

基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 技术的藏药塔黄的化学成分分析

雍 潘, 刘 圆, 吕露阳, 张志峰, 罗 昊, 曾 锐*

西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘 要: 目的 采用 UPLC-ESI-HRMSⁿ 技术对藏药塔黄 *Rheum nobile* 的甲醇提取物进行分离鉴定分析。方法 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱进行分离, 甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 质谱采用正负离子监测模式、全扫描及自动触发二级质谱扫描进行数据采集。通过高分辨质谱数据, 结合 HMDB 数据库、参考相关文献以及对照品比对, 鉴定塔黄的主要化学成分。结果 从塔黄的甲醇提取物中共鉴定了 34 个化学成分, 包括蒽醌类 4 个、酚酸类 15 个、鞣质及鞣质前体类 11 个、有机酸 4 个。其中 27 个化学成分首次从该植物中分离得到。结论 UPLC-ESI-HRMSⁿ 技术可快速、准确地鉴定塔黄中化学成分, 为其药效物质基础及质量控制提供理论依据。

关键词: 塔黄; UPLC-ESI-HRMSⁿ; 酚酸类; 蒽醌类; 鞣质

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1066-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.007

Rapid identification on chemical compounds in roots of *Rheum nobile* based on UPLC-ESI-HRMSⁿ

YONG Pan, LIU Yuan, LV Lu-yang, ZHANG Zhi-feng, LUO Hao, ZENG Rui

School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective A rapid and efficient UPLC-ESI-HRMSⁿ method was developed and applied to rapidly identify the components in *Rheum nobile*. **Methods** With 100% methanol as extract preparation for solution, the extract was separated on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), and eluted with a gradient of methanol-water that containing 0.1% formic acid. Chemical constituents were separated and investigated by UPLC-ESI-HRMSⁿ in both positive and negative ion modes. Combined with accurate mass characteristic fragments, retention time and previous literature database, the structures of compounds were identified or tentatively characterized. **Results** A total of 34 compounds including four anthraquinones, 15 phenolic acid derivatives, 11 tannin precursor and tannins and four organic acid were identified. Twenty-seven compounds were reported for the first time from *R. nobile*. **Conclusion** The analytical method of UPLC-ESI-HRMSⁿ was valuable for rapid identification of unknown constituents of *R. nobile*, which supplies a clear material basis for further study.

Key words: *Rheum nobile* Hook. f. et Thoms; UPLC-ESI-HRMSⁿ; phenolic compounds; anthraquinones; tannin

塔黄 *Rheum nobile* Hook. f. et Thoms 为蓼科 (Polygonaceae) 大黄属 *Rheum* L. 多年生草本植物的干燥根, 收载于《藏药志》, 藏药名为曲玛孜, 主产于西藏喜马拉雅山麓及云南省西北部, 生长在海拔 4 000~4 800 m 高山石滩及湿草地^[1]。其具有泻热、导滞、散癖、消肿等功效, 临床用于治疗黄水、恶性腹水、肾水肿等^[2]。目前, 对传统中药大黄的

化学成分研究较多, 其主要含有蒽醌、蒽酮、二苯乙烯、鞣质、酰基糖苷和色酮类等化学成分^[3], 而对藏药塔黄的研究仅限于基本的药材鉴别、药效研究及少量成分的分离鉴定^[4-6], 对其化学成分的定性鉴别未见文献报道。因此, 研究藏药塔黄的化学成分对其药效物质基础的阐释和质量控制有重要意义。

近年来, UPLC-ESI-HRMSⁿ 四级杆-静电场轨道

收稿日期: 2018-09-27

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700705); 四川省留学人员科技活动项目择优资助经费计划 (2018-68); 四川省科技厅科技支撑计划 (2014SZ0131); 四川省科技厅科技支撑计划 (2016FP0015); 四川省基础研究重点项目 (2018JY0069); 西南民族大学 2018 中央高校重点项目 (2018NZD18); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (CX2017SZ090)

作者简介: 雍 潘 (1994—), 女, 硕士研究生。Tel: 13709079541 E-mail: 13709079541@163.com

*通信作者 曾 锐, 副教授, 主要从事药物制剂及民族药研究。Tel: (028)85522099 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

高分辨质谱技术,以其高分辨率、高灵敏度和精确测定相对分子质量的特点,广泛应用于中药材、复方的化学成分鉴定以及代谢组学等研究领域^[7-8]。因此,本课题组在前期对单味中药进行快速鉴别的经验基础上^[9-11],本实验采用 UPLC-ESI-HRMSⁿ 技术对塔黄的化学成分进行定性分析,从中总结了各类化学成分质谱裂解规律,鉴定出 34 个化学成分,包括 4 个蒽醌类化合物、15 个酚酸类化合物、11 个鞣质及鞣质前体类和 4 个有机酸。为塔黄的药效物质基础和质量控制提供理论依据和参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UPLC-ESI-HRMSⁿ 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱(赛默飞世尔科技公司,美国);Ultimate 3000 超高效液相色谱系统(戴安公司,美国);ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 沃特世科技有限公司,美国);BT25S 十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);HX-200 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

塔黄于 2016 年 10 月采集自四川省康定县雅家埂(N: 29°52', E: 102°01'),经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为蓼科大黄属多年生草本植物塔黄 *Rheum nobile* Hook. f. et Thoms。

对照品大黄素(批号 120210)、没食子酸(批号 140318)和儿茶素(批号 18061201)均购于成都普菲德生物科技有限公司;对照品对香豆酸(批号 150122)和表儿茶素(批号 CHB1800831)购于成都克洛码生物科技有限公司;对照品阿魏酸(批号 111020)购于四川省维克奇生物科技有限公司;对照品大黄酚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷(批号 141209)、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷(批号 141209)和大黄素-1-*O*-葡萄糖苷(批号 120218)均购于南京贝森伽生物科技有限公司;所有对照品质量分数均≥98.0%;色谱纯甲醇(默克公司,美国);色谱纯甲酸(西格玛奥德里奇,美国);自制纯净水(Milli-Q SP Regent Water system, 美国)。

2 方法

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm,

1.7 μm) 色谱柱,流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液。梯度洗脱条件见表 1,体积流量 0.3 mL/min,进样室温度 10 °C,柱温 35 °C。进样量 2 μL。

表 1 UPLC 梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution condition of UPLC

<i>t</i> /min	甲醇/%	0.1%甲酸水溶液/%
0	5	95
2	15	85
5	25	75
8	35	65
12	45	55
20	55	45
25	85	15
30	95	5
35	95	5

2.2 质谱条件

离子源为 HESI 源,正、负离子检测模式,鞘气压力 206.8 kPa;辅助气流量 10 L/min;喷雾电压 2.00 kV;离子传输管温度 320 °C;辅助气温度 350 °C;扫描模式:Full MS/dd-MS²,Full MS 分辨率 70 000,dd-MS² 分辨率 17 500,扫描范围 *m/z* 80~1 200。MS/MS 模式时,所用碰撞能为阶梯能量:30、40 eV。

2.3 混合对照品溶液的制备

称取适量的没食子酸、大黄素、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、对香豆酸、阿魏酸、儿茶素、表儿茶素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 9 种对照品适量,加入甲醇制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

药材干燥后粉碎过 65 目筛。取约 1 g,精密称量,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密量取 25 mL 甲醇,密封后称定质量,室温下超声 30 min,待冷却至室温,后用甲醇补充减失质量,摇匀,滤过,取续滤液,进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.5 数据处理

采用优化后的 UPLC-ESI-HRMSⁿ 条件对塔黄样品进行检测。得到的质谱数据通过对比对照品保留时间以及查阅相关文献及在线数据库进行鉴定。其推导过程如下:(1)根据高分辨质谱数据提供的一级质谱碎片信息及精确相对分子质量,经 Xcalibur 3.0 软件(美国赛默飞科技有限公司)拟合

分子式, 质谱偏差范围 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$ 。(2) 将拟合得到的分子式结合同属植物化学成分的元素组成进行比对, 获得可能的化合物名称。(3) 通过与文献报道的保留时间、质谱碎片信息、裂解行为和在线数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 的质谱信息进行比对。对化合物进行进一步结构鉴定。

3 结果与讨论

根据“2.5”项下数据分析方法, 从塔黄甲醇提取物中共鉴定了 34 个化学成分, 包括蒽醌类 4 个, 酚酸类化合物 15 个, 鞣质及鞣质前体类 11 个和有机酸 4 个。基峰离子流图见图 1。化合物的保留时间、相对分子质量、一级质谱数据及二级质谱碎片离子信息见表 2。

3.1 酚类化合物

酚酸类的质谱裂解行为较为简单。在负离子模式下, 一级质谱中主要以 $[M-H]^-$ 的分子离子峰形式存在。二级质谱主要表现为羧基和羟基的丢失, 产生 $[M-H-CO_2]^-$ 和 $[M-H-H_2O]^-$ 的碎片离子。当酚酸类化合物中含有有机酸时, 容易出现有机酸的丢失。塔黄中简单酚酸类成分大多以没食子酸、对香豆酸、阿魏酸、桂皮酸和对羟基苯甲酸为基本结构, 与其他成分的羟基脱水缩合形成酯, 以葡萄糖苷形式存在。其中以没食子酸的衍生物为主, 在二级质谱中, 易出现 $[M-H-Gal]^-$ 、 $[M-H-$

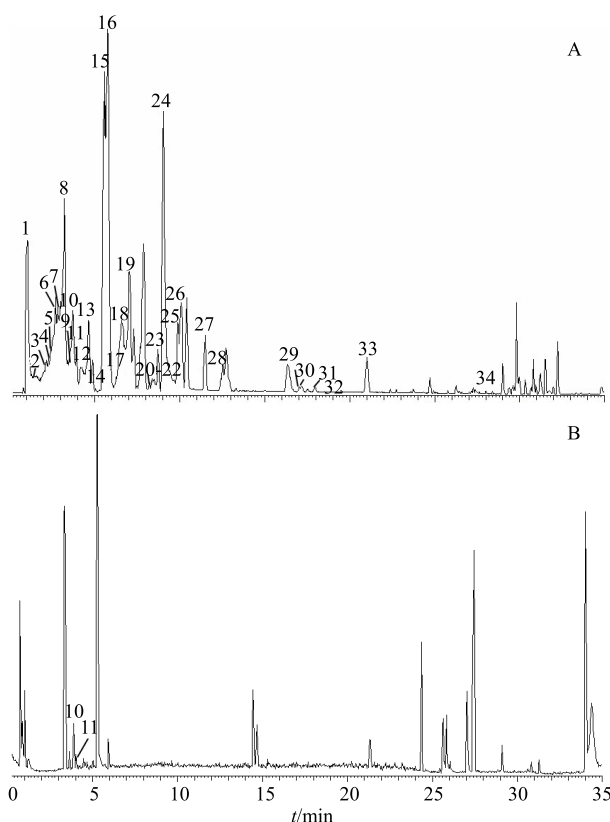


图 1 塔黄负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 下的基峰离子流图

Fig. 1 Base peak ion (BPI) in negative ion (A) and positive ion (B) modes of *R. nobile*

表 2 塔黄化学成分 UPLC-ESI-HRMSⁿ 的鉴别分析结果

Table 2 Identification results of chemical constitutions in *R. nobile* by UPLC-ESI-HRMSⁿ

峰号	t_R/min	分子式	偏差($\times 10^{-6}$)	一级质谱	碎片离子	化合物鉴定
1	1.53	$C_{13}H_{16}O_{10}$	1.657	331.067 6 $[M-H]^-$	271.046 4 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$, 211.024 5 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$, 169.013 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 125.023 3 $[M-H-C_7H_{10}O_7]^-$	一没食子酰葡萄糖苷或异构体 ^[9]
2	1.74	$C_{13}H_{16}O_{10}$	1.317	331.067 3 $[M-H]^-$	271.046 4 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$, 211.024 5 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$, 169.013 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 125.023 3 $[M-H-C_7H_{10}O_7]^-$	一没食子酰葡萄糖苷或异构体 ^[9]
3*	1.96	$C_7H_6O_5$	0.260	169.013 4 $[M-H]^-$	125.023 3 $[M-H-CO_2]^-$, 151.003 1 $[M-H-H_2O]^-$	没食子酸 ^[3]
4	2.13	$C_{13}H_{16}O_{10}$	1.657	331.067 6 $[M-H]^-$	271.046 4 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$, 211.024 5 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$, 169.013 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 125.023 3 $[M-H-C_7H_{10}O_7]^-$	一没食子酰葡萄糖苷或异构体 ^[9]
5	2.30	$C_{19}H_{26}O_{15}$	1.243	493.098 9 $[M-H]^-$	331.067 7 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 169.013 4 $[M-H-C_{12}H_{20}O_{10}]^-$	没食子酸- <i>O</i> -二葡萄糖苷 ^[3]
6	2.84	$C_{21}H_{22}O_{11}$	1.181	449.109 6 $[M-H]^-$	313.057 3 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$, 169.013 4 $[M-H-C_{14}H_6O_6]^-$	对己酰苯酚- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[12]
7	3.48	$C_{21}H_{24}O_{11}$	-2.791	451.123 3 $[M-H]^-$	289.072 3 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 245.082 0 $[M-H-C_7H_{11}O_7]^-$	儿茶素- <i>O</i> -葡萄糖苷/表儿茶素- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[3,13]
8	3.52	$C_{21}H_{24}O_{11}$	-2.791	451.123 3 $[M-H]^-$	289.072 4 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 245.082 1 $[M-H-C_7H_{11}O_7]^-$	儿茶素- <i>O</i> -葡萄糖苷或异构体 ^[3,13]
9	3.63	$C_{20}H_{20}O_{14}$	1.928	483.078 9 $[M-H]^-$	331.067 7 $[M-H-C_7H_4O_4]^-$, 313.057 2 $[M-H-C_7H_6O_5]^-$, 169.013 4 $[M-H-C_{13}H_{14}O_9]^-$, 125.023 3 $[M-H-C_{14}H_{14}O_{11}]^-$	二没食子酰葡萄糖苷 ^[14]

续表 2

峰号	t_R/min	分子式	偏差($\times 10^{-6}$)	一级质谱	碎片离子	化合物鉴定
10 [*]	4.35	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-0.285	289.072 0 [M-H] ⁻	271.061 2 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 245.083 8 [M-H-CO ₂] ⁻ , 203.070 6 (+)-儿茶素 ^[4,13] [M-H-C ₃ H ₂ O ₃] ⁻ , 179.034 0 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁻	
				291.086 0 [M+H] ⁺	139.039 0 [M+H-C ₈ H ₈ O ₃] ⁺ , 123.043 9 [M+H-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺	
11 [*]	4.60	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-0.285	289.072 0 [M-H] ⁻	271.061 2 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 245.083 8 [M-H-CO ₂] ⁻ , 203.070 6 (-)-表儿茶素 ^[4,13] [M-H-C ₃ H ₂ O ₃] ⁻ , 179.034 0 [M-H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁻	
				291.086 0 [M+H] ⁺	139.039 0 [M+H-C ₈ H ₈ O ₃] ⁺ , 123.043 9 [M+H-C ₈ H ₈ O ₄] ⁺	
12	4.63	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	2.228	483.079 2 [M-H] ⁻	331.067 7 [M-H-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ , 313.057 2 [M-H-C ₇ H ₆ O ₅] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₁₃ H ₁₄ O ₉] ⁻ , 125.023 3 [M-H-C ₁₄ H ₁₄ O ₁₁] ⁻	二没食子酰葡萄糖苷 ^[14]
13	4.67	C ₈ H ₈ O ₅	0.440	183.029 2 [M-H] ⁻	168.005 6 [M-H-CH ₃] ⁻ , 124.015 4 [M-H-C ₂ H ₃ O ₂] ⁻	没食子酸甲酯 ^[3]
14	5.01	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	0.190	635.090 3 [M-H] ⁻	465.067 9 [M-H-C ₇ H ₆ O ₅] ⁻ , 313.057 1 [M-H-C ₁₄ H ₁₀ O ₉] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₂₂ H ₁₈ O ₁₃] ⁻ , 125.023 3 [M-H-C ₂₃ H ₁₀ O ₇] ⁻	三没食子酰葡萄糖苷 ^[13]
15	5.43	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	2.547	577.136 6 [M-H] ⁻	407.077 7 [M-H-C ₈ H ₁₀ O ₄] ⁻ , 289.072 2 [M-H-C ₁₅ H ₁₂ O ₆] ⁻ , 245.082 4 [M-H-C ₁₆ H ₁₂ O ₈] ⁻ , 125.023 3 [M-H-C ₂₄ H ₂₀ O ₉] ⁻	原花青素 B 或异构体 ^[14]
16	5.63	C ₁₄ H ₆ O ₈	1.646	300.999 5 [M-H] ⁻	283.996 7 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 257.009 6 [M-H-CO ₂] ⁻	鞣花酸 ^[15]
17	5.70	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	0.259	325.093 4 [M-H] ⁻	163.032 9 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 145.028 5 [M-H-C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁻	对香豆酸- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[16]
18	6.14	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	1.243	493.098 9 [M-H] ⁻	331.067 7 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₁₂ H ₂₀ O ₁₀] ⁻	没食子酸- <i>O</i> -二葡萄糖苷 ^[3]
19	6.51	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	2.043	507.113 2 [M-H] ⁻	331.068 5 [M-H-C ₁₀ H ₈ O ₃] ⁻ , 313.057 1 [M-H-C ₁₀ H ₁₀ O ₄] ⁻ , 193.050 0 [M-C ₁₃ H ₁₄ O ₉] ⁻ , 169.013 5 [M-C ₁₆ H ₁₈ O ₈] ⁻	阿魏酸- <i>O</i> -没食子酰-葡萄糖苷 ^[13]
20 [*]	8.40	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0.235	193.049 8 [M-H] ⁻	178.026 4 [M-H-CH ₃] ⁻ , 149.060 1 [M-H-CO ₂] ⁻	阿魏酸
21	8.76	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₅	3.944	613.122 7 [M-H] ⁻	465.068 1 [M-H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁻ , 313.057 0 [M-H-C ₁₆ H ₁₂ O ₆] ⁻ , 271.046 3 [M-H-C ₁₈ H ₁₄ O ₇] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀] ⁻	桂皮酸- <i>O</i> -二没食子酰-葡萄糖苷 ^[3]
22 [*]	8.80	C ₉ H ₈ O ₃	0.019	163.039 3 [M-H] ⁻	145.027 8 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 119.049 1 [M-H-CO ₂] ⁻	对香豆酸 ^[3]
23	9.30	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀	2.823	881.159 7 [M-H] ⁻	729.149 8 [M-H-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ , 577.132 3 [M-H-C ₁₄ H ₈ O ₈] ⁻ , 289.072 2 [C ₁₅ H ₁₃ O ₆] ⁻ , 169.013 5 [C ₇ H ₅ O ₅] ⁻	原花青素 B- <i>O</i> -二没食子酸酯 ^[16]
24	9.50	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂	1.978	451.089 1 [M-H] ⁻	313.057 2 [M-H-C ₇ H ₆ O ₃] ⁻ , 169.013 5 [M-H-C ₁₃ H ₁₄ O ₇] ⁻	对羟基苯甲酸- <i>O</i> -没食子酰-葡萄糖苷 ^[16]
25	10.03	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	1.717	441.083 3 [M-H] ⁻	289.072 3 [M-H-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₁₅ H ₁₂ O ₅] ⁻ , 125.023 4 [M-H-C ₁₆ H ₁₂ O ₇] ⁻	儿茶素没食子酸酯或异构体 ^[3]
26	10.07	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	1.920	729.148 0 [M-H] ⁻	407.077 6 [M-H-C ₁₅ H ₁₄ O ₈] ⁻ , 289.072 2 [M-H-C ₂₂ H ₁₆ O ₁₀] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₃₀ H ₂₄ O ₁₁] ⁻ , 125.023 3 [M-H-C ₃₁ H ₂₄ O ₁₃] ⁻	原花青素 B- <i>O</i> -没食子酸酯 ^[16]
27	11.83	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	2.372	477.104 6 [M-H] ⁻	313.157 2 [M-H-C ₉ H ₈ O ₃] ⁻ , 169.013 5 [M-H-C ₁₅ H ₁₆ O ₇] ⁻ , 125.023 3 [M-H-C ₁₆ H ₁₆ O ₉] ⁻	对香豆酸- <i>O</i> -没食子酰-葡萄糖苷 ^[14]
28	12.87	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀	2.823	881.159 7 [M-H] ⁻	729.149 8 [M-H-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ , 577.132 3 [M-H-C ₁₄ H ₈ O ₈] ⁻ , 289.072 2 [M-H-C ₂₉ H ₂₀ O ₁₄] ⁻ , 169.013 5 [M-H-C ₃₇ H ₂₈ O ₁₅] ⁻	原花青素 B- <i>O</i> -二没食子酸酯 ^[16]
29	17.61	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	2.022	461.109 9 [M-H] ⁻	313.057 1 [M-H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₁₅ H ₁₆ O ₆] ⁻	桂皮酸- <i>O</i> -没食子酰-葡萄糖苷或异构体 ^[3,13]
30	17.93	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	2.022	461.109 9 [M-H] ⁻	313.057 1 [M-H-C ₉ H ₈ O ₂] ⁻ , 169.013 4 [M-H-C ₁₅ H ₁₆ O ₆] ⁻	桂皮酸- <i>O</i> -没食子酰-葡萄糖苷或异构体 ^[3,13]
31 [*]	18.09	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-0.073	431.096 5 [M-H] ⁻	269.045 9 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 255.029 6 [M-H-C ₈ H ₁₀ O ₈] ⁻	大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[3-4]
32 [*]	18.66	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	4.461	415.101 6 [M-H] ⁻	253.050 6 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	大黄酚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^[9]
33 [*]	21.60	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-0.073	431.096 5 [M-H] ⁻	269.045 9 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 255.029 6 [M-H-C ₈ H ₁₀ O ₈] ⁻	大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^[3-4]
34 [*]	28.15	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	1.600	269.046 1 [M-H] ⁻	241.049 4 [M-H-CO] ⁻ , 225.823 5 [M-H-CO ₂] ⁻ , 181.071 1 [M-H-CO ₂ -CO ₂] ⁻	大黄素 ^[4]

*通过对照品对比确认

*Identified by comparing with reference standard

$\text{H-Glu}]^-$ 和没食子酸的母核碎片离子 m/z 169 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$)。

1、2 和 4 号峰分子离子均为 m/z 331.067 3 $[\text{M-H}]^-$ ，丢失葡萄糖基 (m/z 162, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) 后产生没食子酸的碎片离子 m/z 169.013 4 $[\text{M-H-Glu}]^-$ ，故推断 1、2 和 4 号峰均为一没食子酸糖苷^[9]，其裂解途径如图 2。5 号峰和 18 号峰产生相同的分子离子峰 m/z 493.120 4 $[\text{M-H}]^-$ ，连续丢失 2 分子葡萄糖基后，产生碎片离子 m/z 331.067 9 $[\text{M-H-Glu}]^-$ 和 m/z 169.032 1 $[\text{M-H-2Glu}]^-$ ，故鉴定 5 和 18 号峰为没食子酸-*O*-二葡萄糖苷^[3]。9 和 12 号峰有相同的分子离子峰 m/z 483.120 4 $[\text{M-H}]^-$ ，丢失没食子酰基 (m/z 152, $\text{C}_7\text{O}_4\text{O}_4$) 后，产生 m/z 331.067 7 $[\text{M-H-Gal}]^-$ 、 m/z 313.057 0 $[\text{M-H-Gal-H}_2\text{O}]^-$ 和 m/z

169.013 5 $[\text{M-H-Gal-Glu}]^-$ 的碎片离子。故 9 和 12 号峰被鉴定为二没食子酰葡萄糖苷^[14]。14 号峰的分子离子峰为 m/z 635.090 6 $[\text{M-H}]^-$ ，比 9 号峰的分子离子峰多 1 分子没食子酰基 (m/z 152, $\text{C}_7\text{O}_4\text{O}_4$)，并同样产生碎片离子 m/z 483.076 7 $[\text{M-H-Gal}]^-$ 、 m/z 313.057 0 $[\text{M-H-2Gal-H}_2\text{O}]^-$ 和没食子酸的碎片离子 m/z 169.013 0 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5$)。14 号峰被鉴定为三没食子酰葡萄糖苷^[13]。

17 号峰的分子离子峰为 m/z 325.093 4 $[\text{M-H}]^-$ ，丢失 1 分子葡萄糖和 1 分子水后，产生 m/z 163.039 0 $[\text{M-H-Glu}]^-$ 和 m/z 145.028 5 $[\text{M-H-Glu-H}_2\text{O}]^-$ 的碎片离子。判断该化合物为对香豆酸-*O*-葡萄糖苷^[16]。27 号峰的分子离子峰为 m/z 477.104 3 $[\text{M-H}]^-$ ，中性丢失对香豆酸母核 (m/z

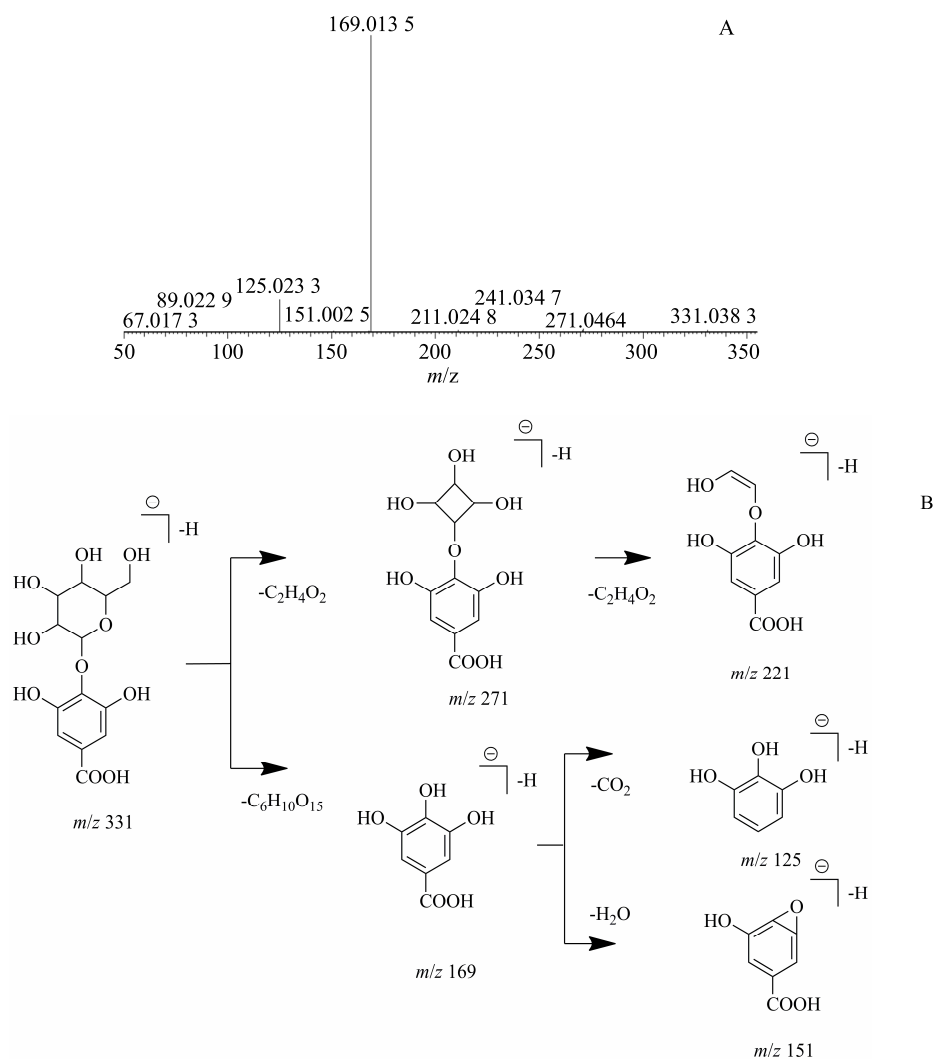


图 2 一没食子酰葡萄糖苷质谱图 (A) 和裂解途径 (B)

Fig. 2 (–) ESI-MS² spectrum (A) and proposed fragmentation process (B) of galloyl glucose

164, $C_9H_8O_3$) 后产生碎片离子 m/z 313.056 8 $[M-H-C_9H_8O_3]^-$ 和没食子酸的特征碎片离子 m/z 169.013 5 ($C_7H_5O_5$)。因此推测 27 号峰为对香豆酸-*O*-没食子酰-葡萄糖苷^[13]。19 号峰的分子离子峰为 m/z 507.113 2 $[M-H]^-$, 丢失阿魏酸取代基 (m/z 176, $C_{10}H_8O_3$) 和阿魏酸的母核离子 (m/z 193, $C_{10}H_9O_4$) 后产生碎片离子 m/z 331.068 5 $[M-H-C_{10}H_8O_3]^-$ 和 m/z 313.057 1 $[M-H-C_{10}H_9O_4]^-$, 还存在没食子酸的特征离子 m/z 169.013 5 ($C_7H_5O_5$), 因此鉴定该化合物为阿魏酸-*O*-没食子酰-葡萄糖苷^[13]。

24 号峰的分子离子峰为 m/z 451.089 0 $[M-H]^-$, 丢失对羟基苯甲酸母核离子 (m/z 138, $C_7H_6O_3$) 后产生碎片离子 m/z 313.057 2 $[M-H-C_7H_6O_3]^-$, 以及没食子酸的特征碎片 m/z 169.013 5 $[M-H-C_{13}H_{14}O_7]^-$, 推测该化合物为对羟基苯甲酸-*O*-没食子酰-葡萄糖苷^[16]。29、30 号峰的分子离子峰都为 m/z 461.110 0 $[M-H]^-$, 中性丢失 1 分子肉桂酸 (m/z 148, $C_9H_8O_2$) 后产生碎片离子 m/z 313.057 3 $[M-H-C_9H_8O_2]^-$ 和没食子酸的特征碎片离子 m/z 169.013 4 ($C_7H_5O_5$), 故鉴定 29 和 30 号峰为桂皮酸-*O*-没食子酰-葡萄糖苷及其异构体^[3]。21 号峰的分子离子峰为 m/z 613.122 7 $[M-H]^-$, 连续丢失 1 分子中性肉桂酸 (m/z 148, $C_9H_8O_2$) 和没食子酰基 (m/z 152, $C_7H_4O_4$) 产生碎片离子 m/z 465.068 1 $[M-H-C_9H_8O_2]^-$ 和 m/z 313.057 0 $[M-H-C_9H_8O_2-C_7H_4O_4]^-$, 并得到没食子酸碎片离子 m/z 169.013 5 ($C_7H_5O_5$)。故鉴定 21 号峰为桂皮酸-*O*-二没食子酰-葡萄糖苷^[3]。6 号峰的分子离子峰为 m/z 449.109 6 $[M-H]^-$, 中性丢失对己酰苯酚后 (m/z 136, $C_8H_8O_2$) 产生碎片离子 m/z 313.057 3 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$ 和没食子酸的特征离子 m/z 169.013 4 ($C_7H_5O_5$), 推测 6 号峰为对己酰苯酚-*O*-葡萄糖苷^[12]。13 号峰的分子离子峰为 m/z $[M-H]^-$ 183.029 3, 相继丢失 1 分子甲基和 CO_2 , 得到了碎片离子 m/z 168.005 6 $[M-H-CH_3]^-$ 和 m/z 124.015 4 $[M-H-CH_3-CO_2]^-$, 鉴定该峰为没食子酸甲酯^[3]。

3.2 鞣质及鞣质前体

鞣质是以儿茶素和没食子酸为单体, 以儿茶素的多聚体和儿茶素与没食子酸的聚合物存在。在负离子模式下的二级质谱中, 易出现 $[M-H-Gal]^-$ 、 $[M-H-Cat]^-$ 、没食子酸的母核碎片离子 m/z 169 ($C_7H_5O_5$) 及儿茶素的母核碎片离子 m/z 289 ($C_{15}H_{13}O_6$)。

10 号和 11 号峰分子离子峰都为 m/z 289.072 0 $[M-H]^-$, 具有 m/z 271.061 2 $[M-H-H_2O]^-$ 、 m/z 245.083 8 $[M-H-CO_2]^-$ 、 m/z 203.070 6 $[M-H-C_3H_2O_3]^-$ 和 m/z 179.034 0 $[M-H-C_6H_6O_2]^-$ 的碎片离子。根据文献的质谱数据及对对照品比对^[13], 鉴定 10 号峰为 (+)-儿茶素, 11 号峰为 (-)-表儿茶素。7 号峰的分子离子峰为 m/z 451.125 9 $[M-H]^-$, 中性丢失 1 分子的葡萄糖基后产生儿茶素/表儿茶素的特征碎片离子 m/z 289.072 0 $[M-H-Glu]^-$, 鉴定 7 号峰为儿茶素/表儿茶素葡萄糖苷, 8 号峰为其同分异构体^[3]。25 号峰的分子离子峰为 m/z 441.083 5 $[M-H]^-$, 除了产生儿茶素/表儿茶素的特征碎片离子 m/z 289.072 0 ($C_{15}H_{13}O_6$) 外, 还产生没食子酸的特征碎片离子 m/z 169.013 4 ($C_7H_5O_5$), 故鉴定 25 号峰为儿茶素没食子酸酯/表儿茶素没食子酸酯^[3], 其质谱裂解途径见图 3。

15 号峰的分子离子峰为 m/z 577.136 6 $[M-H]^-$, 发生逆狄尔斯-阿尔德裂解 (RAD) 后脱水后得到碎片离子 m/z 407.077 5 $[M-H-C_8H_8O_3-H_2O]^-$, m/z 289.072 2 $[M-H-Cat]^-$ 。为失去 1 分子儿茶素产生的碎片离子, 推测 15 号峰为儿茶素的二聚体, 即原花青素 B 或其同分异构体^[14]。26 号峰的分子离子峰为 m/z 729.147 1 $[M-H]^-$, 比 15 号峰多出 1 分子没食子酰基 (m/z 152, $C_7O_4O_4$), 并且具有相同的碎片离子 m/z 577.136 6 和 m/z 289.072 2, 故推断 26 号峰为原花青素 B-*O*-没食子酸酯^[16]。23 和 28 号峰的分子离子峰都为 m/z 881.158 0 $[M-H]^-$, 比 26 号峰多出 1 分子没食子酰基 (m/z 152, $C_7O_4O_4$), 并存在特征离子碎片 m/z 729.147 1 ($C_{37}H_{29}O_{16}$) 和 m/z 289.072 2 ($C_{15}H_{13}O_6$), 故推断 23 号峰和 28 号峰为原花青素 B-*O*-二没食子酸酯或其同分异构体^[16]。

3.3 蒽醌类

塔黄的甲醇提取物中蒽醌类成分较少, 主要为大黄素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷和大黄酚-*O*-吡喃葡萄糖苷。蒽醌类化合物母核基团会逐级脱去 CO 的中性碎片, 并伴随 CO_2 的丢失, 侧链取代基容易丢失 O、 H_2O 、 CH_3 和 CO_2 等中性小分子片段。

34 号峰的分子离子峰为 m/z 269.045 6 $[M-H]^-$, 丢失 1 分子 CO 和 1 分子 CO_2 后, 分别得到碎片离子 m/z 241.050 4 $[M-H-CO]^-$ 和 m/z 225.053 3 $[M-H-CO_2]^-$, 与对照品比较, 鉴定峰 34 为大黄

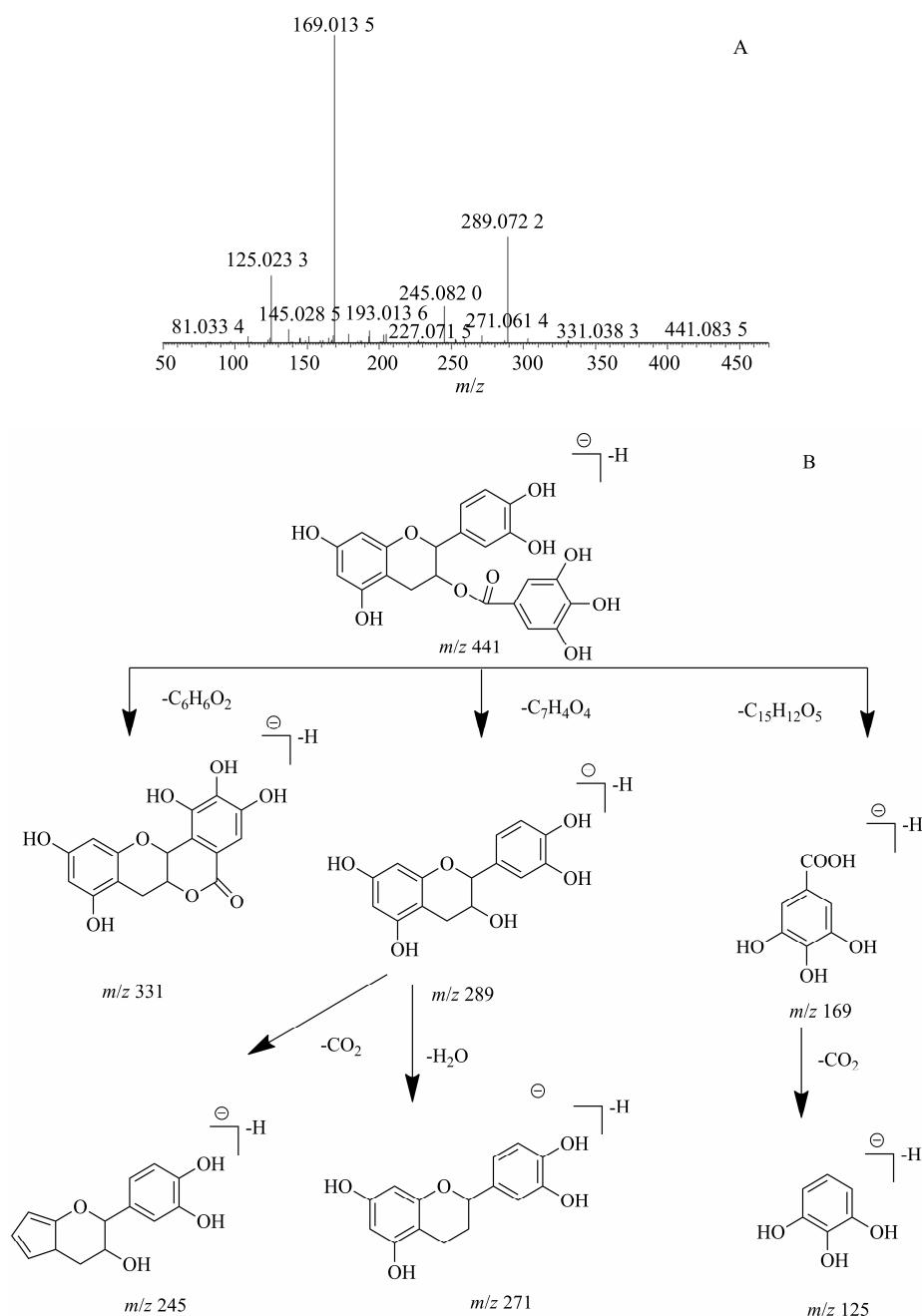


图 3 儿茶素没食子酸酯质谱图 (A) 和裂解途径 (B)

Fig. 3 (-) ESI-MS² spectrum (A) and proposed fragmentation process (B) of catechin gallate

素, 其质谱裂解途径见图 4。31 和 33 号峰的分子离子峰都为 m/z 431.098 4 $[M-H]^-$, 比 34 号峰多 1 分子葡萄糖基 (m/z 162, $C_6H_{10}O_5$), 并有大黄素的特征碎片 m/z 269.045 7 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 推断 31 和 33 号峰互为同分异构体。31 号峰通过对照品比较, 鉴定为大黄素-8-*O*-葡萄糖苷, 通过对比文献质谱数据和对照品比对, 鉴定 33 号峰为大黄素-1-*O*-葡萄糖苷^[3]。32 号峰的准分子离子峰为 m/z 415.130 5

$[M-H]^-$, 丢失 1 分子葡萄糖基后产生碎片离子 253.050 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 经对照品比较, 鉴定峰 32 为大黄酚-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷^[3]。

3.4 有机酸

从塔黄中鉴定出的有机酸有 4 个, 分别为阿魏酸、鞣花酸、没食子酸和对香豆酸。3 号峰的分子离子峰为 m/z 169.013 4 $[M-H]^-$, 丢失 CO_2 和 H_2O 后产生碎片离子 m/z 125.023 3 $[M-H-CO_2]^-$ 和

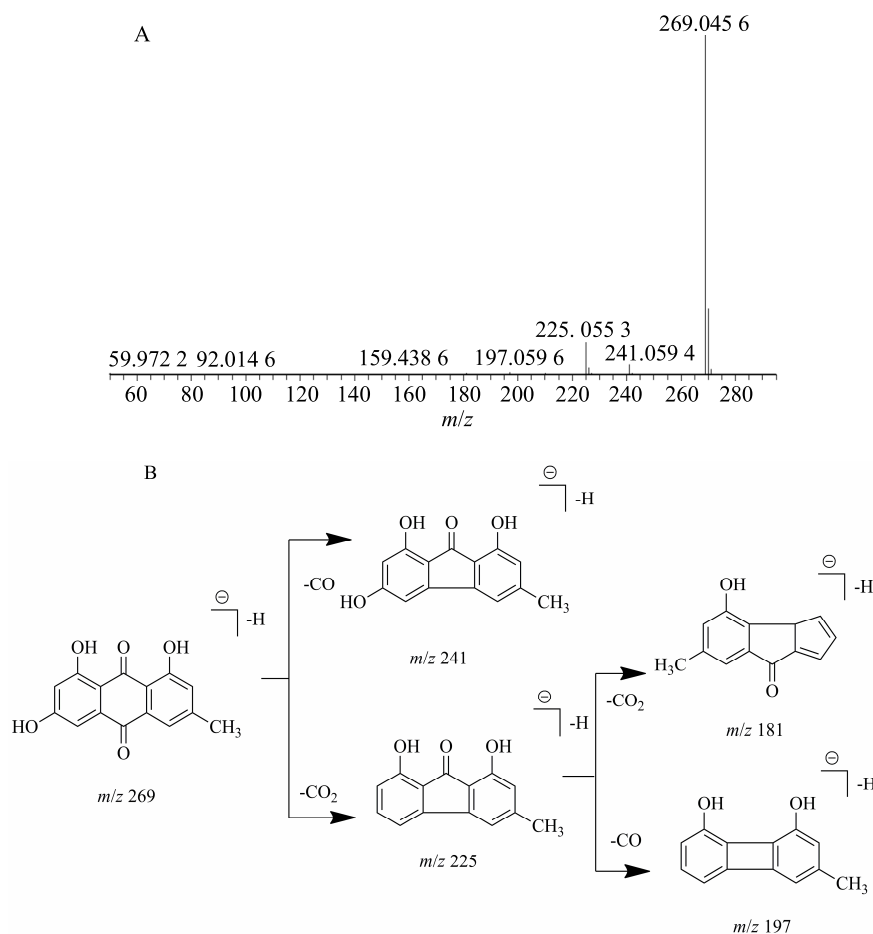


图 4 大黄素质谱图 (A) 和裂解途径 (B)

Fig. 4 (-) ESI-MS² spectrum (A) and proposed fragmentation process (B) of emodin

m/z 151.003 1 $[M-H-H_2O]^-$, 经对照品比对, 鉴定 3 号峰为没食子酸。16 号和 22 号峰的分子离子峰分别为 m/z 300.999 5 $[M-H]^-$ 和 m/z 163.039 3 $[M-H]^-$, 其分子离子峰丢失 CO_2 和 H_2O 后产生的碎片离子分别为 m/z 283.996 7 $[M-H-H_2O]^-$, m/z 257.009 6 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 145.027 8 $[M-H_2O]^-$, m/z 119.049 1 $[M-H-CO_2]^-$, 结合参考文献, 鉴定 16 号峰为鞣花酸^[15]。经对照品比对, 鉴定 22 号峰为对香豆酸, 其质谱裂解途径见图 5。20 号峰分子离子峰为 m/z 193.049 8 $[M-H]^-$, 碎片离子为 m/z 178.024 6 $[M-H-CH_3]^-$, 结合在线数据库和对照品比较, 鉴定 20 号峰为阿魏酸。

4 讨论

本实验进行了提取条件及分析条件的多重优化。优化提取条件时, 比较了 40% 甲醇、80% 甲醇及 100% 甲醇 3 种提取溶剂系统, 显示 100% 甲醇提取时效果最佳; 流动相考察了甲醇-水和乙腈-水, 结果显示甲醇-水的洗脱效果要优于乙腈-水, 且加

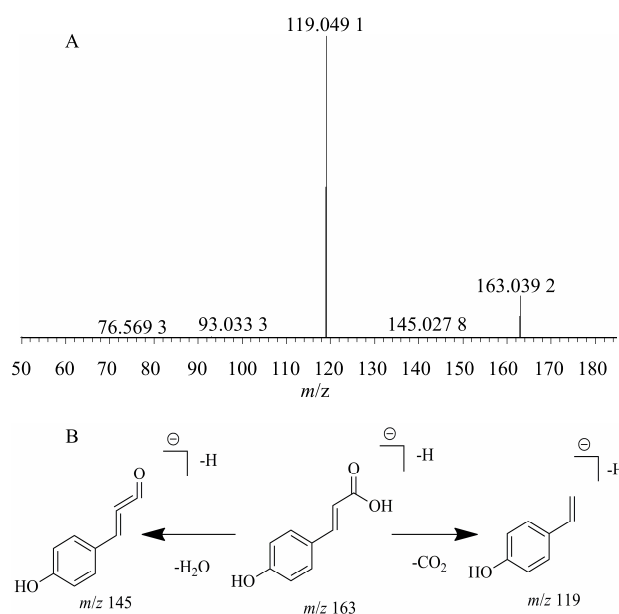


图 5 对香豆酸质谱图 (A) 和裂解途径 (B)

Fig. 5 (-) ESI-MS² spectrum (A) and proposed fragmentation process (B) of *p*-coumaric acid

入0.1%的甲酸可有效改善峰型和离子化效果,因此采用甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相;对比正、负离子扫描模式时,发现在负离子模式下,峰响应值明显高于正离子模式。但考虑到不同化合物在不同扫描模式下的响应不同,因此本实验同时采用正、负离子扫描模式检测,最大程度获得塔黄化学成分的质谱信息。

本实验采用的UPLC-ESI-HRMSⁿ技术,从藏药塔黄中鉴定了34个化合物,除大黄素、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、儿茶素、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯7个成分外,其余27个成分均首次在该植物中报道。根据有关文献报道^[17],大黄属植物含有丰富的蒽醌、蒽酮、二苯乙烯、鞣质类、酰基糖苷和色酮类化合物。本研究鉴定出的34个化合物,主要为酚酸类、鞣质类和蒽醌类化学成分,与前期大黄属植物文献报道一致。其中,在塔黄中检测出的大黄素为《中国药典》2015年版大黄项下定量测定的指标成分之一。但在正、负离子模式下均未检出大黄的另外4个指标成分芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚。这可能与药材的品种、提取方法及液质条件有关。表明藏药塔黄与大黄的药效上的差异需要更进一步研究。此外,研究未能全部定性在基峰离子流图中一些响应较好的峰,其化学成分还有待进一步挖掘。

UPLC-ESI-HRMSⁿ技术结合了UPLC良好的分离效果和ESI-HRMSⁿ高灵敏度、高分辨率的特点,可提供丰富的质谱信息,尤其适用于对照品缺乏的传统中药及民族药化学成分的筛查及新化合物的发掘。该技术灵敏度高、稳定性强,在快速鉴定天然药物化学成分方面有的独特优势。本实验采用UPLC-ESI-HRMSⁿ技术对藏药塔黄的化学成分进行了快速定性分析,为传统中药及民族药的化学成分分析提供了一种快速检测的新方法。同时也为塔黄的药效物质基础的阐明及质量控制提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [3] Yang D Z, Sun G, Zhang A H, *et al.* Screening and analyzing the potential bioactive components from rhubarb, using multivariate data processing approach and ultra-high performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. *AnalMethods*, 2015, 7(2): 650-661.
- [4] Fei Y, Wang J, Peng B, *et al.* Phenolic constituents from *Rheum nobile* and their antioxidant activity [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(24): 2842-2849.
- [5] Bao Y T, Qu Y, Li J H, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of the flowers and leaves from *Paeonia rockii* and identification of their antioxidant constituents by UHPLC-ESI-HRMSⁿ via pre-column DPPH reaction [J]. *Molecules*, 2018, 62(39): 9387-9400.
- [6] 施天一, 廖志新, 叶 润, 等. 塔黄的化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(6): 571-573.
- [7] 陈俊可, 曾 锐. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 的代谢组学技术对粗茎秦艽不同部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2328-2335.
- [8] 徐 燕, 李爱暖, 王 玥, 等. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 评价不同干燥方式对粗茎秦艽中环烯醚萜类及黄酮类成分的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 819-825.
- [9] 董红娇, 陈晓虎, 曾 锐. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析民族药小大黄的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2428-2435.
- [10] 王长生, 董红娇, 包雅婷, 等. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3175-3180.
- [11] 周秀娟, 李燕芳, 陈 莹, 等. 基于 UPLC-Q Exactive 四级杆-轨道阱液质联用法快速建立清热灵颗粒中潜在中药质量标志物 (Q-Marker) 成分库 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 67-74.
- [12] Han J, Ye M, Xu M, *et al.* Comparison of phenolic compounds of rhubarbs in the section deserticola with *Rheum palmatum* by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ [J]. *Planta Med*, 2008, 74(8): 873-879.
- [13] 王 晴, 卢志威, 刘月红, 等. UPLC-Q-TOF/MS. E 结合诊断离子过滤方法快速分析大黄中酚类成分 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1922-1931.
- [14] Yan Y, Zhang Q, Feng F. HPLC-TOF-MS and HPLC-MS/MS combined with multivariate analysis for the characterization and discrimination of phenolic profiles in nonfumigated and sulfur-fumigated rhubarb [J]. *J Separ Sci*, 2016, 39(14): 2667-2677.
- [15] 许维桐, 霍志鹏, 雷 磊, 等. HPLC-IT-TOF/MS 分析地榆水煎液的化学成分群 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1277-1288.
- [16] Gao L L, Guo T, Xu X D, *et al.* Rapid identification and simultaneous analysis of multiple constituents from *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by UPLC/Q-TOF-MS [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(13): 1529-1535.
- [17] 董松林, 张 勇, 李彩霞, 等. 大黄属植物研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2011, 30(2): 20-23.