

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^Δ

赵丹彤^{1,2*}, 高一军³, 毕天琛¹, 刘靖华¹, 朱伟堃¹, 王素香¹, 容蓉^{2#}(1. 菏泽市食品药品检验检测研究院, 山东菏泽 274000; 2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 3. 菏泽市立医院药学部, 山东菏泽 274031)

中图分类号 R917; R927.11 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)20-2454-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.20.05



摘要 目的 建立感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪检测方法, 拟定藏柴胡掺伪限度。方法 采用高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术, 采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行负离子扫描, 以 m/z 943.6→635.5 为定量离子对, 对市售感冒清热颗粒及自制感冒清热标准样品中 nepesaikosaponin K 含量进行检测。同时, 建立感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪比例的计算方法, 并以 nepesaikosaponin K 为指标, 拟定藏柴胡掺伪限度。结果 感冒清热颗粒中 nepesaikosaponin K 检测质量浓度的线性范围为 0.051~20.200 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999$); 精密度、重复性、稳定性(24 h) 试验的 RSD 均小于 2.50%; 平均加样回收率为 97.58% (RSD=2.09%, $n=9$); 检测限为 0.60 $\mu\text{g/g}$, 定量限为 1.80 $\mu\text{g/g}$ 。感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪比例在 5%~100% 的范围内与 nepesaikosaponin K 峰面积的线性关系良好 ($r=0.990$)。15 批市售感冒清热颗粒样品中, nepesaikosaponin K 的含量为 2.584~56.661 $\mu\text{g/g}$; 1 批次样品超出拟定掺伪限度(10%), 不合格率为 6.67%。结论 所建分析方法可用于感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪的检测, 拟定掺伪限度为 10%。

关键词 感冒清热颗粒; 藏柴胡; nepesaikosaponin K; 掺伪; 高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术

Establishment of the detection method for the adulteration of *Bupleurum marginatum* in Ganmao qingre granules and determination of adulteration limit

ZHAO Dantong^{1,2}, GAO Yijun³, BI Tianchen¹, LIU Jinghua¹, ZHU Weikun¹, WANG Suxiang¹, RONG Rong² (1. Heze Institute for Food and Drug Control, Shandong Heze 274000, China; 2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Dept. of Pharmacy, Heze Municipal Hospital, Shandong Heze 274031, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the detection method for the adulteration of *Bupleurum marginatum* in Ganmao qingre granules, and to determine the adulteration limit. **METHODS** HPLC-MS/MS method was used to detect the content of nepesaikosaponin K in commercial and self-made samples of Ganmao qingre granules, using electrospray ionization, and the analysis was carried out under multiple reaction monitoring model in negative mode with m/z 943.6→635.5 as the quantitative ion pair. The calculation method was established for the adulteration proportion of *B. marginatum* in Ganmao qingre granules. Taking nepesaikosaponin K as the index, the adulteration limit was determined. **RESULTS** The linear range of nepesaikosaponin K were 0.051-20.200 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.999$). RSDs of precision, repeatability and stability (24 h) tests were all lower than 2.50%. The average recoveries were 97.58% (RSD=2.09%, $n=9$). The limit of detection was 0.60 $\mu\text{g/g}$, the limit of quantitation was 1.80 $\mu\text{g/g}$. The adulteration ratio of *B. marginatum* in Ganmao qingre granules had a good linear relationship to the peak area of nepesaikosaponin K in the range of 5%-100% ($r=0.990$). The contents of nepesaikosaponin K in 15 batches of Ganmao qingre granules were 2.584-56.661 $\mu\text{g/g}$. One batch of samples exceeded the proposed adulteration limit(10%), and the unqualified rate was 6.67%. **CONCLUSIONS** The established analytical method can be used to detect the adulteration of *B. marginatum* in Ganmao qingre granules, the proposed adulteration limit is 10%.

KEYWORDS Ganmao qingre granules; *Bupleurum marginatum*; nepesaikosaponin K; adulteration; HPLC-MS/MS

感冒清热颗粒由荆芥穗、薄荷、防风、柴胡、紫苏叶、葛根、桔梗、苦杏仁、白芷、苦地丁和芦根 11 味中药组方

Δ 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81873220); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)项目(No.2020CXGC010505); 济南市“新高校 20 条”资助项目(No.2021GXRC028)

* 第一作者 副主任药师, 博士。研究方向: 中药质量控制与关键技术。E-mail: dantongzhao2020@163.com

通信作者 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药及复方活性成分与质量控制。E-mail: rosierong@163.com

而成, 具有疏风散寒、解表清热之功效^[1]。其中, 柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. 的干燥根, 两者分别习称“北柴胡”和“南柴胡”^[1]。我国柴胡属植物种类较多且性状相似, 在采集和使用难以鉴别, 多种混伪品与正品柴胡混淆使用, 掺伪掺杂投料的现象较为普遍^[2-3], 使得含柴胡中成药的安全性和有效性受到影响。

藏柴胡为伞形科植物窄竹叶柴胡 *Bupleurum marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum* (Wolff.) Shan et Y.

Li的干燥根^[4],因其产量和柴胡皂苷含量显著高于其他同属植物,且价格较低,常掺伪或混入北柴胡使用^[5]。藏柴胡与北柴胡、南柴胡等性状相似,化学成分基本一致,考察到以感冒清热颗粒为代表的含柴胡中成药成分多样^[6-7],故对掺伪筛查方法的专属性和准确性要求较高,而仅采用薄层色谱法、高效液相色谱(HPLC)法等手段难以进行有效区分^[8-11]。

nepesaikosaponin K为五环三萜齐墩果烷型衍生物,是藏柴胡特征性柴胡皂苷类成分^[12-13]。本课题组前期研究表明,藏柴胡中nepesaikosaponin K的含量为北柴胡、南柴胡的25~140倍。因此,本研究拟以该成分为指标,采用高效液相色谱-三重四极杆质谱联用(HPLC-MS/MS)技术建立感冒清热颗粒藏柴胡掺伪检测方法,并拟定掺伪限度,以期对含柴胡中成药质量评价与监管提供补充检验方法和技术保障,也为中药掺伪检测技术研究提供新的思路与方法。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1260-6460型HPLC-MS/MS仪(美国Agilent公司),XPR2型百万分之一分析天平、AB104-S型万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司),FRQ-1010T型超声波清洗器(杭州法兰特超声波科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

nepesaikosaponin K对照品(批号DSTAC019202,纯度 $\geq 98\%$)购自成都乐美天医药科技有限公司;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯;氨水为分析纯;水为超纯水。15批感冒清热颗粒样品来自6家生产企业,其具体来源信息见表1。自制感冒清热标准汤剂流浸膏样品所需荆芥穗、薄荷、紫苏叶、北(南)柴胡、藏柴胡、防风、葛根、桔梗、苦杏仁、白芷、苦地丁、芦根饮片均由山东舜王城药业集团有限公司提供,经菏泽市食品药品检验检测研究院沙启营主任中药师鉴定均为真品。

表1 15批感冒清热颗粒样品的来源信息

编号	厂家代码	批号	规格	编号	厂家代码	批号	规格
S1	A	211106	每袋装12g	S9	F	3210317	每袋装12g
S2	B	634118	每袋装12g	S10	F	3210318	每袋装12g
S3	C	20210819	每袋装6g	S11	F	3210903	每袋装12g
S4	D	211138	每袋装12g	S12	F	3210904	每袋装12g
S5	E	201234	每袋装12g	S13	F	3210905	每袋装12g
S6	F	3210605	每袋装12g	S14	F	3210906	每袋装12g
S7	F	3210907	每袋装12g	S15	F	3210604	每袋装12g
S8	F	3210316	每袋装12g				

2 方法与结果

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件 以Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m)为色谱柱,以0.1%甲酸溶液为流动相A、含0.1%甲酸的乙腈为流动相B进行梯度洗脱(0~2 min, 70%A; 2~5 min, 70%A \rightarrow 55%A; 5~8

min, 55%A; 8~9 min, 55%A \rightarrow 70%A; 9~10 min, 70%A); 柱温为40 $^{\circ}$ C;流速为0.25 mL/min;进样量为5 μ L。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源,以多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行负离子扫描。毛细管电压为3 500 V;雾化器压力为20 psi;干燥气温度为300 $^{\circ}$ C,干燥气流速为10 L/min;鞘流气温度为350 $^{\circ}$ C,鞘流气流速为10 L/min;以 m/z 943.6 \rightarrow 635.5(定量离子对)、 m/z 943.6 \rightarrow 797.4(定性离子对)、 m/z 943.6 \rightarrow 781.5(定性离子对)为特征离子对,碎裂电压均为330 V,碰撞能量分别为53、41、50 eV。nepesaikosaponin K的一级、二级质谱图见图1。

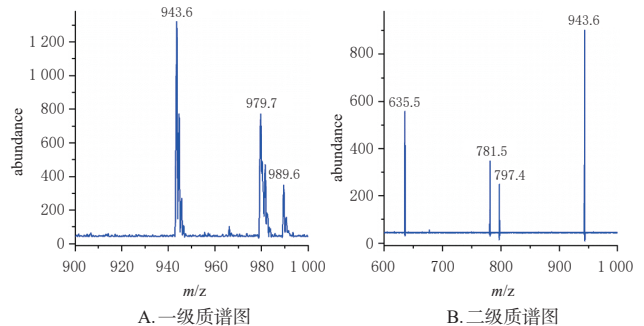


图1 nepesaikosaponin K的一级质谱图和二级质谱图

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取nepesaikosaponin K对照品5.05 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,即得对照品储备液。取对照品储备液适量,分别制成质量浓度为0.051、0.101、0.202、0.505、1.010、2.525、5.050、10.100、20.200 μ g/mL的系列对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取感冒清热颗粒样品,研细,混匀,精密称取样品适量(相当于柴胡0.5 g),置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇(含5%浓氨试液)25 mL,密塞,称定质量,超声(功率350 W,频率37 kHz,下同)处理30 min,取出,放冷,再次称定质量,用甲醇(含5%浓氨试液)补足减失的质量,摇匀,用0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 模拟样品溶液 (1)标准样品溶液:取北(南)柴胡、荆芥穗、薄荷、紫苏叶、防风、葛根、桔梗、苦杏仁、白芷、苦地丁、芦根饮片10、20、6、6、10、10、6、8、6、20、16 g,按2020年版《中国药典》(一部)“感冒清热颗粒”项下制法^[1],分别制得含北柴胡或南柴胡的感冒清热标准汤剂流浸膏各3批。精密称取上述标准汤剂流浸膏适量(相当于柴胡0.5 g),按“2.2.2”项下方法处理,即得标准样品溶液。(2)缺柴胡阴性样品溶液:除不加北(南)柴胡外,其余同“2.2.3(1)”项下处方、制法,制得缺柴胡阴性样品溶液。(3)藏柴胡阳性样品溶液:取藏柴胡10 g替代北(南)柴胡,其余同“2.2.3(1)”项下处方、制法,制得藏柴胡阳性样品溶液。(4)掺伪50%藏柴胡阳性样品溶液:取藏柴胡5 g,北(南)柴胡5 g,其余同“2.2.3(1)”项下处方、制法,制得掺伪50%藏柴胡阳性样品溶液。(5)掺伪10%

藏柴胡阳性样品溶液:取藏柴胡1 g,北(南)柴胡9 g,其余同“2.2.3(1)”项下处方、制法,制得掺伪10%藏柴胡阳性样品溶液。

2.2.4 感冒清热颗粒掺伪混合样品溶液 取感冒清热颗粒样品,研细,混匀,精密称取样品适量(相当于柴胡0.45 g),精密加入藏柴胡粉末0.05 g,其余同“2.2.2”项下处方、制法,制得感冒清热颗粒掺伪混合样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 分别取1.010 $\mu\text{g/mL}$ nepesaikosaponin K对照品溶液、缺柴胡阴性样品溶液、标准样品溶液(含北柴胡或南柴胡)、掺伪50%藏柴胡阳性样品溶液(含北柴胡)和藏柴胡阳性样品溶液,按“2.1”项下检测条件进样测定。总离子流(total ion current, TIC)图和典型MRM图如图2所示,在与nepesaikosaponin K对照品溶液相应保留时间位置上,缺柴胡阴性样品溶液中3对特征离子对峰均未检出,说明缺柴胡阴性样品对检测无干扰。标准样品溶液检出微量nepesaikosaponin K,与其余色谱峰的分离度均大于1.5;掺伪50%藏柴胡阳性样品溶液、藏柴胡阳性样品溶液均检出nepesaikosaponin K,其色谱峰峰面积分别约为标准样品的12倍和25倍,与其余色谱峰的分离度均大于1.5。

2.3.2 线性关系考察 分别取“2.2.1”项下系列对照品溶液,按“2.1”项下检测条件进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X)、定量离子对对应色谱峰峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y=3\ 113.2X+19.084$ ($r=0.999\ 1$),表明nepesaikosaponin K检测质量浓度的线性范围为0.051~20.200 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.3 精密度试验 取“2.2.1”项下质量浓度为1.010 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,按“2.1”项下检测条件连续进样6次,记录峰面积。结果显示,nepesaikosaponin K定量离子对对应色谱峰峰面积的RSD为1.51% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 按“2.2.3(5)”项下方法平行制备掺伪10%藏柴胡阳性样品溶液(含北柴胡),共6份,按“2.1”项下检测条件进样测定,记录峰面积并以外标法计算样品中的nepesaikosaponin K含量。结果显示,该成分含量的RSD为2.02% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 按“2.2.3(5)”项下方法制备掺伪10%藏柴胡阳性样品溶液(含北柴胡),分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时按“2.1”项下检测条件进样测定,记录峰面积。结果显示,nepesaikosaponin K定量离子对对应色谱峰峰面积的RSD为1.89% ($n=8$),表明掺伪10%藏柴胡阳性样品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知nepesaikosaponin K

含量的感冒清热颗粒样品(编号S7)9份(每份约相当于柴胡0.5 g),分别加入低(1.01 $\mu\text{g/mL}$)、中(10.10 $\mu\text{g/mL}$)、高(50.50 $\mu\text{g/mL}$)质量浓度的对照品溶液(按“2.2.1”项下方法配制)1 mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下检测条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,上述溶液中nepesaikosaponin K的平均加样回收率为97.58%,RSD为2.09% ($n=9$),表明方法准确度良好。

2.3.7 检测限与定量限考察 取感冒清热颗粒供试品溶液(编号S7),适当稀释后按“2.1”项下检测条件进样测定。结果显示,当含量为0.59 $\mu\text{g/g}$ 时,nepesaikosaponin K定量、定性离子对对应色谱峰的信噪比均大于3;当含量为1.75 $\mu\text{g/g}$ 时,nepesaikosaponin K定量离子对对应色谱峰的信噪比大于10。综合考虑样品间差异及方法偏差,拟定感冒清热颗粒中nepesaikosaponin K的检测限为0.60 $\mu\text{g/g}$,定量限为1.80 $\mu\text{g/g}$ 。

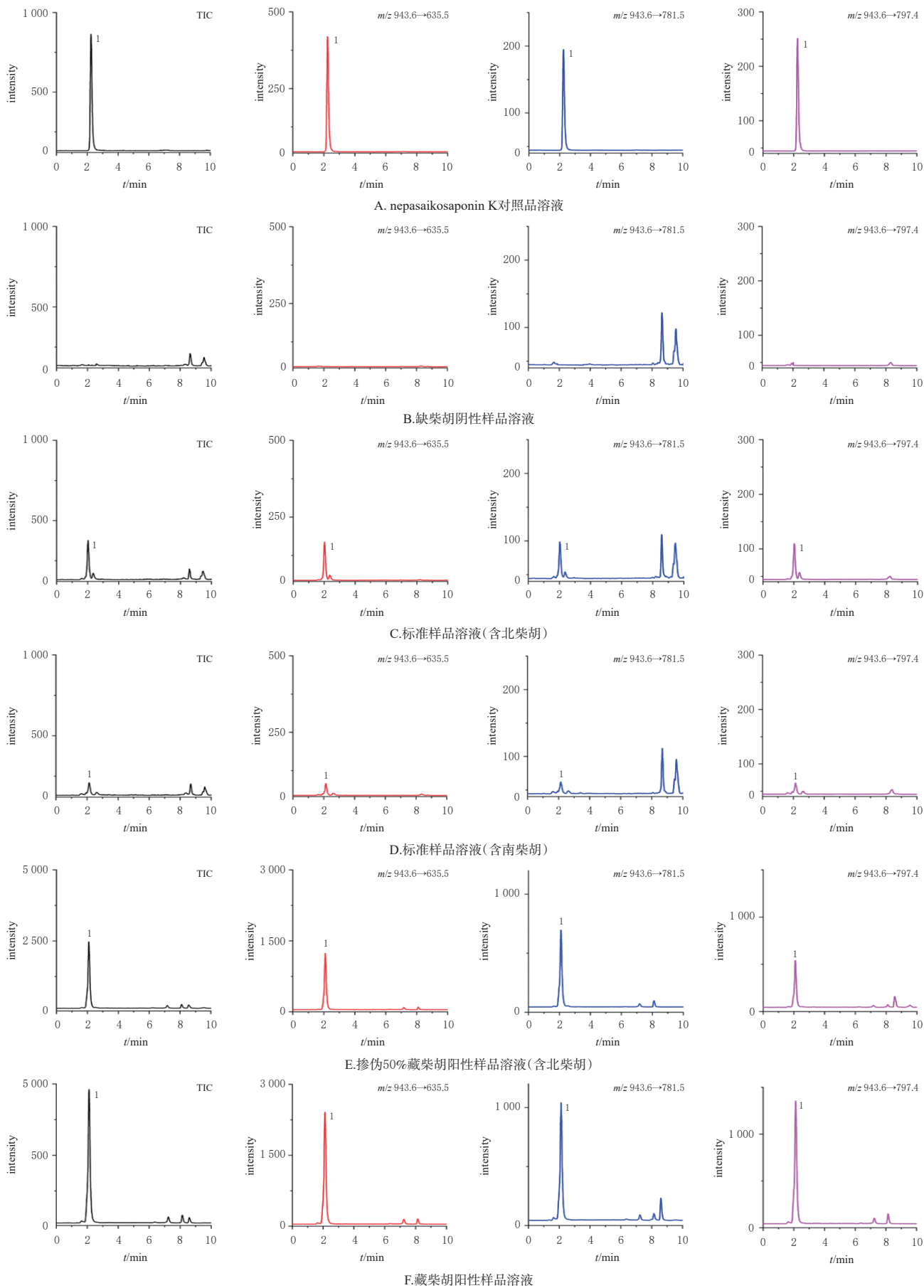
2.4 感冒清热颗粒模拟样品中nepesaikosaponin K的含量

分别取“2.2.3”项下各模拟样品溶液(掺伪10%藏柴胡阳性样品溶液除外)适量,按“2.1”项下检测条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算各样品中nepesaikosaponin K的含量,结果见表2。

2.5 感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪比例检测方法的建立及验证

2.5.1 感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪比例线性关系的考察 取藏柴胡和北柴胡饮片适量,其余同“2.2.3(1)”项下处方、制法,分别制得藏柴胡掺伪比例5%、8%、10%、20%、40%、50%、70%、90%、100%的感冒清热颗粒掺伪样品溶液共9份,按“2.1”项下检测条件进样测定。以掺伪样品溶液中藏柴胡掺伪比例为横坐标(a)、nepesaikosaponin K定量离子对对应色谱峰峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y=26\ 147a+44.603$ ($r=0.990\ 9$),表明感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪比例在5%~100%范围内与峰面积成良好的线性关系。

2.5.2 感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪比例测定方法的验证 取感冒清热颗粒样品3批(编号分别为S1、S6、S15),分别加入一定量的藏柴胡粉末,参照“2.2.4”项下方法制成藏柴胡比例分别为10%、20%、50%的掺伪混合样品溶液,按“2.1”项下检测条件进样测定,记录峰面积并代入“2.5.1”项下线性回归方程计算藏柴胡掺伪比例。结果显示,感冒清热颗粒掺伪混合样品中藏柴胡的理论掺伪比例与实测掺伪比例的平均偏差为1.25%~1.53%,说明该方法能准确测定感冒清热颗粒中藏柴胡的掺伪比例。结果见表3。



1: nepesaikosaponin K

图2 专属性试验的TIC图和典型MRM图

表2 感冒清热颗粒模拟样品中 nepesaikosaponin K 含量的测定结果 (n=3)

模拟样品	nepesaikosaponin K 含量 ^a /(μg/mL)		nepesaikosaponin K 含量 ^b /(μg/g)	
	检测值	平均值	检测值	平均值
缺柴胡阴性样品	ND	ND	ND	ND
北柴胡制标准样品 01	0.316	0.298	15.818	14.946
北柴胡制标准样品 02	0.282		14.116	
北柴胡制标准样品 03	0.298		14.903	
南柴胡制标准样品 01	0.071	0.100	3.564	5.026
南柴胡制标准样品 02	0.108		5.411	
南柴胡制标准样品 03	0.122		6.102	
藏柴胡阳性样品 01	8.098	8.033	404.904	401.649
藏柴胡阳性样品 02	8.020		401.001	
藏柴胡阳性样品 03	7.981		399.041	
掺伪 50% 藏柴胡阳性样品 01	3.677	3.696	183.861	184.782
掺伪 50% 藏柴胡阳性样品 02	3.738		186.896	
掺伪 50% 藏柴胡阳性样品 03	3.672		183.588	

a: 每 1 mL 感冒清热颗粒模拟样品供试品溶液所含 nepesaikosaponin K 的量; b: 每 1 g 感冒清热颗粒模拟样品中柴胡(包括南柴胡、北柴胡和藏柴胡)所含 nepesaikosaponin K 的量; ND: 未检出

表3 感冒清热颗粒掺伪混合样品中藏柴胡实测掺伪比例与理论掺伪比例的比较

编号	理论掺伪比例/%	实测掺伪比例/%	偏差/%	平均偏差/%
S1	10	9.93	0.07	1.51
	20	19.45	0.55	
	50	53.92	3.92	
S6	10	9.63	0.37	1.53
	20	22.66	2.66	
	50	48.44	1.56	
S15	10	10.30	0.30	1.25
	20	21.37	1.37	
	50	52.08	2.08	

2.6 市售感冒清热颗粒中 nepesaikosaponin K 含量分布及掺伪情况分析

分别取感冒清热颗粒样品(编号 S1~S15),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下检测条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中 nepesaikosaponin K 的含量。同时,将各样品中 nepesaikosaponin K 的峰面积代入“2.5.1”项下线性回归方程计算藏柴胡掺伪比例。考虑到不同批次感冒清热颗粒中 nepesaikosaponin K 含量差异和线性拟合误差,拟定疑似掺伪比例低于 6% 为未掺伪,结果见表 4。由表 4 可知,15 批市售感冒清热颗粒样品中 nepesaikosaponin K 含量检测结果为 2.584~56.661 μg/g,其中 2 个批次样品含量测定值异常,其掺伪比例分别为 9.91% 和 13.40%,异常率为 13.33%。

2.7 感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪拟定限度研究

根据市场调研及数据分析,参照 2020 年版《中国药典》(四部)“0212 药材和饮片检定通则”所述杂质通常不得过 3%^[14],考虑柴胡存在交叉种植、种质多样及性状易混淆的情况,结合感冒清热颗粒制法与柴胡处方量,同时考虑北(南)柴胡制感冒清热颗粒标准样品中均含有微量的 nepesaikosaponin K,本研究拟定感冒清热颗粒中藏柴胡的掺伪限度为 10%。

表4 15批感冒清热颗粒样品中 nepesaikosaponin K 含量测定结果及掺伪情况 (n=3)

编号	nepesaikosaponin K ^a /(μg/mL)	nepesaikosaponin K ^b /(μg/g)	是否疑似掺伪	疑似掺伪比例/%
S1	0.130	6.487	否	/
S2	0.840	42.013	是	9.91
S3	1.133	56.661	是	13.40
S4	0.052	2.584	否	/
S5	0.054	2.681	否	/
S6	0.391	19.544	否	/
S7	0.384	19.223	否	/
S8	0.477	23.849	否	/
S9	0.454	22.708	否	/
S10	0.407	20.331	否	/
S11	0.399	19.946	否	/
S12	0.393	19.641	否	/
S13	0.383	19.127	否	/
S14	0.412	20.604	否	/
S15	0.492	24.604	否	/

a: 每 1 mL 感冒清热颗粒样品供试品溶液所含 nepesaikosaponin K 的量; b: 每 1 g 感冒清热颗粒中柴胡(包括南柴胡或北柴胡)所含 nepesaikosaponin K 的量; /: 未掺伪

按感冒清热颗粒处方和制法,分别取不同批次藏柴胡和北柴胡饮片各 5 批,按“2.2.3(5)”项下方法制备掺伪 10% 藏柴胡阳性样品溶液,再按“2.1”项下检测条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算得 5 批掺伪 10% 藏柴胡阳性样品溶液中 nepesaikosaponin K 的平均含量为 1.01 μg/mL,按处方量折算得每 1 g 柴胡所含 nepesaikosaponin K 的质量为 50.42 μg。因此,本研究拟定感冒清热颗粒供试品溶液中 nepesaikosaponin K 的含量限度为 1 μg/mL。

根据上述拟定掺伪限度,由表 4 和图 3 可知,本次收集的 15 批次市售感冒清热颗粒中,1 批次样品超出拟定掺伪限度,不合格率为 6.67%。同时,根据北(南)柴胡制标准样品含量数据(表 2)所绘参考线可知,13 个批次含量检测结果接近或略低于北(南)柴胡制感冒清热颗粒标准样品参考线,2 批次样品偏离感冒清热颗粒标准样品参考线。

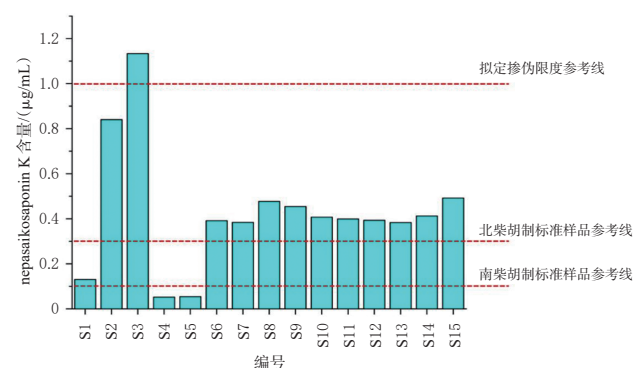


图3 15批感冒清热颗粒中 nepesaikosaponin K 含量分布柱状图

3 讨论

3.1 感冒清热颗粒差异标志物的选择

课题组前期分别对各模拟样品中 nepesaikosaponin K 的含量进行测定,结果显示, nepesaikosaponin K 在缺柴胡阴性样品中未被检出,而藏柴胡阳性样品中该成分的含量为标准样品的 25~115 倍。因此, nepesaikosaponin K 可作为感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪检测方法的差异标志物。

3.2 检测条件优化

3.2.1 供试品溶液制备方法 课题组前期以甲醇(含浓氨试液)为提取溶剂,考察了不同超声时间(30、45、60 min)、溶剂体积(25、50、75 mL)及浓氨试液体积分数(2%、5%、10%)对感冒清热颗粒供试品溶液中待测成分定量离子对对应色谱峰峰面积的影响,最终确定了甲醇所含浓氨试液的体积分数为 5%,提取溶剂用量为 25 mL,超声时间为 30 min。

3.2.2 色谱条件 课题组分别考察了水、甲醇、乙腈、甲(乙)酸溶液等不同流动相体系的分离效果。结果显示,当以甲醇为有机相时,基线噪声较大,色谱响应值偏低,且分离度小于 1.5;采用乙腈为有机相,上述问题均有所改善;同时,为改善待测成分色谱峰的峰形,课题组尝试在流动相中加入一定量的酸。最终确定流动相为 0.1% 甲酸溶液-含 0.1% 甲酸的乙腈,并建立了“2.1.1”项下梯度洗脱程序。课题组还考察了不同柱温(30、35、40 °C)对供试品溶液中待测成分色谱峰峰面积及分离度的影响,最终确定柱温为 40 °C。

3.2.3 质谱条件 课题组分别考察了电喷雾正、负离子模式下对照品溶液和供试品溶液中目标成分的检出情况。结果显示,采用负离子模式可检出 nepesaikosaponin K 的分子离子峰 m/z 943.6[M-H]⁻、氯离子加合峰 m/z 979.7[M+Cl]⁻ 和羧基加合峰 m/z 989.6[M+HCOO]⁻,其中分子离子峰 m/z 943.6[M-H]⁻ 的丰度最高;而采用正离子模式未能检测出 nepesaikosaponin K 色谱峰。因此,最终选取母离子为 m/z 943.6[M-H]⁻,主要碎片离子为 m/z 781.5[M-H-Glu]⁻、 m/z 797.4[M-H-Rha]⁻、 m/z 635.5[M-H-Glu-Rha]⁻。课题组前期分别检测了对照品和供试品溶液中 m/z 943.6→635.5、 m/z 943.6→781.5、 m/z 943.6→797.4 特征离子对对应色谱峰,结果显示,3 组特征离子对均能被检出;其中 m/z 943.6→635.5 对应色谱峰峰面积最大、信噪比高、分离度好,故选择其作为定量离子对。

3.3 市售感冒清热颗粒中 nepesaikosaponin K 含量及藏柴胡掺伪情况分析

采用本研究建立的感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪检测方法,对 6 家生产企业的 15 批市售感冒清热颗粒样品中 nepesaikosaponin K 的含量进行检测,结果表明,1 批次样品超出拟定限度,不合格率为 6.67%。同时,本研究对感冒清热颗粒中掺伪比例进行了调查,结果表明,2 批

次市售样品中 nepesaikosaponin K 的含量偏离感冒清热颗粒标准样品参考线,掺伪比例分别为 9.91% 和 13.40%,说明市售样品存在掺伪现象,应予以关注。现有研究表明,藏柴胡因价格低、产量高的优势常掺伪或混入北柴胡使用^[9];而且其柴胡皂苷含量显著高于其他品种,具有一定的毒性风险^[9],因此本研究建立的方法可对感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪情况进行有效排查和控制。

综上所述,本研究建立了以 nepesaikosaponin K 为指标的感冒清热颗粒中藏柴胡掺伪的检测方法,初步拟定了藏柴胡掺伪限度为 10%,并对市售感冒清热颗粒中 nepesaikosaponin K 含量和藏柴胡掺伪比例进行了调查,可为该制剂质量评价及藏柴胡掺伪筛查提供检测手段,同时也为中成药掺伪检测技术研究提供新的思路与方法。

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,2020:293,1796-1797.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第五十五卷:第一分册[M]. 北京:科学出版社,1979:215.
- [3] 赵佳琛,翁倩倩,张悦,等. 经典名方中柴胡药材的本草考证[J]. 中国中药杂志,2020,45(3):697-703.
- [4] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准:2003 年版[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:165.
- [5] 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.
- [6] 夏玉英,李菁,李楚源,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析感冒清热颗粒化学成分[J]. 中药材,2022,45(02):359-367.
- [7] 张东阁,王凤霞,杨宇杰,等. 感冒清热颗粒挥发油包含工艺的优化[J]. 中国药房,2021,32(14):1734-1740.
- [8] 樊洪利,刘亚雄,乔莉,等. 基于顶空-气相色谱-离子迁移谱的北柴胡与藏柴胡鉴别[J]. 广州中医药大学学报,2022,39(2):417-421.
- [9] 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.
- [10] 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):1975-1981.
- [11] 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):109-114.
- [12] 杨印军,郑伟,郭佳琪,等. 北柴胡、竹叶柴胡、藏柴胡与小叶黑柴胡化学成分比较研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(2):332-337.
- [13] FANG W, YANG Y J, GUO B L, et al. Anti-influenza triterpenoid saponins (saikosaponins) from the roots of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum*[J]. Bioorg Med Chem Lett,2017,27:1654
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2020 年版. 北京:中国医药科技出版社,2020:29.

(收稿日期:2022-05-10 修回日期:2022-08-09)

(编辑:曾海蓉)