

UPLC-PDA-ESI-MS 分析杜仲中化学成分

何峰, 王永林, 郑林, 刘丽君, 王爱民, 李勇军, 黄勇*

(贵阳医学院药学院, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:** 建立杜仲药材中化学成分的超高效液相色谱-电喷雾质谱(UPLC-PDA-ESI-MS)分析方法。**方法:** 采用ACQUITY UPLC系统, BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 流速0.3 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 检测波长190~400 nm, 柱温45 °C。Waters电喷雾三重四级杆质谱仪(TQD), 负离子模式检测, ESI喷雾电压3 kV, 去溶剂气温度350 °C, 去溶剂气(N₂)流量650 L·h⁻¹, 锥孔气(N₂)流量50 L·h⁻¹, 扫描范围m/z 100~1 000。**结果:** 杜仲中化学成分获得了较好的分离和检测, 共鉴定出3个木脂素类、4个环烯醚萜类和4个苯丙素类成分。**结论:** 所建方法灵敏度高、分离度好, 适用于杜仲药材中化学成分的快速定性鉴定。

[关键词] 杜仲; 木脂素; 环烯醚萜; 苯丙素; 超高效液相-电喷雾质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0059-04

[doi] 10.11653/syfy2014030059

Identification of Compounds in Herb of *Eucommia ulmoides* by UPLC-PDA-ESI-MS

HE Feng, WANG Yong-lin, ZHENG Lin, LIU Li-jun, WANG Ai-min, LI Yong-jun, HUANG Yong*

(School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicines and Traditional Chinese Medicine Ministry of Education, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the compounds in herb of *Eucommia ulmoides* by ultra-performance liquid chromatography PDA electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-PDA-ESI-MS). **Method:** The chromatographic separation was carried out at 45 °C on a BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) eluted in the gradient program. The mobile phase consisted of acetonitrile and water (both containing 0.1% formic acid). The detection of PDA was set between 190 nm and 400 nm. The mass spectra were obtained by Waters ACQUITY™ triple quadrupole tandem mass spectrometer in negative ion mode with ion spray voltage 3 kV. The temperature of the source and desolvation was set at 120 °C and 350 °C separately. Nitrogen was used as the desolvation gas (650 L·h⁻¹) and cone gas (50 L·h⁻¹). For collision induced dissociation, argon was used as the collision gas at a flow rate of 0.16 mL·min⁻¹. The mass range recorder was set between 100-1 000 m/z. **Result:** Three lignin, four iridoid and four phenyl propanoid were well separated and identified by the method. **Conclusion:** The method is simple and rapid for the identification and quality control for the herb of *E. ulmoides*.

[Key words] *Eucommia ulmoides*; lignans; iridoid; phenyl propanoid; UPLC-PDA-ESI-MS

杜仲为杜仲科植物杜仲的干燥树皮, 又名思仲、丝棉树, 主产于贵州、云南、四川等地, 是名贵滋补药

[收稿日期] 20130222(003)

[基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合重大专项字[2012]6009)

[第一作者] 何峰, 硕士, 助教, 从事中药新药开发及药代动力学研究, Tel:0851-6908899, E-mail: hf_5020539@126.com

[通讯作者] *黄勇, 硕士, 副教授, 从事中药药代动力学、活性物质基础与新药开发研究, Tel:0851-6908899, E-mail: mailofhy@126.com

材。杜仲味甘、微辛、性温，具补肝肾、强筋骨、降血压、安胎等诸多功效^[1-3]。《神农本草经》将其列为上品，谓其“主治腰膝痛，补中，益精气，坚筋骨，除阴下痒湿，小便余沥，久服，轻身耐老”。目前在贵州以杜仲为主要原料药材生产的中成药有“强力天麻杜仲胶囊”、“杜仲补天素片”和“复方杜仲片”等。现代研究表明杜仲中含有的主要化学成分为木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、黄酮、多糖、氨基酸和杜仲胶等有机化合物以及钙、铁等无机微量元素。本研究利用 UPLC-PDA-ESI-MS 联用技术，对杜仲中的化学成分进行快速定性分析，为杜仲药材的化学成分鉴定和药材真伪的快速鉴别提供了一定的实验参考。

1 材料

ACQUITY™ UPLC 系统(美国 WATERS 公司，包括二元超高压溶剂系统、二极管阵列检测器、柱温箱、电喷雾三重四级杆质谱仪、Masslynx 4.1 质谱工作站)，AE240 型(1/10 万)电子天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司)，RM-220 型超纯水机(四川沃特公司)。

京尼平苷酸(批号 111828-201102)、绿原酸(批号 110753-200413)、咖啡酸(批号 110885-200102)、松脂醇二葡萄糖苷(批号 111537-201103)，以上对照品购自中国食品药品检定研究院，桃叶珊瑚苷(批号 110711)、新绿原酸(批号 X20-20121012)、隐绿原酸(批号 Y58-20121012)、京尼平苷(批号 110722)、松脂醇单糖苷(批号 070801)、杜仲醇(批号 070805)对照品均购自四川省维克奇生物科技有限公司，上述对照品分别用 UPLC-PDA 在多个检测波长下测定，其峰面积归一化结果均 > 98%，色谱乙腈(Merk 公司)，色谱甲酸(Tedia 公司)、其他试剂均为国产分析纯，杜仲药材购于贵州省药材公司，产地贵州，由贵阳医学院药学院药用植物与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮，标本存于民族药与中药开发应用教育部工程研究中心。

2 方法与结果^[4-5]

2.1 供试样品制备 取干燥剪碎的杜仲药材 300 g，分别用 10 倍和 8 倍的水煎煮 1.5 h，过滤，浓缩，微波真空干燥，即得杜仲提取物(得膏率为 13.13%)^[4]。取 25 mg 上述粉末，用 1 mL 水超声助溶，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。

2.2 混合对照品溶液的制备 分别称取上述 10 种对照品适量于 10 mL 量瓶中，用甲醇溶解，定容，经

0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得混合对照品溶液。

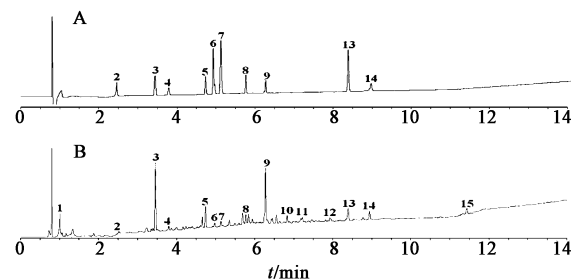
2.3 液相条件 沃特世(Waters®) ACQUITY™ UPLC 系统，Waters Acquity BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱，柱温 45 °C，样品温度 15 °C，PDA 波长范围，190 ~ 400 nm，PDA 采集速度，20 点/s，1 μL 进样分析，梯度洗脱程序见表 1。

表 1 UPLC 梯度洗脱条件

t/min	流速 /mL·min ⁻¹	A-0.1% 甲酸 乙腈/%	B-0.1% 甲酸水/%	曲线
0	0.3	3	97	-
1	0.3	3	97	6
5	0.3	15	85	6
10	0.3	25	75	6
15	0.3	55	45	6
17	0.3	95	5	6
18	0.3	3	97	1

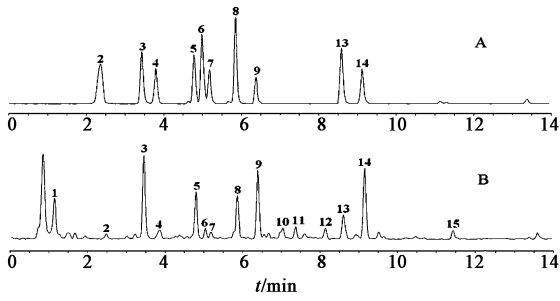
2.4 质谱条件 沃特世(Waters®)三重四级杆质谱检测系统，电离模式 ESI(-)，毛细管电压 3 kV，锥孔电压 30 V，采集范围 100 ~ 1 000 m/z，离子源温度 120 °C，去溶剂温度 350 °C，去溶剂气体，氮气(流速 650 L·h⁻¹)，锥孔气氮气(流速 50 L·h⁻¹)，碰撞气体氩气(流速 0.16 mL·min⁻¹)。

2.5 结果^[6-8] 取混合对照品及供试品溶液进样分析，得到对照品和杜仲样品的紫外色谱图(图 1)和质谱总离子流色谱图(图 2)，化合物紫外吸收波长及负离子模式检测质谱信息见表 2。由图 1 可见杜仲样品的 UPLC 图主要有 15 个色谱峰，各色谱峰之间实现了较好的分离。在此液相色谱条件下，对各主要色谱峰按相对保留时间排序，通过比较对照品和样品的色谱保留时间(t_R)，紫外吸收光谱特征及 ESI-MS 数据，确定色谱峰 2 ~ 9, 13, 14 分别为桃叶



2. 桃叶珊瑚苷; 3. 京尼平苷酸; 4. 新绿原酸; 5. 绿原酸;
6. 隐绿原酸; 7. 咖啡酸; 8. 京尼平苷; 9. 松脂醇二葡萄糖苷;
13. 松脂醇单糖苷; 14. 杜仲醇; A. 对照品; B. 供试品

图 1 杜仲样品 UPLC-UV 图谱



A. 对照品; B. 供试品

图2 杜仲样品的 UPLC-ESI-MS(-)总离子流图谱

珊瑚苷、京尼平苷酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、京尼平苷、松脂醇二葡萄糖苷、松脂醇单糖苷和杜仲醇。

根据杜仲样品中化合物的紫外吸收特征、质谱总离子流以及进一步的子离子碎片信息,并参考相关文献,对色谱图中的 11 号色谱峰进行了初步归属。

峰 11 的准分子离子峰为 m/z 535 $[M - H]^-$, 二级质谱显示主要碎片离子峰为 373 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$, 357 $[M - H - C_6H_{10}O_6]^-$, 与松脂醇单糖苷碎

表2 杜仲样品中各主要成分的 UPLC-PDA-ESI-MS 数据

No.	$[M - H]^-$	$[M + HCOO]^-$	质谱碎片信息	紫外吸收 λ_{max}/nm	化合物
1	190.8(-)		131, 129, 111	198, 280	未知化合物 1
2 ¹⁾		390.9(-)	183 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$, 165 $[M - H - C_6H_{12}O_6]^-$	192	桃叶珊瑚苷
3 ¹⁾	373(-)		211 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$, 193 $[M - H - C_6H_{12}O_6]^-$, 167 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - CO_2]^-$, 149 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - CO_2 - H_2O]^-$	197, 227	京尼平苷酸
4 ¹⁾	352.9(-)		191 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$, 179 $[M - H - C_6H_{10}O_4 - CO]^-$, 173 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - H_2O]^-$	216, 325	新绿原酸
5 ¹⁾	352.9(-)		191 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$	217, 326	绿原酸
6 ¹⁾	352.9(-)		191 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$, 179 $[M - H - C_6H_{10}O_4 - CO]^-$, 173 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - H_2O]^-$	220, 265	隐绿原酸
7 ¹⁾	178.8(-)		135 $[M - H - CO_2]^-$	219, 260, 294	咖啡酸
8 ¹⁾		432.9(-)	225 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$	220	京尼平苷
9 ¹⁾	681.1(-)		357 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - C_6H_{10}O_5]^-$	202, 220, 276	松脂醇二葡萄糖苷
10	172.8(-)		155, 129, 111	212	未知化合物 2
11	535(-)		373 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$, 357 $[M - H - C_6H_{10}O_6]^-$	219	1-羟基松脂素单糖苷
12	520(-)		365, 298, 264	219	未知化合物 3
13 ¹⁾	519(-)		357 $[M - H - C_6H_{10}O_5]^-$, 341 $[M - H - C_6H_{10}O_6]^-$	202, 222, 278	松脂醇单糖苷
14 ¹⁾	186.9(-)		169 $[M - H - H_2O]^-$, 125 $[M - H - H_2O - CO_2]^-$	219	杜仲醇
15	343(-)		271, 241, 237	220	未知化合物 4

注: ¹⁾ 与对照品进行对照。

片离子相比其裂解规律较为一致,根据文献推测其为 1-羟基松脂素单糖苷^[9-10]。

峰 1、峰 10、峰 12 和峰 15 由于缺乏更多的信息和相关文献参考,无法推测其结构。

3 讨论

在 ESI 电离源质谱的检测中毛细管电压和锥孔电压对检测结果有一定的影响,实验中比较了毛细管电压(2~4 kV)和锥孔电压(20~50 V),结果发

现在毛细管电压和锥孔电压分别为 3 kV 和 30 V 时可在总离子流图中获得最优的离子强度。同时负离子模式的离子流信息多于正离子模式,这可能与所检测成分的化学性质有关,因此在实验中我们选择了负离子模式进行检测。此外,由表 2 的实验结果可以看出,在负离子模式下除了峰 2, 8 以 $[M + HCOO]^-$ 峰存在外,其余各峰均以 $[M - H]^-$ 的分子离子峰存在。

硫酸-紫外法与苯酚-硫酸法测定千两茶中总多糖的比较

辛敏^{1,2}, 刘轩², 詹欣^{1,2}, 黄昀², 唐劲天^{1,2}, 盛军^{1,3*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102;

2. 清华大学工程物理系粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084;

3. 云南农业大学普洱茶学教育部重点实验室, 昆明 650201)

[摘要] 目的:比较苯酚-硫酸法与硫酸-紫外法在测定千两茶多糖含量上的差异。方法:千两茶粉经水提醇沉,Sevage法除蛋白后,采用苯酚-硫酸法和硫酸-紫外法测定茶多糖含量。结果:苯酚-硫酸法标准曲线方程为 $Y=4.7550X-0.0295$ ($R^2=0.9904$),硫酸-紫外法标准曲线方程为 $Y=4.7700X-0.0651$ ($R^2=0.9931$),均在 $0.02\sim 0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 有良好的线性关系。所测茶多糖质量分数分别为 2.00% 、 3.21% ,其差异有统计学意义。结论:硫酸-紫外法作为一种多糖检测新手段,可简便测定多糖含量。

[关键词] 茶多糖; 千两茶; 苯酚-硫酸法; 硫酸-紫外法, 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0062-04

[doi] 10.11653/syfy2014030062

Determination of Total Polysaccharides in Qianliang Tea by Sulfuric Acid-UV Method and Phenol-Sulfuric Acid Method

XIN Min^{1,2}, LIU Xuan², ZHAN Xin^{1,2}, HUANG Yun², TANG Jin-tian^{1,2}, SHENG Jun^{1,3*}

[收稿日期] 20130717(017)

[基金项目] 中国博士后基金项目(2013M530603)

[第一作者] 辛敏, 硕士, 从事微生物与生化药学研究, Tel:010-62796784, E-mail: mthsyj@yeah.net

[通讯作者] * 盛军, 博士, 教授, 从事普洱茶学研究, Tel:010-62796784, E-mail: shengj@ynau.edu.cn

[参考文献]

- [1] 李岩. 杜仲现代药理研究综述[J]. 按摩与康复医学, 2011, 12(24): 48.
- [2] 韩宇东. 杜仲药理活性研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2011, 11(2): 125.
- [3] 王丽楠, 李伟, 覃洁萍, 等. 同采收期杜仲不同部位主要有效成分的动态研究[J]. 中国药业, 2009, 18(18): 29.
- [4] 潘亚磊, 翟远坤, 武祥龙, 等. 杜仲活性成分的提取及分离纯化方法研究进展[J]. 化学与生物工程, 2012, 29(2): 1.
- [5] 王少峰. 贵州杜仲产业发展概述[J]. 遵义科技, 2012(1): 13.
- [6] Lee M K, Cho S Y, Kim D J, et al. Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) cortex water extract alters heme biosynthesis and erythrocyte antioxidant defense system in lead-administered rats [J]. J Med Food, Spring, 2005, 8(1): 86.
- [7] 乔颖, 温静, 宋洋, 等. 基于 UPLC-PDA-MS-MS 技术的四逆散水煎液体内外物质基础研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1672.
- [8] Li X Q, Xiong Z L, Ying X X, et al. A rapid ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of the constituents of the flower of *Trollius ledibourii* Reichb. [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 580(2): 170.
- [9] 张丹, 张春风, 杨中林. 杜仲指纹图谱中化学成分的归属研究[J]. 中医药学报, 2012, 40(2): 58.
- [10] 卢定强, 赵辉, 王俊, 等. 杜仲的全生物炼制研究进展[J]. 现代化工, 2009, 29(3): 12.

[责任编辑 顾雪竹]