

· 基础研究 ·

基于 LC-MS 联用的杜仲主要化学成分定性
及定量分析[△]雒晓梅¹, 宿美凤^{1,2}, 常晓燕¹, 王小明¹, 李壮壮¹, 王卫华³, 孙桂波¹, 石钺^{1*}

1. 北京协和医学院 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 北京中医药大学, 北京 100029; 3. 清华大学 药学技术中心, 北京 100084

[摘要] **目的:** 建立超高效液相串联质谱(UPLC-MS/MS)对杜仲主要成分定量及定性的方法。**方法:** 采用UPLC-QE高分辨质谱负离子监测模式进行定性分析; 采用UPLC-MS/MS法, 负离子多反应监测(MRM)模式进行含量测定, 分析杜仲中松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、丁香脂素二葡萄糖苷、桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸、车叶草苷共7个主要成分的含量。**结果:** 定性共鉴定出98个化合物, 包括木脂素类38个, 环烯醚萜类13个, 黄酮类9个, 苯丙素类15个, 酚类7个, 其余化合物共16个; 定量分析在考察的浓度范围内测定的成分线性关系良好($r > 0.9957$), 精密度RSD < 3.42%, 重复性RSD < 4.32%, 回收率($n = 9$)均在91.04% ~ 108.15%, RSD均小于4.89%。**结论:** 该方法灵敏度高、重复性好, 分析快速、准确、可靠, 可用于定性、定量检测杜仲中主要化学成分, 为综合评价杜仲的质量提供参考。

[关键词] 杜仲; 超高效液相串联质谱; 化学成分; 含量测定

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)08-1029-12

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190129004

Qualitative and Quantitative Analysis of Main Chemical Constituents in *Eucommia ulmoides* by LC-MSLUO Xiao-mei¹, SU Mei-feng^{1,2}, CHANG Xiao-yan¹, WANG Xiao-ming¹, LI Zhuang-zhuang¹,WANG Wei-hua³, SUN Gui-bo¹, SHI Yue^{1*}1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science,
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Center of Pharmaceutical Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

[Abstract] **Objective:** The study is aimed at establishing a method for quantitative and qualitative determination of main components of *Eucommia ulmoides* by ultrahigh performance liquid phase tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods:** UPLC-QE method was used for qualitative analysis with negative ion detection model. UPLC-MS/MS method with negative ion MRM detection mode were used to determine the contents of 7 main components in the *E. ulmoides* (pinosresinol diglucoside, pinosresinol-4-*O*-glucoside, geniposidic acid, liriiodendrin, asperuloside, geniposide). **Results:** A total of 99 chromatographic peaks were identified, including 38 lignin, 13 iridoterpenes, 9 flavonoids, 15 phenylaloxins, 7 phenols and 17 other compounds. The linear relationship of the components measured in the concentration range examined was good ($r > 0.9957$), the precision RSD < 3.42%, the reproducible RSD < 4.32%, and the recoveries rate ($n = 9$) were ranged from 91.04% to 108.15%, and the RSD was smaller than 4.89%. **Conclusion:** The UPLC-MS/MS method has high sensitivity and good reproducibility, and the analysis is fast, accurate and reliable. It can be used to qualitatively and quantitatively detect the main chemical components in *E. ulmoides*, and provide a reference for comprehensive evaluation of *E. ulmoides* quality.

[Keywords] *Eucommia ulmoides* Oliv.; UPLC-MS/MS; chemical constituent; content determination

[△] [基金项目] 中医药行业科研专项(201507004)

* [通信作者] 石钺, 研究员, 研究方向: 中药及复方药效物质基础及其质量控制方法; Tel: (010)57833255, E-mail: shiyue1029@126.com

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 为杜仲科杜仲属落叶乔木,是我国特有的第三纪孑遗植物。杜仲干燥树皮自古以来以名贵滋补中药材而著称,用药历史悠久,《神农本草经》将其列为上品,杜仲味辛性平,主治腰膝痛、补中、益精气、坚筋骨、强志,除阴下痒湿,小便余沥^[1]。历版《中华人民共和国药典》均有将杜仲收录在册^[2],现代研究表明杜仲树皮主要化学成分包括木脂素、环烯醚萜、黄酮、苯丙素、酚酸、甾醇及三萜、多糖、抗菌蛋白等,具有降压、降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗菌抗病毒、保肝护肾等药理活性^[3-6]。目前国内学者对杜仲的研究集中在药理活性^[7]、成分分析^[8]、质量评价等^[9-11]方面。本实验在前期的研究基础上,首次采用四级杆-静电轨道阱高分辨质谱(UPLC-QE)对杜仲70%乙醇水提取物的化学成分进行定性分析,采用超高效液相串联质谱(UPLC-MS/MS)三重四级杆质谱仪对其中7个主要成分(松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、丁香脂素二葡萄糖苷、桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸、车叶草苷)进行定量分析,以期完善杜仲临床药效的物质基础,对其进一步合理开发用药及质量控制提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 超高效液相(美国戴安公司)串联 Thermo Q Exactive™ Plus Orbitrap™ 高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司), Agilent1290-QQQ6460 液相色谱串联三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司), Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), Mettler Toledo AB135-S 型分析天平(十万分之一,瑞士), KQ-250DE 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药材与试剂

杜仲(批号:DC1211)购于北京华邈药业有限公司,经北京师范大学资源学院杜树山教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮,药品标本现保存于中国医学科学院药用植物研究所植物化学研究室。对照品均购于成都克洛玛生物科技有限公司,包括松脂醇二葡萄糖苷(批号:CHB170307)、松脂醇单葡萄糖苷(批号:CHB161227)、丁香脂素二葡萄糖苷(批号:CHB170706)、桃叶珊瑚苷(批

号:CHB161103)、京尼平苷(批号:CHB171130)、京尼平苷酸(批号:CHB161101)、车叶草苷(批号:CHB161228)、山柰酚(批号:CHB170224)、黄芩苷(批号:CHB170720)、芦丁(批号:CHB170303)、槲皮素(批号:CHB171229)、绿原酸(批号:CHB170713)、原儿茶酸(批号:CHB170822)、阿魏酸(批号:CHB160913)、咖啡酸(批号:CHB160907),上述对照品 HPLC 法测定质量分数 ≥ 98%。乙腈(色谱级)、甲醇(色谱级)购于 Honeywell Burdick&Jackson 公司。甲酸(色谱级)、氨水(色谱级)购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司,去离子水由 Milli-Q 纯水系统制备。

2 定性分析方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 供试品溶液制备 将干燥的杜仲树皮剪碎称取适量,加入8倍量70%乙醇水热回流提取3次,每次1.5 h,滤过得提取药液,合并3次滤液,减压浓缩得流浸膏(得膏率为25%)。称取上述浸膏1.202 0 g溶于50%甲醇中配成终质量浓度0.5 mg·mL⁻¹(生药质量浓度2 mg·mL⁻¹)的供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液配制 分别精密称取松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、丁香脂素二葡萄糖苷、桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸、车叶草苷、山柰酚、黄芩苷、芦丁、绿原酸、原儿茶酸、阿魏酸,配制质量浓度为1 mg·mL⁻¹的对照品贮备液,取适量对照品贮备液混合后,得对照品混合液。

2.2 液质条件

2.2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A:乙腈,流动相 B:0.1%甲酸-水;流速:0.2 mL·min⁻¹;进样量:5 μL;自动进样器温度:10 °C。梯度洗脱条件:0 ~ 2.0 min, 5% ~ 5% A; 2.0 ~ 42.0 min, 5% ~ 50% A; 42.0 ~ 55.0 min, 50% ~ 50% A; 55.0 ~ 55.1 min, 50% ~ 5% A; 55.1 ~ 60.0 min, 5% ~ 5% A。

2.2.2 质谱条件 ESI 离子源,负离子检测模式,喷雾电压:-2800 V;毛细管温度:320 °C;保护气体流速:35 L·min⁻¹;辅助气体流速:10 L·min⁻¹;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 100 ~ 1500,阶梯碰撞能量:20、40、60 V。

2.3 杜仲化学成分数据库的建立

根据 Dictionary of Natural Product 数据库 (<http://www.chemnetbase.com>)、TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 以及文献检索所提供的杜仲树皮的化学成分, 结合 Chemspider、Pubchem、Chembook 数据库的化合物信息, 构建杜仲的化学成分信息库, 包括化合物的名称、分子式、分子量和 CAS 号等。

2.4 数据处理

将 UPLC-QE 所采集的原始数据导入 Thermo Compound Discover 2.0 (CD) 分析软件进行初步计算, CD 软件可充分利用高保真的 Orbitrap 数据来准确鉴定复杂基质中的化合物, 通过定制相应的工作流程, 结合了多种识别技术, 包括与 mzCloud 库、mzVault 库、Chemspider 库进行碎片及分子量匹配, 从而初步筛选得出杜仲提取物中可能存在的化合物。此外, 借助 Thermo Xcalibur 2.2 分析软件对质谱数据进行进一步分析和处理, 根据高分辨质谱信息对其分子式进行推导, 偏差不得大于 5×10^{-6} , 对照参考文献^[12-13]、各种在线数据库, 推导可能的裂解碎片,

最终确定杜仲提取物中存在的化合物。

2.5 定性分析结果

按 2.2 项下条件对杜仲提取物进行分析, 负离子模式下的总离子流色谱图见图 1。通过与对照品比对及数据解析共确定 98 个化合物结构, 包括木脂素类 38 个, 环烯醚萜类 13 个, 黄酮类 9 个, 苯丙素类 15 个, 酚类 7 个, 三萜类、甾醇、小分子酸及其他化合物共 16 个。定性的结果如表 1 所示。

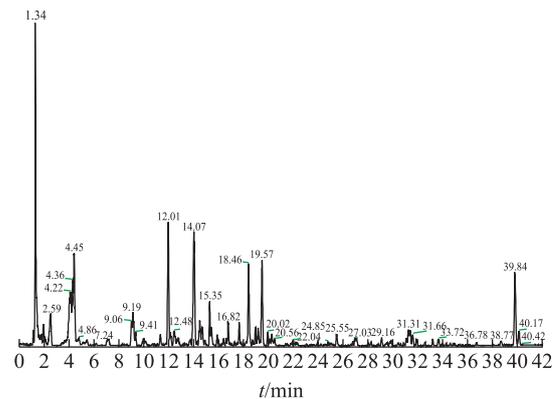


图 1 杜仲 70% 乙醇水提取物的总离子流图

表 1 杜仲 70% 乙醇水提取物中主要化合物

| 序号 | 化合物名称 | 分子式 | t_R /min | Error | $[M-H]^-$ | MS ^a |
|-----|-----------------|---|------------|-------|------------|--|
| 1 | 马来酸 | C ₄ H ₄ O ₄ | 1.824 | -0.84 | 115.003 58 | 71.013 79 |
| 2 | 没食子酸 | C ₇ H ₆ O ₅ | 2.458 | -0.24 | 169.014 21 | 142.946 46, 125.024 40, 114.951 53 |
| 3 | 梓醇 | C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀ | 2.510 | 0.15 | 361.114 07 | 181.050 63, 137.060 73, 122.037 38, 109.065 81 |
| 4 | 去乙酰车叶草酸 | C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁ | 2.540 | 0.43 | 389.109 10 | 345.119 29, 227.056 15, 183.066 27, 165.055 65, 139.040 12 |
| 5* | 桃叶珊瑚苷 | C ₁₅ H ₂₂ O ₉ | 2.557 | -0.52 | 345.118 93 | 183.066 27, 165.055 60, 139.040 12, 121.029 28 |
| 6 | 焦性没食子酸 | C ₆ H ₆ O ₃ | 2.910 | -0.58 | 125.024 35 | 108.021 61, 97.029 40, 95.013 81 |
| 7 | 愈创木基丙三醇 | C ₁₀ H ₁₄ O ₅ | 3.008 | 0.06 | 213.076 86 | 183.066 22, 165.055 53, 151.076 40, 123.045 08 |
| 8 | 4-吡喃葡萄糖氧基-3-苯甲酸 | C ₁₄ H ₁₈ O ₉ | 3.779 | 3.41 | 329.088 93 | 167.034 90, 152.011 43, 123.045 10, 108.021 63 |
| 9* | 京尼平苷酸 | C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀ | 4.175 | -0.51 | 373.113 83 | 211.061 04, 193.050 35, 167.071 24, 149.060 68, 123.045 10 |
| 10 | 地黄素 C | C ₉ H ₁₂ O ₅ | 4.230 | -0.51 | 199.061 19 | 155.071 37, 137.060 75 |
| 11 | 龙胆酸 | C ₇ H ₆ O ₄ | 4.456 | -0.49 | 153.019 23 | 109.029 40 |
| 12* | 原儿茶酸 | C ₇ H ₆ O ₄ | 4.608 | -0.29 | 153.019 29 | 109.029 38, 91.018 76 |
| 13 | 儿茶酚 | C ₆ H ₆ O ₂ | 4.611 | -1.19 | 109.029 37 | 91.018 88, 81.034 48, 67.030 01 |
| 14 | 哈帕昔乙酸酯 | C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁ | 4.810 | 0.06 | 405.140 26 | 191.020 14, 179.056 23, 147.030 09, 119.034 68, 101.024 23 |
| 15 | 4-咖啡酰奎宁酸 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 6.020 | -0.10 | 353.087 77 | 191.056 12, 179.034 97, 135.045 15 |

续表 1

| 序号 | 化合物名称 | 分子式 | t_R /min | Error | $[M-H]^-$ | MS ^a |
|-----|---------------------------------------|---|------------|-------|------------|--|
| 16 | 二氢咖啡酸 | C ₉ H ₁₀ O ₄ | 6.560 | 0.23 | 181.050 67 | 163.040 10, 151.003 62, 135.045 18, 119.050 12 |
| 17 | 杜仲二醇 | C ₉ H ₁₂ O ₄ | 6.820 | -0.32 | 183.066 22 | 151.014 01, 139.076 37, 121.065 70, 111.045 02, 93.034 45 |
| 18 | 杜仲醇苷 | C ₁₅ H ₂₆ O ₉ | 7.440 | -0.30 | 349.150 30 | 179.056 18, 151.039 78, 119.034 72 |
| 19 | 未知 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁ | 7.520 | -4.12 | 403.122 92 | 241.071 62, 139.040 04, 101.024 28 |
| 20 | 5-(3'-O-咖啡酰葡萄糖基)奎宁 | C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄ | 8.320 | -0.36 | 515.140 44 | 323.077 15, 191.056 17, 161.024 17, 135.044 85 |
| 21 | 车叶草酸 | C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂ | 8.690 | 0.16 | 431.119 57 | 251.056 38, 225.076 87, 165.055 36, 147.044 98, 121.029 12 |
| 22* | 绿原酸 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 9.120 | -0.45 | 353.087 65 | 191.056 05, 179.035 13, 173.045 23, 161.024 03, 155.035 06 |
| 23 | 橄榄脂素 4', 4"-二吡喃葡萄糖苷 | C ₃₂ H ₄₄ O ₁₇ | 9.410 | 0.23 | 699.250 73 | 537.197 57, 375.144 68, 345.132 90, 195.066 12, 179.071 30 |
| 24 | 1-O-(3'-O-咖啡酰葡萄糖基)奎宁 | C ₂₂ H ₂₈ O ₁₄ | 9.630 | -0.01 | 515.140 63 | 341.087 62, 179.035 03, 173.045 35, 161.024 20, 135.045 10 |
| 25 | 4-[(4-O-吡喃葡萄糖基-吡喃葡萄糖基)氧基]-3, 5-二羟基苯甲酸 | C ₂₁ H ₃₀ O ₁₅ | 9.670 | -0.13 | 521.151 12 | 341.087 10, 197.045 41, 182.022 06, 153.055 71 |
| 26 | 香草酸 | C ₈ H ₈ O ₄ | 9.740 | -0.42 | 167.034 91 | 152.011 40, 123.045 07, 108.021 57 |
| 27 | 3-[(4-O-吡喃葡萄糖基-吡喃葡萄糖基)氧基]-4, 5-二羟基苯甲酸 | C ₂₁ H ₃₀ O ₁₅ | 9.850 | 0.10 | 521.151 25 | 341.087 10, 326.064 06, 293.087 71, 197.045 41, 182.022 06 |
| 28 | 隐绿原酸 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 10.051 | -0.28 | 353.087 71 | 191.056 11, 179.034 96, 173.045 18, 135.045 14 |
| 29* | 咖啡酸 | C ₉ H ₈ O ₄ | 10.058 | -0.31 | 179.034 93 | 164.011 52, 151.003 57, 135.045 14 |
| 30* | 车叶草苷 | C ₁₈ H ₂₂ O ₁₁ | 10.655 | 0.55 | 413.108 76 | 251.055 47, 191.035 00, 147.045 06 |
| 31 | 京尼平龙胆双糖苷 | C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅ | 11.130 | -0.44 | 549.182 25 | 387.129 82, 207.066 09, 179.056 00, 147.045 12, 101.024 29 |
| 32 | 原儿茶酸甲酯 | C ₈ H ₈ O ₄ | 11.390 | -0.51 | 167.034 90 | 152.011 38, 123.045 09, 108.021 54, 91.018 87 |
| 33 | 4-[2(吡喃木糖氧基)乙基]苯基木糖苷 | C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀ | 11.391 | -0.75 | 401.145 02 | 269.102 94, 193.050 51, 161.045 36, 101.024 27 |
| 34 | 3-对香豆酰奎宁酸 | C ₁₆ H ₁₈ O ₈ | 11.823 | -0.80 | 337.092 62 | 191.056 06, 173.045 41, 163.039 96, 119.050 16 |
| 35* | 京尼平苷 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀ | 12.018 | 2.05 | 387.130 46 | 225.076 77, 207.066 35, 147.045 38, 123.045 04, 101.024 28 |
| 36 | 赤式-二羟基脱氢二松柏醇 | C ₂₀ H ₂₄ O ₈ | 12.390 | -0.10 | 391.139 80 | 343.118 29, 313.072 45, 207.065 83 |
| 37 | 柚皮苷二氢查尔酮 4-O-β-D-葡萄糖苷 | C ₃₃ H ₄₄ O ₁₉ | 12.480 | -0.06 | 743.240 36 | 535.181 88, 373.129 03, 343.118 32, 313.108 09, 151.040 07 |
| 38 | 1-羟基松脂醇二吡喃葡萄糖苷 | C ₃₂ H ₄₂ O ₁₇ | 12.510 | -0.26 | 697.234 74 | 535.183 17, 373.129 12, 313.108 06, 181.050 63, 151.040 01 |
| 39 | 橄榄脂 4'-吡喃葡萄糖苷 | C ₂₆ H ₃₄ O ₁₂ | 12.580 | -0.22 | 537.197 63 | 375.144 59, 327.123 75, 195.066 22, 165.055 39, 150.032 15 |
| 40 | 橄榄脂素 4"-吡喃葡萄糖苷 | C ₂₆ H ₃₄ O ₁₂ | 12.740 | -0.33 | 537.197 57 | 375.144 68, 345.134 22, 195.066 15, 179.071 32 |
| 41 | 苏式-二羟基脱氢二松柏醇 | C ₂₀ H ₂₄ O ₈ | 13.300 | -0.02 | 391.139 83 | 343.118 47, 325.107 88, 313.108 22, 295.061 13 |
| 42 | 绿原酸甲酯 | C ₁₇ H ₂₀ O ₉ | 13.310 | -0.67 | 367.103 21 | 191.056 09, 173.045 41, 134.037 34 |
| 43 | 环橄榄脂素 | C ₂₀ H ₂₄ O ₇ | 13.479 | -0.32 | 375.144 81 | 327.123 69, 297.113 22, 257.081 48, 151.039 96 |

续表 1

| 序号 | 化合物名称 | 分子式 | t_R /min | Error | $[M-H]^-$ | MS ^a |
|-----|--|---|------------|-------|------------|--|
| 44* | 松脂醇二葡萄糖苷 | C ₃₂ H ₄₂ O ₁₆ | 14.084 | -0.74 | 681.239 50 | 519.187 07, 357.134 16, 151.039 92, 136.016 45 |
| 45 | 京尼平 | C ₁₁ H ₁₄ O ₅ | 14.200 | -0.90 | 225.076 64 | 207.066 22, 147.045 12, 123.045 08, 101.024 31 |
| 46 | 脱氢二松柏醇二糖苷 | C ₃₂ H ₄₂ O ₁₆ | 14.570 | -0.47 | 681.239 69 | 501.176 67, 339.123 60, 309.112 82, 179.056 06 |
| 47 | 表松脂醇二葡萄糖苷 | C ₃₃ H ₄₄ O ₁₇ | 14.760 | -0.55 | 711.250 18 | 549.197 20, 387.144 96, 357.097 75, 181.050 61, 151.039 95 |
| 48 | 4, 8, 9, 10-四羟基-3, 6, 7-三甲氧基-2-蒽基-吡喃葡萄糖苷 | C ₂₃ H ₂₆ O ₁₃ | 15.120 | -0.78 | 509.129 67 | 463.218 93, 347.113 56, 297.061 28, 197.045 41, 182.022 08 |
| 49* | 阿魏酸 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 15.221 | -0.49 | 193.050 42 | 178.027 07, 149.060 68, 134.037 29 |
| 50* | 丁香脂素二葡萄糖苷 | C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈ | 15.356 | -0.29 | 741.261 17 | 417.155 49, 387.107 97, 181.050 57, 166.026 99, 151.003 49 |
| 51 | 1-羟基松脂醇 4"-吡喃葡萄糖苷 | C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂ | 15.510 | -0.29 | 535.181 95 | 373.128 97, 343.118 41, 181.050 58, 151.039 98 |
| 52 | 1-羟基松脂醇 4'-吡喃葡萄糖苷 | C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂ | 15.670 | 0.05 | 535.182 13 | 373.129 15, 343.119 75, 313.108 03, 298.084 50, 151.040 13 |
| 53 | Ulmoidoside A | C ₄₈ H ₆₂ O ₂₈ | 16.010 | -1.83 | 1085.333 5 | 877.277 22, 715.222 90, 486.196 84, 341.087 22, 197.045 38 |
| 54* | 芦丁 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 16.060 | -0.28 | 609.145 94 | 301.033 91, 300.027 50, 271.024 75, 255.029 79, 227.035 23 |
| 55 | 橄榄脂素 | C ₂₀ H ₂₄ O ₇ | 16.060 | -0.56 | 375.144 71 | 327.123 60, 195.066 13, 179.071 33, 161.060 59 |
| 56 | 异槲皮素 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 16.660 | -0.01 | 463.088 59 | 301.034 12, 300.027 19, 271.024 44, 255.030 18, 151.003 43 |
| 57 | 柑属苷 B | C ₂₇ H ₃₆ O ₁₃ | 16.890 | -0.54 | 567.208 01 | 341.140 26, 329.139 68, 314.116 58, 269.081 70 |
| 58 | 4- [6-O-(4-羟基-3, 5-二甲氧基苯甲酰基)-β-D-吡喃葡萄糖] 氧基]-3-甲氧基苯甲酸 | C ₂₃ H ₂₆ O ₁₃ | 17.078 | -0.54 | 509.129 79 | 341.087 80, 327.071 69, 167.034 87, 152.011 35 |
| 59 | 烟花苷 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 17.960 | -0.53 | 593.148 19 | 404.218 60, 285.040 07, 255.029 56, 227.035 19 |
| 60 | 异绿原酸 C | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 18.240 | -0.58 | 515.119 20 | 353.087 68, 335.077 30, 191.056 09, 179.034 94, 173.045 50 |
| 61 | 表松脂酚 | C ₂₀ H ₂₂ O ₆ | 18.460 | -1.26 | 357.133 91 | 151.039 93, 136.016 48, 121.029 36 |
| 62* | 松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷 | C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁ | 18.460 | -0.80 | 519.186 77 | 357.134 22, 342.111 33, 311.129 09, 151.039 93, 136.016 48 |
| 63 | 松脂酚 | C ₂₀ H ₂₂ O ₆ | 18.490 | -1.52 | 357.133 82 | 313.108 03, 151.039 93, 136.016 48 |
| 64 | 耳草醇 C 二吡喃葡萄糖苷 | C ₄₃ H ₅₆ O ₂₁ | 18.590 | -0.11 | 907.324 04 | 583.218 38, 387.144 96, 195.066 13, 165.055 54, 150.032 10 |
| 65 | 赤式甘油-β-松柏醇醛醚 | C ₂₀ H ₂₂ O ₇ | 18.600 | -0.58 | 373.129 06 | 325.107 88, 177.055 63, 165.055 57, 162.032 23, 150.032 15 |
| 66 | 松柏醛 | C ₁₀ H ₁₀ O ₃ | 18.986 | -1.08 | 177.055 53 | 164.011 40, 162.032 17, 149.024 46 |
| 67 | 苏式甘油-β-松柏醇醛醚 | C ₂₀ H ₂₂ O ₇ | 19.000 | -0.83 | 373.128 97 | 357.097 93, 177.055 56, 165.055 53, 162.032 20, 150.032 14 |
| 68 | 丁香脂素 | C ₂₂ H ₂₆ O ₈ | 19.021 | -1.40 | 417.154 91 | 387.108 37, 181.050 61, 166.027 04, 151.003 60, 137.024 31 |
| 69 | 丁香脂素 4'-葡萄糖苷 | C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃ | 19.030 | -0.32 | 579.208 13 | 417.155 46, 387.108 28, 181.050 61, 166.027 04, 151.003 60 |
| 70 | 杜仲素 A | C ₂₇ H ₃₄ O ₁₂ | 19.100 | 0.23 | 549.197 88 | 387.144 90, 357.098 18, 181.050 57, 166.027 04, 151.039 95 |

续表 1

| 序号 | 化合物名称 | 分子式 | t_R /min | Error | $[M-H]^-$ | MS ⁿ |
|-----|-------------------------------------|---|------------|-------|------------|--|
| 71 | 中松脂醇 | C ₂₁ H ₂₄ O ₇ | 19.162 | -0.86 | 387.114 59 | 357.097 84, 181.050 58, 166.027 04, 151.039 96, 136.016 49 |
| 72 | 2-(2-羟乙基)-3, 4-二甲基-3-环戊烯-1-基-吡喃葡萄糖苷 | C ₁₅ H ₂₆ O ₇ | 19.280 | -0.94 | 317.160 28 | 243.123 49, 225.112 85, 207.102 65, 181.123 29, 163.112 73 |
| 73 | 杜仲醇 | C ₉ H ₁₆ O ₄ | 19.551 | -0.66 | 187.097 46 | 169.087 05, 143.107 64, 125.097 09 |
| 74 | 未知 | C ₄₃ H ₅₄ O ₂₂ | 20.020 | -0.19 | 921.303 22 | 759.250 55, 417.153 93, 341.087 68, 197.045 36, 181.050 63 |
| 75 | 异绿原酸 A | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 20.021 | -0.70 | 515.119 14 | 353.087 55, 191.056 06, 179.034 91, 173.045 36, 135.045 10 |
| 76 | 中脂素香草酸醚二吡喃葡萄糖苷 | C ₄₁ H ₅₀ O ₂₀ | 20.110 | -0.61 | 861.281 74 | 699.299 80, 341.087 59, 311.077 00, 197.045 47, 151.039 95 |
| 77 | 丁香脂素香草酸醚二吡喃葡萄糖苷 | C ₄₂ H ₅₂ O ₂₁ | 20.340 | -0.26 | 891.292 60 | 729.239 87, 417.155 03, 311.077 06, 181.050 63, 167.034 68 |
| 78 | 1-羟基松脂醇 | C ₂₀ H ₂₂ O ₇ | 20.414 | -0.75 | 373.129 00 | 358.105 47, 343.118 19, 325.107 73, 313.107 79 |
| 79 | 松脂醇香草酸醚二吡喃葡萄糖苷 | C ₄₀ H ₄₈ O ₁₉ | 20.490 | 0.03 | 831.271 73 | 669.218 99, 357.134 64, 311.077 09, 167.034 77, 151.039 93 |
| 80 | 2-(5-羟乙基-2, 3-二甲基-2-环戊烯-1-基)-吡喃葡萄糖苷 | C ₁₅ H ₂₆ O ₇ | 20.750 | -0.75 | 317.160 34 | 243.123 79, 225.113 16, 207.102 69, 181.123 83 |
| 81 | 丙三醇丁香脂素醚二吡喃葡萄糖苷 | C ₄₄ H ₅₈ O ₂₂ | 20.930 | 0.22 | 937.334 90 | 729.278 75, 567.223 51, 387.144 96, 181.050 69, 151.039 98 |
| 82 | 丁香丙三醇-β-丁香脂素醚二糖苷 | C ₄₅ H ₆₀ O ₂₃ | 21.160 | -1.12 | 967.344 18 | 759.283 14, 597.233 70, 387.144 78, 357.134 67, 151.039 89 |
| 83 | 木樨草素 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 21.562 | -0.20 | 285.040 41 | 257.045 87, 227.035 10, 151.003 28 |
| 84 | 丙三醇丁香脂素醚 4"-吡喃葡萄糖苷 | C ₃₈ H ₄₈ O ₁₇ | 21.870 | -0.25 | 775.281 68 | 613.228 70, 565.207 34, 417.155 24, 195.066 16, 165.055 57 |
| 85 | 丙三醇中松脂醇醚 4"-吡喃葡萄糖苷 | C ₃₇ H ₄₆ O ₁₆ | 22.060 | -0.01 | 745.271 30 | 535.197 08, 387.144 35, 195.066 16, 165.055 54, 150.032 14 |
| 86 | 丙三醇丁香脂素醚 4"-吡喃葡萄糖苷 | C ₃₈ H ₄₈ O ₁₇ | 22.060 | 0.06 | 775.281 92 | 613.229 06, 565.207 95, 417.155 67, 195.066 13, 165.055 56 |
| 87 | 丙三醇中松脂醇醚 4"-吡喃葡萄糖苷 | C ₃₇ H ₄₆ O ₁₆ | 22.260 | -0.09 | 745.241 24 | 583.218 38, 535.197 63, 387.144 68, 195.066 16, 150.032 15 |
| 88* | 黄芩苷 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 22.325 | -0.48 | 445.077 42 | 311.056 79, 269.045 41 |
| 89 | 丁香丙三醇-β-丁香脂素醚单糖苷 | C ₃₉ H ₅₀ O ₁₈ | 22.360 | 0.43 | 805.292 79 | 595.218 81, 417.155 52, 225.076 75, 195.066 10, 165.019 13 |
| 90* | 槲皮素 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 23.930 | -0.43 | 301.035 25 | 273.040 04, 178.998 64, 151.003 60 |
| 91 | 1-去氧杜仲醇 | C ₉ H ₁₆ O ₃ | 24.510 | -0.31 | 171.102 62 | 153.091 45, 127.112 72, 125.097 15 |
| 92 | 咖啡酸乙酯 | C ₁₁ H ₁₂ O ₄ | 24.936 | -0.87 | 207.066 10 | 192.042 72, 179.034 85, 161.024 22, 135.045 07 |
| 93 | 中松脂醇香草酸醚吡喃葡萄糖苷 | C ₃₅ H ₄₀ O ₁₅ | 25.160 | -0.19 | 699.229 31 | 537.174 32, 357.134 55, 341.087 62, 311.076 84, 151.039 96 |
| 94 | 松脂醇香草酸醚吡喃葡萄糖苷 | C ₃₄ H ₃₈ O ₁₄ | 25.610 | 0.08 | 669.218 93 | 639.207 95, 357.134 40, 311.077 21, 167.034 87, 151.039 93 |
| 95 | 黄芩苷甲酯 | C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁ | 27.091 | -0.25 | 459.093 17 | 269.045 38, 223.039 20, 197.060 04, 136.987 90 |
| 96* | 山柰酚 | C ₁₅ H ₁₀ O ₆ | 27.816 | -0.41 | 285.040 34 | 239.034 73, 229.050 25, 185.060 58 |
| 97 | 黄芩素 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 29.780 | -0.62 | 269.045 38 | 223.040 22, 197.060 46, 169.065 64 |
| 98 | Ulmoidol | C ₂₉ H ₄₂ O ₅ | 39.390 | 0.55 | 469.296 20 | 423.290 62, 405.280 12, 187.096 85, 125.097 18 |

注:*表示化合物已与对照品比对确定。

2.5.1 木脂素类成分裂解特征 从杜仲提取液中共鉴定出38个木脂素类化合物^[14-20]。该类化合物结构母核有5种:木脂素烃基上不同位置氧取代基缩合形成四氢呋喃型单环氧木脂素(化合物23、39、40、55);单环氧木脂素中脂肪烃链上羟基缩合形成双骈四氢呋喃环的双环氧木脂素(化合物38、44、47、50、51、52、61、62、63、68、69、70、71、78)及倍半木脂素(化合物64、76、77、79、81、82、84、85、86、87、89、93、94)。由1分子苯丙烯的侧链与另一分子苯丙烯的苯核聚合或通过氧键而聚合形成新木脂素(化合物36、41、46、57、65、67)。两分子的苯丙烯侧链聚合形成芳基四氢萘为基本骨架的环木脂素类(化合物43)。倍半木脂素在二级质谱中醚键断裂后,其剩余骨架的碎裂与双环氧木脂素、单环氧木脂素相似,多为先丢失糖基、CH₃、CH₂O、CH₃OH、OCH₃,接着发生四氢呋喃环的裂解,丢失1个或是连续丢失2个CH₂O,最终形成特征离子 m/z 151。以松脂醇二葡萄糖苷的质谱裂解为例,如图2所示,准分子离子峰 m/z 681连续丢失糖基形成 m/z 519、357,前体碎片 m/z 357中的两个四氢呋喃环连续丢失2个CH₂O,最终形成 m/z 151的碎片离子。

2.5.2 环烯醚萜类的裂解特征 从杜仲提取液中共鉴定出13个环烯醚萜类化合物(化合物3、4、5、

9、14、17、18、21、30、31、35、45、53),该类化合物的基本母核是含有半缩醛醇羟基的环烯醚萜醇类,多以苷类的形式存在。常见易丢失母核上的功能基团葡萄糖、葡萄糖残基、H₂O、CO₂、CH₃OH、CH₃COOH等中性碎片^[21-24],形成[M-H-Glu]⁻、[M-H-Glc]⁻、[M-H-Glc-H₂O]⁻、[M-H-Glc-CO₂]⁻、[M-H-Glc-H₂O-CO₂]⁻等碎片离子。此外环戊烯型的环烯醚萜由1个二氢吡喃环顺式连接五元环,由于母核结构上半缩醛结构的异构化,可能造成二氢吡喃环的断裂^[25]。以京尼平苷酸的质谱裂解为例,如图3所示,京尼平苷酸的准分子离子峰 m/z 373丢失1分子Glc、H₂O、CO₂等形成 m/z 211、193、167、149的碎片峰,京尼平苷酸母核结构含有半缩醛结构,易形成2个醛结构的同分异构体,导致母环断裂。 m/z 123碎片离子的形成源于母环裂解后 γ H的重排。

2.5.3 黄酮类的裂解特征 从杜仲提取液中共鉴定出9个黄酮化合物(化合物54、56、59、83、88、90、95、96、97),其中5个黄酮醇类、4个黄酮类。由于黄酮类及黄酮醇类的化合物质谱裂解相似,故以芦丁的质谱裂解为例进行分析^[26-28],如图4所示,芦丁为槲皮素的芸香糖苷,在一级质谱图中可见准分子离子峰 m/z 609,在丢失芸香糖中性碎片后形成苷元碎片 m/z 301,苷元碎片发生RDA裂解产生

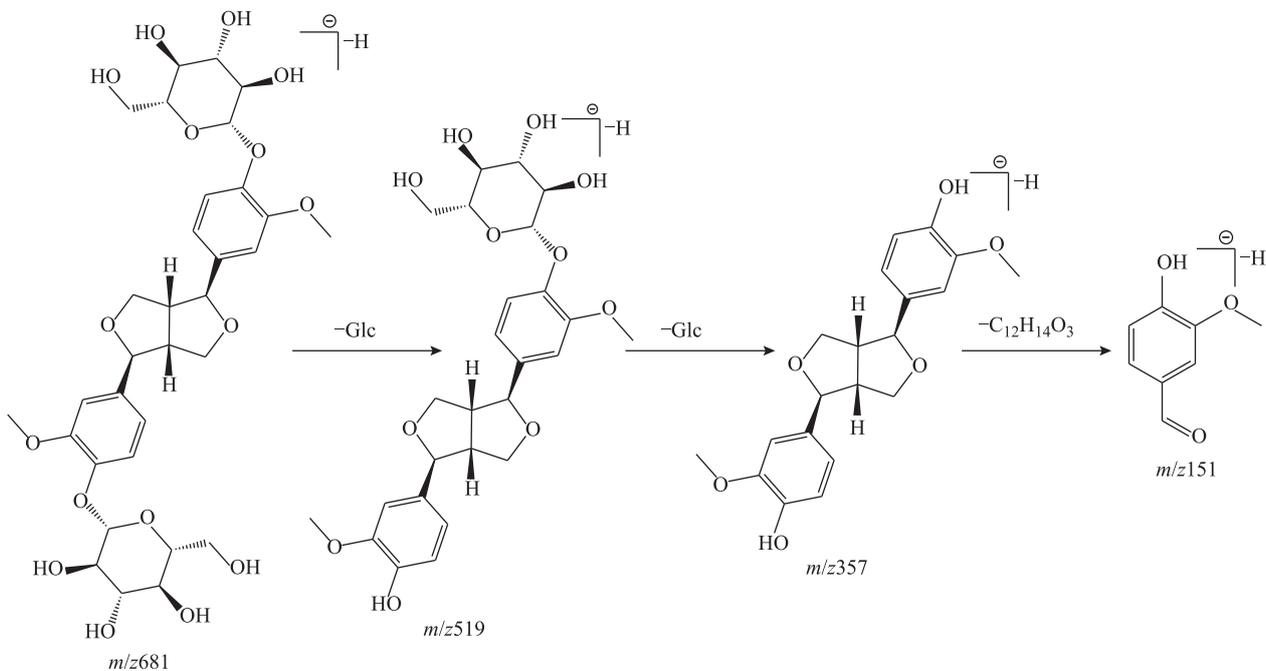


图2 ESI负离子模式下松脂醇二葡萄糖苷可能的裂解途径

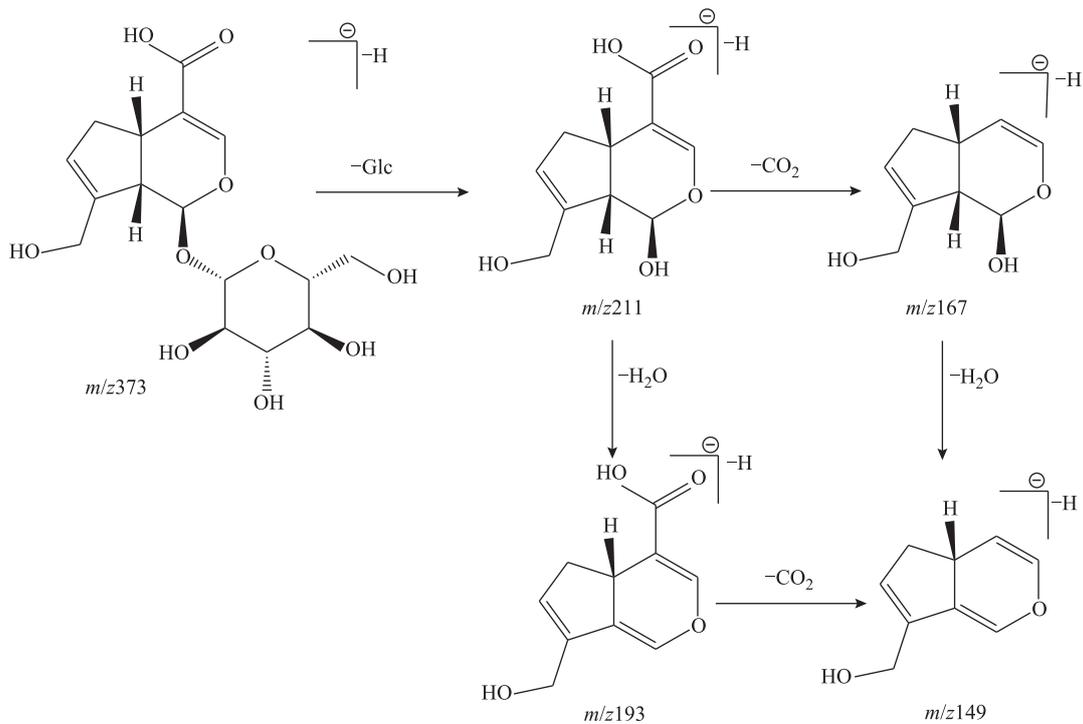


图3 ESI负离子模式下, 京尼平苷酸可能的裂解途径

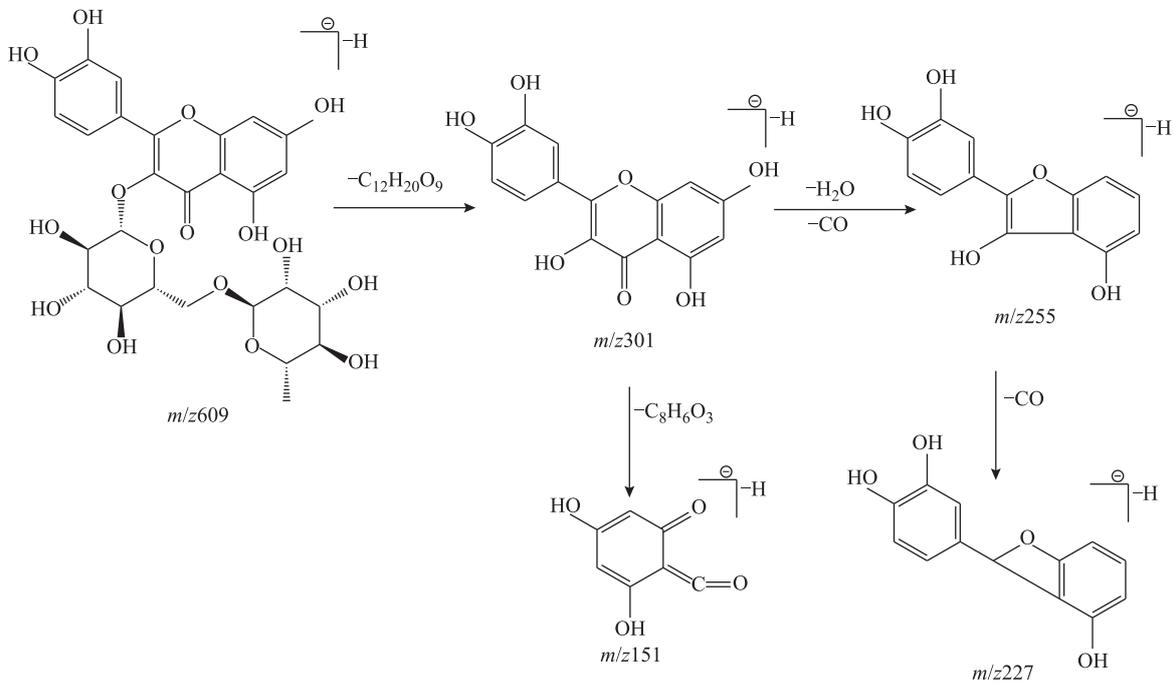


图4 ESI负离子模式下芦丁可能的裂解途径

碎片 m/z 151, 此外, m/z 301 丢失 1 分子 H_2O 、 CO 产生碎片离子 m/z 255, 该碎片离子经重排后易丢失中性分子 CO 产生 m/z 227 的碎片离子。

2.5.4 苯丙素类的裂解特征 在杜仲提取物中鉴定出 15 个苯丙素类化合物(化合物 7、15、16、20、22、24、28、29、34、42、49、60、66、75、92)。

已鉴定的多数苯丙素的结构与绿原酸相似或是绿原酸的某个片段, 故以绿原酸为例说明已解析的苯丙素可能的裂解规律^[29-30]。绿原酸是咖啡酸与奎宁酸形成的酯。在一级质谱中可见其准分子峰 m/z 353, 绿原酸的酯键断裂后形成碎片 m/z 191、179, 奎宁酸片段 m/z 191 在丢失 1 分子 H_2O 后形成碎片离子

m/z 173, 咖啡酸片段 m/z 179 在丢失一分子 CO_2 后形成碎片 m/z 135。

3 定量分析方法与结果

3.1 溶液的配制

3.1.1 供试品溶液配制 精密称取 2.1.1 项下的流浸膏, 以水为稀释液, 稀释不同倍数后作为供试品溶液。

3.1.2 对照品溶液配制 分别精密称取松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、丁香脂素二葡萄糖苷、桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸、车叶草苷, 甲醇溶解, 配制成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品贮备液, 取适量对照品贮备液混合后, 得对照品混合液。

3.2 液质条件

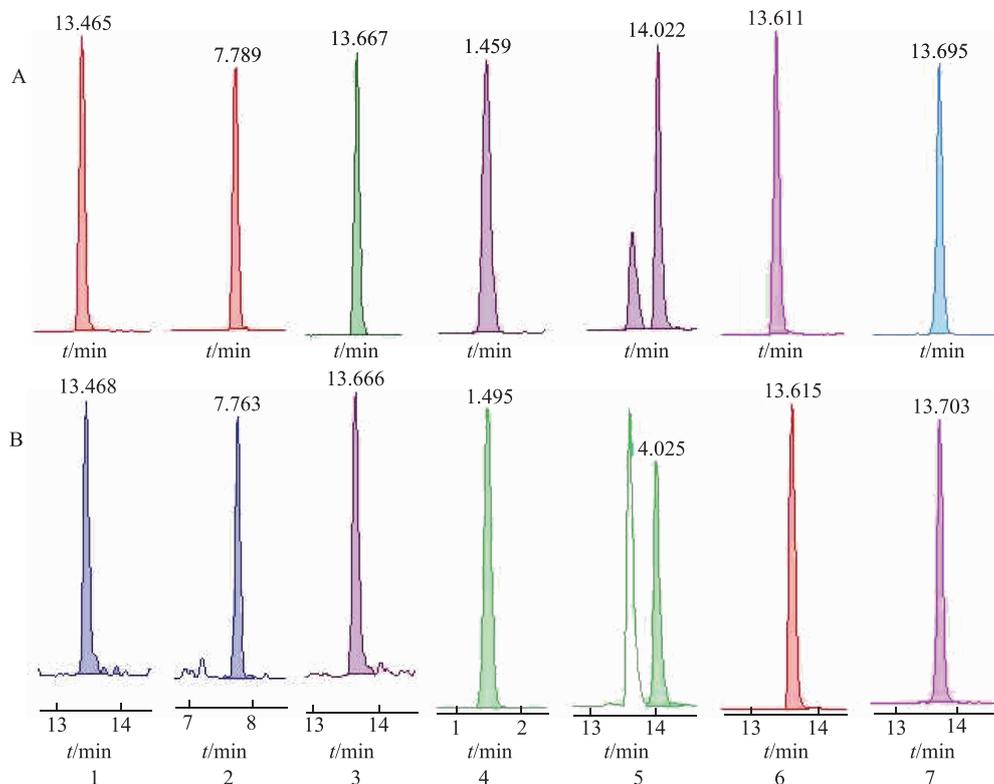
3.2.1 色谱条件 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), 柱温: 30 $^\circ\text{C}$, 进样量: 10 μL , 流动相 A: 体积分数为 0.01% 的氨水, 流动相 B: 体积分数为 0.01% 氨水的乙腈甲醇 (1:1), 流速: 0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 梯度洗脱条件: 0 ~ 3 min, 100% A; 3 ~ 5 min, 100% ~ 90% A; 5 ~ 8 min, 90% ~ 90% A; 8 ~ 11 min, 90% ~ 80% A;

11 ~ 13 min, 80% ~ 20% A; 13 ~ 15 min, 20% ~ 0% A; 15 ~ 16 min, 0% A; 16 ~ 16.1 min, 0% ~ 100% A; 16.1 ~ 20 min, 100% A。

3.2.2 质谱条件 离子源为 ESI 源, 负离子检测模式。Sheath Gas Temp 为 300 $^\circ\text{C}$, Sheath Gas Flow 流速为 $11 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, Gas Temp 为 325 $^\circ\text{C}$, Gas Flow 为 $8 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。Capillary 电压为 4000 V(-), Nebulizing Gas 为 45 psi (1psi = 6.895 kPa), Nozzle Voltage 电压为 500 V(-)。扫描模式为多反应检测模式(MRM), 7 种成分的质谱参数见表 2, 色谱图见图 5。

表 2 杜仲提取物中 7 个主要成分的质谱测定参数

| 分析物 | 分子式 | t_{R}/min | 定量离子对 m/z | 碎裂电压/V | 碰撞电压/V |
|-----------|---|---------------------------|---------------------------|--------|--------|
| 车叶草苷 | $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ | 13.465 | 413.2 \rightarrow 147.3 | 180 | 20 |
| 桃叶珊瑚苷 | $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$ | 7.789 | 345.1 \rightarrow 183.0 | 100 | 5 |
| 京尼平苷 | $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ | 13.667 | 387.2 \rightarrow 123.2 | 160 | 10 |
| 京尼平苷酸 | $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ | 1.459 | 373.2 \rightarrow 123.1 | 160 | 10 |
| 松脂醇单葡萄糖苷 | $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$ | 14.022 | 519.2 \rightarrow 357.1 | 100 | 10 |
| 松脂醇二葡萄糖苷 | $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_{16}$ | 13.611 | 681.3 \rightarrow 357.3 | 135 | 20 |
| 丁香脂素二葡萄糖苷 | $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_{18}$ | 13.695 | 741.3 \rightarrow 417.4 | 135 | 20 |



注: A. 对照品; B. 杜仲提取物样品; 1. 车叶草苷; 2. 桃叶珊瑚苷; 3. 京尼平苷; 4. 京尼平苷酸; 5. 松脂醇单葡萄糖苷; 6. 松脂醇二葡萄糖苷; 7. 丁香脂素葡萄糖苷。

图 5 杜仲提取物中 7 个主要成分的离子流图

3.3 定量方法学考察

3.3.1 线性关系考察 取3.1.2项下的各对照品母液以水进行不同倍数稀释,得到系列浓度的混合对照品工作液。依3.2项下的色谱-质谱条件进样分析。以各待测组分的质量浓度($X, \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)分别对相应峰面积(Y)进行线性回归,得相应的回归方程和相关系数。结果表明,在一定的质量浓度范围内,各成分均有良好的线性关系。将线性范围的最低质量浓度继续稀释,进样分析,以信噪比 $S/N=10$ 的进样浓度为定量下限(LOQ),以信噪比 $S/N=3$ 时的进样浓度为检测限(LOD)。结果见表3。

3.3.2 精密度试验 取3.1.2项下对照品混合溶液,按3.2项下的色谱质谱条件测定。连续进样6次,7个待测化合物峰面积的RSD分别为2.75%、2.25%、2.17%、2.11%、2.21%、1.29%、3.42%,结果见表3,RSD均小于5.0%,表明该仪器及方法的精密度良好。

3.3.3 稳定性试验 取3.1.2项下对照品混合溶液,在3.2项液质条件下,分别于0、4、8、12、24 h进样分析,根据随行标准曲线和样品峰面积计算各成分的含量和RSD,结果显示各成分含量的RSD分别为4.12%、1.90%、2.71%、2.62%、2.96%、5.01%、4.96%,RSD均小于6%,表明各被测成分在24 h内稳定性良好。

3.3.4 重复性试验 按3.1.1项下方法制备杜仲提取物的供试品溶液,在3.2项液质条件下,根据随行标准曲线和样品峰面积计算7个成分的含量及RSD,得出各成分质量浓度平均值分别为28.42、252.57、100.55、351.57、174.40、225.22、160.89 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,RSD分别为1.95%、2.93%、4.32%、1.11%、2.57%、3.15%、3.06%,RSD均小于5%,表明该

方法重复性良好。

3.3.5 加样回收率试验 称定同一批已知含量的杜仲提取物约1 mg,平行6份,置于量瓶中,分别加入各对照品适量,按3.2.1项下方法制备供试品,进样分析,计算回收率及其RSD,结果见表4。各成分平均回收率在90%~110%,RSD均小于5%,表明该方法准确可靠。

3.4 样品含量测定

精密称量杜仲提取物,平行6份,按3.1.1项方法制备供试品溶液,在3.2项液质条件下进样分析,根据随行标准曲线和样品峰面积计算各成分的含量,结果每克杜仲生药含车叶草苷2.84 μg 、桃叶珊瑚苷101.03 μg 、京尼平苷167.59 μg 、京尼平苷酸585.95 μg 、松脂醇单葡萄糖苷290.67 μg 、松脂醇二葡萄糖苷1638.50 μg 、丁香脂素二葡萄糖苷268.15 μg 。

4 讨论

在实验中,定性色谱条件考察了包括乙腈-0.1%甲酸水和甲醇-0.1%甲酸水的不同配比和梯度洗脱,最终确定乙腈-0.1%甲酸水色谱峰的分离度、峰形及质谱的离子化效率更好;定量色谱条件考察中发现加入0.01%氨水后,色谱峰的峰型及离子化更佳。同时考察了Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱以及Waters ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱的差异,通过结果对比最终选择了0.01%氨水-0.01%(V/V)氨水的乙腈-甲醇(1:1)系统以及Waters HSS T3柱。质谱条件考察了UPLC-QE高分辨质谱正、负离子检测模式,得出负离子模式下的各类化合物的离子化更佳、信息更丰富。结合杜仲中化合物的类型,选择负离子检测模式为成分分析及含量测定的方法。

表3 杜仲提取物中7个主要成分的回归方程、线性范围、LOD、LOQ

| 成分 | 线性回归方程 | r | 线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-----------|----------------------------|--------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 车叶草苷 | $Y=96.793368X+33.587285$ | 0.9975 | 5.0~1000.0 | 0.37 | 1.31 |
| 桃叶珊瑚苷 | $Y=23.500619X+61.564643$ | 0.9994 | 5.0~1000.0 | 0.82 | 1.75 |
| 京尼平苷 | $Y=2.208437X-5.817875$ | 0.9985 | 50.0~3200.0 | 2.03 | 6.76 |
| 京尼平苷酸 | $Y=109.226251X+352.704869$ | 0.9957 | 2.0~1000.0 | 0.88 | 1.33 |
| 松脂醇单葡萄糖苷 | $Y=163.213164X-89.412416$ | 0.9976 | 2.0~1000.0 | 0.58 | 1.50 |
| 松脂醇二葡萄糖苷 | $Y=87.890694X+42.018510$ | 0.9990 | 5.0~1000.0 | 0.44 | 1.46 |
| 丁香脂素二葡萄糖苷 | $Y=53.345386X-17.735553$ | 0.9966 | 5.0~1000.0 | 0.52 | 1.44 |

表4 杜仲提取物中7个主要成分的回收率试验结果

| 分析物 | 原有量/ μg·L ⁻¹ | 对照品 加入量/ μg·L ⁻¹ | 平均测得量 (n=3)/ μg·L ⁻¹ | 平均回 收率/ % | RSD (n=9)/ % |
|-----------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------|
| 车叶草苷 | 35.01 | 28.01 | 64.88 | 100.56 | 4.47 |
| | | 35.01 | 69.37 | | |
| | | 42.01 | 76.40 | | |
| 桃叶珊瑚苷 | 47.03 | 37.62 | 87.47 | 102.48 | 3.58 |
| | | 47.03 | 93.72 | | |
| | | 56.43 | 104.47 | | |
| 京尼平苷 | 491.70 | 393.36 | 884.24 | 98.07 | 2.10 |
| | | 491.70 | 968.17 | | |
| | | 590.04 | 1069.35 | | |
| 京尼平苷酸 | 188.78 | 151.03 | 328.78 | 96.64 | 4.89 |
| | | 188.78 | 364.70 | | |
| | | 226.54 | 420.18 | | |
| 松脂醇单葡萄糖苷 | 130.18 | 104.14 | 231.31 | 99.54 | 2.62 |
| | | 130.18 | 261.99 | | |
| | | 156.21 | 285.97 | | |
| 松脂醇二葡萄糖苷 | 227.86 | 182.29 | 396.42 | 99.64 | 4.63 |
| | | 227.86 | 461.97 | | |
| | | 273.43 | 506.28 | | |
| 丁香脂素二葡萄糖苷 | 127.82 | 102.25 | 230.70 | 98.22 | 2.45 |
| | | 127.82 | 253.40 | | |
| | | 153.38 | 275.96 | | |

本研究采用 UPLC-QE 技术快速、全面分析杜仲中的化学成分,共鉴定出 98 个化合物,包括木脂素类 38 个,环烯醚萜类 13 个,黄酮类 9 个,苯丙素类 15 个,酚类 7 个,其余化合物 16 个。杜仲在含有丰富化合物基础上,其药理活性与临床应用也比较广泛^[1-3],目前《中华人民共和国药典》2015 版(一部)中杜仲项下仅对松脂醇二葡萄糖苷进行测定,因此本研究随后选择杜仲中含量丰富且药理活性明确的松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、丁香脂素二葡萄糖苷、桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸、车叶草苷共 7 种化合物进行含量测定。对杜仲中上述 7 种主要活性成分进行含量测定的方法学考察,确定含量测定方法,为综合评价杜仲的药用质量提供重要参考。

参考文献

[1] 冯晗,周宏灏,欧阳冬生. 杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2015,20(6): 713-720.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:200.

[3] HE X, WANG J, LI M, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1): 78-92.

[4] 张帅男,李煦照. 杜仲化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药,2017,26(10): 56-61.

[5] 王娟娟,秦雪梅,高晓霞,等. 杜仲化学成分、药理活性和质量控制现状研究进展[J]. 中草药,2017,48(15): 3228-3237.

[6] 刘丽君. 杜仲化学活性成分及其药理学研究概况[J]. 亚太传统医药,2013,9(5): 82-83.

[7] 李嘉程,许波,李刚,等. 基于网络药理学研究杜仲抗骨质疏松的分子机制[J]. 中国现代中药,2018,20(8): 936-942.

[8] 席晓志,王婉卿,崔晓伟,等. 响应面优化杜仲提取物抗氧化活性及其工艺研究[J]. 中国现代中药,2018,20(3): 310-315.

[9] PI J J, WU X, RUI W, et al. Identification and fragmentation mechanisms of two kinds of chemical compositions in *Eucommia ulmoides* By UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS[J]. Chem Nat Compd,2016,52(1): 144-148.

[10] 严颖,赵慧,邹立思,等. 杜仲化学成分的 LC-Triple TOF MS/MS 分析[J]. 质谱学报,2017,38(1): 146-156.

[11] CHAI X, WANG Y, SU Y, et al. A rapid ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of ten compounds in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. J Pharm Biomed Anal,2011,57(1): 52-61.

[12] HE M Z, JIA J, LI J M, et al. Application of characteristic ion filtering with ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time of flight tandem mass spectrometry for rapid detection and identification of chemical profiling in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. J Chromatogr A, 2018, 1554: 81-91.

[13] 何峰,王永林,郑林,等. UPLC-PDA-ESI-MS 分析杜仲中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(3): 59-62.

[14] DEYAMA T, IKAWA T, KITAGAWA S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. V. Isolation of dihydroxy dehydro diconiferyl alcohol isomers and phenolic compounds[J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(5): 1785-1789.

[15] DEYAMA T. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. I. Isolation of (+)-medioresino di-O-β-D-glucopyranoside[J]. Chem Pharm Bull, 1983, 31(9): 2993-2997.

- [16] DEYAMA T, IKAWA T, KITAGAWA S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. II. Isolation and structures of three new lignan glycosides[J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(9):3651-3657.
- [17] FENG S, NI S, SUN W. Preparative isolation and purification of the lignan pinoresinol diglucoside and liriiodendrin from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. By high speed countercurrent chromatography[J]. J Liq Chromatogr R T, 2007, 30(1):135-145.
- [18] DEYAMA T, IKAWA T, KITAGAWA S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. III. Isolation and structures of a new lignin glycoside[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(2):523-527.
- [19] DEYAMA T, IKAWA T, NISHIBE S. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. IV. Isolation of a new sesquilignan glycoside and iridoids[J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(12):4933-4938.
- [20] DEYAMA T, IKAWA T, KITAGAWA S, et al. The constituents of *Eucommia ulmoides* Oliv. VI. Isolation of a new sesquilignan and neolignan glycosides[J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(5):1803-1807.
- [21] 赵祥升, 杨美华, 吴海峰, 等. 巴戟天中环烯醚萜苷和萜醌在电喷雾离子源负离子模式下的质谱裂解行为[J]. 质谱学报, 2018, 39(3):342-350.
- [22] 卢建秋, 孙明谦, 张宏桂. 栀子苷和梓醇的电喷雾质谱裂解机制研究[J]. 中草药, 2008, 39(7):1011-1013
- [23] 李存满, 梁鑫淼, 薛兴亚. 电喷雾离子源正离子模式下环烯醚萜苷的质谱裂解行为[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(3):567-572.
- [24] REN L, XUE X, ZHANG F, et al. Studies of iridiol glycosides using liquid chromatography /electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(18):3039-3050.
- [25] LI C M, ZHANG X L, XUE X Y, et al. Structural characterization of iridoid glucosides by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Rapid commun Mass Spectrom:RCM, 2008, 22(12):1941-1954.
- [26] 李自红, 魏悦, 范毅, 等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析实验室, 2015, 34(2):186-189.
- [27] 阿布拉江·克依木. 黄酮苷类天然产物的质谱分析方法研究[D]. 北京:中国协和医科大学, 2006.
- [28] YANG W Z, YE M, QIAO X, et al. Collision-induced dissociation of 40 flavonoid aglycones and differentiation of the common flavonoid subtypes using electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Eur J Mass Spectrom, 2012, 18(6):493.
- [29] GUO W, WANG L, GAO Y, et al. Isolation of isochlorogenic acid isomers in flower buds of *Lonicera japonica* by high-speed counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015, 981:27-32.
- [30] 王静哲, 徐凤, 刘震, 等. 玄参化学成分的高压液相色谱-ESI-IT-TOF-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7):1257-1268.

(收稿日期: 2019-01-29 编辑: 王丽英)