

基于 UPLC-Q-TOF/MS² 联用技术的菖蒲属中药 7H- 莼[1,2,3-*i,j*] 异喹啉-7-酮类成分的分析

李娟^{1,2,3}, 黄玉婷¹, 段彦¹,
马源¹, 杨紫怡¹, 严建业¹, 李顺祥^{1,2,3*}

¹湖南中医药大学; ²湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心;

³湖南省中美老年性退行性疾病治疗药物国际联合研究中心, 长沙 410208

摘要: 研究不同产地菖蒲属中药中 7H-莼[1,2,3-*i,j*] 异喹啉-7-酮(7H-azulene[1,2,3-*i,j*] isoquinoline-7-one, 7H-AI7O)类成分的种类和分布。综合运用溶剂提取法、溶剂萃取法、柱色谱分离技术和薄层色谱法,以菖蒲新碱(neotatarine)为对照品,富集菖蒲属中药中 7H-AI7O 类成分,再采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS²)技术分析其组成。在 10 批菖蒲属中药中, S2、S4 和 S5 批藏菖蒲和 S6 批石菖蒲中检测出 7H-AI7O 类成分,其中,藏菖蒲 S2 批检测到 5 个 7H-AI7O 类化合物,藏菖蒲 S4 批检测到 2 个 7H-AI7O 类化合物,藏菖蒲 S5 批和石菖蒲 S6 批中仅检测到菖蒲新碱。虽然检测样本数量有限,但就目前的结果分析,菖蒲属中药藏菖蒲和石菖蒲均存在 7H-AI7O 类成分,含 7H-AI7O 类成分的藏菖蒲较石菖蒲的产地分布广,藏菖蒲所含 7H-AI7O 类成分的种类较石菖蒲丰富。该研究为 7H-AI7O 类成分的多植物来源、微量成分检测及相关作用机理的研究提供了实验依据。

关键词: 菖蒲属; 藏菖蒲; 石菖蒲; 7H-莼[1,2,3-*i,j*] 异喹啉-7-酮; 菖蒲新碱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1929-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.011

Analysis of 7H-azuleno[1,2,3-*i,j*] isoquinolin-7-one components from *Acorus* traditional Chinese medicine based on UPLC-Q-TOF/MS²

LI Juan^{1,2,3}, HUANG Yu-ting¹, DUAN Yan¹,
MA Yuan¹, YANG Zi-yi¹, YAN Jian-ye¹, LI Shun-xiang^{1,2,3*}

¹Hunan University of Chinese Medicine; ²Hunan Engineering Technology Research
Center for Bioactive Substance Discovery of Chinese Medicine;

³Hunan Province Sino-US International Joint Research Center for Therapeutic
Drugs of Senile Degenerative Diseases, Changsha 410208, China

Abstract: This study aimed to investigate the variety and distribution of 7H-azuleno[1,2,3-*i,j*] isoquinoline-7-one (7H-AI7O) components from *Acorus* traditional Chinese medicine. Using liquid-liquid extraction, solvent extraction, column chromatography separation technology and thin-layer chromatography, the enrichment fragments of 7H-AI7O components from *Acori Calami Rhizome* and *Acori Tatarinowii Rhizome* were prepared with neo-tatarine as the reference substance, and then UPLC-Q-TOF/MS² was used to analyze the composition of 7H-AI7O. Identified by thin-layer chromatography, among 10 batches of *Acorus* traditional Chinese medicine, only batches S2, S4 and S5 of *Acori Calami Rhizome* and S6 of *Acori Tatarinowii Rhizome* contained 7H-AI7O components. According to the analysis of the mass spectrometry fragmentation rule of neo-tatarine and target compounds, five 7H-AI7O compounds were detected in batch S2, two 7H-AI7O compounds were detected in batch S4, and only neo-tatarine was detected in batch S5 and S6. Although the number of test samples is limited, according to the analysis of the current results, there are 7H-AI7O components in both *Acori Calami Rhizome* and *Acori Tatarinowii Rhizome*, the distribution of the origin of *Acori Calami Rhizome* containing 7H-AI7O compounds is wider than that of *Acori Tatarinowii Rhizome*.

收稿日期: 2023-04-20

接受日期: 2023-07-28

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81903783); 湖南中医药大学重点学科中药学科(2023-2)

* 通信作者 Tel: 86-731-88459421; E-mail: lishunxiang@hotmail.com

novii Rhizome, and types of 7H-AI7O components in *Acori Calami Rhizome* were more than in *Acori Tatarinowii Rhizome*. This study provides experimental basis for multiple plant sources, trace component detection, and related mechanisms of action of 7H-AI7O components.

Key words: *Acorus*; *Acori Calami Rhizome*; *Acori Tatarinowii Rhizome*; 7H-azuleno[1,2,3-*i,j*] isoquinolin-7-one; neo-tatarine

APG IV 系统是由被子植物系统发育研究组 (angiosperm phylogeny group, APG) 建立的被子植物分类系统的第四版, 该分类系统认为菖蒲目 (Acorales) 属于中生被子植物中的单子叶植物分支, 是单子叶植物的最基部类群, Acorales 下仅有一科 (菖蒲科 Acoraceae) 一属 (菖蒲属 *Acorus*), 常见植物有菖蒲 (*Acorus calamus* L.) 和石菖蒲 (*Acorus tatarinowii* Schott)^[1]。2020 版《中国药典》收录的菖蒲属药材有石菖蒲 (*Acori Tatarinowii Rhizome*) 和藏菖蒲 (*Acori Calami Rhizome*)^[2], 藏菖蒲是因藏药习用而得名, 其基原植物分别为石菖蒲 (*A. tatarinowii* Schott) 和菖蒲 (*A. calamus* L.)。现代药学研究证明, 菖蒲属中药具有较好的改善学习记忆和认知能力的作用^[3-6]。近年来, 除挥发油、 β -细辛醚、倍半萜等活性较明显的成分外^[7-9], 还从菖蒲属中药中发现了活性较好的生物碱类成分, Lao 等^[10]从石菖蒲中分离得到菖蒲碱甲 (tatarine A)、菖蒲碱乙和菖蒲碱丙, 其中, 含此 3 个成分的石菖蒲乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物能显著改善东莨菪碱所致记忆障碍模型小鼠的记忆障碍; Li 等^[11]从菖蒲中分离得到菖蒲碱甲和菖蒲新碱 (neo-tatarine), 这两个生物碱对受损神经细胞具有良好的保护作用。

菖蒲新碱是一种结构新颖的环庚三烯酮异喹啉生物碱 (tropoloisoquinoline alkaloid, 简称 TA), 化学名 6-羟基-5,8-二甲氧基-7H-萸[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮 (6-hydroxy-5,8-dimethoxy-7H-azuleno[1,2,3-*i,j*] isoquinolin-7-one), 其基本母核为 7H-萸[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮 (7H-azuleno[1,2,3-*i,j*] isoquinolin-7-

one, 简称 7H-AI7O, 骨架见图 1)^[11], 菖蒲新碱是目前从自然界中发现的唯一具有 7H-AI7O 结构母核的化合物, 但菖蒲新碱在植物中的量极少, 从 10 kg 植物菖蒲的干燥根茎中仅分离得到 5 mg。因此, 鉴于 7H-AI7O 类成分的结构特点和生物活性, 本文以菖蒲新碱为对照品, 以 7H-AI7O 类成分为监测对象, 采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS²) 联用技术, 快速监测和鉴定菖蒲属中药 7H-AI7O 类成分的组成和分布, 为进一步丰富该类成分的植物来源和相关药物的研发, 提供一定的实验依据。

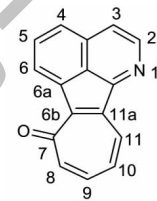


图 1 7H-AI7O 的结构骨架

Fig. 1 Structural skeleton of 7H-AI7O

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2020 年和 2021 年的 11 月份在西藏、安徽、湖南等地, 共采集 10 批菖蒲属植物 (见表 1), 由湖南中医药大学王智副教授鉴定为菖蒲科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 和菖蒲 *Acorus calamus* L., 取石菖蒲和菖蒲根茎, 除去须根和泥沙, 洗净, 阴干, 得到石菖蒲和藏菖蒲药材。标本保存于湖南中医药大学湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心。

表 1 菖蒲属药材的采集信息

Table 1 Collection information of *Acorus* medicinal materials

编号 No.	药材名称 Name of medicinal materials	基原植物 Original plant	采集地点 Collection place	采集时间 Collection time	标本编号 Sample number
S1	藏菖蒲	菖蒲 <i>A. calamus</i> L.	湖南浏阳市张坊镇田溪村	2021. 11. 10	AC211110-1
S2	藏菖蒲	菖蒲 <i>A. calamus</i> L.	湖南浏阳市大围山	2021. 11. 10	AC211110-2
S3	藏菖蒲	菖蒲 <i>A. calamus</i> L.	西藏林芝市波密县	2020. 11. 14	AC201114-3
S4	藏菖蒲	菖蒲 <i>A. calamus</i> L.	安徽省六安市霍山县	2020. 11. 24	AC201124-4
S5	藏菖蒲	菖蒲 <i>A. calamus</i> L.	西藏林芝市察隅县	2020. 11. 16	AC201116-5
S6	石菖蒲	石菖蒲 <i>A. tatarinowii</i> Schott	湖南浏阳市大围山	2021. 11. 10	AT211110-1

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	药材名称 Name of medicinal materials	基原植物 Original plant	采集地点 Collection place	采集时间 Collection time	标本编号 Sample number
S7	石菖蒲	石菖蒲 <i>A. tatarinowii</i> Schott	湖南衡阳市白果镇	2021. 11. 18	AT211118-2
S8	石菖蒲	石菖蒲 <i>A. tatarinowii</i> Schott	安徽省六安市霍山县	2020. 11. 24	AT201124-3
S9	石菖蒲	石菖蒲 <i>A. tatarinowii</i> Schott	西藏林芝市波密县	2020. 11. 14	AT201114-4
S10	石菖蒲	石菖蒲 <i>A. tatarinowii</i> Schott	西藏林芝市察隅县	2020. 11. 16	AT201116-5

试剂:薄层色谱用硅胶(青岛海洋化工集团公司),柱色谱硅胶(300~400目,青岛海洋化工集团公司),乙醇、甲醇、石油醚(60~90℃)、乙酸乙酯、丙酮和硫酸等试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Xevo G2-XS Q-TOF/MS 四级杆飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司);BSA 124S-CW 分析天平(深圳市华恒仪器有限公司);Heraeus Pico 17 高速离心机(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 石菖蒲和藏菖蒲药材中 7H-AI7O 类成分的富集

菖蒲属药材干品粉碎成粗粉,取 100 g 置 2000 mL 圆底烧瓶中,加乙醇回流提取 2 次,每次提取 1.5 h,加 10 倍药材量溶剂,过滤,合并提取液,50℃减压浓缩至无醇味,提取物继续加水 50 mL 使悬浮,转移至分液漏斗,依次用石油醚(60~90℃)和乙酸乙酯萃取 5 次,每次 100 mL,合并乙酸乙酯萃取液,50℃减压浓缩至干,加适量乙醇溶解,上硅胶柱色谱(Φ 3.0 cm × 50.0 cm)分离,依次用不同梯度的石油醚-丙酮(6:1,3:1和 1:1)和甲醇洗脱,每个梯度的溶剂用量为 2 倍柱体积,流速 3 mL/min,洗脱液接样 50 mL/瓶,以菖蒲新碱为对照品,采用薄层层析法(TLC),吸取各洗脱样品 20 μ L,分别点于硅胶 G 薄层板上,以石油醚-丙酮(5:4)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视,与菖蒲新碱对照品斑点比较,确定各批次含 7H-AI7O 类成分的洗脱馏分并合并,50℃减压浓缩至干,即得菖蒲属中药 7H-AI7O 类成分的富集部位。

1.3.2 菖蒲新碱对照品溶液的制备

精密称取菖蒲新碱 2.0 mg,置 10 mL 容量瓶,加三氯甲烷-甲醇(1:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,精密移取 1 mL 置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得,作为 TLC 用对照品溶液。取 TLC

用对照品溶液,加甲醇稀释制成浓度为 20 ng/mL,离心(5 000 r/min)5 min,取上清液,作为 UPLC-Q-TOF/MS² 检测用对照品溶液。

1.3.3 UPLC-Q-TOF/MS² 检测用供试品溶液的制备

称取“1.3.1”制备的不同产地菖蒲属中药 7H-AI7O 类成分的富集部位各 5 mg,加甲醇溶解并定容至 25 mL 容量瓶中,摇匀,离心(5 000 r/min)5 min,取上清液,备用。

1.3.4 UPLC-Q-TOF/MS² 的检测方法

液相色谱条件:ACQUITY UPLC-BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm,1.7 μ m),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),洗脱程序 0~3 min,10%→15% B;3~20 min,15%→30% B;20~40 min,30%→55% B;40~55 min,55%→80% B;55~60 min,80%→10% B,流速 0.3 mL/min,柱温 30℃,进样量 1 μ L。

质谱条件:应用电喷雾正离子模式进行检测,扫描方式为 MRE 扫描,使用 ESI-L Low Concentration Tuning Mix (G1969-8500) 对准确质量数进行矫正。一级全扫质量扫描范围为 m/z 100~1 200,分辨率为 30 000,除溶剂气体为氮气;干燥气流速为 6.8 L/min;毛细管电压为 4.0 kV;Fragment 电压为 110 V;鞘气温度为 350℃;二级质谱使用依赖性扫描,在一级扫描基础之上选择前三强进行诱导碰撞解离获取其二级质谱数据。

1.3.5 数据分析

以菖蒲新碱的一级和二级质谱裂解途径为参比,结合目标生物碱保留时间、一级和二级质谱裂解信息,比较分析不同产地石菖蒲和藏菖蒲药材中存在的 7H-AI7O 类成分。

2 实验结果

2.1 菖蒲属中药 7H-AI7O 类成分富集部位的确定

菖蒲属中药中 7H-AI7O 类成分含量较低,分析前需富集 7H-AI7O 类成分获得富集部位。不同批次石菖蒲和藏菖蒲药材经溶剂提取、溶剂萃取和硅

胶柱色谱分离,以菖蒲新碱为对照,经 TLC 定性分析,仅在藏菖蒲 S2 批、S4 批和 S5 批,石菖蒲 S6 批的洗脱馏分中检测到 7H-AI7O 类成分(TLC 色谱图中呈深红色斑点),分别将这 4 批药材中具有红色斑点的洗脱馏分合并,S2 批合并 1~45 馏分、S4 批合并 11~38 馏分、S5 批合并 9~19 馏份、S6 批合并 13~18 馏分,再进行 UPLC-Q-TOF/MS² 检测和分析。

2.2 UPLC-Q-TOF/MS² 检测结果

2.2.1 菖蒲新碱对照品的质谱裂解途径分析

UPLC-Q-TOF/MS² 监测菖蒲属中药中 7H-AI7O 类成分,采用正离子模式,一级质谱和二级质谱可清晰观察到 7H-AI7O 类成分的准分子离子峰和相关碎片峰,而负离子模式下基本不能观察到相关裂解的碎片峰。

正离子模式下,菖蒲新碱的准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 308.0926,根据二级质谱(见图 2B),推测其裂解途径为 m/z 308.0926 先丢失 1 分子 CO 生成 m/z 280.0971 碎片离子,碎片 m/z 280.0971 的 8 位甲氧基和 6 位羟基依次丢失 CH_3 和 H 自由基产生 m/z 265.0725 和 264.0659 的碎片离子,碎片 264.0659 继续丢失 1 个 CO 分子得到 m/z 236.0710 碎片离子。根据裂解途径分析,7H-AI7O 母核 C-7 位易丢失一个中性 CO 分子,再在 C-8 位甲氧基丢失 1 个 CH_3 自由基,C-6 位羟基丢失 1 个 H 自由基,结构发生电子重排,生成 C-6 和 C-7 位羰基取代的茚莨生物碱(azafluoranthene alkaloid, AA) 结构,继续丢失一个 CO 分子,详见质谱裂解途径(见图 2C)。

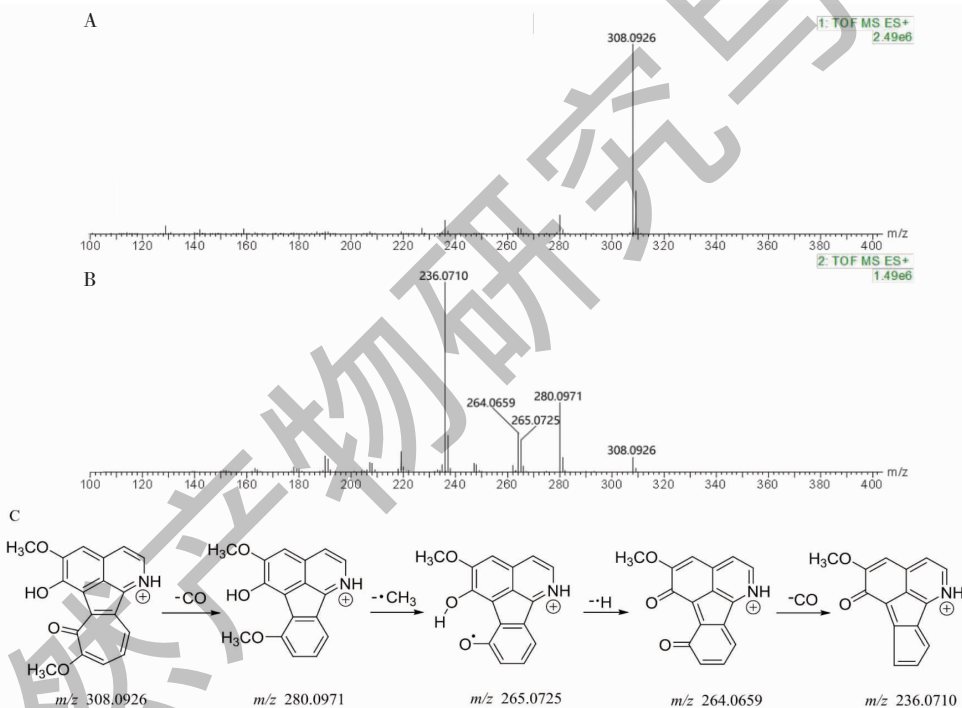


图 2 正离子模式下菖蒲新碱的一级质谱图(A)、二级质谱图(B)和可能的裂解途径(C)

Fig. 2 Primary mass spectrometry (A), secondary mass spectrometry (B), and possible fragmentation pathways (C) of neo-tatarine in positive ion mode

2.2.2 不同产地菖蒲属中药 7H-AI7O 类成分的分析

根据菖蒲新碱对照品的一级质谱和二级质谱的裂解途径比对和目标化合物裂解规律分析,藏菖蒲 S2 批、S4 批和 S5 批和石菖蒲 S6 批检测的 7H-AI7O 类成分的富集部位中,产自湖南浏阳市大围山的 S2 批藏菖蒲中检测到 4 种结构取代基类型,分析出 5 个具有 7H-AI7O 结构的化合物,产自安徽省六安市霍山县的 S4 批藏菖蒲中检测到 2 种结构取代基类

型,分析出 2 个具有 7H-AI7O 结构的化合物,其余产自西藏林芝市察隅县的 S5 批藏菖蒲和产自湖南浏阳市大围山的 S6 批石菖蒲,都只检测到菖蒲新碱。本实验结合化合物取代基种类和极性,以藏菖蒲 S2 批中除菖蒲新碱外的 4 个 7H-AI7O 类化合物为例,分析菖蒲属中药中 7H-AI7O 类成分的结构,详见 4 批样本的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)(见图 3)和母离子及主要碎片离子信息(见表 2)。

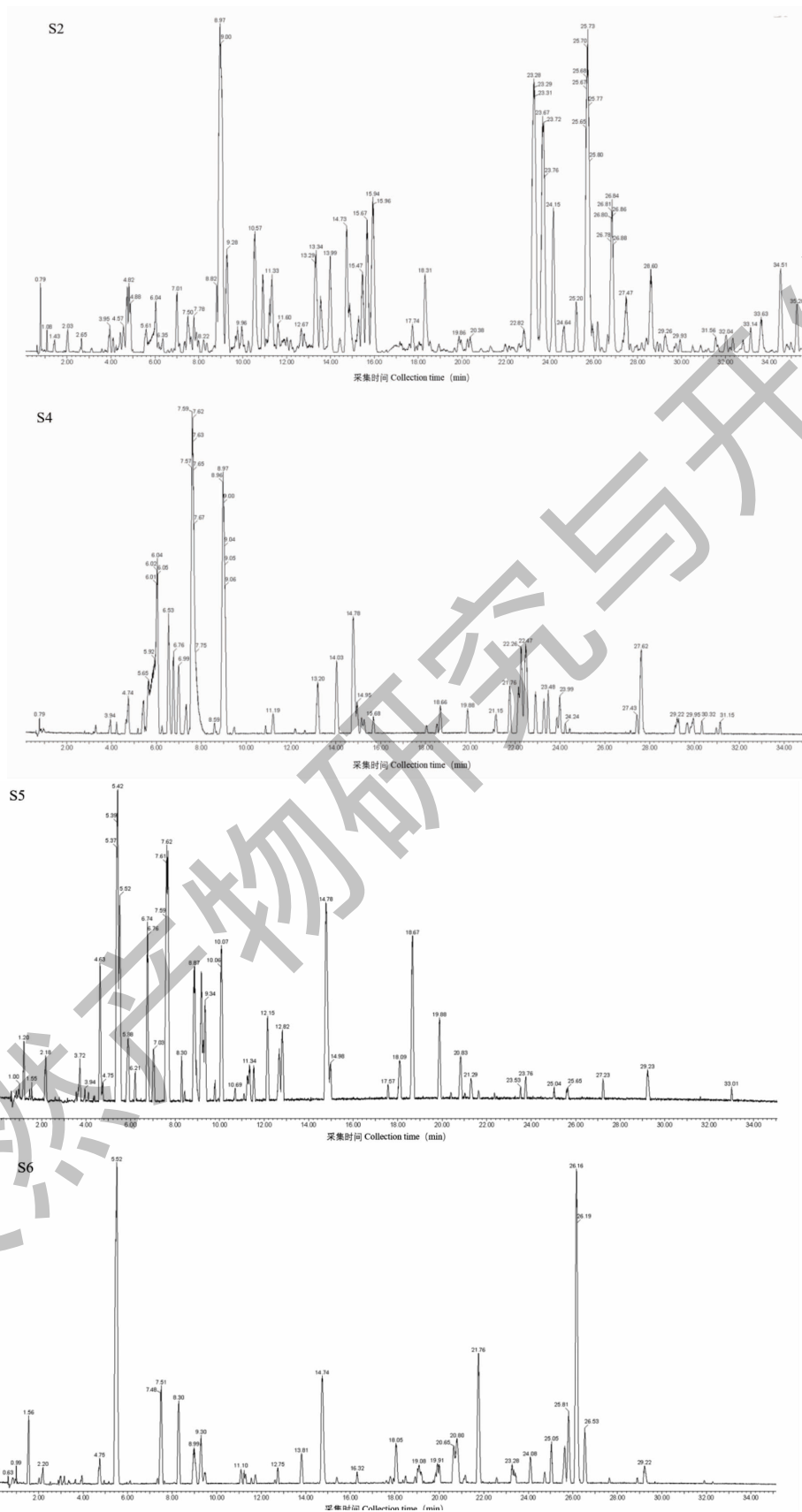


图3 正离子模式下 S2、S4、S5 和 S6 批药材 7H-AI7O 类成分富集部位的总离子流图

Fig. 3 TIC of the enriched sites of 7H-AI7O components in batches S2, S4, S5, and S6 of medicinal materials in positive ion mode

表2 S2、S4、S5 和 S6 批菖蒲属中药中 7H-AI7O 类成分的母离子及主要碎片离子
Table 2 Parent ions and major fragment ions of 7H-AI7O components in batches S2, S4, S5, and S6 of *Acorus* traditional Chinese medicine

编号 No.	t_R (min)	取代基数目 Numbers of substituent			化合物名称 Compound name	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Relative molecular mass		碎片离子 Fragment ion (MS/MS)
		OCH ₃	OH	OCH ₂ CH ₃			[M + H] ⁺		
S2	14.02	3	-	-	5, 6, 8-Trimethoxy-7H-azuleno[1,2,3- <i>i,j</i>]isoquinolin-7-one	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	321.100 1	322.107 8	294.112 2、279.086 0、 264.065 2、236.069 2、 234.090 6、204.079 7
	14.73	2	1	-	菖蒲新碱 Neo-tatarine	C ₁₈ H ₁₃ NO ₄	307.084 5	308.092 5	280.097 2、265.073 5、 264.065 8、236.070 8
	17.11	2	-	1	5, 8-Dimethoxy-6-ethoxy-7H-azuleno[1,2,3- <i>i,j</i>]isoquinolin-7-one	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	335.115 8	336.123 7	308.128 0、308.089 9、 280.097 0、278.082 2、 265.072 2、264.065 9、 250.086 2、236.070 9
	17.74	2	-	1	5, 8-Dimethoxy-9-ethoxy-7H-azuleno[1,2,3- <i>i,j</i>]isoquinolin-7-one	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	335.115 8	336.123 3	308.128 9、308.092 4、 280.097 4、265.072 9、 264.066 7、236.070 9
	18.31	1	1	1	5-Ethoxy-6-hydroxy-8-methoxy-ethoxy-7H-azuleno[1,2,3- <i>i,j</i>]isoquinolin-7-one	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	321.100 1	322.107 7	294.114 0、294.076 3、 266.081 3、251.057 0、 223.062 1
S4	14.03	3	-	-	5, 6, 8-Trimethoxy-7H-azuleno[1,2,3- <i>i,j</i>]isoquinolin-7-one	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	321.100 1	322.107 8	294.112 2、278.080 9、 264.065 2、250.085 4、 236.069 2、232.074 8、 204.079 7
	14.78	2	1	-	菖蒲新碱 Neo-tatarine	C ₁₈ H ₁₃ NO ₄	307.084 5	308.092 1	280.097 3、265.073 3、 264.065 7、236.070 7
S5	14.78	2	1	-	菖蒲新碱 Neo-tatarine	C ₁₈ H ₁₃ NO ₄	307.084 5	308.091 7	280.096 6、265.072 8、 264.065 4、236.070 3
S6	14.74	2	1	-	菖蒲新碱 Neo-tatarine	C ₁₈ H ₁₃ NO ₄	307.084 5	308.092 5	280.096 8、265.073 1、 264.065 3、236.070 5

依据菖蒲新碱裂解规律,并结合 TA 与 AA 天然产物的结构分析^[10],7H-AI7O 结构母核上通常有 OH、OCH₃ 和 COOH 等取代基,并以 OH、OCH₃ 取代为主,基本未发现烷烃基直接取代的情况。

5,6,8-三甲氧基-7H-萹[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的准分子离子峰为 [M + H]⁺ m/z 322.107 8,根据二级质谱(见图 4B),推测母离子 m/z 322.107 8 先丢失 1 个 CO 分子得到 m/z 294.112 2 碎片离子,再依次丢失 3 个 CH₂O 得到 m/z 204.079 7 碎片离子;同时, m/z 294.112 2 碎片离子也可依次丢失 2 个 CH₃ 自由基,经电子重排,得到 m/z 264.065 2 碎片离子,再继续丢失 1 分子 CO。从裂解途径分析,该化合物的结构中应该有 3 个 OCH₃ 取代基,且在 6 和 8

位有 OCH₃ 取代,详见质谱裂解途径(见图 4C)。

5,8-二甲氧基-6-乙氧基-7H-萹[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的准分子离子峰为 [M + H]⁺ m/z 336.123 7,根据二级质谱(见图 5B)分析,母离子 m/z 336.123 7 丢失 1 个 CO 和 1 个 C₂H₄ 得到 m/z 280.097 0 碎片离子, m/z 280.097 0 离子同菖蒲新碱,依次丢失 CH₃ 和 H 自由基产生 m/z 264.065 9 碎片离子,再继续丢失 1 个 CO 生成 m/z 236.070 9 碎片离子。根据裂解途径分析,该化合物结构中存在 1 个 OCH₂CH₃ 和 2 个 OCH₃ 取代基,初步确定 6 位和 8 位为 OCH₂CH₃ 和 OCH₃ 取代,另 1 个 OCH₃ 可能在除 6、7 和 8 位的其他位置取代,详见质谱裂解途径(见图 5C)。

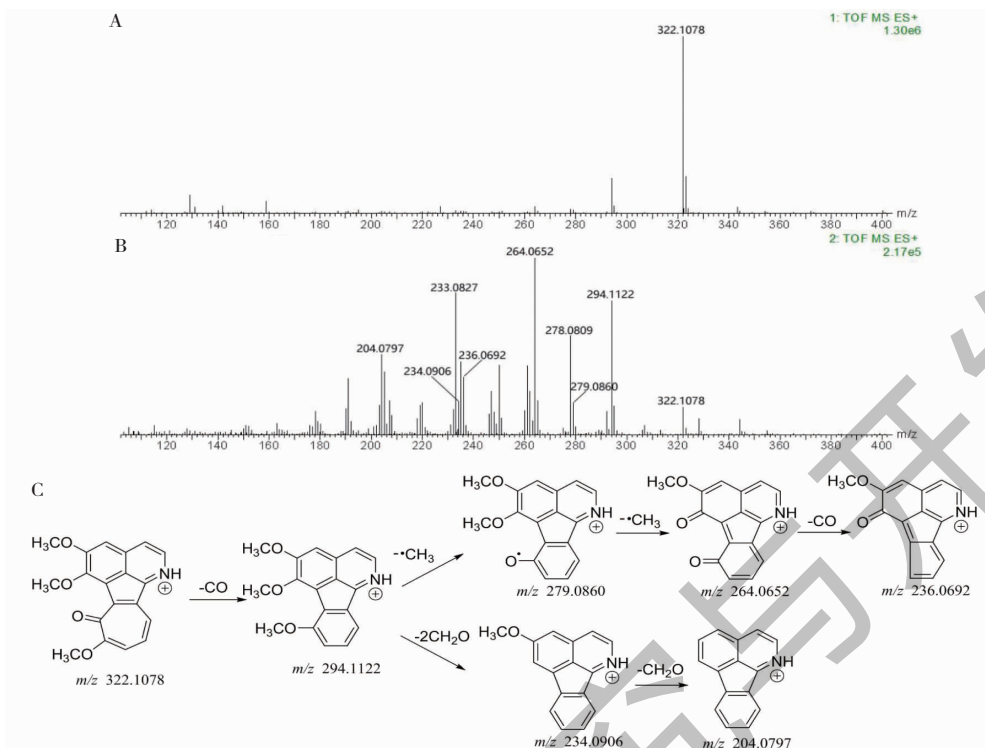


图 4 正离子模式下 5,6,8-三甲氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的一级质谱图(A)、二级质谱图(B)和可能的裂解途径(C)

Fig. 4 Primary mass spectrometry (A), secondary mass spectrometry (B), and possible fragmentation pathways (C) of 5,6,8-trimethoxy-7*H*-azuleno[1,2,3-*i,j*]isoquinolin-7-one in positive ion mode

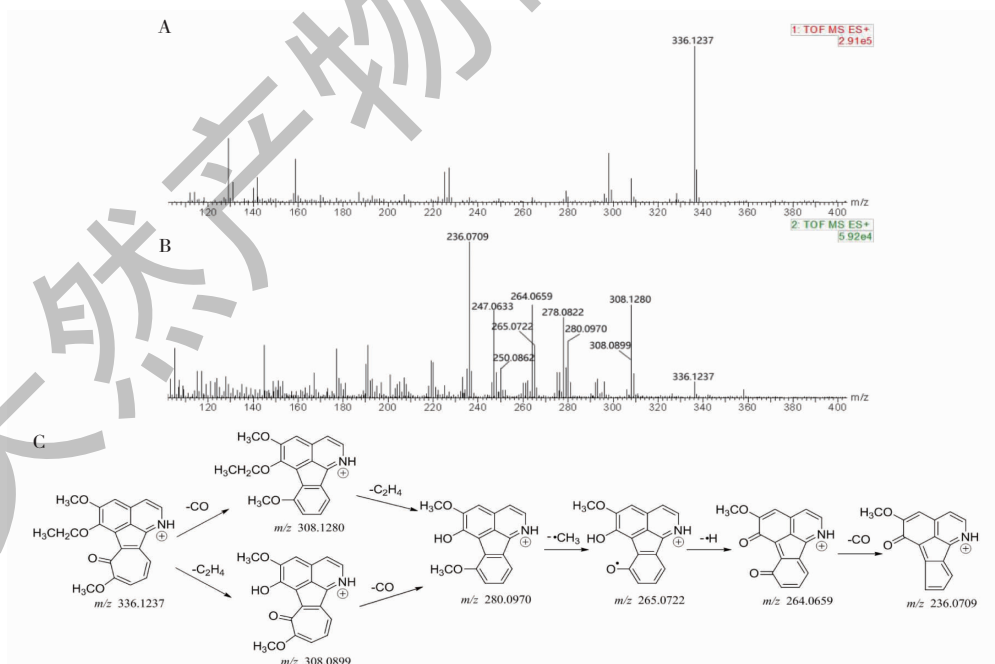


图 5 正离子模式下 5,8-二甲氧基-6-乙氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的一级质谱图(A)、二级质谱图(B)和可能的裂解途径(C)

Fig. 5 Primary mass spectrometry (A), secondary mass spectrometry (B), and possible fragmentation pathways (C) of 5,8-dimethyl-6-ethoxy-7*H*-azuleno[1,2,3-*i,j*]isoquinolin-7-one in positive ion mode

5,8-二甲氧基-9-乙氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 336.1233, 根据二级质谱(见图6B), 推测其裂解途径为, 母离子 m/z 336.1233 丢失1个CO和1个C₂H₄, 得到 m/z 280.0974 碎片离子, m/z 280.0974 离子再依次丢失1个CH₃、1个H自由基和1个CO生成 m/z 236.0709 碎片离子。根据裂解途径分析结构中有2个OCH₃和1个OCH₂CH₃取代基, 取代基类型同5,8-二甲氧基-6-乙氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮, 但从离子流图分析, 5,8-二甲氧基-6-乙氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的 t_R 值17.11 min, 5,8-

二甲氧基-9-乙氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的 t_R 值17.74 min, 说明这两个化合物的极性有差异, 其极性差异与取代基位置直接相关, 初步推测这两个化合物的极性差异与6位是否有OCH₂CH₃取代有关, 当6位有OCH₂CH₃取代时, 与7位羰基产生空间位阻, 一定程度上, 影响7*H*-AI7O的刚性平面, 使化合物极性增大; 当6位无OCH₂CH₃取代时, 不与7位羰基产生空间位阻, 化合物极性相对前者较小, 而OCH₂CH₃取代基位置可能在4、5、9、10或11位, 详见质谱裂解途径(见图6C)。

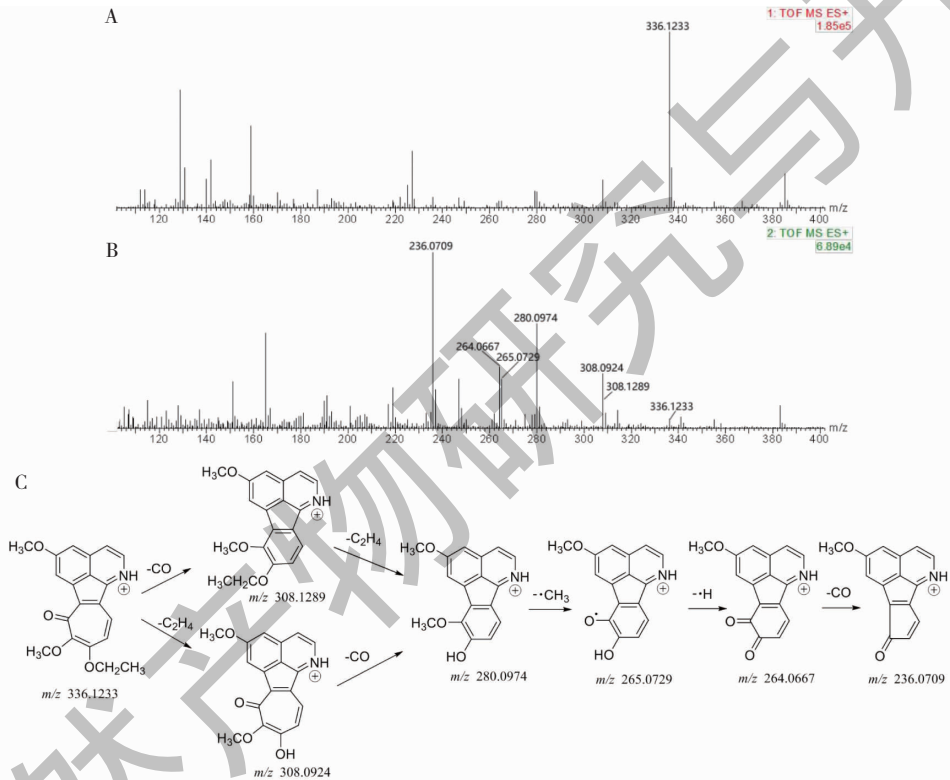


图6 正离子模式下5,8-二甲氧基-9-乙氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的一级质谱图(A)、二级质谱图(B)和可能的裂解途径(C)

Fig. 6 Primary mass spectrometry (A), secondary mass spectrometry (B), and possible fragmentation pathways (C) of 5,8-dimethyl-9-ethoxy-7*H*-azuleno[1,2,3-*i,j*]isoquinolin-7-one in positive ion mode

以5-乙氧基-6-羟基-8-甲氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮为例说明, 该化合物的准分子离子峰为 $[M + H]^+$ m/z 322.1077, 根据二级质谱(见图7B), 推测裂解途径为母离子 m/z 322.1077 分别丢失1个CO分子、1个C₂H₄生成 m/z 266.0813 碎片离子, 再失去1个CH₃ 自由基和1个CO, 生成 m/z 223.0621 碎片离子, 分析结构中存在1个OCH₂CH₃、1个OCH₃和1个OH取代基; 当6位有

OCH₃或OCH₂CH₃取代时, 与7位羰基产生空间位阻, 化合物极性增大, 但与5,6,8-三甲氧基-7*H*-莨[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮和菖蒲新碱的结构和极性比较分析, 该化合物的极性较小, 推测6位无OCH₃或OCH₂CH₃取代, 可能有OH取代, 当6位是OH取代时, 与7位羰基形成分子内氢键缔合, 极性较其他位羟基取代时小, 且OCH₃和OCH₂CH₃的取代基可能在4、5、8、9、10或11位中的任意2个位置取

代,详见质谱裂解途径(见图7C)。

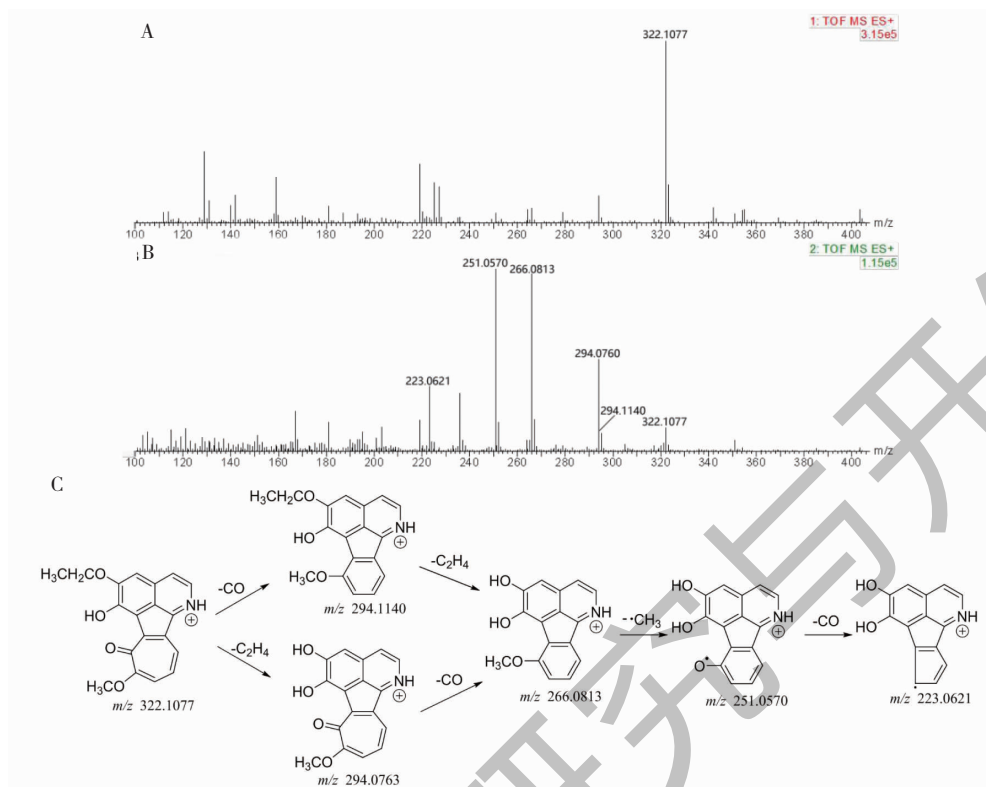


图7 正离子模式下5-乙氧基-6-羟基-8-甲氧基-7H-萸[1,2,3-*i,j*]异喹啉-7-酮的一级质谱图(A)、二级质谱图(B)和可能的裂解途径(C)

Fig. 7 Primary mass spectrometry (A), secondary mass spectrometry (B), and proposed fragmentation pathways (C) of 5-ethoxy-6-hydroxy-8-methoxy-7H-azuleno[1,2,3-*i,j*]isoquinolin-7-one in positive ion mode

二级质谱裂解中7H-AI7O类成分除丢失CO生成 $[M+H-28]^+$ 碎片离子外,结构中8位甲氧基可丢失1个CH₃自由基,6位羟基丢失1个H自由基,发生电子重排后,再丢失1个CO分子,当结构中有OCH₂CH₃取代时,易丢失乙炔分子,生成羟基。因此,可根据碎片离子峰判断7H-AI7O的取代基种类和数目,但不能完全确定7H-AI7O中取代基的具体位置。

3 讨论与结论

目前,本实验仅采集了5批藏菖蒲和5批石菖蒲,样本数量有限、产地较局限,但就目前采集的样本,仍能获得一些信息,藏菖蒲和石菖蒲药材中都存在7H-AI7O类成分;含7H-AI7O类成分的藏菖蒲较石菖蒲的产地分布广;藏菖蒲中所含7H-AI7O化合物的结构种类较石菖蒲的丰富,但研究内容还不够完善,后续将继续扩大标本的采集范围,积累样本数,全面系统地分析不同产地菖蒲属药材中7H-AI7O类成分的分布情况及含量变化规律;对监测到

含有丰富的7H-AI7O类成分的菖蒲属药材进行系统分离,获得具体化合物,进一步完善不同取代基7H-AI7O类成分的质谱数据库,为快速准确地检测和确定7H-AI7O类成分的结构提供实验依据。

植物来源的7H-AI7O量极少,前期实验发现^[11],在菖蒲中可同时分离得到菖蒲新碱(7H-AI7O结构)和菖蒲碱甲(AA结构),这两个化合物的结构差异主要在于前者在7位多一个羰基,结合7H-AI7O类成分易丢失CO生成 $[M+H-28]^+$ 的裂解特点推测,植物体内7H-AI7O与AA类成分之间可能存在生物转化关系,因此,后续研究中也会开展菖蒲属中药7H-AI7O与AA类成分的生物转化关系,及土壤、气候等因素对植物体内7H-AI7O类成分生物合成的影响,为进一步挖掘菖蒲属中药开窍豁痰,醒神益智的物质基础提供实验依据。

参考文献

1 The angiosperm phylogeny group. An update of the angio-

- sperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants; APG IV [J]. Bot J Linn Soc, 2016, 181:1-20.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 93, 396.
 - 3 Tian SM, Ma YX, Sun LZ, et al. Effects of different fractions of *Acori Graminei* Rhizoma extracts on learning and memory abilities in $A\beta$ -induced Alzheimer disease mice [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2012, 28:159-162.
 - 4 Mukherjee PK, Kumar V, Mai M, et al. In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity of the essential oil from *Acorus calamus* and its main constituents [J]. Plant Med, 2007, 73: 283-285.
 - 5 Oh MH, Houghton PJ, Whang WK, et al. Screening of Korean herbal medicines used to improve cognitive function for anti-cholinesterase activity [J]. Phytomedicine, 2004, 11: 544-548.
 - 6 Reddy S, Rao G, Shetty B, et al. Effects of *Acorus calamus* rhizome extract on the neuromodulatory system in restraint stress male rats [J]. Turk Neurosurg, 2015, 25:425-431.
 - 7 Chen Y, Wei G, Nie H, et al. β -Asarone prevents autophagy and synaptic loss by reducing ROCK expression in asenescence-accelerated prone 8 mice [J]. Brain Res, 2014, 1552, 41-54.
 - 8 Xue Z, Guo Y, Zhang S, et al. Beta-asarone attenuates amyloid beta-induced autophagy via Akt/mTOR pathway in PC12 cells [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 741:195-204.
 - 9 Hao ZY. Studies on chemical constituents of the Rhizomes of *Acorus calamus* Linn. and their bioactivities [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College (中国医学科学院北京协和医学院), 2012.
 - 10 Lao AN, Tang XC, Wang HC, et al. Extraction of tatarines A, B and C from *Acorus calamus* for therapeutic use (石菖蒲中菖蒲碱及它们的用途): CN97106786.4 [P]. 1999-06-23.
 - 11 Li J, Li ZX, Zhao JP, et al. A novel tropoloisoquinoline alkaloid, neo-tatarine, from *Acorus calamus* L. [J]. Chem Biodivers, 2017, 14: e1700201.
-
- (上接第 1955 页)
- 17 Ju XY, Cao CL, Jiang JH, et al. Purification and characteristics of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus nebrodensis* [J]. Mycosystema (菌物学报), 2010, 29:403-408.
 - 18 Duan YJ, Katrolia Priti, Zhong AL, et al. Production, purification and characterization of a novel antithrombotic and anticoagulant serine protease from food grade microorganism *Neurospora crassa* [J]. Prep Biochem Biotech, 2022, 52: 1008-1018.
 - 19 Deng YP, Liu XL, Kopparapu NK, et al. A dual-function chymotrypsin-like serine protease with plasminogen activation and fibrinolytic activities from the GRAS fungus, *Neurospora sitophila* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 109:1338-1343.
 - 20 Shen MH, Jin J, Park S, et al. Purification of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Lyophyllum ulmarium* [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2007, 28:41-43.