

基于 UPLC-Triple-TOF/MS 分析续断“发汗”前后化学成分

洪智慧¹, 杜伟锋^{1,2,3*}, 杨莹¹, 康显杰^{2,3}, 洪浩¹, 朱伟豪¹, 葛志伟⁴, 李昌煜⁵, 葛卫红^{2,3}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 311401

3. 浙江中医药大学中药饮片有限公司, 浙江 杭州 311401

4. 浙江大学农业生命环境测试中心, 浙江 杭州 310058

5. 浙江中医药大学中医药科学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 通过超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱法 (UPLC-Triple-TOF-MS) 快速分析续断 *Dipsaci Radix* “发汗”前后的化学成分。方法 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, 体积流量为 0.8 mL/min, 检测波长 215 nm, 柱温为 25 °C; 质谱采用 UPLC-Triple-TOF 5600⁺ 飞行时间液质联用仪, 负离子模式下扫描检测, 扫描范围 *m/z* 100~1 500。根据高分辨质谱结合二级质谱所得的信息对续断“发汗”前后化学成分进行快速的鉴定。结果 根据化合物保留时间、质谱信息, 推测了续断“发汗”前后 52 个共有化学成分, 主要包括三萜皂苷类、环烯醚萜类、酚酸类等, 同时分析了主要成分的裂解规律。并比较了续断“发汗”前后化学成分的差异, 发现发汗后马钱苷酸、绿原酸、马钱苷、异绿原酸 A、川续断皂苷 VI 等 20 种成分含量降低, 咖啡酸、异绿原酸、异绿原酸 C、大花双参苷 A 等成分含量在发汗后升高。结论 研究发现续断“发汗”前后化学成分种类上无明显差异, 而在成分含量上存在一定差异, 未“发汗”续断化学成分含量普遍高于“发汗”续断。本实验采用 UPLC-Triple-TOF-MS 技术分析“发汗”对续断的化学成分的影响, 为探究续断“发汗”前后化学成分物质基础和进一步为续断产地加工方式的研究提供理论依据。**关键词:** 续断; 发汗; 超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱法; 三萜皂苷; 环烯醚萜; 酚酸; 马钱苷酸; 绿原酸; 马钱苷; 异绿原酸 A; 川续断皂苷 VI; 咖啡酸; 异绿原酸; 异绿原酸 C; 大花双参苷 A

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1233-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.020

Analysis of components of crude and sweated *Dipsaci Radix* by UPLC-Triple-TOF/MS

HONG Zhi-hui¹, DU Wei-feng^{1,2,3}, YANG Ying¹, KANG Xian-jie^{2,3}, HONG Hao¹, ZHU Wei-hao¹, GE Zhi-wei⁴, LI Chang-yu⁵, GE Wei-hong^{2,3}

1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Research Center of TCM Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China

3. Chinese Herbal Pieces Co., Ltd., Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China

4. Analysis Center of Agrobiological and Environmental Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

5. Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To establish a quick method of ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Triple-TOF/MS) for the analysis of components of crude and sweated *Dipsaci Radix*. **Methods** The separation was performed on the chromatographic column of Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), and the mobile phase was 0.1% formic acid solution-methanol, with a gradient elution at a flow rate of 0.8 mL/min, the detection wavelength was 215 nm, the column temperature was 25 °C. UPLC-Triple-TOF 5600⁺ time of flight liquid and mass spectrometer was used for mass spectrometry.

收稿日期: 2019-10-05

基金项目: 国家重点研发计划: 中药饮片质量识别关键技术研究 (2018YFC1707001); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-H-ZY-45); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (QNRC2-C12); 浙江省药监局委托产地加工项目 (ZJ-197505-1); 浙江中医药大学校级重点项目 (2019ZZ10); 象山县科技计划项目

作者简介: 洪智慧 (1994—), 女, 在读研究生, 从事中药炮制及中药药理研究。Tel: 15757196242 E-mail: 852505652@qq.com

***通信作者** 杜伟锋 (1984—), 男, 河北任县人, 副研究员, 从事中药炮制及质量控制研究。

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

Electrospray ion source negative ion mode was adopted, and the scanning range was m/z 100—1 500. The components of crude and sweated *Dipsaci Radix* were quickly identified according to the information obtained by high-resolution mass spectrometry combined with secondary mass spectrometry. **Results** Fifty-two common components were identified or tentatively characterized based on the retention time and MS spectra. They were triterpenoid saponins, iridoids, phenolic acids etc. The crack rules of primary components were also analyzed. And comparing the components of crude and sweated *Dipsaci Radix*, it showed that the content of 20 components such as loganin acid, chlorogenic acid, loganin, isochlorogenic acid A, and asperosaponin VI was decreased after sweating, and caffeic acid, isochlorogenic acid, isochlorogenic acid C, and triplastoside A was increased. **Conclusion** The types of components of crude and sweated *Dipsaci Radix* are identical, but there are differences in the content of the components. The content of the components of crude are higher than the sweated *Dipsaci Radix*. UPLC-Triple-TOF-MS technology was used to analyze the influence of “sweating” on the chemical composition of the *Dipsaci Radix*, so as to provide a theoretical basis for the study of the chemical constituents of sweated *Dipsaci Radix* and further research on the origin processing of *Dipsaci Radix*.

Key words: *Dipsaci Radix*; sweating; UPLC-Triple-TOF-MS; triterpenoid saponins; iridoids; phenolic acids; loganin acid; chlorogenic acid; loganin; isochlorogenic acid A; asperosaponin VI; caffeic acid; isochlorogenic acid; isochlorogenic acid C; triplastoside A

续断又名接骨草、龙豆、和尚头、鼓锤草，为川续断科川续断属植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的根^[1]，具有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏的作用，道地产区主要分布在四川省攀枝花及西昌一带。现代药理研究表明，续断具有镇痛、抗炎、抗凝血、抗氧化、调节免疫等作用^[2-4]。续断始载于《神农本草经》，被列为上品，其传统产地初加工方法为去芦头、根头及须根，用微火烘至半干，堆置“发汗”至内部变绿色时，再烘干。《中国药典》2015 年版规定，续断采用“发汗”的产地加工方法^[1]。近年来，市场上存在使用没有发汗或未发汗完全的续断药材，并且其颜色和性状与发汗完全的续断药材存在很大的区别^[5]。目前“发汗”机制尚不明确^[6]，续断“发汗”的研究较少，且主要集中在“发汗”对续断某一类成分的影响^[7-11]。因此，全面研究“发汗”对续断化学成分的影响具有重要意义。本实验采用 UPLC-Triple-TOF-MS 技术分析“发汗”前后续断的化学成分，探究了产地加工“发汗”对续断化学成分的影响，为探究续断“发汗”前后化学成分物质基础提供依据，并为全面评价续断发汗前后的药材质量奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

UPLC-Triple-TOF/MS 系统：AcquityTM ultra 型高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；Triple TOF 5600+型飞行时间质谱，配有电喷雾离子源，美国 AB SCIEX 公司；Eppendorf Minispan 离心机，德国 Eppendorf 公司。

1.2 试药

续断药材购自四川西昌（批号 180709），经由浙江中医药大学来平凡教授鉴定为川续断科川续断

属植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根；未“发汗”样品为续断采收后直接晒干而成，发汗样品为续断采收后除去根头和须根，用微火烘至半干，堆置“发汗”至内部变绿色时，再烘干^[1]，发汗和未发汗样品均由同一批续断药材制得。乙腈和甲酸为色谱纯，Merck 公司；水为 Milli-Q 超纯水，其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 供试品溶液制备

分别取过 80 目筛的续断“发汗”品和未“发汗”品粉末各 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 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.2 液相条件

UPLC-Triple-TOF 5600+飞行时间液质联用仪；色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)；流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，线性梯度洗脱：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 25 $^{\circ}\text{C}$ ，体积流量为 0.8 mL/min；紫外检测波长为 215 nm；进样量为 10 μL 。

2.3 质谱条件

UPLC-Triple-TOF 5600+飞行时间液质联用仪；负离子扫描模式；扫描范围 m/z 100~1 500；雾化气 (GS1)：344.738 kPa (50 psi)；雾化气 (GS2) 344.738 kPa (50 psi)；气帘气 (CUR)：241.317 kPa (35 psi)；离子源温度 (TEM) 550 $^{\circ}\text{C}$ ；离子源电压 (IS) -4 500 V；一级扫描：去簇电压 (DP) 100

V; 聚焦电压(CE)10 V; 二级扫描: 使用 TOF MS~Product Ion~IDA 模式采集质谱数据; CID 能量 20、40、60 V; 进样前, 用 CDS 泵做质量轴校正, 使质量轴误差小于 2×10^{-6} 。

3 结果与分析

3.1 续断“发汗”前后化合物结果分析

续断“发汗”前后供试品溶液在“2.2”和“2.3”项色谱及质谱条件下, 分析出续断“发汗”前后样品 UPLC-Triple-TOF/MS 的总离子流图, 见图 1。课题组前期研究通过对照品比对, 指认了其中 8 个成分(马钱苷酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、川续断皂苷 VI^[12])。根据液质碎片离子峰信息, 并比对数据库及文献, 共得到 52 种化学成分, 结果见表 1。

3.2 化合物结构分析

通过查阅国内外续断及其同科属化学成分研究的相关文献, 并借助 Scifinder 和 Reaxys 数据库, 收集整理了续断中各类化学成分。利用液质联用仪采集数据后, 提取各色谱峰的质谱图, 根据准分子离子 $[M-H]^-$ 和加荷离子 $[M+HCOO]^-$ 信息判断得到的一级质谱精确相对分子质量, 通过 Peakview 1.2 软件在 5×10^{-6} 的质量偏差范围内拟合分子式, 比对文献数据库, 完成各色谱峰初步推测。从二级质谱中获得化合物相应的碎片离子及其信息, 结合碎片离子的裂解情况和数据库比对进一步推测化学成分。

3.2.1 酚酸类 化合物 4 ($t_R=20.41$ min) 在负离子模式下 m/z 353.088 1 $[M-H]^-$, 质谱软件计算出精确分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 观察二级质谱离子碎片, 化合物主要碎片离子为 m/z 191.055 5 $[M-H-caffeoyl]^-$, 与课题组前期对照品比对研究^[12]及文献数据^[15]比对, 鉴定该化合物为绿原酸。

化合物 14、15、17 TOF/MS 均给出分子离子峰 m/z 515.119 5, 质谱软件计算出精确分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$, 与文献报道的异绿原酸类分子式一致, 再根据其主要二级碎片离子裂解规律, 与课题组前期对照品比对研究^[12]及文献数据^[14]比对, 鉴定化合物 14、15、17 分别为异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C。本实验列举异绿原酸 B 裂解途径见图 2。

3.2.2 环烯醚萜苷类 根据文献报道^[14,16]续断提取物中含有獐牙菜苷、林生续断苷 I、茶茱萸苷等类成分, 根据化合物 7、12、16 二级质谱离子碎片分析, 推测结构中均存在葡萄糖结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 推测化合物峰 7、12、16 分别为獐牙菜苷、林生续断苷 I、茶茱萸苷。

化合物 6 ($t_R=26.42$ min) 在负离子模式下 m/z 435.151 3 $[M+HCOO]^-$, 质谱软件计算出精确分子式为 $C_{17}H_{26}O_{10}$, 观察二级质谱离子碎片, 化合物主要碎片离子为 m/z 227.092 3、127.039 9、101.025 3, 课题组前期对照品比对研究^[12]及文献数据^[14]比对, 鉴定该化合物为马钱苷, 推测其裂解途径见图 3。

3.2.3 皂苷类 续断皂苷类成分均属于五环三萜类

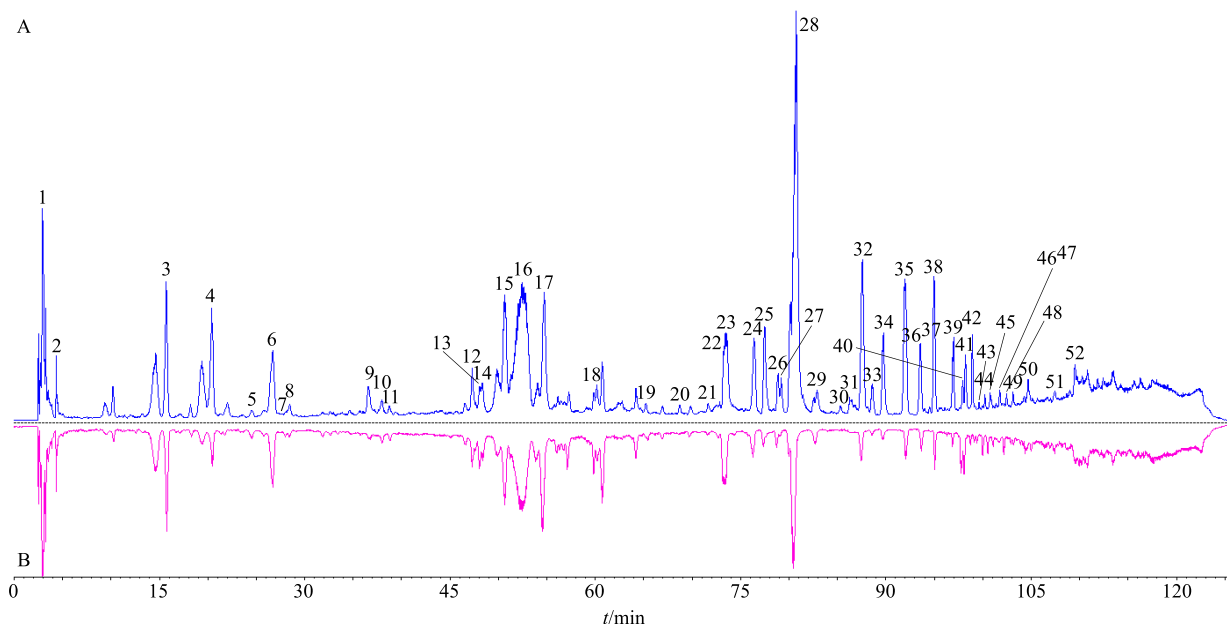


图 1 续断“发汗”前 (A)、后 (B) 样品 UPLC-Triple-TOF/MS 负离子模式下的总离子流图
Fig. 1 UPLC-Triple-TOF/MS total ion chromatogram of crude (A) and sweated (B) *Dipsaci Radix* in negative mode

表 1 续断“发汗”前后化学成分分析

Table 1 Identification analysis of components of crude and sweated *Dipsaci Radix*

峰号	t_R/min	离子峰	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	分子式	误差/ ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)	化合物归属
1	2.96	$[\text{M}-\text{H}]^-$	341.109 5	341.108 9	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	1.76	119.034 1, 101.024 6, 89.025 3, 85.028 2, 71.014 9, 59.017 0, 58.008 0	蔗糖 ^[13]
2	4.34	$[\text{M}-\text{H}]^-$	290.088 4	290.088 1	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_8$	1.03	128.035 2, 84.045 8	α -D-glucopyranose, 2-[(3-carboxy-1-oxo-3-buten-1-yl) amino]-2-deoxy
3	15.67	$[\text{M}-\text{H}]^-$	375.129 9	375.129 7	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	0.53	375.130 2, 373.946 2, 215.019 6, 213.076 1, 169.086 1, 151.076 1, 113.023 3	马钱酸 ^[14]
4	20.41	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.088 1	353.087 8	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	0.85	353.089 4, 191.055 5, 190.450 4, 190.456 0, 135.045 0	绿原酸 ^[12,15]
5	24.55	$[\text{M}-\text{H}]^-$	179.035 2	179.035 0	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	1.12	135.045 4, 134.036 8, 132.025 3, 89.039 3, 79.055 5	咖啡酸 ^[14]
6	26.42	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	435.151 3	435.150 8	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	1.15	227.092 3, 127.039 9, 101.025 3	马钱苷 ^[12,14]
7	26.70	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	403.124 6	403.124 6	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$	0.00	151.072 8, 125.022 7, 125.033 0, 89.026 4, 81.035 1, 71.014 0	獐牙菜苷 ^[14,16]
8	28.47	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	535.167 7	535.168 8	$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	-2.06	489.166 8, 191.056 3, 151.076 3, 149.042 9, 125.023 4, 81.035 8	月腺大戟苷 C
9	36.58	$[\text{M}-\text{H}]^-$	359.134 7	359.134 8	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_9$	-0.28	359.132 3, 197.078 7, 153.090 9, 135.081 1, 59.015 4	7-脱氧马钱苷酸 ^[14]
10	37.96	$[\text{M}-\text{H}]^-$	535.182 8	535.182 1	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	1.31	373.130 8, 343.117 4, 284.104 1, 269.080 9, 254.057 0, 193.049 3, 163.038 5, 149.024 2, 148.015 0	1-羟基松脂醇-4'- β -D-葡萄糖苷
11	38.75	$[\text{M}-\text{H}]^-$	733.258 8	733.256 1	$\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_{19}$	3.68	733.263 6, 571.210 0, 513.169 0, 471.153 3, 375.131 7, 295.120 6, 213.078 8, 195.066 6, 151.075 9, 81.034 6	林生续断苷 I 衍生物 ^[14]
12	47.29	$[\text{M}-\text{H}]^-$	747.274 0	747.271 7	$\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{O}_{19}$	3.08	747.284 4, 586.226 7, 585.223 0, 497.169 4, 485.169 4, 459.153 3, 375.129 8, 357.120 4, 297.097 5, 227.092 0, 195.065 1, 125.023 7	林生续断苷 I ^[14,16]
13	48.07	$[\text{M}-\text{H}]^-$	761.253 0	761.251 0	$\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_{20}$	2.63	761.258 4, 581.190 9, 567.172 6, 581.190 9,	tricoloroside
14	48.34	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.119 1	515.119 5	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	-0.78	353.087 7, 191.055 5, 179.033 9, 173.044 7, 135.044 8, 93.034 9	异绿原酸 B ^[12,14]
15	50.66	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.119 3	515.119 5	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	-0.39	515.123 3, 353.088 9, 191.055 9, 179.034 6	异绿原酸 A ^[12,14]
16	52.50	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	791.264 1	791.261 5	$\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{O}_{19}$	3.29	583.209 8, 513.164 8, 459.154 2, 373.115 4, 297.098 3, 209.081 6, 141.019 6	茶茱萸苷 ^[14,16]
17	54.71	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.118 9	515.119 5	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	-1.16	353.087 8, 191.056 1, 179.034 8, 173.045 4, 135.045 4, 93.035 5	异绿原酸 C ^[12,14]
18	60.17	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	837.306 2	837.303 4	$\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_{20}$	3.34	791.301 7, 629.248 0, 495.151 6, 419.155 7, 393.119 0, 239.091 8, 209.080 5, 141.018 4, 101.025 9	大花双参甙 A ^[14]
19	65.23	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	987.484 1	987.480 6	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{19}$	3.54	941.486 0, 617.373 9, 571.368 0	赤芍苷 B
20	68.72	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	989.497 4	989.496 3	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	1.11	989.505 7, 943.498 2, 620.389 8, 619.388 7, 619.322 3, 487.345 8, 323.096 9, 263.076 9, 143.035 4	齐墩果酸-12-烯-28-油酸, 3-(α -L-阿拉伯吡喃糖)-16,23-二羟基-6-O- β -D-吡喃葡萄糖- β -D-吡喃葡萄糖酯
21	71.65	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 003.513 0	1 003.511 9	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{19}$	1.10	957.513 9, 633.404 9, 631.363 9, 471.346 8, 323.096 1, 179.055 1, 71.013 3	葡萄糖苷 A
22	73.18	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 721.768 1	1 721.765 1	$\text{C}_{76}\text{H}_{124}\text{O}_{40}$	1.74	1 352.671 6, 1 351.669 8, 1 205.608 4, 750.457 0, 749.454 3, 603.393 5, 471.349 5, 323.097 9, 221.066 6	川续断皂苷 X ^[17]
23	73.57	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 219.612 0	1 219.611 7	$\text{C}_{59}\text{H}_{96}\text{O}_{26}$	0.25	1 220.627 8, 1 219.625 3, 1 073.565 1, 911.504 4, 845.471 9, 749.453 9, 603.393 6, 471.347 3, 305.085 1, 143.036 8, 73.032 1	川续断皂苷 B ^[18]
24	76.36	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 235.606 2	1 235.606 6	$\text{C}_{59}\text{H}_{96}\text{O}_{27}$	-0.32	912.512 1, 911.510 2, 750.457 8, 749.452 4, 604.395 4, 603.391 9, 585.380 5, 472.351 9, 471.347 8, 423.325 4, 323.097 6, 119.035 2, 89.026 2	川续断皂苷 VII ^[18]
25	77.48	$[\text{M}-\text{H}]^-$	927.496 3	927.495 9	$\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{O}_{18}$	0.43	927.505 5, 603.392 4, 323.097 8	mazusaponin I
26	78.86	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 073.553 9	1 073.553 8	$\text{C}_{53}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$	0.09	1 073.564 6, 749.453 3, 323.097 0	川续断皂苷乙 ^[14]

续表 1

峰号	<i>t_R</i> /min	离子峰	实测值 (<i>m/z</i>)	理论值 (<i>m/z</i>)	分子式	误差/ (×10 ⁻⁶)	二级质谱 (<i>m/z</i>)	化合物归属
27	79.18	[M-H] ⁻	927.495 0	927.495 9	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	-0.97	927.505 8, 604.398 9, 603.451 4, 603.393 7, 323.098 2, 179.054 7	medicoside F
28	80.72	[M+HCOO] ⁻	973.501 2	973.501 4	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	-0.21	927.505 1, 603.392 7, 323.098 8, 179.056 1	川续断皂苷 VI ^[12,15,19]
29	82.60	[M-H] ⁻	941.475 8	941.475 2	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉	0.64	941.486 8, 747.435 7, 617.371 0, 423.326 6, 323.097 3, 89.024 0	chionacoside B
30	85.32	[M-H] ⁻	969.507 9	969.507 6	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₉	0.31	969.512 4, 645.402 7, 323.096 9,	乙酰基川续断皂苷 VI ^[15]
31	86.31	[M-H] ⁻	925.481 4	925.480 2	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈	1.30	925.490 2, 601.376 0, 599.441 6, 323.096 2, 263.075 8, 179.056 9, 119.033 1	去氢川续断皂苷 VI
32	87.57	[M-H] ⁻	969.506 3	969.506 5	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₉	-0.21	969.516 5, 646.403 9, 645.404 5, 603.303 9, 323.097 1, 179.055 3, 119.035 6	4'- <i>O</i> -乙酰基川续断皂苷 VI ^[15,19]
33	88.61	[M+HCOO] ⁻	1 056.539 6	1 056.538 5	C ₅₁ H ₈₁ NO ₁₉	1.04	1 010.545 8, 927.507 6, 686.432 1, 603.393 3, 323.097 9, 179.055 9	川续断皂苷 VI 4-氨基-2-丁烯酸衍生物
34	89.73	[M-H] ⁻	969.508 1	969.506 5	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₉	1.65	969.514 1, 645.403 0, 323.096 6	2'- <i>O</i> -乙酰基川续断皂苷 VI ^[15,19]
35	91.98	[M-H] ⁻	969.506 9	969.506 5	C ₄₉ H ₇₈ O ₁₉	0.41	969.516 5, 645.404 3, 323.098 0, 221.065 7	3'- <i>O</i> -乙酰基川续断皂苷 VI ^[15,19]
36	93.56	[M+HCOO] ⁻	811.449 4	811.448 5	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	1.11	603.393 2	HN-saponin F ^[14]
37	93.56	[M+HCOO] ⁻	841.459 6	841.459 1	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	0.59	795.453 1, 471.347 6, 323.096 2, 221.066 2, 119.035 0	dipsacussaponin A ^[14]
38	94.98	[M+HCOO] ⁻	957.509 2	957.506 5	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	2.82	911.510 8, 588.400 9, 587.398 2, 587.266 5, 323.097 2, 221.067 1	川续断皂苷 V ^[20]
39	96.95	[M+HCOO] ⁻	1 057.524 5	1 057.522 5	C ₅₁ H ₈₀ O ₂₀	1.89	1 057.541 7, 1 011.526 9, 688.417 9, 687.415 4, 645.402 0, 365.109 8, 323.097 0, 179.055 5, 89.024 5	asperosaponin B 异构体
40	97.94	[M-H] ⁻	1 351.657 1	1 351.654 0	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₃₀	2.29		dipsacussaponin C ^[14]
41	98.22	[M-H] ⁻	1 219.615 2	1 219.611 7	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₆	2.87	1 219.630 5, 1 073.572 0, 749.458 0, 603.395 3, 471.351 3	dipsacussaponin B 异构体
42	98.93	[M+HCOO] ⁻	1 057.525 3	1 057.522 5	C ₅₁ H ₈₀ O ₂₀	2.65	1 011.528 6, 688.420 4, 687.414 4, 323.097 0	asperosaponin B ^[14]
43	99.62	[M-H] ⁻	1 057.559 4	1 057.558 9	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₁	0.47	1 057.570 5, 911.505 8, 749.450 6, 603.392 4, 471.346 5	dipsacussaponin R ^[21]
44	100.23	[M-H] ⁻	911.502 7	911.501 0	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	1.87	912.513 5, 911.510 2, 908.562 1, 749.454 5, 731.442 8, 603.393 2, 541.353 3, 471.348 7, 423.326 5, 127.039 8, 59.017 7	灰毡毛忍冬次苷 A ^[22]
45	100.78	[M-H] ⁻	881.491 3	881.490 4	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₆	1.02	881.498 9, 749.454 9, 731.449 5, 603.393 5, 585.380 3, 471.347 1	dipsacussaponin N
46	101.76	[M+HCOO] ⁻	663.374 9	663.375 0	C ₃₅ H ₅₄ O ₉	-0.15	663.386 0, 617.374 7, 485.330 2, 453.303 5, 131.033 6	齐墩果酸-11,13(18)-乙烯-28-油酸 3, 16,23-三羟基- α - <i>L</i> -阿拉伯吡喃糖酯
47	101.76	[M-H] ⁻	1 203.618 9	1 203.616 8	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₅	1.74	1 204.610 7, 1 203.631 1, 1 057.567 1, 877.500 1, 733.457 8, 587.393 5, 455.348 6	齐墩果酸-12-烯-28-油酸,3-[(<i>O</i> -6-脱氧- α - <i>L</i> -吡喃甘露-(1→6)- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖-(1→4)- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖-(1→3)- <i>O</i> -6-脱氧- α - <i>L</i> -吡喃甘露-(1→2)- α - <i>L</i> -阿拉伯吡喃糖)]
48	102.46	[M-H] ⁻	749.447 0	749.448 2	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	-1.60	749.455 7, 603.394 3, 471.349 4, 423.327 5	α -常春藤皂苷 ^[22]
49	103.14	[M+HCOO] ⁻	649.395 4	649.395 7	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	-0.46	603.396 3, 603.337 1	秋水仙素 A
50	104.68	[M-H] ⁻	603.389 1	603.390 2	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	-1.82	603.392 7, 601.485 8, 601.457 9, 471.341 3	木通皂苷 PA ^[14]
51	107.44	[M-H] ⁻	471.310 3	471.311 6	C ₂₉ H ₄₄ O ₅	-2.76		常春藤皂苷元 ^[14]
52	109.55	[M-H] ⁻	265.146 9	265.147 9	C ₁₂ H ₂₆ SO ₄	-3.77	96.959 9, 95.952 0, 79.957 9	硫酸十二烷基酯

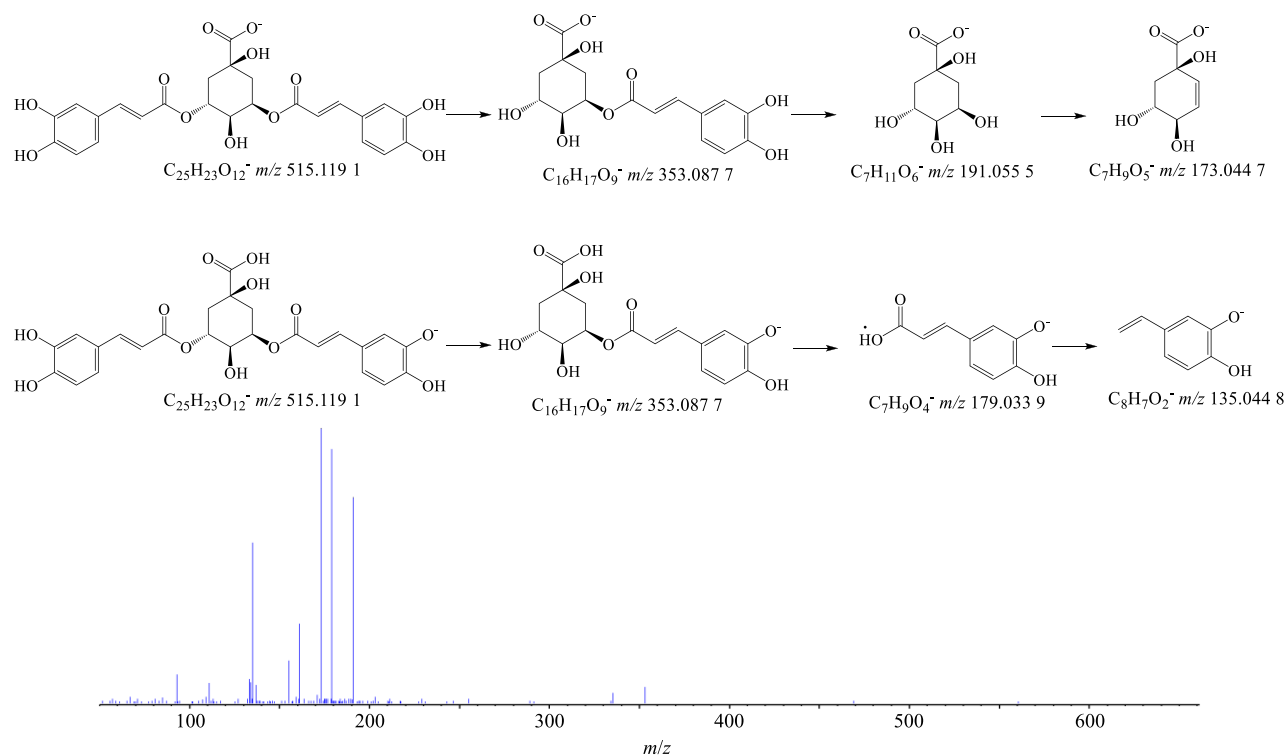


图 2 异绿原酸 B 质谱裂解过程

Fig. 2 Detail fragmentation pathway of isochlorogenic acid B

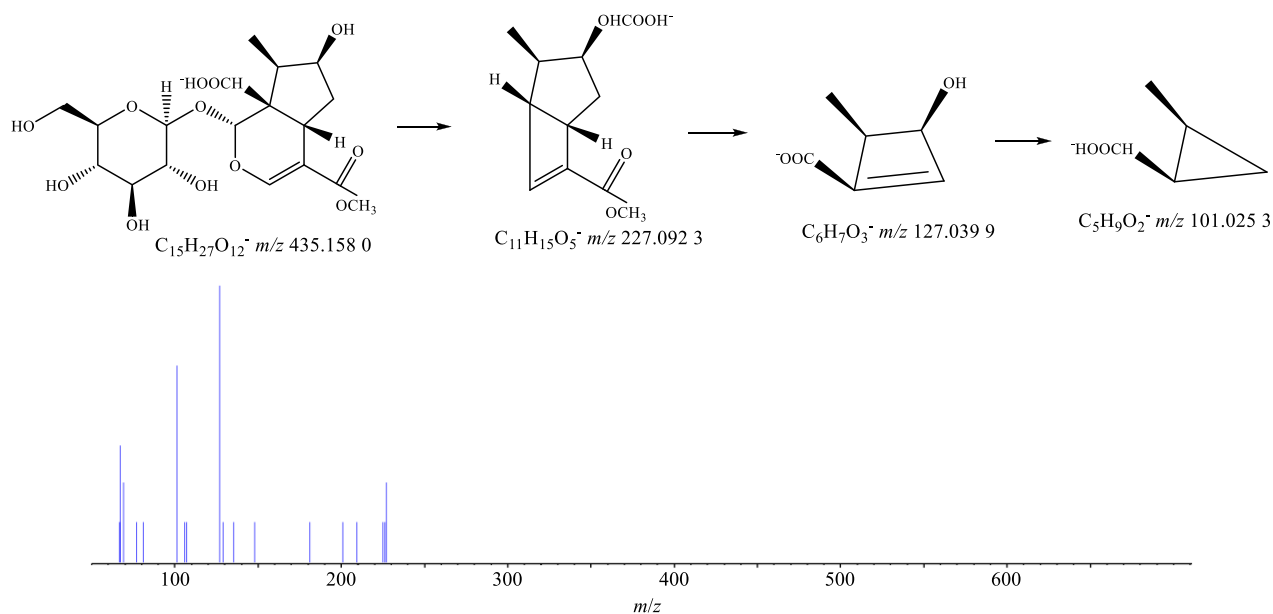


图 3 马钱苷质谱裂解过程

Fig. 3 Detail fragmentation pathway of loganin

齐墩果烷型衍生物，苷元多数为常春藤皂苷元，少数为齐墩果酸皂苷元^[18]，皂苷中含有葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖等糖链结构，在裂解过程中呈现出易脱去糖链的规律。

化合物 **23**、**24** 在一级质谱中 $[M-H]^-$ 丰度较高，质谱软件计算出精确分子式为 $C_{59}H_{96}O_{26}$ ，观察

二级质谱离子碎片，均存在 m/z 471.347 8，可能为常春藤皂苷元，结合其他碎片离子峰，推测结构中存在葡萄糖和鼠李糖结构。根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索，推测化合物 **23**、**24** 分别为川续断皂苷 B 和川续断皂苷 VII，与文献报道一致^[18]。

化合物 **26** ($t_R=78.86$ min) 在负离子模式下

m/z 1 073.553 9 $[M-H]^-$, 质谱软件计算出精确分子式为 $C_{53}H_{86}O_{22}$, 观察二级质谱离子碎片, 化合物主要碎片离子为 m/z 1 073.564 6、749.453 3、323.097 0,

通过 Scifinder 及 Reaxys 数据库检索, 鉴定该化合物为川续断皂苷乙, 与文献报道一致^[14], 推测其裂解途径见图 4。

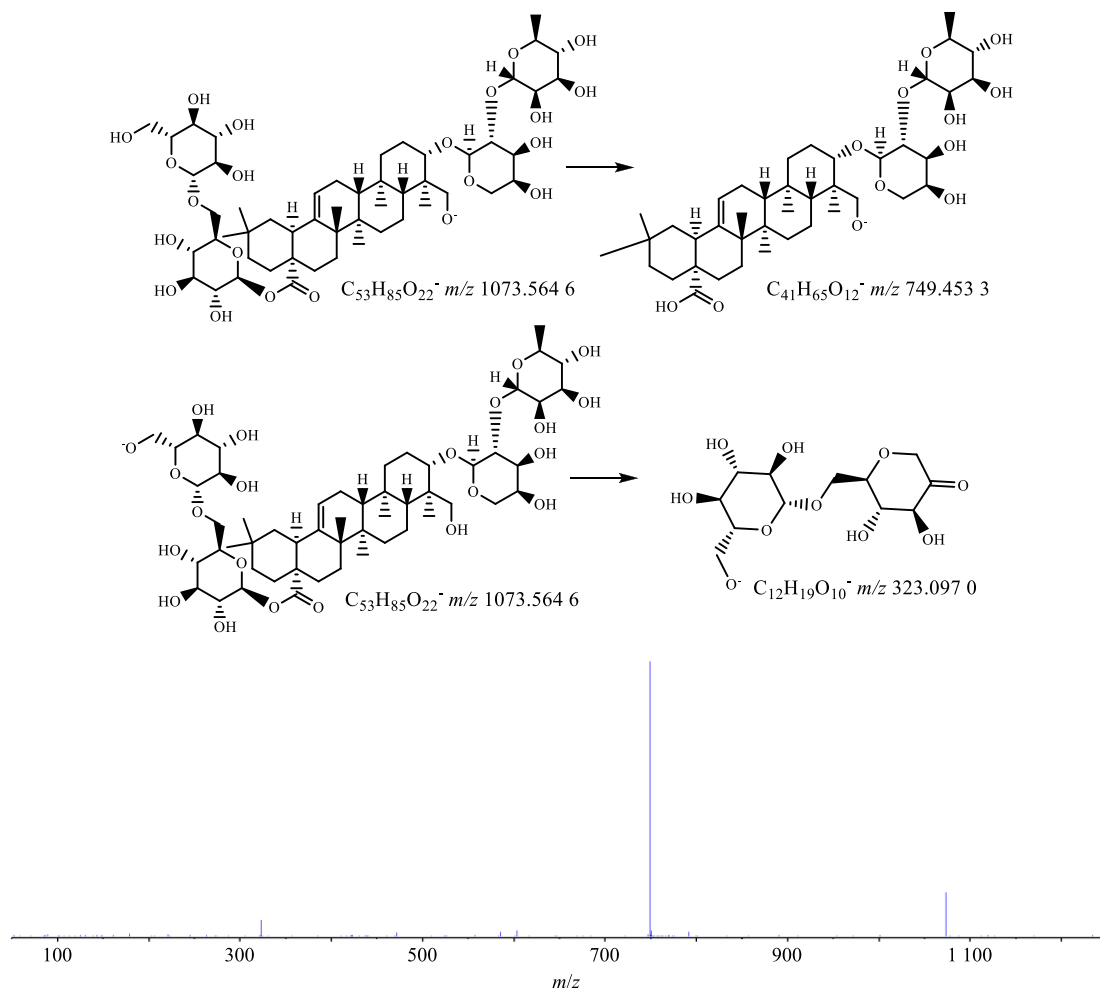


图 4 川续断皂苷乙质谱裂解过程

Fig. 4 Detail fragmentation pathway of dipsacaside B

化合物 **28** ($t_R = 80.72$ min) 在负离子模式下 m/z 973.501 2 $[M+HCOO]^-$, 质谱软件计算出精确分子式为 $C_{47}H_{76}O_{18}$, 观察二级质谱离子碎片, 化合物主要碎片离子为 m/z 927.505 1、603.392 7、323.098 8、179.056 1, 通过 Scifinder 及 Reaxys 数据库检索, 并结合课题组前期对照品比对研究^[12]及文献报道^[15,19]比对, 鉴定该化合物为川续断皂苷 VI, 推测其裂解途径见图 5。

根据 TOF/MS 结果, 化合物 **32**、**34**、**35** 均与化合物 **28** 差 1 个乙酰基, 根据二级质谱离子碎片分析, 推测结构中存在 2 个葡萄糖结构, 根据 Scifinder 和 Reaxy 数据库检索, 鉴定化合物 **32**、**34**、**35** 为 4'-O-乙酰基川续断皂苷 VI、2'-O-乙酰基川续断皂苷 VI、3'-O-乙酰基川续断皂苷 VI, 质谱行为

与文献报道^[15,19]一致。

3.3 续断“发汗”前后化学成分比较

观察图 1 可以推测出续断“发汗”前后, 在化学成分含量上存在一定差异, 马钱苷酸、绿原酸、马钱苷、异绿原酸 A、川续断皂苷 VI、7-脱氧马钱苷酸、茶茱萸苷、川续断皂苷 VII、mazuaponin I、川续断皂苷乙、medicoside F、4'-O-乙酰基川续断皂苷 VI、川续断皂苷 VI 4-氨基-2-丁烯酸衍生物、2'-O-乙酰基川续断皂苷 VI、3'-O-乙酰基川续断皂苷 VI、HN-saponin F、dipsacussaponin A、川续断皂苷 V、asperosaponin B 异构体、asperosaponin B 等在发汗后含量显著降低, 咖啡酸、异绿原酸、异绿原酸 C、大花双参苷 A 等成分含量在发汗后上升, 但尚未发现新增或消失的成分。也许正是这些变化的成分在

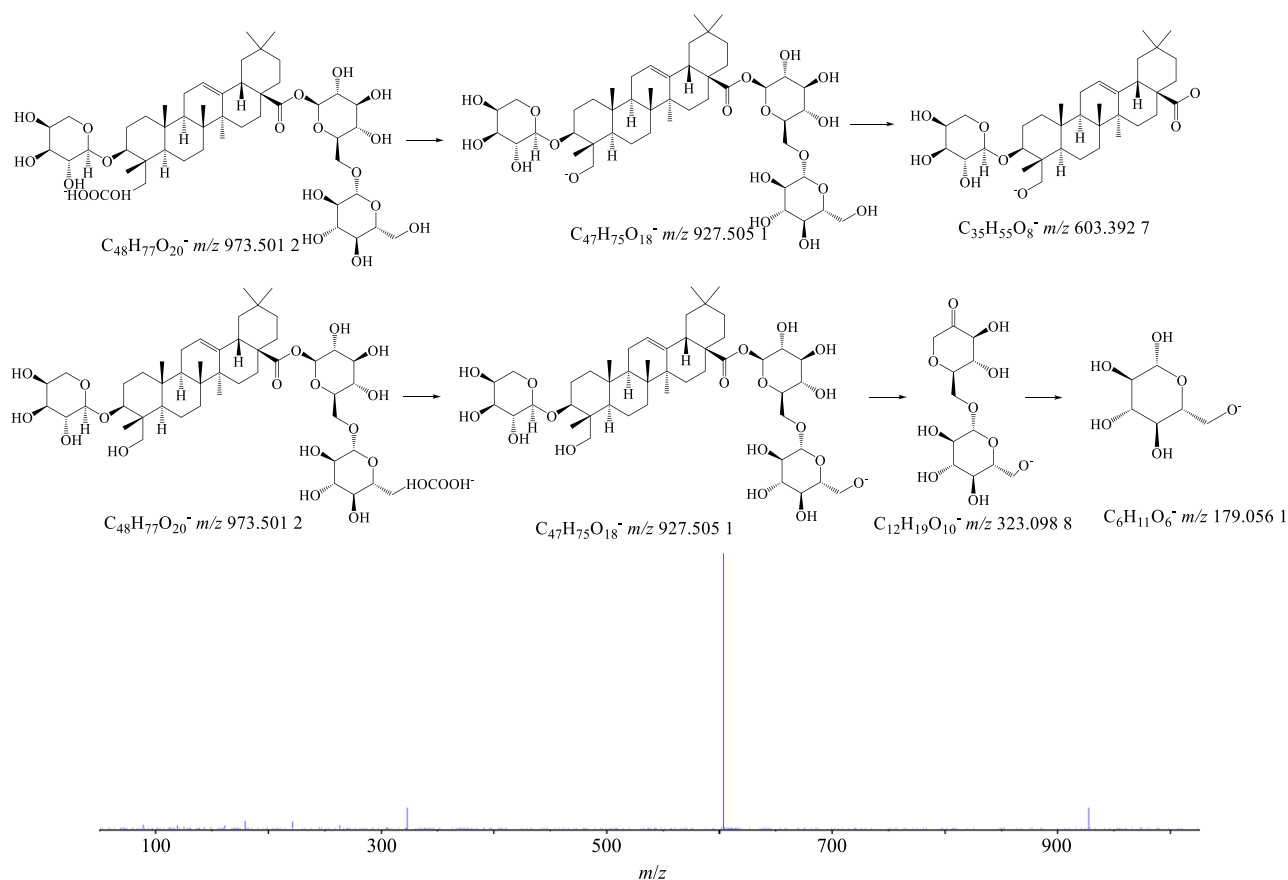


图 5 川续断皂苷 VI 质谱裂解过程

Fig. 5 Detail fragmentation pathway of asperosaponin VI

影响着续断发汗前后的质量差异。

4 讨论

为获得更好的色谱分离和质谱效应,本实验考察了不同梯度的洗脱条件,考虑到对色谱柱及仪器的保护,根据三萜皂苷、环烯醚萜苷等化合物的化学性质,选择以 0.1%甲酸水溶液-乙腈,线性梯度洗脱。质谱条件中比较了正、负离子检测模式,发现负离子模式质谱响应明显优于正离子模式,同时结合三萜皂苷、环烯醚萜苷等化合物结构性质的差异,因此本实验在负离子下定性分析样品。

本实验采用 UPLC-Triple-TOF-MS 对“发汗”前后续断的化学成分进行定性分析,检测出 52 种共有成分,主要为三萜皂苷、环烯醚萜苷、酚酸类等成分,同时研究发现续断“发汗”前后,在化学成分含量上存在一定差异,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。

课题组前期比较了续断发汗前后对大鼠胫骨骨折修复影响,发现续断“发汗”前后对大鼠胫骨骨折药效差异无显著性,并研究了续断发汗前后对成人成骨样 MG-63 细胞、幼鼠成骨细胞增殖的影响,药

理研究表明,“发汗”组较未“发汗”组的药理活性降低^[23]。同时建立了续断“发汗”前后与成骨细胞增殖、人成骨肉瘤 MG-63 细胞增殖分化药效的谱效关系,研究表明,川续断皂苷 VI、绿原酸、马钱苷可能是影响续断发汗后影响细胞增殖分化作用的主要物质基础^[24]。

因此,结合课题组前期研究,续断在“发汗”后较多的化学成分含量降低,且影响成骨细胞增殖、MG-63 细胞增殖分化药效主要有效成分,包括川续断皂苷 VI、绿原酸、马钱苷等成分含量在发汗后均显著降低,推测这些成分含量降低与促进成骨细胞增殖、MG-63 细胞增殖分化药效降低有关。本实验探究了产地加工“发汗”对续断化学成分的影响,为探究续断“发汗”前后化学成分物质基础提供依据,并为全面评价续断发汗前后的药材质量奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 罗 鹏. 川续断化学成分及药理作用研究进展 [J]. 化工管理, 2015(19): 199.

- [3] 高秀芝, 马鲁豫, 金艳霞, 等. 川续断化学成分及药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2010, 6(7): 142-146.
- [4] 刘二伟, 吴 帅, 樊官伟. 川续断化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(7): 1421-1423.
- [5] 杜伟锋, 姜东京, 吴 瑶, 等. 产地加工“发汗”对续断中异绿原酸 A、异绿原酸 B 及异绿原酸 C 含量的影响 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(5): 842-846.
- [6] 陈 茹, 陈 成, 杨兴鑫, 等. 中药“发汗”炮制法的现代研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 489-493.
- [7] 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.
- [8] 佟志刚. 续断中总皂苷的含量测定技术 [J]. 健康必读, 2011(3): 308.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 杜伟锋, 贾永强, 姜东京, 等. 基于 HPLC-ESI-MS 法续断发汗前后的成分分析 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3251-3255.
- [13] 吴 帅, 刘二伟, 张 玮, 等. 川续断中化学成分的研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2010, 29(3): 147-150.
- [14] Zhao Y M, Shi Y P. Phytochemicals and biological activities of *Dipsacus* species [J]. *Chem Biodivers*, 2011, 8(3): 414-430.
- [15] 陶 益, 蒋妍慧, 唐克建, 等. 续断酒炙前后化学成分 UPLC-Q-TOF/MS 比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 672-676.
- [16] Kouno I, Tsuboi A, Nanri M, *et al.* Acylated triterpene glycoside from roots of *Dipsacus asper* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(1): 338-339.
- [17] 刘京晶, 郭宝林, 黄文华, 等. HILIC-HPLC 测续断药材中多种皂苷含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2367-2371.
- [18] 朱净民. 川续断的化学成分和质量标准研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [19] Young J K, Do J C, Son K H. Triterperoids from the roots of *Dipsacus asper* [J]. *J Nat Prod*, 1993, 16(1): 32-35.
- [20] 张永文, 薛 智. 川续断的化学成分研究 [J]. 药学报, 1991, 26(9): 676-681.
- [21] Tao Y, Huang S R, Li W D, *et al.* Simultaneous determination of ten bioactive components in raw and processed *Radix Dipsaci* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2018, 57(2): 122-129.
- [22] Tian B Z, Rui Q Y, Jun X, *et al.* Comprehensive quantitative analysis of Shuang-Huang-Lian oral liquid using UHPLC-Q-TOF-MS and HPLC-ELSD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102: 1-8.
- [23] 杨 莹, 杜伟锋, 康显杰, 等. 续断“发汗”前后水煎液及含药血清对人成骨样 MG-63 细胞、幼鼠成骨细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5594-5599.
- [24] 杨 莹, 康显杰, 杜伟锋, 等. 续断“发汗”前后 HPLC 指纹图谱与细胞增殖分化药效的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3909-3916.