

# 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析 亚大黄中的抗补体活性成分

詹艳芝<sup>1</sup>, 吴蓓<sup>2</sup>, 黄文平<sup>1</sup>, 徐旭<sup>1</sup>, 张晶<sup>1</sup>, 陈思思<sup>1</sup>, 冯育林<sup>1</sup>, 杨世林<sup>1</sup>, 温泉<sup>1\*</sup>

(1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

2. 南昌市食品药品检验所, 南昌 330029)

**[摘要]** **目的:**通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析亚大黄中的抗补体活性成分群,为阐明亚大黄的抗补体活性药效物质基础提供参考。**方法:**对亚大黄 95% 醇提物进行萃取得到石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 3 个部位,并测定 3 个部位经典途径的抗补体溶血活性(CH<sub>50</sub>);采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对 3 个部位分别进行化学成分的表征,使用质谱分析软件中的目标化合物筛查法,通过保留时间、精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片鉴定化学成分。**结果:**亚大黄正丁醇部位抗补体活性为 0.032 g·L<sup>-1</sup>,强于阳性药肝素钠;在优化的 LC-MS 条件下,结合 Scifinder 数据库、对照品和相关文献,鉴定了石油醚部位主要成分 9 个,主要是脂肪酸及甾醇类化合物;鉴定了乙酸乙酯部位主要成分 13 个,主要是游离蒽醌类和二苯乙烯类;鉴定了正丁醇部位主要成分 25 个,主要是蒽醌苷类和二苯乙烯苷类。**结论:**基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术,快捷、准确、较全面地分析鉴定亚大黄的抗补体活性部位的化学成分主要为蒽醌苷和二苯乙烯苷类,为进一步分离及开发亚大黄中苷类抗补体活性成分提供科学依据。

**[关键词]** 亚大黄; 化学成分; 抗补体; 超高压液相色谱四级杆飞行时间质谱; 清热解毒

**[中图分类号]** R284.1;R282.6;R2-031;R29 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0060-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181015

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180312.1419.002.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-12 15:00

## Rapid Analysis of Anti-complement Constituents in *Rheum ihasaense* Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

ZHAN Yan-zhi<sup>1</sup>, WU Bei<sup>2</sup>, HUANG Wen-ping<sup>1</sup>, XU Xu<sup>1\*</sup>, ZHANG Jin<sup>1</sup>,  
CHEN Si-si<sup>1</sup>, FENG Yu-lin<sup>1</sup>, YANG Shi-lin<sup>1</sup>, WEN Quan<sup>1</sup>

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine,  
Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Nanchang Food and Drug Inspection Office, Nanchang 330029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To rapidly analyze the anti-complement active constituents in the *Rheum ihasaense* by UPLC-Q-TOF-MS/MS technology, and to provide a reference for elucidating the anti-complement activity pharmacological basis of the rhubarb. **Method:** 95% ethanol extract of rhubarb was extracted to obtain petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol. The anti-complement hemolytic activity (CH<sub>50</sub>) of three parts was determined. UPLC-Q-TOF-MS/MS was used to characterize the chemical constituents of the three parts by using the target compound screening method in the mass spectrometry software, and the chemical composition was identified by the retention time, the exact molecular weight and the secondary mass spectrometry. **Result:** The values of

**[收稿日期]** 20171110(011)

**[基金项目]** 江西省卫计委中医药科研项目(2017A291);国家自然科学基金青年基金项目(81603274)

**[第一作者]** 詹艳芝,在读硕士,从事中药活性成分研究,Tel: 0791-87119631,E-mail:1358122435@qq.com

**[通信作者]** \*温泉,博士,讲师,从事中药药效物质及质谱研究,Tel:0791-87119633 E-mail:qwen12@fudan.edu.cn

anticomplement activity of adiposin was  $0.032 \cdot \text{mL}^{-1}$ , which was stronger than that of positive drug heparin. In the optimized LC-MS, the scifinder database, reference substance and related literature were combined to identify compounds. The main components of petroleum ether were identified, which were mainly fatty acids and sterols. Thirteen compounds from ethyl acetate were identified, mainly free anthraquinones and stilbenes. The main components of *n*-butanol were identified as mainly anthraquinone glycosides and stilbene glycosides. **Conclusion:** Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology, the chemical constituents of the *n*-butanol-resistant part of the reaction group were mainly anthraquinone and stilbene glycosides, which provided foundation for further separation and development of anti-complement active ingredients from rhubarb.

[ **Key words** ] *Rheum ihasaense*; chemical composition; anti-complement; UPLC-Q-TOF-MS/MS; clearing heat and detoxicating

补体系统是人体重要的免疫防御系统之一,补体系统的正常激活,能够消灭外来微生物、清除体内损伤,在维持机体的平衡中起着重要的作用。然而,补体系统过度激活会导致炎症性疾病,造成人体自身正常组织的损伤,如 SARS,急性肺损伤(ALI),急性呼吸窘迫综合征(ARDS),类风湿性关节炎(RA)等<sup>[1-2]</sup>。临床上使用的合成类抗补体制剂,成本高、选择性差并能产生多种副作用,如甲氨蝶呤等<sup>[3]</sup>。而传统清热解毒、抗炎类中药如鱼腥草、柴胡、夏枯草等,现代药理证实是以抑制补体过度激活而发挥药效<sup>[4-5]</sup>,且毒副作用小。因此,从传统清热解毒中药中快速寻找抗补体活性成分具有针对性且需求迫切。

亚大黄始载于藏族医经典《晶珠本草》,是传统的藏族药,具有清热解毒,泻下,抗炎,行瘀血等作用<sup>[6]</sup>。常用于治疗关节肿胀、感冒初起等,但其药效物质基础研究比较薄弱<sup>[7]</sup>。前期活性筛选研究发现亚大黄 95% 乙醇提取物具有显著的抗补体活性,若通过传统的分离活性成分手段盲目且费时,本研究对 95% 亚大黄乙醇提取物用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取后并进行补体抑制活性测试,基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术,快速解析活性部位的抗补体活性成分。通过质谱数据与相关文献鉴定了亚大黄中 37 个化合物,为进一步研究筛选亚大黄的抗补体化学成分及阐释其药效物质基础提供依据。

## 1 材料

Triple TOF 5600 型超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(美国 AB Sciex 公司),LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),COSMOSIL C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),BT25S 型 1/10 万分析天平(德国 Sartorius 公司)等。乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司),Milli-Q 系列纯化水系统(美国 Millipore

公司),其余试剂为分析纯。

亚大黄药材于 2014 年 12 月购自西藏(奇正藏药有限公司,批号 141211),经南昌市食品药品监督管理局吴蓓副主任药师鉴定为蓼科大黄属植物拉萨大黄 *Rheum ihasaense* 的干燥根。对照品大黄酸(批号 110757-201607),大黄素(批号 110756-201512),大黄酚(批号 110796-201621),大黄素甲醚(批号 110758-201616),甲基虎杖苷(批号 110783-201632),芦荟大黄素(批号 110795-201710)购自中国食品药品检定研究院,纯度供含量测定用。

豚鼠(体质量 200 ~ 250 g, SPF 级,合格证号 SYXK2012-0005)购自北京通利华实验动物技术有限公司,经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准。绵羊红细胞(SRBC,批号 HQ50078),溶血素(批号 170522),与巴比妥缓冲液(BBS,批号 IH0075)购自上海源叶生物科技有限公司;肝素钠( $\geq 140 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$ )购自北京索莱宝公司。

## 2 方法

**2.1 供试品溶液的制备** 取亚大黄药材 500 g,粉碎后用 95% 乙醇加热回流提取 60 min,分别用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,即得石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 3 个部位,称取各部位浸膏约 20 mg,加甲醇溶解于 10 mL 量瓶中,配成约  $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的供试品溶液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,待分析。

**2.2 对照品溶液制备** 精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、甲基虎杖苷各 4.0 mg,至 50 mL 量瓶中加甲醇配制成  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液,进样量 1 μL。

**2.3 质谱条件** 离子源为电喷雾离子化源(ESI),正负离子模式扫描,质量数扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 250,喷雾电压 +4 500 V,雾化气温度 550 °C;采用 TOF-MS-IDA-MS/MS 方法采集数据,TOF-MS 一级预扫描和触发的二级扫描,碰撞能量(CE) + 30 eV,

碰撞能量叠加 (CES) 为  $(30 \pm 10)$  eV, 触发二级的方法为 IDA, 多重质量亏损 (MMDF) 和动态背景扣除 (DBS) 为触发二级的条件, 满足该条件的优先进行二级扫描。

**2.4 色谱条件** UPLC COSMOSIL C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 2 min, 5% ~ 10% B; 2 ~ 4 min, 10% ~ 15% B; 4 ~ 20 min, 15% ~ 35% B, 20 ~ 22 min, 35% ~ 55% B; 22 ~ 32 min, 55% ~ 70% B; 32 ~ 34 min, 70% ~ 90% B, 34 ~ 39 min, 90% ~ 5% B), 柱温 30 °C, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积 2 μL。

**2.5 补体** 经典途径的溶血活性 (CH<sub>50</sub>) 测定补体能使溶血素敏化的绵羊红细胞发生溶血, 当敏化的绵羊红细胞浓度恒定时, 溶血程度与补体含量呈正比例关系。因此, 将供试品做不同浓度稀释后与补体混匀, 与红细胞反应, 测定溶血程度, 以导致 50% 溶血所需最小供试品浓度 (CH<sub>50</sub>) 评价供试品的抗补体活性, 具体实验过程参照文献 [5]。

### 3 结果与分析

**3.1 经典途径补体** 效价及活性测试豚鼠血清 (补体) 用 BBS 对倍稀释成 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 后, 加入溶血体系中, 评价其效价。在补体稀释浓度为 1:2 ~ 1:32 时, 溶血

率接近 100%, 体系基本达到全溶血。为确保体系能够全部溶血和提高药物筛选时方法的灵敏度, 所以选择 1:32 稀释的豚鼠血清作为以下经典途径筛选实验中所使用的补体。将亚大黄的石油醚、乙酸乙酯、正丁醇 3 个部位提取物和肝素钠进行体外抗补体活性测试, CH<sub>50</sub> 分别为 0.173, 0.051, 0.032, 0.041 g·L<sup>-1</sup>; 其中正丁醇部位活性最强为 0.032 g·L<sup>-1</sup>, 优于阳性对照药肝素钠。

**3.2 亚大黄中化学成分鉴定** 利用 Analyst TF1.6 软件对亚大黄的 3 个部位进行分析, 通过大黄属植物的 ScifinderChemspider 等相关数据库的检索结果和相关文献数据报道 [8-13], Peak view 软件平台上建立亚大黄化学成分的目标数据库, 将采集的数据导入 Peak view 定性分析软件, 对各主要分子离子峰进行判识、校正, 与已建立的目标数据库匹配, 与对照品的质谱信息匹配和利用 Peak view 软件中 XIC Manager 功能对目标化合物进行查找和确定, 并通过 Formula finder 软件、相关数据库、同位素分布以及目标化合物的元素组成和裂解途径分析最终确定 39 个化合物信息, 各化合物的保留时间、相对分子质量及质谱裂解后的碎片离子见表 1~3。同时对 5 个对照品的质谱裂解规律 [11-13] 进行分析, 以便推测相关类型化合物。

表 1 亚大黄中石油醚部位化学成分

Table 1 Chemical composition of petroleum ether extract of *Rheum ihasaense*

No.	t <sub>R</sub> /min	实测值	理论值	分子式	化合物	二级碎片 m/z	δ
1	6.57	244.073 5	244.073 5	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	piceatannol (trans-3, 5, 3', 4'-tetrahydroxystilbene)	245.080 9, 227.070 4, 199.074 8, 181.064 1	1
2	23.87	228.078 6	228.078 6	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxystilbene)	229.085 9, 211.075 5, 183.080 7, 165.069 7, 155.085 2	0.9
3	24.44	524.110 7	524.110 7	C <sub>30</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	番泻苷元 C	259.097 3, 241.086 4, 244.073 1, 226.062 5, 231.101 2, 198.067 4	1.2
4	29.26	254.057 9	254.057 9	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	大黄酚	255.065 6, 240.041 8, 237.053 3, 227.069 6, 213.060 4, 181.065 4, 153.070 0	0.9
36	29.63	280.240 2	280.240 2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	亚油酸	281.110 5, 221.231 6, 151.030 6, 123.080 4, 81.069 6, 69.070 0	1.1
37	31.36	298.287 1	298.287 1	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	棕榈酸	299.294 4, 240.241 8, 116.080 7, 102.060 4, 88.040 8	-0.9
5	33.11	284.068 4	284.068 4	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	大黄素甲醚	285.076 2, 243.057 6, 213.075 7	1.6
38	34.73	278.224 5	278.224 5	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	亚麻脂酸	279.094 6, 201.047 2, 149.023 9, 121.027 7	2.7
39	35.15	282.255 8	282.255 8	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	油酸	283.266 7, 263.101 2, 224.244 3, 157.124 5, 154.166 8, 130.096 8, 127.141 8	0.9

化合物 4 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 [M + H]<sup>+</sup> m/z 255.06, 保留时间为 18.10 min, 误差为 1.5, Peak view 定性分析软件推测其分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>, 该化合物二级质谱中, 产生碎片离子 m/z

227.06 比母离子少 28 Da, 为 大黄酚母核上失去 CO 的碎片; m/z 213.05 碎片离子为上个碎片离子脱去 1 分子 CH<sub>3</sub> 的碎片; 该化合物裂解规律与 大黄酚裂解规律一致, 由此可以推测为 大黄酚。见图 1。

表 2 亚大黄中乙酸乙酯部位化学成分

Table 2 Chemical composition of ethyl acetate extract of *Rheum ihasaense*

No.	$t_R/\text{min}$	实测值	理论值	分子式	化合物	二级碎片 $m/z$	$\delta$
2	8.36	228.078 6	228.078 9	$C_{14}H_{12}O_3$	resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxystilbene)	229.087 1, 211.075 9, 183.080 8, 165.070 3, 135.044 2, 107.049 4	1.7
1	9.33	244.074 2	244.073 9	$C_{14}H_{12}O_4$	piceatannol (trans-3, 5, 3', 4'-tetrahydroxystilbene)	245.082 2, 227.071 0, 199.075 8, 181.065 3, 153.070 2, 135.044 4, 107.049 7	2.5
6	16.31	454.141 6	454.142 1	$C_{28}H_{22}O_6$	gnetin C	455.148 8, 427.158 6, 345.114 5, 327.102 5	0.8
7	17.20	242.094 2	242.093 9	$C_{15}H_{14}O_3$	反式-脱氧土大黄苷	243.065 9, 225.091 5, 210.067 7, 207.081 0, 182.072 2	0.6
4	18.10	254.057 9	254.058 3	$C_{15}H_{10}O_4$	大黄酚	255.066 4, 227.070 9, 213.060 0, 181.065 4, 153.070 4	1.5
8	21.50	286.047 7	286.048 1	$C_{15}H_{10}O_6$	羟基大黄素	287.056 0, 269.045 4, 257.044 4, 241.049 6, 213.055 5	3.2
9	24.42	258.089 2	258.089 0	$C_{15}H_{14}O_4$	isohapontigenin	259.097 9, 241.087 1, 244.738, 226.062 9, 231.102 0, 198.068 0	1.7
10	24.78	270.052 8	270.053 2	$C_{15}H_{10}O_5$	芦荟大黄素	271.095 9, 253.082 2, 243.067 4, 239.069 7, 255.052 8, 211.076 0, 165.069 2	0.7
11	26.54	284.032 1	284.032 7	$C_{15}H_8O_6$	大黄酸	285.075 6, 267.033 2, 257.078 8, 241.070 0, 213.075 6, 185.067 4	0.8
12	27.05	270.052 8	270.053 1	$C_{15}H_{10}O_5$	大黄素	271.061 0, 243.060 3, 227.054 8, 199.059 4	0.1
13	30.54	508.115 8	508.116 1	$C_{30}H_{20}O_8$	大黄二蒽酮 B	509.118 5, 281.085 1, 184.073 9	-3
5	33.12	284.068 4	284.068 0	$C_{16}H_{12}O_5$	大黄素甲醚	285.077 3, 243.057 9, 213.075 9	3.4
14	33.23	510.131 4	510.131 1	$C_{30}H_{22}O_8$	掌叶大黄二蒽酮 A	511.141 8, 465.099 5	0.4

表 3 亚大黄中正丁醇部位化学成分

Table 3 Chemical composition of *n*-butanol extract of *Rheum ihasaense*

No.	$t_R/\text{min}$	实测值	理论值	分子式	化合物	二级碎片 $m/z$	$\delta$
15	6.27	406.126 3	406.126 1	$C_{20}H_{22}O_9$	白皮杉醇-3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷	245.082 3, 227.071 0, 199.075 6, 135.044 2	3.2
2	6.68	228.078 6	228.079 0	$C_{14}H_{12}O_3$	白藜芦醇 (3, 5, 4'-trihydroxystilbene)	229.086 7, 211.074 6, 183.080 4, 165.069 4, 135.044 1, 107.049 6	1
16	6.64	390.131 4	390.131 7	$C_{20}H_{22}O_8$	白藜芦醇 3- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷	391.138 8, 373.128 6, 259.099 1, 267.099 6, 229.086 9	2.4
17	7.53	556.158 2	556.156 1	$C_{28}H_{28}O_{12}$	去氧土大黄苷-6'- <i>O</i> -gallate	557.166 3, 395.116 6, 377.104 2, 359.108 1, 275.092 0, 233.081 7, 215.072 1	0.8
18	7.72	580.179 2	580.178 9	$C_{27}H_{32}O_{14}$	大黄苷 A	581.188 9, 419.136 1, 401.127 7, 257.082 2	0.3
19	7.95	862.195 6	862.195 2	$C_{42}H_{38}O_{20}$	番泻苷 A	863.205 8, 683.140 6, 559.148 3, 531.130 9, 513.119 8, 487.142 4, 397.093 9	0.1
20	9.45	564.184 2	564.183 9	$C_{27}H_{32}O_{13}$	cascareside C	565.187 0, 529.165 5, 511.156 6, 481.143 8, 403.135 4, 311.128 8, 293.118 8, 275.106 7, 227.085 9	0.1
21	10.12	558.137 3	558.137 1	$C_{27}H_{26}O_{13}$	白皮杉醇-3'- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -(6'- <i>O</i> -galloyl)-葡萄糖苷	315.072 5, 297.061 5, 245.082 0, 171.029 8, 153.018 5	1.5
22	10.33	418.126 3	418.125 9	$C_{21}H_{22}O_9$	cassialoin	419.135 1, 257.081 4	2.2
6	11.53	454.141 6	454.141 2	$C_{28}H_{22}O_6$	gnetin C	455.150 5, 345.114 2, 333.114 0, 319.094 4, 123.044 4	2.6

续表 3

No.	$t_R/\text{min}$	实测值	理论值	分子式	化合物	二级碎片 $m/z$	$\delta$
23	12.50	416.110 7	416.111 1	$C_{21}H_{20}O_9$	大黄酚-1- $O$ - $\beta$ - $D$ -葡萄糖苷	417.116 3, 399.102 6, 374.098 7, 255.064 9	0.6
24	13.24	446.084 9	446.085 4	$C_{21}H_{18}O_{11}$	大黄酸-8- $O$ - $\beta$ - $D$ -葡萄糖苷	447.131 4, 315.052 8, 297.041 1, 285.077 0, 241.048 7, 285.077 0	4.6
25	13.51	502.111 1	502.112 2	$C_{24}H_{22}O_{12}$	大黄酚-8- $O$ - $\beta$ - $D$ -(6'- $O$ -malonyl)-葡萄糖苷	503.17, 37 5.11, 323.056 0, 279.06, 281.05, 243.103 7	4
26	14.34	542.142 4	542.142 1	$C_{27}H_{26}O_{12}$	白藜芦醇 4'- $O$ - $\beta$ - $D$ -(6''- $O$ -galloyl)-葡萄糖苷	379.105 5, 235.061 5, 217.050 9, 189.055 1	3.9
27	14.60	572.152 9	572.153 2	$C_{28}H_{28}O_{13}$	rhaponticin-2'- $O$ -gallate	379.104 8, 235.061 9, 217.051 1, 189.055 4, 177.055 5	4.6
28	15.11	298.047 7	298.048 0	$C_{16}H_{10}O_6$	虫漆酸 D	299.130 4, 281.046 1, 253.049 5, 225.055 3, 197.059 9, 169.063 8	3.4
29	17.27	432.052 8	432.052 3	$C_{21}H_{20}O_{10}$	芦荟大黄素 8- $O$ - $\beta$ - $D$ -葡萄糖苷	433.112 3, 343.084 3, 317.066 5, 271.060 7, 235.170 5, 201.054 4	0.3
32	18.28	404.147 1	404.147 4	$C_{21}H_{24}O_8$	去氧土大黄苷	405.156 5, 225.108 1, 195.094 9, 167.091 1	1.8
31	18.35	420.142 1	420.142 3	$C_{21}H_{24}O_9$	土大黄苷	421.150 4, 277.070 3, 259.097 0, 217.050 8, 189.055 2	-0.5
30	20.54	406.152 8	406.152 1	$C_{21}H_{26}O_8$	甲基虎杖苷	407.152 8, 227.109 1, 197.095 2, 169.090 8	2.4
33	21.86	432.052 8	432.053 1	$C_{21}H_{20}O_{10}$	芦荟大黄素- $O$ - $\beta$ - $D$ -葡萄糖苷	433.112 3, 343.084 3, 317.066 5, 271.061 8, 229.052 0	1.1
34	22.06	446.121 2	446.121 9	$C_{22}H_{22}O_{10}$	大黄素甲醚-8- $O$ - $\beta$ - $D$ -葡萄糖苷	447.125 2, 285.076 7, 283.059 1, 267.065 5, 239.070 8, 227.070 7	0.8
9	24.43	258.089 2	258.089 0	$C_{15}H_{14}O_4$	isohapontigenin	259.097 9, 244.073 7, 241.087 6, 231.102 0, 203.070 5	2.7
35	32.55	594.158 4	594.157 9	$C_{27}H_{30}O_{15}$	大黄素-龙胆二糖苷	595.348 4, 577.136 7, 549.103 7	0.6
13	34.95	508.115 8	508.116 0	$C_{30}H_{20}O_8$	大黄二萜酮 B	509.125 5, 491.132 3, 463.230 9	1.2

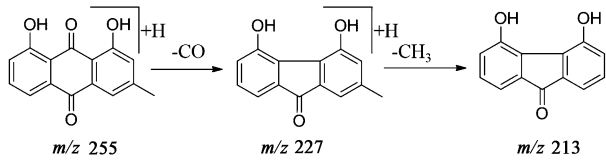


图 1 大黄酚的质谱裂解途径

Fig.1 Mass spectrometric fragmentation pathway of chrysophanol

化合物 5 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为  $[M + H]^+ m/z$  285.07, 保留时间为 33.12 min, 误差为 3.4, Peak view 定性分析软件推测其分子式为  $C_{16}H_{12}O_5$ , 该化合物二级质谱中, 产生碎片离子  $m/z$  243.06 比母离子少 43 Da, 为大黄素甲醚母核上失去  $CO$  和  $CH_3$  的碎片;  $m/z$  213.05 碎片离子为上个碎片离子脱去  $O$  的碎片; 该化合物裂解规律与大黄素甲醚裂解规律一致, 由此可以推测为大黄素甲醚。见图 2。

化合物 11 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为

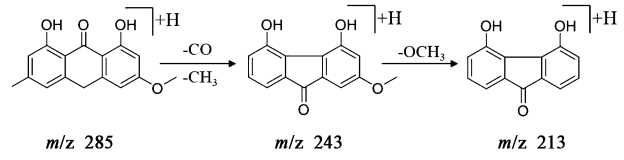


图 2 大黄素甲醚的质谱裂解途径

Fig.2 Mass spectrometric fragmentation pathway of physcione

$[M + H]^+ m/z$  285.08, 保留时间为 26.54 min, 误差为 4.8, Peak view 定性分析软件推测其分子式为  $C_{15}H_8O_6$ , 该化合物二级质谱中, 产生碎片离子  $m/z$  241.07 比母离子少 44 Da, 为大黄酸母核上失去  $COOH$  的碎片;  $m/z$  213.08 碎片离子为上个碎片离子脱去 1 分子  $CO$  环化而成;  $m/z$  185.08 碎片离子为上个碎片离子脱去 1 分子  $CO$  环化而成; 该化合物裂解规律与大黄酸裂解规律一致, 由此可以推测为大黄酸。见图 3。

化合物 12 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为

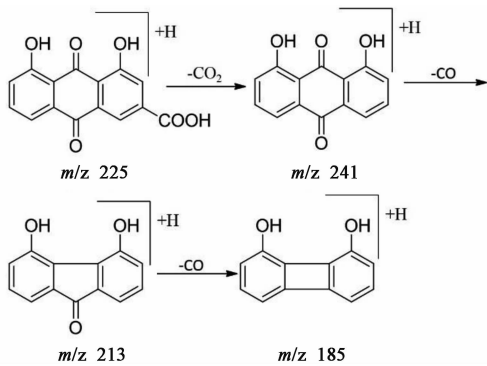


图 3 大黄酸的质谱裂解途径

Fig. 3 Mass spectrometric fragmentation pathway of rhein

[M + H]<sup>+</sup> *m/z* 271.05, 保留时间为 27.00 min, 误差为 2.4, Peak view 定性分析软件推测其分子式为 C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, 该化合物二级质谱中, 产生碎片离子 *m/z* 243.06 比母离子少 28 Da, 为大黄素母核上失去 CO 的碎片; *m/z* 227.06 碎片离子为上个碎片离子脱去中性 O 的碎片; *m/z* 199.07 碎片离子为上个碎片离子脱去 1 分子 CO 环化而成; 该化合物裂解规律与 大黄素裂解规律一致, 由此可以推测为大黄素。见图 4。

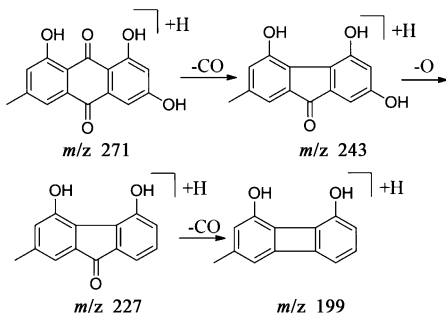


图 4 大黄素的质谱裂解途径

Fig. 4 Mass spectrometric fragmentation pathway of emodin

化合物 30 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 [M + H]<sup>+</sup> *m/z* 406.15, 保留时间为 20.54 min, 误差为 2.4, Peak view 定性分析软件推测其分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>, 该化合物二级质谱中, 产生碎片离子 *m/z* 227.10 比母离子少 162 Da, 为甲基虎杖苷母核上失去葡萄糖的碎片; *m/z* 197.09 碎片离子为上个碎片离子脱去 1 分子 OCH<sub>3</sub> 的碎片; *m/z* 185.08 碎片离子为上个碎片离子脱去 1 分子 CO 环化而成; 该化合物裂解规律与 甲基虎杖苷裂解规律一致, 由此可以推测为甲基虎杖苷。见图 5。

根据裂解规律及文献, 从石油醚部位, 鉴定了 9 个化合物, 主要是脂肪酸类, 以丢失 CH<sub>2</sub> 为主; 从乙酸乙酯中, 鉴定了 13 个化合物, 主要是游离蒽醌类,

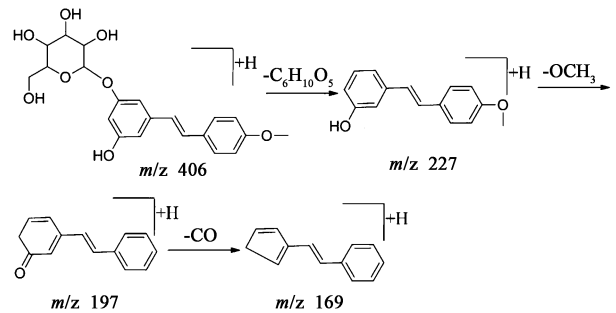


图 5 甲基虎杖苷的质谱裂解途径

Fig. 5 Mass spectrometric fragmentation pathway of deoxyrhaponticin

比如大黄素, 大黄酚, 大黄素甲醚等; 从正丁醇中鉴定了 25 个化合物, 主要是苷类, 该部位化合物主要具有糖片段, 如大黄酸 8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷; rhaponticin-2'-*O*-gallate 等。亚大黄的石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位分别进入 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析, 在负离子模式下总离子流图见图 6。

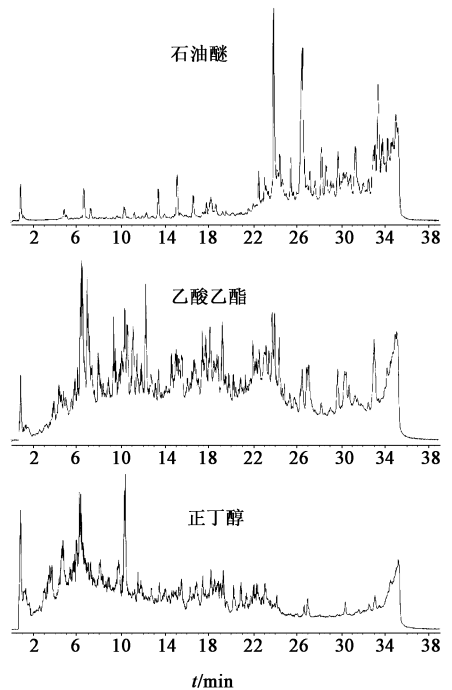


图 6 亚大黄石油醚、乙酸乙酯及正丁醇部位的总离子流

Fig. 6 Total ion flow diagram of petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol of *Rheum ihasaense*

#### 4 结论

亚大黄是传统是藏药中常用的清热解毒中药, 有研究发现抑制补体过度激活是清热解毒药发挥药效的重要途径之一<sup>[4,14]</sup>。前期研究发现亚大黄 95% 醇提物具有显著的抗补体活性为 0.032 g·L<sup>-1</sup>, 但亚大黄中的药效物质基础, 特别是补体抑制活性成分还缺乏研究。本实验基于 UPLC-Q-TOF-MS/

MS技术,结合抗补体活性测试,快速分析了亚大黄中的抗补体活性成分群部位,避免了传统分离手段的耗时盲目及活性成分的丢失。通过正负离子模式,基于化合物的精确相对分子质量、相关数据库和参考文献,从亚大黄中共鉴定出34个化合物,与同属植物大黄成分相近<sup>[15-16]</sup>。结果发现正丁醇部位是亚大黄的抗补体活性部位,从正丁醇部位鉴定25个化合物,主要是蒽醌苷类和二苯乙烯苷类化合物。本研究为控制亚大黄药材的质量、稳定其临床疗效及阐释其抗补体药效物质基础提供了科学依据。

[参考文献]

[1] Clark N M, Lynch J P. Influenza: epidemiology, clinical features, therapy, and prevention [J]. *Semin Resp Crit Care M*, 2011, 32(4):373-392.

[2] Peiris J S M, Chu C M, Cheng V C C, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study [J]. *Lancet*, 2003, 361(9371):1767-1772.

[3] 徐晗,章蕴毅,张建文,等.天然产物中的抗补体活性成分[J]. *中国天然药物*, 2007, 5(5):322-332.

[4] XU H, ZHANG Y Y, ZHANG J W, et al. Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 7(2):175-182.

[5] SONG W H, CHENG Z H, CHEN D F. Anticomplement monoterpenoid glucosides from the root bark of *Paeonia suffruticosa* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 77(1):42-48.

[6] 南海江,许旭东,陈士林,等.大黄属植物研究进展

[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(4):690-701.

[7] 张宁,常春,傅强. HPLC法测定藏药亚大黄中黄酮类成分的研究[J]. *高原医学杂志* 2013, 23(4):55-56.

[8] GAO L L, XU X D, YANG J S, et al. Chemical constituents of the roots of *Rheum officinale* [J]. *Chem Nat Compd*, 2013, 49(4):603-605.

[9] WANG Z, MA P, XU L J, et al. Evaluation of the content variation of anthraquinone glycosides in rhubarb by UPLC-PDA [J]. *Chem Cent J*, 2013, 7(1):170-175.

[10] LI J L, WANG A Q, WU Z Z. Studies on non-anthraquinones in *Rheum officinale* Baill [J]. *China J Chin Mater Med*, 2000, 25(10):612-614.

[11] 崔培坤. 大黄蒽醌 ESI-ITMS<sup>n</sup> 质谱行为的量子化学辅助研究[D]. 佳木斯:佳木斯大学, 2013.

[12] 马小红,沈少林,韩凤梅,等. 大黄蒽醌类化合物电喷雾质谱研究[J]. *湖北大学学报:自然科学版*, 2006, 28(4):403-406.

[13] 陈勇,沈少林,陈怀侠,等. 中药大黄蒽醌类物质电喷雾质谱裂解规律研究[J]. *分析实验室*, 2003, 22(suppl):91-92.

[14] 狄宏晔,章蕴毅,陈道峰. 补体抑制活性柴胡多糖及其作用靶点研究[J]. *中国天然药物*, 2013, 11(2):177-184.

[15] 刘娟,魏胜利,刘春生,等. HPLC测定2种大黄中4类功效组分含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(24):157-161.

[16] 程小丽,魏胜利,刘春生,等. RP-HPLC-DAD同时测定大黄中9种有效成分的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(18):99-102.

[责任编辑 顾雪竹]