

# UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 快速鉴定羊红膻药材的化学成分

刘瑞, 王瑞, 裴科, 张淑蓉, 裴妙荣\*  
(山西中医药大学 中药学院, 山西 晋中 030619)

**[摘要]** 目的: 应用超高液相色谱四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术, 快速识别与鉴定羊红膻药材中主要化学成分。方法: 采用 Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱。质谱采用 ESI 源, 负离子一级全扫描-数据依赖性二级质谱扫描(MS<sup>2</sup>)模式采集数据。通过高分辨质谱数据解析, 并结合对照品数据和相关文献对羊红膻药材中的化学成分进行识别和鉴定。结果: 通过精确相对分子质量和二级碎片离子分析, 并结合对照品确认、质谱裂解规律和相关文献检索, 共鉴定 29 个化合物, 包括绿原酸类化合物 19 个, 黄酮类 7 个, 小分子有机酸 3 个, 其中除木犀草素葡萄糖醛酸苷和芹菜素葡萄糖醛酸苷外, 其余 27 个化合物为首次从该药材中发现。结论: 建立的 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 可快速鉴定羊红膻药材中的化学成分, 研究结果为其药效物质基础、质量控制以及临床应用等研究提供了科学的依据。

**[关键词]** 羊红膻; 化学成分; 绿原酸类; 黄酮类; 酚酸; 超高液相色谱四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用  
**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)05-0145-07  
**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200516  
**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191126.1816.009.html>  
**[网络出版时间]** 2019-11-27 10:41

## Rapid Identification of Chemical Constituents of *Pimpinella thellungiana* by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

LIU Rui, WANG Rui, PEI Ke, ZHANG Shu-rong, PEI Miao-rong\*  
(School of Chinese Materia Medica Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

**[Abstract]** **Objective:** Ultra high performance liquid chromatography coupled with Q-Exactive Focus hybrid quadrupole and orbitrap high resolution mass spectrometer (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) was applied for identification of chemical constituents in *Pimpinella thellungiana*. **Method:** Chromatographic separation was performed on a WATERS BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid aq (A) and acetonitrile (B) with a gradient elution. Mass spectral analysis were performed on Q-Exactive Focus hybrid quadrupole and orbitrap mass spectrometer. The mass spectrometer was connected to UHPLC instrument via an ESI interface. Samples were analyzed in negative ion mode by the full-scan-dd MS<sup>2</sup> (data-dependent MS/MS) scanning mode. Then the constituents of *P. thellungiana* were identified by compared HRMS data with those of the standard compounds, MS cleavage mechanism and the related literatures. **Result:** Based on the characteristic mass data of accurate molecular weight and fragmentation ion information, 29 chemical constituents were identified including 19 chlorogenic acids, 7 flavonoids and 3 phenolic acid. Among them, the identified components except luteolin-7-O-β-D-glucuronopyranoside and apigenin-7-O-β-D-glucuronopyranoside

**[收稿日期]** 20191030(007)  
**[基金项目]** 山西省应用基础研究计划项目(201701D221281); 山西省卫生和计划委员会青年基金项目(20161107); 山西中医药大学科技创新团队项目(2018TD-008)  
**[第一作者]** 刘瑞, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础及质量控制研究, Tel:0351-3179903, E-mail: liurui0126@163.com  
**[通信作者]** \*裴妙荣, 硕士, 教授, 从事中药药效物质基础及质量控制研究, Tel:0351-3179903, E-mail: 13753120091@163.com

were reported in *P. thellungiana* for the first time. **Conclusion:** The established UHPLC-Q-Orbitrap HRMS method can be used to identify the chemical constituents of *P. thellungiana* quickly and accurately, providing the scientific evidence for its quality evaluation and material basis research.

**[Key words]** *Pimpinella thellungiana*; chemical constituents; chlorogenic acids; flavonoids; phenolic acid; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

羊红膻药材为伞形科茴芹属,缺刻叶茴芹的干燥全草,陕北民间习用药材,收载于 2015 年版《陕西省药材标准》<sup>[1]</sup>,具有温中散寒,补养气血,补肾壮阳的功效,用于临床有培补脾肾之功,对阳痿不举、精少精冷,气滞血瘀、胸痹心痛,心悸失眠、胸闷气短等病症有效。现代药理学研究<sup>[2]</sup>表明羊红膻药材还具有降压、降脂、降低心肌耗氧量、提高耐缺氧能力和提高免疫等功效,对于高血压、冠心病和克山病等均有较好的疗效,是《中国药典》品种正心降脂片的君药<sup>[3]</sup>。

目前关于羊红膻药材化学成分的研究报道不多。主要是对羊红膻药材中具有 1-(*E*)-丙基-2-羟基-5-甲氧基苯骨架的一类特殊苯丙素类化合物的研究。并将此类化合物称为拟异丁香酚<sup>[4-5]</sup>(pseudoisoeugenol)。至今拟异丁香酚衍生物只在茴芹属植物中发现<sup>[6]</sup>。羊红膻药材中含有 10 多个这种结构的苯丙素类化合物,如羊红膻素 A, B<sup>[7]</sup>, E, H<sup>[8]</sup>等。除此以外,目前还从羊红膻中分离得到 2 个黄酮苷,5 个香豆素以及 2-甲基丁酸,油酸、棕榈酸, $\beta$ -谷甾醇等 20 多个化合物<sup>[2]</sup>,但对药材中其他可能存在的成分尚未见报道。羊红膻药材化学成分研究基础薄弱,质量控制水平也较低,文献采用显微鉴别<sup>[9]</sup>、薄层鉴别和 UV 测定总黄酮含量<sup>[10]</sup>等方法对其质量进行了初步研究。课题组前期采用 UPLC 测定羊红膻药材中木犀草素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 2 种黄酮苷的含量<sup>[11]</sup>。中药含有的多种化学成分是其发挥药效的物质基础,因此阐明羊红膻药材化学成分对于进一步明确其药效物质基础,提高其质量控制水平是非常必要的。

了解中药化学成分,特别是化合物的化学结构,传统的方法是通过分离纯化得到单体化合物,再通过核磁等各种手段进行结构鉴定。此方法费时费力,对中药成分了解也不全面。近年来,色谱-质谱联用技术尤其是超高效液相色谱-高分辨质谱联用技术由于其高灵敏度、高专属性等特点已成为中药成分定性定量分析有力的技术手段<sup>[12-13]</sup>,尤其是使化合物的鉴定更为便捷和全面。其中由四级杆

quadrupole 和轨道阱 orbitrap 组成的串联质谱仪(Q-Orbitrap hybrid mass spectrometry),将高性能四级杆的母离子选择能力与高分辨轨道阱的精确质量数相结合,可同时实现对母离子和质谱二级碎片离子的高分辨数据采集,为小分子药物的鉴定提供了更准确的信息,在中药成分分析中具有高灵敏度、高分离度、高准确度等优势,得到了广泛的应用<sup>[14-15]</sup>。

本研究基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对羊红膻药材化学成分进行了较全面的定性分析,通过高分辨质谱数据解析,并结合对照品对照、质谱裂解规律和相关文献检索等共鉴定出 29 个化合物,包括绿原酸类 19 个,黄酮类 7 个,小分子有机酸 3 个,其中除木犀草素葡萄糖醛酸苷和芹菜素葡萄糖醛酸苷外,其余 27 个化合物为首次从该药材中发现。研究结果为今后进一步开展羊红膻药材的药效物质基础、质量控制以及临床应用等研究提供了科学的依据。

## 1 材料

Thermo UHPLC-Q Exactive Focus 型液质联用仪,配有二元高压泵,柱温箱,ESI 源,四级杆-轨道阱 Q-Orbitrap 质量分析器(美国 Thermo Scientific 公司); BT25 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius)。

新绿原酸(5-咖啡酰奎宁酸, CQA, 批号 180826), 绿原酸(3-咖啡酰奎宁酸, CQA, 批号 181129), 隐绿原酸(4-咖啡酰奎宁酸, CQA, 批号 180902), 异绿原酸 A(3, 5-二咖啡酰奎宁酸, DiCQA, 批号 181205), 异绿原酸 B(3, 4-二咖啡酰奎宁酸, DiCQB, 批号 190107), 异绿原酸 C(4, 5-二咖啡酰奎宁酸, DiCQC, 批号 181103), 木犀草素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(批号 180926), 芹菜素-7-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷(批号 180124) 和咖啡酸(批号 180526)均购自上海融禾医药科技发展有限公司,对照品纯度均 >98%。羊红膻药材购自陕西省黄安县,经山西中医药大学中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为伞形科茴芹属缺刻叶茴芹 *Pimpinella thellungiana* 的带根全草。乙腈和甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司),甲酸(色谱纯,天津科密欧试剂有

限公司)。

## 2 方法

**2.1 色谱与质谱条件** 色谱条件: Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 13 min, 5% ~ 15% B; 13 ~ 17 min, 15% B; 17 ~ 25 min, 15% ~ 60% B; 25 ~ 30 min, 60% B)。柱温 30 °C, 进样量 2 μL, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>。

质谱条件: 电喷雾离子源, 正负离子切换扫描模式, 鞘气压 40 流量单位, 辅助气压 5 流量单位, 喷雾电压 3.0 kV, 离子传输管温度 300 °C, 雾化温度 320 °C, 透镜电压 50 V, 扫描模式: 一级全扫描-数据依赖性二级质谱扫描(full scan-dd MS<sup>2</sup>, m/z 100 ~ 1 500) 分辨率 70 000(一级质谱), 17 500(二级质谱), 高能量碰撞解离(HCD)。

**2.2 供试品溶液的制备** 取粉碎至粗粉的羊红膻全草药材 0.2 g, 精密称定, 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加 50% 甲醇水 40 mL, 80 °C 回流提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并 3 次滤液, 回收溶剂至干, 残渣加 50% 甲醇水溶解, 并转移至 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.3 混合对照品溶液的制备** 分别取绿原酸, 隐绿原酸, 新绿原酸, 异绿原酸 A, 异绿原酸 B, 异绿原酸

C, 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和咖啡酸 9 个对照品适量, 称定, 加 50% 甲醇水制成质量浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液, 备用。

## 3 结果

羊红膻药材在 2.1 项色谱和质谱条件下得到的 UHPLC-Q-Orbitrap 总离子流图, 见图 1。根据高分辨质谱提供的一级质谱中准分子离子和加和离子等信息推测其精确相对分子质量, 通过 Xcalibur 2.0 软件拟合其分子式, 再根据二级质谱中碎片离子信息以及与对照品、质谱裂解规律, 相关文献数据, Chemspider, massbank 等数据库的信息比对等方法进行化学成分的鉴定和确证。最终, 从羊红膻药材中鉴定化学成分 29 个, 结果见表 1。

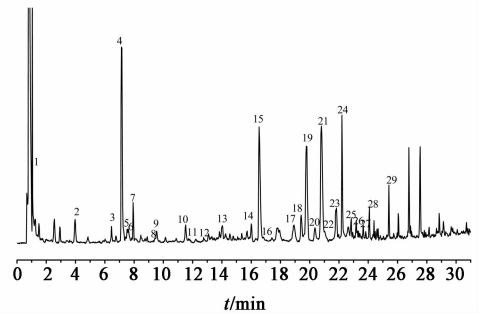


图 1 羊红膻药材总离子流(负离子模式)

Fig. 1 TIC of *Pimpinella thellungiana* (negative ion mode)

表 1 UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS 鉴定羊红膻药材的化学成分

Table 1 Identification of chemical constituents in *Pimpinella thellungiana* by UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS

No.	t <sub>R</sub> /min	[M - H] <sup>-</sup>	δ/ppm	化学式	MS <sup>2</sup>	鉴定
1	0.89	191.055 2	0.2	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	173.04 [M - H - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 127.04 [M - H - 2H <sub>2</sub> O - CO] <sup>-</sup> , 93.03 [M - H - 2H <sub>2</sub> O - CO - 2OH] <sup>-</sup>	奎宁酸
2	3.97	353.088 1	0.2	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	191.05 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - QA] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 127.04 [M - H - Caffeoyl - 2H <sub>2</sub> O - CO] <sup>-</sup>	新绿原酸 <sup>1)</sup>
3	6.63	353.088 1	0.8	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	135.04 [M - H - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 173.04 [M - H - Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 191.05 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	cis-4-CQA
4	7.14	353.087 9	0.2	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	191.05 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - QA] <sup>-</sup> , 127.04 [M - H - Caffeoyl - 2H <sub>2</sub> O - CO] <sup>-</sup>	绿原酸 <sup>1)</sup>
5	7.56	179.034 0	-2.3	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	135.04 [M - H - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 107.05 [M - H - CO <sub>2</sub> - CO] <sup>-</sup>	咖啡酸 <sup>1)</sup>
6	7.79	367.103 7	0.7	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	193.05 [M - H - QA] <sup>-</sup> , 173.04 [M - H - Feruloyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 134.04 [M - H - QA - CH <sub>3</sub> - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	3-FQA
7	7.93	353.088 0	0.5	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	135.04 [M - H - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 173.05 [M - H - Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 191.05 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - QA] <sup>-</sup>	隐绿原酸 <sup>1)</sup>
8	9.45	337.094 2	-1.4	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	191.06 [M - H - p-Coumaroyl] <sup>-</sup> , 93.03 [M - H - p-Coumaroyl - 2H <sub>2</sub> O - CO - 2OH] <sup>-</sup> , 119.05 [M - H - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 163.04 [M - H - QA] <sup>-</sup>	trans-5-pCoQA
9	9.54	353.088 1	0.8	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	191.05 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - QA] <sup>-</sup> , 127.04 [M - H - Caffeoyl - 2H <sub>2</sub> O - CO] <sup>-</sup>	1-CQA
10	11.48	367.103 5	0.2	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	191.06 [M - H - Feruloyl] <sup>-</sup> , 134.04 [M - H - QA - CH <sub>3</sub> - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 173.04 [M - H - Feruloyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	5-FQA

续表 1

No.	$t_R/\text{min}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	误差	化学式	$\text{MS}^2$	鉴定
11	11.91	367.103 8	0.8	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	173.04 [M - H - Feruloyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 134.04 [M - H - QA - CH <sub>3</sub> - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 193.05 [M - H - QA] <sup>-</sup>	4-FQA
12	12.88	337.093 2	1.0	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8$	191.06 [M - H - <i>p</i> -Coumaroyl] <sup>-</sup> , 93.03 [M - H - <i>p</i> -Coumaroyl - 2H <sub>2</sub> O - CO - 2OH] <sup>-</sup>	<i>cis</i> -5- <i>p</i> CoQA
13	14.24	367.103 6	0.4	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$	191.06 [M - H - Feruloyl] <sup>-</sup> , 134.04 [M - H - QA - CH <sub>3</sub> - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	1-FQA
14	16.00	477.068 3	1.7	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$	301.04 [M - H - gluA] <sup>-</sup> , 151.00 [M - H - gluA - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 179.00 [M - H - gluA - C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 107.00 [M - H - gluA - C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> , 283.03 [M - H - gluA - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 273.04 [M - H - gluA - CO] <sup>-</sup>	槲皮素葡萄糖醛酸苷
15	16.55	461.073 8	1	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	285.04 [M - H - gluA] <sup>-</sup> , 133.03 [M - H - gluA - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 151.00 [M - H - gluA - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	木犀草素-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 <sup>1)</sup>
16	16.83	447.093 7	1	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	285.04 [M - H - glu] <sup>-</sup> , 151.00 [M - H - glu - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 133.03 [M - H - glu - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	木犀草素葡萄糖苷
17	18.93	193.049 8	-4.3	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	162.02 [M - H - OCH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 134.04 [M - H - CH <sub>3</sub> - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 178.02 [M - H - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	阿魏酸异构体
18	19.35	515.123 1	1.7	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	135.04 [M - H - Caffeoyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 173.04 [M - H - 2Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Caffeoyl - QA] <sup>-</sup> , 191.06 [M - H - 2Caffeoyl] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	异绿原酸 B <sup>1)</sup>
19	19.86	515.119 6	0.1	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	191.06 [M - H - 2Caffeoyl] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - Caffeoyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Caffeoyl - QA] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	异绿原酸 A <sup>1)</sup>
20	20.55	515.120 0	0.8	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	191.06 [M - H - 2Caffeoyl] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - Caffeoyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Caffeoyl - QA] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	<i>cis</i> -3,5-DiCQA
21	20.79	445.077 8	0.2	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	269.06 [M - H - gluA] <sup>-</sup> , 117.03 [M - H - gluA - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 151.00 [M - H - gluA - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>-</sup> , 225.5 [M - H - gluA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	芹菜素-7- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖醛酸苷 <sup>1)</sup>
22	21.71	515.119 8	0.6	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	173.05 [M - H - 2Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - Caffeoyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Caffeoyl - QA] <sup>-</sup> , 191.05 [M - H - 2Caffeoyl] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	<i>cis</i> -4,5-DiCQA
23	21.83	475.088 4	0.6	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$	284.03 [M - H - gluA - CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup> , 299.06 [M - H - gluA] <sup>-</sup> , 151.00 [M - H - gluA - CH <sub>3</sub> - C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	甲基化木犀草素葡萄糖醛酸苷
24	22.29	515.119 8	0.6	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	173.04 [M - H - 2Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - Caffeoyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Caffeoyl - QA] <sup>-</sup> , 191.06 [M - H - 2Caffeoyl] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	异绿原酸 C <sup>1)</sup>
25	23.27	529.135 9	1.3	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	191.06 [M - H - Feruloyl - Caffeoyl] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - Feruloyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Feruloyl - QA - H] <sup>-</sup> , 173.04 [M - H - Feruloyl - Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Feruloyl] <sup>-</sup> , 367.10 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	3-C-5-FQA
26	23.66	515.119 8	0.5	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	173.04 [M - H - 2Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - Caffeoyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Caffeoyl - QA] <sup>-</sup> , 191.06 [M - H - 2Caffeoyl] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	1,4-DiCQA
27	23.84	529.135 7	1.1	$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	173.04 [M - H - Feruloyl - Caffeoyl - H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 135.04 [M - H - Feruloyl - QA - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 191.06 [M - H - Feruloyl - Caffeoyl] <sup>-</sup> , 353.09 [M - H - Feruloyl] <sup>-</sup> , 179.03 [M - H - Feruloyl - QA - H] <sup>-</sup> , 367.10 [M - H - Caffeoyl] <sup>-</sup>	3-F-4-CQA 或 4-C-5-FQA
28	24.08	285.040 6	0.3	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	133.03 [M - H - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 151.00 [M - H - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 241.05 [M - H - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	木樨草素
29	25.42	269.045 6	0.1	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	117.03 [M - H - C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup> , 151.00 [M - H - C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>-</sup> , 225.06 [M - H - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	芹菜素

注: CQA. 咖啡酰奎宁酸; pCoQA. 香豆酰奎宁酸; FQA. 阿魏酰奎宁酸; CFQA. 咖啡酰-阿魏酰奎宁酸; Caffeoyl. 咖啡酰基; Feruloyl. 阿魏酰基; Coumaroyl. 香豆酰基;<sup>1)</sup>与对照品比对。

**3.1 小分子有机酸类化合物的鉴定** 化合物 **1** 的准分子离子峰为  $m/z$  191.055 21  $[M - H]^-$ , 推断最可能的分子式为  $C_6H_{12}O_6$ 。其  $MS^2$  产生了  $m/z$  173  $[M - H - H_2O]^-$ , 127  $[M - H - 2H_2O - CO]^-$  碎片离子, 故将其鉴定为奎宁酸(QA)<sup>[16]</sup>。化合物 **5** 的准分子离子峰为  $m/z$  179.034 03  $[M - H]^-$ , 推断最可能的分子式为  $C_9H_8O_4$ 。在其二级碎片离子中出现了  $m/z$  135  $[M - H - CO_2]^-$ , 经对照品对照, 确认其为咖啡酸(CA)<sup>[17]</sup>。化合物 **17** 的准分子离子峰为  $m/z$  193.049 79  $[M - H]^-$ , 推断最可能的分子式为  $C_{10}H_{10}O_4$ , 其  $MS^2$  裂解形成了  $m/z$  178  $[M - H - CH_3]^-$ , 162  $[M - H - OCH_3]^-$ , 134  $[M - H - CH_3 - CO_2]^-$  的碎片离子, 推测其为阿魏酸或其异构体(FA)。但与阿魏酸对照品保留时间不一致, 故推测为阿魏酸异构体<sup>[18-19]</sup>。

**3.2 绿原酸类化合物的鉴定** 绿原酸类化合物是由 1 个或多个咖啡酸、阿魏酸、香豆酸等肉桂酸和奎宁酸及其衍生物缩合而成的酯类, 具有抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤等多种功效<sup>[20]</sup>。奎宁酸上含有多个羟基, 可与肉桂酸形成单酯、双酯、三酯及四酯类化合物, 其中单酯和双酯类化合物较为常见。

绿原酸类化合物的 ESI- $MS^2$  具有明显的特征, 产生  $m/z$  191, 179, 173, 135, 193, 134 等特征离子可作为此类化合物的诊断离子。其中  $m/z$  179  $[CA - H]^-$  或  $m/z$  135  $[CA - H - CO_2]^-$  表明存在咖啡酰基团,  $m/z$  191  $[QA - H]^-$  或  $m/z$  173  $[QA - H - H_2O]^-$  表明存在奎宁酸基团,  $m/z$  193  $[FA - H]^-$ , 134  $[FA - H - CH_3 - CO_2]^-$  表明存在阿魏酰基团。同时根据母离子与子离子的质量数差值可推断与奎宁酸成酯的有机酸类型, 母离子与子离子相差 162, 146, 176 Da 表明结构中分别存在 1 个咖啡酰基、香豆酰基和阿魏酰基。此外, 此类化合物存在多种同分异构体, 根据二级质谱图中各碎片离子之间相对丰度比以及化合物在反相色谱柱上的色谱行为等可进行异构体的区分。

化合物 **2** ~ **4**, **7** 和 **9** 准分子离子峰为  $m/z$  353.088 1  $[M - H]^-$ , 推断其分子式可能为  $C_{16}H_{18}O_9$ ,  $MS^2$  裂解产生了  $m/z$  191, 179, 173, 135 等特征碎片离子, 表明这几个化合物为单咖啡酰奎宁酸类化合物。经与对照品比对, 化合物 **2**, **4**, **7** 分别鉴定为新绿原酸(5-CQA), 绿原酸(3-CQA) 和隐绿原酸(4-CQA)。化合物 **3** 的二级质谱图与 4-CQA 相似, 但  $m/z$  191 的相对丰度比 4-CQA 弱, 根据文献<sup>[21]</sup>, 在反相液相色谱条件下, 3-位和 4-位的顺式

异构体比其反式先被洗脱下来, 且 4-位反式异构体  $m/z$  191 的相对强度比顺式强, 因此化合物 **3** 推断为 *cis*-4-CQA。化合物 **9** 的二级质谱图的基峰离子为  $m/z$  191, 且最后被洗脱下来, 根据文献<sup>[22]</sup>推断为 1-CQA。

化合物 **8** 和 **12** 准分子离子峰为  $m/z$  337.094 21  $[M - H]^-$ , 其分子式可能为  $C_{16}H_{17}O_8$ , 且在  $MS^2$  图谱中均产生了  $m/z$  191  $[QA - H]^-$  的基峰离子, 与母离子相差 146 Da, 故为 5 位取代的香豆酰奎宁酸类化合物。根据其保留时间和参考文献<sup>[23]</sup>, 反式比顺式化合物先被洗脱下来, 所以化合物 **8** 和 **12** 推测为 *trans*-5-pCoQA 和 *cis*-5-pCoQA。

化合物 **18** ~ **20**, **22**, **24** 和 **26** 准分子离子峰为  $m/z$  515.119 81  $[M - H]^-$ , 其分子式可能为  $C_{25}H_{24}O_{12}$ , 二级质谱图中生成  $m/z$  353  $[CQA - H]^-$ ,  $m/z$  191  $[QA - H]^-$ ,  $m/z$  179  $[CA - H]^-$ ,  $m/z$  173  $[QA - H - H_2O]^-$  或者  $m/z$  135  $[CA - H - CO_2]^-$ 。母离子 ( $m/z$  515) 和子离子 ( $m/z$  353) 之间相差 162 Da, 以及咖啡酰、奎宁酸的特征离子  $m/z$  191, 179, 173 或 135, 表明这几个化合物是二咖啡酰奎宁酸类化合物。化合物 **19** 和 **20** 图谱中基峰离子是  $m/z$  191, 次高是  $m/z$  135, 丰度最低的是  $m/z$  179, 表明化合物是 3-位取代的奎宁酸酯类。经与对照品比对, 化合物 **19** 鉴定为异绿原酸 A (3, 5-DiCQA), 化合物 **20** 和 **19** 的二级质谱图相似, 故推测为 *cis*-3, 5-DiCQA。化合物 **18**, **22**, **24** 和 **26** 的  $MS^2$  图中基峰离子是  $m/z$  173, 提示这几个化合物是 4-位取代奎宁酸类化合物。经与对照品比对, 化合物 **18** 和 **24** 分别鉴定为异绿原酸 B (3, 4-DiCQA) 和异绿原酸 C (4, 5-DiCQA)。化合物 **22** 和 **24** 的二级质谱图相似, 故推测为 *cis*-4, 5-DiCQA。化合物 **26** 出峰最晚, 根据文献<sup>[24]</sup>, 推测其为 1, 4-CQA。

化合物 **6**, **10**, **11** 和 **13** 准分子离子峰为  $m/z$  367.103 45  $[M - H]^-$ , 其分子式可能为  $C_{17}H_{19}O_9$ , 二级质谱图中生成  $m/z$  193  $[FA - H]^-$ , 134  $[FA - CH_3 - CO_2]^-$  和 191  $[QA - H]^-$ , 173  $[QA - H - H_2O]^-$ , 故推测这几个化合物为阿魏酰奎宁酸类。根据文献<sup>[14]</sup>, 二级质谱中, 5-FQA 的基峰离子是  $m/z$  191, 伴随着相对强度很弱的  $m/z$  173, 而 4-FQA 和 3-FQA 图谱中相对丰度最强的离子分别是  $m/z$  173 和 193。因此化合物 **6**, **10**, **11** 和 **13** 分别推断为 3-FQA, 5-FQA, 4-FQA 和 1-FQA。

化合物 **25** 和 **27** 准分子离子峰为  $m/z$  529.135 88  $[M - H]^-$  ( $C_{26}H_{25}O_{12}$ , <5 ppm), 二级质

谱图中出现  $m/z$  367 [FQA - H]<sup>-</sup>, 353 [CQA - H]<sup>-</sup>, 191 [QA - H]<sup>-</sup>, 173 [QA - H - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 135 [CA - H - CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> 等特征碎片离子。其中母离子 ( $m/z$  529) 和子离子 ( $m/z$  367) 相差 162 Da, 提示丢失一分子咖啡酰, 和子离子 ( $m/z$  353) 相差 176 Da, 提示丢失一分子阿魏酰基, 故推测化合物 **25** 和 **27** 为咖啡酰阿魏酰奎宁酸。化合物 **25** 和 **27** 二级质谱图中  $m/z$  353 的相对丰度比  $m/z$  367 的丰度都高, 而化合物 **25** 的基峰为  $m/z$  191, 化合物 **27** 基峰为  $m/z$  173, 根据文献[25], 化合物 **25** 推测为 3-C-5-FQA, 化合物 **27** 推测为 3-F-4-CQA 或 4-C-5-FQA。

**3.3 黄酮类化合物的鉴定** 黄酮苷类化合物的裂解一般为糖苷键裂解, 生成相应的黄酮苷元。黄酮苷元进一步裂解, 主要形成丢失 H<sub>2</sub>O, CO, CO<sub>2</sub> 等中性小分子或 C 环发生反狄尔斯-阿德尔 (RDA) 裂解的两类碎片离子。不同的黄酮母核 C 环裂解方式和规律不同, 其中正黄酮母核发生 RDA 裂解易形成 A<sup>1,3-</sup> 离子且相对丰度较高, 对于 A 环含有 5,7-二羟基的化合物, 形成的  $m/z$  151 (A<sup>1,3-</sup>) 离子可作为其特征诊断离子。

经与对照品比对, 化合物 **15** 和 **21** 分别鉴定为木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷。化合物 **15** 和 **21** 的裂解规律为先经 CID 裂解丢失 1 分子葡萄糖醛酸残基 176 Da, 形成苷元木犀草素和芹菜素。木犀草素和芹菜素都属于正黄酮母核, 二者差别仅在 C 环上木犀草素比芹菜素多一个 OH。木犀草素  $m/z$  285 产生离子  $m/z$  241 [M - H - CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 并发生 RDA 裂解生成  $m/z$  151 (A<sup>1,3-</sup>),  $m/z$  133 离子<sup>[26-27]</sup>; 芹菜素  $m/z$  269 具有同样的裂解规律, 丢失 1 分子 CO<sub>2</sub> 产生  $m/z$  225, 同时发生 RDA 裂解生成  $m/z$  151 (A<sup>1,3-</sup>),  $m/z$  117 (B<sup>1,3-</sup>) 的特征碎片离子<sup>[22]</sup>。化合物 **28** 的准分子离子峰为  $m/z$  285.040 56 [M - H]<sup>-</sup>, 推测其结构式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>。其产生的碎片离子与木犀草素葡萄糖醛酸苷元二级碎片离子相同, 故推测其为木犀草素。化合物 **29** 的准分子离子峰为  $m/z$  269.045 56 [M - H]<sup>-</sup>, 推测最可能的分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>。其产生的碎片离子与芹菜素葡萄糖醛酸苷元二级碎片离子相同, 故推测其为芹菜素。

化合物 **16** 的准分子离子峰为  $m/z$  447.093 69 [M - H]<sup>-</sup>, 推断最可能的分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>, 其 MS<sup>2</sup> 丢失 1 分子六碳糖 C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (162 Da) 生成  $m/z$  285 的碎片离子, 同时产生的碎片离子和木犀草素相同, 故鉴定其为木犀草素葡萄糖苷。化合物 **23** 的

准分子离子峰为  $m/z$  475.088 44 [M - H]<sup>-</sup>,  $m/z$  951.184 62 [2M - H]<sup>-</sup>, 推断最可能的分子式为 C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>12</sub>。在其二级质谱图中产生了  $m/z$  299 的碎片离子, 与母离子相对分子质量相差 176 Da, 即丢失 1 分子葡萄糖醛酸残基; 随后丢失 1 分子甲基 (CH<sub>3</sub>) 产生  $m/z$  284 的碎片离子, 故参考文献[28]推测其为甲基化木犀草素葡萄糖醛酸苷。

化合物 **14** 的准分子离子峰为  $m/z$  477.068 27 [M - H]<sup>-</sup>, 推断最可能的分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>13</sub>。其 MS<sup>2</sup> 裂解过程中丢失 1 分子葡萄糖醛酸 (176 Da) 产生  $m/z$  301 的碎片离子, 同时产生  $m/z$  283 [M - H - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 273 [M - H - CO]<sup>-</sup>, 并发生 RDA 裂解形成特征碎片离子  $m/z$  151 (A<sup>1,3-</sup>) 以及碎片离子  $m/z$  179 (A<sup>1,2-</sup>),  $m/z$  107 (A<sup>0,4-</sup>) 根据文献[29-30], 推测其苷元为槲皮素, 裂解规律见图 2, 并将化合物 **14** 鉴定为槲皮素葡萄糖醛酸苷。

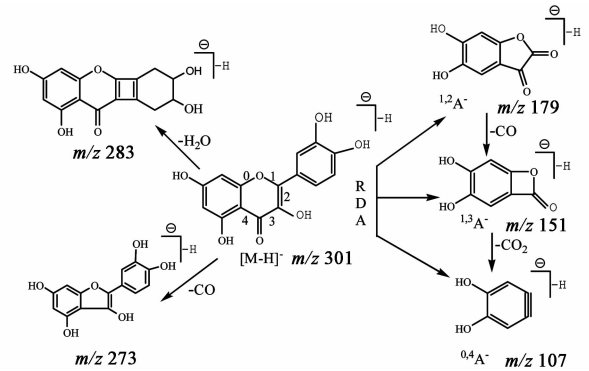


图 2 槲皮素裂解规律  
Fig. 2 Fragmentation pathway of quercetin

#### 4 讨论

研究过程中采用了全扫描和正负离子切换扫描模式对羊红膻中化学成分进行了分析, 但由于目前鉴定出的 3 类化合物包括绿原酸类、黄酮类和小分子有机酸类在负离子模式下有较好的响应和裂解规律, 所以文中主要报道了在负离子模式下鉴定出的化合物。此外, 本研究中未能检测到羊红膻中拟异丁香酚类化合物, 一方面可能是由于采用 50% 甲醇水为提取溶剂未能提取出这些成分, 另一方面可能是由于这些组分极性较小, 不适宜采用 ESI 源作为离子化方式。此部分内容还需进一步研究。

本研究采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 对羊红膻药材的主要化学成分进行了表征, 根据高分辨质谱提供的精确相对分子质量、拟合的分子式、二级碎片信息以及与对照品、相关文献数据比对等方法共鉴定 29 个化合物, 包括绿原酸类化合物 19 个, 黄酮

类 7 个,小分子有机酸 3 个,其中除木犀草素葡萄糖醛酸苷和芹菜素葡萄糖醛酸苷外,其他 27 个化合物均为该药材中首次鉴定。研究结果将为今后进一步研究羊红膻药材的药效物质基础、质量控制以及临床应用等奠定基础。

[参考文献]

[1] 陕西省食品药品监督管理局. 陕西省药材标准[M]. 西安:陕西科学技术出版社,2015:168-169.  
[2] 金振国,王忙生. 草药羊红膻的研究进展[J]. 商洛学院学报,2008,22(5):43-46.  
[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:750-751.  
[4] KUBECZKA K H, MASSOW F V, FORMACEK V, et al. A new type of phenylpropane from the essential fruit oil of *Pimpinella anisum* L [J]. Z Naturforsch, 1976, 31(2): 283-284.  
[5] REICHLING J, KEMMERER B, SAUER-GÜRTH H. Biosynthesis of pseudoisoeugenols in tissue cultures of *Pimpinella anisum*[J]. Pharm World Sci, 1995, 17(4): 113-119.  
[6] 常星. 多枝桧柳和柝叶茴芹活性成分研究[D]. 开封:河南大学,2011.  
[7] 乔博灵,王长岱,米彩峰,等. 羊红膻根中羊红膻素 A 及羊红膻素 B 的分离和鉴定[J]. 药科学报,1997,32(1):56-58.  
[8] 乔博灵,王长岱,李富贤,等. 羊红膻根中羊红膻素 H 等的分离与鉴定[J]. 中草药,2000,31(3):161-162.  
[9] 石会丽,冯一凡,刘珍,等. 羊红膻药材中总黄酮的含量测定方法研究[J]. 西北药学杂志,2009,24(1):18-19.  
[10] 石会丽,杨智锋,李富贤,等. 羊红膻的显微及薄层鉴别研究[J]. 西北药学杂志,2013,28(5):453.  
[11] 刘瑞,王志英,张丹丹,等. UPLC 法测定羊红膻药材中 2 种黄酮苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2017,37(8):1509-1512.  
[12] 马百平,康利平,庞旭,等. 中药化学成分分析、分离技术及策略[J]. 国际药学研究杂志,2015,42(4):413-426.  
[13] 王蔼华,马立满,范珊珊,等. 基于 HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MSn 技术的小叶莲化学成分分析[J]. 中国中药杂志,2018,43(1):123-133.  
[14] 胡英还,许文倩,秦雪梅,等. UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱在线快速识别黄芪建中汤的化学成分[J]. 药科学报,2017,52(6):964-970.  
[15] 左莉华,周霖,李卓伦,等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的天丹通络胶囊中化学成分研究[J]. 中草药,2018,49(5):1031-1040.  
[16] 杨璐萌,杨凌鉴,贾璞,等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 的广枣果肉化学成分分析[J]. 第二军医大学学报,2016,37(2):159-166.  
[17] 卢新义,何娟,陈衍斌,等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法同时快速鉴定复方延寄参胶囊的化学成分[J]. 西北药学杂志,2018,33(2):

181-185.  
[18] 吴吉洋,高方圆,叶晓岚,等. 创新药物川阿格雷及其拼合分子阿魏酸和川芎嗪的质谱裂解规律[J]. 第二军医大学学报,2012,33(7):755-758.  
[19] 吴云,艾玉,王粉绒,等. UPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中阿魏酸的质量浓度及其比较药理学[J]. 沈阳药科大学学报,2016,33(5):396-401.  
[20] 席利莎,木泰华,孙红男. 绿原酸类物质的国内外研究进展[J]. 核农学报,2014,28(2):292-301.  
[21] MADALA N E, TUGIZIMANA F, STEEKAMP P A. Development and optimization of an UPLC-QTOF-MS/MS method based on an in-source collision induced dissociation approach for comprehensive discrimination of chlorogenic acids isomers from *Momordica* plant species[J]. J Anal Methods Chem, 2014, doi: 10.1155/2014/650879.  
[22] ZHANG J Y, ZHANG Q, LI N, et al. Diagnostic fragment-ion-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids isomers in Flos Lonicerae Japonicae by HPLC-ESI-MS<sup>n</sup>[J]. Talanta, 2013, 104:1-9.  
[24] NCUBE E N, MHLONGO M I, PIATER L A, et al. Analyses of chlorogenic acids and related cinnamic acid derivatives from *Nicotiana tabacum* tissues with the aid of UPLC-QTOF-MS/MS based on the in-source collision-induced dissociation method[J]. Chem Cent J, 2014, 8(1):66-75.  
[24] ZHANG J Y, WANG Z J, LI Y, et al. A strategy for comprehensive identification of sequential constituents using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with linear iontrap-orbitrap mass spectrometer, application study on chlorogenic acids in Flos Lonicerae Japonicae[J]. Talanta, 2016, 147:16-27.  
[25] CLIFFORD N, JOHNSTON K L, KNIGHT S, et al. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids[J]. J Agri Food Chem, 2003, 51(10):2900-2911.  
[26] 李伟,冯育林,黎田儿,等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合诊断离子方法快速分析连钱草中黄酮类化合物[J]. 质谱学报,2016,37(6):504-516.  
[27] 徐英,董静,王弘,等. 电喷雾-离子阱-飞行时间质谱联用研究黄酮和异黄酮苷元 C 环上的裂解规律[J]. 高等学校化学学报,2009,30(1):46-50.  
[28] 刘思毅,张秀平,尚展鹏,等. UHPLC-LTQ-Orbitrap 鉴定苦碟子注射液化学成分及其在大鼠血浆中的移行成分[J]. 中国中药杂志,2016,41(12):2235-2244.  
[29] 尹智慧,孙长海,方洪壮. 槲皮素与桑色素的 ESI-MS 裂解行为的比较分析[J]. 分析测试学报,2017,36(2):205-211.  
[30] 林宏英,黄建梅,段天璇,等. 电喷雾-质谱研究 A 环不同取代基对黄酮类化合物裂解途径的影响[J]. 中国测试,2013,39(5):59-61,64.

[责任编辑 顾雪竹]