

基于 LC-MS 拟靶向代谢组学的山西北柴胡质量分析

白雪¹, 郭雅璇¹, 许爱玲², 高晓霞¹, 秦雪梅¹, 王晓民^{2*}, 李震宇^{1*}

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006; 2. 山西农业大学棉花研究所, 山西 运城 044000)

摘要: 柴胡是中医临床常用中药材, 皂苷是其重要的活性成分。本研究首先利用超高效液相色谱-三重四极杆复合线性离子阱质谱 (UHPLC-QTrap-MS) 在智能化分时间段-多反应选择离子监测 (scheduled multiple reaction monitoring, sMRM) 模式下建立了 25 种柴胡皂苷的拟靶向相对定量方法, 所建立的方法具有良好的精密性、线性、重复性和稳定性。将该方法应用于 37 批不同产地北柴胡样品的比较, 结果显示山西不同产地北柴胡皂苷差异不大, 表明北柴胡生长适应力强, 受产地环境因素影响小, 适合广泛种植。夏季采收的柴胡与传统的春秋采收期采收的柴胡的皂苷类成分存在一定差异, 说明传统采收经验的合理性。相关性分析表明, 柴胡皂苷 a 和 d 与部分皂苷类成分存在显著的正相关, 通过变异系数分析确定了 clinoposaponin XII 等 4 种波动较大的皂苷类成分。本研究建立的 LC-MS 拟靶向代谢组学方法, 可以应用于柴胡皂苷类成分的全面检测, 为柴胡的质量评价研究提供新的方法。

关键词: 柴胡; 柴胡皂苷; UHPLC-QTrap-MS; 拟靶向代谢组学; 质量评价

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)07-1963-08

Quality evaluation of Bupleuri Radix in Shanxi Province by LC-MS based pseudotargeted metabonomics

BAI Xue¹, GUO Ya-xuan¹, XU Ai-ling², GAO Xiao-xia¹, QIN Xue-mei¹,
WANG Xiao-min^{2*}, LI Zhen-yu^{1*}

(1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Cotton Research Institute, Shanxi Agricultural University, Yuncheng 044000, China)

Abstract: Bupleuri Radix is commonly used in the traditional Chinese medicine, and saikosaponins are the important active ingredients. In this study, we first established a relative quantitative method for 25 saikosaponins using ultra high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-QTrap-MS) in the scheduled multiple reaction monitoring (sMRM) mode. The established method showed good intra-day and intra-day precision, linearity, repeatability and stability. Then the method was applied to compare 37 batches of Bupleuri Radix from different planting areas. The results showed that there was no significant difference in the saikosaponins composition of Bupleuri Radix from different planting areas in Shanxi Province, which indicating that Bupleuri Radix is well adapted to the environment, so it is suitable for widely planting. However, Bupleuri Radix harvested at spring and autumn were differed from those harvested at summer, which indicated that the traditional harvesting experience was reasonable. Correlation analysis showed that saikosaponins a and d were positively correlated with some saponins, and 4 saponins (such as clinoposaponin XII) showed bigger content variation were identified by coefficient of variation analysis. The LC-MS based pseudotargeted metabonomic

收稿日期: 2022-12-16; 修回日期: 2023-04-03.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFC1710805); 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-21); 山药柴胡种质资源利用及规范生产关键技术研究 (YCKJ-2021017); 运城道地药材柴胡高质量栽培关键技术研究 (2021YNGG05); 山西省现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (2021-11).

*通讯作者 Tel: 86-359-2121243, E-mail: mhswxm@163.com;

Tel: 86-351-7011202, E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1376

method established in this study can be applied to the comprehensive detection of saikosaponins, which providing new method for the quality evaluation of Bupleuri Radix.

Key words: Bupleuri Radix; saikosaponin; UHPLC QTrap-MS; pseudotargeted metabolomics; quality evaluation

柴胡为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 或狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.) 的干燥根, 前者习称为“北柴胡”, 后者也称为“南柴胡”“红柴胡”。柴胡始载于《神农本草经》, 列为上品, 是中医临床常用中药。柴胡具有疏散退热, 疏肝解郁, 升举阳气之功效^[1], 用于感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛、月经不调、子宫脱垂、脱肛等病症。柴胡内在品质优劣直接影响着中药临床疗效, 皂苷类成分是柴胡中主要的药理活性成分之一^[2], 也是柴胡研究较为广泛和深入的一类化合物。北柴胡是山西的道地药材, 在山西省的种植规模较大^[3], 主要集中在山西运城、临汾、长治等地, 此外, 山西大同、吕梁、忻州等地区也有相当规模的种植基地, 使山西北柴胡在药材市场具有较大影响。

按照《中华人民共和国药典》的规定, 柴胡的质量评价指标为柴胡皂苷 a (saikosaponin a, SSa) 和柴胡皂苷 d (saikosaponin d, SSd)。已有研究表明, 除了柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 外, 柴胡中还含有结构多样的其他皂苷类成分^[2]。因此, 建立一种可同时检测多种皂苷类成分的方法, 对于柴胡的质量评价很有必要。拟靶向代谢组学分析方法结合了非靶向和靶向代谢组学分析的优势, 具有较宽的线性动态范围、高灵敏度、高扫描速率以及良好的重复性^[4]。拟靶向代谢组学检测一般采用 sMRM 模式, 它是在常规多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式的基础上增设了保留时间, 可以在预设时间窗口内对设定离子对进行扫描, 从而显著提高检测效率和精度^[5], 适合组学的大样本分析。拟靶向代谢组学分析目前已经应用于中药的质量评价, 如舒血宁^[4]、广陈皮^[6]、肉苁蓉^[7]、前胡等^[8]。

本研究旨在建立一种针对柴胡皂苷类成分的拟靶向代谢组学方法。首先使用超高效液相色谱结合四极杆飞行时间质谱 (QTOF-MS) 方法对柴胡皂苷类成分进行定性表征, 然后运用超高效液相色谱结合三重四极杆复合线性离子阱质谱, 在 sMRM 模式下建立一种柴胡拟靶向代谢组学检测方法, 并对不同产地、不同采收时间的北柴胡中的皂苷类成分进行检测和差异分析。

材料与方法

化学药品和试剂 质谱级乙腈、质谱级甲醇、质谱

级甲酸均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 超纯水 (Milli-Q Integral Water Purification System 制备, 美国 Millipore 公司); 黄芪甲苷标准品 (批号: HA012079198), 购自宝鸡市辰光生物科技有限公司; 柴胡皂苷 a 标准品 (批号: 000214-201907), 购自江西佰草源生物科技有限公司; 柴胡皂苷 b1 标准品 (批号: PS2121-0025), 购自成都普斯生物科技股份有限公司; 柴胡皂苷 c 标准品 (批号: MUST-17031402) 和柴胡皂苷 d 标准品 (批号: MUST-17050106) 均购自成都曼思特生物科技股份有限公司。

样本收集 收集山西省内外不同产地、采收期及不同种植方式的柴胡 37 批, 其中山西省内的北柴胡 31 批, 分别来自山西大同、运城、临汾、吕梁、晋中、忻州等地。省外北柴胡 6 批, 分别来自甘肃和陕西。其中, 春秋采收的北柴胡 22 批, 夏季采收的北柴胡 15 批, 详情见表 1。样品经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为北柴胡 (*B. chinense* DC.) 的干燥根, 样品保存于山西大学中医药现代研究中心。

Table 1 The sample information of Radix Bupleurum

Serial No.	Time of harvest	Area of collection	Serial No.	Time of harvest	Area of collection
CH-19-02	2019.11	Yuncheng	CH-20-28	2020.01	Shaanxi
CH-20-01	2020.03	Jinzhong	CH-20-29	2020.01	Gansu
CH-20-02	2020.09	Jinzhong	CH-20-30	2020.09	Gansu
CH-20-03	2020.08	Yuncheng	CH-20-32	2020.01	Gansu
CH-20-04	2020.03	Yuncheng	CH-20-33	2020.01	Gansu
CH-20-05	2020.01	Yuncheng	CH-20-34	2021.11	Hebei
CH-20-06	2020.07	Yuncheng	CH-21-01	2021.06	Linfen
CH-20-07	2020.07	Yuncheng	CH-21-02	2021.06	Linfen
CH-20-08	2020.09	Linfen	CH-21-03	2021.06	Linfen
CH-20-09	2020.09	Linfen	CH-21-04	2021.06	Linfen
CH-20-11	2020.11	Datong	CH-21-05	2021.06	Linfen
CH-20-12	2020.11	Datong	CH-21-06	2021.06	Linfen
CH-20-13	2020.11	Datong	CH-21-08	2021.06	Linfen
CH-20-15	2020.11	Xinzhou	CH-21-09	2021.06	Linfen
CH-20-23	2020.09	Yuncheng	CH-21-11	2021.06	Linfen
CH-20-24	2020.09	Yuncheng	CH-21-12	2021.06	Linfen
CH-20-25	2020.01	Yuncheng	CH-21-13	2021.06	Datong
CH-20-26	2020.01	Linfen	CH-21-14	2021.06	Datong
CH-20-27	2020.09	Datong			

供试品溶液制备

内标溶液制备 精密称取黄芪甲苷标准品 10 mg 置于 2 mL 量瓶中, 用质谱级甲醇定容, 超声至溶解, 得 5 mg·mL⁻¹ 黄芪甲苷标准溶液。

定性分析用供试品溶液制备 取北柴胡粉末(过四号筛) 2 g置于50 mL锥形瓶中, 封口膜密封, 加甲醇10 mL, 超声处理30 min, 取上清室温下以3 500 r·min⁻¹离心10 min。取上清过0.22 μm微孔滤膜, 得供试品溶液。

拟靶向供试品溶液制备 取上述定性分析供试品溶液1 mL, 加40 μL黄芪甲苷标准溶液。

质控样本(quality control, QC)制备 取等体积(3 mL)的37个供试品溶液混合即得QC溶液。另将QC溶液浓缩并梯度稀释, 得到5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05、0.01倍浓度的QC溶液。分别精确量取各个梯度的QC溶液1 mL, 加40 μL黄芪甲苷对照溶液, 得线性供试品溶液。

高分辨质谱数据采集 使用UHPLC(Agilent 1290)与Triple TOF 5600⁺质谱仪(AB SCIEX)联用, 采用T3(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱, 流速0.3 mL·min⁻¹, 柱温35 °C, 进样量3 μL。流动相组成为0.1%甲酸-水(A)和0.1%甲酸-乙腈(B)。洗脱梯度条件: 0~15 min(10%~40% B), 15~28 min(40%~75% B), 28~33 min(75%~95% B), 33~35 min(95%~95% B), 35~37 min(95%~10% B)。质谱条件: 采用ESI电喷雾离子源, 离子化电压: -4 500 V; 离子源温度: 550 °C; 去簇电压(declustering potential, DP): 60 V; 碰撞能量(collision energy, CE): 40 ± 15 eV; 气帘气(curtain gas, CUR): 30 psi; 喷雾气(ion source gas 1, GS1): 55 psi; 辅助加热气(ion source gas 2, GS2): 55 psi; 一级扫描模式: Full MS; 二级扫描模式: Full MS/dd-MS2; 扫描范围 m/z 100~1 500。此外, 另将CE分别设置为20、30、40和50 eV, 其余条件不变, 以采集不同CE下的图谱。

sMRM最优离子对、CE和DP的优化 使用Onemap软件将不同CE下QC样品的wiff格式文件转换为mgf格式, 随后提取峰表。采用R软件包(https://github.com/zhengfj1994/MRM-Ion_Pair_Finder)确定每个皂苷类成分最合适的离子对和CE^[9]。R语言软件不能优化的成分使用Sciex OS软件自行手动优化, 即根据二级质谱数据, 为每个化合物选择响应度较高的1至2个二级碎片离子作为候选子离子, 分别结合母离子构成离子对, 然后挑选离子对相应强度最高的CE。使用UHPLC(AB SCIEX)与QTrap3200(AB SCIEX)质谱仪联用, 通过sMRM模式下离子跃迁的峰强度最终确定每个化合物响应最高的离子通道, 将该通道所对应的离子对和CE值确定为该化合物的最佳离子对和最佳CE。得到各成分的最佳离子对和最佳CE后, 在sMRM模式下进一步优化DP。将每个离子对的DP分别设置为20、40、60、80 V, 化合物响应最高的离子通道

所对应的DP值作为该化合物的最佳DP。

液相色谱和质谱条件 将各化合物的编号、sMRM离子对、保留时间、最佳CE、最佳DP导入sMRM监测列表中, 进行UHPLC-sMRM分析。色谱条件同上述高分辨质谱数据采集, 进样量为5 μL。质谱条件: CUR: 38 psi; 离子化电压: -4 500 V; 温度: 500 °C; GS1: 50 psi; GS2: 50 psi; 扫描模式为负离子模式。

方法学考察 用浓缩并梯度稀释的QC样本考察线性动态范围, 通过MultiQuant软件计算各个成分峰面积/内标峰面积比值与浓度的关系, 构建回归曲线。选取其中0.6、1、2倍浓度的QC溶液作为低、中、高浓度样本考察日内、日间精密度, 即同一天内三个浓度的QC样本分别连续进6针考察日内精密度, 三个浓度QC样本分别每天进3针, 连续进3天, 考察日间精密度。取1倍浓度QC样本每间隔8针进样1针, 持续24 h, 共5针, 以考察仪器和样本的稳定性。另取柴胡CH21-01平行制备6份供试品溶液, 考察备样方法的重复性。

结果与讨论

1 皂苷成分鉴定及离子对、CE、DP优化

通过文献^[10-17]报道中柴胡皂苷类化合物的质谱信息及裂解规律, 结合标准品对照, 共鉴定柴胡皂苷成分33个。随后通过R语言软件优化出21个皂苷成分的离子对和CE, 其余12个皂苷成分以及内标黄芪甲苷的离子对和CE使用Sciex OS软件手动优化, 最终确定33种皂苷成分和内标黄芪甲苷的最优离子对, 以及最优CE和DP(表2)。以羟基柴胡皂苷a(hydroxyl saikosaponin a, HOSSa)为例(图1), 离子对843.5/797.5和843.5/635.4在不同DP(20 V、40 V、60 V、80 V)参数下, 均在DP为40 V时响应最高。且DP电压均为40 V时, 离子对843.5/797.5的响应高于843.5/635.4, 故确定最优离子对为843.5/797.5, 其对应的最优DP为40 V。将表2中的信息导入sMRM列表, 采集负离子模式下的总离子流图(图2), 峰号与表2中的编号相一致。利用MultiQuant软件提取离子峰, 对峰面积进行积分, 并用内标峰面积进行矫正, 通过相应的回归曲线计算各化合物的相对含量。

2 方法学考察

在33个目标分析物中, 6个皂苷类成分因含量较低导致峰形较差而剔除, 其余的27个成分进一步从线性范围、日间和日内精密度、重复性和稳定性等方面进行方法学考察。重复性考察结果显示, 25个化合物的RSD值均小于20%; 对于24 h内的稳定性, 有24个组分的RSD值小于20%; 日内精密度考察结果显示, 低、

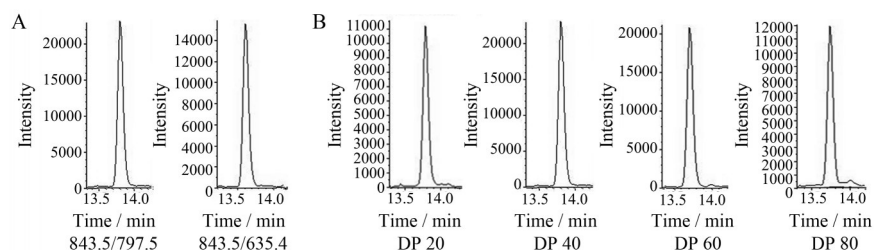


Figure 1 The selection of MRM ion-pair (A) and the optimization of DP (B) of hydroxyl saikosaponin a (DP: Declustering potential)

Table 2 Optimal ion pairs and optimal CE and DP (CE: Collision energy; HOSSa: Hydroxyl saikosaponin a; HOSSd: Hydroxyl saikosaponin d; HOSSc: Hydroxyl saikosaponin c; SSc: Saikosaponin c; SSf: Saikosaponin f; SSb3: Saikosaponin b3; SSb4: Saikosaponin b4; SSn: Saikosaponin n; SSa: Saikosaponin a; SSe: Saikosaponin e; SSm: Saikosaponin m; SSb1: Saikosaponin b1; SSd: Saikosaponin d)

No.	Name	RT /min	DP /V	CE /eV	m/z	
					Parent ion	Daughter ion
1	HOSSa	13.14	-40	-30	843.466 4	797.492 3
2	Bupleuroside IV	13.18	-20	-50	797.462 6	635.440 6
3	HOSSd	13.69	-60	-30	843.467 2	797.497 3
4	Magnoside B	14.00	-20	-40	1 135.591 9	1 089.587 0
5	Malonyl-acetyl-hydroxy-SSa	14.10	-60	-50	883.461 5	635.433 4
6	HOSSc	14.79	-60	-40	989.522 8	943.547 9
7	Clinoposaponin XII	15.46	-60	-30	841.459 7	795.456 5
8	SSc	16.03	-40	-50	971.522 9	925.518 3
9	SSf	16.34	-40	-40	973.537 2	927.533 8
10	Acetyl-SSf	16.76	-20	-40	969.543 1	909.528 6
11	Malonyl-SSf	17.20	-60	-50	1 013.523 7	909.541 2
12	SSb3/SSb4	17.62	-60	-40	857.491 8	811.488 9
13	SSn	17.83	-40	-50	987.508 1	779.477 9
14	Rotundioside N	18.06	-40	-50	987.517 9	779.460 9
15	Chinoposaponin XVIII	18.12	-80	-50	941.511 1	779.458 6
16	SSa	18.63	-20	-50	779.459 5	617.408 4
17	Bupleuroside X	19.00	-80	-50	941.511 0	795.477 0
18	2"-O-Acetyl-SSa	19.20	-20	-30	821.470 6	779.463 1
19	Malonyl-SSa	19.34	-60	-40	865.450 8	779.476 2
20	Dimalonyl-SSa	19.73	-40	-20	951.470 1	907.474 7
21	3"-O-Acetyl-SSa	19.87	-20	-40	821.469 8	779.462 3
22	SSe/SSm	19.95	-20	-30	763.464 1	601.411 9
23	Prosaikogenin A	20.11	-60	-30	663.411 7	617.405 9
24	Acetyl-SSm	20.74	-60	-30	851.480 4	805.477 4
25	Malonyl-SSe	20.97	-40	-20	849.464 8	805.477 8
26	Malonyl-SSn	21.21	-80	-40	1 027.513 2	983.526 1
27	SSb1	21.42	-20	-50	779.459 2	617.406 4
28	Malonyl-SSd	22.11	-40	-30	865.460 5	821.472 6
29	SSd	22.37	-20	-50	779.459 4	617.407 6
30	4"-O-Acetyl-SSa	22.54	-80	-40	821.461 8	779.485 6
31	Diacetyl-SSd	23.12	-20	-30	863.480 8	821.471 8
32	Prosaikogenin D	23.17	-80	-20	663.411 0	617.409 0
33	6"-O-Acetyl-SSa	23.60	-80	-40	821.470 1	779.469 7
34	Astragaloside IV	17.05	-80	-30	783.500 0	179.200 0

中、高浓度下分别有 25、25 和 26 个的化合物的 RSD 值小于 20%；日间精密度考察结果显示，低、中、高浓度下分别有 23、24 和 24 个成分的 RSD 值小于 20%。最终

选择的 25 个柴胡皂苷成分具有良好的稳定性和重复性，作为拟靶向分析的指标成分。如表 3 所示，这些成分在 QC 的 0.01~5 倍浓度范围内均呈现良好的线性关系 ($r > 0.99$)。

3 不同产地、不同采收期北柴胡的皂苷类成分比较

根据上述回归方程计算 37 批北柴胡中 25 种皂苷成分的相对含量。首先将 37 批样本，按照产地分组进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 分析 (图 3A)，结果显示不同产地北柴胡之间没有明显的聚类 and 分离趋势。进一步计算 37 批北柴胡中 25 种皂苷成分的总量 (图 4)，皂苷总量在不同的柴胡样本中差异也不大。表明北柴胡生长适应力强，受产地环境因素影响小，适合广泛种植。

Table 3 Linear regression equation. The numbers hereby are consistent with those in Table 2

No.	Name	Equation of regression
1	HOSSa	$y = 49.570 21 x + 0.459 18$ ($r = 0.996 34$)
2	Bupleuroside IV	$y = 1.029 37 x + 0.009 79$ ($r = 0.999 07$)
3	HOSSd	$y = 19.724 48 x + 0.017 45$ ($r = 0.999 02$)
5	Malonyl-acetyl-hydroxy-SSa	$y = 1.173 21 x + 7.181 66 \times 10^{-5}$ ($r = 0.994 78$)
7	Clinoposaponin XII	$y = 9.544 07 x + 0.259 61$ ($r = 0.999 73$)
9	SSf	$y = 0.705 38 x + 0.060 18$ ($r = 0.998 74$)
10	Acetyl-SSf	$y = 0.152 16 x + 0.006 52$ ($r = 0.992 22$)
11	Malonyl-SSf	$y = 0.375 02 x + 0.031 62$ ($r = 0.998 43$)
12	SSb3/SSb4	$y = 1.970 07 x + 0.073 31$ ($r = 0.992 78$)
15	Chinoposaponin XVIII	$y = 0.904 87 x - 0.029 07$ ($r = 0.992 87$)
16	SSa	$y = 71.119 51 x + 0.515 52$ ($r = 0.999 41$)
17	Bupleuroside X	$y = 0.431 50 x + 2.82675 \times 10^{-4}$ ($r = 0.992 73$)
18	2"-O-Acetyl-SSa	$y = 2.363 23 x + 0.072 38$ ($r = 0.998 17$)
19	Malonyl-SSa	$y = 10.899 58 x - 0.008 90$ ($r = 0.999 18$)
21	3"-O-Acetyl-SSa	$y = 1.670 58 x + 0.087 61$ ($r = 0.997 35$)
23	Prosaikogenin A	$y = 120.071 13 x + 6.444 78$ ($r = 0.999 35$)
24	Acetyl-SSm	$y = 0.928 55 x + 7.912 41 \times 10^{-4}$ ($r = 0.995 99$)
25	Malonyl-SSe	$y = 2.257 51 x + 0.126 70$ ($r = 0.996 92$)
27	SSb1	$y = 17.147 99 x + 0.536 27$ ($r = 0.999 92$)
28	Malonyl-SSd	$y = 50.900 33 x + 1.136 04$ ($r = 0.999 61$)
29	SSd	$y = 12.677 61 x + 0.334 23$ ($r = 0.999 33$)
30	4"-O-Acetyl-SSa	$y = 4.062 47 x + 0.163 83$ ($r = 0.994 03$)
31	Diacetyl-SSd	$y = 2.470 65 x - 0.002 52$ ($r = 0.993 66$)
32	Prosaikogenin D	$y = 7.491 24 x + 0.348 36$ ($r = 0.999 85$)
33	6"-O-Acetyl-SSa	$y = 2.034 60 x + 0.033 12$ ($r = 0.999 07$)

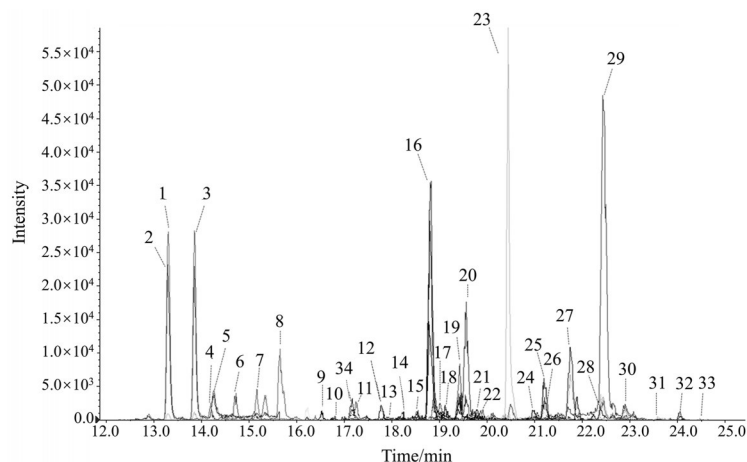


Figure 2 UHPLC-sMRM pseudo-targeted analysis of ion flow pattern in the negative ion mode. The peak numbers hereby are consistent with those in Table 2

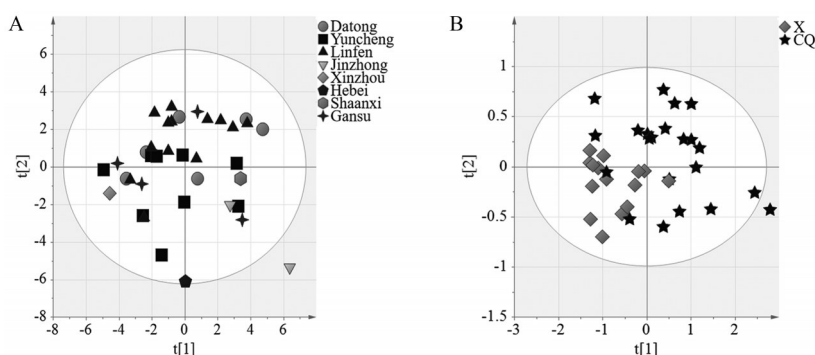


Figure 3 PCA (A) score plot of Bupleuri Radix from different planting areas; PLS-DA (B) score plot of Bupleuri Radix collected at different harvesting seasons (X: Summer; CQ: Spring and autumn)

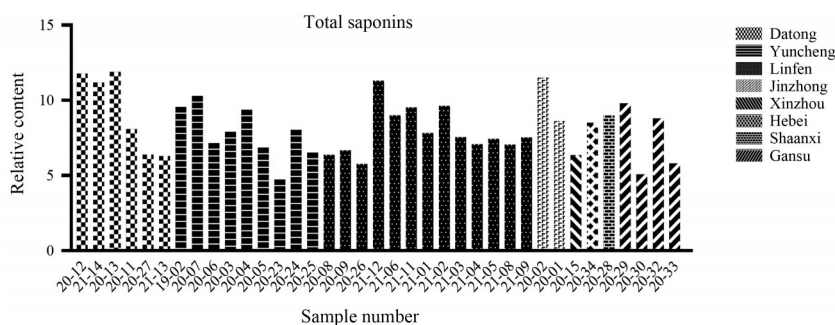


Figure 4 Total saponins content of Bupleuri Radix from different planting areas

随后将37批北柴胡样本按照传统采收期(春秋)和非传统采收期(夏)分组,采用偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)分析可见两者具有一定分离趋势(图3B)。进一步通过倍数差异(fold change, FC)值($FC > 1.2$ 或 $FC < 0.8$)和 t 检验($P < 0.05$)筛选出两组的9个差异成分(表4)。由热图可以看出,春秋与夏季采收的北柴胡确定存在差异,clinoposaponin XII和柴胡次皂苷D在春秋采收的北柴胡样本中含量较高,而丙二酰基-乙酰基-羟基-

柴胡皂苷a、3''-O-乙酰基-柴胡皂苷a、6''-O-乙酰基-柴胡皂苷a、丙二酰基-柴胡皂苷a、丙二酰基-柴胡皂苷d、乙酰基-柴胡皂苷f、乙酰基-柴胡皂苷m等成分在夏季采收的北柴胡样本中较高(图5)。

进一步计算25种柴胡皂苷成分的相关性,如图6所示,红色越深表示正相关性越强,蓝色越深则表示负相关性越强。相关系数的绝对值在0.8~1.0表示极强相关,0.6~0.8表示强相关,0.4~0.6表示中等程度相关,0.2~0.4表示弱相关,0~0.2表示极弱相关或无相

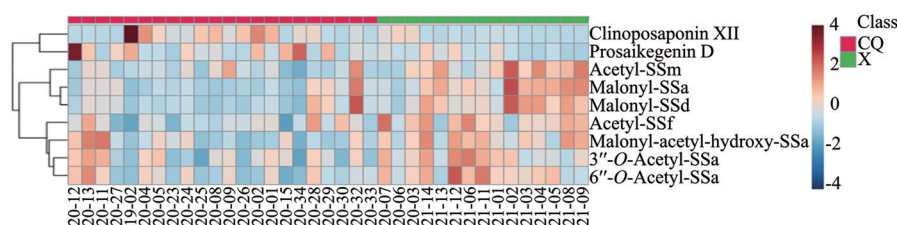


Figure 5 Heat map of different metabolites at different harvesting seasons (CQ: Spring and autumn; X: Summer)

Table 4 Differential metabolites between different harvesting seasons (FC: Fold change)

Name	FC	P
Malonyl-acetyl-hydroxy-SSa	1.471 7	0.015 3
Acetyl-SSf	1.307 7	0.004 6
Malonyl-SSa	1.808 8	0.009 4
3''-O-Acetyl-SSa	1.313 6	0.029 1
Acetyl-SSm	1.449 4	0.044 8
Malonyl-SSd	1.648 0	0.020 0
6''-O-Acetyl-SSa	1.380 4	0.006 8
Clinoposaponin XII	0.342 1	0.032 5
Prosaikengen D	0.383 4	0.009 9

关。25种柴胡皂苷之间呈现262组相关 ($P < 0.05$), 其中238个正相关, 24个负相关。可见, 25种皂苷之间正相关的数量远大于负相关的数量。

柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 是中国药典规定的质量控制指标成分, 柴胡皂苷 a 与柴胡皂苷 d 之间呈现极强的正相关 ($r = 0.84$)。此外, 柴胡皂苷 a 与羟基柴胡皂苷 a ($r = 0.88$)、柴胡皂苷 b1 ($r = 0.82$) 呈极强正相关, 与羟基柴胡皂苷 d ($r = 0.73$)、2''-O-乙酰基-柴胡皂苷 a ($r = 0.71$) 呈强正相关, 与柴胡皂苷 b3/柴胡皂苷 b4 ($r = 0.56$)、丙二酰基-柴胡皂苷 f ($r = 0.54$)、柴胡皂苷 IV ($r = 0.52$)、chinoposaponin XVIII ($r = 0.46$)、柴胡皂苷 f ($r = 0.45$) 呈现中等程度正相关; 柴胡皂苷 d 与柴胡皂苷 b1 ($r = 0.96$) 呈极强正相关, 与羟基柴胡皂苷 a ($r = 0.78$)、羟基柴胡皂苷 d ($r = 0.75$)、柴胡皂苷 IV ($r = 0.76$)、2''-O-乙酰基-柴胡皂苷 a ($r = 0.69$)、chinoposaponin XVIII ($r = 0.68$)、柴胡皂苷 b3/柴胡皂苷 b4 ($r = 0.6$) 呈强正相关, 与丙二酰基-柴胡皂苷 f ($r = 0.59$)、3''-O-乙酰基-柴胡皂苷 a ($r = 0.54$)、6''-O-乙酰基-柴胡皂苷 a ($r = 0.5$)、柴胡皂苷 X ($r = 0.43$) 等呈现中等程度正相关。因此, 按照《中国药典》2020年版方法, 测定柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的含量也可以间接反映羟基柴胡皂苷

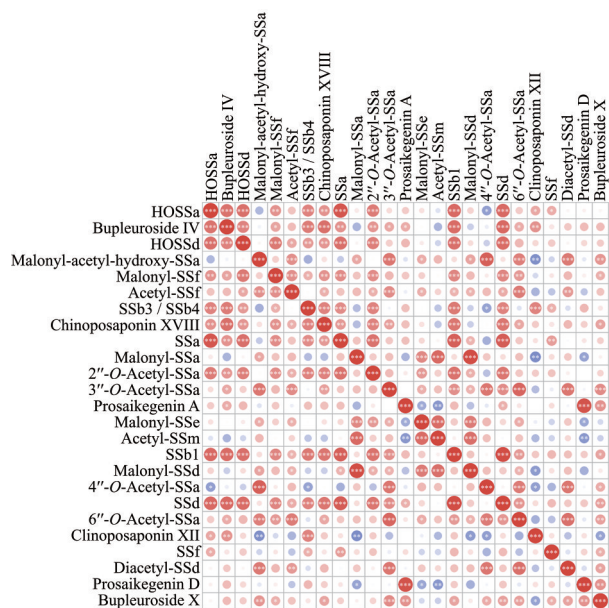


Figure 6 Correlation map of 25 saponins ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ between the two components being compared)

a、羟基柴胡皂苷 d、柴胡皂苷 b1、2''-O-乙酰基-柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b3/柴胡皂苷 b4、chinoposaponin XVIII、柴胡皂苷 IV、丙二酰基-柴胡皂苷 f 等成分的含量。

通过 (75 分位数-25 分位数)/中位数、(最大值-最小值)/中位数、标准偏差/平均值三种方法计算 25 种成分的变异系数 V_1 、 V_2 、 V_3 , 每种算法变异系数最大的前五个成分如表 5 所示, 其交集成分为: clinoposaponin XII、柴胡次皂苷 D、柴胡次皂苷 A、丙二酰基-柴胡皂苷 a, 说明这些成分的含量在不同样本中变异波动较大。

总结与讨论

皂苷是柴胡的重要活性成分, 本研究建立了基于 sMRM 的柴胡皂苷拟靶向代谢组学测定方法, 可同时

Table 5 Compounds with large variation (V_1 , V_2 and V_3 are the coefficient of variation calculated by three different calculation methods)

Name	V_1	Name	V_2	Name	V_3
Clinoposaponin XII	3.63	Clinoposaponin XII	20.51	Clinoposaponin XII	1.47
Prosaikengen D	1.99	Prosaikengen D	9.85	Prosaikengen D	1.12
Prosaikengen A	1.50	SSb3/SSb4	7.30	SSb3/SSb4	1.10
Malonyl-SSa	1.18	Prosaikengen A	6.30	Prosaikengen A	0.99
Bupleuroside IV	0.99	Malonyl-SSa	3.31	Malonyl-SSa	0.65

测定 25 种柴胡皂苷的相对含量。方法学验证表明, 所建立的方法具有较好的日间、日内精密性, 良好的线性、重复性和稳定性, 表明该方法稳定可靠, 可为柴胡皂苷类成分的全面系统检测分析提供依据。

采用所建立的方法, 对 37 批山西省内外采集的北柴胡样本中的皂苷类成分进行相对定量, 并比较了不同产地北柴胡中皂苷类成分的差异, 结果显示不同产地北柴胡中皂苷类成分组成和总量均没有明显差别。但是传统的春秋采收期与夏季采收的柴胡在皂苷类成分上存在一定差异, 部分皂苷类成分在夏季采收的柴胡中含量高于春秋采收的柴胡。相关性分析显示, 柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 与羟基柴胡皂苷 a、羟基柴胡皂苷 d 等皂苷类具有正相关, 可以间接反映它们的含量。变异系数分析表明, clinoposaponin XII、柴胡次皂苷 D 等 4 种成分在 37 批柴胡样本中含量变异较大, 可能影响柴胡质量的均一性。

有研究显示不同产地北柴胡化学一致性较高, 药材质量均一性较好^[18], 遗传因素对柴胡代谢物的影响大于产地环境因素^[19]。叶耀辉等^[20]也发现不同产地北柴胡的指纹图谱相似度极高, 北柴胡药材质量较为稳定。说明北柴胡生长适应力强, 受产地环境因素影响小, 适合广泛种植, 与本研究结果一致。《本草图经》中记载: 柴胡, 二月八月采根^[21]。自古以来, 柴胡通常在春秋两季采收。文献^[22,23]也报道柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 在 5 月、8 月含量最高。现代研究与古籍记载的传统采收经验有一定差异, 但最佳采收期的考量应该综合考虑柴胡中各种成分的含量变化规律, 另外, 是否皂苷成分含量越高就越适宜采收, 还需要从功效、毒性等角度进一步分析。

作者贡献: 白雪负责完成实验、数据处理及文章撰写; 郭雅璇、许爱玲参与部分实验工作; 秦雪梅参与柴胡样品品种的鉴定; 高晓霞、王晓民参与实验样本收集和实验指导; 李震宇负责整个研究工作的设计和指导, 以及对稿件的修改。

利益冲突: 本文的研究无任何利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Vol I (中华人民共和国药典 一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:315.
- [2] Huang HQ, Wang XH, Fu H, et al. Research progress on medicinal plant resources of *Bupleurum* L [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 2989-2996.
- [3] Zhang GX, Wang H, Liu Y, et al. Survey and analysis of cultivated *Bupleurum* spp. germplasm resources in China [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2021, 23: 772-780.
- [4] Yu ST, Qin XM, Li ZY. Quality assessment of Shuxuening injection based on widely targeted metabolomics approach [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 189: 113398.
- [5] Cao Y, Song YL, Li J. Effects of bear bile powder on bile acids pool in rats by widely targeted metabolomics [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2021, 36: 2670-2677.
- [6] Zhang J, Wu XF, Qiu JQ, et al. Comprehensive comparison on the chemical Profile of Guang Chen Pi at different ripeness stages using untargeted and pseudotargeted metabolomics [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68: 8483-8495.
- [7] Yan Y, Song QQ, Chen XJ, et al. Simultaneous determination of components with wide polarity and content ranges in *Cistanche tubulosa* using serially coupled reverse phase-hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2017, 1501: 39-50.
- [8] Song YL, Song QQ, Liu Y, et al. Integrated work-flow for quantitative metabolome profiling of plants, Peucedani Radix as a case [J]. Anal Chim Acta, 2017, 953: 40-47.
- [9] Zheng FJ, Zhao XJ, Zeng ZD, et al. Development of a plasma pseudotargeted metabolomics method based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Nat Protoc, 2020, 15: 2519-2537.
- [10] Guo MN, Liu SX, Zhao YM, et al. Analysis on chemical constituents in *Bupleuri Radix* by HPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2044-2052.
- [11] Lei TL, Chen SF, Wang K, et al. Characterization and discrimination of raw and vinegar-baked *Bupleuri Radix* based on UHPLC-Q-TOF-MS coupled with multivariate statistical analysis [J]. Biomed Chromatogr, 2018, 32: 10.
- [12] Zhu L, Liang ZT, Yi T, et al. Comparison of chemical profiles between the root and aerial parts from three *Bupleurum* species based on a UHPLC-QTOF-MS metabolomics approach [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17: 305.
- [13] Wang P, Gao XX, Gao Y, et al. Antiepileptic effect and mechanism of different parts of *Bupleuri Radix* by integrative pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 2024-2038.
- [14] Yin QC, Chen CC, Tian JS, et al. Analysis of serum pharmacokinetics from *Radix Bupleuri-Radix Paeoniae Alba* herb using UPLC-QE-Orbitrap-MS technology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 2296-2302.
- [15] Yang YJ, Zheng W, Guo JQ, et al. Comparative analysis on chemical constituents in *Bupleurum chinense*, *B. marginatum*, *B. marginatum* var. *stenophyllum* and *B. smithii* var. *parvifolium* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44: 332-337.
- [16] Xia ZD, Liu X, Tong LG, et al. Comparison of chemical constituents of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* and *Bupleurum chinense* DC. using UHPLC-Q-TOF-MS based on a metabolomics approach [J]. Biomed Chromatogr, 2021, 35: e5133.

- [17] Liu WX, Cheng XL, Kang R, et al. Systematic characterization and identification of saikosaponins in extracts from *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* Using UPLC-PDA-Q/TOF-MS [J]. *Front Chem*, 2021, 9: 747987.
- [18] Qin XM, Gao Y, Tian JS, et al. Ideas and strategies from quality evaluation of Radix Bupleurum for development of new anti-depressant drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1402-1408.
- [19] Qin XM. Study on Germplasm Resources of *Bupleurum chinense* DC. by Chemical and Genetic Analysis (北柴胡药材种植资源的化学与遗传分析) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2009.
- [20] Ye YH, Shi Y, Zhang BW, et al. Fingerprint analysis of *Bupleurum chinense* roots from different origins by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25: 124-129.
- [21] Zhao JC, Weng QQ, Zhang Y, et al. Textual research on Bupleuri Radix in Chinese classical prescriptions [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 697-703.
- [22] Duan YZ, Ke SY. Study on the content of saikosaponins and saikosaponin a, d of different parts from introduction *Bupleurum chinense* in various collecting periods [J]. *Chin Agric Sci Bull (中国农学通报)*, 2014, 30: 217-222.
- [23] Hou HP, Zhao SB, Yu KP, et al. Determination of six saikosaponins in *Bupleurum chinense* DC. samples collected from different producing areas at different harvest time with different processing methods [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1887-1893.