

野苏麻中 5 个特征二萜成分裂解规律研究

杨雅欣, 叶江海, 邓 锐, 张敬杰*

贵阳中医学院 贵州省苗医药重点实验室, 贵州 贵阳 550025

摘要:目的 对野苏麻 *Isodon coetsa* 中分离得到的 5 个 7,20-环氧对映-贝壳杉烷二萜化合物(细锥香茶菜乙素、大锥香茶菜乙素、细锥香茶菜甲素、紫毛香茶菜 N 和大锥香茶菜甲素)质谱裂解规律进行初步研究。方法 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF-MS²)技术,通过比较 5 个单体化合物质谱图谱,根据其二级质谱裂解碎片推测裂解过程。结果 负离子模式下,高质量区,该类二萜化合物以连续丢掉 C-1、7 位上取代基及 C-20 位氧桥为主,且根据 C-1 位取代基不同,断裂顺序有所区别;中低质量区的碎片离子信息提示断裂顺序为 A 环到 B 环再到 C 环。结论 该质谱裂解规律可为 7,20-环氧对映-贝壳杉烷二萜化合物结构鉴定提供实验依据。

关键词:野苏麻; 7,20-环氧对映-贝壳杉烷二萜化合物; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱; 裂解途径; 细锥香茶菜乙素; 大锥香茶菜乙素; 细锥香茶菜甲素; 紫毛香茶菜 N; 大锥香茶菜甲素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)17-3493-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.007

Fragmentation pathways of five characteristic diterpenoid compounds in *Isodon coetsa*

YANG Ya-xin, YE Jiang-hai, DENG Rui, ZHANG Jing-jie

Guiyang College of Chinese Medicine, Guizhou Provincial Key Laboratory of Miao Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To study the fragmentation pathways of five 7,20-cyclo-*ent*-kaurane diterpenoid compounds (rabdocoetsin B, megathyrin B, rabdocoetsin A, enanderianin N, and megathyrin A) in *Isodon coetsa*. **Methods** The samples were analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS²). According to the fragment in MS² of five compounds, the possible fragmentation pathways of these diterpenoid compounds were inducted. **Results** In negative mode, the typical fragmentation pathways of these compounds in high-quality areas were mainly loss of substituents on C-1, C-7, and the oxygen bridge on C-20. The fragmentation pathways were different as a result of the difference of the substituents on C-1. The fragment, which in medium and low quality areas, suggested that fracture order of these compounds were A ring to B and then to C ring. **Conclusion** The study on fragmentation pathways contributed to the structural identification of 7,20-cyclo-*ent*-kaurane diterpenoid compounds.

Key words: *Isodon coetsa* (Buch. -Ham. ex D. Don) Kudô; 7,20-cyclo-*ent*-kaurane diterpenoid compounds; UHPLC-Q-TOF-MS²; fragmentation pathways; rabdocoetsin B; megathyrin B; rabdocoetsin A; enanderianin N; megathyrin A

民族药野苏麻为唇形科香茶菜属植物细锥香茶菜 *Isodon coetsa* (Buch. -Ham. ex D. Don) Kudô^[1], 主要分布于我国西南部的贵州、云南、西藏、四川和广西等省份^[2]。《新华本草纲要》记载该植物味苦辛, 性微温, 具有解表散寒、除风温的功效^[3]。在民间, 老中医用野苏麻根和叶配伍治疗肝炎、萎缩性胃炎及各种肿瘤, 得到了广泛的应用。研究表明^[4],

野苏麻全草中含有多种二萜类化合物及三萜类的熊果酸、齐墩果酸等化合物; 二萜类成分主要以 7,20-环氧对映-贝壳杉烷(7,20-cyclo-*ent*-kaurane)类为主; 且具有显著的抗肿瘤、抗菌作用^[5], 是野苏麻特征及药效成分。

本实验对分离得到的 5 个特征二萜成分进行质谱研究, 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质

收稿日期: 2017-05-25

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题([2015]Z59号); 贵中医科学院内科研项目([2015]45号)

作者简介: 杨雅欣(1990—), 女, 助教, 主要从事民族药化学与质量评价研究。E-mail: xixihe426@163.com

*通信作者 张敬杰(1971—), 女, 教授, 主要从事民族药资源与化学研究。Tel: (0851) 88305056 E-mail: 374037510@qq.com

谱 (UHPLC-Q-TOF-MS²) 联用技术, 既能发挥 UHPLC 的超高分离速度、超高分离度和超高灵敏度的特点, 也充分利用 Q-TOF/MS 在结构研究中的优势, 因而可以在复杂的样品中提取出高专属性成分进行定性或定量分析^[6-8]。通过精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片信息确定分子式及分子结构, 进而推测出可能的质谱裂解规律^[9-10]。目前, 未见国内外对野苏麻中特征二萜类成分质谱裂解规律进行分析研究总结。因而本实验拟采用 UHPLC-Q-TOF-MS² 对野苏麻中 5 个特征二萜成分 (细锥香茶菜乙素、大锥香茶菜乙素、细锥香茶菜甲素、紫毛香茶菜 N 和大锥香茶菜甲素, 结构见图 1

和表 1) 质谱裂解规律进行初步探讨, 为 7,20-环氧对映-贝壳杉烷二萜化合物的快速定性和定量鉴别提供实验依据。

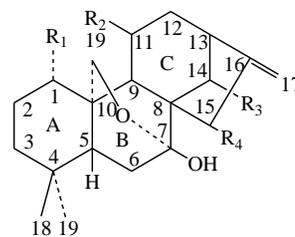


图 1 野苏麻中特征二萜类化合物的母核结构

Fig. 1 Nucleus structure of charatermatic diterpenoid compounds in *Isodon coetsa*

表 1 野苏麻中 5 种特征二萜类化合物的结构

Table 1 Structures of charatermatic diterpenoid compounds in *I. coetsa*

化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	分子式	相对分子质量	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)
细锥香茶菜乙素	OAc	H	OH	=O	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	390.204 2	389.198 2
大锥香茶菜乙素	OH	OH	H	OH	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	350.209 3	349.204 9
细锥香茶菜甲素	OH	OH	H	=O	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	348.193 7	347.187 5
紫毛香茶菜 N	OAc	H	OH	=O	C ₂₂ H ₃₂ O ₆	392.219 9	391.213 0
大锥香茶菜甲素	OH	OAc	H	=O	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	348.193 7	347.187 2

1 仪器与试剂

Thermo U3000 超高效液相色谱仪 (美国 Thermo 公司), 配备二元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器以及在线分析软件等; Bruker Compact 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 色谱甲醇 (美国 Fisher 公司); 纯净水 (中国娃哈哈有限公司)。

野苏麻药材 2013 年 5 月采自贵州省开阳县, 经贵阳中医学院赵俊华教授鉴定为唇形科香茶菜属植物细锥香茶菜 *Isodon coetsa* (Buch. -Ham. ex D. Don) Kudô。研究用细锥香茶菜乙素、大锥香茶菜乙素、细锥香茶菜甲素、紫毛香茶菜 N 和大锥香茶菜甲素样品均为实验室前期对该批野苏麻进行化学成分分离而得, 经 HPLC 测定质量分数均为 95%。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

取细锥香茶菜乙素、大锥香茶菜乙素、细锥香茶菜甲素、紫毛香茶菜 N 和大锥香茶菜甲素样品适量, 分别用甲醇溶解配制成质量浓度为 20 μg/mL 的 5 份样品溶液。

2.2 UHPLC-Q-TOF-MS² 实验条件

2.2.1 色谱条件 Thermo U3000 超高效液相色谱系统 (美国 Thermo 公司): 色谱柱为 Agilent Eclipse

Plus C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 1.7 μm); 流动相为水 (A)-甲醇 (B) 溶液系统, 梯度洗脱: 0~15 min, 5%~100% B; 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温 30 °C, 进样体积为 2 μL。

2.2.2 质谱条件 Bruker Compact 四级杆-飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司), 离子源为 ESI 源, 雾化气和干燥气均为 N₂, 碰撞气为 He。采集模式为负离子模式, 毛细管电压为 2 800 V, 雾化气压力为 200 kPa, 体积流量 6.0 g/L, 温度为 200 °C, 一级质谱扫描范围 *m/z* 50~1 000。二级质谱实验采用 CID 碰撞的方式, CID 碰撞能量均为 28.0 eV。

3 特征二萜成分质谱裂解规律

在负离子模式, 对 5 个特征二萜成分质谱裂解规律进行总结, 野苏麻中 5 个特征二萜成分的主要碎片离子归纳见表 2。通过实验发现, 5 个化合物由于 C-1 位上取代基不同, 造成质谱裂解途径呈现区别。因此分别以 C-1 位-OH 取代的大锥香茶菜乙素及-OAc 取代的紫毛香茶菜 N 为例, 进行质谱裂解规律阐释。

3.1 紫毛香茶菜 N

分子离子峰 *m/z* 391.213 0。如图 2 所示, 碎片离子 *m/z* 331.198 8, 提示首先失去 C-1 位-OAc 基团;

表 2 5 种特征二萜成分的主要碎片离子

Table 2 Main fragment ions of characteristic diterpenoid compounds

成分	高质量区						中、低质量区
	[M-H] ⁻	[M-H-OAc] ⁻	[M-H-OAc-OH] ⁻	[M-H-OAc-OH-CH ₂] ⁻	[M-H-OH-CH ₂ O] ⁻	[M-H-OH-CH ₂ O-OH] ⁻	
细锥香茶菜乙素	389.198 2	329.176 1	311.163 9	299.165 0			239.132 7, 175.074 6
大锥香茶菜乙素	349.204 9				301.178 2	283.174 2	245.113 7, 199.118 5
细锥香茶菜甲素	347.187 5				299.160 2	281.174 0	255.174 6, 199.114 1
紫毛香茶菜 N	391.213 0	331.198 8	313.180 4	283.164 9			255.174 6, 177.093 6
大锥香茶菜甲素	347.187 2				299.161 5	281.173 5	255.173 2, 199.110 6

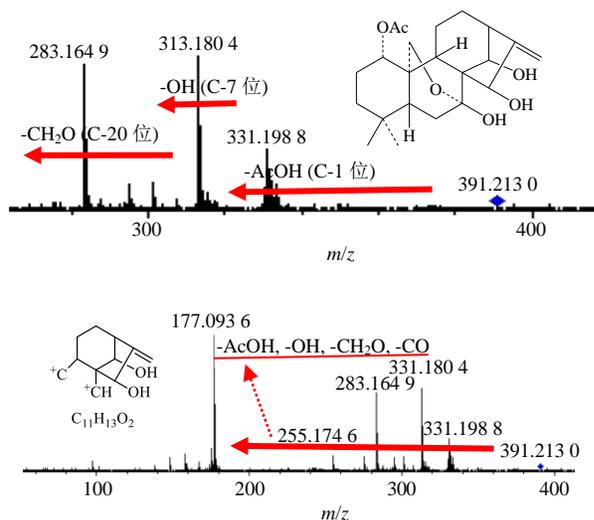


图 2 紫毛香茶菜 N 的 MS² 质谱图
Fig. 2 MS² spectra of enanderianin N

离子强度最高的碎片离子 m/z 313.180 4 与 m/z 331.198 8 的碎片间相差 18 质量数, 提示继续失去 1 分子水; 碎片离子 m/z 283.164 9 与 m/z 313.180 4 质量数相差 30, 提示该碎片离子是由 m/z 313.180 4 的碎片失去 $-CH_2O$ 基团而得, 即发生了 C-20 位氧桥的断裂; 因此, 可以推知, 上一步裂解失去的 1 个水分子应为 C-7 位上的 $-OH$; 中质量区, m/z 255.174 6 的碎片与 m/z 283.164 9 的碎片质量数相差 28, 提示可能是丢失结构中的 $-CO$ 片段^[11]; 低质量区的 m/z 177.093 6 碎片离子, 分子式为 $C_{11}H_{13}O_2$, 推断为 C 环片段, 因此, 推断断裂顺序应该为 A 环、B 环再到 C 环。

3.2 大锥香茶菜乙素

分子离子峰 m/z 349.204 9。如图 3 所示, 碎片离子 m/z 301.178 2 与分子离子峰质量数相差 48, 根据紫毛香茶菜 N 的质谱裂解规律, 提示可能首先失去 C-1 位 $-OH$, 后又继续断裂 C-20 位氧桥结构; 接

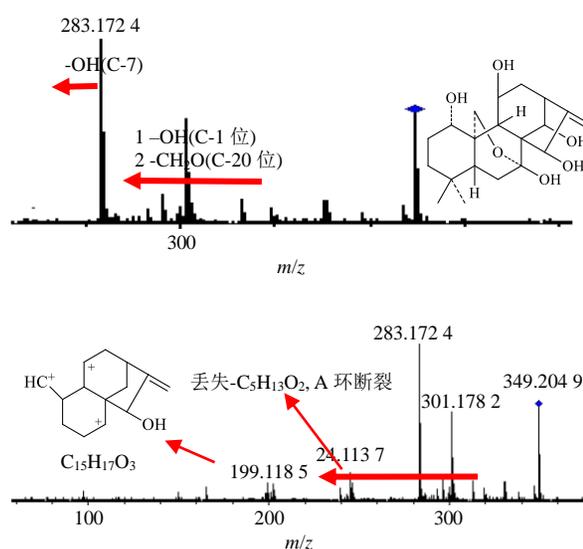


图 3 大锥香茶菜乙素的 MS² 质谱图
Fig. 3 MS² spectra of megathgrin B

着, 离子强度最高的碎片离子 m/z 283.172 4 与 m/z 301.178 2 的碎片离子质量数相差 18, 推知继续失去 C-7 位 $-OH$; 中质量区, 碎片离子 m/z 245.113 7, 分子式为 $C_{15}H_{17}O_3$, 因含有 3 个 O 原子, 说明该碎片离子是断裂 C-1 位 $-OH$ 及 C-20 位上氧桥后, 再断裂 A 环所得; 低质量区, 碎片离子 m/z 199.118 5, 分子式 $C_{14}H_{15}O$, 推断为 B、C 环片段, 这之前推导的化合物紫毛香茶菜 N 先 A 环, 再 B 环, 最后 C 环的裂解顺序相符合。也进一步证实了该推断的可能性。

通过对比 C-1 位以 $-OAc$ 取代的 2 个化合物(细锥香茶菜乙素和紫毛香茶菜 N) 以及以 $-OH$ 取代的 3 个化合物(大锥香茶菜乙素、细锥香茶菜甲素和大锥香茶菜甲素) 碎片裂解方式, 发现在高质量区, 若 C-1 位 $-OAc$ 取代, 常出现的碎片离子质量数比分子离子峰质量数少 60, 即首先发生 C-1 位 $-OAc$ 断

裂;接着,会连续出现断裂 C-7 位上-OH 及 C-20 氧桥的过程,碎片离子峰强度较大;若 C-1 位-OH 取代,常出现的碎片离子质量数比分子离子峰质量数少 48,即首先发生 C-1 位断裂-OH 及 C-20 氧桥的过程,接着,再继续断裂 C-7 位上-OH。在中、低质量区,由于碎片离子信息不够丰富,只能由已知的碎片信息,推测出该类二萜成分的断裂顺序为 A 环到 B 环,最后到 C 环。

4 讨论

本实验采用 UHPLC-Q-TOF-MS² 技术,对野苏麻中 5 个特征性二萜成分进行了质谱裂解初步探究,通过高分辨质谱得到分子离子和碎片离子的准确质荷比及精准的化学分子式,利用实验数据并结合文献,初步解析了 5 个化合物的质谱裂解规律:以 C-1 位上取代基的不同,在高质量区,可以将 5 个化合物分为不同的 2 种质谱裂解途径,且通过中、低质量区的碎片离子信息,为野苏麻中未知的二萜化合物的结构推导提供实验依据。

参考文献

- [1] 中国科学院北京植物研究所. 中国高等植物图鉴 [M]. 北京: 科学出版社, 1974.
- [2] 陈一平, 孙汉董, 林中文. 细椎香茶菜二萜的研究 [J]. 植物学报, 1990, 32(4): 292-296.
- [3] 吴征镒. 新华本草纲要 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
- [4] 何可群, 李相兴. 民族药细椎香茶菜中总黄酮含量的测定 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(2): 421-422.
- [5] 陈林娇, 李植华, 赖小平. 世界香茶菜属植物地理分布及其药用前景 [J]. 中药材, 1996, 19(4): 169-173.
- [6] 夏爱军, 李玲, 董昕, 等. UHPLC-Q-TOF/MS 技术应用于中药旱莲草化学成分研究 [J]. 解放军药学报, 2012, 28(5): 404-407.
- [7] 张小平, 蒋可志, 吕惠卿, 等. HPLC-Q-TOF-MS 鉴定条件椴根茎乙酸乙酯提取物中的主要化学成分 [J]. 质谱学报, 2015, 36(4): 310-320.
- [8] 杨雅欣, 廖尚高, 王正, 等. 血人参水溶性化学成分 UHPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 74-78.
- [9] 杨林云, 谢彦云, 李志锋, 等. UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析中华常春藤中的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 566-572.
- [10] 孙蕾, 王少辰, 孙明谦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 研究 6 种乌头生物碱类成分的裂解途径 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 2827-2831.
- [11] Han J, Ye M, Chen H B, et al. Determination of diterpenoids and flavonoids in *Isodon rubescens* by LC-ESI-MS-MS [J]. *Chromatographia*, 2005, 62(3/4): 203-207.