

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

钟惠娴¹, 胥爱丽^{2,3}, 肖观林^{2,3}, 毕晓黎^{2,3}, 李养学^{2,3}, 李素梅^{2,3}, 陈伟韬^{2,3}, 邱锦燕¹ (1. 广州中医药大学第五临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095; 3. 广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095)

摘要: **目的** 应用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间高分辨质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术分析防风与其伪品水防风化学成分的差异, 结合薄层色谱法鉴别防风药材真伪。**方法** 以 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱; 流速: 0.24 mL·min⁻¹; 进样量: 1 μL。质谱条件为电喷雾离子源(ESI), 在负离子模式下对色谱流出物进行检测, 检测范围(*m/z*) 100~1 500。以 6''-*O*-apiosyl-5-*O*-Methylvisammioside 为对照品, 对防风药材和水防风药材进行薄层色谱鉴别。**结果** 在鉴定得到的 29 个化合物中, 防风有 22 个化学成分, 水防风有 23 个化学成分。负离子模式下筛选得到 6''-*O*-apiosyl-5-*O*-Methylvisammioside、花椒毒素、divaricatol、3'-*O*-2-乙酰亥茅酚、白花前胡乙素、3-(((3*R*, 4*R*, 5*S*)-6-(((3*R*, 4*R*)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3, 2-*g*]chromen-6-one 及其异构体 7 个差异化合物。薄层色谱中水防风药材和对照品在相应位置显示相同颜色的荧光斑点, 可鉴定为防风伪品。**结论** 以 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合薄层色谱法建立了防风和水防风化学成分的鉴别方法, 该方法简便、快速、准确, 可为防风药材的质量评价及药效物质基础研究提供参考。

关键词: 防风; 水防风; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间高分辨质谱法; 薄层色谱法; 化学成分; 鉴别

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)02-0242-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.014

Identification of Characteristic Constituents in *Saposhnikovia divaricata* and Its Adulterant *Libanotis laticalycina* by UPLC-Q-TOF-MS/MS and TLC

ZHONG Huixian¹, XU Aili^{2,3}, XIAO Guanlin^{2,3}, BI Xiaoli^{2,3}, LI Yangxue^{2,3}, LI Sumei^{2,3}, CHEN Weitao^{2,3}, QIU Jinyan¹ (1. The Fifth Clinical Medicine School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095 Guangdong, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095 Guangdong, China)

Abstract: Objective To analyze the chemical constituents of *Saposhnikovia divaricata* and its adulterant *Libanotis laticalycina* by UPLC-Q-TOF-MS/MS, combined with TLC to identify the authenticity of *Saposhnikovia divaricata*.

Methods The mobile phase consisted of acetonitrile(A) with 0.1% formic acid and aqueous solution(B) with 0.1% formic acid was gradient eluted with a flow rate of 0.24 mL·min⁻¹, and the injection volume was 1 μL. The mass spectrometry was performed with electrospray ionization(ESI). MS data were scanned in negative ion mode within the range of *m/z* 100-1 500. Using 6''-*O*-apiosyl-5-*O*-methylvisammioside as reference substance, the TLC was used

收稿日期: 2021-08-04

作者简介: 钟惠娴, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药质量分析。Email: zhonghuixian96@126.com。通信作者: 胥爱丽, 女, 博士, 主任药师, 研究方向: 中药化学。Email: xal555@163.com。

基金项目: 2021 年省属科研机构稳定性支持项目(粤财科教[2021]113 号)。

to identify the medicinal herbs of *Saposhnikovia divaricata* and *Libanotis laticalycina*. **Results** Among the 26 compounds identified, 22 chemical components were found in *Saposhnikovia divaricata* and 23 in *Libanotis laticalycina*. Seven different compounds were obtained under negative ion mode, including 6'-*O*-apiosyl-5-*O*-Methylvisammioside, xanthotoxin, divaricatol, 3'-*O*-2-butyl-3-hydroxy-4-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl oxy methyl-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl oxy)-5-hydroxy-2,2,8-trimethyl-3,4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3,2-g]chromen-6-one(isomer), 3-(((3*R*,4*R*,5*S*)-6-(((3*R*,4*R*)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl oxy) methyl)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl oxy)-5-hydroxy-2,2,8-trimethyl-3,4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3,2-g]chromen-6-one. In TLC, there were fluorescent spots of the same color in the corresponding positions of the *Libanotis laticalycina* and the reference substance, which could be identified as the counterfeit of the *Libanotis laticalycina*. **Conclusion** The comprehensive application of UPLC-Q-TOF-MS/MS and TLC technology can provide a simple, rapid and accurate method for the identification of chemical constituents in *Saposhnikovia divaricata* and *Libanotis laticalycina*, and it can provide reference for the quality evaluation of *Saposhnikovia divaricata* and the basic research of pharmacological substances.

Keywords: *Saposhnikovia divaricata*; *Libanotis laticalycina*; UPLC-Q-TOF-MS; TLC; chemical constituents; identification

防风为伞形科植物防风属防风 *Saposhnikovia divaricata*(Trucz.) Schischk. 未抽花茎的干燥根, 味辛甘, 性温。具解表、祛风、胜湿、止痛之功效^[1]。防风首载于《神农本草经》, 列为上品^[2]。《中药本草》等皆以东北、内蒙古地区作为防风的道地产区^[3]。水防风多分布于河南、山西, 为伞形科岩风属植物宽萼岩风 *Libanotis laticalycina* Shan et shen 的干燥根。防风属于大宗饮片, 是中药制剂处方中的常见药味, 但其野生资源日渐匮乏, 人工种植资源有限, 难以满足市场需求。本课题组在采集防风药材的过程中发现, 防风与水防风的性状和化学成分极为相似, 而现行标准仅采用升麻苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的薄层鉴别和含量测定为评价指标^[4], 难以对防风的质量进行全面、合理的控制, 导致水防风极易混杂在正品防风中投料, 严重影响中药制剂的质量。因此, 应对防风及其伪品水防风的化学成分进行深入的研究, 找出其差异性, 以便能将防风与水防风准确地区分。超高效液相色谱-四级杆-飞行时间高分辨质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术具有分离速度快、专属性强、灵敏度高、扫描速度快的特点, 并可提供准确的分子量及预测化合物的元素组成等优点, 已广泛应用于中药复杂体系的研究^[5-7]。本研究拟采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析防风及其伪品水防风的化学成分, 旨在寻找两者之间化学成分的差异性, 并结合薄层色谱法, 鉴定防风药材的真伪, 为防风药材质量评价指标的选择, 提高防

风药材的质控标准提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 X500R QTOF 型质谱仪和 ExionLC AC 型液相色谱仪(美国 AB SCIEX 公司); XS205 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); Sorvall Legend 17R 型微量离心机(美国 Thermo Scientific 公司, 离心半径 8.6 cm); KQ700-DE 型数控超声波清洗机(江苏昆山超声仪器有限公司)。

1.2 材料 升麻素苷(批号: S-004-180110)、升麻素(批号: S-007-170426), 成都瑞芬思生物科技有限公司; 6'-*O*-apiosyl-5-*O*-Methylvisammiosid(批号: AF20100512)、5-*O*-甲基维斯阿米醇(批号: AF20100511)、3-*O*-乙酰基亥茅酚(批号: AF20100506), 成都埃法生物科技有限公司; 亥茅酚苷(批号: PRF9121702), 成都普瑞法科技开发有限公司; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷(批号: 111523-201509)、紫花前胡苷(批号: 111821-201604)、防风对照药材(批号: 120947-201810)、水防风对照药材(批号: 121349-202002), 中国食品药品检定研究院; 水为屈臣氏蒸馏水, 甲醇、甲酸为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

2 方法

2.1 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

2.1.1 供试品溶液的制备 取药材适量, 粉碎过 50 目

筛, 取约 0.5 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 超声处理(频率 40 kHz, 功率 300 W)30 min, 放冷, 摇匀, 以 $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液适量, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取升麻素苷、升麻素、6''-*O*-apiosyl-5-*O*-Methylvisammiosid、5-*O*-甲基维斯阿米醇、3-*O*-乙酰基亥茅酚、亥茅酚苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、紫花前胡苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声使溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 得混合对照品溶液。

2.1.3 色谱条件 Waters CORTECS UPLC C_{18} 色谱柱 ($2.1\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $1.6\text{ }\mu\text{m}$); 流动相: 0.1%甲酸乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 30%B; 5~20 min, 30%~70%B; 20~27 min, 70%~98%B; 27~30 min, 98%B); 流速: $0.24\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量: $1\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.1.4 质谱条件 扫描范围(m/z)100~1 000; 雾化气压力 379.2 kPa ; 辅助气压力 379.2 kPa ; 气帘气压力 241.3 kPa ; 雾化温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$; 负离子模式进行电喷雾离子源(ESI)全扫描; 毛细管电压 $4\,500\text{ V}$; 裂解

电压 -80 V ; 碰撞能量 35 V 。

2.2 薄层色谱鉴别

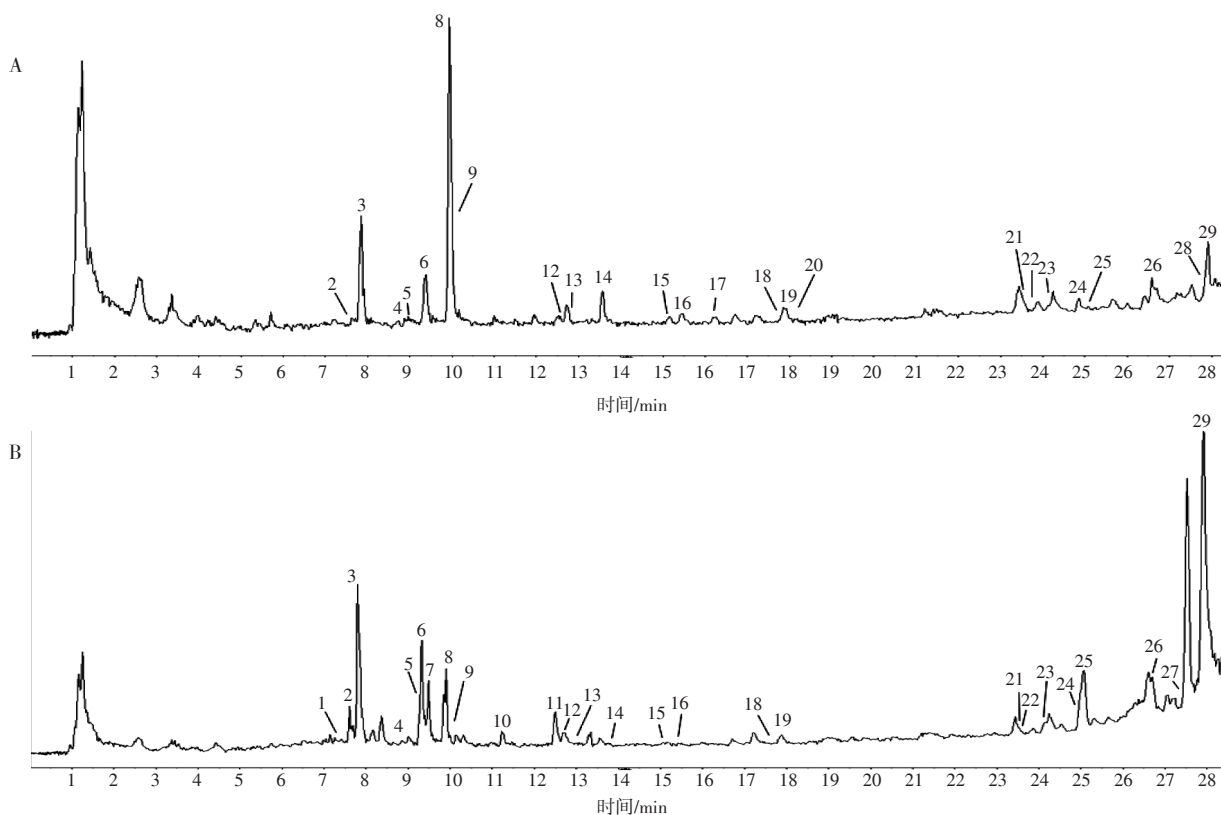
2.2.1 对照品溶液的制备 取 6''-*O*-apiosyl-5-*O*-Methylvisammiosid 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 分别取防风、水防风药材适量, 粉碎过 50 目筛, 取约 0.5 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入乙酸乙酯 20 mL, 超声处理(频率 40 kHz, 功率 300 W)30 min, 放冷, 滤过, 蒸干, 残渣加 1 mL 甲醇即得。

2.2.3 薄层色谱试验 吸取上述制备的防风、水防风供试品溶液各 $3\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\text{ }\mu\text{L}$, 对照品溶液 $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\text{ }\mu\text{L}$, 点于硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(30:3:3:3)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10%硫酸乙醇溶液, 在紫外光灯下检视。

3 结果

3.1 化学成分分析 UPLC-Q-TOF-MS/MS 负离子模式下检测, 得到防风、水防风的质谱基峰离子流图(见图 1), 共检测到 29 个色谱峰。根据质谱数据, 分析化合物保留时间、准确相对分子质量、碎片离



注: A. 防风; B. 水防风

图 1 防风、水防风的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 负离子模式下的离子流图

Figure 1 TIC of *Saposhnikovia divaricata*(Trucz.) Schischk. and *Libanotis laticalycina* Shan et shen in negative ion mode

子信息,并结合对照品以及与文献报道^[8-19]对比,共鉴别出 29 个化学成分,包括 9 个香豆素类(化合物 4~5, 16~18, 23~25, 28), 16 个色原酮类(化合物 3, 6~14, 19~22, 27, 29), 1 个甘油酯类(化合物 2), 3 个未知成分(化合物 1, 15, 26), 其中 8 个化合物通过与对照品进行比对后得到明确识别。鉴定结果见表 1。

表 1 防风、水防风化学成分的 MS/MS 信息

Table 1 Identification of chemical constitutions from *Saposhnikovia divaricata*(Trucz.) Schischk. and *Libanotis laticalycina* Shan et shen by UPLC-Q-TOF-MS/MS

序号	<i>t_R</i> /min	名称	分子式	[M+H] ⁺	误差(×10 ⁻⁶)	碎片离子 <i>m/z</i>	防风	水防风
1	7.42	unknown	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₅	601.212 7	-2.3	469.166 7, 307.116 4		*
2	7.68	divaricacaid	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	321.096 5	-1.2	303.087 4, 273.040 3, 249.040 1	*	*
3	7.82	升麻素苷 ^a	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	469.169 3	-2.5	307.115 6, 290.114 5, 235.059 9	*	*
4	8.99	东莨菪素	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.049 7	0.7	178.026 9, 165.056 9, 137.060 2	*	*
5	9.29	8-羟基-6,7-二甲氧基香豆素	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	223.060 0	-0.3	207.030 2, 190.026 7	*	*
6	9.38	升麻素 ^a	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	307.117 2	-1.2	289.058 4, 259.058 4, 235.058 7	*	*
7	9.48	6''- <i>O</i> -apiosyl-5- <i>O</i> -Methylvisammioside ^a	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₄	585.215 7	-3.6	453.172 6, 291.121 0, 273.111 0		*
8	9.96	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷 ^a	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₀	453.173 6	-4.2	291.120 4, 273.110 3, 231.064 0	*	*
9	10.00	11-hydroxy-sec- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucosylhamaudol	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₁	455.181 9	3.0	293.129 0, 275.119 3, 233.072 5	*	*
10	11.24	3-(((3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i>)-6-(((3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -pyrano[3, 2- <i>g</i>]chromen-6-one(isomer)	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₄	571.201 6	-0.9	439.159 2, 277.105 1, 259.097 0		*
11	12.49	3-(((3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> , 5 <i>S</i>)-6-(((3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -pyrano[3, 2- <i>g</i>]chromen-6-one	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₄	571.200 7	-2.5	439.158 4, 277.105 3, 259.096 4		*
12	12.67	3 <i>S</i> -2, 2-dimethyl-3, 5-dihydroxy-8-hydroxymethyl-3, 4-dihydro-2 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -benzo[1, 2- <i>b</i> :5, 4- <i>b'</i>]dipyrano-6-one(isomer)	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	293.102 2	0.8	275.092 9, 260.069 3, 233.045 6, 221.045 6	*	*
13	12.79	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇 ^a	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	291.122 4	-1	291.121 1, 273.112 6, 243.064 9	*	*
14	13.63	亥茅酚苷 ^a	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₀	439.159 6	-0.6	277.104 5, 259.094 7, 241.086 0	*	*
15	15.17	unknown	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₃	525.1594	-1.7	439.161 2, 277.106 4, 259.096 7, 205.050 5	*	*
16	15.45	补骨脂素	C ₁₁ H ₈ O ₃	187.039 4	2.4	159.046 1, 143.050 4, 131.050 1	*	*
17	16.24	花椒毒素	C ₁₂ H ₈ O ₄	217.249 8	0.4	202.026 8, 174.032 0	*	
18	17.80	佛手柑内酯	C ₁₄ H ₈ O ₄	217.049 8	1.2	202.026 8, 174.032 0	*	*
19	17.89	亥茅酚	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	277.107 0	0	259.096 2, 244.073 9, 205.049 3	*	*
20	18.07	divaricatol	C ₁₇ H ₁₈ O ₇	335.113 1	1.7	275.092 1, 260.069 2, 233.045 8, 221.045 7, 205.050 5, 187.040 2	*	
21	23.46	3- <i>O</i> -乙酰亥茅酚 ^a	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	319.117 6	0	259.096 0, 230.058 5, 217.050 0	*	*
22	23.92	Ledebouriellol	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	375.143 5	-0.9	275.090 5, 247.097 3, 233.044 5	*	*
23	24.30	5-羟基-8-甲氧基补骨脂素	C ₁₂ H ₈ O ₅	233.044 6	0.6	218.021 4, 162.031 8, 134.037 3	*	*
24	24.89	紫花前胡素 ^a	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	329.138 2	-0.5	247.097 4, 229.085 0, 214.062 8	*	*
25	25.05	异欧前胡素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	271.097 5	3.7	203.034 9, 175.038 9, 159.045 0	*	*
26	26.65	Unknown	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.231 5	-1.3	149.024 1, 109.102 1, 95.085 3	*	*
27	27.53	白花前胡乙素	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	446.215 3	-4.8	327.120 7, 245.079 4, 227.070 0		*
28	27.88	3'- <i>O</i> -2-丁酰亥茅酚	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	347.149 5	1.7	259.097 0, 244.074 1, 217.050 0, 205.055 7, 189.055 7, 231.056 0	*	
29	27.92	3- <i>O</i> -当归乙酰亥茅酚	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	359.147 7	-3.4	259.094 3, 241.085 3, 217.047 9	*	*

注: a. 通过与对照品对比确认; *表示在样品中被检出; unknown 为未知化合物

3.2 差异性化学成分的质谱解析 根据上述结果,负离子模式下筛选得到 6''-*O*-apiosyl-5-*O*-Methylvisammioside(7)、花椒毒素(17)、3-(((3*R*, 4*R*, 5*S*)-6-(((3*R*, 4*R*)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2*H*, 6*H*-pyrano[3, 2-*g*] chromen-

6-one(10)及其异构体(11)、divaricatol(20)、白花前胡乙素(27)和 3'-O-2-丁酰亥茅酚(28)共 7 个差异化合物, 包括香豆素类和吡喃色原酮类。

3.2.1 香豆素类 在防风与水防风的差异化学成分中共鉴定出 2 个香豆素类化合物, 其中防风 1 个(花椒毒素)、水防风 1 个(白花前胡乙素)。防风中香豆素多以呋喃香豆素类、二氢呋喃香豆素类和简单香豆素类为主^[9]。呋喃香豆素类化合物广泛分布于高等植物中, 其基本骨架由苯并 α 吡喃酮和呋喃酮构成, 分为线型和角型两种, 并常以 C-5 位和 C-8 位不同取代基的同分异构体形式共存^[11-14]。花椒毒素为呋喃香豆素类, 该化合物可形成 m/z 217.249 8 $[M+H]^+$, 对其进行二级碎裂因丢失甲基自由基和 CO_2 而形成 m/z 202.026 1, 对碎片离子进行碎裂, 可得到丢失 1 个羰基的离子而形成 m/z 174.032 0, 见图 2。

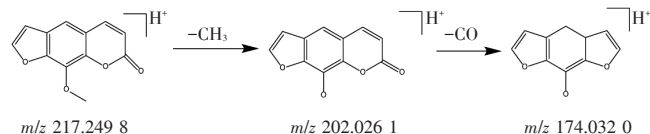


图 2 花椒毒素裂解规律

Figure 2 Fragmentation pathway of xanthotoxin

角型吡喃香豆素是凯尔消旋的衍生物, 在吡喃环的 C-3' 和 C-4' 位置被酰氧基取代。C-3' 和 C-4' 均具有 *R*-和 *S*-构型^[14-16]。角型吡喃香豆素类化合物 ESI-MS 的裂解特征为: 易形成较强的加合离子峰 $[M+NH_4]^+$, 不易形成准分子离子峰 $[M+H]^+$ 。而基峰离子的 C-3' 位置烷氧基断裂形成 m/z 227.070 0 离子, 和 C-3' 位置取代基的酯基断裂形成 m/z 245.079 4 离子。 m/z 227.070 0 离子和 m/z 245.079 4 离子为吡喃香豆素类化合物的特征碎片离子, 是鉴定此类化合物的关键。

白花前胡乙素色谱峰的二级质谱图发现其具有加合离子峰 m/z 446.215 3 $[M+NH_4]^+$ 和特征碎片离子 m/z 327.120 7 $[M+H-C_5H_8O_2]^+$ 、 m/z 245.079 4 $[M+H-C_5H_8O_2-C_5H_6O]^+$ 和 m/z 227.070 0 $[M+H-C_5H_8O_2-C_5H_8O_2]^+$, 见图 3。

3.2.2 吡喃色原酮类 具有差异的化学成分中, 鉴定出 5 个吡喃色原酮类化合物, 其中防风 2 个(divaricatol、3'-O-2-丁酰亥茅酚), 水防风 3 个(6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside、3-(((3*R*, 4*R*, 5*S*)-6-(((3*R*, 4*R*)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3, 2-*g*] chromen-6-one(isomer)、3-(((3*R*, 4*R*, 5*S*)-6-(((3*R*, 4*R*)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3, 2-*g*] chromen-6-one(isomer)、3-(((3*R*, 4*R*, 5*S*)-6-(((3*R*, 4*R*)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3, 2-*g*] chromen-6-one(isomer))。防风是治疗感冒、头痛、风湿关节痛和破伤风的传统中药之一, 其主要的药效成分为色原酮类成分^[20-25]。呋喃色原酮类化合物其母核的裂解一般会先脱掉 CO 或 CO_2 , 有些连接糖基的化合物会优先脱掉糖基, 有些连接羟基的化合物也会优先脱掉 H_2O 。3'-O-2-丁酰亥茅酚在结构上属于吡喃色原酮, 负离子模式下, 3'-O-2-丁酰亥茅酚的离子峰为 m/z 347.149 5 $[M+H]^+$, 二级质谱产生碎片 m/z 259.097 0 $[M+H-C_4H_8O_2]^+$ 、244.074 1 $[M+H-C_4H_8O_2-CH_2]^+$ 、231.056 0 $[M+H-C_4H_8O_2-CO]^+$ 、205.055 7 $[M+H-C_4H_8O_2-CO-C_2H_2]^+$ 、217.050 0 $[M+H-C_7H_{14}O_2]^+$ 、189.055 7 $[M+H-C_7H_{14}O_2-CO]^+$, 见图 4。

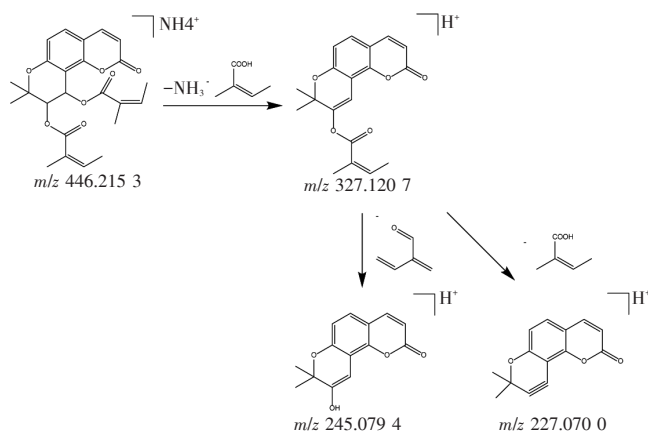


图 3 白花前胡乙素裂解规律

Figure 3 Fragmentation pathway of (-)-Praeruptorin B

8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3, 2-*g*] chromen-6-one(isomer)、3-(((3*R*, 4*R*, 5*S*)-6-(((3*R*, 4*R*)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3, 2-*g*] chromen-6-one)。防风是治疗感冒、头痛、风湿关节痛和破伤风的传统中药之一, 其主要的药效成分为色原酮类成分^[20-25]。呋喃色原酮类化合物其母核的裂解一般会先脱掉 CO 或 CO_2 , 有些连接糖基的化合物会优先脱掉糖基, 有些连接羟基的化合物也会优先脱掉 H_2O 。3'-O-2-丁酰亥茅酚在结构上属于吡喃色原酮, 负离子模式下, 3'-O-2-丁酰亥茅酚的离子峰为 m/z 347.149 5 $[M+H]^+$, 二级质谱产生碎片 m/z 259.097 0 $[M+H-C_4H_8O_2]^+$ 、244.074 1 $[M+H-C_4H_8O_2-CH_2]^+$ 、231.056 0 $[M+H-C_4H_8O_2-CO]^+$ 、205.055 7 $[M+H-C_4H_8O_2-CO-C_2H_2]^+$ 、217.050 0 $[M+H-C_7H_{14}O_2]^+$ 、189.055 7 $[M+H-C_7H_{14}O_2-CO]^+$, 见图 4。

3.3 薄层色谱鉴别结果 参考《中国药典》(一部) 2020 年版防风鉴别方法, 发现防风、水防风色谱中, 在与升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷相对应位置上, 出现相同颜色的荧光斑点, 该方法不能将防风和水防风区分开来, 见图 5-A。根据本研究 UPLC-Q-TOF-MSMS 分析结果, 防风未检测到 6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside、白花前胡乙素、3-(((3*R*, 4*R*, 5*S*)-6-(((3*R*, 4*R*)-3, 4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)oxy)methyl)-3, 4, 5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2, 2, 8-trimethyl-3, 4-dihydro-2H, 6H-pyrano[3, 2-*g*] chromen-

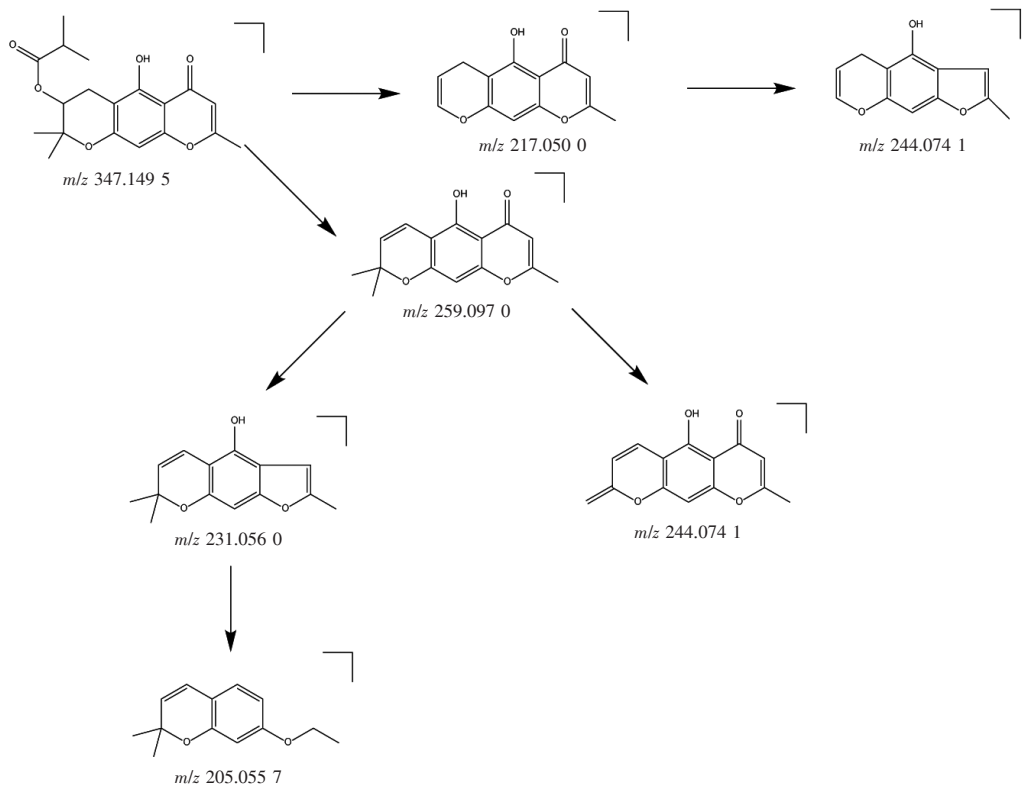
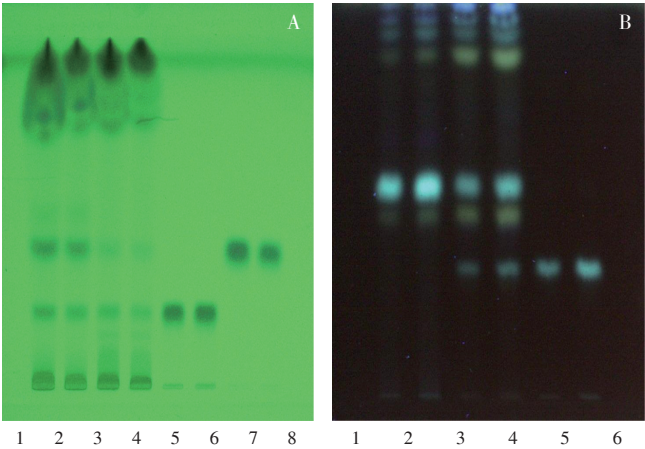


图 4 3'-O-2-丁酰亥茅酚裂解规律
Figure 4 Fragmentation pathway of 3'-O-2-butyrylhydrimol

6-one 及其异构体 4 种成分。所以, 选取 6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside 为对照品, 拟通过该对照品斑点来区分防风和水防风。结果见图 5-B。防风缺少 6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside 对应斑点, 但水防风供试品色谱与 6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside 对照品色谱相应的位置上有相同颜色的斑点对应, 与 UPLC-Q-TOF-MS/MS 测定结果一致, 说明该薄层色谱方法可鉴别防风和水防风。

4 讨论

本研究结果显示, 防风、水防风的离子流图轮廓大致一致, 主要为色原酮类、香豆素类以及少量甘油酯类。升麻素苷(3, $t_R=7.82$ min)、升麻素(6, $t_R=9.38$ min)及 5-O-甲基维斯阿米醇苷(8, $t_R=9.96$ min)在防风、水防风药材中均可见明显信号, 且含量高, 与文献报道^[26]一致。防风中升麻素(6, $t_R=9.38$ min)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(8, $t_R=9.96$ min)、亥茅酚苷(14, $t_R=13.63$ min)响应信号明显高于水防风的响应信号, 而水防风中升麻素苷(3, $t_R=7.82$ min)、异欧前胡素(25, $t_R=25.02$ min)、3-O-当归乙酰亥茅酚(29, $t_R=27.92$ min)响应信号明显高于防风。通过防风、水防风化学成分组的全面比对, 发现两者的化



注: (A)1~2. 防风; 3~4. 水防风; 5~6. 升麻素苷; 7~8. 5-O-甲基维斯阿米醇苷。(B)1~2. 防风; 3~4. 水防风; 5~6. 6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside

图 5 防风及其伪品水防风薄层色谱图
Figure 5 TLC of *Saposhnikovia divaricata* and its adulterant *Libanotis laticalcina*

学成分在组成上比较相似。但是, 部分化学组成存在显著差异, 防风未检测到 6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside、白花前胡乙素、3-(((3R,4R,5S)-6-((((3R,4R)-3,4-dihydroxy-4-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl) (hydroxymethyl) tetrahydrofuran-

2-yl)oxy)methyl)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-5-hydroxy-2,2,8-trimethyl-3,4-dihydro-2H,6H-pyrano[3,2-g]chromen-6-one 及其异构体 4 种成分,水防风未检测到花椒毒素、divaricatol、3'-O-2-丁酰亥茅酚 3 种成分。此外,对于未鉴定的化合物,还有待于下一步深入研究。防风及水防风的薄层色谱图中,6''-O-apiosyl-5-O-Methylvisammioside 的荧光斑点清晰,分离度好,斑点特征可反映防风药材及其伪品水防风药材的差异,所建立的方法能够达到对防风的快速鉴别及质量控制的目的,可作为防风药材的快速鉴别方法。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术能快速、准确地鉴别防风和水防风的差异化合物,可有效用于防风指纹图谱数据的快速分析。在防风和水防风性状极易混淆的情况下,薄层色谱鉴别法能辅助判别防风药材的真伪,以保证中药制剂原料的质量稳定。同时,为提高防风质量控制标准提供了参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 149-150.
- [2] 史磊, 孟祥才, 曹思思, 等. 防风的本草溯源[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(4): 93-97.
- [3] 国家中医药管理局《中药本草》编委会. 中药本草:第5卷[M]. 上海:上海可行技术出版社, 1998: 1006-1032.
- [4] 王浩, 郭凌阁, 尚兴朴, 等. 基于防风外观性状和内在指标性成分划分防风药材商品规格等级研究[J]. 中草药, 2020, 51(20): 5320-5327.
- [5] 叶耀辉, 史毅, 张博文, 等. 不同产地北柴胡药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 124-129.
- [6] 张杨, 冯宝民, 卢轩. UPLC/Q-TOF-MS 联用技术在药物分析中的应用进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(11): 1992-1996.
- [7] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭姣. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术的白术药材化学成分快速识别研究[J]. 质谱学报, 2015, 36(1): 72-77.
- [8] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 等. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2146-2152.
- [9] 曹思思, 史磊, 孙佳琳, 等. 防风的化学成分及药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(1): 95-102.
- [10] 柏桂顺, 王成功, 李江勇, 等. 中药防风活性成分及生理作用研究进展[J]. 中国民间疗法, 2020, 28(12): 116-117.
- [11] 王思淼, 霍金海, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的不同生长年限防风中香豆素成分分析[J]. 中国中医药科技, 2019, 26(3): 362-367, 483.
- [12] 任晓蕾, 霍金海, 孙国东, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析防风中香豆素类化学成分[J]. 中国药房, 2019, 30(3): 349-354.
- [13] LI B, ZHANG X, WANG J, et al. Simultaneous characterisation of fifty coumarins from the roots of *Angelica dahurica* by off-line two-dimensional high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry[J]. Phytochemical Analysis, 2014, 25: 229-240.
- [14] 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/OL]. 中国中药杂志: 1-17[2021-03-03]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20201012.203>.
- [15] 邵怡, 杨玉佩, 李家宇, 等. HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析防风药汤水煎液的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 54-59.
- [16] 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.
- [17] 刘丽娜, 张南平, 金红宇, 等. 野生抽茎与未抽茎防风中色原酮类成分比较研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(8): 637-642.
- [18] 黄彧, 吴桐, 刘春明, 等. 防风中色原酮类化学成分的分离及鉴定[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1558-1561.
- [19] 刘亚娟, 任晓蕾, 霍金海, 等. 防风色原酮类化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(3): 355-361, 384.
- [20] 杨成龙. 防风通圣散加减治疗血管性头痛临床分析[C]//中华中医药学会皮肤病分会. 2013 中华中医药学会皮肤病分会第十次学术交流大会暨湖南省中西医结合皮肤病第八次学术交流大会论文汇编. 中华中医药学会皮肤病分会, 2013: 1.
- [21] 乔夕, 刘维. 防风祛痹丸治疗慢性期痛[J]. 山西中医, 2010, 26(1): 5.
- [22] OKUYAMA E, HASEGAWA T, MATSUSHITA T, et al. Analgesic components of *Saposhnikovia* root (*Saposhnikovia divaricata*) [J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2001, 49(2): 154-160.
- [23] 魏凌雪. 防风通圣散加减治疗小儿脾胃内伤基础上外感发热的效果[J]. 中国民康医学, 2020, 32(18): 76-78.
- [24] 钱浩, 王逸宁, 储非凡, 等. 基于网络药理学及生物信息学探讨防风治疗骨关节炎的物质基础及作用靶点研究[J]. 中国药师, 2021, 24(1): 16-25.
- [25] 柏桂顺, 王成功, 李江勇, 等. 中药防风活性成分及生理作用研究进展[J]. 中国民间疗法, 2020, 28(12): 116-117.
- [26] 毕晓黎, 廖小芳, 胥爱丽, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的防风与其伪品水防风的鉴别研究[J]. 中药材, 2019, 42(3): 530-534.

(编辑: 梁进权)