

• 药材与资源 •

芦荟药材化学成分鉴定及 UPLC 指纹图谱分析

陈彤彤¹, 于 猛², 李凤霞¹, 秦玲玲², 贾红梅², 马百平^{3*}, 邹忠梅^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

3. 军事科学院军事医学研究院 辐射医学研究所, 北京 100850

摘要: 目的 鉴定芦荟中的主要化学成分, 建立 UPLC 特征指纹图谱, 对市售 15 批次芦荟药材的质量进行评价。方法 应用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 采集芦荟色谱质谱数据, 并进行定性分析; UPLC 色谱条件为: Waters CORTECS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 柱温 40 °C, 检测波长 295 nm, 乙腈 (0.1%甲酸)-水 (0.1%甲酸) 为流动相, 体积流量 0.3 mL/min, 梯度洗脱; Q-TOF/MS 条件为采用 ESI 离子源, 负离子扫描模式, 毛细管电压 2.3 kV, 离子源温度 100 °C; 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》软件建立 15 批市售芦荟药材的 UPLC 特征指纹图谱。结果 从芦荟药材中共鉴定 34 个化学成分, 主要包括蒽醌类成分 10 个、蒽醌类成分 1 个、色酮类成分 16 个、吡喃酮类成分 5 个、其他类成分 2 个; 建立的 UPLC 指纹图谱精密度、稳定性、重复性良好, 能够满足《中国药典》2020 年版规定的指纹图谱要求, 15 批芦荟样品的指纹图谱相似度计算结果在 0.867~0.986; 对 18 个共有峰中的 14 个进行了结构指认, 以共有峰峰面积为变量的主成分分析和聚类分析可明确对市售芦荟药材的基原进行分类。结论 所建立的 UPLC-Q-TOF/MS 方法可快速识别中药芦荟中的主要化学成分; 建立的 UPLC 指纹图谱方法稳定可靠、专属性强, 可为芦荟的质量评价提供参考; 指纹图谱中的共有峰芦荟苷 A、芦荟苷 B、芦荟宁 B、芦荟糖苷 A、芦荟糖苷 B 还可用于区分芦荟药材的植物基原。

关键词: 芦荟; UPLC-Q-TOF/MS; 定性分析; 指纹图谱; 芦荟苷 A; 芦荟苷 B; 芦荟宁 B; 芦荟糖苷 A; 芦荟糖苷 B

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)08-2470-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.024

Chemical profile of herbal medicine aloe by UPLC-Q-TOF/MS and its UPLC fingerprinting

CHEN Tong-tong¹, YU Meng², LI Feng-xia¹, QIN Ling-ling², JIA Hong-mei², MA Bai-ping³, ZOU Zhong-mei²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. The Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Objective To identify the major chemical constituents of *Aloe* raw herb and establish UPLC characteristic fingerprinting of *Aloe* (15 batches) for evaluation its quality. **Methods** An ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was applied in this study. The UPLC method was performed on a Waters CORTECS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) column with 40 °C at 295 nm, and gradient elution with acetonitrile (0.1% formic acid) - water (0.1% formic acid) was used at the flow rate of 0.3 mL/min. The Q-TOF/MS method was as follows: electrospray ionization (ESI) source under negative ion scan mode; capillary voltage, 2.3 kV; source temperature, 100 °C. The software of similarity calculation for traditional Chinese medicines fingerprints (version 2012) was used to establish the characteristic fingerprinting of *Aloe* (15 batches). **Results** A total of 34 compounds were identified from *Aloe* raw herb, including 10 anthrones, 1 anthraquinone, 16 chromones, 5 pyrones and 2 other compounds. The established UPLC fingerprinting had good precision, stability, and repeatability, which can meet the demand of the *Chinese Pharmacopoeia*. The similarities of *Aloe* raw herb from 15 batches were

收稿日期: 2021-08-09

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2019ZX09735002)

作者简介: 陈彤彤 (1996—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药分析及质量控制。E-mail: chentongtong11@163.com

*通信作者: 邹忠梅, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (010)57833290 E-mail: zmzou@implad.ac.cn

马百平, 研究员, 研究方向为天然药物化学。Tel: (010)66930265 E-mail: mabaiping@sina.com

between 0.867 and 0.986. Meanwhile, 14 of 18 common peaks were identified by UPLC-Q-TOF/MS. Principal component analysis (PCA) and cluster analysis can clearly classify the original plant of *Aloe vera* using common peak area as the variable. **Conclusion** The established method of UPLC fingerprinting is stable, reliable, and specific, and the major components of *Aloe* raw herb can be quickly identified by the UPLC-Q-TOF/MS method. The combined method of UPLC fingerprinting and qualitative analysis by UPLC-Q-TOF/MS can provide more information for the quality evaluation of *Aloe* raw herb. Among the common peaks in the fingerprinting, aloin A, aloin B, aloenin B, aloinoside A and aloinoside B can be used to differentiate the origin plants of *Aloe*.

Key words: *Aloe*; UPLC-Q-TOF/MS; qualitative analysis; fingerprinting; aloin A; aloin B; aloenin B; aloinoside A; aloinoside B

芦荟为百合科植物库拉索芦荟 *Aloe barbadensis* Miller、好望角芦荟 *Aloe ferox* Miller 或其他同属近缘植物叶的汁液浓缩干燥物^[1]。具有泻下通便、清肝泻火、杀虫疗疳等功效。目前,国内已有复方芦荟片、新复方芦荟胶囊等含芦荟的药品上市,主要用于调节肠胃功能不和、改善便秘等病症。芦荟中主要含有蒽酮类、蒽醌类、色酮类、吡喃酮类、萜类衍生物等多种成分,其中芦荟苷 A 的相对含量较高,且具有泻下^[2]、抗菌^[3]、抗炎^[4]、抗肿瘤^[5]等多种药理活性,因此《中国药典》2020 年版选择其作为中药芦荟的质量控制指标。但芦荟中化学成分类型多样,基原、产地、加工工艺不同均可能影响芦荟药材质量。仅以单一成分作为指标性成分,不足以全面、完整地反映芦荟药材的质量。虽然已有学者建立了中药芦荟多指标成分的含量测定方法^[6-7],但仅限于蒽醌类成分,且测定成分种类较少,尚不能全面控制芦荟的质量。

中药指纹图谱是基于中药化学成分系统研究基础上建立起来的一种分析方法,可直观地从整体上反映中药中复杂成分的特征性,并提供相似性分析,进而开展其质量评价。已广泛应用于中药材的真伪鉴别、一致性评价研究等方面,特别适用于中药多组分复杂体系的质量评价研究。该方法已被收录到《中国药典》2020 年版成为中药整体评价的重要手段之一,并成功应用于天麻^[8]、石斛^[9]等多种中药材的质量控制中。因此,本实验首先应用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对中药芦荟中的化学成分进行全面、系统的表征,然后建立中药芦荟 UPLC 指纹图谱方法,并对不同产地芦荟药材进行研究,以期为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 试剂及材料

质谱级甲醇、乙腈(德国 Merck 公司),质谱级甲酸(美国 Fisher 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

对照品芦荟苷 B (aloin B, 批号 P03410S84824,

质量分数 99.1%)、芦荟苦素 (aloesin, 批号 R01J11F114669, 质量分数 98.4%)、芦荟新苷 D (aloesin D, 批号 Z22J10X91751, 质量分数 98.2%)、7-O-甲基芦荟新苷 A (7-O-methylaloesin A, 批号 P26O10S101346, 质量分数 99.9%) 均购自上海源叶生物科技有限公司,芦荟苷 A (aloin A, 批号 SCI-NCL000081-NX-1, HPLC 测定质量分数 ≥ 98%)、芦荟大黄素 (aloe-emodin, 批号 SCI-NCL001575-NX-1, 质量分数 ≥ 98%) 由国家中药化合物库提供;15 批市售芦荟药材(表 1),经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为库拉索芦荟 *A. barbadensis* Miller (S1、S2、S4、S5、S7、S12、S14、S15) 和好望角芦荟 *A. ferox* Miller (S3、S6、S8~S11、S13)。

1.2 仪器

ACQUITY™ UPLC® 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);SYNAPT G2 HDMS 高分辨质谱联用系统(美国 Waters 公司);MSA125P-100-DU 型电子分析天平(德国 SARTORIUS 公司);KQ-500E 型超声振荡仪(昆山市超声仪器有限公司);MassLynx™ 工作站(美国 Waters 公司, Version 4.1)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 精密称取各批次芦荟药材粉(过五号筛)约 100 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入 50%甲醇定容至刻度,超声辅助溶解,放置至室温后,加 50%甲醇补足溶剂至刻度,摇匀,于 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液,稀释 5 倍,得各批次中药芦荟 2 mg/mL 的供试品溶液,过 0.2 μm 微孔滤膜,待测。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取芦荟苦素、芦荟宁、芦荟苷 A、芦荟苷 B、芦荟新苷 D、7-O-甲基芦荟新苷 A、芦荟大黄素对照品各约 1 mg,分别置于 1 mL 量瓶中,加入甲醇定容至刻度,得质量浓度约为 1 mg/mL 的对照品溶液储备液。

表 1 15 批芦荟药材来源信息

Table 1 Information of 15 batches of *Aloe* raw herb

序号	批号	收集地	产地	性状
S1	20201122002	亳州神农谷中药材商品交易中心	缅甸	褐绿色、断面粗糙、无光泽
S2	20201122003	亳州神农谷中药材商品交易中心	非洲	黄棕色、断面粗糙、无光泽
S3	20201122004	亳州神农谷中药材商品交易中心	非洲	褐绿色、断面光滑、有光泽
S4	20201122005	亳州神农谷中药材商品交易中心	印度	褐绿色、断面粗糙、无光泽
S5	20201122006	亳州神农谷中药材商品交易中心	缅甸	红褐色、断面粗糙、无光泽
S6	20201122008	亳州神农谷中药材商品交易中心	缅甸	褐绿色、断面光滑、有光泽
S7	20201122011	亳州康美中药材市场	库拉索岛	深褐色、断面粗糙、无光泽
S8	20201122012	亳州神农谷中药材商品交易中心	埃塞俄比亚	黄褐色、断面光滑、有光泽
S9	20201122013	亳州康美中药材市场	印度尼西亚	黄褐色、断面光滑、有光泽
S10	20201122014	亳州康美中药材市场	苏丹	褐绿色、断面光滑、有光泽
S11	20201122017	亳州康美中药材市场	印度尼西亚	褐绿色、断面光滑、有光泽
S12	20201122018	亳州康美中药材市场	库拉索岛	褐绿色、断面粗糙、无光泽
S13	20201122019	亳州康美中药材市场	好望角岛	深褐色、断面光滑、有光泽
S14	20201122021	安国市冷背药材有限公司	未知	褐绿色、断面粗糙、无光泽
S15	20200623022	北京同仁堂	未知	褐绿色、断面粗糙、无光泽

2.2 色谱及质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters CORTECS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱, 洗脱程序为 0~0.5 min, 7.0%~10.0% B; 0.5~5.0 min, 10.0%~15.0% B; 5.0~15.0 min, 15.0%~18.5% B; 15.0~15.5 min, 18.5%~20.0% B; 15.5~30.0 min, 20.0%~35.0% B; 30.0~31.0 min, 35.0%~50.0% B; 31.0~31.5 min, 50.0%~99.0% B; 31.5~34 min, 99.0% B; 柱温 40 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 3 μL; 检测波长 295 nm。

2.2.2 质谱条件 采用 Waters SYNAPT G2 HDMS 系统, 氮气作为质谱 ESI 离子源的雾化、锥孔气; 电喷雾电离: 负离子模式; 毛细管电压 2.3 kV; 锥孔电压 40 V; 萃取锥孔电压 3 V; 离子源温度 100 °C; 脱溶剂气温度: 400 °C; 反向锥孔气流 50

L/h; 脱溶剂气体积流量 600 L/h; 碰撞气体积流量 0.5 mL/min; 扫描时间 1.0 s; 扫描时间间隔 0.02 s; 质荷比范围 50~1200; 数据采集形式: continuum; 灵敏性: normal; 动态范围: extended; 采用亮氨酸-脑啡肽进行精确质量校正 (锁定质量数: 554.261 5)。

3 结果与分析

3.1 芦荟 UPLC-Q-TOF/MS 定性分析

应用 UPLC-Q-TOF/MS 分析方法, 按“2.2.1”和“2.2.2”项下色谱质谱条件, 对“2.1.1”项下供试品溶液进行检测, 得到 15 批芦荟药材负离子模式下的质谱基峰图, 以 S15 为例 (图 1), 依据其色谱峰的保留行为、紫外特征吸收光谱、精确分子量和 MS^F 碎片信息, 并与对照品及文献比对, 共鉴定 34 个化学成分 (表 2), 其中包括蒽酮类 10 个、蒽醌类 1 个、色酮类 16 个、吡喃酮类 5 个、其他类化合物 2 个。

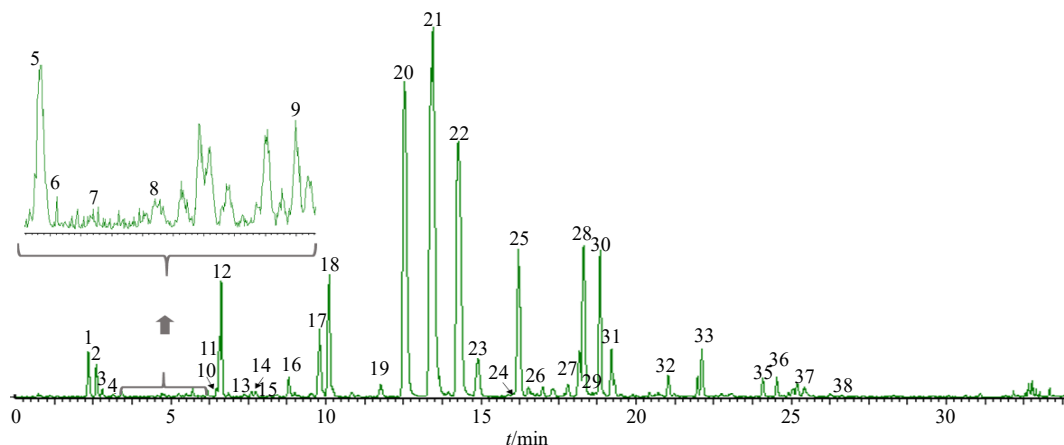


图 1 芦荟 (S15) 的 UPLC-Q-TOF/MS 基峰图

Fig. 1 UPLC-Q-TOF/MS BPI of *Aloe* raw herb (S15)

表 2 芦荟 UPLC-Q-TOF/MS 成分鉴定结果

Table 2 Major constituents in Aloe raw herb identified by UPLC-Q-TOF/MS

序号	t_R /min	化合物名称	分子式	加合离子	实测质量数 (m/z)	误差/($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	λ_{max}/nm	文献
1	2.32	芦荟苦素*	C ₁₉ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	393.122 3	9.41	273.073 9, 245.083 2, 202.060 1 1 173.058 1	252, 297	10
2	2.59	(2 <i>R</i>)-8- <i>C</i> -glucosylaloesol	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	[M-H] ⁻	395.134 4	0.05	351.113 1, 275.093 4, 231.068 3	251, 295	11
3	2.77	8- <i>C</i> -glucosyl-7- <i>O</i> -(<i>S</i>)-methylaloesol	C ₂₀ H ₂₆ O ₉	[M+HCOO] ⁻	455.158 1	6.15	365.123 0, 333.099 2, 275.089 1 1 243.065 2	252, 296	11
4	3.12	7- <i>O</i> -甲基芦荟新苷	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	[M-H] ⁻	407.135 6	3.44	347.108 6, 275.096 4, 243.056 2	297	12
5	3.43	异芦荟宁	C ₂₀ H ₂₆ O ₉	[M-H] ⁻	409.115 1	5.13	247.060 1	252, 296	13
6	3.48	10- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosyl aloenin	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	395.139 0	2.98	409.117 0, 247.061 4, 171.042 2	292	14
7	3.80	iso-8- <i>C</i> -glucosyl-7- <i>O</i> -(<i>S</i>)-methylaloesol	C ₂₀ H ₂₆ O ₉	[M+HCOO] ⁻	455.158 1	6.15	365.123 0	291	11
8	4.33	芦荟新苷 C	C ₃₄ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	701.204 3	-5.56	461.145 8, 367.104 6, 299.093 4	228, 308	15
9	5.47	8- <i>C</i> -glucosyl-(<i>S</i>)-aloesol	C ₁₉ H ₂₄ O ₉	[M-H] ⁻	395.130 3	-9.87	351.109 2, 275.089 1, 231.065 9	294	11
10	6.45	10-羟基芦荟苷 B	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	433.114 7	-2.77	270.050 6, 193.050 7	295	10
11	6.54	芦荟宁*	C ₁₉ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	409.115 1	3.91	247.060 1, 171.045 0	296	16
12	6.58	aloveroside A	C ₃₀ H ₄₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	671.220 0	1.94	525.163 0, 273.079 3, 185.061, 9 161.045 3	225, 297	11
13	7.52	未鉴定	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	541.171 6	1.10	395.133 2, 247.060 4, 163.038 4	218, 300	
14	7.74	10-羟基芦荟苷 A	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	433.114 7	2.77	270.050 6, 193.050 7	300, 363	10
15	8.37	芦荟新苷 A	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	540.163 2	2.99	375.111 0, 299.093 4, 257.079 1	301	16
16	8.74	8-(α- <i>L</i> -rhamnopyranosyloxy)-3-(β- <i>D</i> -xylopyranosyl oxymethyl) naphthalenol	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	509.170 0	8.05	363.106 7, 213.054 3, 163.040 7	224, 299	16
17	9.79	rabaichromone	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	571.183 0	2.45	527.151 6, 247.061 4, 179.036, 1 161.023 1, 135.044 9	229, 298	17
18	10.11	芦荟宁 B	C ₃₄ H ₃₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	717.199 2	-5.44	555.150 2, 409.117 0, 247.061 4	309	11
19	11.77	4'- <i>O</i> -glucosyl-isoaloesin DI	C ₃₅ H ₄₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	717.246 1	-9.20	579.174 4, 433.114 7, 297.081 0	296	14
20	12.52	芦荟苷 B*	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.117 8	-1.92	297.073 5, 239.074 6, 145.028 2	296, 354	18
21	13.47	芦荟新苷 D*	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	555.181 2	-9.73	511.159 5, 417.117 8, 363.106, 7 297.073 5, 213.054 3	228, 300	19
22	14.27	芦荟苷 A*	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	417.117 8	-1.92	297.073 5, 251.069 3, 239.073, 5 225.055 3, 221.059 7	296, 354	20
23	14.90	7- <i>O</i> -甲基芦荟新苷 A*	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	553.171 1	0.18	407.135 6, 189.056 3	222, 300	12
24	15.92	异芦荟新苷 D	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	555.181 2	-9.73	511.159 5, 417.117 8, 363.106, 7 297.073 5, 213.054 3	228, 300	21
25	16.13	芦荟糖苷 B	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	563.174 5	-3.55	443.136 7, 297.082 2	296, 355	20
26	16.53	homonataloin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.096 4	-3.54	417.117 8, 311.052 6	300	21
27	17.81	iso-homonataloin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.096 4	-3.54	417.117 8, 311.052 6	300	21
28	18.31	芦荟糖苷 A	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	563.174 6	-3.55	443.136 7, 297.082 2	296, 355	22
29	18.44	未鉴定	C ₃₉ H ₄₂ O ₁₉	[M-H] ⁻	813.224 5	0.40	627.208 9, 443.132 6, 295.058 7	219, 300	
30	18.85	aloenin-2"- <i>p</i> -coumaroyl ester	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	555.150 2	-0.18	307.080 5, 247.061 4, 171.047, 9 145.028 2	225, 310	23
31	19.21	芦荟新苷 G	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	537.183 5	-1.30	443.145 9, 297.074 6	259, 310	11
32	21.11	deacetyl littoraloin	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	533.170 5	8.63	443.132 5	300	24
33	21.97	未鉴定	C ₃₃ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	651.171 9	0.80	343.081 0, 299.091 6	265, 308	
34	22.93	未鉴定	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	615.208 7	1.50	525.178 8, 339.086 9, 279.065 4	221, 299	
35	24.05	microdantin B	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	563.153 7	-2.84	515.117 0, 443.132 0, 311.052, 6 297.073 5, 255.065 7	218, 300	25
36	24.54	microdantin A	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₁	[M-H] ⁻	563.153 7	-2.84	443.113 6, 297.073 5, 279.068, 7 163.040 7, 145.028 2	218, 300	27
37	25.41	芦荟大黄素*	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.044 2	-2.97	241.089 6, 231.099 2, 162.839 5	254	26
38	26.10	(<i>E</i>)-2-acetonyl-8-(2'- <i>O</i> -caffeoyl)-β- <i>D</i> -glucopyranosyl-7-methoxy-5-methylchromone	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	569.165 2	-1.23	391.102 1, 297.081 0, 247.061 4	221, 306	27

“*” 为与对照品比对

“*” is compared with the reference substance

3.2 主要化学成分质谱裂解规律

3.2.1 蒽酮类成分的鉴定 芦荟蒽酮类成分结构以 1,8-二羟基-3-羟甲基-9-蒽酮为基本母核, 10-位多为葡萄糖取代形成碳苷, 紫外最大吸收波长在 295 nm 和 355 nm。在 ESI-MS 负离子扫描模式下, 通常准分子离子峰 $[M-H]^-$ 可丢失 1 分子葡萄糖产生 $[M-H-162]^-$ 碎片离子, 或糖取代部分 1'C/O 和 2'C/3'C 之间断裂失去碎片 $C_4H_8O_4$ 形成 $[M-H-120]^-$ 的碎片离子, 此为碳苷类化合物的特征裂解规律。而 1,8-二羟基-3-羟甲基-9-蒽酮母核结构碎片离子为 m/z 297。

以芦荟糖苷 B (25) 和芦荟糖苷 A (28) 为例, 推导蒽酮类化学成分结构, 在负离子模式下, 保留时间为 16.13 min 及 18.31 min 的 2 个色谱峰, 准分

子离子峰相同, 均为 m/z 563.174 5 $[M-H]^-$ ($C_{27}H_{32}O_{13}$), 推测二者互为同分异构体。在二级质谱中, 其丰度较大的碎片离子也相同, 为 m/z 443 和 m/z 297, 其中 m/z 443 为糖苷取代部分特征性断裂形成的 $[M-H-120]^-$ 碎片离子, 接着失去 1 分子鼠李糖 ($C_6H_{10}O_4$, m/z 146) 形成碎片离子 m/z 297。在紫外光谱中, 2 色谱峰在 296、355 nm 处均有吸收峰, 与蒽酮类化合物特征吸收波长相符。通过与文献数据^[20, 22]比较, 初步推断为芦荟苷 A 和芦荟苷 B, 根据其 3D 化学结构, 前者为 *R* 构型, 其极性小于 *S* 构型的后者, 故本研究暂推测保留时间靠前的为芦荟糖苷 B (25)、后者为芦荟糖苷 A (28), 后期需要采用对照品进行比对验证。二者可能的质谱裂解规律如图 2 所示。

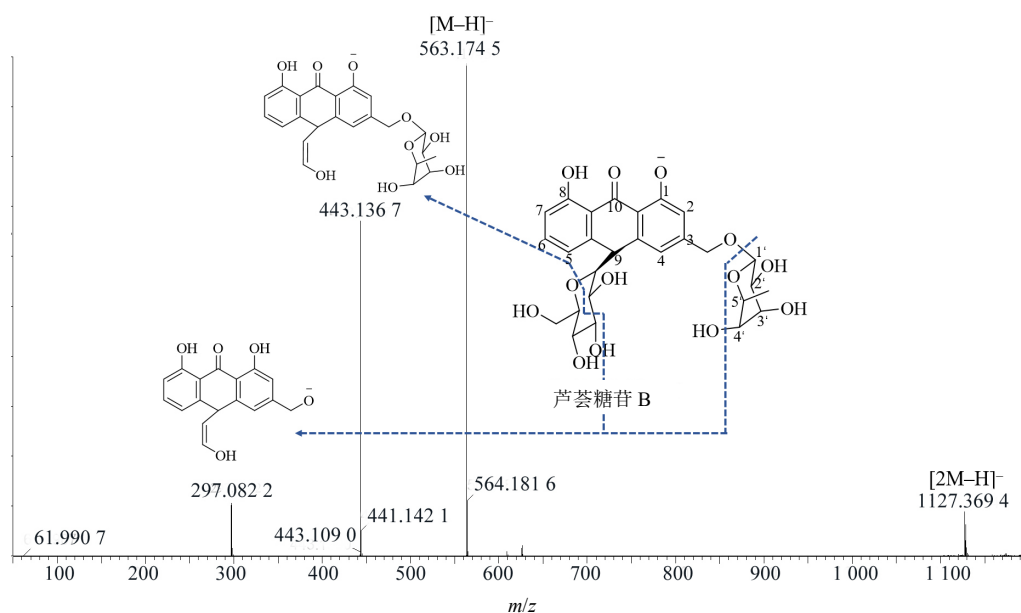


图 2 芦荟糖苷 B 的 ESI-MS 图及裂解途径

Fig. 2 ESI-MS and proposed fragmentation pathway of aloinoside B in negative ion mode

3.2.2 色酮类成分的鉴定 芦荟中的色酮类化学成分主要是以 5-甲基色酮或其 8-位取代糖苷为母核结构的一类化合物, 最大紫外吸收波长在 225、252、297 nm 处。如保留时间为 14.90 min 的 7-*O*-甲基芦荟新苷 A (23), 在负离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 553.171 1 $[M-H]^-$ ($C_{29}H_{30}O_{11}$), 在二级质谱中, 其丰度较大的碎片离子有 m/z 407 和 m/z 189。其中 m/z 407 为脱去香豆酰基 ($C_9H_6O_2$) 形成 $[M-H-146]^-$ 碎片离子, 继而丢失 1 分子葡萄糖、7 位取代部分丢失 CH_2 、2 位取代部分羰基 α 键断裂产生自由离子与邻位吡喃酮双键重排产生新共轭, 最终形成 $[M-H-C_9H_6O_2-218]^-$ (m/z 189.056 3) 碎片

离子峰。在紫外光谱中, 该色谱峰在 222 nm 和 300 nm 处有吸收峰。通过与文献数据^[12]比对, 初步推断为 7-*O*-甲基芦荟新苷 A, 最后通过与对照品比对, 确定该化合物为 7-*O*-甲基芦荟新苷 A, 其可能的质谱裂解规律如图 3 所示。

3.2.3 吡喃酮类成分的鉴定 吡喃酮类成分为 6-苯基吡喃酮类衍生物, 在 ESI-MS 负离子扫描模式下, 形成母核特征碎片离子峰 m/z 247, 最大紫外吸收波长在 300 nm 处左右。如芦荟宁 B (18), 保留时间为 10.11 min, 在负离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 717.199 2 $[M-H]^-$ ($C_{34}H_{38}O_{17}$), 在二级质谱中, 其主要碎片离子有 m/z 555、409、247。

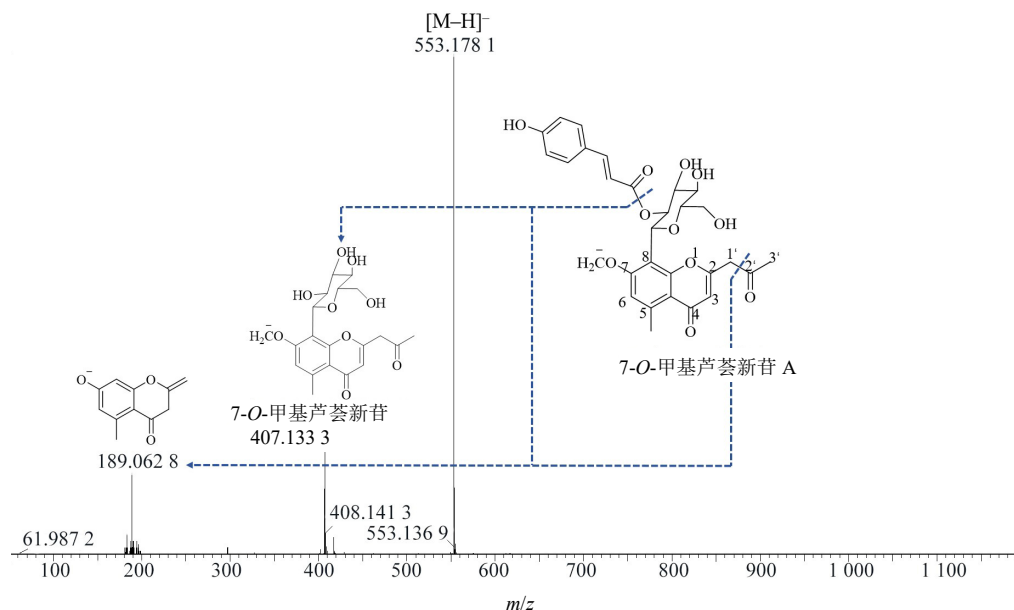


图 3 7-O-甲基芦荟新苷 A 的 ESI-MS 图及裂解途径

Fig. 3 ESI-MS and proposed fragmentation pathway of 7-O-methylaloesin A in negative ion mode

其中 m/z 555 是由准分子离子峰 $[M-H]^-$ 中性丢失 1 分子葡萄糖所产生的碎片离子，继续脱去香豆酰基 ($C_9H_6O_2$, m/z 146) 形成 m/z 409 特征碎片离子，再次脱去 1 分子葡萄糖就产生吡喃酮类化合

物特征碎片离子峰 m/z 247。在紫外光谱中，该色谱峰在 309 nm 处有吸收峰。通过与文献数据^[11]比较，推断为芦荟宁 B，其可能的质谱裂解规律如图 4 所示。

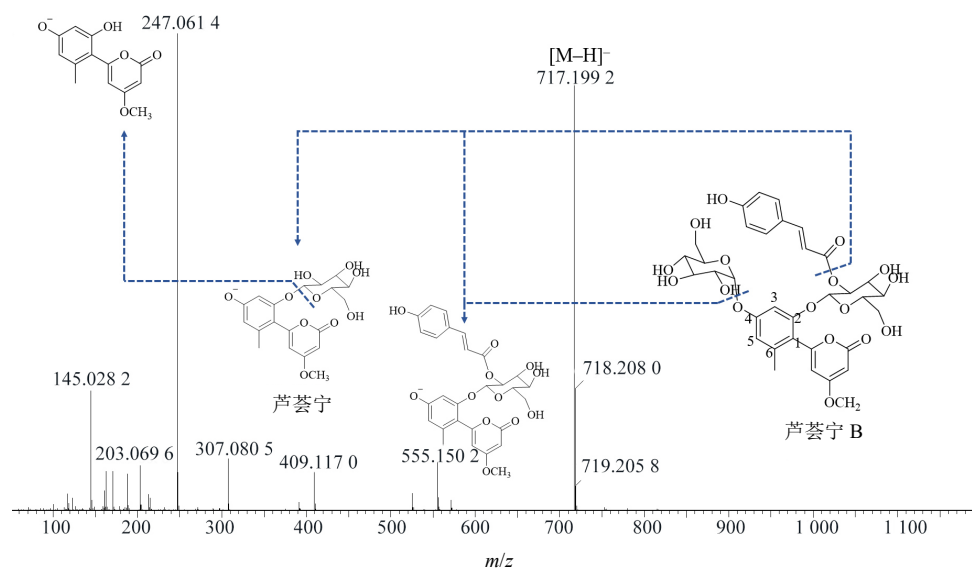


图 4 芦荟宁 B 的 ESI-MS 图及其裂解途径

Fig. 4 ESI-MS and proposed fragmentation pathway of aloenin B in negative ion mode

3.3 市售芦荟药材指纹图谱的建立

3.3.1 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下供试品溶液 S15，按“2.2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录各共有峰的保留时间和峰面积，以峰 8 作为参照峰 (S)，计算其他共有峰与参照峰的相对保留时间 (t_R) 和相对峰面积 (RPA) 的 RSD，结

果 t_R 的 $RSD \leq 0.08\%$ ，RPA 的 $RSD \leq 2.85\%$ ，表明仪器精密度良好。

3.3.2 重复性试验 精密称定 S15 芦荟粉末约 100 mg，按“2.1.1”项下方法平行配制 6 份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件，进样分析，同上述精密度方法对结果进行处理，结果 t_R 的

RSD≤0.03%, RPA 的 RSD≤2.33%。

3.3.3 稳定性试验 分别于 0、2、4、8、12、16、24 h 精密吸取“2.1.1”项下 S15 供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,进样分析,同上述精密度方法对结果进行处理,结果 t_R 的 RSD≤0.88%, RPA 的 RSD≤2.59%。

3.3.4 市售芦荟药材指纹图谱及对照图谱的建立 按“2.1.1”项下方法配制供试品溶液 S1~S15,按“2.2.1”项下色谱条件进行 UPLC 分析,将所得色谱数据以 AIA 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)》(国家药典委员会),得到 15 批市售芦荟药材指纹图谱(图 5-B)。设定 S15 号图谱为参照图谱,采用多点校正后进行自动全谱峰匹配,设定时间窗宽度为 0.1 min,以中位数法生成 18 个共有峰模式的对照指纹图谱(图 5-A)。结合 UPLC-Q-TOF/MS 定性分析结果,比对色谱峰的保留行为、紫外吸收特征等信息,对 18 个共有峰中的 14 个进行指认。

3.3.5 15 批市售芦荟药材指纹图谱相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)》对已导入的 15 批中药芦荟 UPLC 色谱数据进行指纹图谱相似度评价,计算结果在 0.868~0.986,除 S8 和 S12 号样品外,其余样品均大于 0.90,见表 3。

3.4 聚类分析

以市售芦荟药材 UPLC 指纹图谱中 18 个共有峰为指标,峰面积为变量,建立数据集并导入到 SIMCA (13.0 版本)软件进行主成分分析(principal component

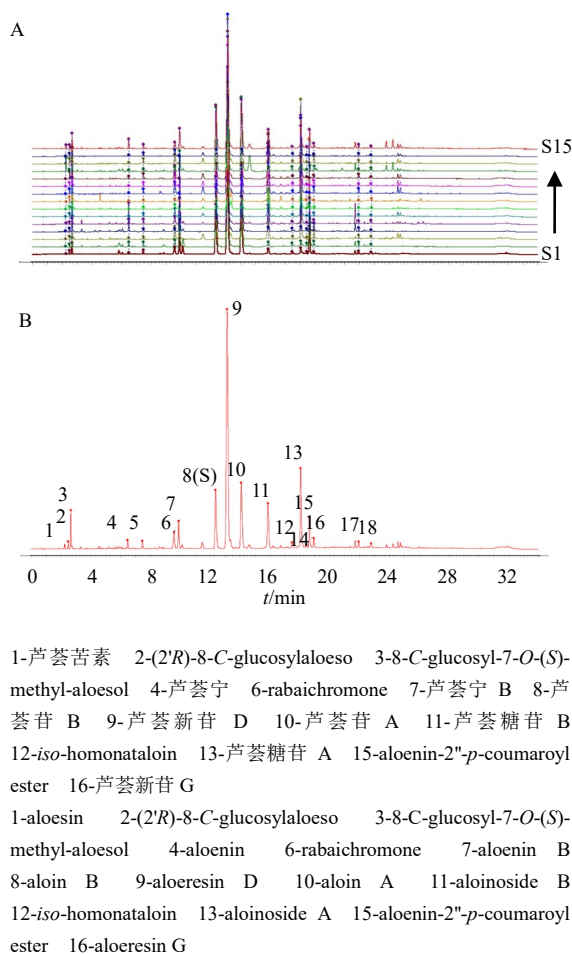


图 5 15 批市售芦荟药材 UPLC 对照指纹图谱 (A) 和指纹图谱 (B)

Fig. 5 UPLC fingerprinting of 15 batches of *Aloe* raw herb (A) and reference fingerprinting of *Aloe* raw herb (B)

表 3 15 批中药芦荟 UPLC 指纹图谱相似度评价

Table 3 Similarity of 15 batches *Aloe* raw herb in UPLC fingerprinting

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.922	S6	0.973	S11	0.978
S2	0.922	S7	0.975	S12	0.868
S3	0.984	S8	0.895	S13	0.977
S4	0.929	S9	0.973	S14	0.972
S5	0.957	S10	0.973	S15	0.986

analysis, PCA), 通过第 1、2 主成分代表样本的变量建立二维图谱,如图 6-A 所示,15 批芦荟药材在主成分 $t[1]$ 方向聚为 2 类。第 1 类样本包括 S1、S2、S4、S5、S12 和 S15,该类样品外观显示为断面粗糙无光泽,与库拉索芦荟的性状相符;第 2 类样本包括 S3、S6、S7、S8、S9、S10、S11、S13 和 S14,除 S7 和 S14 外,该类样品外观表现为断面均光滑且具光泽,

与好望角芦荟的性状描述相符。此外,本实验又将该数据集导入 IBM SPSS (23.0 版本)软件,进行系统聚类分析,以瓦尔德法、平方欧氏距离生成谱系图。结果如图 6-B 所示,15 批次市售芦荟药材聚类分析结果与主成分分析结果基本一致。

《中国药典》2020 年版规定库拉索芦荟中芦荟苷含量(不得少于 16.0%)高于好望角芦荟(不得

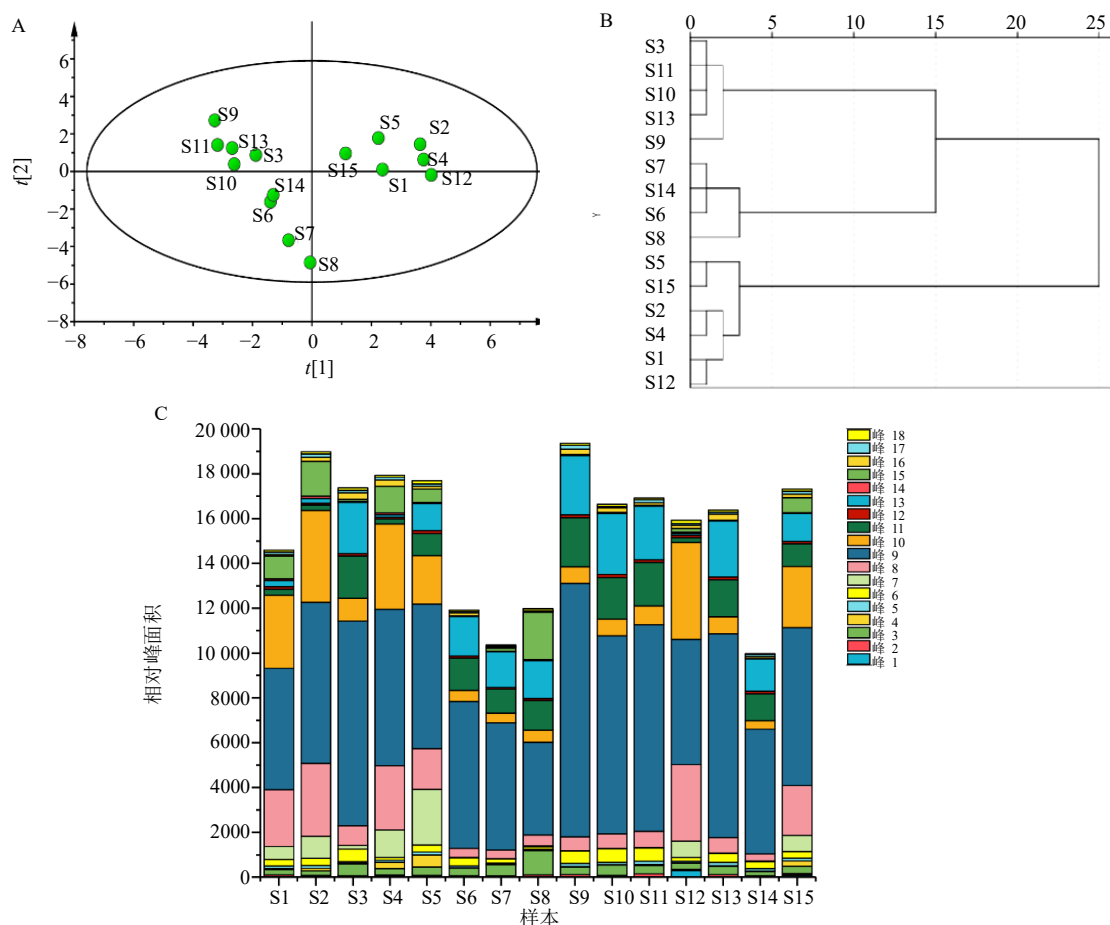


图 6 15 批中药芦荟主成分分析得分图 (A)、聚类分析谱系图 (B)、相对峰面积图 (C)

Fig. 6 PCA score plots (A), hierarchical cluster analysis (B), and relative peak area (C) of *Aloe* raw herb from 15 different batches

少于 6.0%)。主成分分析结果显示, 芦荟苷 A (峰 8)、芦荟苷 B (峰 10)、芦荟宁 B (峰 7)、芦荟糖苷 B (峰 11) 和芦荟糖苷 A (峰 13) (图 6-C) 等 5 个成分的相对峰面积在库拉索芦荟和好望角芦荟药材中具有明显的差异, 其中芦荟苷 A、芦荟苷 B、芦荟宁 B 在库拉索芦荟药材 (第 1 类) 中的相对峰面积较高, 它们的相对含量分别为 18.08%、14.39%和 0.91% (图 7-A), 而在好望角芦荟药材 (第 2 类) 中的含量较低, 分别为 4.17%、3.76%和 0.03%, 符合芦荟苷 (A 和 B) 药典规定标准; 芦荟糖苷 A 和芦荟糖苷 B 在好望角芦荟药材中的相对峰面积较高, 二者的相对含量分别为 13.76%和 10.58%, 而在库拉索芦荟药材中的含量较低, 分别为 3.36%和 2.85% (图 7-B)。因此, 除药典中规定的芦荟苷 (A 和 B) 外, 芦荟宁 B、芦荟糖苷 A 和芦荟糖苷 B 等 3 个成分也是区分芦荟基原植物的重要指标成分。

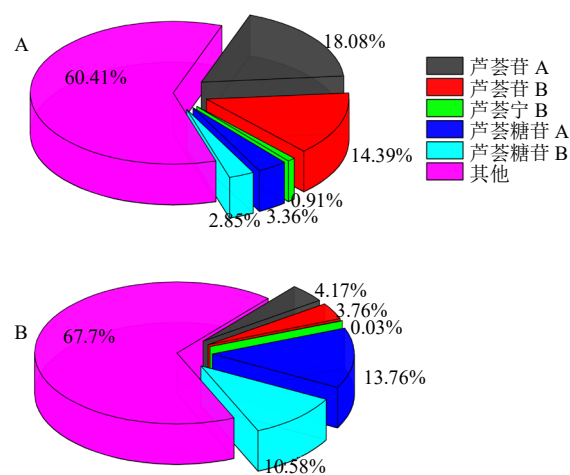


图 7 5 个主要成分在库拉索芦荟 (A) 和好望角芦荟 (B) 中的相对含量

Fig. 7 Relative content of five major constituents in *Aloe barbadensis* Miller (A) and *Aloe ferox* Miller (B)

4 讨论

本实验所建立的芦荟 UPLC 指纹图谱结合 UPLC-Q-TOF/MS 技术的定性分析方法,不仅可以从整体上反映来自不同产地的各批次中药芦荟药材化学成分特征及其主要成分的差异,还能对其色谱共有峰进行精准指认,能够满足中药复杂体系多成分分析要求,该方法稳定可靠、专属性强,可为后续中药芦荟的质量控制研究及指标成分的选择奠定科学基础。

本研究所收集的中药芦荟样品除 2 批来源未知外,其余均为进口药材,采用 UPLC 建立的指纹图谱相似性评价结果介于 0.867~0.986,提示 15 批芦荟药材具有一定的差异。聚类分析可将 15 批芦荟药材分为两类,即库拉索芦荟和好望角芦荟;本研究推测芦荟苷 A、芦荟苷 B、芦荟宁 B、芦荟糖苷 B 和芦荟糖苷 A 5 个成分是区分芦荟基原的重要指标成分。在 UPLC-Q-TOF/MS 定性分析芦荟主要化学成分的基础上,对指纹图谱中 18 个共有峰进行指认,鉴定了其中 14 个成分,尚有 4 个共有峰(峰 5、14、17、18)未鉴定,后续研究可通过制备色谱分离纯化后对其结构进行确定。此外,本研究所收集的芦荟药材样本批次有限,后续研究将会扩大芦荟药材样本量,特别是来源于国内不同产地、不同采集时间的样本对本研究所建立的方法进行验证,以期对中药芦荟的质量评价提供更为全面的参考依据。

本实验前期对数据采集的色谱条件进行了优化,主要包括 Waters BEH C₁₈、Waters HSS T3、Waters CORTECS T3、Agilent SB C₈ 等色谱柱,甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水(0.1%甲酸)、乙腈(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸)等不同流动相组成,柱温、洗脱程序等影响色谱分离的因素进行了考察;结果发现,色谱柱对芦荟主要成分的分离效果影响较大,特别是芦荟新苷 D(21)和芦荟苷 A(22)(图 1-A)在 Waters BEH C₁₈、Waters HSS T3 和 Agilent SB C₈ 中均很难达到基线分离,而 Waters CORTECS T3 色谱柱对二者具有很好的分离效果,因此本实验选择 Waters CORTECS T3 色谱柱进行后续分析。流动相组成的考察结果表明,甲醇-水、乙腈-水均可以实现中药芦荟中主要化学成分的分离,但乙腈-水组成可显著缩短洗脱时间;同时考察了流动相中加入甲酸的影响,发现流动相中加入甲酸与否对中药芦荟主要成分的分离影响不大,但考虑到加入甲酸可以提高质谱离子化的效果,因此本实验选择乙腈

(0.1%甲酸)-水(0.1%甲酸)作为流动相梯度洗脱条件。同时,根据芦荟 UPLC 图谱主要峰的紫外吸收光谱数据发现,蒽醌类化合物最大吸收波长为 256 nm,蒽酮类化合物的最大吸收波长为 295 nm 和 355 nm,色酮类为 297 nm,吡喃酮类为 300 nm,综合分析,选择 295 nm 作为检测波长,各类型化合物均具有良好的响应。

此外,本实验还对质谱条件,包括离子采集模式、毛细管电压、锥孔电压、去溶剂气温度等进行了优化,得到了中药芦荟的质谱采集条件。通过实验发现中药芦荟的主要化学成分在质谱负离子采集模式下的总离子流图较正离子的离子化效果更好,其响应强度也较高。因此,本实验仅提供了质谱负离子模式下的数据,并进行后续分析。从鉴定化合物的类型分析,发现以蒽酮类、色酮类及其衍生物为主,这与多酚类化合物在质谱负离子模式下具有良好的离子化效果相对应。虽然本实验采用的 Q-TOF 质谱具有高分辨率、高选择性等特点,在化合物结构鉴定时能够提供化合物的精确相对分子质量、MS^E 碎片离子等信息,但因中药中的化学成分多存在同分异构现象,因此,本实验选择了部分对照品对定性分析结果进行了验证,同时也根据质谱多级碎片离子信息,参照文献信息,对其可能的质谱裂解规律进行了推导,从而提供更加可靠的定性分析结果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 170.
- [2] 张春玲, 厉保秋, 尹洪银, 等. 芦荟制品中芦荟苷含量测定及通便作用研究 [J]. 食品与药品, 2008, 10(1): 25-28.
- [3] 田兵, 华跃进, 马小琼, 等. 芦荟抗菌作用与蒽醌化合物的关系 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1034-1037.
- [4] Ma Y F, Tang T, Sheng L L, *et al.* Aloin suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibiting JAK1-STAT1/3 activation and ROS production in RAW_{264.7} cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(4): 1925-1934.
- [5] Tao H, Tang T, Wang S N, *et al.* The molecular mechanisms of Aloin induce gastric cancer cells apoptosis by targeting High Mobility Group Box 1 [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 1221-1231.
- [6] 饶楠楠, 张强, 顾华, 等. 高效液相色谱同时测定芦荟中 8 种蒽醌类物质的含量 [J]. 分析试验室, 2018, 37(6): 720-725.

- [7] 陈欣霞, 张宇航, 林颖, 等. HPLC-DAD 和 LC-MS/MS 法对各种芦荟样品中蒽醌类成分的分析研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 817-821.
- [8] 李平, 郝敏, 苏联麟, 等. UPLC 指纹图谱结合多成分含量测定的天麻饮片质量研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5665-5671.
- [9] 刘刚, 俞年军, 韩荣春, 等. 不同生长年限霍山石斛高效液相指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1424-1429.
- [10] Lee S, Do S G, Kim S Y, *et al.* Mass spectrometry-based metabolite profiling and antioxidant activity of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) in different growth stages [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(45): 11222-11228.
- [11] Wu X F, Wan J Z, Luo B J, *et al.* A novel naphthalene derivative from *Aloe barbadensis* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2013, 48(5): 723-727.
- [12] Bisrat D, Dagne E, van Wyk B E, *et al.* Chromones and anthrones from *Aloe marlothii* and *Aloe rupestris* [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(8): 949-952.
- [13] Olennikov D N, Rokhin A V, Zilfikarov I N. Method for determining content of phenolic compounds in *Aloe arborescens* [J]. *Chem Nat Compd*, 2008, 44(6): 715-718.
- [14] Duri L, Morelli C F, Crippa S, *et al.* 6-phenylpyrones and 5-methylchromones from Kenya *Aloe* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(5): 520-522.
- [15] Speranza G, Gramatica P, Dadá G, *et al.* Aloeresin c, a bitter c, o-diglucoside from cape *Aloe* [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(7): 1571-1573.
- [16] Speranza G, Monti D, Crippa S, *et al.* Kenyaloside, a novel O, O, O-triglycosylated naphthalene derivative from the exudate of Kenyan *Aloe* species [J]. *Nat Prod Commun*, 2006, 1(12): 1085-1088.
- [17] Conner J M, Gray A I, Reynolds T, *et al.* Anthracene and chromone derivatives in the exudate of *Aloe rabaiensis* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(12): 3551-3553.
- [18] Megeressa M, Bisrat D, Mazumder A, *et al.* Structural elucidation of some antimicrobial constituents from the leaf latex of *Aloe trigonantha* L. C. Leach [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 1-7.
- [19] Lv L, Yang Q Y, Zhao Y, *et al.* BACE1 (beta-secretase) inhibitory chromone glycosides from *Aloe vera* and *Aloe nobilis* [J]. *Planta Med*, 2008, 74(5): 540-545.
- [20] Van Wyk B E, Van Rheede van Oudtshoorn M C, Smith G F. Geographical variation in the major compounds of *Aloe ferox* leaf exudate [J]. *Planta Med*, 1995, 61(3): 250-253.
- [21] Girma B, Bisrat D, Asres K. Antimalarial evaluation of the leaf latex of *Aloe citrina* and its major constituent [J]. *Anc Sci Life*, 2015, 34(3): 142-146.
- [22] Teka T, Kassahun H. Characterization and evaluation of antioxidant activity of *Aloe schelpei* Reynolds [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1003-1008.
- [23] Duri L, Morelli C F, Crippa S, *et al.* 6-phenylpyrones and 5-methylchromones from Kenya *Aloe* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(5): 520-522.
- [24] Webb G A, Karagianis G, Waterman P G. LC-NMR in dereplication and structure elucidation of herbal drugs [M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008.
- [25] Farah M H, Andersson R, Samuelsson G. Microdantin A and B: Two new aloin derivatives from *Aloe microdonta* [J]. *Planta Med*, 1992, 58(1): 88-93.
- [26] Maity T K, Mandal S C, Bhakta T, *et al.* Metabolism of 1, 8-dihydroxy 3-hydroxy methyl anthraquinone (*Aloe-emodin*) isolated from the leaves of *Cassia tora* in albino rats [J]. *Phytother Res*, 2001, 15(5): 459-460.
- [27] Cedric, W, Holzapfel, Ben-ErikVan Wyk, *et al.* Chromone and aloin derivatives from *Aloe broomii*, *A. africana* and *A. speciosa* [J]. *Phytochemistry*, 1997, 45(1): 97-102.

[责任编辑 时圣明]