

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

刘 星^{1,2}, 王 玲², 姚 帅², 张建青², 果德安^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 中国科学院上海药物研究所, 中药标准化技术国家工程研究中心, 上海 201203

摘要:目的 建立杜仲 *Eucommia ulmoides* 不同部位的高效薄层色谱 (high performance thin layer chromatography, HPTLC)、高效薄层质谱鉴别方法 (TLC/MS) 和高效液相色谱 (HPLC) 指纹图谱, 比较杜仲皮、叶、雄花、种子的差异, 寻找差异性成分, 并互相验证, 用于杜仲的质量控制。方法 通过优化供试品制备、展开剂和显色剂等条件, 建立杜仲皮的 HPTLC, 并将该方法应用于杜仲皮、叶、雄花、种子的区分, 寻找差异性斑点; 利用 QTOF/MS 对 4 个部位的 HPTLC 斑点进行鉴定, 明确差异性成分; 采用 HPLC 建立杜仲皮、叶、雄花、种子的指纹图谱, 采集多批次数据, 利用偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 筛选对 4 个部位区分贡献较大的差异性成分, 与薄层色谱和薄层质谱鉴定结果互相验证。结果 自建 HPTLC 鉴别方法优于各国药典, 可清晰地实现 4 个部位的区分; 利用 QTOF/MS 对主要斑点进行分析, 共鉴定 27 个成分, 其中 10 个成分通过对照品确认; 基于 HPLC 的 PLS-DA 多元统计分析筛选出 14 个差异性成分 (VIP>1)。松脂醇二葡萄糖苷在 HPTLC、TLC/MS 和 HPLC 检测技术下均鉴定为杜仲皮的特异性成分; ulmoidoside A、ulmoidoside B、ulmoidoside C、ulmoidoside D 是种子中稳定的差异性标志物; 对于叶和花的鉴别, 3 种鉴别方式所得到的差异性标志物差别较大, 叶中共找到 7 个标志物, 花中共找到 9 个标志物。结论 建立的高效薄层色谱、薄层质谱和 HPLC 指纹图谱方法均可实现杜仲皮、叶、雄花、种子的区分, 联用技术寻找到的差异性成分为杜仲及其中成药质量控制指标的选择奠定基础。

关键词: 杜仲; 不同部位; 薄层色谱; 薄层质谱; 指纹图谱; 多元统计分析; 松脂醇二葡萄糖苷

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)21-7166-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.025

Chemical variance in different parts of *Eucommia ulmoides* by HPTLC, TLC/MS and HPLC hyphenated techniques

LIU Xing^{1,2}, WANG Ling², YAO Shuai², ZHANG Jian-qing², GUO De-an^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. National Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To establish the high performance thin layer chromatography (HPTLC), thin layer chromatography-mass spectrometry (TLC/MS) and high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint for the identification of bark, leaf, flower and seed of Duzhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and differential components were filtrated and verified for the quality control of *E. ulmoides*. **Methods** HPTLC method was established by optimizing the sample preparation, mobile phase and derivatization reagent and applied to identify the bark, leaf, male flower, seed of *E. ulmoides* based on the specific spots and/or peaks. HPTLC spots in four parts were then identified through quadrupole time of flight mass spectrometry (QTOF/MS) to find the differential components. HPLC was used to establish the fingerprints of bark, leaf, flower and seed of *E. ulmoides*. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was used to screen the chemical markers that contributed greatly to the differentiation of the 4 parts based on multiple batches of data and the results were verified with TLC and TLC/MS. **Results** HPTLC identification method is the best compared to the method reported in pharmacopoeia from other countries, and can clearly distinguish the four parts. Additionally, the main spots were analyzed by QTOF/MS, and a total of 27 components were identified, 10 of which were confirmed by reference substances. Fourteen differential components (VIP > 1) were screened out by PLS-DA based on HPLC. According to the results obtained by HPTLC, TLC/MS and

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82003940); 岐黄工程首席科学家项目 (2020)

作者简介: 刘 星, 女, 硕士研究生, 研究方向为质量控制方法研究。E-mail: 15136456231@163.com

*通信作者: 果德安, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药分析与现代质量标准研究。Tel: (021)50271516 E-mail: daguo@simm.ac.cn

HPLC, pinoresinol diglucoside were selected as the characteristic component of bark, ulmoidoside A, ulmoidoside B, ulmoidoside C, ulmoidoside D as the robust markers in seed. The differential markers obtained by these three methods varied widely, with seven markers in leaf, nine markers in flower in total. **Conclusion** HPTLC, TLC/MS, HPLC methods established could be used to effectively distinguish bark, leaf, flower and seed of *E. ulmoides*, and the screened differential components lay a solid foundation for the selection of quality control indexes of *E. ulmoides* and its related Chinese patent medicines.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; different parts; HPTLC; TLC/MS; HPLC fingerprint; multivariate statistical analysis; pinoresinol diglucoside

杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 为杜仲科杜仲属多年生落叶乔木，是我国传统药用植物。其干燥树皮是名贵中药杜仲，干燥叶是另一味中药杜仲叶。2 者都被收载于《中国药典》2020 年版中，具有补肝肾、强筋骨的功效，用于治疗肝肾不足、腰膝酸痛等^[1]。杜仲树需生长 15 年以上其树皮方可做药用，药用资源紧张^[2]。近年来，人们对杜仲非传统药用部位叶、雄花、种子的化学成分和药理作用开展了系统的研究^[3-6]。杜仲皮、叶、雄花、种子化学成分相似，主要为木脂素类、环烯醚萜类、黄酮类、苯丙素类^[7-8]。市场上植物提取物、中药制剂、保健品中存在药用部位与非药用部位相互掺杂的现象。因此有必要建立区分杜仲不同部位的质量控制方法。

目前报道的文献大多是针对杜仲皮建立薄层色谱鉴别^[9-10]或指纹图谱鉴别方法^[11-13]，尚未有文献建立薄层色谱质谱或指纹图谱鉴别方法对杜仲皮、叶、雄花、种子 4 个部位同时进行区分，本研究从高效薄层色谱（high performance thin layer chromatography, HPTLC）、薄层质谱（thin layer chromatography-mass spectrometry, TLC/MS）、HPLC 指纹图谱 3 个层面建立杜仲不同部位的分析方法，并结合偏最小二乘判别分析（partial least squares discriminant analysis, PLS-DA）等化学模式识别方法，揭示杜仲不同部位间的差异，为杜仲药材质量控制及评价提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HPTLC 系统（瑞士卡玛公司），包括薄层自动点样仪 ATS4、薄层成像仪 VISUALIZER、薄层自动展开仪 ADC2、薄层自动浸渍器、薄层板加热器 III 和 visionCATS 工作站；Waters ACQUITY Arc 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司），配有二元泵、柱温箱、样品管理器、PDA 2998 检测器；UPLC-QTOF/MS 系统由 Waters ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱仪和 Waters Xevo G2-S Q-TOF 质谱仪组成；Quintix 224-1CN-1 型电子天平（赛多利斯北京有限公司）；Milli-Q Integral 型超纯水系统（美国默克公司）；P180H 超声波水浴锅（德国埃尔玛

公司）。

1.2 药物与试剂

对照品松脂醇二葡萄糖苷（批号 8963）、松脂醇单葡萄糖苷（批号 9285）、丁香树脂醇双葡萄糖苷（批号 8792）、京尼平苷（批号 8598）、京尼平苷酸（批号 1241）、车叶草苷酸（批号 9614）、桃叶珊瑚苷（批号 7683）均购自上海诗丹德生物技术有限公司；杜仲树脂酚双葡萄糖苷（批号 PS012113）购自成都普思生物科技股份有限公司，以上对照品质量分数均大于 98%；绿原酸（批号 110753-202018，96.1%）、芦丁（批号 100080-202012，91.6%）均购自中国食品药品检定研究院；液相分析试剂用乙腈为色谱纯（美国霍尼韦尔公司）；磷酸为分析纯（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；样品制备及薄层展开用甲醇、二氯甲烷、冰醋酸等溶剂均为分析纯（国药集团上海化学试剂有限公司）。

1.3 样品

共收集 15 批杜仲皮、9 批杜仲叶、10 批杜仲雄花、9 批杜仲种子，样品产地见表 1。药材均由上海

表 1 杜仲皮、叶、雄花、种子样品信息

Table 1 Sample information of bark, leaf, male flower and seed of *E. ulmoides*

编号	部位	产地	编号	部位	产地
1	皮	四川	23	叶	湖北
2	皮	四川	24	叶	/
3	皮	湖北	25	花	湖南
4	皮	四川	26	花	湖南
5	皮	安徽	27	花	湖南
6	皮	/	28	花	湖南
7	皮	/	29	花	湖南
8	皮	/	30	花	/
9	皮	/	31	花	/
10	皮	/	32	花	安徽
11	皮	四川	33	花	/
12	皮	四川	34	花	湖南
13	皮	四川	35	种子	四川
14	皮	四川	36	种子	山西
15	皮	四川	37	种子	山西
16	叶	湖南	38	种子	江苏
17	叶	湖南	39	种子	江苏
18	叶	福建	40	种子	/
19	叶	湖南	41	种子	/
20	叶	湖南	42	种子	/
21	叶	湖南	43	种子	/
22	叶	/			

药物研究所中药现代化中心姚帅高级实验师通过性状、显微等鉴定为杜仲 *E. ulmoides* Oliv.。

2 方法

2.1 TLC/MS 分析

2.1.1 对照品溶液的制备 称取对照品松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、丁香树脂醇双葡萄糖苷、京尼平苷酸、车叶草苷酸、桃叶珊瑚苷适量，加甲醇溶解配成质量浓度分别为 0.25、0.25、0.25、0.50、0.50、0.50 mg/mL 的对照品溶液，即得。

2.1.2 薄层色谱供试品溶液的制备 精密称取杜仲皮、叶、雄花、种子粉末（过 3 号筛）约 0.5 g，加甲醇 5 mL，超声处理（功率 1130 W，频率 37 kHz）15 min，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液作为供试品溶液。

2.1.3 质谱供试品溶液的制备 取已展开的高效薄层板，沿展开方向剪取部分条带，经显色后置可见光下检视定位斑点，未显色部分按定位结果刮取对应斑点，加 50% 甲醇 1 mL 超声处理 30 min，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液作为供试品溶液。

2.1.4 薄层色谱条件 采用超高效薄层色谱板 G60 F254（20 cm×10 cm，Merck，Darmstadt，德国）。吸取对照品、供试品溶液各 10 μL，以条带状方式点样于高效薄层板上，以二氯甲烷-冰醋酸-甲醇-水（15：6：2：2）为展开剂，展开，取出，晾干；以 10% 硫酸乙醇为显色剂，浸 10% 硫酸乙醇之后 105 ℃ 加热 5 min 显色，置可见光下检视。

2.1.5 质谱条件 电喷雾 ESI 源，负离子模式检测；毛细管电压 1.0 kV；锥孔电压 40 V；source offset 80 V；离子源温度 100 ℃；脱溶剂温度 450 ℃；脱溶剂体积流量 800 L/h；质谱扫描方式为 Fast DDA，扫描范围为 m/z 100~1500，扫描时间 0.20 s；碰撞能设置为低质量端裂解能量 10~20 V，高质量端裂解能量 40~50 V。

2.2 HPLC 分析

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单葡萄糖苷、丁香树脂醇双葡萄糖苷、杜仲树脂酚双葡萄糖苷、京尼平苷、京尼平苷酸、绿原酸、芦丁适量，加甲醇溶解配成质量浓度分别为 50、50、100、50、50、100、100、100 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取杜仲皮、叶、

雄花、种子细粉（过 3 号筛）0.6 g，加 50% 甲醇 20 mL，称定质量，超声处理（功率 1130 W，频率 37 kHz）30 min，放冷，再称定质量，用 50% 甲醇补足减失的质量，14 000 r/min 离心 10 min，取上清液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液即得。

2.2.3 色谱条件 采用 Waters HSS T3（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈（A）-0.1% 磷酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0~48 min，5%~21% A；48~60 min，21%~36% A）。柱温为 30 ℃，体积流量为 1.0 mL/min，进样量为 10 μL，检测波长为 230 nm。

3 结果与分析

3.1 HPTLC 方法的优化

对 HPTLC 供试品制备方式、展开剂和显色剂进行了优化。以杜仲皮为对象，比较了《香港中药材标准》《韩国药典》和《欧洲药典》中的供试品制备方式以及 4 种自建的制备方法，具体见表 2。

表 2 供试品制备方法

Table 2 Preparation methods of test sample

编号	名称	具体方法流程
1	《香港中药材标准》	甲醇超声处理 30 min，取上清液蒸干，残渣加水溶解，二氯甲烷萃取，弃去二氯甲烷层，加正丁醇萃取，取正丁醇层旋干，残渣加甲醇溶解
2	《韩国药典》	甲醇超声处理 60 min
3	《欧洲药典》	甲醇超声处理 10 min，弃去甲醇层，重复操作 2 次，药渣挥干后，加甲醇 60 ℃ 超声 20 min，离心取上清液
4	自建方法 1	甲醇超声 15 min
5	自建方法 2	乙醇超声 15 min
6	自建方法 3	甲醇超声处理 30 min，取上清液蒸干，残渣加水溶解，离心取上清液加入 SPE 柱，60% 甲醇洗脱
7	自建方法 4	甲醇超声处理 30 min，取上清液蒸干，残渣加水溶解，离心取上清液加入 SPE 柱，40% 甲醇洗脱

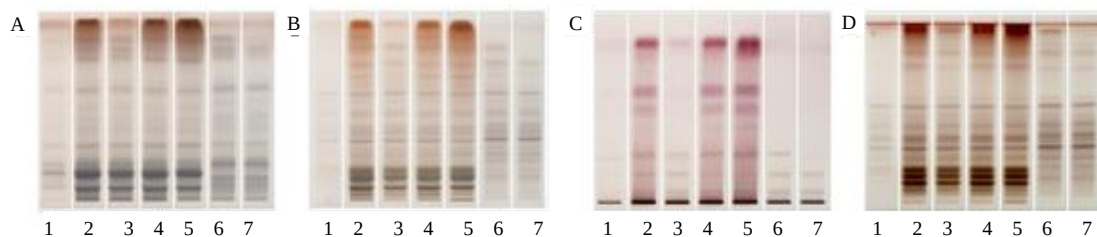
结果表明，不同提取方式在不同显色剂下得到的图谱轮廓具有较大差异，其中方法《韩国药典》、自建方法 1、2 得到成分较为丰富，自建方法 1（甲醇超声处理 15 min）相比于其他制备方法操作简便

省时,背景干扰较小,因此作为最终供试品制备方式。色谱条件方面考察二氯甲烷-甲醇-甲酸(30:10:1)、三氯甲烷-甲醇-水(10:5:1)、甲苯-乙酸乙酯-甲酸(65:35:1)、二氯甲烷-甲醇-冰醋酸-水(15:2:6:2)4种展开剂对杜仲薄层分离的影响,结果表明展开剂三氯甲烷-甲醇-水(10:5:1)和二氯甲烷-甲醇-冰醋酸-水(15:2:6:2)获得的薄层斑点较多,斑点细窄。进一步考察了硫酸-水(2:8)、稀硫酸试液、茴香醛试液、10%硫酸

乙醇试液等显色剂,结果表明,采用10%硫酸乙醇试液显色剂获得条带清晰、斑点分离度好,因此最终选择二氯甲烷-甲醇-冰醋酸-水(15:2:6:2)用于杜仲药材的薄层分析,结果见图1。

3.2 杜仲不同部位的 HPTLC 及区分

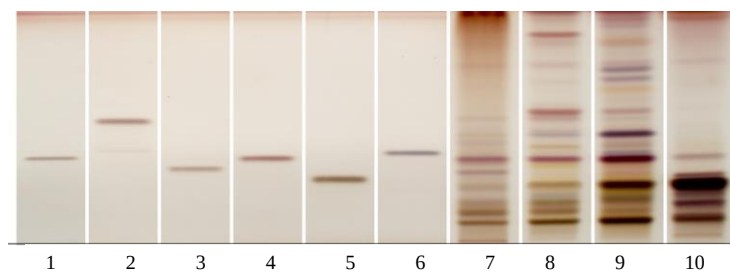
采用上述供试品制备和色谱条件,对杜仲皮、叶、雄花、种子进行分析,代表性样品结果如图2所示。从整体上看,杜仲皮和种子的斑点较少,叶和花的斑点较多。薄层板底部的斑点($R_f=0.10$ 、



A-展开剂为二氯甲烷-甲醇-甲酸(30:10:1),显色剂为硫酸-水(2:8) B-展开剂为三氯甲烷-甲醇-水(10:5:1),显色剂为稀硫酸试液 C-展开剂为甲苯-乙酸乙酯-甲酸(65:35:1),显色剂为茴香醛试液 D-展开剂为二氯甲烷-甲醇-冰醋酸:水(15:2:6:2),显色剂为10%硫酸乙醇试液;条带1、2、3、4、5、6、7的供试品制备方式分别对应文中所述的《香港中药材标准》《韩国药典》《欧洲药典》及4种自建方法 A-mobile phase: methylene chloride-methanol-formic acid (30:10:1), derivatization reagent: sulfuric acid-water (2:8) B-mobile phase: chloroform-methanol-water (10:5:1), derivatization reagent: dilute sulfuric acid C-mobile phase: Toluene-ethyl acetate-formic acid (65:35:1), Derivatization reagent: anisaldehyde solution D-mobile phase: Methylene chloride-methanol-glacial acetic acid-water (15:2:6:2), Derivatization reagent: 10% sulfuric acid in 96% ethanol solution. The preparation methods of strips 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 were in accordance with the Hong Kong Standard of Chinese medicinal materials, the Korean Pharmacopoeia, the European Pharmacopoeia and the four self-established methods

图1 不同供试品制备、展开剂、显色剂下杜仲皮的薄层色谱图

Fig. 1 HPTLC chromatogram of *E. ulmoides* bark under different sample preparation, developing solvent and chromogenic agent



1-丁香树脂醇双葡萄糖苷 2-松脂醇单葡萄糖苷 3-松脂醇二葡萄糖苷 4-京尼平苷酸 5-桃叶珊瑚苷 6-车叶草苷酸 7-杜仲皮 8-杜仲叶 9-杜仲雄花 10-杜仲种子
1-syringaresinol diglucoside 2-pinoresinol 4-O-glucoside 3-pinoresinol diglucoside 4-geniposidic acid 5-aucubin 6-asperulosidic acid 7-*E. ulmoides* bark 8-*E. ulmoides* leaf 9-*E. ulmoides* male flower 10-*E. ulmoides* seed

图2 杜仲皮、叶、雄花、种子和6个对照品在可见光下的薄层色谱图

Fig. 2 HPTLC chromatogram of bark, leaf, male flower, seed of *E. ulmoides* and six reference standards under visible light

0.14、0.17,棕色)以及 $R_f=0.36$ 处的红褐色斑点在皮、叶中均可观察到;在杜仲皮中, $R_f=0.32$ 处的棕色斑点在叶、雄花、种子中观察不到,可作为区分皮与其他部位的特征斑点;在杜仲叶中,除了 R_f 值在0.1~0.2的棕色斑点以及 $R_f=0.36$ 的斑点外,还可以观察到 $R_f=0.27$ (棕色), $R_f=0.54$ (红褐色), $R_f=0.85$ (红褐色)处几个颜色较深的主斑点,说明这些成分在叶中的含量较高,其中 $R_f=0.85$

处的红褐色斑点仅存在于杜仲叶中可作为其特征斑点。在杜仲雄花中,斑点 $R_f=0.1$ (黑色), $R_f=0.24$ (红褐色), $R_f=0.36$ (红褐色), $R_f=0.45$ (紫色)为主要斑点,但杜仲种子在 $R_f=0.1$ 和 $R_f=0.24$,杜仲皮和叶在 $R_f=0.36$ 存在与花颜色相近的斑点,因此将 $R_f=0.45$ 的紫色斑点作为花的特征斑点。此外, $R_f=0.38$ 处的细蓝棕色斑点, $R_f=0.63$ 处的黄色斑点以及 $R_f=0.67$ 和 $R_f=0.71$ 处的2个紫色斑点

仅存在于杜仲雄花中,也可以作为其特征斑点。在种子中,斑点较少且颜色相近,主要集中于薄层板的下三分之一处,与其他部位的条带轮廓差异较大。各个薄层斑点通过质谱进行鉴别并用对照品进行进一步验证,见表 3。

3.3 杜仲不同部位的 TLC/MS 鉴定及区分

通过质谱对薄层色谱得到的主要斑点和差异性斑点进行鉴定,进一步明确杜仲皮、叶、雄花、种子所含成分的差异。取“2.1.3”项下制备的 4 个部位斑点的供试品溶液,进行 UPLC-QTOF/MS 分析,共检测到 31 个成分,杜仲皮的薄层斑点检测到 7 个成分(图 3),主要是木脂素类;杜仲叶、雄花的薄层斑点各检测到 17 个成分(图 4、5),主要是黄

酮类;杜仲种子的薄层斑点检测到 9 个成分(图 6),主要是环烯醚萜类。从 4 个部位共鉴定了 27 个成分,举例说明具体鉴定过程:斑点 p4 ($R_f=0.32$),一级质谱图可见加和离子峰 m/z 727.242 0 ($[M-H+HCOOH]^-$) 和准分子离子峰 m/z 681.240 8 ($[M-H]^-$),二级质谱图中可见 m/z 519.186 3 ($[M-H-Glc]^-$)、 m/z 357.133 6 ($[M-H-2Glc]^-$)、 m/z 151.038 7 ($[M-H-C_{24}H_{34}O_{13}]^-$) 等碎片, m/z 151.038 7 是四氢呋喃环裂解后形成的特征离子,根据这些碎片信息初步将斑点 p4 ($R_f=0.32$) 鉴定为松脂醇二葡萄糖苷,用该对照品进行验证,薄层板上相同 R_f 值处出现颜色相同的斑点(图 2),鉴定结果可靠准确。斑点 p3 ($R_f=0.36$) 的 TIC 图中可

表 3 杜仲不同部位斑点的质谱信息

Table 3 MS information of bands in different parts of *E. ulmoides*

斑点	R_f	化合物	m/z	离子类型	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	碎片	鉴定	皮叶雄花种子
p1	0.51	M1*	519.185 5	$[M-H]^-$	-2.1	$C_{26}H_{32}O_{11}$	357.134 2, 342.100 9, 151.039 0	松脂醇单葡萄糖苷	+- - -
p2/h1	0.45	M2*	433.134 5	$[M-H+HCOOH]^-$	-0.2	$C_{17}H_{24}O_{10}$	387.128 6, 225.075 9, 207.064 9, 123.044 4, 101.023 7	京尼平苷	+- + -
p3	0.36	M3*	787.267 3	$[M-H+HCOOH]^-$	1.5	$C_{34}H_{46}O_{18}$	579.206 8, 417.154 4, 402.134 0, 181.049 7	丁香树脂醇双葡萄糖苷	+- - -
p3/y3/h3/z1	0.36	M4*	373.114 1	$[M-H]^-$	1.6	$C_{16}H_{22}O_{10}$	211.060 7, 193.049 6, 167.070 5, 149.059 8, 123.044 7, 119.034 9	京尼平苷酸	++ + +
p3/y3/h3	0.36	M5	520.179 4	$[M-H]^-$	-4.8	$C_{25}H_{31}NO_{11}$	358.128 3, 340.117 5, 234.076 5, 190.049 9, 164.070 0	eucomoside B	++ + -
p4	0.32	M6*	727.242 0	$[M-H+HCOOH]^-$	-4.0	$C_{32}H_{42}O_{16}$	519.186 3, 357.133 6, 311.126 6, 151.038 7	松脂醇二葡萄糖苷	+- - -
p5	0.17	M7	743.242 6	$[M-H+HCOOH]^-$	3.6	$C_{32}H_{42}O_{17}$	697.237 9, 535.183 1, 373.128 5, 343.112 9, 211.060 9, 193.052 2, 181.048 7, 163.039 5	1-羟基松脂醇双葡萄糖苷	+- - -
y1/h1	0.45	M8*	459.114 5	$[M-H+HCOOH]^-$	1.3	$C_{18}H_{22}O_{11}$	413.106 8, 251.054 8, 191.033 8, 147.044 3	车叶草苷	- + + -
y2	0.40	M9	447.094 0	$[M-H]^-$	2.9	$C_{21}H_{20}O_{11}$	284.031 5, 255.035 2, 178.995 2, 151.001 0	285-O-Glc	- + - -
y4	0.32	M10	463.087 7	$[M-H]^-$	0.0	$C_{21}H_{20}O_{12}$	300.025 9, 271.023 2, 255.027 8, 178.997 7, 151.004 0	301-O-Glc	- + - -
	0.32	M11	593.148 7	$[M-H]^-$	-3.2	$C_{27}H_{30}O_{15}$	285.038 6, 255.026 5, 151.004 3	285-O-Glc-Rha	- + - -
y5/h4/z3	0.24	M12*	391.121 9	$[M-H+HCOOH]^-$	-5.4	$C_{15}H_{22}O_9$	345.118 2, 183.065 9, 165.055 5, 139.039 7	桃叶珊瑚苷	- + + +
y5/h4	0.24	M13	705.161 9	$[M-H]^-$	6.5	$C_{21}H_{38}O_{26}$	513.102 9, 339.050 2, 321.036 7, 229.014 1, 191.055 3	-	- + + -
y5/h4	0.24	M14*	353.088 0	$[M-H]^-$	2.0	$C_{16}H_{18}O_9$	191.056 2, 179.033 7, 173.045 3, 161.022 7	绿原酸	- + + -
	0.24	M15*	609.147 2	$[M-H]^-$	2.6	$C_{27}H_{30}O_{16}$	301.033 5, 271.027 6, 178.997 3, 151.001 6	芦丁	- + + -
y5	0.24	M16	549.084 2	$[M-H]^-$	-6.9	$C_{24}H_{22}O_{15}$	505.097 3, 463.089 4, 300.025 8, 271.022 6, 178.995 7, 151.003 1	301-O-Glc-Mal	- + - -
y6/h5	0.20	M17	595.129 3	$[M-H]^-$	-1.0	$C_{26}H_{28}O_{16}$	300.026 7, 271.023 4, 255.028 5, 178.997 7, 151.001 4	301-O-Glc-Xyl	- + + -
y7	0.14	M18	695.147 8	$[M-H]^-$	2.6	$C_{30}H_{32}O_{19}$	651.155 9, 489.103 3, 446.086 9, 285.041 0	285-O-Glc-Glc-Mal	- + - -
y7/h6/z5	0.14	M19	191.054 8	$[M-H]^-$	-4.2	$C_7H_{12}O_6$	173.047 8, 171.027 8, 127.038 8, 111.044 9, 109.028 0, 93.033 4, 87.008 0, 85.029 0	-	- + + +
y8/h7	0.10	M20	625.138 7	$[M-H]^-$	-2.9	$C_{27}H_{30}O_{17}$	463.084 7, 301.033 9, 151.003 9	301-O-Glc-Glc	- + + -
	0.10	M21	711.142 6	$[M-H]^-$	2.4	$C_{30}H_{32}O_{20}$	667.148 4, 505.097 4, 462.079 7, 301.036 3	301-O-Glc-Glc-Mal	- + + -
y8/h7/z6	0.10	M22	387.112 5	$[M-H+HCOOH]^-$	-3.6	$C_{12}H_{22}O_{11}$	341.107 3, 179.055 3, 161.044 4, 143.034 2, 119.034 1, 101.024 6, 89.024 0	-	- + + +
h2	0.38	M23*	431.117 7	$[M-H]^-$	-3.0	$C_{18}H_{24}O_{12}$	269.065 4, 251.054 8, 165.054 4, 147.044 8, 121.028 8, 119.038 2, 89.024 2	车叶草苷酸	- - + -
h4	0.24	M24	593.153 6	$[M-H]^-$	5.1	$C_{27}H_{30}O_{15}$	285.038 6, 255.026 5, 151.004 3	285-O-Rha-Glc	- - + -
h5	0.20	M25	625.138 7	$[M-H]^-$	-2.9	$C_{27}H_{30}O_{17}$	445.083 2, 300.026 0, 151.003 4	301-O-Glc-Glc	- - + -
	0.20	M26	609.147 2	$[M-H]^-$	2.6	$C_{27}H_{30}O_{16}$	300.026 9, 271.023 2, 178.994 3	301-O-Glc-Rha	- - + -
z2	0.27	M27	1 127.350 0	$[M-H]^-$	4.0	$C_{50}H_{64}O_{29}$	965.290 0, 771.235 2, 711.215 6, 549.161 5, 443.119 4, 373.112 8, 193.050 3, 149.060 0	ulmoidoside B	- - - +
z3	0.24	M28	729.225 0	$[M-H]^-$	1.1	$C_{32}H_{42}O_{19}$	567.167 8, 443.118 3, 373.114 2, 211.058 0, 193.050 5, 175.037 2, 167.070 8, 149.060 6	-	- - - +
z4	0.19	M29	1 483.455 4	$[M-H]^-$	-0.5	$C_{66}H_{84}O_{38}$	1321.391 1, 1067.330 3, 771.237 1, 711.215 1, 549.160 5, 373.111 9, 149.060 1	ulmoidoside D	- - - +
z5	0.14	M30	1 085.338 9	$[M-H]^-$	3.7	$C_{48}H_{62}O_{28}$	923.283 3, 799.230 2, 729.224 5, 711.214 3, 549.161 6, 443.118 8, 373.113 2, 193.050 0, 149.059 9	ulmoidoside A	- - - +
z6	0.10	M31	1 441.446 4	$[M-H]^-$	0.5	$C_{64}H_{82}O_{37}$	1 279.408 4, 1 155.343 8, 373.112 6, 149.059 5	ulmoidoside C	- - - +

*表示与对照品比对确认 “+”-检测到 “-”-未检测到

“**” refers to the compound identified by comparing with reference standard “+”- detected “-”-not detected

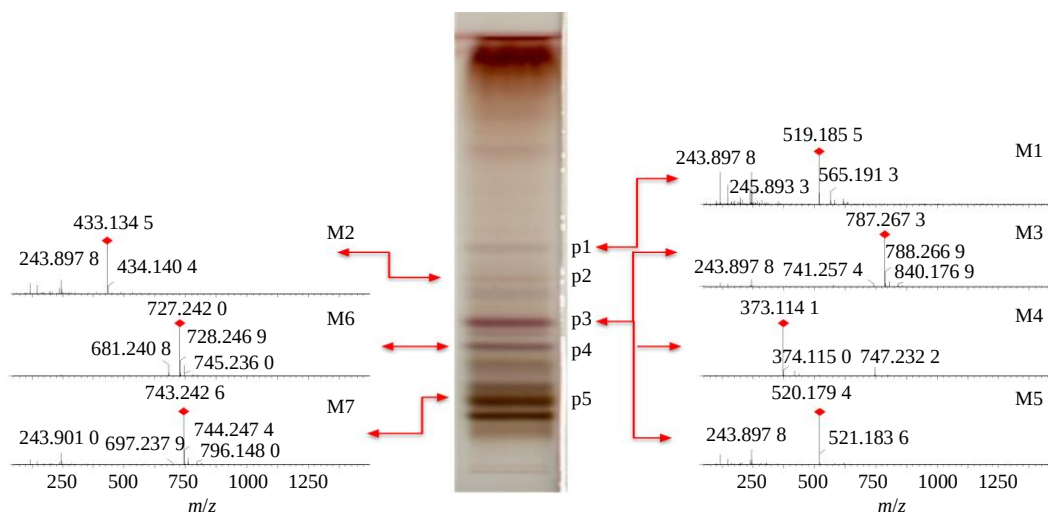


图 3 杜仲皮的 TLC/MS 图谱

Fig. 3 TLC/MS chromatogram of *E. ulmoides* bark

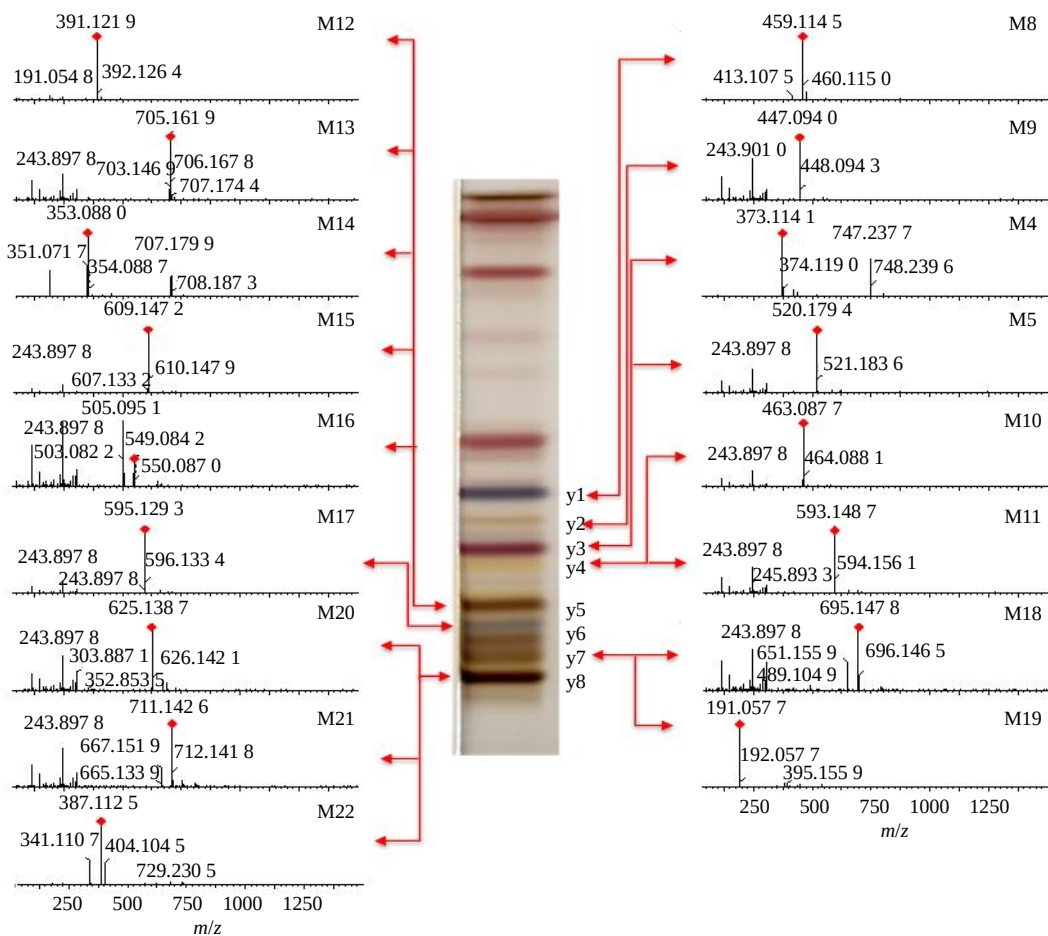


图 4 杜仲叶的 TLC/MS 图谱

Fig. 4 TLC/MS chromatogram of *E. ulmoides* leaf

见 3 个色谱峰，对应的母离子分别为 m/z 373.114 1 ($[M-H]^-$), m/z 787.267 3 ($[M-H+HCOOH]^-$), m/z

520.179 4 ($[M-H]^-$), 根据它们的一级和二级质谱信息, 推测该斑点可能含有京尼平苷酸、丁香树脂醇双

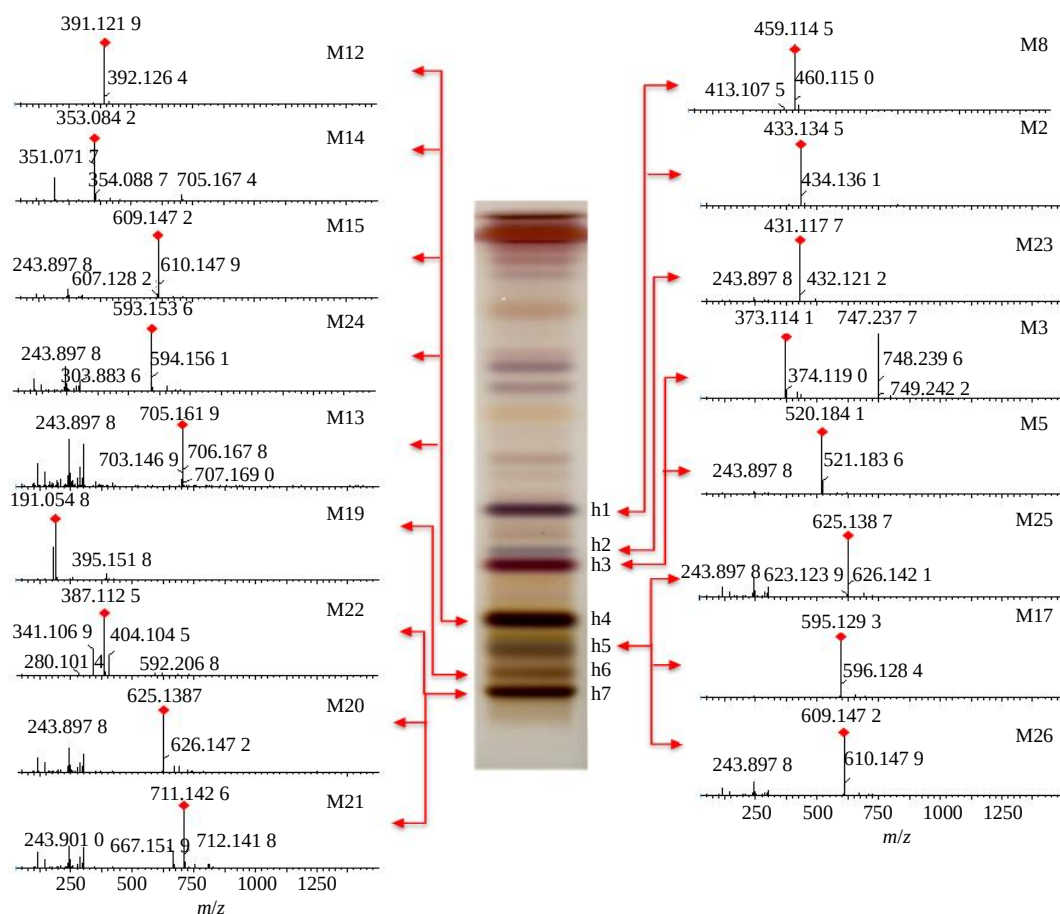


图 5 杜仲雄花的 TLC/MS 图谱

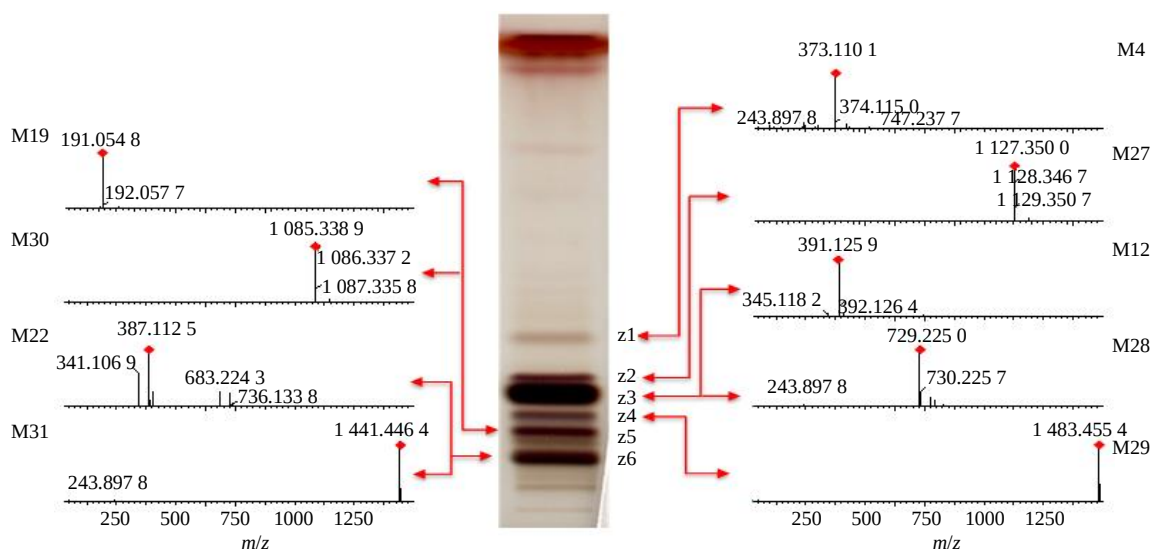
Fig. 5 TLC/MS chromatogram of *E. ulmoides* male flower

图 6 杜仲种子的 TLC/MS 图谱

Fig. 6 TLC/MS chromatogram of *E. ulmoides* seed

葡萄糖苷、eucomoside B, 用对照品进行验证 (图 2), 斑点 p3 ($R_f=0.34$) 含有丁香树脂醇双葡萄糖苷、京

尼平苷酸, 由于没有 eucomoside B 对照品, 所以该成分未进行验证。鉴定的 27 个成分中共有 6 个成分用

对照品在薄层板上进行了验证(图2)。

京尼平苷酸是 4 个部位的共有成分, eucomoside B 是皮、叶、花的共有成分, 桃叶珊瑚苷、 m/z 191.054 8、 m/z 387.112 5 是叶、花、种子的共有成分。化合物 **M1**: 松脂醇单葡萄糖苷、**M3**: 丁香树脂醇双葡萄糖苷、**M6**: 松脂醇二葡萄糖苷、**M7**: 1-羟基松脂醇双葡萄糖苷仅存在于杜仲皮中。化合物 **M9**: 285-O-Glc (m/z 447.094 0)、**M10**: 301-O-Glc (m/z 463.087 7)、**M11**: 285-O-Glc-Rha (m/z 593.148 7)、**M16**: 301-O-Glc-Mal (m/z 549.084 2)、**M18**: 285-O-Glc-Glc-Mal (m/z 695.147 8) 仅存在于杜仲叶中。化合物 **M23**: 车叶草苷酸、**M24**: 285-O-Rha-Glc (m/z 593.153 6)、**M25**: 301-O-Glc-Glc (m/z 625.138 7)、**M26**: 301-O-Glc-Rha (m/z 609.147 2) 仅存在于杜仲雄花中。化合物 **M27**: ulmoidoside B、**M28**: m/z 729.2250、**M29**: ulmoidoside

D、**M30**: ulmoidoside A、**M31**: ulmoidoside C 仅存在于杜仲种子。这些差异性成分对应的薄层斑点体现在杜仲皮中 p_1 ($R_f=0.51$), p_3 ($R_f=0.36$), p_4 ($R_f=0.32$), p_5 ($R_f=0.17$), 杜仲叶中 y_2 : ($R_f=0.40$), y_4 : ($R_f=0.32$), y_5 : ($R_f=0.24$), y_7 : ($R_f=0.14$), 杜仲雄花中 h_2 : ($R_f=0.38$), h_4 : ($R_f=0.24$), h_5 : ($R_f=0.20$), 杜仲种子中 z_2 : ($R_f=0.27$), z_3 : ($R_f=0.24$), z_4 : ($R_f=0.19$), z_5 : ($R_f=0.14$), z_6 : ($R_f=0.10$)。这些差异性的斑点及其对应的质谱信号可作为杜仲不同部位薄层质谱区分的特征。

3.4 杜仲不同部位的 HPLC 色谱及差异性区分

按照“2.2.3”项方法, 采用建立的 HPLC 指纹图谱方法, 对 15 批杜仲皮、9 批杜仲叶、10 批杜仲雄花、9 批杜仲种子的指纹图谱进行采集。为检测仪器稳定性, 每隔 6 针进 1 针 QC 溶液。各部位叠加图谱及对照图谱如图 7 所示。15 批杜仲皮标

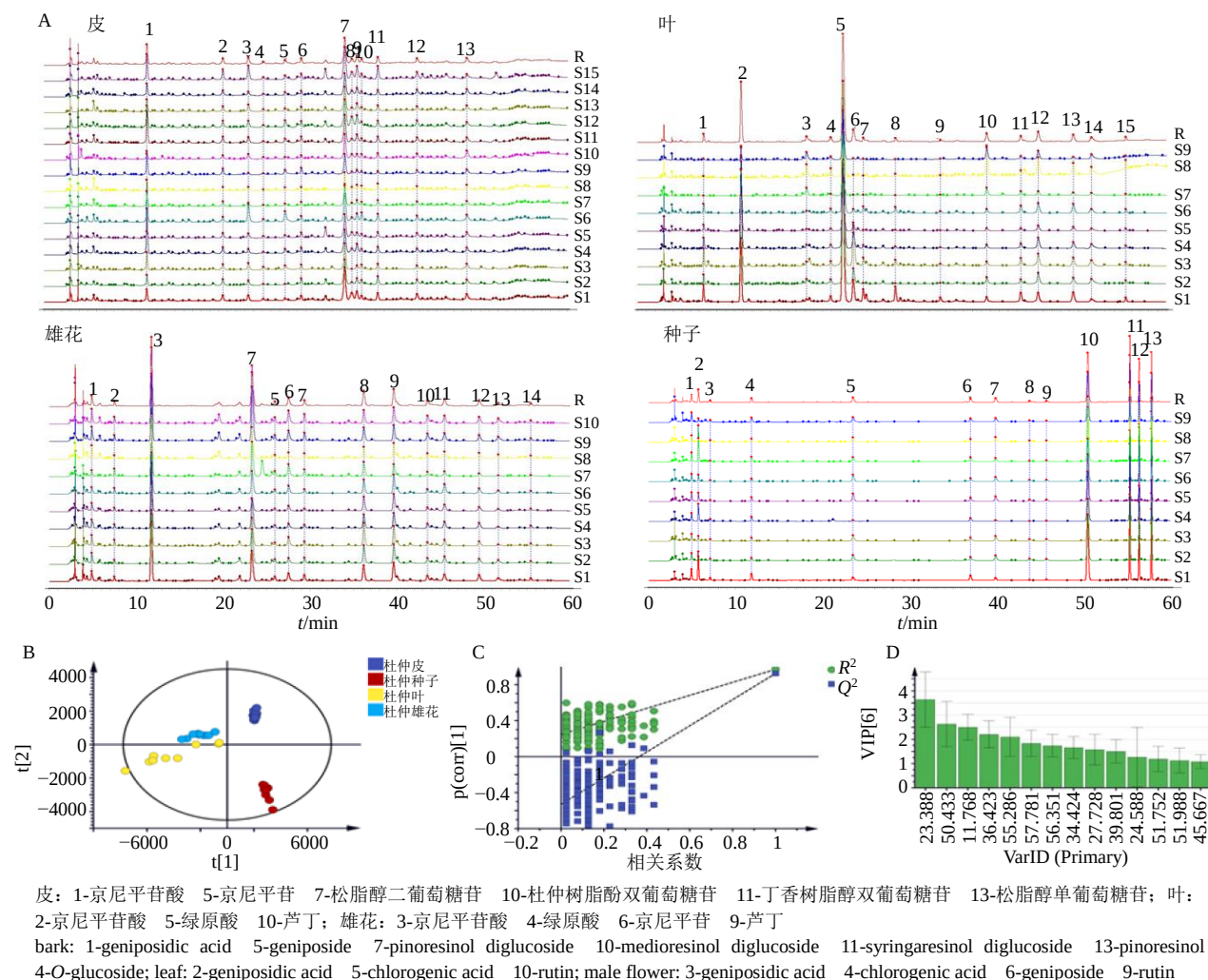


图 7 杜仲皮、叶、雄花、种子的指纹图谱 (A)、PLS-DA (B)、排序检验图 (C) 和 VIP 值 (D)

Fig. 7 Fingerprints of bark, leaf, male flower and seed of *E. ulmoides* (A), PLS-DA (B), sequencing test (C) and VIP values (D)

定了 13 个共有峰, 9 批杜仲叶标定了 15 个共有峰, 10 批杜仲雄花标定了 14 个共有峰, 9 批杜仲种子标定了 13 个共有峰。4 个部位指纹图谱的轮廓图表明杜仲皮中的峰 7, 杜仲叶中的峰 5、6, 杜仲雄花中的峰 8、9, 杜仲种子中的峰 10、11、12、13 是明显有差异的色谱峰。

为了全面、科学、客观地找寻区分 4 个部位的差异性成分, 将 15 批杜仲皮, 9 批杜仲叶, 10 批杜仲雄花, 9 批杜仲种子的各色谱峰峰面积导入 SIMCA-14.1 软件进行多元统计分析。采用 PLS-DA 模型对数据进行统计分析, 标度化方法为 Par, 自变量累积解释能力参数 (R^2_X) 为 0.934, 因变量累积解释能力参数 (R^2_Y) 为 0.972, 预测能力参数 (Q^2) 为 0.934, 均大于 0.5, 说明建立模型有较好的解析能力和预测能力。对该模型进行扰动测试, 200 次验证结果显示, R^2 和 Q^2 在纵轴的截距分别为 0.248, -0.529, 说明 PLS-DA 没有过拟合情况, 预测结果可靠 (图 7-C)。由 PLS-DA 得分图 (图 7-B) 可知杜仲皮、叶、花、种子样品能够实现很好的区分, 说明 4 个部位之间的化学成分存在差异。以 VIP 值 > 1 为标准, 筛选得到 14 个差异性成分, 分别为皮: 峰 7 (松脂醇二葡萄糖苷, $t_R=34.424$ min); 叶: 峰 5 (绿原酸, $t_R=23.388$ min), 峰 6 ($t_R=24.588$ min), 峰 14 ($t_R=51.752$ min), 峰 12 ($t_R=45.667$ min); 雄花: 峰 3 (京尼平苷酸, $t_R=11.768$ min), 峰 8 ($t_R=36.423$ min), 峰 6 (京尼平苷, $t_R=27.728$ min), 峰 9 (芦丁, $t_R=39.801$ min), 峰 13 ($t_R=51.988$ min); 种子: 峰 10 (ulmoidoside A, $t_R=50.433$ min), 峰 11 (ulmoidoside C, $t_R=55.286$ min), 峰 12 (ulmoidoside D, $t_R=56.351$ min), 峰 13

(ulmoidoside B, $t_R=57.781$ min)。综合考虑 4 个部位指纹图谱的轮廓图中差异明显的色谱峰以及 VIP 值筛选出的差异性成分, 将皮中峰 7 (松脂醇二葡萄糖苷) 作为皮的特征峰; 叶中峰 6 ($t_R=24.588$ min) 作为叶的特征峰; 雄花中峰 8 ($t_R=36.423$ min) 作为雄花的特征峰; 种子中峰 10 (ulmoidoside A), 峰 11 (ulmoidoside C), 峰 12 (ulmoidoside D), 峰 13 (ulmoidoside B) 作为种子的特征峰。

3.5 HPTLC、TLC/MS 和 HPLC 指纹图谱对杜仲不同部位差异性成分阐述

HPTLC、TLC/MS 和 HPLC 指纹图谱寻找到的差异性成分及其鉴定结果汇总如表 4 所示。对于杜仲皮的鉴别, 松脂醇二葡萄糖苷在各种检测技术下均鉴定为差异性成分, 说明此成分可作为杜仲皮的质量标志物, 在制定质量标准时需要重点关注。对于杜仲种子的鉴别, ulmoidoside A、ulmoidoside B、ulmoidoside C、ulmoidoside D 也是稳定的差异性标志物。对于叶和花的鉴别, 3 种检测方式所得到的差异性标志物差别较大, 叶中共找到 7 个标志物, 花中共找到 9 个标志物。薄层和液相色谱寻找到的差异性成分相对于薄层质谱较少, 在实际应用时, 可以综合考虑 3 种鉴别方式。本研究寻找到的差异性成分可进一步用于杜仲相关中药、饮片和中成药的标准制定。

4 讨论

HPTLC 方法是《中国药典》2020 年版法定的鉴别手段, 尤其随着自动点样仪、自动展开仪、薄层自动浸渍器等全自动仪器的普及, 使得传统的薄层色谱也能够实现标准化的操作, 增加了薄层色谱的重现性。但薄层色谱仍面临需要主观判断、斑点

表 4 高效薄层色谱、薄层质谱和液相指纹图谱检测到的差异性成分

Table 4 Differential components detected by HPTLC, TLC/MS and HPLC fingerprint

部位	HPTLC	TLC/MS	HPLC
皮	Rf=0.32 (松脂醇二葡萄糖苷)	1-羟基松脂醇双葡萄糖苷 (Rf=0.17)、松脂醇二葡萄糖苷 ($t_R=34.424$ min (松脂醇二葡萄糖苷) (Rf=0.32)、丁香树脂醇双葡萄糖苷 (Rf=0.34)、松脂醇单葡萄糖苷 (Rf=0.51)	
叶	Rf=0.85 (红褐色)	301-O-Glc-Mal (m/z 549.084 2, Rf = 0.14); $t_R=24.588$ min 285-O-Glc-Glc-Mal (m/z 695.147 8, Rf=0.14), 301-O-Glc (m/z 463.087 7, Rf=0.32), 285-O-Glc-Rha (m/z 593.148 7, Rf=0.32), 285-O-Glc (m/z 447.094 0, Rf=0.40)	
花	Rf=0.38 (车叶草苷酸)、Rf=0.45 (紫车叶草苷酸 (Rf=0.38)、301-O-Glc-Glc (m/z 625.1387, $t_R=36.423$ min 色)、Rf=0.63 (紫色)、Rf=0.67 (紫 Rf=0.20)、301-O-Glc-Rha (m/z 609.1472, Rf=0.20)、色)、Rf=0.71 (紫色)	285-O-Rha-Glc (m/z 593.1536, Rf=0.24)	
种子	Rf=0.10 (红褐色)、Rf=0.14 (红褐 ulmoidoside C (Rf=0.10)、ulmoidoside A (Rf=0.14)、 $t_R=50.433$ min (ulmoidoside A)、 $t_R=55.286$ min (ulmoidoside C)、 $t_R=56.351$ min (ulmoidoside D)、 $t_R=57.781$ min (ulmoidoside B)	55.286 min (ulmoidoside C)、 $t_R=56.351$ min (ulmoidoside D)、 $t_R=57.781$ min (ulmoidoside B)	

鉴定难、共流出严重的困境。TLC/MS 联用技术很大程度上可以改善这种劣势,在薄层保留时间和斑点颜色的基础上,提供了精确的相对分子质量和碎片信息,增加了新维度的信息,使得鉴定结果更为可靠。

在杜仲不同部位的鉴定中,利用薄层质谱在叶中找到了 5 个特征成分,同时检测这 5 个特征成分,比薄层的 1 个斑点,液相的 1 个特征峰的鉴定结果更为客观、可靠。在本研究中,也存在薄层色谱寻找到的差异性斑点未在质谱中检测到的情况,可能是由于该成分质谱响应较差,如叶中 $R_f=0.85$ (红褐色) 的斑点。

本研究中,由于客观原因,采用的是离线的薄层质谱联用,操作较为复杂,但当薄层和质谱在线联用的时候,则有可能实现标准化操作。考虑到高分辨质谱费用比较昂贵,可以将薄层色谱与低分辨质谱联用,也可以取得类似的结果。薄层质谱联用技术在中药,尤其是在中成药的鉴别方面是一种非常有潜力且容易推广的技术,一方面能够在复杂体系和共流出严重的情况下监控目标化合物,另一方面可实现多味药的同时鉴别,改变《中国药典》中成药中“一味药一薄层方法”现状,缩短检测时间和检测成本。

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] 郭姝, 刘杰, 李娜, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价杜仲叶代替杜仲皮的可行性 [J]. 中药材, 2020, 43(4): 896-902.
- [3] Luo L F, Wu W H, Zhou Y J, et al. Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Ethnopharmacol*,

2010, 129(2): 238-243.

- [4] 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.
- [5] 雒晓梅, 宿美凤, 常晓燕, 等. 基于 LC-MS 联用的杜仲主要化学成分定性及定量分析 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(8): 1029-1040.
- [6] Jia J, Liu M, Wen Q, et al. Screening of anti-complement active ingredients from *Eucommia ulmoides* Oliv. branches and their metabolism in vivo based on UHPLC-Q-TOF/MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1124: 26-36.
- [7] 冯淼, 王超纯, 凌伟红, 等. 基于指纹图谱和化学模式识别评价杜仲叶质量 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2931-2939.
- [8] Wang C Y, Tang L, He J W, et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacological properties of *Eucommia ulmoides*: A review [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(2): 259-300.
- [9] 韩磊, 邓翀, 宋小妹. 杜仲生品及其炮制品的薄层色谱鉴别 [J]. 黑龙江科技信息, 2015(16): 121.
- [10] 刘玲, 鲍家科. 杜仲药材薄层色谱鉴别研究 [J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(2): 8-9.
- [11] 范彦博, 袁明洋, 张义生. 四川产杜仲药材高效液相色谱指纹图谱的建立 [J]. 医药导报, 2016, 35(10): 1121-1124.
- [12] 刘星, 周欣, 周美, 等. 贵州产杜仲高效液相色谱指纹图谱的建立与分析 [J]. 医药导报, 2015, 34(1): 84-88.
- [13] 资文, 刘韶, 彭应枝. 基于指纹图谱和化学计量学技术筛选张家界产杜仲的标志性成分 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1831-1834.

[责任编辑 时圣明]