

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)18-0089-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.18.019



# 超高效液相色谱串联质谱法测定护肝片(胶囊)中柴胡皂苷K含量\*

钱鑫, 黄婉锋, 潘志文

(广东省佛山市食品药品检验检测中心, 广东 佛山 528051)

**摘要:**目的 建立测定护肝片(胶囊)中柴胡皂苷K含量的超高效液相色谱串联质谱法。方法 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH-C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为 0.30 mL/min, 柱温为 35℃, 进样量为 1 μL。电喷雾离子源, 负离子检测, 多反应监测模式, 离子源温度为 150℃, 毛细管电压为 4.0 kV, 脱溶剂温度为 500℃, 锥孔气流量(氮气)为 50 L/h, 碰撞气流速(氩气)为 0.15 L/h, 氩气流量为 800 L/h。结果 柴胡皂苷K质量浓度在 0.200 7~5.017 6 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.999 9, n=5$ ); 检测限为 0.05 mg/kg, 定量限为 0.20 mg/kg; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%; 平均加样回收率为 98.43%, RSD 为 0.95% ( $n=9$ )。12 个厂家 47 批样品中有 28 批的柴胡皂苷K含量介于 0.556 4~3.589 9 μg/g。结论 该方法操作简便、快捷、灵敏度高、重复性好, 可用于护肝片(胶囊)的质量控制。

**关键词:**超高效液相色谱串联质谱法; 护肝片; 护肝胶囊; 柴胡皂苷K; 含量测定

## Content Determination of Nepesaikosaponin K in Hupan Tablets (Capsules) by UPLC-MS/MS

QIAN Xin, HUANG Wanfeng, PAN Zhiwen

(Foshan Institute for Food and Drug Control, Foshan, Guangdong, China 528051)

**Abstract: Objective** To establish an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the determination of nepesaikosaponin K in Hupan Tablets (Capsules). **Methods** The chromatographic column was Waters Acquity UPLC BEH-C<sub>18</sub> column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (gradient elution), the flow rate was 0.30 mL/min, the column temperature was 35℃, and the injection volume was 1 μL. The electrospray ion source (ESI) was adopted with negative ion detection and multiple reaction monitoring (MRM) mode, the ion source temperature was 150℃, the capillary voltage was 4.0 kV, the desolvent temperature was 500℃, the cone hole gas flow (nitrogen) was 50 L/h, the collision gas flow (argon) was 0.15 L/h, and the nitrogen flow was 800 L/h. **Results** The linear range of nepesaikosaponin K was 0.200 7 - 5.017 6 μg/mL ( $r=0.999 9, n=5$ ). The limit of detection was 0.05 mg/kg, and the limit of quantitation was 0.20 mg/kg. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 3.0%. The average recovery rate of nepesaikosaponin K was 98.43% with an RSD of 0.95% ( $n=9$ ). Among the 47 batches of samples from 12 manufacturers, the content of nepesaikosaponin K in 28 batches of samples was in the range of 0.556 4 to 3.589 9 μg/g. **Conclusion** This method is simple, fast, sensitive and repeatable, which can be used for the quality control of Hupan Tablets (Capsules).

**Key words:** UPLC-MS/MS; Hupan Tablets; Hupan Capsules; nepesaikosaponin K; content determination

护肝片(胶囊)由柴胡、茵陈、板蓝根、五味子、猪胆粉和绿豆组方,有疏肝理气、健脾消食功效,且具有降低转氨酶的作用,临床用于治疗慢性肝炎及早期肝硬化。

化。方中柴胡为君药,始载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>,是伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzoniferolium* Willd. 的干燥根<sup>[2]293</sup>(按性状不同,

\*基金项目:广东省药品抽检工作计划[粤药监办执法[2020]84号]。

第一作者:钱鑫,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为中药学,(电子信箱)598553862@qq.com。

135-139.

[13] 徐 硕,徐文峰,姜文清,等. 石韦质量评价的研究进展[J]. 西北药学杂志,2021,36(2):336-339.

[14] 田 甜,纪玉华,王寿富,等. 车前草浸出物测定方法的建立及熵权 TOPSIS 法评价车前草药材质量[J]. 广东药科大学学报,2021,37(1):16-22.

[15] 纪玉华,魏 梅,李国卫,等. 不同部位车前草 HPLC 特征图谱的建立及多指标成分含量测定[J]. 中药材,2020,43(3):660-664.

[16] 倪文娟,俞松林,张莉华,等. 茯苓三萜类成分利水作用的虚拟筛选[J]. 中国药业,2019,28(11):40-43.

[17] 李晓雪,赵 明,马耀玲,等. 玉米须化学成分研究[J]. 中草药,2021,52(12):3480-3484.

(收稿日期:2022-11-30;修回日期:2023-04-21)

分别称“北柴胡”和“南柴胡”),市场上柴胡种类繁多,存在用药混乱、基源不清、非药用部位混用等问题<sup>[3-8]</sup>。窄竹叶柴胡是柴胡的主要伪品,存在严重的造假风险<sup>[9-13]</sup>;竹叶柴胡、锥叶柴胡的混用也会威胁制剂的安全生产。护肝片现行标准有3个<sup>[2]1031,[14-15]</sup>,护肝胶囊现行标准有1个<sup>[2]1032</sup>,但上述标准均未对窄竹叶柴胡进行有效的风险控制。本课题组前期对窄竹叶柴胡的特征性成分进行研究,柴胡皂苷K含量极高,约为其他品种柴胡的40倍<sup>[11]</sup>。为此,本研究中建立了测定护肝片(胶囊)中柴胡皂苷K含量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,以为该制剂的质量评价提供参考。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Xevo-TQ型三重四极杆液质联用仪(美国Waters公司,配有自动进样器、电喷雾接口、Empower色谱工作站);AB265-S型电子天平、XPR10型超微量天平,均购自瑞士Mettler Toledo公司);S180/H型超声波清洗器(德国Elma公司);MS2型迷你涡旋振荡器(德国IKA公司)。

### 1.2 试剂

护肝片(A厂20批,B厂6批,C厂5批,I厂4批,D厂3批,E厂、F厂各2批,G厂、H厂、J厂各1批);护肝胶囊(K厂、L厂各1批);柴胡皂苷K对照品(上海诗丹德标准技术服务有限公司,批号为7285,含量98.0%);甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸为优级纯,水为超纯水。北柴胡(中国食品药品检定研究院/广东省药材公司中药饮片厂/国药集团冯了性<佛山>药材饮片有限公司,批号分别为120992-201509,B5769112,20210108);窄竹叶柴胡(亳州市众益堂中药材销售有限公司/梅州市上善若水中药材有限公司/广东省广州市清平药材市场,批号分别为20201020,20201020,20201104);竹叶柴胡(四川寻百草药业有限公司/中国食品药品检定研究院,批号分别为2020529,121343-201903);锥叶柴胡(广东省广州市清平药材市场,批号为2020522)。

## 2 方法与结果

### 2.1 试验条件

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH-C<sub>18</sub>柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~1 min时10%A,1~19 min时10%A→60%A,19~20 min时60%A→90%A,20~22 min时90%A,22~22.1 min时90%A→10%A,22.1~24 min时10%A);流速:0.30 mL/min;柱温:35℃;进样量:1 μL。

#### 2.1.2 质谱条件

电喷雾离子源,负离子检测,多反应监测模式;离子源温度:150℃;毛细管电压:4.0 kV;脱溶剂温度:500℃;锥孔气流量(氮气):50 L/h;碰撞气流速(氩气):0.15 L/h;氮气流量:800 L/h。质谱检测参数见表1。

表1 质谱检测参数

Tab.1 Mass spectrometry detection parameters

待测成分	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞电压(V)
柴胡皂苷K	943.6	635.3	74	49
		781.5		40
		797.2		38

### 2.2 溶液制备

取柴胡皂苷K对照品5.120 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇定容,即得对照品溶液。分别精密量取0.10,0.25,0.50,1.25,2.50 mL,置50 mL容量瓶中,加甲醇定容,制成质量浓度分别为0.200 7,0.501 8,1.003 5,2.508 8,5.017 6 μg/mL的系列对照品溶液。取装量差异项样品粉末(内容物)1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇20 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,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。分别取北柴胡、窄竹叶柴胡、竹叶柴胡、锥叶柴胡适量,按护肝片处方和制法制备护肝片标准汤剂样品、窄竹叶柴胡样品、竹叶柴胡样品、锥叶柴胡样品,作为对照药材溶液。按护肝片处方及工艺制备缺北柴胡的阴性样品,按供试品溶液制备方法制得阴性对照品溶液。

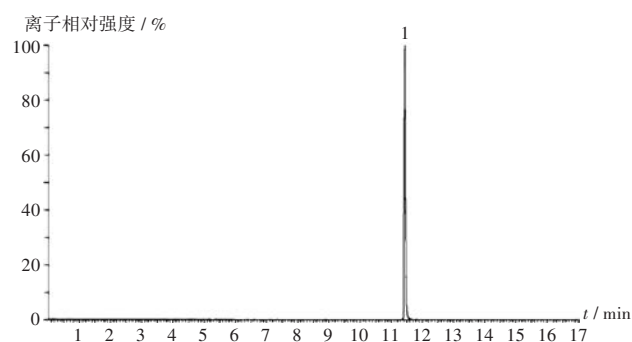
### 2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别精密吸取2.2项下对照溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录总离子流图(TIC)、子离子质谱图。详见图1、图2。

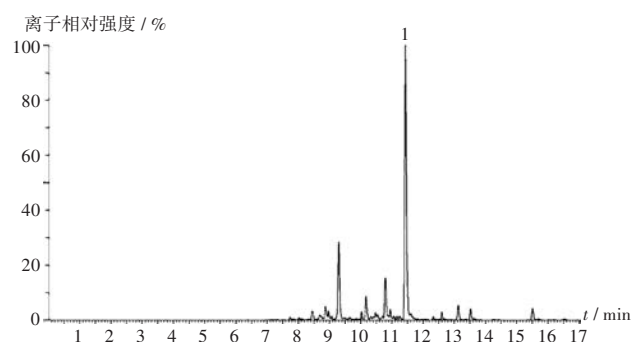
专属性试验:取2.2项下对照药材溶液与阴性对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,采用外标法计算柴胡皂苷K的含量。结果上述样品中,柴胡皂苷K含量分别为0.611 3,39.594 8,0.954 7,1.127 6,0 μg/g,窄竹叶柴胡样品中柴胡皂苷K的含量约为护肝片标准汤剂样品中的65倍,且阴性对照无干扰。

线性关系考察:取2.2项下系列对照品溶液适量,按2.1项下试验条件进样测定。以待测成分质量浓度(X,μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1029.5X - 1.1354$ ( $r = 0.9999$ , $n = 5$ )。结果表明,柴胡皂苷K质量浓度在0.200 7~5.017 6 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

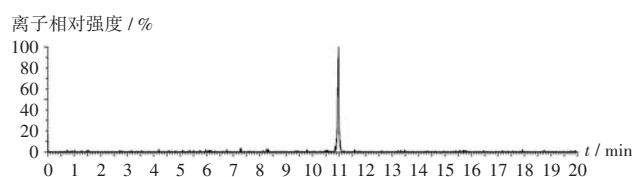
检测限与定量限考察:取2.2项下对照品溶液适量,逐级稀释,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面



A



B



C

1. 柴胡皂苷K

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液(批号 201901068) C. 阴性对照溶液

图1 总离子流图

1. Nepesaikosaponin K

A. Reference solution B. Test solution (batch number: 201901068)

C. Negative reference solution

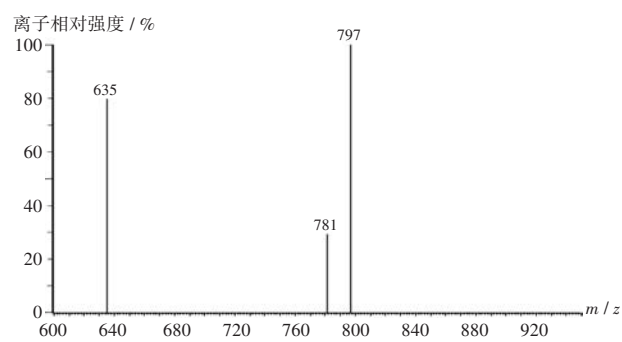
Fig. 1 Total ion chromatograms

积,以信噪比分别为3:1和10:1时的待测成分质量浓度记为检测限和定量限。结果检测限为0.05 mg/kg,定量限为0.20 mg/kg。

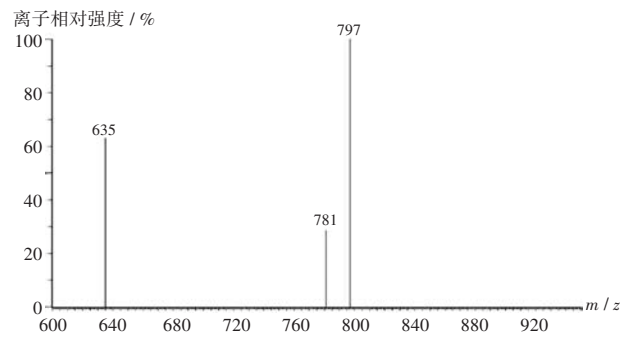
精密度试验:取同一批(批号为200503)样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果柴胡皂苷K峰面积的RSD为1.91%(n=6),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取供试品(批号为200503)溶液适量,分别于室温放置0,2,4,8,12,24,48 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果柴胡皂苷K峰面积的RSD为2.27%(n=7),表明供试品溶液在室温下放置48 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批(批号为200503)样品适量,平行6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下



A



B

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液(批号 201901068)

图2 子离子质谱图

A. Reference solution B. Test solution (batch number: 201901068)

Fig. 2 Mass spectrogram of daughter ions

试验条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果柴胡皂苷K的平均含量为0.4889 μg/mL, RSD为1.26%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批(批号为200503)样品适量,平行9份,精密称定,分别加入质量浓度为100 μg/mL的对照品溶液0.04,0.20,0.80 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表2。

## 2.4 样品含量测定

按2020年版《中国药典(四部)》通则0212药材和饮片检定通则<sup>[16]</sup>规定,杂质通常不得超过3%。由于柴

表2 加样回收试验结果(n=9)

Tab. 2 Results of the recovery test (n=9)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.0375	9.9855	4.0140	13.8751	96.90		
1.0125	9.7449	4.0140	13.6465	97.20		
1.0037	9.6602	4.0140	13.5859	97.80		
1.0062	9.6843	20.0700	29.5737	99.10		
1.0194	9.8113	20.0700	29.5803	98.50	98.43	0.95
1.0163	9.7815	20.0700	29.7311	99.40		
1.0045	9.6679	80.2800	89.1451	99.00		
1.0098	9.7189	80.2800	88.8750	98.60		
1.0103	9.7237	80.2800	89.5220	99.40		

胡药材基源复杂,故将限度放宽为10%。以90%北柴胡中掺10%窄竹叶柴胡拟订柴胡皂苷K的含量限度为4.5 μg/g。取各批样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,采用外标法计算柴胡皂苷K的含量(见表3,其中K厂、L厂产品为胶囊剂,其余厂产品均为片剂)。结果显示,8个生产厂家(A,B,D,E,G,H,J,K)的28批样品含量在拟合限度范围内。

表3 护肝片(胶囊)中柴胡皂苷K含量测定结果(μg/g, n=3)

Tab.3 Results of content determination of nepesaikosaponin K in Hupan Tablets and Hupan Capsules (μg/g, n=3)

厂家	批号	含量	厂家	批号	含量	厂家	批号	含量	厂家	批号	含量
A	201901068	0.808 5		202002060	0.921 2		20200608	25.592 3	F	20190505	0.056 3
	201903058	0.824 5		202003059	0.879 0		20200915	27.931 1		20200603	0.054 6
	201906014	0.811 2		202003061	0.983 5	C	190904	0.058 3	G	200406	0.556 4
	201907026	1.021 2		202003069	1.115 3		200203	0.101 8	H	200410	0.675 2
	201909050	0.826 8		202005016	1.010 4		200205	0.054 7	I	200302	12.799 2
	201911164	0.601 8		202005021	0.780 6		200603	0.059 4		200501	10.788 9
	201911070	0.950 9		202005022	0.959 8		200902	0.051 7		200502	10.130 9
	201911071	0.786 8		202005047	0.915 0	D	20190206	39.912 7		200503	9.624 6
	201911161	0.896 9	B	20191206	0.050 8		20200501	1.096 6	J	200517	2.718 7
	201911180	0.843 3		20190827	0.135 6		20200707	1.629 2	K	190701 024	3.589 9
	201912005	0.888 8		20200311	3.263 1	E	20200603	0.376 2	L	200507 195	38.566 8
	202001015	0.747 5		20200426	0.052 7		20191201	0.059 7			

### 3 讨论

预试验中样品提取方法考察了提取溶剂(甲醇、乙腈、50%甲醇溶液),提取方式(超声处理、加热回流)及提取时间(10,30,60 min)对柴胡皂苷K提取效果的影响。结果柴胡皂苷K在不同组合中提取效率有差异,综合提取效率和溶剂效应,选择甲醇提取,超声处理30 min。

色谱条件,流动相考察了甲醇-水,甲醇-0.1%甲酸水溶液,乙腈-水,乙腈-0.1%甲酸水溶液,结果以乙腈-水流动相测得峰形对称,出峰时间稳定,分离度最佳;色谱柱考察了Agilent SB-C<sub>18</sub>柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), Waters Acquity UPLC BEH-C<sub>18</sub>柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), Waters X Bridge C<sub>18</sub>柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)的分离度和重复性,结果前两者均符合要求,故色谱柱内径选择1.7 μm或1.8 μm。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便,灵敏度高,结果真实可靠,可为监测护肝片(胶囊)中的非法添加成分提供参考。但本研究尚存在不足,如未充分考察北柴胡、窄竹叶柴胡及竹叶柴胡在不同产地、不同采收期和不同炮制品间的含量差异<sup>[17-19]</sup>;同时未分离检测柴胡中柴胡皂苷A、柴胡皂苷B<sub>2</sub>、柴胡皂苷C、柴胡皂苷D、柴胡皂苷E等代表性成分<sup>[20-21]</sup>。后续可进一步增加药材品种,优化供试品制备及分析条件。

### 参考文献

- [1] 崔玲. 神农本草经[M]. 天津:天津古籍出版社, 2009:525.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [3] 潘琪,傅颖,毕琳丽,等. 上海中药市场北柴胡的真伪鉴别[J]. 光明中医,2022,37(3):381-383.
- [4] 杜微波,马智玲,李雪,等. 不同基原柴胡配方颗粒的鉴别研究[J]. 中国药学杂志,2022,57(7):567-572.
- [5] 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):6172-6177.
- [6] 孙婷婷,骆骄阳,徐媛媛,等. 柴胡药材质量国际标准现状概述[J]. 中国中药杂志,2020,45(20):4853-4860.
- [7] 张全芳,范阳阳,刘艳艳,等. 柴胡属药用植物多重实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 药学研究,2019,38(12):693-708.
- [8] 谢嘉驰,李亚兰,彭江丽,等. 柴胡的真伪鉴别[J]. 中国中医药现代远程教育,2019,17(8):86-88.
- [9] 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.
- [10] 周燕燕,郭祥英,蔡彩敏. 北柴胡、南柴胡及藏柴胡的鉴别分析[J]. 海峡药学,2019,31(11):59-62.
- [11] 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(9):1452-1456.
- [12] 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.
- [13] 席啸虎,夏召弟,王世伟,等. 藏柴胡和北柴胡定性及3种成分定量的近红外光谱技术快速分析[J]. 时珍国医国药,2022,33(2):382-386.
- [14] YBZ04482008,国家食品药品监督管理局标准:护肝片[S].
- [15] YBZ04232008,国家食品药品监督管理局标准:护肝片[S].
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:29.
- [17] 彭依晴,刘爽,康泽鹏,等. 柴胡皂苷提取工艺及其含量测定研究[J]. 化学试剂,2021,43(12):1677-1682.
- [18] 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):221-225.
- [19] 侯会平,赵士博,于康平,等. 北柴胡不同产地、不同采收期和不同炮制品中6种柴胡皂苷的含量测定[J]. 药学学报,2018,53(11):1887-1893.
- [20] WANG R, YUAN XM, JU BY, et al. Simultaneous determination of Saikosaponin a, c and d in different parts of wild bupleurum from Shanxi Province [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2018,27(10):703-710.
- [21] 黄炜忠,张清民. 一测多评分析方法下柴胡药材中柴胡皂苷a,c,d含量测定研究[J]. 四川中医,2018,36(1):71-74.

(收稿日期:2022-10-09;修回日期:2023-05-21)