

# UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup> 联合 UNIFI 筛选 平台快速分析牛膝中三萜皂苷类成分

傅俊<sup>1,2</sup>, 吴欢<sup>1,2</sup>, 吴虹<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; <sup>2</sup>新安医学教育部重点实验室, 合肥 230038

**摘要:**为明确牛膝三萜皂苷主要化学成分,采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF/MS)联合 UNIFI 科学信息系统对牛膝中的三萜皂苷进行快速定性分析。首先,经 UPLC 色谱分离后的牛膝三萜皂苷化学成分群在 MS<sup>E</sup> 模式下采集质谱数据;然后,通过 UNIFI 平台自动检出并经过 MassLynx 工作站进行逐个核对,以快速完成牛膝三萜皂苷化学成分群的定性分析。本实验共分离、鉴定了 40 种三萜皂苷类成分,其中以齐墩果酸为母核的化合物有 38 种,另有其它母核的三萜皂苷化合物 2 种。该方法可以快速的对牛膝中的三萜皂苷进行全面分析,将为牛膝皂苷的质量控制及后续药效物质研究提供参考。

**关键词:** UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup>; 牛膝; UNIFI; 三萜皂苷

中图分类号: R917; R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)6-1054-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.6.020

## Rapid characterization of triterpenoid saponins in *Achyranthes bidentate* Blume by UPLC-Q-TOF/MS in MS<sup>E</sup> mode combined with UNIFI screening platform

FU Jun<sup>1,2</sup>, WU Huan<sup>1,2</sup>, WU Hong<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230038, China

**Abstract:** To investigate the main chemical constituents of *Achyranthes bidentate* triterpenoid saponins, a rapid qualitative analysis of triterpenoid saponins in *Achyranthes bidentata* was carried out by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS) in MS<sup>E</sup> mode combined with UNIFI scientific information system. Firstly, the chemical constituents of *Achyranthes bidentata* triterpenoid saponins were separated by UPLC chromatography and the mass spectrometry data were collected by QTOF/MS in MS<sup>E</sup> mode. Then, the chemical constituents of *Achyranthes bidentata* triterpenoid saponins were screened automatically through UNIFI platform and checked by MassLynx workstation, so as to quickly complete the qualitative analysis of the chemical constituents of *Achyranthes bidentata* triterpenoid saponins. AS a result, forty triterpenoid saponins were isolated and identified in this experiment. Among them, there are 38 kinds of compounds with oleanolic acid as the mother nucleus, and two triterpenoid saponins with other mother nucleus. This method can quickly analyze the triterpenoid saponins in *Achyranthes bidentata*, which will provide reference for the quality control of *Achyranthes bidentata* saponins and the study of subsequent pharmacodynamic substances.

**Key words:** UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup>; *Achyranthes bidentate*; UNIFI; triterpenoid saponins

牛膝始载于《神农本草经》,为苋科植物牛膝(*Achyranthes bidentate* Bl.)的干燥根,具有逐瘀通经、补肝肾、强筋骨、利尿通淋、引血下行的作用。研

究表明<sup>[1]</sup>,牛膝中包含多种结构类型的化学成分,包括三萜皂苷类、植物甾酮类以及多糖等成分,其中三萜皂苷类成分是牛膝中的主要活性物质,具有抗炎镇痛,调节免疫和抗肿瘤作用<sup>[2,3]</sup>。目前,关于牛膝三萜皂苷的定性研究较少,缺乏系统性研究。

近年来,超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF/MS)以其高分离度、高灵敏度及高分

收稿日期: 2018-12-24 接受日期: 2019-04-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473400); 安徽中医药大学校级探索性科研项目(2017HXTS37)

\* 通信作者 Tel: 86-551-68129166; E-mail: wuhongprof@aliyun.com

辨率等特点广泛应用于中药成分定性分析,血清药物化学以及代谢组学等各个领域<sup>[4-7]</sup>。UNIFI<sup>[8,9]</sup>作为一个强大的信息处理平台,可以对样品的 MS<sup>E</sup> 数据自动进行离子流提取、分子式确定,同时与数据库中化合物进行比对,并根据高能量下化合物的碎片信息给出化合物可能的裂解方式,最后在预设的过滤条件下显示所鉴定化合物的详细信息。最终,本实验采用 UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup> 结合 UNIFI 平台,对牛膝中 40 种三萜皂苷进行了快速、全面的定性分析,为牛膝三萜皂苷质量控制提供参考,同时为药效物质基础的进一步研究提供参考。

## 1 实验材料

Xevo G2-XS QTOF/MS、Masslynx V4.1 工作站、UNIFI 科学信息学系统(美国 Waters 公司);ADW-1002-B 型超纯水机(美国 Aquapro 公司);KQ-200KDB 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司);色谱级甲酸(Fisher Scientific 公司);色谱级乙腈、甲醇(美国 TEDIA 公司)。

竹节参 IVa(批号:CHB170227)纯度 $\geq 98\%$ ,竹节参皂苷 IV(批号:CHB180524)纯度 $\geq 98\%$ ,人参皂苷 Ro(批号:CHB170310)纯度 $\geq 98\%$ ,购于成都克洛玛生物科技有限公司。本实验所用牛膝药材(*Achyranthes bidentate* Bl.)购自河南焦作市,经安徽中医药大学刘劲松教授鉴定为怀牛膝。

## 2 实验方法

### 2.1 样品溶液制备

取牛膝饮片适量,粉碎成细粉,称取粉末 100 g,加入 1 L 乙醇加热回流提取 3 次,每次 1 h,合并提取液,水浴浓缩浸膏至无醇味,加入蒸馏水定容至 1 L,超声 30 min 后,抽滤,量取续滤液 150 mL 过 D101 型大孔吸附树脂柱,先用 600 mL 蒸馏水洗脱水溶性杂质,最后用 600 mL 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,干燥至恒重。精密称定干燥粉末,加甲醇配成质量浓度为 1 mg/mL 溶液。同时制备空白对照样品。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称定竹节参皂苷 IVa,竹节参皂苷 IV,人参皂苷 Ro 适量,加甲醇定量至容量瓶,配成浓度为 1 mg/mL 的溶液。置于 4 °C 冰箱备用,0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后进样。

### 2.3 色谱条件

Phenomenex C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm  $\times$  100 mm,1.6

$\mu\text{m}$ ),流动相为 0.1% 甲酸水(A)—乙腈(B),梯度洗脱:0~10 min,5%~30% B;10~11 min,30% B;11~12 min,30%~45% B;12~12.5 min,45%~47% B;12.5~15 min,47%~48% B;15~16 min,48%~50% B;16~19 min,50%~70% B;19~22 min,70%~85% B;22~24 min,85%~95% B;24~27 min,95% B;27~28 min,95%~5% B;28~30 min,5% B,流速 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,柱温 30 °C,进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

### 2.4 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),负离子模式扫描:扫描范围  $m/z$  50~1 200,毛细管电压 2.5 kV,锥孔电压 40 V,锥孔气流速 50 L/h,离子源温度 120 °C,脱溶剂气(N<sub>2</sub>)流速 600 L/h,脱溶剂气温度 350 °C。亮氨酸-脑啡肽[M-H]<sup>-</sup> = 554.262 0 作为 LockSpray 校准液(200 pg/mL),流速 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,甲酸钠溶液用来仪器校正。

### 2.5 数据处理方法

为了便于对牛膝中三萜皂苷进行系统性的分析,本实验首先对已有对照品进行质谱分析,总结出其色谱保留行为、裂解规律以及特征离子等。通过相关文献的查询以及质谱数据库(Chempidder, Mass Bank, SCIfinder 等)建立 UNIFI 数据库,并根据皂苷母核上取代基的数量将牛膝三萜皂苷分为单取代类和双取代类化合物。再以 UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup> 采集供试品数据。将 MS<sup>E</sup> 原始文件导入 UNIFI 平台,建立 UNIFI 筛选方法(对于 2D 检测最小峰面积设为 200;3D 检测中,低能量下的峰强度设为 500,高能量峰强度为 150;误差范围  $\pm 5$  ppm,负离子下加和的离子为 +HCOO 和 -H),对化合物进行自动识别。

## 3 结果与分析

### 3.1 牛膝三萜皂苷对照品 UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup> 裂解规律解析

如图 1 所示,3 种牛膝三萜皂苷对照品均在 MS<sup>E</sup> 低能量(6 V)下给出[M-H]<sup>-</sup>,而且都有一个特征的[M+HCOOH-2H]<sup>2-</sup>离子,该结果与文献报道一致<sup>[9]</sup>。MS<sup>E</sup> 高能量下(80~100 V),对照品倾向于先丢失 C28 位上的糖基,这可能是由于 C28 位酯键比 C3 位的醚键更易断裂,当五碳糖与六碳糖同时存在时,五碳糖优先于六碳糖丢失。三个对照品都有齐墩果酸母核的特征碎片离子  $m/z$  455.350 8,但未见齐墩果酸母核继续裂解而产生的碎片离子;同时可见 C3 位的葡萄糖醛酸(GluA)的准分子离子

为  $m/z$  175.02  $[\text{GluA-H}]^-$ , 其碎片离子为 157.01  $[\text{GluA-H-H}_2\text{O}]^-$  和 113.02  $[\text{Glu-H-H}_2\text{O-CO}_2]^-$ ; C28 位的葡萄糖 (Glu) 的准分子离子为  $m/z$  179.05  $[\text{Glu-H}]^-$ , 碎片离子为 161.04  $[\text{Glu-H}_2\text{O-H}]^-$ 、143.03

$[\text{Glu-H}_2\text{O-H}_2\text{O-H}]^-$ 、131.03  $[\text{Glu-H}_2\text{O-CH}_2\text{O-H}]^-$ 、119.03  $[\text{Glu-H}_2\text{O-C}_2\text{H}_2\text{O-H}]^-$  以及 113.02  $[\text{Glu-H}_2\text{O-CH}_2\text{O-H}_2\text{O-H}]^-$ 。

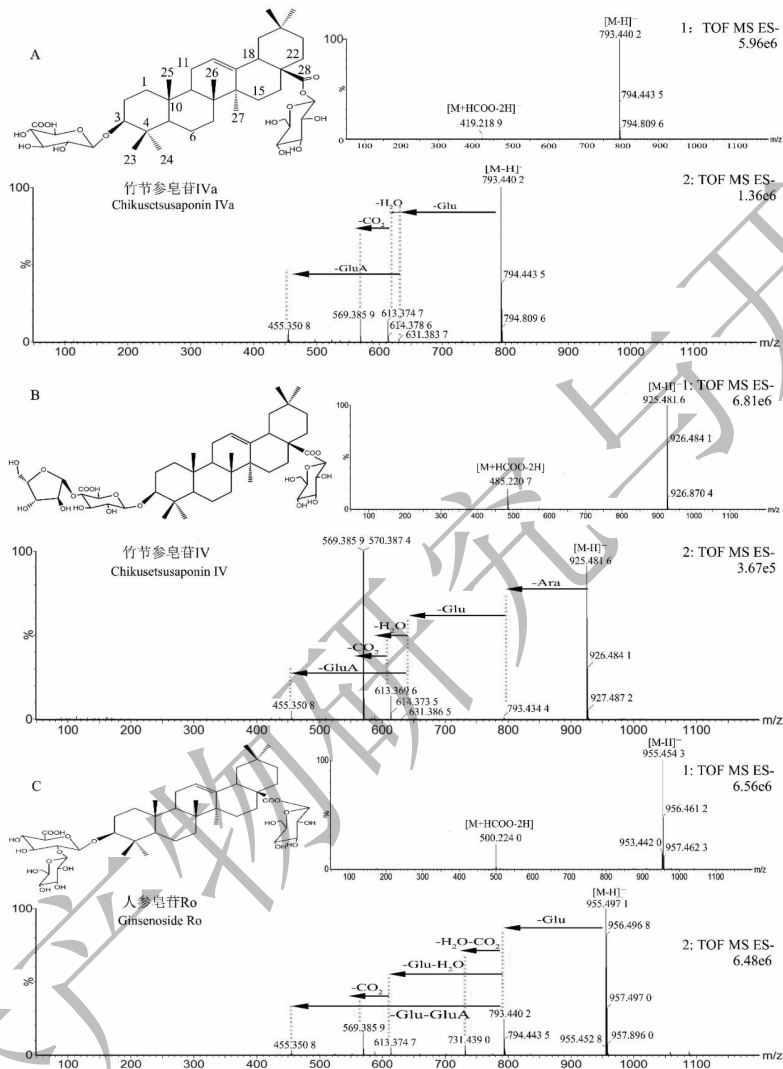


图1 3种牛膝三萜皂苷对照品在  $\text{MS}^E$  模式下低能量(1)与高能量(2)质谱图

Fig. 1 Low energy (1) and high energy (2) mass spectra of three reference standard of *Achyranthes bidentata* in  $\text{MS}^E$  mode

### 3.2 牛膝样品的 UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup> 分析鉴定

牛膝皂苷提取物总离子流图如图2所示,结果共鉴定出40种三萜皂苷。其中在齐墩果酸母核上C3或C28仅有一个取代基的化合物13种,C3和C28位均有取代基的化合物25种,另有其它母核的三萜皂苷化合物2种。化合物保留时间、准分子离子及碎片离子信息详见表1。

#### 3.2.1 齐墩果酸型单取代三萜皂苷化合物的鉴定

单取代化合物指齐墩果酸母核上C3或C28位

只有一个取代基的化合物,本实验共鉴定出13种齐墩果酸型单取代三萜皂苷化合物。以峰25、27、35和36为例阐述其鉴定过程。峰25给出其  $[\text{M-H}]^-$  为  $m/z$  793.4376,通过MassLynx分析其分子式为  $\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{14}$ ,其在高能量下主要的特征碎片离子为  $m/z$  631.3850  $[\text{M-Glu-H}]^-$ 、613.3742  $[\text{M-Glu-H}_2\text{O-H}]^-$ 、455.3508  $[\text{M-Glu-GluA-H}]^-$ ,通过与UNIFI鉴定结果相比对,推测其为姜状三七苷R1。峰27在低能量下给出  $m/z$  763.4354  $[\text{M-H}]^-$  的母离子,

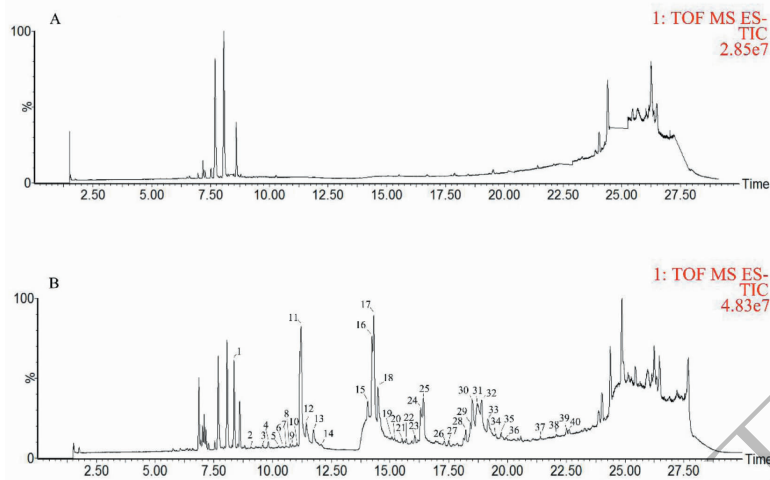


图 2 空白溶液(A)与牛膝样品(B)的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms (TIC) of blank solution (A) and *Achyranthes bidentata* sample (B)表 1 牛膝中三萜皂苷的 UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup> 色谱及质谱数据Table 1 The chromatographic and mass spectrometric data of triterpene saponins identified from AB using UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup>

峰号 No.	分子式 Formula	[M-H] <sup>-</sup>	[M + HCOO] <sup>-</sup>	偏差 Error (ppm)	保留时间 t <sub>R</sub> (min)	碎片离子 Fragmentation ions	鉴定化合物 Identified compounds
1	C <sub>54</sub> H <sub>86</sub> O <sub>23</sub>		1 147. 558 3	4.1	8.36	1 147. 558 3, 1 101. 549 9,793. 438 6, 613. 374 5, 455. 352 4, 162. 839 0, 113. 023 1	Niuxi saponin B
2	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>21</sub>	985. 472 6		4.7	9.09	985. 472 6, 955. 457 4, 909. 448 3, 807. 416 3, 455. 351 8	Achyranthoside F
3	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>20</sub>	969. 467 5		-2.7	9.65	969. 467 5, 793. 438 4, 631. 383 7, 455. 352 3, 113. 021 7	3- <i>O</i> -β-D-Glc-( β-D-GluA )- β-D-GluA oleanolic acid
4	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>18</sub>		971. 485 8	0.1	9.82	971. 485 8, 779. 423 2, 631. 380 8, 455. 352 3, 175. 027 6	Niuxi saponin A
5	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>19</sub>	939. 458 3		-1.3	10.35	939. 458 3, 793. 436 9, 631. 382 5, 455. 352 4, 157. 013 6, 113. 024 1	3- <i>O</i> -β-D-Glc-( 1-2 )-[ [ 2- carboxy-1-( carboxymethyl )- 2-hydroxyethyl ]-( 1-3 ) ]-β- D-GluA-28- <i>O</i> -β-D-Glc oleanolic acid
6	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>20</sub>	969. 469 3		-0.8	10.43	969. 469 3, 793. 436 1, 631. 383 7, 507. 233 2, 455. 351 9, 175. 027 1, 157. 014 0, 113. 024 0	3- <i>O</i> -β-D-GluA-β-D-GluA- 28- <i>O</i> -β-D-Glc oleanolic acid
7	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>		985. 502 9	2.6	10.60	985. 502 9, 777. 440 2, 615. 388 8, 455. 351 6, 161. 008 9, 157. 013 9, 113. 024 1	Momordin IIa
8	C <sub>46</sub> H <sub>70</sub> O <sub>19</sub>	925. 447 5		3.8	10.76	925. 447 5, 793. 436 6, 673. 392 3, 631. 384 0, 569. 385 9, 455. 352 1, 113. 023 9	Achyranthoside E
9	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	955. 490 5		-0.3	10.87	955. 490 5, 793. 435 4, 731. 434 9, 631. 383 0, 613. 373 1, 455. 351 8, 161. 008 5	β-D-glucopyranosyl 3β-[ <i>O</i> - α-L-rhamnopyranosyl-( 1 3 ) ]- <i>O</i> -β-D-glucopyranuro- syloxy ] oleanolate

续表 1 (Continued Tab. 1)

峰号 No.	分子式 Formula	[M-H] <sup>-</sup>	[M + HCOO] <sup>-</sup>	偏差 Error (ppm)	保留时间 t <sub>R</sub> (min)	碎片离子 Fragmentation ions	鉴定化合物 Identified compounds
10	C <sub>53</sub> H <sub>82</sub> O <sub>25</sub>	1 117. 512 5		3.0	11. 18	1 117. 512 5, 997. 502 5, 955. 491 2, 793. 437 3, 731. 437 3, 631. 210 6, 613. 377 6, 581. 250 9, 455. 352 0, 161. 008 9	Achyranthoside D
11	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>19</sub>	955. 497 1		1.5	11. 24	955. 452 2, 793. 440 8, 731. 439 0, 631. 384 5, 613. 374 7, 569. 385 9, 455. 350 8, 157. 013 5	Ginsenoside Ro
12	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>21</sub>	973. 461 8		-3.3	11. 49	973. 461 8, 811. 415 8, 648. 354 3, 472. 312 6	$\beta$ -D-glucopyranosyl $\beta$ -[ O- $\alpha$ -L-galactopyranosyl-( 1 $\rightarrow$ 2 )-O- $\alpha$ -D-glucopyranuro- syloxy ] machaerinate
13	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>18</sub>	925. 481 6		1.5	11. 74	925. 481 6, 793. 434 4, 631. 386 5, 613. 369 6, 455. 350 8, 157. 013 6	Chikusetsusaponin IV
14	C <sub>54</sub> H <sub>84</sub> O <sub>25</sub>	1 131. 525 8		2.6	12. 14	1 131. 525 8, 969. 466 3, 954. 443 7, 631. 385 0, 793. 543 9, 455. 352 7, 157. 013 9	Achyranthoside D methyl ester
15	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>23</sub> S	1 033. 392 7		-2.8	14. 05	1 033. 392 7, 953. 440 8, 763. 425 7, 613. 374 1, 569. 384 6, 455. 352 6, 157. 013 6	Sulfachyranthoside B
16	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>20</sub>	955. 456 4		2.1	14. 24	955. 456 4, 793. 437 3, 631. 384 3, 613. 374 3, 455. 352 6, 175. 024 9	Achyranthoside C
17	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	985. 502 9		2.6	14. 31	985. 502 9, 777. 440 2, 615. 388 8, 455. 351 6	Momordin Iia
18	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>20</sub>	953. 439 4		0.7	14. 48	953. 439 4, 793. 437 1, 631. 385 0, 613. 374 3, 455. 352 7, 161. 009 1	Achyranthoside B or Bidentoside I
19	C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>20</sub>	955. 4545		0.1	15. 07	955. 454 5, 835. 443 9, 793. 436 7, 613. 374 1, 455. 351 8, 161. 008 8	Achyranthoside G
20	C <sub>48</sub> H <sub>72</sub> O <sub>20</sub>	967. 451 9		-2.6	15. 18	967. 451 9, 792. 394 8, 632. 386 3, 455. 351 6, 161. 008 3	Achyranthoside A
21	C <sub>49</sub> H <sub>78</sub> O <sub>19</sub>		1 015. 512 1	1.3	15. 50	1 015. 512 1, 789. 439 0, 627. 386 8, 455. 351 8	Chikusetsusaponin V methyl ester
22	C <sub>49</sub> H <sub>76</sub> O <sub>20</sub>	983. 484 6		-1.1	15. 68	983. 484 6, 793. 435 9, 455. 352 0, 175. 024 4, 113. 024 2	Achyranthoside C dimethyl ester
23	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>19</sub>	953. 472 8		-2.5	16. 06	953. 440 8, 791. 416 4, 629. 367 7, 569. 386 4, 455. 352 6	Achyranthoside E dimethyl ester
24	C <sub>47</sub> H <sub>74</sub> O <sub>18</sub>	925. 472 3		-8.0	16. 31	925. 472 3, 793. 436 6, 631. 384 0, 455. 352 1	Pseudoginsenoside RT1

续表 1 (Continued Tab. 1)

峰号 No.	分子式 Formula	[M-H] <sup>-</sup>	[M + HCOO] <sup>-</sup>	偏差 Error (ppm)	保留时间 $t_R$ (min)	碎片离子 Fragmentation ions	鉴定化合物 Identified compounds
25	C <sub>42</sub> H <sub>66</sub> O <sub>14</sub>	793.437 6		-0.5	16.42	793.437 6, 631.385 0, 613.374 2, 455.350 8, 157.013 2, 113.024 0	Zingibroside R1
26	C <sub>47</sub> H <sub>70</sub> O <sub>20</sub>	953.440 1		1.4	17.30	835.448 0, 793.437 3, 613.374 2, 455.352 5, 161.008 8	Bidentatoside I or Achyranthoside B
27	C <sub>41</sub> H <sub>64</sub> O <sub>13</sub>	763.435 4		0.9	17.50	763.435 4, 631.385 6, 613.373 0, 455.352 6, 175.024 6	28-Desglucosylchikusetsusaponin IV
28	C <sub>41</sub> H <sub>62</sub> O <sub>15</sub>	793.397 9		-4.7	18.22	793.397 9, 631.385 5, 455.352 9, 161.008 9	28-deglucosyl-achyranthoside C
29	C <sub>42</sub> H <sub>66</sub> O <sub>14</sub>	793.440 2		2.7	18.49	793.440 2, 631.384 6, 613.374 7, 569.385 9, 455.350 8, 175.024 7, 113.024 6	Chikusetsusaponin Iva
30	C <sub>43</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>		853.459 9	0.8	18.42	853.459 9, 645.367 9, 455.352 7, 113.024 1	Chikusetsusaponin Iva methyl ester
31	C <sub>41</sub> H <sub>60</sub> O <sub>15</sub>	791.386 1		0.3	18.73	791.386 7, 631.385 2, 613.374 2, 455.352 8, 175.024 4, 113.024 1	Achyranthoside iv
32	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>9</sub>		679.404 3	-1.3	18.89	679.404 3, 471.346 4	Hederagenin-28-O-β-D-glucopyranosyl ester
33	C <sub>40</sub> H <sub>60</sub> O <sub>14</sub>	763.391 5		0.7	19.17	763.391 5, 631.383 4, 455.352 7, 130.998 4	28-deglucosyl-achyranthoside E
34	C <sub>36</sub> H <sub>56</sub> O <sub>9</sub>	631.383 7		-2.37	19.48	631.383 7, 455.350 9, 175.024 4	28-Desglucosylchikusetsusaponin IVa
35	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>8</sub>	617.405 1		-1.3	19.73	617.405 1, 455.353 4, 113.024 3	Oleanolic acid 3-O-β-D-glucopyranoside
36	C <sub>36</sub> H <sub>58</sub> O <sub>8</sub>		663.411 7	0.4	19.91	663.411 7, 455.352 9, 161.045 1	Chikusetsusaponin-1
37	C <sub>53</sub> H <sub>82</sub> O <sub>28</sub> S	1197.259 4			21.40	1197.259 4, 1117.504 2, 955.483 4, 79.394 7, 631.113 7, 455.352 6, 175.024 1	Sulfachyranthoside D
38	C <sub>37</sub> H <sub>60</sub> O <sub>9</sub>	633.399 9		-1.4	22.09	633.399 9, 455.352 6, 113.024 1	Oleanolic acid 3-O-β-D-glucopyranoside-6-O-methyl ester
39	C <sub>46</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub>		895.509 5	1.6	22.51	895.509 5, 687.443 5, 455.351 7, 161.046 5	Chikusetsusaponin Iva butyl ester
40	C <sub>41</sub> H <sub>62</sub> O <sub>14</sub>	777.404 9		-2.3	22.62	777.404 9, 631.384 6, 613.373 0, 455.351 5, 175.024 3	3-O-β-D-Glc-(1→2)-[[2-carboxy-1-(carboxymethyl)-2-hydroxyethyl-(1→3)]-β-D-GluA oleanolic acid

与竹节参皂苷 IV 相比分子量少了 162, 推测其分子式为 C<sub>41</sub>H<sub>64</sub>O<sub>13</sub>, 高能量下特征碎片离子为  $m/z$  631.385 6 [M-Arabinose (Ara)-H]<sup>-</sup>、613.373 0 [M-Ara-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup>、455.352 6 [M-Ara-GluA-H]<sup>-</sup>, 其中  $m/z$  631.385 6、613.373 0、455.352 6 分别与竹节参皂苷

IV 的碎片离子相同, 峰 27 鉴定为 28-去葡萄糖竹节参皂苷 IV。峰 35 在低能量下给出  $m/z$  617.405 1 [M-H]<sup>-</sup> 的离子峰, 峰 36 给出  $m/z$  663.411 7 [M + HCOO]<sup>-</sup>, 二者在高能量下都产生了相同的碎片离子  $m/z$  455.35 [M-H-Glu]<sup>-</sup>, 通过比对文献<sup>[10]</sup>, 分

别推测为 3-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖基齐墩果酸苷和竹节参皂苷 1。

### 3.2.2 齐墩果酸型双取代三萜皂苷化合物的鉴定

双取代化合物指齐墩果酸母核的 C3 和 C28 位上同时具有取代基的化合物,本实验共鉴定出 25 种双取代化合物。现以峰 10 和峰 24 为例,阐述双取代化合物鉴定过程。峰 10 在低能量下给出一个  $[M-H]^-$   $m/z$  1117.5125 以及  $[M+HCOOH-2H]^{2-}$   $m/z$  581.2509, 高能量下主要特征碎片离子  $m/z$  955.4918  $[M-H-C_5H_7O_6]^-$ 、793.4379  $[M-H-C_5H_7O_6-Glu]^-$ 、631.3844  $[M-H-C_5H_7O_6-2Glu]^-$  和 455.3531  $[M-H-C_5H_7O_6-2Glu-GluA]^-$  (如图 3), 可推测该化合物为牛膝皂苷 D, 其可能裂解途径如图 4 所示。峰 24 在低能量下给出一个  $[M-H]^-$   $m/z$  925.4723 以及  $[M+HCOOH-2H]^{2-}$   $m/z$  485.2385, 高能量下产生的碎片离子  $m/z$  793.4366  $[M-H-xy-$

lose(Xyl)] $^-$ 、631.3840  $[M-H-Xyl-Glu]^-$ 、455.3521  $[M-H-Xyl-Glu-GluA]^-$ , 结合文献报道<sup>[11]</sup>, 将其鉴定为假人参皂苷 RT1。

此外,本实验通过 UNIFI 自建数据库以及在线数据库发现,峰 12 和峰 32 与上述三萜皂苷具有相同质谱行为,但碎片离子中并未发现齐墩果酸母核 455.35 的碎片离子,通过软件自带元素分析功能确定分子式以及在线数据库确定可能结构,最终峰 12 和 32 分别被推测为  $\beta$ -D-glucopyranosyl 3 $\beta$ -[*O*- $\alpha$ -L-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -D-glucopyranuronosyloxy] machaerinate 和 hederagenin-28-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester, 两者均为非齐墩果酸型三萜皂苷。

## 4 讨论

本实验通过 UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup> 技术结合 UNIFI 平台对牛膝中的三萜皂苷进行了快速的分析。在 MS<sup>E</sup> 模式下高、低能量动态变化的碰撞诱导解离过

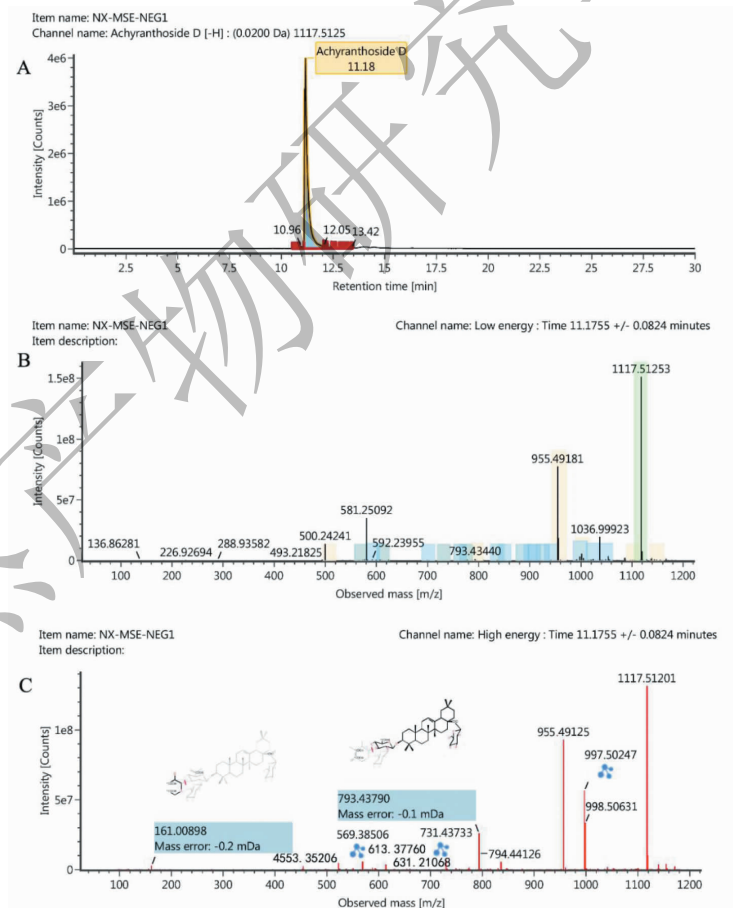


图 3 牛膝皂苷 D 的 UNIFI 结果报告图:提取离子流图(A),低能量(B)及高能量质谱图(C)

Fig. 3 UNIFI results of Achyranthoside D:

Extract ion chromatograms

(A), low energy (B) and high energy (C) mass spectrometry

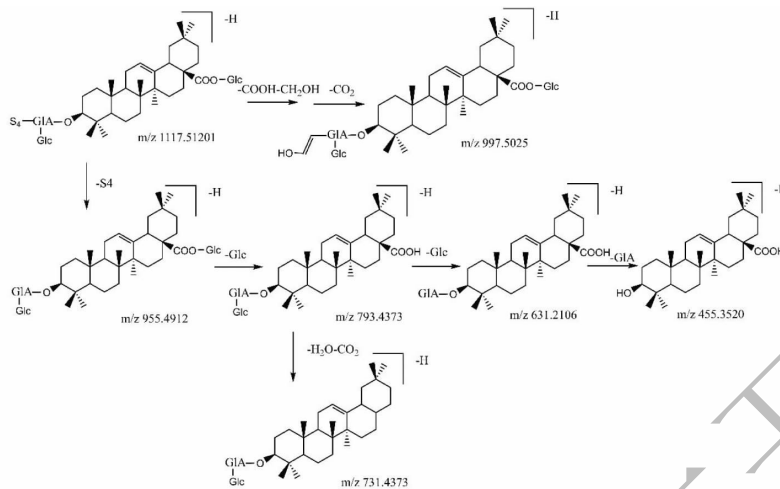


图4 牛膝皂苷D可能裂解途径

Fig. 4 Possible fragmentation pathways of Achyranthoside D

程中,可以实现一次进样即可同时获得化合物的准分子离子峰及相关碎片信息<sup>[12]</sup>。为了获取三萜皂苷丰富的离子信息,更为全面的推测化合物的结构,本实验比较了正、负离子两种质谱扫描模式,结果显示三萜皂苷在负离子模式下质谱响应较好,故最终确定为负离子模式下进行分析。同时本实验考察了水-乙腈以及0.1%甲酸水-乙腈不同流动相对色谱峰的影响。最终采用了能有效改善峰形和离子化效果的0.1%甲酸水作为水相。此外,UNIFI平台,可以按预设参数,进行成分的自动解析,并给出可能的裂解过程,极大的简化了分析过程。本实验根据对照品的裂解规律以及相关文献,结合样品在MS<sup>E</sup>模式下的精密分子质量,碎片离子以及保留时间等信息,通过UNIFI平台进行UNIFI自带数据库、自建数据库以及在线数据库(Chempid, MassBank等)的检索比对并利用MassLynx工作站进行人工核对。共鉴定了40种三萜类皂苷类成分,其中在齐墩果酸母核上C3或C28仅有一个取代基的化合物13种,C3和C28位均有取代基的化合物25种,另有其它母核的化合物2种。

另外,本实验发现齐墩果酸型三萜皂苷在负离子模式下存在一定的规律性:当C3位有取代基时会产生一个[M-H]<sup>-</sup>的准分子离子峰,但当单取代在C28位时,会产生一个[M+HCOO]<sup>-</sup>的准分子离子峰;当C3和C28位均有取代基时,C28位的取代基优于C3位取代基先脱去,五碳糖(Ara, Xyl)优于六碳糖(Glu)脱去。此外,当C3和C28位均有取代

基时,除了会产生一个[M-H]<sup>-</sup>的准分子离子峰外,还会产生一个特征的[M+HCOOH-2H]<sup>2-</sup>分子离子峰。

总之,UPLC-QTOF/MS<sup>E</sup>以其高灵敏、高分辨率的特点结合UNIFI强大的数据处理能力能快速为牛膝中的三萜皂苷作定性分析,为中药有效成分的鉴定提供了参考,同时也为牛膝皂苷的药效物质、质量控制研究提供科学依据。

#### 参考文献

- 1 He XR, Wang XX, Fang JC, et al. The genus *Achyranthes*: A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 203: 260-278.
- 2 Xu XX, Zhang XH, Diao Y, et al. *Achyranthes bidentata* saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation and apoptosis *in vitro* [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2017, 33(2): 62-68.
- 3 He G, Guo W, Lou ZY, et al. *Achyranthes bidentata* saponins promote osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells through the ERK MAPK signaling pathway [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70: 467-473.
- 4 Yuan C, Wang HF, Hu X, et al. Rapid Identification on chemical constituents of antimicrobial fractions from *Blumea balsamifera* (L.) DC. by UPLC-Q-TOF-MS<sup>E</sup> [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1904-1912.
- 5 Zhou GS, Wang MY, Li Y, et al. Comprehensive analysis of 61 characteristic constituents from *Siraitiae fructus* using ultrahigh-pressure liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 125: 1-14.