

基原为云南独蒜兰的山慈菇的化学成分鉴定与分析^Δ

王 静^{1,2*}, 肖秋肖^{1,2}, 周祖英^{1,2}, 仁莎莎^{1,2}, 陈思颖¹, 巩仔鹏¹, 黄 勇¹, 王爱民³, 刘春花³, 李月婷^{1#}(1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R917;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)10-1165-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.10.03



摘要 目的 鉴定、分析山慈菇(基原为云南独蒜兰)的化学成分。方法 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术。色谱柱为Hyperdil GOLD, 流动相为0.1%甲酸溶液-0.1%甲酸乙腈溶液(梯度洗脱), 流速为0.3 mL/min, 柱温为40 ℃, 进样量为2 μL; 离子源为电喷雾离子源, 扫描范围为 m/z 100~1 500, 扫描模式为全扫描+数据依赖二级扫描的正负离子交换模式。采用Compound Discoverer 3.1软件, 通过与mzCloud、PubChem网络数据库和中药成分高分辨质谱本地数据库OTCML进行比对, 同时结合对照品和已有文献确定化合物结构。**结果与结论** 从山慈菇中共鉴定出42个化学成分(正离子模式下有24个、负离子模式下有27个), 包括13个丁二酸苄酯苷类成分(如dactylorhin C、coelovirin A、militarine等)、4个酚苷类成分(如腺苷、鸟苷、天麻素等)、3个生物碱类成分(胆碱、甜菜碱、小檗碱)、1个黄酮类成分(川陈皮素)、7个芳香族类成分(如DL-赖氨酸、DL-精氨酸、DL-谷氨酰胺等)、1个糖类成分(蔗糖)、3个联苄类成分(shancigusin H、shancigusin H isomer、山药素Ⅲ)和10个其他类成分(如对甲氧基苯甲酸、十二烷二酸单甲酯、二苯胺等)。丁二酸苄酯苷类成分在裂解过程中易丢失葡萄糖氧苄基和一些小分子; 酚苷类成分易丢失糖基; 生物碱类成分以小分子取代基的裂解和丢失为主; 黄酮类成分多发生脱甲基反应。

关键词 山慈菇; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术; 化学成分; 鉴定; 分析

Identification and analysis of chemical constituents of *Pleione yunnanensis* with origin of *Pleione yunnanensis*

WANG Jing^{1,2}, XIAO Qiuxiao^{1,2}, ZHOU Zuying^{1,2}, REN Shasha^{1,2}, CHEN Siying¹, GONG Zipeng¹, HUANG Yong¹, WANG Aimin³, LIU Chunhua³, LI Yueting¹(1. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center of the Ministry of Education for the Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To identify and analyze chemical constituents of *Pleione yunnanensis* with origin of *Pleione yunnanensis*. **METHODS** UPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS was adopted. The determination was performed on Hyperdil GOLD column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-0.1% formic acid acetonitrile solution (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40 ℃, and sample size was 2 μL. The electrospray ion source was adopted, and the scanning range was m/z 100-1 500, and the scanning mode was positive and negative ion exchange mode of full scan+ddMS². The structure of chemical constituents were determined by using Compound Discoverer 3.1 software, comparing with mzCloud, PubChem network database and OTCML, on the basis of reference substance and published literatures. **RESULTS & CONCLUSIONS** A total of 42 chemical constituents were identified (positive ion mode has 24, negative ion mode has 27), including 13 benzyl succinate glycosides (such as dactylorhin C, coelovirin A, militarine), 4 phenol glycosides (such as adenosine, guanosine, gastrodin), 3 alkaloids (choline, betaine, berberine), and one flavonoid (nobiletin), 7 aromatics (such as DL-lysine, DL-arginine, DL-glutamine), one sugar (sucrose), 3 benzenes (shancigusin H, shancigusin H isomer, batatasin III) and 10 others (such as *p*-methoxybenzoic acid, monomethyl dodecanedioate, diphenylamine). Glucose oxybenzyl and some small molecules are easy to be lost in the cleavage of benzyl succinate glycosides; glycosyl is easy to be lost in the cleavage of phenol glycosides; the cleavage of alkaloids mainly manifest as the cleavage and loss of small molecular substituents; demethylation reaction is occurred in most flavonoids.

KEYWORDS *Pleione yunnanensis*; UPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS; chemical constituents; identification; analysis

Δ 基金项目: 国家自然科学基金委-特色民族药药效物质及体内过程与毒效机制研究(No.U1812403-5); 中央引导地方科技发展专项资金项目(No.黔科中引地[2018]4006); 贵州省高层次创新型人才项目[No.黔科合平台人才(2016)5677]

* 硕士研究生。研究方向: 药物新剂型、新技术及药理学。E-mail: 1135500301@qq.com

通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药药效物质、作用机制及质量控制。电话: 0851-86908648。E-mail: nhwslyt@163.com

山慈菇为兰科植物杜鹃兰 *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino、独蒜兰 *Pleione bulbocodioides* (Franch.) Rolfe 或云南独蒜兰 *Pleione yunnanensis* Rolfe 的干燥假鳞茎,前者习称“毛慈菇”,后两者习称“冰珠子”^[1]。该药主要分布于我国贵州、云南、山西、陕西等地,为我国濒危药用植物^[2]。山慈菇归肝、脾经,具有清热解毒、化痰散结的功效^[1],以山慈菇为主要药材的多种中药复方制剂(如菊藻丸)疗效显著^[3]。目前,山慈菇的基础研究多集中在杜鹃兰化学成分分离鉴定及综述报道^[4-5],而关于云南独蒜兰的研究较少。山慈菇作为2020年版《中国药典》(一部)收录品种之一,仅有“性状”和“鉴别”项^[1],缺乏有效的质量控制标准,加之山慈菇基原多样,导致市面上山慈菇伪品不断^[6]。因此,明确山慈菇化学成分,不仅有助于阐明其药效物质基础,还可用于药材基原的确定。

近年来,超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用(UPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS)技术被广泛应用于蛋白组学和中药复方、成分的分析,具有分离效率高、扫描速度快、分辨率高、灵敏度高等特点^[7]。基于此,本研究拟采用UPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS技术对山慈菇(基原为云南独蒜兰)的主要成分进行分析,旨在为阐明其化学成分、挖掘药效物质基础及建立质量标准提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Vanquish型UPLC系统、Q Exactive Plus型高分辨质谱仪及配套的中药成分高分辨质谱本地数据库OTCML(美国Thermo Fisher Scientific公司),FW100型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),EL-104型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],Allegra X-30R Centrifuge型离心机(美国Beckman Coulter公司),KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 药品与试剂

天麻素对照品(批号110807-202010,纯度≥98%)购自中国食品药品检定研究院;山药素Ⅲ、militarine、dactylorhin A对照品(批号分别为AF20080910、AF20082308、AF21071602,纯度均大于98%)均购自成都埃法生物科技有限公司;鸟苷对照品(批号F2012066,纯度≥98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;腺苷对照品(批号A8653358E,纯度≥98%)购自上海吉至生化科技有限公司;loroglossin对照品(批号210610,纯度≥97%)购自上海源叶生物科技有限公司;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

山慈菇饮片(批号201103)购自亳州市永刚饮片厂有限公司,经贵州医科大学药学院生药学教研室刘春花副教授鉴定为兰科植物云南独蒜兰 *P. yunnanensis* Rolfe

的干燥假鳞茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

以Hyperdil GOLD(100 mm×2.1 mm,1.9 μm)为色谱柱,以0.1%甲酸溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~4 min,2% B→5% B;4~8 min,5% B→12% B;8~11 min,12% B→20% B;11~16 min,20% B→22% B;16~22 min,22% B→28% B;22~30 min,28% B→35% B;30~33 min,35% B→65% B;33~36 min,65% B→95% B;36~39 min,95% B→40% B;39~40 min,40% B→2% B;40~43 min,2% B);流速为0.3 mL/min;柱温为40 ℃;进样量为2 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源;喷雾电压为3 500 V;鞘气流速为40 arb;辅助气压力为10 arb;雾化气温度为350 ℃;扫描范围为 m/z 100~1 500;毛细管温度为320 ℃;探头加热器温度为350 ℃;离子透镜电压频率为50.0;碰撞能梯度为20、40、60 eV;扫描模式为全扫描+数据依赖二级扫描的正负离子交换模式;一级分辨率为70 000;二级分辨率为17 500。

2.3 供试品溶液的制备

取山慈菇饮片适量,粉碎,过40目筛。精密称取上述粉末1 g,加入80%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率500 W,频率40 kHz,下同)处理30 min,冷却至室温,再次称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,滤过,以12 000 r/min离心5 min,取上清液,即得质量浓度为40 mg/mL(以生药量计)的供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取天麻素、山药素Ⅲ、dactylorhin A、鸟苷、腺苷、loroglossin、militarine对照品适量,分别置于5 mL量瓶中,加甲醇超声溶解后再用甲醇定容,制得质量浓度均为20 μg/mL的单一对照品溶液,置于-20 ℃冰箱中保存,备用。

2.5 数据处理

采用Compound Discoverer 3.1软件分析山慈菇的UPLC-MS/MS数据,将所得到的质谱信息(保留时间、一级和二级碎片离子信息等)与mzCloud(www.mzCloud.org)、PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)网络数据库、中药成分高分辨质谱本地数据库OTCML进行比对,设置两者一级、二级质量的误差为5 ppm。

2.6 化学成分分析

2.6.1 正离子模式 取“2.3”项下供试品溶液和“2.4”项下各单一对照品溶液,按“2.1”“2.2”项下条件进样分析,得山慈菇在正离子模式下的总离子流图(图1,对照品图略)。根据各成分峰的碎片离子信息,按“2.5”项下方法处理质谱数据,并参考相关文献^[18-30],最终从山慈菇中共鉴定出24个化学成分。结果见表1。

2.6.2 负离子模式 取“2.3”项下供试品溶液和“2.4”项下各单一对照品溶液,按“2.1”“2.2”项下条件进样分析,得山慈菇在负离子模式下的总离子流图(图2,对照品图略)。根据各成分峰的碎片离子信息,按“2.5”项下方法处理质谱数据,并参考相关文献^[8-30],最终从山慈菇中共鉴定出27个化学成分。结果见表1。

同时通过与各单一对照品质谱图进行对比,指认峰10为腺苷、峰11为鸟苷、峰12为天麻素、峰27为loroglossin、峰30为dactylorhin A、峰32为militarine、峰35为山药素Ⅲ。结果见图3。

2.7 裂解规律分析

2.7.1 丁二酸苄酯苷类化合物 丁二酸苄酯苷类是一类存在于兰科植物中且结构较新颖的化学成分。该类

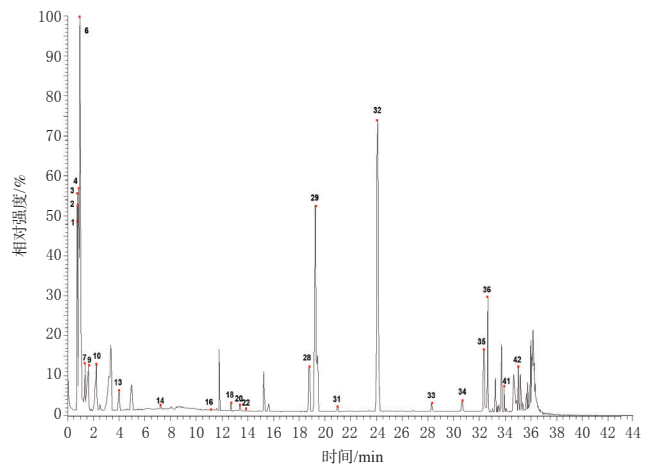


图1 山慈菇的总离子流图(正离子模式)

表1 山慈菇中共有化合物的分析结果(正、负离子模式)

峰号	保留时间/min	分子式	准分子离子	理论值(<i>m/z</i>)	误差/ppm	碎片离子	化合物名称	参考文献
1	0.81	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	146.113	-0.029	84.081, 130.086, 67.055	DL-赖氨酸	[8]
2	0.86	C ₅ H ₁₃ NO ⁺	[M+H] ⁺	104.107	-0.006	105.110, 60.081, 58.066	胆碱	[9]
3	0.91	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	174.119	-0.003	70.066, 60.056, 116.071	DL-精氨酸	[10]
4	0.92	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	146.076	0.009	84.045, 130.050, 102.055	DL-谷氨酰胺	[11]
5	0.98	C ₆ H ₁₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	342.108	0.006	341.109, 179.055, 161.044, 119.034, 89.023	蔗糖	[12]
6	1.05	C ₆ H ₁₀ NO ₂	[M+H] ⁺	117.086	0.041	58.066, 59.074	甜菜碱	[13]
7	1.36	C ₆ H ₁₀ NO ₂	[M+H] ⁺	129.086	0.037	84.081, 56.050, 130.086	D-(+)-2-哌啶酸	[14]
8	1.70	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₆	[M-H] ⁻	244.077	-0.003	243.062, 113.023, 71.013, 82.029	尿苷	[15]
9	1.83	C ₆ H ₁₁ NO ₃	[M+H] ⁺	181.081	0.001	165.054, 136.075, 123.044, 119.049, 91.055	L-酪氨酸	[16]
10	2.25	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₄	[M+H] ⁺	267.104	-0.002	136.062, 119.035	腺苷	[17]
11	2.54	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₃	[M-H] ⁻	283.083	-0.005	150.041, 133.014, 108.019	鸟苷	[15]
12	3.38	C ₉ H ₉ O ₃	[M-H] ⁻	286.097	0.001	123.044, 105.034	天麻素	[18]
13	3.99	C ₆ H ₉ NO	[M+H] ⁺	109.060	-0.004	65.039, 92.050	4-氨基苯酚	[19]
14	7.23	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	204.097	-0.004	205.097, 204.068, 117.070, 188.070	色氨酸	[20]
15	11.77	C ₁₄ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	352.129	-0.003	351.130, 171.065, 127.075	dactylorhin C	[17]
16	11.80	C ₈ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	152.055	-0.004	111.044, 65.039, 93.034, 125.060	香兰素	[21]
17	12.56	C ₈ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	168.034	0.029	152.010, 108.021, 123.007	5-甲氧基水杨酸	[22]
18	12.70	C ₈ H ₈ N ₂	[M+H] ⁺	144.076	-0.034	145.076, 118.065, 91.055	4-苯基咪唑	[17]
19	13.36	C ₈ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	152.039	-0.004	151.039, 136.016, 107.049	对甲氧基苯甲酸	[23]
20	13.39	C ₆ H ₁₀ NO ₂	[M+H] ⁺	165.086	0.029	166.086, 120.981	L-苯丙氨酸	[24]
21	13.73	C ₆ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	174.081	0.027	111.080, 173.081, 83.049	辛二酸	[25]
22	13.76	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	208.081	0.022	209.080, 194.057, 190.953	(2E)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid	[17]
23	14.58	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	474.165	-0.003	473.166, 285.099, 159.065, 115.075	coelovirin A	[17]
24	15.27	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	620.223	-0.001	439.161, 171.065, 153.055, 123.044	dactylorhin E	[17]
25	15.59	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	138.023	-0.004	137.023, 93.033, 65.038	水杨酸	[26]
26	15.64	C ₂₇ H ₄₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	620.223	-0.001	439.161, 171.065, 153.055, 123.044	dactylorhin E isomer	[17]
27	16.39	C ₅₈ H ₈₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	742.260	-0.001	473.166, 159.065, 115.075	loroglossin	[17]
28	18.77	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	458.170	0.002	457.171, 285.098, 153.055, 127.075	gymnoside I	[27]
29	18.94	C ₃₁ H ₃₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	458.170	0.002	457.171, 285.098, 153.055, 127.075	gymnoside II	[27]
30	19.25	C ₆₀ H ₈₂ O ₂₂	[M-H] ⁻	888.318	0.001	619.224, 439.161, 285.097, 153.055	dactylorhin A	[17]
31	20.97	C ₂₀ H ₁₇ NO ₄ ⁺	[M+H] ⁺	336.123	-0.014	336.123, 322.091, 307.043, 292.096, 278.080	小檗碱	[28]
32	24.08	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	726.265	0.004	457.171, 285.098, 189.076, 153.055, 123.044	militarine	[27]
33	28.28	C ₄₈ H ₆₂ O ₂₄	[M-H] ⁻	1 035.355	0.001	1 033.356, 765.260, 619.224, 439.161	shancigusin H	[17]
34	29.50	C ₄₈ H ₆₂ O ₂₄	[M-H] ⁻	1 035.355	0.001	1 033.357, 853.291, 765.261, 585.195, 439.161	shancigusin H isomer	[17]
35	32.37	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	244.102	-0.001	243.102, 227.071, 185.060	山药素Ⅲ	[17]
36	32.63	C ₄₈ H ₆₂ O ₂₃	[M-H] ⁻	1 019.360	-0.004	749.266, 619.224, 569.203, 439.161	gymnoside V	[17]
37	33.21	C ₄₈ H ₆₂ O ₂₃	[M-H] ⁻	1 019.360	-0.004	749.266, 619.224, 569.202	gymnoside IV	[17]
38	33.74	C ₄₈ H ₆₂ O ₂₃	[M-H] ⁻	1 019.360	-0.004	749.266, 619.222, 569.202	gymnoside VI	[17]
39	33.85	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	[M-H] ⁻	244.143	0.019	211.133, 185.874, 167.143	十二烷二酸单甲酯	[17]
40	33.90	C ₄₈ H ₆₂ O ₂₃	[M-H] ⁻	1 019.360	-0.004	749.266, 619.224, 569.203, 439.161	gymnoside V isomer	[17]
41	34.00	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	403.139	-0.010	388.115, 373.091, 355.080, 327.086	川陈皮素	[29]
42	35.23	C ₁₂ H ₁₆ N	[M+H] ⁺	169.096	0.024	170.096, 94.061, 77.040, 93.058, 92.050, 153.070, 51.024	二苯胺	[30]

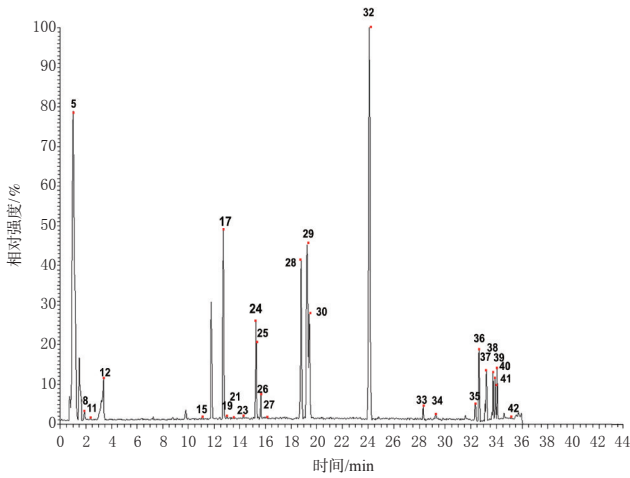


图2 山慈菇的总离子流图(负离子模式)

化合物有2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苄酯结构,具有益智、延缓衰老、保护神经等作用^[31]。本研究从山慈菇中共鉴定出13个丁二酸苄酯苷类化合物,分别为dactylorhin C(峰15)、coelovirin A(峰23)、dactylorhin E(峰24)、dactylorhin E isomer(峰26)、loroglossin(峰27)、gymnoside I(峰28)、gymnoside II(峰29)、dactylorhin A(峰30)、militarine(峰32)、gymnoside V(峰36)、gymnoside IV(峰37)、gymnoside VI(峰38)、gymnoside V isomer(峰40),其中峰27、30、32经与对照品对比确认,分别为loroglossin、dactylorhin A、militarine。

以保留时间为24.08 min的化合物32为例,其分子式为 $C_{34}H_{46}O_{17}$,在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 725.265 $[M-H]^-$ 。参考其碎片离子信息推测裂解规律

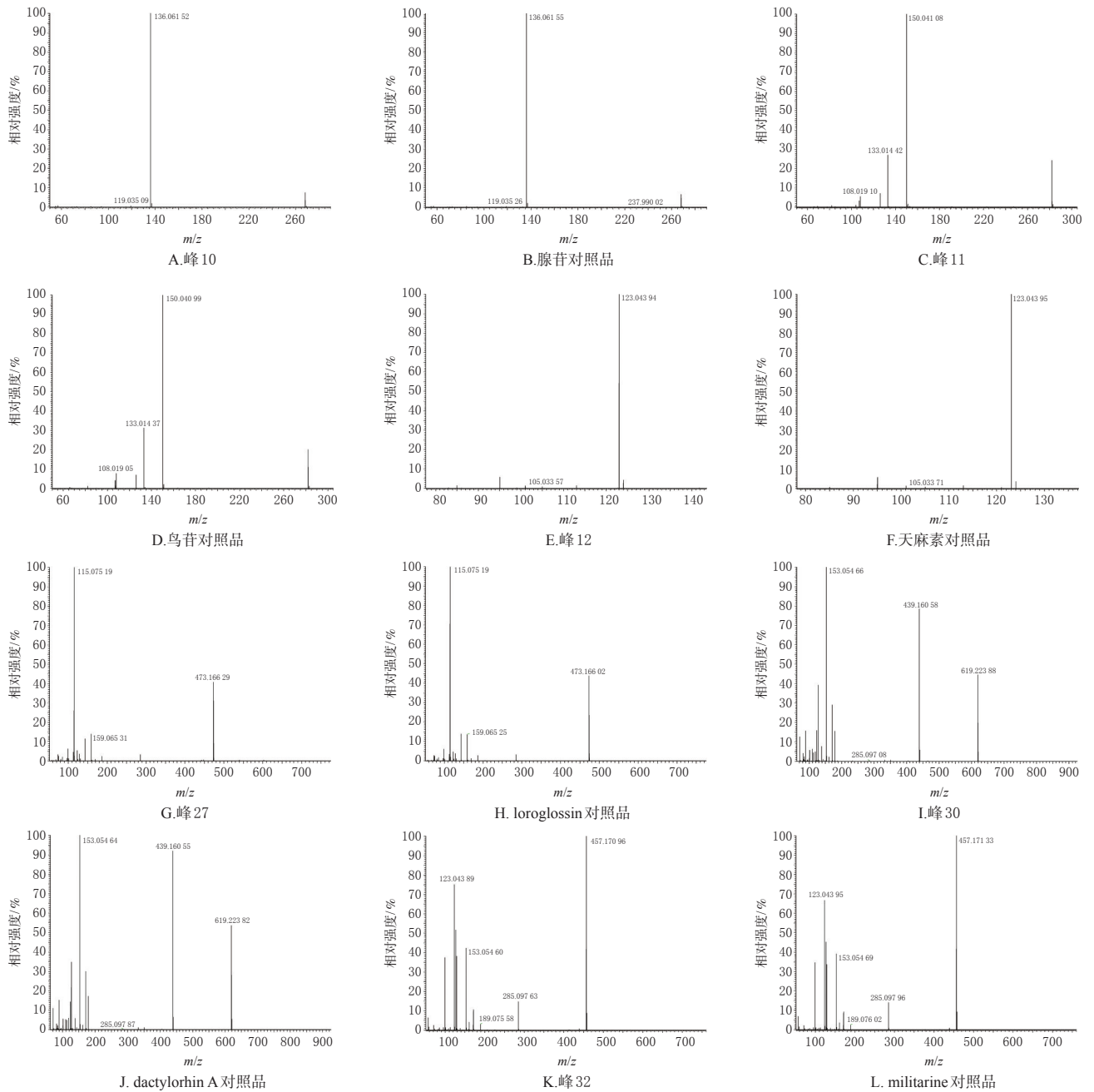
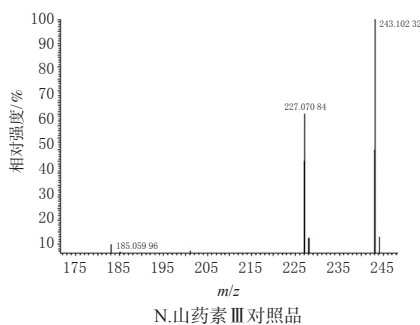
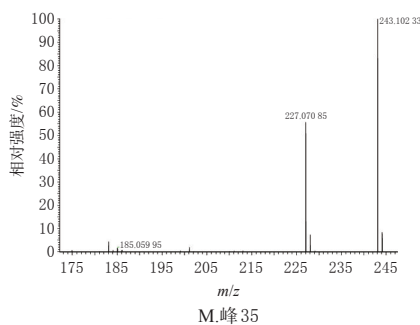


图3 山慈菇部分成分与对照品比对的二级质谱图



续图3

如下:准分子离子峰水解脱酯,从酯键断裂,失去1个天麻单元($-C_{13}H_{16}O_6$,质量数少了268),形成特征碎片离子峰 m/z 457.171 $[M-C_{13}H_{16}O_6-H]^-$;进一步裂解,失去1个异丁基-苹果酸单元和天麻单元,分别形成碎片离子峰 m/z 285.098 $[M-C_{26}H_{32}O_{12}-H]^-$ 和 m/z 189.076 $[M-C_{26}H_{32}O_{12}-H]^-$;碎片离子峰 m/z 189.076 进一步裂解,脱去2分子 H_2O 得到碎片离子峰 m/z 153.055 $[M-C_{26}H_{36}O_{14}-H]^-$ 。根据上述裂解规律并参考相关文献^[27],推测化合物32(militarine)可能的裂解途径如图4所示。

如下:准分子离子峰通过消除葡萄糖基,产生特征碎片离子峰 m/z 123.044 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ 、 m/z 105.034 $[M-C_6H_{12}O_6-H]^-$ 。根据上述裂解规律并参考相关文献^[18],推测化合物12(天麻素)可能的裂解途径如图5所示。

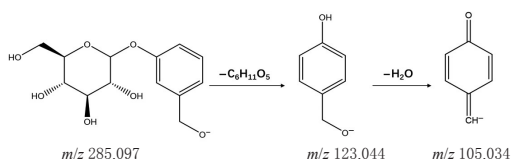


图5 天麻素可能的裂解途径

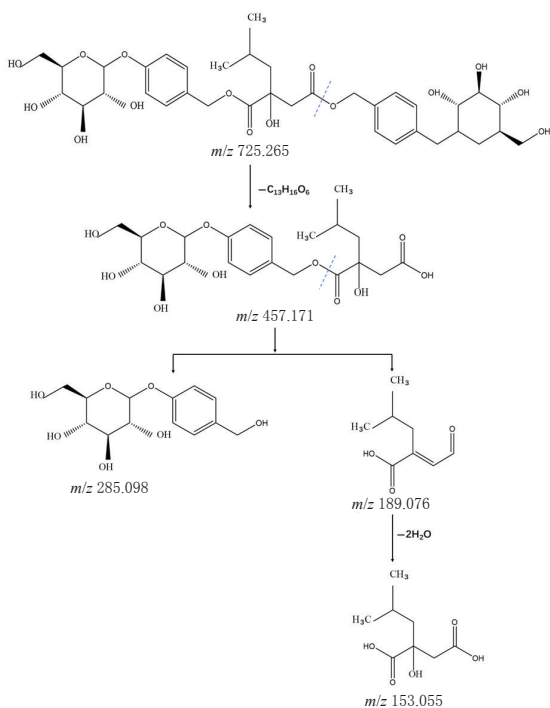


图4 militarine可能的裂解途径

2.7.2 酚苷类化合物 酚苷类化合物是由苷元分子中的酚羟基与糖分子中的端基碳原子缩合而成的苷类化合物^[32]。本研究从山慈菇中共鉴定出4个酚苷类化合物,分别为尿苷(峰8)、腺苷(峰10)、鸟苷(峰11)、天麻素(峰12),其中峰10、11、12经与对照品对比确认,分别为腺苷、鸟苷、天麻素。

以保留时间为3.38 min的化合物12为例,其分子式为 $C_{13}H_{18}O_7$,在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 285.097 $[M-H]^-$ 。参考其碎片离子信息推测裂解规律

2.7.3 生物碱类化合物 生物碱类化合物又被称为“贗碱”,是广泛存在于自然界(主要为植物)中的一类含氮碱性有机化合物,有类似碱的性质和药理活性(如调节血脂、抗炎、抗病毒等)^[33]。本研究从山慈菇中共鉴定出3个生物碱类化合物,分别为胆碱(峰2)、甜菜碱(峰6)、小檗碱(峰31)。

以保留时间为20.97 min的化合物31为例,其分子式为 $C_{20}H_{17}NO_4$,在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 336.123 $[M+H]^+$ 。参考其碎片离子信息推测裂解规律如下:由于准分子离子峰9位/10位的羟基氢被甲基取代,容易发生脱甲基化,失去1分子 CH_2 (断裂为9位或10位),产生二级碎片离子峰 m/z 322.091 $[M-CH_2+H]^+$;该碎片离子峰再次发生去甲基化反应,产生碎片离子峰 m/z 307.043 $[M-CH_3-CH_2+H]^+$ 。根据上述裂解规律并参考相关文献^[28],确认化合物31为小檗碱,其可能的裂解途径如图6所示。

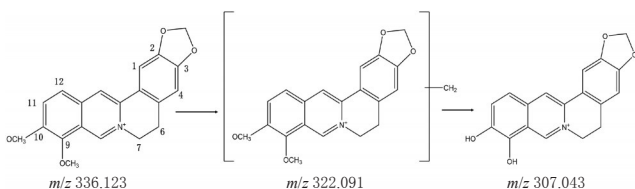


图6 小檗碱可能的裂解途径

2.7.4 黄酮类化合物 黄酮类化合物是一类以2-苯基色原酮为基本母核的化合物,又名黄酮或黄碱素^[34],具有保护神经、抗心肌缺血、降压等作用^[34]。本研究从山慈菇中共鉴定出1个黄酮类化合物,为川陈皮素(峰41)。

化合物 41 的保留时间为 34.00 min, 其分子式为 $C_{21}H_{22}O_8$, 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 403.139 $[M+H]^+$ 。参考其碎片离子信息推测裂解规律如下: 由于准分子离子峰的羟基氢被甲基取代, 发生单脱甲基反应, 失去 1 分子 CH_3 , 产生碎片离子峰 m/z 388.115 $[M-CH_3+H]^+$; 该碎片离子峰继续发生双脱甲基反应, 生成比准分子离子峰少 28 的碎片离子峰 m/z 373.091 $[M-OCH_3+H]^+$, 再进一步脱去 1 分子 H_2O , 生成二级碎片离子峰 m/z 355.080 $[M-CH_2O_2+H]^+$ 。根据上述裂解规律并参考相关文献^[29], 确认化合物 41 为川陈皮素, 其可能的裂解途径如图 7 所示。

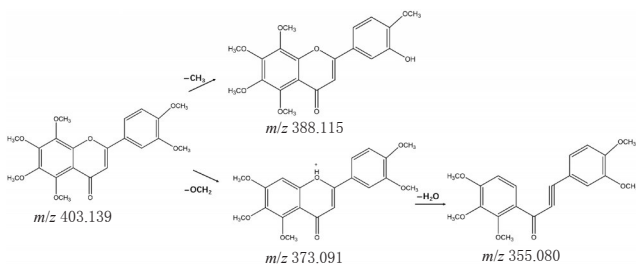


图 7 川陈皮素可能的裂解途径

2.7.5 芳香族类、糖类、联苕类及其他类化合物 本研究从山慈菇中共鉴定出 7 个芳香族类(DL-赖氨酸、DL-精氨酸、DL-谷氨酰胺、L-酪氨酸、色氨酸、香兰素、L-苯丙氨酸)、1 个糖类(蔗糖)、3 个联苕类(shancigusin H、shancigusin H isomer、山药素 III)和 10 个其他类(对甲氧基苯甲酸、十二烷二酸单甲酯、二苯胺等), 其可能的裂解途径略。

3 讨论

由于山慈菇(基原为杜鹃兰)所含成分具有抗肿瘤活性^[35], 加之市场需求不断增加, 使其成为热点品种。云南独蒜兰作为山慈菇的基原之一, 其组胚培育技术较为成熟^[36], 但药效物质基础不明确, 化学成分及药理作用研究较少。为防止不同种质混用并明确山慈菇的化学成分, 本课题组对基原为云南独蒜兰的山慈菇进行了成分分析。

UPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS 技术具有高分辨率、高分离效率及高灵敏度等特点^[7], 与既往研究山慈菇化学成分所用方法(硅胶柱色谱、凝胶柱色谱、反相柱色谱等)相比, 操作更为简单、快速, 可全面、整体地对山慈菇化学成分进行解析。本课题组前期对不同流动相体系(水-乙腈、0.1% 甲酸溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液)进行了考察, 结果显示, 以 0.1% 甲酸溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液为流动相时, 各色谱峰的峰形较好, 故选择 0.1% 甲酸溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液为流动相。为最大程度获取成分的质谱信息, 本课题组前期分别采用正、负离子模式进行扫描, 结果显示, 各成分在正、负离子模式下的响应强度存在明显差异, 但同时使用两种模式时能够满足快速、准确的定性要求。

本研究从山慈菇中共鉴定出 42 个化学成分, 包括 13 个丁二酸苕酯苕类成分(如 dactylorhin C、coelovirin A、militarine 等)、4 个酚苕类成分(如腺苕、鸟苕、天麻素等)、3 个生物碱类成分(胆碱、甜菜碱、小檗碱)、1 个黄酮类成分(川陈皮素)、7 个芳香族类成分(如 DL-赖氨酸、DL-精氨酸、DL-谷氨酰胺等)、1 个糖类成分(蔗糖)、3 个联苕类成分(shancigusin H、shancigusin H isomer、山药素 III)和 10 个其他类成分(如对甲氧基苯甲酸、十二烷二酸单甲酯、二苯胺等), 其中有 5 个成分(对甲氧基苯甲酸、川陈皮素、香兰素、shancigusin H isomer、dactylorhin C)为首次从山慈菇(基原为云南独蒜兰)中发现。丁二酸苕酯苕类化合物在二级质谱的诱导碰撞解离中易裂解, 丢失葡萄糖氧苕基离子, 失去一些小分子; 酚苕类化合物由于苕元分子中的酚羟基易与糖分子中的端基碳原子缩合形成氧苕, 在裂解过程中, 多以丢失糖基为主; 生物碱类化合物在质谱高能碰撞下, 母核一般不发生裂解, 主要以发生小分子取代基的裂解与丢失(如 CH_2)为主, 使其母核形成更稳定的大 π 共轭体系; 黄酮类化合物由于黄酮母核上有多个甲氧基取代, 在质谱条件下主要丢失 CH_3 、 H_2O 。

本研究通过分析山慈菇化学成分发现, 丁二酸苕酯苕类成分在总离子流图中响应较强, 同时对山慈菇含量进行检测后发现, 含量较高的 dactylorhin A、militarine、gymnoside V 均属于丁二酸苕酯苕类成分, 表明丁二酸苕酯苕类成分山慈菇的主要化学成分。查阅文献发现, 该类化合物具有改善认知、提高学习记忆能力、抗炎、抗氧化等作用^[31], 其中 dactylorhin A、militarine 对阿尔茨海默病模型大鼠的痴呆症状有改善作用^[37]。酚苕类化合物可抑制缺血性脑卒中导致的神经元死亡^[38]。此外, 有文献报道, 山慈菇(基原为杜鹃兰)具有神经保护作用^[39]。由此推测, 山慈菇(基原为云南独蒜兰)可能也具有保护神经的作用, 但后续尚需药效学研究予以证实。

综上所述, 本研究采用 UPLC-Q-Exactive-Plus-Orbitrap-MS 技术对山慈菇的化学成分进行了鉴定, 并探讨了丁二酸苕酯苕类、酚苕类、生物碱类和黄酮类化合物的潜在质谱裂解规律, 为山慈菇的药效物质基础研究提供了参考, 亦为其质量控制提供了依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 34.
- [2] 周跃华. 关于《国家重点保护野生药材物种名录》修订之探讨[J]. 中国现代中药, 2012, 14(9): 1-12.
- [3] 王焱需, 李擎虎, 彭瑶, 等. 菊藻丸联合化疗对中晚期胃癌患者临床效果及生活质量的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(5): 700-703.
- [4] ZHANG H F, ZHANG Z Y, DU H, et al. Effects of different extracts of *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino on apoptosis of A549 cells[J]. Trop J Pharm Res, 2020, 19(8): 1653-1659.

- [5] LIU J Y, HE C, TANG Y, et al. A review of *Cremastra appendiculata* (D. Don) Makino as a traditional herbal medicine and its main components[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114357.
- [6] 刘婷婷, 于栋华, 刘树民. 山慈菇的本草考证及现代研究进展[J]. *中国药房*, 2020, 31(24): 3055-3059.
- [7] JIANG C L, HAN H L, DAI J X, et al. Insights into stress degradation behavior of gibberellic acid by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap mass spectrometry[J]. *Food Chem*, 2022, 367: 130662.
- [8] 马赟, 蔡静, 张园娇, 等. UFLC-QTRAP-MS/MS法同时测定绞股蓝中11种氨基酸[J]. *中成药*, 2018, 40(1): 133-137.
- [9] 张瑞端, 杜伟锋, 岑建斌, 等. HPLC-MS/MS测定化妆品中5种禁用胆碱类化合物[J]. *日用化学工业*, 2018, 48(4): 237-242.
- [10] 裴丽英. 基于UPLC-TOF-MS/MS技术探究L-精氨酸在急性胰腺炎大鼠体内的代谢产物变化[D]. 大连: 大连医科大学, 2020.
- [11] 王荣艳, 徐聪玲, 李海龙, 等. UPLC-MS/MS法测定乳基食品中谷氨酰胺含量研究[J]. *中国乳业*, 2019(2): 63-67.
- [12] 周远明, 徐坤, 王倩文. 超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中葡萄糖、果糖、蔗糖及山梨醇含量[J]. *化学与生物工程*, 2019, 36(3): 66-68.
- [13] 陈偲, 彭祖茂, 廖功诚, 等. 测定血清游离胆碱、甜菜碱、三甲胺和胺氧化三甲 UPLC-MS/MS[J]. *中国公共卫生*, 2019, 35(9): 1271-1275.
- [14] 吴璐一, 顾沐恩, 朱毅, 等. 基于UPLC-Q/TOFMS技术的隔药饼灸合募配穴治疗UC大鼠的尿液代谢组学研究[J]. *世界中医药*, 2016, 11(12): 2547-2552.
- [15] 杨秋红, 张红伟, 张振凌, 等. UPLC-MS/MS同时测定山药药片中6个核苷类成分的含量[J]. *中南药学*, 2020, 18(5): 849-853.
- [16] 梁先玉, 李斌, 万益群. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定生物体液中的酪氨酸及其代谢产物[J]. *分析科学学报*, 2019, 35(4): 411-416.
- [17] 刘星星, 刘宏栋, 潘玲玲, 等. 独蒜兰化学成分及生物活性研究进展[J]. *江西中医药大学学报*, 2019, 31(2): 106-111.
- [18] 秦亚东, 汪荣斌, 方凤满, 等. 化学模式识别分析白及不同采收期次生代谢产物动态变化特征[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(1): 11-17.
- [19] 王建玲, 肖晓峰, 何军, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定塑料类食品接触材料中4种苯胺衍生物的特定迁移量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2017, 53(3): 263-269.
- [20] 田欢, 翟俊杰, 李孟秋, 等. LC-MS/MS法测定小鼠脑组织中色氨酸及其3种代谢物[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(1): 315-319, 330.
- [21] 马启明, 梁小敏, 曾广丰. 增强型基质去除净化-UPLC-Q-TOF/MS法快速测定奶粉中的香兰素类化合物[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(10): 54-58.
- [22] 董芳. 基于UPLC/Q-TOF-MS技术和模式识别方法的多囊卵巢综合征的血清代谢组学研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2015.
- [23] 张勋, 刘韬, 吴连鹏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定多种食品中7种酚类抗氧化剂和对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(11): 206-211.
- [24] 姚英艳. L-苯丙氨酸寡肽的合成分离及其与DNA相互作用的初步研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2007.
- [25] 应龙彬. 猫爪草有效部位和质量控制的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2008.
- [26] 张瑞, 陆舍铭, 丁丽婷, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定化妆品中水杨酸[J]. *理化检验(化学分册)*, 2011, 47(1): 65-67.
- [27] LI L M, HAO B, ZHANG Y L, et al. Metabolite profiling and distribution of militarine in rats using UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Molecules*, 2020, 25(5): 1082.
- [28] LI Y, WANG H J, SI N, et al. Metabolic profiling analysis of berberine, palmatine, jatrorrhizine, coptisine and epiberberine in zebrafish by ultra-high performance liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometer[J]. *Xenobiotica*, 2015, 45(4): 302-311.
- [29] OSHITARI T, OKUYAMA Y, MIYATA Y, et al. Nobiletin metabolites: synthesis and inhibitory activity against matrix metalloproteinase-9 production[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(15): 4540-4544.
- [30] 周琛, 骆春迎, 余辉菊, 等. 直接进样-液相色谱-串联质谱法同时测定水中的5种苯胺类化合物[J]. *分析化学*, 2016, 44(6): 935-941.
- [31] 李敏, 郭顺星, 王春兰, 等. 2-异丁基苹果酸葡萄糖氧基苄酯类化合物在兰科植物中的分布特点及药理活性[J]. *中国药理学杂志*, 2010, 45(10): 724-726.
- [32] 张李赢. 糖苷水解酶在中药成分生物转化中的应用研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2012.
- [33] 袁海梅, 邱露, 谢贞建, 等. 花椒属植物生物碱类成分及其药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(23): 4573-4584.
- [34] 黄华艺, 查锡良. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2002, 21(7): 428-433.
- [35] 严玉玲, 万琼, 周俭珊, 等. 山慈菇抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *广东医学*, 2016, 37(22): 3468-3469.
- [36] 吴沙沙, 沈立明, 曹孟霞, 等. 独蒜兰和云南独蒜兰无公害种植体系研究[J]. *世界中医药*, 2020, 15(13): 1920-1925.
- [37] 张丹, 王亚芳, 张建军. 传统藏药旺拉对淀粉样蛋白A β 致大鼠痴呆的治疗作用[J]. *中国药理通讯*, 2006, 23(3): 15-16.
- [38] 许鑫, 周欣, 楚世峰, 等. 天麻素治疗缺血性脑卒中导致神经元死亡的作用机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(11): 1581-1587.
- [39] 林松, 高欢, 张帅, 等. 杜鹃兰化学成分及神经保护活性研究[J]. *中草药*, 2016, 47(21): 3779-3786.

(收稿日期: 2021-12-24 修回日期: 2022-03-31)

(编辑: 陈宏)