

基于 UPLC-QTOF-MS 技术分析野生与栽培杨树桑黄的化学成分

谷立峰^{1,3*}, 范宇光², 包海鹰³, 图力古尔³, 叶嘉¹¹邯郸学院生命科学与工程学院, 邯郸 056005; ²海南医学院药学院, 海口 571199;³吉林农业大学药用菌物资源及其开发利用重点实验室, 长春 130118

摘要:采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱(UPLC-QTOF-MS)技术快速识别和鉴定了野生与栽培杨树桑黄子实体的化学成分。选用反相 Waters Acuity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 甲醇与水(含 0.1% 甲酸)作为流动相二元线性梯度洗脱, 在电喷雾负离子模式下扫描化合物的分子离子峰、二级质谱碎片信息, 并结合保留时间和相关文献, 从野生和栽培杨树桑黄子实体中共鉴定出 40 个化合物, 包括小分子有机酸 8 个、儿茶素类 3 个、吡喃酮类 20 个、黄酮 9 个, 其中野生和栽培子实体中共有成分 14 个, 野生子实体中特有成分 14 个, 栽培子实体中特有成分 12 个。分析结果表明吡喃酮酚类化合物是杨树桑黄子实体中的主要活性成分之一, 本研究可为野生和栽培杨树桑黄子实体的快速鉴定、质量控制以及阐明药效物质基础提供参考。

关键词:杨树桑黄; 吡喃酮; 黄酮; 超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱

中图分类号: R932; Q946.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)11-1818-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.11.002

Characterization of chemical compositions from the wild and cultivated *Sanguangporus vaninii* based on UPLC-QTOF-MS

ZAN Li-feng^{1,3*}, FAN Yu-guang², BAO Hai-ying³, Tolgor³, YE Jia¹¹School of Life Science and Engineering, Handan University, Handan 056005, China;²Pharmacy College, Hainan Medical University, Haikou 571199, China;³Key Laboratory of Medicinal Fungal Resources and Development and Utilization, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: The chemical compositions in wild and cultivated fruiting body of *Sanguangporus vaninii* were analyzed rapidly by ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS). Waters Acuity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) chromatographic column and methanol with water (containing 0.1% formic acid) gradient elution were used to analyze the extracts sample. The ESI-MS negative molecular ion peaks, MS² product ions, retention time and together with the references were used to tentative identify the chemical constituents. The results indicated that 40 metabolites from wild and cultivated fruiting bodies of *S. vaninii* were identified, including 8 organic acids, 3 catechins, 20 pyranones and 9 flavonoids, of which 14 components in wild and cultivated fruiting body, 14 unique components in wild and 12 unique components in cultivated fruiting body. The analysis results showed that pyranone phenolic compounds were presumed to be mainly active components in the fruiting body of *S. vaninii*. This method is rapid, sensitive, which can provide the reference for evaluation of the quality from *S. vaninii*.

Key words: *Sanguangporus vaninii*; pyranone; flavonoid; UPLC-QTOF-MS

杨树桑黄 (*Sanguangporus vaninii* (Ljub.) L. W. Zhou & Y. C. Dai) 隶属于锈革孔菌科 (Hymenochaetaceae) 桑黄菌属 (*Sanguangporus*) 的多年生大型药用真菌^[1]。生长于山杨 (*Populus davidiana*)

活立木、倒木及树桩上, 主要分布于中国长白山和小兴安岭地区以及日本、朝鲜、韩国等东北亚国家^[2]。杨树桑黄具有利五脏, 软坚和胃, 护肝益气之功效, 临床上主治胃失和降, 肝阳上亢, 肾虚精亏。现代研究发现杨树桑黄具有良好的抗肿瘤、免疫调节、抗菌、抗氧化和保肝护肝等多种药理活性, 从其子实体中分离得到麦角甾-4, 6, 8(14), 22(23)-四烯-3-酮、

收稿日期: 2021-04-07 接受日期: 2021-09-10

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (C2019109043)

* 通信作者 E-mail: tengfei007zlf@126.com.

樱花亭、二氢茨非素、7-甲氧基二氢茨非素、3,4,5-三羟基-7-甲氧基-二氢黄酮醇、4-(3,4-二羟苯基)-3-丁烯-2-酮、hispolon 等麦角甙、黄酮、吡喃酮类活性成分^[34]。

杨树桑黄是目前市场上主要商品化的“桑黄”物种,栽培技术较为成熟,其子实体栽培包括木段栽培和木屑代料栽培两种模式。有研究发现^[5],木段和木屑代料栽培桑黄子实体提取物对肿瘤细胞增殖具有良好的抑制作用,且发现活性成分黄酮、多酚含量与肿瘤细胞增殖抑制和体外抗氧化能力趋势一致。Huo^[6]研究发现杨树桑黄水提取物对小鼠各器官没有明显的毒副作用,主要成分为多糖、核苷酸、多酚类化合物,其中多酚为其主要活性成分。目前杨树桑黄子实体质量标准中仅包括总多糖、总酚及麦角甙醇的含量,而关于野生和不同栽培杨树桑黄子实体中活性指标成分的系统分析未见详细报道,同时桑黄中吡喃酮酚类成分易在分离过程中发生结构变化,不易准确鉴定其结构。超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱(UPLC-QTOF-MS)技术兼具液相色谱的高效分离能力与质谱的高灵敏度、高检测能力,在药物有效成分分析、药效物质基础研究等方面具有独特的优势。本研究拟采用 UPLC-QTOF-MS 技术,根据化合物保留时间、分子离子峰及二级质谱裂解碎片并参照相关文献系统分析野生和栽培杨树桑黄子实体中的活性成分,旨在为进一步指导杨树桑黄开发及提升质量控制标准提供技术支持,同时为其药用功能研究奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

野生杨树桑黄、栽培杨树桑黄子实体于 2020 年 8 月由海南医学院药学院范宇光博士提供并鉴定,3~8℃低温放置备用。

甲醇和甲酸为色谱级,购自美国 Sigma 公司,其余试剂为分析纯,实验用水为超纯水。Seplite AB-8 型大孔吸附树脂购于西安蓝晓科技有限公司。

1.2 仪器与设备

Acquity UPLC-G2 QTOF 联用系统(Waters 公司);Waters BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);N-1200B 旋转蒸发器(东京理化器械株式会社);Mill-Q Advantage A10 超纯水仪(Millipore 公司)。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

杨树桑黄子实体粉碎至 20~40 目,称取粉末

200 g,先采用正己烷在 40℃脱脂 3 次,阴干后用 80%的乙醇按料液比 1:7.5 在 45℃浸提 3 次,每次 1.5 h,合并提取液并离心过滤,过滤液在温度为 45~50℃减压浓缩为水混悬液,水混悬液采用大孔吸附树脂吸附分离纯化,85%乙醇解吸得到解吸液,解吸液减压蒸发浓缩后冷冻干燥得到粉末,分析前取适量用甲醇溶解并过 0.22 μm 滤膜,即得样品溶液。

1.3.2 色谱条件

色谱柱为 Waters BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为甲醇,B 相为水溶液(含 0.1% 甲酸),流动相梯度洗脱过程如下:5% A (0~2 min),5%→100% A (2~30 min),100% A (30~35 min),100%→5% A (35~35.1 min),5% A (35.1~40 min);流速为 0.3 mL/min;进样量为 10 μL;柱温 40℃。

1.3.3 质谱条件

电喷雾离子源(ESI)负离子模式扫描,扫描范围质荷比(m/z)50~1 200,毛细管电压为 2 800 V,样品锥孔电压 30 V,萃取锥孔电压 1 V,离子源温度 100℃,脱溶剂温度 300℃,锥孔气 50 L/h,脱溶剂气流速 900 L/h。

2 结果与分析

2.1 杨树桑黄乙醇提取物分析

图 1 为杨树桑黄子实体乙醇提取物的 UPLC-QTOF-MS 离子流色谱图,从图中看出 UPLC 分离条件可以有效地将提取物中的活性成分分开,在 UPLC-QTOF-MS 条件下得到质谱图,从野生与栽培杨树桑黄子实体中共鉴定出 40 个化合物,包括小分子有机酸 8 个、儿茶素类化合物 3 个、吡喃酮 20 个、黄酮 9 个,其中野生和栽培子实体中共有成分 14 个,包括小分子有机酸 3 个、吡喃酮酚类物质 11 个,但各成分相对含量在野生和栽培子实体中差异明显,吡喃酮酚类物质在木屑栽培和木段栽培子实体中相对含量较高,且木屑栽培略高于木段栽培子实体;野生子实体中特有成分 14 个,包括小分子有机酸 1 个、儿茶素类 3 个、吡喃酮 1 个、黄酮 9 个,其中儿茶素类和黄酮类化合物仅在野生子实体中发现,而在两种栽培子实体中均未发现;栽培子实体中出现 12 种特有成分,8 种为两种栽培子实体共有成分,4 种为木屑栽培子实体中出现,主要为小分子有机酸和吡喃酮。小分子有机酸、儿茶素类、吡喃酮、黄酮化合物在 ESI 离子源负离子模式下主要产生 $[M-H]^-$ 准分子离子峰,具体信息见表 1 所示。

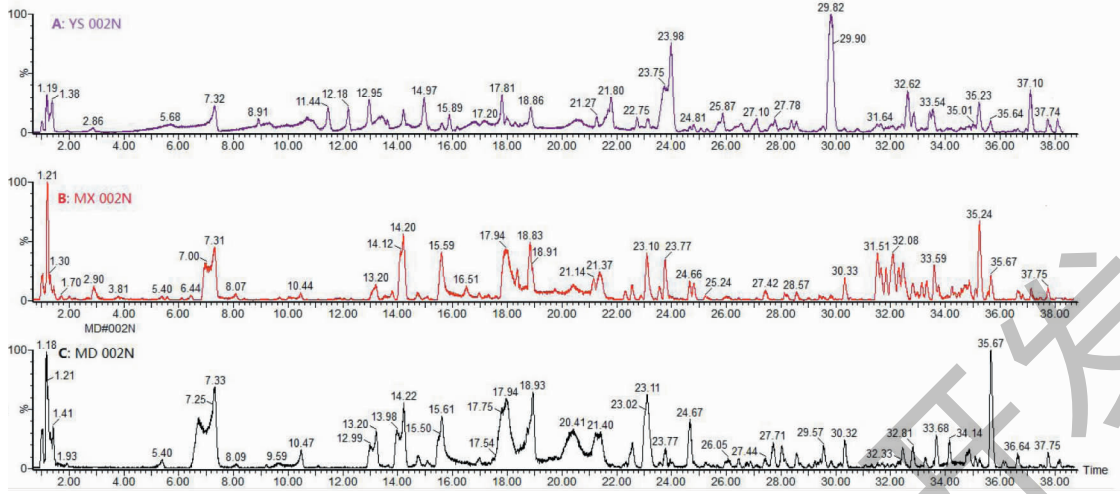


图1 杨树桑黄子实体提取物负离子模式下的离子基峰图

Fig. 1 The base peak ion (BPI) of the negative mode in extracts from *S. vaninii*

注:A:野生;B:木屑袋料栽培;C:木段栽培。Note: A: Wild fruiting body; B: Bag-cultivated fruiting body; C: Wood cultivated fruiting body.

表1 UPLC-QTOF-MS 鉴定杨树桑黄提取物中的化合物

Table 1 Identification of compounds from *S. vaninii* extracts by UPLC-QTOF-MS

序号 No.	类别 Classify	保留时间 t_R (min)	分子离子 Molecular ion (m/z)	分子式 Molecular formula	特征碎片 Fragmentation (m/z)	化合物 Compound	来源 Source
1	有机酸	1.38	191.109 2	$C_6H_8O_7$	147.030 1	柠檬酸 Citric acid	YS, MX, MD
2		2.86	169.013 3	$C_7H_6O_5$	125.024 2	没食子酸 Gallic acid	YS
3		2.90	242.976 5	$C_8H_4O_9$	111.007 2	呋喃四羧酸 Furantricarboxylic acid	MX
4		5.40	153.018 5	$C_7H_6O_4$	109.030 2	原儿茶酸 Protocatechuic acid	YS, MX, MD
5		6.44	209.007 5	$C_9H_6O_6$	121.026 3	苯三甲酸 Benzenetricarboxylic acid	MX
6		7.32	137.023 8	$C_7H_6O_3$	108.021 9	原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	YS, MX, MD
7		8.09	198.987 0	$C_7H_4O_7$	111.007 4	袂康酸 Meconic acid	MX, MD
8		10.47	179.034 5	$C_9H_8O_4$	135.043 8	咖啡酸 Caffeic acid	MX, MD
9	儿茶素	8.91, 12.18	289.071 4	$C_{15}H_{14}O_6$	125.023 0	儿茶素 Catechin、表儿茶素 Epicatechin	YS
10		11.44, 12.95	457.077 0	$C_{22}H_{18}O_{11}$	169.013 2	没食子儿茶素没食子酸酯 Gallocatechin gallate	YS
11		14.97, 15.89	441.083 0	$C_{22}H_{18}O_{10}$	169.012 2	儿茶素没食子酸酯 Catechin gallate	YS
12	吡喃酮	13.80	423.069 7	$C_{22}H_{16}O_9$	159.043 0	Phellibaumin D	MX
13		14.20	177.055 5	$C_{10}H_{10}O_3$	134.036 2	4-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one	YS, MX, MD
14		14.72	288.996 4	$C_{13}H_6O_8$	245.012 0	Phelligrudin J	MX, MD
15		15.61	245.060 5	$C_{13}H_{10}O_5$	159.044 7	Hispidin	YS, MX, MD
16		16.51	421.092 7	$C_{23}H_{18}O_8$	243.027 4	Interfungin B	MX
17		17.94, 21.37	975.146 6	$C_{52}H_{32}O_{20}$	243.027 1	Phelligrudin A	YS, MX, MD
18		18.86	463.104 5	$C_{25}H_{20}O_9$	243.029 3	Davallialactone	YS, MX, MD
19		18.93	521.112 9	$C_{27}H_{22}O_{11}$	243.029 5	Baumin	YS, MX, MD
20		21.80	423.165 3	$C_{22}H_{16}O_9$	243.029 7	Phellibaumin B 或 D	YS
21		23.10, 24.66	489.083 7	$C_{26}H_{18}O_{10}$	241.049 9	Hypohomine B	YS, MX, MD
22		23.77, 24.80	461.088 3	$C_{25}H_{18}O_9$	243.026 6	Inoscavin A	YS, MX, MD

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	类别 Classify	保留时间 t_R (min)	分子离子 Molecular ion (m/z)	分子式 Molecular formula	特征碎片 Fragmentation (m/z)	化合物 Compound	来源 Source
23		26.44	473.086 4	$C_{26}H_{18}O_9$	243.028 6	Hypholomine A	MX、MD
24		26.60	351.046 9	$C_{19}H_{12}O_7$	243.029 6	Phellibaumin A	MX、MD
25		27.42	379.046 8	$C_{20}H_{12}O_8$	243.026 6	Phelligradin D	YS、MX、MD
26		28.13	477.121 8	$C_{26}H_{22}O_9$	243.024 8	Phelligradin F	YS、MX、MD
27		28.21	419.078 4	$C_{23}H_{16}O_8$	243.028 3	Inoscavin C	MX、MD
28		28.57	395.077 0	$C_{21}H_{16}O_8$	243.028 4	Inoscavin D	YS、MX、MD
29		28.68	623.082 9	$C_{33}H_{20}O_{13}$	243.028 4	Phelligradin I	MX、MD
30		29.57	363.050 8	$C_{20}H_{12}O_7$	159.044 3	Phelligradin C	MX、MD
31		30.32	435.108 7	$C_{24}H_{20}O_8$	243.028 9	Inoscavin B	YS、MX、MD
32	黄酮	17.81	287.056 1	$C_{15}H_{12}O_6$	259.061 3	二氢茨非素 Aromadendrin	YS
33		23.98	271.061 2	$C_{15}H_{12}O_5$	271.060 3	柚皮素 Naringenin	YS
34		25.87、27.10	301.071 1	$C_{16}H_{14}O_6$	273.076 3	橙皮素 Hesperetin	YS
35		27.78	393.096 0	$C_{22}H_{18}O_7$	259.060 7	Phelligrin D	YS
36		29.82	285.076 5	$C_{16}H_{14}O_5$	271.060 6	樱花亭 Sakuranetin	YS
37		32.62	377.104 5	$C_{22}H_{18}O_6$	271.061 4	Phelligrin A 或 B	YS
38		32.84、33.42	391.118 9	$C_{23}H_{20}O_6$	271.061 2	Methylphelligrin A 或 B	YS
39		33.54	499.139 3	$C_{29}H_{24}O_8$	393.096 9	Phelligrin E	YS
40		37.10	483.143 3	$C_{29}H_{24}O_7$	377.100 9	Phelligrin C	YS

注:YS:野生子实体;MX:木屑栽培子实体;MD:木段栽培子实体。

Note: YS: Wild fruiting body;MX: Bag-cultivated fruiting body;MD: Wood cultivated fruiting body.

2.2 化合物鉴定

2.2.1 小分子有机酸

在负离子模式下,从野生与栽培杨树桑黄子实体中鉴定出小分子有机酸 8 个,二级质谱(MS/MS)主要通过失去羧基(COO^-)得到特征碎片。

化合物 1 保留时间 1.38 min,分子离子峰为 m/z 191.109 2 [$M-H$] $^-$,分子式为 $C_6H_8O_7$,MS/MS 质谱中母离子裂解失去 1 分子羧基(44 Da)产生碎片 m/z 147.030 1 [$M-H-CO_2$] $^-$,出峰保留时间较短,比较碎片信息,推测化合物为柠檬酸。

化合物 2 保留时间 2.86 min,分子离子峰为 m/z 169.013 3 [$M-H$] $^-$,分子式为 $C_7H_6O_5$ 。MS/MS 质谱中通过母离子裂解失去 1 分子羧基(44 Da)产生特征碎片 m/z 125.024 2,确定为没食子酸,仅在野生子实体中出现。

化合物 3 保留时间 2.90 min,分子离子峰为 m/z 242.976 5 [$M-H$] $^-$,分子式为 $C_8H_4O_9$ 。MS/MS 质谱中分子离子峰裂解分别失去 3 分子羧基(44 Da)产生碎片 m/z 198.986 4、154.997 5、111.007 2,在线查阅 Chemical spider 数据库,推测化合物为呋喃

四羧酸,该化合物仅在木屑栽培子实体中出现。

化合物 4、6 保留时间分别为 5.40、7.32 min,分子离子基峰分别为 m/z 153.018 5 [$M-H$] $^-$ 和 m/z 137.023 8 [$M-H$] $^-$,分子式分别为 $C_7H_6O_4$ 和 $C_7H_6O_3$,分子量相差 16。MS/MS 质谱中分别出现 m/z 109.030 2、108.021 9 特征碎片,推测化合物通过裂解分别失去 1 分子羧基(44 Da)和 1 分子醛基(29 Da)得到特征碎片,参考文献^[7]推测化合物 4 和 6 分别为原儿茶酸和原儿茶醛。

化合物 5 保留时间为 6.44 min,仅在木屑栽培子实体质谱中检测到,分子离子峰为 m/z 209.007 5 [$M-H$] $^-$,分子式为 $C_9H_6O_6$ 。MS/MS 质谱中分子离子峰失去 1 分子羧基(44 Da)产生碎片 m/z 165.019 4,继续失去 1 分子羧基(44 Da)得到特征碎片 m/z 121.026 3,推测化合物为苯三甲酸。

化合物 7 保留时间 8.09 min,分子离子峰为 m/z 198.987 0 [$M-H$] $^-$,分子式为 $C_7H_4O_7$,MS/MS 质谱中分别失去 2 分子羧基产生碎片 m/z 154.996 8、111.007 4,在线从 Chemical spider 和 PubMed 数据库查阅结构图,比较分析推测化合物为袂康酸。

化合物 **8** 保留时间 10.47 min, 栽培子实体中检测到分子离子峰为 m/z 179.034 5 $[M-H]^-$ 、分子式为 $C_9H_8O_4$ 的化合物, MS/MS 质谱失去 1 分子羧基得到碎片 m/z 135.043 8, 参考文献^[8] 推测化合物为咖啡酸。

2.2.2 儿茶素类化合物

从野生杨树桑黄子实体提取物中鉴定出 3 个儿茶素类化合物, 且出现多个同分异构现象, 而在两种栽培子实体提取物中均未发现此类化合物。

化合物 **9** 保留时间为 8.91、12.18 min, 分子离子峰均为 m/z 289.071 4 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$ 。MS/MS 质谱中产生没食子酸特征碎片 m/z 169.014 3、125.023 0, 推测其为同分异构体, 根据化合物保留时间, 并参考文献^[9] 推测化合物分别为儿茶素和表儿茶素。

化合物 **10** 保留时间为 11.44、12.95 min, 分子

离子峰均为 m/z 457.077 0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{22}H_{18}O_{11}$ 。MS/MS 质谱中分子离子峰失去 1 分子没食子酰基 (152 Da) 产生碎片 m/z 305.062 6, 而分子离子峰失去 1 分子没食子酸得到儿茶素碎片离子 m/z 289.070 6, 同时产生 m/z 169.013 2 特征碎片, 儿茶素碎片离子进一步通过 C 环的 1,4 键断裂得到碎片 m/z 125.022 9, 综合碎片裂解规律和保留时间并参考文献^[9] 鉴定为没食子儿茶素没食子酸酯和表没食子儿茶素没食子酸酯, 其二级质谱图及裂解规律见图 2 所示。

化合物 **11** 保留时间为 14.97、15.89 min, 分子离子峰为 m/z 441.083 0 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{22}H_{18}O_{10}$, 与化合物 **10** 仅相差 1 分子羟基, MS/MS 质谱同样产生 m/z 289.069 0、169.012 2、125.022 7 碎片离子, 推测化合物 **11** 为儿茶素没食子酸酯、表儿茶素没食子酸酯。

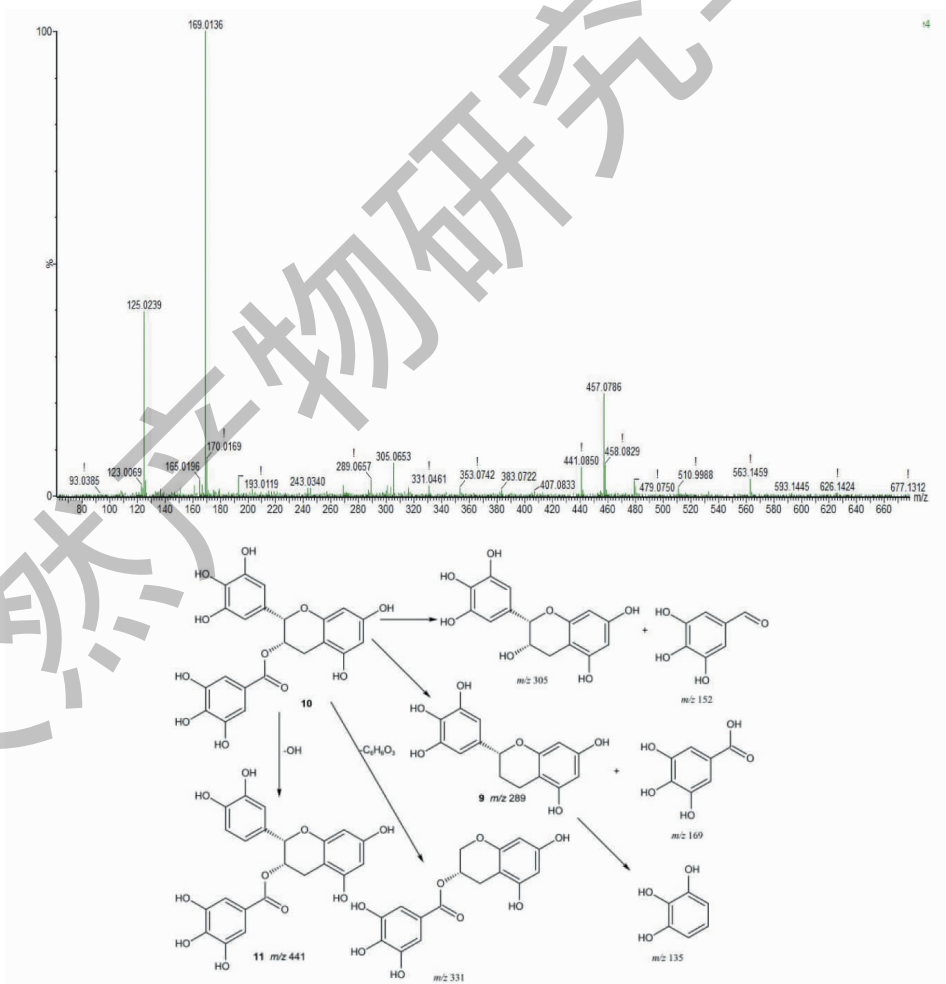


图 2 化合物 **10** 的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 2 The MS² spectrum and fragmentation pathway of compound **10** at negative ion mode

2.2.3 吡喃酮类化合物

吡喃酮类化合物是杨树桑黄子实体中的主要活性成分之一,主要由苯乙烯基吡喃酮(hispidin)骨架组成,衍生物一般为几分子 hispidin 聚合或由 hispidin 与其他多酚化合物缩合而成^[10],此类化合物在负离子模式下二级质谱主要产生 m/z 243.029 3 ($C_{13}H_7O_5$) 和 m/z 159.044 0 ($C_{10}H_7O_2$) 的特征碎片离子。

化合物 **12** 保留时间 13.80 min,分子离子峰为 m/z 423.069 7 [$M-H$]⁻,元素组成分析化合物分子式为 $C_{22}H_{16}O_9$ 。MS/MS 质谱中母离子失去 1 分子羧基(44 Da)产生碎片 m/z 379.081 1,母离子失去 1 分子咖啡酸产生碎片 m/z 243.029 9,母核离子发生裂解失去碎片 $C_3H_2O_3$ 得到特征碎片 m/z 159.043 0,参考文献^[11]推测化合物为 phellibaumin D。

化合物 **13** 保留时间 14.20 min,分子离子峰为 m/z 177.055 5 [$M-H$]⁻,分子式为 $C_{10}H_{10}O_3$ 。MS/MS 质谱中母离子失去 1 分子羟基(16 Da)产生碎片 m/z 161.025 1,母离子失去碎片 C_2H_3O (43Da)产生特征碎片 m/z 134.036 2,参考文献^[12],推测化合物为 4-(3,4-二羟基苯基)-3-丁烯-2-酮 [4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one]。

化合物 **14** 保留时间 14.72 min,分子离子峰为 m/z 288.996 4 [$M-H$]⁻,分子式为 $C_{13}H_6O_8$ 。MS/MS 质谱中母离子失去 1 分子羧基(44 Da)产生特征碎片 m/z 245.012 0,进一步裂解失去 2 分子 CO 得到碎片 m/z 217.017 5、189.018 3,同时发现母离子失去 2 分子羟基得到碎片 m/z 257.052 5,参考文献^[13]推测化合物为 phelligridin J。

化合物 **15** 保留时间 15.61 min,分子离子峰为 m/z 245.060 5 [$M-H$]⁻,分子式为 $C_{13}H_{10}O_5$ 。MS/MS 质谱中母离子裂解失去碎片离子 CO_2 、 $C_3H_3O_2$ 产生碎片 m/z 201.018 0、173.019 6,母离子失去碎片离子 $C_3H_2O_3$ 得到特征碎片离子 m/z 159.044 7 ($C_{10}H_7O_2$),参考文献^[12]推测化合物为典型吡喃酮化合物 hispidin。

化合物 **16** 保留时间 16.51 min,分子离子峰为 m/z 421.092 7 [$M-H$]⁻,分子式为 $C_{23}H_{18}O_8$ 。MS/MS 质谱中母离子失去 1 分子羟基产生碎片 m/z 405.066 9 [$M-OH$]⁻,母离子失去 1 分子 C_2H_2O 离子得到碎片 m/z 379.083 4 [$M-H-C_2H_2O$]⁻,失去 1 分子二羟基苯乙烯离子得到碎片 m/z 285.030 4 [$M-H-C_8H_8O_2$]⁻,分子离子峰失去 1 分子 4-(3,4-二

羟基苯基)-3-丁烯-2-酮得到 hispidin 特征碎片离子 m/z 243.027 4 [$M-H-C_{10}H_{10}O_3$]⁻,hispidin 母核离子进一步裂解产生碎片离子 m/z 217.049 5、159.044 1,参考文献^[14]推测化合物为 interfungin B。

化合物 **17** 保留时间 17.94、21.37 min,分子离子峰均为 m/z 975.146 6 [$M-H$]⁻,分子式为 $C_{52}H_{32}O_{20}$,二级质谱产生碎片离子峰基本相同,推测两化合物可能为同分异构体。MS/MS 质谱中母离子裂解失去一半结构产生主要碎片 m/z 487.074 3 [$M-H-C_{26}H_{16}O_{10}$]⁻,推测化合物可能由 2 分子 hypholomine B 组成;hypholomine B 碎片离子进一步裂解失去一半结构产生化合物 hispidin 母核典型特征碎片离子 m/z 243.027 1 ($C_{13}H_7O_5$),综合以上分析化合物由 4 分子 hispidin 聚合而成,参考文献^[15]推测化合物为 phelligridimer A 及其异构体。

化合物 **18** 保留时间 18.86 min,分子离子峰为 m/z 463.104 5 [$M-H$]⁻,二倍分子离子峰为 m/z 927.213 9 [$2M-H$]⁻,分子式为 $C_{25}H_{20}O_9$ 。MS/MS 质谱中产生 hispidin 特征碎片 m/z 243.029 3,推测化合物为 hispidin 衍生物,二级质谱产生碎片 m/z 405.059 0 [$M-H_3-CH_3-CO-CH$]⁻、379.082 1 [$M-H-CH_3-CO-CH-CO$]⁻、259.060 8 [$M-H-C_6H_5O_2-C_5H_3O_2$]⁻、243.029 3 [$M-H-C_6H_5O_2-C_6H_7O_2$]⁻,hispidin 母核进一步裂解产生碎片 m/z 217.050 2、159.044 5、135.044 4,根据二级质谱裂解规律并参考文献^[16]推测化合物为 davallialactone,裂解规律如图 3 所示。

化合物 **19** 保留时间 18.93 min,分子离子峰为 m/z 521.112 9 [$M-H$]⁻,分子式为 $C_{27}H_{22}O_{11}$,一级质谱中出现 m/z 463.104 5 [$M-H$]⁻离子峰,推测化合物与 davallialactone 结构相似。MS/MS 质谱中裂解碎片产生碎片 m/z 463.097 5、405.064 7、379.084 8、259.061 9、243.029 5、159.044 8、135.043 8,由裂解碎片可知 m/z 463.097 5 碎片与分子离子峰分子量相差 58 ($C_2H_2O_2$),参考文献^[17]推测化合物为 baumin。

化合物 **20** 保留时间 21.80 min,分子离子峰为 m/z 423.165 3 [$M-H$]⁻,二倍分子离子峰为 m/z 847.333 4 [$2M-H$]⁻,分子式为 $C_{22}H_{16}O_9$ 。MS/MS 质谱中裂解失去 1 分子咖啡酸产生特征碎片 m/z 243.029 7,吡喃酮母核裂解产生碎片 m/z 159.044 9、135.044 9,参考文献^[11]推测化合物可能为 phellibaumin B 或 D。

化合物 **21** 保留时间为 23.10、24.66 min, 分子离子峰均为 m/z 489.083 7 $[M-H]^-$, 二倍分子离子

峰为 m/z 979.169 7 $[2M-H]^-$, 分子式为 $C_{26}H_{18}O_{10}$ 。MS/MS 质谱中裂解产生碎片 m/z 445.093 1 $[M-H]$

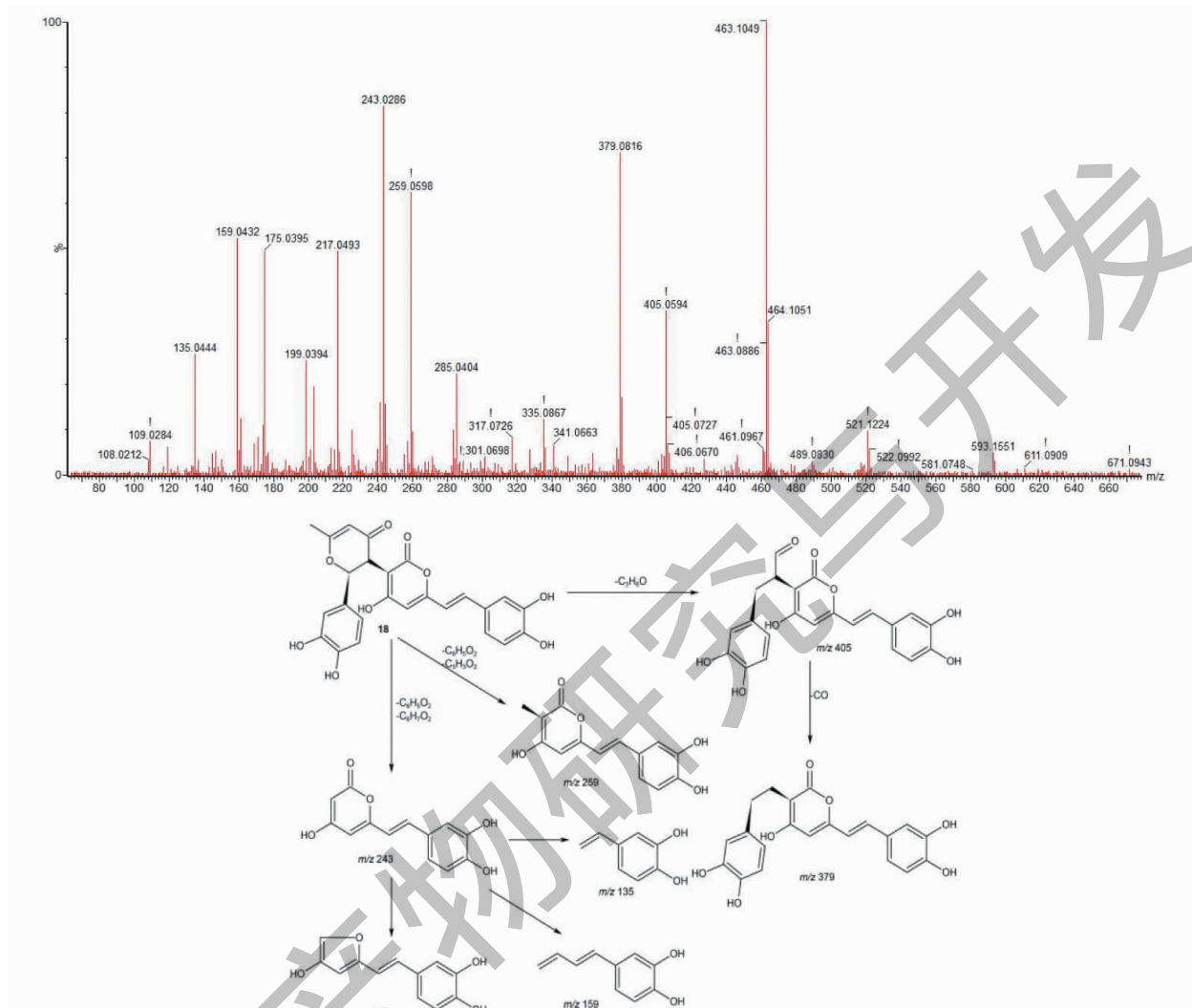


图 3 化合物 **18** 的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 3 The MS² spectrum and fragmentation pathway of compound **18** at negative ion mode

$CO_2]^-$ 、403.086 4 $[M-H-C_3H_2O_3]^-$ 、377.068 5 $[M-H-C_5H_4O_3]^-$ 、335.061 4 $[M-H-C_8H_9O_2-OH]^-$ 、241.049 9 $[M-H-C_8H_9O_2-C_5H_3O_3]^-$, hispidin 母核进一步裂解产生碎片 m/z 159.045 7、135.044 4, 根据质谱裂解规律, 参考文献^[18] 推测化合物为 hypholomine B 及其异构, 裂解规律如图 4 所示。

化合物 **22** 保留时间 23.77、24.80 min, 分子离子峰均为 m/z 461.088 3 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{25}H_{18}O_9$ 。MS/MS 质谱中裂解产生碎片 m/z 377.065 6 $[M-H-C_4H_4O_2]^-$ 、243.026 6 $[M-H-C_{12}H_{10}O_4]^-$, 吡喃酮母核裂解产生典型碎片 m/z 159.043 6、135.045 1, 参考文献^[19] 推测化合物为 inoscavin A 及其异构

体。

化合物 **23** 保留时间 26.44 min, 分子离子峰为 m/z 473.086 4 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{26}H_{18}O_9$ 。二级质谱分子离子峰失去 1 分子 CO_2 产生碎片 m/z 429.096 3, 分子离子峰裂解产生碎片 m/z 405.060 2 $[M-H-C_4H_4O]^-$ 、283.057 8 $[M-H-C_{10}H_6O_4]^-$ 、243.028 6 $[M-H-C_{13}H_{10}O_4]^-$, 得到 hispidin 母核进一步裂解产生碎片 m/z 217.048 1、159.044 6、135.046 8, 参考文献^[20] 推测化合物为 hypholomine A。

化合物 **24** 保留时间 26.60 min, 分子离子峰为 m/z 351.046 9 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{19}H_{12}O_7$ 。二级质谱分子离子峰裂解失去 1 分子二羟基苯

($C_6H_4O_2$) 产生特征碎片 m/z 243.029 6, 特征碎片进一步裂解产生碎片 m/z 159.042 7、135.045 5, 参考文献^[11] 推测化合物为 phellibaumin A。

化合物 **25** 保留时间 27.42 min, 分子离子峰为 m/z 379.046 8 [$M-H$]⁻, 分子式为 $C_{20}H_{12}O_8$ 。MS/MS 质谱中裂解产生碎片 m/z 335.051 1 [$M-H-$

CO_2]⁻、269.003 4 [$M-H-C_6H_6O_2$]⁻, 分子离子峰失去 1 分子二羟基苯甲酸基得到特征碎片 m/z 243.026 6 [$M-H-C_8H_7O_3$]⁻, 特征碎片进一步裂解产生碎片 m/z 159.044 9、135.045 1, 参考文献^[21] 推测化合物为 phelligrudin D。

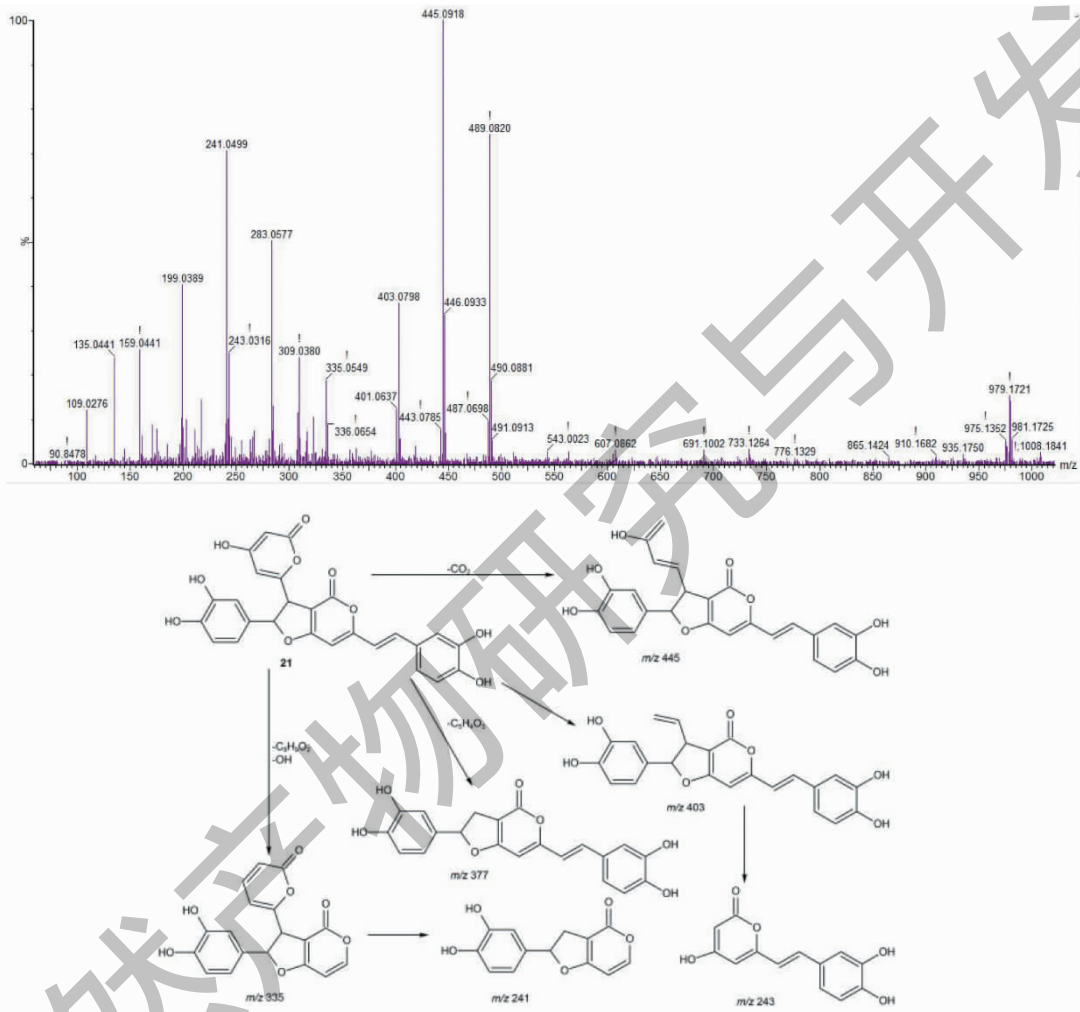


图 4 化合物 **21** 的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 4 The MS² spectrum and fragmentation pathway of compound **21** at negative ion mode

化合物 **26** 保留时间 28.13 min, 分子离子峰为 m/z 477.121 8 [$M-H$]⁻, 分子式为 $C_{26}H_{22}O_9$ 。MS/MS 质谱中分子离子峰裂解失去 1 分子甲基和 1 分子氧产生碎片 m/z 446.094 0 [$M-H-CH_3O$]⁻, 失去 1 分子甲基和 1 分子异丙酮基得到碎片 m/z 405.057 2 [$M-H-C_3H_5O-CH_3$]⁻, 碎片继续失去 1 分子 CO 得到碎片 m/z 377.066 2, 进一步裂解得到特征碎片 m/z 243.024 8, 母核裂解产生碎片 m/z 159.045 7, 参考文献^[21] 推测化合物为 phelligrudin F。

化合物 **27** 保留时间 28.21 min, 分子离子峰为 m/z 419.078 4 [$M-H$]⁻, 分子式为 $C_{23}H_{16}O_8$ 。MS/MS 质谱中裂解产生碎片 m/z 403.039 6 [$M-H-OH$]⁻、377.070 1 [$M-H-C_2H_2O$]⁻、283.058 4 [$M-H-C_7H_4O_3$]⁻, 分子离子峰失去 1 分子 Hispolon 得到特征碎片 m/z 243.028 3 [$M-H-C_{10}H_8O_3$]⁻, 特征碎片继续裂解产生碎片 m/z 159.044 3, 根据二级质谱裂解碎片, 参考文献^[22] 推测化合物为 inoscavin C。

化合物 **28** 保留时间 28.57 min, 分子离子峰为

m/z 395.076 7 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₁H₁₆O₈。MS/MS 质谱中裂解产生碎片 m/z 363.052 8 [M-H-2OH]⁻、285.043 5 [M-H-C₆H₆O₂]⁻, 母离子失去 1 分子甲基和 1 分子二羟基苯甲醛基得到特征碎片 m/z 243.028 4 [M-H-C₈H₆O₃]⁻, 母核继续裂解产生碎片 m/z 159.044 3、135.043 0, 参考文献^[22] 推测化合物为 inoscavin D。

化合物 29 保留时间 28.68 min, 分子离子峰为 m/z 623.082 9 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₃H₂₀O₁₃。MS/MS 质谱中裂解产生碎片 m/z 579.078 8 [M-H-CO₂]⁻、535.322 6 [M-H-2CO₂]⁻、419.036 3 [M-H-C₁₀H₄O₅]⁻, 母离子失去 1 分子二羟基苯甲醛和 1 分子 hispidin 得到特征碎片 m/z 243.028 4 [M-H-C₂₀H₁₂O₈]⁻, 母核裂解产生碎片 m/z 159.044 3、135.043 0, 参考文献^[23] 推测化合物为 phelligrin I (inonoblin A)。

化合物 30 保留时间 29.57 min, 分子离子峰为 m/z 363.050 8 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₀H₁₂O₇。MS/MS 质谱中裂解产生碎片 m/z 345.227 0 [M-H-OH]⁻、281.140 0 [M-H-C₄H₃O₂]⁻、227.125 6 [M-H-C₇H₄O₃]⁻、159.044 3 [M-H-C₂₃H₁₂O₁₁]⁻、135.043 0, 根据裂解规律并参考文献^[21] 推测化合物为 phelligrin C。

化合物 31 保留时间 30.32 min, 分子离子峰为 m/z 435.108 7 [M-H]⁻, 分子式 C₂₄H₂₀O₈。MS/MS 质谱中产生碎片 m/z 403.083 0 [M-H-CH₃-OH]⁻、273.073 2 [M-H-C₉H₆O₃]⁻、243.028 9 [M-H-C₁₁H₁₂O₃]⁻、159.044 3、135.043 0, 参考文献^[22] 推测化合物为 inoscavin B。

2.2.4 黄酮类化合物

野生杨树桑黄中黄酮化合物主要是以柚皮素和二氢茛菪非素为母核的化合物及其衍生物, 裂解规律相似, 母核裂解产生黄酮典型碎片 m/z 151、119, 而栽培杨树桑黄子实体中未发现典型黄酮化合物。

化合物 32 保留时间 17.81 min, 分子离子峰为 m/z 287.056 1 [M-H]⁻, 元素组成分析分子式为 C₁₅H₁₂O₆, 二级质谱中产生特征碎片 m/z 259.061 3 [M-H-CO]⁻, 进一步失去 1 分子羟基得到碎片 m/z 243.029 6, 母核进一步裂解产生碎片 m/z 151.001 6, 参考文献^[24] 推测化合物为二氢茛菪非素。

化合物 33 保留时间 23.98 min, 分子离子峰 m/z 271.061 2 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₅H₁₂O₅, 二倍分子

量为 543.128 8 [2M-H]⁻。二级质谱碎片失去 1 分子 CO 得到碎片离子 m/z 243.029 7, 母核进一步裂解失去碎片离子 C₄H₈O₄ 和 CH₃OH, 分别得到典型黄酮碎片离子 m/z 151.003 0、119.050 5, 参考文献^[24] 推测其为柚皮素。

化合物 34 保留时间 25.87、27.10 min, 分子离子峰均为 m/z 301.0711 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₆H₁₄O₆。二级质谱由分子离子失去 1 分子 CH₃ 产生碎片离子 m/z 285.038 7, 母离子失去 1 分子 CO 产生特征碎片离子 m/z 273.076 3, 母离子进一步裂解产生黄酮裂解产生的典型碎片 m/z 178.996 1、151.001 4, 参考文献^[20] 推测其为橙皮素及其异构体 7-甲基圣草酚。

化合物 35 保留时间 27.78 min, 分子离子峰 m/z 393.096 0 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₂H₁₈O₇, 二级质谱由分子离子峰失去 1 分子邻羟基甲苯 (C₇H₆O⁻) 得到碎片 m/z 287.054 2, 母核离子分别失去 1 分子 CO 和 1 分子 CO₂ 得到碎片离子 m/z 259.060 7、243.026 9, 母核离子进一步裂解得到典型黄酮碎片离子 m/z 151.002 8、119.049 3, 参考文献^[11] 中报道桑黄子实体中出现的二羟基甲基苯基团均为邻羟基甲基, 由此推测化合物可能为 3,5,7-trihydroxy-6-(2-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one (phelligrin D)。

化合物 36 保留时间 29.82 min, 野生子实体中出现的最强离子峰, 分子离子峰为 m/z 285.076 5 [M-H]⁻, 分子式为 C₁₆H₁₄O₅, 二级质谱由分子离子峰失去 1 分子甲基得到碎片 m/z 271.060 6, 母核离子继续失去 1 分子 CO 得到碎片离子 m/z 243.027 2, 分子离子峰裂解失去 C₄H₈O₄ 得到碎片 m/z 165.017 2, 母核离子继续裂解产生典型黄酮碎片离子 m/z 151.002 4、119.049 4, 参考文献^[24] 推测其为樱花亭。

化合物 37 保留时间 32.62 min, 分子离子峰 m/z 377.104 5 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₂H₁₈O₆, 二级质谱由分子离子峰失去 1 分子邻羟基苯得到碎片 m/z 283.060 3, 母离子失去 1 分子邻羟基甲苯得到碎片 m/z 271.061 4, 母核离子裂解产生典型黄酮碎片离子 m/z 151.002 7、119.049 3, 参考文献^[11] 推测其为 phelligrin A 或 B。

化合物 38 保留时间 32.84、33.42 min, 分子离子峰均为 m/z 391.118 9 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₃H₂₀O₆, 推测其为同分异构体, 该化合物与化合物 37 仅

相差 1 分子甲基,同时二级质谱裂解产生碎片与 phelligrin A 或 B 基本一致,参考文献^[11]推测化合物为 methylphelligrin A 或 B。

化合物 **39** 保留时间 33.54 min,分子离子峰 m/z 499.139 3 $[M-H]^-$,分子式为 $C_{29}H_{24}O_8$,与化合物 **35** 分子量相差 106 (C_7H_6O),即推测与化合物 **35** 相差 1 分子邻羟基甲苯,二级质谱裂解规律与化合物 **35** 基本相似,产生典型黄酮碎片,推测化合物为 3,5,7-trihydroxy-6,8-bis(2-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one (phelligrin E)。

化合物 **40** 保留时间为 37.10 min,分子离子峰为 m/z 483.143 3 $[M-H]^-$,分子式为 $C_{29}H_{24}O_7$,该化合物与化合物 **37** 分子量相差 106,即推测可能相差为 1 分子邻羟基甲苯,同时二级质谱裂解产生碎片与 phelligrin A 或 B 基本一致,参考文献^[11]推测化合物为 5,7-dihydroxy-6,8-bis(2-hydroxybenzyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one (phelligrin C),化合物二级质谱图及裂解规律如图 5 所示。

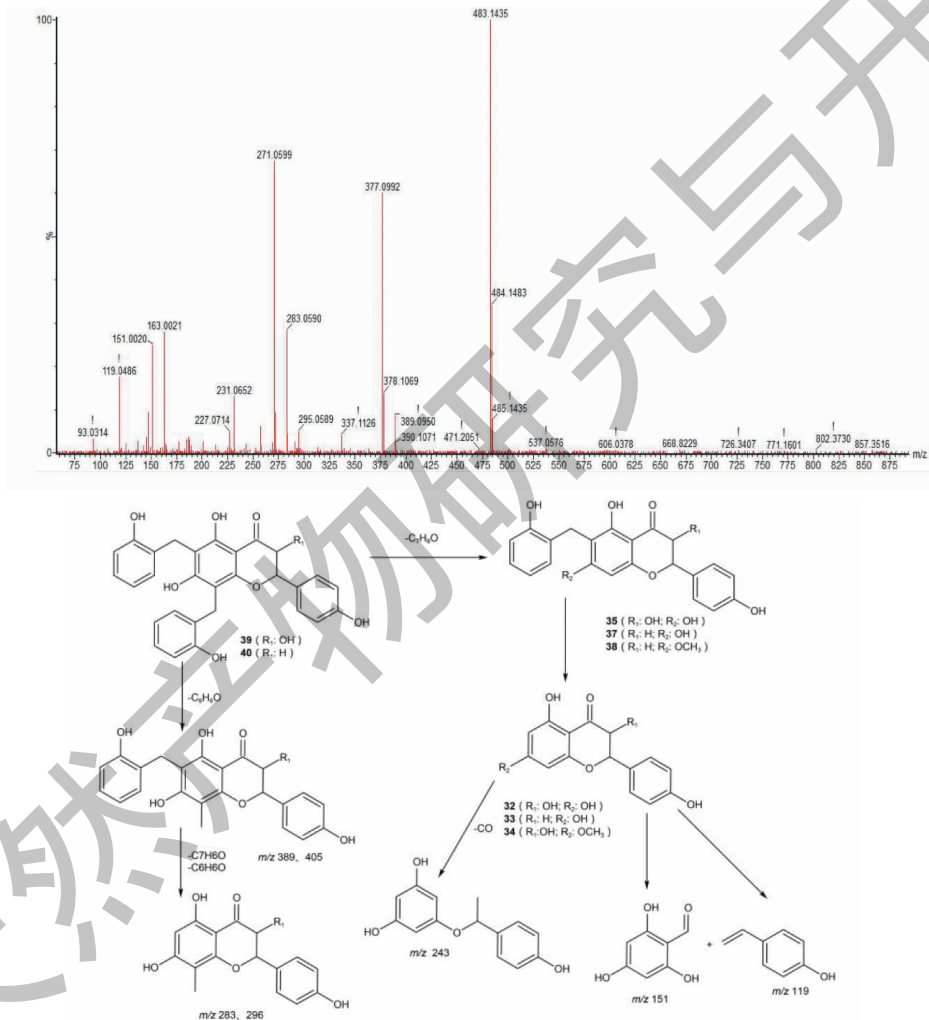


图 5 化合物 **40** 的二级质谱图及其裂解途径

Fig. 5 The MS² spectrum and fragmentation pathway (right) of compound **40** at negative ion mode

3 结论

本研究采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱 (UPLC-QTOF-MS) 对野生和栽培杨树桑黄子实体乙醇提取物中的化学成分进行系统分析,桑黄中多酚、黄酮化合物含有多个酚羟基,呈酸性,在负离

子模式下具有较高的离子化效率,因此选择负离子模式并结合相关文献对其成分结构进行推测,结果从野生和栽培杨树桑黄子实体乙醇提取物中鉴定出小分子有机酸 8 个、儿茶素类 3 个、吡喃酮类 20 个、黄酮 9 个,其中 phelligrins C ~ E 3 个黄酮化合物推

测可能为新化合物,均为 phelligrin A 或 B 的同系物,准确结构还需进一步鉴定。野生和栽培子实体中共有成分 14 个,其中 11 个为吡喃酮酚类成分。

分析结果显示野生杨树桑黄子实体中含有丰富的黄酮、儿茶素类和吡喃酮类化合物,且出现多个同分异构现象,而栽培桑黄子实体中主要是吡喃酮和小分子有机酸化合物,均未发现典型黄酮及儿茶素类化合物,结合文献^[5]报道的总酚含量与肿瘤细胞增殖抑制和体外抗氧化能力趋势一致,且栽培子实体的活性高于野生子实体,本次 UPLC-QTOF-MS 分析结果显示栽培子实体中吡喃酮酚类物质的相对峰面积明显高于野生子实体,且木屑栽培略高于木段栽培子实体,综合分析认为吡喃酮酚类化合物是野生和栽培子实体中的主要活性成分之一,主要包括化合物 hispidin 和 4-(3,4-二羟基苯基)-3-丁烯-2-酮、phelligrin A、davallialactone、hypholomine B、inoscavin A 和 B,且化合物 davallialactone 和 hypholomine B 在杨树桑黄子实体中含量较高,表现出良好的抗氧化、肿瘤细胞增殖抑制和降血糖活性^[25,26]。在杨树桑黄子实体质量标准制定中建议将总酚含量结合吡喃酮化合物 davallialactone 和 hypholomine B 作为质量标准的指标成分,完善桑黄的质量标准控制体系。本研究可以为杨树桑黄子实体的质量标准提升和功能研究奠定了理论基础。

参考文献

- Zhou LW, Vlasák J, Decock C, et al. Global diversity and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex (Hymenochaetales, Basidiomycota): *Sanghuangporus* gen. nov., *Tropicoporus ex-centrodendri* and *T. guanacastensis* gen. et spp. nov., and 17 new combinations [J]. *Fungal Divers*, 2016, 77: 335-347.
- Dai YC. A new medicinal fungus-*Phellinus vaninii* [J]. *Edible Fungi China* (中国食用菌), 2003, 22(5): 7-8.
- Bao HY, Wang CY, Bau T. Herbalogical textual research on "Sanghuang" [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2013, 32: 70-78.
- Li Y, Bao HY. Mycomedicines in China (中国菌物药) [M]. Zhengzhou: Zhongyuan Farmer Publishing House, 2020: 382-384.
- He PY, Yang Y, Di L, et al. A comparative study on *in vitro* antitumor activities of the medicinal fungus *Sanghuangporus baumii* cultivated in different substrates [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2020, 39: 1400-1409.
- Huo JX, Sun YQ, Zhong S, et al. Safety evaluation of aqueous extracts of *Sanghuangporus vaninii* fruiting body in Sprague-Dawley rats [J]. *Food Sci Nutr*, 2020, 8: 5107-5113.
- Zan LF, Qin JC, Zhang YM, et al. Antioxidant hispidin derivatives from medicinal mushroom *Inonotus hispidus* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59: 770-772.
- Mo SY, Yang YC, Shi JG. Studies on chemical constituents of *Phellinus igniarius* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35: 1095-1097.
- Liu GQ, Dong J, Wang H, et al. Study on the fragmentation pathways of EGC/GC and EGCG/GCG using ESI-IT-TOF [J]. *J Chin Mass Spectr Soc* (质谱学报), 2009, 30: 287-294.
- Lee IK, Yun BS. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance [J]. *J Antibiot*, 2011, 64: 349-359.
- Wu CS, Lin ZM, Wang LN, et al. Phenolic compounds with NF- κ B inhibitory effects from the fungus *Phellinus baumii* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 3261-3267.
- Wangun HV, Hartl A, Tam Kiet T, et al. Inotilone and related phenylpropanoid polyketides from *Inonotus* sp. and their identification as potent COX and XO inhibitors. [J]. *Org Biomol Chem*, 2006, 4: 2545-2548.
- Wang Y, Mo SY, Wang SJ, et al. A unique highly oxygenated pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione derivative with antioxidant and cytotoxic activities from the fungus *Phellinus igniarius* [J]. *Org Lett*, 2005, 7: 1675-1678.
- Papawee S, Ryotaro S, Leo VG, et al. Polyphenol extract from *Phellinus igniarius* protects against acrolein toxicity *in vitro* and provides protection in a mouse stroke model [J]. *Plos One*, 2015, 10(3): e0122733.
- Wang Y, Wang SJ, Mo SY, et al. Phelligrin A, a highly oxygenated and unsaturated 26-membered macrocyclic metabolite with antioxidant activity from the fungus *Phellinus igniarius* [J]. *Org Lett*, 2005, 7: 4733-4736.
- Lee YG, Lee WM, Kim JY, et al. Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW2647 cells. [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154: 852-863.
- Lee IK, Han MS, Lee MS, et al. Styrylpyrones from the medicinal fungus *Phellinus baumii* and their antioxidant properties [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 5459-5461.
- Fiasson JL. Distribution of styrylpyrones in the basidiocarps of various Hymenochaetales [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1982, 10: 289-296.
- Kim JP, Yun BS, Shim YK, et al. Inoscavin A, a new free radical scavenger the mushroom *Inonotus xeranticus*. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40: 6643-6644.