

基于 LC-Triple TOF MS/MS 技术分析杜仲不同药用部位化学成分差异

严颖, 赵慧, 邹立思, 刘训红, 柴川, 王胜男, 华愉教

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:为探讨杜仲不同药用部位(杜仲、杜仲叶和杜仲雄花)化学成分的差异,采用液相色谱-串联三重四极杆飞行时间高分辨质谱(LC-Triple TOF MS/MS)结合多元统计分析技术对杜仲不同药用部位的化学成分进行差异分析。通过对多级串联质谱数据进行峰匹配、峰对齐、滤噪处理等分析,提取特征峰;用聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)进行数据处理;通过一级质谱精确质荷比和二级质谱碎片信息,结合软件数据库搜索、标准品比对及相关文献进行成分鉴定。结果显示:杜仲、杜仲叶与杜仲雄花三者的化学组成可得到明显区分;初步筛选鉴定出 23 种差异显著的化学成分,且呈现不同的变化规律。杜仲、杜仲叶及杜仲雄花化学成分的差异及其变化规律,可为揭示三者药效差异的物质基础提供依据。

关键词:杜仲;杜仲叶;杜仲雄花;液相色谱-串联三重四极杆飞行时间高分辨质谱(LC-Triple TOF MS/MS);化学成分

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2018)01-0101-11

doi:10.7538/zpzb.2017.0032

Difference of Chemical Constituents in Different Medicinal Parts of *Eucommia ulmoides* by LC-Triple TOF MS/MS

YAN Ying, ZHAO Hui, ZOU Li-si, LIU Xun-hong, CHAI Chuan,

WANG Sheng-nan, HUA Yu-jiao

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: In order to study the difference of synthesis and accumulation of metabolites in different medicinal parts of *Eucommia ulmoides* Oilv. (*Eucommiae Cortex*, *Eucommiae Folium* and *Eucommiae Flos Male*), LC-Triple TOF MS/MS method combined with multivariate statistical analysis was used to analyze the difference of chemical constituents in different medicinal parts of *Eucommia ulmoides* Oilv. Through the analysis of the multistage tandem mass spectrometry, the characteristic peaks were extracted with mass spectrometry data peak matching, peak alignment, noise filtering. Hierarchical

收稿日期:2017-02-20;修回日期:2017-05-30

基金项目:江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXK-2014);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A070)资助

作者简介:严颖(1993—),女(汉族),江苏溧阳人,硕士研究生,中药学专业。E-mail: yanying93ly@163.com

通信作者:刘训红(1959—),男(汉族),江苏滨海人,教授,从事中药鉴定与品质评价研究。E-mail: liuxunh1959@sohu.com

cal cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) were used for data processing. The constituents were identified according to MS accurate mass and MS/MS spectrometry fragmentation information, combined with the software of database search, comparison with reference standards and literature. The results showed that the chemical constituents in *Eucommiae Cortex*, *Eucommiae Folium* and *Eucommiae Flos Male* were clearly distinguished. Kinds of 23 differential chemical constituents are screened and indentified, including aucubin, deacetyl asperulosidic acid, guaiacyl glycerol, geniposidic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, geniposide, caffeic acid, pinoresinol-di- O - β - D -glucopyranoside, rutin, kaempferol-3- O -rutinoside, isoquercitrin, eucomoside B, pinoresinol-4'- O - β - D -glucopyranoside, quercetin-3- O -malonyl- β - D -glucoside, astragalín, isochlorogenic acid A, kaempferol-3- O -(6"- O -acetyl)- β - D -glucopyranoside, naringenin, kaempferol and three kinds of quercetin glycoside, which present different changing laws. The different constituents among *Eucommiae Cortex*, *Eucommiae Folium* and *Eucommiae Flos Male* can provide the material basis for revealing the property and efficacy of different medicinal parts of *Eucommia ulmoides* Oliv.

Key words: *Eucommiae Cortex*; *Eucommiae Folium*; *Eucommiae Flos Male*; LC-Triple TOF MS/MS; chemical constituents

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是我国特有的名贵药用植物,其树皮、叶及雄树花均可供药用,分别称为杜仲、杜仲叶及杜仲雄花。杜仲和杜仲叶收载于2015版《中国药典》,具有补肝肾、强筋骨之功效,用于肝肾不足、腰膝酸痛、筋骨无力、头晕目眩等症状;杜仲还具有安胎之功效,亦用于妊娠漏血、胎动不安等症状^[1]。杜仲雄花具有补肝利胆、通便、安眠等保健功效,且有很高的营养价值,目前已被批准为新食品原料,备受市场关注^[2-3]。现代研究表明,杜仲、杜仲叶及杜仲雄花均含有木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、黄酮类等药效成分,具有降血压、降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗菌抗病毒、保肝护肾、抗骨质疏松等药理作用^[2-5]。虽然三者来源于同一植物,其化学成分类型基本一致,但药效却有所不同。近年来,对杜仲类药材的研究主要集中在化学成分、药理作用和品质评价等方面^[6-11],尚未见杜仲、杜仲叶与杜仲雄花三者化学成分的整体变化或差异性化学成分研究。

液相色谱-质谱联用技术广泛应用于中药复杂体系的定性和定量分析中,常用的质谱技术有四极杆质谱、离子阱质谱、飞行时间质谱及复合式串联质谱等^[12]。采用高分辨质谱能够测得化合物的精确分子质量,进而获得化合物

的分子式,通过多级质谱给出的化合物二级裂解碎片信息,并结合相关文献和数据库资料,可以快速鉴定化合物结构^[13]。植物代谢组学即研究不同物种、不同基因类型或不同生态类型的植物在不同生长时期或者受某种刺激干扰前后的所有小分子代谢产物,并对其进行定性、定量分析,找出代谢变化的规律^[14-15]。本研究将借鉴植物代谢组学的思路和方法,采用液相色谱-串联三重四极杆飞行时间高分辨质谱法(LC-Triple TOF MS/MS)分析杜仲、杜仲叶与杜仲雄花三者化学成分的差异性,通过多元统计分析找出其中差异显著的化学成分及其变化规律,旨在为揭示杜仲不同药用部位之间药效差异的物质基础提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

Triple TOF™ 5600 System-MS/MS 电喷雾飞行时间高分辨质谱仪;美国 AB Sciex 公司产品,配有 Peakview1.2 数据处理工作站;SIL-20A XR 超快速液相色谱仪;日本 Shimadzu 公司产品;Anke TGL-16B 离心机;上海安亭科学仪器有限公司产品;BSA224S 电子天平;德国赛多利斯公司产品;KQ-500B 型超声仪;昆山

市超声仪器有限公司产品;Milli-Q 超纯水制备仪:美国 Millipore 公司产品。

松脂醇二葡萄糖苷(批号:111537-200501)、桃叶珊瑚苷(批号:111761-200601)、京尼平苷(批号:110749-200714)、京尼平苷酸(批号:111828-201102)、绿原酸(批号:110753-200413)、咖啡酸(批号:110885-200102)、芦丁(批号:100080-200707)、紫云英苷(批号:11092001)、山奈素(批号:110861-201310)对照品:纯度均大于99%,由中国食品药品检定研究院提供;松脂醇单葡萄糖苷(批号:151205):成都克洛玛生物科技有限公司产品;隐绿原酸(批号:12112605)、异绿原酸 A(批号:12022803):纯度均大于98%,成都普瑞法科技开发有限公司产品;异槲皮苷(批号:BCBB2943):纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司产品;甲醇(批号:143135):色谱纯,江苏汉邦科技有限公司产品;乙腈、甲酸:均为色谱纯,德国 Merck 公司产品;实验用水:Milli-Q 超纯水。

实验样品:于2016年4月21日采自陕西省略阳县郭镇北河沟(海拔1455 m,北纬 $105^{\circ}42'53''$,东经 $33^{\circ}23'6''$),每个药用部位采集样品5份(S1~S5为杜仲,S6~S10为杜仲叶,S11~S15为杜仲雄花)。杜仲树皮堆积发汗至内皮变紫褐色后晒干,杜仲叶于 50°C 烘干,杜仲雄花自然晾干。样品经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮、叶和雄花,留样凭证保存于南京中医药大学中药鉴定实验室。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18 柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}\times 5\text{ }\mu\text{m}$);流动相:A为0.1%甲酸-水溶液,B为乙腈;梯度洗脱程序:0~10 min(5%~10%B),10~12 min(10%~15%B),12~22 min(15%~20%B),22~35 min(20%~30%B),35~42 min(30%~60%B),42~55 min(60%~85%B),55~57 min(85%~5%B),57~60 min(5%B);柱温 30°C ;流速 1.0 mL/min ;进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)负离子模式,质量扫描范围 m/z 50~1500,气帘气压力 275.8 kPa ,雾化气压力 379.2 kPa ,辅助气压力 379.2 kPa ,离子源温度 550°C ,喷雾电压 -4500 V ,解簇电压 -100 V 。

1.3 溶液制备

1.3.1 对照品溶液 分别取适量的各对照品,精密称定,置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解,配制成对照品溶液;分别取 0.2 mL 各对照品溶液,置于 10 mL 容量瓶中,用50%甲醇配制成混合对照品溶液。

1.3.2 供试品溶液 精密称取 0.6 g 样品粉末,加入 30 mL 50%甲醇,密闭,称定质量后,超声处理(功率 250 W ,频率 30 kHz) 20 min ,放置冷却,再次称其质量,用50%甲醇补足质量损失,过滤,以 12000 r/min 离心 10 min ,取上清液,过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,即得供试品溶液。

1.4 样品分析

采用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱对分离条件进行优化,以确定最佳的色谱分离条件。根据设定的色谱和质谱条件,取供试品溶液进样分析。

1.5 数据预处理与统计分析

将原始质谱数据和色谱图导入 Peak-view1.2 进行峰匹配、峰对齐、滤噪处理等,结果保存为文本格式。将文本文件调整后导入 SIMCA-P13.0 进行分析。采用主成分分析(PCA)法,通过初步观察各样品的聚集情况,直观地表达杜仲不同药用部位的化学组成差异;采用 SPSS 软件对样品进行聚类分析,观察分组情况;再用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)对各样品进行分类,其中 R^2X 、 R^2Y 越接近1,表示模型越稳定, $Q^2>0.5$ 表示预测率高。根据 PLS-DA 模型得到的变量权重值($\text{VIP}>1$)找到潜在的差异化学成分。采用 t 检验验证多维统计中找到的差异化学成分是否在单维统计中具有显著性差异,其中 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

1.6 差异化学成分的鉴定

根据质谱数据得到主要差异化学成分的质荷比、碎片离子信息等,结合 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)和 METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)数据库搜索、标准品比对及文献报道确定或推测化合物的结构信息。

2 结果与讨论

2.1 样品处理方法的优化

实验分别考察了甲醇、70%甲醇和50%甲醇作为提取溶剂时的提取效果,同时考察了超

声提取时间为 10、20、40、60 min 时对提取效果的影响。为了在最短时间内达到理想提取效率,最终选择用 50%甲醇超声提取 20 min。

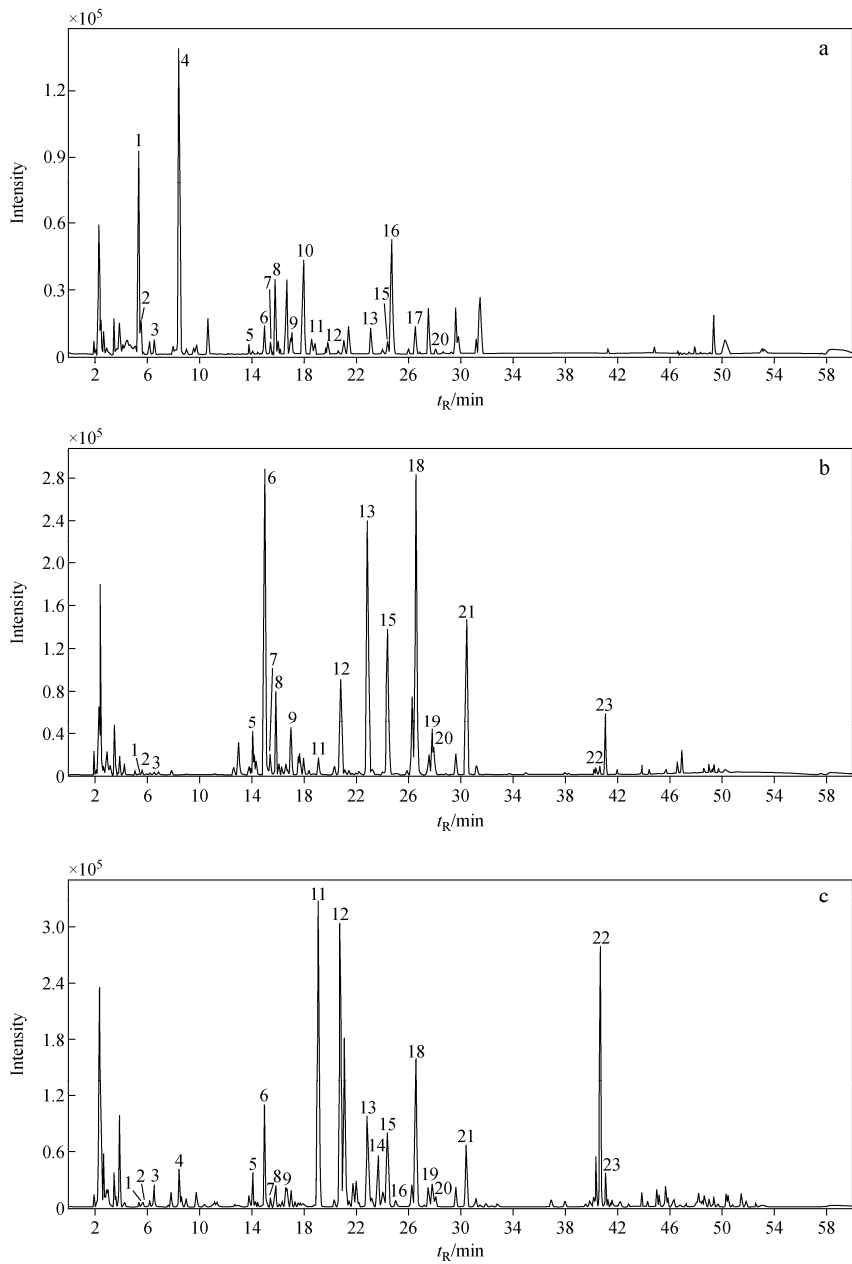
2.2 色谱条件的优化

实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水及乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相时,梯度洗脱条件下样品中各峰分离度的情况。结果发现,采用乙腈-0.1%甲酸

水溶液进行梯度洗脱时,峰型较好且有良好的分离效果。最终确定的最佳色谱条件见 1.2.1 节。

2.3 样品分析

根据设定的液相色谱-质谱条件,取供试品溶液进样分析。杜仲不同药用部位样品在负离子模式下的 LC-Triple TOF MS/MS 基峰强度离子流(BPI)色谱图示于图 1。



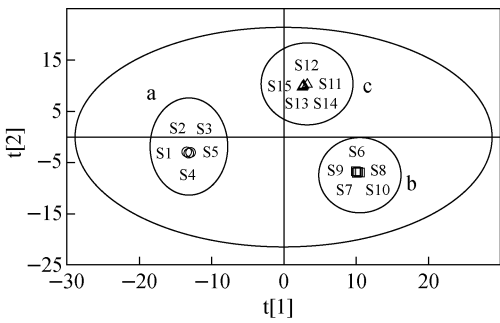
注:a. 杜仲;b. 杜仲叶;c. 杜仲雄花

图 1 杜仲不同药用部位样品的提取离子流(BPI)色谱图

Fig. 1 LC-Triple TOF MS/MS base peak intensity (BPI) chromatograms of different medicinal parts of *Eucommia ulmoides* Oliv.

2.4 多元统计分析

2.4.1 PCA 及 HCA 分析 采用PCA 法分析杜仲不同药用部位样品的差异性化学成分。结果显示,PCA 模型的 $R^2X=0.984,Q^2=0.978$,表明该模型稳定,预测能力较强。杜仲不同药用部位 PCA 分析的散点图($t_1:0.558;t_2:0.427$)示于图 2,可以看出,杜仲不同药用部位的代谢组可以很明显地分开,各自聚为一类,说明杜仲、杜仲叶和杜仲雄花样品之间的化学成分差异较大。对 3 组样品的质谱数据进行标准化变换,采用 SPSS 软件对色谱图进行聚类分析研究。选用欧式距离平方作为样品间的相似性测度,采用最远邻距离的方法进行聚类分析,结果示于图 3。可以看出,杜仲、杜仲叶和杜仲雄花样品能够很明显地分为 3 类,表明三者之间的化学成分差异较大,相对而言,杜仲叶与杜



注:a. 杜仲;b. 杜仲叶;c. 杜仲雄花

图 2 杜仲不同药用部位样品的 PCA 得分图
Fig. 2 PCA scores of different medicinal parts of *Eucommia ulmoides* Oilv.

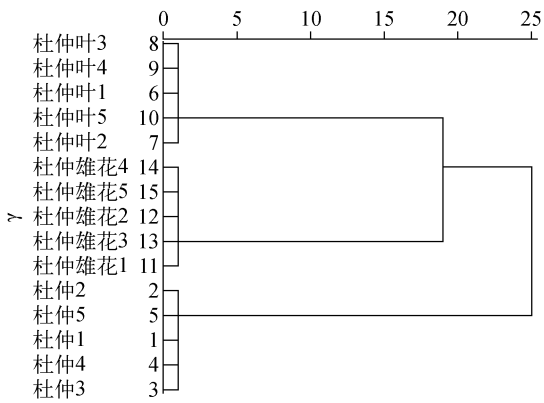


图 3 杜仲不同药用部位样品的聚类分析谱系图
Fig. 3 Dendrogram of different medicinal parts of *Eucommia ulmoides* Oilv.

仲雄花样品的化学成分更接近,而杜仲样品与二者的差异更大。

2.4.2 PLS-DA 分析 用有监督的模式识别方法 PLS-DA 分析杜仲不同药用部位之间的差异变量,即差异化学成分。变量载荷评价参数值(VIP)用于描述变量的贡献程度,通常以 $VIP>1$ 的变量作为特征变量。首先对杜仲与杜仲叶样品进行 PLS-DA 分析,其得分图示于图 4a,两个样品沿着 PC1 轴明显分开。模型验证结果($R^2Y=0.968,Q^2=0.999$)显示,该模型有效可靠。VIP 得分图和柱状载荷图分别示于图 4b 和 4c,对两组分类贡献较大的差异性成分($VIP>1$)共有 121 个特征峰。

对杜仲和杜仲雄花样品进行 PLS-DA 分析,在散点图中,两者可以明显区分,示于图 5a。模型验证结果($R^2Y=0.982,Q^2=0.999$)显示其有效可靠。同样,分析两个样品的 VIP 图(图 5b)和柱状载荷图(图 5c),显示共有 113 个特征峰的 VIP 值大于 1。

对杜仲叶和杜仲雄花样品进行 PLS-DA 分析,在散点图中两者可以明显区分,示于图 6a。模型验证结果($R^2Y=0.946,Q^2=0.999$)证明其可靠程度较高。VIP 图(图 6b)和柱状载荷图(图 6c)显示,对两组分类贡献较大的差异性成分($VIP>1$)共有 114 个特征峰。

2.5 差异化学成分鉴定及相对含量变化

根据质谱数据得到的主要差异化学成分的质荷比、碎片离子信息等,结合 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)和 METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)数据库搜索、标准品比对及文献^[16-34]检索,对 $VIP>1$ 且 $p<0.05$ 的差异化学成分进行结构鉴定,初步鉴定出 23 个差异化学成分。提取差异成分在各组样品间对应的峰面积代表其相对含量,对杜仲、杜仲叶和杜仲雄花样品中同一物质峰面积的平均值和标准偏差进行计算,得到差异成分在三者间的相对含量变化,结果列于表 1。

2.6 结果分析

PCA 分析结果显示,杜仲、杜仲叶和杜仲雄花样品在 PCA 轴上沿 PC1 轴、PC2 轴分开,可以看出杜仲不同药用部位样品分布在不同区域,分类结果较为理想,说明杜仲、杜仲叶和杜仲雄花样品的化学成分存在明显差异。同时观

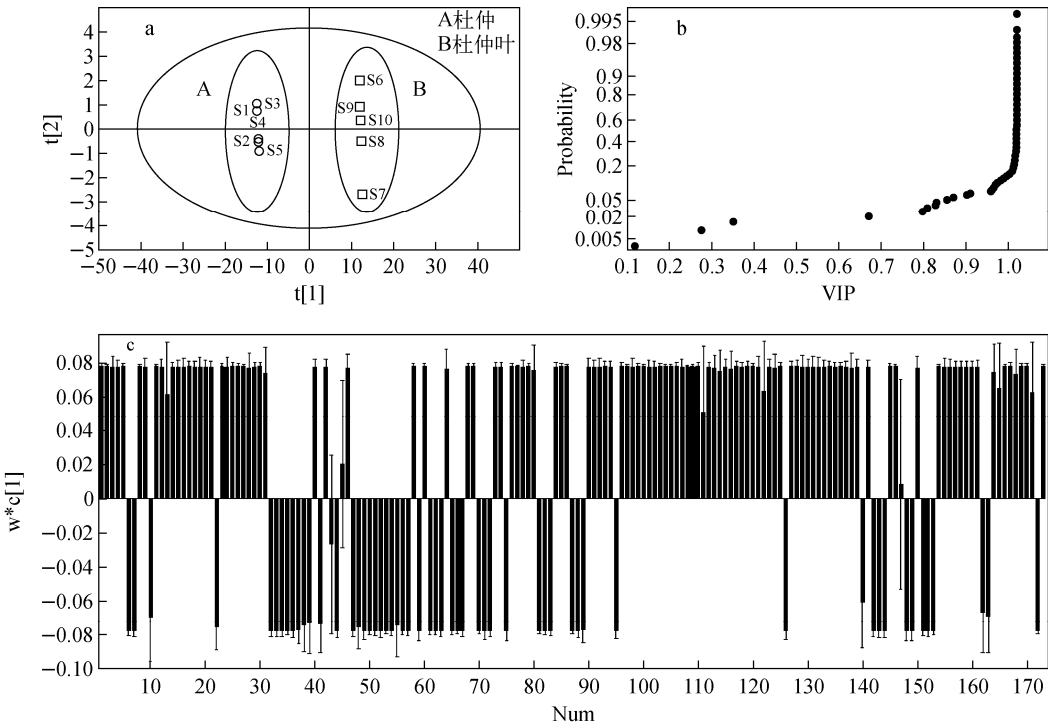


图 4 杜仲和杜仲叶样品的 PLS-DA 得分图(a)、VIP 得分图(b)和柱状载荷图(c)
Fig. 4 PLS-DA scores plot (a), variable importance plot (b) and loading plot (c)
of *Eucommiae Cortex* and *Eucommiae Folium*

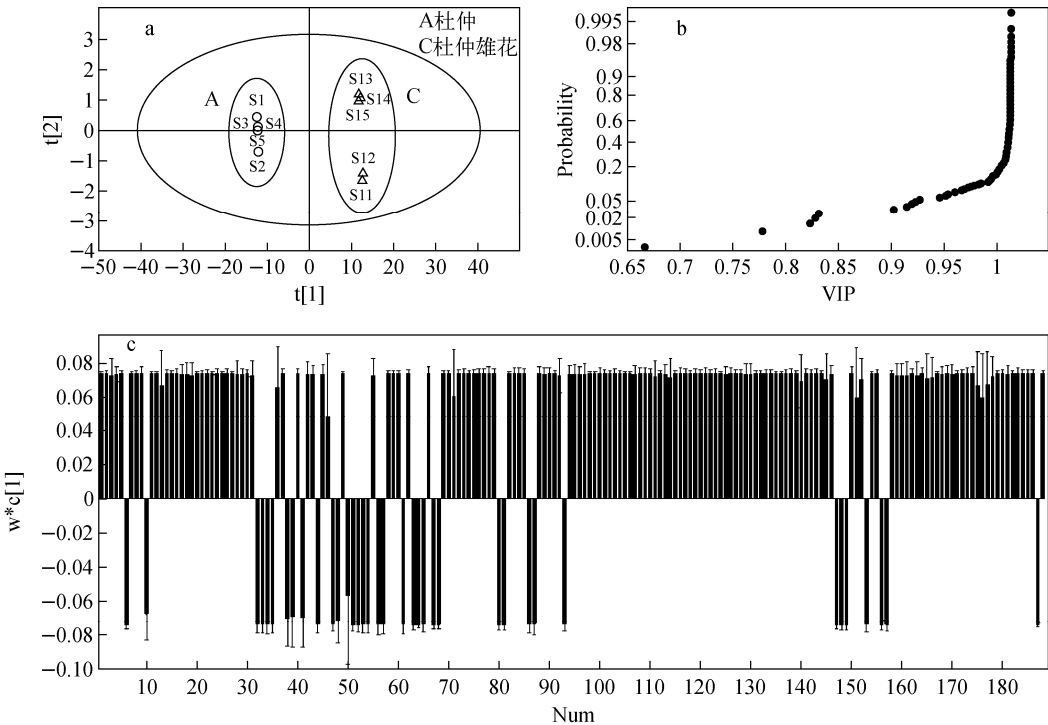


图 5 杜仲和杜仲雄花样品的 PLS-DA 得分图(a)、VIP 得分图(b)和柱状载荷图(c)
Fig. 5 PLS-DA scores plot (a), variable importance plot (b) and loading plot (c)
of *Eucommiae Cortex* and *Eucommiae Flos Male*

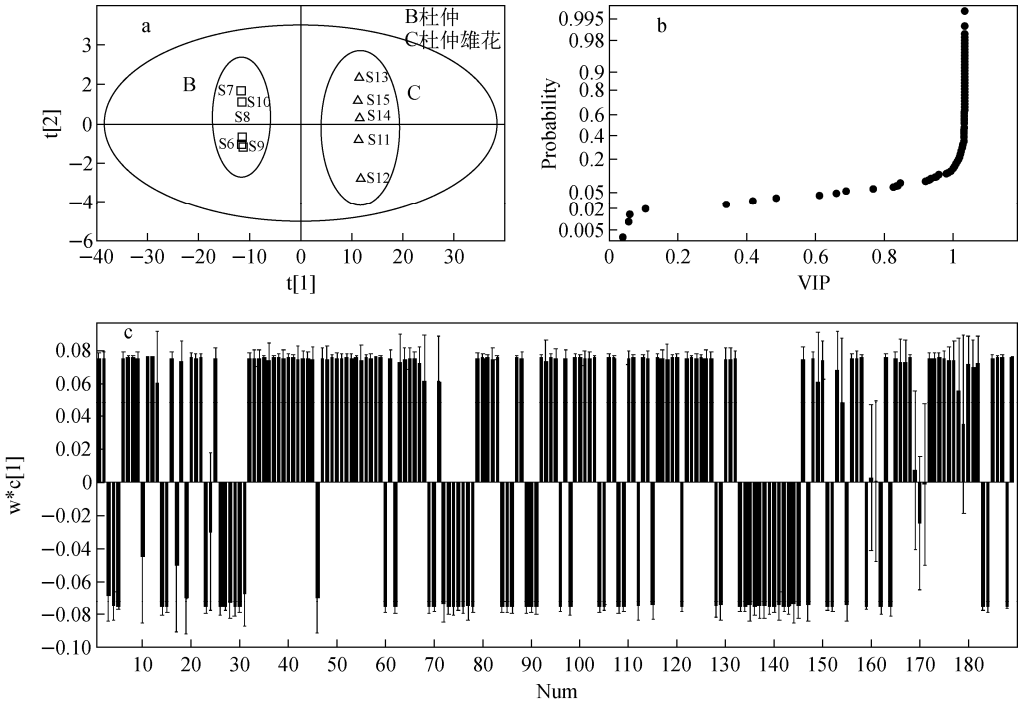


图 6 杜仲叶和杜仲雄花样品的 PLS-DA 得分图(a)、VIP 得分图(b)和柱状载荷图(c)

Fig. 6 PLS-DA scores plot (a), variable importance plot (b) and loading plot (c)

of *Eucommiae Folium* and *Eucommiae Flos Male*

表 1 杜仲、杜仲叶和杜仲雄花中差异化学成分信息及相对含量变化

Table 1 Information and relative content variation of the different chemical constituents in <i>Eucommiae Cortex</i> , <i>Eucommiae Folium</i> and <i>Eucommiae Flos Male</i>						
序号 No.	保留时间 <i>t</i> _R /min	化学成分 Chemical constituent	分子式 Formula	测量值 MS ¹	主要二级质谱峰 Main peaks of MS ²	相对含量变化 Relative content variation
1 *	5.37	桃叶珊瑚苷 Aucubin	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	391.123[M+HCOO] ⁻	345,183,165,139	A>C>B
2	5.54	去乙酰车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	389.109 [M-H] ⁻	227,209,183,165,147,121	A>C>B
3	6.53	愈创木基丙三醇 Guaiacyl glycerol	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	213.078 [M-H] ⁻	165,121,97,93,89	C>A>B
4 *	8.47	京尼平苷酸 Geniposidic acid	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.113 [M-H] ⁻ 747.232 [2M-H] ⁻	211,193,167,149,121	A>C>B
5	14.07	槲皮素糖苷 1 Quercetin glycoside 1	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₁	757.184 [M-H] ⁻ 803.186 [M+HCOO] ⁻	595,463,301	B>C>A
6 *	14.96	绿原酸 Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 [M-H] ⁻	191,179,135	B>C>A
7 *	15.41	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.088 [M-H] ⁻	191,179,135	B>C>A
8 *	15.82	京尼平苷 Geniposide	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	433.134 [M+HCOO] ⁻	225,207,123	A>C>B
9 *	16.75	咖啡酸 Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	179.036 [M-H] ⁻	135	C>B>A
10 *	18.01	松脂醇二葡萄糖苷 Pinoresinol-di- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₆	681.234 [M-H] ⁻	519,357,151	A>B=C
11	19.07	槲皮素糖苷 2 Quercetin glycoside 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625.138 [M-H] ⁻	463,301,271,255,179	C>B>A

续表 1

序号 No.	保留时间 <i>t</i> _R /min	化学成分 Chemical constituent	分子式 Formula	测量值 MS ¹	主要二级质谱峰 Main peaks of MS ²	相对含量变化 Relative content variation
12	20.77	槲皮素糖苷 3 Quercetin glycoside 3	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595.127 [M-H] ⁻	301,271,255,179	C>B>A
13*	22.86	芦丁 Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.144 [M-H] ⁻	301,271,255	B>C>A
14	23.66	烟花苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.147 [M-H] ⁻	285,255,227	C>B>A
15*	24.36	异槲皮苷 Isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 [M-H] ⁻	301,271,255	B>C>A
16	24.71	Eucomoside B	C ₂₅ H ₃₁ NO ₁₁	520.177 [M-H] ⁻	358,234,190,164	A>C>B
17*	26.54	松脂醇单葡萄糖苷 Pinoresinol-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	519.183 [M-H] ⁻ 555.162 [M+Cl-H] ⁻	357,151	A>B=C
18	26.59	槲皮素-3- <i>O</i> -丙二酰基-β- <i>D</i> -葡萄糖苷 Quercetin-3- <i>O</i> -malonyl-β- <i>D</i> -glucoside	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	549.086 [M-H] ⁻	505,301,271,155	B>C>A
19*	27.8	紫云英苷 Astragalin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.092 [M-H] ⁻	285,255,227	B>C>A
20*	28.10	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.119 [M-H] ⁻	353,191,179,173,135	C>B>A
21	30.43	山奈酚-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -乙酰基)-β- <i>D</i> -葡萄糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -acetyl)-β- <i>D</i> -glucopyranoside	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	489.1058 [M-H] ⁻	285,255,227	B>C>A
22	40.68	柚皮素 Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.061 [M-H] ⁻	177,151,119	C>B>A
23*	41.07	山奈酚 Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 [M-H] ⁻	257,173,159,151	B>C>A

注:标*的化合物已与对照品比对确定;
A表示杜仲,B表示杜仲叶,C表示杜仲雄花

察聚类分析谱系图,在距离为 20 的位置,杜仲叶和杜仲雄花的样品可以聚在一类,说明二者的化学成分更为接近。通过 PLS-DA 分析得到 23 个差异化学成分,它们在 3 组样品中的相对含量呈现不同的变化规律。其中,杜仲中以桃叶珊瑚苷、去乙酰车叶草苷酸、京尼平苷酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、Eucomoside B、松脂醇单葡萄糖苷的含量较高,均为木脂素类和环烯醚萜类成分;杜仲叶或杜仲雄花中以苯丙素类和黄酮类成分含量较高,其中杜仲叶中以绿原酸、隐绿原酸、芦丁、槲皮素-3-*O*-丙二酰基-β-*D*-葡萄糖苷、异槲皮苷、紫云英苷、山奈酚、山奈酚-3-*O*-(6"-*O*-乙酰基)-β-*D*-葡萄糖苷及槲皮素糖苷 1 的含量较高,杜仲雄花中以愈创木基丙三醇、咖啡酸、烟花苷、异绿原酸 A、柚皮素、槲皮素糖苷 2 及槲皮素糖苷 3 的含量较高。

3 讨论

现代研究表明,在杜仲中相对含量较高的木脂素类化合物具有降压、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、保肝及抑制血小板活化因子等生理功能,是杜仲护肾的活性成分之一;环烯醚萜类化合物也以杜仲中含量较高,具有抗菌、抗炎、止痛、利胆、保肝、通便、降压、镇静、抗肿瘤等生理功能,其中桃叶珊瑚苷、京尼平苷、京尼平苷酸为保肝、降血脂、降压的活性成分;苯丙素类和黄酮类化合物以杜仲叶和杜仲雄花中含量较高,苯丙素类化合物具有抗菌消炎、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、保肝护肝等生理功能,其中绿原酸是抗菌、抗病毒、抗氧化、降压的活性成分,咖啡酸有降压、抗氧化等生理活性;黄酮类化合物具有降血糖、降血脂、抗氧化、抗骨质疏松等生理功能^[4-5,32,35-37]。活性成分含量的差异可能表现为临床药效的差异。以降压作用为例,杜仲叶在

急性动物实验中,剂量为杜仲的2倍时,才呈现与杜仲相近的降压效果。这是因为主要降压成分木脂素类和环烯醚萜类^[35]在杜仲中含量较多。此外,杜仲雄花水提液抑菌、抗炎、镇痛作用强于杜仲和杜仲叶^[38],这可能与其黄酮含量较高有关。从本实验初步研究结果可见,杜仲、杜仲叶、杜仲雄花三者化学成分存在明显差异,其临床功效亦存在差异,有必要开展进一步研究并建立关联。

4 小结

本实验建立了基于 LC-Triple TOF MS/MS 结合多元统计分析技术分析杜仲不同药用部位中化学成分差异的方法,并对分析结果进行探讨。比较杜仲、杜仲叶和杜仲雄花中化学成分相对含量差异,仅仅是对三者临床药效差异的初步探讨,由于杜仲、杜仲叶和杜仲雄花中整体化学成分的潜在差异,可能会导致其在体内的吸收、代谢及效用有所不同,最终导致三者临床使用不同。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:164.

[2] 赫锦锦. 杜仲皮及雄花中次生代谢产物的变化规律研究[D]. 郑州:河南大学,2010.

[3] 杜庆鑫,刘攀峰,魏艳秀,等. 杜仲雄花氨基酸多样性及营养价值评价[J]. 天然产物研究与开发, 2016,(6):889-897.

DU Qingxin, LIU Panfeng, WEI Yanxiu, et al. Diversity and nutritional value of amino acids in *Eucommia ulmoides* male flowers[J]. Natural Product Research and Development, 2016, (6): 889-897(in Chinese).

[4] 李欣,刘严,朱文学,等. 杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(10): 378-382.

LI Xin, LIU Yan, ZHU Wenxue, et al. Study advancement about chemical composition and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(10): 378-382(in Chinese).

[5] 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.

FENG Han, ZHOU Honghao, OUYANG Dongsheng. Study advancement about chemical composition and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2015, 20(6): 713-720(in Chinese).

[6] 孙佳,陆苑,向文英,等. UPLC 同时测定杜仲中6种有效成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2016,(6):874-879.

SUN Jia, LU Yuan, XIANG Wenying, et al. Simultaneous determination of six components in *Eucommia ulmoides* by UPLC[J]. Natural Product Research and Development, 2016, (6): 874-879(in Chinese).

[7] 魏学军,孙晓惠,刘汇丽,等. 不同加工方法对杜仲总黄酮含量的影响[J]. 中国药房,2016,27(28):3 967-3 969.

WEI Xuejun, SUN Xiaohui, LIU Huili, et al. Effects of different processing methods on the content of total flavonoids in *Eucommia ulmoides* [J]. China Pharmacy, 2016, 27(28): 3 967-3 969(in Chinese).

[8] 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.

[9] 刘星,龚小见,陈华国,等. 基于入血成分的杜仲药材的含量测定[J]. 中国中药杂志,2015,40(9):1 771-1 775.

LIU Xing, GONG Xiaojian, CHEN Huaguo, et al. Study on quality standard of *Eucommia ulmoides* based on absorbed active components in rat plasma[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(9): 1 771-1 775(in Chinese).

[10] 许烨. 杜仲道地性药材形成的物质基础研究[D]. 成都:成都理工大学,2015.

[11] 苏卓,郭诚. 杜仲对链脲佐菌素致糖尿病小鼠降血糖作用[J]. 中药药理与临床,2015,(4):144-146.

SU Zhuo, GUO Cheng. The hypoglycemic effects and mechanism of *Eucommia extracts* on streptozotocin induced diabetic mice[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2015, (4): 144-146(in Chinese).

[12] 齐小城,章弘扬,梁麒麟,等. 液质联用技术及其在代谢组学研究中的应用[J]. 中成药,2009,31(1):106-112.

QI Xiaocheng, ZHANG Hongyang, LIANG

- Qionglin, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry and its application in metabonomics [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2009, 31(1): 106-112(in Chinese).
- [13] 李坤平, 高崇凯, 李卫民. UPLC/ESI-TOF-MS/MS 分析蛇床子提取物中香豆素类化合物[J]. 中成药, 2009, 31(4): 584-587.
- LI Kunping, GAO Chongkai, LI Weimin. Analysis of coumarins in extract of *Cnidium monnieri* by UPLC/ESI-TOF-MS/MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2009, 31(4): 584-587(in Chinese).
- [14] 刘祥东, 罗国安, 王义明. 代谢物组学应用的领域之二——植物代谢物组学[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1 515-1 517.
- LIU Xiangdong, LUO Guoan, WANG Yiming. The field of metabonomics applications II -plant metabonomic[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2006, 28(10): 1 515-1 517 (in Chinese).
- [15] 李春雨, 王张, 王平, 等. 基于代谢组学技术的中药效应物质基础及作用机制研究[J]. 中草药, 2013, 44(7): 918-922.
- LI Chunyu, WANG Zhang, WANG Ping, et al. Therapeutic material basis and action mechanism of Chinese materia medica based on metabonomic technology[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2013, 44(7): 918-922(in Chinese).
- [16] 李爱平, 李震宇, 邢婕, 等. 核磁共振代谢组学技术检测食醋化学成分[J]. 食品科学, 2013, 34(12): 247-253.
- LI Aiping, LI Zhenyu, XING Jie, et al. Chemical characterization of different vinegars by NMR-based metabolomics approach[J]. Food Science, 2013, 34(12): 247-253(in Chinese).
- [17] 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.
- HE Feng, WANG Yonglin, ZHENG Lin, et al. Identification of compounds in herb of *Eucommia ulmoides* by UPLC-PDA-ESI-MS [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(3): 59-62(in Chinese).
- [18] 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]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, 57(1): 52-61.
- [19] 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]. Chemistry of Natural Compounds, 2016, 52(1): 144-148.
- [20] 刘才英. 杜仲活性成分与土壤因子相关性及其化学成分 HPLC-Q-TOF-MS 分析的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013.
- [21] 田晨煦, 徐小平, 廖丽云, 等. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定绿原酸及其相关杂质[J]. 色谱, 2007, 25(4): 496-500.
- TIAN Chenxu, XU Xiaoping, LIAO Liyun, et al. Separation and identification of chlorogenic acid and related impurities by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2007, 25(4): 496-500(in Chinese).
- [22] 李存满, 骆亚薇, 田宝勇. 环烯醚萜类化合物的质谱裂解规律研究进展[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2015, (6): 522-526.
- LI Cunman, LUO Yawei, TIAN Baoyong. Research progress on mass spectral fragmentation of iridoids[J]. Journal of Hebei Normal University: Natural Science Edition, 2015, (6): 522-526 (in Chinese).
- [23] 李自红, 魏悦, 范毅, 等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析试验室, 2015, (2): 186-189.
- LI Zihong, WEI Yue, FAN Yi, et al. Elucidation of rutin by electron spray ionization mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, (2): 186-189(in Chinese).
- [24] 李宇航, 戴海学, 汪明明, 等. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 质谱学报, 2009, 30(6): 374-378.
- LI Yuhang, DAI Haixue, WANG Mingming, et al. Elucidation of quercetin by electron spray ionization mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2009, 30(6): 374-378(in Chinese).
- [25] ZHANG X, LI B, ZHOU M, et al. Chemical constituents from *Gymnosporia variabilis* Loes. [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12(2): 163-169.
- [26] BRENES M, HIDALGO F J, GARCIA A, et al. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new

- phenolic compounds identified in olive oil[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2000, 77(7): 715-720.
- [27] FENG S, NI S, SUN W. Preparative isolation and purification of the Lignan Pinoresinol Diglucoside and Liriodendrin from the bark of by high speed countercurrent chromatography[J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2007, 30(1): 135-145.
- [28] QI L, CHEN Y, LI P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in *Flos Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23(19): 3 227-3 242.
- [29] HASAN S N, LIS I C, COSKUN M, et al. A novel naphthoquinone glycoside from *Rubia perigrina* L. [J]. Turkish Journal of Chemistry, 2009, 33(4): 561-568.
- [30] 丁艳霞,郭洋静,任莹璐,等. 杜仲雄花中黄酮类化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2014, 45(3): 323-327.
- DING Yanxia, GUO Yangjing, REN Yinglu, et al. Isolation of flavonoids from male flowers of *Eucommia ulmoides* and their anti-oxidantive activities [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(3): 323-327(in Chinese).
- [31] DING Y, DOU D, GUO Y, et al. Simultaneous quantification of eleven bioactive components of male flowers of *Eucommia ulmoides* oliver by HPLC and their quality evaluation by chemical fingerprint analysis with hierarchical clustering analysis[J]. Pharmacognosy Magazine, 2014, 10(40): 435-440.
- [32] 李钦,张木升,杜红岩. 杜仲雄花茶化学成分及药理作用研究进展[J]. 河南大学学报:医学版, 2011, 30(1): 6-7.
- LI Qin, ZHANG Musheng, DU Hongyan. Study advancement about chemical composition and pharmacological effects of the tea of *Eucommia ulmoides* male flowers [J]. Journal of Henan University: Medical Science, 2011, 30(1): 6-7 (in Chinese).
- [33] 吕寒,李维林,裴咏萍,等. 枇杷叶中黄酮类化学成分的 HPLC-MSⁿ 分析[J]. 现代中药研究与实践, 2009, (6): 56-58.
- LV Han, LI Weilin, PEI Yongping, et al. Detection of flavonoids in *Eriobotrya japonica* (Thumb. Lindl.) by HPLC-MSⁿ [J]. Research and Practice on Chinese Medicines, 2009, (6): 56-58(in Chinese).
- [34] 杨洁,陈纯,邢建军,等. 油菜蜂花粉中黄酮类化合物的提取与鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 273-278.
- YANG Jie, CHEN Chun, XING Jianjun, et al. Extraction and identification of flavonoids in *Rape Bee Pollen* [J]. Food Science, 2010, 31(22): 273-278(in Chinese).
- [35] 肖立,周日贵. 杜仲降压作用的研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, (16): 501-502.
- XIAO Li, ZHOU Rigui. Progress in research on antihypertensive effects of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Guide of China Medicine, 2013, (16): 501-502(in Chinese).
- [36] 马博,张媛,张达义,等. 杜仲的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 西部中医药, 2013, (12): 153-159.
- MA Bo, ZHANG Yuan, ZHANG Yida, et al. Advance at chemical ingredients and pharmacological activity of Du Zhong[J]. Western Journal of Chinese medicine, 2013, (12): 153-159 (in Chinese).
- [37] 赖娟华,徐丽瑛,饶华,等. 杜仲叶化学成分和药理作用研究概况[J]. 实用中西医结合临床, 2004, 4(2): 67-68.
- LAI Juanhua, XU Liying, RAO Hua, et al. Study of chemical constituents and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides* leaves[J]. Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2004, 4(2): 67-68(in Chinese).
- [38] 陈晓俊,王凤琛,袁颖,等. 杜仲皮、杜仲叶、杜仲雄花的药效学比较研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2016, 33(5): 5-8.
- CHEN Xiaojun, WANG Fengchen, YUAN Ying, et al. Comparative study of bark, leaf and male flower of *Eucommia* on pharmacodynamics [J]. Journal of Gansu College of Traditional Chinese Medicine, 2016, 33(5): 5-8(in Chinese).