

LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 分析当归芍药散中化学成分

牛 研, 王书芳*

浙江大学药物信息研究所, 浙江 杭州 310058

摘要: 目的 对当归芍药散中化学成分进行研究。方法 采用液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(LC-Q-TOF-MS)和液相色谱-离子阱-质谱(LC-IT-MSⁿ)对当归芍药散 70%乙醇-水提取物进行分析, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈、Rapid Resolution HT (50 mm×4.6 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.05%甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱, 体积流量为 0.6 mL/min。结合 LC-Q-TOF-MS 提供的化合物准确相对分子质量和 LC-IT-MS 分析获得的化合物多级质谱信息, 对当归芍药散化学成分进行结构推测鉴定, 并对化合物的药材来源进行归属。结果 共鉴定了当归芍药散中 30 个成分, 其中 14 个为首次在当归芍药散中发现, 包括以绿原酸(8)和没食子酰蔗糖(5~7)为代表的 6 个有机酸及其苷类化合物, 以 16-氧化泽泻醇 A 23-乙酸酯(22)为代表的 2 个原萜烷型三萜类化合物, 以环四(异)亮氨酸(14)为代表的 4 个环肽类化合物以及 *N*-(1-deoxy-*D*-fructos-1-yl) pyroglutamic acid(1)和腺苷(3)等。结论 研究结果加深了对当归芍药散化学组成的理解, 为其药效物质基础研究及质量控制提供了一定的理论依据。

关键词: 当归芍药散; 液相色谱-四级杆-飞行时间质谱; 液相色谱-离子阱-质谱; 绿原酸; 16-氧化泽泻醇 A 23-乙酸酯

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)08-1056-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.08.004

Analysis on chemical constituents in Danggui-Shaoyao-San by LC-Q-TOF-MS and LC-IT-MSⁿ

NIU Yan, WANG Shu-fang

Pharmaceutical Informatics Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Objective To study the constituents in Danggui-Shaoyao-San (DSS, a powder prescription with *Angelicae Sinensis Radix*, *Paeoniae Radix Alba*, *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, *Poria*, *Alismatis Rhizome*, and *Chuanxiong Rhizome*). **Methods** To analyze the 70% ethanol-water extract from DDS by LC-Q-TOF-MS and LC-IT-MS. The analysis was performed on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column and Rapid Resolution HT column (50 mm × 4.6 mm, 1.8 μm) with gradient elution of 0.05% formic acid (A)-acetonitrile (B) at the flow rate of 0.6 mL/min. The constituents from DSS were identified according to the relative molecule weight by LC-Q-TOF-MS and multistage MS informatics by LC-IT-MS. All the peaks were assigned to the corresponding traditional Chinese medicinal materials. **Results** Thirty compounds from DDS could be identified, and 14 of them were identified for the first time in DSS including six organic acids, such as chlorogenic acid (8) and galloylsucrose (5-7); two protostane triterpenoids, such as 16-oxoalisol A 23-acetate (22); four cyclopeptides, such as cyclo tetraaleucyl (or isoleucyl) (14) and other types of compounds, such as *N*-(1-deoxy-*D*-fructos-1-yl) pyroglutamic acid (1) and adenosine (3). **Conclusion** This work investigates the compounds from DSS, and the results could provide the evidence for the research on active constituents and quality control of DSS.

Key words: Danggui-Shaoyao-San; LC-Q-TOF-MS; LC-IT-MSⁿ; chlorogenic acid; 16-oxoalisol A 23-acetate

当归芍药散出自《金匮要略》“妇人妊娠病脉证篇”和“妇人杂病脉证并治篇”, 用于治疗因肝脾不和导致的妇人妊娠腹痛和各种腹痛。全方由当归 *Angelicae Sinensis Radix*、白术 *Atractylodis*

Macrocephalae Rhizoma、白芍 *Paeoniae Radix Alba*、茯苓 *Poria*、泽泻 *Alismatis Rhizome* 和川芎 *Chuanxiong Rhizome* 6 味药组成。

目前, 国内外对当归芍药散的研究多为临床及

收稿日期: 2014-01-18

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项 (2011ZX09307-002-01)

作者简介: 牛 研 (1988—), 女, 硕士, 研究方向为方剂化学。Tel: 15167145060 E-mail: niuyan1026@163.com

*通信作者 王书芳 Tel: (0571)88208426 E-mail: wangsf@zju.edu.cn

药理方面研究^[1-4],而对于该方化学成分的研究主要为阿魏酸和芍药苷的定量测定^[5-7],Chen等^[8]和尚玮玮等^[9]采用液相色谱-离子阱-质谱(LC-IT-MSⁿ)法对当归芍药散中化学成分进行定性分析。

随着液质联用技术的发展,液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(LC-Q-TOF-MS)在中药成分分析中的应用越来越多。LC-Q-TOF-MS可给出化合物的准确相对分子质量及二级碎片信息,结合LC-IT-MS提供的化合物多级质谱信息,可以更准确地推测未知化合物的结构。因此,本研究采用LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MSⁿ方法,对当归芍药散中的化学成分进行了结构推测鉴定,共鉴定了30个成分,包括8个有机酸及其苷、6个单萜、8个三萜、4个环肽、2个苯肽及2个含氮化合物。其中14个化合物为当归芍药散成分研究文献中未报道的成分,包括*N*-(1-deoxy-*D*-fructos-1-yl) pyroglutamic acid (1)、柠檬酸(2)、腺苷(3)、没食子酰蔗糖及其同分异构体(5、6、7)、绿原酸(8)、隐绿原酸(9)、环四(异)亮氨酸(14)、环五(异)亮氨酸(16)、环六(异)亮氨酸(17)、环七(异)亮氨酸(19)、16-氧化泽泻醇A 23-乙酸酯(22)和16-氧化泽泻醇A 24-乙酸酯(25)。本研究对当归芍药散药效物质基础研究、质量控制及其临床用药具有一定的指导意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UPLC-Q-TOF-MS系统:AcquityTM ultra型高效液相(美国Waters公司);Triple TOF 5600⁺型飞行时间质谱,配有电喷雾离子源(美国AB SCIEX公司);LC-IT-MS系统:Agilent 1100型高效液相,配有自动进样器、柱温箱和光电二极管阵列检测器(PDA);Finnigan LCQ DECA XP^{Plus}质谱仪(Thermo Finnigan,美国),配有电喷雾离子源(IT);Eppendorf 5810R离心机(Eppendorf, German);Milli-Q(18.2i)超纯水处理系统(美国Millipore公司)。

无水乙醇(分析纯)购于浙江常青化工公司,乙腈(色谱纯)购于德国Merck公司,甲酸(色谱纯)购于(Tedia公司),试验用水为Milli-Q超纯水,柠檬酸(批号T20060119)购于国药集团化学试剂有限公司,没食子酸(批号F20090707)购于中国医药集团(上海)化学试剂公司,腺苷(批号101209)、绿原酸(批号130116)、隐绿原酸(批号130405)和*Z*-槲本内酯(批号110825)购于上海融禾公司,芍药苷(批号46600)购于阿拉丁试剂(上

海)有限公司,洋川芎内酯A(批号MUST-12071102)购自成都曼斯特公司。

本实验所采用的当归、川芎、茯苓、白芍、白术和泽泻6种药材购于浙江中医药大学饮片有限公司,经浙江大学药物信息学研究所陈柳蓉副教授鉴定。

1.2 对照品溶液的制备

分别取约1 mg腺苷、没食子酸、柠檬酸、绿原酸、隐绿原酸、芍药苷、洋川芎内酯A和*Z*-槲本内酯对照品,精密称定,用乙醇溶解,配制至质量浓度为1 mg/mL的对照品溶液。

1.3 样品溶液的制备

1.3.1 当归芍药散样品的制备 按《金匱要略》中当归芍药散的各药材配比称取当归14.0 g、白芍74.4 g、茯苓18.6 g、白术18.6 g、泽泻37.2 g和川芎37.2 g于2 L圆底烧瓶中。由于该方剂为散剂,即药材粉末直接入药,为能更全面提取其中成分,采用如下方法提取:加70%乙醇水浸泡过夜后,加热回流提取2次,每次1 h,第1次加6倍量70%乙醇-水(约1 200 mL),第2次加4倍量70%乙醇-水(约800 mL),合并2次提取液,纱布滤过,取滤液,减压浓缩至200 mL,取其中5 mL浓缩液转移至12 mL棕色样品瓶,冷冻干燥。称取干燥后浸膏10 mg,用水溶解,配制成质量浓度为10 mg/mL的样品溶液。

1.3.2 单味药材样品的制备 取当归、川芎、白芍、泽泻、茯苓和白术各10.0 g,按“1.3.1”项下方法制备,得到各单味药材样品溶液。

1.4 液相色谱分析条件

采用Zorbax SB-C₁₈, Rapid Resolution色谱柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm)(Agilent, 美国);流动相:0.05%甲酸水溶液(A)-乙腈(B);采用梯度洗脱:0~35 min, 3%~41% B; 35~40 min, 41%~100% B; 40~50 min, 100% B; 体积流量:0.6 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长为230、254、280和310 nm;进样量3 μL。

1.5 LC-Q-TOF-MS分析条件

正/负离子一级质谱(MS)条件:扫描检测,*m/z* 100~1 500,干燥气344.75 kPa,辅助加热气344.75 kPa,气帘气206.85 kPa,毛细管温度600/550 ℃,离子喷雾空载电压5 500 V/-4 500 V,去簇电压+/-100 V,碰撞能量+/-10 eV。

正/负离子二级质谱(MS²)条件:扫描检测,*m/z* 100~1 500,高灵敏度,去簇电压+/-100 V,碰撞能量+/-35 eV,碰撞能量幅度10.0,离子释放

延迟 67, 离子释放宽度 25。

1.6 LC-IT-MS 分析条件

正/负离子条件: 扫描检测, m/z 100~1 500, 离子源电压+4 kV/-3 kV, 毛细管电压+19 V/-15 V, 套管透镜补偿电压 25 V/-30 V, 毛细管温度 350 °C, 鞘气体积流量 60 L/min, 辅助气和吹扫气体积流量 20 L/min。多级质谱分析: 碰撞气为高纯氦气, 用 dependent scan 或 selected reaction monitoring (SRM) 扫描监测模式分析。应用 Thermo Finnigan Xcalibur 1.3 工作站对采集数据进行记录和处理。

2 结果与分析

2.1 LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 分析结果

按“1.4”项下色谱条件, 采用 LC-Q-TOF-MS

和 LC-IT-MSⁿ 技术对当归芍药散样品溶液进样分析, 正、负总离子流图见图 1。根据化合物准确相对分子质量、各化合物的碎片信息并参考相关文献数据及与对照品对照, 共鉴定了 30 个化合物, 具体结果见表 1。各化合物通过与药材 LC-IT-MSⁿ 图谱对照确定其来源归属。

2.2 有机酸及其苷类

已经鉴定的有机酸类化合物包括柠檬酸(2)、没食子酸(4)、绿原酸(8)、隐绿原酸(9)和香草酸(10)。上述化合物在负离子模式下, 准分子离子峰以 $[M-H]^-$ 形式存在, 在多级质谱中主要发生 CO_2 或 H_2O 分子的中性丢失形成 $[M-H-CO_2]^-$ 或 $[M-H-H_2O]^-$ 碎片离子, 通过与对照品对照, 确

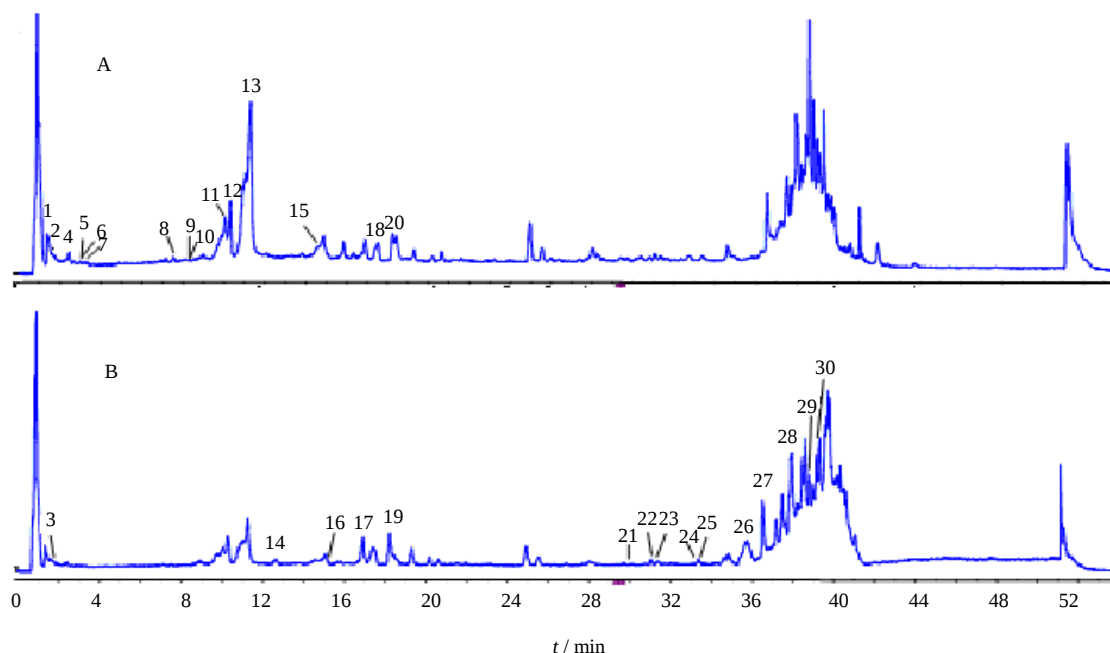


图1 当归芍药散的 LC-Q-TOF-MS 的负离子 (A) 和正离子 (B) 总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatogram of negative (A) and positive (B) of DSS LC-Q-TOF-MS

定 2 号峰为柠檬酸(2)、4 号峰为没食子酸(4)。

鉴定出的有机酸苷类化合物包括没食子酰蔗糖及其同分异构体(5~7), 在白芍中检测到。5~7 号峰出峰时间相近, 且 LC-Q-TOF-MS 分析显示其分子式相同, 推测为 3 个同分异构体。以 5 号峰为例, 在二级质谱中, 该化合物碎片离子中有一系列失去六碳糖基结构片段而形成的碎片离子, 如 m/z 433 $[M-H-60]^-$ 、 m/z 403 $[M-H-90]^-$ 、 m/z 331 $[M-H-162]^-$ 和 m/z 313 $[M-H-180]^-$ 。在三级质谱中, m/z 331 再失去一分子葡萄糖, 最后形成没食子酸母核。6 和 7 号峰裂解规律均与 5 号峰类似。在白芍药材中,

曾报道过 3 个该类化合物, 为 1'-O-没食子酰蔗糖、6'-O-没食子酰蔗糖和 6-O-没食子酰蔗糖^[10], 根据现有多级质谱信息无法确定苷元与糖链的连接位置, 因此 5、6 和 7 号峰均暂定为没食子酰蔗糖(5~7)。

8 号峰的准分子离子峰为 m/z 353 $[M-H]^-$, 在二级质谱中, 该母离子丢失 1 分子葡萄糖形成 m/z 191 的碎片离子, 然后再依次丢失 1 分子 H_2O 和 CO_2 形成 m/z 173 的碎片离子, 之后又失去 1 分子 CO_2 形成 m/z 127 的碎片。所得碎片信息与绿原酸对照品的碎片信息相同, 且保留时间相同, 最后确定为绿原酸(8)。9 号峰的裂解途径与 8 号峰相似, 但

表1 当归芍药散中鉴定化合物的LC-Q-TOF-MS及LC-IT-MSⁿ结果
Table 1 LC-Q-TOF-MS and LC-IT-MSⁿ results of identified compounds in DSS

编号	t _R / min	化合物	分子式	高分辨质谱 (m/z)	MS ² (相对丰度 / %)	MS ³ (相对丰度 / %)	药材来源
1 ^a	1.332	N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)pyroglutamic acid	C ₁₁ H ₁₇ NO ₈	290.088 5[M-H] ⁻	272(25), 200(100)	156(13), 129(12), 128(100)	All
2 ^{a*}	1.401	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	191.020 6[M-H] ⁻	173(25), 131(1), 129(2), 111(100), 87(2)		All
3 ^{a*}	1.977	腺苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.104 6[M+H] ⁺	250(1), 136(100)		DG, CX, BZ, FL, BS
4 [*]	2.382	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	169.015 2[M-H] ⁻	169(65), 125(100)	125(56), 81(100)	BS
5 ^a	2.976	没食子酰蔗糖苷	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	493.119 9[M-H] ⁻	433(1), 403(57), 331(33), 313(100), 283(29)	283(24), 241(8), 223(24), 169(100), 125(13)	BS
6 ^a	3.155	没食子酰蔗糖苷	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	493.120 0[M-H] ⁻	475(1), 331(12), 313(100), 271(42), 169(15)	225(15), 223(21), 169(100), 146(4), 125(12),	BS
7 ^a	3.329	没食子酰蔗糖苷	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	493.120 1[M-H] ⁻	331(2), 313(100), 223(2), 179(2), 169(4)	241(36), 223(85), 169(100), 153(22), 151(62)	BS
8 ^{a*}	7.567	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8[M-H] ⁻	191(100), 179(5), 173(2), 135(3)	191(23), 173(71), 171(21), 127(96), 111(55), 93(65), 87(26), 85(100)	BZ, CX, DG
9 ^{a*}	8.110	隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 7[M-H] ⁻	324(81), 317(35), 295(99), 179(89), 173(100)		BZ, CX, DG
10	8.283	香草酸	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	167.035 7[M-H] ⁻	167(10), 123(100)		DG
11 [#]	10.077	isomaltopaeoniflorin	C ₃₀ H ₄₀ O ₁₈	687.213 2 [M+H-HCOOH] ⁻	641(18), 611(46), 593(100), 489(18), 471(14), 323(8), 121(11)		BS
12 [#]	10.325	芍药内酯苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.162 0 [M+H-HCOOH] ⁻	479(100), 357(8), 283(12), 121(67)		BS
13 ^{*#}	11.288	芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.161 9 [M+H-HCOOH] ⁻	479(23), 449(100), 431(13), 327(63), 165(12), 121(63)		BS
14 ^a	12.645	环四(异)亮氨酸	C ₂₄ H ₄₄ N ₄ O ₄	453.343 5[M+H] ⁺	453(2), 435(100), 341(3), 340(4), 322(27), 228(3), 209(4)		All
15	14.876	没食子酰芍药苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.168 3[M-H] ⁻	613(100), 509(13), 491(24), 465(27), 399(14), 313(9), 271(27)		BS
16 ^a	15.073	环五(异)亮氨酸	C ₃₀ H ₅₅ N ₅ O ₅	566.428 6[M+H] ⁺	566(14), 548(100), 547(2), 453(5), 435(39), 322(13), 209(2)		DG, CX, FL, ZX, BZ
17 ^a	16.909	环六(异)亮氨酸	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	679.512 7[M+H] ⁺	679(100), 566(3), 435(3), 322(1)		All
18 [#]	17.519	牡丹皮苷 I	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.162 1 [M+H-HCOOH] ⁻	479(100), 357(10), 283(13), 121(67)		BS
19 ^a	18.244	环七(异)亮氨酸	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	792.596 8[M+H] ⁺	792(12), 775(3), 774(100), 679(4), 661(36), 548(13), 435(13), 322(6)		BS, CX, BZ, FL, ZX

续表 1

编号	t_R / min	化合物	分子式	高分辨质谱 (m/z)	MS^2 (相对丰度 / %)	MS^3 (相对丰度 / %)	药材来源
20	18.440	芍药新苷	$C_{23}H_{26}O_{10}$	507.151 7 $[M+H]^+$	461(100), 431(3), 339(87), HCOOH ⁻ 283(5), 179(2), 177(13)		BS
21 [#]	30.042	16-氧化泽泻醇 A	$C_{30}H_{48}O_6$	505.352 5 $[M+H]^+$	487(10), 469(19), 415(100), 397(11), 353(6)		ZX
22 ^{a, #}	31.041	16-氧化泽泻醇 A23-乙 酸酯	$C_{32}H_{50}O_7$	547.363 6 $[M+H]^+$	547(100), 469(65), 451(65)		ZX
23 [#]	31.770	泽泻醇 C23-乙酸酯 或其异构体	$C_{32}H_{48}O_6$	529.352 4 $[M+H]^+$	511(32), 451(100), 433(57), 397(23), 381(12), 353(8)		ZX
24 [#]	33.360	泽泻醇 C23-乙酸酯 或其异构体	$C_{32}H_{48}O_6$	529.353 0 $[M+H]^+$	511(67), 451(55), 433(100), 397(50), 353(15)		ZX
25 ^{a, #}	33.362	16-氧化泽泻醇 A24-乙 酸酯	$C_{32}H_{50}O_7$	547.363 3 $[M+H]^+$	529(65), 469(33), 451(100), 433(15), 415(57)		ZX
26 [*]	35.787	洋川芎内酯 A	$C_{12}H_{16}O_2$	193.122 3 $[M+H]^+$	147(100)	119(65), 105(100), 91 (35), 81(6), 67(7)	DG, CX
27 [#]	36.515	泽泻醇 C	$C_{30}H_{46}O_5$	487.342 3 $[M+H]^+$	469(11), 451(28), 397(100), 353(10)		ZX
28 [*]	37.915	Z-藁本内酯	$C_{12}H_{14}O_2$	191.106 9 $[M+H]^+$	191(100), 173(84), 163(25), 149(10), 145(45), 117(8), 105(7), 91(5)	155(2), 145(100), 143 (1), 131(3)	DG, CX
29 [#]	38.599	泽泻醇 B	$C_{30}H_{48}O_4$	473.362 9 $[M+H]^+$	455(19), 473(13), 383(81), 365(100), 339(50), 219(46), 121(26)		ZX
30 [#]	39.042	泽泻醇 B23-乙酸酯	$C_{32}H_{50}O_5$	515.373 5 $[M+H]^+$	515(55), 383(73), 365(100), 339(78)		ZX

*代表与对照品比照鉴定; ^a为首次在当归芍药散中发现; [#]为 LC-Q-TOF-MS 碎片, 二级能量为 (35±10) V; All=全部, DG=当归, CX=川芎, BZ=白术, FL=茯苓, BS=白芍, ZX=泽泻

*compared with reference compounds; ^aidentified for the first time in DSS; [#]LC-Q-TOF-MS fragments, collision energy (35±10) V; DG = *Angelicae Sinensis Radix*, CX = *Chuanxiong Rhizome*, BZ = *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*, FL = *Poria*, BS = *Paeoniae Radix Alba*, ZX = *Alismatis Rhizome*

其二级质谱中 m/z 173 $[M-162-H_2O]^+$ 的碎片离子丰度高于 m/z 191 $[M-162]^+$ 的碎片离子, 通过与对照品对照, 确定 9 号峰为隐绿原酸 (9)。

2.3 蒽烷型单萜苷类

当归芍药散中共鉴定了 6 个蒽烷型单萜苷类化合物, 包括 isomaltopaeoniflorin (11)、芍药内酯苷 (12)、芍药苷 (13)、没食子酰芍药苷 (15) 和牡丹皮苷 I (18), 是白芍的特征成分。该类化合物在负离子模式下主要以 $[M-H+HCOOH]^+$ 形式存在, 少数以 $[M-H]^+$ 形式存在。在二级质谱中, 母离子 $[M-H+HCOOH]^+$ 易失去 1 分子苯甲酸 (BA) 而形成 $[M-H-122]^+$ 和 m/z 121 $[BA-H]^+$ 的特征离子。13 号峰在负离子模式下形成 m/z 525 $[M-H+HCOOH]^+$ 的准分子离子峰, m/z 449 为该化合物失去葡萄糖 6 位上的 1 分子 HCHO 形成, 接着, 该离子再失去 1

分子苯甲酸形成 m/z 327 碎片离子, 之后再继续失去葡萄糖残基和甲基自由基形成 m/z 165 碎片离子。最后通过与对照品比较确定该化合物为芍药苷 (13)。

12 和 18 号峰两化合物分子式相同, 为一对同分异构体, 初步推测为芍药内酯苷和牡丹皮苷 I。两化合物碎片类似, 最后与文献对照^[8], 推测 12 号峰为芍药内酯苷 (12), 18 号峰为牡丹皮苷 I (18)。

2.4 原萜烷型三萜类

已鉴定的此类化合物共 8 个, 包括 16-氧化泽泻醇 A (21)、16-氧化泽泻醇 A 23-乙酸酯 (22)、泽泻醇 C 23-乙酸酯或其异构体 (23、24)、16-氧化泽泻醇 A 24-乙酸酯 (25)、泽泻醇 C (27)、泽泻醇 B (29) 和泽泻醇 B 23-乙酸酯 (30), 是泽泻的主要成分。泽泻醇类化合物在正离子模式下形成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰。在二级质谱中, 准分子离子

峰易失去 1 分子水而形成 $[M+H-H_2O]^+$ 的碎片离子。另外一条途径, 准分子离子通过 C-23 和 C-24 之间的重排而断裂 $C_{23}-C_{24}$ 形成碎片离子。如 29 号峰在二级质谱中分别失去 1 分子和 2 分子水得到 m/z 487 和 m/z 469 的离子。而丰度最高的 m/z 415 峰则是由 C-23 和 C-24 之间的重排后失去 $C_4H_{10}O_2$ 形成的, 最后参考文献报道^[11]推测该化合物为泽泻醇 B (29)。

乙酰化是原萜烷类三萜化合物常见的生物合成途径。大多数原萜烷类三萜化合物都有其乙酰化衍生物。而乙酰化经常发生在 23-OH 或 24-OH。16-氧化泽泻醇 A 23-乙酸酯 (22) 和 16-氧化泽泻醇 A 24-乙酸酯 (25) 为 1 对同分异构体, 在正离子模式下, 这对同分异构体的裂解碎片除 m/z 415 $[M+H-C_6H_{12}O_3]^+$ 外几乎相同, 25 号峰 m/z 415 离子丰度为 57%, 而 22 号峰则无此碎片离子, 这是由于 16-氧化泽泻醇 A 24-乙酸酯 (25) 容易发生 C-23 和 C-24 之间的 H 重排失去 $C_6H_{12}O_3$ 生成 m/z 415 的碎片, 而 16-氧化泽泻醇 A 23-乙酸酯 (22) 则不易失去 $C_6H_{12}O_3$ ^[11]。由此推测 22 号峰为 16-氧化泽泻醇 A 23-乙酸酯 (22), 25 号峰为 16-氧化泽泻醇 A 24-乙酸酯 (25)。

2.5 苯酞类

已鉴定的此类化合物包括洋川芎内酯 A (26) 和 Z-藁本内酯 (28), 是川芎和当归的主要成分。该类化合物在二级质谱中易形成丢失水和烷基链的碎片离子。28 号峰在正离子模式下形成 m/z 191 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 在二级质谱中它分别失去 1 分子水和 2 分子水形成 m/z 173 和 m/z 155 的碎片离子; 准分子离子 m/z 191 分别失去 1 分子 CO 和烷基链生成碎片离子 m/z 163 和 m/z 149; 而 m/z 117、 m/z 105 和 m/z 91 等碎片离子则是由 m/z 191 离子失去 1 分子水和 CO 后再断裂碳链形成的。最后通过与对照品比较将此化合物确定为 Z-藁本内酯 (28)。

2.6 环肽类

已鉴定的此类化合物包括环四(异)亮氨酸 (14)、环五(异)亮氨酸 (16)、环六(异)亮氨酸 (17) 和环七(异)亮氨酸 (19), 这类化合物在当归芍药散各组方药材中均有检测到。其质谱裂解特征为: 在一级质谱中形成 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰; 在二级质谱中, 该准分子离子失去 1 分子水形成 $[M+H-H_2O]^+$ 的碎片离子, 接着, 该碎片离子依次失去亮氨酸或异亮氨酸的结构单元 (相对分子质量为 113)。按此规律, 推测 14、16、17 和 20 号峰分别为环四(异)亮氨酸 (14)、环五(异)亮氨酸 (16)、环六(异)

亮氨酸 (17) 和环七(异)亮氨酸 (20)。

2.7 其他类

1 号峰在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 290 $[M-H]^-$, 在二级质谱中, 该离子失去糖基结构片段, 形成基峰离子 m/z 200 $[M-H-90]^-$ 。在三级质谱中, 母离子完全失去糖基碎片, 形成 m/z 128 $[M-H-162]^-$ 的碎片离子。结合 LC-Q-TOF-MS 给出的精确相对分子质量, 推测该化合物为 N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) pyroglutamic acid (1)。

3 号峰在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 268 $[M+H]^+$ 。在二级质谱中, 该准分子离子峰失去 1 分子水形成 m/z 250 $[M+H-H_2O]^+$ 的离子, 而 m/z 136 的离子则是由 m/z 268 失去 1 分子五碳糖形成的。最后根据精确相对分子质量及与对照品对照, 确定该峰为腺苷 (3)。

3 结论

本实验采用 LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 法鉴定出当归芍药散中 30 个成分, 其中 14 个为在当归芍药散中首次报道。研究结果表明, LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 法可以简便、快速地对方剂中化学成分进行定性研究。本实验结果可以为当归芍药散的药效物质基础及质量控制研究提供一定的理论依据。

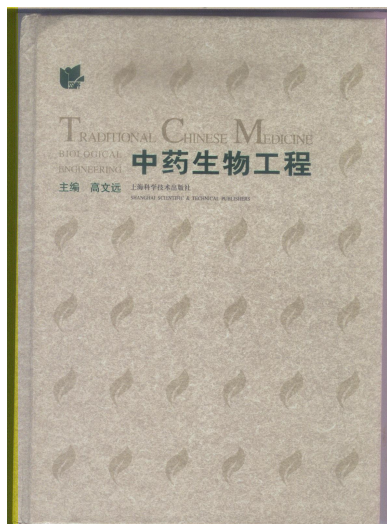
参考文献

- [1] Hu Z Y, Liu G, Cheng X R, et al. JD-30, an active fraction extracted from Danggui-Shaoyao-San, decreases beta-amyloid content and deposition, improves LTP reduction and prevents spatial cognition impairment in SAMP8 mice [J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(1): 14-22.
- [2] Hu Z Y, Liu G, Yuan H, et al. Danggui-Shaoyao-San and its active fraction JD-30 improve A beta-induced spatial recognition deficits in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 365-372.
- [3] Hu Z Y, Yuan H, Huang Y, et al. Danggui-Shaoyao-San improves learning and memory in SAMP8 [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34: 105.
- [4] Lan Z, Liu J P, Chen L Y, et al. Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress-related neuronal apoptosis in D-galactose-induced senescent mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(1): 386-395.
- [5] 罗兰, 曾宇, 王晓静. 气相色谱法测定当归芍药散挥发油中藁本内酯的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 110-112.
- [6] 宋欣, 陶春蕾, 孟广东, 等. 高效液相-二极管阵列法检测当归芍药散中主要化学成分 [J]. *安徽中医学院学*

- 报, 2012, 31(1): 65-68.
- [7] 贺晓艳, 宋秋月, 郑 丹, 等. HPLC 法测定当归芍药散中芍药苷、白芍苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 的含量 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(7): 36-39.
- [8] Chen L L, Qi J, Chang Y X, *et al.* Identification and determination of the major constituents in Traditional Chinese Medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(2): 127-137.
- [9] 尚玮玮, 郭继芬, 乔善义. HPLC/DAD-MS 法分析当归芍药散中的主要成分 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(增刊): 59-60.
- [10] Tanaka T, Kataoka M, Tsuboi N, *et al.* New monoterpene glycoside esters and phenolic constituents of paeoniae radix, and increase of water solubility of proanthocyanidins in the presence of paeoniflorin [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(2): 201-207.
- [11] Liu X, Li S L, Zhou Y, *et al.* Characterization of protostane triterpenoids in *Alisma orientalis* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24(11): 1514-1522

• 书讯 •

《中药生物工程》出版



由高文远主编的《中药生物工程》一书日前由上海科学技术出版社出版面世。该书为一部系统论述中药生物工程的创新性学术专著, 分别从组织和细胞培养、反应器工程、发酵工程、基因工程和分子标记技术 5 个方面详细论述了各种中药生物工程技术的基本概念、操作要求、发展现状以及在中药资源开发和保护方面的应用前景, 介绍的大量技术具有重要的实用价值。

中药生物工程是个新兴的领域, 是现代生物工程技术在中药领域的应用, 是解决中药资源紧缺问题的重要途径。该书作者作为该领域的先行者, 在书中融入了其多年的原创性研究实践和思考。该书内容新颖, 方法先进, 图文并茂, 反映了该领域的国际前沿动态。对从事中药生物工程研究与应用的人员有参考价值, 也可供从事生物学、植物学和天然产物专业的科研人员参考和使用。