

## 灯心草及野灯心草中菲类成分的 LC-ESI-MS 快速识别及鉴定

赵丹丹, 李贵云, 王小红, 王 杨, 林宏英, 黄建梅\*

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

**摘要:** **目的** 快速识别及鉴定灯心草及野灯心草中的菲类成分。**方法** 运用高效液相色谱-电喷雾质谱 (HPLC-ESI-MS) 联用技术研究菲类成分的裂解规律, 并分别对灯心草和野灯心草甲醇提取液中的菲类成分进行快速识别和鉴定。**结果** 在负离子模式下, 菲类成分容易丢失 2H 的碎片, 推测可能是乙烯基与苯环环合而失去 2 个氢; 也易发生重排丢失羰基, 呈现出一定的裂解规律。根据菲类成分的裂解规律, 从灯心草和野灯心草甲醇提取物中快速筛选了 21 个菲类成分, 其中 6 个成分经与对照品比对而准确鉴定; 另外结合质谱裂解信息及极性差异, 推测出其中 5 个成分的结构。**结论** HPLC-ESI-MS 技术既可以从中药复杂体系中快速识别菲类成分并根据裂解规律初步确定菲类成分结构, 也是实现中药中目标天然产物定向分离的有效手段。

**关键词:** 灯心草; 野灯心草; 菲类; 高效液相色谱-电喷雾质谱; 质谱裂解

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)12-1539-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.12.004

## Rapid recognition and identification of phenanthrenes in *Juncus effusus* and *Juncus setchuensis* by LC-ESI-MS

ZHAO Dan-dan, LI Gui-yun, WANG Xiao-hong, WANG Yang, LIN Hong-ying, HUANG Jian-mei

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

**Abstract: Objective** To rapidly recognize and identify phenanthrenes in *Juncus effusus* and *J. setchuensis*. **Methods** HPLC-ESI-MS method was used to investigate the ESI-MS characteristics of those phenanthrenes, to screen, and to identify phenanthrenes in *J. effusus* and *J. setchuensis*. **Results** Under negative mode, phenanthrenes were inclined to loss two hydrogens, which presumably caused by the cyclization of vinyl and aromatic ring; Furthermore, the loss of C=O could be also observed. Fragmentation pathway of phenanthrenes in ESI as a negative ion mode was summarized. Twenty-one phenanthrenes were rapidly detected from the extracts of *J. effusus* and *J. setchuensis*. Among them, six compounds were accurately identified by comparison with reference substances; The structures of five compounds were inferred according to their MS spectrum and polarity. **Conclusion** HPLC-ESI-MS provides not only a new technique for the rapid identification of phenanthrenes from complex matrix, but also an effective method for the target separation of constituents in Chinese materia medica.

**Key words:** *Juncus effusus* L.; *Juncus setchuensis* Buchen.; phenanthrenes; HPLC-ESI-MS; MS fragmentation

灯心草 *Juncus effusus* L. 和野灯心草 *J. setchuensis* Buchen. 为灯心草科灯心草属植物, 以干燥茎髓入药, 具有清心火、利小便之功效<sup>[1-2]</sup>。灯心草及野灯心草中主要含有菲类、黄酮类、甾体等成分<sup>[3-9]</sup>, 其中菲类成分为主要成分。本课题组前期对不同产地 11 批灯心草药材的指纹图谱研究发现其指纹图谱具有很高的相似度<sup>[10]</sup>; 通过小鼠高架十字迷宫模型, 证实灯心草中菲类成分厄弗酚、去氢

厄弗酚、灯心草酚、去氢灯心草酚具有明显抗焦虑作用<sup>[11-12]</sup>。目前对灯心草属菲类成分的研究主要是通过多种分离技术从中分离出单一化学成分, 再通过 NMR 等技术鉴定结构。由于所含化学成分复杂, 有目标地分离菲类成分的难度较大。为了实现灯心草属植物菲类成分的高效分离, 本实验利用高效液相色谱-电喷雾质谱 (HPLC-ESI-MS) 联用技术, 研究总结了菲类成分的质谱裂解规律, 并对灯心草和野灯心

收稿日期: 2013-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173541); 北京中医药大学科研创新团队项目 (2011-CXTD-14)

作者简介: 赵丹丹 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药成分分析和体内药物分析。Tel: (010)84738937 E-mail: zydandan2008@126.com

\*通信作者 黄建梅 Tel: (010)84738619 E-mail: huangjm@bucm.edu.cn

草中的菲类成分进行快速识别和鉴定。HPLC-ESI-MS技术既可以从复杂的天然产物中快速识别菲类成分,也为目标产物的快速分离提供一种有效的方法。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Thermo Fisher Scientific TSQ Quantum 三重四级杆液质联用仪(包括 Surveyor PDA 检测器, Accela Auto Sample 自动进样器, Accela Pump 溶剂输送泵, TSQ Quantum 质谱仪以及 Xcalibur 2.0 数据处理系统); KQ3200DE 型数控超声提取器(昆山市超声仪器有限公司); BL-100 型高速多功能粉碎机(浙江省永康市五金有限公司)。

### 1.2 药材与试剂

灯心草 *Juncus effusus* L. 采自四川南充, 野灯心草 *Juncus setchuensis* Buchen. 采自福建武夷山, 均经中国科学院植物所标本室林祁教授鉴定。甲醇(色谱级, 美国 Fisher 公司), 水为娃哈哈纯净水; 对照品去氢厄弗酚、厄弗酚、去氢灯心草酚、灯心草酚、2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲和灯心草素为本研究团队自制, 经 HPLC-UV 面积归一化法确定各化合物质量分数均大于 95%, 经波谱分析确定结构<sup>[12-13]</sup>。

## 2 实验方法

### 2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 分别取灯心草和野灯心草药材, 粉碎后过 60 目筛, 各称取 0.6 g, 分别置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50 mL 甲醇, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 240 W, 频率 40 kHz) 30 min, 静置至室温, 用甲醇补足减失的质量, 摇

匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别称取去氢厄弗酚、厄弗酚、去氢灯心草酚、灯心草酚、2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲和灯心草素约 0.2 mg, 甲醇定容至 50 mL 容量瓶中, 摇匀, 配制成上述物质的混合对照品溶液(相当于各对照品的质量浓度约为 4 μg/mL), 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

### 2.2 HPLC 与质谱分析

2.2.1 HPLC 条件 色谱柱为 Agilent HC-C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱: 0~10 min, 35%~65%A; 10~30 min, 65%~85%A; 30~40 min, 85%~35%A; 体积流量: 1 mL/min; 柱温: 23 °C; 检测波长: 269 nm; 进样量: 10 μL。

2.2.2 质谱条件 ESI 离子源, 负离子模式检测, 喷雾电压 2 500 V, 蒸发器温度 400 °C, 鞘气 10 L/min, 辅助气 5 L/min, 毛细管温度: 350 °C。采用全扫描、选择离子扫描及二级全扫描, 全扫描质量范围 100~800, 碰撞能量 36 eV。流动相采用柱后分流方式, 分流比为 4:1。

2.2.3 样品测定 取制备好的供试品溶液和混合对照品溶液, 分别进样 10 μL, 按上述色谱质谱条件测定分析。

## 3 实验结果

### 3.1 菲类成分的 ESI-MS 裂解特征

通过对混合对照品质谱检测结果的分析, 对厄弗酚、灯心草酚、去氢厄弗酚、去氢灯心草酚和 2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲(结构见图 1)的

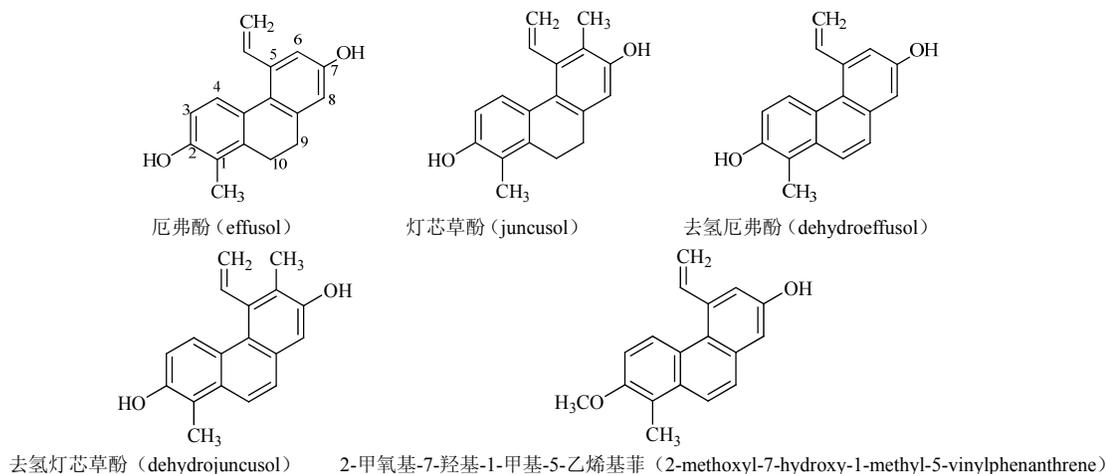


图 1 5 种菲类成分的结构

Fig. 1 Structures of five phenanthrenes

质谱裂解途径进行了推导。

按照“2.2”项下的条件测得 ESI-MS (-) 谱图见图 2, 数据分析结果见表 1。从图 2 和表 1 可以看出, 菲类成分容易丢失 2H 的碎片, 推测可能是乙烯基与苯环环合而失去两个氢, 形成 [M-H-2H]<sup>-</sup> 碎片离子 *m/z* 249、263、247、261; 另外较容易丢失

侧链基团 OH, 形成 [M-H-OH]<sup>-</sup> 碎片离子 *m/z* 234、248、232、246; 可以发生母核重排丢失 CO, 形成 [M-H-2H-CO]<sup>-</sup> 碎片离子 *m/z* 221、235、219、233, 同时丢失侧链基团 CH<sub>3</sub> 或 CH<sub>2</sub> 形成碎片离子 *m/z* 206、204、222。图 3 所示为去氢厄弗酚可能的裂解方式。

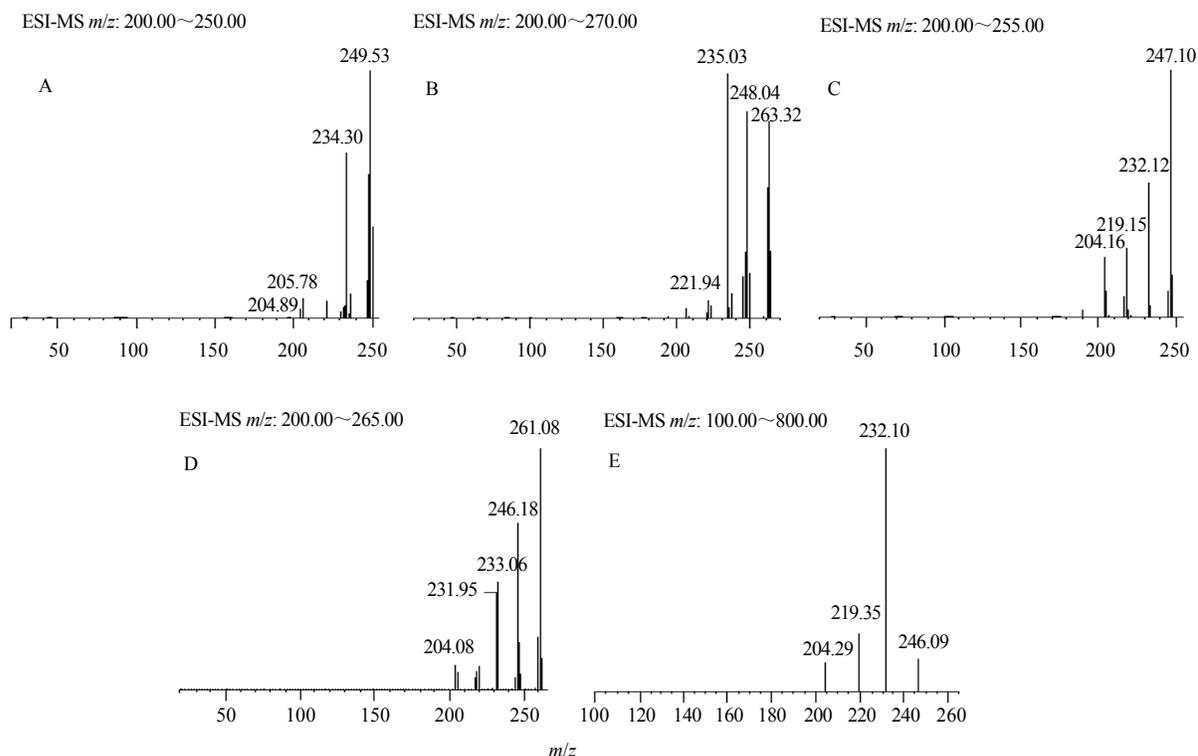


图 2 厄弗酚 (A)、灯心草酚 (B)、去氢厄弗酚 (C)、去氢灯心草酚 (D) 和 2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲 (E) 的 ESI-MS<sup>2</sup> 图谱

Fig. 2 ESI-MS<sup>2</sup> spectra of effusol (A), juncusol (B), dehydroeffusol (C), dehydrojuncusol (D), and 2-methoxy-7-hydroxy-1-methyl-5-vinyl phenanthrene (E)

表 1 菲类成分的 ESI-MS<sup>2</sup> 裂解特征

Table 1 ESI-MS<sup>2</sup> characterization of phenanthrenes

化合物	相对分子质量	MS ( <i>m/z</i> )	MS <sup>2</sup> 谱主要的碎片离子 ( <i>m/z</i> )
厄弗酚	252	[M-H] <sup>-</sup> 251	249, 234, 221, 206
灯心草酚	266	[M-H] <sup>-</sup> 265	263, 248, 235, 222
去氢厄弗酚	250	[M-H] <sup>-</sup> 249	247, 232, 219, 204
去氢灯心草酚	264	[M-H] <sup>-</sup> 263	261, 246, 233, 219
2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲	264	[M-H] <sup>-</sup> 263	246, 232, 219, 204

### 3.2 灯心草和野灯心草中菲类成分的快速识别及鉴定

采用“2.2”项下的液质联用色谱条件, 对灯心草和野灯心草药材进行了 LC-MS-MS 分析, 结果见

图 4。根据上述总结的菲类成分 ESI-MS (-) 裂解规律, 对药材中的菲类成分进行了快速识别和鉴定, 结果见表 2、表 3。

由表 2、表 3 可知, 灯心草和野灯心草中含有

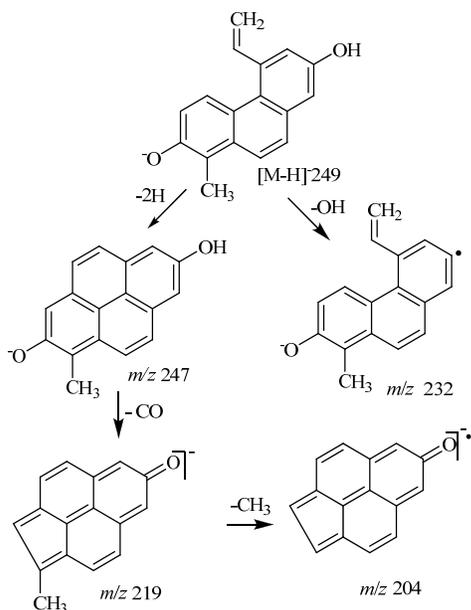
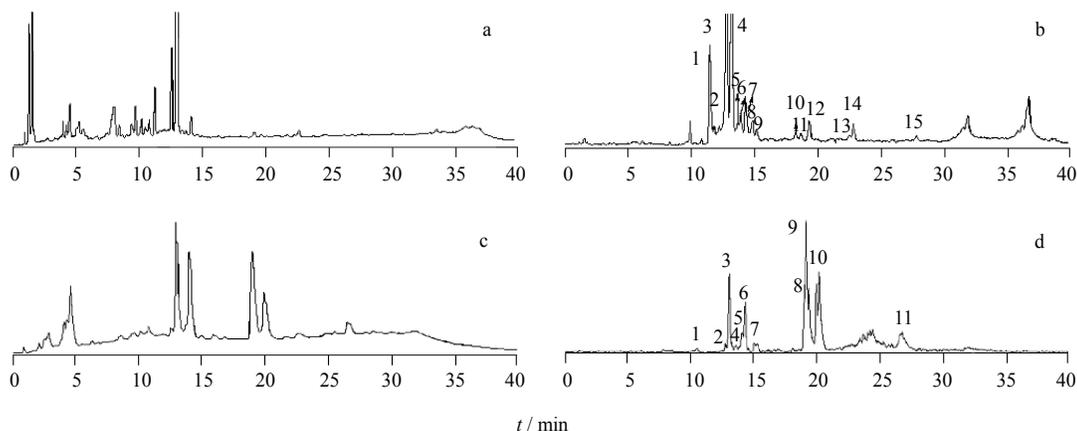


图 3 去氢厄弗酚可能的 ESI-MS 裂解途径  
Fig. 3 Proposed ESI-MS fragmentation pathway of dehydroeffusol

大量的菲类成分，根据上述规律可以从其提取物中快速识别出菲类成分共 21 个，可通过对照品比对的方法得到验证的有 6 个，参照文献及化合物极性大小推测出菲类成分结构的有 5 个，灯心草素和所推测化合物结构见图 5。

灯心草中色谱峰 13:  $m/z$  265  $[M-H]^-$ ，出峰时间紧邻去氢厄弗酚的 C-2 位羟基被甲基化的化合物 2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲，根据其质谱裂解碎片  $m/z$  248、234 和 206 均比去氢厄弗酚的 C-2 位羟基被甲基化的化合物相应的碎片离子  $m/z$  多 2，推测其为厄弗酚的 C-2 位羟基被甲基化的化合物 2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基-9, 10-二氢菲<sup>[14]</sup>。

野灯心草中色谱峰 1:  $m/z$  295  $[M-H]^-$ ，和厄弗酚相比较多了 44，推测在苯环侧链多了 1 个羧基，参考文献报道<sup>[4]</sup>，结合质谱裂解碎片  $m/z$  277  $[M-H-H_2O]^-$ 、262  $[M-H-H_2O-CH_3]^-$ 、251  $[M-H-CO_2]^-$ 、236  $[M-H-CO_2-CH_3]^-$ ，推测其为 juncuenin C。



a-灯心草 HPLC-UV 色谱图 b-灯心草 HPLC-ESI-MS 总离子流图(负离子扫描模式) c-野灯心草 HPLC-UV 色谱图 d-野灯心草 HPLC-ESI-MS 总离子流图(负离子扫描模式)  
a-HPLC-UV chromatogram of *J. effusus*; b-HPLC-ESI-MS total ion chromatogram of *J. effusus* (negative ion scan mode); c-HPLC-UV chromatogram of *J. setchuensis*; d-HPLC-ESI-MS total ion chromatogram of *J. setchuensis* (negative ion scan mode)

图 4 灯心草和野灯心草提取物的 HPLC-UV-MS 色谱图

Fig. 4 HPLC-UV-MS chromatograms of *J. effusus* and *J. setchuensis* extracts

野灯心草中色谱峰 9:  $m/z$  265  $[M-H]^-$ ，碎片离子  $m/z$  263，说明存在乙烯基，由出峰时间可知其极性小于灯心草酚，推测苯环上的侧链为甲氧基或羟甲基取代，由 2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲可知，甲氧基的极性更小，出峰时间在 23 min 左右，推测苯环上的侧链为羟甲基取代，参考文献数据<sup>[15]</sup>，结合质谱裂解碎片  $m/z$  263  $[M-H-2H]^-$ 、249

$[M-H-2H-CH_2]^-$ 、234  $[M-H-CH_2OH]^-$ 、221  $[M-H-2H-CH_2-CO]^-$ ，推测其为 6、7 或 8 位为羟甲基取代的灯心草酚异构体。

野灯心草中色谱峰 10:  $m/z$  263  $[M-H]^-$ ，出峰时间紧邻化合物 X，根据其质谱裂解碎片  $m/z$  261、247、232 和 219 均比化合物 X 相应的碎片离子  $m/z$  少 2，参考文献数据<sup>[14]</sup>，推测其为 6、7 或 8 位为羟

表2 灯心草中菲类成分的LC-MS<sup>2</sup>识别

Table 2 LC-MS<sup>2</sup> identification of phenanthrenes in *J. effusus*

峰号	t <sub>R</sub> / min	MS (m/z)	MS <sup>2</sup> 谱主要的碎片离子 (m/z)	菲类成分识别结果
1	11.47	251	249, 234, 221	—
2	12.25	251	249, 234, 221	—
3	12.77	251	249, 234, 221, 206	厄弗酚
4	13.18	249	247, 232, 219, 204	去氢厄弗酚
5	13.82	265	263, 248, 235	—
6	13.91	265	263, 248, 235, 222	灯心草酚
7	14.21	263	261, 246, 233, 218	去氢灯心草酚
8	14.34	265	263, 248, 235	—
9	15.12	265	263, 248, 232	—
10	18.19	263	261, 232, 219	—
11	18.54	263	261, 247	—
12	19.13	497	479, 469, 247, 235	灯心草素
13	22.41	265	248, 234, 206	推测为 2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基-9, 10-二氢菲
14	22.70	263	246, 232, 219, 204	2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲
15	27.65	497	451, 264, 248, 233	—

—: 尚无确认的结构, 下同

—: structure was unconfirmed, same as below

表3 野灯心草中菲类成分的LC-MS<sup>2</sup>识别

Table 3 LC-MS<sup>2</sup> identification of phenanthrenes in *J. setchuensis*

峰号	t <sub>R</sub> / min	MS (m/z)	MS <sup>2</sup> 谱主要的碎片离子 (m/z)	菲类成分识别结果
1	10.51	295	277, 262, 251, 236	推测为 juncuenin C
2	12.65	251	249, 234, 221, 206	厄弗酚
3	13.14	249	247, 232, 219, 204	去氢厄弗酚
4	13.55	251	249, 234, 221	—
5	14.15	265	263, 248, 235, 222	灯心草酚
6	14.46	263	261, 246, 233, 218	去氢灯心草酚
7	15.06	265	263, 248, 232	—
8	19.07	497	479, 469, 247, 235	灯心草素
9	19.15	265	263, 249, 234, 221	推测为 C-6, 7 或 8 位为羟甲基取代的灯心草酚异构体 (化合物 X)
10	20.13	263	261, 247, 232, 219	推测为 C-6, 7 或 8 位为羟甲基取代的去氢灯心草酚异构体 (化合物 Y)
11	26.87	249	247, 233, 221, 207	推测为 juncunol

甲基取代的去氢灯心草酚异构体。

野灯心草中色谱峰 11: [M-H]<sup>-</sup> m/z 249, 与去氢厄弗酚的相对分子质量相同, 但由出峰时间知其极性远小于去氢厄弗酚, 参考文献数据<sup>[16-17]</sup>, 结合质谱裂解碎片 m/z 247 [M-H-2H]<sup>-</sup>、233 [M-H-2H-CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup>、221 [M-H-CO]<sup>-</sup>、207 [M-H-CO-CH<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 推测其为 juncunol。

由表 2、表 3 及上述分析结果可以看出, 菲和 9, 10-二氢菲在灯心草科植物中常成对出现。它们质谱准分子离子 [M-H]<sup>-</sup>和碎片离子的 m/z 差 2, 保留时间也很接近, 且 9, 10-二氢菲出峰在前, 菲紧随其后出峰, 如厄弗酚和去氢厄弗酚、灯心草酚和去氢灯心草酚、2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基-9, 10-二氢菲和 2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基菲等。

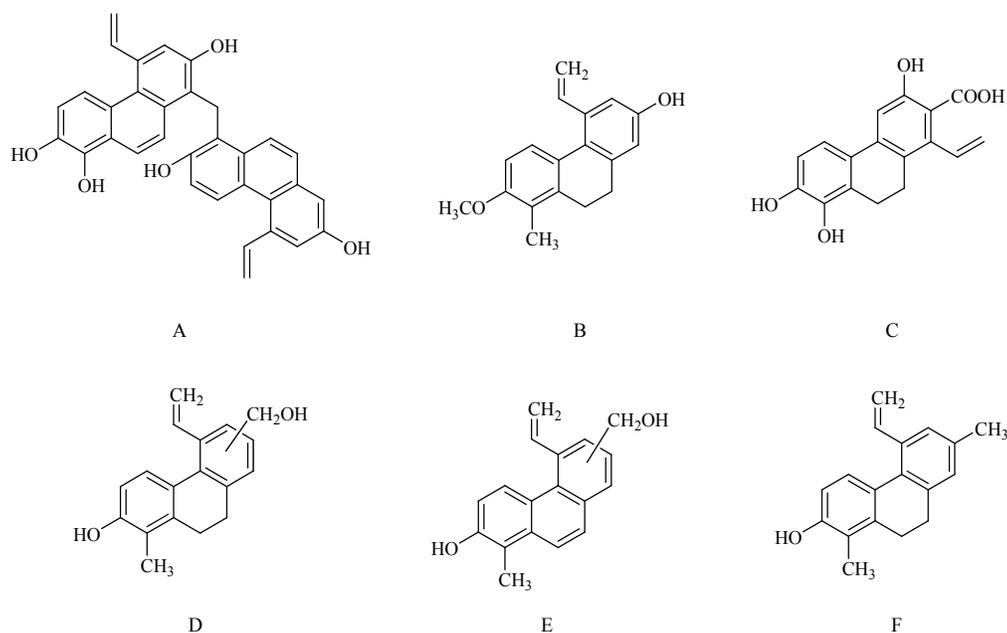


图5 灯心草素 (A)、2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基-9,10-二氢菲 (B)、juncuenin C (C)、化合物 X (D)、化合物 Y (E) 和 juncunol (F) 的结构

Fig. 5 Structures of juncusin (A), 2-methoxy-7-hydroxy-1-methyl-5-vinyl-9,10-dihydro-phenanthrene (B), juncuenin C (C), compound X (D), compound Y (E), and juncunol (F)

此规律可以帮助快速识别菲类成分。

#### 4 讨论

由于化合物灯心草素结构复杂,其二级质谱裂解碎片比较多,未能推断出其质谱裂解规律,因此“3.1”项未给出灯心草素的ESI-MS<sup>2</sup>质谱裂解特征。

利用HPLC-ESI-MS法,通过对灯心草属植物菲类成分的MS裂解规律的分析以及不同取代基菲类成分的极性大小的分析,快速从灯心草和野灯心草中识别21个菲类成分,在确认6个菲类成分结构基础上,首次从灯心草中识别并鉴定化合物2-甲氧基-7-羟基-1-甲基-5-乙烯基-9,10-二氢菲,首次从野灯心草中识别并鉴定化合物去氢厄弗酚、去氢灯心草酚、灯心草素、化合物X和Y。说明HPLC-ESI-MS法可以从复杂的灯心草属植物提取物中迅速地识别并鉴定此类化合物,有利于实现对该类化合物的导向分离,大大提高分离效率,具有很强的实用性。

用HPLC-ESI-MS快速识别和鉴定灯心草属植物菲类成分,根据MS谱图中的准分子离子和碎片离子信息,结合上述MS的裂解规律,可以较为方便地从灯心草属植物提取物中识别菲类成分。具体规律如下:(1)利用HPLC中的保留时间可以初步确定菲类成分母核结构,9,10-二氢菲母核出峰在

前,菲母核出峰紧随其后,且质荷比相差2。(2)对于母核和取代基类型均相同,仅取代基位置不同的菲类成分,其保留时间和质谱裂解规律都很相似,较难利用HPLC-ESI-MS法鉴别其结构。根据目前的研究结果,乙烯基取代位置如果在C-5位,其准分子离子的二级MS谱图中很容易出现丢失2H的子离子,依据此规律可以初步判断乙烯基取代在C-5位。对于母核上有甲氧基取代的产物,甲氧基上的甲基在二级MS谱图中很容易丢失,依此可判断甲氧基的存在。

为了更好地利用HPLC-ESI-MS法快速鉴别菲类成分的结构,既要更多地了解菲类成分同分异构体的裂解规律,也要结合菲类成分的极性大小,根据其在HPLC上的保留时间先后加以综合分析。

#### 参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 四川省卫生厅.四川省中药材标准(1987年版)增补本[M].成都:四川人民出版社,1992.
- [3] Wang J, Liu J, Wen Q, *et al.* Chemical constituents from the aerial parts of *Juncus setchuensis* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2010, 38(5): 1039-1041.
- [4] Wang X Y, Ke C Q, Tang C P, *et al.* 9, 10-dihydro-phenanthrenes and phenanthrenes from *Juncus*

- setchuensis* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(6): 1209-1212.
- [5] 章华伟, 倪士峰. 野灯心草化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(B05): 7-8.
- [6] Della G M, Fiorentino A, Mangoni L, *et al.* Cytotoxic 9, 10-dihydrophenanthrenes from *Juncus effusus* L. [J]. *Tetrahedron*, 1993, 49(16): 3425-3432.
- [7] Greca M D, Fiorentino A, Mangoni L, *et al.* 9, 10-dihydrophenanthrene metabolites from *Juncus effusus* L. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33(36): 5257-5260.
- [8] Shima K, Toyota M, Asakawa Y. Phenanthrene derivatives from the medullae of *Juncus effusus* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(9): 3149-3151.
- [9] Mody N V, Mahmoud I I, Finer-Moore J, *et al.* Constituents of *Juncus effusus*: the X-ray analysis of effusol diacetate [J]. *J Nat Prod*, 1982, 45(6): 733-737.
- [10] 简伟杰, 段琼, 段天璇, 等. 灯心草药材 RP-HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 60-63.
- [11] Liao Y J, Zhai H F, Zhang B, *et al.* Anxiolytic and sedative effects of dehydroeffusol from *Juncus effusus* in mice [J]. *Planta Med*, 2011, 77(5): 416-420.
- [12] Wang Y G, Wang Y L, Zhai H F, *et al.* Phenanthrenes from *Juncus effusus* with anxiolytic and sedative activities [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(13): 1234-1239.
- [13] 王杨, 黄建梅, 段天璇, 等. 灯心草中菲类化合物的研究 [A] // 第十一届全国青年药学工作者最新科研成果交流会论文集 [C]. 杭州: 第十一届全国青年药学工作者最新科研成果交流会, 2012.
- [14] Dellagreca M, Isidori M, Lavorgna M, *et al.* Bioactivity of phenanthrenes from *Juncus acutus* on *Selenastrum capricornutum* [J]. *J Chem Ecol*, 2004, 30(4): 867-879.
- [15] Dellagreca M, Monaco P, Previtera L, *et al.* Minor bioactive dihydrophenanthrenes from *Juncus effusus* [J]. *J Nat Prod*, 1997, 60(12): 1265-1268.
- [16] Cossey A L, Gunter M J, Mander L N. Juncunol: Revision of structure and synthesis [J]. *Tetrahedron Lett*, 1980, 21(34): 3309-3312.
- [17] Bhattacharyya J, Miles D H. Structure of juncunol, a novel 9, 10-dihydrophenanthrene from *Juncus roemerianus* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1977, 18(32): 2749-2750.