

绵马贯众抗禽流感病毒活性部位的高效液相色谱 - 质谱法分析

陈建新^{1,3}, 曾振灵¹, 方炳虎¹, 杨运云², 牟德海², 叶文才³

(1. 华南农业大学 兽医学院 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642;
2. 中国广州分析测试中心, 广东 广州 510070; 3. 暨南大学 药学院, 广东 广州 510632)

摘要: 分别在 ESI(+)、ESI(-)和 APCI(+) 3 种电离检测模式下对绵马贯众抗禽流感病毒活性部位进行了液相色谱分离及离子阱质谱检测, 共有 21 种组分能在 2 种或 3 种检测模式下被同时检测到。比较分析 3 种检测模式下得到的总离子流色谱图及各色谱峰的多级质谱图, 并参考相关文献, 推测活性部位中含有 15 种间苯三酚衍生物, 是绵马贯众抗 A/V 活性部位的主要成分。

关键词: 绵马贯众; 抗禽流感病毒; 高效液相色谱 - 质谱; 间苯三酚衍生物

中图分类号: O657.63; R978.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)06 - 0623 - 04

Analysis of Chemical Constituents of the Anti-avian Influenza Virus Site of *Dryopteris Crassirhizoma* by HPLC - ESI/APCI - MSⁿ

CHEN Jian-xin^{1,3}, ZENG Zhen-ling¹, FANG Bing-hu¹,
YANG Yun-yun², MU De-hai², YE Wen-cai³

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. China National Analytical Center(Guangzhou), Guangzhou 510070, China; 3. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The anti-A/V site of *Dryopteris Crassirhizoma* (DC) was analyzed by HPLC - IT - MS under three different ionization modes, viz ESI(+), ESI(-) and APCI(+), respectively. Twenty-one constituents had been detected simultaneously under two or three ionization modes. By comparing the total ion chromatograms and the chromatographic peaks of multistage mass spectra obtained under three different detection modes, together with the related references, it was found that there were 15 phlorphenone derivatives in the active site of DC and were confirmed to be the main constituents of the anti-avian influenza virus site of DC.

Key words: *Dryopteris Crassirhizoma*; anti-avian influenza virus(A/V); liquid chromatography - tandem mass spectrometry(HPLC - MSⁿ); phlorphenone derivatives

绵马贯众系鳞毛蕨科植物 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的根茎, 是中药贯众的主流品种, 具有清热解毒、驱虫、止血等功效, 现代研究表明, 绵马贯众具有抗肿瘤、抗疟、抗病毒等活性^[1]。本课题组利用鸡胚试验发现绵马贯众醇提物的正丁醇萃取物对禽流感 H₉N₂ 亚型病毒具有显著抑制作用^[2]。为探明绵马贯众抗禽流感病毒 (avian influenza virus, A/V) 活性部位的化学成分, 本文采用高效液相色谱 - 离子阱质谱, 对其活性部位——正丁醇萃取物进行了初步分析, 获得了该活性部位主要组分的相对分子质量信息, 并根据色谱组分的多级质谱推测间苯三酚类衍生物是其活性部位的主要成分, 为绵马贯众抗禽流感病毒药效成分的深入研究及绵马贯众药材的“色谱 - 质谱”指纹图谱的构建提供依据。

1 实验部分

1.1 试剂与样品

乙腈为色谱纯, 水为 MillQ 超纯水, 甲酸、石油醚 (60 ~ 90 沸程)、乙酸乙酯、正丁醇及体积分

收稿日期: 2007 - 09 - 03; 修回日期: 2007 - 09 - 18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772643)

第一作者: 陈建新 (1967 -), 男, 湖南祁东人, 副研究员, 博士研究生, Tel: 020 - 88257119, E - mail: jxchen@scau.edu.cn

数为 95% 的乙醇均为分析纯。绵马贯众药材由北京中医药大学中药学院高增平副研究员鉴定。

1.2 样品处理

将 50 g 绵马贯众粉碎成粗粉, 用 500 mL 体积分数为 50% 的乙醇水溶液分 3 次加热回流提取, 合并提取液, 减压旋蒸至膏状后用 100 mL 水溶解, 依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 3 次, 取对禽流感病毒有显著抑制活性的正丁醇萃取部位进行液相色谱 - 质谱分析。

1.3 仪器及实验条件

美国 Agilent 公司 1100 型液相色谱 - 离子阱质谱联用仪。色谱柱: XDB-C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm i. d., 3.5 μm); 二元梯度洗脱, A 相为乙腈, B 相为水, 均含 1% (体积分数) 甲酸; 梯度程序: 20% A 保持 2 min, 逐渐增加 A 比例, 至 50 min 时 A 为 100%, 保持 10 min; 流速: 0.5 mL/min; 进样量 20 μL。

质谱条件: ESI 离子源, 正、负离子模式检测; APC 离子源, 正离子模式检测; 雾化气 N₂, 压力 276 kPa; 干燥气 N₂, 流速 9 L/min; 质量扫描范围 100 ~ 1 000 u; 自动三级质谱 (自动选择最强离子进行源内诱导裂解)。

2 结果与讨论

2.1 不同电离方式得到的总离子流色谱及组分质谱比较

尽管色谱分离条件完全一致, 但不同电离模式得到的总离子流色谱 (见图 1) 及各色谱组分的质谱有显著差异。3 种电离检测模式得到的色谱峰数分别为: ESI(+) 共 52 个、ESI(-) 共 38 个、APCI(+) 共 20 个。ESI(-) 检测到的大部分组分在色谱图的后半段, 而 ESI(+) 检测到的组分在色谱图上的分布较均匀, 表明贯众活性部位组分较易在 ESI 电离源中捕获 H⁺ 及 Na⁺, 但极性较大组分在 ESI 电离源中不易失去质子; APCI(+) 检测到的组分较少, 表明大部分组分在 APCI 电离源中不能电离; APCI(-) 检测到的组分更少。大部分组分不能在 3 种电离模式下同时被检出, 表 1 比较了 3 种检测模式在同一保留时间检测到的一级质谱离子, 共有 8 个色谱组分能在 APCI(+), ESI(+) 和 ESI(-) 3 种电离模式下同时被检出, APCI(+) 和 ESI(+) 检测到的离子质量相同, 且与 ESI(-) 检测到的离子质量相差 2; 共有 7 个组分能在 APCI(+) 和 ESI(+) 2 种电离模式下同时检测到相同质量的离子, 共有 3 个组分能在 APCI(+) 和 ESI(-) 两种电离模式下同时检测到质量数相差 2 的离子。此外, ESI(+) 检测模式得到的色谱图中共有 7 个组分的一级质谱包含质量数相差 22 的离子对, 很可能是组分分子电离时生成了 H⁺ 和 Na⁺ 的加合离子。比较 3 种电离模式得到的色谱图及其质谱图, 推测绵马贯众活性部位至少含 21 种成分, 其相对分子质量见表 1。在 APCI(+) 检测模式下, 保留时间 37.5、39.6 和 41.9 min 的色谱组分均检测到 *m/z* 405 离子, 在 ESI(-) 检测模式下, 对应保留时间的色谱组分均检测到 *m/z* 403 离子, 而且它们具有相同的二级质谱图, 表明它们是同分异构体, 相对分子质量均为 404 u。此外, 相对分子质量为 418、612 u 的组分也存在同分异构体。

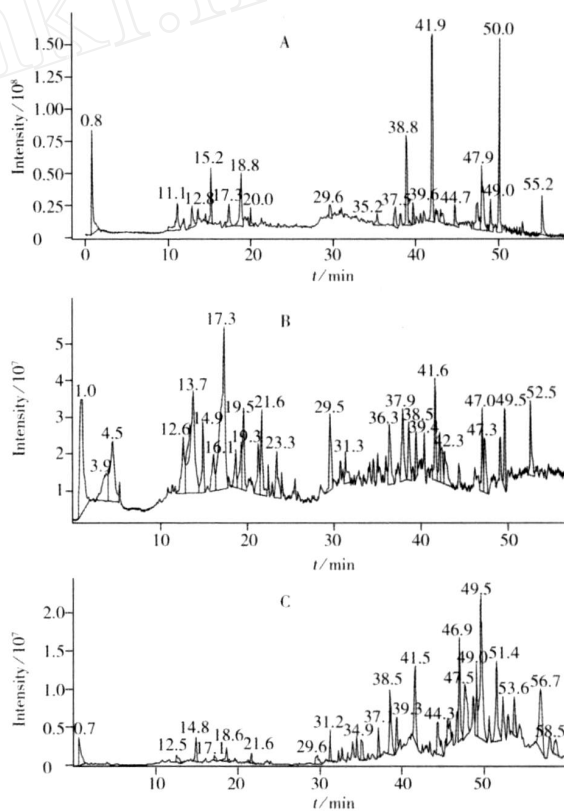


图 1 绵马贯众正丁醇萃取物在不同电离和检测模式下的总离子流色谱图

Fig. 1 TIC of *n*-butanol extract of *Dryopteris Crassirhizoma* (DC) under different ionization and detection modes
A. APCHMS(+); B. ESHMS(+); C. ESHMS(-)

表 1 2 种或 3 种电离模式能同时检测出的贯众提取物组分
Table 1 Results of HPLC - MS analysis in ESI/APCI ionization modes for DC extract

No	Retention time t_R /min	MS ¹ major ion m/z			M_r
		APCI(+)	ESI(+)	ESI(-)	
1	0.8 (APCI), 1.0 (ESI+)	266 ⁺ , 248	381, 266 ⁺ , 365		265
2	11.1 (APCI), 10.8 (ESI+)	355 ⁺	355 ⁺ , 377, 311		354
3	12.8 (APCI), 12.6 (ESI+)	453 ⁺ , 333, 373	453 ⁺ , 362, 340		452
4	15.2 (APCI), 14.9 (ESI+), 14.8 (ESI-)	349 ⁺ , 331	349 ⁺ , 371, 387	695, 347 ⁺	348
5	17.3 (APCI), 17.3 (ESI+)	453 ⁺ , 317, 306	475, 453 ⁺		453
6	18.8 (APCI), 18.6 (ESI+)	289 ⁺ , 435, 451	457, 597, 289 ⁺		288
7	29.6 (APCI), 29.5 (ESI+)	295 ⁺	353, 295 ⁺ , 277		294
8	31.3 (APCI), 31.2 (ESI-)	353, 311, 557 ⁺	555 ⁺		556
9	35.2 (APCI), 34.9 (ESI+), 34.9 (ESI-)	391 ⁺ , 451	355, 391 ⁺	389 ⁺ , 581	390
10	37.5 (APCI), 37.1 (ESI-)	405 ⁺		403 ⁺ , 375	404
11	38.8 (APCI), 38.5 (ESI+), 38.5 (ESI-)	419 ⁺	419 ⁺	417 ⁺	418
12	39.6 (APCI), 39.4 (ESI+), 39.3 (ESI-)	405 ⁺ , 295, 209	405 ⁺ , 295	403 ⁺	404
13	41.9 (APCI), 41.5 (ESI+), 41.5 (ESI-)	405 ⁺	405 ⁺ , 427, 419	403 ⁺	404
14	42.9 (APCI), 42.7 (ESI+)	413 ⁺	413 ⁺ , 453		412
15	44.7 (APCI), 44.3 (ESI+), 44.3 (ESI-)	419 ⁺	419 ⁺ , 377, 355	417 ⁺	418
16	47.3 (APCI), 47.0, 47.3 (ESI+), 46.6, 46.9 (ESI-)	463 ⁺ , 405, 613 ⁺	613 ⁺ , 585 ⁺ , 463 ⁺ , 485	583 ⁺ , 611 ⁺ , 585	462, 612, 584
17	47.9 (APCI), 47.5 (ESI-)	627 ⁺ , 419		625 ⁺	626
18	49.0 (APCI), 48.5 (ESI-)	599 ⁺		597 ⁺ , 611	598
19	50.0 (APCI), 49.5 (ESI+), 49.0, 49.5 (ESI-)	613 ⁺ , 405, 417	613 ⁺	639, 611 ⁺	612

* based ions for determining relative molecular mass of constituents(推测组分相对分子质量依据的离子)

2.2 多聚间苯三酚类衍生物的结构推测

已有的研究表明^[3-4]，多聚间苯三酚类衍生物在绵马属植物中分布广泛，是绵马属植物的标志成分。本实验利用 HPLC - ESI/APCI - MS 联用分析贯众活性部位，得到了活性部位的总离子流色谱图及各色谱组分的多级质谱图。在 ESI(+)和 APCI(+)的检测模式下，多个色谱组分的质谱包含 m/z 191、193、197、209、211、223、391、403、417、431 等间苯三酚衍生物的特征离子；在 ESI(-)的检测模式下，多个色谱组分的质谱包含 m/z 195、207、209、211、389、401、403、417、429 等间苯三酚衍生物的特征离子。在前人对绵马属植物中间苯三酚类衍生物化学结构的研究基础上^[5-6]，本文根据贯众活性部位色谱组分的质谱图对含有以上特征离子的组分进行结构推导，推测绵马贯众活性部位含有 15 种多聚间苯三酚类衍生物，其名称(相对分子质量)初步鉴定为：根皮吡喃酮 PB (348) (phbropyrone PB)、黄绵马酸 AA (390) (flavaspidic acid AA)、白绵马素 AA (404) (albaspidin AA)、绵马素 AA (404) (aspidin AA)、绵马素 AP (418) (aspidin AP)、黄绵马酸 AB (418) (flavaspidic acid AB)、绵马酸 ABA (598) (flicic acid ABA)、绵马根酸 ABA (612) (filixic acid ABA)、三环黄绵马酸 APB (612) (trisflavaspidic acid APB)、绵马酸 ABB (626) (flicic acid ABB)、绵马酸 PBP (640) (flicic acid BPB)、东北贯众素 ABAA (792) (dryocrassin ABAA)、东北贯众素 ABPP (820) (dryocrassin ABPP)、东北贯众素 ABBP (834) (dryocrassin ABBP)、东北贯众素 PBBP (848) (dryocrassin PBBP) 等。图 2A 是 ESI(-)检测模式下保留时间 46.9 min 色谱组分的一级质谱，B 和 C 分别是其二级和三级质谱；图 3A 是 APCI(+)检测模式下对应保留时间 (47.3 min) 色谱组分的一级质谱，B 和 C 分别是其二级和三级质谱。根据质谱推测该组分为三环黄绵马酸 APB (M_r = 612)，图 4 表示其在 APCI(+)检测模式下可能的质谱裂解途径。

3 种质谱检测模式均检测到贯众药效部位含有多种多聚间苯三酚衍生物。APCI(+)和 ESI(-)2 种检测模式得到的总离子流色谱中，含有多聚间苯三酚衍生物的组分峰面积分别占全部组分色谱峰面积的 61.6% 和 77.8%，表明多聚间苯三酚类衍生物是绵马贯众抗流感病毒活性部位的主要成分。

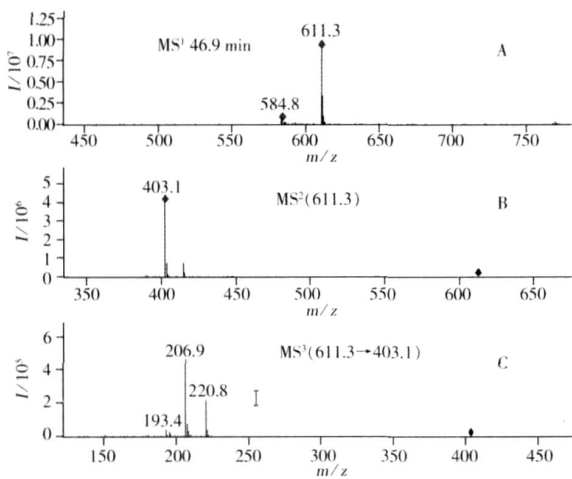


图2 三环黄绵马酸 APB 的 ESI(-)电离多级质谱图
Fig. 2 MSⁿ spectra of trisflavaspodic acid(APB) in ESI negative mode(A. MS¹; B. MS²; C. MS³)

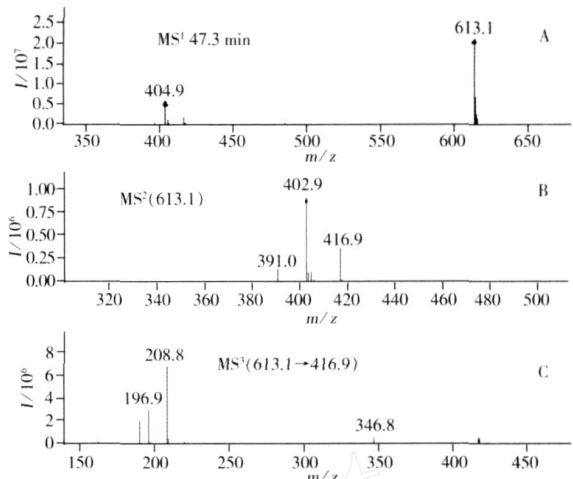


图3 三环黄绵马酸 APB 的 APCI(+)电离多级质谱图
Fig. 3 MSⁿ spectra of APB in APCI positive mode (A. MS¹; B. MS²; C. MS³)

3 结 论

在相同的色谱分离条件下，同时运用多种质谱电离模式(ESI/APCI(±))对绵马贯众抗病毒活性部位进行分析，利用不同检测模式下得到的[M + H]⁺、[M + Na]⁺及[M - H]⁻相互印证，可以较准确地推测出活性部位各组分的相对分子质量。

一般而言，仅凭质谱很难确定物质的结构。但由于天然产物常含有骨架结构相同的同系物，它们具有相同的质谱裂解规律，基于未知组分与已知组分质谱的异同，往往可以对未知组分的结构进行初步鉴定。本文利用 HPLC - MSⁿ 初步检测到绵马贯众抗病毒活性部位含有 15 种多聚间苯三酚类衍生物，其中根皮吡喃酮等 5 种在绵马属其它植物中含有，但在绵马贯众中未见报道。

参考文献：

[1] 蒋亚生, 杨宁. 贯众的药理研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(1): 17 - 18
[2] 陈建新, 曾振灵, 陈杖榴, 等. 一种抗流感和禽流感病毒的药物: 中国, 200610011341. 4[P/OL]. 2006 - 10 - 01.
[3] 吴寿金, 杨秀贤. 绵马贯众化学成分的研究. 绵马贯众中间苯三酚衍生物的质谱 - 质谱分析 [J]. 中草药, 1997, 28(12): 712 - 713
[4] 高增平, 陆蕴如, 江佩芬, 等. 绵马贯众部位的抗疟作用和急性毒性实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(2): 52 - 54
[5] KAPADIA G, TOKUDA H, KONOSHIMA T, et al. Anti-tumor promoting activity of dryopteris phlobaphenone derivatives [J]. Cancer Lett, 1996, 105(2): 161 - 165.
[6] JOHAN C, ROY C, REICHSTEIN T, et al. A survey of phenolic compounds in *Dryopteris* and related fern genera [J]. Ann Bot Fennici, 2001, 38(4): 99 - 138

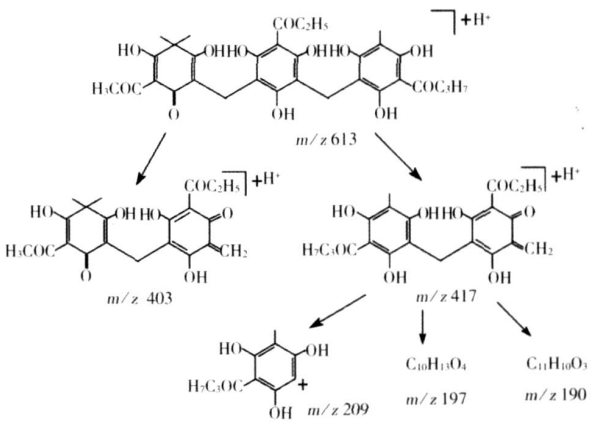


图 4 三环黄绵马酸 APB 在 APCI(+) 模式下的电离裂解途径

Fig. 4 Fragmentation scheme of APB in APCI positive mode