

• 药剂与工艺 •

基于 HPLC-ESI-MS 法续断发汗前后的成分分析

杜伟锋¹, 贾永强², 姜东京¹, 蔡宝昌^{1,3}

1. 浙江中医药大学 中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 311401
2. 中国医学科学院药物研究所 北京协和药厂, 北京 102600
3. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210046

摘要: 目的 建立高效液相色谱-电喷雾-质谱 (HPLC-ESI-MS) 分析续断发汗前后成分变化的方法。方法 HPLC 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~45 min, 6%~20% 乙腈; 45~90 min, 20%~35% 乙腈; 90~110 min, 35%~70% 乙腈; 110~120 min, 70% 乙腈; 柱温为 30 ℃, 体积流量为 0.8 mL/min; 质谱采用电喷雾离子源, 正负离子模式下全扫描检测, 并通过 $[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$ 、 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 等离子信息推断化合物。结果 建立了续断发汗前后的 HPLC-ESI-MS 图谱, 均得到 42 个色谱峰, 通过与对照品和文献对照, 推断出了 31 个化合物; 续断经产地加工发汗后, 有些成分的量下降, 如马钱苷酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、异绿原酸 B、续断苷 A、续断苷 B 等; 有些成分的量升高, 如茶茱萸苷、川续断皂苷 X、川续断皂苷 VI、川续断皂苷 VII、川续断皂苷乙、川续断皂苷 XIII、川续断皂苷 A 等; 其他成分的量几乎不变。结论 所建立的 HPLC-ESI-MS 图谱, 便于全面控制续断发汗与未发汗药材的质量。

关键词: 续断; 产地加工; 发汗; 高效液相色谱-电喷雾-质谱; 成分分析; 马钱苷酸; 绿原酸; 咖啡酸; 马钱苷; 续断苷; 茶茱萸苷; 川续断皂苷

中图分类号: R286.02; R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3251-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.007

Component analysis of crude and sweated *Dipsaci Radix* based on HPLC-ESI-MSDU Wei-feng¹, JIA Yong-qiang², JIANG Dong-jing¹, CAI Bao-chang^{1,3}

1. Research Center of Chinese Materia Medica Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China
2. Institute of Materia, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Medical Factory, Beijing 102600, China
3. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Materia Medica Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective A high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) method was developed for the component analysis of the crude and sweated *Dipsaci Radix*. **Methods** Analyses were carried out on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) column by gradient elution using (A) 0.1% aqueous formic acid and (B) acetonitrile. The column was maintained at 30 ℃, and the flow rate was 0.8 mL/min. Chemical characteristics of the crude and sweated *Dipsaci Radix* were analyzed by MS techniques with an ESI source, the quasi molecular ions of compounds in both negative and positive modes were observed for molecule mass information as $[M-H]^-$, $[M+HCOO]^-$, $[M+H]^+$, and $[M+Na]^+$. **Results** An HPLC-ESI-MS spectrum of the crude and sweated *Dipsaci Radix* was established with 42 peaks respectively, and the potential structures of 31 characteristic components were identified by study on the MS of compounds and comparing with reference data and some of standards. After being sweated, the contents of some components in *Dipsaci Radix* decreased, such as loganic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, loganin, isochlorogenic acid B, dipsanoside A, and dipsanoside B, but some ones increased, such as cantleyoside, dipsacoside X, dipsacoside VI, dipsacoside VII, dipsacoside B, dipsacoside XIII, and dipsacus saponin A. The amount of other ingredients are almost the same. **Conclusion** The HPLC-ESI-MS spectrum could comprehensively control the quality of the crude and sweated *Dipsaci Radix*.

收稿日期: 2014-06-06

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81303224)

作者简介: 杜伟锋 (1984—), 男, 河北任县人, 硕士, 助理研究员, 从事中药炮制及质量控制研究。

Tel: (0571)87195895 E-mail: duweifeng_200158@sohu.com

Key words: *Dipsaci Radix*; primary processing; sweated; HPLC-ESI-MS; component analysis; loganic acid; chlorogenic acid; caffeic acid; loganin; dipsanoside; cantleyoside; dipsacoside

续断 *Dipsaci Radix* 为川续断科多年生草本植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的根,因能“续折接骨”而得名。《滇南本草》记载:“补肝,强筋骨,定经络,止经中(筋骨)酸痛……”。临床上用于腰背酸痛、肢节痿痹、跌扑创伤、损筋折骨、胎动漏红、血崩、遗精、带下、痈疽疮肿。续断传统多采用“发汗”的产地加工方法^[1],“发汗”除了干燥目的外,还伴随着性状的变化,即药材内部变绿,此多是由于化学成分的变化引起的。相关学者研究发现,续断经产地加工发汗后,其水溶性浸出物和药效成分总皂苷及川续断皂苷 VI 均降低,因而对药材有无必要“发汗”持怀疑态度^[2-5]。本课题组前期比较了不同产地的发汗前后的续断,结果发现,经发汗加工后,续断中水溶性浸出物、醇溶性浸出物、总皂苷、绿原酸的量均有所降低,而川续断皂苷 VI 的量有所升高^[6-7]。然而仅凭这几种成分的变化难以阐明续断发汗的真正机制,应从续断经发汗产地加工后可能引起系列成分变化的角度,进行整体药材质量评价。本实验采用 HPLC-ESI-MS 建立了续断发汗前后的分析方法,并通过与对照品和质谱信息对照,对部分成分进行了指认,为全面评价续断发汗前后的药材质量奠定了基础。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱-6410 三重四极杆质谱联用仪,美国 Agilent 仪器公司; AG285 电子天平,0.01 mg, Mettler, Switzerland; KQ—500E 型超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

对照品:马钱苷酸(批号 111865-201102,质量分数 93.8%)、绿原酸(批号 110753-201314,质量分数 96.6%)、咖啡酸(批号 110885-200102,质量分数 100.0%)、马钱苷(批号 111640-201005,质量分数 99.2%)、川续断皂苷 VI(批号 111685-201003,质量分数 93.5%),购自中国食品药品检定研究院;川续断皂苷乙(批号 33289-85-9,质量分数 98.0%),购自成都曼思特生物技术有限公司; α -常春藤皂苷(批号 BW60211,质量分数 98.0%)、常春藤皂苷元(批号 BW6423,质量分数 98.0%),购自北京北研馨绿生物技术有限公司。甲醇、甲酸为分析纯;乙腈为色谱纯;水为娃哈哈纯净水。

续断样品采自四川西昌,经浙江中医药大学来

平凡教授鉴定为川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根;未发汗样品为续断经采集后于 80 ℃ 条件下烘干而成,发汗样品为续断采新后经产地发汗加工后而成。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取对照品(马钱苷酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、川续断皂苷乙、川续断皂苷 VI、 α -常春藤皂苷和常春藤皂苷元)各 1.5 mg 于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,制成质量浓度 0.15 mg/mL 的对照品混合溶液,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,备用。

2.2 样品处理

取过 80 目筛的样品粉末 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声(功率 100 W,频率 40 kHz)处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取上清液过 0.45 μ m 微孔滤膜,即得。

2.3 色谱条件

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱:0~45 min, 6%~20%乙腈;45~90 min, 20%~35%乙腈;90~110 min, 35%~70%乙腈;110~120 min, 70%乙腈;柱后平衡时间为 10 min;柱温为 25 ℃;体积流量 0.8 mL/min;检测波长 212 nm;进样量为 10 μ L。

2.4 质谱条件

Agilent 6410 三重四极杆质谱仪,离子源:电喷雾源(ESI);扫描范围: m/z 100~2 000;干燥气:氮气,体积流量 10 L/min;雾化气压力 103.44 kPa;干燥气温度 300 ℃;毛细管电压 4.0 kV;离子检测模式:全扫描检测;离子极性:正、负离子;扫描时间 0.5 s;碎裂电压 135 V;增加电压值 400 V。检测到续断主要的分子离子峰有 $[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$ 、 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 。

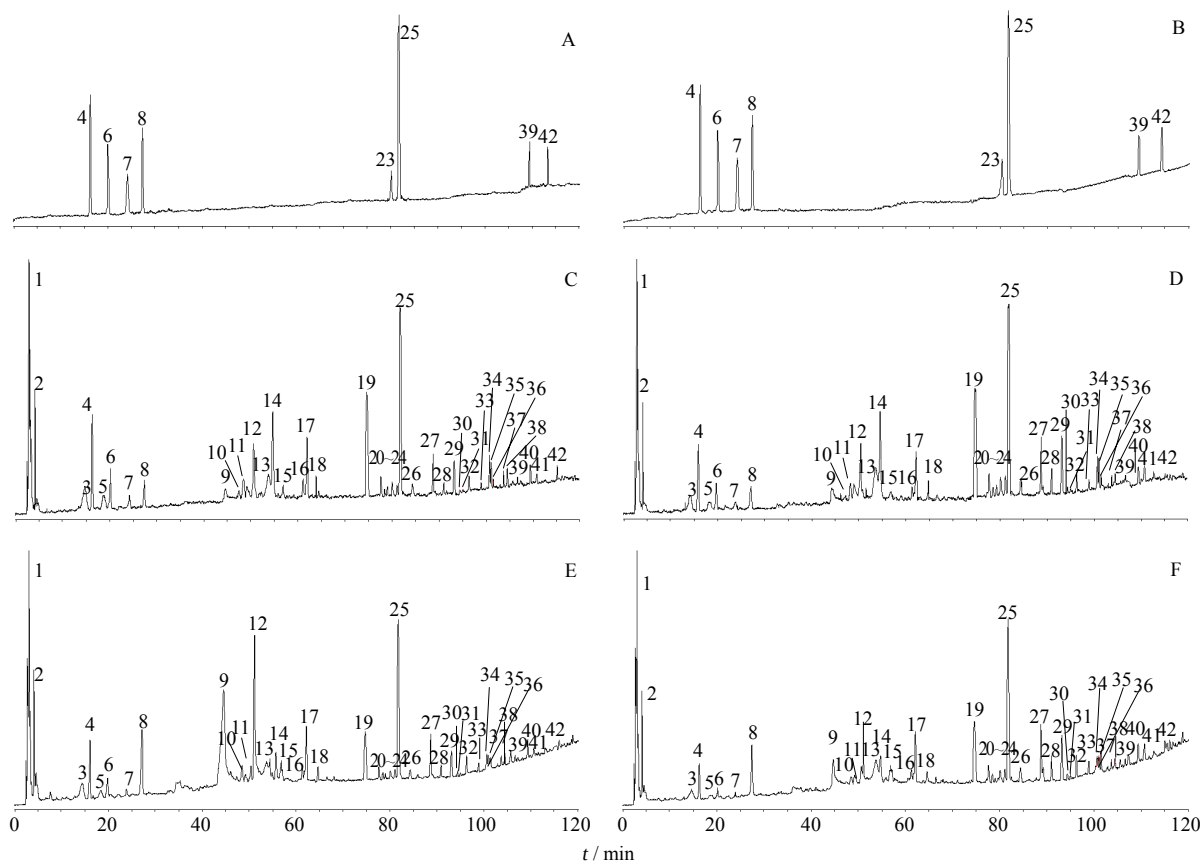
2.5 HPLC-ESI-MS 分析

将续断未发汗和发汗样品按照“2.2”项的方法制备溶液,采用“2.3”项和“2.4”项的方法进样分析,所得到的 HPLC-ESI-MS 图谱见图 1,各得到 42 个峰。

2.6 成分分析

通过质谱分析,得到了各个色谱峰在负离子模式下 ($[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$) 和在正离子模式下 ($[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$) 的质谱信息,进而来确定各个化合物的相对分子质量。通过与 8 个对照品的保留时间和质谱信息进行对照 (图 1),再结合文献信息,最终推断出了 31 个色谱峰所对应的化合物,结果见表 1。

从续断发汗前后成分比较中初步得知,续断发汗后,有些成分的量降低 (如马钱苷酸异构体、马钱苷酸、隐绿原酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、异绿原酸 B、续断苷 A、续断苷 B 等);有些成分的量升高 (如茶茱萸苷、川续断皂苷 X、川续断皂苷 VI、川续断皂苷 VII、川续断皂苷乙、川续断皂苷 VI 同分异构体、川续断皂苷 XIII、川续断皂苷 IV 同分异构体、川续断皂苷 A 等);其他成分的量几



4-马钱苷酸 6-绿原酸 7-咖啡酸 8-马钱苷 23-川续断皂苷乙 25-川续断皂苷 VI 39- α -常春藤皂苷 42-常春藤皂苷元
4-loganic acid 6-chlorogenic acid 7-caffeic acid 8-loganin 23-dipsacoside B 25-asperosaponin VI 39- α -hederin 42-hederagenin

图 1 8 个对照品的总离子流图 (A-负离子模式, B-正离子模式)、续断的负离子总离子流图 (C-未发汗样品, D-发汗样品) 和续断的正离子总离子流图 (E-未发汗样品, F-发汗样品)

Fig. 1 TIC of eight reference compounds (A-negative ion mode, B-positive ion mode), negative ion TIC of *Dipsaci Radix* (C-crude sample, D-sweated sample), and positive ion TIC of *Dipsaci Radix* (E-crude sample, F-sweated sample)

表 1 续断的 HPLC-ESI-MS 数据及化合物归属

Table 1 HPLC-ESI-MS data and compounds attribution of *Dipsaci Radix*

峰号	t_R / min	负离子模式		正离子模式		相对分子质量	分子式	化合物归属
		$[M-H]^-$	$[M+HCOO]^-$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$			
1	2.803							/
2	4.091							/
3	14.183	374.9			399.0	376	$C_{16}H_{24}O_{10}$	马钱苷酸异构体 ^[8]
4	15.908	374.9			399.0	376	$C_{16}H_{24}O_{10}$	马钱苷酸 ^{*[8]}

续表 1

峰号	t_R / min	负离子模式		正离子模式		相对分子质量	分子式	化合物归属
		$[\text{M}-\text{H}]^-$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$			
5	18.326	352.9		377.0		354	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	隐绿原酸 ^[9]
6	19.741	352.8		377.0		354	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	绿原酸 ^{*[9]}
7	23.759	178.9		203.0		180	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	咖啡酸 ^{*[10]}
8	27.096		434.9	413.0		390	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	马钱苷 ^{*[8]}
9	44.274	627.2						/
10	48.272	515.0		538.9		516	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	异绿原酸 B ^[11]
11	48.923	761.0		785.1				/
12	50.369	514.9		539.0		516	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	异绿原酸 A ^[11]
13	53.520	745.0		769.0		746	$\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_{19}$	茶茱萸苷 ^[8]
14	54.563	514.9		539.0		516	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	异绿原酸 C ^[11]
15	56.867	931.0		933.1				/
16	61.278	1 473.2		1 497.5	1 474	$\text{C}_{66}\text{H}_{90}\text{O}_{37}$		续断苷 A ^[12]
17	62.135	1 473.2		1 497.4	1 474	$\text{C}_{66}\text{H}_{90}\text{O}_{38}$		续断苷 B ^[12]
18	64.738	931.0		933.1				/
19	74.675	1 675.5		1 699.8	1 676	$\text{C}_{76}\text{H}_{124}\text{O}_{40}$		川续断皂苷 X ^[13]
20	77.692	1 235.4		1 259.4	1 236	$\text{C}_{59}\text{H}_{96}\text{O}_{27}$		川续断皂苷 VII ^[14]
21	78.529		973.2	951.3	928	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$		川续断皂苷 VI 同分异构体 ^[15]
22	79.066	648.2						/
23	80.150	1 073.3		1 097.4	1 074	$\text{C}_{53}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$		川续断皂苷乙 ^{*[16]}
24	81.132		973.1	951.3	928	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$		川续断皂苷 VI 同分异构体 ^[15]
25	81.762		973.1	951.3	928	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$		川续断皂苷 VI ^{*[15]}
26	84.365	1 659.5		1 683.4	1 660	$\text{C}_{76}\text{H}_{124}\text{O}_{39}$		川续断皂苷 XIII ^[17]
27	88.673		1 015.2	993.3	970	$\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$		川续断皂苷 IV 同分异构体 ^[18]
28	90.925		1 015.2	993.3	970	$\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$		川续断皂苷 IV 同分异构体 ^[18]
29	93.114		1 015.2	993.3	970	$\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$		川续断皂苷 IV 同分异构体 ^[18]
30	94.375		841.2	819.2	796	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$		川续断皂苷 A ^[19]
31	94.953		811.1	789.1	766	$\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{O}_{13}$		3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖-常春藤皂苷元-28-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 ^[20]
32	96.265		957.2	935.3	912	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{17}$		川续断皂苷 V ^[18]
33	98.845		1 057.2	1 035.2				/
34	100.645	1 351.5		1 375.4	1 352	$\text{C}_{64}\text{H}_{104}\text{O}_{30}$		川续断皂苷 IX ^[13]
35	101.007	1 219.4		1 243.5	1 220	$\text{C}_{59}\text{H}_{96}\text{O}_{26}$		川续断皂苷 XI ^[17]
36	101.513		1 057.2	1 035.4				/
37	103.682	911.2		935.3	912	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{17}$		灰毡毛忍冬次苷 D ^[20]
38	104.415	881.3		905.2				/
39	106.616		795.3	773.4		$\text{C}_{41}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$		α -常春藤皂苷 ^{*[20]}
40	109.425		649.1	627.2	604	$\text{C}_{35}\text{H}_{56}\text{O}_8$		3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖-常春藤皂苷元 ^[18]
41	110.686	473.1		497.2				/
42	112.690	471.1		495.2	472	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$		常春藤皂苷元 ^{*[21]}

*与对照品确认

*to confirm with reference

乎不变(如异绿原酸 A、异绿原酸 C、3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖-常春藤皂苷元-28-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、川续断皂苷 V、川续断皂苷 IX、川续断皂苷 XI、灰毡毛忍冬次苷 D、 α -常春藤皂苷、3-O- α -L-吡喃阿拉伯糖-常春藤皂苷元、常春藤皂苷元等)。尚未发现新增或消失的成分。也许正是这些变化的成分在影响着续断发汗前后的质量差异。

3 讨论

本实验采用液质联用方法,结合全扫描的离子检测模式,建立了续断发汗与未发汗样品的成分分析图谱,各得到了42个色谱峰,推断出了其中的31个化合物,较文献报道的多^[22],所得指纹图谱的成分信息量大,可用作续断“发汗”全面质量控制的评价依据。

本实验对影响分析方法建立的关键条件进行了考察。考察了流动相系统甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液,最终确定了乙腈-0.1%甲酸水溶液系统;考察了碎裂电压100、110、120、130、135、140、150 eV,最终选择了135 eV;考察了干燥气的体积流量6、8、10 L/min,最终选择了10 L/min;考察了雾化气压力68.96、103.44、137.92 kPa等,最终选择了103.44 kPa;考察了离子化温度250、300、350℃,最终选择了350℃。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 杨中林,刘双跃,秦民坚.不同加工方法对续断中 Akebia Saponin D 含量变化的影响[J].中医药信息,2000,17(1):16-17.
- [3] 佟志刚.续断中总皂苷的含量测定技术[J].健康必读(下旬刊),2011(3):308.
- [4] 汪霞.发汗与不发汗续断的比较研究[J].浙江中医杂志,2011,46(4):292-293.
- [5] 王初.发汗与不发汗续断中水溶性浸出物和川续断皂苷 VI 的比较[J].中草药,2007,38(6):865-866.
- [6] 金奇,来平凡,杜伟锋,等.“发汗”对续断质量的影响[J].中华中医药学刊,2011,29(12):2636-2638.
- [7] 杜伟锋,丛晓东,蔡宝昌.HPLC-ESI/MS法测定续断

“发汗”前后绿原酸和川续断皂苷 VI 的含量[J].药物分析杂志,2013,33(1):112-115.

- [8] Papalexandrou A, Magiatis P, Perdetzoglou D, et al. Iridoids from *Scabiosa variifolia* (Dipsacaceae) growing in Greece [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, 31(1): 91-93.
- [9] Kowalczyk A, Krzyzanowska J. Preliminary antifungal activity of some Dipsacaceae family plants [J]. *Herba Polonica*, 1999, 45(2): 101-105.
- [10] Kim S Y, Kwon Y S, Kim C M. Chemical constituents from *Dipsacus asper* [J]. *Saengyak Hakhoechi*, 1999, 30(4): 420-425.
- [11] Hung T M, Na M K, Thuong P T, et al. Cytotoxic saponins from the roots of *Dipsacus asper* Wall [J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28(9): 1053-1056.
- [12] 田小雁.四种中草药的活性成分研究[D].北京:中国协和医科大学,2006.
- [13] 张永文,薛智.川续断中皂苷 IX 和 X 的结构研究[J].药学学报,1992,27(12):912-917.
- [14] 张永文,薛智.川续断中的新三萜皂苷[J].药学学报,1991,26(12):911-917.
- [15] Kouno I, Tsuboi A, Nanri M, et al. Acylated triterpene glycoside from roots of *Dipsacus asper* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(1): 338-339.
- [16] Mukhamedziev M M, Alimbaeva P K. Triterpene glycosides of *Dipsacus azureus* [J]. *Chem Nat Compd*, 1969, 5(5): 451-452.
- [17] 张永文,薛智.川续断中皂苷 XI, XII, XIII 的结构研究[J].药学学报,1993,28(5):358-163.
- [18] 张永文,薛智.川续断的化学成分研究[J].药学学报,1991,26(9):676-681.
- [19] Young J K, Do J C, Son K H. Triterpene glycosides from the roots of *Dipsacus asper* [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(11): 1912-1916.
- [20] Young J K, Son K H, Do J C. Triterpenoids from the roots of *Dipsacus asper* [J]. *Arch Pharm Res*, 1993, 16(1): 32-35.
- [21] 魏慧芬,梁光义.川续断化学成分[J].中草药,1987,18(5):6-9.
- [22] 刘云飞,季德,张春风,等.HPLC-TOF/MS 归属续断指纹图谱中的化学成分[J].中国野生植物资源,2012,31(3):22-25.