

· 药学基础 ·

光叶丁公藤中化学成分的 UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS 鉴定

胡静¹, 杨媛媛², 任慧¹, 崔小敏¹, 刘小妹¹, 罗佳怡³, 陈志永^{1*}

(1. 陕西省中医药研究院, 西安 710061; 2. 西安市食品药品检验所, 西安 710054;

3. 西安培华学院 医学院, 西安 710125)

[摘要] 目的: 利用UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS技术对光叶丁公藤中的化学成分进行快速识别和鉴定。方法: 选用80%甲醇提取光叶丁公藤作为供试品溶液, 对光叶丁公藤药材的化学成分进行分析和鉴定。采用Thermo Accucore aQ C₁₈色谱柱(2.1 mm×150 mm, 2.6 μm)进行色谱分离, 以甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~12 min, 5%~25%A; 12~20 min, 25%~30%A; 20~28 min, 30%~38%A; 28~40 min, 38%~42%A); 质谱分析采用正、负离子监测模式和加热电喷雾离子源(HESI), 扫描范围 m/z 80~1 200。结果: 共鉴定出了42个化学成分, 包括香豆素类12个、绿原酸类14个、生物碱类1个、酰胺类1个, 其余14个为酯化糖苷类。结论: UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS技术可以快速、全面地鉴定光叶丁公藤药材中的化学成分, 其中11个成分经与对照品比对后准确鉴定, 31个成分在该植物中属首次发现, 2个成分在丁公藤属植物中属首次发现, 可为光叶丁公藤的物质基础研究和替代品开发提供重要依据。

[关键词] 光叶丁公藤; 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道离子阱联用质谱法(UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS); 绿原酸类; 香豆素类; 苣荬烷型生物碱; 酰胺类; 酯化糖苷类

[中图分类号] R22; R28; R931; O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)18-0124-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201162

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200325.1931.003.html>

[网络出版日期] 2020-3-26 11:08

Identification of Chemical Constituents in Caulis of *Erycibe schmidtii* by UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS

HU Jing¹, YANG Yuan-yuan², REN Hui¹, CUI Xiao-min¹, LIU Xiao-mei¹, LUO Jia-yi³, CHEN Zhi-yong^{1*}

(1. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710061, China;

2. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China;

3. Medical School, Xi'an Peihua University, Xi'an 710125, China)

[Abstract] **Objective:** To rapidly recognize and identify the chemical constituents in caulis of *Erycibe schmidtii* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with Q-Exactive Focus mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS). **Method:** Taking 80% methanol extract of *E. schmidtii* caulis as the test solution, the chemical constituents in caulis of *E. schmidtii* were analyzed and identified. Thermo Accucore aQ C₁₈ column (2.1 mm×150 mm, 2.6 μm) was used for chromatographic separation with the mobile phase of methanol (A) -0.1% formic acid solution (B) for gradient elution (0-12 min, 5%-25%A; 12-20 min, 25%-30%A; 20-28 min, 30%-38%A; 28-40 min, 38%-42%A). Positive and negative ion monitoring modes and

[收稿日期] 20200116(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81973419); 国家自然科学基金青年基金项目(81603264); 陕西省创新人才推进计划——青年科技新星项目(2018KJXX-073); 陕西省重点研发计划一般项目(2019SF-302); 西安市科技计划项目[201805103YX11SF37(17)]

[第一作者] 胡静, 硕士, 主管药师, 从事中药质量控制与活性成分研究, Tel: 029-85395696, E-mail: huj668@163.com

[通信作者] * 陈志永, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制与活性成分研究, Tel: 029-85395696, E-mail: chenzy0612@163.com

heated electrospray ion source (HESI) were used for mass spectrographic analysis. The scanning range was m/z 80-1 200. **Result:** A total of 42 chemical constituents from caulis of *E. schmidtii* were identified, including 12 coumarins, 14 chlorogenic acids, 1 tropane alkaloid, 1 amide and 14 esterified glycosides. **Conclusion:** Chemical constituents in caulis of *E. schmidtii* can be quickly and fully identified by UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS. Among them, 11 compounds are unambiguously identified by comparing with reference standards, 31 compounds are reported for the first time in this herb, 2 compounds are reported for the first time in *Erycibe* plants. This paper can provide the important basis for study on pharmacodynamic material base and substitute development of *E. schmidtii* caulis.

[Key words] *Erycibe schmidtii* caulis; ultra-high performance liquid chromatography coupled with Q-Exactive Focus mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS); chlorogenic acids; coumarins; tropane alkaloids; amides; esterified glycosides

丁公藤属植物为多年生木质藤本,全世界有66种,多数产自热带亚洲,我国有11种,主要分布在台湾、广东、广西和云南等地区^[1]。光叶丁公藤为旋花科丁公藤属植物^[2],1995年版《中国药典》(一部)开始收载光叶丁公藤的茎藤作为中药丁公藤的来源之一,具有祛风除湿、消肿止痛的功效,用于治疗风湿痹痛、半身不遂、跌扑肿痛^[3]。现代药理研究表明光叶丁公藤具有镇痛、抗炎、缩瞳和降眼压、提高呼吸道免疫功能等作用^[4-6]。丁公藤是中医临床常用药材,也是冯了性风湿跌打药酒、丁公藤风湿药酒、丁公藤滴眼液等中药制剂的主要原料药。

丁公藤属植物主要含香豆素类、绿原酸类、生物碱类、长链烷烃及甾醇类^[7]等化合物。目前,关于光叶丁公藤化学成分的研究极少^[8-10],且通过分离手段得到的化合物数量较少,尚缺乏系统的质谱鉴别研究。因此,本实验采用UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS技术对光叶丁公藤的化学成分进行快速、全面的定性分析,共鉴定出了42个化学成分,其中11个成分经过与对照品比对而准确鉴定,31个成分为首次从光叶丁公藤中得到,伞形花内酯和秦皮乙素为首次从丁公藤属植物得到,可为该药材的药效物质和质量控制研究提供实验依据。

1 材料

UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS型高分辨质谱仪和UltiMate3000型超高效液相色谱系统(美国赛默飞世尔科技公司),BT25S型1/10万电子分析天平 and BS210S型1/1万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。东莨菪苷,东莨菪内酯,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,伞形花内酯,秦皮乙素和咖啡酸对照品(上海圻明生物科技有限公司,批号分别为16040805, 161208, 1701904, 17061401, 17062003,

19061201, 17121201, 18070401, 18010202, 18092803, 17122804, 纯度均 $\geq 98\%$);水为屈臣氏蒸馏水,甲醇、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。光叶丁公藤药材于2011年10月于广东省阳西县织篢镇凤蛾岭自然保护区采集、清洗、切片、干燥,并保存备用,经陕西省中医药研究院陈志永副研究员鉴定为旋花科植物光叶丁公藤 *Erycibe schmidtii* 的藤茎,符合2015年版《中国药典》(一部)相关项下要求。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 精密称取不同批次的样品粉末0.5 g(过40目筛),置100 mL具塞锥形瓶中。精密加入80%甲醇50 mL,称重,常温下超声处理30 min(频率40 kHz,功率100 W),放冷,用80%甲醇补足损失的质量,摇匀,过滤,取续滤液5 mL转移至10 mL量瓶中,加40%甲醇定容至刻度,过孔径0.22 μm 的微孔滤膜,即得。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取东莨菪苷,东莨菪内酯,伞形花内酯,秦皮乙素,咖啡酸,绿原酸,新绿原酸,隐绿原酸,异绿原酸A,异绿原酸B,异绿原酸C对照品适量,置于10 mL量瓶中,加甲醇使溶解并定容,制备单一对照品储备液;各单一对照品储备液混合并稀释得混合对照品溶液储备液;均置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 Thermo Accucore aQ C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 150 mm, 2.6 μm),流动相甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~12 min, 5%~25%A; 12~20 min, 25%~30%A; 20~28 min, 30%~38%A; 28~40 min, 38%~42%A),流速0.3 mL \cdot min⁻¹,进样室温度10 $^{\circ}\text{C}$,柱温30 $^{\circ}\text{C}$,进样量2 μL 。

2.3.2 质谱条件 加热电喷雾离子源(HESI),正、

负离子检测模式,鞘气流速设定45 arb,辅助气流速15 arb,喷雾电压3.5 kV,毛细管温度350 °C,雾化温度320 °C,扫描模式为Full MS/dd-MS, Full MS分辨率7万, dd-MS分辨率17 500,扫描范围选择 m/z 80~1 200。MS/MS模式时所用碰撞能量30 eV。

3 结果与分析

取光叶丁公藤供试品溶液及对照品溶液适量,按2.3项下条件进行分析,得总离子流图,见图1。根据Xcalibur 2.0软件计算出的高分辨精确质量数,以及实际测得的相对分子质量与理论相对分子质量二者偏差<5 ppm的原则推导其可能的分子式。通过对照品的二级质谱数据、相关文献信息及自建的光叶丁公藤药材化学成分数据库信息[包括中英文名称,美国化学文摘社登记号码(CAS号),分子式和精确相对分子质量]对目标化合物进行快速鉴定和确证。结合化合物的一级、二级质谱及裂解规律进行分析和鉴别,最终从光叶丁公藤药材中共鉴定出42种化合物,包括香豆素类12个(化合物3~5, 8, 9, 12, 21, 28, 30, 36, 39, 40, 前6个化合物为简单香豆素类),绿原酸类14个(化合物2, 6, 7, 10, 11,

18, 23, 25, 27, 29, 33, 34, 41, 42),生物碱类1个(化合物1),酰胺类1个(化合物32),其余14个为酯化糖苷类^[11-12](化合物13~17, 19, 20, 22, 24, 26, 31, 35, 37, 38),其中,11个化合物通过与对照品进行比对后得到明确识别。见表1。

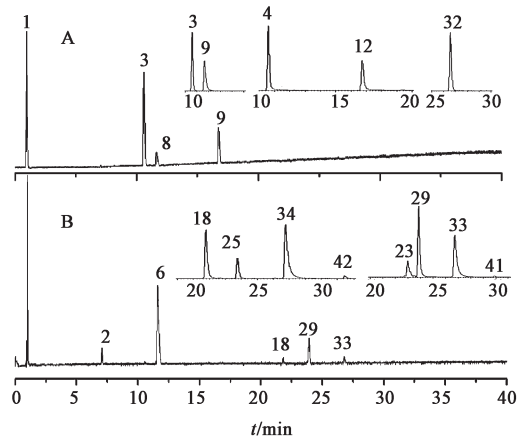


图1 光叶丁公藤在正离子(A)和负离子(B)模式下的总离子流及部分化合物的提取离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms of *Erycibe schmidtii* caulis in positive ion (A) and negative ion (B) modes and extracted ion chromatograms of some compounds

表1 光叶丁公藤中化学成分的UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents in *Erycibe schmidtii* caulis by UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS

No.	t_R /min	准分子离子	δ /ppm	分子式	碎片离子	化合物
1	1.01	144.101 9 [M+H] ⁺	-0.69	C ₇ H ₁₃ NO ₂	144.101 7, 126.091 3, 108.080 6, 98.060 0, 84.080 7, 68.069 9	包公藤丙素 ^[8]
2 ^{1,2)}	6.76	353.087 6 [M-H] ⁻	2.55	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.056 1, 179.034 9, 135.045 1, 111.045 2	新绿原酸 ^[9]
3 ¹⁾	10.58	355.101 8 [M+H] ⁺	-1.41	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	193.049 3, 178.025 9, 165.054 3, 133.028 2	东莨菪苷 ^[8]
4 ²⁾	10.60	193.049 3 [M+H] ⁺	-1.04	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.049 3, 178.025 3, 133.028 1, 106.064 9, 88.075 8	东莨菪内酯同分异构体
5 ^{1,2)}	10.77	177.018 5 [M-H] ⁻	-4.51	C ₉ H ₆ O ₄	177.019 0, 159.878 1, 149.971 6, 141.868 2, 133.029 4, 104.026 4, 89.039 6, 61.988 3	秦皮乙素(6,7-二羟基香豆素) ^[13]
6 ¹⁾	11.56	353.087 6 [M-H] ⁻	2.55	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.056 0, 179.034 7, 161.024 2	绿原酸 ^[8-9]
7 ¹⁾	11.60	179.034 8 [M-H] ⁻	0.56	C ₉ H ₈ O ₄	135.045 0	咖啡酸 ^[9]
8 ^{1,2)}	11.64	163.038 8 [M+H] ⁺	-0.61	C ₉ H ₆ O ₃	163.038 7, 146.028 3, 135.043 9, 119.033 4, 102.048 9, 89.038 4	伞形花内酯 ^[13]
9 ²⁾	11.64	355.101 8 [M+H] ⁺	-1.41	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	163.038 8, 145.028 4, 135.044 0, 117.033 3	东莨菪苷同分异构体
10 ¹⁾	13.45	353.087 6 [M-H] ⁻	2.55	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.055 9, 179.034 7, 173.045 2, 135.045 0	隐绿原酸 ^[9]
11	16.69	367.102 3 [M-H] ⁻	3.10	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	191.056 0, 173.055 4, 146.965 7, 134.037 2, 111.044 9, 93.034 5	绿原酸甲酯 ^[9]
12 ¹⁾	16.72	193.049 3 [M+H] ⁺	-1.04	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.049 4, 178.025 9, 165.054 2, 149.060 1, 137.059 5, 133.028 2	东莨菪内酯 ^[8]
13 ^{2,3)}	17.46	581.224 2 [M-H] ⁻	2.41	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	581.225 2, 419.171 3, 404.148 9, 373.129 4, 359.113 7, 233.083 8, 202.064 0, 153.055 6, 138.032 3, 101.024 3, 89.024 4	lyoniresinol 3a-O-β-D-glucopyranoside 或其同分异构体 ^[12]
14 ^{2,3)}	17.94	581.224 2 [M-H] ⁻	2.41	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	581.226 3, 419.171 1, 405.154 4, 373.129 1, 233.082 8, 153.055 9, 138.032 1, 101.024 4, 89.024 6	lyoniresinol 3a-O-β-D-glucopyranoside 或其同分异构体 ^[12]

续表 1

No.	t_R /min	准分子离子	δ /ppm	分子式	碎片离子	化合物
15 ^{2,3)}	20.07	627.192 3 [M-H] ⁻	0.64	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₆	627.158 1, 447.112 5, 429.101 9, 315.072 5, 263.233 2, 197.045 6, 183.030 1, 152.011 5, 109.029 4	eryciboside N 或 khaepuaside B 或二者同分异构体 ^[12]
16 ^{2,3)}	20.24	665.170 0 [M-H] ⁻	-1.80	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₇	198.048 9, 191.034 9, 176.011 3, 153.055 6, 121.029 4	eryciboside A 或 B 或 C ^[12]
17 ^{2,3)}	21.48	657.204 2 [M-H] ⁻	2.59	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₇	375.059 2, 197.045 7, 153.055 6, 121.029 4	albibrissinoside A 或 1-O-[6-O- (5-O-syringoyloyl- β -D-apiofuranosyl) - β -D-glucopyranosyl]-3,4,5-trimethoxybenzene 或二者同分异构体 ^[12]
18 ^{2,3)}	21.77	533.130 2 [M-H] ⁻	2.44	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	353.087 7, 335.078 0, 197.045 5, 191.046 6, 179.035 0, 161.024 2, 135.045 0	5-O-caffeoyl-4-O-syringoylquinic acid 或 5-O-caffeoyl-3-O-syringoylquinic acid 或 4-O-caffeoyl-5-O-syringoylquinic acid 或 5-O-caffeoyl-4-O-vanilloylquinic acid methyl ester ^[12]
19 ²⁾	21.86	711.251 1 [M-H] ⁻	2.39	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₇	417.055 0, 402.132 1, 293.088 4, 233.066 7, 181.050 6, 125.024 3, 99.008 7, 89.024 4, 71.013 8	(+) -syringaresinol-4-O- β -D-apiofuranosyl- (1 \rightarrow 6) - β -D-glucopyranoside ^[11]
20 ^{2,3)}	22.29	627.194 1 [M-H] ⁻	3.51	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₆	167.034 8, 152.011 4, 123.045 1, 108.021 5	eryciboside N 或 khaepuaside B 或二者同分异构体 ^[12]
21 ^{2,3)}	22.47	691.185 1 [M-H] ⁻	-2.46	C ₃₂ H ₃₆ O ₁₇	575.572 4, 424.114 7, 223.061 1, 191.035 1, 164.047 7, 149.024 2, 61.988 3	7-O-[6-O- (5-O-sinapoyl- β -D-apiofuranosyl) - β -D-glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或 7-O-[2-O- (5-O-sinapoyl- β -D-apiofuranosyl) - β -D-glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin ^[11]
22 ^{2,3)}	22.68	657.204 2 [M-H] ⁻	2.59	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₇	375.068 3, 197.045 5, 182.021 9, 153.055 7, 121.029 4	albibrissinoside A 或 1-O-[6-O- (5-O-syringoyloyl- β -D-apiofuranosyl) - β -D-glucopyranosyl]-3,4,5-trimethoxybenzene 或二者同分异构体 ^[12]
23 ¹⁾	23.00	515.119 5 [M-H] ⁻	2.14	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.087 5, 191.056 1, 179.034 9, 173.045 3, 161.024 3, 135.045 2, 111.045 9, 93.034 4	异绿原酸 B ^[9]
24 ^{2,3)}	23.70	627.194 1 [M-H] ⁻	3.51	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₆	375.069 5, 353.087 3, 335.037 5, 201.016 9, 179.034 9, 167.034 8, 135.045 2, 123.045 1, 110.975 7	eryciboside N 或 khaepuaside B 或二者同分异构体 ^[12]
25 ^{2,3)}	23.74	533.130 2 [M-H] ⁻	2.44	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	335.078 1, 197.045 5, 191.056 2, 173.045 3, 167.034 9, 153.055 6, 121.029 3	5-O-caffeoyl-4-O-syringoylquinic acid 或 5-O-caffeoyl-3-O-syringoylquinic acid 或 4-O-caffeoyl-5-O-syringoylquinic acid 或 5-O-caffeoyl-4-O-vanilloylquinic acid methyl ester ^[12]
26 ^{2,3)}	23.78	657.204 2 [M-H] ⁻	2.59	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₇	375.069 6, 197.044 5, 182.021 9, 153.055 7, 121.029 4	albibrissinoside A 或 1-O-[6-O- (5-O-syringoyloyl- β -D-apiofuranosyl) - β -D-glucopyranosyl]-3,4,5-trimethoxybenzene 或二者同分异构体 ^[12]
27 ²⁾	23.85	353.087 6 [M-H] ⁻	2.55	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.056 2, 179.034 9, 173.045 1, 135.045 2	绿原酸同分异构体 ^[14]
28 ²⁾	23.79	695.181 5 [M-H] ⁻	-0.29	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₈	537.379 8, 284.513 3, 167.034 9, 152.017 7, 123.045 1, 96.960 0	eryciboside F ^[12]
29 ¹⁾	23.86	515.119 5 [M-H] ⁻	2.14	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.087 8, 191.056 0, 179.034 9, 135.045 1	异绿原酸 A ^[9]
30 ^{2,3)}	25.68	559.145 9 [M-H] ⁻	2.32	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	391.474 7, 335.077 1, 223.066 9, 205.051 0, 179.034 9, 173.045 6, 164.047 9, 155.034 8, 135.045 2	7-O-[6-O-sinapoyl- β -D-glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或 7-O-[2-O-sinapoyl- β -D-glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或二者同分异构体 ^[11]
31 ^{2,3)}	26.17	683.217 2 [M-H] ⁻	-1.32	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₇	223.061 2, 205.050 7, 179.071 7, 164.047 9, 149.024 2	1-O-[6-O- (5-O-sinapoyl- β -D-apiofuranosyl) - β -D-glucopyranosyl]-3,4,5-trimethoxyphenol 或其同分异构体 ^[11]

续表 1

No.	t_R /min	准分子离子	δ /ppm	分子式	碎片离子	化合物
32	26.55	314.138 4 [M+H] ⁺	-0.64	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	177.054 4, 145.028 2, 121.064 6, 93.069 7	<i>N</i> -反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺 ^[9]
33 ¹⁾	26.76	515.119 5 [M-H] ⁻	2.14	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.087 7, 191.056 0, 179.034 9, 173.045 4, 135.045 2, 93.034 4	异绿原酸 C ^[9]
34 ^{2,3)}	26.76	533.130 2 [M-H] ⁻	2.44	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	371.097 7, 197.045 5, 173.045 4, 153.055 0, 93.034 5	5- <i>O</i> -caffeoyl-4- <i>O</i> -syringoylquinic acid 或 5- <i>O</i> -caffeoyl-3- <i>O</i> -syringoylquinic acid 或 4- <i>O</i> -caffeoyl-5- <i>O</i> -syringoylquinic acid 或 5- <i>O</i> -caffeoyl-4- <i>O</i> -vanilloylquinic acid methyl ester ^[12]
35 ^{2,3)}	26.86	683.217 2 [M-H] ⁻	-1.32	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₇	553.060 7, 375.071 9, 296.115 9, 223.061 2, 205.050 7, 179.071 3, 164.047 8, 149.024 2	1- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -(5- <i>O</i> -sinapoyl- β - <i>D</i> -apiofuranosyl)- β - <i>D</i> -glucopyranosyl]-3,4,5-trimethoxyphenol或其同分异构体 ^[11]
36 ^{2,3)}	27.05	559.145 9 [M-H] ⁻	2.32	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	223.061 1, 205.156 3, 191.055 6, 173.045 1, 164.047 8, 149.024 2	7- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -sinapoyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或 7- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -sinapoyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或二者同分异构体 ^[11]
37 ²⁾	27.54	703.318 6 [M-H] ⁻	2.13	C ₃₃ H ₃₂ O ₁₆	501.402 8, 197.045 5, 153.055 5, 121.029 5	eryciboside K ^[12]
38 ²⁾	27.82	701.303 4 [M-H] ⁻	2.71	C ₃₃ H ₃₀ O ₁₆	603.106 7, 304.100 5, 197.045 5, 179.034 7, 161.024 3, 153.055 7, 121.029 2	eryciboside I ^[12]
39 ^{2,3)}	27.84	559.145 9 [M-H] ⁻	2.32	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	478.304 0, 223.062 1, 205.050 7, 197.045 7, 191.034 9, 176.011 4, 153.055 8	7- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -sinapoyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或 7- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -sinapoyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或二者同分异构体 ^[11]
40 ^{2,3)}	29.35	559.145 9 [M-H] ⁻	2.32	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	397.113 3, 223.061 1, 173.045 4, 155.035 0	7- <i>O</i> -[6- <i>O</i> -sinapoyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或 7- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -sinapoyl- β - <i>D</i> -glucopyranosyl]-6-methoxycoumarin 或二者同分异构体 ^[11]
41 ²⁾	29.89	515.119 5 [M-H] ⁻	2.14	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.087 2, 273.544 3, 191.055 9, 179.034 9, 173.045 3, 161.024 4, 135.045 2	异绿原酸 A 同分异构体 ^[14]
42 ^{2,3)}	30.45	533.130 2 [M-H] ⁻	2.44	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	371.098 5, 197.045 6, 173.045 4, 153.055 0, 93.034 4	5- <i>O</i> -caffeoyl-4- <i>O</i> -syringoylquinic acid 或 5- <i>O</i> -caffeoyl-3- <i>O</i> -syringoylquinic acid 或 4- <i>O</i> -caffeoyl-5- <i>O</i> -syringoylquinic acid 或 5- <i>O</i> -caffeoyl-4- <i>O</i> -vanilloylquinic acid methyl ester ^[12]

注: ¹⁾通过对照品对比确认; ²⁾首次从光叶丁公藤中报道; ³⁾未能确定具体结构。

3.1 香豆素类化合物的鉴定 从光叶丁公藤提取物中共鉴定 12 个香豆素类化合物, 其中化合物 **3**, **5**, **8**, **12** 经对照品比对, 分别确定为东莨菪苷、秦皮乙素、伞形花内酯(7-羟基香豆素)和东莨菪内酯, 这 4 个化合物结构相似, 同为简单香豆素类化合物。分析此类化合物的裂解规律时发现, 化合物 **3** 在正离子模式下, 一级质谱中准分子离子峰为 m/z 355 [M+H]⁺, 在二级质谱中, [M+H]⁺ 失去 1 个葡萄糖残基 C₆H₁₀O₅ 形成特征碎片 m/z 193 [M+H-C₆H₁₀O₅]⁺, 再失去 1 个甲基形成特征碎片 m/z 178 [M+H-C₆H₁₀O₅-CH₃]⁺; 或碎片 m/z 193 [M+H-C₆H₁₀O₅]⁺ 脱羧后再失去 1 个氧离子形成特征碎片 m/z 133 [M+H-C₆H₁₀O₅-COO-O]⁺; 或碎片 m/z 193 [M+H-C₆H₁₀O₅]⁺ 失去 1 个羰基形成特征碎片 m/z 165 [M+H-C₆H₁₀O₅-CO]⁺。化合物 **3** 和 **12** 的区别为化合物 **3** 的 7 位取代为葡萄糖, 而化合物 **12** 的 7 位取代为羟

基, 故正离子模式下化合物 **12** 的一级质谱中准分子离子峰为 m/z 193 [M+H]⁺, 经裂解后可得到 m/z 178 [M+H-CH₃]⁺, m/z 165 [M+H-CO]⁺, m/z 133 [M+H-COO-O]⁺ 等特征碎片^[13]。化合物 **5** 为秦皮乙素, 在负离子模式下一级质谱中准分子离子峰为 m/z 177 [M-H]⁻, 在二级质谱中, 失去 1 个羰基得到 m/z 149 [M-H-CO]⁻, 或脱羧形成特征碎片 m/z 133 [M-H-COO]⁻。化合物 **8** 为伞形花内酯, 正离子模式下一级质谱中准分子离子峰为 m/z 163 [M+H]⁺, 在二级质谱中, [M+H]⁺ 脱羧得到碎片 m/z 119 [M+H-COO]⁺, 或 [M+H]⁺ 脱羰基得到碎片 m/z 135 [M+H-CO]⁺, 或 [M+H]⁺ 脱羟基得到碎片 m/z 146 [M+H-OH]⁺, 或 [M+H]⁺ 脱羧基、脱羟基后得到碎片 m/z 102 [M+H-COO-OH]⁺。以东莨菪内酯为例推测裂解途径见图 2。

3.2 绿原酸类化合物鉴定 通过质谱提供的分子

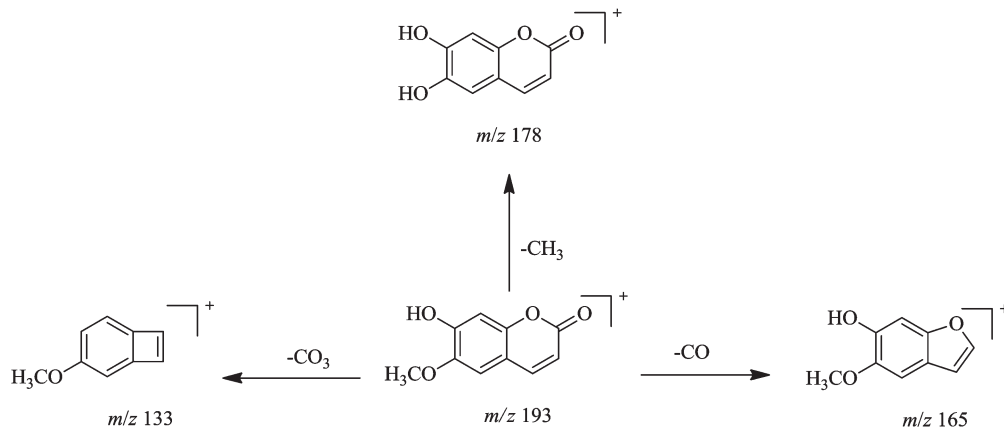


图2 东莨菪内酯的质谱裂解途径分析

Fig. 2 MS fragmentation pathways of scopoletin

离子峰及二级质谱裂解碎片的种类和丰度,并结合文献[14-16],对光叶丁公藤中绿原酸类成分的归属

进行了初步推断,见表1。主要绿原酸类结构化合物见图3。

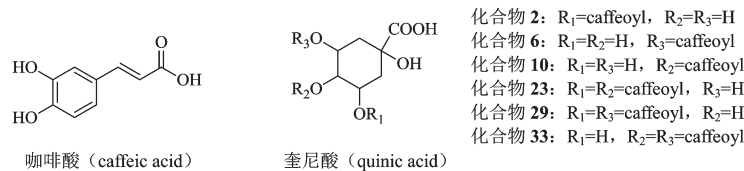


图3 光叶丁公藤中绿原酸类化合物的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of chlorogenic acids in *Erycibe schmidtii* caulis

3.2.1 咖啡酸 化合物7在正、负模式扫描下可见 m/z 181 $[M+H]^+$ 和 m/z 179 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰,负离子模式二级质谱给出 m/z 135 $[M-H-COO]^-$ 碎片离子,说明结构中有羧基或内酯结构,经与对照品比对鉴定为咖啡酸。

3.2.2 单咖啡酰奎尼酸 该类化合物是由一分子的咖啡酸和一分子的奎尼酸通过酯化缩合产生的。在负离子模式下检测到化合物2,6,10一级质谱准分子离子峰均为 m/z 353 $[M-H]^-$ 。通过与对照品比对,确定化合物2,6,10分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸。分析这3种化合物的质谱裂解规律发现,化合物2和6的准分子离子在HESI-MS²中都是失去咖啡酰基,生成奎尼酸特征碎片离子 m/z 191 $[M-\text{caffeoyl}-H]^-$,同时都产生了咖啡酸特征碎片离子 m/z 179 $[M-\text{quinic}-H]^-$,其重要区别是酰化位置在3位时产生的 m/z 179 碎片离子丰度达到100%,比在5位时高。另外化合物2会有咖啡酸脱羧后的特征碎片 m/z 135 $[\text{caffeoyl}-H-COO]^-$ 产生;化合物10为4位取代,具有 m/z 173 $[M-\text{caffeoyl}-H_2O-H]^-$ 特征碎片离子^[14],除此之外还能检测到碎片离子 m/z 179,135,191,与文献报道的裂解规律一

致^[14],可以确定为隐绿原酸。化合物11的保留时间为16.69 min,一级质谱准分子离子峰为 m/z 367 $[M-H]^-$,碎片离子为 m/z 191,173,134等,结合文献[9,14],推测其为绿原酸甲酯。故通过比较图谱中碎片离子的种类和离子丰度的差异,可确定奎尼酸上酰化的位置,即可作为区分3位,4位,5位单咖啡酰取代的依据。以绿原酸为例推测其裂解途径见图4。

3.2.3 双咖啡酰奎尼酸 该类化合物是由两分子的咖啡酸和一分子的奎尼酸通过酯化缩合产生的。异绿原酸A,B,C的结构均较绿原酸多一分子的咖啡酰基,因此,具有相似的结构碎片。在负离子模式下检测到化合物23,29,33,41一级质谱准分子离子峰均为 m/z 515 $[M-H]^-$,二级质谱均有失去一分子肉桂酸酯的碎片离子 m/z 353 $[M-\text{cinamate}-H]^-$ 。由单咖啡酰奎尼酸类化合物的裂解规律可知,绿原酸类化合物二级质谱碎片具有明显的自身特征,负离子模式监测下的二级质谱多存在 m/z 191,179,173,161 特征离子碎片,结合文献[15]可知, m/z 191 或 m/z 173 表明存在奎尼酸基团, m/z 179 或 m/z 161 表明存在咖啡酸基团,双咖啡酰奎尼酸类化合物也

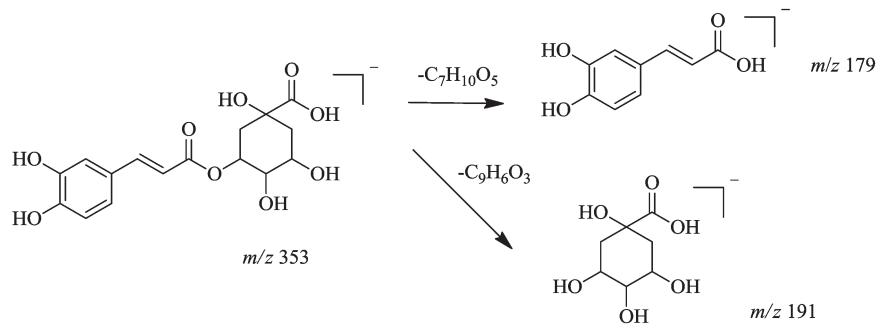


图4 绿原酸的质谱裂解途径分析

Fig. 4 MS fragmentation pathways of chlorogenic acid

同时具有这些特征碎片。但是化合物 **29** 二级质谱碎片 m/z 191 丰度 100%，其次 m/z 179 丰度 70%，碎片 m/z 173 丰度 $\leq 5\%$ ；而化合物 **23**, **33**, **41** 的 m/z 173 丰度 100%，说明化合物 **29** 不存在 4 位取代，而其他 3 个双咖啡酰奎尼酸具有 4 位取代，最终通过与对照

品比对与查阅文献[14-17]，确定化合物 **23**, **29**, **33** 分别为异绿原酸 B, A, C，化合物 **41** 由于和异绿原酸 B，异绿原酸 C 具有相似的裂解碎片而无法确定除了 4 位取代外的其他取代基位置，故只能暂定为双咖啡酰奎尼酸。异绿原酸 A 的裂解途径见图 5。

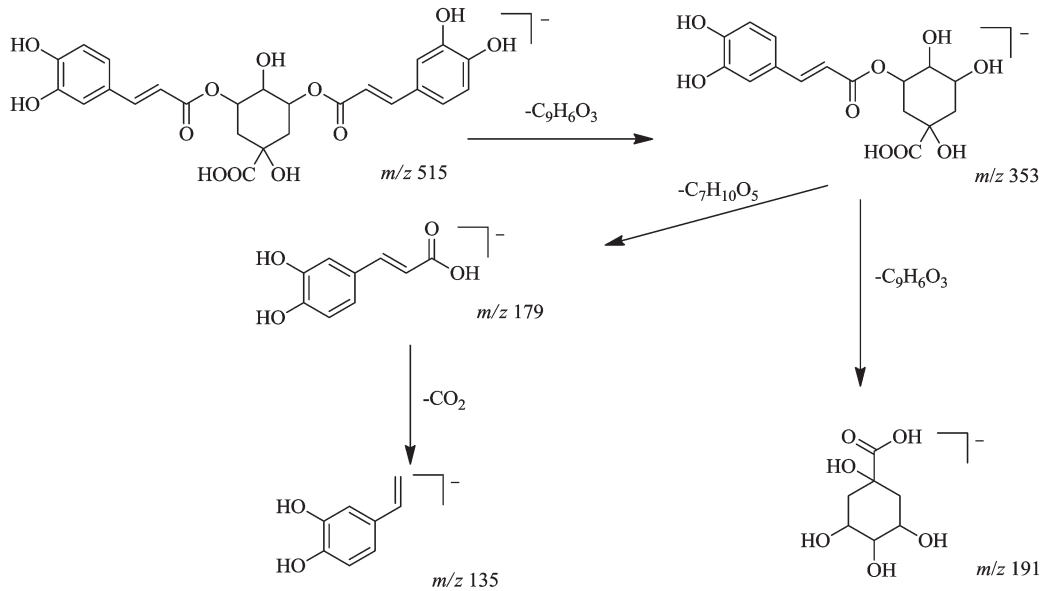


图5 异绿原酸 A 的质谱裂解途径分析

Fig. 5 MS fragmentation pathways of isochlorogenic acid A

3.3 生物碱类化合物鉴定 丁公藤属植物中发现的生物碱均为茛菪烷型生物碱，分别为包公藤甲素 (2 β -羟基-6 β -乙酰氧基去甲茛菪烷)，包公藤丙素 (2 β , 6 β -二羟基去甲茛菪烷) 和凹脉丁公藤碱 (2 β , 7 β -二羟基去甲茛菪烷)，其中包公藤甲素为缩瞳作用的主要活性成分^[7]。本研究中发现的生物碱为包公藤丙素，其与凹脉丁公藤碱为同分异构体，一级质谱准分子离子峰均为 m/z 144 [M+H]⁺，但凹脉丁公藤碱目前仅在凹脉丁公藤中发现^[18]，而本实验所用样品均为光叶丁公藤，故可鉴定该生物碱为包公藤丙素。在二级碎片中可以看到减 18 和减 36 的离子 m/z 126 [M-H₂O+H]⁺ 和 m/z 108 [M-2H₂O+H]⁺，

说明具有 2 个羟基。那么二级碎片 m/z 98 [M-C₂H₆O+H]⁺ 和 m/z 82 [M-C₂H₇O₂+H]⁺ (由于碎片 m/z 84 的丰度达到 20%，而碎片 m/z 82 的丰度低于 5%，故表 1 中包公藤丙素的二级碎片 m/z 82 未列出) 分别为仲胺基 α 断裂所得到的六元环离子碎片及继续失去 1 个羟基所得六元环离子碎片，而 m/z 68 [M-C₃H₈O₂+H]⁺ 为仲胺基 α 断裂所得到的五元环离子碎片并失去 1 个羟基后的离子碎片^[19]。推测包公藤丙素的裂解途径见图 6。

3.4 酰胺类化合物鉴定 目前已知存在于丁公藤属植物中的酰胺类成分有 2 种，对羟基苯乙基阿魏酰胺和对羟基苯乙基香豆酰胺，且各有顺式和反式

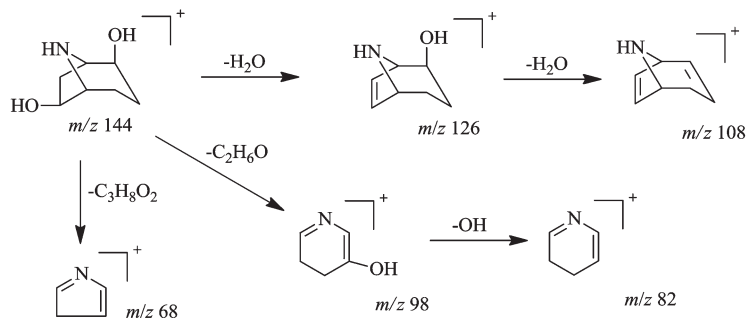


图6 包公藤丙素的质谱裂解途径分析
Fig. 6 MS fragmentation pathways of Baogongteng C

构象^[10,12],但是在光叶丁公藤中分离得到仅有*N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺^[9-10]。化合物32一级质谱准分子离子峰为 m/z 314 $[M+H]^+$,二级碎片主要为 m/z 177(丰度100%), m/z 121(丰度55%)和 m/z 145(丰度30%),其余二级碎片离子丰度均 $<5\%$ 。分析其裂解规律发现,二级碎片 m/z 121为对苯乙烯基

碎片, m/z 178为酰胺键断裂后的阿魏酰碎片, m/z 148为阿魏酰碎片 m/z 178失去甲氧基后的质谱碎片离子,由于碎片 m/z 148和 m/z 178丰度极低,故未在表1中列出。综合相关文献报道,可以确定为*N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺,推测其裂解途径见图7。

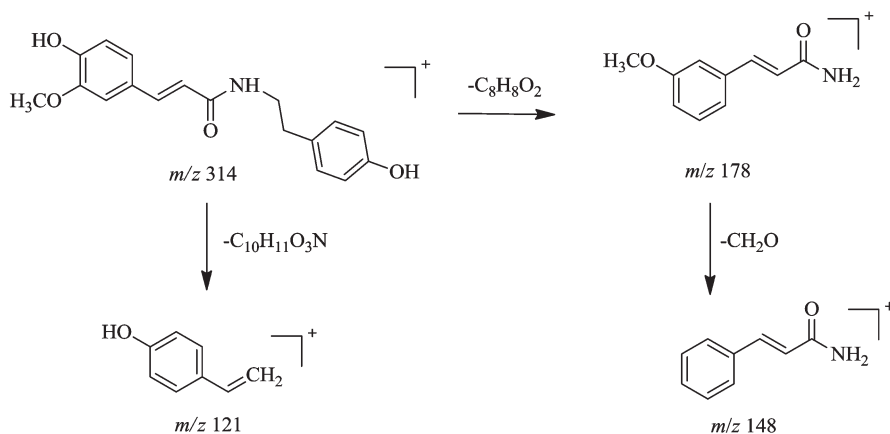


图7 *N*-反式-对羟基苯乙基阿魏酰胺的质谱裂解途径分析
Fig. 7 MS fragmentation pathways of *N*-trans-feruloyltyramine

4 讨论与总结

4.1 液质联用条件的优化 预试验针对流动相考察了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液和乙腈-0.1%甲酸水溶液,流动相中加入少量酸,能有效改善峰形及离子化效果。甲醇和乙腈的比较并未发现二者对峰形有较大影响,因此,最终选用甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相。为了最大程度地推测样品中的化合物,本实验采用了正、负离子2种质谱扫描模式,正离子总离子流图中色谱峰主要为香豆素类、生物碱类及酰胺类,且集中在前半部分;负离子模式下总离子流图中的色谱峰为绿原酸类和酯化糖苷类,且集中在后半部分。

4.2 光叶丁公藤中生物碱类成分分析 包公藤甲素、包公藤丙素和凹脉丁公藤碱等生物碱类成分为丁公藤属植物中的特征性成分。然而,根据文献报

道^[20],此类茛菪烷型生物碱成分在丁公藤属植物中含量不高,且包公藤甲素化学性质不稳定,一般以包公藤甲素苯甲酸盐形式存在。本课题组在研究中也发现此类生物碱在反相色谱柱上保留行为极差。综合含量低、性质不稳定、色谱保留行为差等因素,因此,在本研究中仅检测到了包公藤丙素1个生物碱成分。

4.3 总结 本研究共鉴定出了42个化学成分,其中31个成分是首次在光叶丁公藤中发现的。笔者在建立光叶丁公藤化学成分数据库的时候发现其文献报道较少,因此,笔者对丁公藤属植物化学成分研究的文献进行汇总,建立了丁公藤属植物化学成分数据库,结果表明本研究所鉴定的光叶丁公藤化学成分大部分源自同属植物已报道的化学成分。由此可见,该属植物的化学成分具有一定相似性。

近年来,随着生态环境的恶化和不合理的开发利用,光叶丁公藤野生药用资源珍稀、濒危,已经无法满足临床用药需求,为保障光叶丁公藤资源的可持续利用,对其替代品的开发已经迫在眉睫。在替代品的开发过程中,化学成分的相似性是替代品可行性评价的重要前提。然而,由于光叶丁公藤化学成分缺少系统的研究,文献报道较少,给其替代品可行性评价研究带来了障碍。本研究通过高分辨质谱鉴别方法系统、快速地阐明了光叶丁公藤的化学成分,为其后续替代品开发与评价打下了坚实的基础,对光叶丁公藤资源保护与可持续利用意义重大。

[参考文献]

- [1] 宋爽,刘照振,冯子明,等.丁公藤属植物化学成分和生物活性研究进展[EB/OL].<http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201404-232>, 2014-04-18/2020-01-14.
- [2] 中国医学科学院药物研究所.中药志[M].北京:人民卫生出版社,1994.
- [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,2015:3-4.
- [4] 郑婧,张贵君.丁公藤研究进展[A].第四届中国中药商品学术大会暨中药鉴定学科教学改革与教材建设研讨会论文集[C].北京:出版社不详,2015:240-243.
- [5] 谭建宁,高振霞.丁公藤的研究进展[J].广西科学院学报,2008,24(1):49-52.
- [6] 叶惠珍,范椰新,刘植蔚,等.丁公藤抗风湿有效成分的研究[J].中草药,1981,12(5):5-7.
- [7] 刘健.丁公藤的化学成分及生物活性研究[D].北京:中国协和医科大学,2007.
- [8] 宋蔚,金蓉鸾,刘继华.光叶丁公藤化学成分的研究[J].中国中药杂志,1997,22(6):359-360.
- [9] 周岳.光叶丁公藤化学成分及其抑制T细胞增殖和巨噬细胞分泌NO研究[D].成都:成都医学院,2016.
- [10] 周岳,曾婷,李丽梅.光叶丁公藤酚性成分研究[J].中草药,2016,47(9):1496-1500.
- [11] 刘照振,詹志来,蒋建双,等.丁公藤中酯化糖苷类化学成分的研究[A].2011年中国药学会暨第11届中国药师周论文集[C].烟台:出版社不详,2011:236-248.
- [12] 宋爽. I 毛叶丁公藤化学成分及药理活性研究; II 砂棘豆化学成分及药理活性研究[D].北京:中国协和医科大学,2010.
- [13] 席海为.香豆素类化合物检测方法及应用研究[D].北京:北京中医药大学,2010.
- [14] 张倩,张加余,隋丞琳,等.HPLC-DAD-ESI-MS/MS研究金银花水提工艺中绿原酸类成分的变化规律[J].中国中药杂志,2012,37(23):3564-3568.
- [15] 袁晓艳,高明哲,王锴,等.高效液相色谱-质谱法分析菊芋叶中的绿原酸类化合物[J].色谱,2008,26(3):335-338.
- [16] CLIFFORD M N, JOHNSTON K L, KNIGHT S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(10):2900-2911.
- [17] CLIFFORD M N, KNIGHT S, KUHNERT N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(10):3821-3832.
- [18] 陆阳,姚天荣,陈泽乃.凹脉丁公藤化学成分的研究[J].药学报,1986,21(11):829-835.
- [19] 陈泽乃,徐佩娟,姚天荣.包公藤(丁公藤)的化学研究——Ⅲ.包公藤乙素的鉴定和丙素的研究[J].中草药,1986,17(9):2-3.
- [20] 姚天荣,陈泽乃.包公藤的化学研究——Ⅰ.缩瞳有效成分包公藤甲素的分离和初步研究[J].药学报,1979,14(12):731-735.

[责任编辑 刘德文]