

基于 UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析鳖血柴胡皂苷类化学成分

陈文彬, 史毅, 马亚男, 叶耀辉

(江西中医药大学药学院, 江西南昌 330004)

摘要: 以鳖血柴胡 (*Bupleuri radix* with turtle blood) 炮制品为原料, 基于超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UPLC/Q-TOF-MS/MS) 分析手段, 建立皂苷类成分快速分析方法。采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以 0.01% 甲酸水溶液 (A) -乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 2 μL, 柱温 40 °C, ESI 采用负离子扫描模式采集数据。结果表明: 利用已建立的筛查数据库将满足质量误差小于 5×10^{-6} 、同位素分布正确且含有二级质谱裂解片段的离子作为分析目标化合物, 结合软件 Formula Finder, Mass Calculators 等功能, 在线数据库 (Human Metabolome Database、Pub Chem、Mass Bank、Chem Spider 等) 及二级碎片裂解规律, 从鳖血柴胡中共分离和鉴定出 44 个皂苷类成分, 主要为环氧醚型、异环双烯型、12-烯型、12-烯-28-羧酸型柴胡皂苷。综上分析, UPLC/Q-TOF-MS/MS 方法能快速、准确、较全面地鉴定鳖血柴胡中皂苷类成分, 为鳖血柴胡的质量评价指标选择和药效物质基础的研究提供可行方法。

关键词: 柴胡; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 柴胡皂苷; 柴胡皂苷 A; 柴胡皂苷 D

文章编号: 1673-9078(2019)07-247-253

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.034

Analysis of the Chemical Constituents of *Bupleurum* Saponins in *Bupleuri radix* with Turtle Blood by UPLC/Q-TOF-MS/MS

CHEN Wen-bin, SHI Yi, MA Ya-nan, YE Yao-hui

(College of Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330004, China)

Abstract: A rapid method for the analysis of saponins based on UPLC/Q-TOF-MS/MS was established by using *Bupleuri radix* with Turtle Blood processed products as raw materials. The analysis was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) by gradient elution. The mobile phase consisted of 0.01% formic acid solution (A)-acetonitrile (B) at a flow rate of 0.3 mL/min, and the injection volume was 2 μL, the column temperature was at 40 °C. The mass spectrometer was operated in negative mode. Results showed that the compounds with a mass error of less than 5×10^{-6} , a correct isotope distribution and fragment ion were used as the target compounds, using the established screening database. Combined with software Formula Finder, Mass Calculators and other functions, online databases (Human Metabolome Database, PubChem, MassBank, ChemSpider, etc.), and two stage fragmentation rule, a total of 44 saponins were separated and identified in *Bupleuri radix* with Turtle Blood, including epoxy ether type, isophthalene type, 12-ene-type and 12-ene-28-carboxylic acid type saikosaponins. In conclusion, the results demonstrate that UPLC/Q-TOF-MS/MS method is quick, accurate, and efficient for the identification of saponins in *Bupleuri radix* with Turtle Blood, and provides a feasible method for the selection of quality control indicators and the efficacy of active compounds in *Bupleuri radix* with Turtle Blood.

Key words: *Bupleuri radix*; UPLC/Q-TOF-MS/MS; saikosaponin; saikosaponin A; saikosaponin D

柴胡为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 或狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzonifolium* Willd.)

收稿日期: 2019-03-09

基金项目: 江西省研究生创新专项资金项目 (YC2015-B066)

作者简介: 陈文彬 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源及品质评价

通讯作者: 叶耀辉 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药炮制机制研究

的干燥根, 味辛、苦, 性微寒; 归肝、胆、肺经; 具有疏散退热、舒肝解郁、升举阳气等作用, 用于治疗感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛等^[1]。柴胡为我国常用中药之一, 其加工炮制品有醋柴胡、鳖血柴胡、酒柴胡、柴胡炭、蜜柴胡等^[2], 而以鳖血柴胡最具特色, 是通过新鲜鳖血炮制柴胡得到的一种传统、特色饮片, 其临床应用主要是通过借鳖血阴液之性缓柴胡劫阴之性, 从而具有填阴

滋血, 抑制其浮阳之性, 增强清肝退热的功效, 可用于热入血室、骨蒸劳热^[3]。文献记载鳖血柴胡有鳖血拌和鳖血炒 2 种炮制方法^[4], 而炮制工艺研究集中于鳖血炒柴胡, 于欢等^[5]通过多指标正交试验优选出鳖血炒柴胡最佳工艺为鳖血量 0.05 mL/g, 在温度 150 °C 炒制 10 min; 叶耀辉等^[6]采用响应面法优选出鳖血炒柴胡的最佳工艺为每 100 g 柴胡加 15 g 鳖血, 在温度 110 °C 炒制 15 min。目前, 在鳖血柴胡的化学成分研究方面多集中于研究其挥发油、氨基酸、多糖等, 如于欢等^[5]利用 GC-MS 技术建立鳖血柴胡饮片挥发油成分定性及半定量分析方法, 从鳖血柴胡中定性分析出 105 种挥发油成分, 采用 PITC 柱前衍生技术建立鳖血柴胡饮片多种氨基酸的定量分析方法, 同时建立 UV 法测定柴胡多糖含量; 对于鳖血柴胡中皂苷类化合物的定性鉴别未见文献报道。因此, 本实验采用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 技术对鳖血柴胡中皂苷类化合物进行系统研究, 通过已建数据库筛查得到的目标化合物, 根据有关化合物结构的二级碎片离子信息, 结合文献报道的质谱裂解规律及在线数据库比对, 从而推断化合物的结构, 为科学阐明鳖血柴胡药效物质基础和建立质量控制体系提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原材料及试剂

鳖血柴胡炮制品: 柴胡药材(批号: 20171201)购于河北安国药材市场, 中华鳖(批号: 20180722)购于江西省军山湖甲鱼养殖基地; 将新鲜鳖血与适量柴胡饮片拌匀(每 100 g 柴胡拌入 15 g 鳖血), 鉴于鳖血量较少, 可先将新鲜鳖血加入少许温水稀释后再与柴胡饮片拌匀, 稍闷润至鳖血吸尽后, 放入铜锅中, 在温度 110 °C 下炒制 15 min, 取出, 放凉^[6]。

甲酸和乙腈为色谱纯, 购于美国 Merck 公司; 乙醇、正丁醇、石油醚为分析纯, 均购于西陇科学股份有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备

超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(AB SCIEX Triple TOF 5600+; Foster City, CA), 配有电喷雾离子源(ESI)、Analyst 1.6 色谱工作站和 Peakview 等质谱分析软件, AB SCIEX 公司; 岛津超高效液相色谱仪(Nexera UPLC LC-30A, 日本), 含在线真空脱气机, 自动进样器, 柱温箱, 高压二元梯度泵和二极管阵列检测器; Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 奥豪斯 CP214 型万分

之一电子天平, 奥豪斯仪器上海有限公司; 粉碎机, 瑞安市永历制药机械有限公司; KQ-5200B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 超纯水系统, 法国 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备

参照柴胡总皂苷的提取方法^[7], 准确称取鳖血柴胡粉末 10 g, 加 8 倍量 80%乙醇, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 滤过, 减压浓缩至原体积的 1/10, 用等体积的石油醚萃取 3 次, 弃石油醚层, 提取液用等量的水饱和的正丁醇溶液萃取 3 次, 合并正丁醇部位, 减压浓缩至干燥, 残渣用甲醇溶解并经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

1.2.2 分析条件

1.2.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.01%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~8 min, 20%~40% B; 8~28 min, 40%~95% B; 28~30 min, 95% B; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL。

1.2.2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI), 负离子模式下采集数据, 质量扫描范围 m/z 100~1000, 喷雾电压为-5500 V, 离子源温度为 500 °C, 裂解电压(DP) -100 V, 碰撞能量(CE)为-45 eV, 碰撞能量扩展(CES)为-15 eV, 雾化气(gas1)为 50 psi, 辅助气(gas2)为 50 psi, 气帘气(curtain gas)为 40 psi。

1.2.3 数据统计分析

通过 Scifinder 数据库对柴胡中的化合物进行检索, 建立包括中英文名称、分子式、精确相对分子量以及特征碎片的柴胡潜在化学成分数据库。采用 Analyst TF1.6 和 Peakview 1.2 (AB SCIEX) 软件对鳖血柴胡提取物的质谱数据进行处理; 依据实测相对分子量与理论精确相对分子质量的偏差小于 5×10^{-6} 、同位素分布正确及含有二级质谱裂解碎片的原则, 确定各色谱峰对应化合物的分子式, 在已建立的柴胡化学成分数据库中检索确证匹配的化合物。对于一些无法对应的色谱峰, 利用 Peakview 1.2 (AB SCIEX) 软件中 Formula finder 功能, 结合 MS/MS 碎片信息以及文献报道, 进一步推断。

2 结果与分析

2.1 鳖血柴胡中皂苷类成分鉴别分析

采用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 技术的负离子模式分析鳖血柴胡皂苷类成分(-ESI-MS 的质谱总离子流图 (TIC) 如图 1 所示, 通过查阅国内外文献以及 Scifinder 数据库, 建立含有 93 个柴胡化学成分数据库, 结合 Peakview 软件中 XIC Manager 功能对目标化合物进行了鉴定和确证。根据 Peakview 1.2 工作站给出的高分辨的精确相对分子质量、二级质谱碎片离子信息, 结合文献报道的质谱裂解规律及在线数据库的检索 (HMDB、Pub Chem、Mass Bank、Chem Spider 等), 进行数据定性鉴定处理分析, 共鉴定出 44 个皂苷类成分 (含同分异构体), 分析数据见表 1。

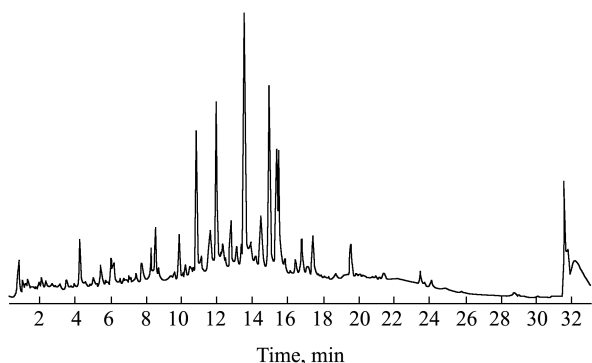


图 1 鳖血柴胡提取液的 UPLC/Q-TOF-MS/MS 负离子模式总离子流图

Fig.1 Total ion chromatogram of UPLC/Q-TOF-MS/MS by negative mode for extraction of *Bupleuri radix* with turtle blood

2.2 皂苷类化合物的质谱裂解规律分析

柴胡皂苷类成分均属于五环三萜类齐墩果烷型衍生物, 其苷元不同分为 7 种类型, 在鳖血柴胡中共鉴定出 44 个皂苷类化合物, 4 种类型且含量较高, 分别为环氧醚型 (I)、异环双烯型 (II)、12-烯型 (III)、12-烯-28-羧酸型 (V), 柴胡皂苷中含有葡萄糖、呋糖、鼠李糖等糖链结构, 呈现一定的质谱裂解规律。现以柴胡皂苷 F 为例, 依据多级碎片信息, 解析鳖血柴胡皂苷类成分的质谱裂解规律。柴胡皂苷 F 的分子式为 $C_{48}H_{80}O_{17}$, 由 PeakView 软件计算出精确相对分子质量为 928.53955, 在负离子模式下的分子离子峰为 m/z 927.5263[M-H], 鳖血柴胡样品中化合物 12 的 TOF-MS 给出[M-H]为 927.5250, 其质量偏差范围在 5×10^{-6} 内, 初步推断其为柴胡皂苷 F, 其 TOF-MS 二

级碎片离子有 m/z 927.5250、781.4692、619.4135, 根据结构和二级碎片离子, 推断二级质谱中 m/z 781.4692 峰是由 m/z 927.5250 丢失 146×10^{-6} 的中性碎片所致, 碎片离子 m/z 619.4135 是由 m/z 781.4692 进一步丢失 162×10^{-6} 的中性碎片所致, 提示 m/z 619.4135 是由 m/z 927.5250 脱掉二糖产生, 推测其质谱裂解途径见图 2。综上, 化合物 12 与参考文献^[8]进行比对确认为柴胡皂苷 F; 结合文献^[9-21]指认其他鳖血柴胡中皂苷类成分详见表 1。

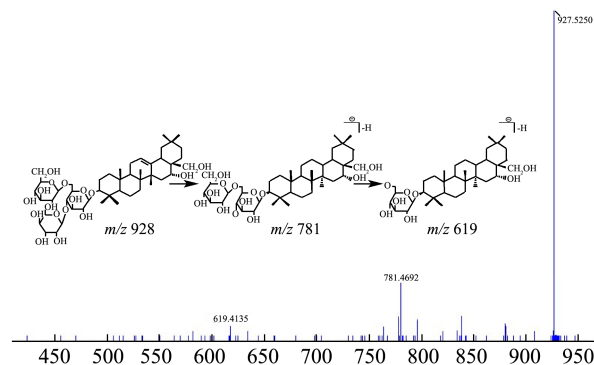


图 2 柴胡皂苷 F 质谱裂解过程

Fig.2 Fragmentation pathway of saikosaponin F

化合物 11 分子组成 $C_{48}H_{78}O_{17}$, 母离子为 m/z 925.5136[M-H], 相对分子质量为 926。其 TOF-MS 二级碎片离子有 m/z 779.4565, 763.4610, 617.4038, 该离子的特征碎片 m/z 779.4565 比母离子少了 146×10^{-6} , 继续脱去 1 个氧原子得到 m/z 763.4610 的碎片离子, 再脱去 1 分子葡萄糖得到 m/z 617.4038 的碎片离子。根据参考文献^[8]进行比对确认为柴胡皂苷 I, 推测其质谱裂解途径见图 3。

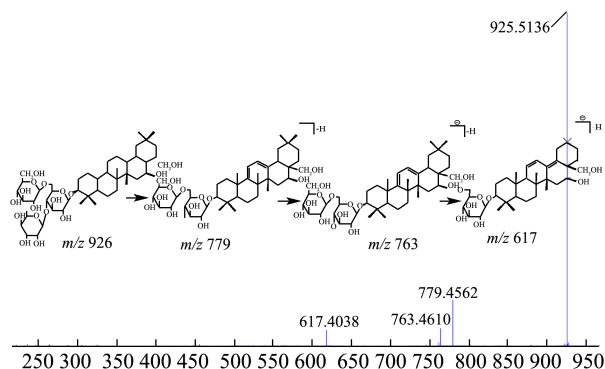


图 3 柴胡皂苷 I 质谱裂解过程

Fig.3 Fragmentation pathway of saikosaponin I

表1 鳖血柴胡中皂苷类成分的质谱数据及鉴定结果

Table 1 Mass Spectrometry data and Identification results of saponins in *Bupleuri Radix* with Turtle Blood

编号	T _R /min	化合物	分子式	离子峰归属	理论值(m/z)	测定值(m/z)	误差($\times 10^{-6}$)	碎片离子	参考文献
1	5.86	Hydroxysaikosaponin C	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	943.5272	943.5255	-1.8	797.4663,781.4766	[13]
2	5.86	Rotundioside P	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	943.5272	943.5255	-1.8	797.4663,781.4766	[17]
3	5.86	Rotundioside U	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₈	[M-H] ⁻	943.5272	943.5255	-1.8	797.4663,781.4766	[17]
4	6.85	Hydroxysaikosaponin A	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	797.4693	797.4680	-1.6	635.4136	[13]
5	6.85	Hydroxysaikosaponin D	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	797.4693	797.4680	-1.6	797.4673,635.4136	[13]
6	8.53	柴胡皂苷 C	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	925.5166	925.5148	-1.9	779.4562	[8,9]
7	8.53	Rotundifolioside F	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	925.5166	925.5148	-1.9	779.4562	[16]
8	8.53	3-0-β-glucopyranosyl-(1->6)-(α-rhamnopyranosyl-(1->4))-β-gucopyranoside of 16-epi-saikogenin C	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	925.5166	925.5148	-1.9	779.4562	[15]
9	8.53	Rotundioside S	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	925.5166	925.5148	-1.9	925.5136,779.4562	[17]
10	8.53	Rotundioside M	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	925.5166	925.5148	-1.9	911.4983,779.4552,617.4022	[17]
11	8.53	柴胡皂苷 I	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	925.5166	925.5136	-1.9	779.4565,763.4610,617,4038	[8]
12	8.69	柴胡皂苷 F	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	927.5323	927.5250	-2.8	781.4692, 619.4135	[8]
13	8.69	Rotundifolioside C	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	927.5323	927.5297	-2.8	781.4723,619.4202	[16]
14	9.86	柴胡皂苷 B ₃	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	811.4849	811.4833	-2	649.4295	[12,14]
15	9.86	柴胡皂苷 B ₄	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	811.4849	811.4833	-2	649.4295	[12,14]
16	9.86	Malonylsaikosaponin D	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	811.4849	811.4833	-2	649.4295	[14]
17	9.86	Bupleuroside III	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	811.4849	811.4833	-2	649.4295	[18]
18	10.45	Saikosaponin S	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M-H] ⁻	941.5115	941.5091	-2.6	779.4550,617.4021	[14]
19	10.45	2''-O-β-D-glucopyranosyl saikosaponin B ₂	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M-H] ⁻	941.5115	941.5091	-2.6	779.4550,617.4021	[15]
20	10.45	3-0-β-glucopyranosyl-(1->6)-(α-rhamnopyranosyl-(1->4))-β-gucopyranoside of 30-hydroxy 16-epi-saikogenin C	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M-H] ⁻	941.5115	941.5091	-2.6	779.4550,617.4021	[15]
21	10.45	Rotundioside N	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	[M-H] ⁻	941.5115	941.5091	-2.6	941.5078,779.4550,617.4021	[17]
22	10.74	Rotundifolioside G	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	[M-H] ⁻	927.4959	927.4942	-1.8	927.4920,765.4375	[16]
23	10.81	Rotundifolioside D	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	[M-H] ⁻	911.5010	911.4985	-2.7	779.4552,617.4022	[16]
24	10.81	Rotundifolioside A	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	[M-H] ⁻	911.5010	911.4985	-2.7	779.4552,617.4022	[16]
25	12.98	11α-methoxysaikosaponin F	C ₄₉ H ₈₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	957.5423	957.5402	-2.7	811.5349	[14]
26	13.53	柴胡皂苷 D	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779.4587	779.4576	-1.5	617.4027	[8,9]
27	13.53	柴胡皂苷 A	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779.4587	779.4576	-1.5	617.4027	[8,9]

转下页

接上页

28	13.53	柴胡皂苷 B ₂	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779.4587	779.4576	-1.5	617.4027	[9,10]
29	13.53	saikosaponin G	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	779.4587	779.4559	-1.5	617.4027,471.0273	[9]
30	14.93	Prosaikogenin D	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	[M-H] ⁻	617.40589	617.40455	-2.2	455.3521	[20]
31	14.93	3β-hydroxyolean-12-ene-28-O-β-D-glucopyranoside	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	[M-H] ⁻	617.40589	617.40455	-2.2	455.3521	[21]
32	15.5	3''-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4029	[8,9]
33	15.5	4''-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4030	[8,9]
34	15.5	2''-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4031	[8,9]
35	15.5	6''-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4032	[8,9]
36	15.5	3''-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4033	[8,9]
37	15.5	4''-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4034	[8,9]
38	15.5	2''-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4035	[8,9]
39	15.5	6''-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	821.4693	821.4683	-1.3	779.4554,761.4456,617.4036	[8,9]
40	15.83	柴胡皂苷元 A	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M-H] ⁻	471.3480	471.3468	-2.5	453.3369,425.3417	[11]
41	15.83	柴胡皂苷元 F	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M-H] ⁻	471.3480	471.3468	-2.5	453.3369,425.3416	[11]
42	17.38	柴胡皂苷 E	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	763.4638	763.4628	-1.3	601.4087	[8]
43	17.38	柴胡皂苷 M	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	763.4638	763.4628	-1.3	601.4087	[8]
44	19.45	3''-O-acetylsaikosaponin e	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	805.4744	805.4737	-0.8	763.4629,745.4509,601.4094	[14]

化合物 29 分子组成 $C_{42}H_{68}O_{13}$, 母离子为 m/z 779.4559[M-H], 相对分子质量为 780。其 TOF-MS 二级碎片离子有 m/z 617.4027, 471.0273, 该离子的特征碎片 m/z 617.4027 比母离子少了 162×10^{-6} , 是由 m/z 779.4559 中性丢失 1 分子葡萄糖残基所致, 再脱去 1 分子糖基得到 m/z 471.0273 的碎片离子。根据文献参考文献[9]进行比对确认为柴胡皂苷 G, 推测其质谱裂解途径见图 4。

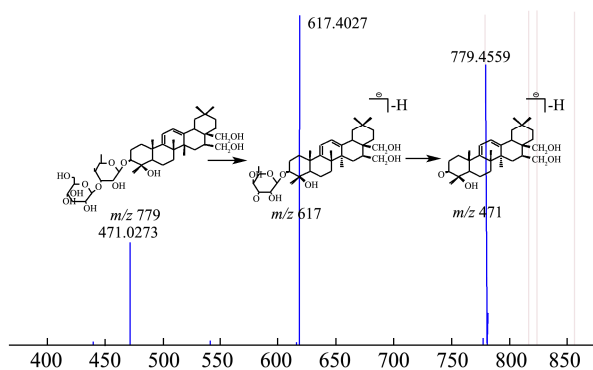


图 4 柴胡皂苷 G 质谱裂解过程

Fig.4 Fragmentation pathway of saikosaponin G

3 结论

3.1 为获得更好地色谱分离和质谱效应, 考察了不同的梯度进行洗脱, 由于柴胡皂苷均为五环三萜类齐墩果烷型衍生物^[19], 极性偏大, 最终以 20%~95%乙腈梯度进行洗脱, 同时因为单纯水使得色谱峰有严重拖尾, 所以在水相中加入甲酸来改善峰形, 最终确定以 0.01%甲酸水溶液-乙腈为样品分析的流动相。质谱条件的优化比较了正负离子检测模式, 发现负离子模式质谱响应优于正离子模式, 同时结合柴胡皂苷的结构性质差异, 因此本实验在负离子模式下定性分析样品。

3.2 对于鳖血柴胡皂苷的裂解, 根据二级碎片离子信息及文献报道的化合物质谱裂解规律, 结合自建数据库、在线数据库的筛查和检索, 确认和鉴定相应的化合物。同时, 柴胡中皂苷成分复杂, 且同分异构体很多^[11], 而本实验只鉴定了鳖血柴胡中 44 种含量较高的皂苷类化学成分, 对于其它一些出现在提取液总离子流图中的色谱峰, 由于浓度较低, 导致无法产生二级碎片离子的化合物, 并没有进行定性分析, 但总体来说, 在鉴定柴胡皂苷类成分分析上, 该方法相较于 LC-MS 技术更具优势^[8], 其鉴定的成分种类更多, 灵敏度更强。

3.3 UPLC/Q-TOF-MS/MS 联用技术能进行准确、快速的分析, 具有在高灵敏度的前提下保证高分辨率(高精度)的优点, 这新型液质联用技术的出现解决了中药化学成分复杂性与多样性对其物质基础的研究带来

的难题, 极大缩短中药化学成分分析工作的研究周期, 节约成本, 为合理开发中药资源奠定基础。本实验利用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 联用技术, 建立了鳖血柴胡皂苷类成分分析方法, 共分析了鳖血柴胡 44 个皂苷化合物, 为鳖血柴胡皂苷类成分定性研究提供了一种快速、高效的分析方法。鳖血炮制柴胡是樟帮特色的炮制工艺, 由炮制过程中是否加热可得到鳖血拌柴胡和鳖血炙柴胡两种炮制品, 而在本实验中没有采用对照品进行对比, 鉴别的准确度有所欠缺, 因此, 在后期的研究中在采用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 的基础上利用对照品分析鳖血拌柴胡和鳖血炙柴胡两种炮制品, 以期阐明“勿令犯火”炮制机理。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015
Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015
- [2] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012
GONG Qian-feng. Processing of Traditional Chinese Medicine [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2012
- [3] 于欢. 鳖血柴胡与雄黄颗粒饮片的炮制现代研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015
YU Huan. Modern study on the preparation of *Radix Bupleuri* and realgar granule slices of *Trionyx sinensis* [D]. Beijing: Beijing University of traditional Chinese Medicine, 2015
- [4] 叶耀辉, 史毅, 张博文, 等. 鳖血柴胡的研究进展[J]. 江西中医药, 2017, 48(3): 61-63
YE Yao-hui, SHI Yi, ZHANG Bo-wen, et al. Research progress of *Trionyx sinensis* blood *Bupleurum chinense* [J]. Jiangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 48(3): 61-63
- [5] 于欢, 李小宁, 钟凌云, 等. 多指标正交试验优选鳖血柴胡的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 8-11, 7
YU Huan, LI Xiao-ning, ZHONG Ling-yun, et al. Optimization of processing technology of *Trionyx sinensis* blood *Bupleurum chinense* by multi-index orthogonal test [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2015, 21(15): 8-11, 7
- [6] 叶耀辉, 郑红梅, 张博文, 等. Box-Behnken 响应面法优化鳖血柴胡炮制工艺[J]. 中药材, 2017, 40(2): 334-337
YE Yao-hui, ZHENG Hong-mei, ZHANG Bo-wen, et al.

- Optimization of processing technology of *Bupleurum chinense* by Box-Behnken response surface methodology [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(2): 334-337
- [7] 张国松,封传华,罗晓健,等.柴胡总皂苷提取工艺的优化[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):17-20
ZHANG Guo-song, FENG Chuan-hua, LUO Xiao-jian, et al. Optimization of extraction process of total saponins from *Bupleurum chinense* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(12): 17-20
- [8] 孙健,张立富,范斌,等.柴胡皂苷类化学成分的LC-MS分析[J].中国药物警戒,2012,9(12):725-727
SUN Jian, ZHANG Li-fu, FAN Bin, et al. LC-MS analysis of the chemical constituents of saikosaponins [J]. Chinese Journal of Pharmacovigilance, 2012, 9(12): 725-727
- [9] 贺晶,高晓霞,田俊生,等.UPLC-MS分析柴胡、白芍水煎液的化学成分及其对逍遥散的贡献[J].山西医科大学学报,2018,49(4):375-382
HE Jing, GAO Xiao-xia, TIAN Jun-sheng, et al. Analysis of chemical constituents of *Bupleurum chinense* and *Paeonia lactiflora* decoction by UPLC-MS and its contribution to Xiaoyao powder [J]. Journal of Shanxi Medical University, 2018, 49(4): 375-382
- [10] 刘晓帆,娄子洋,朱臻宇,等.采用HPLC-TOF/MS对中药复方小柴胡汤中化学成分的快速分析鉴别[J].第二军医大学学报,2009,30(8):941-946
LIU Xiao-fan, LOU Zi-yang, ZHU Zhen-yu, et al. Rapid analysis and identification of chemical constituents in traditional Chinese medicine compound Xiaochaihu decoction by HPLC-TOF/MS [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2009, 30(8): 941-946
- [11] 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 Xiao-meng. Studies on chemical constituents and quality control methods of *Bupleurum chinense* [D]. Beijing: Beijing University of traditional Chinese Medicine, 2018
- [12] 杨瑶琨.阿尔泰柴胡的化学成分及质量研究[D].北京:北京中医药大学,2006
YANG Yao-jun. Studies on the chemical constituents and quality of *Bupleurum altai* [D]. Beijing: Beijing University of traditional Chinese Medicine, 2006
- [13] Ebata N, Nakajima K, Hayashi K, et al. Saponins from the root of *Bupleurum falcatum* [J]. Phytochemistry, 1996, 41(3): 895-901
- [14] Huang H, Zhang X, Lin M, et al. Characterization and identification of saikosaponins in crude extracts from three *Bupleurum* species using LC-ESI-MS [J]. Journal of Separation Science, 2008, 31(18): 3190-3201
- [15] Luo S, Jin H, Kawai H, et al. Isolation of new saponins from the aerial part of *Bupleurum kunmingense* Y. Li et S. L. Pan [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(6): 1515-1519
- [16] Fujioka T, Yoshida K, Fujii H, et al. Antiproliferative constituents from umbelliferae plants VI. new ursane-type saikosaponin analogs from the fruits of *Bupleurum rotundifolium* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 51(4): 365-372
- [17] Fujioka T, Yoshida K, Shibao H, et al. Antiproliferative constituents from umbelliferae plants. IX. new triterpenoid glycosides from the fruits of *Bupleurum rotundifolium* [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2006, 54(12): 1694-1704
- [18] Matsuda H, Murakami T, Ninomiya K, et al. New hepatoprotective saponins, bupleurosides III, VI, IX, and XIII, from Chinese *Bupleuri radix*: Structure-requirements for the cytoprotective activity in primary cultured rat hepatocytes [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1997, 7(17): 2193-2198
- [19] 谢东浩,蔡宝昌,安益强,等.柴胡皂苷类化学成分及药理作用研究进展[J].南京中医药大学学报,2007,23(1):63-65
XIE Dong-hao, CAI Bao-chang, AN Yi-qiang, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological action of saikosaponins [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2007, 23(1): 63-65
- [20] Shimizu K, Amagaya S, Ogihara Y, et al. New derivatives of saikosaponins [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1985, 33(8): 3349-3355
- [21] Gupta A, Singh R, Purwar C, et al. Two pentacyclic triterpenes from the stem of *Calotropis procera* [J]. Indian Journal of Chemistry Section B-organic Chemistry Including Medicinal Chemistry, 2003, 42(8): 2030-2033