5 重复性试验** 取同一批次红五参胶囊(批号 20211001),分别精密称取低(0.75 g)、中(1.50 g)、高(2.25 g)3个水平样品量,每个水平3份样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取各供试

品溶液 1  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下条件进样分析,测定峰面积,计算含量,结果咖啡酸、阿福豆苷、没食子酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、红景天苷、紫丁香苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rd 的平均质量分数( $n = 9$ )分别为 0.012、0.001、0.036、0.313、0.417、0.413、4.357、0.031、0.996、1.122、2.536  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,RSD 分别为 1.7%、3.2%、0.74%、4.8%、3.1%、3.5%、3.3%、4.7%、4.0%、4.8%、4.3%,表明该方法重复性良好。

**2.3.6 加样回收率试验** 取同一批次(批号 20211001)已知含量的红五参胶囊内容物粉末6份,每份约 0.75 g,精密称定,加入与样品中各成分的已知含量相当的对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,精密吸取各供试溶液 1  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下条件进样分析,测定峰面积,分别计算11个成分的加样回收率。结果见表3,表明该方法准确度良好。

#### 2.4 样品含量测定

精密称取10批红五参胶囊样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 1  $\mu\text{L}$ ,按“2.2.2”项下液质联用条件进样分析,测定峰面积,计算含量。结果见表4。

表 3 加样回收率试验结果

Tab. 3 Experimental results of sample recovery rate

成分 (component)	原有量 (original)/ $\mu\text{g}$	加入量 (added)/ $\mu\text{g}$	测得量 (detected)/ $\mu\text{g}$	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean)/%	RSD/ %
咖啡酸(caffeic acid)	8.628 5	8.469 8	17.209 6	101.3	99.3	2.7
	8.638 8		16.838 7	96.8		
	8.633 1		16.798 9	96.4		
	8.626 2		17.369 0	103.2		
	8.631 9		16.968 2	98.4		
	8.635 4		17.085 2	99.8		
阿福豆苷(afzelin)	0.750 3	0.740 9	1.484 8	98.2	98.7	3.7
	0.751 2		1.450 5	93.5		
	0.750 7		1.515 5	102.3		
	0.750 1		1.496 6	99.8		
	0.750 6		1.517 9	102.6		
	0.750 9		1.465 9	95.6		
没食子酸(gallic acid)	27.010 8	26.006 4	53.376 9	101.4	101.5	1.6
	27.043 2		54.128 4	104.2		
	27.025 2		53.325 5	101.1		
	27.003 6		53.057 8	100.2		
	27.021 6		52.975 5	99.8		
	27.032 4		53.685 7	102.5		
新绿原酸(neochlorogenic acid)	234.468 8	232.942 5	473.782 6	102.7	98.0	2.7
	234.750 0		456.287 1	95.1		
	234.593 8		464.136 8	98.5		
	234.406 3		462.506 5	97.9		
	234.562 5		459.110 1	96.4		
	234.656 3		461.283 8	97.3		
绿原酸(chlorogenic acid)	313.102 2	310.627 5	609.060 5	95.3	97.8	3.7
	313.475 8		611.515 4	96.0		
	313.267 1		619.840 9	98.7		
	313.016 7		611.195 2	96.0		
	313.225 4		619.733 3	104.8		
	313.350 6		612.476 1	96.3		
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	309.573 8	306.130 6	611.327 9	98.6	97.1	1.0
	309.945 1		609.234 2	97.8		
	309.738 8		605.570 4	96.6		
	309.491 3		605.570 4	96.7		
	309.697 6		607.664 0	97.3		
	309.821 3		602.953 3	95.8		
红景天苷(salidroside)	3 268.757 0	3 233.569 6	6 557.991 9	101.7	99.7	1.9
	3 272.677 9		6 395.679 0	96.6		
	3 270.499 6		6 525.529 3	100.7		
	3 267.885 7		6 495.385 5	99.8		
	3 270.064 0		6 530.166 8	100.8		
	3 271.370 9		6 458.285 4	98.6		

表 3(续)

成分 (component)	原有量 (original)/ $\mu\text{g}$	加入量 (added)/ $\mu\text{g}$	测得量 (detected)/ $\mu\text{g}$	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (mean)/%	RSD/ %
紫丁香苷(eleutheroside B)	23.109 2	23.772 4	46.118 1	96.8	99.1	3.2
	23.137 0		46.572 3	98.7		
	23.121 6		48.071 2	105.0		
	23.103 1		46.027 3	96.4		
	23.118 5		46.935 7	100.2		
	23.127 7		46.390 6	97.9		
人参皂苷 Re(ginsenoside Re)	747.148 7	741.949 9	1 463.778 6	96.6	99.2	2.6
	748.045 0		1 490.154 5	100.0		
	747.547 1		1 456.205 3	95.5		
	746.949 6		1 501.122 7	101.7		
	767.447 5		1 502.950 8	101.8		
	747.746 2		1 485.976 1	99.5		
人参皂苷 Rg <sub>1</sub> (ginsenoside Rg <sub>1</sub> )	842.136 7	844.897 6	1 652.171 5	95.9	101.3	3.1
	843.146 9		1 690.982 6	100.4		
	842.585 7		1 722.031 5	104.1		
	841.912 2		1 690.982 6	100.5		
	842.473 4		1 722.031 5	104.1		
	842.810 2		1 714.269 3	103.1		
人参皂苷 Rd(ginsenoside Rd)	1 902.760 8	1 907.136 0	3 786.672 3	98.8	99.9	1.0
	1 905.043 2		3 794.450 7	99.1		
	1 903.775 2		3 821.675 3	100.6		
	1 902.253 6		3 825.564 5	100.9		
	1 903.521 6		3 825.564 5	100.8		
	1 904.282 4		3 794.450 7	99.1		

表 4 红五参胶囊中 11 个成分的含量测定(n=2)

Tab. 4 Content determination of 11 components in Hongwushen capsules

样品 批号 (sample No.)	含量(content)/(mg·g <sup>-1</sup> )										
	咖啡酸 (caffeic acid)	阿福 豆苷 (afzelin)	没食子酸 (gallic acid)	新绿原酸 (neochloro- genic acid)	绿原酸 (chlorogenic acid)	隐绿原酸 (cryptochloro- ogenic acid)	红景天苷 (salidro- side)	紫丁香苷 (eleuthero- side B)	人参皂苷 Re (ginseno- side Re)	人参皂苷 Rg <sub>1</sub> (ginseno- side Rg <sub>1</sub> )	人参皂苷 Rd (ginseno- side Rd)
20211001	0.011 5	0.000 8	0.036 0	0.312 5	0.417 3	0.412 6	4.357 4	0.030 8	0.995 8	1.121 4	2.536 0
20211002	0.010 4	0.000 9	0.037 1	0.311 6	0.416 7	0.413 8	4.356 3	0.031 0	0.994 9	1.122 4	2.537 2
20211003	0.012 3	0.001 0	0.036 8	0.312 3	0.413 7	0.414 9	4.355 7	0.031 6	0.996 0	1.122 0	2.536 1
20211004	0.011 1	0.000 9	0.038 2	0.314 4	0.413 3	0.415 5	4.356 0	0.030 9	0.995 2	1.123 5	2.535 7
20211005	0.010 5	0.001 2	0.035 8	0.315 2	0.417 4	0.410 6	4.356 6	0.031 8	0.994 4	1.121 6	2.535 8
20211006	0.013 3	0.001 0	0.036 4	0.312 6	0.413 9	0.412 7	4.358 1	0.032 1	0.995 7	1.123 8	2.537 6
20211007	0.012 0	0.000 7	0.037 7	0.313 9	0.412 8	0.411 7	4.355 9	0.030 6	0.993 4	1.121 8	2.536 9
20211008	0.011 4	0.001 1	0.036 2	0.315 1	0.416 1	0.412 8	4.356 7	0.031 4	0.995 9	1.120 4	2.538 2
20211009	0.013 4	0.001 4	0.034 9	0.314 9	0.415 8	0.415 3	4.355 6	0.030 3	0.996 7	1.121 2	2.537 8
20211010	0.013 1	0.001 1	0.036 7	0.312 4	0.412 6	0.411 5	4.354 8	0.031 5	0.998 5	1.122 5	2.536 5

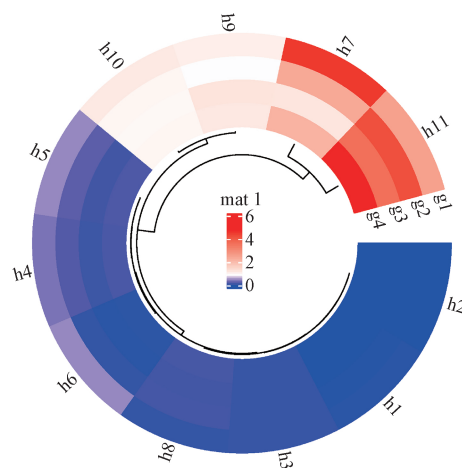
### 3 讨论

为了实现被测成分的快速分离,试验中考察了不同流动相体系(甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸-0.5 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵水溶液、乙腈-0.1%乙酸-1 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵水溶液、乙腈-0.1%乙酸-2 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵水溶液)进行梯度洗脱。结果发现乙腈的洗脱能力更强,有利于有效成分的分离检出;乙酸可以改善色谱峰的拖尾现象,使峰形更好;加入乙酸铵可以提高被测成分的质谱响应,因此选用乙腈-0.1%乙酸-1 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵水溶液为流动相洗脱体系。

前期进行的红五参胶囊特征图谱试验中进行了提取溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇)和提取时间(超声 20 min、超声 30 min、超声 40 min、冷浸 24 h)的考察,发现采用 70%甲醇、超声 30 min 时待测成分含量较高,最终选取以 70%甲醇为提取溶剂,超声 30 min 的提取方式提取有效成分。试验中发现将样品浓缩 1 倍,可以使更多的有效成分被检出,便于更好地进行质量控制。同时试验考察了不同浓缩方法及温度对待测成分的影响,包括常压浓缩(100 ℃)、减压浓缩(40、50、60 ℃)。不同处理方式下,待测成分的含量如图 3,综合各成分的提取情况,常压浓缩(100 ℃)的方式所提取出的样品中成分含量相对较高,因此选取常压浓缩样品的提取方式。

质谱分析中同分异构体有相同的裂解行为,难以区分,因此通过调整流动相比例进行分离,试验中实现了新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸以及人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rd 2 对同分异构体的分离,能在较短时间快速分离和检测目标化合物。

红五参胶囊具有缓解疲劳的功效,试验中所检测的 11 个成分均有相关的药理活性。研究发现红景天苷可以减轻氧化应激损伤,从而实现缓解疲劳的作用<sup>[7-8]</sup>。研究表明黄酮类化合物可以降低羟基自由基和 DPPH 自由基的半抑制浓度<sup>[9-10]</sup>;有机酸类成分通过对 DPPH 自由基的较强清除,来实现缓解疲劳的功效<sup>[11]</sup>,因此黄酮类成分阿福豆苷、有机酸类成分没食子酸、咖啡酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸均具有较好的缓解疲劳作用。研究发现紫丁香苷可能是通过减少乳酸在肌肉中的积累,来保护肌肉组织从而发挥缓解疲劳作用<sup>[12-13]</sup>。



g1. 常压浓缩-100 ℃ (normal pressure condense - 100 ℃) g2. 减压浓缩-40 ℃ (decompression concentration - 40 ℃) g3. 减压浓缩-50 ℃ (decompression concentration - 50 ℃) g4. 减压浓缩-60 ℃ (decompression concentration - 60 ℃)

h1. 咖啡酸 (caffeic acid) h2. 阿福豆苷 (afzelin) h3. 没食子酸 (gallic acid) h4. 新绿原酸 (neochlorogenic acid) h5. 绿原酸 (chlorogenic acid) h6. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid) h7. 红景天苷 (salidroside) h8. 紫丁香苷 (eleutheroside B) h9. 人参皂苷 Re (ginsenoside Re) h10. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> (ginsenoside Rg<sub>1</sub>) h11. 人参皂苷 Rd (ginsenoside Rd)

图 3 不同浓缩方式下供试品溶液中 11 个待测成分的含量

Fig. 3 The contents of 11 components in the test solutions under different extraction methods

人参皂苷 Rg<sub>1</sub>可加速调节线粒体生物合成的作用,通过 PGC-1 $\alpha$  途径最终达到缓解疲劳的效果<sup>[14]</sup>。人参皂苷 Re 可使下丘脑 5-HT、ACh 和 GA-BA 水平均显著性降低,DA 含量则显著性上升<sup>[15-16]</sup>,起到缓解疲劳的作用。原人参二醇型皂苷人参皂苷 Rd 可以提高肌糖原和肝糖原含量、降低血清中 LD 含量及提高 LDH 活力<sup>[17]</sup>来缓解疲劳。本研究针对红五参胶囊中的每味药材均建立多成分的含量测定方法,且被测的 11 个成分均与缓解疲劳活性相关,对临床应用及评价控制红五参胶囊质量具有重要意义。

试验采用 UPLC-MS/MS 法测定了 11 个有效成分,该方法灵敏度高,专属性强,重复性良好,能够在 36 min 内快速实现对目标成分的分离和含量测定,具有高选择性、高灵敏度的特点。11 个有效成分中红景天苷、阿福豆苷来源于红景天,紫丁香苷、新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸来源于刺五加,人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rd 来源于人参茎叶,咖啡酸、没食子酸为红景天和刺五加共有。本实验对每一味药均进行质量控制,以期更全面地控制红

五参胶囊的质量,为建立红五参胶囊的质量控制方法提供科学依据。

#### 参考文献

- [1] 程甲波. 刺五加抗疲劳谱效关系及质量评价研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2022  
CHENG JB. Study on Anti-fatigue Spectrum Effect Relationship and Quality Evaluation of *Acanthopanax senticosus*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2022
- [2] 谢靖宇, 郭传燕. 刺五加提取物对强迫游泳小鼠的抗疲劳能力的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(9):4277  
XIE JY, GUO CY. Effect of *Acanthopanax senticosus* extract on anti-fatigue ability of forced swimming mice[J]. Genomics Appl Biol, 2020, 39(9):4277
- [3] 师艺玮, 王洪玲, 黄慧莲, 等. UPLC-MS/MS法同时测定经典方剂槐花散中7个成分含量[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(2):219  
SHI YW, WANG HL, HUANG HL, et al. Simultaneous determination of 7 components in classic formula Huaihua powder by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2023, 43(2):219
- [4] 黄如玉, 唐瑞欣, 厉言, 等. UPLC-MS/MS法同时测定莲花清瘟胶囊中11种成分[J]. 中成药, 2023, 45(1):24  
HUANG RY, TANG RX, LI Y, et al. Simultaneous determination of eleven constituents in Lianhua Qingwen capsules by UPLC-MS/MS[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(1):24
- [5] 郑燕芳, 林逸凡, 朱铭星, 等. UPLC-MS/MS同时测定八宝丹中15个胆酸类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(12):2186  
ZHENG YF, LIN YF, ZHU MX, et al. Simultaneous determination of 15 bile acids in Babaodan by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(12):2186
- [6] 王博, 杨忠杰, 裴媛, 等. LC-MS/MS同时测定芪桂苓合剂中7个成分[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(12):2202  
WANG B, YANG ZJ, PEI Y, et al. Simultaneous determination of seven components in Qiguling mixture by LC-MS/MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(12):2202
- [7] 秦宁宇, 谢华, 赵安鹏, 等. 高原低氧环境下红景天苷对小鼠运动耐力的影响[J]. 浙江大学学报(医学版), 2022, 51(4):397  
QIN NN, XIE H, ZHAO AP, et al. Effects of salidroside on exercise tolerance of mice under high altitude hypoxia environment[J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2022, 51(4):397
- [8] 刘昕. 梔子花黄酮纯化工艺及其抗氧化与抗运动疲劳作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(2):27  
LIU X. Optimization of purification process of flavonoids of *Gardenia flower* and its anti-oxidant and anti-fatigue effects[J]. China Food Addit, 2023, 34(2):27
- [9] XIA F, ZHONG Y, LI M, et al. Antioxidant and anti-fatigue constituents of okra[J]. Nutrients, 2015, 7(10):8846
- [10] ANDRADE AWL, MACHADO KDC, MACHADO KDC, et al. In vitro antioxidant properties of the biflavonoid agathisflavone[J]. Chem Cent J, 2018, 12(1):75
- [11] CHENG J, QIU L, AHMAD N, et al. Screening of anti-fatigue active ingredients of *Eleutherococcus senticosus* via spectrum-effect relationship based on factor analysis and LC-MS/MS[J]. Nat Prod Res, 2023, 37(24):1
- [12] 彭烁. 罗非鱼抗氧化肽的制备及其抗疲劳功效研究[D]. 湛江:广东海洋大学, 2022  
PENG S. Preparation of Antioxidant Peptides from Tilapia and Its Anti-fatigue Effects Abstract[D]. Zhanjiang: Ocean University of Guangdong, 2022
- [13] HUANG LZ, HUANG BK, YE Q, et al. Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of *Acanthopanax senticosus*[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 133(1):213
- [14] 孔凡秀. 人参皂苷 R<sub>g1</sub>通过 PGC-1 $\alpha$ 途径抗疲劳及机制研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2021  
KONG FX. Research on Anti-fatigue and Mechanism of Ginsenoside R<sub>g1</sub> through PGC-1 $\alpha$  Pathway[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2021
- [15] 赵丽, 吴建忠, 岳明, 等. 一次力竭运动小鼠中脑单胺类神经递质的代谢特点[J]. 中国医学创新, 2014, 11(6):8  
ZHAO L, WU JZ, YUE M, et al. Branin monoamines neurotransmitters metabolism induced by a prolonged exhaustive exercise in mice[J]. Med Innov China, 2014, 11(6):8
- [16] 张祥, 张晶莹, 宋昕恬, 等. 人参皂苷的抗疲劳作用研究[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(5):12  
ZHANG X, ZHANG JY, SONG XT, et al. Study on anti-fatigue effects of ginsenoside[J]. J Anhui Agric Sci, 2018, 46(5):12
- [17] 王丽娜, 姜珊, 王溪竹, 等. 人参茎叶中原二醇型、原三醇型人参皂苷抗疲劳作用试验[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(8):81  
WANG LN, JIANG S, WANG XZ, et al. Study on anti-fatigue effect of protopanaxadiol-type Ginseng and protopanaxatriol-type Ginseng stem and leave saponin[J]. J Univ Vet Med, 2019, 55(8):81

(本文于2023年7月18日收到)