

基于 LC-MS 树参叶指纹图谱的建立

刘敏¹, 陈梦¹, 陈桂云¹, 冯美玲¹, 张晓芹², 余乐¹, 范蕾¹(1.丽水市食品药品与质量技术检验检测院, 浙江 丽水 323000; 2.丽水市中医院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 根据树参叶液相色谱-质谱联用的分析结果, 建立其液相色谱指纹图谱的鉴别方法。方法 采用 Waters BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)。流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量为 1 μL; 电喷雾电离源(ESI), 负离子检测, 离子源温度为 150 °C, 脱溶剂气温度为 500 °C, 脱溶剂气流速 800 L·h⁻¹, 锥孔气流速 50 L·h⁻¹, 碰撞气为氦气, 毛细管电压为 3 000 V, 对树参叶主要成分进行确证。采用 Waters Sunfire™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A)-混合水溶液(含甲酸 0.2%和四氢呋喃 0.06%)(B), 梯度洗脱, 检测波长 256 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 分析时间 80 min, 进样量为 5 μL, 建立树参叶的指纹图谱鉴别方法。结果 10 批样品相似度为 0.939~0.989, 均符合要求。结论 树参为常绿植物, 其叶中所含化学成分和植物的生长年限、环境、采收季节密切相关, 建立的指纹图谱鉴别方法简便、重复性好, 可为树参叶的品质评价提供科学依据。

关键词: 树参叶; 液相色谱-质谱联用; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)01-0040-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.01.008

引用本文: 刘敏, 陈梦, 陈桂云, 等. 基于 LC-MS 树参叶指纹图谱的建立[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(1): 40-44.

Establishing Fingerprint of the Leaves of *Dendropanax Dentiger* Based on LC-MS

LIU Min¹, CHEN Meng¹, CHEN Guiyun¹, FENG Meiling¹, ZHANG Xiaoqin², YU Le¹, FAN lei¹(1.Lishui Institute of Food and Drug & Quality and Technical Inspection, Lishui 323000, China; 2.Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPLC fingerprint of the leaves of *Dendropanax dentiger* based on LC-MS. **METHODS** The column was Waters BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm). Mobile phase consisted acetonitrile(A)-0.1% formic acid(B) with gradient elution. Column temperature was 35 °C, flow rate was 0.2 mL·min⁻¹ and injection volume was 1 μL. Mass spectrum condition was electrospray ionization source with negative ion detection, and the source temperature was 150 °C, the desolvation temperature was 500 °C, the desolvation with N₂ was 800 L·h⁻¹, the cone with N₂ was 50 L·h⁻¹, the collision gas was Ar, the capillary was 3 000 V. HPLC with Waters Sunfire™ C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used. Mobile phase consisted acetonitrile(A)-aqueous solution(B) including 0.2% formic acid and 0.06% tetrahydrofuran with gradient elution. Detection wavelength was 256 nm. Column temperature was 30 °C. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and analytic time was 80 min. Injection volume was 5 μL. Used the methods established above to be the HPLC fingerprint of *Dendropanax dentiger*. **RESULTS** Under the same fingerprint chromatogram condition, the methodological results were satisfactory to 10 batches of the samples. And the similarity range was 0.939–0.989. **CONCLUSION** *Dendropanax dentiger* is an evergreen plant. The chemical constituents in its leaves are closely related to the growth years, environment and harvesting season of the plant. The established fingerprint identification method is simple and reproducible, which can provide a scientific basis for the quality evaluation of the leaves of *Dendropanax dentiger*.

KEYWORDS: leaves of *Dendropanax dentiger*; LC-MS; HPLC; fingerprint

树参属 *Dendropanax* Decne. et Planch. 为五加科 *Araliaceae* 的常绿灌木或乔木, 多数为我国民间传统常用草药, 药用历史悠久, 具有祛风除湿、活血消肿的功效, 被载入《中华本草》《中药大辞典》《全国中草药汇编》《中国民族医药学》等书籍中。作为人参三七等名贵药材的近缘植物, 是

具有潜在开发价值的药用植物群。其常用的药用植物有 6 种, 其中, 树参属植物树参 [*Dendropanax dentiger* (Harms) Merr.] 或变叶树参 [*Dendropanax proteus* (Champ.) Benth.] 的根、茎或树皮又名枫荷梨、鸭掌柴、半边枫、半枫荷、白半枫荷等, 具有祛风除湿、活血消肿的功效, 用于治疗风湿痹

基金项目: 丽水市高层次人才培养项目(2017RC25)

作者简介: 刘敏, 女, 硕士, 副主任中药师 Tel: (0578)2155869 E-mail: 2001lm2005@163.com

痛、头痛、月经不调、跌打损伤等^[1]。树参的根，又名鸭掌柴、半架风、半边枫，是我国江西和浙江一带畲医使用频率较高的 30 种畲药之一，用于治疗风湿病、关节炎、半身不遂等^[2-3]。此外，树参提取物常作为保健饮品，树参嫩芽被誉为“保健森林蔬菜”之一，在国际市场上被视为珍品。药理研究表明，树参嫩叶提取物能提高兔的免疫能力^[4]，其叶的醇提物还具有抗心律失常的作用^[5]。在前期研究中发现树参叶所含成分较根、茎更为丰富，为探究树参叶的起效物质基础，开发树参新的药用价值，保护药用植物资源，本研究在树参叶液相色谱-质谱联用分析结果的基础上，采用普及度更高的 HPLC 建立树参叶的指纹图谱。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity 液质色谱仪(Waters); 1260 高效液相色谱仪(安捷伦); XS105DU 电子天平(METTLER TOLEDO 公司)。

1.2 试剂

紫丁香苷对照品(批号: 111574-201605; 含量: 95.2%), 绿原酸对照品(批号: 110753-201716; 含量: 99.3%), 芦丁对照品(批号: 100080-201409; 含量: 91.9%), 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸对照品(批号: 111782-201706; 含量: 97.3%), 山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品(批号: 112007-201602; 含量: 90.8%), 上述对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲酸、四氢呋喃为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水。

树参叶样品共 10 批，经李建良主任中药师鉴定为五加科植物树参(*Dendropanax dentiger*)。具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 树参叶主要成分的液相色谱-质谱联用确证

2.1.1 色谱条件与质谱条件 色谱条件: 色谱柱为 Waters BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)。流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B)，梯度洗脱: 0~5 min, 5%→30%A; 5~6 min, 30%→70%A; 6~7 min, 70%A; 7~7.5 min, 70%→5%A; 7.5~10 min, 5%A。体积流量为 0.2 mL·min⁻¹，柱温 35 ℃，进样量为 1 μL。

质谱条件: 电喷雾电离源(ESI)，负离子检测，离子源温度为 150 ℃，脱溶剂气温度为 500 ℃，

脱溶剂气流氮气 800 L·h⁻¹，锥孔气流氮气 50 L·h⁻¹，碰撞气为氩气，毛细管电压为 3 000 V。

表 1 树参样品信息表

Tab. 1 Sample information table of *Dendropanax dentiger*

样品编号	采收地	采收日期
1	丽水市莲都区庞山村	2018.07.02
2	丽水市莲都区官岩村	2018.07.02
3	丽水市缙云县方溪乡	2018.07.04
4	丽水市景宁县草鱼塘	2018.07.04
5	丽水市遂昌县黄沙腰村	2018.07.05
6	丽水市云和县朱村	2018.07.09
7	丽水市松阳县白角外村	2018.07.09
8	丽水市青田县仰木湖	2018.07.15
9	丽水市龙泉市	2018.07.22
10	丽水市庆元县	2018.07.23

2.1.2 供试品溶液的制备 取干燥并过 2 号筛的 4 号样品粉末约 2 g，精密加入 80%甲醇，水浴加热回流提取 2 h，冷却至室温后，用提取溶剂补足减失的质量，过滤，即得。

2.1.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称取对照品适量至 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容制成每 1 mL 含紫丁香苷 0.39 mg·L⁻¹、绿原酸 0.46 mg·L⁻¹、芦丁 0.46 mg·L⁻¹、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 0.29 mg·L⁻¹、山柰酚-3-O-芸香糖苷 0.22 mg·L⁻¹ 的对照品储备液。再分别精密移取上述对照品储备溶液 0.3, 1, 1, 1, 1 mL 于同一 5 mL 量瓶中，加甲醇定容，即得混合对照品溶液。

2.1.4 质谱总离子流色谱图及提取离子色谱图 分别精密吸取“2.1.2”“2.1.3”项下制备的溶液，按照“2.1.1”项下条件进样检测，得到对照品及供试品质谱离子流色谱图见图 1。

2.1.5 树参叶中各化合物的质谱归属 根据“2.1.4”的结果，对树参叶中各化合物的质谱归属分析，结果见表 2。

2.2 树参叶液相指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters SunfireTM C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)，流动相为乙腈(A)-混合水溶液(含甲酸 0.2%和四氢呋喃 0.06%)(B)，梯度洗脱: 0~5 min, 4%→9%A; 5~35 min, 9%→14%A; 35~50 min, 14%A; 50~60 min, 14%→20%A; 60~80 min, 20%→30%A。检测波长为 256 nm，柱温 30 ℃，体积流量为 1.0 mL·min⁻¹，分析时间为 80 min，进样量为 5 μL。

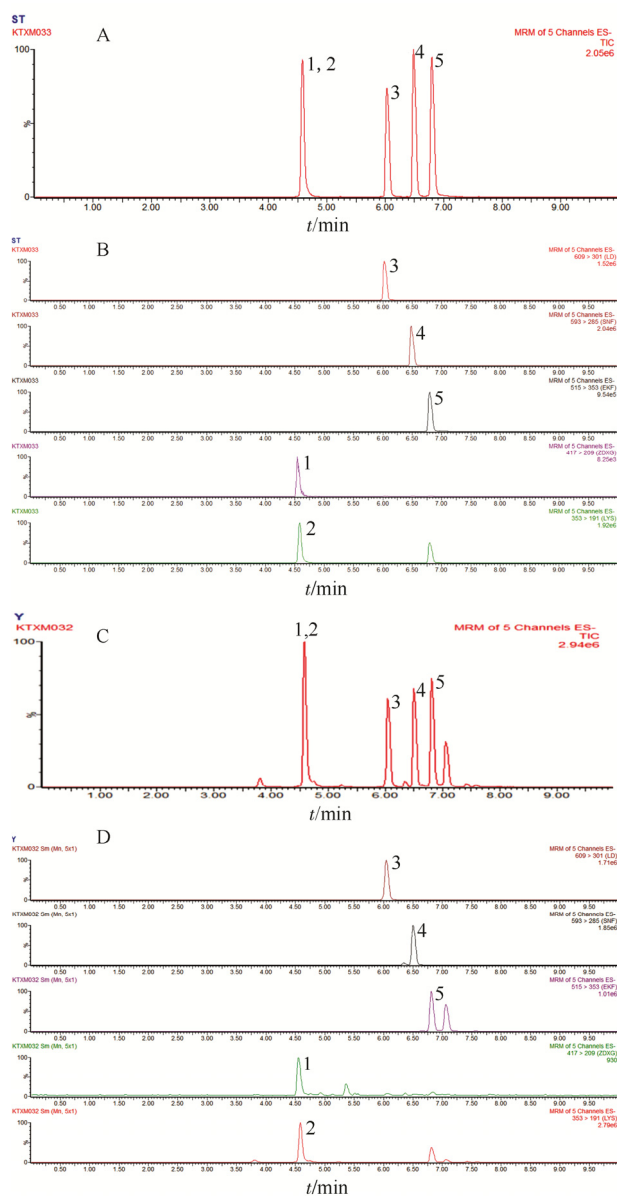


图 1 对照品及供试品质谱离子流色谱图
A-混合对照品溶液总离子流色谱图；B-混合对照品溶液中各化合物提取离子色谱图；C-供试品溶液总离子流色谱图；D-供试品溶液中各化合物提取离子色谱图；1-紫丁香苷；2-绿原酸；3-芦丁；4-山柰酚-3-O-芸香糖苷；5-3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸。

Fig. 1 Ion current chromatogram of reference substance and test quality spectrum

A-TIC chromatogram of mixed reference solution; B-extracted ion chromatogram of mixed reference solution; C-TIC chromatogram of the sample; D-extracted ion chromatogram of compounds in the sample; 1-syringin; 2-chlorogenic acid; 3-rutin; 4-kaempferol-3-O-rutinoside; 5-3,5-O-caffeoylquinic acid methyl ester.

2.2.2 方法学考察 色谱图中单峰面积占总峰面积 $>3\%$ 的共有指纹峰共有 6 个，以分离度较好、保留时间适中的绿原酸为参照，进行精密度、重复性、稳定性考察。

表 2 树参叶中各化合物的质谱归属

Tab. 2 MS attribution of compounds of the leaves of *Dendropanax dentiger*

序号	分子量/ MW	保留时间/ min	母离子/ m/z	子离子/ m/z	归属	化合物
1	372	4.6	417	209	$[M+COOH]^-$	紫丁香苷
2	354	4.6	353	191	$[M-H]^-$	绿原酸
3	610	6.1	609	301	$[M-H]^-$	芦丁
4	594	6.5	593	285	$[M-H]^-$	山柰酚-3-O-芸香糖苷
5	516	6.8	515	353	$[M-H]^-$	3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸

注：glc-葡萄糖碎片(MW=162)；caffeoyl-咖啡酰基碎片(MW=162)；rha-鼠李糖碎片(MW=146)。

Note: glc-glucose fragment(MW=162); caffeoyl-caffeoyl fragment(MW=162); rha-rhamnose fragment(MW=146)。

2.2.2.1 精密度考察 取 4 号样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，记录色谱图，相对保留时间的 RSD 为 0.05%~0.30%，相对峰面积的 RSD 为 0.36%~1.34%，结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致，测定结果精密度较好。

2.2.2.2 重复性试验 取 4 号样品，按“2.1.2”项下方法同时制备 6 份供试品溶液，分别进样，记录色谱图，相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.11%，相对峰面积的 RSD 为 1.07%~3.93%，结果表明重复性较好。

2.2.2.3 稳定性试验 取 4 号样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0, 2, 6, 12, 24 h 进样，记录色谱图，相对保留时间的 RSD 为 0.02%~0.25%，相对峰面积的 RSD 为 0.33%~4.79%，结果表明样品在 24 h 内基本稳定。

2.2.3 指纹图谱的建立及相关分析

2.2.3.1 指纹图谱的建立和相似度分析 取 10 批树参样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，另取“2.1.3”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定，采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.0 版)进行评价，以 S1 为参照图谱，选择时间宽度 0.5，生成色谱的方法为平均值，生成对照图 R，确定了 18 个共有峰，各批样品与对照指纹图谱比较相似度为 0.939~0.989。结果见图 2~4。

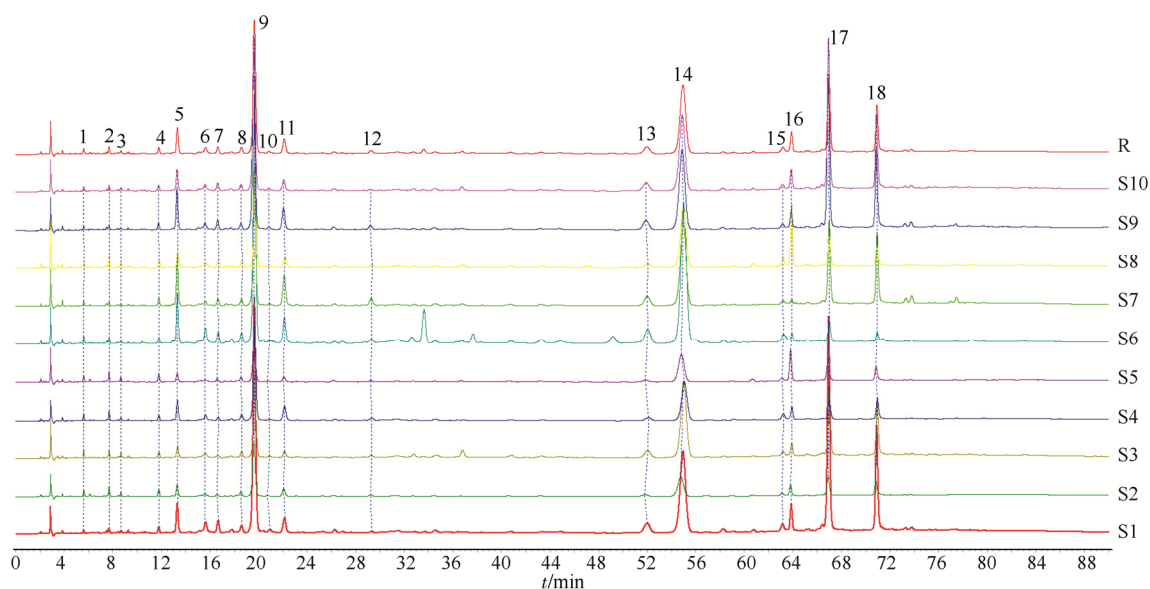


图2 10批样品指纹图谱汇总图

Fig. 2 Fingerprint of 10 batches of *Dendropanax dentiger*

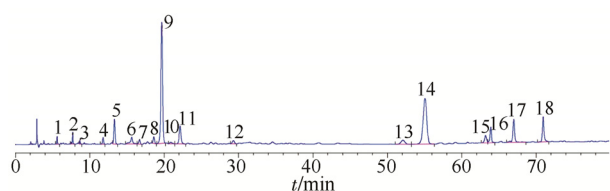


图3 典型样品色谱图

Fig. 3 Typical chromatogram of *Dendropanax dentiger*

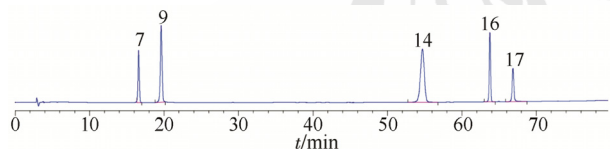


图4 混合对照品色谱图

7-紫丁香苷; 9-绿原酸; 14-芦丁; 16-山柰酚-3-O-芸香糖苷; 17-3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸。

Fig. 4 Chromatogram of mixed reference

7-syringin; 9-chlorogenic acid; 14-rutin; 16-kaempferol-3-O-rutinoside; 17-3,5-O-caffeoylquinic acid methyl ester.

2.2.3.2 共有指纹峰的相对保留时间 以绿原酸为参照物, 计算各色谱峰的相对保留时间, 结果其相对保留时间为 0.284~3.618, RSD 为 0.04%~0.15%。

2.2.3.3 共有指纹峰的相对峰面积 以绿原酸为参照物, 计算各色谱峰的相对峰面积, 结果其相对峰面积为 0.005 4~3.171, RSD 为 29.97%~69.98%。

3 讨论

树参叶中含有较多的奎宁酸类成分及黄酮类成分, 很多化合物紫外吸收图谱一致, 特别是二

咖啡酰奎宁酸类化合物, 只凭借紫外吸收特征图谱难以将其区别和确证, 采用液相色谱-质谱联用可得到每个色谱峰的保留时间、相对分子质量、特征碎片 3 个方面信息, 再结合各色谱峰紫外吸收特征能很好地解决上述问题。本研究通过质谱准确将树参叶所含主要成分进行鉴别和归属, 质谱显示样品中第 18 号峰具有和 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸相同的母离子, 提示 18 号峰所对应化学物质有可能为 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的同分异构体或其酯类成分, 在接下去的研究中将对该成分进行进一步确证。

液相色谱-质谱联用对所用色谱柱、流动相有特定的要求, 针对质谱通过相对分子质量、特征碎片可进行鉴别, 但是色谱图中尚未分离的紫丁香苷和绿原酸, 在普通液相中可通过调整流动相将两者分离, 并且方法简单, 便于推广应用, 故而, 本课题组在液相色谱-质谱联用分析结果的基础上, 建立其液相指纹图谱鉴别方法。

从相似度评价结果来看, 10 批样品相似度均符合要求。但是 6 号样品图谱在 30~50 min 之间有更多色谱峰, 从性状上看, 这批样品相较其他样品叶片更薄、革质化程度较弱, 干燥后呈卷曲状态, 推测其主要为当年生新叶。因树参为常绿植物, 其叶中所含化学成分和植物的生长年限、环境、采收季节息息相关, 目前, 国际市场上主要

以树参嫩叶作为保健食用蔬菜。不同批次样品相对峰面积大小说明了各批次样品的差异性,也说明建立的树参叶指纹图谱可对其品质进行评价,而本项目组在接下去的实验中也将对不同产地、不同采收日期、不同生产年限的树参叶成分的差异性作进一步深入的研究。

在前期初步研究中发现树参叶、根、茎中均含有紫丁香苷、绿原酸、二咖啡酰基奎宁酸类化合物,其中茎中紫丁香苷明显高于叶、根,为便于接下来进行的树参不同药用部位指纹图谱及药效学的系列研究,虽然叶中紫丁香苷含量不高,但也选择其作为一个标志性成分。

REFERENCES

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第5卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 793-794.
- [2] 雷后兴, 李水福. 中国畲族医药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 426-427.
- [3] 雷后兴, 李建良. 中国畲药学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2014: 175.
- [4] CHEN Y Q, LU Z M, YANG Y, et al. Active compounds extracted from leaves of *Dendropanax dentiger* and study on boost immunity for rex babbits [J]. Non-timber Forst Products, 2017(1): 47-50.
- [5] HUANG J Y, LIU C M, QI P L, et al. Studies on the antiarrhythmic effects of leaves of *Dendropanax chevalieri* (Vig.) Merr. et Chun [J]. China J Chin Mater Med, 1989, 14(6): 367-370, 384.

收稿日期: 2019-03-14

(本文责编: 沈倩)

本刊 2019 年度特邀审稿专家名单

本刊 2019 年特邀请以下医药专家 171 人(以姓名拼音为序)审定稿件。各位审稿专家以严谨的科学作风、高超的学术造诣、对作者负责的高尚精神认真审稿,并提出修改意见,保证和提高了杂志的质量。编辑部全体同仁并代表广大作者、读者,在此表示衷心的感谢!

Aiming Yu	蔡宇	陈碧莲	陈丹菲	陈金亮	陈珏	陈枢青	陈素红	陈文腾
陈悦	陈志卫	程国华	程洪强	程汝滨	戴海斌	董晓武	董宇	杜光
范灵灵	方红梅	方罗	方晴霞	方伟杰	冯瑛	傅旭春	高建青	葛卫红
郭建军	郭建明	郭瑞臣	郭勇	韩峰	韩旻	何明芳	何俏军	何昱
洪利娅	洪燕君	胡巧红	黄永焯	黄真	贾飞	管凌燕	简瞰昱	江波
姜昕鹏	蒋程	金银秀	居靖	柯霞	匡荣	李波	李范珠	李功华
李沛波	李文龙	李迎迎	梁锦锋	梁文权	刘斌	刘丙进	刘滔	楼洪刚
陆国红	骆翔	吕圭源	马忠俊	毛斌	毛根祥	毛培江	苗明三	倪韶青
潘杰	彭丽华	秦路平	邱利焱	邱晓燕	瞿海斌	茹仁萍	邵华	邵加安
沈水杰	盛荣	石庆平	史天陆	寿旦	寿旗扬	帅棋	宋沁馨	孙德清
孙世光	孙晓译	汤晓玲	陶巧凤	王斌	王海钠	王建平	王金朝	王娜妮
王俏	王溶溶	王向军	王泽民	王增	王长连	王知坚	王志安	王卓
魏晓红	文爱东	翁勤洁	吴斌	吴人照	吴耀东	吴永江	向铮	谢升阳
辛传伟	熊山	熊阳	徐云根	许东航	燕茹	羊红玉	杨波	杨波
杨明华	杨伟峰	杨欣	杨振中	叶益萍	应美丹	应晓英	应茵	余露山
俞佳	俞蕴莉	袁弘	原永芳	曾苏	詹金彪	张波	张得钧	张建永
张剑萍	张水利	张信岳	张岩	张耀	张轶雯	张志清	章超凡	赵华军
赵静	赵梦丹	赵青威	赵瑞芝	赵维良	赵永星	郑斌	郑彩虹	郑高利
周长新	周萍	周权	朱虹	朱建国	朱全红	朱婉萍	朱余兵	邹海