

DOI: 10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2020.122701

荒漠肉苁蓉不同部位高效液相指纹图谱与化学成分分析

侯建华^{1,2}, 王 劼^{1,2}, 周玉碧^{*1}

(1. 中国科学院藏药研究重点实验室, 青海省青藏高原特色生物资源研究重点实验室, 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 采用液相色谱技术建立了荒漠肉苁蓉花序部位和茎部位的液相指纹图谱, 并对其化学成分进行对比分析。首先对其指纹图谱进行对比分析与相似度评价, 发现不同部位之间相似度较低, 其指纹图谱在峰数量和峰高上存在明显差异。其次对荒漠肉苁蓉的 7 种苯乙醇苷类成分进行测定, 发现花序与茎部位成分含量差异显著, 花序部位检出 5 种苯乙醇苷成分, 茎部位 7 种成分均有检出。主成分分析将荒漠肉苁蓉不同部位聚为相对独立的类群, 表明不同部位之间差异性较大。荒漠肉苁蓉不同部位指纹图谱的建立与化学成分的分析为其品质评价与资源综合利用提供科学依据。

关键词: 荒漠肉苁蓉; 指纹图谱; 液相色谱; 成分分析

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2021)10-1182-05

HPLC fingerprints and chemical compositions analysis of *Cistanche deserticola* from different parts

HOU Jianhua^{1,2}, WANG Jie^{1,2}, ZHOU Yubi^{*1} (1. CAS Key Laboratory of Tibetan Medicine Research and Qinghai Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Resources, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: HPLC was used to establish the fingerprints of the inflorescence and stem of *Cistanche deserticola*, and the chemical components were analyzed and compared. Firstly, the comparative analysis and similarity evaluation were carried out. It was found that the similarity between the different parts was low, and there were significant differences in peaks number and height of the fingerprints of different parts. Secondly, the 7 phenethanol glycosides of *C. deserticola* were determined and analyzed by HPLC. It was found that the contents of these phenethanol glycosides in the inflorescence and the stem were significantly different. 5 phenylethanol glycosides were detected in the inflorescence, and all 7 components were detected in the stem. Principal component analysis could cluster different parts of *C. deserticola* into relatively independent groups, which indicated that there were great differences between different parts. The establishment of fingerprints and component analysis of different parts of *C. deserticola* could provide scientific basis for its quality evaluation and comprehensive utilization of resources.

Keywords: *Cistanche deserticola*; fingerprint; liquid chromatography; component analysis

荒漠肉苁蓉是列当科肉苁蓉属植物, 具有补肾阳、益精血、润肠通便的功效, 可用于阳痿、遗精、早泄、腰膝冷痛等, 素有“沙漠人参”之称^[1]。荒漠肉苁蓉为药食两用植物^[2], 在我国主要分布于新疆

维吾尔自治区、内蒙古自治区、甘肃省、宁夏回族自治区等荒漠或半荒漠地区。随着荒漠肉苁蓉产业的发展, 生产规模日益扩大, 人工栽培技术逐渐规范化, 新疆已成为荒漠肉苁蓉的主产地之一^[3]。

收稿日期: 2020-12-27

基金项目: 内蒙古自治区科技创新引导项目(KCM2018046)、青海省重点实验室发展建设专项(2017-ZJ-Y10)和青海省重点研发与计划转化项目(2019-SF-171)资助

作者简介: 侯建华, 女(1996-), 硕士。研究方向: 中药学, 1143297831@qq.com

* 通信作者: 周玉碧, 男(1979-), 博士, 副研究员。研究方向: 资源生态学, 39235705@qq.com

《中国药典》将荒漠肉苁蓉列为肉苁蓉药材的基源植物,且将茎部作为药用部位^[4],因此在人工采挖过程中花序部位会被丢弃,造成了资源的极大浪费。研究花序与茎部位的异同,分析花序部位潜在的应用价值,可提高荒漠肉苁蓉的利用率。

指纹图谱作为较为完善的药材评价体系,主要分为色谱、光谱和分子指纹图谱等^[5-6]。液相色谱作为目前应用最为广泛的分析技术,具有灵敏度高、适用范围广等优点^[7],已用于植物成分分析与鉴别应用中^[8-9]。本研究以荒漠肉苁蓉花序部位与茎部位为研究对象,通过液相色谱技术建立指纹图谱并进行化学成分分析,旨在为荒漠肉苁蓉药材的开发和利用提供基础依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-10AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司); AUW2200 电子天平(岛津菲律宾工厂); UPH-1-40L 纯水机(四川优普超纯水公司); 3-1BKS 台式高速冷冻离心机(德国西格玛公司)。

7 种苯乙醇苷对照品(上海源叶生物公司,规格: 20mg): 松果菊苷(批号: 82854-37-3; 含量 \geq 98%); 肉苁蓉苷 A(批号: 93236-42-1; 含量 \geq 95%); 管花苷 A(批号: 112516-05-9; 含量 \geq 98%); 毛蕊花糖苷(批号: 61276-17-3; 含量 \geq 98%); 异毛蕊花糖苷(批号: 61303-13-7; 含量 \geq 98%); 2'-乙酰毛蕊花糖苷(批号: 94492-24-7; 含量 \geq 98%); 管花苷 B(批号: 112516-04-8; 含量 \geq 96%); 乙腈、甲醇(色谱纯); 去离子超纯水(电阻率: 18.25 M Ω ·cm)。

荒漠肉苁蓉于 2019 年 4 月中下旬采集于新疆且末县、于田县、阿克苏地区和吐鲁番地区,总计 10 批次。将 10 批次荒漠肉苁蓉花序部位依次命名为 XF-1~XF-10,茎部位依次命名为 XJ-1~XJ-10。原植物样品经甘肃农业大学孙学刚教授鉴定为列当科肉苁蓉属植物荒漠肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Ma。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制 标准品的配制: 称取 7 种标准品适量,用 50% (V/V) 的甲醇溶液溶解后配制对照品溶液。

供试液的配制: 称取 0.2 g 样品,加入 10 倍量 50% (V/V) 甲醇溶液,称重,静置浸泡 30 min,超声提取 45 min,冷却后称重,用 50% (V/V) 甲醇溶液补足失重,以 4000 r/min 离心 20 min,收集滤液,测试前用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤。

1.2.2 色谱条件的选择 色谱柱(ZORBAX Eclipse XDB-C18 column),柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL/min,检测波长为 330 nm,进样量为 2 μ L。以 0.1% (V/V) H₃PO₄ 溶液为流动相 A,乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱: 0~10 min,16%~22.3% B; 10~12 min,22.3%~23% B; 12~16 min,23%~26% B; 16~23 min,26%~30% B。

1.2.3 标准曲线的绘制 取不同质量浓度的各标准品溶液适量,按上述色谱条件测得各色谱峰的相对保留时间和峰面积。以不同浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,求得各标准品的标准曲线 R^2 均大于 0.999。

1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 重复性实验 按 1.2.1 节平行制备同一样品溶液 6 份,按 1.2.2 节测定,以 7 种苯乙醇苷峰面积为指标,RSDs 在 0.9%~1.8% 之间,表明操作误差较小,重复性良好。

1.2.4.2 稳定性实验 分别在 0,2,4,6,8,12,18,24 h,按 1.2.2 节平行测定同一样品 6 次,以 7 种苯乙醇苷峰面积为指标,计算各自的 RSD 值,均在 1.1%~3.7% 之间,表明在 24 h 内样品稳定性良好。

1.2.4.3 精密度实验 按 1.2.2 节的色谱条件平行测定管花苷 A 对照品 6 次,计算 RSD 值为 1.0%,表明仪器精密度良好。

1.2.4.4 加样回收率实验 以 XF-2 为测试样品,分别加入 80%,100%,120% 浓度的对照品毛蕊花糖苷溶液,计算 3 个加标水平下的回收率在 97.9%~101.2% 之间。每个实验平行测定 3 次(2 h/次),保证该方法的重复性与稳定性,计算其相对标准偏差 RSD 在 0.1%~0.4% 之间,表明该方法测定的结果误差较小。

2 结果与讨论

2.1 荒漠肉苁蓉不同部位液相指纹图谱的建立与相似度评价

2.1.1 荒漠肉苁蓉不同部位指纹图谱的建立 将所得到的液相数据通过原始色谱工作站转换成 AIA 格式后,导入《中药指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)进行分析,以 S2 作为参照图谱,设定时间窗口为 0.1 min,采用中位数法进行多点校正后自动匹配,分别生成花序部位(图 1a)与茎部位(图 1b)的指纹图谱。荒漠肉苁蓉花序部位相对峰数较少,最高峰在 16 min 左右,且其含量很高;荒漠肉苁蓉茎部位的相对峰数多,出峰情况较为复

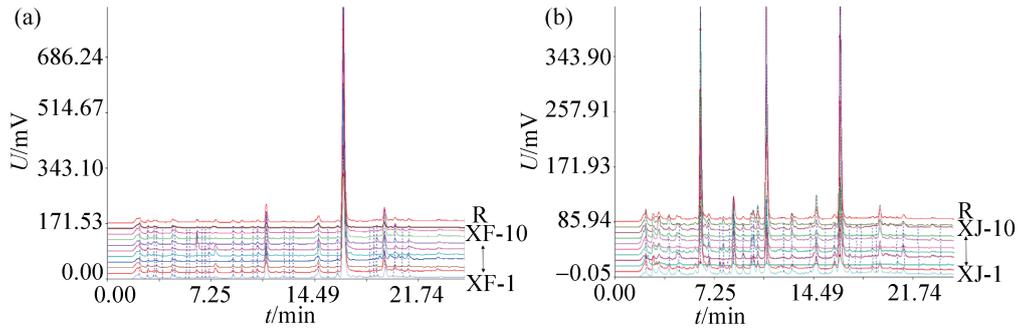


图 1 花序部 (a) 和茎部 (b) 指纹图谱及对照图谱

Fig. 1 Inflorescence (a) and stem (b) fingerprint and control fingerprint

XF: *C. deserticola* inflorescence; XJ: *C. deserticola* stem parts

杂,在 6.5,10.9 和 16 min 左右出现最高峰,说明荒漠肉苁蓉茎部位中化学成分种类与含量较花序部位具有复杂性和多样性。

对不同部位指纹图谱进行相似度检验,将 XF-2 作为对照指纹图谱,相似度设置为 1 进行评价,结果如表 1 所示。花序部位相似度较高,说明花序部位之间化学成分差异性小,具有一致性;而茎部位相似度在 0.428~0.995 之间,说明花序部位与茎部位相似度低,差异性大。

表 1 不同部位 HPLC 特征图谱相似度分析结果

Table 1 Similarity analysis results of HPLC feature fingerprint in different parts

| Sample No. | Similarity | Sample No. | Similarity |
|------------|------------|------------|------------|
| XF-1 | 0.995 | XJ-1 | 0.771 |
| XF-2 | 0.989 | XJ-2 | 0.464 |
| XF-3 | 0.986 | XJ-3 | 0.503 |
| XF-4 | 0.991 | XJ-4 | 0.995 |
| XF-5 | 0.984 | XJ-5 | 0.524 |
| XF-6 | 0.994 | XJ-6 | 0.428 |
| XF-7 | 0.993 | XJ-7 | 0.817 |
| XF-8 | 0.986 | XJ-8 | 0.866 |
| XF-9 | 0.988 | XJ-9 | 0.849 |
| XF-10 | 0.988 | XJ-10 | 0.393 |

2.1.2 共有峰的确定 荒漠肉苁蓉不同部位对照谱图与标准品谱图如图 2 所示,花序部位具有 13 个公共峰(去除溶剂峰),确定出 5 个公共峰;茎部位共具有 19 个公共峰(去除溶剂峰),与标准品对比后确定出 7 个公共峰,分别为 2 号峰(松果菊苷)、8 号峰(肉苁蓉苷 A)、12 号峰(管花苷 A)、13 号峰(毛蕊花糖苷)、14 号峰(异毛蕊花糖苷)、17 号峰(2'-乙酰毛蕊花糖苷)和 19 号峰(管花苷 B)。

2.2 荒漠肉苁蓉不同部位的成分分析

荒漠肉苁蓉中主要含有苯乙醇苷类、多糖类、

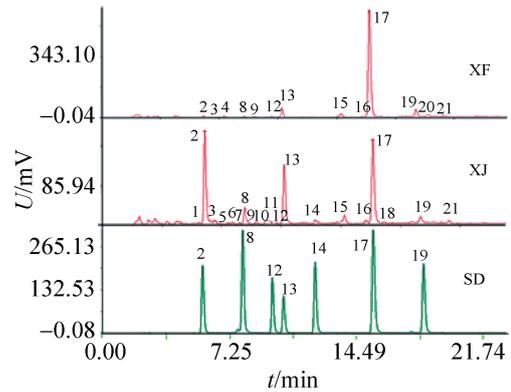


图 2 不同部位对照谱图对比

Fig. 2 Comparison of different parts of the control fingerprint

SD: standard product; XF: *C. deserticola* inflorescence; XJ: *C. deserticola* stem parts

环烯醚萜类、木脂素、黄酮和生物碱等化合物,其中苯乙醇苷类为主要活性成分^[10-11]。以 7 种苯乙醇苷标准品为参照,采用 SPSS 26 软件进行单因素方差分析,结果如表 2 所示。在 7 种苯乙醇苷成分中,花序与茎部位中毛蕊花糖苷成分含量差异显著,其他 6 种苯乙醇苷成分在不同部位之间差异极显著,但总含量无显著性差异。

花序部位中 2'-乙酰毛蕊花糖苷为主要苯乙醇苷成分,不含有肉苁蓉苷 A 和异毛蕊花糖苷,与王金芳^[12]研究结果基本一致。茎部位中主要有松果菊苷、毛蕊花糖苷和 2'-乙酰毛蕊花糖苷,其中松果菊苷和毛蕊花糖苷含量很高(大于 60%),它们作为荒漠肉苁蓉的指标成分,是发挥药效的关键成分^[13-14]。杨建华等^[15]发现 2'-乙酰毛蕊花糖苷具有很强的抗氧化活性,花序部位可参考作为抗氧化物资源进行研究与利用,从而减少资源的浪费。

2.3 荒漠肉苁蓉花序和茎部位的主成分分析

为进一步研究荒漠肉苁蓉不同部位液相指纹

表 2 不同部位 7 种苯乙醇苷成分的含量与方差分析

Table 2 Contents of 7 phenethanol glycosides and variance analysis in different parts

| Composition | Parts | Average/(mg/mL) | Deviation/(mg/mL) | F | Significance |
|-------------------|-------|------------------|--------------------|--------|--------------|
| Echinacoside | XF | 0.030 | 0.094 | 17.035 | ** |
| | XJ | 1.173 | 0.871 | | |
| Cistanoside A | XF | — | — | 16.927 | ** |
| | XJ | 0.162 | 0.125 | | |
| Tubuloside A | XF | 0.010 | 0.018 | 9.922 | ** |
| | XJ | 0.042 | 0.026 | | |
| Acteoside | XF | 0.189 | 0.114 | 5.216 | * |
| | XJ | 0.542 | 0.475 | | |
| Isoacteoside | XF | — | — | 10.930 | ** |
| | XJ | 0.036 | 0.035 | | |
| 2'-Acetylaceoside | XF | 2.355 | 0.854 | 20.684 | ** |
| | XJ | 0.828 | 0.631 | | |
| Tubuloside B | XF | 0.167 | 0.080 | 9.874 | ** |
| | XJ | 0.067 | 0.060 | | |
| Total | XF | 2.753 | 1.017 | 0.028 | |
| | XJ | 2.850 | 1.539 | | |

— the ingredient had not been detected; ** extremely significant, $P < 0.01$; * significant, $P < 0.05$

图谱的异同,以 7 种苯乙醇苷类指标成分作为变量,导入 SPSS 26 数据统计软件进行主成分分析。第一个主成分特征值为 3.775,方差贡献率为 53.923%;第二个主成分特征值为 1.593,方差贡献率为 22.759%;第三个主成分特征值为 0.721,方差贡献率为 10.295%。提取出对应特征值相对较大的三个主成分进行分析,其累计贡献率可达到 86.977%,包含了大部分信息,以 PC1 和 PC2 主成分建立坐标系进行投影得到样品的 PCA 得分图(图 3)。

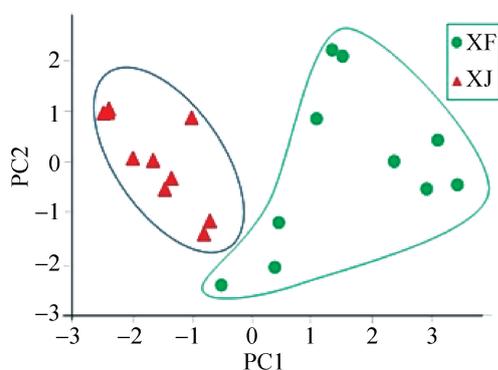


图 3 不同部位主成分得分图

Fig. 3 Principal component score chart of different parts

以 PC1 为 -0.5 为界限,荒漠肉苁蓉茎部位在 $PC1 > -0.5$ 为一类,花序部位在 $PC1 < -0.5$ 聚为一类,在 PC1 接近 -0.5 时,既有花序部又有茎部,说明有些样品之间具有一定的相似性。整体上

主成分分析能够将荒漠肉苁蓉不同部位聚为两类,符合不同部位具有不同特征图谱的特点,主成分分析可用于区分荒漠肉苁蓉的不同部位。

2.4 荒漠肉苁蓉花序和茎部位苯乙醇成分的 TOPSIS 评价分析

TOPSIS 分析建立的数学模型可实现多目标决策分析,目前已用于中药材质量综合评价等多个方面^[15]。以荒漠肉苁蓉 7 种苯乙醇苷成分为指标,对 10 批次荒漠肉苁蓉的花序与茎部位的苯乙醇苷成分进行评价分析,结果见表 3,茎部位的综合品质评分高于花序部位。

表 3 各个样本排序指标值

Table 3 Sort index value of each sample

| Samples | Di + | Di - | Statistics | Ranks |
|---------|---------|---------|------------|-------|
| XF | 1.96858 | 0.82483 | 0.29528 | 2 |
| XJ | 0.82483 | 1.96858 | 0.70472 | 1 |

Di + : the distance between the i evaluation index and the optimal plan; Di - : the distance between the i evaluation index and the worst plan

3 结论

采用高效液相色谱技术建立荒漠肉苁蓉不同部位的指纹图谱,并采用主成分分析法与 TOPSIS 评价法对荒漠肉苁蓉不同部位苯乙醇苷化学成分进行分析。该方法准确可行,能够有效地揭示荒漠肉苁蓉花序与茎部位之间的异同。在茎部位作为

主要功效成分进行食品药品开发的同时,花序部位 从而提高荒漠肉苁蓉的利用率,减少资源的浪费,
可参考作为天然的抗氧化物资源进行研究与利用, 为其产业发展提供新方向。

参考文献

- [1] Flora of China Editorial Committee. Flora Reipublicae Popularis Sinicae[M]. Beijing: Science Press, 1990: 82.
中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 82.
- [2] Li Z. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 24(11): 131.
栗 征. 中医药导报, 2018, 24(11): 131.
- [3] Liu P, Liu H. Ningxia J Agric and Fores, 2019, 60(11): 9.
刘 鹏, 刘 华. 宁夏农林科技, 2019, 60(11): 9.
- [4] Chinese pharmacopoeia 2015. Vol I [S]. 2015: 135.
中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 135.
- [5] Zhou J Y, Zhou G M, Chen R, Huang Z Y. Chin J Anal Lab, 2021, 40(3): 255.
周家羽, 周光明, 陈 蓉, 黄子怡. 分析试验室, 2021, 40(3): 255.
- [6] Zhang D W, Song N, Liu Y, Liu Z Z, Shi B W. Chin J Anal Lab, 2021, 40(3): 351.
张大维, 宋 宁, 刘 语, 刘铮铮, 史博文. 分析试验室, 2021, 40(3): 351.
- [7] Xu X N. The Study of chromatographic fingerprints of traditional Chinese medicine and application of chemometrics methods [D]. Changsha: Central South University, 2010.
徐小娜. 中药色谱指纹图谱研究及化学计量学方法的应用[D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [8] Li Y, Qiu G Y, Li X C, Cheng X L, Wei F, Ma S C. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(7): 1323.
李 运, 邱国玉, 李晓春, 程显隆, 魏 锋, 马双成. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1323.
- [9] Wang Y, Zhang L, Du Z, Pei J, Huang L. Enti Rep, 2019, 9(1): 19737.
- [10] Fu Z F, Fan X, Wang X Y, Gao X M. J Ethnopharmacol, 2018, 219: 233.
- [11] Jiang Y, Li S P, Wang Y T, Chen X J, Tu P F. J Chromatogr A, 2009, 1216(11): 2156.
- [12] Wang J F. Qualitative and quantitative studies on phenylethanoid glycosides from different parts of *Cistanche deserticola* [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014.
王金芳. 肉苁蓉不同部位苯乙醇苷类成分的定性定量研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
- [13] Wang M W, Li S, Li M, Li C Y, Yang F D. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 23(5): 63.
王明伟, 李 硕, 李 敏, 李成义, 杨扶德. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 63.
- [14] Liu Y. Study on the active constituent and fingerprint of *Cistanche deserticola* Ma and *Boschniakia rossica* [D]. Jilin: Jilin University, 2013.
刘 洋. 肉苁蓉、草苁蓉活性成分和指纹图谱研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [15] Yang J H, Hu J P, Kasimu R N, Du N S. J Chin Med Mater, 2009, 32(7): 1067.
杨建华, 胡君萍, 热 娜·卡斯木, 堵年生. 中药材, 2009, 32(7): 1067.