



超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术结合质谱裂解规律快速分析 *Alternaria panax* 中二酮哌嗪类化学成分

陈卉青^{1#}, 谭祥梅^{1#}, 李琦¹, 孙文松², 李勇^{1*}, 丁刚^{1*}

1 中国医学科学院药用植物研究所 中草药物物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

2 辽宁省经济作物研究所, 辽宁 辽阳 111000

陈卉青, 谭祥梅, 李琦, 孙文松, 李勇, 丁刚. 超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术结合质谱裂解规律快速分析 *Alternaria panax* 中二酮哌嗪类化学成分[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1008-1022.

CHEN Huiqing, TAN Xiangmei, LI Qi, SUN Wensong, LI Yong, DING Gang. Rapid analysis of diketopiperazines in *Alternaria panax* by UPLC-Q-TOF-MS/MS combined with fragmentation patterns[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1008-1022.

摘要: 【目的】利用超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术(ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS)结合质谱裂解规律分析, 靶向分离 *Alternaria panax* 发酵液粗提物中次生代谢产物。【方法】用马铃薯葡萄糖(potato dextrose broth, PDB)培养基液体发酵 *A. panax* 14 d, 将滤液用乙酸乙酯萃取后减压浓缩得粗提物; 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 方法(高分辨质谱、分子式与碎片峰等)分析粗提物化学成分及质谱裂解规律; 采用半制备高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)方法进一步分离纯化; 结合核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)和质谱(mass spectrometry, MS)等谱学技术以及与文献数据对照确定化合物结构。【结果】利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析出 *A. panax* 发酵液中存在 9 个二酮哌嗪类化合物(1-9), 并分析其质谱裂解规律; 为验证结构推测的准确性, 靶向分离鉴定了化合物 1-3, 结合高分辨质谱数

资助项目: 名贵中药资源可持续利用能力建设项目(2060302-2101-18); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-032); 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21)

This work was supported by the Ability Establishment of Sustainable Use for Valuable Chinese Medicine Resources (2060302-2101-18), the Chinese Academy of Medical Sciences Initiative for Innovative Medicine (2021-I2M-1-032), and the National Project for Agricultural Technology System (CARS-21).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. LI Yong, liyong@implad.ac.cn;

DING Gang, Tel: +86-10-57833281, E-mail: dgfyhchina@163.com

Received: 2022-06-04; Accepted: 2022-08-29; Published online: 2022-09-05

据, 靶向分离得到的化合物结构与质谱分析结构一致。【结论】UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合质谱裂解规律能够快速、高效地完成样品中目标成分的分析, 并可以指导化合物的靶向分离。

关键词: UPLC-Q-TOF-MS/MS; 二酮哌嗪类; 质谱裂解规律; 靶向分离

Rapid analysis of diketopiperazines in *Alternaria panax* by UPLC-Q-TOF-MS/MS combined with fragmentation patterns

CHEN Huiqing^{1#}, TAN Xiangmei^{1#}, LI Qi¹, SUN Wensong², LI Yong^{1*}, DING Gang^{1*}

1 Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

2 Liaoning Research Institute of Cash Crops, Liaoyang 111000, Liaoning, China

Abstract: [Objective] To obtain the target compounds from the extract of *Alternaria panax* based on ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) combined with their fragmentation patterns. [Methods] *A. panax* was fermented in potato dextrose broth (PDB) for 14 days. The filtrate was extracted with ethyl acetate and concentrated under reduced pressure to obtain the crude extract. The chemical composition and fragmentation pattern of the crude extract of *A. panax* were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS (including high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS), molecular formula, and fragment peak). Semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to further purify the target compounds. The structures of the compounds were identified by nuclear magnetic resonance (NMR), mass spectrometry (MS), and comparison with literature data. [Results] Nine diketopiperazines (1–9) were identified by UPLC-Q-TOF-MS/MS from the crude extract of *A. panax* and their fragmentation patterns were analyzed. To verify the correctness of these structures, we separated compounds 1–3 and determined their chemical structures. The obtained structures of compounds 1–3 were consistent with the results of UPLC-Q-TOF-MS/MS. [Conclusion] UPLC-Q-TOF-MS/MS combined with fragmentation patterns can rapidly and efficiently identify the target components in an unknown sample, which can guide the targeted isolation as well.

Keywords: UPLC-Q-TOF-MS/MS; diketopiperazines; fragmentation pattern; targeted isolation

二酮哌嗪类化合物 (diketopiperazines, DKPs), 又称环二肽 (cyclic dipeptides), 在 1880 年被首次发现。该类化合物可被多种生物合成, 广泛分布于细菌、放线菌、真菌和各类海洋高等生物中^[1]。该环肽类化合物的基本骨架是一种由 2 个氨基酸缩合形成的六元环。

因其结构稳定, 且有 2 个氢键供体和氢键受体, 使得二酮哌嗪类化合物具有强亲和力和多种活性, 在药物开发领域成为重要的药效团之一^[2-3]。据文献报道, 二酮哌嗪类化合物具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、降血糖、抗心律失常和抗高血压等多种良好药理活性, 且具

有较高的细胞通透性和与特殊靶点结合的亲和性, 已作为未来创新药物进行广泛研发^[4-5]。例如, Nilov 等^[6]首次证明了天然二酮哌嗪类化合物可以抑制重要的抗癌靶点聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP), 为 PARP 抑制剂基础结构提供了新的思路; Mohanlal 等^[7]证明海洋源 *Aspergillus* sp. 的 plinabulin 可以提高非小细胞肺癌患者的生存率, 且目前已进入III期临床试验; Liddle 等^[8]发现 retosiban 可作为临床早产的催产素拮抗剂使用。环二肽类化合物对酶水解有明显的抗性, 并有自组成凝胶的倾向, 在功能材料领域也具有巨大的应用前景^[9-10]。此外, 二酮哌嗪类化合物也常作为调味剂等添加在食品中^[11]。这种独特的环肽类化合物以其稳定的结构和丰富的生物活性, 吸引着众多研究者的深入挖掘。然而, 使用传统的分离方法很难在复杂的未知生物样品中快速检测并靶向分离到目标化合物, 这也成为了继续发掘该类化合物的一大阻碍。因此, 亟需找到更高效的方法寻找结构新颖或拥有良好活性的二酮哌嗪类化合物。

超高效液相色谱 (ultra-high-performance liquid chromatography, UPLC)与质谱技术联用, 具有高效、高灵敏度等众多优势, 能够提供复杂样品中单一化合物的元素组成和离子碎片信息。该技术在许多研究中都已被证实可以在化合物鉴定过程中与核磁共振波谱等技术提供的数据互为补充, 既可以用于检测新的化合物, 也可以通过分析化合物元素组成和离子碎片裂解规律等进行结构推测、目标化合物鉴定等, 为复杂样品的检测和鉴定提供了有效思路^[12-16]。例如, Wang 等^[17]总结 *seco-sativene* 倍半萜的质谱裂解规律, 并结合超高效液相色谱与串联四级杆飞行时间质谱仪联用技术 (ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole

time-of-flight tandem mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术成功实现了类似物的靶向分离。Tan 等^[18]通过总结 *Alternaria oxytropis* (*Pleosporaceae*)中愈创木烷类倍半萜烯的质谱裂解规律, 也利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 实现了类似物的靶向分离。

本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合质谱裂解规律分析了人参黑斑菌 *Alternaria panax* 的发酵液粗提物, 暗示提取物中存在 9 个二酮哌嗪类化合物(不同立体构型 15 个类似物)。为验证该分析方法的可靠性, 通过 HPLC 的追踪实现 3 个主要化合物的靶向分离。结合 ¹H-NMR 和高分辨质谱数据进行结构鉴定, 3 个化合物实际结构与前期推测一致, 证实了 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合质谱裂解规律分析提取物中化合物结构的高效、准确与可靠性(图 1)。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂及仪器

1.1.1 供试菌株

本研究使用的人参黑斑菌 *Alternaria panax* 菌株由沈阳农业大学傅俊范教授提供, 该菌株对人参的致病性已得到证实^[19-20]。

1.1.2 试剂

色谱乙腈、色谱甲醇、水和甲酸, 默克公司; 石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇、乙醇、丙酮等其他试剂, 天津精细化工有限公司。

1.1.3 仪器

KQ-500E 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 配有低温冷却循环泵(长城科技工贸有限公司)的旋转蒸发仪(EYELA); 超高效液相色谱仪 UPLC: 采用 Waters Acquity UPLC-PDA 系统, 配置分析反相色谱柱 C₁₈ (100 mm×2.1 mm,

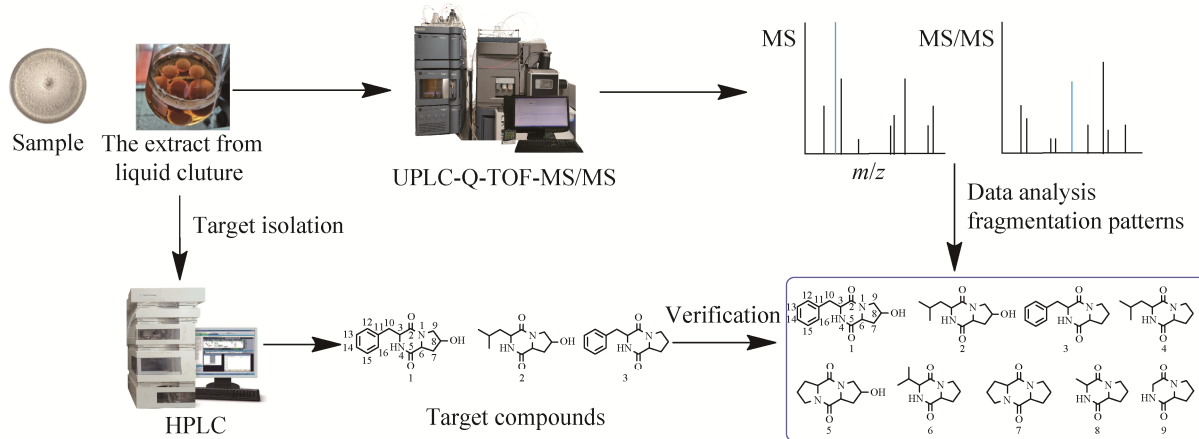


图 1 *Alternaria panax* 成分分析及目标化合物靶向分离流程

Figure 1 Constituent analysis and targeted separation processes based on *Alternaria panax*.

1.7 μm , Acquity BEH, Waters); 飞行时间质谱仪 UPLC-TOF-MS (Waters): 采用 Xevo G2-SQTOF 系统(Waters), 配备电喷雾电离源(ESI), 使用 MassLynx 4.1 软件(Waters); 核磁共振仪: Bruker AM 500 (核磁共振仪, Bruker); 半制备液相色谱: SEP LC-52 [森诺达(北京)分离技术有限公司], 配有 MWD 紫外检测器和 YMC-pack ODS-A 色谱柱 (250 mm \times 10 mm, 5 μm); TG16-WS 高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 真菌发酵与提取

将菌块接种在 PDA 平板上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 于菌落边缘取 8 个直径 8 mm 的菌饼, 接种到事先灭菌的 8 瓶 200 mL PDB 培养液中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养 14 d。最终得到发酵液 1.6 L, 用 1.6 L 乙酸乙酯萃取 3 次, 减压浓缩得粗提物 400 mg。

1.3 二酮哌嗪类化合物 1–3 的纯化与分离

粗提物(400 mg)经过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 及 HPLC 跟踪进行化合物的靶向分离, 在分离过程中通过保留时间及质谱数据等的对比, 只保留含有目标化合物的馏分。最终得到馏分 Fr.1 (10 mg), 通过高效液相(UV 210 nm, 45% 甲醇-水)进一步纯化, 得化合物 2 (t_{R} =15.0 min,

2.0 mg); Fr.2 (23 mg), 进一步通过高效液相(UV 210 nm, 23%乙腈-水)纯化, 得化合物 1 (t_{R} =12.3 min, 2.1 mg); Fr.3 (10 mg)通过半制备液相(UV 210 nm, 23%乙腈-水)进一步纯化, 得化合物 3 (t_{R} =24.5 min, 1.4 mg)。

1.4 高效液相色谱-质谱联用条件

UPLC 采用 Waters Acquity UPLC-PDA 系统, 配置分析反相色谱柱 C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm , Acquity BEH, Waters), 吸光度范围 210–500 nm。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相为乙腈(A)–0.1%甲酸水溶液(B), 梯度条件为: 0–18 min, 5%–95% A; 18.5 min, 5% A; 20 min, 5% A。UPLC 系统进入 ESI-Q-TOF-MS 检测器的流速为 0.5 mL/min, 进样量 1 μL 。

飞行时间质谱检测采用 Xevo G2-SQTOF 系统(Waters), 配备电喷雾电离源(ESI)。使用负离子和正离子模式设置分析参数, 在 m/z =50–1 500 质量范围内获取数据。设定离子源温度(source temperature)为 100 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气温度(desolvation temperature)为 450 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流速(desolvation gas flow)为 900 L/h。锁定质量数(lock mass)为 m/z =556.277 1 所使用的锁定质量化合物为 Leu 脑啡肽, 浓度为

200 pg/ μL 。毛细管电压为 2.5 kV。锥孔电压 (sampling cone) 40 V。低能量扫描时碰撞能量 6 eV, 高能扫描时碰撞能量 25–40 eV。仪器采用 MassLynx 4.1 软件控制。

2 结果与分析

2.1 *Alternaria panax* 乙酸乙酯部粗提物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 与裂解规律分析

乙酸乙酯部粗提物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 谱显示(图 2), 从 1.00 min 到 4.00 min (正离子模式)出现了 15 个主要的分子离子峰($[\text{M}+\text{H}]^+$) (表 1), 图 S1 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000173, 分子量(MW)为 $m/z=261$ (3 个立体异构体, $t_{\text{R}}=2.14$ 、2.86 和 3.11 min, 相同分子量和类似的质谱裂解规律), $m/z=227$ (1 个立体异构体, $t_{\text{R}}=2.56$ min),

$m/z=245$ (2 个立体异构体, $t_{\text{R}}=3.63$ 和 3.92 min), $m/z=211$ (3 个立体异构体, $t_{\text{R}}=3.06$ 、3.23 和 3.37 min), $m/z=211$ (1 个立体异构体, $t_{\text{R}}=1.21$ min), $m/z=197$ (2 个立体异构体, $t_{\text{R}}=2.22$ 和 2.28 min), $m/z=195$ (1 个立体异构体, $t_{\text{R}}=1.67$ min), $m/z=169$ (1 个立体异构体, $t_{\text{R}}=1.26$ min)和 $m/z=155$ (1 个立体异构体, $t_{\text{R}}=1.00$ min)。在这些分子离子峰的 MS/MS 数据中, 28 (CO)和 18 (H_2O)的中性丢失占主导。根据乙酸乙酯部粗提物 UPLC-Q-TOF-MS/MS 谱的高分辨分子量和碎片峰, 共推断出 9 个二酮哌嗪类化合物(平面结构), 包括 cyclo(Phe-hydroxy-Pro) (**1**, $[\text{M}+\text{H}]^+=261$), cyclo(Hyp-Leu) (**2**, $[\text{M}+\text{H}]^+=227$), cyclo(Pro-Phe) (**3**, $[\text{M}+\text{H}]^+=245$), cyclo(Pro-Leu) (**4**, $[\text{M}+\text{H}]^+=211$), cyclo(Hyp-Pro) (**5**, $[\text{M}+\text{H}]^+=211$), cyclo(Pro-Val) (**6**, $[\text{M}+\text{H}]^+=197$), cyclo(Pro-Pro)

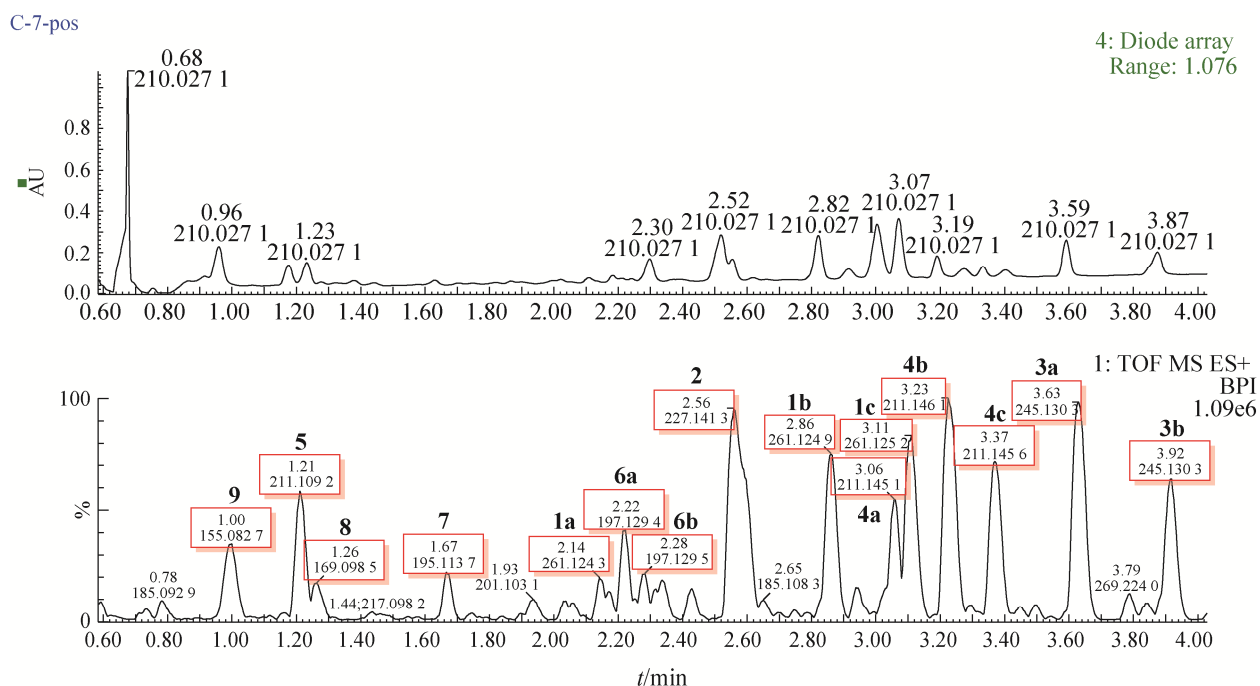


图 2 *Alternaria panax* 发酵液粗提物在 0.60–4.00 min (正源模式)的 UPLC-UV-Q-TOF 和 UPLC-Q-TOF-MS/MS 总离子流图

Figure 2 UPLC-UV-Q-TOF and UPLC-Q-TOF-MS/MS profiles from 0.60 to 4.00 min (positive mode) of the extract from liquid culture of *Alternaria panax*. Number 1–9: Compounds 1–9 respectively; a, b, c: Isomers.

(7, $[M+H]^+=195$), cyclo(Pro-Ala) (8, $[M+H]^+=169$) 和 cyclo(Pro-Gly) (9, $[M+H]^+=155$) (图 3 为 1-9 的结构, 图 4 为 1-9 的裂解规律; 表 2 为分子离子

与子离子质谱数据; 化合物 1-9 的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 图(图 S2)已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000173)。

表 1 使用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对 15 个离子峰进行精确分子量鉴定

Table 1 Mass accuracy measurement of fifteen peaks using UPLC-Q-TOF-MS/MS

| Number | Retention time (min) | Experimental mass (m/z) | Theoretical mass (m/z) | Molecular formula | Error | | DBE | Fit Conf % |
|--------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------|-------|-----------|-----|------------|
| | | | | | mDa | 10^{-6} | | |
| 1 | 0.999 | 155.082 7 | 155.082 1 | C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂ | 0.6 | 3.9 | 4 | - |
| 2 | 1.218 | 211.109 1 | 211.108 3 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₃ | 0.8 | 3.8 | 5 | 100.00 |
| 3 | 1.268 | 169.098 3 | 169.097 7 | C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 0.6 | 3.5 | 4 | 100.00 |
| 4 | 1.670 | 195.113 8 | 195.113 4 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂ | 0.4 | 2.1 | 5 | 99.78 |
| 5 | 2.141 | 261.124 3 | 261.123 9 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 0.4 | 1.5 | 8 | 99.74 |
| 6 | 2.226 | 197.129 1 | 197.129 0 | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 0.1 | 0.5 | 4 | 100.00 |
| 7 | 2.279 | 197.129 2 | 197.129 0 | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 0.2 | 1.0 | 4 | 100.00 |
| 8 | 2.559 | 227.141 3 | 227.139 6 | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃ | 1.7 | 7.5 | 4 | 98.23 |
| 9 | 2.857 | 261.124 9 | 261.123 9 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 1.0 | 3.8 | 8 | 99.99 |
| 10 | 3.064 | 211.145 0 | 211.144 7 | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂ | 0.3 | 1.4 | 4 | 99.98 |
| 11 | 3.110 | 261.125 2 | 261.123 9 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 1.3 | 5.0 | 8 | 99.92 |
| 12 | 3.241 | 211.145 3 | 211.144 7 | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂ | 0.6 | 2.8 | 4 | 99.87 |
| 13 | 3.374 | 211.145 3 | 211.144 7 | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂ | 0.6 | 2.8 | 4 | 100.00 |
| 14 | 3.631 | 245.130 3 | 245.129 0 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 1.3 | 5.3 | 8 | 92.25 |
| 15 | 3.918 | 245.130 3 | 245.129 0 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 1.3 | 5.3 | 8 | 100.00 |

-: No data.

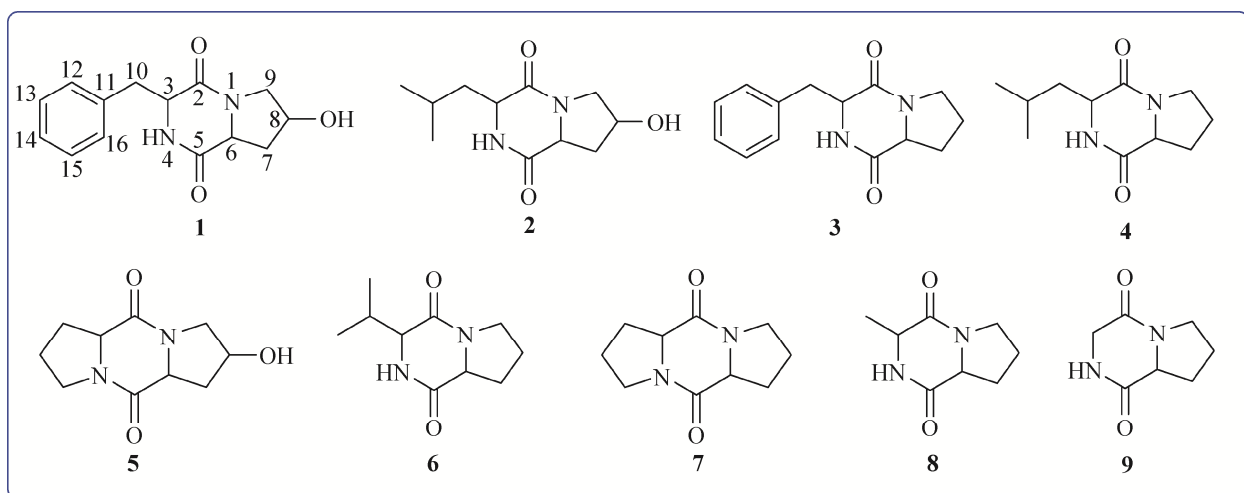


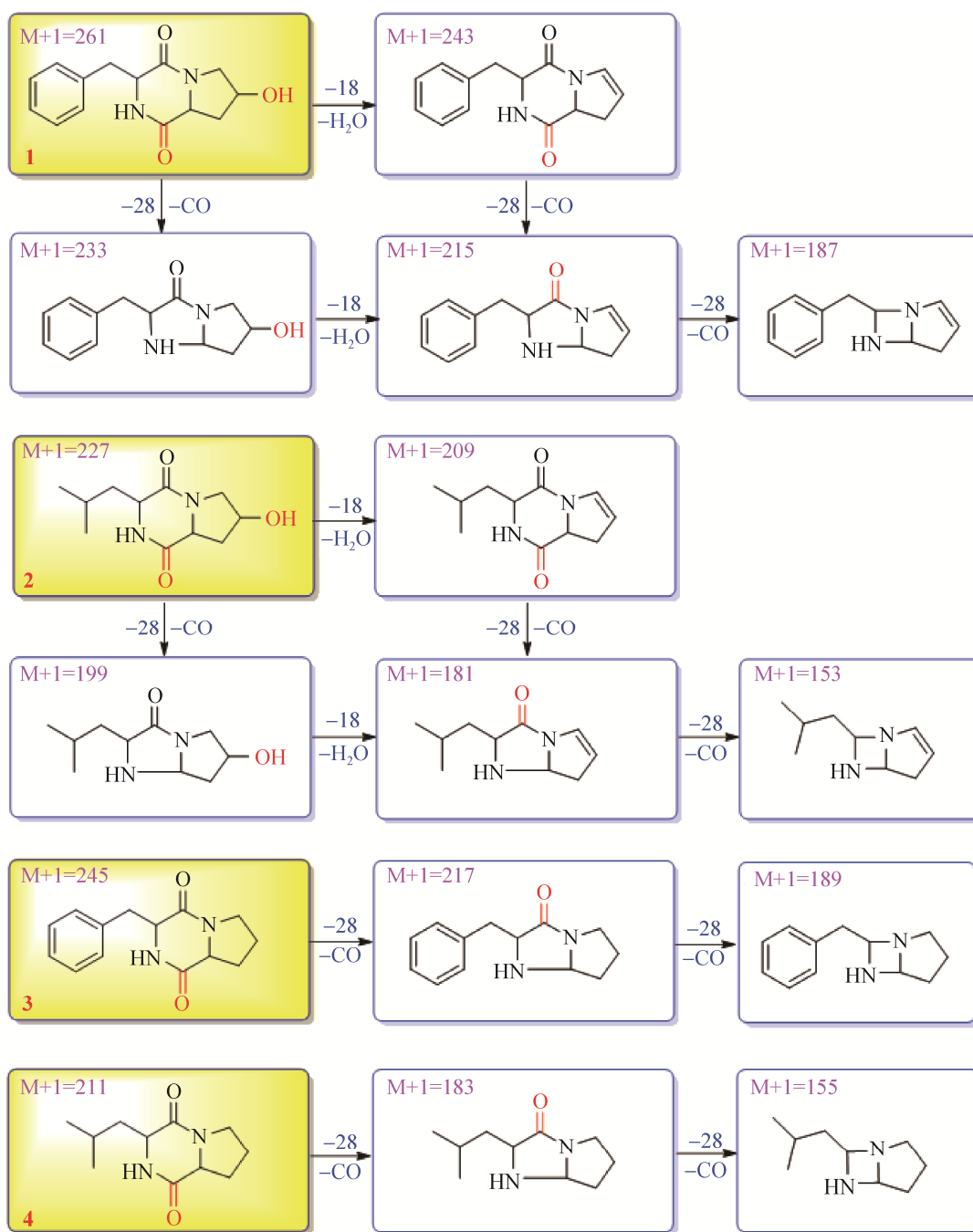
图 3 *Alternaria panax* 粗提物中的 9 个二酮哌嗪类化合物

Figure 3 Nine diketopiperazines from the extract of *Alternaria panax*. 1: cyclo(Phe-hydroxy-Pro); 2: cyclo(Hyp-Leu); 3: cyclo(Pro-Phe); 4: cyclo(Pro-Leu); 5: cyclo(Hyp-Pro); 6: cyclo(Pro-Val); 7: cyclo(Pro-Pro); 8: cyclo(Pro-Ala); 9: cyclo(Pro-Gly).

2.2 二酮哌嗪类化合物 1-9 的质谱裂解规律及质谱特征

通过分析二酮哌嗪类化合物 1-9 的质谱裂解规律, 可见该类化合物母离子丰度较高, 以基峰形式呈现。其余碎片丰度较低。中性丢失为该类化合物的主要质谱裂解方式, 主要包括

羰基 CO (28)和羟基-OH (18)的丢失(图 4)。例如, 化合物 1 的母离子 $m/z=261.1236$ $[M+H]^+$ 丢失一个水分(H_2O , -18)后得到子离子 $m/z=243.1141$ 。随后, 该碎片离子通过连续丢失羰基(CO, -28)分别得到碎片离子 $m/z=215.1184$ 和 $m/z=187.1245$ 。化合物 2 的质谱裂解规律与



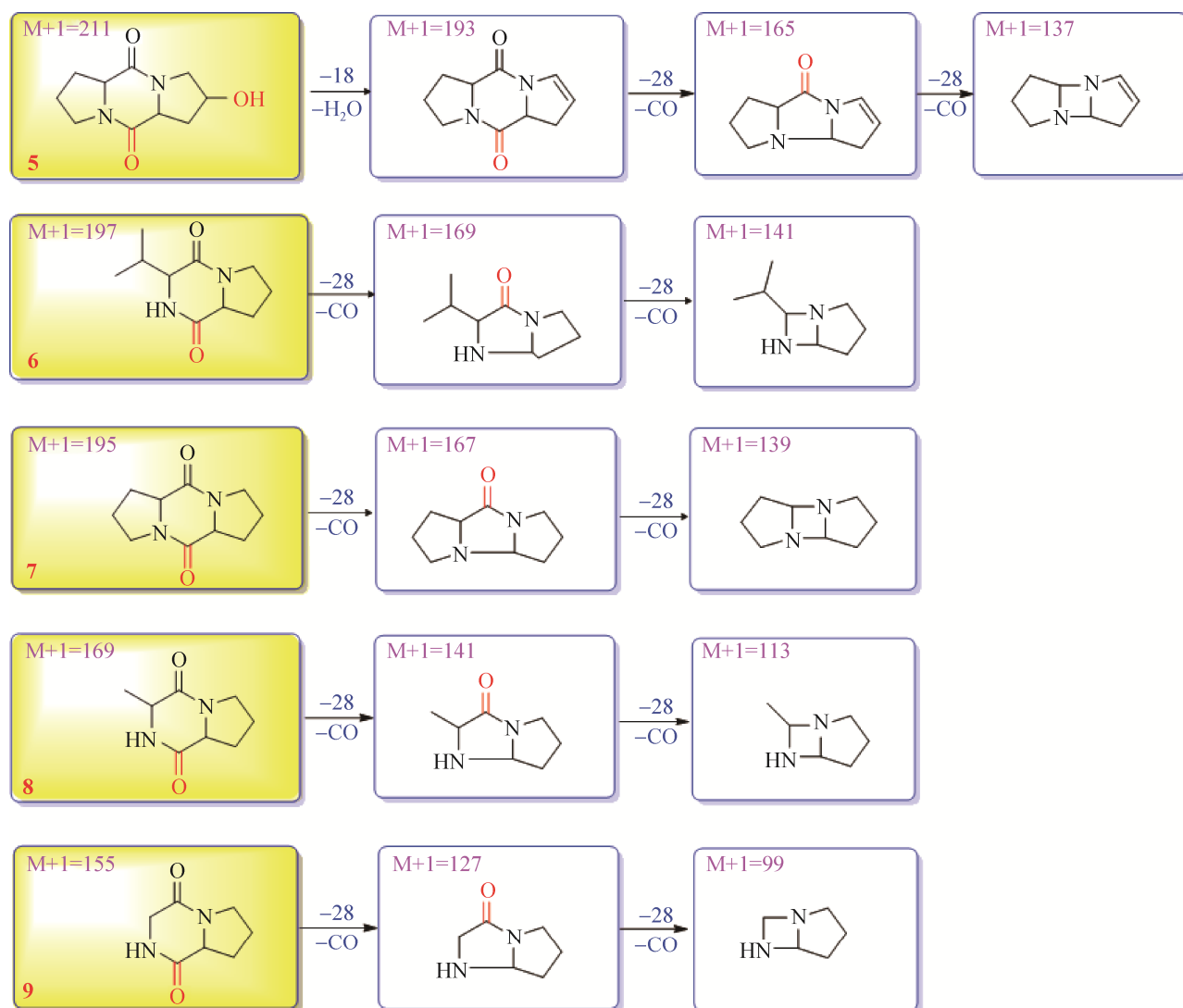


图 4 二酮哌嗪类化合物(1-9)的质谱裂解规律

Figure 4 MS/MS fragmentation of diketopiperazines (1-9). 1: cyclo(Phe-hydroxy-Pro); 2: cyclo(Hyp-Leu); 3: cyclo(Pro-Phe); 4: cyclo(Pro-Leu); 5: cyclo(Hyp-Pro); 6: cyclo(Pro-Val); 7: cyclo(Pro-Pro); 8: cyclo(Pro-Ala); 9: cyclo(Pro-Gly).

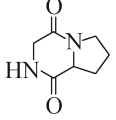
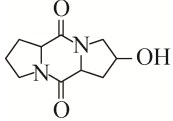
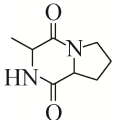
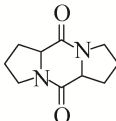
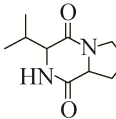
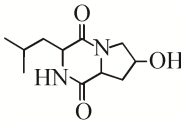

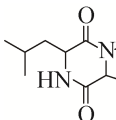
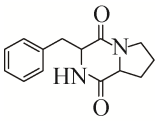
化合物 1 呈现一致性, 根据化合物的质谱数据分析, 可见其分子离子峰丰度最高 ($m/z=227.140$), 为基峰。碎片离子 $m/z=209.128$ 6、 181.132 9、 153.137 5 和 $m/z=199.142$ 7、 181.132 9、 153.137 5 分别是由分子离子峰逐级失去 1 分子 H_2O 和 2 个分子 CO , 或失去 2 分子 CO 和 1 分子 H_2O 得到的。化合物 3 的子离子 $m/z=217.134$ 5 和 $m/z=189.136$ 2 分别是 $m/z=$

245.128 3 母离子失去 1 分子 CO 或 2 分子 CO 得到的。化合物 4-9 也主要表现为 2 位和 5 位酰胺羰基的丢失, 其中, 化合物 5 还会出现 8 位羟基的丢失。

由此, 结合化合物元素组成分析中 2 个氮原子的出现及同骨架类似物特征的质谱裂解规律, 可以实现二酮哌嗪类化合物的质谱跟踪及靶向分离。

表 2 九个二酮哌嗪类化合物的 HR-ESI 和 MS/MS 数据

Table 2 UPLC-Q-TOF-MS/MS HR-ESI and MS/MS data of nine diketopiperazines

| Compound | Retention time (min) | Experimental mass (<i>m/z</i>) | Theoretical mass (<i>m/z</i>) | Molecular formula | Diff (10^{-6}) | Loss mass | Loss formula |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|-----------|----------------------------------------------|
|  | 0.999 | 155.082 7 | 155.082 1 | C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂ | 3.9 | – | – |
| | | 127.087 5 | 127.087 1 | C ₆ H ₁₀ N ₂ O | 3.1 | 27.994 9 | CO |
| | | 99.092 9 | 99.092 2 | C ₅ H ₁₀ N ₂ | 7.1 | 55.989 8 | C ₂ O ₂ |
|  | 1.218 | 211.109 1 | 211.108 3 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₃ | 3.8 | – | – |
| | | 193.098 7 | 193.097 7 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 5.2 | 18.010 6 | H ₂ O |
| | | 165.102 7 | 165.102 8 | C ₉ H ₁₂ N ₂ O | –0.6 | 46.005 5 | CH ₂ O ₂ |
| | | 137.107 7 | 137.107 9 | C ₈ H ₁₂ N ₂ | –1.5 | 74.000 4 | C ₂ H ₂ O ₃ |
|  | 1.268 | 169.098 3 | 169.097 7 | C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 1.5 | – | – |
| | | 141.102 6 | 141.102 8 | C ₇ H ₁₂ N ₂ O | –1.4 | 27.994 9 | CO |
| | | 113.107 6 | 113.107 9 | C ₆ H ₁₂ N ₂ | –2.7 | 55.989 8 | C ₂ O ₂ |
|  | 1.670 | 195.113 8 | 195.113 4 | C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂ | 2.1 | – | – |
| | | 167.118 8 | 167.118 4 | C ₉ H ₁₄ N ₂ O | 2.4 | 27.994 9 | CO |
| | | 139.124 5 | 139.123 5 | C ₈ H ₁₄ N ₂ | 7.2 | 55.989 8 | C ₂ O ₂ |
|  | 2.226 | 197.129 1 | 197.129 0 | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 0.5 | – | – |
| | | 169.134 1 | 169.134 1 | C ₉ H ₁₆ N ₂ O | 0.0 | 27.994 9 | CO |
| | | 141.138 7 | 141.139 2 | C ₈ H ₁₆ N ₂ | –3.5 | 55.989 8 | C ₂ O ₂ |
|  | 2.559 | 227.141 3 | 227.139 6 | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃ | 7.5 | – | – |
| | | 209.130 4 | 209.129 0 | C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 6.7 | 18.010 6 | H ₂ O |
| | | 199.145 0 | 199.144 7 | C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₂ | 1.5 | 27.994 9 | CO |
| | | 181.134 1 | 181.134 1 | C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O | 0.0 | 46.005 5 | CH ₂ O ₂ |
| | | 153.139 4 | 153.139 2 | C ₉ H ₁₆ N ₂ | 1.3 | 74.000 4 | C ₂ H ₂ O ₃ |
|  | 2.857 | 261.124 9 | 261.123 9 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 3.8 | – | – |
| | | 243.113 7 | 243.113 4 | C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂ | 1.2 | 18.010 6 | H ₂ O |
| | | 233.129 1 | 233.129 0 | C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 0.4 | 27.994 9 | CO |
| | | 215.118 5 | 215.118 4 | C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O | 0.5 | 46.005 5 | CH ₂ O ₂ |
| | | 187.124 2 | 187.123 5 | C ₁₂ H ₁₄ N ₂ | 3.7 | 74.000 4 | C ₂ H ₂ O ₃ |
|  | 3.064 | 211.145 0 | 211.144 7 | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂ | 1.4 | – | – |
| | | 183.149 8 | 183.149 7 | C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O | 0.5 | 27.994 9 | CO |
| | | 155.153 7 | 155.154 8 | C ₉ H ₁₈ N ₂ | –7.1 | 55.989 8 | C ₂ O ₂ |
|  | 3.631 | 245.130 3 | 245.129 0 | C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 5.3 | – | – |
| | | 217.134 2 | 217.134 1 | C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O | 0.5 | 27.994 9 | CO |
| | | 189.138 9 | 189.139 2 | C ₁₂ H ₁₆ N ₂ | –1.6 | 55.989 8 | C ₂ O ₂ |

–: No data.

2.3 化合物 1-3 的分离纯化结构鉴定

为验证本研究推测的一系列二酮哌嗪类化合物结构的准确性, 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS结果及质谱裂解规律, 将*A. panax*乙酸乙酯部粗提物经过质谱、UPLC-Q-TOF-MS/MS及HPLC的跟踪实现化合物1-3的靶向分离(在化合物1和3中, 选取了1a和3b两个紫外吸收较高的同分异构体进行分离), 应用高效液相(UV 210 nm, 45%甲醇-水)从Fr.1 (10 mg)中纯化, 得化合物2 cyclo(Hyp-Leu) (对应表1中的8号峰); (UV 210 nm, 23%乙腈-水)从Fr.2 (23 mg)中纯化, 得化合物1 cyclo(Phe-hydroxy-Pro) (对应表1中的9号峰, 图2中的1b); (UV 210 nm, 23%乙腈-水)从Fr.3 (10 mg)中纯化, 得化合物3 cyclo(Pro-Phe) (图3, 对应表1中的14号峰, 图2中的3a)。

化合物1: 黄色油状, 正离子HR-ESI-MS显

示其准分子离子峰为 $m/z=[M+H]^+=261.1236$, 母离子丰度最高, 推测其分子式为 $C_{14}H_{16}N_2O_3$, 根据不饱和度为8, 推测化合物1有3环结构。基于 1H -NMR图谱分析, 在化学位移值7.20-7.30范围内存在5个单取代苯环氢信号(δ_H 7.20, 7.20, 7.30, 7.30, 7.30); 1个酰胺氢信号(δ_H 6.14); 存在3个次甲基信号(δ_H 4.38, 4.24, 3.86), 其中化学位移值为4.38的氢信号(δ_H 4.38, tdd)为H-8, 暗示C-8与羟基相连; 其中化学位移值为4.24的氢信号(δ_H 4.38, m)为H-3, 化学位移值为3.86的氢信号(δ_H 3.86, dd)为H-6, 表明C-3和C-6都连接氮。低场区存在3个亚甲基信号(H₂-9, δ_H 3.30, 3.12; H-10, δ_H 3.12; H₂-7, δ_H 2.34, 2.20)。其核磁数据见表3, 化合物1核磁数据与文献报道的波谱数据一致, 鉴定为cyclo(Phe-hydroxy-Pro)^[21]。

表3 化合物 1、3 的 1H (600 MHz)核磁数据(CDCl₃)和化合物 2 的 1H (500 MHz)核磁数据(CDOD)

Table 3 1H NMR data of compounds 1/3 in CDCl₃ and 2 in CDOD

| Pos | δ_H (mult, J in Hz) | | |
|------|----------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| | 1 ^a | 2 ^b | 3 ^a |
| 2 | | | |
| 3 | 4.24, m | 4.17, m | 4.09, t (7.8) |
| 4 | | | |
| 5 | | | |
| 6 | 3.86, dd (12.6, 1.8) | 4.46, t (4.0) | 4.28, dd (11.2, 3.6) |
| 7 | 2.34, m; 2.20, m | 2.27, ddt (13.0, 6.5, 1.0); 2.08, ddd (13.0, 11.0, 4.0) | 2.35, m; 2.03, m |
| 8 | 4.38, tdd (5.6, 4.2, 3.0) | 4.52, ddd (11.0, 6.5, 1.5) | 2.03, m; 1.92, m |
| 9 | 3.30, dd (12.6, 5.0); 3.12, m | 3.65, m; 3.43, m | 3.65, m; 3.65, m |
| 10 | 3.12, m; 3.12, m | 1.90, m; 1.51, m | 3.59, m; 2.77, dd (15.0, 10.8) |
| 11 | | 1.90, m | |
| 12 | 7.20, m | 0.95, d (5.5); 0.95, d (5.5); 0.95, d (5.5) | 7.23, m |
| 13 | 7.30, m | 0.96, d (5.5); 0.96, d (5.5); 0.96, d (5.5) | 7.36, m |
| 14 | 7.30, m | | 7.30, m |
| 15 | 7.30, m | | 7.36, m |
| 16 | 7.20, m | | 7.23, m |
| 4-NH | 6.14, s | 2.55, s | 5.60, s |

^a: Recorded at 600 MHz (1H NMR); ^b: Recorded at 500 MHz (1H NMR).

化合物**2**: 黄色固体, 正离子HR-ESI-MS显示其准分子离子峰为 $m/z=[M+H]^+=227.140\ 5$, 推测其分子式为 $C_{11}H_{18}N_2O_3$, 该化合物分子式不饱和度为 4, 比化合物**1**少 4 个不饱和度, 表明化合物**2**中不含苯环。化合物**2**的 NMR 数据与化合物**1**相似, 但多了 2 个双峰甲基(δ_H 0.96, d, $J=5.5$, H_3-13 ; δ_H 0.95, d, $J=5.5$, H_3-12), 缺少了 1 个苯基, H_2-10 的化学位移也分别下降至 1.90 和 1.51。结合不饱和度, 认为在结构**2**中存在 2 个环。其核磁数据见表 3, 化合物**2**核磁数据与文献报道的波谱数据一致, 鉴定为 cyclo(Hypo-Leu)^[21]。

化合物**3**: 黄色固体, 正离子HR-ESI-MS显示其准分子离子峰为 $m/z=[M+H]^+=245.128\ 3$, 推测其分子式为 $C_{14}H_{16}N_2O_2$ 。化合物**3**的 NMR 数据与化合物**1**相似, 但少了一个活泼氢, H_2-8 的化学位移值降低至 2.03 和 1.92, 结合化合物分子式, 表明在化合物**3**中不存在与 C-8 相连的羟基。其核磁数据见表 3, 化合物**3**核磁数据与文献报道的波谱数据一致, 鉴定为 cyclo(Pro-Phe)^[22]。

利用 HR-ESI-MS 和 NMR 技术鉴定出的化合物**1-3** (图 5 化合物**1-3**的质谱裂解规律)的结构与前期实验中依据 UPLC-Q-TOF-MS/MS 数据推测的结构一致。证明了基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合质谱裂解规律推测化合物结构的可靠性。

3 讨论与结论

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术结合质谱裂解(MS/MS)规律从人参病原菌 *A. panax* 发酵液粗提物中解析出 9 个二酮哌嗪类化合物, 并构建其可能的质谱裂解规律。其中中性丢失即 2、5 位酰胺羰基(CO, 28)和 8 位羟基(H_2O , 18)

的丢失是该类化合物主要的裂解方式。其次, 在该类化合物的质谱中分子离子峰丰度一般较高。因此, 在未知样品分析中出现以上特征信号, 则可以考虑二酮哌嗪类化合物的存在。为验证该分析方法的可靠性, 通过 HPLC 追踪靶向分离到化合物**1-3**, 利用 NMR 和高分辨质谱等对其进行结构鉴定, 其结构与推测结果相同, 从而证明了 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结构推测的准确性与可靠性。

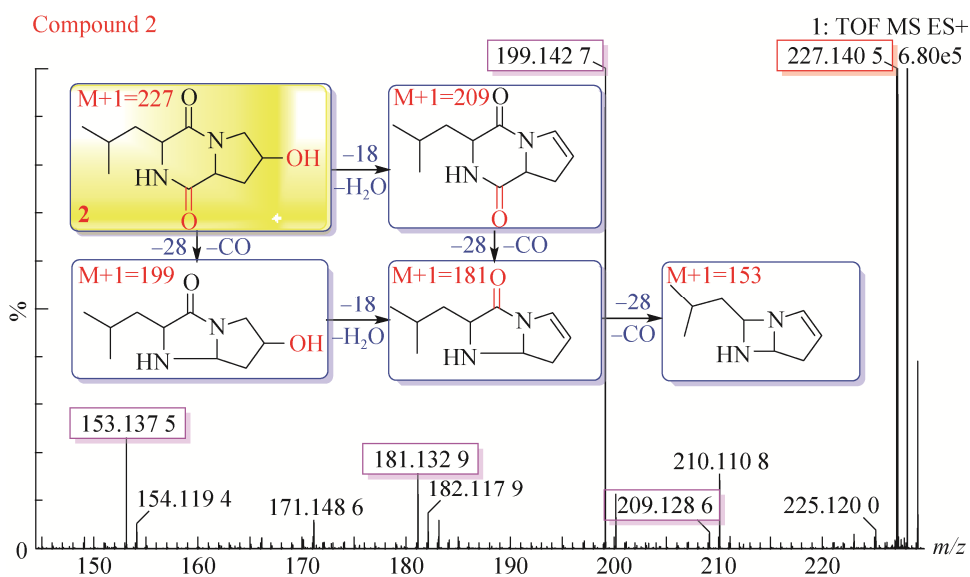
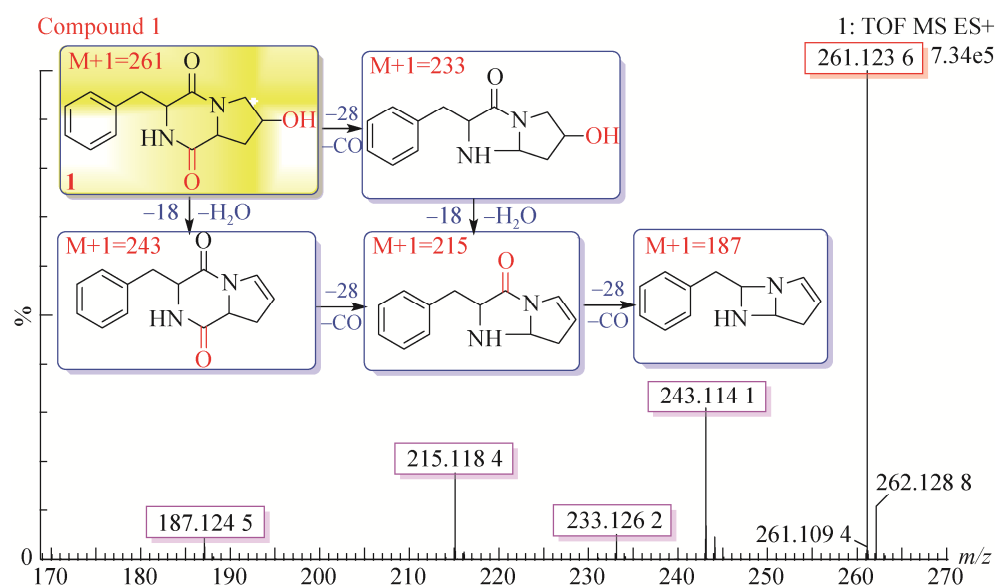
本文的关注对象为二酮哌嗪类化合物, 该类化合物因其特殊的结构及与多种酶的高亲和力^[12], 常表现出多种活性。例如, 化合物**1**和**3**曾从一种与 *Palythoa* sp. 相关的海洋细菌中分离得到, 并且对莴苣(*Lactuca sativa*)种子生长有促进作用^[23]; 来源于红树林 *Streptomyces* sp. Q24 的化合物**1**可以抑制人脑胶质瘤细胞 U87-MG 和 U251 细胞的增殖, IC50 分别为 5.8 和 18.6 $\mu\text{mol/L}$ ^[24]。Wei 等^[21]发现化合物**2**对萝卜(*Raphanus sativus*)幼苗生长有抑制作用, 浓度于 100 mg/L 时抑制率达 60%, 优于阳性对照草甘膦; Stierle^[25]等从植物病原菌 *A. alternata* 中分离出 7 个二酮哌嗪类化合物(包括化合物**3**、**4**、**6**和**8**), 其中, 化合物**3**对寄主植物斑点矢车菊有植物毒活性; 此外, 来源于 *Streptomyces* sp. 的化合物**4**可抑制耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococci*, VRE)的生长, 其 MIC 值为 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 为耐药性菌株提供了新的组合治疗方案^[26]。来源于海洋真菌 *Penicillium purpurogenum* G59 的化合物**6**在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对人癌细胞 HeLa 的抑制率为 33.3%^[27]; Lin 等^[28]发现化合物**7**在 20 $\mu\text{mol/L}$ 对人癌细胞 HeLa-S3 的抑制率为 40%。

UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术能为结构表征快速提供高分辨的结构碎片, 现已发展成为

一种成熟、通用的分析技术, 目前广泛应用于分析各种生物资源的次生代谢产物分析, 识别其中结构新颖的次生代谢产物或对目标化合物(如活性化合物、毒性化合物等)进行快速检测^[29-30]。UPLC-Q-TOF-MS/MS 作为一种高效的分析方法, 其主要优势在于分析速度快、灵敏度高、准确性好等, 可以在短时间内大规模筛选目标化合物, 如本研究中对 *A. panax* 二酮哌嗪类化合物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

在 5 min 内即可完成, 该技术可应用于批量菌株中目标化合物的筛选, 还可以通过结合定量方法筛选出其中产量最高的菌株作为工业生产中应用的菌株。

本研究首次建立了人参黑斑病 *A. panax* 发酵液提取物中次级代谢产物快速分析、靶向分离与结构鉴定方法, 总结了二酮哌嗪类化合物的质谱裂解规律, 为其他生物样本中二酮哌嗪类化合物的结构快速分析和靶向分离奠定了基础。



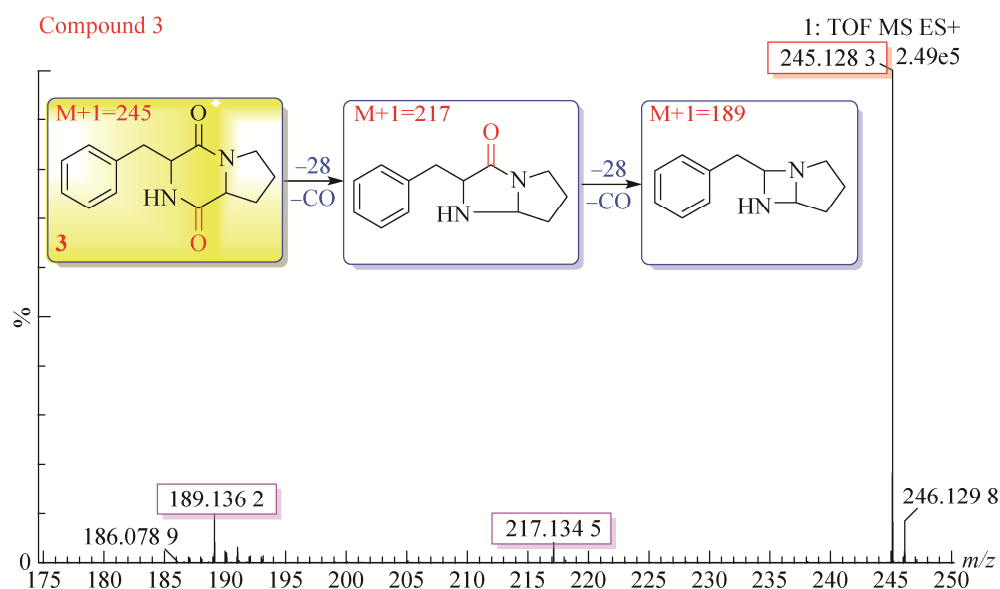


图 5 化合物 1-3 的 HR-ESI 和 MS/MS 数据

Figure 5 The HR-ESI and MS/MS data of compounds 1-3. 1: cyclo(Phe-hydroxy-Pro); 2: cyclo(Hyp-Leu); 3: cyclo(Pro-Phe).

参考文献

- [1] ZHANG L, FENG LL, WANG GF, YANG QL, FU XZ, LI Z, LIU M, KOU LJ, XU B, XIE ZP, ZHANG SM, GUO L. Strepyrazinone, a tricyclic diketopiperazine derivative with cytotoxicity from a marine-derived actinobacterium[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2021, 23(10): 968-974.
- [2] 曲承蕾, 杨雪, 张淑敏, 谢则平, 金海珠. 海洋源放线菌 *Streptomyces* sp. 223 中二酮哌嗪类成分的研究[J]. *中国海洋药物*, 2015, 34(3): 23-28.
QU CL, YANG X, ZHANG SM, XIE ZP, JIN HZ. Study of diketopiperazines from the marine-derived *Streptomyces* sp. 223[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2015, 34(3): 23-28 (in Chinese).
- [3] CORNACCHIA C, CACCIATORE I, BALDASSARRE L, MOLLICA A, FELICIANI F, PINNEN F. 2,5-diketopiperazines as neuroprotective agents[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2012, 12(1): 2-12.
- [4] BOJARSKA J, MIECZKOWSKI A, ZIORA ZM, SKWARCZYNSKI M, TOTH I, SHALASH AO, PARANG K, EL-MOWAFI SA, MOHAMMED EHM, ELNAGDY S, ALKHAZINDAR M, WOLF WM. Cyclic dipeptides: the biological and structural landscape with special focus on the anti-cancer proline-based scaffold[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1515.
- [5] LIU J, BRAHIMI F, SARAGOVIC HU, BURGESS K. Bivalent diketopiperazine-based tropomyosin receptor kinase C (TrkC) antagonists[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53(13): 5044-5048.
- [6] NILOV DK, YASHINA KI, GUSHCHINA IV, ZAKHARENKO AL, SUKHANOVA MV, LAVRIK OI, ŠVEDAS VK. 2,5-diketopiperazines: a new class of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors[J]. *Biochemistry: Moscow*, 2018, 83(2): 152-158.
- [7] MOHANLAL RW, LLOYD K, HUANG L. Plinabulin, a novel small molecule clinical stage IO agent with anti-cancer activity, to prevent chemo-induced neutropenia and immune related AEs[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2018, 36(5_suppl): 126.
- [8] LIDDLE J, ALLEN MJ, BORTHWICK AD, BROOKS DP, DAVIES DE, EDWARDS RM, EXALL AM, HAMLETT C, IRVING WR, MASON AM, MCCAFFERTY GP, NEROZZI F, PEACE S, PHILP J, POLLARD D, PULLEN MA, SHABBIR SS, SOLLIS

- SL, WESTFALL TD, WOOLLARD PM, WU C, et al. The discovery of GSK221149A: a potent and selective oxytocin antagonist[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(1): 90-94.
- [9] SCAREL M, MARCHESAN S. Diketopiperazine gels: new horizons from the self-assembly of cyclic dipeptides[J]. *Molecules*: Basel, Switzerland, 2021, 26(11): 3376.
- [10] BORTHWICK AD, DA COSTA NC. 2,5-diketopiperazines in food and beverages: taste and bioactivity[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(4): 718-742.
- [11] BORTHWICK AD. 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products[J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(7): 3641-3716.
- [12] ZHOU MY, HUO JH, WANG CR, WANG WM. UPLC/Q-TOF MS screening and identification of antibacterial compounds in *Forsythia suspensa* (thunb.) vahl leaves[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 12: 704260.
- [13] NASSAR AF, WU T, NASSAR SF, WISNEWSKI AV. UPLC-MS for metabolomics: a giant step forward in support of pharmaceutical research[J]. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(2): 463-470.
- [14] PLUMB RS, JOHNSON KA, RAINVILLE P, SMITH BW, WILSON ID, CASTRO-PEREZ JM, NICHOLSON JK. UPLC/MS(E): a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 2006, 20(13): 1989-1994.
- [15] RAB RA, ZAHIRUDDIN S, IBRAHIM M, HUSAIN F, PARVEEN R, KHAN W, AHMAD FJ, KHAN AA, AHMAD S. HPTLC and UPLC-MS/MS methods for quality control analysis of itrifal formulations of unani system of medicine[J]. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2020, 103(3): 649-658.
- [16] WANG YY, GU EM, DU XX, XU RN, LIN GY. A novel UPLC-MS/MS assay for the measurement of linezolid and its metabolite PNU-142300 in human serum and its application to patients with renal insufficiency[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 641872.
- [17] WANG YD, YANG J, LI Q, LI YY, TAN XM, YAO SY, NIU SB, DENG H, GUO LP, DING G. UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of *Seco-sativene* sesquiterpenoids to detect new and bioactive analogues from plant pathogen *Bipolaris sorokiniana*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 807014.
- [18] TAN XM, LI Q, WANG YD, WANG TL, YANG J, SUN BD, GUO LP, DING G. UPLC-Q-TOF-MS/MS analysis of the guaiane sesquiterpenoids oxytropiols A–J and detection of undescribed analogues from the locoweed endophytic fungus *Alternaria oxytropis* (*Pleosporaceae*)[J]. *Phytochemical Analysis*, 2022, 33(3): 344-354.
- [19] WANG CR, WU YS, PU ZS, LIU GS, ZHANG CH. Study on black-fleck disease of ginseng I survey of yield production, pathogenic fungus and incidence pattern of the disease[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 1986, 17(3): 11-21.
- [20] 王崇仁, 吴友三, 卜增山, 刘高生, 张纯化. 人参斑点病(*Alternaria panax*)病原学、发生规律及药剂防治[J]. *中国农业科学*, 1986, 19(5): 94-95.
- WANG CR, WU YS, BU ZS, LIU GS, ZHANG CH. The etiology, occurrence pattern and medicinal control of ginseng spot disease—*Alternaria panax*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1986, 19(5): 94-95 (in Chinese).
- [21] WEI J, ZHANG XY, DENG S, CAO L, XUE QH, GAO JM. α -glucosidase inhibitors and phytotoxins from *Streptomyces xanthophaeus*[J]. *Natural Product Research*, 2017, 31(17): 2062-2066.
- [22] STRÖM K, SJÖGREN J, BROBERG A, SCHNÜRER J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4322-4327.
- [23] CRONAN JM, DAVIDSON TR, SINGLETON FL, COLWELL RR, CARdeLLINA JH. Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palythoa* sp.[J]. *Natural Product Letters*, 1998, 11(4): 271-278.
- [24] YE XW, CHAI WY, LIAN XY, ZHANG ZZ. Novel propanamide analogue and antiproliferative

- diketopiperazines from mangrove *Streptomyces* sp. Q24[J]. *Natural Product Research*, 2017, 31(12): 1390-1396.
- [25] STIERLE AC, CARDELLINA JH, STROBEL GA. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*[J]. *PNAS*, 1988, 85(21): 8008-8011.
- [26] RHEE KH. Isolation and characterization of *Streptomyces* sp. KH-614 producing anti-VRE (vancomycin-resistant enterococci) antibiotics[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2002, 48(6): 321-327.
- [27] WANG N, CUI CB, LI CW. A new cyclic dipeptide penicimutide: the activated production of cyclic dipeptides by introduction of neomycin-resistance in the marine-derived fungus *Penicillium*[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2016, 39(6): 762-770.
- [28] LIN WX, XIE CL, ZHOU M, XIA ML, ZHOU TT, CHEN HF, YANG XW, YANG Q. Chemical constituents from the deep sea-derived *Streptomyces xiamenensis* MCCC 1A01570 and their effects on RXR α transcriptional regulation[J]. *Natural Product Research*, 2018, 34(10): 1461-1464.
- [29] SAHU PK, RAMISETTI NR, CECCHI T, SWAIN S, PATRO CS, PANDA J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147: 590-611.
- [30] van HAANDEL L, STOBAUGH JF. Folate determination in human health: UPLC-MS/MS is the emerging methodology of choice[J]. *Bioanalysis*, 2013, 5(24): 3023-3031.