

## 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱法检测柴胡中藏柴胡的掺伪\*

李敏<sup>1</sup>, 李婷<sup>3</sup>, 韩潇潇<sup>1</sup>, 马潇<sup>1</sup>, 李冬华<sup>1</sup>, 张平<sup>2\*\*</sup>, 杨玲霞<sup>1\*\*</sup>

(1. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730030; 2. 甘肃省药品监督管理局审核查验中心, 兰州 730030;

3. 北京葵花医药研究有限责任公司, 北京 100050)

**摘要 目的:** 建立检测柴胡及藏柴胡中柴胡皂苷 K 成分的液相色谱 - 质谱法(LC - MS)检查方法, 用以快速鉴别北柴胡是否为藏柴胡或混有藏柴胡。同时对 16 批藏柴胡和 157 批柴胡饮片中的柴胡皂苷 K 进行检测。**方法:** 采用超高效液相色谱 - 三重四极杆串联质谱(UPLC - QqQ - MS)对柴胡及藏柴胡中柴胡皂苷 K 进行检测, 色谱柱为 Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈(A) - 水(B), 梯度洗脱(0 ~ 5 min, 15%A → 25%A; 5 ~ 30 min, 25%A → 30%A; 30 ~ 35 min, 30%A → 90%A; 35 ~ 36 min, 90%A → 15%A; 36 ~ 40 min, 15%A), 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 进样量 5 μL; 采用电喷雾离子源(ESI<sup>-</sup>), 负离子模式扫描, 多反应监测(MRM)模式检测, 选择柴胡皂苷 K 特征分子离子峰 m/z 943.5 → 797.3、m/z 943.5 → 635.3 和 m/z 943.5 → 781.3 作为检测离子对。**结果:** 16 批藏柴胡中柴胡皂苷 K 的量远高于限度要求, 157 批柴胡饮片中有 8 批样品中均检出藏柴胡类成分柴胡皂苷 K。**结论:** 所建立的方法经方法学验证, 专属性强, 以期制定柴胡中藏柴胡成分检查项补充检验方法, 提升柴胡饮片质量控制标准及真伪鉴别研究, 可进一步有效控制其质量, 保障临床疗效。

**关键词:** 柴胡; 藏柴胡; 柴胡皂苷 K; 补充检验方法; 超高效液相色谱 - 三重四极杆串联质谱; 真伪鉴别; 质量问题

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)06 - 0999 - 10

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.06.10

## Determination of adulteration of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in *Bupleurum* by UPLC - QqQ - MS\*

LI Min<sup>1</sup>, LI Ting<sup>3</sup>, HAN Xiao - xiao<sup>1</sup>, MA Xiao<sup>1</sup>,  
LI Dong - hua<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>2\*\*</sup>, YANG Ling - xia<sup>1\*\*</sup>

(1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730030, China; 2. Center for Inspection of GSMPA, Lanzhou 730030, China;

3. Beijing Sunflower Pharmaceutical Research Co., Ltd., Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To establish a liquid chromatography mass spectrometry (LC - MS) method for the detection of nepesaikosaponin K in *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*, which could be used to quickly identify

\* 甘肃省药品监督管理局, 中药材及饮片质量控制重点实验室(2023GSMPA - KL06); 国家药监局中药材及饮片质量控制重点实验室项目(2021GSMPA - KL04, 2022GSMPA - KL12, 2022GSMPA - KL10, 2020GSMPA - KL15); 甘肃省药品监督管理局, 甘肃省中药饮片炮制规范化研究(2022GSMPA - 0075)

\*\* 通信作者 张平 Tel: 17709310037; E - mail: 58735870@qq.com

杨玲霞 Tel: 13909427927; E - mail: yanglingxia009@126.com

第一作者 李敏 Tel: 18809421680; E - mail: 1781722359@qq.com

李婷 Tel: 13693527343; E - mail: 1006287965@qq.com

whether *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* was substituted for *Bupleurum* or was mixed with *Bupleurum*. At the same time, nepesaikosaponin K was detected in 16 batches of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* and 157 batches of bupleurum decoction pieces. **Methods:** Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) coupled with triple quadrupole mass spectrometry (QqQ MS) was used to detect nepesaikosaponin K in *Bupleurum* and *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*. Determination was carried out with the application of a Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column at temperature of 25 °C. The mobile phase was composed of acetonitrile (A) and water (B) with gradient elution (0–5 min 15% A → 25% A; 5–30 min, 25% A → 30% A; 30–35 min, 30% A → 90% A; 35–36 min, 90% A → 15% A; 36–40 min, 15% A) at a flow rate of 0.3 mL · min<sup>-1</sup>. The electrospray ionization (ESI<sup>-</sup>) source was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode of the transitions of  $m/z$  943.5 → 797.3,  $m/z$  943.5 → 635.3, and  $m/z$  943.5 → 781.3. **Results:** The contents of nepesaikosaponin K detected in 16 batches of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* were much higher than minimum requirements. Nepesaikosaponin K was detected in 8 out of 157 batches of *Bupleurum*. **Conclusion:** The established method is verified by methodology to be specific, so as to develop a supplementary test method for the components of *Bupleurum* and *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*. to improve the quality control standard and authentic identification investigation, and to effectively control the quality of *Bupleurum* decoction pieces and guarantee its clinical efficacy.

**Keywords:** *Bupleurum chinense* DC.; *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*; nepesaikosaponin K; supplementary test method; UPLC-QqQ-MS; authentic identification; quality issue

柴胡始载于《神农本草经》，为中医常用清虚热药，既是传统中药，又是现代临床常用中药，主产于辽宁、河北、山西、河南、陕西及甘肃等地<sup>[1]</sup>，具有疏肝解郁、发表退热和升举阳气等功效，主要用于治疗感冒发热、寒热往来、月经不调、肝郁气滞等病证<sup>[2-4]</sup>。其化学成分主要包括皂苷、黄酮、挥发油、多糖和炔类等<sup>[5-7]</sup>。现代药理研究表明，柴胡具有抗癌、抗炎、抗抑郁、降血脂和保护肝肺损伤等药理作用<sup>[8-12]</sup>。柴胡作为大宗中药材品种，市场需求量巨大，市场上有柴胡的栽培品、野生品和部分伪品，近年来随着过度采挖，野生柴胡资源急剧短缺，所以市场上大部分为栽培品，然而栽培品存在问题较多，包括药材基原多、药用状况混乱、质量参差不齐等<sup>[13-15]</sup>。

柴胡药源的混乱给柴胡及其制剂的质量带来隐患，据调查显示，我国有 42 种柴胡，其中包含 17 个变种和 7 种变型<sup>[16]</sup>。市场的主流柴胡药材有北柴胡、竹叶柴胡、藏柴胡和锥叶柴胡。由于柴胡属植物的性状特征十分接近，在采集和使用很难进行有效鉴别，加之正品柴胡药材资源匮乏等因素，使得多种混伪品与正品柴胡混用的现象普遍<sup>[17-20]</sup>，临床用药的安全性和有效性受到很大

的威胁。

藏柴胡作为柴胡近年来出现的主要伪品，由于其价格较低且柴胡皂苷 a、d 含量很高，达 2.0% 以上，很受相关制剂生产企业青睐，导致市场上藏柴胡流通量较大<sup>[21-22]</sup>，柴胡中藏柴胡参伪研究是近年来研究的热点，因此建立快速、稳定的鉴别柴胡掺伪藏柴胡的方法尤为重要。目前在药材鉴别中常用的方法包括理化性质鉴定、性状鉴定和显微鉴定等，虽然能够在一定程度上鉴定中药的良莠<sup>[21-22]</sup>，但采用这些传统的鉴别手段鉴别中药材对人员的专业能力要求较高<sup>[23-24]</sup>，而且理化鉴定耗时耗力。近年来，有许多学者采用灵敏度高、选择性强的液质联用 (LC-MS) 技术对柴胡掺伪问题进行研究，赵丹彤等<sup>[25-26]</sup>采用高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 技术，对柴胡属饮片及含柴胡的中成药中的藏柴胡掺伪检测方法进行了研究。本文以中国食品药品检定研究院联合甘肃省级药检机构对市场及多家企业抽检的 157 批柴胡为样本，利用具有快速高效分析能力的 UPLC-QqQ-MS (MRM) 技术手段来建立柴胡掺伪藏柴胡的鉴别方法，以期制定柴胡药材及饮片中藏柴胡成分检查项的补充检验方法，完善质量控制技术和提高用药安全性。

## 1 仪器、试药及样品

### 1.1 仪器

LCMS-8060 三重四极杆液质联用仪(岛津公司); AB SCIEX QTRAP5500 三重四极杆液质联用仪(AB); Mettler XS205DU(十万分之一)、Mettler AE240 型万分之一电子分析天平(梅特勒公司); Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

柴胡皂苷 K 对照品(7285)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 柴胡对照药材(120992-201509)、

竹叶柴胡对照药材(121343-201903)均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈为色谱纯(默克公司); 氨水为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水。

### 1.3 样品

北柴胡药材 6 批, 南柴胡药材 3 批, 藏柴胡药材 22 批, 锥叶柴胡、竹叶柴胡、小叶黑柴胡药材各 2 批, 银柴胡、三岛柴胡、红柴胡药材各 1 批, 其中北柴胡、竹叶柴胡、南柴胡、黑柴胡、三岛柴胡、红柴胡等大部分样品均为产地采集的样品, 马潇主任中药师将以上样品与标本及植物志核对后确定为对应的品种。样品信息详见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

样品编号 (sample No.)	名称 (name)	来源 (source)
B1	北柴胡对照药材( <i>Bupleuri Radix</i> reference)	中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)
B2	北柴胡( <i>Bupleurum chinense</i> DC.)	购自企业(purchase from enterprise)
B3		
B4		
B5		
B6		
N1	南柴胡( <i>Bupleurum scorzonerifolium</i> Willd.)	
N2		
N3		
A1	锥叶柴胡( <i>Bupleurum bicaule</i> Helm)	购自市场(purchase from market)
A2		
A3	银柴胡( <i>Stellaria dichotoma</i> L. var. <i>lanceolata</i> Bge.)	
A4	竹叶柴胡( <i>Bupleurum marginatum</i> Wall. ex DC.)	购自企业(purchase from enterprise)
A5	竹叶柴胡对照药材( <i>Bupleuri Marginati</i> Herba)	中国食品药品检定研究院(National Institutes for Food and Drug Control)
A6	三岛柴胡( <i>Bupleurum falcatum</i> L.)	购自市场(purchase from market)
A7	小叶黑柴胡( <i>Bupleurum smithii</i> Wolff var. <i>parvifolium</i> Shan et Y. Li)	
A8		
A9	红柴胡( <i>Bupleurum scorzonerifolium</i> Willd.)	
Z1	藏柴胡( <i>Bupleurum marginatum</i> Wall. ex DC. var. <i>stenophyllum</i> (Wolf) Shan et Y. Li)	国抽检品(National sampling inspection products)
Z2		
Z3		
Z4		
Z5		
Z6	藏柴胡( <i>Bupleurum marginatum</i> Wall. ex DC. var. <i>stenophyllum</i> (Wolf) Shan et Y. Li)	省院标本馆提供(Provided by Provincial Herbarium)
Z7		
Z8		省抽专项抽检(Provincial special sampling inspection)
Z9		
Z10		
Z11		

表1(续)

样品编号 (sample No.)	名称 (name)	来源 (source)
Z12		
Z13		
Z14		
Z15		
Z16		购自市场(purchase from market)
Z17		
Z18		
Z19		
Z20		
Z21		
Z22		国抽检品(National sampling inspection products)

## 2 方法与结果

### 2.1 液相色谱条件

采用 Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈(A) - 水(B), 梯度洗脱(0 ~ 5 min, 15% A → 25% A; 5 ~ 30 min, 25% A → 30% A; 30 ~ 35 min, 30% A → 90% A), 流速为 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 25 °C, 进样量为 5 μL。

### 2.2 质谱条件

离子化模式为 ESI<sup>-</sup>, 进行多反应监测(MRM), 选择柴胡皂苷 K 特征分子离子峰  $m/z$  943.5 → 797.3 (定量)、 $m/z$  943.5 → 635.3 和  $m/z$  943.5 → 781.3 (定性) 作为检测离子对。

### 2.3 溶液制备

#### 2.3.1 对照品溶液

取柴胡皂苷 K 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 1.0 μg 的溶液, 即得。

#### 2.3.2 藏柴胡参比溶液

取藏柴胡 0.06 g、北柴胡对照药材 1.94 g (掺伪 3%), 精密称定, 精密加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 50 mL, 称量, 超声(功率 500 W, 频率 80 kHz) 处理 30 min, 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 各种柴胡药材溶液

取表 1 中柴胡药材(南柴胡、锥叶柴胡、银柴胡、竹叶柴胡、三岛柴胡、黑柴胡、红柴胡) 细粉 0.5 g, 精密称定, 精密加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 50 mL, 称量, 超声(功率 500 W, 频率 80 kHz) 处理 30 min, 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。

### 2.3.4 藏柴胡药材线性关系考察溶液

分别取藏柴胡(编号 Z1) 0.06、0.1、0.2、0.5、1、2 g, 对应北柴胡(批号 B1) 1.94、1.9、1.8、1.5、1.0 g (相当于北柴胡中掺入藏柴胡分别为 3%、5%、10%、25%、50%、100%), 精密称定, 精密加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 50 mL, 称量, 超声(功率 500 W, 频率 80 kHz) 处理 30 min, 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。

### 2.4 方法学考察

#### 2.4.1 专属性考察

**2.4.1.1 阴性样品溶液(基质溶液)的制备** 取北柴胡(B1、B2、B3、B4、B5、B6) 阴性样品 0.5 g, 精密称定, 精密加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 50 mL, 称定重量, 超声(功率 500 W, 频率 80 kHz) 处理 30 min, 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。

**2.4.1.2 阳性样品溶液的制备** 取藏柴胡(Z1、Z2、Z3、Z4、Z5、Z6) 0.5 g, 按“2.4.1.1”项方法制备藏柴胡阳性样品溶液。

**2.4.1.3 专属性试验** 分别取对照品溶液、阴性样品溶液、阳性样品溶液、“2.3.3”项下各柴胡药材供试品溶液各 5 μL 进样, 按“2.1”项下液相色谱条件及“2.2”项下质谱条件进行测定。结果不同种柴胡中均含有柴胡皂苷 K, 但藏柴胡中柴胡皂苷 K 含量均比其他几种柴胡药材含量高约 10 ~ 30 倍, 其中以柴胡皂苷 K 特征离子平均峰面积计, 约为北柴胡中柴胡皂苷 K 特征离子的近 40 倍。结果见图 1。

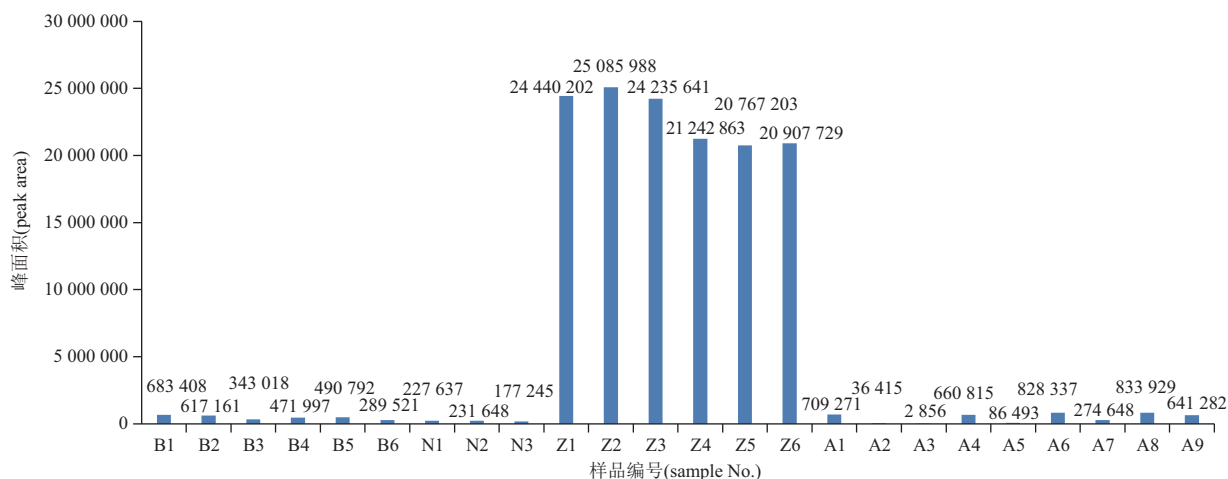


图1 各品种柴胡药材中特征离子对的峰面积 ( $m/z$  943.5→797.3)

Fig. 1 Peak area of characteristic ion pairs ( $m/z$  943.5→797.3) in various Bupleurum

北柴胡阴性样品 (B1、B2、B3、B4、B5、B6) 中柴胡皂苷 K 特征离子平均峰面积为 482 650, 藏柴胡阳性样品 (Z1、Z2、Z3、Z4、Z5、Z6) 中柴胡皂苷 K 特征离子平均峰面积为 21 113 271, 数据高出阴性样品 2 个数量级, 说明该方法专属性好, 阴性对目标成分测定基本无干扰。

**2.4.1.4 基质效应考察** 按“2.3.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下液相色谱条件及“2.2”项

下质谱条件进行测定。以样品中柴胡皂苷 K ( $m/z$  943.5→797.3) 的峰面积  $Y$  为纵坐标, 藏柴胡掺入量  $X$  为横坐标, 绘制标准曲线:

$$Y = 5.08 \times 10^7 X + 5.18 \times 10^6 \quad r = 0.990 0$$

结果见图 2。且藏柴胡中柴胡皂苷 K 特征离子对  $m/z$  943.5→797.3 的色谱峰面积与其掺伪量相等的北柴胡药材差异较小, 基质效应影响较小, 结果见图 3。

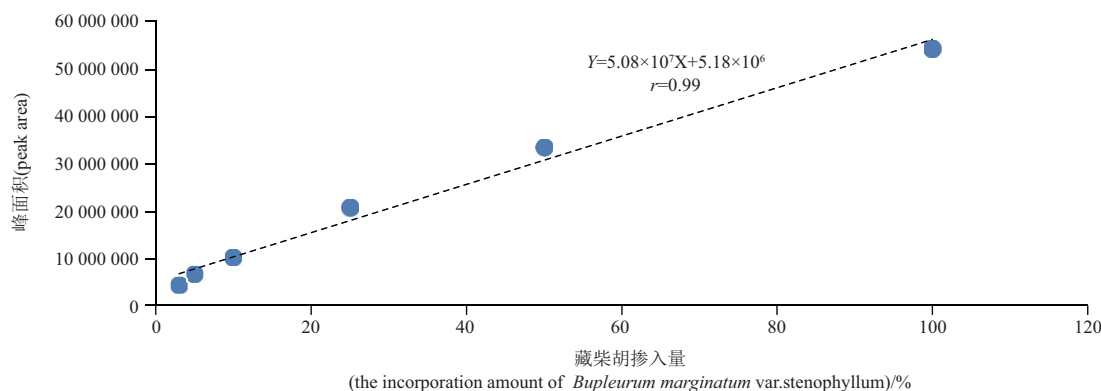


图2 柴胡药材中藏柴胡掺入量与面积的线性关系

Fig. 2 Linear relationship between the adulteration amount and area of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* in Bupleurum

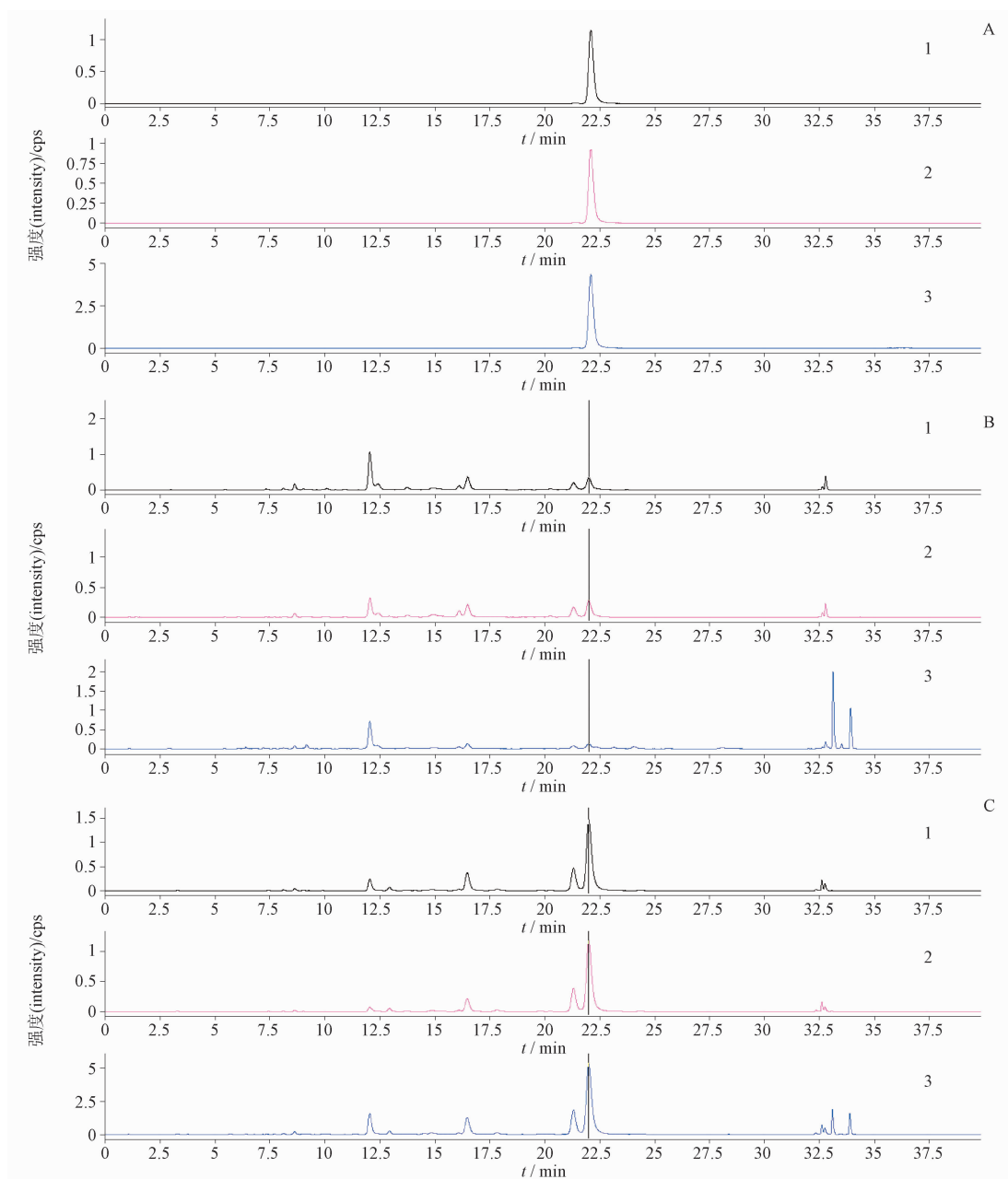
#### 2.4.2 精密度试验

取藏柴胡饮片 (编号 Z1), 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下液相条件及“2.2”项下质谱条件进行测定, 连续进样 6 次, 记录供试品溶液中柴胡皂苷 K 特征离子对的 MRM 色谱峰峰面积 ( $m/z$  943.5→797.3)。结果供试品溶液中柴胡皂苷 K 的 MRM 色谱峰峰面积的 RSD 为 1.4%, 小于

3.0%, 说明仪器精密度良好。

#### 2.4.3 重复性试验

取藏柴胡饮片 (编号 Z1), 按“2.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下液相条件及“2.2”项下质谱条件进行测定, 记录供试品溶液中柴胡皂苷 K 特征离子对的 MRM 色谱峰峰面积 ( $m/z$  943.5→797.3)。结果供试品溶液中柴胡皂苷 K



1.  $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 797.3 2.  $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 635.3 3.  $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 781.3

A. 对照品 (reference substance) B. 阴性样品 (negative sample) C. 阳性样品 (positive sample)

图3 柴胡 UPLC-QqQ-MS 色谱图

Fig. 3 HPLC-QqQ-MS MRM chromatograms of *Bupleurum*

平均含量为  $0.956 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 为 1.8%, 小于 3%, 说明方法重复性良好。

#### 2.4.4 稳定性试验

取藏柴胡饮片 (编号 Z1), 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下液相条件及“2.2”项下质谱条件进行测定, 分别于 0、2、6、12、20、24 h 进样, 记录供试品溶液中柴胡皂苷 K 特征离子对的

MRM 色谱峰峰面积 ( $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 797.3)。结果供试品溶液中柴胡皂苷 K 的 MRM 色谱峰峰面积的 RSD 为 1.1%, 小于 3%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

#### 2.4.5 检测限试验

取藏柴胡 (编号 Z1) 0.02 g, 北柴胡 (编号 B1) 1.98 g, 相当于北柴胡中掺入藏柴胡为 1%, 精密称

定,精密加入含 5% 浓氨试液的甲醇溶液 50 mL,称量,超声(功率 500 W,频率 80 kHz)处理 30 min,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  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得。

将相当于北柴胡中掺 1% 藏柴胡的供试品溶液,按“2.1”项下液相条件及“2.2”项下质谱条件进行测定,结果 MRM 色谱图中柴胡皂苷 K 的检测离子对  $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 797.3、 $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 635.3 和  $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 781.3 的色谱峰的信噪比均大于 10。该方法检测限为相当于北柴胡中掺入藏柴胡为 1%,即可检出。

#### 2.4.6 线性关系考察

精密称取柴胡皂苷 K 对照品 2.11 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,制成每 1 mL 含 21.1  $\mu\text{g}$  的溶液,作为对照品储备液;将储备液逐级稀释,即得系列浓度的对照品溶液,质量浓度分别为 0.105 5、0.211 0、0.527 5、1.012 8、2.025 6、5.064 0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,按“2.1”项下液相条件及“2.2”项下质谱条件进行测定,以柴胡皂苷 K 的 943.5 $\rightarrow$ 797.3 的色谱峰峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程:

$$Y = 2.579 \times 10^6 X + 7.127 \times 10^5 \quad r = 0.9918$$

结果表明柴胡皂苷 K 在 0.105 5 ~ 5.064 0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  线性关系良好。

#### 2.5 柴胡饮片中藏柴胡掺伪拟定限度研究

按照 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则 0212“药材和饮片检定”项,杂质通常不得过 3%。严格按照标准要求进行控制,拟定北柴胡中掺伪藏柴胡的限度为 3%。按“2.3.2”项下藏柴胡参比溶液的制备方法平行制备供试品样品 5 份,按“2.1”项下液相条件及“2.2”项下质谱条件进行测定,在对照品柴胡皂苷 K 的线性范围内,计算藏柴胡掺伪 3% 的供试品中柴胡皂苷 K 峰面积对应的浓度,以该柴胡皂苷 K 对照品溶液浓度作为柴胡药材及饮片中藏柴胡的检出限度。

5 份藏柴胡掺伪 3% 北柴胡中柴胡皂苷 K 的  $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 797.3 的色谱峰峰面积平均值 4 257 338,根据柴胡皂苷 K 的  $m/z$  943.5 $\rightarrow$ 797.3 的色谱峰线性关系,计算藏柴胡掺伪 3% 时北柴胡中柴胡皂苷 K 的浓度为 1.373 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,故将柴胡皂苷 K 对照品溶液的限度拟定为 1.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

#### 2.6 样品检测

精密称取编号为 Z001 ~ Z016 的 16 批藏柴胡样品粉末各 0.5 g,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下液相条件及“2.2”项下质谱条件进行测定。结果 16 批样品中均检出柴胡皂苷 K 成分,对照品溶液浓度 1.012 8  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,其峰面积为 3 521 846,16 批藏柴胡中柴胡皂苷 K 色谱峰峰面积远高于本研究拟定的掺伪限度。结果见图 4。

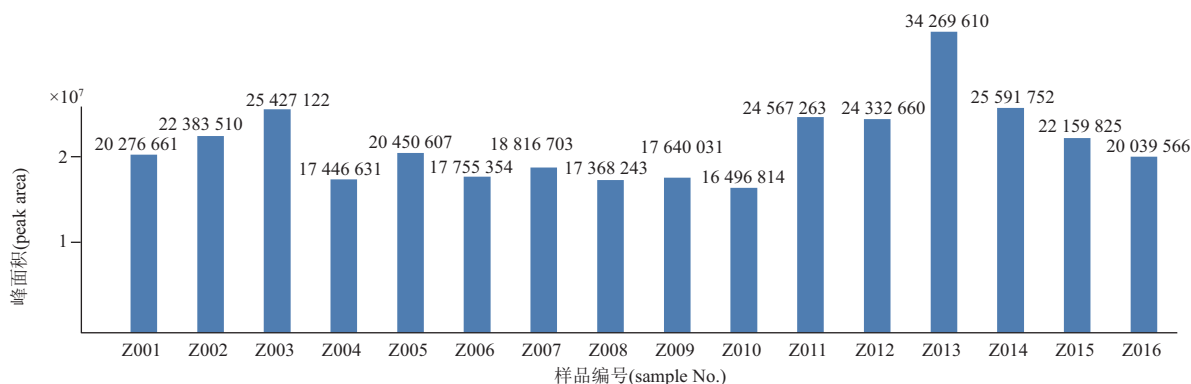


图 4 藏柴胡中柴胡皂苷 K 检测结果

Fig. 4 Detection results of nepesaikosaponin K in *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*

### 3 讨论

#### 3.1 检测目标物的选择

柴胡属药材和饮片的主要活性成分是柴胡皂苷,近年来,研究者多采用液相色谱法对柴胡中的柴

胡皂苷  $b_1$ 、 $b_2$ 、 $a$ 、 $c$ 、 $d$  等化学成分进行研究<sup>[24,27]</sup>;而对其他柴胡皂苷类成分研究极少,且现有方法灵敏度低、各皂苷类成分多以同分异构体的形式存在,增加了分析检测工作的难度。柴胡皂苷 K 在北柴胡等品

种中含量低,但其在藏柴胡中含量高,有助于提高掺伪后目标成分检测的灵敏度;但柴胡皂苷 K 的结构和多种皂苷极为相似,研究发现液相分离难度大、薄层色谱图中藏柴胡与柴胡的色谱斑点与颜色无较大差别<sup>[28]</sup>。所以采用液质联用法可以提高检测的灵敏度,使得柴胡属饮片中藏柴胡掺伪检测方法的准确度提高<sup>[26]</sup>。

### 3.2 色谱条件的优化

本实验对乙腈-水,甲醇-水,乙腈-0.1% 甲酸水溶液等多个流动相系统进行了考察,结果表明,流动相系统选择乙腈-水进行梯度洗脱时柴胡皂苷 K 分离效果及峰形最好。故选择乙腈-水进行梯度洗脱,洗脱时间为 40 min,色谱柱温度为 25 ℃。通过对柴胡皂苷 K(相对分子质量为 943.5)对照品溶

液进行子离子(daughter scan)扫描,选择 3 个丰度较高的碎片离子  $m/z$  635.3、797.4、781.4 作为柴胡皂苷 K 的特征离子,结果见图 5。

### 3.3 耐用性考察

为了适应不同灵敏度的仪器,分别考察本方法在岛津 LCMS-8060 和 SCIEX TQ-5500 三重四极杆液质联用仪上的重现性,以柴胡皂苷 K 的  $m/z$  943.5→797.3、 $m/z$  943.5→635.3 和  $m/z$  943.5→781.3 作为选择离子对进行检测。结果表明柴胡皂苷 K 在 2 种类型的仪器上均可检出,且色谱峰峰型和分离度均良好。另外,分别考察了不同型号的色谱柱、不同柱温、不同流动相系统等对样品中柴胡皂苷 K 检测结果的影响,结果表明,在不同的色谱条件下,检测方法的耐受程度较好,检测结果均符合规定。

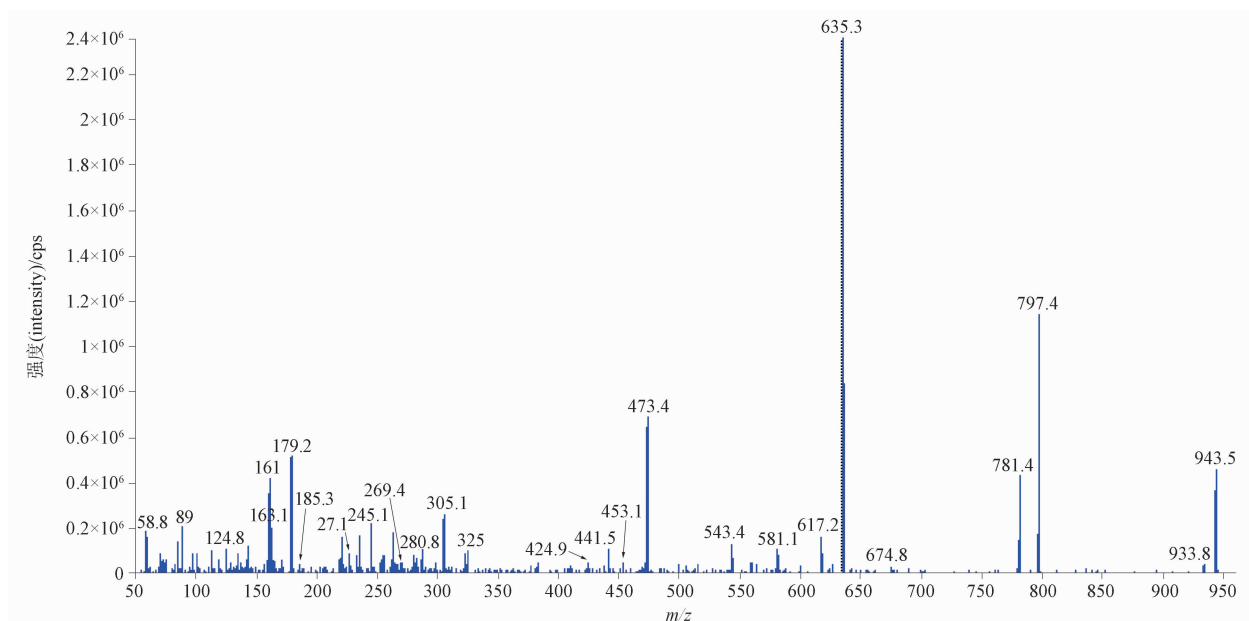


图 5 柴胡皂苷 K 的二级质谱图

Fig. 5 The MS/MS spectra of nepesaikosaponin K

### 3.4 抽检样品检测结果

目前,由于正品柴胡药材资源长时间短缺,导致多种混伪品与正品柴胡混淆用的问题突出<sup>[20]</sup>,针对这一问题,为保证药品质量,中检院联合甘肃省药检机构对市场及多家企业的柴胡开展了抽检工作。结果 157 批样品中 8 批柴胡饮片(S26、S85、S99、S105、S138、S142、S153、S155)中检出藏柴胡类成分柴胡皂苷 K,限度大于定量限,结果见图 6。

## 4 结论

随着中药产业的快速发展,部分中药材及饮片品种出现了资源短缺的状态,中药材以掺伪造假获取经济利益的现象频发。中药补充检验方法在市场监管中发挥着积极作用,可以有效地打击非法添加、染色、掺伪造假和增重等不法行为。本研究通过对所建立方法的专属性和柴胡中藏柴胡掺入量限度等的研究考察,开发了一种操作简便,精密度高,稳定性好的补充检验方法,适用于检查柴胡掺伪藏柴胡的现象。

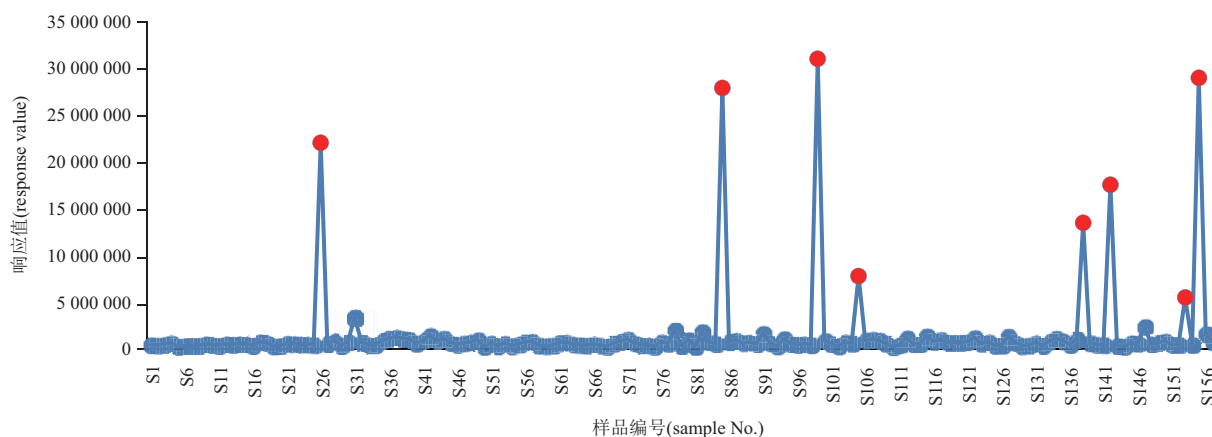


图6 157批柴胡饮片中柴胡皂苷K测定结果汇总

Fig. 6 Results of nepesaikosaponin K in 157 batches of *Bupleurum chinense* DC. decoction pieces

## 参考文献

- [1] 颜美玲, 杨柳, 侯阿娇, 等. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2018, 35(5): 103  
YAN ML, YANG L, HOU AJ, *et al.* Research progress on chemical composition and pharmacological effect of *Bupleurum chinense* DC. [J]. Inf Tradit Chin Med, 2018, 35(5): 103
- [2] 郭泰麟, 康廷国, 张慧. 不同产地南北柴胡中柴胡皂苷的含量测定[J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39(2): 221  
GUO TL, KANG TG, ZHANG H. Determination of saikosaponin in *Bupleurum chinense* DC. and *Bupleurum scorzoniferolium* Willd from different areas [J]. Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2020, 39(2): 221
- [3] 林家冉, 赵林华, 邸莎, 等. 柴胡的临床应用及其用量探究[J]. 吉林中医药, 2019, 39(4): 449  
LIN JR, ZHAO LH, DI S, *et al.* Exploration about the clinical application and dosage of *Bupleurum* [J]. Jilin J Chin Med, 2019, 39(4): 449
- [4] 赵佳琛, 翁倩倩, 张悦, 等. 经典方中柴胡药材的本草考证[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(3): 697  
ZHAO JC, WENG QQ, ZHANG Y, *et al.* Textual research on *Bupleuri radix* in Chinese classical prescriptions [J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(3): 697
- [5] 李艳凤, 刘雅舒, 李艳生. 柴胡的化学成分与药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2022, 37(5): 186  
LI YF, LIU YS, LI YS. Chemical composition and pharmacological effects of *Bupleuri radix* [J]. North West Pharm J, 2022, 37(5): 186
- [6] 徐雪娇, 李天英, 李欣, 等. 柴胡化学成分及抗抑郁机制研究进展[J]. 化学工程师, 2022, 36(6): 65  
XU XJ, LI TY, LI X, *et al.* Research progress on the chemical constituents and antidepressant mechanism of *Bupleurum* [J]. Chem Eng, 2022, 36(6): 65
- [7] 黄冬芳, 韦金玉, 梁洁, 等. 柴胡质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(10): 126  
HUANG DF, WEI JY, LIANG J, *et al.* Prediction and analysis of Chaihu (*Bupleurum Chinense* DC.) on quality marker [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2021, 39(10): 126
- [8] 吴丹, 高耀, 向欢, 等. 基于网络药理学的柴胡抗抑郁作用机制研究[J]. 药学学报, 2018, 53(2): 210  
WU D, GAO Y, XIANG H, *et al.* Exploration into mechanism of antidepressant of *Bupleuri radix* based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin, 2018, 53(2): 210
- [9] ASHOUR ML, WINK M. Genus *Bupleurum*; a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action [J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(3): 305
- [10] 李春娜, 刘悦, 刘洋洋, 等. 北柴胡化学成分及活性部位研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(11): 2674  
LI CN, LIU Y, LIU YY, *et al.* Advances in research of chemical constituents and active constituents of *Dictamnus dasycarpus* DC. [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(11): 2674
- [11] 高丽萍. 柴胡有效成分与药理作用探究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 70(4): 13853  
GAO LP. Study on the effective components and pharmacological activity of *Bupleurum chinense* DC. [J]. Elect J Clin Med Liter, 2017, 70(4): 13853
- [12] 贾为壹, 刘佳佳, 胡睿, 等. 小柴胡颗粒激活 Nrf2 通路抗 TAA 致大鼠急性肝损伤的机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 5459  
JIA WY, LIU JJ, HU R, *et al.* Therapeutic mechanism of Xiaochaihu granule on acute liver injury induced by thioacetamide in rats through Nrf2 pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(8): 5459
- [13] 梁镇标, 刘力, 晁志. 柴胡属植物资源及生产状况调查[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 2011  
LIANG ZB, LIU L, CHAO Z. Investigation of medicinal *Bupleurum* resources and current situation of Chaihu production [J]. Lishizhen Med Mater Med Res 2012, 23(8): 2011
- [14] 严华, 董亚娟, 程显隆, 等. 南柴胡与常见混伪品的鉴别方法

- 研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(2): 109  
YAN H, DONG YJ, CHENG XL, *et al.* Identification of *Bupleurum scorzoniferolium* and its adulterants[J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(2): 109
- [15] 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  
LAI J, SHI ZF, SONG PS, *et al.* Identification of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* adulterated *Bupleurum chinense* DC. by PCR amplification of based on ITS sequences[J]. *Res Pract Chin Med*, 2021, 35(2): 18
- [16] 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  
WANG MD, JIN GQ. Research progress on the pesources of *Bupleurum chinensis* [J]. *Shan dong Forestry Sci Technol*, 2019, 49(3): 107
- [17] 王砚. 竹叶柴胡和北柴胡品质比较研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2014  
WANG Y. Comparative Study on the Quality of *B. marginatum* Wall. ex DC. and *Bupleurem chinense* DC. [D]. Chengdu: Chengdu University of Tradition Chinese Medicine, 2014
- [18] 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  
GUO JQ, YANG YJ, FANG W, *et al.* Saikosaponins content in *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* and cultivated *B. chinense* and *B. marginatum*[J]. *Mod Chin Med*, 2018, 20(1): 34
- [19] 魏晓萌. 锥叶柴胡化学成分及质量控制方法研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2018  
WEI XM. Study on Chemical Composition and Quality Control of *Bupleurum bicaule* Helm[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018
- [20] 严华, 董亚娟, 程显隆, 等. 南柴胡与常见混伪品的鉴别方法研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(2): 109  
YAN H, DONG YJ, CHENG XL, *et al.* Identification of *Bupleurum scorzoniferolium* and its adulterants[J]. *Chin Pharm J*, 2015, 50(2): 109
- [21] 丁锤, 徐莹, 马孝熙, 等. 柴胡属 5 种易混药材的鉴别研究[J]. 中药材, 2016, 39(9): 1975  
DING C, XU Y, MA XX, *et al.* Identification on five kinds of easily confused *Bupleurum* medicinal materials[J]. *J Chin Med Mater*, 2016, 39(9): 1975
- [22] 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  
WANG H, LIU X. Research progress on *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*[J]. *World Latest Med Inf*, 2019, 19(20): 110
- [23] 孙旖. 中药柴胡与常见混伪品的鉴别方法分析[J]. 光明中医, 2018, 33(17): 2502  
SUN Y. Analysis of the identification method of traditional Chinese medicine *Bupleuri radix* and common adulterants[J]. *Guangming J Chin Med*, 2018, 33(17): 2502
- [24] 夏召弟. 藏柴胡与北柴胡化学成分及质量控制方法的比较研究[D]. 太原:山西省中医药研究院, 2021  
XIA ZD. Comparative Study on Chemical Constituents and Quality Control Methods of *B. marginatum* var. *stenophyllum* and *B. chinense* DC. [D]. Taiyuan: Shanxi Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, 2021
- [25] 赵丹彤, 高一军, 毕天琛, 等. 感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪检测方法的建立及掺伪限度拟定[J]. 中国药房, 2022, 33(20): 2454  
ZHAO DT, GAO YJ, BI TC, *et al.* Establishment of the detection method for the adulteration of *Bupleurum marginatum* in Ganmao Qingre granules and determination of adulteration limit[J]. *J Chin Pharm*, 2022, 33(20): 2454
- [26] 赵丹彤, 高一军, 毕天琛, 等. 柴胡属饮片中藏柴胡掺伪检测方法研究[J]. 药学研究, 2022, 41(10): 653  
ZHAO DT, GAO YJ, BI TC, *et al.* Analytical method of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* sdulteration in *Bupleurum* [J]. *J Pharm Res*, 2022, 41(10): 653
- [27] 郭佳琪, 杨印军, 方伟, 等. 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  
GUO JQ, YANG YJ, FANG W, *et al.* Saikosaponins content in *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* and cultivated *B. chinense* and *B. marginatum*[J]. *Mod Chin Med*, 2018, 20(1): 34
- [28] 张军, 苏本正, 戴衍朋, 等. 基于市售柴胡饮片质量考察的质量控制标准提升及真伪鉴别研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10): 6172  
ZHANG J, SU BZ, DAI YP, *et al.* Study on improvement of quality control standard and true and false identification based on quality investigation of commercial *Bupleuri radix* pieces[J]. *Chin Med Pharm*, 2021, 36(10): 6172

(本文于 2024 年 4 月 9 日修改回)