

液相色谱-串联质谱法分析绵马贯众 抗禽流感病毒活性部位的化学成分

陈建新¹, 曾振灵¹, 杨运云², 牟德海², 陈杖榴¹, 方炳虎¹

(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, 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070)

Investigation of Chemical Constituents of Anti-AIV Fractions from *Dryopteris Crassirhizoma* by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

CHEN Jian-xin¹, ZENG Zhen-ling¹, YANG Yun-yun²,
MOU De-hai², CHEN Zhang-liu¹, FANG Bing-hu¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. China National Analytical Center At Guangzhou, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The chemical constituents of anti-avian influenza virus (AIV) fractions from *Dryopteris Crassirhizoma* were investigated using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MSⁿ). 52, 38 and 20 chromatogram peaks were detected using HPLC-MSⁿ in (+) ESI, (-) ESI and (+) APCI modes, respectively. The result showed that most constituents of anti-avian influenza virus (AIV) fractions from *Dryopteris Crassirhizoma* were phlorophenone derivatives. Fourteen phlorophenone derivatives from *Dryopteris Crassirhizoma* were identified and characterized basing on MSⁿ data. The results of this paper provided available data for further studies on anti-AIV constituents and fingerprint of *Dryopteris Crassirhizoma*.

Key words: *Dryopteris Crassirhizoma*; anti-avian influenza virus (AIV); liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MSⁿ); phlorophenone derivatives

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2006)增刊-118-03

绵马贯众系鳞毛蕨科 *Dryopteris Crassirhizoma* Nakai 的根茎, 是贯众用作中药的主流品种, 具有清热解毒、驱虫、止血等功效, 其应用始载于《神农本草经》。现代研究表明, 绵马贯

众具有抗肿瘤、抗疟、抗病毒等活性^[1]。我们利用鸡胚试验, 发现绵马贯众对禽流感 H₉N₂ 亚型病毒具有显著抑制作用, 0.625 mg 的醇提取物即能有效抑制鸡胚内病毒的繁殖; 小鼠试验表明绵

马贯众提取物对感染流感病毒的小鼠具有保护作用^[2]。正丁醇萃取物为其活性部位。

本文采用高效液相色谱梯度洗脱,ESI/APCI-离子阱质谱检测,对绵马贯众抗禽流感病毒的活性部位-正丁醇萃取物进行了初步分析,获得了活性部位主要组分的分子质量信息及其多级质谱“指纹”信息,识别了14种化学成分,为绵马贯众抗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HPLC级,水为MiliQ超纯水,甲酸、石油醚(60~90℃沸程)、乙酸乙酯、正丁醇及95%的乙醇均为分析纯。绵马贯众由北京中医药大学中药学院高增平副研究员及中科院长春应用化学研究所赵宇峰博士惠赠。

1.2 样品处理

50g绵马贯众粉碎成粗粉,用500mL50%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100mL水溶解,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取各3次,将相同萃取液合并旋蒸近干后加适量助溶剂溶解于水,剩余水层浓缩至50mL。分别试验四种极性部位对鸡胚的毒性及其对禽流感病毒的抑制作用,取对禽流感病毒有显著抑制活性的正丁醇萃取物进行液相色谱-质谱分析。

1.3 仪器及条件

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

质谱条件:ESI离子源,正、负离子模式检测;APCI离子源,正离子模式检测;雾化器N₂压力40psi;干燥气N₂流速9L/min;质量扫描范围100~1000u;自动3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 不同电离方式比较

尽管贯众提取物的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及各色谱组分的质谱有显著差异。比较不同电离方式在相同保留时间的色谱组分的一级质谱,可以看出ESI正离子、ESI负离子、APCI正离子三种电离方式检测到的离子不完全一致,表1比较了三种检测模式在同一保留时间检测到的一级质谱离子,并根据相同保留时间色谱组分在两种或三种电离模式下均能检测到的离子推测出该组分含有的成分的相对分子质量。结果表明,共有9个组分能在APCI(+)、ESI(+)和ESI(-)三种电离模式下同时被检出,共有8个组分能在APCI(+)和ESI(+)两种电离模式下同时被检出,共有3个组分能在APCI(+)和ESI(-)两种电离模式下同时被检出。APCI(+)和ESI(+)能同时检测到的组分主要在色谱分离的前半段($t_R < 32.0$ min),三种模式能同时检测到的组分主要在色谱分离的后半段($t_R > 32.0$ min)。比较相同保留时间三种电离模式检测到的色谱组分的一级质谱,可以看出ESI(-)容易检测出的质量数较大的组分,而APCI(+)和ESI(+)易检测出质量数较小的组分。

2.2 多聚间苯三酚类衍生物的结构推测

吴寿金、高增平等研究发现绵马贯众种含有白绵马素AA等9种间苯三酚类衍生物^[3]。本实验利用HPLC-ESI/APCI-MS联用分析贯众有效部位,得到了有效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中包含 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中包含 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报道基础上^[4],本文根据贯众有效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,确定了绵马贯众活性部位中含有14种多聚间苯三酚类衍生物,其名称(相对分子质量)分别是:根皮吡喃酮PB(348)、黄绵马酸AA(390)、白绵马素AA(404)、绵马素AA(404)、绵马素AP(418)、黄绵马酸AB(418)、绵马酸ABA(598)、

绵马根酸 ABA(612)、绵马酸 ABB(626)、绵马酸 PBP(640)、东北贯众素 ABAA(792)、东北贯众素 ABPP(820)、东北贯众素 ABBP(834)、东北贯众素 PBBP(848)等。其中根皮吡喃酮 PB、

黄绵马酸 AA、绵马素 AA、绵马素 AP、绵马酸 ABA、绵马酸 ABB、绵马酸 PBP、东北贯众素 ABPP、东北贯众素 PBBP 等 9 种化合物为首次在绵马贯众中发现的新化合物。

表 1 两种或三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 active fractions against AIV from *Dryopteris Crassirhizoma*

序号	保留时间 t_R /min	MS ¹ 主要离子			组分相对分子质量
		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(ESI+),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

注: * 推测组分相对分子质量依据的离子。

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[P]. CN200610011341.4.
- [3] 高增平,陆蕴如,江佩芬,等. 绵马贯众部位 II 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.

- [4] Carl Johan, Christopher Roy, Tadeus Reichstein, et al. A survey of phenolic compounds in *Dryopteris* and related fern genera [J]. *Ann. Bot. Fennici*, 2001, 38(4):99-138.