

基于指纹图谱和化学模式识别评价杜仲叶质量

冯 淼¹, 王超纯¹, 凌伟红¹, 龚慧敏³, 田学文⁴, 田春莲^{1,2,3*}

1. 吉首大学林产化工工程湖南省重点实验室, 湖南 张家界 427000
2. 杜仲综合利用技术国家地方联合工程实验室, 湖南 吉首 416000
3. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000
4. 慈利县江垭国有林场, 湖南 张家界 427000

摘要: 目的 建立杜仲 *Eucommia ulmoides* 叶高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 结合化学模式识别评价其质量。方法 采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL, 波长为 207、240、277、350 nm, 检测杜仲叶中 12 种活性成分含量并建立指纹图谱, 应用 SPSS 25.0 和 SIMCA 14.1 软件进行聚类分析 (clustering analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA), 对不同产地杜仲叶进行质量评价。结果 不同产地杜仲叶桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、原儿茶素、绿原酸、儿茶素、车叶草苷、咖啡酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、异槲皮素、紫云英苷差异显著, 质量分数范围分别为 0.053%~4.563%、0.078%~0.977%、0.018%~0.084%、2.634%~6.183%、0.010%~0.088%、0.124%~0.582%、0.001%~0.242%、0.033%~0.163%、0.065%~0.215%、0.045%~0.865%、0.199%~0.910%、0.020%~0.221%; 20 批杜仲叶 HPLC 指纹图谱确定了 25 个共有峰, 经对照品指认 11 个色谱峰, 相似度 0.905~0.996; 通过聚类分析将样品按不同产地分为 2 大类, 最后筛选出绿原酸、桃叶珊瑚苷、车叶草苷、芦丁、松脂醇二葡萄糖苷是导致不同产地样品差异的标志性化合物。结论 建立的指纹图谱方法稳定、可靠、重复性好, 结合化学模式识别可用于杜仲叶质量评价。

关键词: 杜仲叶; 指纹图谱; 化学模式识别; 桃叶珊瑚苷; 京尼平苷酸; 原儿茶素; 绿原酸; 儿茶素; 车叶草苷; 咖啡酸; 京尼平苷; 松脂醇二葡萄糖苷; 芦丁; 异槲皮素; 紫云英苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2931-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.026

Quality evaluation of *Eucommia ulmoides* leaves based on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition analysis

FENG Miao¹, WANG Chao-chun¹, LING Wei-hong¹, GONG Hui-min³, TIAN Xue-wen⁴, TIAN Chun-lian^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000, China
2. National and Local United Engineering Laboratory of Integrative Utilization Technology of *Eucommia ulmoides*, Jishou University, Jishou 416000, China
3. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Ji Shou 416000, China
4. Jiangya State-owned Forest Farm in Cili County, Zhangjiajie 427000, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of *Eucommia ulmoides* leaves, and to evaluate its quality by chemical pattern recognition. **Methods** The chromatographic column was an Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution using acetonitrile-0.1% phosphate solution as the mobile phase at a flow rate of 0.1 mL/min and a column temperature of 30 ℃ with an injection volume of 20 μL. The sample was detected at 207 nm, 240 nm, 277 nm and 350 nm, respectively. The contents of 12 active ingredients in *E. ulmoides* leaves were detected and fingerprints were established. SPSS25.0 and SIMCA 14.1 software were applied to perform clustering analysis, principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis to evaluate the quality of *Eucommia* leaves from different origins. **Results** Significant differences were found between different origins of *E. ulmoides* leaves aucubin, geniposidic acid, protocatechin, chlorogenic acid, catechin, asperuloside, caffeic acid, geniposide, pinosresinol diglucoside, rutin, isoquercetin

收稿日期: 2022-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32160388); 吉首大学校级科研项目 (Jdy20050)

作者简介: 冯 淼 (1998—), 女, 硕士, 从事天然产物研发及药物质量控制研究。Tel: (0744)8231386 E-mail: 912098529@qq.com

*通信作者: 田春莲 (1970—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药、民族药质量控制研究。

Tel: (0744)8231386 E-mail: tianchunlian1970@163.com

and astragalin, with contents ranging from 0.053% to 4.563%, 0.078% to 0.977%, 0.018% to 0.084%, 2.634% to 6.183%, 0.010% to 0.088%, 0.124% to 0.582%, 0.001% to 0.242%, 0.033% to 0.163%, 0.065% to 0.215%, 0.045% to 0.865%, 0.199% to 0.910%, and 0.020% to 0.221%; The HPLC fingerprinting of 20 batches of *E. ulmoides* leaves identified 25 common peaks and 11 peaks identified by the control, with similarities ranging from 0.905 to 0.996; the samples were divided into two major categories according to different origins by cluster analysis. Chlorogenic acid, aucubin, asperuloside, rutin and pinorensinol diglucoside being the signature compounds that caused the differences. **Conclusion** The established fingerprinting method is reliable and reproducible and shows a potential improvement in the quality evaluation of *E. ulmoides* leaves in combination with chemical pattern recognition.

Key words: *Eucommia ulmoides* leaves; fingerprint; chemical pattern recognition; aucubin, geniposidic acid; protocatechin; chlorogenic acid; catechin; asperuloside; caffeic acid; geniposide; pinorensinol diglucoside; rutin; isoquercetin; astragalin

杜仲叶为杜仲科杜仲属植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶,《中国药典》2005 年版收载入药,具有补肝肾、强筋骨功效,主治肝肾不足、头晕目眩、腰膝酸痛、筋骨痿软等病症^[1]。杜仲叶富含木脂素类、苯丙素类、环烯醚萜类、黄酮及多糖类等活性成分^[2-3]。以绿原酸为代表的苯丙素类降压、抗菌、抗病毒等功效显著,京尼平苷酸、桃叶珊瑚苷等环烯醚萜类抗骨质疏松作用尤为明显^[4-5]。杜仲分布广,主产于湖南、贵州、陕西、河南等地^[6],产地环境及生长条件导致杜仲叶成分差异较大^[7-8]。目前对于杜仲叶的质量控制多集中于单一成分的含量测定,《中国药典》2005 年版~2020 年版也以绿原酸含量作为考察指标,但杜仲叶专属活性成分并非绿原酸,其他活性成分药理作用明显。因此,综合反映杜仲叶药用品质和产地质量的差异,必须建立一种整体、全面的药材质量控制方法。

指纹图谱技术既能充分体现不同产地中药材的共性图谱片段,又能凸显有效成分的整体性和稳定性,广泛应用于中药材鉴别和质量控制^[9-11]。化学模式识别结合指纹图谱信息,能快速筛选不同产地中药材的差异性成分^[12]。前人已使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统快速匹配和识别指纹图谱数据,结合聚类分析(clustering analysis, CA)和主成分分析(principal component analysis, PCA)并标记共有峰、推测差异性化合物^[13-16]来评价杜仲叶质量;但运用 SIMCA 软件,结合 CA、PCA、偏最小二乘法判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)多种模式识别进行直观、深入的评判仅见于杜仲皮质量以及不同部位差异化合物的筛选^[17-18]。因此,本研究拟采用 HPLC 建立 20 批杜仲叶指纹图谱,结合 PCA 及 PLS-DA 等多种化学模式识别方法,比较不同产地杜仲叶的差异性,为完善杜仲叶的质量控制提供依据,为深入开发杜仲资源奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(配置 G1311C 四元梯度泵、G1316A 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器,Chemstation 色谱工作站),美国 Agilent 公司;FA2204B 型电子分析天平,上海佑科仪器仪表有限公司;XO-5200DT 型超声波清洗机,南京先欧仪器制造有限公司。

1.2 试药

桃叶珊瑚苷(批号 RP190719)、京尼平苷酸(批号 RP200425)、原儿茶素(批号 RP190605)、绿原酸(批号 RP190505)、儿茶素(批号 RP200829)、车叶草苷(批号 RP191123)、咖啡酸(批号 RP190614)、京尼平苷(批号 RP190629)、松脂醇二葡萄糖苷(批号 RP200319)、芦丁(批号 RP190213)、异槲皮素(批号 RP190404)、紫云英苷(批号 RP190820)均购于成都麦德生科技有限公司,质量分数均>98%;甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂为 AR。

1.3 样品

20 批次样品(S1~S20)于 2020 年 8~10 月采自湖南、贵州、陕西、山西四省 11 个不同产地(表 1),

表 1 杜仲叶样品信息

Table 1 Sample information of *E. ulmoides* leaves

编号	产地	编号	产地
S1	湖南慈利金岩	S11	贵州汇川十字铺
S2	湖南慈利杨柳铺	S12	贵州汇川十字铺
S3	湖南慈利广福桥	S13	贵州汇川十字铺
S4	湖南慈利江垭	S14	陕西略阳金家河
S5	湖南慈利江垭	S15	陕西略阳金家河
S6	湖南慈利洞溪	S16	陕西略阳金家河
S7	湖南慈利洞溪	S17	山西闻喜郭家庄
S8	湖南永定官黎坪	S18	山西闻喜郭家庄
S9	湖南永定天门山	S19	山西闻喜郭家庄
S10	湖南桃源热市	S20	山西闻喜郭家庄

经吉首大学廖博儒研究员鉴定为杜仲科杜仲属植物杜仲 *E. ulmoides* Oliv. 的成熟叶片, 将样品按《中国药典》2020 年版方法低温烘干, 粉碎后过 40 目筛, 贮存备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

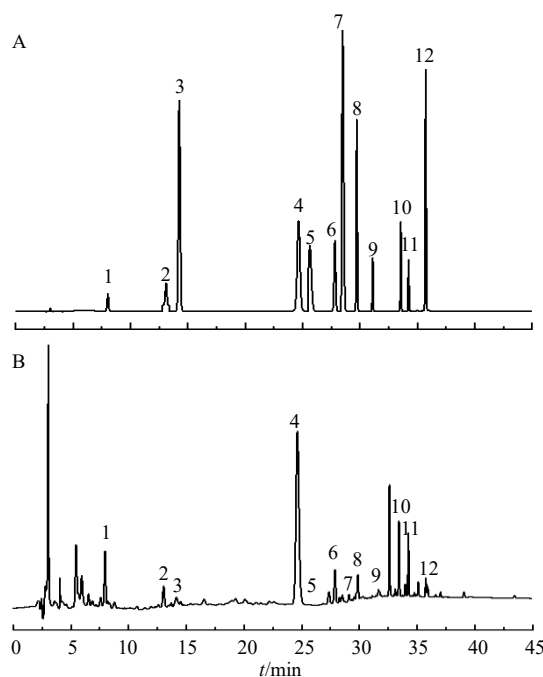
Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸溶液 (B); 梯度洗脱 (0~12 min、96%~92% A, 12~22 min、92%~90% A, 22~30 min、90%~76% A, 30~35 min、76%~70% A, 35~50 min、70% A); 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 0~12 min、207 nm, 12~30 min、240 nm, 30~32 min、277 nm, 32~45 min、350 nm。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取适量的桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、原儿茶素、绿原酸、儿茶素、车叶草苷、咖啡酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、异槲皮素、紫云英苷对照品, 置同一量瓶中, 用 50% 甲醇定容, 配制成上述成分质量浓度分别为 182.8、210.8、201.6、242.4、231.2、184.4、222.4、336.0、213.2、237.2、256.4、243.6 μg/mL 的混合对照品溶液, 4 ℃ 保存备用。按“2.1”项色谱条件得混合对照品色谱图 (图 1-A)。

2.3 样品溶液的制备

准确称取杜仲叶粉末 0.5 g, 加入 50% 甲醇 20 mL, 超声 (300 W、40 kHz) 40 min, 冷却至室温, 用 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 真空滤过, 取滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得^[19]。按“2.1”项下色谱条件进样得样品色谱图 (图 1-B)。



1-桃叶珊瑚苷 2-京尼平苷酸 3-原儿茶素 4-绿原酸 5-儿茶素 6-车叶草苷 7-咖啡酸 8-京尼平苷 9-松脂醇二葡萄糖苷 10-芦丁 11-异槲皮素 12-紫云英苷

1-aucubin 2-geniposidic acid 3-protocatechin 4-chlorogenic acid 5-catechin 6-asperuloside 7-caffeic acid 8-geniposide 9-pinorensinol diglucoside 10-rutin 11-isoquercetin 12-astragalin

图 1 混合对照品 (A) 和杜仲叶样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A) and *E. ulmoides* leaves sample (B)

2.4 线性关系的考察

精密吸取梯度浓度范围的对照品混合溶液, 进样量为 20 μL, 按“2.1”项色谱条件注入高效液相色谱仪, 测定峰面积 (重复 3 次), 以进样浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 结果 (表 2) 显示 12 种活性成分的线性关系良好。

表 2 12 种活性成分的回归方程及相关系数

Table 2 Regression equations and correlation coefficients of 12 active ingredients

成分	回归方程	R^2	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
桃叶珊瑚苷	$Y=3\ 003.3\ X+6.270\ 8$	0.999 1	13.25~1 140.75
京尼平苷酸	$Y=9\ 140.4\ X-79.767$	0.999 3	19.50~244.25
原儿茶素	$Y=156\ 991\ X+849.56$	0.999 0	4.50~21.00
绿原酸	$Y=12\ 977\ X+13.814$	0.999 9	658.50~1 545.75
儿茶素	$Y=14\ 778\ X-17.062$	0.999 5	2.50~22.00
车叶草苷	$Y=20\ 051\ X-34.7$	0.999 2	31.00~145.50
咖啡酸	$Y=33\ 489\ X+10.283$	0.999 4	0.25~60.50
京尼平苷	$Y=15\ 248\ X+17.847$	0.999 2	8.25~40.75
松脂醇二葡萄糖苷	$Y=13\ 208\ X-40.85$	0.999 6	16.25~53.75
芦丁	$Y=14\ 417\ X+101.89$	0.999 6	11.25~216.25
异槲皮素	$Y=15\ 211\ X+782.39$	0.999 3	49.75~227.50
紫云英苷	$Y=28\ 379\ X+30.308$	0.999 3	5.00~55.25

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取杜仲叶粉末 0.5 g, 按“2.3”项下方法制备样品提取液, 再按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定并计算色谱峰峰面积和 RSD, 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、原儿茶素、绿原酸、儿茶素、车叶草苷、咖啡酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、异槲皮素、紫云英苷的 RSD 分别为 0.17%、0.91%、1.37%、0.04%、1.44%、0.52%、1.98%、0.23%、0.52%、0.04%、0.10%、0.15%, RSD<2%。

2.5.2 稳定性试验 取杜仲叶粉末 0.5 g, 按“2.3”项下方法制备样品提取液, 室温放置 0、2、4、6、8、10、12 h, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录各色谱峰峰面积并计算 RSD。桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、原儿茶素、绿原酸、儿茶素、车叶草苷、咖啡酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、异槲皮素、紫云英苷的 RSD 分别为 1.39%、1.71%、4.23%、0.12%、1.56%、1.10%、3.25%、2.86%、3.03%、0.94%、0.82%、3.76%, RSD<4.5%。

2.5.3 重复性试验 称取同一杜仲叶样品粉末 0.5 g 共 6 份, 按“2.3”项方法分别制成样品提取液, 按 2.1 项下色谱条件进样, 记录各色谱峰峰面积并计算 RSD。结果显示, 桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸、原儿茶素、绿原酸、儿茶素、车叶草苷、咖啡酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、异槲皮素、紫云英苷的 RSD 分别为 0.24%、0.41%、0.68%、

0.04%、0.75%、0.05%、0.82%、1.27%、0.06%、0.12%、0.14%、1.35%, RSD<2%。表明方法重复性良好。

2.5.4 加样回收率试验 称取已知成分含量的杜仲叶样品 3 份, 按“2.3”项下方法制备样品提取液, 分别加入不同浓度的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 计算样品的加样回收率和 RSD。结果表明: 加样回收率为 99.82%~103.02%, 即桃叶珊瑚苷(99.82%)、京尼平苷酸(100.13%)、原儿茶素(100.78%)、绿原酸(100.29%)、儿茶素(100.75%)、车叶草苷(99.87%)、咖啡酸(101.38%)、京尼平苷(100.92%)、松脂醇二葡萄糖苷(101.13%)、芦丁(102.91%)、异槲皮素(101.43%)、紫云英苷(103.02%); RSD 值分别为 0.23%、0.25%、0.09%、0.02%、0.36%、1.63%、0.55%、1.90%、1.40%、1.10%、0.19%、0.64%, 均小于 2%。

2.6 杜仲叶主要活性成分的产地差异性分析

精密称取不同产地杜仲叶样品 0.5 g, 按“2.3”项下方法制备供试液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 按外标法计算各成分含量, 结果见表 3。

2.6.1 杜仲叶中 4 种环烯醚萜类成分的含量分析 如图 2 所示, 4 种环烯醚萜类成分含量高低排序为桃叶珊瑚苷>京尼平苷酸>京尼平苷>车叶草苷; 表 3 显示, 桃叶珊瑚苷质量分数 0.053%~4.563%, S10 最高 4.563%, S20 最低 0.053%; 京尼平苷酸质量分数 0.078%~0.977%, S1 最高 0.977%, S16 最

表 3 杜仲叶 12 种成分含量测定结果

Table 3 Determination results of 12 components in *E. ulmoides* leaves

编号	质量分数/%											
	桃叶珊瑚苷	京尼平苷酸	原儿茶素	绿原酸	儿茶素	车叶草苷	咖啡酸	京尼平苷	松脂醇二葡萄糖苷	芦丁	异槲皮素	紫云英苷
S1	0.799	0.977	0.049	4.519	0.013	0.157	0.011	0.113	0.082	0.191	0.333	0.057
S2	1.302	0.540	0.043	3.412	0.011	0.211	0.005	0.143	0.082	0.165	0.466	0.081
S3	0.275	0.379	0.021	4.411	0.042	0.177	0.001	0.074	0.112	0.377	0.624	0.106
S4	1.287	0.233	0.037	4.766	0.018	0.244	0.011	0.134	0.083	0.121	0.482	0.060
S5	4.060	0.632	0.084	6.032	0.014	0.582	0.013	0.156	0.071	0.865	0.778	0.101
S6	1.851	0.491	0.041	6.183	0.030	0.163	0.206	0.163	0.142	0.141	0.640	0.101
S7	0.869	0.112	0.025	6.140	0.041	0.145	0.196	0.033	0.215	0.436	0.910	0.221
S8	1.370	0.261	0.018	4.086	0.047	0.369	0.001	0.124	0.116	0.170	0.492	0.057
S9	1.080	0.884	0.028	4.553	0.088	0.283	0.011	0.136	0.073	0.182	0.786	0.101
S10	4.563	0.237	0.053	4.084	0.013	0.128	0.242	0.112	0.074	0.045	0.285	0.080
S11	1.546	0.155	0.071	5.486	0.020	0.290	0.017	0.133	0.134	0.157	0.504	0.073
S12	1.445	0.358	0.040	3.796	0.018	0.334	0.007	0.080	0.097	0.154	0.366	0.071
S13	0.294	0.109	0.061	3.542	0.024	0.239	0.014	0.080	0.090	0.152	0.488	0.087
S14	2.559	0.113	0.048	3.809	0.021	0.321	0.009	0.137	0.065	0.146	0.248	0.027
S15	0.532	0.154	0.054	3.084	0.015	0.196	0.012	0.123	0.087	0.131	0.223	0.020
S16	3.087	0.078	0.026	2.634	0.021	0.188	0.003	0.115	0.065	0.120	0.199	0.046
S17	1.403	0.185	0.028	3.722	0.010	0.203	0.002	0.155	0.114	0.363	0.664	0.122
S18	3.213	0.261	0.018	3.247	0.014	0.124	0.005	0.123	0.070	0.194	0.533	0.027
S19	3.339	0.515	0.027	3.523	0.014	0.177	0.002	0.145	0.085	0.181	0.335	0.071
S20	0.053	0.354	0.039	2.690	0.011	0.130	0.005	0.074	0.084	0.135	0.220	0.035

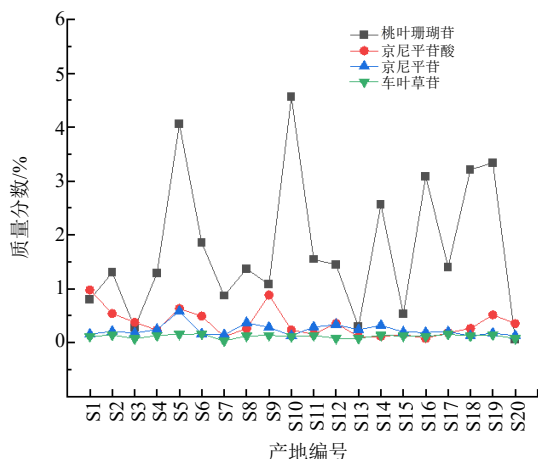


图 2 不同产地杜仲叶中 4 种环烯醚萜类成分含量比较

Fig. 2 Comparison contents of four iridoids in *E. ulmoides* leaves

低 0.078%; 车叶草苷质量分数 0.124%~0.582%, S5 最高 0.582%, S18 最低 0.124%; 京尼平苷质量分数 0.033%~0.163%, S6 最高 0.163%, S7 最低 0.033%; 说明不同产地杜仲叶烯醚萜类成分含量差异明显。

2.6.2 杜仲叶中 4 种酚类成分的含量分析 如图 3 所示, 杜仲叶中绿原酸含量大于其他 3 种酚类成分, 原儿茶素、儿茶素、咖啡酸的含量相近, 分别为原儿茶素质量分数 0.018%~0.084%, S5 最高 0.084%, S8 最低 0.084%; 儿茶素质量分数 0.010%~0.088%, S9 最高 0.088%, S17 最低 0.010%; 咖啡酸质量分数 0.001%~0.242%, S6 最高 0.242%, S3 与 S8 最低 0.001%; 20 批杜仲叶绿原酸含量均达到《中国药典》2020 年版要求的 0.080%, S6 最高 6.183%, S16 最低 2.634%, 远高于《中国药典》2020 年版要求。

2.6.3 杜仲叶中松脂醇二葡萄糖苷和黄酮类成分的含量分析 图 4 和表 3 直观显示, 20 批杜仲叶松脂醇二葡萄糖苷质量分数在 0.065%~0.215%, S7 最高 0.215%, S16 最低 0.065%; S3 (0.112%)、S17 (0.114%)、S8 (0.116%)、S11 (0.134%)、S6 (0.142%)、S7 (0.215%) 均达到《中国药典》2020 年版杜仲皮中 0.10% 的要求; 3 种黄酮类成分质量分数高低为异槲皮素>芦丁>紫云英苷, 异槲皮素质量分数 0.199%~0.910%, S7 最高 0.910%, S16 最低 0.199%; 芦丁质量分数 0.045%~0.865%, S5 最高 0.865%, S10 最低 0.045%; 紫云英苷质量分数 0.020%~0.221%, S7 最高 0.221%, S15 最低 0.020%。

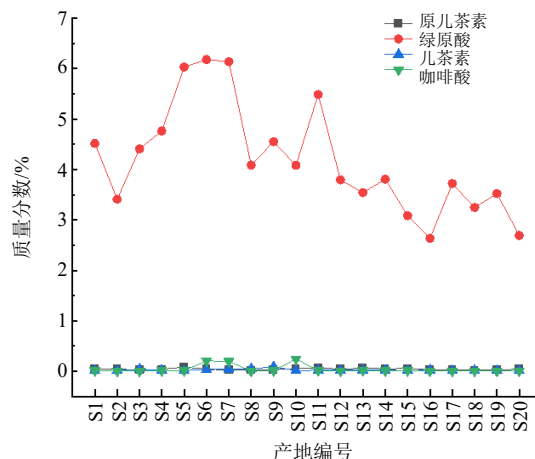


图 3 杜仲叶中 4 种酚类成分含量比较

Fig. 3 Comparison content of four phenolic in *E. ulmoides* leaves

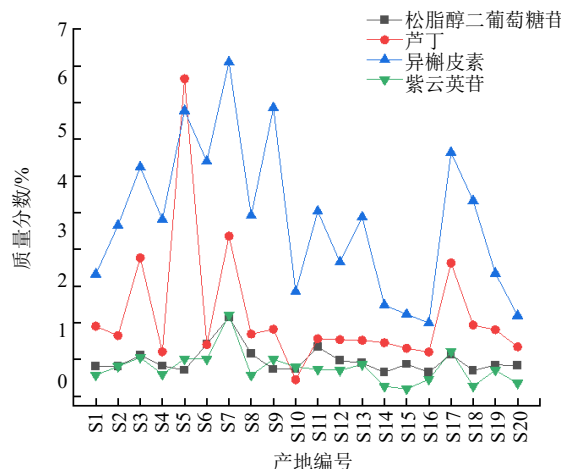


图 4 杜仲叶中松脂醇二葡萄糖苷和黄酮类成分含量比较

Fig. 4 Comparison contents of pinoresinol diglucoside and flavonoids in *E. ulmoides* leaves

2.7 杜仲叶指纹图谱的建立与相似度评价

2.7.1 杜仲叶指纹图谱的建立 称取各样品 0.5 g, 按“2.1~2.3”项方法分别制备供试液和进样测定, 记录 HPLC 数据, 将原始数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版), 采用平均数法、多点校正法匹配共有峰, 结果见图 5 和图 6。20 批次样品的 HPLC 指纹图谱显示共有峰 25 个, 经与对照品谱图 (图 2) 比对, 指认了 11 种化合物, 分别为桃叶珊瑚苷 (峰 5)、京尼平苷酸 (峰 7)、原儿茶素 (峰 8)、绿原酸 (峰 13)、车叶草苷 (峰 15)、咖啡酸 (峰 17)、京尼平苷 (峰 18)、松脂醇二葡萄糖苷 (峰 19)、芦丁 (峰 20)、异槲皮素

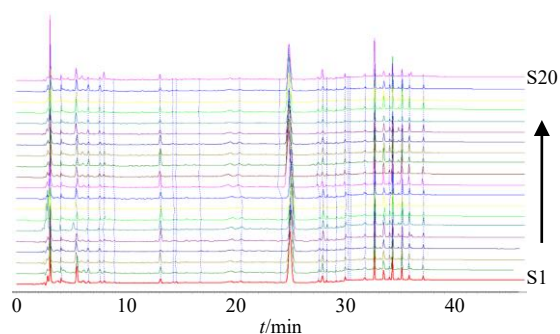


图 5 20 批杜仲叶的 HPLC 指纹图谱

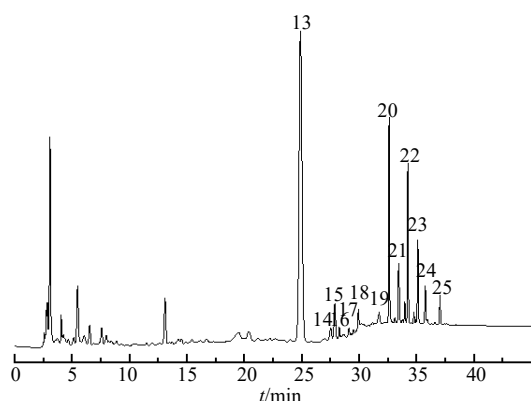
Fig. 5 HPLC fingerprint of 20 batches of *E. ulmoides* leaves

图 6 杜仲叶的对照指纹图谱

Fig. 6 Comparison of fingerprint of *E. ulmoides* leaves

(峰 22)、紫云英苷(峰 23), 平均质量分数依次为 1.746%、0.351%、0.041%、4.186%、0.233%、0.039%、0.118%、0.097%、0.221%、0.479%、0.077%。

2.7.2 指纹图谱相似度评价 以 S1 图谱为参考图谱, 得到 20 批样品的 HPLC 指纹图谱与对照图谱的相似度分别为 0.992、0.993、0.943、0.988、0.993、0.953、0.986、0.961、0.996、0.990、0.994、0.984、0.991、0.996、0.905、0.961、0.993、0.968、0.975、0.965, 均 > 0.900 , 表明各产地间的杜仲叶有较高的一致性。样品指纹图谱共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.07%~2.6%, 均小于 3%, 表明样品 25 个共有峰保留时间较稳定, 但相对峰面积 RSD 为 15.66%~80.93%, 相差较大, 显示各批次间 25 个共有峰所代表化合物的含量差异较大。

2.8 化学模式识别分析

2.8.1 CA 应用 SPSS 25.0 软件, 以杜仲叶 HPLC 指纹图谱 25 个共有峰的峰面积为变量, 采用组间联

接的聚类方法, 以平方欧式距离为样品间距离进行聚类分析^[10]。如图 7 所示, 20 批杜仲叶被分为 2 类: S5~S7、S11 为第 1 类(I 组), 产地为湖南慈利江垭(S5)、慈利洞溪(S6、S7)和贵州遵义(S11); 其余样品为第 2 类(II 组), 当分类距离为 5 时, II 组分为 2 小类: S2、S13、S15~S20 为 1 类(IIa 组), 包含产于陕西略阳和山西闻喜的绝大多数样品, S1、S3~S4、S8~S10、S12、S14 为另 1 类(IIb 组), 除 S14 外均为来自武陵山区的湖南张家界和贵州遵义的杜仲叶。另外, 所有样品各化合物的共有峰峰面积差异显著, 聚类结果与样品绿原酸峰面积的差异相符, 即 I 组的绿原酸峰面积最高, IIb 组次之, IIa 组较低。

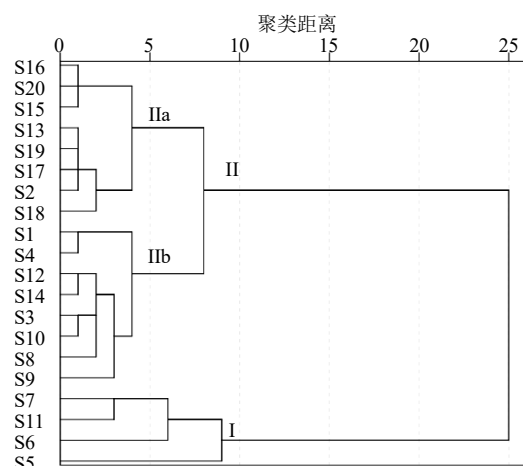


图 7 20 批杜仲叶聚类分析谱系图

Fig. 7 Pedigree of cluster analysis of 20 batches of *E. ulmoides* leaves

2.8.2 PCA 采用 SPSS25.0 软件对所有样品 PCA, 将共有峰峰面积标准化, 计算方差贡献率, 以特征值 > 1.0 提取的 8 个主成分方差贡献率依次为 24.293%、15.576%、11.744%、9.418%、7.020%、5.831%、4.830%、4.336%, 累积贡献率 83.048%, 可代表指纹图谱中 25 个共有峰的大部分信息。载荷绝对值大小体现各共有成分对主成分的影响程度, 表 4 可知, 第 1 主成分主要反映了色谱峰 2~3、7~9、12~15、19、24 的信息, 第 2 主成分主要反映了色谱峰 1、16、21~22、25 的信息, 第 3 主成分主要反映了色谱峰 5、20 的信息, 第 4 主成分主要反映了色谱峰 18、23 的信息, 第 5 主成分主要反映了色谱峰 4、11 的信息, 第 6 主成分主要反映了色谱峰 10 的信息, 第 7 主成分主要反映了色谱峰 17 的信息, 第 8 主成分主

表 4 主成分矩阵

Table 4 Principal component matrix

峰号	主成分							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-0.184	0.536	0.405	0.364	-0.317	0.220	0.360	0.013
2	0.539	-0.285	-0.121	0.366	0.481	-0.310	-0.239	-0.185
3	-0.696	0.384	0.369	-0.011	-0.244	-0.162	0.001	0.029
4	-0.482	0.139	0.419	0.363	0.469	0.334	-0.019	-0.115
5	-0.503	0.145	0.445	0.438	0.316	0.394	-0.025	-0.042
6	0.234	0.369	0.238	-0.405	-0.311	-0.075	0.040	-0.633
7	0.567	0.532	0.364	-0.035	0.251	0.013	0.005	-0.060
8	0.680	0.222	0.261	-0.174	-0.014	0.220	-0.222	0.133
9	0.603	0.353	0.301	-0.386	0.310	-0.099	-0.045	-0.076
10	-0.096	0.606	0.152	0.167	-0.114	-0.626	-0.172	0.097
11	0.172	-0.033	0.483	0.074	-0.667	0.044	-0.348	0.036
12	0.673	0.018	0.337	0.144	0.021	0.340	0.049	0.160
13	0.637	0.234	0.288	-0.270	-0.006	0.193	-0.255	-0.071
14	0.747	0.157	-0.400	0.081	0.056	0.003	-0.200	0.240
15	0.623	0.404	-0.237	0.245	-0.277	0.107	-0.006	0.015
16	0.271	0.646	-0.446	-0.122	-0.003	0.330	0.004	0.229
17	-0.035	0.440	-0.032	-0.486	0.258	-0.110	0.466	-0.083
18	0.558	-0.012	0.282	0.600	0.126	-0.254	-0.102	-0.190
19	0.725	-0.270	0.092	0.192	-0.069	-0.111	0.359	-0.159
20	-0.104	0.454	-0.635	0.400	-0.218	0.139	-0.005	-0.243
21	0.157	0.681	-0.597	0.107	0.148	0.050	0.086	-0.051
22	0.465	-0.574	-0.054	0.157	-0.255	0.078	0.149	0.144
23	0.260	0.280	0.044	0.593	-0.096	-0.274	0.318	0.106
24	0.536	-0.225	0.371	-0.172	0.041	-0.136	0.438	0.332
25	-0.463	0.567	0.200	-0.043	0.132	-0.280	-0.168	0.427

要反映了色谱峰 6 的信息。图 8 表明, 20 批样品明显分为 2 类, 位于图左方的 S5~S7 分为一类, 其余样本分为一类, PCA 结果与聚类分析基本一致, 进一步验证了聚类分析的分类结果。

2.8.3 PLS-DA 为更好地观察组间差异, 在 PCA 基础上运用 SIMCA 14.1 软件选择有监督模式的 PLS-DA 进行了各组间的判别分析。结果 PLS-DA 模型的拟合参数 $R^2_X=0.516$, $R^2_Y=0.991$, 模型预测参数 $Q^2=0.729$, 均大于 0.5, 表明建立的数学模

型稳定且预测能力较强。PLS-DA 的变量重要性投影值 (variable importance for the projection, VIP) 见图 9, 以 $VIP>1.0$ 为阈值, 筛选可作为产地间相互区分的 8 个 (峰) 差异化合物, VIP 大小排序为峰 13 (绿原酸、1.63) > 峰 15 (车叶草苷、1.37) > 峰 20 (芦丁、1.36) > 峰 19 (松脂醇二葡萄糖苷、1.26) > 峰 21 (未知峰、1.25) > 峰 6 (未知峰、1.24) > 峰 5 (桃叶珊瑚苷、1.13) > 峰 4 (未知峰、1.12), 说明绿原酸、车叶草苷、芦丁、松脂醇二葡萄糖苷、桃叶珊瑚苷和未知峰 21、6、4 可作为产地区分的标志性成分。

3 讨论

3.1 流动相和检测波长的选择

本研究流动相选择时分别考察了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.4%磷酸溶液体系。结果甲醇-水作为流动相时, 化合物出峰时间长且峰型拖尾严重; 甲醇-0.1%磷酸溶液作为流动相时, 绿原酸、儿茶素等化合物的峰无法分离; 乙腈-水作为流动相时, 绿原酸、芦丁、桃叶珊瑚苷等化合物出现拖尾现象; 乙腈-0.4%磷酸溶液为流动相, 会使色谱柱柱压过高且清洗难度大;

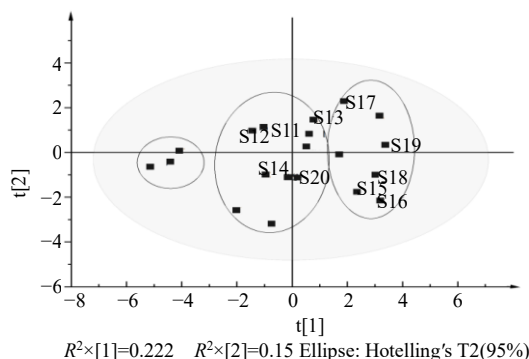


图 8 20 批杜仲叶 PCA 得分图

Fig. 8 PCA scores plot of 20 batches of *E. ulmoides* leaves

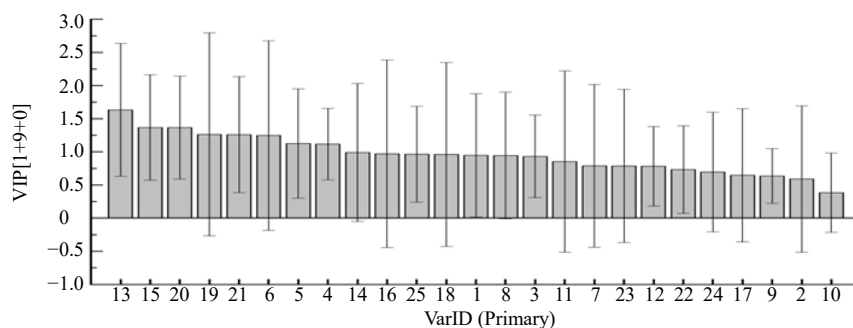


图9 PLS-DA 的 VIP 图

Fig.9 VIP plot of PLS-DA

而采用乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相时,各目标化合物有较好的色谱行为,12种活性成分色谱峰与前后峰分离完全,色谱峰峰型稳定。最佳检测波长的选择时,应用DAD检测器在200~400 nm对12种成分扫描,由于测定成分较多,各成分最大吸收波长差异较大,同一波长无法同时检测,应采用仪器自带多波长分段切换方式开展研究,经查阅相关文献并结合光谱图,综合比较各成分的最大吸收,最终选择207 nm测定桃叶珊瑚苷,在240 nm波长下测定京尼平苷酸、儿茶素、原儿茶素、绿原酸、车叶草苷、咖啡酸、京尼平苷,277 nm检测松脂醇二葡萄糖苷,350 nm检测芦丁、异槲皮素、紫云英苷,既能保证基线平稳,又能确保每个待测成分的色谱峰有足够大的紫外吸收。

3.2 活性成分含量分析

查阅文献可知,杜仲叶化学成分的研究多有报道,产地环境不同导致杜仲叶少数活性成分差异明显^[3, 19-22],但尚未对不同产地杜仲叶化学成分的全面比较研究。本研究发现不同产地杜仲叶中绿原酸含量最高为6.183%,最低为2.634%,均远高于《中国药典》要求的0.080%,其含量也高于已有的文献报道^[16, 19, 21-22]。杜仲绿原酸是苯丙烷类代谢的次生代谢产物,由“咖啡酰-辅酶A和奎宁酸经由羟基肉桂酰-辅酶A 奎宁酸酯羟基肉桂酰基转移酶催化合成”和“对香豆酰基奎宁酸被香豆酸-3-羟化酶羟基化合成”两种途径合成^[23],苯丙氨酸解氨酶是催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶(中心酶),绿原酸合成随其活性升高而增加^[24]。杜仲中绿原酸含量受生态条件影响较大,在气候恶劣条^[25],强光照时间长^[26],土壤有机质丰富^[27]的地区含量增加,绿原酸在金银花^[28]和杨树^[29]中的积累受温度与干旱胁迫的影响显著。武陵山区是

杜仲的中心栽培区,处于我国中亚热带中段,独特的自然环境和近年来极端气候条件的频繁出现适于杜仲的生长和绿原酸等次生代谢物的积累^[30]。松脂醇二葡萄糖苷质量分数为0.065%~0.215%,6批样达到《中国药典》2020年版对杜仲皮0.10%的要求。除绿原酸外,杜仲叶富含环烯醚萜类、黄酮类成分,且含量依次为桃叶珊瑚苷>京尼平苷酸>车叶草苷>京尼平苷,异槲皮素>芦丁>紫云英苷。本实验对杜仲叶化学成分的对标分析,明确了不同产地杜仲叶品质的差异,为药用杜仲叶基原的选择和资源合理开发利用提供了依据。

3.3 指纹图谱与化学模式识别

指纹图谱结合化学模式识别,与以往仅以化合物含量测定^[7-8, 19-21]或指纹图谱^[15, 22, 31]的品质评价与质量控制方法相比,不仅可有效评价杜仲叶品质的一致性,还可诠释造成品质差异形成的主要因素,为杜仲叶品质评价与质量控制提供了更为丰富的信息。实验表明,20批杜仲叶的HPLC指纹图谱具有25个共有指纹峰,所含化学成分大体一致,相似度计算结果均大于0.90也证实了上述结论。为进一步寻找导致不同产地杜仲叶有别的差异性成分,本实验采用CA、PCA 2种无监督的化学模式识别方法将杜仲叶分为2类,并利用所建立的PLS-DA模型,找出8种含量具有显著差异的标志物,针对3个未知化合物,后续将收集更多对照品进行比对,并结合LC-MS质谱信息进一步指认。前人研究建议用绿原酸、桃叶珊瑚苷、京尼平苷酸^[32-33]进行杜仲叶质量控制,本研究发现杜仲叶产地差异已知化合物有绿原酸、桃叶珊瑚苷、车叶草苷、松脂醇二葡萄糖苷和芦丁,依据质量标志物的基本条件和确定原则,认定绿原酸、桃叶珊瑚苷、车叶草苷、芦丁可

作为质量标志物,车叶草苷和芦丁为首次提出。我国杜仲资源丰富且分布广,差异显著的生长环境导致杜仲叶药材品质参差不齐,质量标志物的筛选有利于建立杜仲叶中药材全程质量控制及质量溯源体系,也为杜仲叶的综合利用提供了新思路。

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: 173.
- [2] Luo S B, Ren X M, Shi X Q, *et al.* Study on enhanced extraction and seasonal variation of secondary metabolites in *Eucommia ulmoides* leaves using deep eutectic solvents [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 209: 114514.
- [3] 张智, 龙华, 曾罗, 等. 不同产地杜仲雄花指纹图谱的建立及其化学模式识别研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7207-7213.
- [4] Wang L. Chlorogenic acid inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cell lines by targeting annexin A2 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110673.
- [5] Wang T, Fan L M, Feng S, *et al.* Network pharmacology of iridoid glycosides from *Eucommia ulmoides* oliver against osteoporosis [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 7430.
- [6] 刘攀峰, 王璐, 杜庆鑫, 等. 杜仲在我国潜在适生区估计及其生态特征分析 [J]. *生态学报*, 2020, 40(16): 5674-5684.
- [7] 刘荣华, 唐芳瑞, 陈兰英, 等. 不同产地杜仲叶中 5 种主要有效成分的含量比较 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(18): 31-34.
- [8] 兰济艳, 刘泽, 张芹, 等. 不同产地杜仲生长特性及叶中主要有效成分含量的差异与动态变化 [J]. *河北农业大学学报*, 2019, 42(1): 51-56.
- [9] 张婷, 罗云云, 杜伟锋, 等. 不同产地薏苡仁 HPLC 指纹图谱建立及甘油三油酸酯测定 [J]. *中成药*, 2021, 43(4): 944-948.
- [10] 谢苏梦, 季巧遇, 吕尚, 等. 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(24): 7616-7623.
- [11] 白云霞, 宋晓玲, 渠弼, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合灰色关联度与聚类分析对不同产地石榴皮质量评价研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2021, 56(1): 68-74.
- [12] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 231-237.
- [13] 钟世红, 古锐, 李羿, 等. 杜仲叶 HPLC 指纹图谱及成分积累规律的研究 [J]. *华西药理学杂志*, 2010, 25(4): 464-466.
- [14] 马金花, 黎晓敏, 徐爱平. 重庆产杜仲叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中药材*, 2011, 34(2): 206-209.
- [15] 唐芳瑞, 刘荣华, 邵峰, 等. 不同产地杜仲叶高效液相色谱指纹图谱分析 [J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(6): 1496-1498.
- [16] 吴可心, 吴斌, 彭晓曦, 等. 不同产地杜仲叶片活性成分及杜仲胶质量分数差异 [J]. *东北林业大学学报*, 2019, 47(10): 40-43.
- [17] 赵杨, 周欣, 龚小见, 等. 直接进样-质谱检测指纹图谱技术结合化学模式识别法研究杜仲的质量 [J]. *中草药*, 2014, 45(19): 2844-2849.
- [18] 刘星, 王玲, 姚帅, 等. 高效薄层色谱、薄层质谱和 HPLC 指纹图谱联用技术鉴定杜仲不同部位的化学成分差异 [J]. *中草药*, 2022, 53(17): 1-11.
- [19] 张留记, 李宁, 屠万倩, 等. HPLC 法同时测定杜仲叶中 8 种成分的含量 [J]. *中国药房*, 2019, 30(24): 3383-3387.
- [20] 魏艳秀, 刘攀峰, 杜庆鑫, 等. 不同种质杜仲叶中多酚和黄酮含量差异性分析 [J]. *林业科学研究*, 2016, 29(4): 529-535.
- [21] 糜亚男. 不同产地的杜仲遗传多态性及杜仲叶活性成分含量研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [22] 叶东旭, 李钦, 杜红岩, 等. 杜仲雌雄株叶高效液相色谱指纹图谱和次生代谢产物的含量比较 [J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(5): 1077-1079.
- [23] Ye J, Han W J, Deng P, *et al.* Comparative transcriptome analysis to identify candidate genes related to chlorogenic acid biosynthesis in *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. *Trees*, 2019, 33(5): 1373-1384.
- [24] 张争, 杨云, 魏建和, 等. 环境因子导致的植物防御反应与药用次生代谢物的合成和积累 [J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(9): 919-924.
- [25] 张鞍灵, 马亚团, 赵德义, 等. 杜仲叶次生代谢物季节和地域差异性研究 [J]. *林产化学与工业*, 2009, 29(5): 104-108.
- [26] Ma Y, Liu Y, Yang P, *et al.* The synthesis mechanism of chlorogenic acid in leaves of *eucommia ulmoides* oliver [J]. *Appl Ecol Env Res*, 2020, 18(2): 2719-2725.
- [27] 伍庆, 王兴宁, 夏品华. 土壤养分因子对杜仲有效成分含量影响研究 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(25): 11002-11004.
- [28] 张萍, 蒲高斌. 气候因子对金银花绿原酸含量影响的研究 [J]. *山东农业科学*, 2015, 47(9): 77-79.
- [29] Popović B M, Štajner D, Ždero-Pavlović R, *et al.* Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus* spp.) [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 105: 242-250.
- [30] 张维涛, 高巍, 陈金翠. 武陵山区杜仲生态气候特征的初步研究 [J]. *中国农业气象*, 1990, 11(3): 46-49.
- [31] 严瑞娟, 张水寒, 罗跃龙, 等. 不同产地初加工方式处理杜仲叶的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(15): 2085-2091.
- [32] 申梦园, 吴蓓, 段涵琪, 等. 杜仲叶指纹图谱的建立及化学模式识别 [J/OL]. *成都中医药大学学报*, 2022: [2022-06-21]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1501.r.20220621.1452.002.html>.
- [33] 王萍, 梁少佳, 张文文, 等. 杜仲叶质量评价和药典标准建议 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(2): 10-17.

[责任编辑 时圣明]