

基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 益智仁中倍半萜类物质的分析与鉴定

张梦雅^{1,2}, 左莉华^{1,2}, 周霖^{1,2}, 高一乔^{1,2}, 关克磊^{1,2}, 杜翔宇³, 张瑞^{1,2}, 贾清泉^{1,2}, 裴健颖^{1,2}, 李寒冰⁴, 孙志^{1,2*}, 杜书章^{1,2*}

1. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450052
2. 河南省精准临床药学重点实验室, 河南 郑州 450052
3. 河南大学基础医学院, 河南 开封 475000
4. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 建立中药复杂体系快速、准确鉴定的分析方法, 系统阐明益智仁 (益智 *Alpinia oxyphylla* 的干燥成熟果实) 中倍半萜类物质的化学组成。方法 采用超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术, 在优化倍半萜类物质提取工艺的基础上, 通过质谱全扫描捕捉未知化合物的精确相对分子质量及二级碎片离子信息, 同时与对照品的相对保留时间和质谱数据进行比对, 并结合相关参考文献及数据库, 实现对益智仁中倍半萜类未知化合物的准确快速鉴定。结果 共鉴定出 24 种倍半萜类化合物, 根据骨架结构将其归为 4 类, 其中 9 个桉叶烷型、6 个杜松烷型、8 个艾里莫芬烷型、1 个刺参酮型。结论 利用所建立的分析方法, 实现对益智仁中多种倍半萜类成分的快速、准确鉴定, 为益智仁药效物质基础及质量控制研究提供理论依据。

关键词: 益智仁; 倍半萜类; 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 提取工艺; 桉叶烷型; 杜松烷型

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)24-6168-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.005

Analysis and Identification of Sesquiterpenes in *Alpinia oxyphylla* Miq Based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS

ZHANG Meng-ya^{1,2}, ZUO Li-hua^{1,2}, ZHOU Lin^{1,2}, GAO Yi-qiao^{1,2}, GUAN Ke-lei^{1,2}, DU Xiang-yu³, ZHANG Rui^{1,2}, JIA Qing-guan^{1,2}, PEI Jian-ying^{1,2}, LI Han-bing⁴, SUN Zhi^{1,2}, DU Shu-zhang^{1,2}

1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China
2. Henan Key Laboratory of Precision Clinical Pharmacy, Zhengzhou 450052, China
3. School of Basic Medical Sciences, Henan University, Kaifeng 475000, China
4. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To establish a rapid and accurate analytical method for the identification of complex system of traditional Chinese medicine, and to systematically clarify the chemical composition of sesquiterpenes in *Alpinia oxyphylla*. **Method** On the basis of optimizing the extraction process of sesquiterpenes, the accurate molecular weight and secondary fragment ions information of unknown compounds were captured by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS). Compared with the relative retention time and mass spectrometry data of the reference substance, combined with relevant references and databases, the sesquiterpene unknown compounds in the fruits of *A. oxyphylla* were accurately and rapidly characterized. **Results** A total of 24 sesquiterpenes were identified and classified into four categories according to their skeleton structure, including nine eudesmane-type, six cadinane-type, eight eremophilane-type, and one oplopanone-type. **Conclusion** In this study, the established analytical method was used to realize the rapid and accurate identification

收稿日期: 2020-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81703666); 国家自然科学基金资助项目 (82003921); 河南省高等学校重点科研项目基础研究计划 (19A360008); 河南省高等学校重点科研项目基础研究计划 (19A320070); 河南省科技计划项目 (182102310243)

作者简介: 张梦雅, 女, 在读硕士, 研究方向为药物分析。Tel: (0371)66862570 E-mail: 2425523632@qq.com

*通信作者 杜书章, 男, 本科, 主任药师, 研究方向为药物分析。Tel: (0371)66862570 E-mail: dushuzhang911@163.com

孙志, 男, 博士, 主管药师, 研究方向为药物分析。Tel: (0371)66862570 E-mail: sunzhi2013@163.com

of sesquiterpenes in the fruits of *A. oxyphylla*, which provided a theoretical basis for the research on the pharmacodynamic substance basis and quality control of the fruits of *A. oxyphylla*.

Key words: *Alpinia oxyphylla* Miq; sesquiterpenes; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; extraction process; eudesmane-type; six cadinane-type

益智仁为姜科植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实, 主要种植在广西、云南、海南等南部地区, 为“四大南药”之一, 目前收载于《中国药典》一部^[1]。现代药理研究发现, 该药具有神经保护、提高学习记忆能力、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抗炎等多方面的药理活性^[2-5]。

中药具有多层次、多靶点的特性, 同类成分可能因其具有相似化学结构而发挥相同的作用效果, 明确其化学成分, 阐明主要药效物质基础对中药走向现代化、科学化有着至关重要的作用。研究表明, 从益智仁中分离得到的化合物主要为倍半萜类、单萜类、二萜类、二苯庚烷类及黄酮类^[6-9], 其中, 倍半萜类为益智仁的主要特征化学成分, 具有一定的生物活性^[10-11], 且与益智仁的保健作用密切相关。但目前尚缺少对其倍半萜类化学成分进行快速分析的研究报道。因此, 为进一步揭示益智仁的药效物质基础, 本研究聚焦于其特征成分倍半萜类, 在优化其提取工艺的基础上, 利用超高效液相色谱四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术, 建立系统性分析方法, 根据高分辨质谱获得精准相对分子质量、碎片离子峰、保留时间及对照品信息, 同时结合相关文献及数据库, 实现对益智仁中倍半萜类化学成分的快速、准确鉴定。为益智仁的药效物质基础研究和质量控制水平提升奠定了基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UHPLC-Q-Orbitrap 液相色谱-质谱联用系统: Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (Dionex 公司, 美国) 串联 Q Exactive 型高分辨质谱 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); JP-300B 型高速多功能粉碎机 (永康市久品工贸有限公司); AL104 型万分之一分析天平 [瑞士 Mettler Toledo (上海) 有限公司]; MDS-6G 多通量密闭微波化学站 (上海新仪微波化学科技有限公司)。

1.2 试剂

益智仁药材购于同仁堂, 经河南中医药大学李寒冰教授鉴定为姜科山姜属植物益智 *Alpinia oxyphylla* Miq. 的干燥成熟果实; 对照品诺卡酮

(nootkatone, 北京中科仪友化工技术研究院, 批号 180308, 经 HPLC 质量分数 $\geq 98\%$)、oxyphyllenone A (百灵威科技有限公司, 批号 LK20T56, 经 HPLC 质量分数 $\geq 97\%$)、valencene (ChromaDex, Inc. Irvine, 批号 00022050-007, 经 HPLC 质量分数 $\geq 98\%$) 和 oplopanone (百灵威科技有限公司, 批号 LK20T55, 经 HPLC 质量分数 $\geq 96\%$)。无水乙醇 (分析纯, 天津市凯通化学试剂有限公司), 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 水为超纯水。

2 方法

2.1 供试品溶液和对照品溶液制备

精密称取干燥的益智仁粗粉 1.0 g, 按料液比为 1:30 的比例加入 60% 乙醇 30 mL, 提取温度 80 °C, 微波提取仪功率固定为 6 W, 微波提取 10 min 抽滤, 用提取溶剂定容至 40 mL, 充分摇匀后取 1 mL 溶液, 置 100 mL 量瓶定容至刻度, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

取诺卡酮、oxyphyllenone A、valencene 和 oplopanone 对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加入甲醇适量, 制得质量浓度为 0.1 mg/mL 的单一对照品溶液, 置 4 °C 冰箱中保存备用, 其中 0.1 mg/mL 诺卡酮对照品用于定量分析。再分别精密量取上述 4 个单一对照品储备液适量, 混合后加入纯甲醇稀释, 最终制备成各对照品质量浓度均为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 用于后续定性分析。

2.2 定量分析条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLCBEH C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 以乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~3.0 min, 95%A; 3.0~16.0 min, 95%~85%A; 16.0~20.0 min, 85%~78%A; 20.0~26.0 min, 78%~45%A; 26.0~30.0 min, 45%A~100%B; 30.0~35.0 min, 100%B; 35.0~36.0 min, 100%~5%B; 36.0~40.0 min, 5%B; 体积流量为 0.2 mL/min, 进样量 5 μL ; 柱温 40 °C。

2.2.2 质谱条件 本实验采用 UHPLC-Q-Orbitrap 液质联用仪中的 Full-MS 一级模式对诺卡酮进行定量测定。离子源采用 HESI 源 (heated ESI), 辅助气流量 10 $\mu\text{L/min}$, 辅助气温度 320 °C, 离子

传输管温度 320 °C；鞘气体积流量 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，喷雾电压 3.50 kV；质谱分辨率 70 000 FWHM，扫描范围 m/z 80~1 200。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围 精密量取 0.02、0.04、0.08、0.12、0.16、0.20 mL 诺卡酮对照品溶液（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），分别置于 25 mL 量瓶中，50% 甲醇定容至刻度，配制质量浓度分别为 0.08、0.16、0.32、0.48、0.64、0.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列梯度溶液，在“2.2”项下色谱和质谱条件下进样分析，记录峰面积。以对照品诺卡酮质量浓度为横坐标（ X ），峰面积为纵坐标（ Y ），进行线性回归，即得标准曲线方程 $Y=2\times 10^9 X+3\times 10^7 (R^2=0.999)$ ，表明诺卡酮质量浓度在 0.08~0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.3.2 精密度考察 取“2.1”项下供试品溶液，在“2.2”项下条件下连续进样 6 次，记录峰面积。得到诺卡酮峰面积的 RSD 值为 1.82%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性考察 按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.2”项下色谱和质谱条件下进样分析，记录峰面积。计算得诺卡酮质量浓度，其 RSD 值为 2.93%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性考察 取“2.1”项下供试品溶液，分别于 0、2、6、10、12、24 h 室温放置后，按“2.2”项下色谱和质谱条件进样分析，记录峰面积。计算诺卡酮质量浓度，其 RSD 值为 1.38%。结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 称取益智仁样品粉末 6 份，取样量分别为 1.002 2、1.004 8、1.003 6、1.007 2、1.002 6、1.009 8 g，精密称定，分别加入诺卡酮对照品适量，使加入的诺卡酮含量为供试品中诺卡酮含量的 100%。按“2.1”项下方法平行制备供试品溶液，处理后按“2.2”项下色谱和质谱条件进样分析，记录峰面积。计算诺卡酮浓度，得到平均回收率为 97.20%，RSD 为 3.46%。结果表明，该方法下待测成分的测定准确度较好。

2.3.6 供试品的测定 按“2.1”项下方法制备供试品溶液，取适量供试品按上述方法测定诺卡酮含量，平行 3 次，再按照公式计算诺卡酮提取量。

$$\text{诺卡酮提取量} = CDV/M$$

C 为样品的诺卡酮质量浓度； D 为供试品稀释倍数； V 为测定总品溶液体积； M 为样品质量。

诺卡酮提取量作为响应曲面法优化的指标，用

于益智仁提取条件的考察。

2.4 响应曲面法优化工艺

2.4.1 单因素考察 精密称取干燥的益智仁粗粉 1.0 g，考察料液比（1:5、1:10、1:20、1:30、1:40），提取溶剂乙醇体积分数（40%、55%、70%、85%、100%），提取温度（40、50、60、70、80 °C），对益智仁倍半萜化合物诺卡酮提取量的影响，以确定各提取条件适宜范围，为优化微波提取益智仁工艺参数提供依据。

2.4.2 响应曲面优化试验设计 根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理，在单因素实验基础上，选择乙醇体积分数（ A ）、提取温度（ B ）和料液比（ C ）为考察因素，诺卡酮提取量为响应值，利用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验进行设计，优化微波提取法提取益智仁中诺卡酮的工艺参数。实验因素水平见表 1。

表 1 实验因素水平

Table 1 Factors and levels for Box-Behnken design

水平	因素		
	A/%	B/°C	C/(mL·g ⁻¹)
-1	55	60	20
0	70	70	30
1	85	80	40

2.5 定性分析条件

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLCBEH C₁₈（100 mm×2.1 mm，1.7 μm ）；以 0.1% 甲酸水溶液（ A ）-乙腈（ B ）为流动相，梯度洗脱，洗脱程序为 0~2.0 min，95% A ；2.0~8.0 min，95%~50% A ；8.0~15.0 min，50%~25% A ；15.0~30.0 min，75%~100% B ；30.0~35.0 min，100% B ；35.0~36.0 min，75%~5% B ；36.0~40.0 min，5% B ；体积流量 0.2 mL/min，进样量 5 μL ；柱温 40 °C。

2.5.2 质谱条件 UHPLC-Q-Orbitrap 液质联用仪：离子源采用 HESI 源（heated ESI），辅助气体积流量 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，辅助气温度 320 °C，离子传输管温度 320 °C；正离子模式下：鞘气体积流量 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，喷雾电压 3.50 kV；负离子模式下：鞘气体积流量 38 $\mu\text{L}/\text{min}$ ，喷雾电压 2.80 kV。扫描方式：正、负离子 Full MS/dd-MS² 模式，Full MS 分辨率 70 000 FWHM，dd-MS² 分辨率 17 500 FWHM，扫描范围： m/z 80~1 200，质荷比窗口宽度设置为 2，碰撞能梯度为 20、40、60 eV。

2.6 益智仁倍半萜类化合物鉴定方法

按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.5”项下条件进样后，根据质谱提供的准分子离子和加合离子等信息推测并得到一级质谱的精确相对分子质量，经 Xcalibur 2.0 软件拟合分子式，并与数据库进行比对，对各色谱峰进行初步推测，再依据对照品或参考文献、Mass Bank 数据库提供的保留时间及高能碰撞下产生的碎片离子信息，进一步推断待测化学成分

3 结果与分析

3.1 提取工艺的优化

3.1.1 单因素考察结果 结果如图 1 所示，随着乙

醇体积分数增加，提取量先大幅增加再缓慢下降，为达到较高的提取量，需进一步优化乙醇体积分数。提取量随着温度增加而增加，在提取温度为 80 °C 时达到峰值，温度升高有助于倍半萜类化合物的提取，但过高的温度可能导致有些倍半萜类化合物的结构被破坏，且考虑到安全问题，微波萃取时设定的温度不能超过提取溶剂的沸点，故试验设定 80 °C 为最大温度。提取量随着液料比的增加先缓慢增加再大幅增加，之后呈下降趋势，需进一步优化合适的液料比。

3.1.2 响应曲面优化试验结果 在单因素试验结果的基础上，采用 Box-Behnken 试验设计优化微波萃

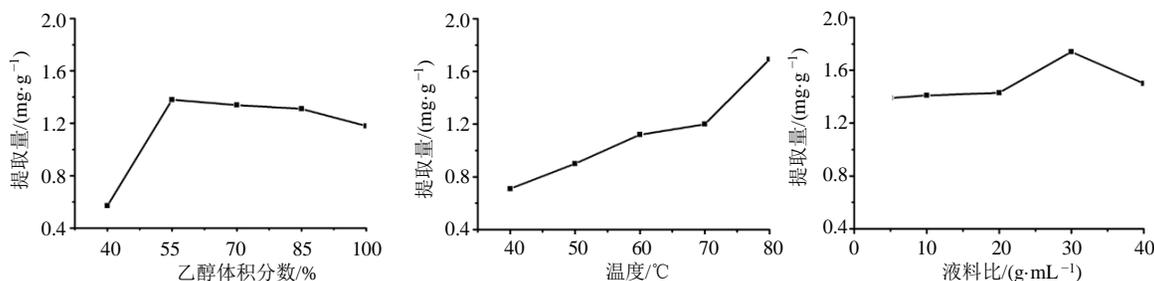


图 1 单因素实验结果

Fig.1 Results of single-factor experiments

取法提取益智仁倍半萜类的最佳条件，结果见表 2。

利用 Design-Expert 8.0.6 对提取量试验数据进行二项多元回归拟合，得到的二次回归方程的三维响应曲面图，结果见图 2~4。根据响应曲面图评价各因素之间交互作用对提取量的影响强度，筛选出各考察因素的最佳取值。根据软件预测结果，并结合实际情况，确定最优提取条件为：乙醇浓度 60%，提取温度 80 °C，料液比为 1 : 30，提取量的预测值为 1.73 mg/g。

3.2 益智仁倍半萜类化合物的鉴定

根据“2.5”项下色谱条件进样，在 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 条件下对供试品及对照品溶液进行分析，所得总离子流图 (TIC) 见图 5、6。根据“2.6”项数据分析方法，共鉴定出 24 种化学成分。根据益智仁中倍半萜类化合物的结构特点，可将鉴定出的 24 种成分分为桉叶烷型倍半萜、杜松烷型倍半萜、艾里莫芬烷型倍半萜、刺参酮型倍半萜。其中桉叶烷型 9 个、杜松烷型 6 个、艾里莫芬烷型 8 个、刺参酮型 1 个，结果见表 3。

3.2.1 桉叶烷型倍半萜 本研究共鉴定出 9 个桉叶烷型倍半萜，包括 oxyphyllenone B、(4S*,5E,10R*)-7-oxo-tri-nor-eudesm-5-en-4β-ol、oxyphyllanene B、

表 2 Box-Behnken 设计方案及试验结果

Table 2 Experimental results for Box-Behnken design

编号	乙醇体积分数/%	温度/°C	液料比/(mL·g ⁻¹)	诺卡酮提取量/(mg·g ⁻¹)
1	70.00	60.00	30.00	1.288 24
2	55.00	70.00	30.00	1.545 78
3	55.00	70.00	30.00	1.489 28
4	55.00	60.00	40.00	1.290 01
5	55.00	70.00	30.00	1.424 87
6	40.00	70.00	20.00	0.907 01
7	70.00	80.00	30.00	1.705 05
8	55.00	60.00	20.00	1.315 94
9	55.00	70.00	30.00	1.405 68
10	55.00	70.00	30.00	1.424 96
11	70.00	70.00	40.00	1.282 53
12	70.00	70.00	20.00	1.267 92
13	55.00	80.00	40.00	1.491 68
14	40.00	60.00	30.00	0.685 32
15	40.00	80.00	30.00	1.081 17
16	40.00	70.00	40.00	0.500 07
17	55.00	80.00	20.00	1.480 57

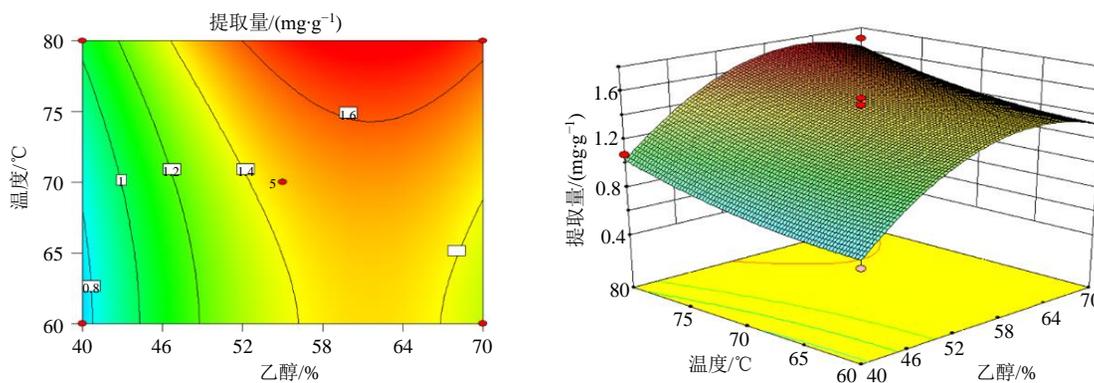


图 2 乙醇体积分数与温度对提取量的响应面图和等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plot diagram of ethanol concentration and temperature to extraction quantity

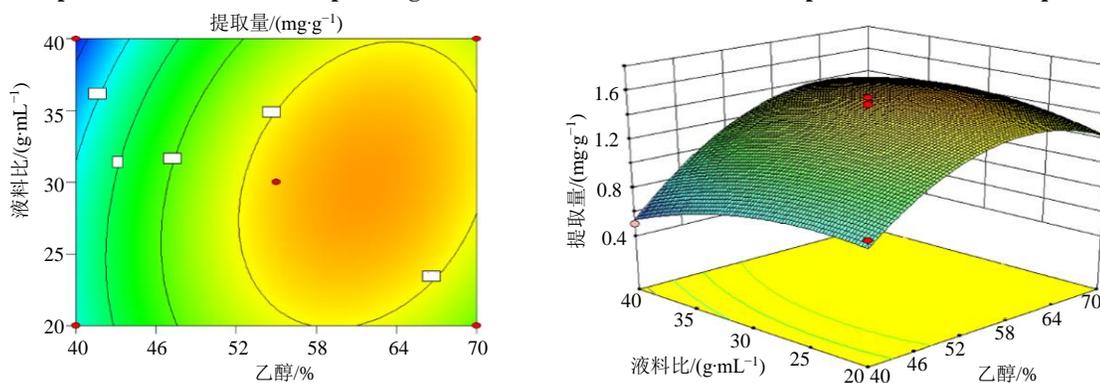


图 3 乙醇体积分数与液料比对提取量的响应面图和等高线图

Fig. 3 Response surface and contour plot diagram of ethanol concentration to material-liquid ratio for extraction quantity

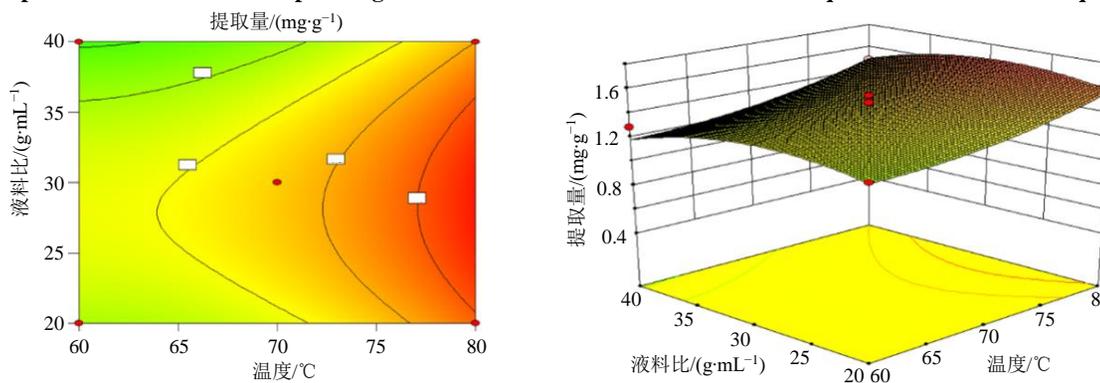


图 4 温度与液料比对提取量的响应面图和等高线图

Fig. 4 Response surface and contour plot diagram of temperature and material-liquid ratio for extraction quantity

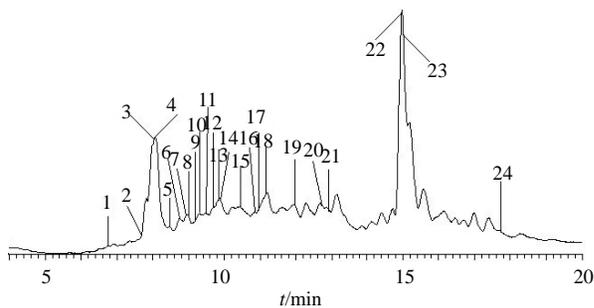


图 5 正离子模式下供试品 TIC 图

Fig. 5 TIC of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* (positive ion mode)

(5*S*,7*R*,10*R*)-5-hydroxy-noreudesma-2-tien-3,11-dione、teuhetenone A、7-*epi*-teucrenone、oxyphyllanene A、oxyphyllenone A、(4*aS*,7*S*)-7-hydroxy-1,4*a*-dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)-4,4*a*,5,6,7,-hexahydronaphthalen 2(3*H*)-one。

以 7-*epi*-teucrenone 为例，供试品中该化合物的保留时间为 9.31 min。根据一级质谱信息，其 $[M+H]^+$ 分子离子峰为 m/z 235.169 3，由此确定相对分子质量为 234.169 3。根据二级质谱提供的离子碎片，可观察到有 H_2O 、 C_3H_6 、 C_5H_8 、 C_6H_6 、 CO 等中性

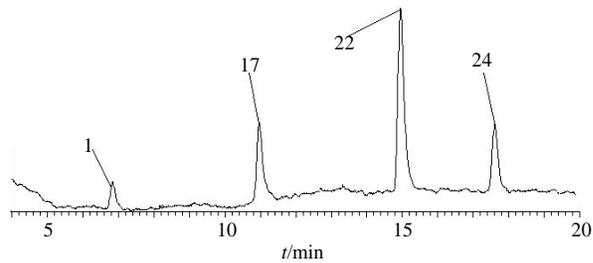


图 6 正离子模式下混合对照品 TIC 图

Fig. 6 TIC of mixed references (positive ion mode)

丢失碎片,结合精确质量数以及二级高分辨质谱图,推断该化合物为 7-*epi*-teucrenone,其质谱裂解途径见图 7。

3.3.2 杜松烷型倍半萜 本研究共鉴定出 6 个杜松烷型,包括 oxyphyllendiol A、oxyphyllone E、oxyphyllendiol B、4*S*-isopropyl-6-methyl-1-tetralone、oxyphyllene H、ketoalcohol。以 oxyphyllene H 为例,供试品中该化合物的保留时间为 11.15 min。根据一级质谱信息,其 $[M+H]^+$ 分子离子峰为 m/z

表 3 益智仁倍半萜类化学成分

Table 3 Chemical composition identified in compound sesquiterpenes from *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*

编号	化合物名称	分子式	模式	t_R /min	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分类
1	oxyphyllene A [#]	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	正离子	6.79	211.132 9	211.132 5	-1.947	a
2	oxyphyllene B ^[12]	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	正离子	7.66	211.132 9	211.132 6	-1.378	a
3	oxyphyllendiol A ^[7]	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	正离子	8.06	239.164 2	239.163 6	-2.555	b
4	(1 <i>S</i>)-nootkatone-11,12-diol ^[13]	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	正离子	8.06	253.179 8	253.179 1	-2.690	c
5	oxyphyllanene B ^[7]	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	正离子	8.57	191.106 7	191.106 5	-0.765	a
6	oxyphyllone E ^[7]	C ₁₄ H ₂₀ O ₃	正离子	8.74	237.148 5	237.148 1	-1.691	b
7	oxyphyllendiol B ^[14]	C ₁₄ H ₂₂ O ₃	正离子	8.91	239.164 2	239.163 7	-1.928	b
8	(4 <i>S</i> *,5 <i>E</i> ,10 <i>R</i> *)-7-oxo-trior-eudesm-5-en-4 β -ol ^[14]	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	正离子	8.97	195.138 0	195.137 7	-1.416	a
9	(5 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,10 <i>R</i>)-5-hydroxynoreudesma-2-tien-3,11-dione ^[7]	C ₁₄ H ₂₀ O ₃	正离子	9.17	237.148 5	237.148 2	-1.396	a
10	7- <i>epi</i> -teucrenone ^[15]	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	正离子	9.31	235.169 3	235.168 8	-1.856	a
11	teuhtenone A ^[13]	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	正离子	9.47	195.138 0	195.137 7	-1.314	a
12	oxyphyllanene A ^[13]	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	正离子	9.66	193.122 3	193.122 2	-0.758	a
13	diketone ^[7]	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	正离子	9.82	221.153 6	221.153 2	-1.657	c
14	11-hydroxy-valenc-1(10)-en-2-one ^[15]	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	正离子	9.87	237.184 9	237.184 3	-2.389	c
15	dehydro-nootkatone ^[14]	C ₁₅ H ₂₀ O	正离子	10.40	217.158 7	217.158 3	-1.666	c
16	nootkato ^[7]	C ₁₅ H ₂₄ O	正离子	10.95	221.190 0	221.189 6	-1.682	c
17	oplopanone [#]	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	正离子	10.98	239.200 6	239.199 9	-2.703	d
18	oxyphyllene H ^[14]	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	正离子	11.15	223.169 3	223.168 9	-1.732	b
19	(4 <i>aS</i> ,7 <i>S</i>)-7-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)-4,4a,5,6,7-hexahydronaphthalen-2(3 <i>H</i>)-one ^[7]	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	正离子	11.83	235.169 3	235.168 8	-1.984	a
20	ketoalcohol ^[7]	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	正离子	12.67	223.168 9	223.168 8	-2.001	b
21	eremophila-1(10),11(12)-dien-2,9-dione ^[8]	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	正离子	12.88	233.153 6	233.153 3	-1.443	c
22	nootkatone [#] [14]	C ₁₅ H ₂₂ O	正离子	14.96	219.174 3	219.173 8	-2.472	c
23	4 <i>S</i> -isopropyl-6-methyl-1-tetralone ^[8]	C ₁₄ H ₁₈ O	正离子	15.01	203.143 0	203.142 7	-1.830	b
24	valencene [#]	C ₁₅ H ₂₄	正离子	17.69	205.195 1	205.194 7	-1.839	c

[#]经对照品对照 a-桉叶烷型倍半萜 b-杜松烷型倍半萜 c-艾里莫芬烷型倍半萜 d-刺参酮型倍半萜

[#]Compared with standard substance a-eudesmane-type b-cadinane-type c-eremophilane-type d-oplopanone-type

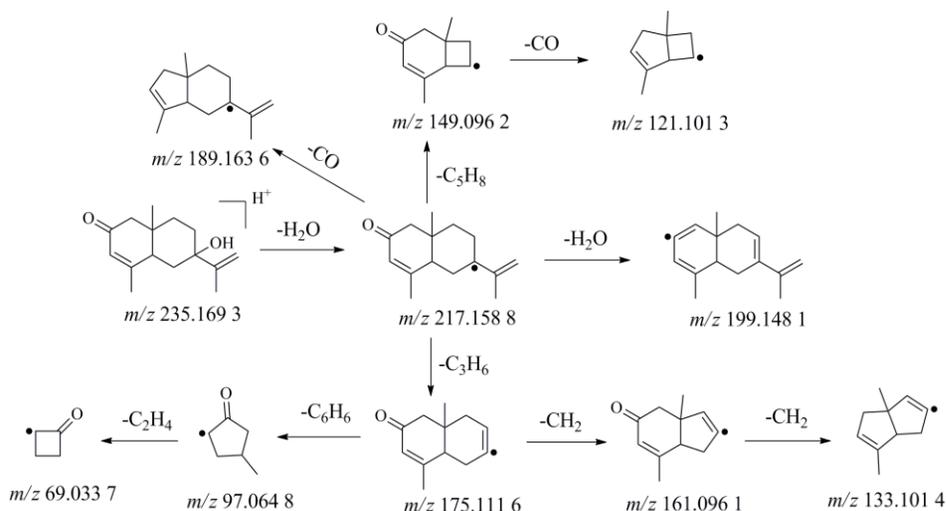


图 7 7-*epi*-teucrenone 质谱裂解途径

Fig. 7 Fragment pathway of 7-*epi*-teucrenone

223.169 3, 由此确定相对分子质量为 222.169 3。根据二级质谱提供的离子碎片, 可观察到有 H₂O、C₃H₆、C₄H₆、C₂H₂ 等中性丢失碎片, 结合精确质量数以及二级高分辨质谱图, 推断该化合物为 oxyphyllene H, 其质谱裂解途径见图 8。

3.3.3 艾里莫芬烷型倍半萜 本研究共鉴定 8 个艾里莫芬烷型倍半萜, 包括 (11*S*)-nootkatone-11,12-diol、diketone、11-hydroxy-valenc-1(10)-en-2-one、dehydro-nootkatone、nootkatol、eremophila-1(10), 11(12)-dien-2,9-dione、nootkatone、valencene。以 nootkatone 为例, 供试品中该化合物的保留时间为 14.96 min。根据一级质谱信息, 其 [M+H]⁺ 分子离子峰为 *m/z* 219.174 3, 由此确定相对分子质量为

218.174 3。根据二级质谱提供的离子碎片, 可观察到有 H₂O、C₄H₈、CH₂、CO 等中性丢失碎片, 结合精确质量数并与对照品对比, 推断该化合物为 nootkatone, 其质谱裂解途径见图 9。

3.3.4 刺参酮型倍半萜 本研究共鉴定出 1 个刺参酮型倍半萜 (oplopanone), 供试品中该化合物的保留时间为 10.98 min。根据一级质谱信息, 其 [M+H]⁺ 分子离子峰为 *m/z* 239.200 6, 由此确定相对分子质量为 238.200 6。根据二级质谱提供的离子碎片, 可观察到有 H₂O、C₃H₆、C₄H₈、C₄H₄、C₂H₄ 等中性离子丢失, 结合精确质量数并与对照品对比, 推断该化合物为 oplopanone, 其质谱裂解途径见图 10。

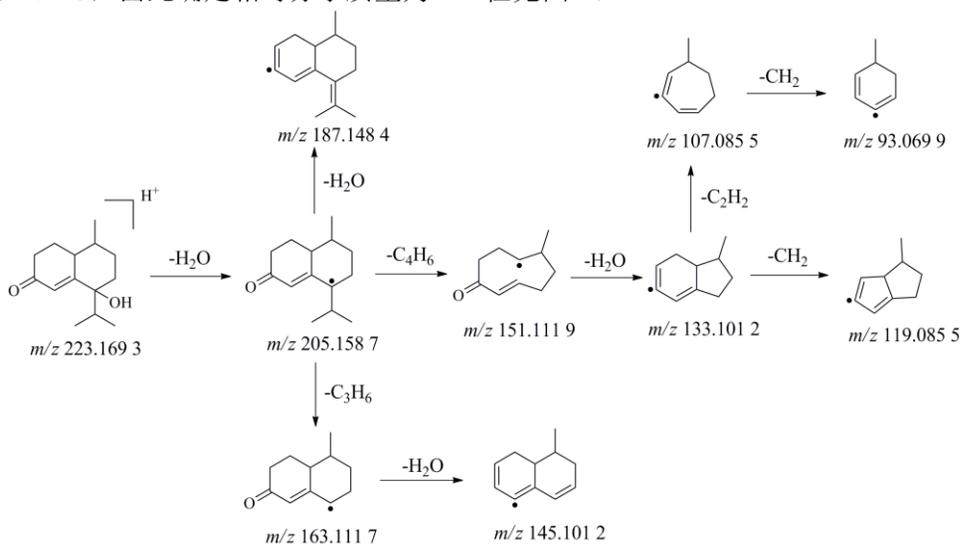


图 8 Oxyphyllene H 质谱裂解途径

Fig. 8 Fragment pathway of oxyphyllene H

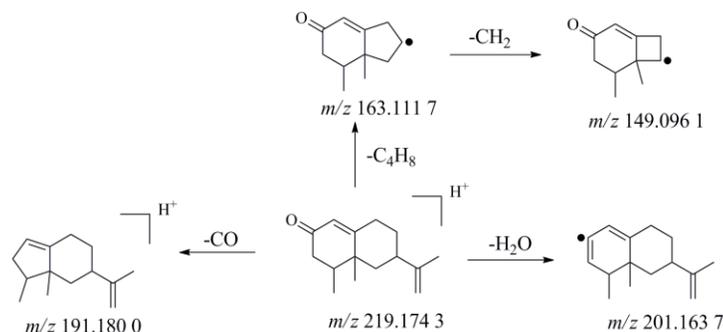


图 9 Nootkatone 质谱裂解途径

Fig. 9 Fragment pathway of nootkatone

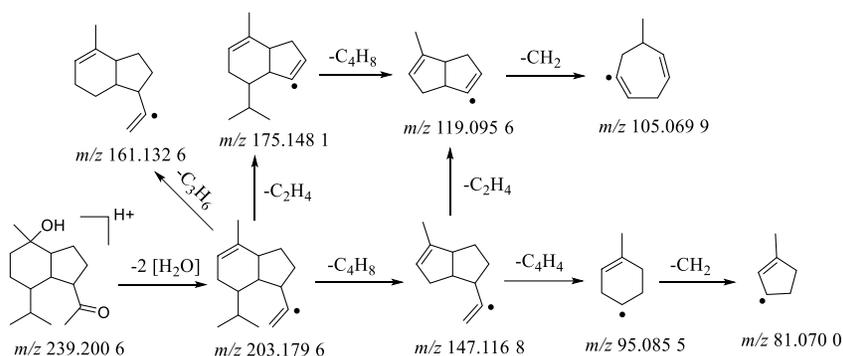


图 10 Oplopanone 质谱裂解途径

Fig. 10 Fragment pathway of oplopanone

4 讨论

4.1 制备方法的优化

诺卡酮作为益智仁中主要活性成分之一，具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、保护神经、提高学习记忆力等作用，在治疗阿尔茨海默病和护肝抗纤维化等方面具有潜在优势^[2-3]。已有研究表明，益智仁所含成分中诺卡酮居于首位（14.42%）^[16]。本课题组前期实验发现，益智仁提取物中诺卡酮峰面积是其他萜类化合物的几倍甚至几百倍。因此，本研究以诺卡酮的提取含量为指标，优化最佳提取条件，为倍半萜类化合物定性分析提供前期基础。

有关益智仁提取工艺研究多采用正交试验，但对分析各因素对提取效果的交互影响方面存在不足^[17]。本研究采用 Box-Behnken 响应面法，通过试验体系的响应值作为多个实验因素的函数，并将函数关系通过多维图形显示，结合图形分析、函数求导等方法优化试验设计中的提取条件^[18]。与传统正交和均匀设计法相比，Box-Behnken 响应曲面法可以通过有限的实验次数，建立各因素的多元二次模型，充分考察多个影响因素以及各因素之间的交互作用对提取率的影响，避免了简单的线性模式设计

实验预测值与真实值偏差较大的缺点，较好地保证准确度，得到准确预测值^[19]。

4.2 分析方法的优化

本实验在进行色谱柱的选择时，主要考察了 ACQUITY UPLC®HSS T3 型色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）和 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；结果显示这 2 种色谱柱分离效果均较好，但经 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ 色谱柱分离的多数化合物出峰偏靠前，保留时间较短，总分析时间相对缩短。因此，本实验选择了分析时间更短的 UPLC®BEH C₁₈ 色谱柱进行化合物的分离。

本实验分别比较了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水作为流动相系统时的色谱行为，对比发现乙腈-水的基线噪音稳定优于甲醇-水，主要表现为色谱峰大多不受基线噪音的干扰；在乙腈-0.1%甲酸水系统中，可见各成分分离度更好，且质谱响应有所提高；因此，最终选择乙腈-0.1%甲酸水两相作为本研究流动相系统。为了使化合物出峰更加提前且减少叠加的问题，本实验进一步对流动相梯度进行优化，确保了最优分离效果和较短的分析时间。

UHPLC-Q-Orbitrap 色谱质谱联用技术具有灵敏度高、稳定性好以及定性定量准确的优势,被广泛应用于中药或复杂基质中未知物的筛选、鉴定及定量分析。本实验采用基于四级杆-静电场轨道阱技术的高分辨质谱系统对益智仁中的倍半萜类活性化学成分进行定性研究,结合一级质谱所得精确质量数及二级高分辨质谱图等信息对可能的化合物进行确认,并采用 Mass Frontier 软件推断所得化合物的碎裂途径,极大程度上简化了数据处理流程,为益智仁中倍半萜类化合物的进一步研究提供实验依据。

本研究采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 对益智仁所含倍半萜类化学成分进行分析,共鉴定出 24 种倍半萜类物质。倍半萜类作为益智仁中主要特征化学成分,具有多种生物活性。如 nootkatone、 β -nootkatol、eremophila-1(10),11(12)-dien-2,9-dione、7-*epi*-teucrenone、teuhtenone A、oxyphyllene A、oxyphyllane F、(4a*S*,7*S*)-7-hydroxy-1,4a-dimethyl-7-(prop-1-en-2-yl)-4,4a,5,6,7-hexahydronaphthalen-2-(3*H*)-one、oxyphyllendiol A、oxyphyllendiol B 等倍半萜类成分能够抑制 NO 生成^[10,20-24]; nootkatone^[2,23]、valencene^[25-26]、oxyphyllene A^[23] 具有抗炎作用; nootkatone、oxyphyllol C、oplopanone、7-*epi*-teucrenone 具有神经保护活性^[3,9]; nootkatone 具有抗氧化、抑制凋亡、抑制 RBL-2H3 细胞释放 β -己糖胺酶等作用^[2,21,27]; 7-*epi*-teucrenone 能在一定范围内具有降低膀胱逼尿肌收缩张力^[28]; β -nootkatol 能够拮抗钙离子活性,并已被申请专利,注册为新型血管舒张药^[29]。本研究采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术,对益智仁中倍半萜类物质进行系统性鉴定分析,较全面地探究其药效物质基础,为益智仁质量控制水平的提升及其药物资源的进一步开发、利用与转化提供了科学依据和前期基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Kurdi A, Hassan K, Venkataraman B, *et al.* Nootkatone confers hepatoprotective and anti-fibrotic actions in a murine model of liver fibrosis by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, doi: 10.1002/jbt.22017.
- [3] Wang Y L, Wang M S, Xu M J, *et al.* Nootkatone, a neuroprotective agent from *Alpinia Oxyphyllae Fructus*, improves cognitive impairment in lipopolysaccharide-induced mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 62: 77-85.
- [4] 刘红, 郭祀远, 韩长日, 等. 益智有效抗氧化成分的分选条件的研究 [J]. *广西植物*, 2005, 25(5): 469-471.
- [5] He Z H, Ge W, Yue G G L, *et al.* Anti-angiogenic effects of the fruit of *Alpinia oxyphylla* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(2): 443-449.
- [6] 陈萍, 王培培, 焦泽沼, 等. 益智仁的化学成分及药理活性研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(4): 617-623.
- [7] 侯蕾. 益智化学成分的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [8] 江蓓. 益智仁的化学成分研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2012.
- [9] 刘楠. 益智仁化学成分的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2007.
- [10] Xu J J, Ji C J, Zhang Y M, *et al.* Inhibitory activity of eudesmane sesquiterpenes from *Alpinia oxyphylla* on production of nitric oxide [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(4): 1660-1663.
- [11] Luo J G, Lv X, Wang X B, *et al.* Sesquiterpenoids from the fruits of *Alpinia oxyphylla* and inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages [J]. *Phytochem Lett*, 2012, 5(1): 134-138.
- [12] 侯蕾, 王亚玲, 王文锦, 等. 益智仁化学成分研究 [J]. *中草药*, 2020, 50(2): 315-320.
- [13] Shi S H, Zhao X, Liu B, *et al.* The effects of sesquiterpenes-rich extract of *Alpinia oxyphylla* Miq. on amyloid- β -induced cognitive impairment and neuronal abnormalities in the cortex and *Hippocampus* of mice [J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2014, 2014: 1-11.
- [14] Sun Z, Kong X Z, Zuo L H, *et al.* Rapid extraction and determination of 25 bioactive constituents in *Alpinia oxyphylla* using microwave extraction with ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(3): 603-610.
- [15] 龚晓猛, 李梦琪, 吴珊珊, 等. 盐炙益智仁石油醚部位缩尿成分分离与药效学分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(6): 13-18.
- [16] 陈画虹, 朱文姬, 王冰洁, 等. 益智不同部位挥发油成分分析 [J]. *中药材*, 1999(9): 460-461.
- [17] 罗琴, 李星, 谭睿, 等. 益智仁挥发油的水蒸气蒸馏法提取工艺优化及其体外抑菌活性的研究 [J]. *华西药学杂志*, 2011, 26(2): 147-149.
- [18] Ahmad M A, Alrozi R. Optimization of preparation conditions for mangosteen peel-based activated carbons for the removal of Remazol Brilliant Blue R using response surface methodology [J]. *Chem Eng J*, 2010, 165(3): 883-890.

- [19] 王协和, 夏林丽, 呼梅, 等. Box-Behnken 响应曲面结合多指标综合评分法优选通脉复方提取工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(8): 712-716.
- [20] Muraoka O, Fujimoto M, Tanabe G, *et al.* Absolute stereostructures of novel norcadinane- and trinoreudesmane-type sesquiterpenes with nitric oxide production inhibitory activity from *Alpinia oxyphylla* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(16): 2217-2220.
- [21] Morikawa T, Matsuda H, Toguchida I, *et al.* Absolute stereostructures of three new sesquiterpenes from the fruit of *Alpinia oxyphylla* with inhibitory effects on nitric oxide production and degranulation in RBL-2H3 Cells 1 [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(10): 1468-1474.
- [22] Qing Z J, Yong W, Hui L Y, *et al.* Two new natural products from the fruits of *Alpinia oxyphylla* with inhibitory effects on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW_{264.7} macrophage cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(12): 2143-2146.
- [23] Ye W C, Al E. ChemInform abstract: New eudesmane sesquiterpenes from *Alpinia oxyphylla* and determination of their inhibitory effects on microglia [J]. *ChemInform*, 2013, doi: org/10.1002/chin.201343195.
- [24] Park D H, Lee J W, Jin Q H, *et al.* ChemInform abstract: A new noreudesmane-type sesquiterpenoid from *Alpinia oxyphylla* [J]. *ChemInform*, 2015, 46(2): 1565-1567.
- [25] Marques F M, Figueira M M, Schmitt E F P, *et al.* *In vitro* anti-inflammatory activity of terpenes via suppression of superoxide and nitric oxide generation and the NF- κ B signalling pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(2): 281-289.
- [26] Yang I J, Lee D U, Shin H M. Inhibitory effect of valencene on the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/nga mice [J]. *Evid-Based Complementary Altern Med*, 2016, 2016: 1-11.
- [27] 刘红. 益智的抗氧化作用及成分研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2006.
- [28] 龚晓猛, 李梦琪, 吴珊珊, 等. 盐炙益智仁石油醚部位缩尿成分分离与药效学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 13-18.
- [29] Shoji N, Umeyama A, Takemoto T, *et al.* Isolation of a cardiogenic principle from *Alpinia oxyphylla* [J]. *Planta Med*, 1984, 50(2): 186-187.