

UPLC-QToF-MS 测定不同提取条件下柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的转化规律

郭 智¹, 彭 冰², 李宗阳¹, 潘瑞乐^{1*}

¹中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; ²首都医科大学附属北京中医医院 北京 100010

摘要: 使用 UPLC-QToF-MS 研究了不同提取条件下柴胡皂苷 a、d 的转化规律。色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-0.01% 甲酸水溶液; 流速为 0.45 mL/min。以四极杆串联飞行时间质谱 (Q-ToF) 为检测器, 使用负离子检测模式, 对经过 12 种不同提取方法提取的柴胡样品 (1~12) 进行检测。得到柴胡皂苷 a、d 不同提取方法下的转化规律: 酸性常温条件下水解生成柴胡皂苷 b₁、b₂, 酸性加热情况下糖苷键水解生成皂苷元; 中性、碱性条件下均较稳定。实验结果对柴胡皂苷 a、d 的提取、分离、分析提供了参考依据。

关键词: UPLC-QToF-MS; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; 柴胡皂苷 b₁; 柴胡皂苷 b₂; 提取

中图分类号: R932

文献标识码: A

Study on Transformation Rule of Saikosaponin a and Saikosaponin d Under Different Extraction Conditions by UPLC-QToF-MS

GUO Zhi¹, PENG Bing², LI Zhong-yang¹, PAN Rui-le^{1*}

¹Institute of Medicinal Plant development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; ²Beijing Hospital of TCM Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100010, China

Abstract: The transformation rules of saikosaponin a and saikosaponin d under different extraction methods were studied by ultra-performance liquid chromatography coupled with Quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-QToF-MS). A new UPLC-QToF-MS method was developed for profiling and quantification of the transformation products of saikosaponin a and saikosaponin d under different extraction methods. Chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile (A) and 0.01% formic acid in water (B). The flow rate was kept constant at 0.45 mL/min with a gradient elution. QToF-MS was used as the detector. Twelve samples of Radix Bupleuri were individually extracted using 12 different extraction methods and were then analyzed by UPLC-QToF-MS with negative ion mode. The transformation rule of saikosaponin a and saikosaponin d under different extraction methods were derived: saikosaponin a and saikosaponin d were hydrolyzed into saikosaponin b₁ and saikosaponin b₂ under acidic condition at room temperature. The glycosidic bond was hydrolyzed yielded to sapogenin under acid condition and being heated. Saikosaponin a and saikosaponin d were stable under neutral and alkaline condition. The experimental results provided a reference for extraction, separation and analysis of saikosaponin a and saikosaponin d.

Key words: UPLC-QToF-MS; saikosaponin a; saikosaponin d; saikosaponin b₁; saikosaponin b₂; extraction

柴胡为临床的常用中药, 其原植物为伞形科柴胡属植物北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonerifolium* Wild 的干燥根, 具有疏散退热、疏肝解郁、升阳举陷之功效^[1]。研究表明柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 是柴胡药材中含量高、活性

好的两个主要成分, 《中国药典》(2010 版) 记载柴胡药材质量标准以柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 作为定性定量的控制指标。文献^[2-4] 指出柴胡皂苷 a、d 结构含有醚键, 遇酸或受热不稳定, 因此测定柴胡皂苷 a、d 含量时建议采用低温提取并加入少量碱水。本课题组前期在测定某柴胡制剂中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的含量时, 发现制剂中柴胡皂苷 d 未能检出, 柴胡皂苷 a 的含量下降了很多。相同药材采用甲醇低温提取时柴胡皂苷 a、d 具有较高的含量; 但采用

水煮提取时,发现水提液呈酸性,柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 均发生了不同程度的变化。柴胡作为临床常用中药,汤剂及中成药制剂中使用很多,且大多以水煎煮法提取。以水作溶剂加热提取柴胡药材时,柴胡皂苷 a、d 如何变化、变化成何种化合物及变化程度未见有文献报道。本研究利用高灵敏度的 UPLC-QToF-MS 对不同提取条件柴胡药材柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的变化进行定性研究,以期找到柴胡药材和制剂质量控制的合理指标。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC I-class 超高效液相系统(沃特世),Xervo G2 QToF 质谱系统(沃特世),Acquity 工作站(沃特世),Masslynx4.1 工作站(沃特世);Integral 3 Milli-Q 超纯水系统(默克密理博);MS105 DU 电子分析天平(梅特勒);N1100 旋转蒸发器(东京理化);KQ-250B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。Optima LC/MS 乙腈(赛默飞),HPLC 甲醇(赛默飞)。提取用乙醇为分析纯(北京化工厂),提取用水为市售 Wahaha 纯净水。

柴胡皂苷 a(SSa)、柴胡皂苷 d(SSd)标准品由中国药品生物制品鉴定所提供,批号分别为 110777-200406、110778-200506;柴胡皂苷 b₁(SSb₁)标准品由成都曼斯特生物科技有限公司提供,批号为 MUST-13091109;柴胡皂苷 b₂(SSb₂)标准品由天津马克生物技术有限公司提供,批号为 2012-1205。柴胡样品采自甘肃陇西县,经张本刚教授鉴定为植物银州柴胡 *B. yinchowense* 的干燥根。样品标本存于中国医学科学院药用植物研究所标本馆。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm × 50 mm,1.7 μm);保护柱:VanGuard BEH C₁₈(2.1 mm × 5 mm,1.7 μm),流动相:A 为乙腈,B 为 0.01% 甲酸水溶液,梯度洗脱程序:0 ~ 2 min,10% ~ 30% A;2 ~ 9 min,30% ~ 38% A;9 ~ 11 min,38% ~ 50% A;11 ~ 12 min,50% ~ 100% A;12 ~ 13.5 min,100% A;13.5 ~ 13.51 min,100% ~ 10% A;13.51 ~ 15 min,10% A;流速:0.45 mL/min;进样量:1 μL;柱温 35 °C。

1.2.2 质谱条件

负离子,MS⁻ 模式;检测范围 100 ~ 1500 Da;毛

细管电压:3 kV,锥孔电压:45 V,裂解电压:45 ~ 55 V;锥孔气流量:50 L/h;脱溶剂气流量:800 L/h;源温:100 °C;脱溶剂气温度 350 °C;准确质量测定采用亮氨酸-脑啡肽(Leucine-Enkephalin, *m/z* = 554.2615)溶液做为质量锁定溶液。

在以上条件下,四种柴胡皂苷均能达到基线分离,质谱信号响应良好。

1.3 对照品溶液制备

分别精密称定柴胡皂苷 a、d、b₁、b₂ 分别为 2.38、2.52、1.93、2.43 mg,使用色谱甲醇定容于 2 mL 容量瓶得到对照品储备液。精确吸取储备液 100 μL 于 25 mL 容量瓶,色谱甲醇定容后吸取 2.0 mL,使用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液,分别得 SSa、SSd、SSb₁、SSb₂ 对照品工作液。

1.4 供试品溶液制备

1.4.1 提取方法设计

选择温度(30 °C 和 100 °C)、溶剂(水和乙醇)、酸碱度(酸性、中性和碱性)作为考查因素,设计不同的提取方法,见表 1。

表 1 柴胡提取方法设计

Table 1 Different extraction conditions of saikosaponin a and saikosaponin d

试验编号 No.	提取条件 Extraction conditions		
	pH	温度 Temperature	溶剂 Solvent
1	5	30 °C	水
2	5	30 °C	乙醇
3	5	100 °C	水
4	5	100 °C	乙醇
5	7	30 °C	水
6	7	30 °C	乙醇
7	7	100 °C	水
8	7	100 °C	乙醇
9	10	30 °C	水
10	10	30 °C	乙醇
11	10	100 °C	水
12	10	100 °C	乙醇

1.4.2 制备流程

精密称定柴胡药材粉末(40 目)1.00 g,置于 50 mL 梨形瓶中,精确加入 25 mL 提取液,分别按照表 2 设计的方法提取。各提取液过滤,滤渣用少量相同提取液润洗两次,合并滤液,减压回收至干,残渣

加入色谱纯甲醇使其充分溶解,定溶于 25 mL 容量瓶,摇匀。分析前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液,既得供试品溶液,编号按表 1 顺序为 1~12。

2 实验结果

2.1 对照品 SSa、SSd、SSb₁、SSb₂ 质谱裂解规律

SSa、SSd、SSb₁、SSb₂ 属于同分异构体,在此分析

条件下,SSa、SSd、SSb₁、SSb₂ 的色谱保留时间分别为 6.56、10.37、8.26、6.84 min 对照品的总离子流色谱图见图 1;ESI 离子源负离子模式下,它们具有基本相同的一级质谱,基峰为 $[\text{M}-\text{H} + \text{HCOOH}]^-$ ($m/z = 825.4635$);二级质谱主要的碎片峰有: $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($m/z = 779.4594$), $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ ($m/z = 617.4050$), $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{Fuc}]^-$ ($m/z = 471.3469$), SSb₁ 和 SSb₂ 还有 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{Fuc}-\text{CH}_2\text{OH}]^-$ ($m/z = 423.2360$)。

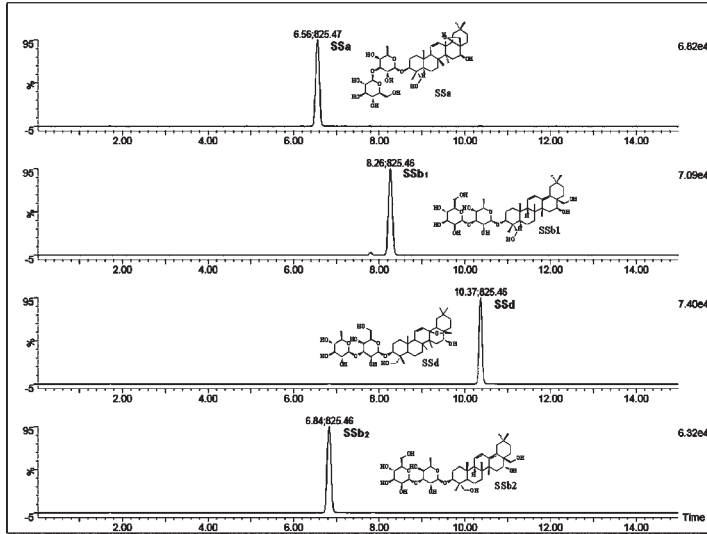


图 1 对照品 SSa、SSd、SSb₁、SSb₂ 的结构式和总离子流色谱图

Fig. 1 Chemical structures and total ion chromatograms of SSa, SSd, SSb₁, SSb₂ standards

2.2 柴胡不同提取方法柴胡皂苷 a 和 d 的 UPLC-QToF-MS 研究

不同提取方法柴胡样品 1~12 的 UPLC-QToF-MS 色谱图见图 2。

图 2 中样品 1~4 为酸性条件下提取的柴胡样品的 UPLC-MS 色谱图。由图可知,四个样品均未检测出柴胡皂苷 a (保留时间为 6.56 min)、d (保留时间为 10.37 min)。在常温酸性条件下提取的样品 1 和 2 中检测到柴胡皂苷 b₁ (保留时间为 8.26 min) 和柴胡皂苷 b₂ (保留时间为 6.84 min)。以水为溶剂,加酸加热回流条件提取的样品 3 中,柴胡皂苷 a、d、b₁、b₂ 均未检测出,在此条件下柴胡皂苷发生酸水解;以乙醇作溶剂,加酸加热回流提取的样品 4 中,可检测到脱去两分子糖的苷元加甲酸峰 (m/z : 517.3536)。

图 2 中样品 5~8 为中性条件下提取的柴胡样品的 UPLC-MS 色谱图。由图可知,四个样品中均有

柴胡皂苷 a、d 检出。其中水、醇常温提取和醇加热提取的样品 5、6、8 检测到柴胡皂苷 a、d 为大量成分,基本无柴胡皂苷 b₁ 检出,有少量柴胡皂苷 b₂ 检出。由样品 6 中小量柴胡皂苷 b₂ 的检出推测柴胡生药中也含有少量柴胡皂苷 b₂。水加热提取的样品 7 中柴胡除有柴胡皂苷 a、d 检出外,还有较大量的柴胡皂苷 b₂ 检出,测定其提取液的 pH 值由中性转变为酸性 (pH = 4),由于酸性条件部分柴胡皂苷 d 水解开环生成柴胡皂苷 b₂。

图 2 中样品 9~12 为碱性条件下提取的柴胡样品的 UPLC-MS 色谱图。由图可知,四个样品中柴胡皂苷 a、d 均为大量成分,无柴胡皂苷 b₁ 检出,四个样品均有少量柴胡皂苷 b₂ 检出。加入碱可以抑制柴胡皂苷 a、d 的水解开环。

对 1~12 号样品色谱图进行积分,以 SSa、SSd、SSb₁、SSb₂ 的最大峰面积为基峰 (100%) 分别计算相对含量,图 3 为 1~12 号样品柴胡皂苷 a、b₁ 相对含量。

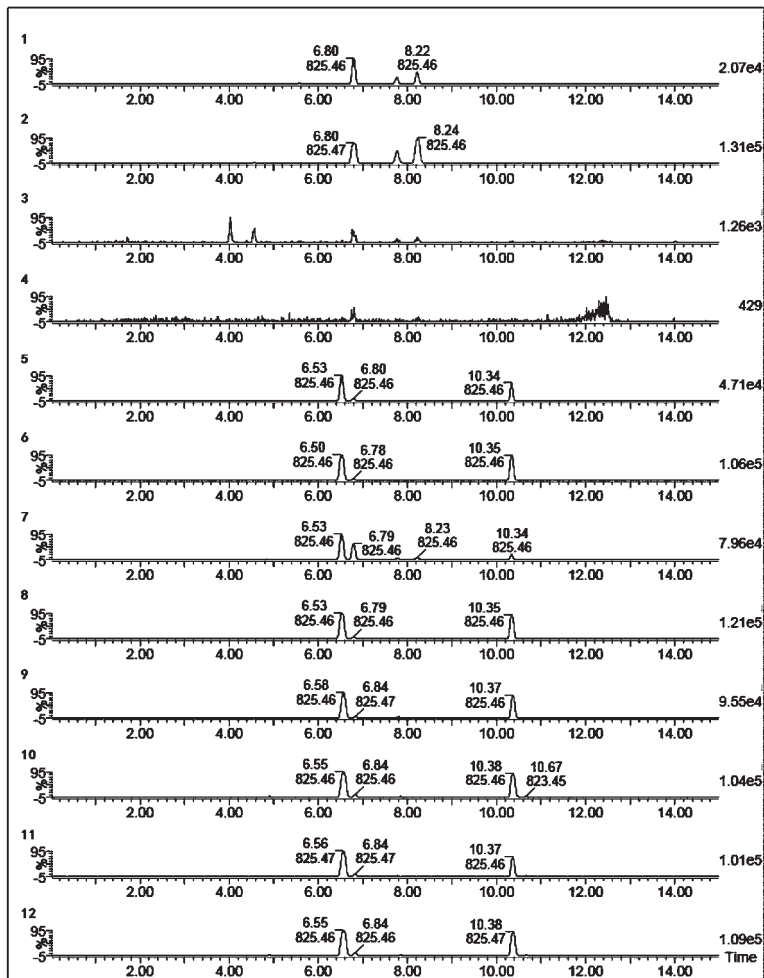


图 2 样品 1~12 以核质比 825.46 ± 0.1Da 提取离子流色谱图

Fig.2 Extracted ion chromatograms (825.46 ± 0.1Da) of sample1-12

图 4 为 1-12 号样品柴胡皂苷 d、b₂ 相对含量。

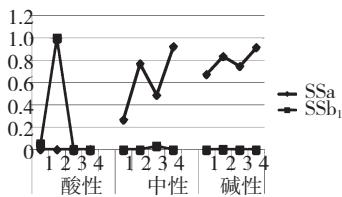


图 3 样品 1-12 号柴胡皂苷 a、b₁ 相对含量

Fig.3 Relative contents of saikosaponin a, b₁ of sample 1-12

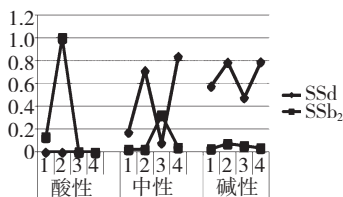


图 4 样品 1~12 号柴胡皂苷 d、b₂ 相对含量

Fig.4 Relative contents of saikosaponin d, b₂ of sample 1-12

3 讨论

柴胡皂苷紫外吸收很弱或无紫外吸收,传统对柴胡皂苷的测定选择紫外检测器,使用 210 nm 作为检测波长^[5,6],但存在吸收较弱和干扰较多的问题。本研究选择飞行时间质谱(Q-ToF)作为检测器,解决了以上问题。同时可以给出碎片精确的分子量,有助于对化合物结构变化的跟踪和解析。前期实验通过比较正离子、负离子两种模式,发现负离子模式色谱峰型优于正离子模式,杂峰较少,故选择负离子模式。而超高效液相系统相比传统的高效液相系统能显著的缩短分析时间,提高分析效率。本研究表明在酸性条件提取时,柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 全部转化。常温时柴胡皂苷 a 转化为柴胡皂苷 b₁,柴胡皂苷 d 转化为 b₂;加热时柴胡皂苷 a 和

柴胡皂苷 d 发生糖苷键酸水解。在中性常温条件提取时,柴胡皂苷 a、d 比较稳定,但以水作溶剂加热时,柴胡皂苷 d 转化为柴胡皂苷 b₂。在弱碱性条件下,柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 均比较稳定,但四个样品仍有极小量的柴胡皂苷 b₂ 检出,但未有柴胡皂苷 b₁,说明柴胡皂苷 b₂ 可能是柴胡中天然存在的。

由于水作溶剂加热提取柴胡时,柴胡皂苷 a、d 不稳定,并且随着加热时间的延长,柴胡皂苷 a、d 会逐渐水解开环生成柴胡皂苷 b₁、b₂。柴胡制剂多数以水加热提取,因此,柴胡制剂质量控制的指标若仍以柴胡皂苷 a、d 作为指标是不科学的。柴胡制剂的质量控制建议综合考虑柴胡皂苷 a、d、b₁、b₂ 总量来控制。

参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 263-264.
- Bao Y, Li C, Shen H, *et al.* Determination of saikosaponin derivatives in Radix bupleuri and in pharmaceuticals of the chinese multiherb remedy xiaochaihu-tang using liquid chromatographic tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004, 76: 4208-4216.
- Liu MX (刘密新), Wu ZP (吴筑平), Yang CD (杨成对), *et al.* Study on saikosaponin A and D in a Chinese traditional medicine by LC/MS. *J Chin Mass Spectro Soc* (质谱学报), 2000, 21: 77-78.
- Shimizu K, Amagaya S, Ogihara Y. Structural transformation of saikosaponins by gastric juice and intestinal flora. *J Pharmacobiodyn*, 1985, 8: 718-725.
- Huang S (黄帅), Ma M (马森), Huang QQ (黄倩倩), *et al.* 一测多评法同步测定柴胡药材中 3 种皂苷的含量. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 4: 838-840.
- Fu Y (符颖), Zhu ZJ (朱占军), Huang S (黄帅), *et al.* Determination of five saikosaponins in Bupleurum yinchowense by HPLC. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 3: 494-497.
- Liu XL (刘小林), Cheng CR (程春荣), Cao W (曹威), *et al.* Advances in studies on pharmacological effects of *Huperzia serrata* and clinical application. *Her Med* (医学导报), 2006, 2(25): 90-95.
- Zeng FX (曾繁星), Jiang HL (蒋华良), Yang YS (杨玉社), *et al.* Progress in synthesis and structural modification of Huperzine A. *Proc Chem* (化学进展), 2000, 12: 63-76.
- Chen WP (陈卫平), Yang FQ (杨福秋). Asymmetric total synthesis of optically active Huperzine A. *China J Med Chem* (中国药物化学杂志), 1995, 5: 10-17.
- Yu HY (余红英), Sun YM (孙远明), Yang YJ (杨跃进). Advances in studies on *Huperzia Serrata*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药) 2001, 32: 279-281.
- Ma XQ, Gang DR. *In vitro* production of Huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimers' s disease. *Phytochemistry*, 2008, 69: 2022-2028.
- Tu YS (涂艺声). Rapid Mass Propagation Techniques of Economic Plants (经济植物大规模快速繁殖技术). Beijing: Chemical Industry Press, 2009. 281-282.
- Tu YS (涂艺声), Jiang HR (江洪如), Wang BQ (王碧琴). Cultures of callus and cell suspension of *Sarcandra Glabra* for the production of medicinal component. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1995, 7: 35-41.
- Wang J (王峻), Wu W (吴伟), Pan SL (潘胜利). Determination of huperzine A in six plants of *Huperziaceae*. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34: 607-608.
- Zhou HH (周汉华), Jia XS (贾宪生), Gao YM (高言明), *et al.* Determination of Huperzine A in *Huperzia crispata* Ching by TLC scanning. *J Chin Med Mat* (中药材), 2008, 31(2): 235-237.
- Wang S (王姗), Wang M (王沫). Determination of Huperzine A in three species of *Huperzia Berm.* by HPLC. *J Shangluo Univ* (商洛学院学报), 2012, 26(2): 38-41.
- Shen XX (沈晓霞), Yu XP (俞旭平), Sheng SJ (盛东军). Research on tissue culture technology for *Huperzia Serrata*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27: 458-459.
- Zhou Y (周颖), Liu X (刘星), Li KG (李克刚), *et al.* Tissue culture of *Huperzia Serrata*. *J Jishou Univ, Nat Sci* (吉首大学学报, 自科版), 2009, 30(2): 90-93.
- Yang XF (杨雪飞), Luo JP (罗建平), Wang Y (王瑛). Studies on culture and sterilization method of *Huperzia Serrata*. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2008, 36: 4947-4948.
- Sun YQ (孙玉强), Tong JX (童建新), Ruan SL (阮松林), *et al.* Research on explants of *Huperzia Serrata* in culture. *J Hangzhou Agri Sci Tech* (杭州农业科技), 2008 (4): 10-12.

(上接第 649 页)