液质联用技术联合化学计量法分析比较续断盐制前后质量差异

吴杭莎[1]，吕　悦[1]，韦飞扬[1]，李昌煜[1, 4]，葛卫红[1, 2*]，杜伟锋[1, 2, 3*]

1. 浙江中医药大学药学院，浙江 杭州　311402
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-四级杆-飞行时间质谱技术（UPLC-Q-TOF-MS/MS）鉴定续断 *Dipsaci Radix* 盐制前后化学成分，并寻找其差异性成分。**方法**　液相采用 Agilent Zorbax SB-C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5.0 μm），流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱，柱温 25 ℃，体积流量 0.8 mL/min，检测波长 215 nm。质谱采用电喷雾离子源负离子模式采集样品数据，扫描范围为 *m*/*z* 100～2000。根据质谱信息，结合碎片裂解规律，与数据库、文献及对照品的比对对检测到的化学成分进行综合鉴定；通过主成分分析（principal component analysis，PCA）和正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）对比分析续断盐制前后的质量差异。**结果**　共鉴定和推测出生续断与盐续断中 54 种共有化学成分，主要包括皂苷类、环烯醚萜类和酚酸类化合物等。通过多元统计分析表明，生续断和盐续断在 PCA 模型中能清晰地分为 2 类，OPLS-DA 模型筛选得到 12 个主要差异成分，分别为马钱苷酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、茶茱萸苷、异绿原酸 C、续断苷 B、续断苷 A、川续断皂苷 VI、木通皂苷 St(b)。**结论**　建立了生续断与盐续断化学成分定性分析的方法，初步筛选了影响续断盐制前后质量变化的主要化合物，为后续对续断药效物质基础的研究提供了依据，有助于提高续断的质量控制水平。

关键词：续断；盐制；UPLC-Q-TOF-MS/MS；质量差异；化学计量法；主成分分析；正交偏最小二乘法-判别分析；皂苷；环烯醚萜；酚酸；马钱苷酸；绿原酸；咖啡酸；马钱苷；异绿原酸 B；异绿原酸 A；茶茱萸苷；异绿原酸 C；续断苷 B；续断苷 A；川续断皂苷 VI；木通皂苷 St(b)

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)07 - 2066 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.006

Analysis and comparison of mass differences between raw and salt-processed *Dipsaci Radix* by LC/MS combined with chemometrics

WU Hang-sha[1], LYU Yue[1], WEI Fei-yang[1], LI Chang-yu[1, 4], GE Wei-hong[1, 2], DU Wei-feng[1, 2, 3]

1. School of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China
2. Research Center of Traditional Chinese Medicine Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China
3. Zhejiang Chinese Medical University Chinese Medicine Yinpian Co., Ltd., Hangzhou 311401, China
4. Academy of Chinese Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective　To identify the chemical constituents in Xuduan (*Dipsaci Radix*) by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS), and find out the differences between raw and salt-processed *Dipsaci Radix*. **Methods**　The liquid phase was performed on an Agilent Zorbax SB-C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), the mobile phase was 0.1% aqueous formic acid-acetonitrile, gradient elution, the column temperature was 25 ℃, the

收稿日期：2022-11-11

基金项目：杭州市农业与社会发展科研重点项目（202204A06）；宁波市“科技创新 2025”重大专项（20201ZDYF020069）；国家重点研发计划（2018YFC1707001）；国家中药标准化项目（ZYBZH-H-ZY-45）

作者简介：吴杭莎（1998—），女，浙江杭州人，在读硕士研究生，从事中药炮制及中药药理研究。E-mail: whs540412@163.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。E-mail: duweifeng_200158@sohu.com

葛卫红（1969—），男，浙江台州人，研究员，从事中药药理与新产品开发研究，E-mail: geweihong@hotmail.com

flow rate was 0.8 mL/min, and the detection wavelength was 215 nm. The mass spectrometry used electrospray ion source negative ion mode to collect sample data, and the scanning range was *m*/*z* 100—2000. According to mass spectrometry information, combined with fragmentation rules, the detected chemical components were comprehensively identified by comparing with databases, literature and reference substances. Then, the quality differences before and after the salting process were compared and analyzed by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** A total of 54 common chemical constituents were identified and speculated in raw and salt-processed *Dipsaci Radix*, mainly including saponins, iridoids and phenolic acids. Through multivariate statistical analysis, it was shown that the raw and salt-processed *Dipsaci Radix* could be clearly divided into two categories in the PCA model. At the same time, there were 12 main differential components, including loganic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, loganin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, cantleyoside, isochlorogenic acid C, dipsanoside B, dipsanoside A, asperosaponin VI, *Akebia* saponin St(b), had been screened by OPLS-DA model. **Conclusion** In this study, a method for qualitative analysis of the chemical components of was established to screen the main material basis affecting the quality change raw and salt-processed *Dipsaci Radix* preliminarily. It provided a basis for subsequent studies on the material basis of the medicinal effect of the *Dipsaci Radix* and helped to improve the quality control of the *Dipsaci Radix*.

Key words: *Dipsaci Radix*; salt-processing; UPLC-Q-TOF-MS/MS; mass difference; chemometrics; PCA; OPLS-DA; saponins; iridoids; phenolic acids; loganic acid; chlorogenic acid; caffeic acid; loganin; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A; cantleyoside; isochlorogenic acid C; dipsanoside B; dipsanoside A; asperosaponin VI; *Akebia* saponin St(b);

续断始载于《神农本草经》，为川续断科川续断属植物川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的干燥根，有补肝肾、强筋骨、续折伤、止崩漏之功效，目前常应用于临床的饮片主要为续断片、酒续断和盐续断[1]。续断主要含有三萜皂苷、环烯醚萜、生物碱等成分，其中三萜皂苷和环烯醚萜类成分含量较高[2-3]；其药理作用主要有促进骨细胞增殖、改善骨损伤、抗炎止痛、神经保护和免疫调节等[4-6]。

盐制续断为近代发展使用的炮制方法。明代《本草蒙筌》记载：“入盐走肾脏，仍使软坚”以及《黄帝内经》记载“肾主骨”，据此可推测，盐制续断可增强其补肾强骨的作用。近年来，国内外学者围绕盐续断已经陆续开展了一些研究，但主要集中于续断盐制工艺优化[7]、盐制前后指纹图谱及化学成分含量变化等[8-11]，对于续断盐制增效物质基础尚无系统研究，难以阐明续断盐制增效机制。

本研究通过超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱技术（UPLC-Q-TOF-MS/MS）对续断盐制前后化学成分进行定性分析并对其组成进行分类鉴定，采用化学计量法筛选影响续断盐制前后质量差异的潜在化合物，为提高续断饮片的质量及后续对于续断盐制增效物质基础和增效机制的研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Acquity UPLC-Q-TOF-MS/MS 5600+型超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪，美国 AB Sciex 公司；ME-204E 型电子分析天平（0.01 g）、NT-xs105 型电子分析天平（0.01 mg），瑞士 Mettler Toledo 公司；DFT-200 型手提式高速中药粉碎机，温岭市林大机械有限公司；TG16-WS 型台式高速离心机，上海卢湘仪离心机仪器有限公司；CGDC-750 型电磁炒药机，杭州海善制药设备股份有限公司；KQ-500DB 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

1.2 试剂

对照品马钱苷酸（质量分数 98%，批号 130008-201908）、川续断皂苷 VI（质量分数 94.3%，批号 111685-201907）、续断苷 A（质量分数 99%，批号 1647-0025）、续断苷 B（质量分数 99%，批号 1647-0026）、绿原酸（质量分数 98%，批号 120052-201912）、马钱苷（质量分数 99%，批号 111640-201808）、咖啡酸（质量分数 99.7%，批号 110885-201703）均购自中国食品药品检定研究院；对照品异绿原酸 A（质量分数 98%，批号 250034-202003）、异绿原酸 B（质量分数 98%，批号 250035-202003）、异绿原酸 C（质量分数 98%，批号 250036-202003）均购自上海鸿永生物科技有限公司；甲醇（分析纯）购自广东光华科技股份有限公司；甲酸（色谱纯）购自美国 ACS 公司；乙腈（色谱纯）购自美国 Tedia 公司；纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

1.3 药材

1.3.1 生续断 5 批生续断饮片分别来源于眉山、昆明、乐山、丽江、西昌，均经浙江中医药大学葛卫红教授鉴定为川续断科川续断属植物川续断 *D. asper* Wall. ex Henry 的干燥根的加工品，批次信息见表 1。

1.3.2 盐续断 取生续断，加盐水拌匀，闷透，置

表 1　续断样品批次信息

Table 1　Batch information of *Dipsaci Radix* samples

续断批号	续断编号	来源	盐续断批号	盐续断编号
S201908	S1	眉山	Y201908	Y1
S201911-1	S2	昆明	Y201911-1	Y2
S20190157	S3	乐山	Y20199157	Y3
S20190417	S4	丽江	Y20190417	Y4
S20190416	S5	西昌	Y20190416	Y5

电磁炒药机中，160 ℃翻炒 10 min，取出，放凉，即得。（每 100 千克生续断，用食盐 2 kg）。批次信息见表 1。

2　方法

2.1　溶液的制备

2.1.1　供试品溶液　精密称取续断样品粉末（过五号筛）0.5 g，置于 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 80%甲醇水溶液，密塞，称定质量，超声提取 30 min，放冷，再次称定质量，加 80%甲醇水溶液补足减失的质量，摇匀，滤过得到续滤液，用时经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.1.2　对照品溶液　分别取对照品马钱苷酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、续断苷 A、续断苷 B 和川续断皂苷 VI 适量，精密称定，置于棕色量瓶中，加入 80%甲醇溶解并稀释定容，得到混和对照品储备液。10 个对照品质量浓度分别为 953.54、477.26、420.73、1 185.03、602.70、830.06、602.70、110.85、40.2、1 952.01 μg/mL。

2.2　色谱条件

Agilent Zorbax SB-C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5.0 μm），流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0～5 min，2%～6%乙腈；5～18 min，6%～10%乙腈；18～40 min，10%～20%乙腈；40～70 min，20%～25%乙腈；70～80 min，25%～35%乙腈；80～90 min，35%～60%乙腈；90～110 min，60%～70%乙腈；110～120 min，70%乙腈；柱温 25 ℃；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 215 nm；进样量为 10 μL。

2.3　质谱条件

扫描模式为负离子，扫描范围为 *m*/*z* 100～2000，雾化气压（GS1）344.738 kPa（50 psi），雾化气压（GS2）344.738 kPa（50 psi），气帘气压（CUR）241.317 kPa（35 psi），离子源温度（TEM）为 550 ℃，离子源电压（IS）为−4500 V；一级扫描：去簇电压（DP）为 100 V；聚焦电压（CE）为 10 V；二级扫描：采用 TOF MS-Product Ion-IDA 模式采集；CID 能量为 40 V。

2.4　成分鉴定方法

通过 Analyst® TF 1.6 软件采集数据，Peakview 1.2 软件拟合化合物的分子式，根据二级质谱中碎片离子的裂解情况比对 Scifinder 和 Reaxy 数据库以及国内外续断化学成分研究相关文献和对照品数据，结合误差值综合鉴定生续断及盐续断中化合物的结构和归属。

2.5　多元统计分析

使用 Markerview 软件对样品中所有化合物的峰进行离子强度归一化处理，将数据导入 Simca 14.1 软件进行主成分分析（principal component analysis，PCA）、正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）多元统计分析。

3　结果与分析

3.1　生续断与盐续断性状差异

由图 1 清晰可见，续断饮片多呈圆柱形，略扁，有的微弯曲，长约 1～4 cm，直径 0.5～1.5 cm，表面有稍扭曲或明显扭曲的纵皱和沟纹。对比盐制前后续断饮片的差异，生续断表面呈灰褐色或黄褐色，味微苦而涩；盐续断饮片表面经炮制变为棕黄色或黑褐色，味微苦而咸。

3.2　化合物分析与鉴定

将生续断与盐续断供试品溶液按在“2.2”和“2.3”项下的色谱及质谱条件进行分析，得到续断盐制前后 UPLC-Q-TOF-MS/MS 负离子模式下的总离子流图，结果见图 2。经与文献报道[12-22]、对照品及数据库进行比对，结果共推断出生续断和盐续断中 54 个共有化合物，其中皂苷类 32 种、环烯醚萜类 12 种、酚酸类 5 种、其他类 5 种，各成分误差



图 1　生续断与盐续断饮片影像图

Fig. 1　Image of raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

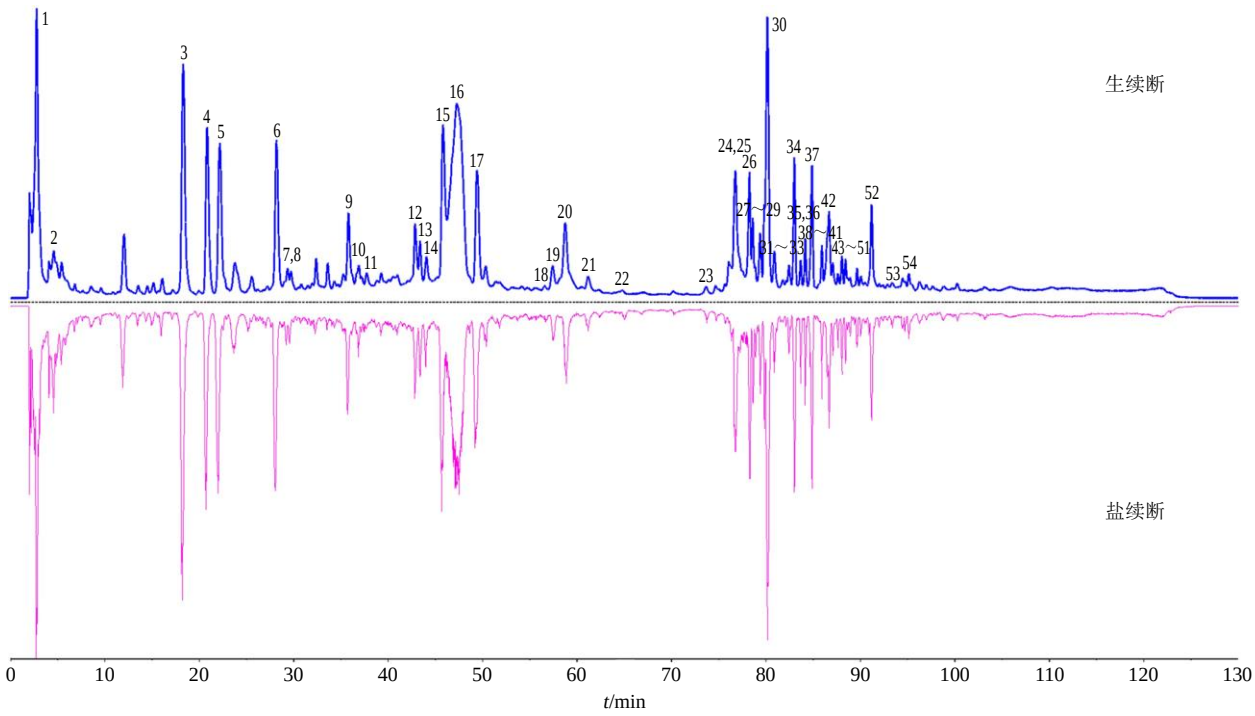


图 2 生续断和盐续断在 UPLC-Q-TOF-MS/MS 负离子模式下总离子流图 (镜像图)

Fig. 2 Total ion chromatograms (mirror image) of UPLC-Q-TOF-MS/MS of raw *Dipsaci Radix* and salt-processed *Dipsaci Radix* in negative ion mode

值在 1.1×10^{-5} 之内，详细信息见表 2。

3.2.1 皂苷类 峰 24 分子离子 *m/z* 为 1 721.777 1 [M＋HCOO]$^-$，拟合分子式为 $C_{76}H_{124}O_{40}$，二级质谱显示主要碎片离子为 *m/z* 1 352.673、323.098 5、179.055 7，对照数据库和文献报道[20]，推测其为川续断皂苷 X，分析其裂解途径为图 3 所示。峰 30 分子离子 *m/z* 为 973.506 9 [M＋HCOO]$^-$，通过二级质谱的碎片离子分析及与数据库、文献数据[14-15,22]和对照品比对，鉴定峰 30 为川续断皂苷 VI。峰 39 的分子离子 *m/z* 为 957.512 4 [M＋HCOO]$^-$，软件拟合得到其精确的分子式为 $C_{47}H_{76}O_{17}$，根据二级质谱离子碎片分析，结构中存在 2 个葡萄糖结构，经数据库检索，推测该化合物可能为川续断皂苷 V。峰 50 分子离子 *m/z* 为 749.451 5 [M－H]$^-$，拟合分子式为 $C_{41}H_{66}O_{15}$，根据二级质谱离子碎片分析，结构中存在常春藤皂苷元 *m/z* 471.350 0，木糖和鼠李糖结构，根据数据库检索，推测该化合物可能为 α-常春藤皂苷，并分析其裂解途径如图 4 所示。

3.2.2 环烯醚萜类 峰 3 分子离子 *m/z* 为 375.130 0 [M－H]$^-$，软件拟合分子式为 $C_{16}H_{24}O_{10}$，二级质谱主要碎片离子为 *m/z* 213.076 2、151.076 4、113.025 8，推测结构中存在六元糖、羟基和羧基等特征结构，对照数据库及文献数据，并经对照品比对，最终鉴定该化合物为马钱苷酸。根据质谱信息可知，峰 9 与峰 3 仅差 1 个-O 基，对其离子碎片信息进行分析，结构中有葡萄糖和羧基，根据数据库、文献参考和裂解途径分析，推测峰 9 可能为 7-脱氧马钱苷酸，裂解途径如图 5 所示。峰 6 分子离子 *m/z* 为 435.152 0 [M＋HCOO]$^-$，软件拟合分子式为 $C_{17}H_{26}O_{10}$，二级质谱碎片离子为 *m/z* 227.093 0、127.040 2，对照数据库及文献数据[13-14]，并经对照品比对，鉴定该化合物为马钱苷。峰 7 和峰 16 的分子离子 *m/z* 分别为 403.124 8 [M＋HCOO]$^-$、791.266 1 [M＋HCOO]$^-$，根据二级质谱离子碎片分析，结构中均存在葡萄糖结构，根据数据库检索及文献，推测化合物分别为当药苷和茶茱萸苷，并对茶茱萸苷进行了裂解规律的分析，如图 6 所示。

3.2.3 酚酸类 峰 4 分子离子 *m/z* 为 353.088 7 [M－H]$^-$，分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$，二级质谱显示，结构中存在绿原酸类化合物的特征系列碎片离子 *m/z* 191.054 9，比对数据库与对照品，鉴定该化合物为绿原酸。峰 5 分子离子 *m/z* 为 179.036 7 [M－H]$^-$，分子式为 $C_9H_8O_4$。二级质谱 135.045 2、107.051 1、89.041 5 等为酚酸类化合物的特征碎片离子，根据数据库及文献数据，同时比对对照品，鉴定该化合物为咖啡酸。峰 14、15、17 均有分子离子 *m/z* 515，

表 2　续断盐制前后共有化学成分分析鉴定

Table 2　Analysis and identification of common chemical constituents in raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

峰号	t_R/min	离子形式	测定值 (*m*/*z*)	理论值 (*m*/*z*)	分子式	二级质谱 (*m*/*z*)	化合物	分类
1	3.11	$[M-H]^-$	341.109 6	341.108 9	$C_{12}H_{22}O_{11}$	179.057 7, 101.025 7, 89.026 4, 59.019 2	蔗糖	其他
2	4.62	$[M-H]^-$	290.088 8	290.088 1	$C_{11}H_{17}NO_8$	201.059 3, 200.056 0, 128.039 3	α-*D*-葡萄糖-2-[(3-羧基-1-氧代-3-丁烯-1-基)氨基]-2-脱氧糖	其他
3	18.33	$[M-H]^-$	375.130 0	375.129 7	$C_{16}H_{24}O_{10}$	213.076 2, 151.076 4, 113.025 8	马钱苷酸#	环烯醚萜类
4	21.81	$[M-H]^-$	353.088 7	353.087 8	$C_{16}H_{18}O_9$	191.054 9	绿原酸#	酚酸类
5	25.36	$[M-H]^-$	179.036 7	179.035 0	$C_9H_8O_4$	135.045 2, 107.051 1, 89.041 5, 79.058 0	咖啡酸#	酚酸类
6	27.98	$[M+HCOO]^-$	435.152 0	435.150 8	$C_{17}H_{26}O_{10}$	227.093 0, 127.040 2	马钱苷#	环烯醚萜类
7	29.28	$[M+HCOO]^-$	403.124 8	403.124 6	$C_{16}H_{22}O_9$	357.122 1, 195.062 2, 125.024 1, 81.037 1	当药苷	环烯醚萜类
8	29.49	$[M+HCOO]^-$	535.169 0	535.168 8	$C_{21}H_{30}O_{13}$	489.164 9, 293.088 3, 149.044 8, 125.025 1, 81.037 6	月腺大戟苷 C	环烯醚萜类
9	35.67	$[M-H]^-$	359.136 3	359.134 8	$C_{16}H_{24}O_9$	197.082 2, 153.092 5, 135.081 7, 59.019 2	7-脱氧马钱苷酸	环烯醚萜类
10	36.67	$[M-H]^-$	535.181 7	535.182 1	$C_{26}H_{32}O_{12}$	373.129 8, 344.122 8, 343.117 1	1-羟基松脂醇-4′-β-*D*-葡萄糖苷	其他
11	36.80	$[M-H]^-$	733.260 2	733.256 1	$C_{32}H_{46}O_{19}$	571.211 9, 471.156 6, 375.132 8, 357.122 2, 195.067 5, 151.077 2	林生续断苷 I 衍生物	环烯醚萜类
12	42.77	$[M-H]^-$	747.276 4	747.271 7	$C_{33}H_{48}O_{19}$	629.239 4, 585.229 4, 485.167 2, 399.130 2, 88.996 3	林生续断苷 I	环烯醚萜类
13	43.37	$[M-H]^-$	761.255 8	761.251 0	$C_{33}H_{46}O_{20}$	581.195 6, 567.179 5, 485.171 9, 389.112 0, 371.100 5, 165.055 6, 121.031 0	三色苷	环烯醚萜类
14	44.17	$[M-H]^-$	515.121 9	515.119 5	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.089 3, 191.056 1, 173.045 3, 135.045 4, 137.024 7	异绿原酸 B#	酚酸类
15	45.68	$[M-H]^-$	515.120 7	515.119 5	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.088 0, 191.055 0, 179.034 2, 135.044 8	异绿原酸 A#	酚酸类
16	46.93	$[M+HCOO]^-$	791.266 1	791.261 5	$C_{33}H_{46}O_{19}$	745.267 1, 583.209 4, 513.165 5, 459.154 1, 373.116 8, 297.099 3, 209.082 2, 179.056 1, 89.026 2	茶茱萸苷	环烯醚萜类
17	49.14	$[M-H]^-$	515.121 4	515.119 5	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.089 6, 203.035 7, 191.055 9, 173.045 1, 179.034 6, 135.045 7, 137.025 7	异绿原酸 C#	酚酸类
18	56.54	$[M+HCOO]^-$	837.307 0	837.303 4	$C_{35}H_{52}O_{20}$	791.306 9, 629.250 2, 527.181 6, 495.154 2, 496.157 0, 459.152 4, 419.157 7, 335.116 1, 239.093 4, 209.082 0, 179.055 2	大花双参甙 A	环烯醚萜类
19	57.47	$[M+HCOO]^-$	1 519.527 6	1 519.523 9	$C_{66}H_{90}O_{37}$	1 241.447 3	续断苷 B#	环烯醚萜类
20	58.79	$[M+HCOO]^-$	1 519.527 9	1 519.524 3	$C_{66}H_{90}O_{37}$	1 243.443 9	续断苷 A#	环烯醚萜类
21	64.28	$[M+HCOO]^-$	989.492 3	989.496 3	$C_{47}H_{76}O_{19}$	943.495 3, 619.379 3, 618.373 0, 617.374 3	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	皂苷类
22	64.54	$[M+HCOO]^-$	987.487 8	987.480 6	$C_{47}H_{74}O_{19}$	944.503 8, 619.387 3, 617.405 4	赤芍苷 B	皂苷类
23	74.76	$[M+HCOO]^-$	1 003.518 2	1 003.511 9	$C_{48}H_{78}O_{19}$	958.528 3, 957.524 8, 633.409 1, 634.414 2, 323.099 9	葡萄糖苷 A	皂苷类
24	76.80	$[M+HCOO]^-$	1 721.777 1	1 721.765 1	$C_{76}H_{124}O_{40}$	1352.67 3, 837.889 6, 675.831 5, 676.332 9, 369.104 6, 323.098 5, 179.055 7	川续断皂苷 X	皂苷类
25	76.99	$[M-H]^-$	1 219.617 0	1 219.611 7	$C_{59}H_{96}O_{26}$	790.360 0, 361.074 2, 360.080 1, 323.100 2	川续断皂苷 B	皂苷类
26	78.15	$[M-H]^-$	1 235.612 4	1 235.606 6	$C_{59}H_{96}O_{27}$	911.514 2, 912.518 3, 750.466 2, 749.460 6, 617.806 9, 603.397 7, 471.352 5	川续断皂苷 VII	皂苷类
27	78.91	$[M-H]^-$	927.501 4	927.495 9	$C_{47}H_{76}O_{18}$	602.388 3, 601.383 7, 323.097 9	mazusaponin I	皂苷类
28	79.28	$[M-H]^-$	1 073.559 6	1 073.553 8	$C_{53}H_{86}O_{22}$	749.462 5, 323.100 7	川续断皂苷乙	皂苷类
29	79.40	$[M-H]^-$	927.501 1	927.495 9	$C_{47}H_{76}O_{18}$	604.399 6, 324.102 4, 179.561 0	medicoside F	皂苷类

续表 2

峰号	t_R/min	离子形式	测定值 (*m*/*z*)	理论值 (*m*/*z*)	分子式	二级质谱 (*m*/*z*)	化合物	分类
30	80.03	$[M+HCOO]^-$	973.506 9	973.501 4	$C_{47}H_{76}O_{18}$	927.509 3, 603.394 7, 323.097 8, 221.066 6, 179.055 4, 119.035 3	川续断皂苷 VI#	皂苷类
31	80.96	$[M-H]^-$	941.481 1	941.475 2	$C_{47}H_{74}O_{19}$	747.447 0, 617.378 6, 423.332 0, 323.100 2	chionaeoside B	皂苷类
32	82.15	$[M-H]^-$	969.511 8	969.507 6	$C_{49}H_{78}O_{19}$	645.409 9, 646.414 1, 323.098 6	乙酰基川续断皂苷 VI	皂苷类
33	82.37	$[M-H]^-$	925.484 6	925.480 2	$C_{47}H_{74}O_{18}$	601.382 9, 602.389 4, 599.474 6, 323.096 2, 179.055 7, 89.030 1	去氢川续断皂苷 VI	皂苷类
34	82.95	$[M-H]^-$	969.511 7	969.506 5	$C_{49}H_{78}O_{19}$	645.406 6, 646.414 2, 603.396 1, 323.099 5, 221.065 6, 179.055 4	4′-*O*-乙酰基川续断皂苷 VI	皂苷类
35	83.58	$[M-H]^-$	969.512 6	969.506 5	$C_{49}H_{78}O_{19}$	645.410 0, 646.415 1, 323.099 6	2′-*O*-乙酰基川续断皂苷 VI	皂苷类
36	84.11	$[M-H]^-$	969.510 7	969.506 5	$C_{49}H_{78}O_{19}$	645.410 4, 646.413 6, 323.100 0	3′-*O*-乙酰基川续断皂苷 VI	皂苷类
37	84.71	$[M+HCOO]^-$	841.464 9	841.459 1	$C_{42}H_{68}O_{14}$	839.454 9, 796.476 3, 795.471 5, 794.460 6, 471.353 8, 469.330 7, 472.353 1, 323.116 4	dipsacussaponin A	皂苷类
38	84.78	$[M+HCOO]^-$	811.453 7	811.448 5	$C_{41}H_{66}O_{13}$	765.453 5, 645.408 9, 604.402 5, 603.394 3	HN-saponin F	皂苷类
39	84.90	$[M+HCOO]^-$	957.512 4	957.506 5	$C_{47}H_{76}O_{17}$	911.514 8, 912.520 3, 587.400 5, 588.408 9, 589.347 4, 323.098 7, 179.055 7, 119.035 1	川续断皂苷 V	皂苷类
40	85.23	$[M+HCOO]^-$	1 056.527 9	1 056.538 5	$C_{51}H_{81}NO_{19}$	1 011.536 0, 1 012.538 9, 687.422 1, 688.422 5, 323.099 7, 179.056 5	川续断皂苷 VI 4-氨基-2-丁烯酸衍生物	皂苷类
41	85.94	$[M+HCOO]^-$	1 057.529 6	1 057.522 5	$C_{51}H_{80}O_{20}$	1 011.534 0, 1 012.540 5, 687.419 1, 688.425 9, 323.099 8, 221.067 3, 179.056 5, 119.036 3	asperosaponin B 异构体	皂苷类
42	86.41	$[M-H]^-$	1 351.662 9	1 351.654 0	$C_{64}H_{104}O_{30}$	749.460 1, 693.322 0, 603.392 6	dipsacussaponin C	皂苷类
43	86.71	$[M-H]^-$	1 219.617 1	1 219.611 7	$C_{59}H_{96}O_{26}$	1 073.578 3	dipsacussaponin B 异构体	皂苷类
44	86.99	$[M+HCOO]^-$	1 057.528 3	1 057.522 5	$C_{51}H_{80}O_{20}$	687.420 0, 688.428 0, 323.100 1, 179.055 9	川续断皂苷 B	皂苷类
45	87.59	$[M-H]^-$	1 057.565 0	1 057.558 9	$C_{53}H_{86}O_{21}$	749.467 1, 603.402 3, 471.358 0	dipsacussaponin R	皂苷类
46	87.99	$[M-H]^-$	911.507 0	911.501 0	$C_{47}H_{76}O_{17}$	749.459 8, 603.398 2, 471.351 6	灰毡毛忍冬次苷 A	皂苷类
47	88.44	$[M-H]^-$	881.496 4	881.490 4	$C_{46}H_{74}O_{16}$	749.462 7, 603.400 9, 471.335 0	dipsacussaponin N	皂苷类
48	88.94	$[M-H]^-$	1 203.625 2	1 203.616 8	$C_{59}H_{96}O_{25}$	1203.638 9	齐墩果酸-12-烯-28-油酸-3-[(*O*-6-脱氧-α-*L*-吡喃甘露-(1→6)-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖-(1→4)-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖-(1→3)-*O*-6-脱氧-α-*L*-吡喃甘露-(1→2)-α-*L*-阿拉伯吡喃糖)*O*]	皂苷类
49	89.37	$[M+HCOO]^-$	663.377 5	663.375 0	$C_{35}H_{54}O_9$	663.384 4, 617.376 8, 618.381 4	齐墩果酸-11,13(18)-乙烯-28-油酸-3,16,23-三羟基-α-*L*-阿拉伯吡喃糖酯	皂苷类
50	89.51	$[M-H]^-$	749.451 5	749.448 2	$C_{41}H_{66}O_{12}$	603.394 8, 471.350 0, 149.045 1	α-常春藤皂苷	皂苷类
51	91.14	$[M+HCOO]^-$	649.398 5	649.395 7	$C_{35}H_{56}O_8$	603.393 8, 604.428 3, 605.578 3	秋水仙素 A	其他
52	91.47	$[M-H]^-$	603.393 1	603.396 2	$C_{35}H_{56}O_8$	603.3965 9	木通皂苷 St(b)	皂苷类
53	93.38	$[M-H]^-$	471.313 0	471.311 6	$C_{29}H_{44}O_5$	471.319 6	常春藤皂苷元	皂苷类
54	97.65	$[M-H]^-$	265.149 2	265.147 9	$C_{12}H_{26}SO_4$	247.110 9, 96.963 1, 79.967 2	硫酸十二烷基酯	其他

“#”表示与对照品对照分析

“#” indicates control analysis with comparators

通过 peakview 软件拟合出化合物的分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$，推测为异绿原酸类化合物，结合二级质谱中的碎片离子信息，对照数据库及文献数据，并经对照品比对，鉴定峰 14 为异绿原酸 B，峰 15 为异绿原酸 A，峰 17 为异绿原酸 C。以异绿原酸 A 的裂解途径分析为例，见图 7。

3.3 盐制前后差异性化学成分筛选

3.3.1 PCA PCA 是一种利用方差最大原则将多个

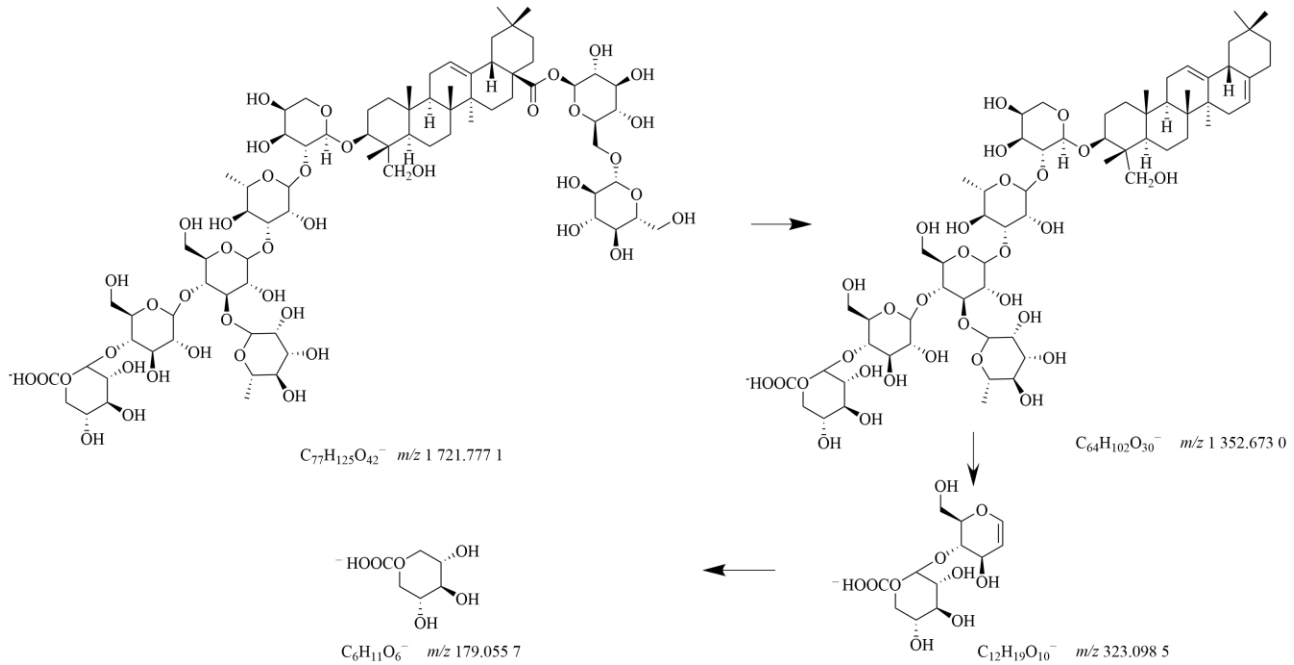


图 3　川续断皂苷 X 的质谱裂解过程

Fig. 3　Mass spectrometry fragmentation process of asperosaponin X

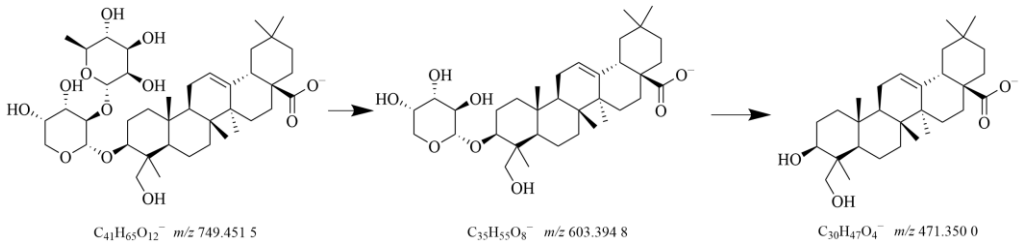


图 4　α-常春藤皂苷质谱裂解过程

Fig. 4　Mass spectrometry fragmentation process of α-hederin

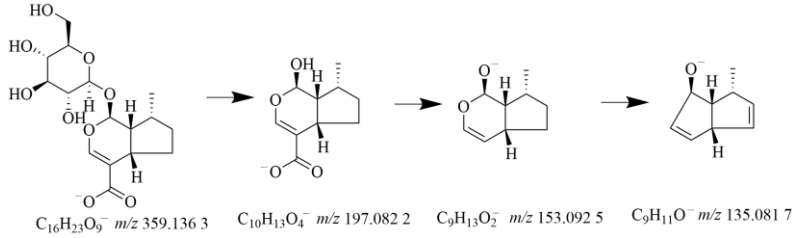


图 5　7-脱氧马钱苷酸质谱裂解过程

Fig. 5　Mass spectrometry fragmentation process of 7-deoxyloganine

变量数据进行降维分析的无监督统计方法，通过得分图实现不同样本可视化分类效果。将 5 批生续断与盐续断样品成分信息经 Markerview 软件处理后得到的数据导入 Simca 14.1 软件进行建模，所得结果如图 8 所示。生续断和盐续断样品沿 t[1]轴分散于左右两侧，在 95%置信区间内具有明显的区分，说明续断在盐制后化学成分的总体特征产生了改变，生续断与盐续断存在质量上的差异。

3.3.2　OPLS-DA　OPLS-DA 是一种有监督的判别分析统计方法，常常被用来筛选中药中不同组样本间具有显著性差异的成分。采用 OPLS-DA 对续断盐制前后样品进行判别分析，图 9 得分图结果显示，生续断与盐续断明显聚集为 2 类。R^2 和 Q^2 分别表示在随机化 Y 变量模型下对数据的解释程度和对模型的预测能力，结果表明累积解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.740、0.937，预测能力参数 Q^2 为 0.829，表明该模型稳定可靠、预测能力强，可用于区别生续断与盐续断。在 200 次置换检验图（图 10）中可知，R^2 和 Q^2 的回归线分别与左侧纵轴相交于 2 条回归线，斜率均较大，且左侧随机排列得到的 R^2 和

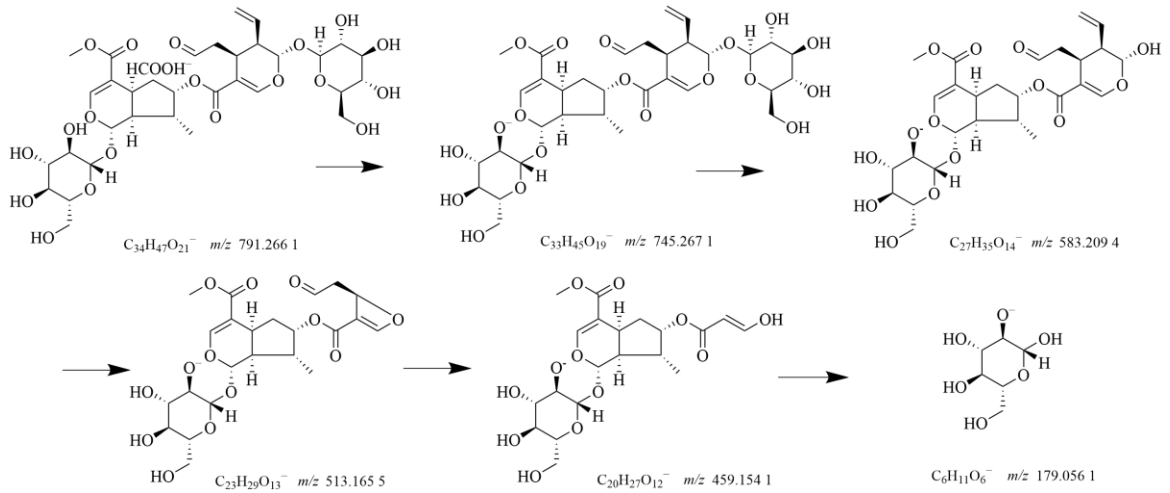


图 6　茶茱萸苷质谱裂解过程

Fig. 6　Mass spectrometry fragmentation process of cantleyoside

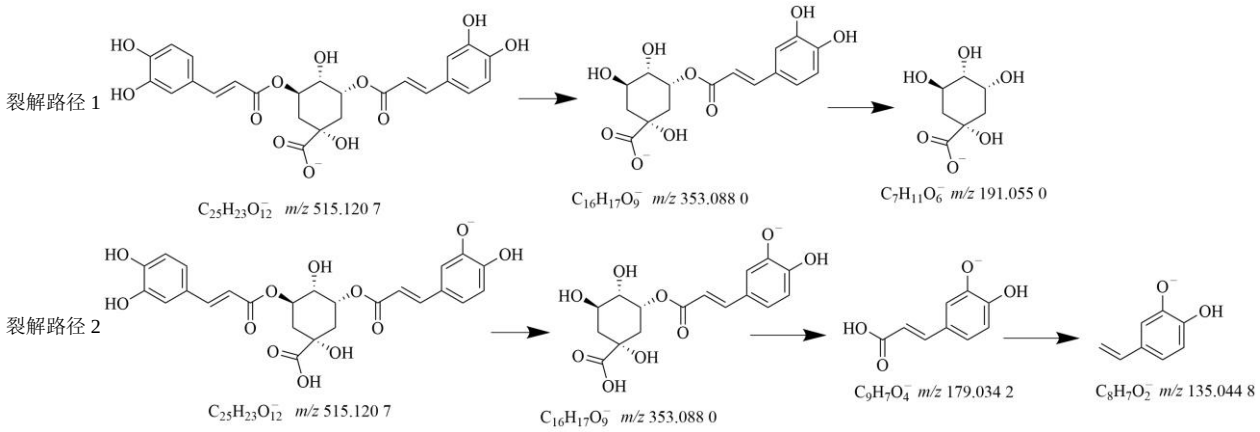


图 7　异绿原酸 A 质谱裂解过程

Fig. 7　Mass spectrometry fragmentation process of isochlorogenic acid A

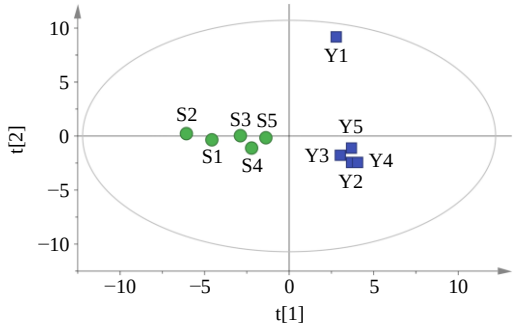


图 8　生续断与盐续断的 PCA 得分图

Fig. 8　PCA scatter plot of raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

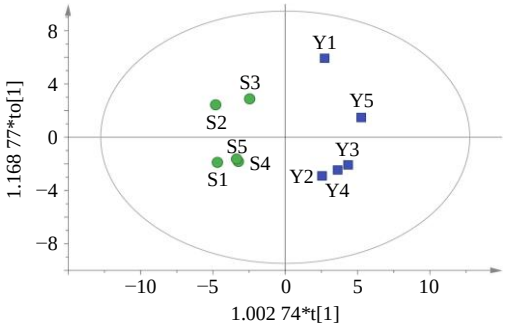


图 9　生续断与盐续断的 OPLS-DA 得分图

Fig. 9　OPLS-DA scatter plot of raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

Q^2 均要小于右侧的原始值，说明该模型有效、稳定，且未出现过拟合，可用于进行进一步的数据分析。

进一步生成模型的 S-Plot 图（图 11），将 p_{corr} 和 P 值导入到 Excel 中计算 $|p_{corr}|$ 和 $-\lg P$，以 $|p_{corr}| \geq 0.5$ 和 $-\lg P > 1.3$ 为条件对影响续断炮制前后质量差异的潜在成分进行筛选，利用 Fold Change（FC）计算 $\log_2$FC 值，以 $\log_2$FC 和 $-\lg P$ 建立火山图，将差异成分筛选结果进行可视化，图中三角形代表续断盐制后含量显著上调的成分，菱形代表显著下调的成分，圆点为无显著性差异的成分，正方形外圈

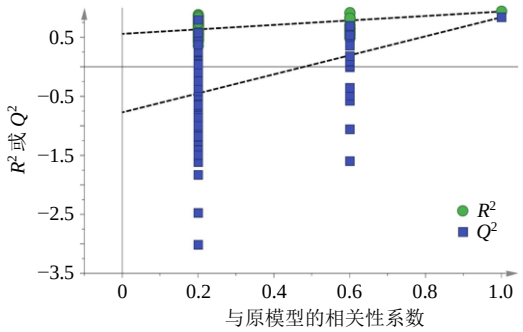


图 10　生续断与盐续断 OPLS-DA 模型 200 次置换检验图

Fig. 10　Permutation validation figure of OPLS-DA model of raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

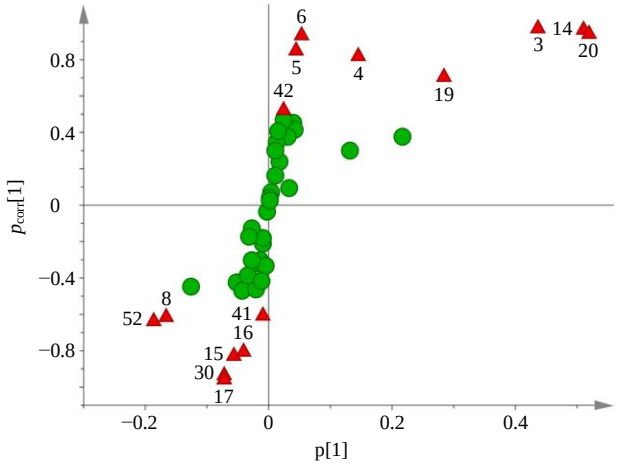


图 11　生续断与盐续断 54 种共有成分 S-Plot 图

Fig. 11　S-plot spectrogram of 54 common components of raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

表示$|p_{corr}|\geqslant 0.5$，由图 12 可知共筛选出 12 种差异性化学成分，其中包括 5 个环烯醚萜类、5 个酚酸类和 2 个皂苷类。然后对这些成分的 VIP 值进行排序，VIP 值越大则说明差异代谢物越有意义，结果如表 3 所示，按照 VIP 值从大到小分别为峰 20（续断苷 A）、峰 14（异绿原酸 B）、峰 3（马钱苷酸）、

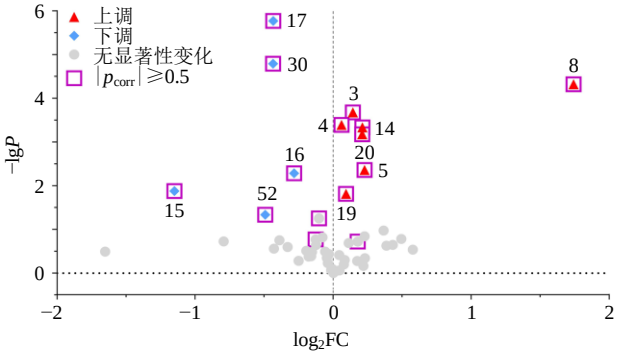


图 12　生续断与盐续断差异代谢物筛选火山图

Fig. 12　Differential metabolite screening volcano plot of raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

表 3　生续断与盐续断差异性成分

Table 3　Differences of ingredients between raw and salt-processed *Dipsaci Radix*

序号	峰号	化学成分	VIP 值	$\|p_{corr}\|$	$-\lg P$
1	20	续断苷 A	3.71	0.94	3.18
2	14	异绿原酸 B	3.66	0.96	3.34
3	3	马钱苷酸	3.12	0.97	3.68
4	19	续断苷 B	2.04	0.71	1.82
5	52	木通皂苷 St(b)	1.34	0.64	1.34
6	4	绿原酸	1.04	0.82	3.39
7	30	川续断皂苷 VI	0.62	0.96	4.79
8	17	异绿原酸 C	0.56	0.94	5.77
9	5	咖啡酸	0.52	0.85	2.36
10	16	茶茱萸苷	0.46	0.81	2.28
11	6	马钱苷	0.38	0.93	4.32
12	15	异绿原酸 A	0.35	0.83	1.88

峰 19（续断苷 B）、峰 52［木通皂苷 St(b)］、峰 4（绿原酸）、峰 30（川续断皂苷 VI）、峰 17（异绿原酸 C）、峰 5（咖啡酸）、峰 16（茶茱萸苷）、峰 6（马钱苷）、峰 15（异绿原酸 A）。以上成分可以作为潜在的物质基础，亦可作为指标性成分来判断续断盐制前后的质量。

4　讨论

近年来，液质联用技术作为一种分离和鉴定的分析方法，被广泛应用于中药质量分析与控制中，具有灵敏度高、分离能力好等优点[23]，对成分的检测较为全面。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对续断盐制前后成分进行定性分析，通过液质数据库、对照品比对以及文献查阅对化合物进行推断，共检测出 54 个共有成分，其中皂苷类 32 种，环烯醚萜类 12 种，酚酸类 5 种以及其他类 5 种，炮制前后未发现新增或消失的成分。

结合 PCA 和 OPLS-DA 结果，筛选得到 12 个炮制前后差异性成分，初步得到炮制变化的主要物质基础，分别为马钱苷酸、绿原酸、咖啡酸、马钱苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、茶茱萸苷、异绿原酸 C、续断苷 B、续断苷 A、川续断皂苷 VI、木通皂苷 St(b)。其中，绿原酸、咖啡酸和异绿原酸 A、B、C 属于酚酸类化合物，咖啡酸作为一种抗氧化剂，可以改善活性氧引起的骨质流失，并通过抑制破骨细胞的产生和骨吸收来调节骨重塑过程，对治疗骨相关疾病有药用价值[24-25]；绿原酸和异绿原酸常共存于植物体内，具有相似的生物合成途径，研究发现两者均

有较强的抑菌和消灭病毒作用[26]。马钱苷酸、马钱苷可以抑制环氧化酶-2（cyclooxygenase-2，COX-2）、基质金属蛋白酶-3（matrix metalloproteinase-3，MMP-3）和 MMP-13 或核转录因子 κB（nuclear factor-kappa B，NF-κB）信号，以减弱软骨基质的分解，减少软骨退化，可作为骨相关疾病的潜在治疗剂[27-28]。川续断皂苷 VI 是续断皂苷中具有代表性的一个成分，其在抗肺血栓、骨保护、抗细胞凋亡、抗皮肤衰老等方面均具有活性作用[29-30]。这些结果证明了从筛选中获得的有效成分的可靠性，对后续研究有一定的意义。同时，续断苷 A 和续断苷 B 是近年来从续断中分离出来的新型四咪唑类葡萄糖苷，两者的化学结构单元与马钱苷存在相似的部分[31]，而茶茱萸苷作为所筛选出的活性成分，目前鲜有学者对其进行深入分析，这三者是值得研究的全新成分。

液质化合物分析结果显示，续断盐制前后未发现新增或消失的成分，但从离子图的各成分峰值对比推测，一些成分在盐制后存在含量的变化，说明盐制过程没有对续断的化学成分产生实质性的改变，但存在着一定的内在转化，比如马钱苷酸与马钱苷，绿原酸与异绿原酸，川续断皂苷 VI 与其他皂苷成分。成分之间的转化可能影响了药效的改变，后期可以针对单体化合物之间的转化及药效进行研究，从而深层次分析炮制机制。

本研究采取液质联用技术较好地分析了续断中的成分组成，同时结合化学计量法对盐制前后的差异性成分进行了筛选，鉴定分析出 54 个共有成分，筛选出 12 个炮制后变化的主要差异物质，为续断的质量标准提升、炮制机理探究及盐制前后的药效物质基础研究提供了参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 343-344.

[2] Tao Y, Chen L, Yan J Z. Traditional uses, processing methods, phytochemistry, pharmacology and quality control of *Dipsacus asper* Wall. ex C. B. Clarke: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 258: 112912.

[3] Sun X G, Ma G X, Zhang D W, *et al*. New lignans and iridoid glycosides from *Dipsacus asper* Wall. [J]. *Molecules*, 2015, 20(2): 2165-2175.

[4] 代琪, 叶臻, 叶俏波, 等. 续断来源考证、化学成分及药理作用综述 [J]. 中国药物评价, 2020, 37(6): 432-436.

[5] Gong L L, Yang S, Liu H, *et al*. Anti-nociceptive and anti-inflammatory potentials of *Akebia* saponin D [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 845: 85-90.

[6] Yu J H, Yu Z P, Wang Y Y, *et al*. Triterpenoids and triterpenoid saponins from *Dipsacus asper* and their cytotoxic and antibacterial activities [J]. *Phytochemistry*, 2019, 162: 241-249.

[7] 张丹, 颜学伟, 王刚, 等. 正交试验优选盐炙续断炮制工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 27-29.

[8] 彭丹, 杨小林, 黄文哲, 等. 川续断不同炮制品中总皂苷及川续断皂苷 VI、X 含量测定 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(13): 34-37.

[9] 王强, 刘二伟, 王磊, 等. LC-MS 法测定不同炮制工艺对续断化学成分含量影响 [J]. 中医药导报, 2015, 21(20): 18-20.

[10] 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*, 2019, 57(2): 122-129.

[11] 罗君, 卿娟, 张丽艳, 等. 续断片及其盐炙品高效液相指纹图谱 [J]. 信阳师范学院学报: 自然科学版, 2015, 28(2): 235-238.

[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, 张祎, 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] 任洪民, 张金莲, 邓亚羚, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的多花黄精酒制前后化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 110-121.

[15] Zhao Y M, Shi Y P. Phytochemicals and biological activities of *Dipsacus* species [J]. *Chem Biodivers*, 2011, 8(3): 414-430.

[16] Sun X G, Zhang Y F, Yang Y J, *et al*. Qualitative and quantitative analysis of furofuran lignans, iridoid glycosides, and phenolic acids in *Radix Dipsaci* by UHPLC-Q-TOF/MS and UHPLC-PDA [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 154: 40-47.

[17] 陶益, 蒋妍慧, 唐克建, 等. 续断酒炙前后化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 672-676.

[18] 陈昆南, 傅红燕, 王长军. 基于 UPLC/Q-TOF MS 技术对延胡索醋法炮制前后化学成分的研究 [J]. 化学研究与应用, 2019, 31(9): 1618-1622.

[19] 苏联麟, 李昱, 徐祯, 等. 基于多元统计分析和网络药理学的五味子醋制前后质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4643-4653.

[20] Kauno I, Tsuboi A, Nanri M, *et al*. Acylated triterpene

glycoside from roots of *Dipsacus asper* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(1): 338-339.

[21] 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.

[22] 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.

[23] 熊晓莉, 万书源, 龚来觐, 等. 现代化中药质量控制中液质联用技术的应用与展望 [J]. 现代盐化工, 2022, 49(3): 73-75.

[24] Ekeuku S O, Pang K L, Chin K Y. Effects of caffeic acid and its derivatives on bone: A systematic review [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 259-275.

[25] Liu L L, Mu H, Pang Y. Caffeic acid treatment augments the cell proliferation, differentiation, and calcium mineralization in the human osteoblast-like MG-63 cells [J]. *Phcog Mag*, 2021, 17(73): 38.

[26] 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.

[27] Park E, Lee C G, Yun S H, *et al*. Ameliorative effects of loganin on arthritis in chondrocytes and destabilization of the medial Meniscus-induced animal model [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(2): 135.

[28] Hu J M, Zhou J Y, Wu J T, *et al*. Loganin ameliorates cartilage degeneration and osteoarthritis development in an osteoarthritis mouse model through inhibition of NF-κB activity and pyroptosis in chondrocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247: 112261.

[29] 刘海倩, 梁雁翔, 鲁东昊, 等. 川续断皂苷 VI 对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞损伤的保护作用 [J]. 广东化工, 2022, 49(24): 46-48.

[30] 张友恒, 叶陈丽. 川续断皂苷 VI 不同给药方式对肺血栓小鼠的保护作用比较 [J]. 海峡药学, 2021, 33(1): 26-29.

[31] Tian X Y, Wang Y H, Yu S S, *et al*. Two novel tetrairidoid glucosides from *Dipsacus asper* [J]. *Org Lett*, 2006, 8(10): 2179-2182.

[责任编辑　郑礼胜]