

基于 UHPLC-QE Plus-MS/MS 法分析柴黄颗粒及柴胡中化学成分

陈 晶, 傅欣彤, 陈有根, 郭洪祝*

北京市药品检验研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室 中药成分分析与生物评价北京市重点实验室
北京 102206

摘要: 目的 基于 UHPLC-QE Plus-MS/MS 方法分析柴黄颗粒以及柴胡的化学成分, 明确其质量特征。方法 以 5% 氨甲醇溶液超声提取, 采用 Luna Omega 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸溶液进行梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min。电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式下采集。根据精确相对分子质量以及二级离子碎片信息, 结合相对保留时间, 通过查阅文献以及和对照品比对, 进行成分指认。结果 鉴定出柴胡药材中化合物 50 个; 柴黄颗粒中 71 个化合物, 其中 36 个峰归属于黄芩, 33 个归属于柴胡。结论 建立的方法能快速、准确分析柴黄颗粒和柴胡化学成分, 归纳各主要成分裂解规律, 并通过与两者成分比较, 发现柴胡配伍前后化学成分的变化, 提示柴黄颗粒及柴胡中的质控成分。

关键词: 柴黄颗粒; 柴胡; 黄芩; UHPLC-QE Plus-MS/MS; 柴胡皂苷 v; 柴胡皂苷 p; 柴胡皂苷 a; 野黄芩苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4634-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.006

Analysis of chemical constituents of Chaihuang Granules by UHPLC-QE Plus-MS/MS

CHEN Jing, FU Xin-tong, CHEN You-gen, GUO Hong-zhu

NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Beijing Key Laboratory of Components Analysis and Biological Evaluation on Chinese Medicine, Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102206, China

Abstract: Objective To analyze and identify the chemical components and characteristic components of Chaihuang Granules (柴黄颗粒) and Chaihu (*Bupleuri Radix*) by UHPLC-QE Plus-MS/MS. **Methods** The samples were extracted with 5% ammonia-methanol solution by ultrasonic. The analyses was performed on a Luna Omega C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution with gradient elution mode at the flow rate of 0.3 mL/min. Electrospray ion source (ESI) was applied in negative ion mode. The chemical constituents were analyzed by exact relative molecular weight, fragment ion and the relative retention time and comparison with the related literature and reference standards. **Results** A total of 50 chemical compounds were identified from *Bupleuri Radix*, 71 chemical compounds in Chaihuang Granules were identified, among which 36 compounds were attributed to Huangqin (*Scutellariae Radix*) and 33 compounds were attributed to *Bupleuri Radix*. **Conclusion** The method is fast and highly sensitive for the screening and confirmation of the chemical constituents from Chaihuang Granules and *Bupleuri Radix*. The fragmentation characteristics were summarized in this paper. By comparing the chemical constituents in Chaihuang Granules and *Bupleuri Radix*, the chemical composition changes before and after compatibility can be found, which suggested a reference for the quality control components of Chaihuang Granules and *Bupleuri Radix*.

Key words: Chaihuang Granules; *Bupleuri Radix*; *Scutellariae Radix*; UHPLC-QE Plus-MS/MS; saikosaponin v; saikosaponin p; saikosaponin a; scutellarin

柴黄颗粒出自张仲景《伤寒杂病论》中的小柴胡汤, 是由柴胡和黄芩这对经典搭配组成的中成药制剂, 具有清热消炎功效, 用于上呼吸道感染, 感

冒发烧。中医理论中, 柴胡具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气作用, 黄芩则用于清热燥湿, 泻火解毒, 两者共同起到上下通达, 内外清解之功效。

收稿日期: 2022-03-09

作者简介: 陈 晶 (1987—), 女, 硕士, 主管药师, 主要从事中药成分分析研究。Tel: 18010281088 E-mail: chenjing4477@163.com

*通信作者: 郭洪祝, 男, 博士生导师, 主任药师, 主要从事中药鉴定、成分分析及药效代谢学研究。Tel: 18010281003 E-mail: guohz@bidc.org.cn

柴胡为方中君药,主要有皂苷、挥发油、香豆素、甾醇类成分,黄芩含多种黄酮类衍生物。虽然柴胡黄芩这组药对所含化学成分较多,但目前多集中于对柴胡皂苷 a、d 和黄芩苷的研究,对于柴胡煎煮前后皂苷成分的整体变化则更鲜有报道。本研究通过液质联用对柴黄颗粒中的化学成分进行分析,因柴胡中具有 13,28-氧环的三萜类化合物,其结构不稳定,在制剂加工过程中易断裂生成次生物,故增加柴胡药材的化学成分分析,通过中成药与药材中化学成分的比对,推断配伍前后皂苷类成分变化规律,从整体上反映物质基础,为实现柴黄颗粒整体控制质量提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超高效液相色谱串联质谱 Ultimate 3000/Q Exactive Plus (Thermo 公司); DTC-27J 型超声波清洗器,湖北鼎泰恒胜科技设备有限公司。

1.2 材料

乙腈为色谱纯(Thermo Fisher),甲酸为质谱级,其它试剂为分析纯。水为屈臣氏蒸馏水。柴胡(北柴胡)对照药材(批号 120992-201509)由中国食品药品检定研究院提供。对照品柴胡皂苷 a(批号 110777-201912,质量分数 94.8%)、柴胡皂苷 d(批号 110778-201912,质量分数 96.3%)、野黄芩苷(批号 110842-201709,质量分数 91.7%)、黄芩苷(批号 110715-201821,质量分数 95.4%)、汉黄芩苷(批号 112002-201702,质量分数 98.5%),为中国食品药品检定研究院提供;柴胡皂苷 i(批号 DST191109-015,97%),柴胡皂苷 b1(批号 DST200409-009,质量分数 98%),柴胡皂苷 b2(批号 DST191020-010,质量分数 98%),柴胡皂苷 c(批号 DST191118-007,质量分数 98%),柴胡皂苷 g(批号 DST191118-016,质量分数 98%),柴胡皂苷 h(批号 DST191118-014,质量分数 98%),柴胡皂苷 f(批号 DST191118-013,质量分数 98%),柴胡次苷 D(批号 DST191118-203,质量分数 98%),由乐美天医药(德斯特生物)提供;尼泊柴胡皂苷 k(批号 7285,质量分数 98%),由 NATURE STANDARD 提供。柴黄颗粒(批号 20191003)购自河南灵佑药业股份有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件

2.1.1 色谱条件 十八烷基硅烷键合硅胶柱(Luna

Omega 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm),以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱(0~3 min, 20%→30%B; 3~15 min, 30%→35%B; 15~30 min, 35%→65%B; 30~35 min, 65%→90%B; 35~40 min, 90%→100%B),体积流量 0.3 mL/min,柱温 30 °C,进样量 0.5 μL。

2.1.2 质谱条件电喷雾(ESI)源,离子源温度: 300 °C,鞘气流量 40 arb,辅助气流量 10 arb,扫描范围 m/z 150~1200,负离子全扫模式电压 3 kV。

2.2 溶液的制备

2.2.1 柴胡药材溶液的制备 精密称取柴胡对照药材 0.5 g,加 5%氨甲醇溶液 25 mL,超声处理 30 min,滤过,即得。

2.2.2 柴黄颗粒溶液的制备 精密称取柴黄颗粒样品(相当于柴胡药材 0.5 g)0.08 g,加 5%氨甲醇溶液 25 mL,超声处理 30 min,滤过,即得。

3 结果

用 UHPLC-QE Plus-MS/MS 负离子模式分析柴胡和柴黄颗粒 5%氨甲醇溶液的质谱总离子流图,如图 1 所示。因为黄芩中黄酮类成分含量与柴胡中三萜类成分含量不在同一个数量级,在同一张图谱上不能完全反映出来,故根据两者相对分子质量以荷质比 660 为分界在 2 个图中展示。查阅大量柴胡、黄芩的文献,建立相应的化学成分数据库,根据准分子离子得到其可能的分子式(误差范围 $\pm 5 \times 10^{-6}$),通过与 TCMSP 数据库及本实验室建立的数据库鉴定识别其成分。个别化合物经过了对照品进行指认。共识别出柴胡中 50 个化合物,柴黄颗粒中 71 个化合物,结果见表 1、2。

3.1 柴胡中化合物的质谱裂解规律分析

3.1.1 四糖三萜皂苷类 3 号峰负离子 m/z 1151.550 9 $[M+HCOO]^-$,其可能的分子式为 $C_{53}H_{86}O_{24}$,二级碎片中 m/z 791.42、629.37 响应值较高,分别为失去 $H_2O-CO-xyol-glc-H_2O$,进而再丢失 1 个六碳糖葡萄糖所得, m/z 483.31 是脱掉 1 个甲基五碳岩藻糖。通过其裂解规律结合文献报道^[1],鉴定为柴胡皂苷 v。

3.1.2 三糖三萜皂苷类 6 号峰与 3 号峰的二级碎片相同,其一级质谱中分子离子以 $[M+HCOO]^-$ 存在, m/z 为 989.498 17,与柴胡皂苷 v 相差 162 即 1 个六碳糖,查阅文献报道^[2]确定为柴胡皂苷 v-1。

峰 5、11、19 的一级质谱中分子离子荷质比为

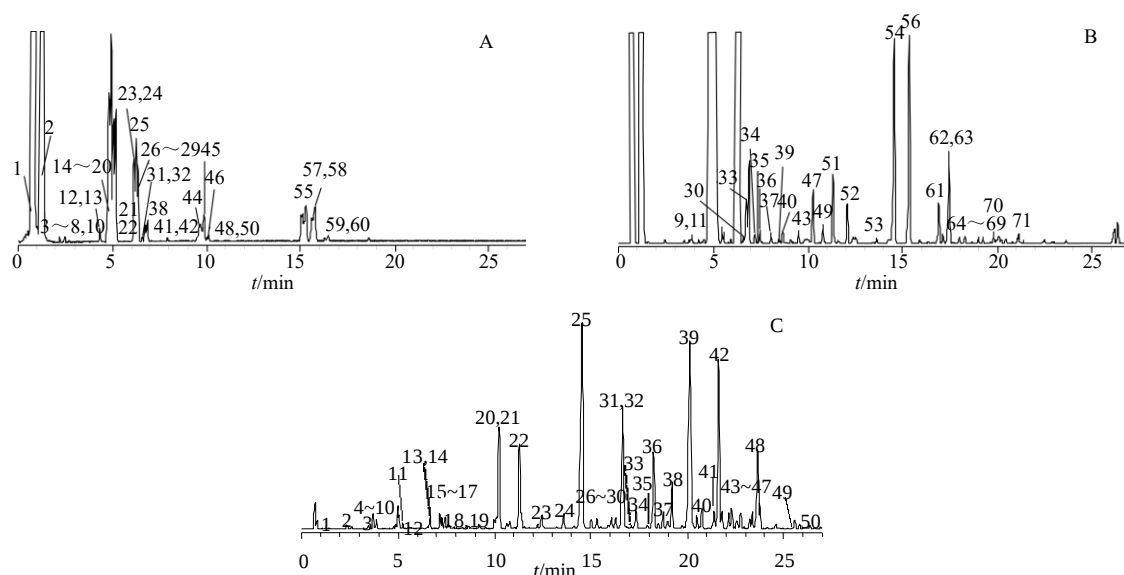


图 1 柴黄颗粒 LC-MS/MS 基峰离子流图 (提取范围 170~660, A; 提取范围 660~1200, B) 及柴胡 LC-MS/MS 基峰离子流图 (C)

Fig. 1 Base peak ion chromatography of LC-MS/MS of Chaihuang Granules in negative mode (scan ranges: 170—660) (A), (scan ranges: 660—1200) (B) and base peak ion chromatography of LC-MS/MS of *Bupleuri Radix* in negative mode (C)

表 1 柴胡中化学成分鉴定结果

Table 1 Component identification from *Bupleuri Radix*

编号	t_R/min	分子式	分子离子 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物
1	1.30	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	353.088 04 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.331	191.06	绿原酸
2	2.36	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	609.146 61 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.824	300.03	芦丁
3	3.48	$\text{C}_{53}\text{H}_{86}\text{O}_{24}$	1 151.550 90 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1.558	791.42, 629.37, 483.31, 313.11	柴胡皂苷 v
4	3.72	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	623.162 60 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.351	315.05, 300.03, 271.02, 151.00, 243.44	水仙苷
5	3.73	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$	1 003.512 51 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	0.576	957.50, 811.46, 795.47, 649.39, 487.34	柴胡皂苷 q
6	3.86	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	989.498 17 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1.908	791.42, 629.37, 483.31, 313.11	柴胡皂苷 v1
7	3.97	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	515.120 00 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.972	173.04, 179.03, 191.06, 353.09	异绿原酸 B
8	4.17	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	477.104 37 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.092	314.04, 271.02, 299.02, 243.03	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷
9	4.23	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	515.120 06 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.089	191.06, 179.03, 353.09	异绿原酸 A
10	4.58	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	515.120 06 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.089	173.04, 179.03, 191.06, 353.09	异绿原酸 C
11	5.13	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$	1 003.514 95 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	3.007	957.51, 795.46, 633.40, 647.84	30- β -D-吡喃葡萄糖基-30-羟基柴胡皂苷 b2
12	6.29	$\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{19}$	1 005.529 42 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1.827	959.52, 797.47, 635.42, 487.34	11 α ,16 β ,23,28-四羟基齐墩果烷-12-烯-3 β -氧基- β -D-吡喃夫糖基(3 $\rightarrow$ 1)- β -D-吡喃葡萄糖基(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-吡喃葡萄糖苷
13	6.53	$\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$	989.535 40 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	2.761	943.52, 797.47, 781.47, 635.42, 473.36	羟基柴胡皂苷 c
14	6.66	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$	843.476 26 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1.779	797.47, 635.42, 469.35	羟基柴胡皂苷 a
15	7.18	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$	843.476 50 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	2.064	797.47, 635.42, 471.35	羟基柴胡皂苷 d
16	7.44	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}$	987.519 17 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	2.179	941.51, 795.46, 779.46, 633.40	草柴胡皂苷 II
17	7.56	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$	843.477 05 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	2.716	797.47, 635.42, 456.73	Bupleuroside XIII
18*	8.64	$\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$	989.534 73 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	2.084	943.53, 797.47, 635.42, 473.36, 781.47	尼泊柴胡皂苷 k
19	8.72	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$	1 003.514 59 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	2.648	957.50, 795.46, 633.41	柴胡皂苷 p
20*	10.23	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{17}$	971.522 22 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	0.120	925.52, 779.46, 617.41, 763.46, 455.35	柴胡皂苷 c
21	10.23	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5$	329.233 64 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.889	211.13, 229.14, 171.10	半夏酸
22*	11.28	$\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{17}$	973.538 09 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	0.346	927.53, 781.47, 765.48, 619.42, 457.37	柴胡皂苷 f

续表 1

编号	tr/min	分子式	分子离子 (<i>m/z</i>)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物
23	12.48	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	987.519 29 [M+HCOO] ⁻	2.301	941.51, 795.45, 779.45, 633.40	16- <i>epi</i> -草柴胡皂苷 II
24	13.59	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	987.518 74 [M+HCOO] ⁻	1.744	941.51, 779.46, 617.41, 471.36	3 β ,16 β ,23-三羟基-13,28-环氧基-11-烯-3 β 氧基- β -D-吡喃夫糖基(3 $\rightarrow$ 1)- β -D-吡喃葡萄糖基(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-吡喃葡萄糖苷
25*	14.52	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.464 97 [M+HCOO] ⁻	0.940	779.46, 617.41, 471.35	柴胡皂苷 a
26	15.01	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	865.461 12 [M-H] ⁻	2.324	779.46, 617.40	丙二酸单酰柴胡皂苷 a
27*	15.30	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.466 13 [M+HCOO] ⁻	-1.907	779.46, 617.41	柴胡皂苷 b ₂
28	16.04	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.474 43 [M+HCOO] ⁻	-0.379	779.46, 617.41, 471.35	2''-O-乙酰柴胡皂苷 a
29	16.05	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	865.460 82 [M-H] ⁻	1.977	779.46, 617.41	丙二酸单酰柴胡皂苷 a
30	16.27	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.476 38 [M+HCOO] ⁻	1.868	821.47, 779.46, 617.41, 469.32	3''-O-乙酰柴胡皂苷 a
31	16.62	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	865.459 84 [M-H] ⁻	0.845	779.46, 617.41, 471.35	6''-O-丙二酸单酰柴胡皂苷 a
32	16.75	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.476 44 [M+HCOO] ⁻	1.938	821.47, 779.46, 617.41, 471.35	4''-O-乙酰柴胡皂苷 a
33*	17.07	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.466 80 [M+HCOO] ⁻	3.156	779.46, 617.4	柴胡皂苷 g
34*	17.32	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.412 54 [M+HCOO] ⁻	1.762	617.41	柴胡次皂苷 F
35*	17.95	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.413 21 [M+HCOO] ⁻	2.772	617.41	柴胡次皂苷 D
36*	18.25	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	809.470 15 [M+HCOO] ⁻	1.075	763.46, 601.41	柴胡皂苷 e
37	18.75	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	987.518 49 [M+HCOO] ⁻	1.491	941.51, 779.46, 617.41	bupleuroside I
38	19.19	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.475 46 [M+HCOO] ⁻	0.808	821.47, 779.45, 617.41, 416.64	6''-O-乙酰柴胡皂苷 a
39*	20.13	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.464 78 [M+HCOO] ⁻	0.709	779.46, 617.41, 471.35	柴胡皂苷 d
40	20.49	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	865.460 75 [M-H] ⁻	1.896	779.46, 617.41	丙二酸单酰柴胡皂苷 d
41	21.37	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	865.460 39 [M-H] ⁻	1.480	779.46, 617.41, 471.35	丙二酸单酰柴胡皂苷 d
42	21.60	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₆	865.459 47 [M-H] ⁻	0.417	779.46, 617.41, 761.44	6''-O-丙二酸单酰柴胡皂苷 d
43	21.77	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.475 71 [M+HCOO] ⁻	1.096	821.47, 779.46, 617.41, 471.35	2''-O-乙酰柴胡皂苷 d
44	22.14	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.475 65 [M+HCOO] ⁻	1.027	779.46, 617.41, 471.35	3''-O-乙酰柴胡皂苷 d
45	22.27	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.475 65 [M+HCOO] ⁻	1.027	779.46, 617.40, 471.35	4''-O-乙酰柴胡皂苷 d
46	22.75	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.412 60 [M+HCOO] ⁻	1.852	617.41	柴胡次皂苷 G
47	23.48	C ₃₆ H ₅₆ O ₈	661.397 40 [M+HCOO] ⁻	2.538	615.40, 469.10	柴胡次皂苷 I
48	23.64	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.475 28 [M+HCOO] ⁻	0.600	821.48, 779.46, 617.41, 471.35, 541.80	6''-O-乙酰柴胡皂苷 d
49	25.43	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₅	909.487 49 [M+HCOO] ⁻	2.382	867.25, 770.61, 647.33, 445.05	二乙酰柴胡皂苷 a/d
50	26.30	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₅	909.487 24 [M+HCOO] ⁻	2.107	863.36, 821.46, 761.51, 617.41, 577.99	二乙酰柴胡皂苷 a/d

*经对照品确认的化合物, 表 2 同

*compounds identified by reference standards, same as table 2

表 2 柴黄颗粒中化学成分鉴定结果

Table 2 Components identification from Chaihuang Granules

编号	tr/min	分子式	分子离子 (<i>m/z</i>)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物
1*	0.74	C ₁₃ H ₂₃ O ₁₃	387.114 75 [M+HCOO] ⁻	0.868	341.11, 179.06, 89.02, 161.04, 119.03	蔗糖
2*	1.15	C ₆ H ₁₂ NNaO ₃ S	178.053 10 [M-Na] ⁻	/	79.96, 161.89	甜蜜素
3 ^s	2.35	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	547.147 34 [M-H] ⁻	2.972	487.13, 457.12, 427.10, 367.08, 337.07	白杨素-6-C- α -L-阿拉伯糖-8-C- β -D-葡萄糖苷
4 ^s	2.59	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	547.147 34 [M-H] ⁻	2.972	457.11, 427.10, 487.13, 367.08, 337.07, 263.00, 282.04	白杨素-6-C- β -L-阿拉伯糖-8-C- β -D-葡萄糖苷
5 ^s	2.96	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	547.147 46 [M-H] ⁻	3.191	457.11, 427.10, 367.08, 337.07	白杨素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- α -L-阿拉伯糖苷
6 ^s	3.22	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	547.147 34 [M-H] ⁻	2.972	457.11, 427.10, 367.08, 337.07	白杨素-6-C- β -D-葡萄糖-8-C- β -L-阿拉伯糖苷
7 ^{s*}	3.30	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.073 52 [M-H] ⁻	2.106	285.04, 267.03, 190.93, 146.94, 174.96, 113.02, 85.03	野黄芩苷

续表 2

编号	tr/min	分子式	分子离子 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物
8 ^s	3.49	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	547.147 52 [M-H] ⁻	3.301	457.11, 427.10, 367.08, 337.07	白杨素-6-C-β-D-葡萄糖-8-C-β-阿拉伯糖苷
9 ^b	3.76	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	1 003.515 81 [M+HCOO] ⁻	3.864	957.50, 811.45, 795.45, 649.40, 781.44, 655.10, 449.90	柴胡皂苷 q
10 ^b	3.87	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.121 03 [M-H] ⁻	2.972	173.04, 179.03, 191.06, 353.09	异绿原酸 B
11 ^b	3.89	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₉	989.500 18 [M+HCOO] ⁻	3.939	791.42, 629.37, 779.42, 617.38, 313.11	柴胡皂苷 v1
12 ^s	4.55	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.090 12 [M-H] ⁻	4.043	299.06, 266.05, 285.04, 238.05	scutevulin-7-O-β-D-葡萄糖醛酸
13 ^b	4.58	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.121 22 [M-H] ⁻	3.340	173.04, 179.03, 191.06, 353.09	异绿原酸 C
14 ^s	4.67	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.089 94 [M-H] ⁻	3.664	299.06, 284.03, 266.05	粗毛豚草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷
15 ^s	4.76	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.088 32 [M-H] ⁻	0.254	299.06, 284.03, 268.06, 266.05, 161.85	三羟甲氧基黄酮葡萄糖醛酸
16 ^{s*}	4.97	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	444.094 42 [M-H ₂ O+NH ₂] ⁻	1.804	269.05, 113.02, 175.02	黄芩苷
17 ^s	5.15	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.099 46 [M-H] ⁻	2.528	269.05, 161.90	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷
18 ^b	5.15	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	1 003.512 88 [M+HCOO] ⁻	0.944	/	30-β-D-吡喃葡萄糖基-30-羟基柴胡皂苷 b2
19 ^s	5.20	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.078 31 [M-H] ⁻	1.518	269.05, 175.02, 113.02	去甲汉黄芩苷
20 ^s	5.24	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.103 55 [M-H] ⁻	0.228	295.01, 325.07	白杨素-6-C-β-D-葡萄糖苷
21 ^s	5.46	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.089 97 [M-H] ⁻	3.727	299.06, 284.03, 267.03	三羟甲氧基黄酮葡萄糖苷酸
22 ^s	5.57	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.089 81 [M-H] ⁻	3.391	299.06, 284.03, 267.03, 396.86	三羟甲氧基黄酮葡萄糖苷酸
23 ^{s*}	6.17	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	459.094 02 [M-H] ⁻	1.602	283.06, 268.04, 175.02, 113.02	汉黄芩苷
24 ^s	6.22	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.088 07 [M-H] ⁻	-0.272	299.06, 284.03, 253.05	三羟甲氧基黄酮葡萄糖苷酸
25 ^s	6.29	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	459.093 90 [M-H] ⁻	1.341	283.06, 268.04, 175.02, 113.02, 85.03	千层纸素 A 苷
26 ^s	6.39	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.088 38 [M-H] ⁻	0.381	299.06, 253.05, 284.03,	三羟甲氧基黄酮葡萄糖苷酸
27 ^s	6.39	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	429.083 34 [M-H] ⁻	1.445	253.05, 175.02, 113.02	白杨素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸
28 ^s	6.41	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.103 06 [M-H] ⁻	-0.952	295.05, 325.08	白杨素-8-C-β-D-葡萄糖苷
29 ^s	6.43	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.078 06 [M-H] ⁻	0.956	269.05, 175.02, 113.02	黄芩素-6-O-β-D-葡萄糖醛酸苷
30 ^b	6.56	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₈	943.525 63 [M-H] ⁻	-1.652	797.47, 733.41, 467.06, 433.61	羟基柴胡皂苷 c
31 ^s	6.61	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.079 25 [M-H] ⁻	3.630	269.05, 174.95, 113.02	黄芩素-5-O-β-D-葡萄糖醛酸苷
32 ^s	6.69	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.099 98 [M-H] ⁻	3.735	269.05, 253.05, 161.89, 113.02	千层纸苷 A
33 ^b	6.70	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄	843.478 03 [M+HCOO] ⁻	3.878	797.46, 635.41	羟基柴胡皂苷 a
34 ^b	7.21	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄	843.477 97 [M+HCOO] ⁻	3.807	797.47, 635.42, 472.63	羟基柴胡皂苷 d
35 ^b	7.29	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₅	857.456 91 [M+HCOO] ⁻	3.366	/	藏柴胡苷 V
36 ^b	7.48	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	941.510 38 [M-H] ⁻	-1.230	941.51, 795.45, 779.46, 633.40, 471.35	草柴胡皂苷 II
37 ^{b*}	8.06	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	987.521 00 [M+HCOO] ⁻	4.033	941.51, 795.45, 633.41, 779.46, 617.57, 457.18	柴胡皂苷 s
38 ^s	8.44	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.056 40 [M-H] ⁻	0.965	299.06, 284.03, 232.93, 164.93, 184.95, 155.04, 112.98	三羟基甲氧基黄酮
39 ^b	8.47	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	987.520 94 [M+HCOO] ⁻	3.972	941.51, 795.45, 779.46, 633.40	bupleuroside VII
40 ^{b*}	8.68	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₈	943.529 05 [M-H] ⁻	1.973	943.53, 797.47, 781.47, 635.42, 473.37	尼泊柴胡皂苷 k
41 ^s	8.77	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.056 49 [M-H] ⁻	1.266	299.06, 284.03, 164.93, 232.92, 184.95, 155.04	三羟基甲氧基黄酮
42 ^s	9.12	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.056 55 [M-H] ⁻	1.467	299.06, 284.03, 164.93, 155.04, 184.95, 232.92	三羟基甲氧基黄酮
43 ^b	9.51	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	941.509 52 [M-H] ⁻	-2.144	941.51, 795.45, 633.40, 779.46, 471.35	柴胡皂苷 n
44 ^s	9.68	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 93 [M-H] ⁻	1.425	269.05, 251.03, 166.99	芹菜素
45 ^{s*}	9.89	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 96 [M-H] ⁻	1.536	269.05, 251.03, 166.99, 132.97	黄芩素
46 ^b	10.15	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.233 89 [M-H] ⁻	1.648	211.13, 229.14, 171.10, 184.02	半夏酸
47 ^{b*}	10.27	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	925.517 94 [M-H] ⁻	1.422	925.51, 779.46, 763.46, 617.41	柴胡皂苷 c
48 ^s	10.71	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.056 52 [M-H] ⁻	1.367	299.06, 284.03, 164.93, 152.00, 184.95, 253.05, 232.92	三羟基甲氧基黄酮
49 ^{b*}	10.81	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	925.518 43 [M-H] ⁻	1.951	925.52, 779.46, 763.46, 617.41	柴胡皂苷 i
50 ^s	10.97	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.056 52 [M-H] ⁻	1.367	299.06, 284.03, 164.93, 232.92, 184.95, 155.00	切黄芩素 II
51 ^{b*}	11.34	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₇	927.531 31 [M-H] ⁻	-1.039	927.53, 781.47, 765.48, 619.42, 457.37, 697.75, 473.75	柴胡皂苷 f

续表 2

编号	ts/min	分子式	分子离子 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物
52 ^{b*}	12.11	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	925.517 46 [M-H] ⁻	0.903	925.51, 779.46, 763.47, 617.40	柴胡皂苷 h
53 ^b	13.64	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	941.513 61 [M-H] ⁻	2.200	941.51, 779.46, 617.41	3 β ,16 β ,23-三羟基-13,28-环氧基-11-烯-3- β -氧基- β -D-吡喃夫糖基(3 $\rightarrow$ 1)- β -D-吡喃葡萄糖基(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-吡喃葡萄糖苷
54 ^{b*}	14.57	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.466 98 [M+HCOO] ⁻	3.374	779.45, 617.41, 455.49	柴胡皂苷 a
55 ^s	15.32	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.061 49 [M-H] ⁻	1.036	268.04, 283.06, 137.02, 161.88, 72.64	汉黄芩素
56 ^{b*}	15.35	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.466 92 [M+HCOO] ⁻	3.302	779.46, 617.41, 471.63	柴胡皂苷 b ₂
57 ^s	15.80	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.056 37 [M-H] ⁻	0.865	253.05, 283.02, 164.93, 232.92, 112.98	高车前素
58 ^s	15.80	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.050 64 [M-H] ⁻	0.031	209.06	白杨素
59 ^s	16.47	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.061 58 [M-H] ⁻	1.354	268.04, 283.06	千层纸素 A
60 ^s	16.70	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	373.093 44 [M-H] ⁻	1.472	358.07, 343.05, 174.95, 249.00, 112.98, 102.96	黄芩新素 II
61 ^{b*}	16.91	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.467 35 [M+HCOO] ⁻	3.823	779.45, 617.41	柴胡皂苷 g
62 ^{b*}	17.38	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.413 94 [M+HCOO] ⁻	3.872	617.41	柴胡次皂苷 F
63 ^{b*}	17.47	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	825.467 53 [M+HCOO] ⁻	4.041	779.47, 617.41, 456.84	柴胡皂苷 b ₁
64 ^{b*}	18.00	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.413 94 [M+HCOO] ⁻	3.872	617.41	柴胡次皂苷 D
65 ^{b*}	18.30	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	809.472 29 [M+HCOO] ⁻	3.719	763.46	柴胡皂苷 e
66 ^b	19.25	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.478 09 [M+HCOO] ⁻	3.840	617.41, 779.47	6"-O-乙酰柴胡皂苷 a
67 ^b	19.64	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.413 82 [M+HCOO] ⁻	3.691	/	柴胡次皂苷 H
68 ^b	19.81	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.478 03 [M+HCOO] ⁻	3.771	820.89, 617.41, 779.46, 464.54	6"-O-乙酰柴胡皂苷 b ₂
69 ^b	20.09	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	663.413 88 [M+HCOO] ⁻	3.782	617.41	柴胡次皂苷 A
70 ^b	21.39	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	867.478 03 [M+HCOO] ⁻	3.771	/	6"-O-乙酰柴胡皂苷 b ₁
71 ^b	23.53	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	661.398 19 [M+HCOO] ⁻	3.733	/	柴胡次皂苷 I

s-来源于黄芩 b-来源于柴胡

s-source of *Scutellariae Radix* b-source of *Bupleuri Radix*

1 003.512 51、1 003.514 95、1 003.514 59, 软件推测其分子式均为 C₄₈H₇₈O₁₉, 但二级碎片峰不同, 峰 2 m/z 957.50 [M-H]⁻ 丢失 1 个甲基五碳糖形成 m/z 811.46 [M-H-rha]⁻, 再丢失 1 个六碳糖形成 m/z 649.39[M-H-rha-glc]⁻, 或者先丢失 1 个六碳糖形成 m/z 795.47[M-H-glc]⁻, 再丢失 1 个甲基五碳糖形成 m/z 649.39 [M-H-glc-rha]⁻, 在 m/z 649.39 基础上丢失 1 个六碳糖成 m/z 487.34, 由此推出 3 个糖是以支链形式与苷元结合, 且甲基五碳糖外侧不再与其它糖基结合, 查阅文献报道^[3-5] 归属了 5 号峰为柴胡皂苷 q, 同理归属 11 号峰为 30- β -D-吡喃葡萄糖-30-羟基柴胡皂苷 b₂, 19 号峰为柴胡皂苷 p。

12 号峰通过精确相对分子质量 m/z 1 005.529 42 [M+HCOO]⁻ 确定其分子式为 C₄₈H₈₀O₁₉, 根据碎片离子峰 m/z 959.52、797.47、635.42、487.34 可得出其依次脱掉 1 个甲酸、2 个六碳糖葡萄糖、1 个甲基五碳岩藻糖和 2 个氢, 查阅文献报道^[6], 与 11 α ,16 β ,23,28-四羟基齐墩果烷-12-烯-3 β -D-吡喃岩藻

糖基(3 $\rightarrow$ 1)- β -D-葡萄糖基(2 $\rightarrow$ 1)- β -D-葡萄糖苷一致。

13 号峰与 18 号峰通过精确相对分子质量确定分子式为 C₄₈H₈₀O₁₈, 裂解规律相同, 查阅的文献^[7-8] 中, 羟基柴胡皂苷 c 和尼泊柴胡皂苷 k 吻合, 峰 13 出峰时间早, 极性大, 所以应该对应羟基柴胡皂苷 c, 峰 18 对应尼泊柴胡皂苷 k, 且在相同质谱条件下与尼泊柴胡皂苷 k 的保留时间和裂解规律一致, 验证了推断结果。

14、15、17 号峰 [M+HCOO]⁻ 分子离子峰质荷比为 843.476 26、843.476 50、43.477 05, 软件推断的化学式相同即为 C₄₂H₇₀O₁₄, 都出现 [M-H-162]⁻ 碎片离子, 14 号峰与 15 号峰出现 [M-H-162-146-146-18]⁻、[M-H-162-146-146-18-1]⁻ 碎片离子, 在丢掉 1 个六碳糖与甲基五碳糖基础上又失去了 1 个水, 与羟基柴胡皂苷 a、d 裂解模式相同, 16 位连有 β -OH 的羟基柴胡皂苷 a 极性大于连有 α -OH 键的羟基柴胡皂苷 d, 故根据保留时间可确定对应化合物。17 号峰碎片离子 m/z 456.73 是在丢失 2 个糖之后再断裂 1 个羟甲基形成

的,与文献报道^[9]中的bupleurosideXIII裂解规律相同。

同理推算,根据精确相对分子质量和裂解规律结合文献报道^[10-12],推算出 16、20、22、23、24 和 37 号峰,且 20、22 号峰与相应的对照品出峰时间和二级碎片一致,结果详见表 1。

3.1.3 二糖三萜皂苷类 25 号峰 m/z 825.464 97 $[M+HCOO]^-$, 其响应值与 39 号峰都非常高,脱掉 HCOOH 得到准分子离子 779.46,再脱去 1 个葡萄糖(glc)和岩藻糖(fuc)得到 617.41、471.35 离子,其保留时间和裂解规律与柴胡皂苷 a 对照品相一致,确定 25 号峰为柴胡皂苷 a,同理确定 27、33、39 号峰分别为柴胡皂苷 b₂、柴胡皂苷 g、柴胡皂苷 d。

26、29、31、40、41、42 号峰通过准分子离子峰 m/z 865.461 12、865.460 82、865.459 84、865.460 75、865.460 39、865.459 47 $[M-H]^-$ 分析其分子式均为 C₄₅H₇₀O₁₆,其裂解碎片中有脱落丙二酸单酰基的碎片,其他碎片峰与 25 号峰相近,根据文献报道^[13],确认 31 号峰为 6''-O-丙二酸单酰柴胡皂苷 a,42 号峰为 6''-O-丙二酸单酰柴胡皂苷 d,26、29、40、41 号峰为丙二酸单酰基与柴胡皂苷 a/d 中糖基的其他位置结合形成,因具体位置不确定,统称为丙二酸单酰柴胡皂苷 a/d。同理推测峰 28、30、32、38、43、44、45、48 为乙酰柴胡皂苷 a 或 d,再结合其极性判断是葡萄糖上 2、3、4、6 位分别被乙酰基取代。峰 49、50 为二乙酰基柴胡皂苷 a 或 d,因取代位置可能性太多^[14],未能确定具体取代位置,因此命名时也未明确标注取代位置。

36 号峰 m/z 809 $[M+HCOO]^-$, 碎片峰为 763 $[M-H]^-$ 、601 $[M-H-glc]^-$, 均比柴胡皂苷 a 少 1 个氧,查阅文献报道^[15]确认为柴胡皂苷 e。

3.1.4 单糖三萜皂苷类 34、35、46 号峰一级质谱以 $[M+HCOO]^-$ 形式存在,质荷比分别为 663.412 54、663.413 21、663.412 60,碎片离子 $[M-H]^-$ 均为 617.41,比对柴胡药材和柴黄颗粒中 m/z 663 提取的峰,结合醚键煎煮后结构发生改变的规律,再参考

文献数据^[16],确认 34 号峰为柴胡次皂苷 F,35 号峰是 46 号峰柴胡次皂苷 G 的醚键断裂产物柴胡次皂苷 D。47 号峰不饱和度值比 38 号峰大 1,说明双键数目要多 1 个,根据文献数据^[16]确认为柴胡次皂苷 I。

3.1.5 非三萜皂苷类 7、9、10 号峰通过荷质比确定分子式均为 C₂₅H₂₄O₁₂,其裂解规律相似,均为丢失 1 个咖啡酰基得到 m/z 353.09 碎片峰,继而再丢失 1 个咖啡酰基得到 m/z 191.06 碎片峰,或者丢失奎宁酸得到 m/z 179.03 碎片峰, m/z 173.04 峰是 m/z 191.06 碎片峰失去 1 个水分子所得,推断为苯丙素类化合物异绿原酸,依据其极性^[17-18]确定具体归属。21 号峰半夏酸^[19]分子离子峰 m/z 329.233 64 $[M-H]^-$,分子式为 C₁₈H₃₄O₅,不饱和度仅为 2,提示可能为不饱和和羟基脂肪酸, m/z 229.14 为丢失戊酸所得,去掉丁烷得 m/z 171.10,去掉 1 个水分子得 m/z 211.13。黄酮类成分裂解规律同黄芩中的黄酮类成分。

3.2 柴黄颗粒中化合物的质谱裂解规律分析

3.2.1 柴胡中三萜皂苷类成分 成药中柴胡是水煎煮后入药,在煎煮过程中,13,28-氧环不稳定,醚键会断裂生成次生物^[10,20-22]。如柴胡皂苷 a 转化成柴胡皂苷 b₁ 和柴胡皂苷 g,柴胡皂苷 d 转化成柴胡皂苷 b₂。6''-O-乙酰柴胡皂苷 a 转化成 6''-O-乙酰柴胡皂苷 b₁,6''-O-乙酰柴胡皂苷 d 转化成 6''-O-乙酰柴胡皂苷 b₂。草柴胡皂苷 II 醚键断裂成烯键形成的化合物为柴胡皂苷 n,其同分异构体 16-*epi*-草柴胡皂苷 II 则转换成柴胡皂苷 s。柴胡皂苷 c 生成柴胡皂苷 h 和柴胡皂苷 i,柴胡次皂苷 F 断裂成柴胡次皂苷 H 和柴胡次皂苷 A。以柴胡皂苷 c 为例,醚键断裂规律见图 2,二级裂解碎片及裂解规律见图 3。药材与成药中皂苷类成分比对见表 3,部分未检出可能因为含量过低。

3.2.2 黄芩中黄酮类成分 碳苷类成分查阅文献报道^[23-24],负离子质谱中六碳黄酮碳苷二级碎片中会出现 $[M-H-60]^-$ 、 $[M-H-90]^-$ 、 $[M-H-120]^-$

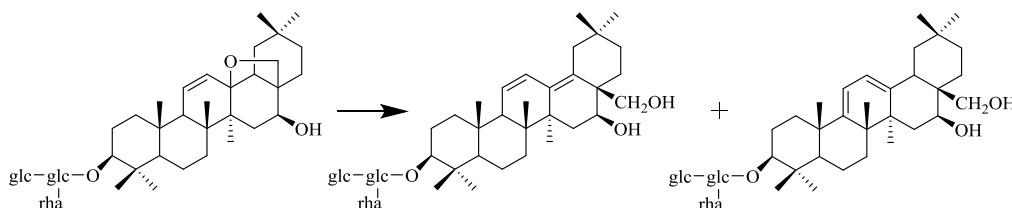


图 2 柴胡皂苷 c 转化成柴胡皂苷 h 和柴胡皂苷 i 示意图

Fig. 2 Conversion of saikosaponin c to saikosaponin h and saikosaponin i

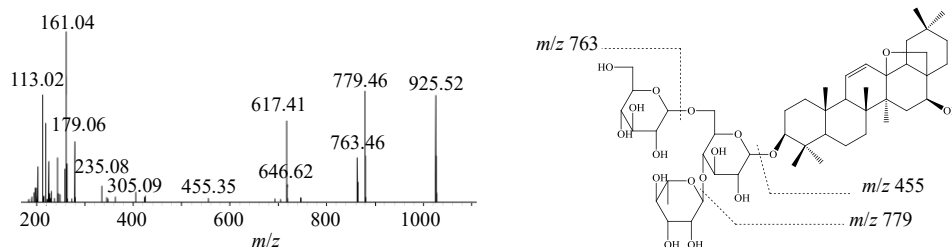


图 3 柴胡皂苷 c 裂解过程

Fig. 3 MS/MS fragment and pathway of saikosaponin c

表 3 柴胡药材及柴黄颗粒中皂苷类成分组成

Table 3 Composition of saponins in *Bupleuri Radix* and *Chaihuang Granules*

化合物	药材	成药	化合物	药材	成药
柴胡皂苷 v	+	-	2''-O-乙酰柴胡皂苷 a	+	-
柴胡皂苷 q	+	+	3''-O-乙酰柴胡皂苷 a	+	-
柴胡皂苷 v1	+	+	6''-O-丙二酸单酰柴胡皂苷 a	+	-
30-β-D-吡喃葡萄糖基-30-羟基柴胡皂苷 b2	+	+	4''-O-乙酰柴胡皂苷 a	+	-
11α,16β,23,28-四羟基齐墩果烷-12-烯-3β-氧基-β-D-吡喃岩藻糖基(3→1)-β-D-吡喃葡萄糖基(2→1)-β-D-吡喃葡萄糖苷	+	-	3β,16β,23-三羟基-13,28-环氧基-11-烯-3-β-氧基-β-D-吡喃岩藻糖基(3→1)-β-D-吡喃葡萄糖基(2→1)-β-D-吡喃葡萄糖苷	+	+
羟基柴胡皂苷 c	+	+	柴胡次皂苷 F	+	+
羟基柴胡皂苷 a	+	+	柴胡皂苷 b ₁	-	+
羟基柴胡皂苷 d	+	+	柴胡次皂苷 D	+	+
藏柴胡皂苷 V	-	+	柴胡皂苷 e	+	+
草柴胡皂苷 II	+	+	bupleuroside I	+	-
bupleuroside XIII	+	-	6''-O-乙酰柴胡皂苷 a	+	+
柴胡皂苷 s	-	+	柴胡次皂苷 H	-	+
bupleuroside VII	-	+	6''-O-乙酰柴胡皂苷 b ₂	-	+
尼泊柴胡皂苷 k	+	+	柴胡次皂苷 A	-	+
柴胡皂苷 p	+	-	柴胡皂苷 d*	+	-
柴胡皂苷 n	-	+	丙二酸单酰柴胡皂苷 d	+	-
柴胡皂苷 c	+	+	6''-O-乙酰柴胡皂苷 b ₁	-	+
柴胡皂苷 i	-	+	6''-O-丙二酸单酰柴胡皂苷 d	+	-
柴胡皂苷 f	+	+	2''-O-乙酰柴胡皂苷 d	+	-
柴胡皂苷 h	-	+	3''-O-乙酰柴胡皂苷 d	+	-
16- <i>epi</i> -草柴胡皂苷 II	+	-	4''-O-乙酰柴胡皂苷 d	+	-
柴胡皂苷 g	+	+	柴胡次皂苷 G	+	-
柴胡皂苷 a	+	+	柴胡次皂苷 I	+	+
丙二酸单酰柴胡皂苷 a	+	-	6''-O-乙酰柴胡皂苷 d	+	-
柴胡皂苷 b ₂	+	+	二乙酰柴胡皂苷 a/d	+	-

“-” 未检出, “+” 含量低, “+*” 含量高

“-” trace, “+” low, “+*” high

离子峰, 五碳黄酮碳苷的二级谱图中只能产生脱掉 60 和 90 的碎片峰。3 号峰负离子一级质谱中准分子离子峰为 m/z 547.147 34 $[M-H]^-$, 二级碎片峰 457.12 $[M-H-90]^-$ 、427.10 $[M-H-120]^-$ 、487.13 $[M-H-60]^-$ 、367.08 $[M-H-120-60]^-$ $[M-H-$

90-90] $^-$ 、337.07 $[M-H-120-90]^-$ 说明掉了 1 个六碳糖和五碳糖, 二级碎片及裂解规律见图 4, 通过比对文献数据^[25], 推测 3 号峰为白杨素-6-C-α-L-阿拉伯糖-8-C-β-D-葡萄糖苷, 同理推断 4~6、8、20、28 号峰的归属。

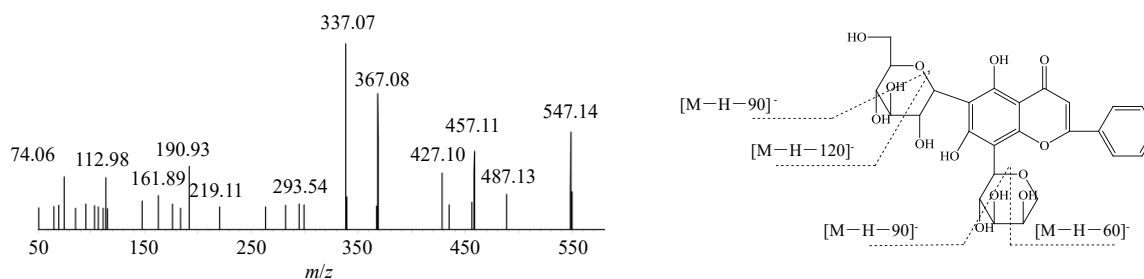


图 4 白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷裂解过程

Fig. 4 MS/MS fragment and the pathway of chrysin-6-C-arabinose-8-C-giucoside

葡萄糖醛酸苷类成分葡萄糖醛酸苷类成分二级质谱中有一响应值很高的丢失葡萄糖醛酸的苷元离子, 部分可看到脱水分子。如野黄芩苷准分子离子峰 m/z 461.073 52 $[M-H]^-$, 根据精确相对分子质量确定分子式为 $C_{21}H_{18}O_{12}$, 二级碎片离子 285.04 分别是丢失 1 分子葡萄糖醛酸和 1 分子水得到。黄芩提取物中黄芩苷含量高于 85%, 在 5% 氨甲醇溶液中黄芩苷的分子离子峰为丢失 2 个氢所得, 二级碎片峰 269.05 比野黄芩苷碎片离子 285.04 少 1 个氧, 结构式中应该少 1 个羟基, 其保留时间和碎片离子峰与对照品一致, 确定为黄芩苷。对于相对分子质量形同的同分异构体, 如 19、29、31 号峰, 查阅文献报道^[26-28], 再根据结合位置极性大小, 在反相柱中的出峰时间确定其具体归属。对于不确定具体取代位置的, 则统一命名, 如三羟甲氧基黄酮葡萄糖醛酸。

葡萄糖苷类成分 17 号峰与 32 号峰依据其精确相对分子质量推断出分子式为 $C_{21}H_{20}O_{10}$, 二级质谱中都有 m/z 269.05 $[M-H-gluc]^-$ 碎片离子, 也相应能观察到葡萄糖碎片, 检索 TCMSP 数据库, 再结合其极性, 推断 17 号峰为芹菜素-7- O - β -D-葡萄糖苷, 32 号峰为千层纸苷 A。

黄酮苷元类成分黄酮苷元为黄酮类成分, 多遵循 RDA 裂解规律, 如黄芩素 m/z 269.045 96 $[M-H]^-$, 脱去 1 分子水后得到 m/z 251.03 碎片峰, 分子离子峰通过 RDA 裂解方式得到碎片峰 166.99 和 133.97, 然后在黄酮本体 (119、101) 基础上, 根据 2 个碎片峰的相对分子质量推算出各环上连接的基团, 167 比 119 多 48, 所以 A 环上连有 3 个羟基, 133 是 167 脱去 2 个羟基所得。分子离子峰 269 去掉 167 后是 102, 比 101 多 1, B 环上未连有其他基团。

3.3 辅料

柴黄颗粒总离子流图中 0.74 min 和 1.15 min 的

2 个峰响应值最高, 且质荷比较小, 1 号峰一级谱图显示 $[M+HCOO]^-$ 峰, 二级碎片有去氢准分子离子峰 341.11, 单糖峰 179.06、161.04 以及单糖断裂碎片峰 119.03、89.02, 根据其裂解规律及对照品定位确定为蔗糖, 蔗糖在柴胡药材中有少量存在, 本实验室依据样品中柴胡的提取方式制备柴胡提取物, 发现蔗糖转移率低, 对比后确定大部分蔗糖是作为辅料加入。2 号峰 m/z $[M-Na]^-$ 178.053 1, 二级谱图中有亚硫酸根离子峰 79.96 以及去掉 1 个氧的 161.89 碎片离子, 与文献报道^[29]中甜蜜素的裂解规律相同, 与甜蜜素对照品保留时间与裂解规律一致, 明确为甜蜜素, 同时与该企业产品说明书中标明加入的 2 种甜味剂蔗糖和甜蜜素相吻合。

3.4 质量特征成分

对柴黄颗粒及柴胡药材中的化学成分分析, 共识别出柴胡中 50 个化合物, 其中皂苷类 42 个、苯丙素类 4 个、黄酮类成分 3 个及羟基不饱和脂肪酸 1 个, 柴黄颗粒中 71 个化合物, 36 个归属于黄芩、33 个归于柴胡、11 个皂苷类成分相对药材有明显检出, 该方法对柴黄颗粒及其中柴胡药味中的成分可以在较短时间内得到很好分离。

从分析结果可以看出, 柴黄颗粒化学成分中来自黄芩提取物的成分以黄芩苷为主要代表, 均以原形存在, 组成基本稳定, 黄芩苷在现行质量标准中已经作为质控成分, 此外汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素也可纳入质控范围; 从表 3 柴胡药材及成药中皂苷类成分存在情况判断, 来自柴胡中的原型皂苷类成分柴胡皂苷 a、f、c, 伴随次生皂苷类成分柴胡皂苷 b1、b2、h、g, 可以作为柴黄颗粒整体质量控制的指标成分组合。柴胡皂苷 c、f、a、d, 6''- O -丙二酸单酰柴胡皂苷 a、d, 6''- O -乙酰柴胡皂苷 a、d 可以作为柴胡药材的质控指标性成分, 其中 6''- O -丙二酸单酰柴胡皂苷 a、d 可以用来衡量柴胡药材储

存时间长短。

4 讨论

柴胡中具有醚键的皂苷成分不稳定, 加入氨可以中和植物中酸, 防止皂苷次生化^[30], 因此为了真实反映柴胡原药材与水煎煮后柴黄颗粒中皂苷类成分, 选取药典中柴胡含量测定项下的提取溶剂, 即含 5%浓氨试液的甲醇溶液进行提取。

柴黄颗粒组方简单, 只有柴胡和黄芩提取物两味药, 柴胡中的三萜皂苷和黄芩中的黄酮氧苷类成分裂解规律相似, 都是苷键易断裂, 黄酮碳苷类因为碳苷键较稳定, 多从糖基内部断裂, 黄酮苷元多遵循 RDA 裂解规律。

对柴胡药材与成药中成分进行比较时发现, 柴胡中有醚键的三萜成分, 16 位是 β -OH 的稳定性远大于 α -OH, α 型醚键原型成分在成药中较难检出。醚键三萜转化成 11,13-双烯结构成分要多于 9,12-双烯结构, 对于部分文献报道的转化成 11-甲氧基, 12-烯结构, 并未检出, 可能因为再加甲氧基相对自身双键转化阻力更大。葡萄糖上连有丙二酸酐基的皂苷类在成药中可能因含量过低未有检出, 推测其在药材储存和煎煮过程中, 酯键断裂, 生成柴胡皂苷 a/d 或其次生产物。

本实验对柴黄颗粒和柴胡的基础成分做了鉴别, 尤其对柴胡水煎后入药成分变化以及变化规律做了分析, 初步明确了质控指标性成分组合, 为柴黄颗粒和柴胡的整体质量控制提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁鸿, 赵玉英, 白焱晶, 等. 柴胡皂甙 v 的结构鉴定 [J]. 药学学报, 1998, 33(4): 282-285.
- [2] Liu Q X, Liang H, Zhao Y Y, et al. Saikosaponin v-1 from roots of *Bupleurum chinense* DC. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2001, 3(2): 139-144.
- [3] 罗何生, 赵玉英, 马立斌, 等. 柴胡皂甙 q 及其甙元的结构鉴定 [J]. 药学学报, 1995(6): 435-439.
- [4] 罗何生, 赵玉英, 乔梁, 等. 柴胡皂甙 p 的结构鉴定 [J]. 植物学报, 1996, 38(11): 910-913.
- [5] Seto H, Ōtake N, Luo S Q, et al. Isolation of triterpenoid glycosides (saikosaponins) from *Bupleurum kunmingense* and their chemical structures [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50(4): 943-948.
- [6] Pistelli L, Bilia A R, Marsili A, et al. Triterpenoid saponins from *Bupleurum fruticosum* [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(2): 240-244.
- [7] Ebata N, Nakajima K, Hayashi K, et al. Saponins from the root of *Bupleurum falcatum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 895-901.
- [8] Hinako Ishiguro, Miwa Takeuchi, Akira Namera, et al. Studies on medicinal plant resources of the Himalayas. Chemical evaluation of *Bupleurum falcatum* var. *gracillimum* collected in Nepal [J]. *Jap Soc Pharmacog*, 2001, 55(2): 55-60.
- [9] 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]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1997, 7(17): 2193-2198.
- [10] Ding J K, Fujino(nce Kimata) H, Kasai R, et al. Chemical evaluation of *Bupleurum* species collected in Yunnan, China [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(3): 1158-1167.
- [11] 方伟, 杨印军, 郭宝林, 等. 藏柴胡中三萜皂苷类成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1251-1256.
- [12] 贾琦, 张如意. 柴胡属植物中皂甙化学研究进展 [J]. 药学报, 1989, 24(12): 961-971.
- [13] Ebata N, Nakajima K, Hayashi K, et al. Saponins from the root of *Bupleurum falcatum* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(3): 895-901.
- [14] Seto H, Kawai H, Ōtake N, et al. Structures of new saponins isolated from *Bupleurum kunmingense* Y. Li et S. L. pan [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(6): 1613-1620.
- [15] Huang H Q, Zhang X, Lin M, et al. Characterization and identification of saikosaponins in crude extracts from three *Bupleurum* species using LC-ESI-MS [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(18): 3190-3201.
- [16] 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.
- [17] 段慧芳, 吴啟南, 朱亚莹, 等. UPLC 同时测定不同产地金银花中 10 种成分 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5858-5864.
- [18] 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, 47(12): 2044-2052.
- [19] 史月皎, 王瑛, 朱惠照, 等. LC-MS 快速分析紫苏水煎液中的主要化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(8): 1417-1423.
- [20] 谭利, 赵玉英, 王分, 等. 柴胡皂甙 s 的结构鉴定 [J]. 植物学报, 1998(2): 176.
- [21] 张如意, 陈喜奎, 杨宪斌, 等. 柴胡皂甙 m 和柴胡皂甙 n 的结构鉴定 [J]. 药学报, 1994, 29(9): 684-688.
- [22] Shimizu K, Amagaya S, Ogihara Y. New derivatives of saikosaponins [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(8): 1417-1423.

- 3349-3355.
- [23] 吴新安, 都模勤. 黄酮碳苷类化合物 ESIMS-MS 裂解规律初探 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(6): 1085-1087.
- [24] 杨悦, 刘颖, 刘晓谦, 等. 基于超高效液相色谱串联质谱技术的山楂核抗菌、抗氧化药效物质基础研究 [J]. 世界中医药, 2021, 16(17): 2527-2532.
- [25] Zhang F X, Li Z T, Li M, *et al.* An integrated strategy for profiling the chemical components of *Scutellariae Radix* and their exogenous substances in rats by ultra-high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2020, 34(18): e8823.
- [26] 龙海林. 黄芩表观型化学组成特征及其在基源鉴定中的应用研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [27] 周丹丹, 邹秦文, 林瑞超. 基于超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱质谱的胃复春片化学成分研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1841-1848.
- [28] 柴冲冲, 曹妍, 毛民, 等. 基于 HPLC 特征图谱、UPLC-Q-TOF/MS 定性及多成分定量的黄芩酒炙前后化学成分变化研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2436-2447.
- [29] 李云飞, 殷红, 杨玲春, 等. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速测定食品中 6 种甜味剂 [J]. 环境化学, 2016, 35(8): 1737-1740.
- [30] 闵宇航, 王京辉, 范妙璇, 等. 柴胡饮片皂苷类成分变化及质量控制研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 836-843.
- [责任编辑 王文倩]

• 公益广告 •

