基于高分辨质谱定性分析羌活指纹图谱中的特征峰

宋金玉[1#]，连云岚[2#]，郑 锌[3]，张 禄[2]，郝云芳[2]，董培智[1,2*]

（1. 山西药科职业学院，山西太原 030031；2. 山西省检验检测中心药品检验技术研究所，食品药品安全防控山西省重点试验室，山西太原 030031；3. 岛津企业管理（中国）有限公司北京分公司，北京 100081）

摘要：利用 HPLC - 高分辨质谱对羌活指纹图谱中的特征峰进行定性。羌活经过甲醇超声提取、离心取上清液，过滤后进样分析。采用电喷雾离子源、正负离子模式；质谱数据采集使用全扫描和数据依赖采集模式，经过 LabSolutions Insight 软件结合 ChemSpider 数据库检索，确认了羌活和宽叶羌活指纹图谱中 12 个特征色谱峰的元素组成及其可能的结构信息，其中 1,5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸和白花前胡乙素为首次从羌活中鉴定出来，为拓展羌活应用、完善羌活的整体质量评价体系提供了参考。

关键词：HPLC；高分辨质谱；羌活；指纹图谱；中药材

中图分类号：R917；R284.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)04-0545-12

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.04.016

Qualitative Analysis on Characteristic Peaks of *Notopterygii Rhizoma et Radix* in Fingerprints Based on High-resolution Mass Spectrometry

SONG Jinyu[1#], LIAN Yunlan[2#], ZHENG Xin[3], ZHANG Lu[2], HAO Yunfang[2], DONG Peizhi[1,2*]

(*1. Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyuan 030031; 2. Shanxi Key Lab. of Food and Drug Safety Prevention and Control, Institute of Drug Inspection Technology, Inspection and Testing Center of Shanxi Province, Taiyuan 030031; 3. Shimadzu (China) Co., Ltd., Beijing Branch, Beijing 100081*)

ABSTRACT: Qualitative analysis was performed on the characteristic peaks in the fingerprint of *Notopterygii Rhizoma et Radix* by HPLC-high-resolution mass spectrometry. *Notopterygii Rhizoma et Radix* was extracted by methanol with ultrasound, and then the supernatant was centrifuged and filtered before analysis. The electric spray ion source was used in positive and negative ion mode, and data was collected in full scan and data-dependent acquisition (DDA) modes. Then, these data were retrieved using LabSolutions Insight software combined with the ChemSpider database to confirm the elemental compositions and possible structural information on twelve characteristic chromatographic peaks in *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang and *Notopterygium franchetii* H. de Boiss. Among them, 1,5-*O*-dicaffeoylquinic acid and praeruptorin B were identified for the first time from *Notopterygii Rhizoma et Radix*. This study provided a reference for expanding the application of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and improving the overall quality evaluation system of *Rhizoma et Radix Notopterygii*.

Key Words: HPLC; high-resolution mass spectrometry; *Notopterygii Rhizoma et Radix*; fingerprint; Chinese medicinal material

羌活（*Notopterygii Rhizoma et Radix*）为伞形科植物羌活（*Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang）或宽叶羌活（*Notopterygium franchetii* H. de Boiss.）的干燥根茎及根，功效为解表散寒、祛风除湿、通痹止痛，是治疗四时风寒湿痹的要药[1]。羌活的化学成分[2]复杂、药理活性广泛。现代药理学研究[3]表明，羌活具有抗炎、抗菌、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤细胞增殖、解热镇痛等活性，且对心脑血管系统、消化系统、呼吸系统和中枢神经系统有显著影响。还有研究[4]显示，羌活中的紫花前胡苷有改善学习和记忆等作用；香豆素类化合物，如羌活醇、薄荷醇和异欧前胡素，具有抗炎、镇痛、抗肿瘤和抗凝活性[5]；异欧前胡素等化合物可通过与3CL水解酶和血管紧张素转换酶2结合而调节多种信号通路[6]，临床多用于治疗风寒感冒、头痛项强、风湿痹痛和肩背酸痛。

羌活药材主要分布于我国陕西、四川、甘肃、青海、云南、西藏等地，生长于海拔2 000～4 000 m的林缘及灌丛内[7]，是中、藏、羌医药体系中的常用药材，药用历史悠久。自1995年以来，羌活的野生资源量呈急剧下降趋势，其市场价格大幅增长。在利益驱动下，掺假、以次充好的现象较普遍[8]。所以，建立能有效评价羌活质量的检测方法就显得尤为重要。

2020年版ChP一部规定了羌活HPLC特征谱图中的4个特征峰，分别是羌活醇、阿魏酸苯乙醇酯、异欧前胡素、镰叶芹二醇。研究[7,9—10]表明，羌活中的天然产物种类较多，主要有挥发油类、萜类、香豆素类、糖苷类、酚酸类以及倍半萜类等化合物。为了更加全面地表征羌活质量，以及评价药材真伪、区分品种和产地因素带来的药材疗效差异，本课题组前期采用GC结合HPLC法研究了羌活中的挥发性和非挥发性成分，建立了羌活HPLC指纹图谱，对222批次的羌活及伪品进行了有效鉴别与区分，并确立了羌活中9个特征峰、宽叶羌活中7个特征峰作为质量控制的关键化合物[1]。

但前期已发表的HPLC指纹图谱[1]中仍有部分成分未能确认。为此，本研究采用HPLC-高分辨质谱法，对前期研究中未能确认的特征峰进行鉴定，最终识别出绿原酸、二咖啡酰奎宁酸、白花前胡乙素等12个特征化合物。本研究对进一步拓展羌活应用、完善羌活的整体质量评价体系具有重要意义。

1　仪器与试药

Nexera X2型超高效液相色谱系统-LC/MS-9030型四极杆-飞行时间质谱（Q-TOF）联用仪（日本岛津公司）；Q-Exactive型高分辨液质联用仪（美国Thermo公司）；DV215CD型电子天平（美国奥豪斯公司）。

羌活醇（含量>99.9%，批号111820-201705）、异欧前胡素（含量>99.6%，批号110827-201812）、阿魏酸（含量>99.0%，批号110773-201915）、白花前胡乙素（含量99.7%，批号111904-202105）、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸（含量95.9%，批号111782-202208）、4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸（含量94.9%，批号111894-202205）、1,3-*O*-二咖啡酰奎宁酸（含量94.5%，批号111717-201404）的对照品均购自中国食品药品检定研究院；1,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸（含量99.46%，批号MUST-23060110）和3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸（含量99.84%，批号MUST-23042612）的对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司；羌活及宽叶羌活采集于四川小金县，经山西省食品药品检验所崔宇宏主任药师分别鉴定为羌活及宽叶羌活药材；甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件和质谱条件

色谱条件：色谱柱Inertsil ODS-3柱（2.1 mm×250 mm，5 μm）；流动相A为0.1%甲酸溶液，B为乙腈，梯度洗脱（0—25.0 min，B 15%—38%；25.1—45.0 min，B 38%—50%；45.1—55.0 min，B

[#] 对文章贡献等同。

收稿日期：2023-05-11

基金项目：山西省2020年度职业院校教师素质提高计划中高职教师素质协同提升项目（CXTD2020-11）、食品药品安全防控山西省重点实验室资金项目（202204010931006）

作者简介：宋金玉（1971—），男，副教授，从事药物分析研究。

连云岚（1972—），女，主任药师，从事中药质量研究。

通信作者：董培智（1973—），男，博士，主任药师，从事食品药品质量研究。

E-mail：peizhid@126.com

50%—75%；55.1—70.0 min，B 75%—85%；70.1—80.0 min，B 85%—15%）；检测波长 310 nm；流速 0.2 mL/min；柱温 25 ℃；进样量 2 μL。

质谱条件：离子源 $ESI^{+/-}$；接口电压 4.5 kV；雾化气 3.0 L/min；加热气流量 10.0 L/min；干燥气流量 10.0 L/min；接口温度 300 ℃；DL 管温度 250 ℃；加热块温度 400 ℃；校准方法 外标（NaI）法校准质量数，分辨率 >30 000，质量误差 $<2\times10^{-6}$；扫描模式 MS 全扫描模式 *m/z* 100 ～ 1 000、MS/MS 数据依赖采集（data-dependent acquisition，DDA）模式 *m/z* 50 ～ 1 000。

2.2 样品前处理

取羌活粉末约 0.4 g，置锥形瓶中，加入甲醇 50 mL，超声处理 30 min，放冷，摇匀，于 10 ℃离心（2 775×*g*）10 min，取上清液，过滤，取续滤液过微孔滤膜（0.22 μm），即得。

2.3 数据解析

本试验在上述色谱分离条件下，对羌活及宽叶羌活的指纹图谱进行分析，确定了其中 12 个色谱峰，使用岛津 LabSolutions Insight 软件（版本 3.80）对色谱峰进行提取鉴定，包括元素组成及碎片归属。质谱图结构分析由 ACD/Labs Ver2012 软件完成。

2.4 羌活醇及异欧前胡素的质谱裂解规律

根据之前建立的羌活和宽叶羌活 HPLC 指纹图谱条件 [1]，对羌活醇、阿魏酸苯乙醇酯、异欧前胡素等峰的质谱碎裂规律进行了探索。

羌活醇峰在 ESI^{+} 模式下的准分子离子峰为 355.154 1，选择母离子进行碰撞诱导解离（collision induced dissociation，CID）裂解，在二级质谱图中出现 *m/z* 337.142 9、309.147 8、281.080 0、239.033 3、215.069 7、163.038 2 等特征碎片离子。其中，碎片离子 *m/z* 337.142 9 是羌活醇的 C17 位发生脱水反应，即母核脱去 1 分子水形成的，*m/z* 309.147 8 是羌活醇头部内酯发生逆狄尔斯 - 阿德尔（retro Diels-Alder，RDA）反应，进一步丢失 1 分子 CO 形成的；另一条裂解途径是，在补骨脂型香豆素的酚羟基侧链上发生环化，形成 *m/z* 281.080 0 的碎片离子，进一步脱去烷基和呋喃环，则生成 *m/z* 239.033 3、215.069 7、163.038 2 的碎片离子。呋喃型香豆素衍生物以脱羰基、脱羧基为基本特征，羌活醇由于 C8 位取代基的活性较强，其质谱裂解规律与呋喃型香豆素裂解途径差别较大。羌活醇的二级质谱及可能的裂解途径如图 1A 和图 2 所示。

异欧前胡素峰的准分子离子峰为 *m/z* 271.096 5，将母离子进行裂解，在二级质谱图中出现了 *m/z* 203.034 2、175.039 0、159.044 1、147.043 9、131.048 8、119.049 1、91.054 0 等特征碎片离子。其中 *m/z* 203.034 2 的碎片离子是呋喃型香豆素 C5 位置取代基—C_5H_8 脱去产生的，进一步脱去羰基，则形成 *m/z* 175.039 0 的碎片离子。由于 *m/z* 203.034 2 的碎片离子是内酯结构，可失去 CO_2 形成分子，得到 *m/z* 159.044 1 的碎片离子；在此基础上进一步脱羰基，生成 *m/z* 131.048 8 的碎片离子；呋喃环打开，与中间的五元环重排，形成六元环，得到 *m/z* 119.049 1 的碎片离子；再进一步脱去羰基形成七元共轭环状结构，得到 *m/z* 91.054 0 的碎片离子。异欧前胡素二级质谱图以及可能的裂解途径如图 1B 和图 3 所示。异欧前胡素在 Q-TOF 上的裂解

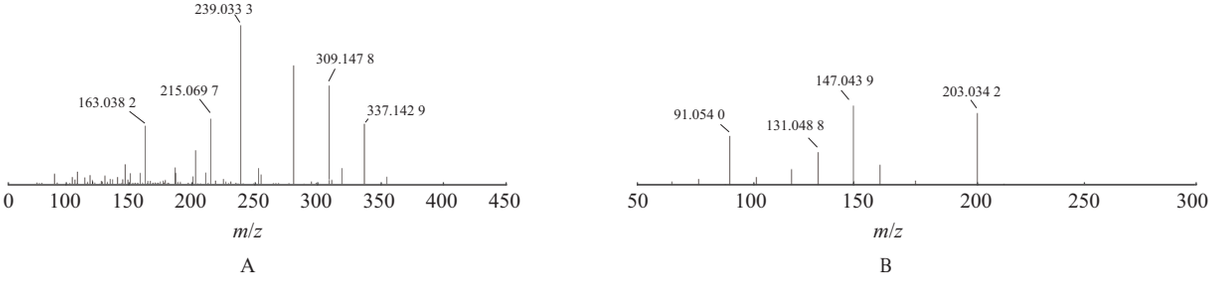


图 1 正离子模式下羌活醇（A）以及异欧前胡素（B）的二级质谱图

Fig.1 Secondary Mass Spectra of Notopterol（A）and Isoimperatorin（B）in Positive Ion Mode

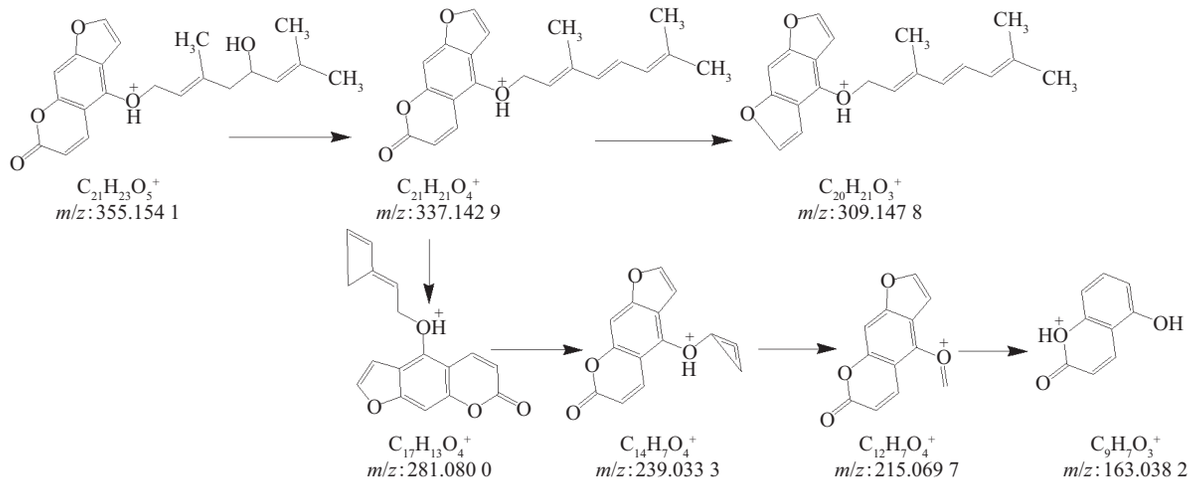


图 2　正离子模式下羌活醇的可能裂解途径

Fig.2　Possible Fragmentation Pathway in Positive Ion Mode of Notopterol

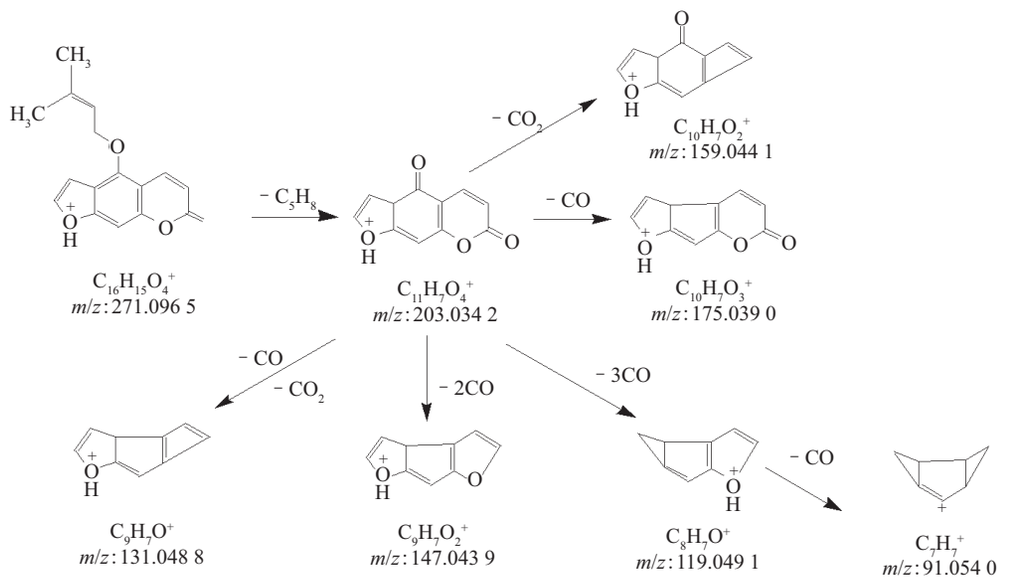


图 3　正离子模式下异欧前胡素的可能裂解途径

Fig.3　Possible Fragmentation Pathway in Positive Ion Mode of Isoimperatorin

规律与文献[9,11—12]的报道一致。

2.5　羌活指纹图谱和宽叶羌活指纹图谱中特征峰的定性分析

指纹图谱[1]（图 4）显示，在 310 nm 处羌活及宽叶羌活有 8 个共有峰。参考羌活醇、异欧前胡素的裂解途径，本研究鉴定了其中香豆素类以及酚酸类的组成及结构。

质谱定性分析结果显示，图中编号相同的峰属同一化合物。峰 1 的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 355.102 0，使用 Formula Predictor 软件（版本 1.06），设定碳氢比、氮规则、同位素，预测其可能的分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$，同位素得分为 99.39，与理论值偏差仅 -1.01×10^{-6}，以该分子式于 ChemSpider 网站（https://www.chemspider.com/）进行检索，仅找到 1

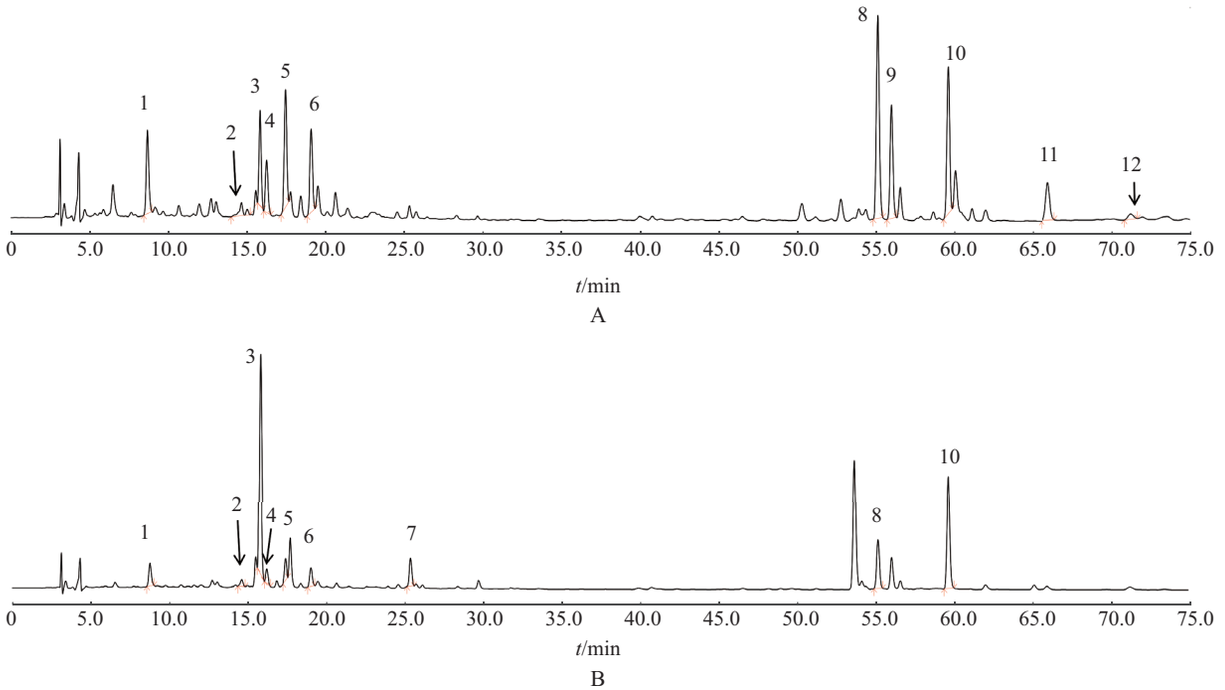


图 4 羌活（A）和宽叶羌活（B）的指纹图谱特征峰 [1]

Fig.4 Fingerprint Characteristic Peaks of *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang（A）and *Notopterygium franchetii* H. de Boiss.(B) [1]

个结果，即为绿原酸。为了进一步验证峰 1 化合物的结构，对 *m/z* 355.102 0 的碎片离子进行二级质谱解析，结果如图 5A 所示。*m/z* 355.102 0 碎片离子主要包括 *m/z* 163.038 3、145.027 6、135.044 0、117.032 9、89.039 0，Formula Predictor 软件预测上述碎片离子的元素组成分别为 $C_9H_7O_3^+$、$C_9H_5O_2^+$、$C_8H_7O_2^+$、$C_8H_5O^+$、$C_7H_5^+$。母离子 $C_{16}H_{19}O_9^+$ 很容易失去 1 分子 $C_7H_{12}O_6$，形成 $C_9H_7O_3^+$；然后逐渐失去 1 分子 H_2O 或 1 分子 CO，分别生成 $C_9H_5O_2^+$ 或 $C_8H_7O_2^+$；再失去 1 分子 H_2O 生成 $C_8H_5O^+$、或脱去 CO 形成 $C_7H_5^+$。根据二级质谱图绘制出绿原酸可能的碎裂规律，如图 5B 所示，结果可见二级质谱峰归属合理，因此推断峰 1 为绿原酸。

峰 2 化合物的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 365.086 4，Formula Predictor 软件预测其可能的分子式为 $C_{17}H_{16}O_9$，同位素得分为 98.56，ChemSpider 网站显示其可能的结构有 9 种。为了进一步验证峰 2 的结构，对 *m/z* 365.086 4 进行二级质谱检测。如图 6 所示，其主要碎片为 *m/z* 203.033 4、147.043 4，对应的分子式可能为 $C_{11}H_7O_4^+$、$C_9H_7O_2^+$。根据异欧前胡素的二级碎裂规律，显然，这 2 个碎片都是香豆素类化合物的特征碎片。这说明峰 2 化合物具有香豆素母核，$C_{17}H_{17}O_9^+$ 脱去 1 个 $C_6H_{10}O_5$ 形成 $C_{11}H_7O_4^+$、进而失去 2CO 形成 $C_9H_7O_2^+$ 的碎片。由此推测峰 2 化合物可能为 4 位或 9 位糖苷化的补骨脂型香豆素化合物，典型代表化合物为佛手酚葡萄糖苷。

峰 3 化合物的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 409.149 2，Formula Predictor 软件预测其可能的分子式为 $C_{20}H_{24}O_9$，同位素得分为 92.88，ChemSpider 网站显示其可能的结构有 5 种。为了进一步验证峰 3 化合物的结构，对 *m/z* 409.149 2 进行二级质谱检测。如图 7A 所示，其主要碎片为 *m/z* 247.096 1、229.085 4、187.039 1、159.043 3，对应的分子式可能为 $C_{14}H_{15}O_4^+$、$C_{14}H_{13}O_3^+$、$C_{11}H_7O_3^+$、$C_{10}H_7O_2^+$。二级质谱图显示，$C_{20}H_{25}O_9^+$ 首先脱去 1 分子 $C_6H_{10}O_5$ 生成 $C_{14}H_{15}O_4^+$，再脱去 1 分子 H_2O 形成 $C_{14}H_{13}O_3^+$，失去 C_4H_6 或 C_3H_6 形成 $C_{10}H_7O_3^+$、$C_{11}H_7O_3^+$，$C_{11}H_7O_3^+$ 再脱去 CO 形成 $C_{10}H_7O_2^+$。显然，*m/z* 187.039 1 为紫

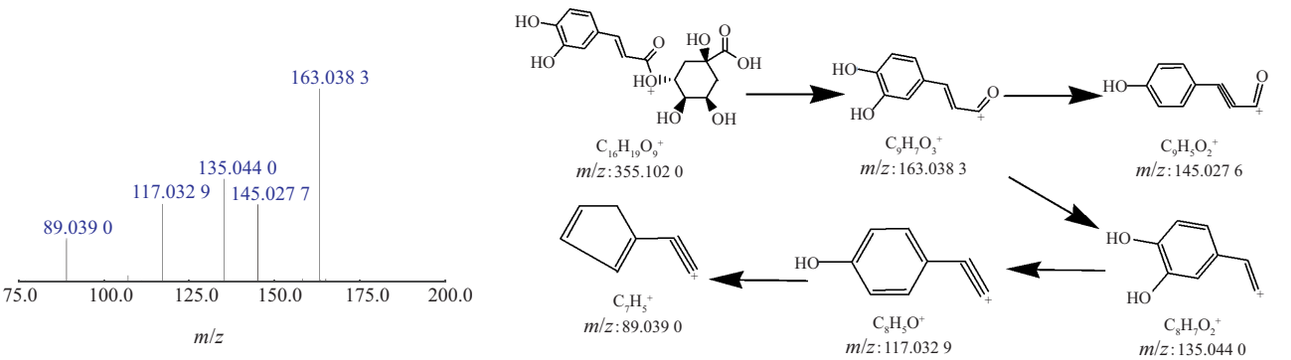


图 5　未知峰 1 化合物的二级质谱图（A）及其可能的裂解规律（B）

Fig.5　Secondary Mass Spectrum (A) of Unknown Peak 1 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern (B)

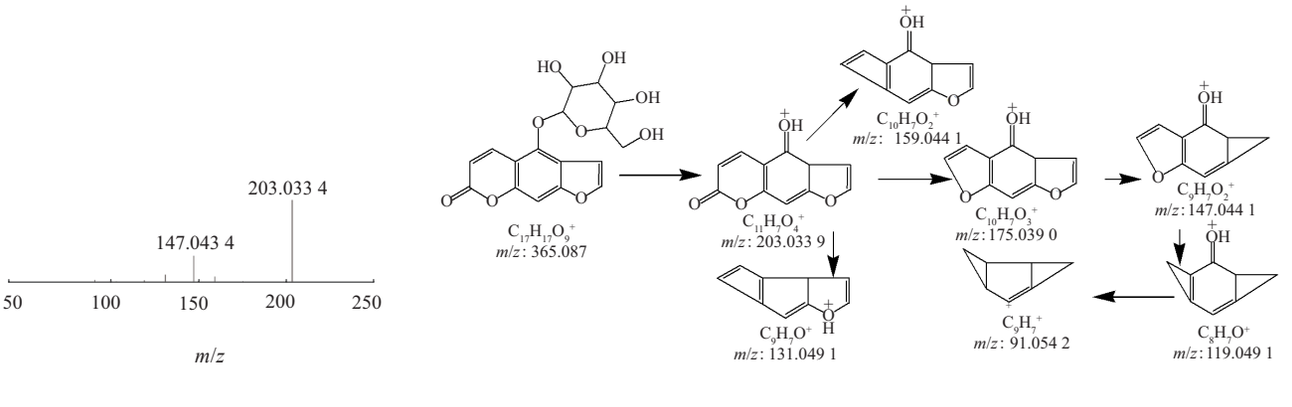


图 6　未知峰 2 化合物的二级质谱图（A）及其可能的裂解规律（B）

Fig.6　Secondary Mass Spectrum (A) of Unknown Peak 2 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern (B)

花前胡苷内酯型香豆素的特征峰，因此推断峰 3 对应的化合物为紫花前胡苷。根据 *m/z* 409.149 2 的二级质谱图信息，结合紫花前胡苷结构绘制了可能的碎裂规律图（图 7B），结果二级质谱峰归属拟合良好。

峰 4 化合物的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 165.054 5，Formula Predictor 软件预测其可能的分子式为 $C_9H_8O_3$，同位素得分为 98.69，ChemSpider 网站显示其可能的结构有 11 种，以酚酸类或苯甲酸酯类为主。为了进一步验证峰 4 化合物的结构，对 *m/z* 165.054 5 进行二级质谱检测。如图 8A 所示，其主要碎片为 *m/z* 147.043 9、119.049 0、91.054 1，对应的分子式可能为 $C_9H_7O_2^+$、$C_8H_7O^+$、$C_7H_7^+$。二级质谱图显示，$C_9H_9O_3^+$ 首先脱去 1 分子 H_2O 生成 $C_9H_7O_2^+$，再脱去 1 分子 CO 形成 $C_8H_7O^+$，再失去 CO 形成 $C_7H_7^+$。然而，二级图谱中没有出现脱甲氧基的信息，由此推测峰 4 为酚酸类化合物。对其进行负离子模式分析，如图 8B 显示，主要碎片为 *m/z* 119.050 2、93.034 4。对应的分子式为 $C_8H_7O^-$、$C_6H_5O^-$。$C_9H_7O_3^-$ 脱去 1 分子 CO_2 生成 $C_8H_7O^-$，再失去 C_2H_2 生成 $C_6H_5O^-$，$C_6H_5O^-$ 是苯酚的分子离子 $[M-H]^-$，因此峰 4 化合物可能为对羟基肉桂酸。可能的碎裂规律如下图 8C 所示。

峰 5 化合物的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 195.065 4，Formula Predictor 软件预测其可能的分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$，同位素得分为 99.22，ChemSpider 网站

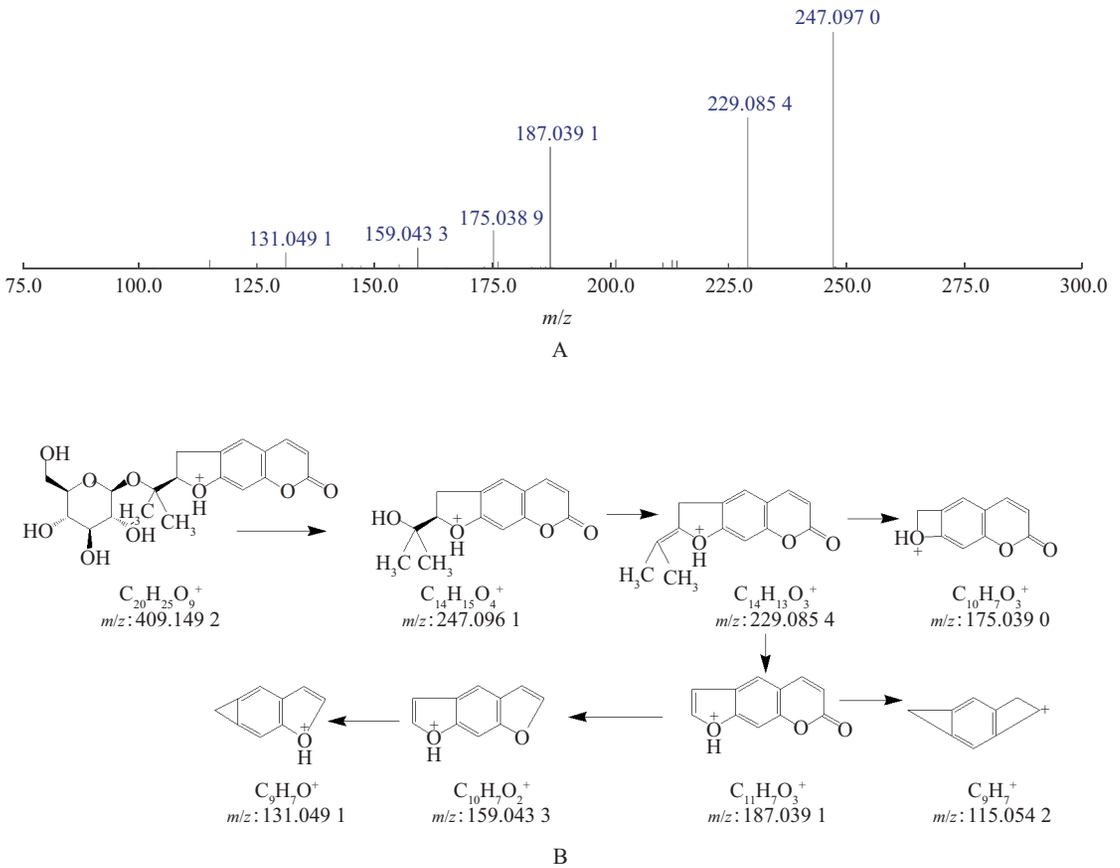


图 7 未知峰 3 化合物的二级质谱图（A）及其可能的裂解规律（B）

Fig.7 Secondary Mass Spectrum (A) of Unknown Peak 3 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern (B)

显示其可能的结构有 1 种，即阿魏酸。因此对其进行负离子模式分析（图 9A），其 $[M-H]^-$ 为 *m/z* 193.050 9，碎片离子主要为 *m/z* 178.027 2、149.060 5、133.029 4，可能的碎裂规律如图 9B 所示。

峰 6 化合物的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 517.133 6，Formula Predictor 软件预测其可能分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$，同位素得分为 90.68，ChemSpider 网站显示其可能的结构有 1 种，即二咖啡酰奎宁酸。对其进行二级质谱检测。如图 10A 所示，其主要碎片为 *m/z* 163.038 2、145.027 5、135.044 0，对应的分子式可能为 $C_9H_7O_3^+$、$C_8H_7O_2^+$。咖啡酸的取代位置尚无法判断，其可能的碎裂规律如下图 10B 所示。

峰 7 化合物仅存在于宽叶羌活中，$[M+H]^+$ 为 *m/z* 585.195 9，Formula Predictor 软件预测其可能的分子式为 $C_{30}H_{32}O_{12}$，同位素得分为 83.80，ChemSpider 网站显示其可能的结构有 3 种。对 *m/z* 585.195 9 进行二级质谱检测，如图 11A 所示，其主要碎片为 *m/z* 247.095 6、229.085 0、177.053 6、145.027 3，对应的分子式可能为 $C_{14}H_{15}O_4^+$、$C_{14}H_{13}O_3^+$、$C_{10}H_9O_3^+$、$C_9H_5O_2^+$。根据特征碎片离子 *m/z* 247.095 6、229.085 0 判断其可能为紫花前胡内酯型香豆素取代化合物，结合文献报道[11—12]，其可能为 6′-*O*- 阿魏酰紫花前胡苷。其可能的碎裂规律如图 11B 所示。

峰 8、峰 9 和峰 10 化合物对应的一级及二级质谱信息分别与羌活醇、阿魏酸苯乙醇酯和异欧前胡素匹配良好。

峰 11 化合物的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 299.164 2，Formula Predictor 软件预测其可能的分子式为 $C_{19}H_{22}O_3$，同位素得分为 99.58，ChemSpider 网站

显示其可能的结构有 14 种。对其进行二级质谱分析（图 12A），主要碎片离子为 *m/z* 175.038 9、147.043 5、91.053 9，分别对应 $C_{10}H_7O_3^+$、$C_9H_7O_2^+$、$C_7H_7^+$。$C_{19}H_{23}O_3^+$ 脱去 1 个长的碳链 C_9H_{16} 形成了 $C_{10}H_7O_3^+$ 的碎片。因此，该化合物可能还有 1 个碳链取代，且不饱和度为 2，即取代基上还有 2 个双键或 1 个三键等。由此推断，峰 11 化合物可能为王草素，可能的裂解规律如图 12B 所示。

峰 12 化合物的 $[M+H]^+$ 为 *m/z* 427.174 8，Formula Predictor 软件预测其可能的分子式为 $C_{24}H_{26}O_7$，同位素得分为 98.56，ChemSpider 网站显示其可能的结构有 9 种。对其进行二级质谱分析，主要碎片离子为 *m/z* 327.123 4、245.080 2、217.085 3。如图 13A 所示，分别对应 $C_{19}H_{19}O_5^+$、$C_{14}H_{13}O_4^+$、$C_{13}H_{13}O_3^+$。$C_{24}H_{27}O_7^+$ 脱去 1 个 $C_5H_8O_2$ 基团形成了 $C_{19}H_{19}O_5^+$ 的碎片，再次脱去 C_5H_6O 生成了 $C_{14}H_{13}O_4^+$，再失去 1 分子 CO 形成 $C_{13}H_{13}O_3^+$。因此该化合物可能为白花前胡乙素，可能的裂解规律如图 13B 所示。

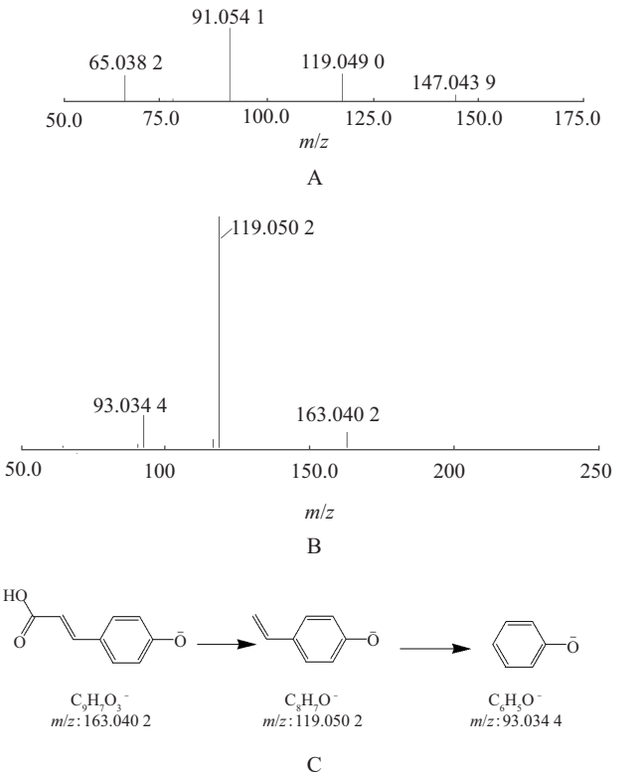


图 8　未知峰 4 化合物的二级质谱图（A—正离子模式；B—负离子模式）**及其可能的裂解规律**（C）

Fig.8　Secondary Mass Spectrum（A—in Positive Ion Mode; B—in Negative Ion Mode）of Unknown Peak 4 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern（C）

2.6　对白花前胡乙素和二咖啡酰奎宁酸的确认

取对照品及样品制备后，采用高分辨液质联用仪对样品中白花前胡乙素和二咖啡酰奎宁酸进行了确认。色谱中出现了与白花前胡乙素对照品保留时间（64.1 min）相同的色谱峰，两者的一级质谱（$[M+NH_3]^+$=444.20）、二级质谱及丰度比均一致，二级离子碎片为：*m/z* 327.120 9、245.079 6、227.068 9、83.048 6 和 55.054 3，与文献[13—14]结果相同（色谱和质谱图存编辑部），确认羌活样品中含有白花前胡乙素，上述对未知峰 12 化合物的推测正确。

利用 5 种二咖啡酰奎宁酸对照品对羌活样品中二咖啡酰奎宁酸的取代位置进行确认。结果显示，在同一色谱条件下，5 种对照品保留时间不一，按

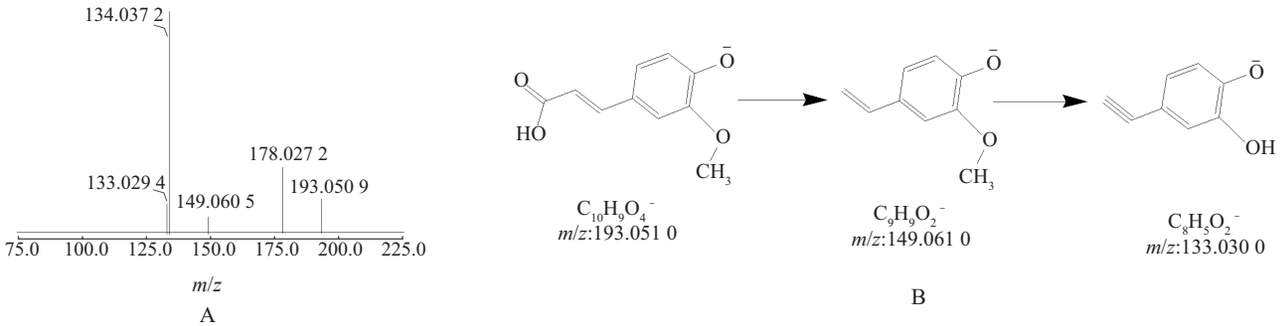


图 9　未知峰 5 化合物的二级质谱图（A）**及其可能的裂解规律**（B）

Fig.9　Secondary Mass Spectrum（A）of Unknown Peak 5 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern（B）

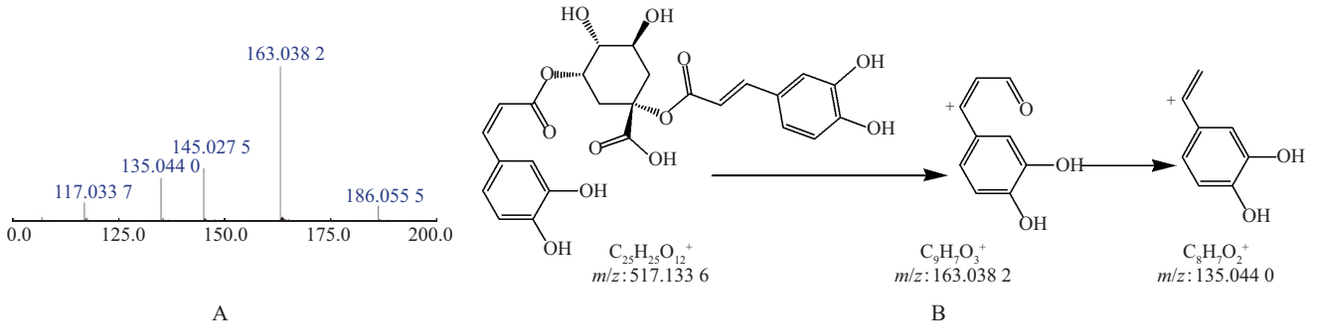


图 10 未知峰 6 化合物的二级质谱图（A）及其可能的裂解规律（B）

Fig.10 Secondary Mass Spectrum (A) of Unknown Peak 6 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern (B)

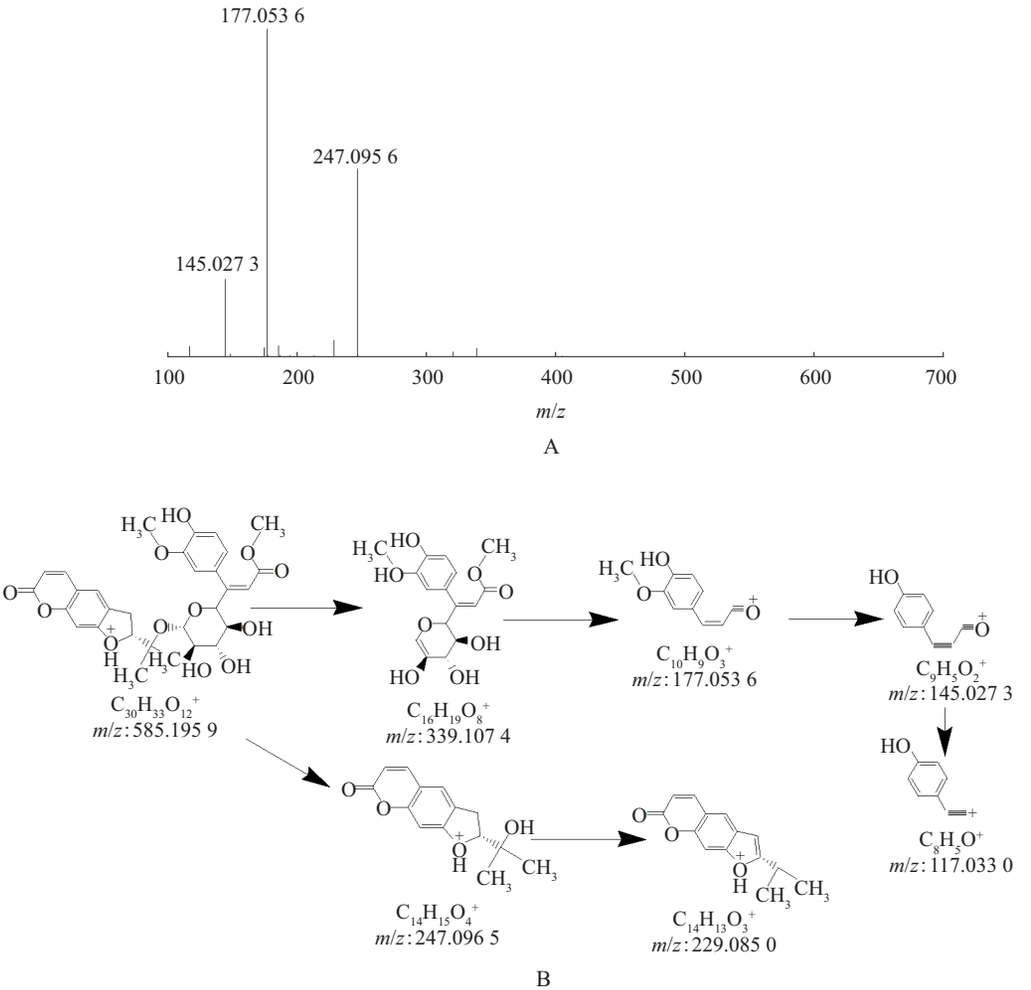


图 11 未知峰 7 化合物的二级质谱图（A）及其可能的裂解规律（B）

Fig.11 Secondary Mass Spectrum (A) of Unknown Peak 7 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern (B)

照出峰顺序先后为：1,3-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸、3,4-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸、1,5-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸和 4,5-*O*- 二咖啡酰基奎宁酸，保留时间分别为 7.2、16.27、16.48、16.85 和 18.67 min。负离子模式下，5 种对照品二级离子碎片有一些差异，共同的碎片主要为：*m/z* 353.090 6、

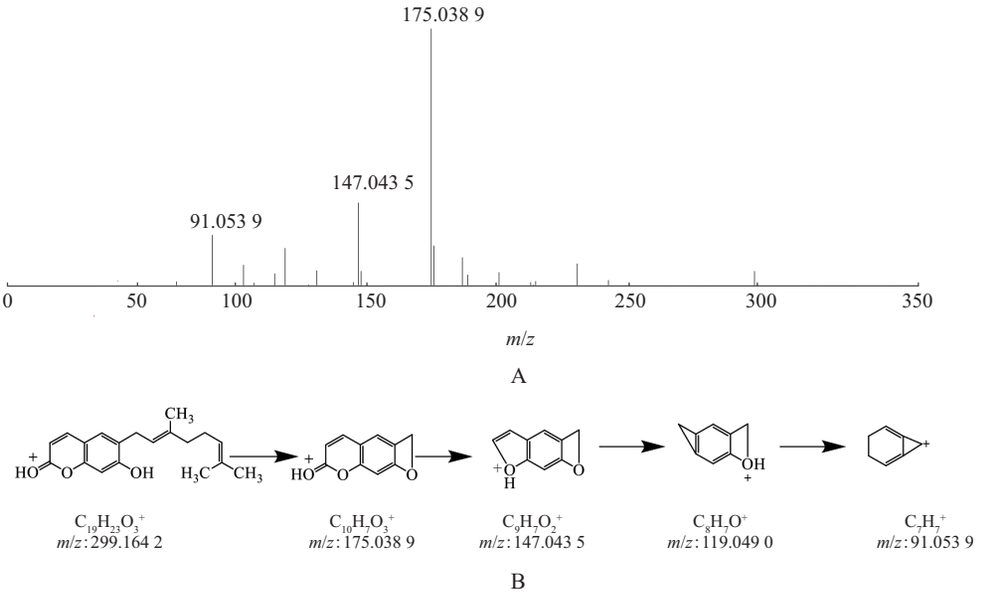


图 12　未知峰 11 化合物的二级质谱图（A）及其可能的裂解规律（B）

Fig.12　Secondary Mass Spectrum (A) of Unknown Peak 11 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern (B)

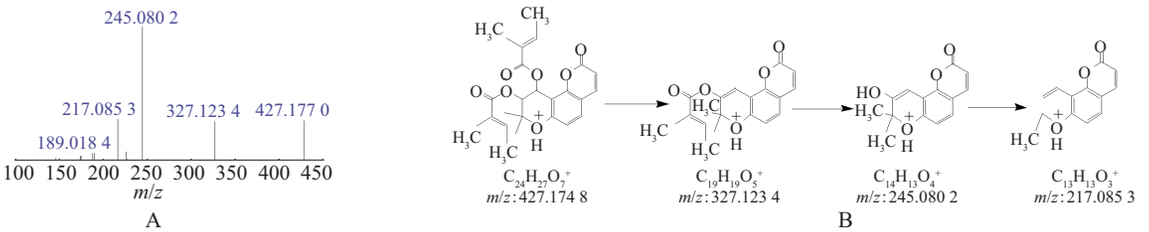


图 13　未知峰 12 化合物的二级质谱图（A）及其可能的裂解规律（B）

Fig.13　Secondary Mass Spectrum (A) of Unknown Peak 12 Compound and Its Inferred Fragmentation Pattern (B)

191.056 7、179.035 4、161.024 4、135.044 8 等，与文献[15—16]报道结果一致。各离子碎片丰度比有显著区别，因此可通过对比色谱保留时间和二级离子碎片以及丰度比，确认羌活样品中二咖啡酰奎宁酸的取代位置。试验表明，羌活样品中二咖啡酰奎宁酸保留时间为 16.47 min，二级质谱碎片为 *m*/*z* 353.090 3、191.056 5、179.035 1、161.024 4、135.044 8 等，其保留时间、二级质谱离子碎片及丰度比均与 1,5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸对照品一致（色谱和质谱图存编辑部），故确认未知峰 6 化合物中咖啡酸的取代位置为 1,5 位。

对 12 个未知峰信息进行汇总（表 1），可见高分辨质荷比的实测值与理论值的误差均在 2×10^{-6} 以内。再结合二级碎片离子的合理归属，确定了羌活及宽叶羌活指纹图谱中的未知峰。

3　讨论

已有报道从羌活中分析鉴定了多种成分，例如，郭慧清[17]从 3 种商品规格羌活提取物中分析鉴定了 34 个化学成分，包括 24 个香豆素类化合物、7 个酚酸类化合物、2 个黄酮类化合物和 1 个聚烯炔类化合物；罗鑫等[18]从羌活的 70% 乙醇提取物中分离得到 14 个化合物。XIE 等[19]使用 HPLC-Q-TOF/MS 法鉴定了羌活中的 33 种化合物。本研究采用 HPLC-Q-TOF 技术，对羌活的指纹图谱特征峰进行研究，共鉴定出 12 种化合物。参考羌活醇、异欧前胡素等已知峰裂解规律和特征碎片进行筛查，

表 1 羌活与宽叶羌活中非挥发性天然产物的组成

Tab.1 Composition of Non Volatile Natural Products in *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang and *Notopterygium franchetii* H. de Boiss.

共有峰峰号	化合物名称	分子式	保留时间 /min	理论 $[M+H]^+$	实测 $[M+H]^+$	误差 /$\times10^{-6}$
1	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	8.884	355.102 4	355.102 0	－1.01
2	佛手酚葡萄糖苷	$C_{17}H_{16}O_9$	14.830	365.086 7	365.086 4	－0.85
3	紫花前胡苷	$C_{20}H_{24}O_9$	15.999	409.149 3	409.149 2	－0.27
4	反式对羟基肉桂酸	$C_9H_8O_3$	16.418	165.054 6	165.054 5	－0.73
5	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	17.617	195.065 2	195.065 4	1.10
6	1,5-*O*- 二咖啡酰奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	19.235	517.134 0	517.133 6	－0.88
7	6′-*O*- 阿魏酰紫花前胡苷	$C_{30}H_{32}O_{12}$	25.529	585.196 6	585.195 9	1.32
8	羌活醇	$C_{21}H_{22}O_5$	55.299	355.154 0	355.154 1	0.25
9	阿魏酸苯乙醇酯	$C_{18}H_{18}O_4$	56.154	299.127 8	299.127 8	0.05
10	异欧前胡素	$C_{16}H_{14}O_4$	59.822	271.096 5	271.096 6	0.42
11	王草素	$C_{19}H_{22}O_3$	66.098	299.164 2	299.164 2	0.10
12	白花前胡乙素	$C_{24}H_{26}O_7$	71.535	427.175 1	427.174 8	－0.77

结合精确相对分子质量和相关文献信息，对羌活中12 种香豆素类、酚酸类化合物进行鉴定及碎片归属研究。其中，二咖啡酰奎宁酸、白花前胡乙素为首次从羌活属植物中分离得到，均未见文献报道。

结合文献[20—21]，羌活中香豆素类化合物共有4 种类型，即补骨脂型香豆素、角型呋喃香豆素、线型呋喃香豆素、二氢呋喃香豆素；其质谱特点在正离子模式下，连续丢失 CO 中性分子。补骨脂型香豆素二级质谱图中会出现 *m/z* 337 和 281 碎片，以羌活醇（峰 8）为例，碎片离子 *m/z* 337 是羌活醇的 C17 位发生脱水反应，母核脱去 1 分子水形成的，酚羟基侧链上发生环化时则形成 *m/z* 281。角型呋喃香豆素的特征离子是 *m/z* 131，*m/z* 203 在角型呋喃香豆素中信号极其微弱，如异补骨脂素准分子离子连续失去 CO 中性分子所得到的产物离子 *m/z* 159、131、103。茴芹内酯在二级质谱图中 *m/z* 203→*m/z* 175、*m/z* 217→*m/z* 161 分别为丢失 1 分子 CO 和 2 分子 CO 的裂解过程。二级质谱中 *m/z* 217 是由准分子离子连续失去 2 个甲基自由基得到的产物离子，结构中有 2 个甲氧基取代。线型呋喃香豆素质谱特征为 *m/z* 203 和 *m/z* 147，如异欧前胡素（峰 10），在一级谱图中，异欧前胡素丢失 C5 侧链后得到的产物离子（*m/z* 203）信号明显，该产物离子接着丢失 CO_2 中性分子或者丢失 2 分子 CO 中性分子，分别得到产物离子 *m/z* 159 或 *m/z* 147，体现了内酯的质谱裂解特点。在二级质谱图中，*m/z* 147 丢失或连续丢失 CO 得到 *m/z* 119、*m/z* 91 碎片，如本研究中峰 2 佛手酚葡萄糖苷的离子碎片。二氢呋喃香豆素如紫花前胡苷（峰 3）结构中的呋喃环 C2’和 C3’位被氢取代，而且在 C2’位存在取代基；因此，其裂解途径与羌活醇或异欧前胡素不同。在正离子模式下，一级质谱图中，紫花前胡苷（如峰 3）的分子结合钠离子形成准分子离子 $[M+Na]^+$，C1″位糖苷键断裂产生的产物离子 *m/z* 247 信号明显。该离子进一步以丢失 1 分子 H_2O 的方式脱羟基，得到 *m/z* 229 离子，或者失去 C_3H_8O（**Δ***m*=60）中性片段以脱除整个 C2’位侧链，得到 *m/z* 187 产物离子，如本研究中峰 7（6′-*O*- 阿魏酰紫花前胡苷）。在二级质谱图中还检测到连续丢失 CO 的香豆素特征信号（*m/z* 187→*m/z* 159，*m/z* 159→*m/z* 131），以及 C2’异丙醇取代所引起的 CH_4 中性丢失信号（*m/z* 229→*m/z* 213）。

总结羌活中酚酸类化合物的裂解规律，绿原酸（峰 1）的特征碎片与其咖啡酰基、奎宁酰基有关，主要碎片离子为 *m/z* 163、135[22]。对羟基苯甲酸类化合物（峰 4）含有羟基和羰基，在 ESI 离子源电离时既可脱去氢离子显示电负性，又可带氢离子显示电正性。大多数在负模式 $[M-H]^-$ 下响应较高，宜采用负模式进行测定。对羟基苯甲酸类的分子式差异主要为 R1、R2 和 R3 基团的不同，除了 3,5- 二氯对羟基苯甲酸甲酯，其他化合物失去 R1 基团后，一般可产生 *m/z* 136 碎片。该碎片

经过二次或三次碎裂，可得到 *m/z* 108 和 93，其余的碎片主要来源于［R1－O］$^{-}$[23]。阿魏酸（峰 5）去质子化离子的 MS 谱图中主要产生 3 个碎片离子，分别为 *m/z* 178、149、133，即母离子分别丢失甲基自由基、CO_2 和以上二者（甲基自由基 +CO_2）获得[24]。二咖啡酰奎宁酸（峰 6）特征离子主要与咖啡酰奎宁酸有关，正离子模式下二级质谱碎片主要为 *m/z* 355（咖啡酰奎宁酸 +H），以及单啡酰基奎宁酸的特征离子 *m/z* 193（咖啡酰奎宁酸 － 奎宁酸）、181（咖啡酰奎宁酸 － 咖啡酸）、175（咖啡酰基奎宁酸 － 奎宁酸 －H_2O）、163（咖啡酰基奎宁酸 － 咖啡酸 －H_2O）、135（咖啡酰基奎宁酸 － 咖啡酸 －CO）等[16]。

对于液相色谱图中未知色谱峰的定性，一般遵循 2 个思路：一是采用放大制备的思路将未知化合物纯化分离得到单品，利用核磁强大的定性能量，直接得出化合物的分子组成及结构信息；二是将液相色谱直接串接高分辨质谱，获得化合物的高分辨质荷比，由此判断未知化合物的分子式和组成，然后通过查询数据库或根据二级碎片信息推测化合物的可能结构。高分辨质谱用于未知样品的定性无需样品的制备和纯化，可以直接将液相色谱条件平移至液质联用条件，大幅节省了分析时间及方法开发成本。

本研究采用 Q-TOF 多数据采集结合数据库实现了羌活中指纹峰的快速鉴定，羌活及宽叶羌活中共 12 种香豆素类及有机酸化合物可以作为羌活质量控制的靶标物质，为羌活的质量控制及药效学研究提供参考。

致谢：岛津企业管理（中国）有限公司的冀峰和李月琪 2 位工程师对本研究过程提供帮助。

参考文献：

［1］ 张远芳，连云岚，郝云芳，等．羌活与宽叶羌活的 GC/HPLC 指纹图谱研究［J］．中国药事，2019, **33**(5)：45-53.

［2］ 唐国琳，黄　凤，高天元，等．HPLC 同时测定宽叶羌活药材中 5 种成分含量［J］．中药与临床，2018, **9**(6)：14-17.

［3］ 马丽梅，杨军丽．羌活药材的化学成分和药理活性研究进展［J］．中草药，2021, **52**(19)：6111-6120.

［4］ KIM D H, KIM D Y, KIM Y C, *et al*．Nodakenin, a coumarin compound, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in mice［J］．*Life Sci*, 2007, **80**(21)：1944-1950.

［5］ GARCÍAARGÁEZ A, APAN T, DELGADO H P, *et al*．Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model［J］．*Planta Med*, 2000, **66**(3)：279-281.

［6］ LI X,WEN Z, SI M, *et al*．Exploration of *Hanshi Zufei* prescription for treatment of COVID-19 based on network pharmacology［J］．*Chin Herb Med*, 2022, **14**(2)：294-302.

［7］ 林立五，时嘉敏，王建忠，等．羌活的化学成分研究［J］．华西药学杂志，2020, **35**(1)：28-31.

［8］ 蒋舜媛，孙　辉，王红兰，等．羌活产业现状及发展对策［J］．中国中药杂志，2017, **42**(14)：2627-2632.

［9］ 罗　鑫，王雪晶，赵祎武，等．羌活化学成分研究［J］．中草药，2016, **47**(9)：1492-1495.

［10］ 郭　培，郎拥军，张国桃．羌活化学成分及药理活性研究进展［J］．中成药，2019, **41**(10)：2445-2459.

［11］ 王旭光，杨洪军，王松松，等．基于 LTQ-Orbitrap 的白芷中 5 种呋喃香豆素类化合物的质谱裂解规律研究［J］．中国中药杂志，2015, **40**(7)：1334-1341.

［12］ 孙明谦，卢建秋，张宏桂．呋喃香豆素类化合物电喷雾质谱裂解途径［J］．药物分析杂志，2009, **29**(1)：82-85.

［13］ 钟惠娴，胥爱丽，肖观林，等．UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合薄层色谱法分析防风与其伪品水防风的化学成分差异［J］．中药新药与临床药理，2022, **33**(2)：242-248.

［14］ 李颖硕，周　秀，李瑞芳，等．基于 UPLC-Q-TOF/MS 法分析不同产地前胡药材质量［J］．中成药，2019, **41**(5)：1110-1114.

［15］ 游飞祥，韩彦琪，龚苏晓，等．HPLC-Q-TOF-MS 分析植物凉茶中的化学成分［J］．食品研究与开发，2016, **37**(8)：161-165.

［16］ 张维冰，王智聪，张凌怡．超高效液相色谱 - 二极管阵列检测 - 串联质谱法测定菊花中的 10 种咖啡酰基奎宁酸和 22 种黄酮类化合物［J］．分析化学，2013, **41**(12)：1851-1861.

［17］ 郭慧清．不同商品规格羌活药材的化学成分差异及谱效关系研究［D］．北京：北京中医药大学硕士学位论文，2019.

［18］ 罗　鑫，王雪晶，赵祎武，等．羌活化学成分研究［J］．中草药，2016, **47**(9)：1492-1495.

（下转第 590 页）

［24］ 黄润青 , 云南省短缺药品供应保障现状调查及监测预警平台的构建研究 [D]. 昆明 : 昆明医科大学硕士学位论文 , 2020.

［25］ 江　雯. 2017—2018 年某三级甲等医院药品短缺情况分析 [J]. 广西医学 , 2020, **42**(14): 1875-1878.

［26］ SHUKAR S, ZAHOOR F, HAYAT K, *et al*. Drug shortage: causes, impact, and mitigation strategies [J]. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 693426.

［27］ PULK R A, LEBER M, TRAN L, *et al*. Dynamic pharmacy leadership during the COVID-19 crisis: optimizing patient care through formulary and drug shortage management [J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2020, **77**(22): 1874-1884.

［28］ 李　勇 , 盛亚楠 , 赵梦蕊 , 等. 供应链视角下我国药品短缺原因及供应保障研究 [J]. 卫生经济研究 , 2017, (6): 55-59.

（上接第 556 页）

［19］ XIE A Y, JIN L, AZIETAKU J T, *et al*. A single standard to determine multi-components method coupled with chemometric methods for the quantification, evaluation and classification of *Notopterygii Rhizoma* et Radix from different regions [J]. *Molecules*, 2019, **24**(19): 3574

［20］ 王维皓 , 严平贞 , 杨　滨. 羌活中香豆素类化合物 UPLC-Q-TOF 质谱裂解规律研究 [J]. 中国中药杂志 , 2021, **46**(5): 1179-1190.

［21］ QIAN G S, WANG Q, LEUNG K S, *et al*. Quality assessment of *Rhizoma* et Radix *Notopterygii* by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, **44**(3): 812-817.

［22］ 张小平. 酚酸类与氮杂环类化合物的电喷雾质谱行为研究 [D]. 杭州 : 浙江工业大学博士学位论文 , 2016.

［23］ 岑建斌 , 周朗君 , 方厚托 , 等. 超高效液相色谱 - 四极杆 / 静电场轨道阱高分辨质谱快速测定水果中 17 种对羟基苯甲酸酯 [J]. 分析测试学报 , 2022, **41**(6): 843-850.

［24］ 余文怡 , 应金琴 , 刘艳芳 , 等. 诊断离子技术在中药质谱分析中的应用 [J]. 分析测试学报 , 2022, **41**(9): 1419-1430.