

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的红花寄生及其寄主 夹竹桃强心苷成分相关性分析

柴子舒¹, 刘人源¹, 李立章¹, 黄蜚颖¹, 苏本伟², 朱开昕², 李永华^{1*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200; 2. 钦州市中医药研究所, 广西 钦州 535000)

[摘要] **目的:** 建立超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS/MS)的红花寄生及其寄主夹竹桃强心苷成分鉴定方法,以桂花树寄主红花寄生及其寄主桂花树样品为对照,通过与强心苷对照品或文献报道比对,鉴定其中的强心苷化学成分,分析红花寄生及其寄主夹竹桃强心苷成分的相关性,并且评价寄主对桑寄生药材质量影响。**方法:** 采集红花寄生及其寄主夹竹桃样品,用桂花寄主及其红花寄生为对照样品,样品用 70% 乙醇超声提取。采用 ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),以流动相 0.1% 甲酸水-乙腈梯度洗脱,流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 0.5 μL。以 Masslynx4.1 软件分析数据,根据正、负离子模式质谱数据及元素组成分析,结合强心苷对照品和相关文献,对红花寄生及其寄主夹竹桃强心苷成分进行鉴定,并分析各成分之间的相关性。**结果:** 共鉴定出 26 个强心苷成分,其中夹竹桃寄主鉴定出强心苷成分 25 个,夹竹桃寄主红花寄生鉴定出强心苷成分 5 个,桂花寄主及其红花寄生没有强心苷。**结论:** UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术能快速、准确、全面地鉴定夹竹桃及其红花寄生强心苷成分,红花寄生本身不含强心苷,其强心苷为来自其寄主夹竹桃。

[关键词] 红花寄生; 夹竹桃; 强心苷; 寄主; 岩桂

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0138-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192211

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190808.1049.003.html>

[网络出版时间] 2019-08-08 11:18

Chemical Constitutes of Cardiac Glycosides in *Scurrula parasitica* and Its *Nerium indicum* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

CHAI Zi-shu¹, LIU Ren-yuan¹, LI Li-zhang¹, HUANG Fei-ying¹, SU Ben-wei²,
ZHU Kai-xin², LI Yong-hua^{1*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

2. Qinzhou Institute of Traditional Chinese Medicine, Qinzhou 535000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for identifying cardiac glycosides in *Scurrula parasitica* and its *Nerium indicum* host by UPLC-Q-TOF-MS/MS. With safflower parasitoids with sweet-scented osmanthus trees as the host and their host osmanthus tree samples used for control, the chemical constituents of the cardiac glycosides were identified by comparison between the cardiac glycoside reference substances and literatures, so as to analyze the correlation between the safflower parasitoid and its host oleander glycoside components, and evaluate the host's

[收稿日期] 20190327(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660669,81173537);广西自然科学基金项目(2017GXNSFAA198316);广西一流学科建设项目重点课题(2018XK027);广西中医药大学中药学优势学科建设专项(ZYXZ2015002);广西中医药大学中药提取与质量分析重点实验室开放课题(J1700206);广西卫生厅中医药科技专项(GZZY13-39);广西自治区研究生科研创新项目(YCSW2017172,YCSW2018170)

[第一作者] 柴子舒,在读硕士,从事中药质量控制与中药资源开发研究,Tel:0771-4928552,E-mail:919552139@qq.com

[通信作者] *李永华,博士,研究员,从事中药质量控制与中药资源开发研究,Tel:0771-4928552,E-mail:liyonghua185@126.com

impact on the quality of Taxilli Herba. **Method:** Samples of *S. parasitica* (parasitic on *N. indicum* and *Osmanthus fragrans*), *N. indicum* and *O. fragrans* were collected. Samples of *S. parasitica* and its *O. fragrans* host were taken for control. All of the samples were extracted through ultrasonic extraction with 70% ethanol. ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) column was adopted with mobile phase A comprising 0.1% formic acid water and mobile phase B comprising acetonitrile for gradient elution. The sample size was 0.5 μL. The flow rate was 0.6 mL · min⁻¹. The column temperature was maintained at 40 °C. MassLynx V4.1 software was used to analyze the data. Identification and correlation of chemical constitute of cardiac glycosides in *S. parasitica* and its *N. indicum* host were performed through analysis on cardiac glycosides reference substances, relevant literatures, elemental composition of compounds and positive and negative ion mode mass spectrometry data. **Result:** A total of 26 compounds of cardiac glycoside were identified, including 25 compounds of cardiac glycoside from *N. indicum* host, and 5 compounds of cardiac glycoside from *S. parasitic* (parasitic on *N. indicum*). none of cardiac glycosides were found in *S. parasitica* (parasitic on *O. fragrans*) and its *O. fragrans* host. **Conclusion:** It was rapid, accurate and comprehensive to identify cardiac glycosides in *S. parasitica* (parasitic on *N. indicum*) and its *N. indicum* host by UPLC-Q-TOF-MS/MS. *S. parasitica* itself does not contain cardiac glycosides, its host may impact the quality of *S. parasitica* by delivering cardiac glycosides, a kind of its characteristic compound.

[**Key words**] *Scurrula parasitica*; *Nerium ndicum*; cardiac glycoside; host; *Osmanthus fragrans*

红花寄生是桑寄生科梨果寄生属的一种半寄生性灌木,在云南、四川、贵州、广西、广东、湖南、江西、福建、台湾等省区有分布,寄主通常见柚树、桔树、柠檬、黄皮、桃树、梨树或壳斗科、大戟科、夹竹桃科、榆科、无患子科等植物,在产区特别是在民间也作桑寄生入药,并有作桑寄生药材商品流通使用,具有祛风除湿、舒肝止痛、行气通络等功效,治疗风湿痹痛、肝胃气痛、疝气偏坠、睾丸胀痛等^[1-2]。近年来,人们从成分到药理作用对红花寄生进行研究,取得了一些研究成果,特别是基于寄主对红花寄生毒理及药理作用的影响研究,如陈金月等^[3]对来源于红花夹竹桃寄主上的红花寄生和桑寄生进行毒理研究发现,寄生在红花夹竹桃上的红花寄生和桑寄生均具有一定的毒性,周芳等^[4]对寄生在夹竹桃上的红花寄生进行强心作用研究发现,红花寄生具有其寄主夹竹桃样的强心作用,可见夹竹桃上的红花寄生很有可能转移了其寄主夹竹桃的强心苷成分,但强心苷是一类具有强心作用的化合物,文屏等^[5]采用 UPLC-Q-TOF-MS 对黄花夹竹桃的强心苷成分进行分析,鉴定出 6 个强心苷化合物成分,而夹竹桃中的强心苷成分组成,以及红花寄生会从寄主夹竹桃上获得的强心苷成分,国内外还未有相关报道。

本研究小组的一系列前期研究结果也表明,寄主植物会通过寄生与寄主这种特殊寄生关系,由寄主向寄生植物输送属于寄主的特征性成分,从而影响寄生药材质量^[6-8]。液质联用技术作为一种新型

的分析技术,具有高分辨、高灵敏的定性能力和强大的结构表征能力,被广泛应用到中药化学成分分析、中药药效物质基础、代谢组学的研究中^[9-10]。本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对红花寄生及其寄主夹竹桃样品提取物进行检测,以桂花树寄主的花寄生及其寄主桂花树样品为对照,通过与强心苷对照品或文献报道比对,鉴定其中的强心苷化学成分,识别并鉴定出夹竹桃寄主强心苷成分 25 个,夹竹桃寄主的花寄生强心苷成分 5 个,其中 5 个夹竹桃寄主红花寄生强心苷成分中有 4 个在其寄主夹竹桃中明确能找到对应的成分,共鉴定强心苷成分 26 个。桂花树寄主和桂花树寄主红花寄生没有识别并鉴定出任何强心苷。

1 材料

XEVO G2-S 型 QTOF-MS 质谱仪, I Class 型液相色谱仪(美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); MassLynxV4.1 分析软件; Sartorius BT 125D 型 1/10 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; KQ-5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); H160 型台式高速离心机医用离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 明澈 D24UV 型纯水仪(默克密理博实验室设备有限公司)。

夹竹桃苷 A, 夹竹桃苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号 wkq17021401, wkq17011606, 纯度均 ≥ 98%); 欧夹竹桃苷乙对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 批号 MUST-16102708, 纯度 ≥

98%)。乙腈、甲酸(德国 Merck 公司,色谱纯);95%乙醇(成都市科隆化学品有限公司,分析纯);红花寄生及其寄主夹竹桃和红花寄生及其寄主桂花,均经广西中医药大学李永华研究员鉴定,样品具体信息见表 1。

表 1 红花寄生及其寄主样品信息

Table 1 Sample information of *Scurrula parasitica* and its host

样品	寄主	采集时间	采集地
红花寄生茎叶 <i>Scurrula parasitica</i>	夹竹桃	2018-08	广西桂林
红花寄生茎叶 <i>S. parasitica</i>	桂花	2018-10	广西南宁
夹竹桃枝 <i>Nerium indicum</i>	-	2018-08	广西桂林
桂花树枝 <i>Osmanthus fragrans</i>	-	2018-10	广西南宁

2 方法

2.1 样品溶液的制备 将采集的夹竹桃、桂花两种寄主的花寄生(枝叶比 1:2)和两种寄主的茎枝样品,阴干,粉碎(过 50 目),各样品粉末分别称取 2 g,加 70%乙醇 50 mL,超声提取 40 min,离心取上清液(6 000 r·min⁻¹, 10 min),沉淀再加 70%乙醇 50 mL 继续超声 40 min,离心取上清液(6 000 r·min⁻¹, 10 min),合并 2 次离心液,70%乙醇定容至 100 mL。进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取夹竹桃苷 A,夹竹桃苷,欧夹竹桃苷乙适量,加 70%乙醇超声溶解,制成质量浓度分别为 18.48, 19.96, 19.20 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,4℃冰箱中避光保存,备用。

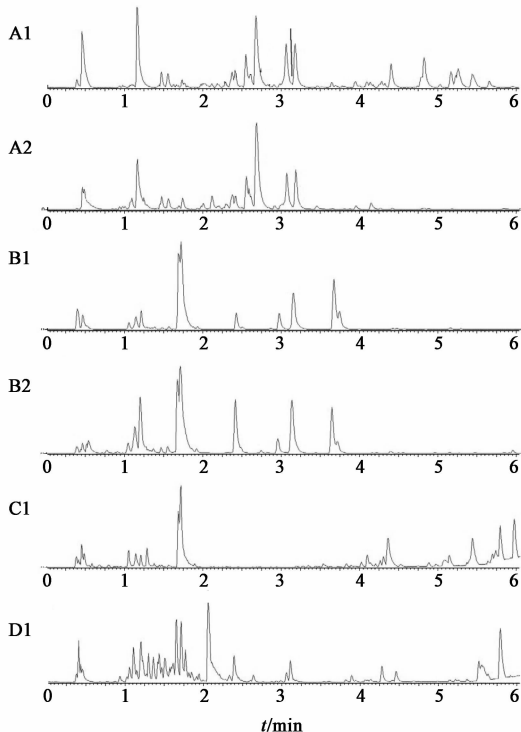
2.3 液相检测条件 ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2.5 min, 95%~70%A, 2.5~6.0 min, 70%~63%A);柱温 40℃;流速 0.6 mL·min⁻¹;进样量 0.5 μL。

2.4 质谱检测条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,扫描范围 m/z 100~1 200 Da;碰撞电压 35~50 V;毛细管电压 3.3 kV;锥孔电压 40 V;去溶剂气温度 400℃;去溶剂气体流速 800 L·h⁻¹;在线校准物质亮氨酸脑啡肽。

3 结果

对红花寄生及其寄主夹竹桃、桂花样品 70%乙醇提取液进行 UPLC-Q-TOF-MS 检测,其 UPLC-Q-TOF-MS 的总离子流图见图 1。分析各个正负离子流数据,结合强心苷对照品信息和相关文献,共鉴定出强心苷成分 26 个,其中夹竹桃寄主强心苷成分 25 个,以夹竹桃为寄主的花寄生强心苷成分 5

个,桂花寄主及其红花寄生没有鉴定出任何强心苷成分,结果见图 2 和表 2,3。夹竹桃寄主的花寄生 5 个强心苷成分中,有 4 个强心苷成分在其寄主夹竹桃中能明确找到对应碎片,有 1 个强心苷成分(成分 26)在其寄主夹竹桃正离子模式下总离子流图中对应时间未能找到相应的碎片,但在负离子模式下则发现 1 个比较低的对应碎片(m/z 595.310 6 [M+HCOO]⁻)。



A. 夹竹桃;B 夹竹桃寄主的花寄生;C. 桂花树寄主的花寄生;D. 桂花树;1. 正离子模式;2. 负离子模式

图 1 正、负离子模式红花寄生及其寄主总离子流

Fig. 1 Total ion chromatograms in positive and negative of *Scurrula parasitica* and host

3.1 强心苷的分析鉴定 强心苷是存在于夹竹桃寄主中的一类特征性成分物质。夹竹桃强心苷多为 I 型强心苷^[24] [苷元-(2,6-去氧糖)_x-(D-葡萄糖)_y]和 II 型强心苷 [苷元-(6-去氧糖)_x-(D-葡萄糖)_y]。结合文献^[11-12,14]及二级碎片信息,夹竹桃中 I, II 型强心苷 $x=1$, 即糖链中只有 1 个去氧糖甲醚; I 型强心苷中主要有 3 种 2,6-去氧糖甲醚,分别为 D-沙门糖(D-sarmentose), L-夹竹桃糖(L-oleandrose)和 D-迪吉糖(D-diginose),见图 2 中 a, b, c; II 型强心苷主要有 2 种 6-去氧糖甲醚,分别为 D-洋地黄糖(D-digitalose)和 L-黄花夹竹桃糖(L-thevetose),见图 2 中 d, e, f。

通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 二级及一级质谱数

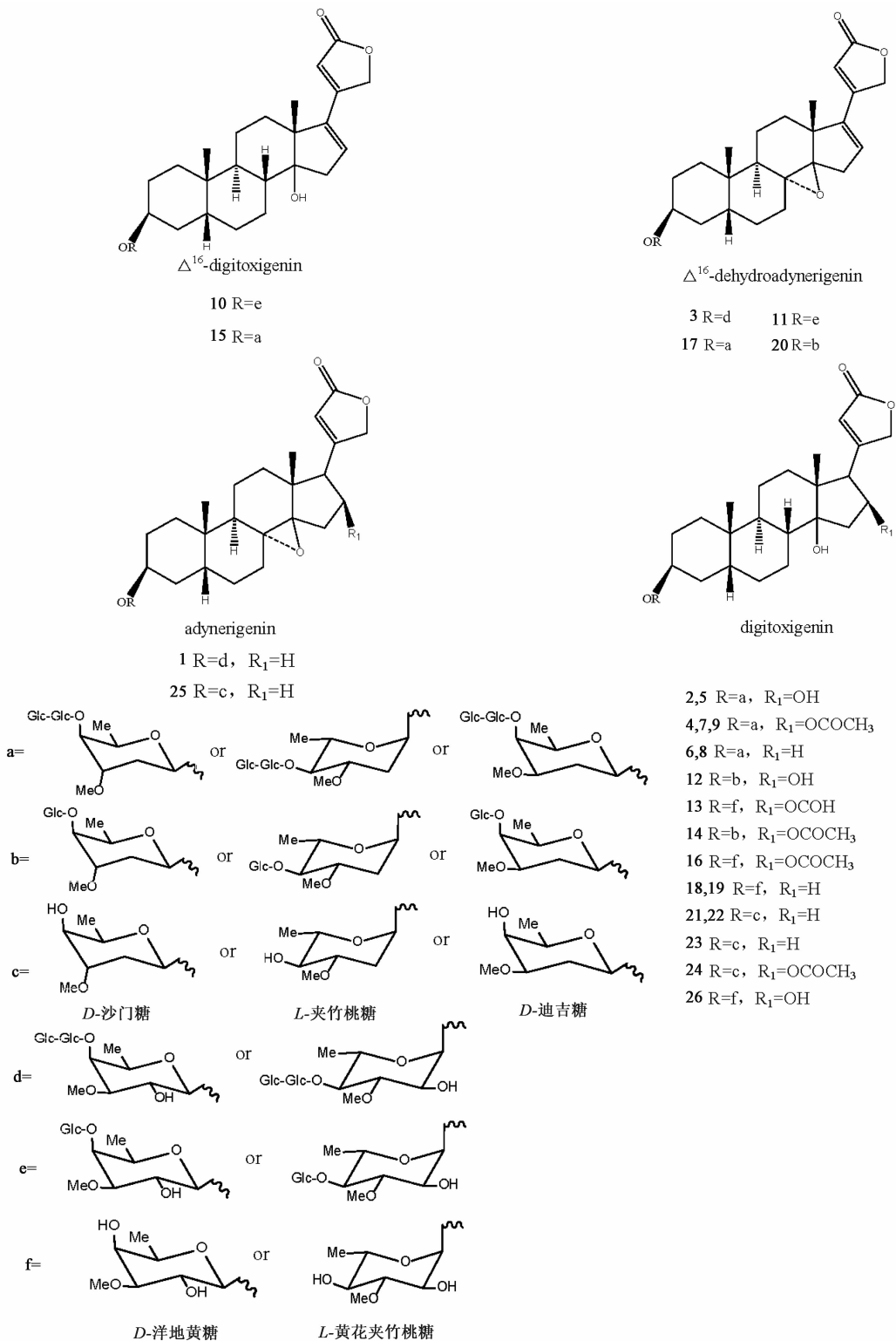


图 2 红花寄生及其寄主夹竹桃强心苷鉴定结构

Fig. 2 *Scurrula parasitica* and its *Nerium indicum* host cardiac glycoside identification chart

据分析,在正离子模式下总离子流图中寻找强心苷的苷元母核碎片^[19,22,25](371.22,373.23,375.25)及其各自的失水碎片,来确定其强心苷母核的信息,鉴定可能的母核结构,分别为 Δ^{16} -digitoxigenin,

Δ^{16} -dehydroadynenerigenin, adynenerigenin 和 digitoxigenin 中不同的母核结构,见图 2。再根据其 他碎片鉴别支链及其糖的连接方式,结合强心苷对 照品信息和有关文献,鉴定为何种强心苷成分。

表 2 红花寄生及其寄主夹竹桃强心苷成分鉴定

Table 2 *Scurrula parasitica* and its *Nerium indicum* host cardiac glycoside identification results

成分	t_R /min	[M + HCOO] ⁻		δ	分子式	名称	二级碎片(正离子模式)	参考文献
		实测值	理论值					
1	2.18	901.404 2	901.406 9	2.7	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₈	adynerigenin odorotriose *	874.441 9, 533.315 3, 373.237 6, 355.226 5	[11-12]
2	2.26	903.419 9	903.422 6	2.7	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₈	gitoxigenin oleatrioside *	876.457 7, 697.376 5, 535.326 0, 391.246 5, 373.237 9, 355.225 6, 337.216 1	[11-12]
3	2.30	899.387 8	899.391 3	3.5	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₈	Δ^{16} -adynerigenin odorotriose *	872.429 3, 371.222 1, 353.209 9	[11]
4	2.39	945.432 1	945.433 1	1.0	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₉	gentiobiosyl nerigoside *	918.469 0, 433.259 4, 373.237 8, 355.226 0, 337.217 6	[11-12]
5	2.42	903.420 5	903.422 6	2.1	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₈	gitoxigenin oleatrioside *	876.459 6, 665.354 2, 391.248 1, 373.237 2, 355.216 8	[11-12]
6	2.53	887.428 1	887.427 7	0.4	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₇	digitoxigenin β -oleatrioside *	860.462 8, 519.332 0, 375.253 4, 357.243 3, 339.232 4	[11-12]
7	2.59	945.433 0	945.433 1	0.1	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₉	gentiobiosyl nerigoside *	918.470 2, 433.258 7, 373.237 1, 355.225 9	[11-12]
8	2.61	887.427 1	887.427 7	0.6	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₇	digitoxigenin β -oleatrioside *	860.463 9, 375.252 8, 357.240 8, 339.232 3	[11-12]
9	2.62	945.433 0	945.433 1	0.1	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₉	gentiobiosyl nerigoside *	918.470 3, 739.385 4, 433.259 2, 373.237 1, 355.228 0, 337.215 3	[11-12]
10	2.75	739.355 2	739.354 1	1.1	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₃	obebioside D *	712.388 9, 533.311 2, 373.237 6, 355.226 9, 337.216 9	[13]
11	2.82	737.337 8	737.338 4	0.6	C ₃₆ H ₅₂ O ₁₃	Δ^{16} -dehydroadynerigenin glucosyl digitaloside *	710.373 2, 531.294 6, 371.220 4, 353.211 5	[14-15]
12	2.91	741.368 3	741.369 7	1.4	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₃	glucogitoroside *	714.406 8, 391.248 2, 373.237 0, 355.226 1	[16]
13	2.96	623.307 3	623.306 8	0.5	C ₃₁ H ₄₆ O ₁₀	verodoxin *	579.317 1, 533.315 0, 515.294 0, 487.135 3, 419.242 3, 401.234 0, 373.236 7, 355.227 1, 337.216 8	[17]
14	2.98	783.381 9	783.380 3	1.6	C ₃₈ H ₅₈ O ₁₄	oleandrin gentiobioside *	756.415 3, 433.258 6, 373.237 0, 355.235 8, 337.215 8	[11, 18]
15	3.09	885.413 3	885.412 0	1.3	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₇	Δ^{16} -digitoxigenin β -neritroside *	858.447 8, 373.237 4, 355.227 3, 337.214 9	[11]
16	3.13	637.323 0	637.322 4	0.6	C ₃₂ H ₄₈ O ₁₀	neritaloside *	593.331 2, 533.311 8, 373.238 73, 355.227 2, 337.215 9	[19-20]
17	3.19	883.397 4	883.396 4	1	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	Δ^{16} -adynerigenin β -neritroside *	856.432 7, 371.221 7, 353.210 7	[11, 15]
18	3.64	579.316 3	579.316 9	0.6	C ₃₀ H ₄₆ O ₈	odoroside H *	535.326 7, 517.313 5, 375.253 8, 357.243 3, 339.232 2	[20-21]
19	3.72	579.318 8	579.316 9	1.9	C ₃₀ H ₄₆ O ₈	odoroside H *	535.326 9, 375.252 0, 357.240 4, 339.231 0	[20-21]
20	3.86	721.343 3	721.343 5	0.2	C ₃₆ H ₅₂ O ₁₂	Δ^{16} -adynerigenin β -neribioside *	694.377 4, 515.298 2, 371.220 8, 353.216 7	[11]
21	3.94	579.317 2	579.316 9	0.3	C ₃₀ H ₄₆ O ₈	deacetyloleandrin *	552.353 9, 391.248 2, 373.237 2, 355.226 7, 337.216 3	[17, 21]

续表 2

成分	t_R /min	$[M + HCOO]^-$		δ	分子式	名称	二级碎片(正离子模式)	参考文献
		实测值	理论值					
22	4.24	579.316 8	579.316 9	0.1	$C_{30}H_{46}O_8$	deacetyloleandrin*	535.316 8, 517.317 7, 391.250 4, 373.237 7, 355.226 4, 337.216 2	[18,21]
23*	4.80	563.321 8	563.322 0	0.2	$C_{30}H_{46}O_7$	夹竹桃苷 A	519.332 2, 501.322 2, 375.253 4, 357.243 0, 339.232 3	-
24*	4.87	621.326 4	621.327 5	1.1	$C_{32}H_{48}O_9$	夹竹桃苷	577.337 8, 517.317 7, 433.260 4, 373.237 6, 355.226 3, 337.217 3	-
25*	5.17	561.305 2	561.306 4	1.2	$C_{30}H_{44}O_7$	欧夹竹桃苷乙	1 050.652 1, 534.344 3, 373.237 5	-
26	2.41	595.312 0	595.311 8	0.2	$C_{30}H_{46}O_9$	strosposide*	1 101.633 7, 533.310 9, 515.301 8, 373.236 1, 355.227 1, 337.215 1	[22-23]

注:成分 23,24,25 与对照品比对鉴定。*代表可能为其异构体。

根据强心苷结合糖分子数量的多少,25 个夹竹桃寄主强心苷成分中,含 1 个去氧糖的强心苷 9 个(单糖强心苷),含 1 个去氧糖和 1 个葡萄糖的强心苷 5 个(二糖强心苷),含 1 个去氧糖和 2 个葡萄糖的强心苷 11 个(三糖强心苷),而 5 个以夹竹桃为寄主的红花寄生强心苷,均为单糖强心苷,见图 2。

3.2 adynerigenin 母核结构的强心苷成分的鉴定

26 个强心苷成分中,以 adynerigenin 为母核结构的强心苷有 2 个,见图 2。下面以强心苷成分 1 为

例说明推断过程,化合物 1 ($t_R = 2.18 \text{ min}$) 在正离子模式下基峰为 m/z 874.44,检索相关文献[22]可推测在正离子模式下生成 $[M + NH_4]^+$,负离子模式下生成 m/z 901.40 $[M + HCOO]^-$ 。在成分 1 的二级质谱中可观察到 3 个糖配基(6-去氧糖甲醚-葡萄糖-葡萄糖)的丢失信息。在丢失 3 个糖配基后(m/z 373.23),只见到 1 个脱水碎片,结合参考文献[11-12],鉴定其母核为 adynerigenin 的强心苷成分,相关信息见表 2,可能的裂解途径见图 3。

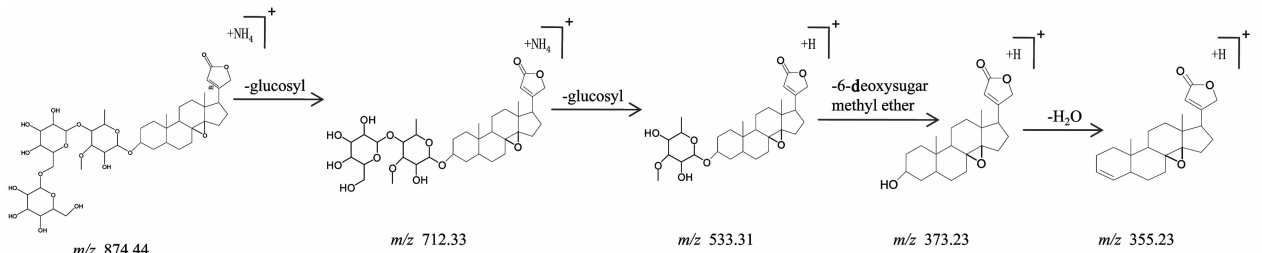


图 3 成分 1 可能的裂解途径

Fig.3 Candidate fragmentation pathway of compound 1

3.3 Δ^{16} -digitoxigenin 母核结构的强心苷成分的鉴定

26 个强心苷成分中,以 Δ^{16} -digitoxigenin 为母核结构的强心苷成分有 2 个,见图 2。下面以强心苷成分 10 为例来说明推断过程,成分 10 ($t_R = 2.75 \text{ min}$) 在正离子模式下接连失去 2 分子糖,生成 m/z 533.31 $[M - Glu + H]^+$ 和 m/z 373.23 $[M - Glu - 6 - \text{去氧糖甲醚} + H]^+$ 。母核上的羟基脱水分别生成 m/z 355.22 和 m/z 337.21 碎片,且没有其他小分子碎片的丢失,结合参考文献[13],故鉴定其母核结构为 Δ^{16} -digitoxigenin 的强心苷,相关信息见表 2,可能的裂解途径见图 4。

3.4 Δ^{16} -dehydroadynerigenin 母核结构的强心苷成分的鉴定

26 个强心苷成分中,以 Δ^{16} -dehydroadynerigenin 为母核结构的强心苷成分有 4 个,见图 2。下面以强心苷成分 11 为例来说明推断过程,成分 11 ($t_R = 2.82 \text{ min}$) 裂解过程中糖的丢失同成分 10 一致,但成分 11 相对于成分 10 多了 1 个不饱和度,只有 1 个失水碎片。结合参考文献[14-15],鉴定其母核结构为 C_8 和 C_{14} 环氧的 Δ^{16} -dehydroadynerigenin 强心苷成分。相关信息见表 2,可能的裂解途径见图 5。

3.5 digitoxigenin 母核结构的强心苷成分的鉴定

26 个强心苷成分中,以 digitoxigenin 为母核结构的

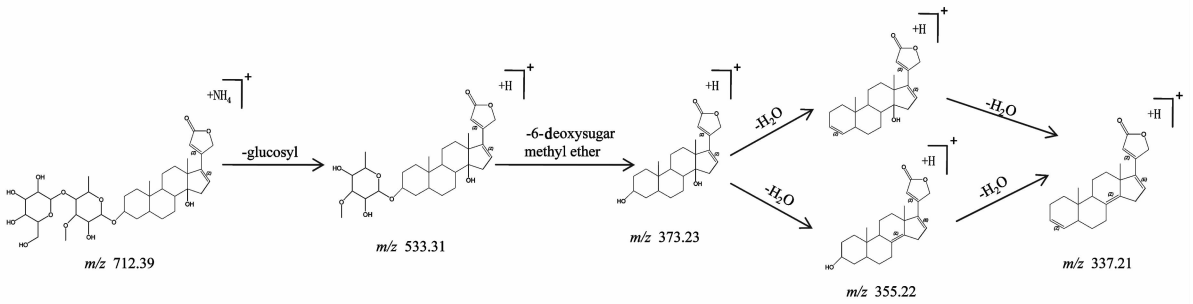


图 4 成分 10 可能的裂解途径

Fig. 4 Candidate fragmentation pathway of compound 10

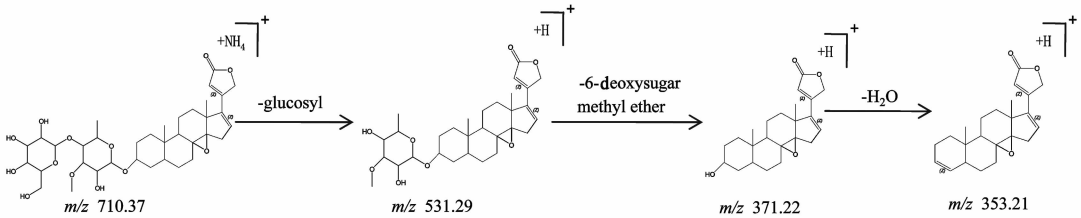


图 5 成分 11 可能的裂解途径

Fig. 5 Candidate fragmentation pathway of compound 11

强心苷成分有 18 个,见图 2。下面以夹竹桃苷为例说明推断过程,在夹竹桃苷(成分 24, $t_R = 4.87$ min)二级图谱中 m/z 577.33 $[M + H]^+$, 丢失 1 个 2,6-去氧糖甲醚生成 m/z 433.25 $[M - 2,6\text{-去氧糖甲醚} + H]^+$; 或丢失 1 个 $C_2H_4O_2$ 生成 m/z 517.31

$[M - C_2H_4O_2 + H]^+$ 。化合物失去 2,6-去氧糖甲醚及 $C_2H_4O_2$ 后生成 m/z 373.23 $[M - 2,6\text{-去氧糖甲醚} - C_2H_4O_2 + H]^+$, 继续失去 2 个分子水, 表明该母核上存在 2 个羟基。参考文献[21], 鉴定其母核为 digitoxigenin 的强心苷成分, 见表 2, 图 6。

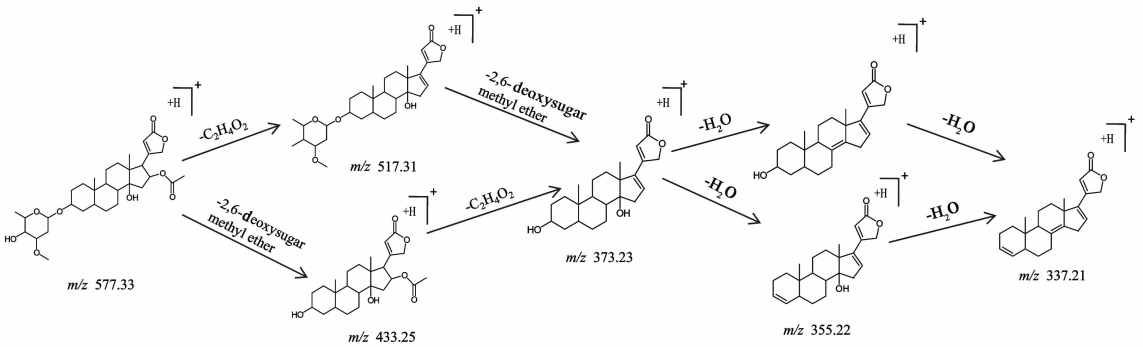


图 6 成分 24 (夹竹桃苷) 可能的裂解途径

Fig. 6 Candidate fragmentation pathway of compound 24

表 3 红花寄生及其寄主夹竹桃, 桂花树强心苷鉴定结果对比

Table 3 Characterization of cardiac glycoside of *Scurrula parasitica* and their hosts

样品	峰号																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
夹竹桃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*
夹竹桃上的红花寄生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
桂花树上的红花寄生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
桂花树	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表注: “+”表示该样品中含有相对应的强心苷成分,“-”表示该样品中不含有相对应的强心苷成分,“*”表示其含量低,无法在正离子模式下检测到。

4 讨论

强心苷为存在于玄参科地黄属、夹竹桃科黄花夹竹桃属和羊角拗属、萝藦科杠柳属和马利筋属等多科多属植物中,且具有强心作用的一类物质,由具有固醇核的母核结合数量不同的糖分子组成,临床上主要用于治疗心功能不全。迄今为止从各种植物中发现的强心苷有数百种之多,本实验通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术,对夹竹桃寄主茎枝和来源于夹竹桃寄主的红花寄生枝叶的 70% 乙醇提取液进行检测,发现强心苷成分在负离子模式下能很好的形成准分子离子峰,在正离子模式下能形成更多的碎片峰,故结合正负离子来鉴定强心苷成分。通过该方法共识别并鉴定出 26 个强心苷成分,根据其母核结构不同,有 Δ^{16} -digitoxigenin, Δ^{16} -dehydroadynenerigenin, adynenerigenin 和 digitoxigenin 4 种不同母核结构类型的强心苷,根据其结合糖分子数量的不同,有单糖、二糖、三糖 3 种类型强心苷。

至今没有资料显示桑寄生科植物含有强心苷成分,《中国药典》明确规定桑寄生药材不能检出强心苷,尽管红花寄生不属于《中国药典》桑寄生药材的基原植物,但在红花寄生产区尤其是民间,红花寄生也作桑寄生流通和使用。本实验通过对夹竹桃和桂花两种寄主来源的红花寄生进行强心苷检测,其中夹竹桃寄主来源的红花寄生检测到强心苷成分,而桂花寄主来源的红花寄生检测不到任何强心苷成分,结合寄主夹竹桃的强心苷检测结果,推断夹竹桃寄主红花寄生的强心苷成分为来自于其寄主夹竹桃。研究成果一方面进一步证明红花寄生本身不含强心苷成分,另一方面当红花寄生作桑寄生使用时,不能使用含有强心苷成分寄主来源的红花寄生。

本实验夹竹桃寄主检测出 25 个强心苷成分,夹竹桃寄主来源的红花寄生检测出 5 个强心苷成分,通过将夹竹桃寄主红花寄生的强心苷成分组与其寄主夹竹桃的强心苷成分组进行比对,红花寄生的 5 个强心苷成分中有 4 个成分在其寄主夹竹桃中能够找到对应的强心苷,且红花寄生强心苷成分的信号响应值都高于其寄主夹竹桃。红花寄生中有 1 个强心苷(成分 26, strosposide)在寄主夹竹桃正离子模式下没有发现相应的碎片信号,仅仅是在负离子模式下找到一个较低的碎片信号(m/z 595. 310 6 [M + HCOO]⁻),推测是由于该强心苷在寄主夹竹桃中量很少的缘故。可见,强心苷成分不仅会由夹竹桃红花寄生输送,且在红花寄生中还会有一定的蓄积作用。

实验结果发现,25 个夹竹桃寄主强心苷成分中,有单糖强心苷 9 个、二糖强心苷 5 个和三糖强心苷 11 个,而夹竹桃寄主来源的红花寄生的 5 个强心苷成分则全部为单糖强心苷,且均为 digitoxigenin 母核结构的强心苷。因此,强心苷作为夹竹桃寄主的特征性次生代谢物质,可以通过夹竹桃与红花寄生之间这种特殊的寄生关系,将它特有的强心苷成分由夹竹桃寄主向红花寄生转移。本实验结果显示,转移的强心苷成分均为单糖苷类型的强心苷,二糖、三糖苷类型的强心苷没有转移;4 种母核结构中,除了 digitoxigenin 母核结构的强心苷有转移,其他 3 种母核结构的强心苷没有看到转移,其转移机制值得进一步研究。

UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术能快捷、准确,且较全面地检测出红花寄生及其寄主夹竹桃强心苷成分,同时,实验结果同本研究小组之前诸多的研究结果一致,即寄主会通过寄主与寄生之间这种特殊的寄生关系,将属于寄主特有的成分转移到寄生药材中,从而对寄生药材质量产生不同程度的影响。像这种有毒寄主(如夹竹桃)的有毒成分的转移,对桑寄生药材的质量安全可能会构成威胁,提醒规范寄主来源,对于确保桑寄生药材质量安全具有重要的现实意义。

[参考文献]

- [1] 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第二十四卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 龚祝南, 王铮涛, 徐璐珊, 等. 中国桑寄生科 Loranthaceae 药用植物研究 [J]. 中国野生植物资源, 1996(1): 11-15.
- [3] 陈金月, 周芳. 红花夹竹桃、红花寄生及桑寄生对小鼠的半数致死量测定 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2418-2419.
- [4] 周芳, 李爱媛, 廖月葵, 等. 桑寄生与红花寄生强心作用的比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(9): 2236-2237.
- [5] 文屏, 郭巧技, 黄晓炜, 等. 黄花夹竹桃中强心苷类成分的 UPLC-QTOF/MS 快速鉴定 [J]. 中国民族医药杂志, 2013(4): 45-46.
- [6] ZHANG X J, SU B W, LI J, et al. Analysis by RP-HPLC of mangiferin component correlation between medicinal *Loranthus* and their mango host trees [J]. J Chromatographic Sci, 2014, 52(1): 1-4.
- [7] LU D, SU B W, LI Y H, et al. Study on salicin content correlation between *Taxilli Herba* and their willow host plants [J]. J Med Plant Res, 2012, 6(12): 2474-2477.

- [8] HU K F, LI Y H, DU Y K, et al. Analysis of 1-deoxyojirimycin component correlation between medicinal parasitic loranthus from Loranthaceae and their mulberry host trees[J]. J Med Plant Res, 2011, 5 (17): 4326-4331.
- [9] 林秀莲, 宋粉云, 潘玄玄, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析补肾强身片中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(19): 61-67.
- [10] 吴茵, 白万军, 魏欣. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析木蝴蝶中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 196-200.
- [11] Fumiko A, Tatsuo Y. Cardenolide triosides of oleander leaves[J]. Phytochemistry, 1992, 31(7): 2459-2463.
- [12] BAI Y H, ZHAO M, BAI L M, et al. The biological activities of cardenolide triglycosides from stems, twigs, and leaves of *Nerium oleander*[J]. J Wood Sci, 2011, 57 (1): 56-65.
- [13] Tatsuo Y, Fumiko A. Cardiac glycosides and pregnanes from *Adenium obesum* (studies on the constituents of *Adenium* I) [J]. Chem Pharmaceut Bull, 1990, 38(3): 669-672.
- [14] ZHAO M, BAI L M, Asami T, et al. The structure of a new cardenolide diglycoside and the biological activities of eleven cardenolide diglycosides from *Nerium oleander* [J]. Chem Pharmaceut Bull, 2011, 59(3): 371-377.
- [15] Tatsuo Y, Naoe T, Tomiko M. Cardiac glycosides of the leaves of *Nerium odorum*[J]. Phytochemistry, 1975, 14 (5): 1379-1382.
- [16] Hasan K, Milena M, Michela F, et al. Steroidal glycosides with antiproliferative activities from *Digitalis trojana*[J]. Phytother Res, 2014, 28(4): 534-538.
- [17] Georges A, Page J, Duvernay G. Considerations on the biological activity of new cardiotoxic glycosides of digitalis purpurea: gitaloxin and verodoxin [J]. Therapie, 1961, 16: 998-1006.
- [18] Fumiko A, Tatsuo Y, Kazuo M. Presence of cardenolides and ursolic acid from oleander leaves in larvae and frass of *Daphnis nerii* [J]. Phytochemistry, 1996, 42 (1): 45-49.
- [19] WANG X M, Jeffrey B P, Robert A N, et al. LC/MS/MS analyses of an oleander extract for cancer treatment[J]. Anal Chem, 2000, 72(15): 3547-3552.
- [20] Luay J R, Katrin F, Myint M K, et al. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 781-788.
- [21] 郭春雨. 夹竹桃叶中的甾体类化学成分及其细胞毒活性的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2010.
- [22] Farzad S, A Daninel J. Nontargeted profiling of specialized metabolites of *Digitalis purpurea* with a focus on cardiac glycosides [J]. ACS Symposium Series, 2012, 1093: 185-205.
- [23] Angela P, Anna C, Michela F, et al. Antiproliferative steroidal glycosides from *Digitalis ciliata* [J]. Fitoterapia, 2012, 83(3): 554-562.
- [24] 匡海学. 中药化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 252.
- [25] Mitsuo T, Toshio F, Taro N. Formation and fragmentation of the $[M + Na]^+$ ion of glycosides in fast atom bombardment mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 1991, 26(7): 655-659.

[责任编辑 顾雪竹]