

高效液相色谱-高分辨质谱法 鉴定拉萨大黄化学成分

孙玉明¹, 徐 蒙², 李文慧², 王 静², 张 华², 王玉林³

(1. 大连理工大学分析测试中心, 辽宁 大连 116024; 2. 大连理工大学化工学院, 辽宁 大连 116024;
3. 大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044)

摘要:建立了高效液相色谱-高分辨质谱法分析鉴定拉萨大黄化学成分。选用 Agilent Zorbax SB-C18 柱 (150 mm×4.6 mm×5 μm), 以乙腈和水为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min; 采用电喷雾离子源, 在正、负离子模式下对拉萨大黄提取物进行一级和多级全扫描质谱分析。综合分析化合物的色谱和质谱行为, 并结合对照品、文献和数据库等相关数据鉴定化合物。在负离子模式下, 鉴定出 63 种化合物; 正离子模式下, 鉴定出 54 种化合物。所检测到的化合物包括 22 种鞣质类、28 种芪类、6 种黄酮类、3 种苯丙酸类、2 种苯丁酮类和 2 种有机酸类, 其中有 53 种化合物为在该药材中首次发现, 且未发现蒽醌类成分。该方法快速、灵敏, 不仅提高了拉萨大黄复杂基质中微量化合物的鉴定效率, 同时实现了对拉萨大黄提取物中不同类型化合物的分析鉴别, 为进一步阐明拉萨大黄的药效物质基础及质控标准提供了科学依据。

关键词: 拉萨大黄; 高效液相色谱-高分辨质谱 (HPLC-HRMS); 鞣质类; 芪类; 苯丁酮类; 黄酮类; 苯丙酸类
中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2021)06-1100-13
doi: 10.7538/zpxb.2020.0121

Identification of Chemical Constituents of *Rheum Lhasa* A. J. Li et P. K. Hsiao by Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry

SUN Yu-ming¹, XU Meng², LI Wen-hui², WANG Jing², ZHANG Hua², WANG Yu-lin³

(1. Instrumental Analysis Center, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;
2. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;
3. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: A method of high performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS) was developed for the separation and identification of chemical components in *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao extract. The separation of compounds was carried out on an Agilent Zorbax SB-C18 column (150 mm×4.6 mm×5 μm). The mobile phase was composed with acetonitrile and water with the flow rate of 0.5 mL/min. Electrospray ionisation source (ESI) was used, and *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao extract was analyzed by MS and MSⁿ full scan at positive and negative ion modes. Through comprehensive analysis of the mass spectra

and chromatographic behaviors of the compounds, and comparing with the related data from standard substrates, literatures and database, the main chemical components of *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao extract were deduced and identified. A total of 63 compounds are identified from *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao extract at negative ion mode, and 54 compounds are identified at positive ionization mode. These compounds contain 22 tannins, 28 stilbenes, 6 flavonoids, 3 phenylpropanoids, 2 butyrophonones and 2 organic acids, which of 53 compounds are firstly discovered in *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao. And as reported in the literature, enquinones are not found. This method is fast and sensitive, which not only improves the identification efficiency of trace compounds in *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao complex matrix, but also achieves the analysis and identification of different types of compounds. It is helpful to provide scientific basis for further clarifying the material basis and quality control standards of *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao.

Key words: *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao; high performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS); tannins; stilbenes; butyrophonones; flavonoids; phenylpropanoids

大黄是中药发展中最古老、使用频率最高、最重要的草药之一。该药材不仅可以食用,还具有重要的经济价值^[1]。在全球范围内,大黄属植物共有 60 多种,我国有 41 种和 4 个变种,不同产地、品种、采收时节的不同,会造成大黄化学成分的不同,功效也有所差异^[2]。我国 2020 版药典中收录的大黄为蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L)、唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf)、药用大黄(*Rheum officinale* Baill)的干燥根和根茎。本研究的拉萨大黄(*Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao)为蓼科大黄属多年生高大草本植物,是藏族民间常用草药,名曲札。拉萨大黄的干燥根不仅具有治疗便秘、腹胀腹痛、消肿愈创、清热解毒、破积滞、行瘀血等功效^[3],还可以通过改善微循环和冠状动脉流量、降低血压、抑制血小板聚集和消除自由基来治疗高血脂症及心脑血管疾病^[4]。近期, Hu 等^[5]研究发现,拉萨大黄可以降低血液中冠状病毒,进而治疗病毒性肺炎。

拉萨大黄与一般大黄的化学成分有所不同, Liu 等^[6]研究发现其化学成分中含有 2 种白藜芦醇三聚体 rheumlhasol A 和 rheumlhasol B, 4 种白藜芦醇二聚体,而不含蒽醌类化合物。龚云麟等^[7]采用 UV、MS、¹H NMR、¹³C NMR 以及薄层色谱法分离并鉴定拉萨大黄乙醇提取物

中的去氧土大黄苷、曲札芪苷、虎杖苷、白藜芦醇、白皮杉醇和土大黄苷元-3'-O- β -D-葡萄糖苷等 6 种成分,其中芪类成分居多。目前,关于拉萨大黄化学成分分析的文献报道较少^[6-7],一般多采用分离、纯化、鉴定的方法,且仅检测到 12 种化合物,无法有效完成拉萨大黄的药材质量控制及药效物质基础研究。高效液相色谱-高分辨质谱(HPLC-HRMS)具有高分离效率、高选择性及高灵敏度的检测优势,可以解决中药成分复杂性、多样性和微量性带来的分析困难,在中药材化学成分分析领域得到了广泛应用^[8-11]。

本研究拟采用 HPLC-HRMS 法分析拉萨大黄提取物的化学成分,通过综合分析各化合物的色谱和质谱行为,为拉萨大黄的质量评价及药效物质基础研究提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

LTQ-Orbitrap XL 高效液相色谱-高分辨质谱联用仪;美国赛默飞世尔科技有限公司产品,配有 Thermo Xcalibur 2.1 数据处理系统、Accela 液相色谱系统、Accela 1250 四元梯度泵及 Accela AS 自动进样器;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器、RE-52C 旋转蒸发仪;巩义市予华仪器有限责任公司产品;BS124S 万分之

一天平:德国赛多利斯科学仪器有限公司产品;KQ-200DB 数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司产品;Milli-Q 超纯水机:美国 Merck Millipore 公司产品;CS-700 中药材粉碎机:五亿海纳电器有限公司产品;GL-88B 旋涡混合器:海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品。

1.2 试剂与材料

拉萨大黄:来源于香格里拉高山植物园,由大连医科大学第一附属医院中药剂科主任中药师李永杰鉴定并确认。

无水乙醇:天津市科密欧化学试剂有限公司产品;乙酸(色谱纯):迪马科技有限公司产品;甲醇、乙腈(色谱纯):赛默飞世尔科技有限公司产品;超纯水:实验室自制。

去氧土大黄苷(HPLC $\geq 98\%$, LOT: P13S9F70275)、曲扎茛苷(HPLC $\geq 98\%$, LOT: P14D7F26825)、白皮杉醇(HPLC $\geq 98\%$, LOT: Y15A8C33972):上海源叶生物科技有限公司产品;儿茶素(HPLC $\geq 98\%$, LOT: C11263757)、表儿茶素(HPLC $\geq 98\%$, LOT: C10376713)、虎杖苷(HPLC $\geq 95\%$, LOT: C10083549)、丹叶大黄素(HPLC $\geq 98\%$, LOT: C11251823)、没食子酸(HPLC = 99% , LOT: C11062421)、4-香豆酸(HPLC = 98% , LOT: C11334633):上海麦克林生化科技有限公司产品。

1.3 实验部分

1.3.1 拉萨大黄的提取 取 10 g 粉碎的拉萨大黄干燥根粉末,加入 90% 乙醇,加热回流 2 次,每次 2 h,真空抽滤,合并 2 次所得滤液,65 °C 减压浓缩至浸膏状。在拉萨大黄的提取和样品制备过程中均须避光操作以防止样品降解。

1.3.2 样品制备 称取适量的拉萨大黄浸膏,加入无水乙醇,经超声溶解配制成 400 g/L 溶液;取适量的上述溶液,加入甲醇稀释,配制成 20 g/L 溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,进样量 2 μL 。

取适量的对照品,加入甲醇溶解稀释,配制成约 20 mg/L 溶液,进样量 2 μL 。

1.3.3 实验条件 色谱条件:Agilent Zorbax SB-C18 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm),柱温为室温;流动相 A 为乙腈,B 为水;梯度洗脱程序为 0~5 min(10%~30% A),5~10 min

(30%~70% A),10~12 min(70%~100% A),12~15 min(100% A),15~15.1 min(100%~10% A),15.1~20 min(10% A);流速 0.5 mL/min;进样量 2.0 μL 。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式;源喷雾电压分别为 3.5 kV(正离子模式)和 3.0 kV(负离子模式);鞘气和辅助气均为氮气,流速分别为 15、5 L/min;加热毛细管温度 350 °C,毛细管电压 35 V;分辨率 30 000,最大允许偏差 $\pm 5 \times 10^{-6}$;一级和多级全扫描方式。

2 结果与讨论

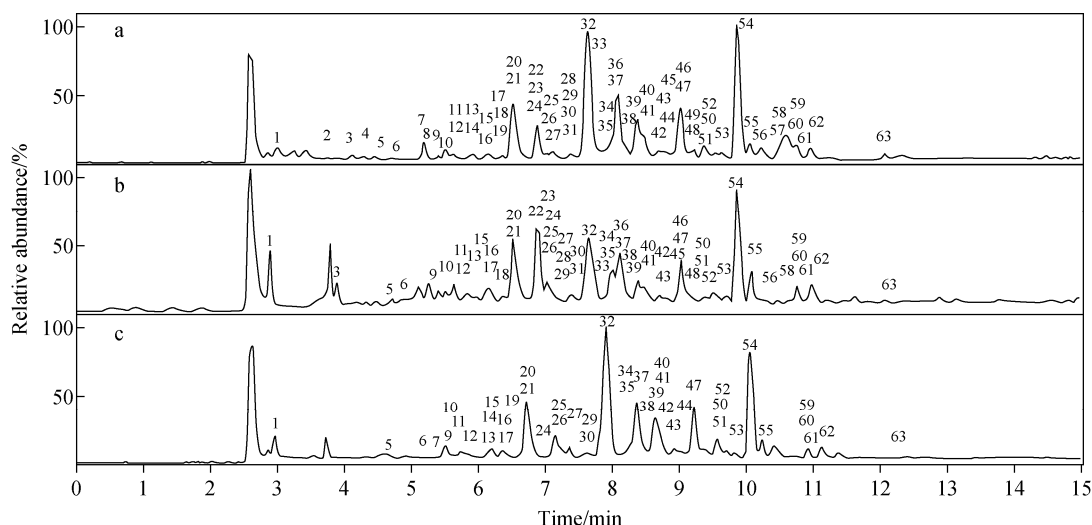
2.1 检测条件的选择

本实验采用 HPLC-HRMS 法在正、负离子模式下分析鉴定拉萨大黄的化学成分。结果表明,负离子模式下检测到的化合物种类较多,且质谱响应强度相对较大,这与化合物结构中均含有酚羟基或羧基等酸性基团有关。为提高化合物的分离度,分别以纯水和 0.3% 乙酸水溶液作为流动相中的水相进行梯度洗脱,在水相中添加酸性改性剂后,部分化合物的峰形和分离度得到了一定程度的改善,但由于酸性改性剂在负离子模式下的离子抑制作用,导致 18 种化合物(化合物 2,3,4,8,18,22,23,28,31,33,36,45,46,48,49,56,57,58)无法被检测,示于图 1。因此,采用以纯水为流动相中的水相进行梯度洗脱。

2.2 化学成分分析

本实验采用 HPLC-HRMS 法分离鉴定拉萨大黄提取物的化学成分,分别对样品进行(+)ESI-MSⁿ 和(−)ESI-MSⁿ 检测。通过综合分析各化合物的保留时间、精确分子质量和多级质谱信息,并与文献^[10-19]数据或对照品对比,共检测出鞣质类、茛类、黄酮类、苯丙酸类、苯丁酮类等 63 种化合物,各化合物的相关数据列于表 1。

2.2.1 鞣质类 鞣质又称单宁,是一类水溶性多元酚类化合物,其在大黄中分为水解鞣质和缩合鞣质两类,这两类鞣质的单体分别为没食子酸和 *d*-儿茶素^[20],也有报道将这两种类型鞣质的结合体称为复合鞣质^[21]。本研究在拉萨大黄中检测到 22 种鞣质类化合物,其中 10 种



注:a. 负离子模式下,以乙腈-水为流动相;b. 正离子模式下,以乙腈-水为流动相;

c. 负离子模式下,以乙腈-0.3%乙酸水为流动相

图1 拉萨大黄提取物的典型色谱图

Fig. 1 Typical chromatograms of *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao extract

水解鞣质,分别为化合物1、2、3、5、6、9、10、11、13、18;7种缩合鞣质,分别为化合物12、16、17、21、26、29、41;5种复合鞣质,分别为化合物24、30、34、40、43。下面以化合物12、16、21、29为例进行分析。

化合物12($t_R = 5.65$ min)、16($t_R = 6.17$ min)、21($t_R = 6.60$ min)和29($t_R = 7.38$ min)在ESI⁻模式下产生的准分子离子峰[M-H]⁻为 m/z 577.1351。根据高分辨数据拟合其元素组成均为C₃₀H₂₆O₁₂,在ESI⁺模式下同样有质谱响应,数据列于表1,初步推断为(表)儿茶素二聚体结构。为进一步确定结构,对 m/z 577进行二级全扫描质谱分析,产生的主要碎片离子有 m/z 559、451、425、407、289,与文献^[15]报道一致。其中, m/z 559相比于 m/z 577减少了18 u,推断为该化合物脱掉1分子H₂O形成的[M-H-H₂O]⁻碎片离子; m/z 451与 m/z 559相比减少了108 u,推测为C-C键断裂进一步脱去1分子邻苯二酐形成的[M-H-H₂O-C₆H₄O₂]⁻碎片离子; m/z 425与母离子相比减少了125 u,推断为母离子发生逆Diels-Alder开环反应脱掉1分子C₈H₈O₃形成的[M-H-C₈H₈O₃]⁻碎片离子; m/z 407与 m/z 425相比减少了18 u,为进一步脱去1分子H₂O形成的[M-H-C₈H₈O₃-

H₂O]⁻碎片离子; m/z 289比母离子减少288 u,推断为C-C键断裂脱去1分子儿茶素形成[M-H-C₁₅H₁₂O₆]⁻碎片离子,其质谱图及可能的裂解途径分别示于图2、图3。结合裂解碎片信息,并对比相关文献^[15],确定化合物12、16、21和29为(表)儿茶素二聚体,因其结构中含有多个手性碳原子,所以可形成多个非对映异构体。研究发现,缩合鞣质类化合物的裂解规律为易在脱水后母核儿茶素分子上C-C键断裂脱去1分子邻苯二酐形成[M-H-H₂O-C₆H₄O₂]⁻碎片离子,母离子发生逆Diels-Alder开环反应脱掉1分子C₈H₈O₃形成[M-H-C₈H₈O₃]⁻碎片离子,且易脱去儿茶素单体形成[M-H-C₁₅H₁₂O₆]⁻碎片离子。水解鞣质易脱去葡萄糖分子形成[M-H-C₆H₁₀O₅]⁻碎片离子,而得到的母核离子易脱去1分子CO₂,葡萄糖分子上易脱去1分子C₂H₄O₂。其他鞣质类化合物也有相似的裂解规律。

2.2.2 芪类 芪类化合物是对具有二苯乙烯母核一类化合物的总称,主要存在于植物的木质部薄壁细胞中^[22],是大黄的主要成分。芪类化合物中苷类化合物易水解得到苷元,其苷元上的苯环易发生裂解脱去乙炔和乙炔醇。本研究共检测到28种芪类化合物,以化合物27和32为例进行分析。

表 1 负离子模式下,拉萨大黄提取物中的化学成分

Table 1 Chemical compositions of *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao extract at negative ion mode

序号 No.	保留时间 Retention time/min	分子式 Molecular formula	$[M+H]^+ / [M-H]^- (m/z)$	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>)	化合物 Chemical compound	类型 Property
1	3.04	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	333.0817/331.0668	0.107/-0.785	271,241,211,193,169,125 ^[10-11]	没食子酸葡萄糖苷	鞣质类
2	3.87	C ₁₄ H ₁₈ O ₁₀	-/345.0825	-0.579/-0.579	285,225,207,183,168	甲氧基没食子酸葡萄糖苷	鞣质类
3	4.15	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	333.0817/331.0669	0.127/-0.634	271,169,125 ^[10-11]	没食子酸葡萄糖苷	鞣质类
4 ^a	4.29	C ₇ H ₆ O ₅	-/169.0142	-/-0.057	125 ^[12-16]	没食子酸	有机酸类
5	4.47	C ₁₄ H ₁₈ O ₁₀	347.0966/345.0825	-1.882/-0.579	299,285,225,207,183,168	甲氧基没食子酸葡萄糖苷	鞣质类
6	4.82	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	453.1379/451.1245	-2.776/-0.232	331,289,245 ^[11]	(表)儿茶素葡萄糖苷	鞣质类
7	5.24	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	-/325.0926	-/0.771	163,119	香豆酸-4-葡萄糖苷	苯丙酸类
8	5.34	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	-/567.1719	-/-0.086	405,243	白皮杉醇二葡萄糖苷	芪类
9	5.41	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	453.1378/451.1247	-2.180/0.189	289,245 ^[11]	(表)儿茶素葡萄糖苷	鞣质类
10	5.55	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	485.0932/483.0780	0.648/-0.059	439,331,313,271,169 ^[14-15,17]	二没食子酰基葡萄糖苷	鞣质类
11	5.61	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	453.1378/451.1244	-2.908/-0.365	313,289,245 ^[11]	(表)儿茶素葡萄糖苷	鞣质类
12	5.65	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	579.1480/577.1349	-2.923/-0.345	559,451,425,407,289 ^[15]	儿茶素二聚体	鞣质类
13	5.93	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	485.0930/483.0780	0.378/-0.059	439,331,313,271,169 ^[14-17]	二没食子酰基葡萄糖苷	鞣质类
14	5.96	C ₈ H ₈ O ₅	-/183.0300	-/0.510	168,139,124	4-甲氧基没食子酸	有机酸类
15	6.14	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	569.1870/567.1720	0.468/0.143	243	白皮杉醇二葡萄糖苷	芪类
16	6.17	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	579.1481/577.1351	-2.819/-0.137	559,533,451,439,425,407,393,289 ^[15]	(表)儿茶素二聚体	鞣质类
17	6.32	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	867.2150/865.1979	2.259/-1.241	847,739,713,695,577,451,425,407,287 ^[12]	(表)儿茶素三聚体	鞣质类
18	6.35	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	453.1378/451.1242	-3.063/-0.764	313,289,271,169,137 ^[14,16]	儿茶素-3-O-葡萄糖苷	鞣质类
19	6.39	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	-/325.0924	-/0.636	265,187,163,145,119	对香豆酸葡萄糖苷	苯丙酸类
20 ^a	6.53	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0856/289.0720	-2.352/0.756	271,245,205,179,125 ^[13]	儿茶素	黄酮类

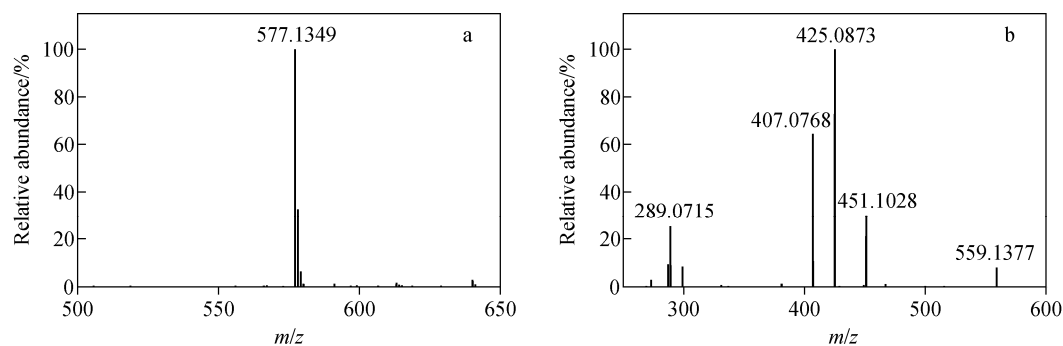
续表 1

序号 No.	保留时间 Retention time/min	分子式 Molecular formula	$\frac{[M+H]^+}{[M-H]^-}$ (m/z)	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>)	化合物 Chemical compound	类型 Property
21	6.60	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	579.1482/577.1355	-2.612/0.694	559,451,425,407,289 ^[15]	(表)儿茶素二聚体	鞣质类
22	6.93	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	569.1869/567.1720	0.418/0.143	539,405,387,243	白皮杉醇二葡萄糖苷	芪类
23	6.94	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	479.1537/477.1404	-2.229/0.430	433,313,169 ^[11,13-14]	异连花掌苷	苯丁酮类
24	6.95	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	731.1593/729.1458	-1.862/-0.409	577,559,451,425,407,289 ^[11,17]	儿茶素二聚体没食子酸酯	鞣质类
25 ^a	7.03	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0857/289.0717	-2.249/-0.247	245,205,179 ^[13]	表儿茶素	黄酮类
26	7.07	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	867.2144/865.1996	1.498/-1.205	695,577,451,407 ^[12]	(表)儿茶素三聚体	鞣质类
27	7.14	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	407.1324/405.1190	-3.190/-0.359	243 ^[18]	白皮杉醇葡萄糖苷	芪类
28	7.37	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.1292/433.1133	1.509/-0.760	271,227	柚皮素葡萄糖苷	黄酮类
29	7.38	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₂	579.1483/577.1352	-2.491/0.220	559,451,425,407,289 ^[15]	(表)儿茶素二聚体	鞣质类
30	7.39	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	731.1591/729.1046	-2.190/-0.230	711,603,577,559,451,441,407,289 ^[11]	(表)儿茶素二聚体没食子酸酯	鞣质类
31	7.42	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	569.1868/567.1719	0.278/0.020	405,243	白皮杉醇二葡萄糖苷	芪类
32 ^a	7.65	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	407.1327/405.1192	-2.453/0.233	406,243 ^[18]	曲扎芪苷	芪类
33	7.85	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	559.1431/557.1301	-2.767/0.101	405,313,243,169 ^[18]	白皮杉醇-(O-没食子酰)-葡萄糖苷	芪类
34	8.00	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	731.1591/729.1451	-2.108/-1.410	577,559,425,407 ^[15,17]	(表)儿茶素二聚体没食子酸酯	鞣质类
35	8.01	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	479.1538/477.1404	-2.104/0.367	433,313,169 ^[11,13-14]	连花掌苷	苯丁酮类
36	8.09	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	421.1498/419.1346	1.143/-0.490	257,376,402 ^[18]	土大黄苷	芪类
37 ^a	8.10	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	391.1377/389.1243	-2.695/0.409	389,227 ^[18]	虎杖苷	芪类
38	8.21	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	559.1431/557.1304	-2.767/0.549	405,313,243,169 ^[18]	白皮杉醇-(O-没食子酰)-葡萄糖苷	芪类
39	8.39	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	559.1432/557.1306	-2.445/0.998	405,313,243,169 ^[18]	白皮杉醇-(O-没食子酰)-葡萄糖苷	芪类
40	8.46	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	731.1597/729.1464	-1.356/0.428	577,559,451,425,407,289 ^[11]	(表)儿茶素二聚体没食子酸酯	鞣质类
41	8.49	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	443.0958/441.0829	-1.483/0.318	331,289,271,169 ^[11,13-14,16]	(表)儿茶素没食子酸	鞣质类

续表 1

序号 No.	保留时间 Retention time/min	分子式 Molecular formula	$[M+H]^+ /$ $[M-H]^- (m/z)$	误差 Error/ $\times 10^{-6}$	碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>)	化合物 Chemical compound	类型 Property
42	8.70	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂	543.1481/541.1351	-1.633/-0.137	313,227,169 ^[14,15]	白藜芦醇-(O-没食子酰)-葡萄糖苷	萜类
43	8.74	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	731.1591/729.1455	-2.108/-0.820	577,559,451,407 ^[11]	(表)儿茶素二聚体没食子酸酯	鞣质类
44 ^a	8.81	C ₉ H ₈ O ₃	-/163.0402	-/0.813	119 ^[14]	4-香豆酸	苯丙酸类
45	8.88	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	435.1293/433.1133	1.716/-0.730	271,227	柚皮素葡萄糖苷	黄酮类
46	8.96	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	451.1238/449.1086	0.758/-0.345	287	圣草酚葡萄糖苷	黄酮类
47	9.03	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₃	573.1587/571.1459	-2.752/0.273	387,327,313,257,243	土大黄苷没食子酸酯	萜类
48	9.21	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₂	557.1640/555.1507	-2.428/-0.179	540,451,393,371,327,313,227,183 ^[16]	白藜芦醇-(没食子酰甲酰)-葡萄糖苷	萜类
49	9.31	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	-/557.1300	-/-0.115	405,313,243 ^[18]	白皮杉醇-(O-没食子酰)-葡萄糖苷	萜类
50 ^a	9.38	C ₁₄ H ₁₂ O ₄	245.0800/243.0663	-3.572/0.279	243,225,201,175,159 ^[18]	白皮杉醇	萜类
51	9.39	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₁	527.1533/525.1404	-2.491/0.162	405,397,363,281,243	白皮杉醇-(O-羟基苯基甲酰)-葡萄糖苷	萜类
52	9.46	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₃	573.1587/571.1460	-1.064/0.483	419,387,327,313,257,243	土大黄苷没食子酸酯	萜类
53	9.57	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	455.1474/453.1345	-2.450/0.217	359,265	白藜芦醇二聚体	萜类
54 ^a	9.86	C ₂₁ H ₂₄ O ₈	405.1534/403.1399	-2.503/0.196	241 ^[18]	去氧土大黄苷	萜类
55	10.08	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₂	557.1638/555.1510	-1.593/0.361	393,313,241,169 ^[18]	去氧土大黄苷没食子酸酯	萜类
56 ^a	10.22	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	229.0852/227.0713	-3.015/-0.474	185,159,143 ^[13,18]	白藜芦醇	萜类
57 ^a	10.46	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	-/257.0819	-/0.030	242,241 ^[13,18]	丹叶大黄素	萜类
58	10.57	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	289.0706/287.0556	-0.154/-0.401	269,151 ^[19]	圣草酚	黄酮类
59	10.78	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	455.1478/453.1345	-2.450/0.217	435,411,369,359,347,333,265	白藜芦醇二聚体	萜类
60 ^a	10.79	C ₄₂ H ₃₂ O ₉	681.2120/679.1974	0.207/1.503	661,637,595,585,543,491	白藜芦醇三聚体	萜类
61	10.95	C ₄₂ H ₃₂ O ₉	681.2123/679.1974	0.559/0.325	661,637,595,585,543,491	白藜芦醇三聚体	萜类
62	11.08	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	455.1476/453.1342	-2.867/-0.357	435,411,369,359,347,333	白藜芦醇二聚体	萜类
63	12.07	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	243.1015/241.0866	-0.209/-0.428	226,225,197 ^[18]	去氧土大黄苷元	萜类

注：-表示未检测到；a 表示通过对照品对比确认



注: a. 一级质谱图; b. 二级质谱图

图 2 化合物 12 的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of compound 12

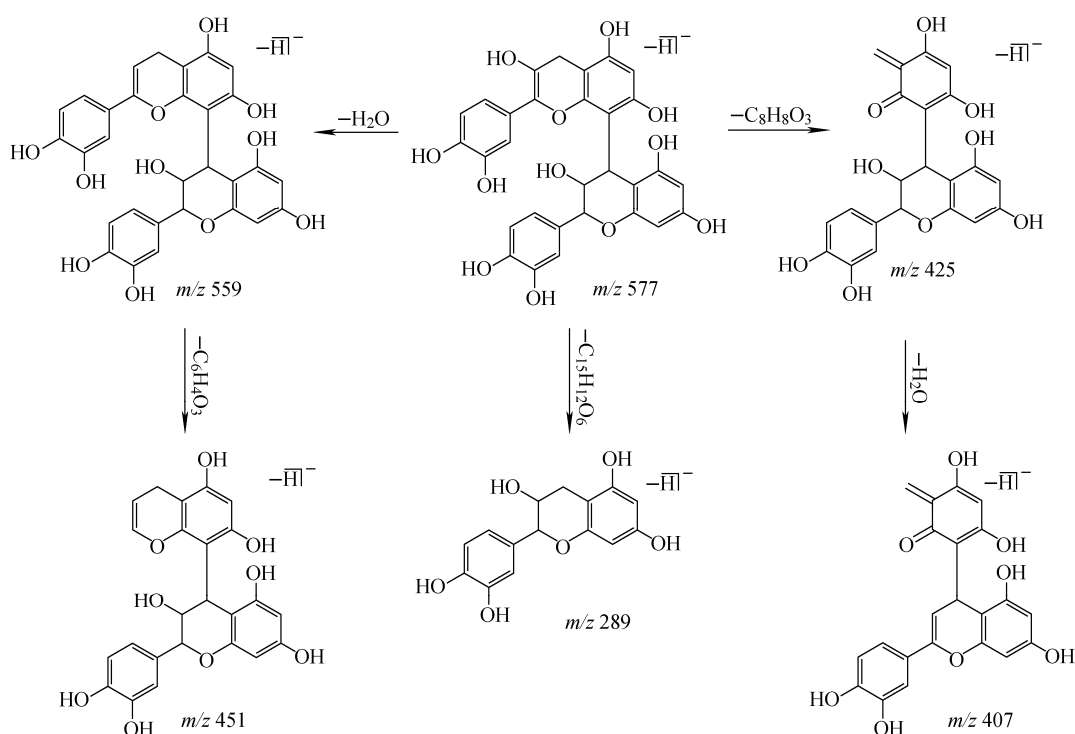


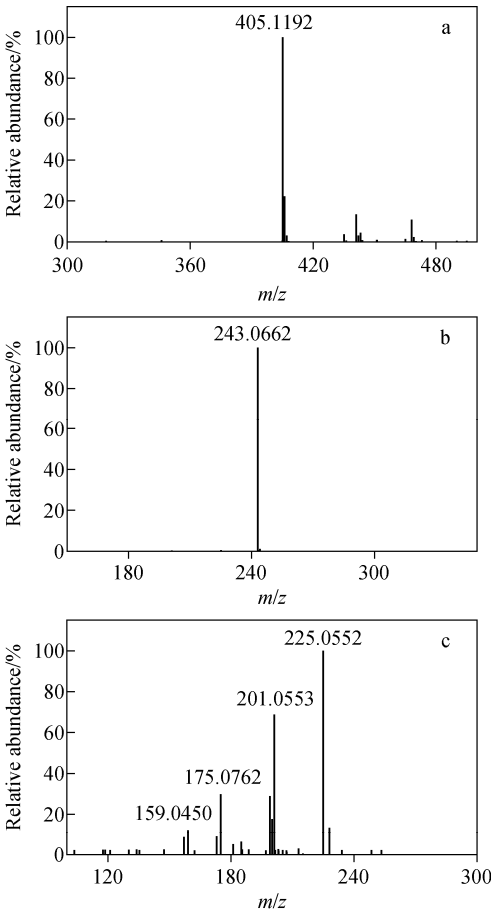
图 3 化合物 12 可能的质谱裂解途径

Fig. 3 Proposed fragmentation pathways of compound 12

化合物 27 ($t_R = 7.14$ min) 和化合物 32 ($t_R = 7.65$ min) 在 ESI^- 模式下产生准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 405.119 0, 根据高分辨数据拟合其元素组成均为 $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_9$, m/z 441 为加合离子 $[\text{M}-\text{H}+\text{HCl}]^-$, 初步推断为白皮杉醇葡萄糖苷。为进一步确定结构, 对 m/z 405 进行二级全扫描质谱分析, 产生的主要碎片离子为 m/z 243, 推测为糖苷键断裂脱去 1 分子葡萄糖形成的 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ 碎片离子。为进一步确定苷元结构, 对 m/z 243 进行三级

质谱分析, 其主要碎片离子为 m/z 243、225、201、175、159。其中, m/z 225 为 m/z 243 脱去 1 分子水形成的 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ 碎片离子, m/z 201 为 m/z 243 脱去 1 分子乙炔醇得到的 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ 碎片离子, m/z 175 是由 m/z 243 脱去 1 分子乙炔醇和 1 分子乙炔得到的 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2]^-$ 碎片离子, m/z 159 是由 m/z 243 脱去 2 分子乙炔醇得到的 $[\text{M}-\text{H}-2\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ 碎片离子。通过与对照品比对, 发现化合物 32 与对照品曲扎茛苷的色谱

和质谱行为一致,确定化合物 32 为曲札芪苷,而化合物 27 为白皮杉醇葡萄糖苷。化合物 32 的质谱图及可能的裂解途径分别示于图 4、



注: a. 一级质谱图; b. 二级质谱图; c. 三级质谱图

图 4 化合物 32 的质谱图

Fig. 4 Mass spectra of compound 32

图 5。其他芪类化合物也有相似的裂解规律。
2.2.3 苯丁酮类 苯丁酮类化合物是大黄的活性成分之一。苯丁酮衍生物的苯环 4 位上易被葡萄糖苷化,葡萄糖的 2、6 位羟基易与没食子酸或苯丙酸衍生物缩合形成酯。本研究共检测到 2 种苯丁酮类化合物,下面对其进行结构鉴定分析。

化合物 23 ($t_R = 6.94$ min) 和化合物 35 ($t_R = 8.01$ min) 在 ESI⁻ 模式下产生准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 477.1404, 根据高分辨数据推测其元素组成均为 C₂₃H₂₆O₁₁。这 2 种化合物在 ESI⁺ 模式下同样有质谱响应,数据列于表 1,推测其可能为莲花掌苷或异莲花掌苷。为进一步确定结构,对 m/z 477 进行二级全扫描质谱分析,产生的主要碎片离子有 m/z 433、313、169,与文献^[11,13-14]报道一致。 m/z 433 相比于 m/z 477 减少 44 u,推断为苯丁酮所在部分 C—C 键断裂脱掉 1 分子 CH₃CHO 形成的 $[M-H-C_2H_4O]^-$ 碎片离子; m/z 313 比 m/z 477 减少 164 u,推测为糖苷键断裂脱去 1 分子苯丁酮得到的 $[M-H-C_{10}H_{12}O_2]^-$ 碎片离子; m/z 169 与没食子酸的准分子离子相同,推测为 C—O 键断裂脱去苯丁酮葡萄糖苷部分形成的 $[M-H-C_{16}H_{20}O_6]^-$ 碎片离子,其质谱图及可能的裂解途径分别示于图 6、图 7。根据相关文献^[11]报道,在反相色谱系统中异莲花掌苷的保留时间相对较短,结合裂解碎片信息,推测化合物 23 为异莲花掌苷,化合物 35 为莲花掌苷。

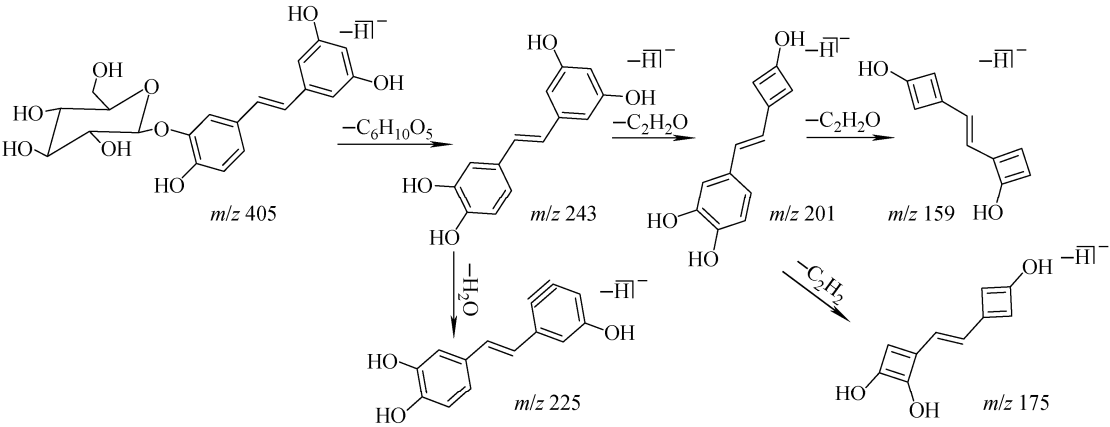
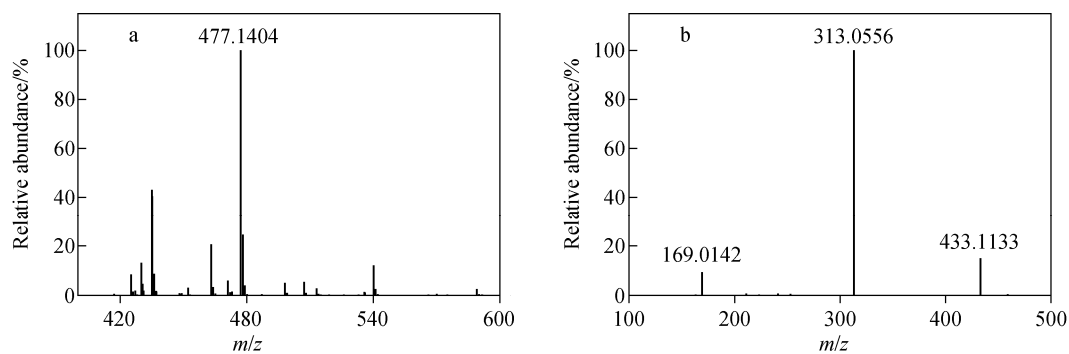


图 5 化合物 32 可能的质谱裂解途径

Fig. 5 Proposed fragmentation pathways of compound 32



注:a. 一级质谱图;b. 二级质谱图

图6 化合物35的质谱图

Fig. 6 Mass spectra of compound 35

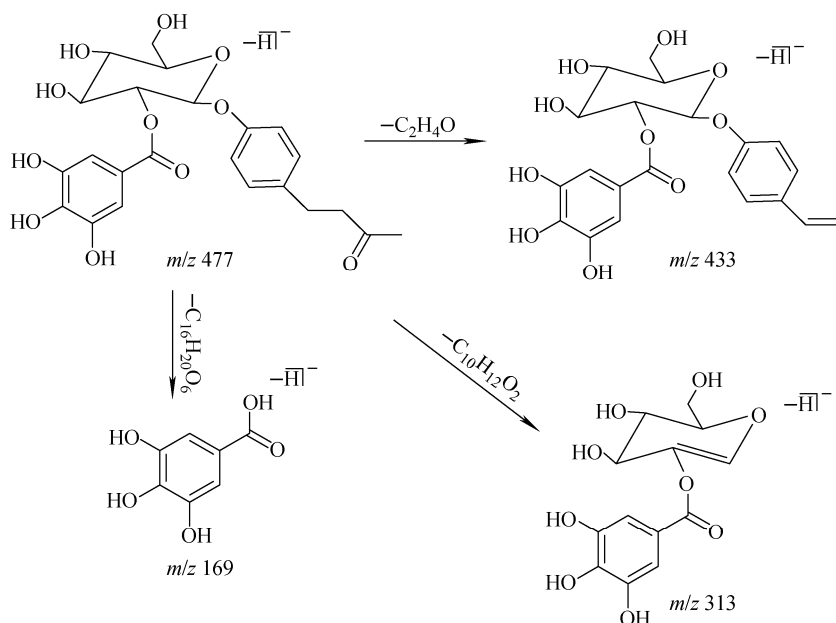


图7 化合物35可能的质谱裂解途径

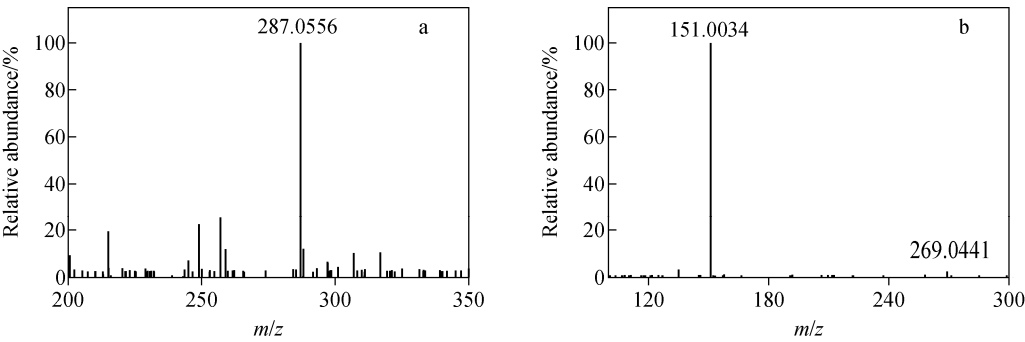
Fig. 7 Proposed fragmentation pathways of compound 35

2.2.4 黄酮类 黄酮类化合物是一类以2-苯基色原酮为母核的化合物,因其结构不同,种类繁多,具有多种药理作用。黄酮类化合物典型的裂解方式是逆 Dials-Alder 裂解,本研究共检测到6种黄酮类化合物,以化合物58为例进行结构鉴定分析。

化合物58($t_R=10.57$ min)在ESI⁻模式下产生准分子离子峰[M-H]⁻ m/z 287.056 1,该化合物在ESI⁺模式下同样有质谱响应,根据高分辨数据拟合其元素组成为C₁₅H₁₂O₆,初步推断为圣草酚。为进一步确定结构,对 m/z 287.056 1进行二级全扫描质谱分析,产生的主

要碎片离子有 m/z 269、151,与文献^[16]报道一致。其中, m/z 269 与 m/z 287 相比减少了18 u,推测为脱掉1分子H₂O形成的[M-H-H₂O]⁻碎片离子; m/z 151 比 m/z 287 减少136 u,推测是黄酮类化合物典型的逆 Dials-Alder 裂解途径,脱掉1分子C₈H₈O₂形成的[M-H-C₈H₈O₂]⁻碎片离子。综合考虑元素组成及碎片信息,推断化合物58为圣草酚,其质谱图及可能的裂解途径示于图8、图9。

本研究在负离子模式下检测到63种化合物,正离子模式下检测到54种化合物,其中包括22种鞣质类化合物,28种芪类化合物,3种



注：a. 一级质谱图；b. 二级质谱图

图 8 化合物 58 的质谱图

Fig. 8 Mass spectra of compound 58

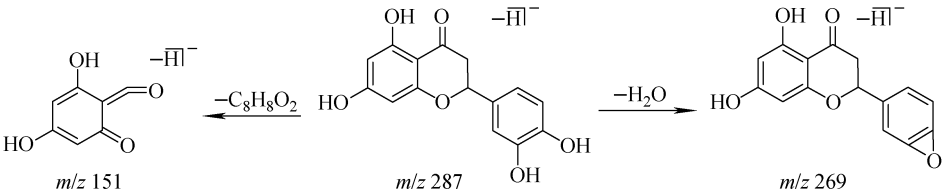


图 9 化合物 58 可能的质谱裂解途径

Fig. 9 Proposed fragmentation pathways of the compound 58

苯丙酸类化合物,6 种黄酮类化合物,2 种苯丁酮类化合物及 2 种有机酸类化合物。除化合物 32、37、50、53、54、56、59、60、61、62 外,其余均为首次在拉萨大黄提取物中发现,对拉萨大黄的成分进行了较全面的分析和补充。拉萨大黄中的主要有效成分为芪类化合物,且 Hu 等^[5]发现,纯化的曲扎芪苷、虎杖苷等组合物和拉萨大黄的总提取物都具有抑制冠状病毒活性的作用,但拉萨大黄总提取物的效果比组合物的预防效果好。

3 结论

本文建立了 HPLC-HRMS 法分析鉴定拉萨大黄提取物的主要化学成分,共鉴定出 63 种化合物,其中有 53 种化合物是在该药材中首次发现,但未发现蒽醌类成分。本研究为拉萨大黄药材的鉴定及质量控制提供了有效方法,也为其在临床应用及药理研究奠定了基础。

致谢:感谢大连医科大学第一附属医院中药剂科主任中药师李永杰对中药材拉萨大黄的鉴定。

参考文献:

[1] 胡延萍,王莉,李毅. 分子标记技术在大黄属植物种质资源研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(12):64-68.
HU Yanping, WANG Li, LI Yi. Application of molecular techniques in the research of germplasm resources of *Rheum*[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(12): 64-68(in Chinese).
[2] 陈艳琰,唐于平,陈嘉倩,曹玉洁,段金殿. 大黄资源化学研究进展与利用策略[J]. 中草药, 2018,49(21):5 170-5 178.
CHEN Yanyan, TANG Yuping, CHEN Jiaqian, CAO Yujie, DUAN Jin'ao. Research progress and utilization strategy on resource chemistry of *Rhei Radix et Rhizoma*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(21): 5 170-5 178 (in Chinese).
[3] 罗达尚. 中华藏本草[M]. 北京:民族出版社, 1997:49-50.
[4] HU L, LI Q Q, REN Y F, HU Q, YIN K Y, FANG Z D. Healthcare wine useful for e. g. treating modern metabolic diseases, including diabetes, hyperlipidemia and cardiovascular and cerebrovascular diseases comprises artificially planted or wild rhizome of *Rheum lhasaense*;

- China, CN110624006-A[P]. 2019-12-31.
- [5] HU L, REN Y F, LI Q Q, HU Q, YIN K Y, FANG Z D. Use of *Rheum lhasaense* in preparing medicine for preventing and treating viral pneumonia; China, CN111228343-A[P]. 2020-06-05.
- [6] LIU W, HU L, HU Q, CHEN N N, YANG Q S, WANG F F. New resveratrol oligomer derivatives from the roots of *Rheum lhasaense*[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2013, 18(6): 7 093-7 102.
- [7] 龚云麒,陈锦铎,方芳,陈云建,胡琳,杨兆祥. 拉萨大黄化学成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 601-602.
- GONG Yunqi, CHEN Jinxin, FANG Fang, CHEN Yunjian, HU Lin, YANG Zhaoxiang. Study on chemical composition of *Rheum Lhasa A. J. Li et P. K. Hsia*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015, 26(3): 601-602(in Chinese).
- [8] 李婷,许霞,常安琪,刘文静,宋青青,宋月林,屠鹏飞. 利用在线加压溶剂提取-超高效液相色谱-离子阱-飞行时间-质谱法直接分析中药草苁蓉的化学成分组[J]. 色谱, 2020, 38(5): 554-563.
- LI Ting, XU Xia, CHANG Anqi, LIU Wenjing, SONG Qingqing, SONG Yuelin, TU Pengfei. Direct chemome profiling of *Boschniakia rossica* using online pressurized extraction-ultrahigh-performance liquid chromatograph-ion trap-time-of-flight mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(5): 554-563(in Chinese).
- [9] 孙玉明,王月月,蔡蕊,张华,王玉林. 高效液相色谱-光电二极管阵列-高分辨质谱联用鉴定马鞭草提取物中的化学成分[J]. 色谱, 2017, 35(9): 987-994(in Chinese).
- SUN Yuming, WANG Yueyue, CAI Rui, ZHANG Hua, WANG Yulin. Identification of the chemical compositions of *Verbena officinalis* L. extract by high performance liquid chromatograph-photodiode array-high resolution mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(9): 987-994(in Chinese).
- [10] 蒋海强,容蓉,吕青涛. 大黄化学成分的液相色谱-质谱联用鉴别[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1 705-1 706.
- JIANG Haiqiang, RONG Rong, LV Qingtao. Identification of the chemical composition in *Rhubarb* by high performance liquid chromatograph with mass spectrometry[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(7): 1 705-1 706(in Chinese).
- [11] YANG D Z, SUN G, ZHANG A H, FU S, LIU J H. Screening and analyzing the potential bioactive components from *Rhubarb*, using a multivariate data processing approach and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytical Methods, 2015, 7(2): 650-661.
- [12] 彭春,唐玲,王燕. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的三黄片化学成分解析[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(7): 757-764.
- PENG Chun, TANG Ling, WANG Yan. Characterization of chemical profiling in Sanhuang tablets by UPLC-Q-TOF/MS[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2020, 40(7): 757-764 (in Chinese).
- [13] 陆杰,王婷婷,梁琨,安歆,王新宏,陈颖. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法分析大承气汤化学成分[J]. 中成药, 2020, 42(12): 3 275-3 280.
- LU Jie, WANG Tingting, LIANG Kun, AN Rui, WANG Xinhong, CHEN Ying. Analysis of chemical constituents of Dachengqi Decoction by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(12): 3 275-3 280 (in Chinese).
- [14] 王银洁,刘本臣,刘军,莫家欣,胡安琪,刘嘉琪,冯倩仪,宫凯敏. UPLC-Q-TOF-MS 法鉴定消肿止痛液有效部位的化学成分[J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3 232-3 239.
- WANG Yinjie, LIU Benchen, LIU Jun, MO Jiaxin, HU Anqi, LIU Jiaqi, FENG Qianyi, GONG Kaimin. Identification of chemical components in active fraction of Xiaozhong Zhitong lotion by UPLC-Q-TOF-MS[J]. China Pharmacy, 2019, 30(23): 3 232-3 239(in Chinese).
- [15] ZHU T, LIU X, WANG X L, CAO G, QIN K M, PEI K, ZHU Hui, CAI Hao, NIU M J, CAI B C. Profiling and analysis of multiple compounds in *Rhubarb* decoction after processing by wine steaming using UHPLC-Q-TOF-MS coupled with multiple statistical strategies[J]. Journal of Separation Science, 2016, 39(15): 3 081-3 090.
- [16] WANG J W, QIN Y, KONG W J, WANG Z

- W, ZENG L N, FANG F, JIN C, ZHAO Y L, XIAO X H. Identification of the antidiarrhoeal components in *Official rhubarb* using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1 737-1 743.
- [17] YE M, HAN J, CHEN H B, ZHENG J H, GUO D. Analysis of phenolic compounds in *Rhubarbs* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2007, 18(1): 82-91.
- [18] 詹艳芝, 吴蓓, 黄文平, 徐旭, 张晶, 陈思思, 冯育林, 杨世林, 温泉. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析亚大黄中的抗补体活性成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10): 60-66.
- ZHAN Yanzhi, WU Bei, HUANG Wenping, XU Xu, ZHANG Jing, CHEN Sisi, FENG Yulin, YANG Shilin, WEN Quan. Rapid analysis of anti-complement constituents in *Rheum iha-saense* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2018, 24(10): 60-66(in Chinese).
- [19] 邹瑾, 周金彩, 龙红萍, 李静, 陈文明. UPLC-ESI-Q-TOF-MS 法分析兖州卷柏化学成分[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2 334-2 337.
- ZOU Jin, ZHOU Jincai, LONG Hongping, LI Jing, CHEN Wenming. Identification of chemical components in *Selaginella involven Spring* using UHPLC-Q-TOF-MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(10): 2 334-2 337 (in Chinese).
- [20] 邓瑞雪, 黄玉阳, 张玉秀, 陆世鹏, 孟文娟, 张雨, 刘普. 掌叶大黄鞣质类化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(4): 908-911.
- DENG Ruixue, HUANG Yuyang, ZHANG Yuxiu, LU Shipeng, MENG Wenjuan, ZHANG Yu, LIU Pu. Chemical constituents of tannin from roots of *Rheum palmatum*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(4): 908-911(in Chinese).
- [21] 朱玥, 金哲雄. 鞣质类化合物的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(1): 23-25.
- ZHU Yue, JIN Zhexiong. Research progress on tannin compounds[J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2015, 28(1): 23-25(in Chinese).
- [22] 斯建勇. 天然芪类化合物及其生物活性[J]. 国外医药(植物药分册), 1991, 6(4): 155-156.
- SI Jianyong. Natural stilbene compounds and their biological activities[J]. World Phytomedicines, 1991, 6(4): 155-156(in Chinese).
- (收稿日期: 2020-11-06; 修回日期: 2021-01-26)