

# LC-MS/MS 法分析西藏不同产地 大花红景天中主要化学组成\*

唐诚芳<sup>1</sup>, 蒋思萍<sup>2</sup>, 陈彬<sup>2</sup>, 徐爱国<sup>2</sup>, 周海云<sup>1</sup>, 刘岚<sup>3</sup>

(1. 中山大学测试中心, 广东 广州 510275;

2. 西藏自治区高原生物研究所, 西藏 拉萨 850001;

3. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

**摘要:** 采用超高相液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪(UPLC-MS/MS), 在电喷雾负离子模式下, 对6个从西藏不同地区采集的大花红景天植物药材的甲醇提取液进行分析, 通过准分子离子及其二级质谱碎片等信息归属了12个化合物, 并且初步比较了样品中相关化合物相对含量的差异。结果表明, 采集地不同, 植物药材中化学组成存在明显的差异。

**关键词:** 大花红景天; UPLC-ESI-MS/MS; 化学组成; 红景天苷; 黄酮苷

**中图分类号:** R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2013)06-0099-05

## Analysis of Chemical Composition of *Rhodiola crenulata* Collected from Tibet by LC-MS/MS

TANG Chengfang<sup>1</sup>, JIANG Siping<sup>2</sup>, CHEN Bin<sup>2</sup>, XU Aiguo<sup>2</sup>, ZHOU Haiyun<sup>1</sup>, LIU Lan<sup>3</sup>

(1. Instrumental Analysis and Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Tibetan Plateau Institute of Biology, Lasa 850001, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Six *Rhodiola crenulata* samples collected from different places in Tibet were extracted by methanol and analyzed using UPLC-ESI-MS/MS in negative-ion mode. In addition to 12 compounds identified based on quasi-molecular ion and MS2 fragment ions, the differences of the relative content of related compounds were compared. The results showed that there were obvious differences in the composition of identified compounds in herbs with different collection places.

**Key words:** *Rhodiola crenulata*; UPLC-ESI-MS/MS; chemical composition; Salidroside; flavone

红景天属植物为景天科(*Crassulaceae*)红景天属(*Rhodiola*)植物。我国红景天植物有70余种, 主要分布在西南、西北、华北、华中及东北地区, 西南及西北地区种类多, 蕴藏量较大。西藏产30余种, 资源分布较丰富, 种类及蕴藏量均占世界首位<sup>[1]</sup>。红景天植物中的大花红景天别名宽瓣红景天、宽叶景天, 是红景天的优良品种之一, 已先后收载于《中华人民共和国卫生部藏药标准》和《中国药典》2005年、2010年版<sup>[2]</sup>。

据报道, 红景天富含苯乙醇类、黄酮类、萜类、有机酸类等成分<sup>[3]</sup>, 具有刺激神经系统, 改善睡眠、保护心血管特性、抗肿瘤、抗辐射、抗抑郁、抗炎等药理作用<sup>[4-5]</sup>。现有研究表明, 不同产地之间红景天药材其化学成分存在一定的差异<sup>[6-7]</sup>, 本文采用UPLC-ESI-MS/MS联用技术测定了6个采自西藏不同地区的大花红景天植物药材的甲醇提取液, 利用ESI-MS得到的信息结合相关文献, 对主要谱峰进行归属, 并比较相关化合物相

\* 收稿日期: 2013-08-19

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2012CB722905)

作者简介: 唐诚芳(1987年生), 女; 研究方向: 药物仪器分析; 通讯作者: 蒋思萍; E-mail: jiangsiping2003@yahoo.com.cn

对含量的差异,为合理开发西藏大花红景天药用植物资源提供参考。

## 1 仪器与试药

TSQ Quantum Ultra 三重四极杆串联液质联用仪 (ThermoFisher), 配 ESI 离子源, 自动进样器。仪器自带 Xcalibur 数据处理系统。

对照品没食子酸和红景天苷购自中国药品生物制品所。超纯水 (Millipore, USA), 乙腈 (色谱纯, Merck), 甲酸为国产分析纯。

在西藏那曲、山南和林芝等地区县采集 6 个大花红景天药材, 药材具体采集地信息如下: 1 号为林芝米拉山、2 号为林芝季拉山、3 号为林芝朗县、4 号为林芝米林县、5 号为那曲县、6 号为山南桑日县。经西藏高原生物研究所李晖研究员鉴定, 均为大花红景天 (*Rhodiola crenulata*)。

样品切片、阴干, 用粉碎机粉碎, 过 50 目筛, 玻璃瓶储装备用。

## 2 实验方法

### 2.1 液相色谱条件

色谱柱为 Hypersil GOLD C18, 100 × 2.1 mm, 1.9 μm (Thermo 公司), 柱温 35 °C。流动相 φ = 0.05% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B) 梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0 ~ 1 min, 2% B; 1 ~ 8 min, 2% ~ 19.5% B; 8 ~ 17 min, 19.5% ~ 35.5% B; 17 ~ 20 min, 35.5% ~ 100% B; 20 ~ 25 min, 100% B。进样量为 0.3 μL, 流速为 200 μL/min, 分析时间 25 min。

### 2.2 质谱条件

电离源: - ESI, 扫描范围  $m/z$  100 ~ 1 000 u。离子源参数: 喷雾电压: -3 kV, 汽化温度: 350

°C; 鞘气压力: 30 arb; 辅助气压力: 5 arb; 毛细管温度: 350 °C; 碰撞电压: 25 V。

### 2.3 样品溶液的制备

精密称取样品粉末 0.5 g 置顶空瓶中, 准确加入甲醇 10 mL, 密塞。置恒温箱中 68 °C 加热 40 min 后放置室温冷却, 称量用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 10 000 r/min 转速下离心 5 min, 取上清液, 过滤 (5 μm) 即得待测样品溶液。

### 2.4 对照品溶液的制备

取没食子酸和红景天苷对照品适量, 分别以甲醇溶解备用。

## 3 结果

### 3.1 大花红景天样品之间的总离子流图比较

样品的总离子流图 (TIC) 如图 1 所示。样品大部分组分在 25 min 之前基本流出。从谱峰的数目、流出时间、谱峰的相对强度进行分析, 可以初步比较出样品之间存在的相似以及差异的地方。

0 ~ 5 min 时间段, 出峰数目较少,  $t_R = 1.3$  min 和 3.0 min 为主要的共同的谱峰。

5 ~ 13 min 时间段, 出峰数目比较多和集中, 除了谱峰响应值有差异以外, 出峰的数目及其相对应的流出时间基本接近。

13 min 以后, 样品图谱间的差异明显, 表现在 13.5 ~ 15 和 18 min 以后的时间段, 2 号、3 号、4 号样品有较强相应的谱峰, 而 1 号、5 号和 6 号样品在此区域则没有响应信号。

2 号样品出峰数目相对较多, 其 TIC 图如图 2。

### 3.2 大花红景天的 HPLC-ESI/MS 分析及样品之间化学成分的差异

红景天苷、大花红景天素、红景天素、没食子

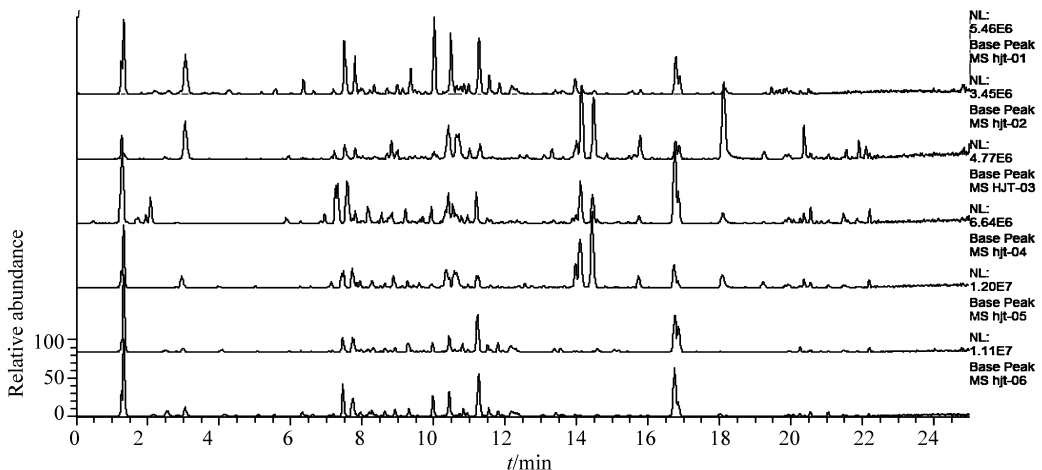


图 1 大花红景天样品的总离子流质谱图 (TIC)

Fig. 1 Total ion chromatograms (TIC) of *Rhodiola crenulata*

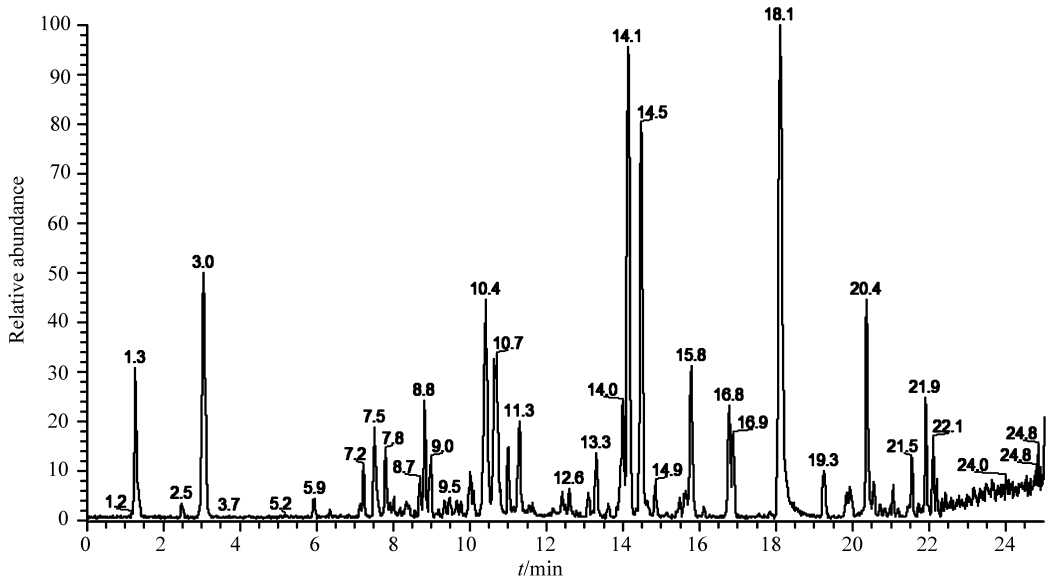


图 2 大花红景天 2 号样品的 TIC 图

Fig. 2 TIC of No. 2 *Rhodiola crenulata*

酸、黄酮及其糖苷等构成红景天的有效成分。本实验对质谱图中信号较强的谱峰通过其  $[M-H]^-$  准分子离子峰及二级质谱产生的碎片信息进行了化合物的归属,同时比较了所归属化合物在 6 个样品之间的差异,结果见表 1。

$t_R = 3.0$  min 谱峰的基峰  $[M-H]^-$  为  $m/z$  169, 二级质谱产生的碎片有  $m/z$  125、97 和 79, 与对照品没食子酸的出峰时间、质谱信息一致。有文献报道<sup>[8]</sup>, 没食子酸具有抗肿瘤、抗突变、抗氧化、抗乙肝病毒等生物学活性。1 号、2 号样品中没食子酸含量明显高于其它样品的量, 其中 5 号样品的量检出最少。

红景天苷是目前文献和中国药典中衡量大花红景天质量的主要指标之一。红景天苷对照品出峰时间在  $t_R = 7.5$  min。样品在相应保留时间都有强度不一的谱峰, 质谱图对应  $m/z$  299 的基峰,  $m/z$  299 的二级碎片主要有  $m/z$  141、119, 与对照品红景天苷的质谱信息一致。以红景天苷的峰强度作为判断指标时, 1 号样品的量最高, 6 号, 3 号, 5 号, 4 号, 2 号样品的量依次减少, 其中 2 号, 4 号, 5 号样品的量基本接近。

大花红景天素(相对分子质量为 480)和红景天素(相对分子质量为 610)是大花红景天植物中特征成分, 后者属于黄酮化合物, 苷元为草质素(3, 5, 7, 8, 4'-五羟基黄酮)。以大花红景天素的  $[M-H]^-$   $m/z$  479 为基峰判断标准进行质谱图的选择离子提取, 得到 1 个峰 ( $t_R = 20.4$  min),

其二级质谱产生  $m/z$  300、299, 271、255 等主要碎片(图 3), 结合大花红景天素的化学结构<sup>[9]</sup>, 这些二级质谱碎片的和归属裂解途径都能得到合理的解释(图 3), 因此  $t_R = 20.4$  min 的峰被鉴定为大花红景天素。在所分析的 6 个样品中, 2 号样品大花红景天素明显高于其它 5 个样品。同样, 对红景天素的  $[M-H]^-$   $m/z$  609 进行质谱图的选择离子提取<sup>[1,10]</sup>, 也得到  $t_R = 14.1$  min 的一个谱峰, 其二级质谱只产生  $m/z$  301 的碎片(图 4), 对应红景天素母离子脱去二糖基后的黄酮苷元草质素。在分析的 6 个样品中, 2 号和 4 号含量均较高, 5 号和 6 号样品几乎未检出。

除上述特征组分以外, 山奈酚、草质素及其糖苷化合物也构成红景天主要物质组成<sup>[1,3,5,9-10]</sup>。黄酮苷化合物的电喷雾质谱有明显的质谱特征, 母离子的二级质谱中糖苷键容易断裂失去糖基得到信号非常强的苷元碎片信息, 从丢失的碎片可以推测苷元上所连接的糖基, 如失去 162、146 分别对应于母离子失去一分子脱氧葡萄糖、一分子脱氧鼠李糖, 失去 308 对应于母离子失去芸香糖苷。

山奈酚、槲皮素和草质素的鼠李糖、葡萄糖苷均有文献报道存在于红景天药材中<sup>[9,11-14]</sup>。在  $t_R = 14.0$  min 观察到  $m/z$  463 的基峰, 它产生碎片中存在  $m/z$  301 碎片, 对应黄酮苷母核槲皮素;  $t_R = 12.6$ 、14.9 和 15.8 min 分别观察到  $m/z$  447、 $m/z$  593 和  $m/z$  431 的基峰, 它们产生碎片中均存在非常强的  $m/z$  285 碎片, 对应黄酮苷母核山奈酚。这

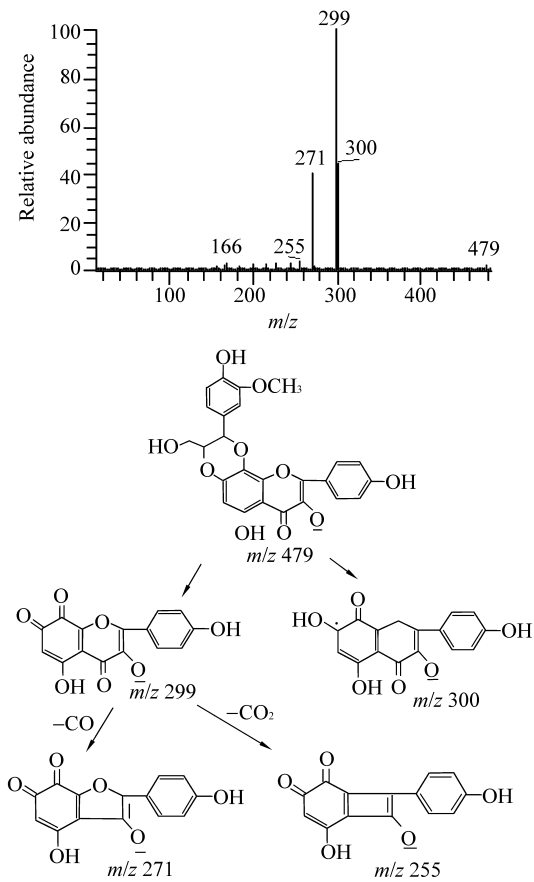


图 3 大花红景天素  $[M-H]^-$   $m/z$  479 的二级质谱图及其产生的二级质谱碎片的可能归属  
Fig. 3 MS<sup>2</sup> of  $m/z$  479, and its possible fragmentation pathway

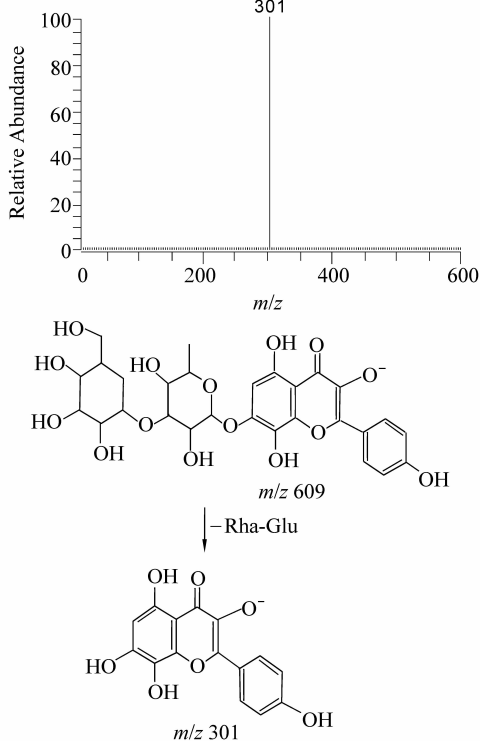


图 4 红景天素  $[M-H]^-$   $m/z$  609 的二级质谱图及其产生的二级质谱碎片的可能归属  
Fig. 4 MS<sup>2</sup> of  $m/z$  609, and its possible fragmentation pathway

些化合物从母离子到  $m/z$  301 或  $m/z$  285 的质量丢失分别为 162、308 和 146, 可以推测  $t_R = 14.0$  min 的化合物为槲皮素-葡萄糖苷, 12.6 min 对应化合物为山奈酚-葡萄糖苷, 而 14.9 min 对应的化合物为山奈酚-芸香糖苷,  $t_R = 15.8$  min 的化合物为山奈酚-鼠李糖苷 (表 1、图 5)。山奈酚具有抗菌、抗氧化、止咳等多种功效, 样品中鉴定出山奈酚及其单糖、二糖苷的存在, 但这些化合物在不同产地的红景天样品中的相对含量有明显差异。

在  $t_R = 10.4$  和 10.7 min 有两个强峰 (图 6), 对应  $[M-H]^-$   $m/z$  607 和  $m/z$  445, 两者都有相同的碎片  $m/z$  299, 从碎片丢失可以推测出前者是芸香糖苷, 后者是鼠李糖苷, 苷元为甲氧基三羟基黄酮。

以上述已基本确定结构化合物的各自峰面积占总出峰面积的百分比来表示这些化合物的相对含量, 结果见表 1。选取 2 号样品, 按 2.1 和 2.2 项下的色谱条件连续进样 3 次, 测定其中代表化合物红景天苷的峰面积, 结果显示, 其峰面积的 RSD = 8.61%, 保留时间的 RSD = 0.34%。

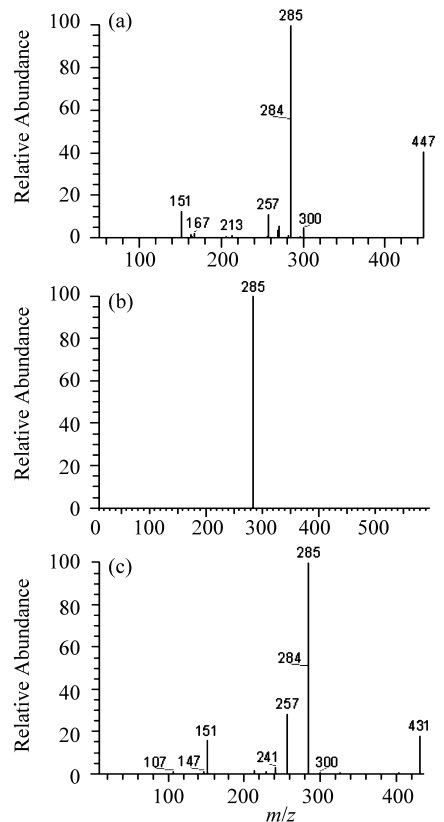


图 5 以山奈酚为母核的黄酮苷类化合物的二级质谱图  
Fig. 5 MS<sup>2</sup> of flavonoid glycosides compounds of kaempferol  
a: 山奈酚-葡萄糖苷; b: 山奈酚-芸香糖苷;  
c: 山奈酚-鼠李糖苷

表 1 主要化学成分的比较

Table 1 Comparison of the main chemical composition

编号	$t_R/\text{min}$	$[M-H]^-$	$MS^2$ (base peak/%)	归属	各批次样品相对峰面积/%					
					1	2	3	4	5	6
1	3.0	169	125(100), 97(20), 79(30)	没食子酸	7.61	6.66	3.51	3.13	1.42	2.13
2	7.5	299	141(20), 119(85)	红景天苷	7.82	2.01	3.72	2.50	2.73	4.51
3	10.4	607	299(100), 271(15)	甲氧基三羟基黄酮-芸香苷	0.99	6.28	3.24	5.55	0.54	0.48
4	10.7	445	299(100), 271(30), 243(4), 215(6)	甲氧基三羟基黄酮-鼠李糖苷	1.22	6.29	2.87	6.18	0.82	0.62
5	12.6	447	300(8), 285(100), 284(55), 271(9), 257(12)	山奈酚-葡萄糖苷	0.09	0.35	0	0	0	0
6	14.0	463	301(100), 300(18), 271(1), 255(1)	槲皮素-葡萄糖苷	0	1.74	0.47	0.86	0.11	0.04
7	14.1	609	301(100)	红景天素	0.80	11.13	6.24	12.3	0.33	0.14
8	14.5	447	301(100), 300(4), 273(2)	草质素-鼠李糖苷	0.60	9.18	4.41	15.7	0.35	0
9	14.9	593	285(100)	山奈酚-芸香苷	0.13	0.50	0.20	0.40	0	0
10	15.8	431	285(100), 284(65), 257(20), 151(18)	山奈酚-鼠李糖苷	0.74	3.18	1.26	2.65	0.08	0.11
11	18.1	285	257(2), 229(4), 199(2), 151(2), 135(2)	山奈酚	1.41	15.78	2.64	4.08	0.13	0.30
12	20.4	479	301(10), 300(45), 299(100), 271(40), 255(4)	大花红景天素	0.77	3.96	1.39	1.68	0.27	0.26

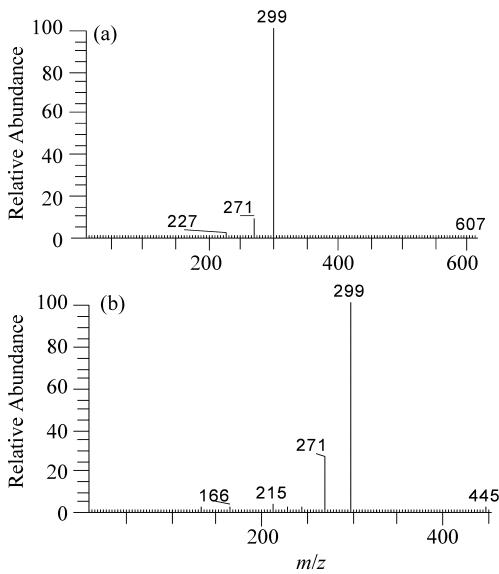


图 6 以甲氧基三羟基黄酮为母核的黄酮苷类化合物的二级质谱图

Fig. 6  $MS^2$  of flavonoid glycosides compounds of methoxy trihydroxy flavone

a: 甲氧基三羟基黄酮-芸香苷;  
b: 甲氧基三羟基黄酮-鼠李糖苷

## 4 结 论

本文采用了 UPLC-ESI-MS/MS 联用技术, 对 6 个不同产地的大花红景天的甲醇提取液进行主要化学成分分析。综合实验结果, 西藏不同产地采集的红景天药材之间红景天苷、大花红景天素、没食子酸、黄酮等主要的化学成分存在着差异。除了红景天苷以外, 其它化合物如黄酮苷类化合物均有一定的药效, 因而在开发西藏大花红景天植物药材是应综合考虑所含的有效化合物成分。

### 参考文献:

[1] 朱曼萍. 大花红景天的化学成分及质量研究[D]. 北

京:北京中医药大学,2007.

[2] 崔秀梅,商国懋,吴建民. 不同产地大花红景天中红景天苷含量比较[J]. 中国现代中药,2010,12(9):26-27.

[3] 马朝阳. 玫瑰红景天有效成分分离纯化及结构鉴定[D]. 江苏:江南大学,2009.

[4] ALEKSANTERI PETSALO, JORMA JALONEN, ARI TOLONEN. Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2006,1112:224-231.

[5] 倪付勇,陈重,许琼明,等. 高山红景天化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(7):798-802.

[6] 陈海娟,王慧春,张国燕,等. RP-HPLC 法比较青海不同产地红景天属药材中成分组成的差异性[J]. 亚太传统医药,2012,8(8):31-33.

[7] 谢惜娟,陈彬,刘岚,等. HS-GC-MS 法分析比较十二种西藏红景天样品的挥发性成分[J]. 中山大学学报:自然科学版,2013,52(5):97-102.

[8] 李肖玲,崔岚,祝德. 没食子酸生物学作用的研究进展[J]. 中国药师,2004,10(07):767-769.

[9] 杜玫,谢家敏. 云南大花红景天化学成分研究[J]. 化学学报,1994,52:927-931.

[10] 霍佳丽,王建华,吴志军,等. 新疆大花红景天化学成分的 HPLC-MS 研究[J]. 天然产物研究与开发,2012,24:1405-1407.

[11] ABLAJAN K, TUOHETI A. Fragmentation characteristics and isomeric differentiation of flavonol *o*-rhamnoses using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry,2013,27:451-460.

[12] 彭江南,马成禹,葛泳潮,等. 大花红景天化学成分的研究[J]. 中草药,1995,26(4):177-178.

[13] 吴少雄,郭亚东,郭祀远,等. 大花红景天乙醇提取物的化学成分研究[J]. 现代食品科技,2008,24(4):322-326.

[14] PANOSSIAN A, WIKMANA G, SARRIS J. Rosenoot (*Rhodiolarosea*): Traditional use chemical composition, pharmacology and clinical efficacy[J]. Phytomedicine, 2010,17:481-493.