

专栏：中成药掺伪打假研究

基于UPLC-MS/MS技术检查银柴颗粒中柴胡掺伪的鉴别研究

陈馥, 黄俊忠, 徐万帮, 刘潇潇* (广东省药品检验所, 国家药品监督管理局药品快速检验技术重点实验室, 广东省药品监督管理局粤港澳大湾区中药标准研究重点实验室, 广州 510700)

摘要 目的: 建立银柴颗粒中藏柴胡的检查方法, 考察生产企业是否存在使用藏柴胡代替柴胡投料的现象。方法: 采用高效液相色谱-质谱法, 选择Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm × 3 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈(A)-水(B), 二元梯度洗脱, 流速0.3 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C; 采用质谱检测器, 电喷雾负离子模式(ESI⁻), 进行多反应监测(MRM), 选择 m/z 943.5 → 797.5、 m/z 943.5 → 635.4和 m/z 943.5 → 781.5为检测离子对。结果: 尼泊尔柴胡皂苷K在0.1~5 μg · mL⁻¹浓度范围与峰面积呈现出良好的线性关系($r=0.9920$), 仪器精密度RSD($n=6$)为0.57%, 样品重复性RSD($n=6$)为0.95%。以掺杂藏柴胡不得过10%为限度, 对27批银柴颗粒样品进行筛查, 结果4批银柴颗粒分别掺杂藏柴胡59%、21%、32%、71%, 超过拟定限度。结论: 该方法经过方法学验证, 灵敏、准确, 可作为银柴颗粒中柴胡掺杂藏柴胡的检查方法, 为打击藏柴胡掺伪提供有力技术支持。

关键词: 尼泊尔柴胡皂苷K; 藏柴胡; 银柴颗粒; 高效液相色谱-质谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)04-0426-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.04.009

Identification of *Bupleurum chinense* in Yinchai Granules by UPLC-MS/MS

Chen Fu, Huang Junzhong, Xu Wanbang, Liu Xiaoxiao* (Guangdong Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Rapid Testin Technology of Drug, GDMPA Greater Bay Area (GBA) Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Standard Research, Guangzhou 510700, China)

Abstract Objective: To establish the identification method of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in Yinchai granules and investigate whether there exists a phenomenon of using *B. marginatum* var. *stenophyllum* to replace *B. chinense* in the manufacture enterprises. **Method:** UPLC-MS/MS was used with Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm × 3 mm, 1.8 μm) as analytical column, acetonitrile (A)-water(B) as a phase of step gradient elution, the flow rate was 0.3 mL · min⁻¹, the column temperature was 40 °C. The target compound was analyzed under multiple reaction monitoring (MRM) mode with an ESI⁻ source operating in negative ion mode, m/z 943.5 → 797.5, m/z 943.5 → 635.4, m/z 943.5 → 781.5 were selected as the detection ion pairs. **Results:** Nepesaikosaponin K showed a good linear relationship in the range of 0.1-5 μg · mL⁻¹ with a r at 0.9920, the precision RSD ($n=6$) of apparatus was 0.57%, the repeatability RSD ($n=6$) of sample was 0.95%. Total of 27 batches of Yinchai granule samples were screened with the limit that the doping of *B. marginatum* var. *stenophyllum* should not exceed 10%.

作者简介: 陈馥 Tel: (020) 81863096; E-mail: 418675499@qq.com

通信作者: 刘潇潇 Tel: (020) 81863096; E-mail: liuxiaoxiao@gdldc.org.cn

The results showed that the doping of *B. marginatum* var. *stenophyllum* in 4 batches of Yinchai granules was 59%, 21%, 32% and 71%, which exceeded the proposed limit. **Conclusion:** The method has been verified by methodology, it is sensitive and accurate, and could be applied to detect the *B. marginatum* var. *stenophyllum* in the Yinchai granules.

Keywords: Nepesaikosaponin K; *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*; Yinchai granules; UPLC-MS/MS

银柴颗粒质量标准WS3-B-2612-97收载于《卫生部药品标准》^[1]中药成方制剂第十三册，处方由忍冬藤、芦根、薄荷、柴胡、枇杷叶5味中药加工制成。其中柴胡为常用大宗药材，有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的功效^[2-4]。2020年版《中华人民共和国药典》一部^[5]收载柴胡为伞形科植物柴胡*Bupleurum chinense* DC.和狭叶柴胡*B. scorzonifolium* Wild.的干燥根，按性状不同，分别习称“北柴胡”和“南柴胡”。柴胡属植物品种较多，分布广泛，且性状特征较为相似，常有混伪品与正品柴胡混淆用药的情况^[6-9]。藏柴胡来源于伞形科植物窄竹叶柴胡*Bupleurum marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum* (Wolf) Shan et Y. Li的干燥根，其柴胡皂苷a、b的含量约为北柴胡的2~3倍^[10-12]，但价格约为北柴胡的1/2，为柴胡较常见的混伪品种。若含柴胡中药制剂中掺入藏柴胡，则改变了药品的药效物质基础，严重影响药品的质量和疗效^[13-14]。

本课题组对藏柴胡进行了系统的研究，发现藏柴胡中尼泊尔柴胡皂苷K（Nepesaikosaponin K）含量极高，约为其他种柴胡的40倍，且不同产地不同批次药材中的含量均较稳定^[15]。因此，尼泊尔柴胡皂苷K可作为藏柴胡的特征成分区分于其他柴胡。本研究拟在前期工作的基础上对银柴颗粒开展藏柴胡掺杂检查研究，为打击药品掺杂使假行为、保障药

品质量安全提供技术支撑。

1 仪器与试药

1.1 仪器

液相色谱-质谱联用仪（Xevo TQ-S，沃特世公司），超声清洗器（KQ-300DE型，昆山市超声仪器有限公司），电子天平（CP225D，赛多利斯）。

1.2 试剂与样品

乙腈（质谱纯，默克公司），甲醇、氨水（分析纯，广州试剂厂），Milli-Q纯水。尼泊尔柴胡皂苷K对照品（批号7032，含量98%，上海诗丹德标准技术服务有限公司）。

收集藏柴胡药材12批、北柴胡药材11批、南柴胡4批。本试验中所有药材均经广东省药品检验所中药材（饮片）室林锦锋主任中药师鉴定。银柴颗粒共27批，来自8个生产企业，企业A 4批，企业B 3批，企业C 5批，企业D 4批，企业E 3批，企业F 3批，企业G 3批，企业H 2批。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Agilent Eclipse Plus C₁₈（100 mm × 3 mm，1.8 μm）色谱柱，流动相为乙腈（A）-水（B），按表1程序进行梯度洗脱；流速0.3 mL · min⁻¹，柱温40 ℃，进样量1 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间 /min	比例 /%	
	流动相 A	流动相 B
0~3	25 → 30	75 → 70
3~30	30 → 50	70 → 50
30~31	50 → 90	50 → 10
31~35	90	10
35~36	90 → 25	10 → 75

2.2 质谱条件

采用电喷雾负离子模式 (ESI⁻)；多反应离子监测 (MRM)；毛细管电压3.5 kV；干燥气温度550 ℃；干燥气流速800 L·h⁻¹。选择 m/z 943.5→797.5、 m/z 943.5→635.4和 m/z 943.5→781.5为检测离子对，锥孔电压均为30 V，碰撞能量均为40 V。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液

取尼泊尔柴胡皂苷K对照品 0.01 g，精密称定，加甲醇制成每1 mL含0.5 μg的溶液，即得。

2.3.2 供试品溶液

取本品适量，混匀，研细，取约相当于柴胡0.5 g的样品，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入含5%浓氨试液的甲醇溶液25 mL，密塞，称量，超声处理（功率350 W，频率37 kHz）30 min，取出，放冷，再称量，用含5%浓氨试液的甲醇溶液补足减失的量，摇匀，用0.22 μm微孔滤膜滤过，即得。

2.3.3 不同柴胡药材样品溶液

取收集的柴胡药材（藏柴胡12批、北柴胡11批、南柴胡4批）各3 g，分别加水200 mL，煎煮2次，每次2 h，离心，合并上清液，浓缩至约

10 mL，称量；取约相当于柴胡0.5 g的浓缩液，精密称定，按“2.3.2”项方法制备各柴胡药材样品溶液。

2.3.4 对照制剂溶液

按银柴颗粒的处方和制法，取北柴胡和处方中其余4味药材，制备对照制剂，按“2.3.2”项方法制备对照制剂溶液。

2.3.5 藏柴胡阳性样品溶液

按银柴颗粒的处方和制法，取藏柴胡和处方中其余4味药材，制备藏柴胡阳性样品，按“2.3.2”项方法制备藏柴胡阳性样品溶液。

2.3.6 柴胡阴性样品溶液

按银柴颗粒的处方和制法，取处方中除柴胡外的4味药材，制备柴胡阴性样品，按“2.3.2”项方法制备柴胡阴性样品溶液。

2.4 藏柴胡指标成分的确定

取不同柴胡药材样品溶液依照“2.1”“2.2”项条件进行检测，以其MRM色谱图中与尼泊尔柴胡皂苷K对照品保留时间一致的色谱峰的峰面积进行计算，结果发现不同种柴胡中均含有该化合物，但是藏柴胡中该化合物含量高，约为柴胡（北柴胡、南柴胡）的40倍（以 m/z 943.5→797.5特征离子对峰面积计），结果见表2。

表 2 各柴胡药材中特征离子对的尼泊尔柴胡皂苷 K 峰面积检测

药材	峰面积		
	m/z 943.5→635.4	m/z 943.5→781.5	m/z 943.5→797.5
藏柴胡-001	1065522	598632	1708070
藏柴胡-002	964307	545732	1536765
藏柴胡-003	1588315	891685	2508990
藏柴胡-004	1129800	637007	1808438
藏柴胡-005	1245133	704537	1998583
藏柴胡-006	2729798	1529444	4345447
藏柴胡-007	1256059	712458	2004449
藏柴胡-008	1672669	944698	2682546
藏柴胡-009	1485883	840101	2382367
藏柴胡-010	1270786	720451	2024223
藏柴胡-011	1159472	654783	1859212

续表 2

药材	峰面积		
	<i>m/z</i> 943.5→635.4	<i>m/z</i> 943.5→781.5	<i>m/z</i> 943.5→797.5
藏柴胡-012	949570	546376	1545957
北柴胡-001	38167	27291	65000
北柴胡-002	42232	29505	73571
北柴胡-003	56258	38391	94707
北柴胡-004	44731	30640	76535
北柴胡-005	12370	13748	20702
北柴胡-006	34638	24957	59871
北柴胡-007	34808	25629	57503
北柴胡-008	40473	29397	66013
北柴胡-009	43493	30316	70382
北柴胡-010	30043	22195	47668
北柴胡-011	55245	39303	93319
南柴胡-001	2160	985	2644
南柴胡-002	1554	516	1603
南柴胡-003	1833	605	2354
南柴胡-004	7672	3577	10466

2.5 专属性考察

取对照制剂溶液、藏柴胡阳性样品溶液、柴胡阴性样品溶液，依照“2.1”“2.2”项条件进行检测，以*m/z* 943.5→797.5的色谱图中与尼泊尔柴胡皂苷K对照品保留时间一致的色谱峰（峰1）的峰面

积进行计算，结果显示，藏柴胡阳性样品（3批）中尼泊尔柴胡皂苷K的*m/z* 943.5→797.5色谱峰（峰1）的平均峰面积约为对照制剂的100倍，柴胡阴性样品中特征离子均未检出，阴性无干扰，结果见表3、图1~3。

表 3 制剂的专属性考察

样品	峰面积		
	<i>m/z</i> 943.5 → 635.4	<i>m/z</i> 943.5 → 781.5	<i>m/z</i> 943.5 → 797.5
藏柴胡阳性样品-001	691096	384075	1078986
藏柴胡阳性样品-002	447957	246463	692473
藏柴胡阳性样品-003	405854	226873	636959
对照制剂	3997	2648	6941
柴胡阴性样品	—	—	—

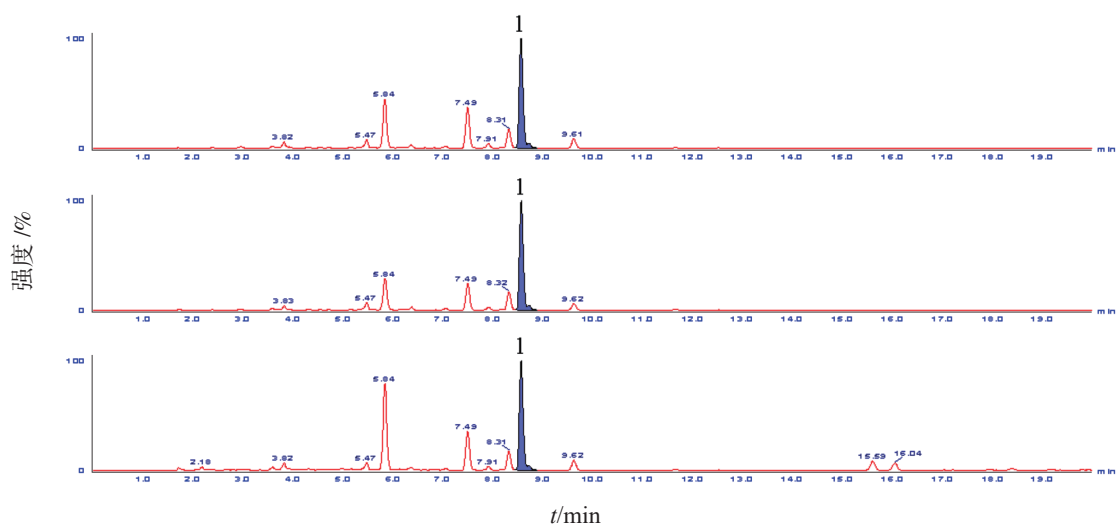


图1 藏柴胡阳性样品 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5、 m/z 943.5 $\rightarrow$ 635.4和 m/z 943.5 $\rightarrow$ 781.5的MRM图

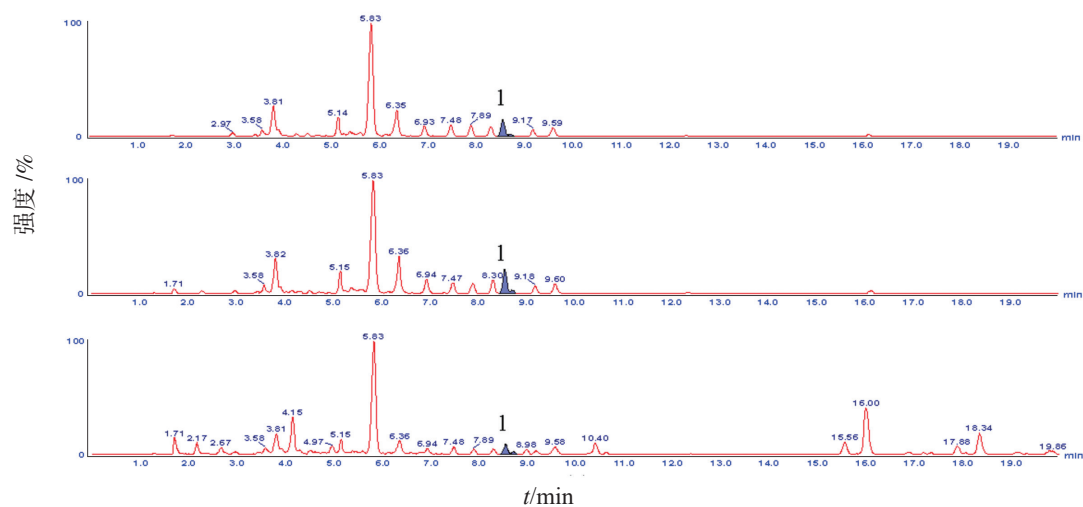


图2 对照试剂 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5、 m/z 943.5 $\rightarrow$ 635.4和 m/z 943.5 $\rightarrow$ 781.5的MRM图

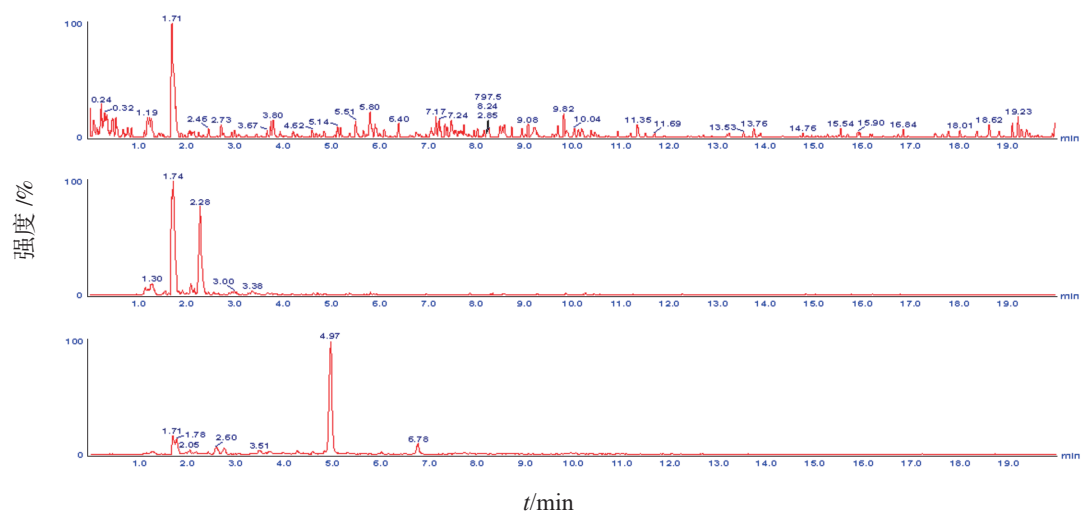


图3 柴胡阴性样品 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5、 m/z 943.5 $\rightarrow$ 635.4和 m/z 943.5 $\rightarrow$ 781.5的MRM图

2.6 检测限测定

按银柴颗粒处方、制法与“2.3.2”项方法,制备相当于北柴胡中掺1%藏柴胡样品溶液。依照“2.1”“2.2”项条件进行检测,结果 m/z 943.5 $\rightarrow$ 635.4、 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5、 m/z 943.5 $\rightarrow$ 781.5的MRM图中尼泊尔柴胡皂苷K色谱峰(峰1)的信噪比均大于10。因此,该方法检测限为银柴颗粒中柴胡掺伪1%,即每1 g银柴颗粒中掺藏柴胡4.6 mg,即可检出。

2.7 精密度考察

取藏柴胡阳性样品溶液,依照“2.1”“2.2”项条件,连续进样6次,以 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷K色谱峰(峰1)的峰面积进行计算,结果RSD($n=6$)为0.57%,表明仪器精密度良好。

2.8 重复性考察

取样品(企业F批号180101),按“2.3.2”项方法平行制备6份供试品溶液,依照“2.1”“2.2”项条件进行检测,以 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷K色谱峰(峰1)的峰面积进行计算,结果RSD($n=6$)为0.95%,表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性考察

取样品(企业F批号180101),按“2.3.2”项方法制备供试品溶液,依照“2.1”“2.2”项条件分别于0、3、6、12、24、36 h测定,计算 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷K色谱峰

(峰1)的峰面积。结果表明,供试品溶液在36 h内稳定。

2.10 限度测定

按照《中华人民共和国药典》2020年版四部^[16]0212药材和饮片检定通则,杂质通常不得过3%。考虑柴胡药材性状鉴别较难,且有交叉种植的可能,故放宽限度,拟定北柴胡中掺伪藏柴胡的限度为10%。按照藏柴胡掺伪10%的比例制备银柴颗粒样品12份,测定 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷K色谱峰的峰面积平均值为110307。根据尼泊尔柴胡皂苷K的 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱峰线性关系,计算得出银柴颗粒中掺伪10%藏柴胡时尼泊尔柴胡皂苷K的质量浓度为 $0.55 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,故将尼泊尔柴胡皂苷K对照品溶液的限度拟定为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.10.1 尼泊尔柴胡皂苷K线性关系考察

取尼泊尔柴胡皂苷K对照品 0.01070 g,精密称定,加甲醇制成每1 mL含 $0.535 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为储备液;将尼泊尔柴胡皂苷K对照品储备液逐级稀释,配制尼泊尔柴胡皂苷K对照品工作溶液(0.1、0.2、0.5、1、2、2.5、5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),依照“2.1”“2.2”项条件分别测定,以尼泊尔柴胡皂苷K的 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱峰峰面积(y)为纵坐标,质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线, $y=13552x+38425$, $R^2=0.992$,尼泊尔柴胡皂苷K质量浓度在0.1~5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,见图4。

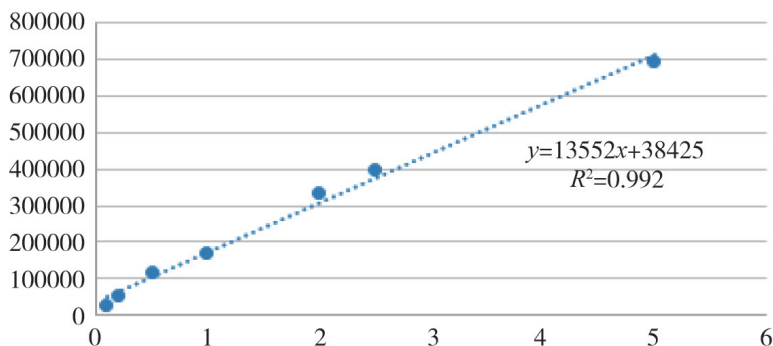


图4 尼泊尔柴胡皂苷K的线性关系

2.10.2 掺伪10%藏柴胡供试品溶液的测定

按银柴颗粒的处方和制法,制备不同批次藏柴胡制备的掺伪10%藏柴胡供试品溶液,依照

“2.1”“2.2”项条件,测定 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷K色谱峰(峰1)的峰面积,结果见表4。

表 4 不同批次藏柴胡制备的掺伪 10% 藏柴胡的银柴颗粒参比溶液的检测结果

藏柴胡自编号	m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5 的 MRM 图中 Nepesaikosaponin K 色谱峰的峰面积	藏柴胡自编号	m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5 的 MRM 图中 Nepesaikosaponin K 色谱峰的峰面积
001	65487	007	112539
002	85239	008	147888
003	164143	009	115712
004	80791	010	79177
005	107708	011	96328
006	181273	012	87409
平均值	110307		

3 样品测定

按拟定方法，对8家生产企业27批银柴颗粒样品进行筛查，记录 m/z 943.5 $\rightarrow$ 797.5的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷K的峰面积，以银柴颗粒中掺不

同比例藏柴胡的线性曲线进行计算，以尼泊尔柴胡皂苷K 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为限度（相当于藏柴胡掺伪10%），结果有2家生产企业共4批样品检出藏柴胡，检出率为14.8%，详见表5。

表 5 银柴颗粒藏柴胡检查结果

序号	生产企业	批号	掺藏柴胡 含量 /%	检测结果	序号	生产企业	批号	掺藏柴胡 含量 /%	检测结果
1	企业 A	171002	1.1	(-)	15		1610014	3.1	(-)
2		170605	0.6	(-)	16		1702003	2.8	(-)
3		171101	7.5	(-)	17	企业 E	170301	0.6	(-)
4		171109	6.7	(-)	18		170401	0.7	(-)
5	企业 B	17.02.23	5.8	(-)	19		1709001	59.0	(+)
6		17.04.13	4.2	(-)	20	企业 F	060302	20.8	(+)
7		17.09.26	2.5	(-)	21		170202	32.4	(+)
8	企业 C	16050010	5.7	(-)	22		180101	70.8	(+)
9		16060013	4.0	(-)	23	企业 G	171104	0.1	(-)
10		16060014	3.7	(-)	24		180104	0.0	(-)
11		18010001	3.3	(-)	25		180106	0.0	(-)
12		18010002	3.0	(-)	26	企业 H	171201	0.8	(-)
13	企业 D	1606008	9.9	(-)	27		180103	2.0	(-)
14		1609013	2.8	(-)					

注：(+)：检出，(-)：未检出。

4 讨论

色谱柱的选择：分别采用Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×3mm, 1.8 μm)、Agilent RRHD C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Phenomenex Titank C₁₈ (100 mm×2 mm, 3.0 μm)、ACE Ultra Core C₁₈ (100 mm×2.1mm, 2.5 μm) 色谱柱考察该方法的重现性, 以 m/z 943.5→797.5的色谱图中尼泊尔柴胡皂苷K色谱峰(峰1)进行计算。结果显示, 采用粒径1.8 μm的色谱柱, 该方法满足耐用性要求; 而使用粒径3.0 μm或2.5 μm的色谱柱, 分离度不符合药典规定的要求, 故本方法采用粒径为1.8 μm的色谱柱来进行检测。

结果的判断: 以 m/z 943.5→635.4、 m/z 943.5→781.5和 m/z 943.5→797.5离子对提取的供试品离子流色谱中, 若同时出现与对照品色谱保留时间相同的色谱峰, 则要求以 m/z 943.5→797.5离子对提取的供试品离子流图中色谱峰面积不得超过对照品的色谱峰面积。

5 结论

本文采用高效液相色谱-质谱法, 建立了银柴颗粒使用混伪品藏柴胡投料的检测方法, 所建立的方法快速便捷, 可靠性强。在8家生产企业27批银柴颗粒样品中检测出2家生产企业共4批银柴颗粒均含有藏柴胡成分的特征色谱峰, 解决了银柴颗粒中非法掺入藏柴胡的检测问题, 为藏柴胡掺伪投料违规生产银柴颗粒的监管提供了技术支撑。建议生产企业切实履行药品上市许可人的责任和义务, 加强药材源头和中药生产全过程质量管理, 严把药品质量关, 确保人民群众用药安全、有效。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 卫生部药品标准: 中药成方制剂[S]. 第十三册: WS3-B-2612-97.
- [2] 郭敏娜, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于HPLC-Q-TOF-MS技术的柴胡化学成分分析[J]. 中草药, 2016, 6 (12): 2044-2052.
- [3] 黄涵签, 王潇晗, 付航, 等. 柴胡属药用植物资源研究

进展[J]. 中草药, 2017, 48 (14): 2989-2996.

- [4] 王梦迪, 靳光乾. 柴胡中药资源研究进展[J]. 山东林业科技, 2019, 49 (3): 107-110.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020: 293.
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [7] 周燕燕, 郭禅英, 蔡彩敏, 等. 北柴胡、南柴胡及藏柴胡的鉴别分析[J]. 海峡药学, 2019, 31 (11): 1452: 59-62.
- [8] 赖晶, 史中飞, 宋平顺, 等. 基于ITS序列位点特异性PCR鉴别北柴胡掺伪藏柴胡[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35 (2): 18-21.
- [9] 王惠, 刘霞. 藏柴胡的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (20): 110-113.
- [10] 郭佳琪, 杨印军, 方伟, 等. 藏柴胡以及种植北柴胡和竹叶柴胡的皂苷含量研究[J]. 中国现代中药, 2018, 20 (1): 34-38.
- [11] 赵维丽, 杨玉华, 孙裕, 等. 不同产地和不同品种柴胡药材质量研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36 (3): 28-31.
- [12] 赵香妍, 刘长利. 中药柴胡的研究概况与发展趋势[J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (4): 963-966.
- [13] 袁伯川, 李文东, 马永生, 等. 柴胡属药用植物的分子鉴定及市售柴胡药材的质量调查[J]. 药学学报, 2017, 52 (1): 162-171.
- [14] 王惠, 冯玛莉, 张越, 等. 藏柴胡与北柴胡急性毒性、解热、抗炎作用的对比研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22 (5): 1517-1523.
- [15] 刘潇潇, 陈馥, 林锦锋, 等. 含柴胡中成药的质量控制方法探讨[J]. 中国药学杂志, 2019, 54 (17): 1452-1456.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 29-31.

(收稿日期 2022年7月1日 编辑 郑丽娥)