

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的沉香 2-(2-苯乙基)色酮聚合物成分分析

阳辛凤^{1,3}, 梅文莉², 李 薇², 庞朝海^{1,3}, 董文化², 潘永波⁴, 张 群^{1,3}

1. 中国热带农业科学院分析测试中心/海南省热带果蔬产品质量安全重点实验室, 海南海口 571101; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/海南省沉香工程技术研究中心, 海南海口 571101; 3. 农业农村部亚热带果品蔬菜质量安全控制重点实验室, 海南海口 571101; 4. 海南省食品检验检测中心, 海南海口 571101

摘要: 为了明确沉香 (*Aquilaria* spp.) 药材中 2-(2-苯乙基)色酮聚合物 (PPECs) 组分及其结构, 本研究采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 采集沉香样品一级与二级质谱图, 对 PPECs 的质谱裂解途径进行分析, 对沉香药材中 PPECs 组分进行筛查与结构确证。共鉴定出 PPECs 组分 55 个, 根据结构特征, 55 个组分分属于 3 种结构类型, 即 2-(2-苯乙基)色酮二聚物 (DPECs)、2-(2-苯乙基)色酮三聚物 (TPECs) 和萜类-2-(2-苯乙基)色酮二聚物 (SPECs)。鉴定的全部组分包括 44 个 DPECs、3 个 TPECs 和 8 个 SPECs, 其中 9 个 DPECs、1 个 TPECs 和 1 个 SPECs 首次在沉香中被发现; 其次, 沉香 PPECs 的部分组分具有 2~4 个同分异构体。综上, 沉香药材中 PPECs 组分及其同分异构体丰富, 且 DPECs 类型的组分在总 PPECs 中所占比例最高 (80%)。该研究结果可为沉香药效物质基础研究及开发利用提供参考。

关键词: 沉香; 2-(2-苯乙基)色酮聚合物; 超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱

中图分类号: Q949.761.1; R284.1 文献标识码: A

Analysis of Polymeric 2-(2-Phenylethyl) Chromones from the Agarwood by UPLC-Q-TOF-MS/MS

YANG Xinfeng^{1,3}, MEI Wenli², LI Wei², PANG Chaohai^{1,3}, DONG Wenhua², PAN Yongbo⁴, ZHANG Qun^{1,3}

1. Analysis and Testing Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Provincial Key Laboratory of Quality and Safety for Tropical Fruits and Vegetables, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Engineering Research Center of Agarwood, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruit and Vegetable, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Hainan Institute for Food Control, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: In order to explore the polymeric 2-(2-phenylethyl) chromones (PPECs) components and the structures from agarwood (*Aquilaria* spp.), ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass /mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to acquire the spectrum of TOF-MS and TOF-MS/MS of agarwood samples. The fragmentation pathway of PPECs was analyzed. The screening and structure confirmation of PPECs from agarwood was performed. A total of 55 PPECs components were identified. According to the structural characteristics, 55 components were grouped into three types, including dimeric 2-(2-phenylethyl) chromones (DPECs), trimeric 2-(2-phenylethyl) chromones (TPECs) and sesquiterpenoid-2-(2-phenylethyl) chromones (SPECs). All identified components were consisted of 44 DPECs, 3 TPECs and 8 SPECs, of which nine DPECs, one TPECs and one SPECs were firstly identified in agarwood. Furthermore, 2–4 isomers were observed for some PPECs components from agarwood. The results showed that agarwood were rich in PPECs components and the corresponding isomers. Meanwhile, the proportion of DPECs was the highest (80%) among total PPECs. The results could provide reference for the study of material basis of phar-

收稿日期 2022-06-14; 修回日期 2022-09-09

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2020160)。

作者简介 阳辛凤 (1971—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 农产品质量安全; E-mail: yangxinf@sina.com。

macodynamics effect and utilization of agarwood.

Keywords: agarwood; polymeric 2-(2-phenylethyl) chromones (PPECs); UPLC-Q-TOF-MS/MS

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.09.017

沉香 (agarwood) 是由瑞香科沉香属 (*Aquilaria* spp.) 植物木质部组织及其分泌物共同组成的木材^[1-3], 主要分布于印度尼西亚、马来西亚、越南、柬埔寨、中国等国家^[3-5]。沉香是一种珍稀药材, 具有安神镇静、消炎止痛、抗菌、抗氧化、抗心肌缺血、抗肿瘤等功效^[3, 6-9]。2-(2-苯乙基)色酮聚合物 (PPECs) 是与沉香药理活性密切相关的一类重要生物活性物质^[3]。根据结构特征, PPECs 分为 3 类, 由 2 个或 3 个 2-(2-苯乙基)色酮单元结合形成的 2-(2-苯乙基)色酮二聚物 (DPECs) 和 2-(2-苯乙基)色酮三聚物 (TPECs), 以及由萜类与 2-(2-苯乙基)色酮单元结合形成的萜类-2-(2-苯乙基)色酮二聚物 (SPECs)^[3-5]。在已有报道中, 气质联用技术是对沉香中化学成分进行分析的主要方法, 广泛用于萜类为主的众多挥发性成分和低分子量 2-(2-苯乙基)色酮类成分的鉴定^[10-16]。然而沉香中 PPECs 分子量较大, 沸点高, 不适于气质联用分析。目前对沉香 PPECs 的分析多沿用传统的先分离纯化后结构鉴定方式^[17-20]。据报道, 从不同产地、不同品种沉香中分离鉴定的 2-(2-苯乙基)色酮类成分约 250 个, 其中 PPECs 约 100 个^[3-5]。近年来, 超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 开始应用于沉香中色酮类成分的鉴定, 鉴定了 AH12、AH13、AH15、AH21、methoxy AH21、dehydroxy AH21 等 PPECs^[5, 21-23]。PPECs 不仅具有生物活性, 而且多样性丰富, 是沉香产地鉴定、结香方式鉴别的重要标志性成分^[5, 21-23], 因此有必要深入挖掘沉香 PPECs 分子资源。

本研究采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 对沉香 PPECs 成分进行鉴定, 有助于深入了解沉香药材的药物组成, 为沉香药材的现代化与标准化提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 沉香对照药材购自中国食品药品检定研究院。

1.1.2 试剂 乙腈(色谱纯), 购自德国默克公司; 甲酸(色谱纯), 购自美国 Fisher 公司。超纯水为 Milli-Q 系统纯化水, 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱仪: Triple TOF 5600⁺型, 安装有 Analyst[®] TF 1.6 工作站、PeakView[®] 2.0 软件, 美国 AB SCIEX 公司; 电子天平: ME204 型, 感量 0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司; 电子天平: JJ500 型, 感量 0.01 g, 江苏常熟市双杰测试仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 提取 称取沉香对照药材粉末 0.50 g, 置于 50 mL 具塞三角瓶中, 加入甲醇 10 mL, 称重, 浸泡 0.5 h, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 KHz) 1 h, 冷却, 再次称重, 滴加甲醇补足重量, 摇匀, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待上机分析。

1.2.2 仪器参数 液相色谱仪参数: Waters Atlantis T3 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 3.0 μm); 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 5% B; 2~5 min, 5%~15% B; 5~10 min, 15%~20% B; 10~28 min, 20%~25% B; 28~50 min, 25%~35% B; 50~60 min, 35%~40% B; 60~80 min, 40%~90% B; 80~87 min, 90% B; 87~88 min, 90%~5% B; 88~90 min, 5% B; 流速 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 5 μL。

飞行时间质谱仪参数: ESI 离子源, 电喷雾正离子模式, 离子源电压 5500 V, 离子源温度 550 °C, 雾化气 55 psi, 辅助气 55 psi, 气帘气 35 psi, 去簇电压 100 V, 碰撞能量 35 eV, 能量扩展±15 eV, TOF-MS 扫描范围 50~1200 Da, Product Ion 扫描范围 50~1000 Da。扫描方式为 IDA 模式。

1.3 数据处理

采取靶向检索与非靶向检索相结合策略。

靶向检索: 通过查询文献, 建立 PPECs 组分列表, 包括英文名称、CAS 号、分子结构式、分子量、二级碎片离子质荷比 (m/z) 等信息。将样品数据导入 PeakView 软件进行检索, 依据测定的精确质量数与理论的精确质量数的偏差小于

5 mmol/L 的原则以及同位素分布模式, 确定各色谱峰的成分归属, 根据二级碎片离子信息推断各色谱峰所对应未知物的结构, 并与文献报道进行比对从而进一步确证结构。

非靶向检索: 样品数据导入 PeakView 软件进行非靶向检索, 如果色谱峰的精确质量数与同位素偏差均小于 5 mmol/L, 母离子 m/z 大于 400, 碎裂反应时以脱水、脱羰基等中性丢失为主要形式, 且二级碎片离子中具有 m/z 为 91、107、121、137、164、192、227、239、255、267、283、301 等特征离子, 则初步判定该未知物属于 PPECs。采用 Formula Finder 程序推测未知物分子式, 并基于 PPECs 的质谱裂解规律以及二级质谱碎片信息, 推断 PPECs 中 2-(2-苯乙基)色酮结构单元的类型和结合方式, 以及取代基类型与位置, 初步确定 PPECs 的结构。绘制 PPECs 结构式并将其导入 PeakView 软件, 通过 Frangment Pane 程序计算理论二级碎片与实际二级碎片之间的匹配度, 从而确定 PPECs 结构, 并与文献报道进行比对从而进一步确证结构。

2 结果与分析

2.1 PPECs 鉴定结果

采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析沉香 PPECs, 在正离子模式下进行一级及二级质谱数据采集, 获得各未知物的保留时间、准分子离子峰及 MS/MS 碎片离子的精确相对分子质量。共鉴定出 PPECs 成分 55 个, 其中 44 个 DPECs、3 个 TPECs 和 8 个 SPECs。DPECs 组分最为丰富, 在总 PPECs 中所占比例最高, 达到 80%; 其次是 SPECs (14.5%); TPECs 组分最少, 仅为 5.5%。相关成分的质谱信息列于表 1, 结构见图 1~图 3。

2.2 质谱裂解规律分析

2.2.1 色酮二聚物 (DPECs) 沉香样品中共鉴定出 44 个 DPECs 成分, 分别是化合物 **1~17**、**19~31**、**33**、**35**、**36**、**40~47** 和 **48~50** (表 1, 图 1)。图 1 表明, DPECs 的结构单元之间的连接方式具有差异性, 根据 2-(2-苯乙基)色酮单元之间连接方式的不同, 44 个 DPECs 成分分为 4 种类型, A 型 DPECs 的结构单元之间通过 C-C 键相连, 如化合物 **50**; B 型 DPECs 结构单元之间通过 C-O-C 键相连, 如化合物 **1**、**2**、**3**、**6**、**7** 等; C 型 DPECs 结

构单元之间通过 2 个 C-O-C 键相连, 如化合物 **3**、**4**、**5**、**36** 等; D 型 DPECs 其结构单元之间通过 C-C 键和 C-O-C 键相连, 如化合物 **28**、**42**、**44~46**。

DPECs 的质谱裂解具有较强的规律性, 如常见的有脱水 ($[M+H-18]^+$)、脱羧 ($[M+H-44]^+$)、脱羰基 ($[M+H-28]^+$)、碳碳键 (C-C) 断裂等^[5, 11, 17], 这些规律是对 DPECs 进行结构分析的重要依据。序号 20、25、27 和 41 的色谱峰其母离子具有相同的质荷比 (m/z) 和相同的分子式, 鉴定为 AH15 及其同分异构体, 它们的二级质谱图与可能的质谱裂解途径见图 4 和图 5。色谱峰 20 母离子 ($[M+H]^+$) m/z 为 583.1986, 连续 2 次失去水分子分别产生碎片 m/z 565.1865 ($[M+H-18]^+$) 和 m/z 547.1758 ($[M+H-36]^+$), m/z 547.1758 丢失羰基则产生碎片 m/z 519.1807 ($[M+H-36-28]^+$), m/z 519.1807 丢失苯环则产生碎片 m/z 441.1330 ($[M+H-36-28-78]^+$)。其次, m/z 583.1986 的 C-O-C 键发生断裂, 断裂产物随后发生脱水反应, 生成碎片 m/z 301.1078, m/z 301.1078 失去一分子水产生碎片 m/z 283.0966, m/z 283.0966 脱去一分子羰基生成碎片 m/z 255.1008, 脱去一分子 CO_2 则生成 m/z 239.1049, m/z 283.0966 的色酮环与苯环之间 C7'、C8' 处的 C-C 键受到电子轰击而断裂, 生成碎片 m/z 192.0398 和 m/z 91.0525。根据以上分析, 推测该未知物是 AH15, 即沉香四醇与 6,7-二羟基-2-(2-苯乙基)色酮通过 C-O-C 键相连形成的色酮二聚物。

同理, 通过对其他色谱峰二级碎片等信息进行分析, 确定了共 44 种 DPECs 化合物的结构 (图 1)。其中 9 个 DPECs 化合物尚无文献报道, 即化合物 **1**、**7~11**、**13**、**14** 和 **21**, 是潜在的新化合物。

本研究从沉香样品中鉴定的 PPECs 组分普遍具有同分异构体, 如 AH13、AH15 各有 4 个同分异构体, AH21、dehydroxy AH21、AH12 等各有 2 个同分异构体。据 LI 等^[5]报道, 沉香 PPECs 同分异构体丰富, 如, AH15 同分异构体多达 13 个, AH21 同分异构体有 7 个, hydroxyl AH11、AH12、AH13 则各有 6 个同分异构体。PPECs 结构中含有色酮环, 环上的氢原子、羟基、甲氧基等取代基的取代位置不同和化学键空间朝向不同是同分异构体丰富的主要来源。具有相同分子式的一组同分异构体的共同特征是质谱二级碎片大多相同, 但保留时间不同。液相色谱-飞行时间质谱能

表 1 沉香色酮聚合物 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果
Tab. 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis results of polymeric chromones from agarwood

序号 No.	保留 时间 Rt/min	[M+H] ⁺ 理论值/测定值 Theoretical/ Experimental(m/z)	偏差 Error/ (mmol·L ⁻¹)	二级碎片 Fragmentions (m/z)	分子式 Formula	分子质量 Mass/Da	化合物 Compound	类别 Classifi- cation	参考 文献 Ref.
1	13.90	693.2178/693.2199	3.0	675, 657, 639, 611, 465, 429, 365, 347, 329, 327, 313, 301, 137	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₄	692.2030	2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxy phenyl)ethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{5",6"-epoxy-7"-hydroxy-2-[2-(3'''-hydroxy-4'''-methoxyphenyl)ethyl]chromonyl-8-oxy}chromone	DPECs	
2	17.22	675.2072/675.2075	0.4	657, 639, 611, 463, 447, 329, 301, 285, 137	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₃	674.1994	2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxy phenyl)ethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"-hydroxy-2-[2-(3'''-hydroxy-4'''-methoxyphenyl)ethyl]chromonyl-7-oxy}chromone	DPECs	[3]
3	18.79	565.1857/565.1876	3.4	547, 519, 283, 91, 164, 227, 255, 192	C ₃₄ H ₂₈ O ₈	564.1784	AH21 (isomer 1)	DPECs	[4-5]
4	19.05	595.1963/595.1968	0.8	577, 549, 313, 283, 255, 227, 192, 164, 121, 91	C ₃₅ H ₃₀ O ₉	594.1884	4'-methoxyaquisinenone G	DPECs	[3-4]
5	19.38	625.2068/625.2079	1.8	607, 579, 343, 313, 285, 121	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₀	624.1990	4,4'-dimethoxy aquisinenone G	DPECs	[3-4]
6	19.96	689.2229/689.2242	1.9	671, 653, 517, 343, 329, 301, 137	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₃	688.2504	2-[2-(3'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"-methoxy-2-[2-(3'''-methoxy-4'''-hydroxyphenyl)ethyl]chromonyl-7-oxy}chromone (isomer 1)	DPECs	[3]
7	21.82	677.2229/677.2244	2.2	659, 641, 623, 605, 595, 489, 466, 449, 413, 347, 345, 327, 313, 297, 227, 121	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₃	676.2150	2-[2-(4'-methoxy phenyl)ethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{5",6"-epoxy-7"-hydroxy-2-[2-(3'''-hydroxy-4'''-methoxyphenyl)ethyl]chromonyl-8-oxy}chromone	DPECs	
8	21.83	647.2123/647.2138	2.3	629, 611, 593, 575, 419, 383, 347, 327, 283, 267, 137	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₂	646.2045	2-(2-phenylethyl)-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{5",6"-epoxy-7"-hydroxy-2-[2-(3'''-hydroxy-4'''-methoxyphenyl)ethyl]chromonyl-8-oxy}chromone	DPECs	
9	22.59	619.2174/619.2183	1.4	601, 583, 547, 319, 301, 283, 255, 227, 164, 91	C ₃₄ H ₃₄ O ₁₁	618.2096	2,2'-di-(2-phenylethyl)-8,8'-bi tetrahydrochromone (isomer 1)	DPECs	
10	26.64	659.2123/659.2153	4.6	641, 623, 461, 445, 431, 329, 313, 137, 121	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₂	658.2045	2-[2-(4'-methoxy phenyl)ethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{5"-hydroxy-2-[2-(3'''-hydroxy-4'''-methoxyphenyl)ethyl]chromonyl-7-oxy}chromone	DPECs	
11	26.65	619.2174/619.2188	2.3	601, 583, 319, 301, 283, 255, 227, 164, 91	C ₃₄ H ₃₄ O ₁₁	618.2096	2,2'-di-(2-phenylethyl)-8,8'-bi tetrahydro-chromone (isomer 2)	DPECs	
12	27.34	689.2229/689.2239	1.4	671, 653, 517, 475, 459, 343, 329, 301, 137	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₃	688.2504	2-[2-(3'-Hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"-methoxy-2-[2-(3'''-methoxy-4'''-hydroxyphenyl)ethyl]chromonyl-7-oxy}chromone (isomer 2)	DPECs	[3]
13	27.42	629.2017 629.2039	3.5	611, 593, 575, 565, 329, 283, 255, 137	C ₃₅ H ₃₂ O ₁₁	628.1939	2-[2-(3',4'-hydroxy)-phenylethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"-methoxy-2-[2-(4'''-methoxy)-phenylethyl]chromonyl-7-oxy}chromone	DPECs	
14	34.35	601.2068/601.2060	-1.3	583, 565, 547, 451, 319, 301, 283, 255, 227, 164, 121, 91	C ₃₄ H ₃₂ O ₁₀	600.199	2-(2-phenylethyl)-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-[5",6'-epoxy-7"-hydroxy-2-(2-phenylethyl)chromonyl-8-oxy]chromone	DPECs	
15	37.52	673.2280/673.2279	0.1	655, 637, 475, 459, 343, 313, 137, 121	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₂	672.2201	2-[2-(4'-Methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"-methoxy-2-[2-(3'''-methoxy-4'''-hydroxyphenyl)ethyl]chromonyl-7-oxy}chromone, (isomer 1)	DPECs	[3-4]
16	38.77	643.2174/643.2198	3.7	625, 607, 331, 313, 269, 258, 121	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₁	642.2096	4,4'-dimethoxyaquisinen-one K	DPECs	[3, 18]

续表 1 沉香色酮聚合物 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果
Tab. 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis results of polymeric chromones from agarwood (continued)

序号 No.	保留 时间 Rt/min	[M+H] ⁺ 理论值/测定值 Theoretical/ Experimental(m/z)	偏差 Error/ (mmol·L ⁻¹)	二级碎片 Fragmentions (m/z)	分子式 Formula	分子质量 Mass/Da	化合物 Compound	类别 Classifi- cation	参考 文献 Ref.
17	39.22	673.2280/673.2296	2.4	655, 637, 623, 475, 459, 343, 327, 313, 269, 137, 121	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₂	672.2201	2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7-t rihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8- {6"-methoxy-2-[2-(3"-methoxy-4"-h ydroxyphenyl)ethyl]chromonyl- 7-oxy}chromone, (isomer 2)	DPECs	[3-4]
18	39.48	599.2851/599.2874	3.8	329, 347, 581, 563, 545, 457, 365, 313, 301, 283, 255, 233, 217, 137, 121	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₀	599.2772	sesquiterpene-2-(2-phenylethyl) chromone dimer	SPECs	[18]
19	39.72	613.2068/613.2095	4.4	595, 577, 549, 313, 302, 283, 255, 239, 121, 91	C ₃₅ H ₃₂ O ₁₀	612.1990	2-(2-phenylethyl)-5,6,7-trihydroxy-5, 6,7,8-tetrahydro-8-{2-[2-(3"-hydroxy -4"- methoxy)phenylethyl] chromonyl-6-oxy}chromone	DPECs	[18]
20	40.76	583.1963/583.1989	4.4	565, 547, 519, 441, 415, 373, 301, 283, 255, 239, 192, 91	C ₃₄ H ₃₀ O ₉	582.1890	aquisinenone K (AH15) (isomer 1)	DPECs	[3-5]
21	41.02	641.2017/641.2049	5.0	623, 329, 313, 285, 137, 121	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₁	640.1939	(7",8"-epoxy-6"-hydroxy)-2-[2-(4'- methoxy phenyl)ethyl]-5,6,7,8- tetrahydro-5-{7"-hydroxy-2-[2- (3"-hydroxy-4"-methoxyphenyl) ethyl]chromonyl-6-oxy}chromone	DPECs	
22	41.33	657.2330/657.2341	1.7	639, 621, 327, 313, 285, 121	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₁	656.2251	2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7-t rihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"- methoxy-2-[2-(4"-methoxyphenyl) ethyl]chromonyl-7-oxy}chromone (isomer1)	DPECs	[3-4]
23	42.86	657.2330/657.2332	0.3	639, 621, 603, 593, 357, 347, 327, 313, 285, 121	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₁	656.2251	2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7-t rihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"- methoxy-2-[2-(4"-thoxyphenyl) ethyl]chromonyl-7-oxy} chromone (isomer2)	DPECs	[3-4]
24	43.62	567.2013/567.2028	2.6	283, 267, 91, 164, 255, 239, 531, 549, 503, 228, 227, 192	C ₃₄ H ₃₀ O ₈	566.1941	AH13 (isomer 1)	DPECs	[4-5]
25	43.75	583.1963/583.1981	2.9	565, 547, 519, 301, 283, 255, 239, 192, 91	C ₃₄ H ₃₀ O ₉	582.1890	aquisinenone K (AH15) (isomer 2)	DPECs	[3-5]
26	43.86	627.2225/627.2237	1.9	627, 609, 591, 573, 563, 327, 313, 297, 283, 255, 220, 121	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₀	626.2146	crassin C	DPECs	[4]
27	45.17	583.1963/583.1981	2.9	565, 547, 519, 441, 415, 373, 301, 283, 255, 239, 192, 91	C ₃₄ H ₃₀ O ₉	582.1890	aquisinenone K (AH15) (isomer 3)	DPECs	[3-5]
28	48.21	655.2174/655.2195	3.2	637, 343, 327, 191, 137, 121	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₁	654.2096	hydroxy aquisinenone D	DPECs	[3]
29	49.20	597.2119/597.2118	-0.2	579, 561, 297, 283, 255, 121, 91	C ₃₅ H ₃₂ O ₉	596.2041	AH12 (isomer 1)	DPECs	[4-5]
30	50.17	657.2330/657.2358	4.3	639, 621, 327, 313, 121	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₁	656.2251	2-[2-(4'-methoxyphenyl)ethyl]-5,6,7-t rihydroxy-5,6,7,8-tetrahydro-8-{6"- methoxy-2-[2-(4"-methoxyphenyl) ethyl]chromonyl-7-oxy}chromone (isomer3)	DPECs	[3-4]
31	50.76	597.2119/597.2128	1.5	579, 561, 533, 429, 387, 297, 283, 267, 255, 239, 164, 121, 91	C ₃₅ H ₃₂ O ₉	596.2041	AH12 (isomer 2)	DPECs	[4-5]
32	50.88	535.2690/535.2691	0.2	517, 499, 283, 301, 255, 217, 192	C ₃₂ H ₃₈ O ₇	534.2612	aquilacrassin A (isomer 1)	SPECs	[3-4]
33	51.57	567.2013/567.2028	2.6	283, 267, 164, 255, 239, 531, 549, 301, 227, 91	C ₃₄ H ₃₀ O ₈	566.1941	AH13 (isomer 2)	DPECs	[4-5]

续表 1 沉香色酮聚合物 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结果
Tab. 1 UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis results of polymeric chromones from agarwood (continued)

序号 No.	保留 时间 Rt/min	[M+H] ⁺ 理论值/测定值 Theoretical/ Experimental(m/z)	偏差 Error/ (mmol·L ⁻¹)	二级碎片 Fragmentions (m/z)	分子式 Formula	分子质量 Mass/Da	化合物 Compound	类别 Classifi- cation	参考 文献 Ref.
34	52.71	883.2960/883.2993	4.1	283, 865, 847, 829, 811, 783, 583, 565, 547, 415, 301, 267, 255, 239, 192,	C ₅₁ H ₄₆ O ₁₄	882.2888	AH18 (isomer 1)	TPECs	[3-5]
35	52.80	567.2013/567.2027	2.5	283, 267, 91, 164, 255, 239, 531, 549, 513, 503, 357	C ₃₄ H ₃₀ O ₈	566.1941	AH13 (isomer 3)	DPECs	[4-5]
36	53.18	565.1857/565.1872	2.6	547, 519, 474, 409, 283, 255, 91, 164, 227, 192	C ₃₄ H ₂₈ O ₈	564.1784	AH21 (isomer 2)	DPECs	[4-5]
37	53.40	551.2640/551.2641	0.2	533, 515, 497, 469, 441, 301, 283, 255, 233, 227, 164, 91	C ₃₂ H ₃₈ O ₈	550.2561	qinanmer	SPECs	[2-3]
38	53.85	883.2960/883.2996	4.0	865, 847, 829, 811, 801, 783, 583, 565, 547, 301, 283, 267, 255, 239, 192, 91	C ₅₁ H ₄₆ O ₁₄	882.2888	AH18 (isomer 2)	TPECs	[3-5]
39	53.92	535.2690/535.2705	2.8	517, 499, 283, 301, 255, 217, 192	C ₃₂ H ₃₈ O ₇	534.2612	aquilacrassnin A (isomer 2)	SPECs	[3-4]
40	54.69	567.2013/567.2041	4.9	283, 267, 91, 164, 255, 239, 531, 549, 513, 503, 485, 440, 357	C ₃₄ H ₃₀ O ₈	566.1941	AH13 (isomer 4)	DPECs	[4-5]
41	57.04	583.1963/583.1987	4.1	565, 547, 519, 441, 415, 301, 283, 281, 255, 239, 192, 121, 91	C ₃₄ H ₃₀ O ₉	582.1890	aquisinenone K (AH15) (isomer 4)	DPECs	[3-5]
42	58.71	579.2014/579.2020	1.0	561, 543, 313, 297, 285, 121	C ₃₅ H ₃₀ O ₈	578.1935	4'-methoxyaquisinenone A (isomer 1)	DPECs	[3, 5]
43	58.99	639.2225/639.2240	2.3	621, 327, 313, 297, 283, 137, 121	C ₃₇ H ₃₄ O ₁₀	638.2146	aquisinenone D	DPECs	[3]
44	60.08	609.2119/609.2132	2.1	591, 327, 297, 283, 255, 227, 191, 164, 137, 121	C ₃₆ H ₃₂ O ₉	608.2041	4,4'-dimethoxyaquisinenone A (isomer 1)	DPECs	[3-4]
45	61.56	609.2119/609.2137	3.0	591, 327, 313, 297, 283, 255, 164, 121	C ₃₆ H ₃₂ O ₉	608.2041	4,4'-dimethoxyaquisinenone A (isomer 2)	DPECs	[3-4]
46	62.01	579.2014/579.2026	2.4	561, 543, 313, 297, 285, 283, 267, 255, 164, 121	C ₃₅ H ₃₀ O ₈	578.1935	4'-methoxyaquisinenone A (isomer 2)	DPECs	[3, 5]
47	62.22	549.1908/549.1931	4.2	531, 513, 283, 267, 255, 227, 164, 91	C ₃₄ H ₂₈ O ₇	548.1830	dehydroxy AH21 (isomer 1)	DPECs	[3-5]
48	65.04	549.1908/549.1930	4.0	531, 513, 283, 267, 255, 227, 164, 91	C ₃₄ H ₂₈ O ₇	548.183	dehydroxy AH21 (isomer 2)	DPECs	[3-5]
49	65.47	585.1675/585.1702	4.6	549, 267, 319, 301, 283, 255, 176, 91	C ₃₄ H ₂₉ O ₇ Cl	584.1596	6-[(8-chloro-6,7-dihydroxy-4-oxo-2-phenethyl-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chromen-5-yl)oxy]-2-phenethyl-chromone (B-type)	DPECs	[5]
50	65.73	547.1751/547.1757	1.1	529, 511, 456, 313, 282, 267, 121, 91	C ₃₄ H ₂₆ O ₇	546.1673	hydroxyl AH11 (A-type)	SPECs	[5]
51	66.29	535.2690/535.2697	1.3	499, 301, 283, 301, 255, 192	C ₃₂ H ₃₈ O ₇	534.2612	aquilacrassnin A (isomer 3)	SPECs	[3-4]
52	67.48	535.2690/535.2703	2.4	517, 499, 283, 301, 255, 217, 192, 164	C ₃₂ H ₃₈ O ₇	534.2612	aquilacrassnin A (isomer 4)	SPECs	[3-4]
53	68.07	565.2796/565.2799	0.5	547, 529, 313, 283, 255, 217, 121	C ₃₃ H ₄₀ O ₈	564.2723	aquilacrassnin D	SPECs	[4]
54	70.93	815.2851/815.2865	1.7	797, 779, 761, 549, 531, 503, 479, 435, 357, 283, 267, 255, 239, 91	C ₅₁ H ₄₂ O ₁₀	814.2772	tri-2-(2-phenylethyl) chromone derivative	TPECs	
55	74.86	581.2745/581.2766	3.6	563, 545, 527, 331, 313, 285, 121	C ₃₃ H ₄₀ O ₈	580.2667	methoxyqinanmer	SPECs	

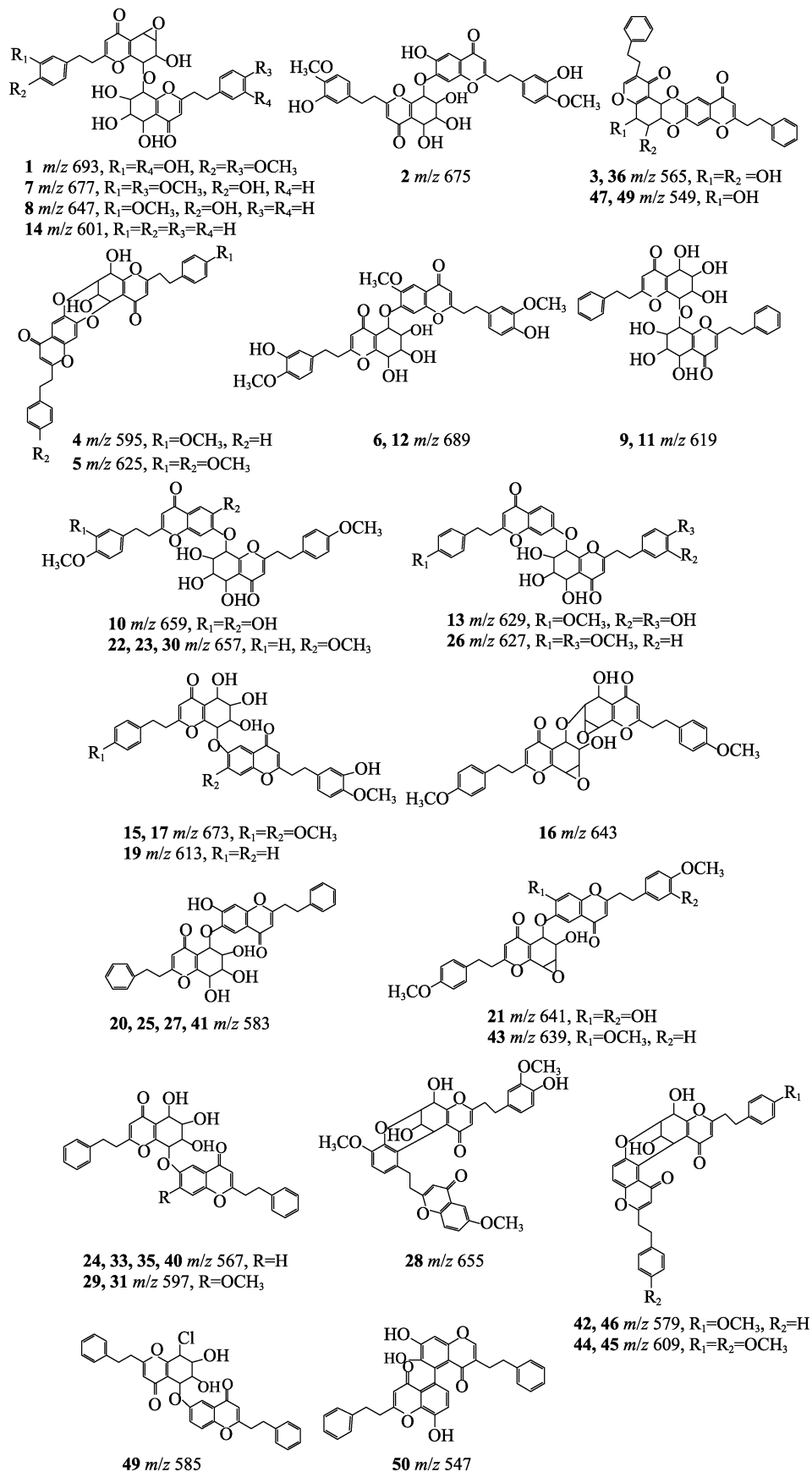


图 1 沉香 2-(2-苯乙基)色酮二聚物的结构

Fig. 1 Structure of DPECs from agarwood

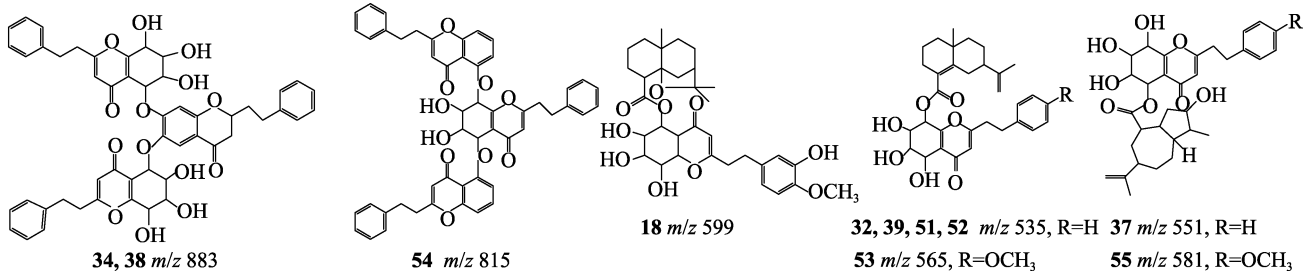


图 2 沉香 2-(2-苯乙基)色酮三聚物的结构

Fig. 2 Structure of TPECs from agarwood

图 3 沉香萜类-2-(2-苯乙基)色酮二聚物的结构

Fig. 3 Structure of SPECs from agarwood

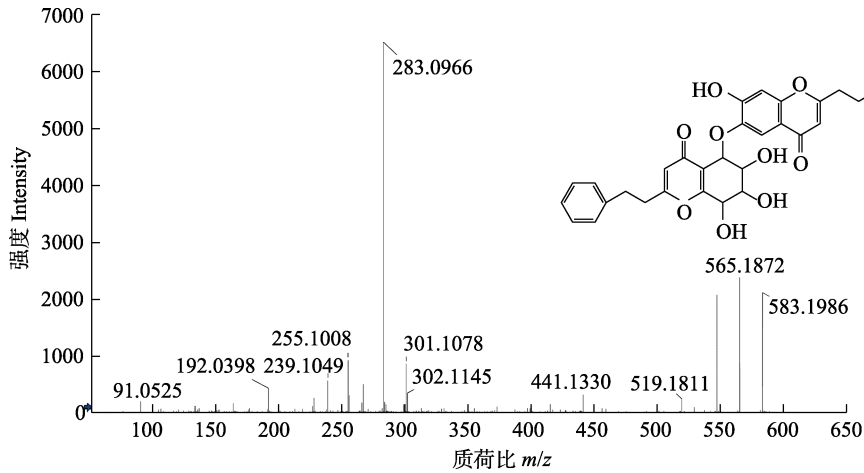


图 4 色酮二聚物 (AH15) 二级质谱图

Fig. 4 MS/MS spectrum of DPECs (AH15)

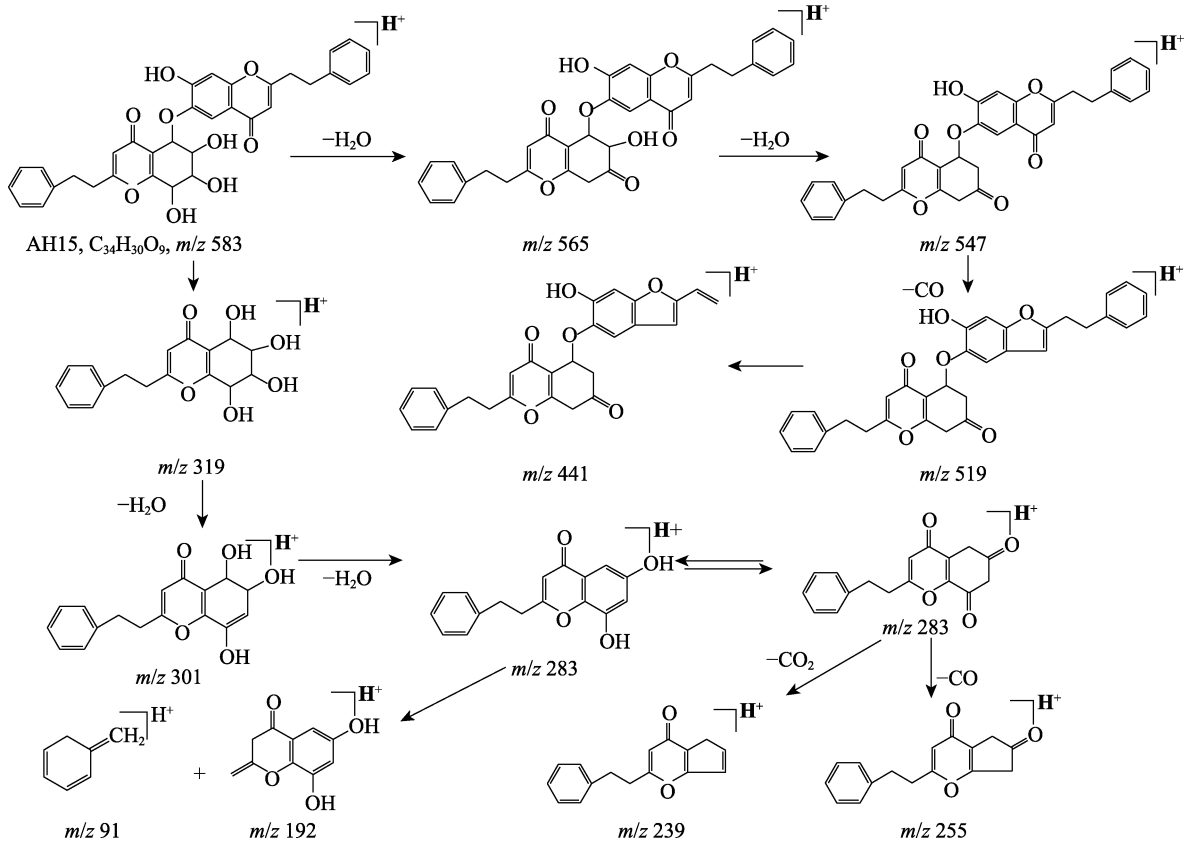


图 5 色酮二聚物 (AH15) 裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathway of DPECs (AH15)

鉴定出分子式相同的一组同分异构体, 但是无法确定结构中各取代基的空间朝向。

2.2.2 色酮三聚物 (TPECs) 从沉香样品中共鉴定出 3 个 TPECs 组分, 分别是化合物 34、38、54 (图 1), 其中化合物 34、38 为同分异构体。化合物 54 的二级质谱图与质谱裂解途径见图 6 和图 7, 母离子 ($[M+H]^+$) m/z 815.2865, 失去一分子水生成碎片 m/z 797.3320 ($[M+H-18]^+$), 化合物 54 结构中的 C-O-C 键发生断裂, 生成 2 个碎

片 m/z 267.1019 和 m/z 567.2241, m/z 567.2241 脱去一分子水生成碎片 m/z 549.1916, m/z 549.1916 继续脱水产生碎片 m/z 531.1816, m/z 531.1816 中的酯键发生断裂产生 m/z 283.0969, m/z 283.0969 脱去一分子 CO_2 则生成 m/z 239.1065。根据质谱裂解规律, 推测化合物 54 是由沉香四醇与两分子 5-羟基-2-(2-苯乙基)色酮通过 C-O-C 键相连形成的色酮三聚物。化合物 54 目前尚无文献报道, 推测为新化合物。

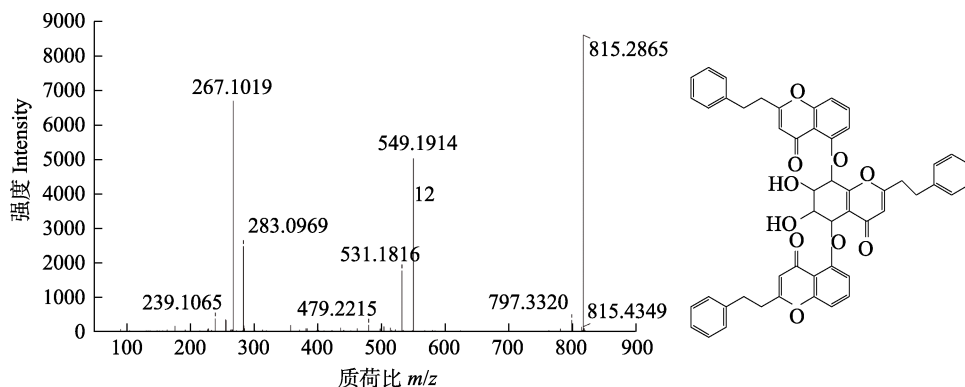


图 6 色酮三聚物 (化合物 54) 二级质谱图

Fig. 6 MS/MS spectrum of TPECs (compound 54)

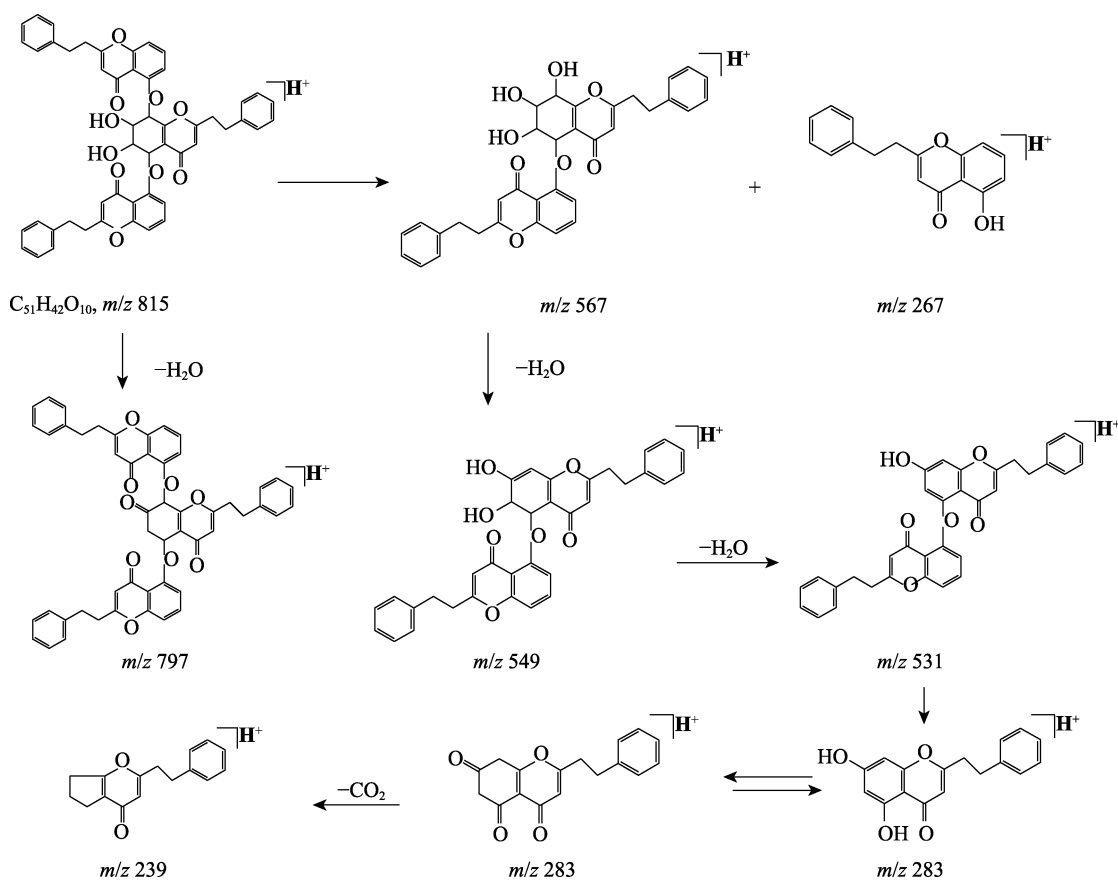


图 7 色酮三聚物 (化合物 54) 裂解途径

Fig. 7 Fragmentation pathway of TPECs (compound 54)

2.2.3 萜类-色酮二聚物 (SPECs) 总共鉴定出 8 个 SPECs 组分, 分别是化合物 **18**、**32**、**37**、**39**、**51**、**52**、**53** 和 **55**。4 个化合物 (**32**、**39**、**51** 和 **52**) 被鉴定为 aquilacrassnin A 及其同分异构体。化合物 **32** 的二级质谱图与质谱裂解途径见图 8 和图 9。化合物 **32** 母离子 ($[M+H]^+$) m/z 535.2691, 失去一分子水生成碎片 m/z 517.2596 ($[M+H-18]^+$), 再失去一分子水生成碎片 m/z 499.2468 ($[M+H-36]^+$)。母离子结构中的酯键发生断裂, 生成 2 个碎片 m/z

235.1678 和 m/z 319.1194, m/z 319.1194 脱去一分子水生成碎片 m/z 301.1054, m/z 301.1054 继续脱水产生碎片 m/z 283.0957, m/z 283.0957 中脱去苯甲基则生成 m/z 192.0397。 m/z 235.1678 脱去一分子水生成碎片 m/z 217.1574, m/z 217.1574 脱去一分子羰基生成碎片 m/z 189.1611。根据以上分析, 推断化合物 **32** 为 aquilacrassnin A, 是沉香四醇与芹子-4,11-二烯-14-油酸 (selina-4,11-dien-14-oic acid) 通过酯键相连形成的二聚物。

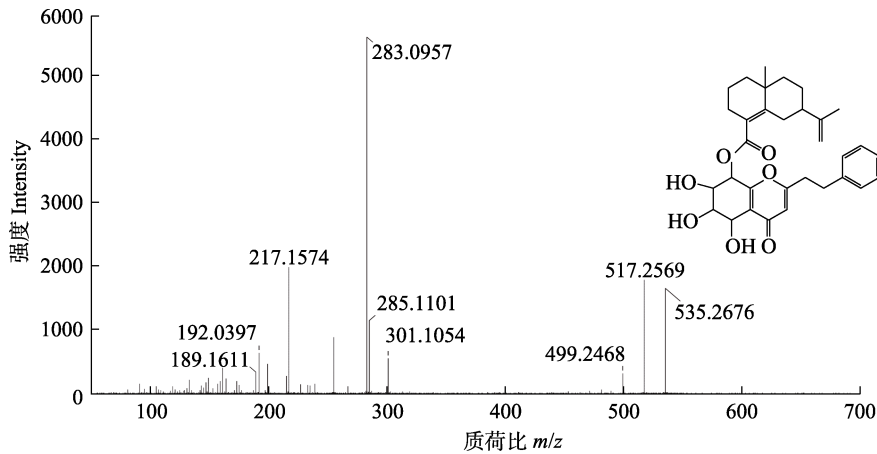


图 8 萜类-色酮二聚物 (aquilacrassnin A) 二级质谱图

Fig. 8 MS/MS spectrum of SPECs (aquilacrassnin A)

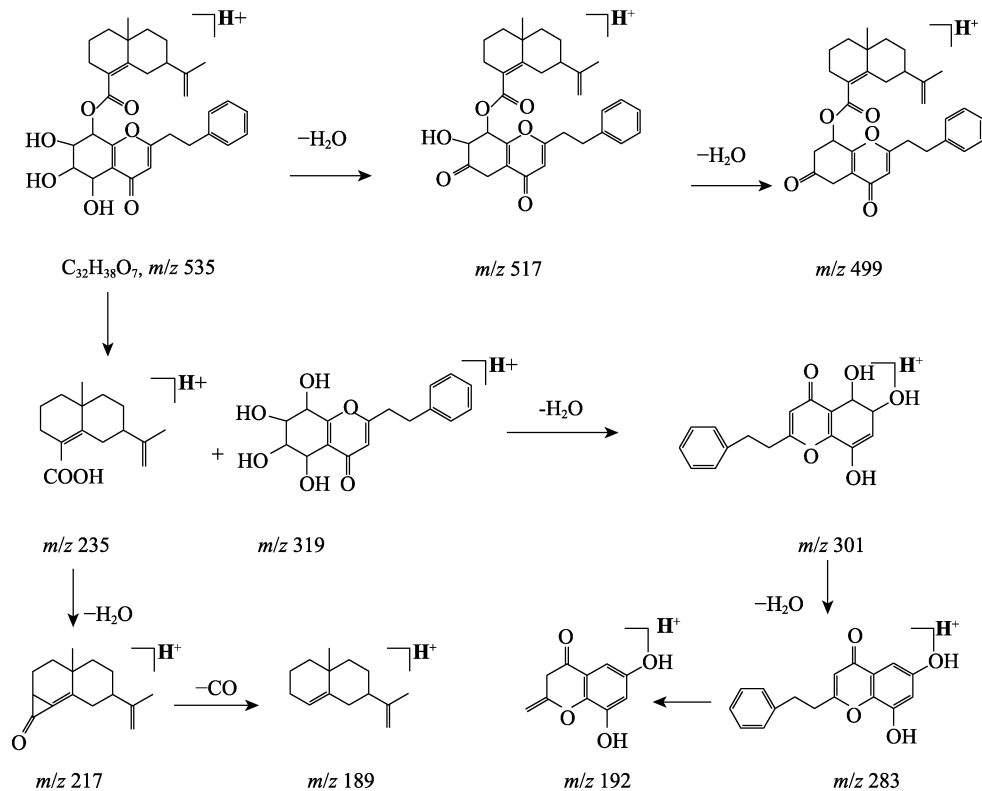


图 9 萜类-色酮二聚物 (aquilacrassnin A) 裂解途径

Fig. 9 Fragmentation pathway of TPECs (aquilacrassnin A)

3 讨论

沉香 2-(2-苯乙基)色酮类化合物种类丰富,但是同分异构体与立体异构体众多,质谱规律呈现出多样性与复杂性,质谱解析难度大。PPECs 的裂解规律与 2-(2-苯乙基)色酮单元裂解规律相似,受到电子轰击时往往先脱去一分子或多分子水,或脱羰基,然后色酮单元之间的化学键发生断裂,生成 2~3 个相应的色酮单元或脱水、脱羰基后的色酮单元,并在此基础上进一步发生碎裂反应,例如色酮单元中连接色酮环和苯环的 C7'、C8' 处的 C-C 键发生断裂,形成色酮离子碎片和苯甲基离子碎片,以及色酮环上发生进一步脱水、脱羰基。

本研究采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱对沉香药材中 PPECs 进行分析,探讨了 PPECs 成分的质谱裂解规律。共鉴定出 55 个 PPECs 成分,包括 2-(2-苯乙基)色酮二聚物(DPECs)44 个,三聚物(TPECs)3 个,萜类-2-(2-苯乙基)色酮二聚物(SPECs)8 个,其中 9 个 DPECs、1 个 TPECs 和 1 个 SPECs 首次在沉香中被发现。其次,沉香 PPECs 的部分组分具有 2~4 个同分异构体。以上结果表明,沉香药材中的 PPECs 组分及其同分异构体丰富,且 DPECs 类型的组分在总 PPECs 中所占比例最高(80%)。研究结果为沉香药效物质基础研究及开发利用奠定基础,为沉香药材的现代化与标准化提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 192-193.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (1st Section)[M]. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Publishing House, 2020: 192-193. (in Chinese)
- [2] 殷亚方, 李改云, 付跃进, 张淑娟, 周飞, 戴好富. 沉香: LY/T 2904—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
YIN Y F, LI G Y, FU Y J, ZHANG S J, ZHOU F, DAI H F. Agarwood: LY/T 2904—2017[S]. Beijing: China Standards Publishing House, 2018. (in Chinese)
- [3] LI W, CHEN H Q, WANG H, MEI W L, DAI H F. Natural products in agarwood and *Aquilaria* plants: chemistry, biological activities and biosynthesis[J]. Natural Product Reports, 2021, 38: 528-565.
- [4] GAO M, HAN X M, SUN Y, CHEN H J, YANG Y, LIU Y Y, MENG H, GAO Z H, XU Y H, ZHANG Z, HAN J P. Overview of sesquiterpenes and chromones of agarwood originating from four main species of the genus *Aquilaria*[J]. RSC Advances, 2019, 9: 4113-4130.
- [5] LI Y B, SHENG N, WANG L L, LI S J, CHEN J N, LAI X P. Analysis of 2-(2-phenylethyl) chromones by UPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate statistical methods in wild and cultivated agarwood[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 771.
- [6] YU Z X, WANG C H, ZHENG W, CHEN D L, LIU Y Y, YANG Y, WEI J H. Anti-inflammatory 5,6,7,8-tetrahydro-2-(2-phenylethyl) chromones from agarwood of *Aquilaria sinensis*[J]. Bioorganic Chemistry, 2020, 99: 103789.
- [7] MI C N, YUAN J Z, ZHU M M, YANG L, DAI H F. 2-(2-Phenylethyl) chromone derivatives: promising α -glucosidase inhibitors in agarwood from *Aquilaria filarial*[J]. Phytochemistry, 2021, 181: 112578.
- [8] LIAO G, MEI W L, KONG F D, LI W, YUAN J Z, DAI H F. 5,6,7,8-Tetrahydro-2-(2-phenylethyl) chromones from artificial agarwood of *Aquilaria sinensis* and their inhibitory activity against acetylcholinesterase[J]. Phytochemistry, 2017, 139: 98-108.
- [9] 肖梦君, 高志晖, 魏建和. 2-(2-苯乙基)色酮类化合物的生物活性及其生物合成研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2019, 54: 1909-1918.
XIAO M J, GAO Z H, WEI J H. Advances in research on bioactivity and biosynthesis of 2-(2-phenylethyl) chromones[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2019, 54: 1909-1918. (in Chinese)
- [10] YAN T T, YANG S, CHEN Y, WANG Q, LI G Y. Chemical profiles of cultivated agarwood induced by different techniques[J]. Molecules, 2019, 24: 1990.
- [11] LIAO G, DONG W H, YANG J L, LI W, WANG J, MEI W L, DAI H F. Monitoring the chemical profile in agarwood formation within one year and speculating on the biosynthesis of 2-(2-phenylethyl) chromones[J]. Molecules, 2018, 23: 1261-1290.
- [12] WANG S, YU Z X, WANG C H, WU C M, GUO P, WEI J H. Chemical constituents and pharmacological activity of agarwood and *Aquilaria* plants[J]. Molecules, 2018, 23: 342.
- [13] LI W, LIAO G, WANG H, DONG W H, YANG L, KONG F D, CAI C H, WANG J, MANDID A, KURTAND T, MEI W L, DAI H F. Five new epoxy-5,6,7,8-tetrahydro-2-(2-phenylethyl) chromones from Chinese agarwood by artificial holing[J]. Fitoterapia, 2019, 134: 182-187.
- [14] 吴泽青, 李智, 孔静怡, 李静, 陈金明, 薛金涛, 吴娇, 申远. 不同树龄对火烫法所得沉香的质量比较研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2255-2258.
WU Z Q, LI Z, KONG J Y, LI J, CHEN J M, XUE J T, WU

- J, SHEN Y. Quality evaluation of agarwood samples by burning - chisel drilling method on different ages of *Aqiralia sinensis* (Lour.) Gilg trees[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2019, 30(9): 2255-2258. (in Chinese)
- [15] 李凯明, 马清温, 孙震晓. 中药沉香主要化学成分与质量评价研究进展[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(13): 1538-1545. LI K M, MA Q W, SUN Z X. A review on the main chemical constituents and quality evaluation methods of *Aquilariae Lignum Resinatum* from *Aquilaria sinensis*[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2017, 26(13): 1538-1545. (in Chinese)
- [16] 李薇, 梅文莉, 左文健, 蔡彩虹, 董文化, 戴好富. 国产人工打洞沉香的化学成分研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2016, 24(3): 342-347. LI W, MEI W L, ZUO W J, CAI C H, DONG W H, DAI H F. Chemical constituents of Chinese agarwood induced by artificial holing[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2016, 24(3): 342-347. (in Chinese)
- [17] 吴惠勤, 黄芳, 黄晓兰, 罗辉泰, 谢淑桐, 周熙. 沉香的高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱数字化指纹图谱研究[J]. 分析测试学报, 2020, 30(1): 89-98. WU H Q, HUANG F, HUANG X L, LUO H T, XIE S T, ZHOU X. Research on digital fingerprints of agarwood using high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2020, 30(1): 89-98. (in Chinese)
- [18] YANG Y, CHEN H Q, KONG F D, ZHOU L M, LI W, DONG W H, CHEN Z B, MEI W L, DAI H F. Dimeric sesquiterpenoid-4H-chromone derivatives from agarwood of *Aquilaria crassna* and their cytotoxicity[J]. Phytochemistry, 2018, 145: 207-213.
- [19] LI W, YANG Y, DONG W H, WANG H, KONG F D, CAI C H, MEI W L, DAI H F. Dimeric 2-(2-phenylethyl) chromones from the agarwood of *Aquilaria crassna* in Laos[J]. Fitoterapia, 2019, 133: 12-16.
- [20] XIA L L, LI W, WANG H, CHEN H Q, CAI C H, YANG L, JIANG B, YANG Y L, MEI W L, DAI H F. LC-MS guided identification of dimeric 2-(2-phenylethyl) chromones and sesquiterpene-2-(2-phenylethyl) chromone conjugates from agarwood of *Aquilaria crassna* and their cytotoxicity[J]. Fitoterapia, 2019, 138: 104349.
- [21] 胡汝慧, 李薇, 王昊, 梅文莉, 米承能, 袁靖喆, 戴好富. 国产人工打洞沉香中一个新的2-(2-苯乙基)色酮二聚体[J]. 热带作物学报, 2021, 42(2): 569-574. HU R H, LI W, WANG H, MEI W L, MI C N, YUAN J Z, DAI H F. A new dimeric 2-(2-phenethyl) chromone from Chinese agarwood induced by artificial holing[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(2): 569-574. (in Chinese)
- [22] TIAN C P, WU A Q, YAO C Y, SONG Z J, SHEN L Q, HE L L. UHPLC-QTOF-MS based metabolite profiling analysis and the correlation with biological properties of wild and artificial agarwood[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 194: 113782.
- [23] 李远彬. 基于色谱联用技术的沉香标志性差异成分分析研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017. LI Y B. Application of GC-MS and LC-MS for screening and identification of different markers in agarwood[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017. (in Chinese)