活血止痛制剂中三七的专属性鉴别方法研究

王峰，聂黎行*，于健东，戴忠，马双成*（中国食品药品检定研究院，北京 100050）

摘要 目的：建立活血止痛散和活血止痛胶囊中三七的专属性鉴别方法，并采用高分离度快速液相色谱－三重串联四极杆质谱（RRLC-QQQ/MS）对结果加以验证。**方法：**采用高效薄层色谱法研究三七与其混伪品人参、红参、三七茎叶的特征条带。以高效硅胶 G 薄层板为固定相，二氯甲烷－无水乙醇－水（70 ∶ 45 ∶ 6.5）展开，10% 硫酸乙醇溶液显色，105℃加热至条带清晰。分别置紫外光灯（365 nm）和日光下检视。RRLC-QQQ/MS 分析采用 Agilent Rapid Resolution HT SB-C18 (2.1 mm × 100 mm，1.8 μm) 色谱柱，以 5 mmol · L^{-1} 醋酸铵溶液－乙腈为流动相梯度洗脱。离子化模式为 ESI-，碎裂电压 100 V。**结果：**三七可检出三七皂苷 R1，未检出人参皂苷 Rb_3、人参皂苷 Rf。人参和红参可检出人参皂苷 Rb_3 和人参皂苷 Rf，未检出三七皂苷 R1。三七茎叶可检出人参皂苷 Rb_3，未检出三七皂苷 R1 或人参皂苷 Rg_1。以三七对照药材、三七皂苷 R1（应检出）和人参皂苷 Rb_3（不得检出）为对照，可实现活血止痛制剂中三七的专属性鉴别和人参（红参）或三七茎叶的非法掺杂投料检查。6 个厂家的 93 批样品均未发现人参、红参或三七茎叶冒充三七非法投料。RRLC-QQQ/MS 与高效薄层分析结果一致。**结论：**该方法简便、快速、灵敏、准确，可为含三七中成药的质量控制提供参考。

关键词： 活血止痛散；活血止痛胶囊；三七；专属性鉴别；高效薄层色谱法；高分离度快速液相色谱－三重串联四极杆质谱；人参；红参；三七茎叶

中图分类号：R282.5 **文献标识码：**A **文章编号：**1002-7777(2019)07-0760-07
doi:10.16153/j.1002-7777.2019.07.007

Study on Specific Identification Method of Notoginseng Radix et Rhizoma in Huoxue Zhitong Preparations

Wang Feng, Nie Lixing*, Yu Jiandong, Dai Zhong, Ma Shuangcheng* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish specific identification method of Notoginseng Radix et Rhizoma in Huoxue Zhitong Powders and Huoxue Zhitong Capsules and validate the results by rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry (RRLC-QQQ/MS). **Methods:** High performance thin layer chromatography (HPTLC) was used to study the characteristic bands of Notoginseng Radix et Rhizoma and its adulterants, such as Ginseng Radix et Rhizoma, Ginseng Radix et Rhizoma Rubra and Notoginseng Caulis et Folium. High performance silica gel G was used as the coating substance and a mixture of dichloromethane, anhydrous ethanol and water (70 ∶ 45 ∶ 6.5) was used as the mobile phase. 10%

基金项目：国家自然科学基金（编号 81303194）；中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金（编号 2017X1）
作者简介：王峰，主管药师，主要从事中药质量控制方法的研究；Tel：（010）67095387；E-mail：alioncn@126.com
通信作者：聂黎行；Tel：（010）67095313；E-mail：nielixing@163.com
马双成；Tel：（010）67095272，67095887；E-mail：masc@nifdc.org.cn

solution of sulfuric acid in ethanol was sprayed and the plate was heated at 105℃ until the bands were distinct. The plates were examined in daylight and under ultraviolet light at 365 nm. The RRLC-QQQ/MS analysis was performed on an Agilent Rapid Resolution HT SB-C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) column. The mobile phase was composed of acetonitrile and 5 mmol · L^{-1} ammonium acetate with grade elution. Ionization mode was ESI- and ragmentation voltage was 100 V. **Results:** Notoginsenoside R1 was detected in Notoginseng Radix et Rhizoma while ginsenoside Rb_3 or ginsenoside Rf was not detected. Ginsenoside Rb_3 and ginsenoside Rf were detected in Ginseng Radix et Rhizoma and Ginseng Radix et Rhizoma Rubra while Notoginsenoside R1 was not detected. Ginsenoside Rb_3 was detected in Notoginseng Caulis et Folium while notoginsenoside R1 or ginsenoside Rg_1 was not detected. Using Notoginseng Radix et Rhizoma as reference medicinal material, notoginsenoside R1 reference substance (should be detected) and ginsenoside Rb_3 reference substance (should not be detected) as references, specific identification of Notoginseng Radix et Rhizoma and test of illegal adulteration of Ginseng Radix et Rhizoma, Ginseng Radix et Rhizoma Rubra or Notoginseng Caulis et Folium in Huoxue Zhitong Preparations could be achieved. Illegal adulteration of Ginseng Radix et Rhizoma, Ginseng Radix et Rhizoma Rubra or Notoginseng Caulis et Folium was not found in 93 batches of samples from 6 manufactures. Results of RRLC-QQQ/MS were consistent with those of HPTLC. **Conclusion:** The established method is simple, fast, sensitive, accurate and can provide references for quality control of Chinese patent medicines containing Notoginseng Radix et Rhizoma.

Keywords: Huoxue Zhitong Powders; Huoxue Zhitong Capsules; Notoginseng Radix et Rhizoma; specific identification; high performance thin layer chromatography (HPTLC); rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry (RRLC-QQQ/MS); Ginseng Radix et Rhizoma; Ginseng Radix et Rhizoma Rubra; Notoginseng Caulis et Folium

活血止痛散和活血止痛胶囊由当归、三七、乳香（制）、冰片、土鳖虫、自然铜（煅）六味药组成，具有活血散瘀、消肿止痛的作用，用于跌打损伤、淤血肿痛。活血止痛散和活血止痛胶囊现行标准收载于《中华人民共和国药典》2015年版一部[1]，主要包括当归、三七、土鳖虫的显微鉴别，自然铜的理化鉴别，冰片、当归、三七的薄层鉴别和当归的含量测定项。三七是活血止痛制剂中一味贵细原料药，具有止血活血的药理活性[2-5]，在方中起到补血、散瘀定痛的作用[6]。近年来，随着三七价格的不断走高，出现了以价格较低的人参（红参）或三七茎叶冒充三七投料的现象[7-9]。现行标准采用薄层色谱法鉴别三七，分离度低，斑点（条带）重叠，专属性差。三七与其充伪品亲源关系相近，化学成分相似，可采用分子鉴定[10-13]或液相色谱[14-15]等技术进行鉴别。三七与三七茎叶可通过显微法加以区分。但上述方法操作繁琐，分析时间较长，所用仪器、试剂昂贵，对分析人员的要求也较高，故需要建立一种简便、快捷的鉴别方法。本文采用高效薄层色谱法，针对三七、人参、三七茎叶的特有成分，建立了活血止痛制剂中三七的专属性鉴别方法，并采用高分离度快速液相色谱–三重串联四极杆质谱（RRLC–QQQ/MS）对结果加以验证。

1 仪器与试药

1.1 仪器

CAMAG Linomat–5半自动点样台，CAMAG REPORTSTAR薄层色谱摄像系统，METTLER AE240百万分之一电子天平，Agilent 1200高分离度快速液相色谱–6410B三重四极杆质谱联用系统。

1.2 试药

当归对照药材（批号：120927–201014）、三七对照药材（批号：120941–200807）、乳香（埃塞俄比亚乳香）对照药材（批号：120970–200904）、土鳖虫（地鳖）对照药材（批号：121533–200702）、人参对照药材（批号：120917–200609）、红参对照药材（批号：121045–200604）、冰片（批号：110743–

200905）、三七皂苷R1对照品（批号：110745-200607）、人参皂苷Rg_1对照品（批号：110703-200726）、人参皂苷Re对照品（批号：110754-200822）、人参皂苷Rf对照品（批号：111719-200703）、人参皂苷Rb_1对照品（批号：110704-200318）、人参皂苷Rb_3对照品(批号：111686-200501)，均来自中国食品药品检定研究院；人参皂苷Rd对照品（批号：171101）、人参皂苷Rc对照品（批号：170507）购于吉林大学，纯度均大于98%；自然铜、三七茎叶购于同仁堂药店。3个厂家（编号分别为A、B、C）的活血止痛散6批、3个厂家（编号分别为D、E、F）的活血止痛胶囊87批，均为国家药品评价抽验样品。预制高效硅胶薄层板（HPTLC Silica gel 60，20×10 cm）购于Merk公司。分析纯乙醚、二氯甲烷、甲醇、无水乙醇、正丁醇、硫酸、五氧化二磷、醋酸铵购于北京化学试剂公司，色谱纯乙腈购于Merck公司，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取活血止痛散/胶囊2 g，加乙醚40 mL，超声处理（功率：300 W，频率：40 kHz）10 min，滤过，药渣挥去乙醚，加甲醇30 mL，超声处理（功率：300 W，频率：40 kHz）15 min，滤过，滤液蒸干，残渣加水10 mL使溶解，用水饱和的正丁醇振摇提取2次，每次15 mL，合并正丁醇液，用水洗涤2次，每次10 mL，正丁醇液蒸干，残渣加甲醇2 mL使溶解，作为供试品溶液。

2.2 三七对照药材溶液的制备

取三七对照药材0.5 g，加甲醇30 mL，按“2.1”方法同法制成对照药材溶液。

2.3 人参、红参、三七茎叶对照溶液的制备

取人参、红参、三七茎叶粉末各0.5 g，加甲醇30 mL，按“2.1”方法分别制成人参、红参和三七茎叶对照溶液。

2.4 缺三七阴性对照溶液的制备

取当归、乳香、冰片、土鳖虫、自然铜，按处方制得缺三七阴性样品，照“2.1”方法制得缺三七阴性对照溶液。

2.5 投人参、投红参、投三七茎叶假阳性对照溶液的制备

取人参对照药材、红参对照药材、三七茎叶粉末，加当归、乳香、冰片、土鳖虫、自然铜，按处方分别制得投人参、投红参、投三七茎叶假阳性对照样品，按“2.1”方法制得相应假阳性对照溶液。

2.6 对照品溶液的制备

取三七皂苷R1、人参皂苷Rg_1、人参皂苷Re、人参皂苷Rf、人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rd、人参皂苷Rc对照品适量，加甲醇分别制得浓度为0.2 $mg\cdot mL^{-1}$的对照品溶液。

2.7 高效薄层色谱条件[16]

固定相：高效硅胶G薄层板。点样量：1 μL，点样后薄层板置五氧化二磷干燥器中真空干燥2 h以上。展开剂：二氯甲烷-无水乙醇-水（70∶45∶6.5），层析缸预平衡15 min，在相对湿度16%、温度18℃条件下展开。显色剂：10%硫酸乙醇溶液，105℃加热至条带清晰。检视：分别置紫外光灯（365 nm）和日光下检视。

2.8 RRLC-QQQ/MS条件

色谱条件：色谱柱：Agilent Rapid Resolution HT SB-C18（2.1 mm× 100 mm，1.8 μm），柱温：30℃，流动相： 5 $mmol\cdot L^{-1}$醋酸铵溶液-乙腈梯度洗脱（0~20 min，乙腈15%→45%；20~30 min，乙腈45%→75%），流速：0.4 $mL\cdot min^{-1}$，进样量：1 μL。

质谱条件：离子化模式：ESI-，离子源温度：120℃，毛细管电压：3500 V，干燥气温度：300℃，干燥气流速：9 $L\cdot min^{-1}$，雾化气压力：30 Psi。扫描方式：全扫描（SCAN），锥孔电压：30 V，碰撞能量：100 V。

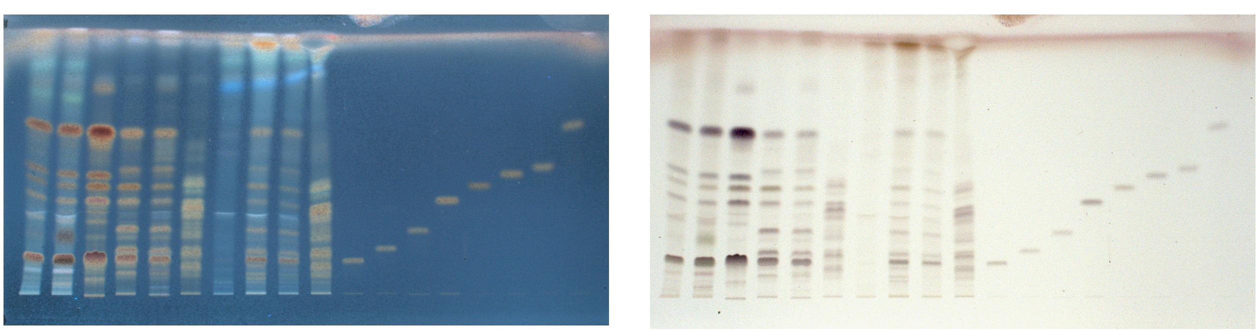
2.9 三七、人参、红参、三七茎叶的HPTLC薄层鉴别特征

取活血止痛散和活血止痛胶囊供试品溶液各1份，三七对照药材溶液，人参、红参、三七茎叶对照溶液，缺三七阴性对照溶液，投人参、投红参、投三七茎叶假阳性对照溶液，人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rb_3、人参皂苷Rc、人参皂苷Rd、人参皂苷Re、三七皂苷R1、人参皂苷Rf和人参皂苷Rg_1对照品溶液，点样，展开，色谱图见图1。由表1可见，三七皂苷R1是三七的特征成分，三七与人参（红参）的区别在于三七可检出三七皂苷R1，未检出人参皂苷Rb_3或人参皂苷Rf；人参和红参可检出人参皂苷Rb_3和人参皂苷Rf，未检出三七皂苷R1。

三七与三七茎叶的区别在于三七可检出三七皂苷R1和人参皂苷Rg_1，未检出人参皂苷Rb_3；三七茎叶可检出人参皂苷Rb_3，未检出三七皂苷R1或人参皂苷Rg_1。采用本文的高效薄层色谱条件，以三七对照药材、三七皂苷R1（应检出）和人参皂苷Rb_3（不得检出）为对照，可实现活血止痛制剂中三七的专属性鉴别和人参（红参）或三七茎叶的非法掺杂投料检查，阴性或假阳性样品无干扰。

表 1　三七、人参、红参、三七茎叶的 HPTLC 鉴别特征

试药	人参皂苷 Rb_1	人参皂苷 Rb_3	人参皂苷 Rc	人参皂苷 Rd	人参皂苷 Re	三七皂苷 R1	人参皂苷 Rf	人参皂苷 Rg_1
活血止痛散	+	－	+	+	+	+	－	+
活血止痛胶囊	+	－	+	+	+	+	－	+
三七	+	－	+	+	+	+	－	+
人参	+	+	+	+	+	－	+	+
红参	+	+	+	+	+	－	+	+
三七茎叶	+	+	+	+	+	－	－	－
缺三七阴性对照	－	－	－	－	－	－	－	－
投人参假阳性对照	+	+	+	+	+	－	+	+
投红参假阳性对照	+	+	+	+	+	－	+	+
投三七茎叶假阳性对照	+	+	+	+	+	－	－	－

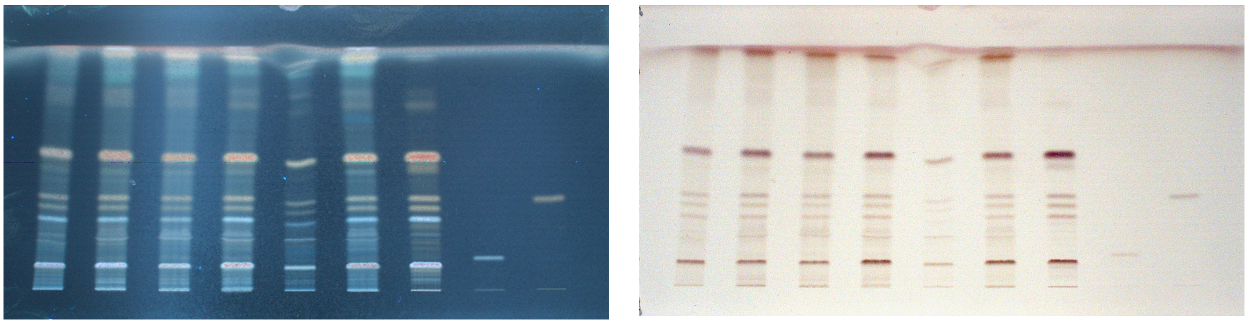


1. 活血止痛散；2. 活血止痛胶囊；3. 三七对照药材；4. 人参；5. 红参；6. 三七茎叶；7. 缺三七阴性样品；8. 投人参假阳性样品；9. 投红参假阳性样品；10. 投三七茎叶假阳性样品；11. 人参皂苷 Rb_1；12. 人参皂苷 Rb_3；13. 人参皂苷 Rc；14. 人参皂苷 Rd；15. 人参皂苷 Re；16. 三七皂苷 R1；17. 人参皂苷 Rf；18. 人参皂苷 Rg_1。

图 1　三七、人参、红参、三七茎叶的 HPTLC 鉴别特征

2.10 活血止痛制剂中三七的专属性鉴别

取活血止痛散和活血止痛胶囊、三七对照药材溶液、三七皂苷R1和人参皂苷Rb_3对照品溶液，点样，展开，显色，检视。结果93批抽样均检出三七皂苷R1和三七对照药材对应的条带，未检出与人参皂苷Rb_3对应的条带，所有批次样品均未发现人参、红参或三七茎叶非法投料，合格率为100%。不同厂家样品色谱图见图2。



1 2 3 4 5 6 7 8 9　　1 2 3 4 5 6 7 8 9

365 nm 紫外光灯下检视　　日光下检视

1～3. A、B、C 3个厂家的活血止痛散；4～6. D、E、F 3个厂家的活血止痛胶囊；
7. 三七对照药材；8. 人参皂苷Rb_3；9. 三七皂苷R1。

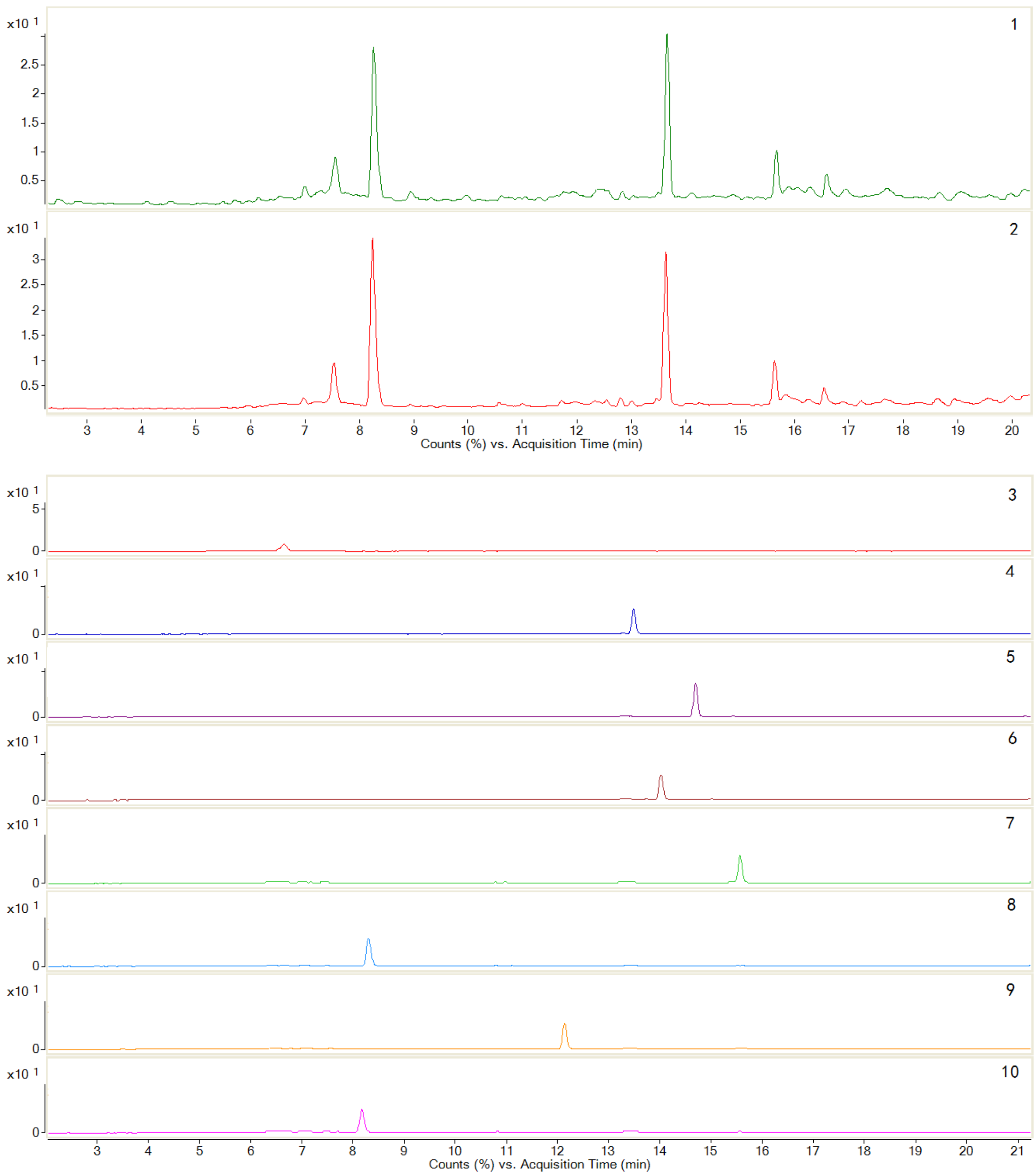
图 2 样品检测结果

2.11 RRLC-QQQ/MS验证

取“2.1”项下的供试品溶液和“2.6”项下的各对照品溶液，分别稀释1倍，依法测定。样品和对照品总离子流图见图3，经与各对照品的保留时间、一二级质谱母、子离子m/z值（见表2）比对，结果显示活血止痛散和活血止痛胶囊中均可检出人参皂苷Rb_1、人参皂苷Rc、人参皂苷Rd、人参皂苷Re、三七皂苷R1和人参皂苷Rg_1，未检出人参皂苷Rb_3和人参皂苷Rf，与HPTLC检测结果一致。

表 2 各对照品保留时间和一二级质谱信息

化合物	保留时间 /min	母离子 /（m/z）	子离子 /（m/z）
三七皂苷 R1	6.65	931.6	495.4
人参皂苷 Rb_1	13.49	1107.8	588.4
人参皂苷 Rb_3	14.69	1077.7	568.4
人参皂苷 Rc	14.02	1077.7	568.4
人参皂苷 Rd	15.56	1008.6	945.6
人参皂苷 Re	8.30	1008.6	945.6
人参皂苷 Rf	12.13	962.6	799.5
人参皂苷 Rg_1	8.16	859.5	799.5



1. 活血止痛散；2. 活血止痛胶囊；3. 三七皂苷R1对照品溶液；4. 人参皂苷Rb_1对照品溶液；
5. 人参皂苷Rb_3对照品溶液；6. 人参皂苷Rc对照品溶液；7. 人参皂苷Rd对照品溶液；
8. 人参皂苷Re对照品溶液；9. 人参皂苷Rf对照品溶液；10. 人参皂苷Rg_1对照品溶液。

图3 RRLC-QQQ/MS总离子流图

3 讨论

3.1 三七不同部位HPTLC色谱行为的考察

试验尚对三七的主根（传统药用部位）、支根（筋条）及根茎（剪口）的皂苷类成分进行了比较，结果显示三者HPTLC薄层色谱基本一致，由于中国药典已将支根和根茎列为三七药材的合法来源，故不再继续讨论。

3.2 薄层板的选择

比较了不同厂家的普通和高效薄层硅胶板的分离效果，结果普通薄层板均不能将人参皂苷Re与三七皂苷R1、人参皂苷Rb_1与人参皂苷Rb_3有效分离，高效薄层板中以Merk公司产品分离效果最好。

3.3 温度和湿度的影响

温度和相对湿度对条带分离度影响很大，相

对湿度应控制在20%以下，温度在10～25℃均可。薄层板点样后应先干燥，再立即放入平衡好的展开缸内展开。

3.4 点样量的影响

三七对照药材和样品中人参皂苷Rb_1含量较高，条带扩散拖尾会影响人参皂苷Rb_3的检查，试验中可根据展开情况适当降低点样量，以获得最好的结果。

参考文献：

[1] 中华人民共和国药典：一部[S]. 2015：1292- 1293.

[2] 孙雯怡，罗旺辉，周铖，等. 三七总皂苷预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 湖南中医药大学学报，2018，38（1）：21-26.

[3] 李泽东，赵荣华，张兆传，等. 三七皂苷合成及调控机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24（14）：71-77.

[4] 谭亮. 三七皂苷R1药理作用的研究进展[J]. 中国药理学通报，2018，34（5）：604-607.

[5] 陈社带，邹燕，赵伟国，等. 三七总皂苷对大鼠缺血心肌血管新生及相关生长因子的影响[J]. 辽宁医学院学报，2015，36（1）：7-9.

[6] 关志宇，濮存海，段广勋. 活血止痛胶囊处方考证及研究进展[J]. 食品与药品，2006，8（2A）：17-21.

[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] 钟玉兰，乐智勇. 利用近红外光谱技术快速鉴别三七粉及其伪品[J]. 江西中医药大学学报，2018，30（3）：70-76.

[9] 李争. 三七及其混伪品鉴别方法研究[J]. 亚太传统医药，2017，13（13）：27-28.

[10] 陈康，蒋超，金艳，等. 人参属中药材高分辨率熔解曲线鉴定及其方法学考察[J]. 药物分析杂志，2017，37（1）：64-73.

[11] 刘丽，肖炳燚，聂平，等. 采用RAPD技术对人参属的亲缘关系和鉴别的分析[J]. 药物分析杂志，2016，36（2）：255-260.

[12] 刘丽，肖炳燚，罗晖明，等. 三七特异性PCR真伪鉴别方法研究[J]. 药物分析杂志，2016，36（5）：878-886.

[13] 刘丽，肖炳燚，罗晖明，等. 多重PCR方法同时鉴别人参、西洋参、三七[J]. 药物分析杂志，2016，36（4）：668-677.

[14] 韩丽丽，孙俊英，马全龙. 三七粉及其一种伪品的鉴别检验研究[J]. 时珍国医国药，2016，27（12）：2932-2933.

[15] 徐倩. HPLC法鉴别两种三七片伪品的应用分析[J]. 药品评价，2016，13（14）：40-50.

[16] 颜玉贞，余琼希，谢培山. 三七药材高效薄层色谱指纹图谱分析：色谱条件优化的再研究[J]. 中药新药与临床药理，2007，18（4）：303-305.

（收稿日期 2019年2月9日 编辑 王雅雯）