

有机质谱学在厚朴酚与和厚朴酚结构确定中的应用

曾 志^{1, 2}, 赵富春^{1, 3}, 蒙绍金¹

(1. 华南师范大学化学与环境学院, 广东 广州 510631;

2. 秋田省立大学生物资源科学学院, 日本 秋田 010-0195;

3. 华南热带农业大学理工学院, 海南 儋州 571737)

摘要:采用超临界 CO₂ 提取方法对厚朴药材的化学物质进行提取, 用毛细管气相色谱-质谱联用技术 (GC/MS) 对提取物进行分析。在厚朴酚与和厚朴酚的质谱中, 其分子离子峰 M⁺ (m/z 266) 均为基峰, 主要碎片峰 m/z 237、184、165、91、77 都相一致, 而碎片峰 m/z 247 是区别厚朴酚与和厚朴酚化学结构的典型质谱特征。

关键词:厚朴; 厚朴酚; 和厚朴酚; 有机质谱学; 结构确定

中图分类号: O657. 63; R284. 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2006)02-65-06

Applications of Organic Mass Spectrometry in
Structure Elucidation of Magnolol and HonokiolZENG Zhi^{1, 2}, ZHAO Fu-chun^{1, 3}, MENG Shao-jin¹

(1. School of Chemistry and Environment, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Akita 010-0195, Japan;

3. College of Technology, South China University of Tropical Agriculture, Danzhou 571737, China)

Abstract: Chemical substances of *Magnolia officinalis* were extracted by supercritical CO₂ method. The extract was analyzed by capillary gas chromatography combined with mass spectrometric detection (GC/MS). In the mass spectra of both magnolol and honokiol, the both molecular ion peaks at m/z 266 (M⁺) are the basic peaks. The main fragment peaks at m/z 237, 184, 165, 91, 77 are the same. But the fragment peak at m/z 247 is the typical characteristic of the mass spectra to differentiate the chemical structures between magnolol and honokiol.

Key words: *Magnolia officinalis*; magnolol; honokiol; organic mass spectrometry; structure elucidation

收稿日期: 2005-06-13; 修回日期: 2006-02-20

基金项目: 本文系广东省科技计划重大专项 (No. A 301020101)、广东省自然科学基金 (No. 01142)、广东省教育厅高校自然科学研究项目 (No. 0124) 和广东省中医药局科研项目 (No. 403047, 401039) 资助

作者简介: 曾 志 (1962 ~), 男 (汉族), 湖南岳阳人, 博士, 教授。研究方向: 有机质谱学在中药有效成分研究中的应用, 中药现代化与天然产物化学。E-mail: zhizeng@scnu.edu.cn; zhizeng@akita-pu.ac.jp

厚朴为木兰科植物厚朴 (*Magnolia officinalis* Rehd et Wils.) 的干燥干皮,是我国传统中药材,被誉为三木药材之一。它也是国家计划管理的麝香、甘草、杜仲、厚朴四种重要药材之一,主产于四川、湖北、浙江、江西等省。厚朴是一种被广泛使用的芳香化湿类中药,具有中枢镇静等功效^[1-2]。在中国、日本被作为镇痛剂、镇静剂、胃药、止咳药广泛使用。随着厚朴中的厚朴酚与和厚朴酚各种生理作用的深入研究,厚朴酚与和厚朴酚被认为是厚朴的主要有效成分^[3]。药理实验表明,厚朴酚能松弛大鼠血管平滑肌,清除羟基自由基,抑制嗜中性粒细胞聚集和超氧化物阴离子的产生;阻断体外实验人体肝细胞的增生,具有消炎止痛作用;保护心脏;抑制大鼠 A23187 诱导嗜中性粒细胞中凝血噁烷 B₂ (TXB₂) 和 LTB₄ 的形成^[4];在 1~100 $\mu\text{mol/L}$ 可以使中性粒细胞的超氧阴离子的产生增加,在大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时可以明显地抑制激活的中性粒细胞 β -葡萄糖苷酸酶和溶菌酶的释放;同时对白细胞 LTB₄ 和 5-HETE 的生物合成有较强的抑制作用,还可以抑制趋化三肽 (fMLP) 刺激的白细胞内钙升高^[5]。和厚朴酚对革兰氏阴性菌、耐酸性菌、真菌、生霉菌、链球菌等有明显的抗菌活性,对三种致病细菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、链球菌)均有很强的抑菌作用,抑菌浓度约为 10 mg/L^[6];它对阻止血小板凝结、抗血栓形成、促进血液循环也有显著的作用;对自由基引起的感染、癌症、老化、白内障及自身免疫障碍的治疗也有一定效果^[2,7]。

超临界流体具有高度溶解性,能加快物质迁移速率,其操作具有可控性,还具有避免热降解和溶剂污染等优点,因此受到中药有效成分研究领域的极大关注。本文用超临界 CO₂ 对厚朴药材中的有效成分进行提取,用 GC/MS 联用技术对提取物化学成分及相对含量进行分析。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

药材厚朴购于广州市清平中药材专业市场,经鉴定为植物厚朴 (*Manolia officinalis*) 的干燥干皮,粉碎过 20 目筛备用。HA-121-50-01 型超临界提取装置由两个解析釜进行二级分离,CO₂ 为超临界流体状态。HP 6890 型气相色谱

仪(美国 HP 公司),Platform II GC/MS 联用仪(英国 Micromass 公司)。

1.2 超临界 CO₂ 提取

对超临界 CO₂ 的提取条件,如温度、压力等进行了优化以得到最好的提取率,发现在压力为 25 MPa,温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,提取时间为 1.5 h 的条件下提取率较高。取一定量的厚朴药材投入提取釜中,对提取釜、解析釜 I、解析釜 II 及贮藏罐分别进行加热或冷却。当提取釜温度达到 35 $^{\circ}\text{C}$ 时,解析釜 I 的温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,解析釜 II 的温度达到 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,打开 CO₂ 气瓶;当提取釜压力达 25 MPa,解析釜 I 的压力达到 6 MPa,解析釜 II 的压力达到 6 MPa 时,开始循环提取;CO₂ 流量为 20 kg/h 左右,提取 1.5 h 后从解析釜出料口出料,得淡黄色油状物,收率为 8.6 %。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 毛细管色谱用 HP 6890 型色谱仪和 DB1 柱 (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm)。程序升温:60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min,以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 240 $^{\circ}\text{C}$,再以 23 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 290 $^{\circ}\text{C}$ 保持至完成分析。进样温度 280 $^{\circ}\text{C}$,分流比 20 : 1,载气:He,载气流速 1 mL/min。

1.3.2 质谱条件 EI 电离方式;电子能量 70 eV;离子源温度:180 $^{\circ}\text{C}$;离子流:200 μA ;扫描质量范围 m/z 50~500。质谱数据库:NIST Mass Data Base (1994)。

1.3.3 样品处理 取超临界提取物 10 mg 溶于二氯甲烷中,取 1 μL 进样。

2 结果与讨论

2.1 厚朴超临界 CO₂ 提取物的化学组成

应用 GC/MS 技术对厚朴超临界 CO₂ 提取物的化学组成进行分析,鉴定出 20 个化合物;应用峰面积归一化法确定了它们的相对含量,结果见表 1。从表 1 可以看出:超临界 CO₂ 提取物的主要化学成分为厚朴酚与和厚朴酚,二者的含量为 85.90 %。

2.2 有机质谱学在厚朴酚与和厚朴酚结构确定中的应用

曾志曾经应用有机质谱学对海洋甾醇及其衍生物的结构进行较系统的研究^[8-10]。近期正致力于应用有机质谱学对中药的有效成分进行研究^[11]和应用色谱指纹图谱对中药的质量控制

表 1 厚朴超临界 CO₂ 提取物的化学组成及相对含量

Table 1 The chemical composition the extract from <i>Magnolia officinalis</i> by supercritical CO ₂ method					
编号 No.	保留时间 <i>t</i> _R /min	组成 Composition	相似度 Similarity /%	<i>M</i> _r	相对含量 Relative content /%
1	24. 21	3,3-二甲基-双环[2. 2. 1]庚烷-2-羧酸甲酯 methyl 3,3-dimethyl-bicyclo[2. 2. 1]heptane-2-carboxylate	87	182	0. 15
2	32. 14	咕吧烯 copanen	90	204	0. 24
3	34. 66	石竹烯 caryophyllene	89	204	0. 26
4	35. 39	异喇叭烯 isodene	85	204	0. 15
5	38. 69	枝叶二烯 eudesma-4(14),11-diene	89	204	0. 56
6	39. 23	十氢-4a-甲基-1-亚甲基-7-异丙基萘 decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)naphthalene	93	204	0. 83
7	39. 70	α-依兰油烯 α-muurolene	89	204	0. 53
8	41. 05	1,2,3,5,6,8a-六氢-4,7-二甲基-1-异丙基萘 1,2,3,5,6,8a-hexa- hydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-naphthalene	81	204	0. 54
9	44. 17	石竹烯氧化物 caryophyllene oxide	88	220	0. 53
10	45. 64	1,5,5,8-四甲基-12-含氧双环[9. 1. 0]十二-3,7-二烯 1,5,5,8-tetramethyl-12-oxabicyclo[9. 1. 0]dodeca-3,7-diene	92	220	0. 25
11	46. 99	1,2,3,4,4a,5,6,7-八氢-α,α,4a,8-四甲基-2-羟甲基萘 1,2,3,4,4a,5, 6,7-octahydro-α,α,4a,8-tetramethyl-2-naphthalenemethanol	89	220	0. 35
12	47. 93	十氢-α,α,4a-三甲基-8-亚甲基-2-萘甲醇 decahydro-α,α,4a-trimethyl-8-methylene-2-naphthalenemethanol	93	222	1. 16
13	48. 53	1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢-8-四甲基-2-羟甲基萘 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-8-tetramethyl-2-naphthalenemethanol	93	222	1. 02
14	56. 44	愈创木醇 guaiol	87	222	0. 29
15	69. 91	苯基丙酸苯丙烯酸酯 cinnamyl phenylpropionate	85	162	0. 17
16	75. 13	厚朴酚 magnolol	91	266	50. 82
17	75. 64	3-苯基-2-(3'-甲基-1H-吲哚-2'-基)-1H-吲哚 3-phenyl-2-(3'-methyl-1H-indol-2'-yl)-1H-indole	81	322	1. 52
18	77. 98	3-甲氧基-雌-1,3,5,7,9-戊烯-17-酮 3-methoxy-estra-1,3,5,7,9-pentaen-17-one	87	280	2. 74
19	78. 40	2,4,6-三甲基-苯甲酸 5-亚甲基-1,3a,4,5,6,6a-六氢并环戊二烯-1-酯 5-methylene-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropentalen-1-yl 2,4,6-trimethyl- benzoate	84	282	2. 11
20	80. 59	和厚朴酚 honokiol	59	266	35. 08

进行研究^[12]。在应用气质联用技术研究中药有效成分的化学结构时,一般利用检索质谱数据库来确定化合物的结构。然而,由于数据库自身收录的质谱数据源未必齐全完备,少数特别成分的质谱图与检索出的质谱图有一定差异,检索的相似度不高,这些特别成分仅按质谱数据库检索出的化合物为鉴定依据会出现差错。在这种情况下,应用有机质谱学规律和一些文献质谱数据来进一步确证这些特别成分的化学结构才能保证结论的正确性^[8-11]。

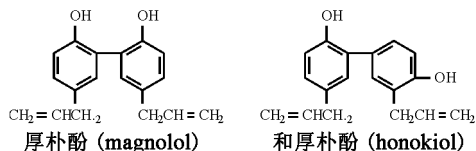


图 1 厚朴酚与和厚朴酚的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of magnolol and honokiol

在研究厚朴超临界 CO_2 提取物的化学组成时,获得了化合物 16 与化合物 20 的质谱图。化合物 16 的质谱与检索质谱数据库中厚朴酚的质谱相一致,如图 2,其相似度为 91 %。根据图 3 中厚朴酚的质谱裂解规律可进一步加以确证。在厚朴酚的质谱中,其分子离子峰 M^+ (m/z 266) 为基峰。分子离子峰失去 1 个羟基氢后再失去 1 个羰基 $[\text{H} + \text{CO}]$ 形成碎片峰 m/z 237 $[M^+ - 29]$,说明分子中有与碳相连的羟基。分子离子峰分别失去 1 个烯丙基 $[\cdot \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2]$ 形成碎片峰 m/z 224 $[M^+ - 41]$ 和失去 2 个烯丙基 $2 \times [\cdot \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2]$ 形成碎片峰 m/z 184 $[M^+ - 2 \times 41]$,说明分子中有 2 个烯丙基。碎片峰 m/z 184、165、91、77 表明分子中有联苯酚结构单元的存在。根据图 3 中厚朴酚主要质谱碎片的裂解规律,特征碎片峰 m/z 247 表明了联苯酚结构单元中两个与羟基相连

的苯环由相邻近的对称位(2,2'位)相连接。这样的分子结构有利于形成厚朴酚中碎片峰 m/z 247 的大 π 共轭体系,因此有一定的丰度。

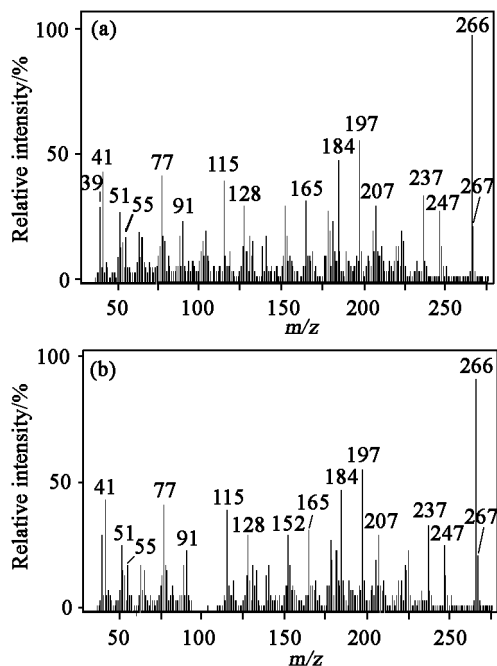


图 2 化合物 16 与厚朴酚的质谱比较

(a) 化合物 16 的质谱, (b) 厚朴酚的质谱

Fig. 2 The mass spectra comparison between compound 16 and magnolol

(a) mass spectrum of compound 16, (b) mass spectrum of magnolol

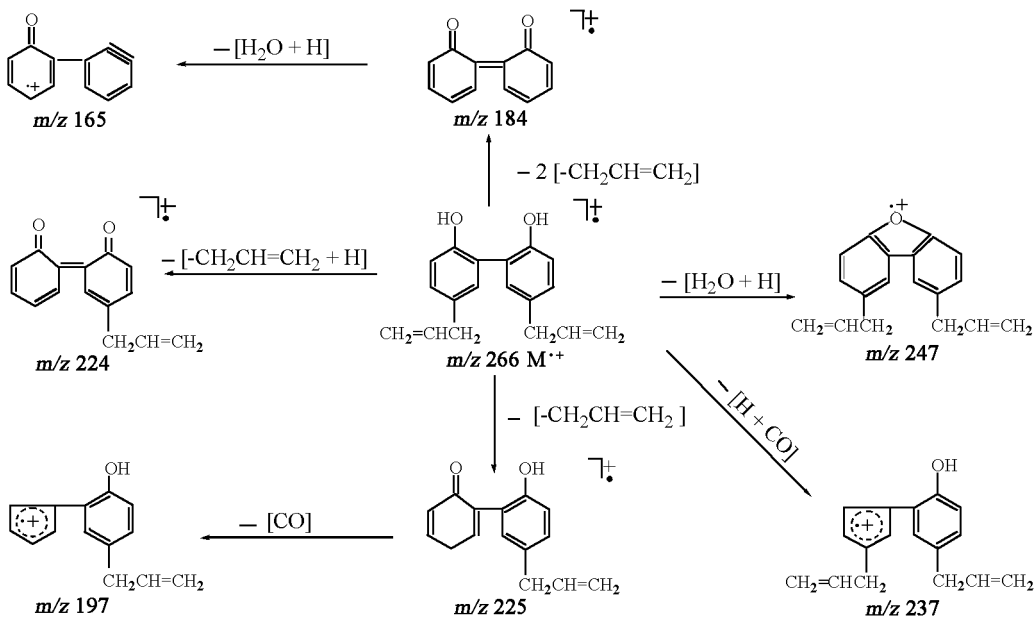


图 3 厚朴酚主要质谱碎片的裂解机理

Fig. 3 Cleavage mechanism of main fragments of magnolol

在化合物 **20** 的质谱中,其分子离子峰也是 m/z 266 $[M^+]$,为基峰。然而,化合物 **20** 的质谱与检索质谱数据库为马萆雌酮(equilenin)的质谱有一定差异,如图 4,其相似度仅为 59 %。两者的质谱除分子离子峰相一致和碎片峰 m/z 197、165 都出现外,化合物 **20** 的质谱中丰度较高的特征峰 m/z 237、224、184、91、77 在马萆雌酮的质谱中没有出现。根据这些质谱特征可以确定化合物 **20** 不是质谱库中检索出的马萆雌酮。将化合物 **20** 的质谱与厚朴酚的质谱相比较,除了厚朴酚的质谱中的特征峰 m/z 247 在化合物 **20** 的质谱中没有出现外,其他特征峰 m/z 266 $[M^+]$ 、237、224、197、184、165、91、77 都相一致,可以确定化合物 **20** 与厚朴酚的化学结构相类似。化合物 **20** 的质谱中出现了表明分子中有联苯酚结构单元的碎片峰 m/z 184、165、91、77,却没有出现表明联苯酚结构单元中两个与羟基相连的苯环相邻近的对称位(2,2'位)相连接的质谱特征峰 m/z 247,说明分子中联苯酚结构单元两个与羟基相连的苯环相连接的不在相邻近的对称位。根据图 5 中和厚朴酚主要质谱碎片的裂解规律,两者的质谱数据相一致,可以确定化合物 **20** 为和厚朴酚。

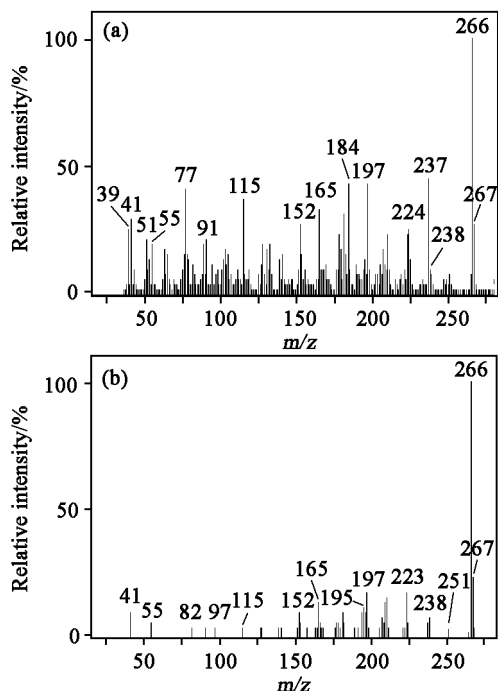


图 4 化合物 **20**(和厚朴酚)与马萆雌酮的质谱比较
(a) 化合物 **20** 的质谱;(b) 马萆雌酮的质谱

Fig. 4 The mass spectra comparison between compound **20** (konokiol) and equilenin
(a) mass spectrum of compound **20** (konokiol);
(b) mass spectrum of equilenin

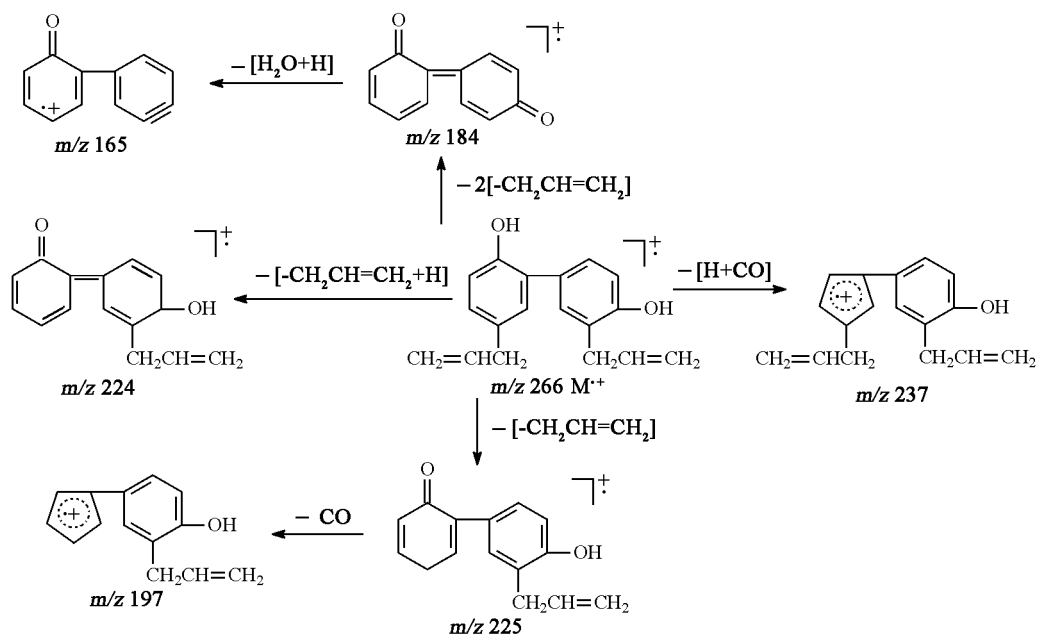


图 5 和厚朴酚主要质谱碎片峰的裂解机理

Fig. 5 Cleavage mechanism of main fragments of honokiol

3 结 论

本研究应用有机质谱学对厚朴酚与和厚朴酚进行了结构鉴定。在厚朴酚与和厚朴酚的质谱中,其分子离子峰 m/z 266 M^+ 都为基峰。碎片峰 m/z 237、184、165、91、77 都相一致。厚朴酚的特征碎片峰 m/z 247 表明了联苯酚结构单元中两个与羟基相连的苯环由相邻近的对称位(2,2'位)相连接。这样的分子结构有利于形成厚朴酚中碎片峰 m/z 247 的大 π 共轭体系。而和厚朴酚却没有出现质谱特征峰 m/z 247,说明分子中联苯酚结构单元两个与羟基相连的苯环相连接的不在相邻近的对称位。质谱碎片峰 m/z 247 是区别厚朴酚与和厚朴酚化学结构的质谱典型特征。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2000: 204-205.
- [2] Wu X, Chen X, Hu Z. High-performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Honokiol and Magnolol in Rat Plasma[J]. Talanta, 2003, 59(1):115-121.
- [3] Keiichi S, Yuji I, Kazuhiko S, et al. Determination of Magnolol and Honokiol in Magnoliae Cortex Using Supercritical Fluid Chromatography On-line Coupled with Supercritical Fluid Extraction by On-column Trapping[J]. Journal of Chromatography A,1997,786: 366-370.

- [4] Hsu M, Lu M, Tsao L, et al. Mechanisms of the Influence of Magnolol on Eicosanoid Metabolism in Neutrophils [J]. Biochemical Pharmacology, 2004, (67): 831-840.
- [5] 李杰萍,梁 统,周克元. 厚朴酚对趋化三肽激活的中性粒细胞功能的影响[J]. 中国药科大学学报,2003,34(3):260-263.
- [6] 林桂云,谢生发,谢 鸿,等. 和厚朴酚抑菌作用的研究[J]. 成都大学学报,2003,22(2):18-20.
- [7] 胡劲波,龚思源,孙成科,等. 和厚朴酚的电化学行为及反应机理研究[J]. 分析化学,2000,28(5): 539-543.
- [8] 曾 志,曾陇梅. 甾醇及其衍生物的质谱学规律(IV),普通饱和侧链及侧链含有环丙烷结构单元的 Δ -5-甾醇乙酸酯的质谱特征研究[J]. 质谱学报,1997,18(1):7-13.
- [9] 曾 志,曾陇梅. 甾醇及其衍生物的质谱规律(III), 5α -饱和甾核,4-甲基- 5α -饱和甾核, Δ -3-甾酮的质谱特征研究[J]. 质谱学报,1996,17(4):13-18.
- [10] 曾 志,曾陇梅. 甾醇及其衍生物的质谱学规律(II), Δ -5-, Δ -7-, Δ -8-甾醇乙酸酯的质谱特征研究[J]. 质谱学报,1996,17(3):25-30.
- [11] 曾 志,石建功,曾和平,等. 有机质谱学在中药鱼腥草研究中的应用[J]. 分析化学,2003,31(4): 399-404.
- [12] 曾 志,杨东晖,陶敬奇,等. 高效液相色谱指纹图谱在中药芦根上的应用[J]. 分析化学,2004,32(8):1 035-1 038.