

UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究胆木药材水提物的化学成分

陈金梅¹, 廖锦红², 高金薇¹, 张鹏², 高广慧^{3*}, 孙立新^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁本溪 117004; 2. 海南森祺制药有限公司, 海口 570216;
3. 辽宁省食品检验检测院, 沈阳 110015)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对胆木药材水提物的化学成分进行定性分析。方法:采用 Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm),以 0.2% 甲酸铵缓冲盐溶液-0.2% 甲酸铵缓冲盐甲醇溶液为流动相进行梯度洗脱,柱温 30 ℃;采用电喷雾离子化源,正、负离子全扫描模式。结果:通过高分辨质谱数据分析结合对照品及相关文献,从胆木药材水提取物中共鉴定出 47 个化学成分,包括 26 个吲哚类生物碱,15 个有机酚酸及其苷类,2 个喹啉酮类生物碱,2 个三萜类,1 个黄酮类和 1 个环烯醚萜苷类化合物,其中奎宁酸,3,4-二羟基肉桂酸,马尾柴酸,nauclefine,香草酸,3,4,5-三甲氧基苯酚,3,4-二羟基苯甲酸甲酯,2,3-二羟基苯甲酸和乌檀酰胺 A 同分异构体为首次从胆木中报道。结论:该研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速鉴定胆木药材水提物的主要化学成分为吲哚类生物碱和有机酚酸及其苷类,其中 9 个化合物为首次从胆木中报道。

[关键词] 胆木; 水提物; 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱; 吲哚类生物碱; 喹啉酮类生物碱

[中图分类号] R284.1;R289;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0049-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181517

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180517.1515.002.html>

[网络出版时间] 2018-05-18 14:58

Study on Chemical Components of Aqueous Extract from Raw *Nauclea officinalis* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

CHEN Jin-mei¹, LIAO Jin-hong², GAO Jin-wei¹, ZHANG Peng², GAO Guang-hui^{3*}, SUN Li-xin^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, China;
2. Hainan Senqi Pharmaceutical Co. Ltd, Hainan 570216, China;
3. Liaoning Institute for Food and Control, Shenyang 110015, China)

[Abstract] **Objective:** To conduct a qualitative analysis on the chemical constituents of the aqueous extract from raw *Nauclea officinalis* by using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) method. **Method:** Chromatographic separation was performed on Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm) with 0.2% ammonium formate buffer salt solution-0.2% ammonium formate buffer salt methanol solution as the mobile phase for gradient elution. The column temperature was maintained at 30 ℃, and the analytes were determined by a positive and negative ionization electrospray mass spectrometer with electro-spray ionization source. **Result:** The 47 chemical constituents including 26 indole alkaloids, 15 organic phenolic acids and glycosides, 2 isoquinoline alkaloids, 2 triterpenes, 1 flavonoids and 1 iridoid glycoside were identified from the aqueous extract of *N. officinalis* or tentatively characterized by comparing

[收稿日期] 20180131(014)

[基金项目] 辽宁省特聘教授项目(2014)

[第一作者] 陈金梅,在读硕士,从事中药成分分析及药效研究,Tel:024-43520599,E-mail:chenjinmei9008@163.com

[通信作者] *孙立新,博士,教授,从事中药活性成分和质量控制研究,Tel:024-43520600,E-mail:slx04@163.com;

*高广慧,硕士,主任药师,从事食品营养与安全研究,Tel:024-31620848,E-mail:gghgh2000@163.com

their mass spectra information with those of reference substances and literature data. Nine compounds were reported for the first time from *N. officinalis*, namely quinic acid, 3, 4-dihydroxy cinnamic acid, barbinervic acid, naucleoline, vanillic acid, 3, 4, 5-trimethoxy phenol, 3, 4-dihydroxy benzoic acid methyl ester, 2, 3-dihydroxy benzoic acid amide and naucleactonin A isomers. **Conclusion:** In this study, the main chemical components from the aqueous extract of *N. officinalis* were rapidly identified as indole alkaloids, organic phenolic acids and glycosides by using UPLC-Q-TOF-MS/MS. Nine compounds were reported from *N. officinalis* for the first time.

[Key words] *Nauclea officinalis*; aqueous extract; UPLC-Q-TOF-MS/MS; indole alkaloids; quinoline alkaloids

胆木又名山熊胆、熊胆树、乌檀,是我国原产唯一的茜草科乌檀属植物,主要分布于海南、广东、广西等地,为我国重点保护的珍稀野生植物物种之一^[1-3]。胆木收载于《黎族医药》,茎皮均能入药,在海南黎族人作为民间常用草药用于治疗感冒发热、急性扁桃体炎、咽喉炎支气管炎等疾病^[4-6]。目前从胆木茎、皮、枝中分离鉴定出的化合物主要有生物碱类、五环三萜类和有机酚酸类等^[7-8]。ZHU等^[9]采用超高效液相色谱-二极管阵列检测器-飞行时间质谱法(UPLC-PDA-TOF-MS)法鉴定出胆木浸膏片和胆木注射液中33个化合物,分别为27个生物碱及其苷类,5个酚酸及其苷类,1个环烯醚萜苷类化合物;王静静^[10]采用液相色谱-二极管阵列检测器-电喷雾-质谱(HPLC-DAD-ESI-MSⁿ)法鉴定胆木注射液中25个化合物,包括16个生物碱及其苷类,7个有机酸及其苷类,2个环烯醚萜苷化合物。目前尚无采用液质联用方法对胆木药材化学成分研究的报道。超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术是近几年发展起来的快速高效鉴定天然药物中复杂庞大化合物体系的分析技术,可以在不依靠对照品的情况下,对每个组分进行定性分析^[11-13]。故本研究采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对胆木药材水提物的化学成分进行鉴定,为胆木化学成分和药效物质基础研究提供依据。

1 材料

UltiMate 3000型超高效液相色谱仪,配有双元泵,真空脱气机,DAD检测器(美国Thermo Fisher公司);Impact II Q-TOF型质谱仪,配有电喷雾离子化源,OtofControl工作站以及DataAnalysis 4.3数据处理软件(德国Bruker公司);CPA225D型1/10万电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);甲酸(质谱纯,美国Sigma公司);甲酸胺(色谱纯,美国Sigma公司);实验用水(Milli-Q超纯水)。獐牙菜苷对照品(批号20151208,纯度98%)和原儿茶酸对照品

(批号20160413,纯度98%)购自宝鸡市辰光生物科技有限公司。三批胆木药材干燥茎(带皮)切片(批号160913,160914,160915)由海南森祺制药有限公司提供,经沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定为茜草科乌檀属植物胆木*Nauclea officinalis*的干燥茎(带皮)切片。

2 方法

2.1 色谱条件 采用AcclaimTM RSLC 120 C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm);流动相0.2%甲酸铵缓冲盐溶液(A)-0.2%甲酸铵缓冲盐甲醇溶液(B),梯度洗脱(0~3 min, 1.0%~39.0% B,流速0.2 mL·min⁻¹;3~14 min, 39.0%~99.9% B,流速0.4 mL·min⁻¹),柱温30℃,进样量5 μL。

2.2 质谱条件 一级全扫描:离子源为电喷雾离子化源(ESI),采用正离子与负离子两种扫描方式,以2 mmol·L⁻¹甲酸钠溶液进行准确质量数校正,质量扫描范围*m/z* 50~1 000。锥孔电压35 V,毛细管电压4 500 V,雾化气和干燥气均为氮气,干燥气温度200℃,干燥气流速8.0 L·min⁻¹,雾化气压力0.12 MPa,注射泵流速80 μL·h⁻¹。

二级扫描:质量扫描范围*m/z* 50~1 000,碰撞气氮气,碰撞能10~30 eV,使用自动采集模式自动选择质谱产生的最强离子峰作为二级质谱的母离子进行碎裂。

2.3 对照品溶液的配制 精密称定獐牙菜苷和原儿茶酸对照品5.08,5.05 mg,分别置于5 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成各对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液适量,用甲醇稀释制成獐牙菜苷、原儿茶酸的质量浓度分别为1.02,1.01 mg·L⁻¹的混合对照品储备液,过孔径为0.22 μm滤膜,取续滤液,即得,于4℃储存备用。

2.4 药材供试品溶液的制备 取胆木药材干燥茎(带皮)切片约10 g,精密称定,加水100 mL,加热回流2 h,摇匀,过滤,滤渣加水80 mL,加热回流提取1.5 h,摇匀,过滤,滤渣加水60 mL,加热回流1 h,

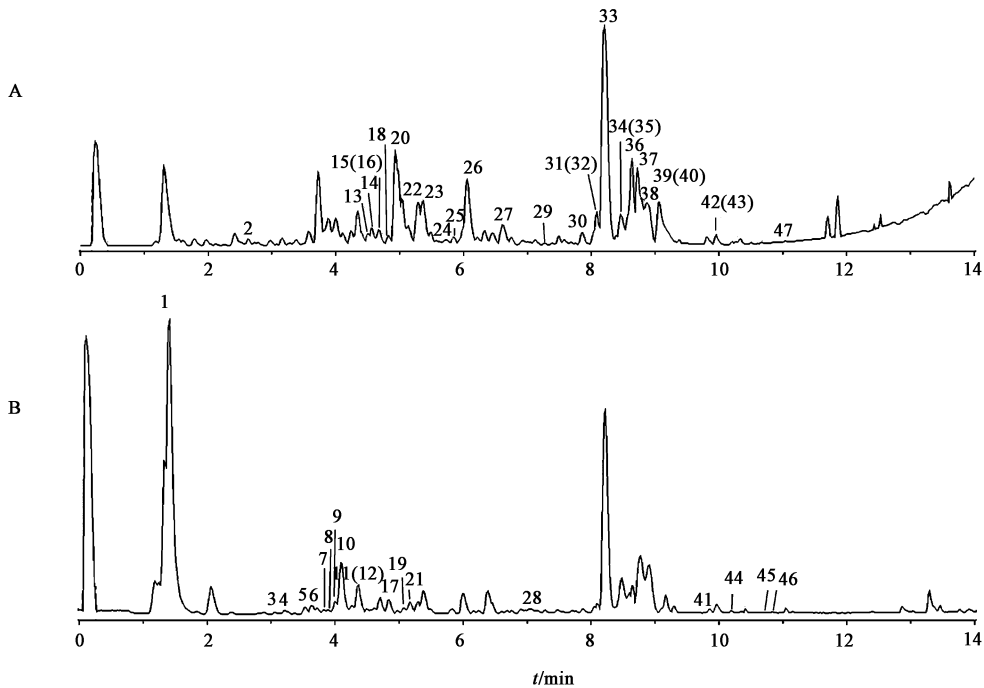
摇匀,过滤,合并 3 次滤液置 250 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,制成质量浓度约为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜,取续滤液,即得,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存备用。

3 结果

3.1 化学成分数据库的建立 根据国内外数据库检索与胆木的相关文献,收集胆木中化学成分,通过 Compass IsotopePattern 软件(含各元素精确质量数),根据各成分碳、氢、氧的个数,计算精确相对分子质量,建立包括化合物名称、分子式、精确相对分子质量及所属化合物类别的胆木化学成分数据库。

3.2 化合物鉴定 采用 2.1 与 2.2 项下的色谱和质谱条件,对混合对照品溶液和供试品溶液进样分析,得到典型正、负离子基峰色谱图(BPC)和提取离

子流色谱图(EIC)见图 1。首先,结合正负离子模式下检测所得的精确相对分子质量,通过 Compass DataAnalysis SmartFormula Manually 软件在 5 ppm 的质量偏差范围内计算其精确分子式,与数据库化合物的分子式进行对比,对化合物进行初步鉴定。其次,使用 Auto MS/MS 模式获得化合物相应的碎片离子,根据离子的裂解情况并结合文献进一步比对推测。对于数据库中没有的化合物,通过 Compass DataAnalysis SmartFormula Manually 软件在 5 ppm 的质量偏差范围内计算精确分子式,使用中药化学成分数据库进行检索得到可能的化合物,通过对比化合物的二级碎片,进一步比对推测。



A. 正离子模式;B. 负离子模式;1. 奎宁酸;2. 2,3-二羟基苯甲酸;4. 新绿原酸;5. 原儿茶酸;6. 绿原酸;7. 隐绿原酸;8. 马钱酸;9. kelpayoside A;10. 对羟基苯甲酸;11. 3,4-二羟基肉桂酸;12. 3,4-二羟基苯甲酸甲酯;17. 3,4,5-三甲氧基苯酚;19. 香草酸;21. 橙皮苷;28. 香草醛;41. 2β , 3β , 19α , 23 -四羟基- 12 -烯- 28 -乌苏酸;44. 3,14-dihydroangustine;45. 马尾柴酸;46. 乌檀酰胺 A 同分异构体

图 1 正、负离子模式下胆木药材水提取物离子流色谱

Fig. 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS chromatograms in positive and negative ion mode of sweroside and the aqueous extract of raw *Nauclea officinalis*

由于不同批号的样品差异,药材(批号 160913)最多鉴定出 47 个化合物,包括 26 个吡啶类生物碱,15 个有机酚酸及其苷类,2 个喹啉酮类生物碱,2 个三萜类,1 个黄酮类和 1 个环烯醚萜苷类化合物,具体鉴定结果见表 1。奎宁酸,3,4-二羟基肉桂酸,马

尾柴酸,nauclefiline,香草酸,3,4,5-三甲氧基苯酚,3,4-二羟基苯甲酸甲酯,2,3-二羟基苯甲酸,乌檀酰胺 A 同分异构体等 9 个化合物为首次从胆木中报道。鉴定出的 47 个化合物,其中獐牙菜苷和原儿茶酸经与对照品比对确定。

表 1 胆木药材水提取物中化学成分鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents of aqueous extract of raw *Nauclea officinalis*

峰号	t_R /min	分子式	化合物	$[M+H]^+$ / $[M-H]^-$ (m/z)	二级质谱碎片	化合物 类型
1	1.36	$C_7H_{12}O_6$	奎宁酸 quinic acid	191.056 2	127.040 2, 109.029 4, 93.034 7	b
2	2.69	$C_9H_{10}O_4$	藜芦酸 resveratrol	183.065 0	165.054 1, 147.043 7, 137.059 9	b
3	3.15	$C_7H_6O_4$	2,3-二羟基苯甲酸 2,3-dihydroxybenzoic acid	153.019 1	108.021 6	b
4	3.26	$C_{16}H_{18}O_9$	新绿原酸 neochlorogenic acid	353.088 2	191.056 2, 179.035 4, 135.045 3	b
5	3.55	$C_7H_6O_4$	原儿茶酸 protocatechuic acid	153.019 5	108.021 8, 91.018 8	b
6	3.67	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸 chlorogenic acid	353.088 6	191.056 3, 179.035 3, 135.045 1	b
7	3.90	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸 cryptochlorogenic acid	353.088 1	191.056 1, 179.035 3, 135.045 3	b
8	3.96	$C_{16}H_{24}O_{10}$	马钱酸 loganate	375.128 3	213.076 7, 169.086 9	b
9	4.01	$C_{20}H_{30}O_{13}$	kelampayoside A	477.162 0	353.088 5, 233.067 2, 125.024 1	a
10	4.14	$C_7H_6O_3$	对羟基苯甲酸 hydroxy benzoic acid	137.024 4	108.021 8, 92.026 9	b
11	4.46	$C_9H_8O_4$	3,4-二羟基肉桂酸 3,4-dihydroxycinnamic acid	179.035 0	135.044 9, 92.994 3	b
12	4.47	$C_8H_8O_4$	3,4-二羟基苯甲酸甲酯 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester	167.034 7	152.011 0, 108.021 8, 93.035 1	b
13	4.53	$C_{26}H_{34}N_2O_9$	naucleamide A-10- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	519.233 4	357.180 2, 339.169 7, 160.075 3	a
14	4.61	$C_{16}H_{22}O_9$	獐牙菜苷 sweroside	359.133 9	283.071 6, 125.024 4, 255.233 5	f
15	4.78	$C_{26}H_{30}N_2O_{10}$	naucleoxoside C	531.197 2	515.201 4, 369.143 9, 353.149 1	a
16	4.79	$C_{26}H_{30}N_2O_{10}$	nauclealotide B (nauclealotide C or nauclealotide D)	531.197 2	349.119 5, 297.088 4, 511.176 0	a
17	4.87	$C_9H_{12}O_4$	3,4,5-三甲氧基苯酚 3,4,5-trimethyl phenol	183.066 2	151.003 8, 139.076 9, 123.008 7	b
18	4.88	$C_{26}H_{30}N_2O_9$	naucleoxoside A (naucleoxoside B)	515.202 3	353.149 5, 283.107 7, 137.059 5	a
19	5.08	$C_8H_8O_4$	香草酸 vanillic acid	167.034 9	135.045 1, 108.021 5, 91.018 8	b
20	5.11	$C_{26}H_{28}N_2O_9$	3-表短小蛇根草苷 3-epi-pumiloside	513.186 8	351.133 8, 333.123 1, 281.091 9	c
21	5.18	$C_{28}H_{34}O_{15}$	橙皮苷 hesperidin	609.183 4	455.119 5, 179.034 8, 161.024 2	e
22	5.38	$C_{11}H_{12}O_4$	3,4-二甲氧基肉桂酸 3,4-dimethoxycinnamic acid	209.080 8	191.069 9, 177.054 2, 149.059 3	b
23	5.42	$C_{28}H_{34}N_2O_{11}$	5- β -carboxystrictoside	575.223 5	413.170 4, 395.159 9, 343.128 7	a
24	5.82	$C_{26}H_{30}N_2O_{11}$	naucleoxoside D (naucleoxoside E)	547.192 1	367.128 9, 297.086 8, 158.060 0	a
25	5.93	$C_{20}H_{18}N_2O_4$	乌檀酰胺 B naucleactonin B	351.133 8	321.123 1, 259.147 1, 160.075 6	a
26	6.04	$C_{26}H_{28}N_2O_9$	短小蛇根草苷 pumiloside	513.186 1	351.131 9, 333.123 3, 281.093 2	c
27	6.75	$C_{26}H_{30}N_2O_9$	10-羟基异长春花苷内酰胺 (10-羟基喜果苷) 10-hydroxystrictosamide (10-hydroxy vincosamide)	515.202 2	353.149 2, 283.107 3, 160.075 2	a
28	7.15	$C_8H_8O_3$	香草醛 vanillin	151.040 5	123.046 6, 110.983 5, 92.026 4	b
29	7.24	$C_{27}H_{30}N_2O_{10}$	3 α ,5 α -tetrahydrodeoxycordifoline lactam	543.196 6	381.143 2, 335.137 9, 311.101 6	a
30	7.84	$C_{20}H_{22}N_2O_3$	naucleamide E	339.170 5	321.159 3, 303.148 6, 249.138 1	a
31	8.04	$C_{20}H_{24}N_2O_3$	naucleamide A (naucleamide B)	341.185 7	323.175 2, 305.164 6, 144.080 6	a
32	8.09	$C_{20}H_{20}N_2O_3$	乌檀醛碱 naucleidinal	337.154 5	293.165 0, 185.107 4	a
33	8.21	$C_{26}H_{30}N_2O_8$	异长春花苷内酰胺 strictosamide	499.207 1	337.154 7, 267.112 7, 171.091 6	a
34	8.38	$C_{20}H_{22}N_2O_3$	乌檀酰胺 D naucleactonin D	339.169 9	321.159 1, 249.138 0, 171.091 8	a
35	8.40	$C_{20}H_{20}N_2O_2$	nauclefiline	321.159 5	293.128 3, 249.138 6, 109.064 9	a
36	8.64	$C_{16}H_{12}N_2O_2$	乌檀费定碱 nauclefidine	265.096 8	263.081 5, 247.086 6	a
37	8.73	$C_{20}H_{20}N_2O_3$	乌檀酰胺 C naucleactonin C	337.154 4	267.112 7, 171.091 5, 144.080 7	a

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	化合物	$[M + H]^+$ / $[M - H]^-$ (m/z)	二级质谱碎片	化合物 类型
38	8.85	$C_{20}H_{22}N_2O_3$	naucleofficine D	339.170 1	321.159 2, 249.138 1, 109.064 4	a
39	9.19	$C_{26}H_{30}N_2O_8$	喜果苷 vincosamide	499.206 7	337.154 0, 267.112 2, 171.091 2	a
40	9.24	$C_{20}H_{19}N_3O_2$	3-R-3,4-二氢牛眼马钱托林碱(3-S-3,4-二氢牛眼马钱托林碱) 3-R-3, 4-dihydroangustoline (3-S-3, 4-dihydroangustoline)	334.155 1	305.133 6, 171.091 1	a
41	9.76	$C_{30}H_{48}O_6$	2 β ,3 β ,19 α ,23-四羟基-12-烯-28-乌苏酸 2 β ,3 β ,19 α ,23-tetrahydroxy-12-ene-28-oxuronic acid	503.337 9	485.328 3, 459.347 4	d
42	9.86	$C_{20}H_{17}N_3O_2$	牛眼马钱托林碱 angustoline	332.139 4	316.110 4, 288.144 0, 142.066 2	a
43	9.89	$C_{19}H_{14}N_2O_3$	乌檀酰胺 A naucleactonin A	319.107 5	275.082 4, 172.040 6, 144.045 4	a
44	10.18	$C_{20}H_{17}N_3O$	3,14-dihydroangustine	314.129 6	299.106 0, 171.056 3	a
45	10.74	$C_{30}H_{48}O_5$	马尾柴酸 barbinervic acid	487.341 8	469.332 5, 437.306 2	d
46	10.84	$C_{19}H_{14}N_2O_3$	乌檀酰胺 A 同分异构体 naucleactonin A isomers	319.107 4	303.112 0, 171.090 3	a
47	11.13	$C_{20}H_{15}N_3O$	angustine	314.128 5	297.102 1, 282.167 3	a

注: a. 吲哚类生物碱; b. 有机酚酸及其苷类; c. 喹啉酮类生物碱; d. 三萜类; e. 黄酮类; f. 环烯醚萜苷类。

3.3 胆木水提物化学成分的鉴定

3.3.1 吲哚类生物碱 异长春花苷内酰胺和喜果苷互为一对对映异构体, 异长春花酰胺 C-3 位为 α -H, 喜果苷 C-3 位为 β -H, 二者具有相同的质谱裂解行为。有文献报道称胆木中 C-3 位为 α -H 的化合物含量较大^[8], 峰 33 和峰 39 的分子组成均为 $C_{26}H_{30}N_2O_8$, 母离子分别为 499.207 1 $[M + H]^+$ 和 499.206 7 $[M + H]^+$ 。结合二者提取离子流色谱图, 推测峰 33 为异长春花苷内酰胺, 保留时间为 8.21 min, 峰 39 为喜果苷, 保留时间为 9.19 min。二者质谱裂解基本一致, 以异长春花苷内酰胺为例正离子模式下经一级质谱扫描得到准分子离子 m/z 499.207 1 $[M + H]^+$, 脱去一分子葡萄糖产生 m/z 337.154 7 的碎片离子峰, 进而脱去一分子水得二级碎片离子 m/z 319.143 9, 同时离子 m/z 337.154 7 发生 E 环 RDA 反应得二级碎片离子 m/z 267.112 7, 发生 D 环 RDA 反应得二级碎片离子 m/z 171.091 6, 发生 C 环 RDA 反应得二级碎片离子 m/z 144.080 7, 与文献^[14]报道一致。

峰 35 为 nauclefiline, 首次从胆木中鉴定出, 分子式为 $C_{20}H_{20}N_2O_2$, 准分子离子为 m/z 321.159 7 $[M + H]^+$ 。对比 nauclefiline 和乌檀酰胺 D 的结构式及质谱数据可知, nauclefiline 为乌檀酰胺 D 脱去一分子水所得, 准分子离子 m/z 321.159 7 脱去一分子 CO 产生 m/z 293.128 3 的碎片离子峰, 同时准分子离子 m/z 321.159 1 发生 E 环 RDA 反应得二级碎片离子 m/z 249.138 6, 二级质谱图见图 2。

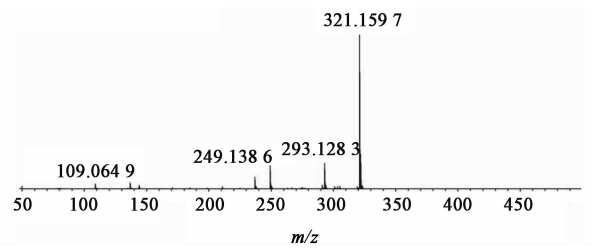


图 2 nauclefiline 的二级质谱
Fig. 2 Product ion spectrum of nauclefiline

峰 46 与乌檀酰胺 A 具有相同的分子式 $C_{19}H_{14}N_2O_3$, 为乌檀酰胺 A 的同分异构体, 首次从胆木中鉴定出, 此化合物二级质谱图中有吲哚类生物碱的特征母核碎片离子 m/z 171.090 3 和 m/z 144.079 0, 可以推断其为吲哚类生物碱化合物。其保留时间为 10.84 min, 正离子模式下经一级质谱扫描得到准分子离子 m/z 319.106 7 $[M + H]^+$, 其裂解脱去一分子 CH_2 , 进一步裂解脱去一分子 CO 得到 m/z 277.096 5, 碎片离子 m/z 303.112 0 如何从准分子离子 m/z 319.106 9 裂解未分析出来。母核发生 RDA 裂解分别产生 m/z 171.090 3 和 m/z 144.079 0 的碎片离子, 二级质谱图如图 3 所示。由于未检索到此化合物的信息, 所以先暂称此化合物为乌檀酰胺 A 的同分异构体。

3.3.2 喹啉酮类生物碱 在胆木中发现的喹啉酮类生物碱只有 2 个, 分别为峰 26 短小蛇根草苷, 保留时间为 6.04 min 和峰 20 3-表短小蛇根草苷, 保留时间为 5.11 min, 两者互为一对对映异构体, 具有相同的质谱裂解行为, 以 3-表短小蛇根草苷为例, 正

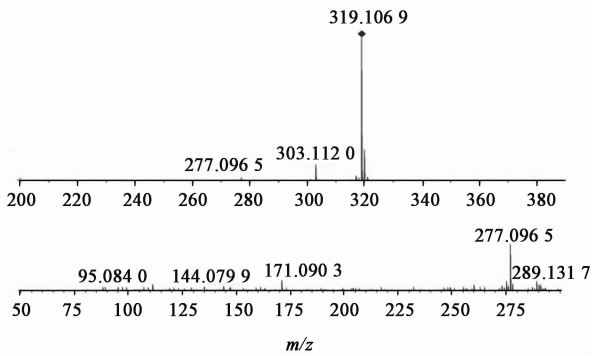


图 3 乌檀酰胺 A 同分异构体的二级质谱

Fig. 3 Product ion spectrum of isomers of nucleactonin A

离子模式下,一级质谱扫描得到准分子离子 m/z 513.1865 $[M + H]^+$,二级质谱产生的碎片离子主要有 m/z 351.1338, 333.1231, 305.1280, 281.0919, 263.0891, 185.0704, 158.0603, 与文献 [15] 报道相一致。其特征性裂解途径有 2 种,一种是二级质谱得到的碎片离子 m/z 351.1338 脱去一分子 OH 生成离子 m/z 333.1231,进一步脱去一分子 CO,生成较稳定的离子 m/z 305.1280;另一种是 m/z 351.1338 经 E 环发生 RDA 裂解,丢失特征性中性碎片 70 生成子离子 m/z 281.0919,又经 D 环上的 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 185.0704,进一步 C 环发生 RDA 裂解最终得到喹啉酮母核碎片离子 m/z 158.0603。

3.3.3 有机酚酸及其苷类 绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸三者互为异构体,分子组成为 $C_{16}H_{18}O_9$,三者只是咖啡酰基连接的位置不同,文献报道 [16] 当咖啡酰基取代在 3 或 5 位时,都会产生 m/z 191 的基峰离子,但前者产生的 m/z 179 丰度较后者要高,当咖啡酰基取代在 5 位时,一般只检出 m/z 191 碎片离子, m/z 179, 135 等极少。而当咖啡酰基取代在 4 位时, m/z 173 $[191 - H_2O]^-$ 是其 MS^2 谱的基峰离子。结合文献报道 [17] 中三者反相色谱柱上的保留行为差异及质谱图的差别,可以推测峰 6 为绿原酸保留时间为 3.67 min,峰 4 为新绿原酸保留时间为 3.26 min,峰 7 为隐绿原酸保留时间为 3.90 min。据文献报道 [18] 表明它们具有相似的质谱裂解行为,裂解方式存在一定的规律性:在负离子模式下,质谱特征碎片显示该类化合物较易产生苯乙醇苷元与咖啡酰基结构,以新绿原酸为例,负离子模式下,一级质谱去质子化得到准分子离子 m/z 353.0888 $[M - H]^-$,得到的特征碎片离子主要为准分子离子丢失奎宁酰基得 m/z 191.0562,进一步丢失一分子

H_2O 得 m/z 179.0354,进一步脱羧后的分子离子峰 m/z 135.0453,准分子离子丢失咖啡酰基得 m/z 161.0247。

峰 1, 3, 11, 12, 17, 19 均为首次从胆木中鉴定的化合物。峰 1 为奎宁酸,分子式为 $C_7H_{12}O_6$,其保留时间为 1.39 min,表明其极性非常大,二级质谱图见图 4,从中可见中性丢失水分子的碎片,说明该化合物结构中含有羟基集团,结合文献报道的奎宁酸的碎片离子与二级质谱图相一致 [19],推测此化合物为奎宁酸。

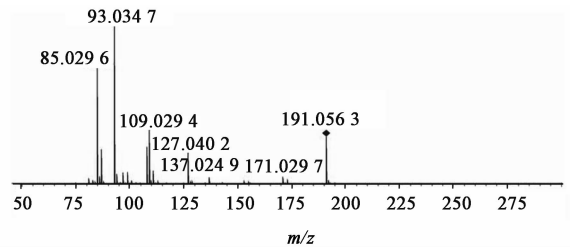


图 4 奎宁酸的二级质谱

Fig. 4 Product ion spectrum of quinic acid

峰 3 为 2,3-二羟基苯甲酸,保留时间为 3.15 min,分子式为 $C_7H_6O_4$,为原儿茶酸的同分异构体。峰 5 原儿茶酸与对照品进行比对,保留时间相同,质谱裂解规律一致。该化合物的二级碎片离子与原儿茶酸产生的碎片离子相似,见图 5,根据文献可知乌檀属植物中分离得到过 2,3-二羟基苯甲酸 [20],所以推测此化合物为 2,3-二羟基苯甲酸。

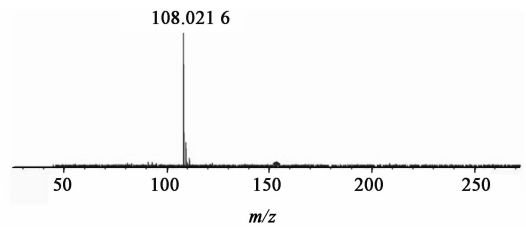


图 5 2,3-二羟基苯甲酸的二级质谱

Fig. 5 Product ion spectrum of 2,3-dihydroxybenzoic acid

峰 11 为 3,4-二羟基肉桂酸,又名咖啡酸,广泛存在于植物中,分子式为 $C_9H_8O_4$ 。3,4-二羟基肉桂酸在负离子模式下经一级质谱扫描得到准分子离子 m/z 179.0352 $[M - H]^-$,其 MS^2 谱中的基准峰为 m/z 135.0449,为 3,4-二羟基肉桂酸脱羧后的分子离子峰,二级质谱图见图 6。查阅相关文献,其与 3,4-二羟基肉桂酸的二级碎片一致 [21],故推测此化合物为 3,4-二羟基肉桂酸。

峰 12 为 3,4-二羟基苯甲酸甲酯,分子式为 $C_8H_8O_4$ 负离子模式下准分子离子峰为 167.0347

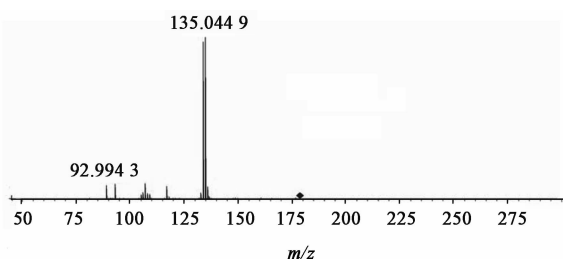


图 6 3,4-二羟基肉桂酸的二级质谱
Fig. 6 Product ion spectrum of 3,4-dihydroxy cinnamic acid

[M - H]⁻,由图 7 可以看出,二级质谱图中出现的碎片离子 m/z 108.021 8 和 m/z 93.035 1,分别为对羟基苯甲酸脱去羰基和脱去羰基进一步脱羟基得到的碎片离子,所以推测此化合物为对羟基苯甲酸的衍生物。通过查阅文献得知乌檀属植物中曾分离得到 3,4-二羟基苯甲酸甲酯^[20],由于胆木也是乌檀属植物,所以推测此化合物为 3,4-二羟基苯甲酸甲酯。

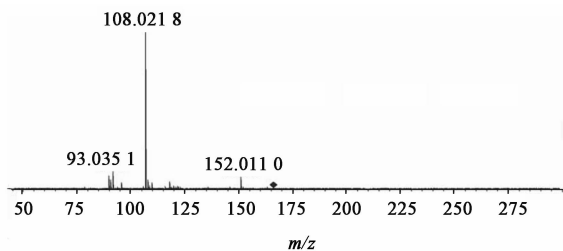


图 7 3,4-二羟基苯甲酸甲酯的二级质谱
Fig. 7 Product ion spectrum of 3,4-dihydroxybenzoate

峰 17 为 3,4,5-三甲氧基苯酚,分子式 $C_9H_{12}O_4$,保留时间 4.87 min,负离子模式下准分子离子峰为 m/z 183.066 2 [M - H]⁻,由于乌檀属植物中分离得到过此化合物^[20],由于胆木也是乌檀属植物,对比图 8 和质谱图库中 3,4,5-三甲氧基苯酚的二级质谱图,暂时推测此化合物为 3,4,5-三甲氧基苯酚。

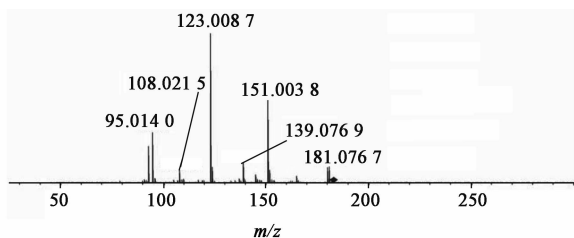


图 8 3,4,5-三甲氧基苯酚的二级质谱
Fig. 8 Product ion spectrum of 3,4,5-trimethoxyphenol

峰 19 为香草酸,分子式为 $C_8H_8O_4$,由图 9 可以看出,负离子模式下准分子离子峰为 m/z 167.034 9 [M - H]⁻,脱去一分子甲氧基得碎片离子 m/z 135.045 1,进一步脱去一分子 CO 得到碎片离子

m/z 108.021 5,进一步脱去羟基得 m/z 91.018 8。通过查阅文献得知乌檀属植物中曾分离得到香草酸^[20],由于胆木是乌檀属植物,所以推测此化合物为香草酸。

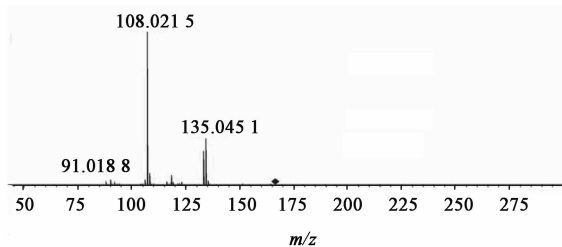


图 9 香草酸的二级质谱
Fig. 9 Product ion spectrum of vanillic acid

3.3.4 三萜类 峰 45 为马尾柴酸,分子式为 $C_{30}H_{48}O_5$,负离子模式下准分子离子峰为 m/z 487.341 8 [M - H]⁻,脱去羟基后形成碎片离子 m/z 469.332 5 [M - H - OH]⁻,进一步脱去 CH_2OH 得到 m/z 437.306 2 [M - H - CH_2OH]⁻,二级质谱图如图 10 所示。通过查阅文献发现茜草科植物中分离得到过此化合物^[22],推测该化合物为马尾柴酸。

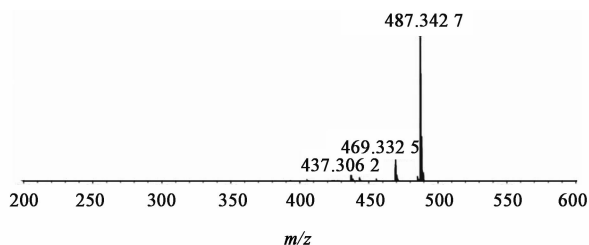


图 10 马尾柴酸的二级质谱
Fig. 10 Product ion spectrum of barbinervic acid

4 讨论

本实验采用相同的提取方式对胆木药材干燥茎(带皮)切片粉碎前后进行提取,比较粉碎前后提取物中化合物数量的差异,结果显示,粉碎后提取物中化合物数并未增加,因此采用了与企业大生产提取工艺相同的胆木药材干燥茎(带皮)切片进行提取。

在优化色谱条件时,首先比较甲醇-水和乙腈-水流动相系统,甲醇-水系统下分离效果好且峰形好,故选择甲醇-水作为流动相。其次向流动相中加入少量甲酸铵增大质谱响应强度,比较甲酸铵在流动相中的加入比例(0.05%,0.1%,0.2%),通过比较正负离子模式下待测物响应的大小,确定 0.2% 为最佳比例。

在优化质谱条件时,分别进行了正、负离子 2 种模式的测定,结果表明生物碱类化合物在正离子模式下响应较好,有机酚酸类化合物在负离子模式下

响应较好,为了得到全面的化合物信息,因此本研究使用正、负离子2种模式对胆木药材水提物进行测定。此外,对质谱的锥孔压和碰撞能进行优化,因为它们对获得二级碎片信息的影响很大。考虑到灵敏度和获得最多的碎片信息,锥孔电压设置为35 V,碰撞能设置为10~30 eV。

从胆木药材水提物的基峰色谱图中发现,有一些响应较好的色谱峰未能鉴定出,提示胆木中还有一些未知成分,有待进一步研究。

本实验采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术,对胆木药材水提物的化学成分进行研究^[23-24]。通过高分辨质谱中精确分子质量信息归属出元素组成,进一步对二级质谱裂解碎片进行分析,结合对照品及相关文献共鉴定出47个化学成分,主要包括吲哚类生物碱、有机酚酸及其苷类、喹啉酮类生物碱、三萜类、黄酮类和环烯醚萜苷类化合物,其中9个化合物为首次从胆木药材中报道。本文阐明了从胆木中鉴定化合物的过程,为胆木化学成分和药效物质基础研究提供依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:人民卫生出版社,1977.

[2] 侯宽昭. 中国种子植物科属词典[M]. 北京:科学出版社,1982.

[3] 陈健妙. 珍稀野生植物乌檀的开发利用[J]. 中国野生植物资源,2003,22(4):38-39.

[4] 国家中医药管理局《中华本草》编辑委员会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:6.

[5] 钟捷东. 黎族医药[M]. 海口:海南出版社,2008:279.

[6] 《全国中草药汇编》组. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:1.

[7] 孙敬勇. 胆木和山香圆化学成分及其生物活性研究[D]. 济南:山东大学,2008:12-16.

[8] 宣伟东. 中药胆木和云南狗牙花活性成分研究[D]. 上海:第二军医大学,2005:8-9.

[9] ZHU F, CHEN J, WANG J, et al. Qualitative and quantitative analysis of the constituents in *Nauclea officinalis* preparations by UPLC-PDA-TOF-MS [J]. J Chromatographic Sci, 2013, 52(8):862-871.

[10] 王静静. 胆木注射液化学成分及其抗炎物质基础研究[D]. 镇江:江苏大学,2012:37-40.

[11] YANG M, SUN J, LU Z, et al. Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid

chromatography coupled with mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(11):2045-2062.

[12] 刘丽萍,徐晓芳,孙东东,等. 淫羊藿水提部位化学成分的HPLC-ESI-Q-TOF-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):112-116.

[13] JIANG Y, ZHONG M, PENG W. Qualitative analysis of plant-derived samples by liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry [J]. Tropical J Pharmaceut Res, 2015, 14(5):925-930.

[14] LI Q, ZHANG Y, WU B, et al. Identification of indole alkaloids in *Nauclea officinalis* using high-performance liquid chromatography coupled with ion trap and time-of-flight mass spectrometry [J]. European J Mass Spectrometry, 2011, 17(3):277-286.

[15] 朱粉霞,贾晓斌,李秀峰,等. 胆木注射液中2种主要生物碱的质谱裂解行为解析及HPLC含量测评[J]. 南京中医药大学学报,2011,27(5):492-494.

[16] 张倩. 基于LC-MSⁿ技术的清开灵注射液绿原酸类成分研究[D]. 北京:北京中医药大学,2013:32-33.

[17] 欧阳文竹,尚展鹏,王文建,等. 茵陈提取物中化学成分的UHPLC-LTQ-Orbitrap快速鉴定[J]. 中国中药杂志,2017,42(3):523-530.

[18] 张阿琴,李遂娜,张仓,等. LC-MS分析消癌平注射液中有机酸类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):88-90.

[19] Ščančar J, Zuliani T, Žigon D, et al. Ni speciation in tea infusions by monolithic chromatography-ICP-MS and Q-TOF-MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(6):2041-2051.

[20] 朱粉霞,王静静,殷蓉,等. 乌檀属植物化学成分研究进展[J]. 中华中医药杂志,2014,29(9):2877-2880.

[21] 马长振,陈佩东,张丽,等. UPLC-ESI-MSⁿ法分析白茅根中的化学成分[J]. 中成药,2010,32(4):625-628.

[22] Donfack E V, Lenta B N, Kongue M D T, et al. Naucleactonin D, an indole alkaloid and other chemical constituents from roots and fruits of *Mitragyna inermis* [J]. Zeitschrift für Naturforschung B, 2012, 67(11):1159-1165.

[23] 章晨峰,曹亮,衡晴晴,等. 胆木叶片抗大鼠急性咽炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(23):97-100.

[24] 曹亮,李娜,姜雅琼,等. 胆木叶提取部位群的抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):124-127.

[责任编辑 顾雪竹]