

基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术研究酒苁蓉增效的物质基础

黄林芳*, 李文涛, 王冬梅, 任伟光

中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 以肉苁蓉为研究对象, 阐述其经酒炙前后的物质基础差异, 探讨酒制肉苁蓉增强温肾助阳功效, 避免滑肠致泻副作用的科学内涵。方法 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF/MS) 分析了肉苁蓉酒炙前后成分变化, 并运用主成分分析法和正交偏最小二乘判别法分析酒炙前后肉苁蓉化学成分量的变化。结果 研究首次揭示肉苁蓉酒炙增效的物质基础, 松果菊苷、毛蕊花糖苷、 β -谷甾醇、胡萝卜苷、蔗糖、次黄嘌呤核苷的量升高, 其中以苯乙醇苷类化合物松果菊苷、毛蕊花糖苷最显著; 而 8-表马钱酸、丁二酸、京尼平苷的量呈下降趋势。松果菊苷、毛蕊花糖苷、8-表马钱酸、丁二酸可作为区分生品与炮制品的指标性成分。结论 对阐明肉苁蓉酒炙的炮制原理阐明具有重要意义, 同时也为阐明酒炙肉苁蓉增效减毒机制提供了重要科学依据。

关键词: 肉苁蓉; 酒炙肉苁蓉; UPLC-Q-TOF/MS; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别法

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)24-3471-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.24.008

Study on material basis of increasing efficacy of wine-fried *Cistanches Herba* by UPLC-Q-TOF/MS

HUANG Lin-fang, LI Wen-tao, WANG Dong-mei, REN Wei-guang

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective *Cistanche Herba* was studied to explain the differences of the material basis before and after wine-fried processing, and to approach the scientific connotation for wine-fried *Cistanche Herba* with the functions of warming and tonifying kidney-*Yang* and avoiding side effects of slippery bowel diarrhea. **Methods** The chemical analysis of crude and processed *Cistanche Herba* was performed by ultra-performance liquid chromatography method (UPLC) coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry (Q-TOF/MS). The principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squared discriminant analysis (OPLS-DA) were used to distinguish the content variation between crude and processed *Cistanche Herba*. **Results** The material basis for increased efficacy of wine-fried *Cistanche Herba* was studied for the first time. The contents of echinacoside, acteoside, β -sitosterol, daucosterol, sucrose, and inosine increased. Especially, the contents of echinacoside and acteoside increased significantly. The contents of 8-epiloganic acid, succinic acid, and geniposide decreased in the wine-fried *Cistanche Herba*. The most obvious chemical markers, such as echinacoside, acteoside, cistanoside A, and geniposide, could be used as index components to distinguish the crude and processed *Cistanche Herba*. **Conclusion** The study is important for the processing principle of the processed *Cistanche Herba* and provides an important scientific basis for clarifying the effective material basis and avoiding the side effects of the wine-fried *Cistanche Herba*.

Key words: *Cistanches Herba*; wine-fried *Cistanches Herba*; UPLC-Q-TOF/MS; PCA; OPLS-DA

肉苁蓉 *Cistanches Herba* 为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schrenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎,

主产于内蒙古、甘肃、新疆、青海等地^[1-2]。其具有补肾益精、润肠通便之功效, 现代临床主治肾阳不足、精血亏虚、阳痿不孕、腰膝酸软、筋骨无力、

收稿日期: 2013-08-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274013); 国家自然科学基金重点项目 (81130069); 国家重大科技专项创新药项目 (2011ZX09307-002-01)

*通信作者 黄林芳 Tel: (010)57833197 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

肠燥便秘等症^[3]。安肾丸、复方肉苁蓉补肾颗粒等是以前为原料的药品和保健品。肉苁蓉素有“沙漠人参”美称，是我国传统的名贵中药材^[4-5]，其主要化学成分为苯乙醇苷类、环烯醚萜苷、木脂素苷、单糖、双糖、多糖、氨基酸、多肽、蛋白质、三萜、甾醇、多元醇等^[6]。其中松果菊苷、毛蕊花糖苷具有补肾壮阳、抗衰老、增强免疫力等功效^[7]。传统炮制认为酒炙能升提^[8]。肉苁蓉经酒炙后可避免滑肠致泻的副作用，同时增强温肾助阳功能^[9-10]。

超高效液相色谱(UPLC)是近年来新兴的分析技术，有超高压、超高灵敏度、超高分力度的特点，在中药分析分离上具有明显优势。飞行时间串联质谱仪(Q-TOF/MS)为高分辨率质谱，有高分辨率、高选择性、可得到精确的相对分子质量和质谱图的特点^[11]。UPLC与Q-TOF/MS联用技术在目前中药分析工具中占有优势，集高效分离能力的色谱和高分辨、高灵敏、强定性能力质谱于一体，已成为中药成分研究的最有效的分析工具之一^[12-13]。本研究以肉苁蓉及其酒炙品为研究对象，结合Markerlynx 4.1软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)，探讨酒炙对肉苁蓉的成分的影响，试图从化学成分角度阐述酒炙肉苁蓉增效减副科学内涵和炮制机制，为临床用药提供科学依据。

1 仪器与材料

Acquity UPLC-Synapt MS 色谱-质谱联用仪(Waters公司)、MassLynx V4.1 质谱工作站(Waters公司)、采用Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Waters公司)、ELGA Purelab Classic-UVF 纯水仪(英国ELGA公司)。乙腈(色谱纯, Fisher公司)、甲酸(色谱纯)、超纯水。

肉苁蓉于2012年5月采自内蒙古阿拉善左旗，经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定为列当科植物荒漠肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 的干燥带鳞叶的肉质茎，样品保存在中国医学科学院药用植物研究所标本馆。

2 方法与结果

2.1 酒炙肉苁蓉制备

肉苁蓉 10 g 与黄酒 10 mL 拌匀，室温下闷润 8 h，蒸制 12 h，取出略放凉，干燥至干，粉碎备用。方法参考本课题组建立的一种酒炙肉苁蓉的新制备方法(专利申请号为 2012105903922)。

2.2 供试品溶液制备

分别取肉苁蓉药材及酒炙品粉末(过4号筛)约1g，精密称定，精密加入50%甲醇50mL，密塞，摇匀，称定质量，浸泡30min，超声处理40min(功率250W，频率35kHz)，放冷，再称定质量，加50%甲醇补足减失的质量，摇匀，静置，取上清液，滤过，取续滤液，即得。

2.3 UPLC 条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, Waters公司) 色谱柱；柱温为35℃，体积流量为0.40 mL/min，进样量为3 μL；流动相为0.1%甲酸水溶液-乙醇，梯度洗脱：0~2 min，5%乙醇；2~10 min，5%~30%乙醇；10~11 min，30%~5%乙醇；11~12 min，5%乙醇。

2.4 质谱条件

采用电喷雾电离离子源(ESI)，正离子模式检测： m/z 50~1 200，毛细管电压为3.0 kV，锥孔电压为35 V，离子源温度为120℃，脱溶剂温度为450℃，雾化气(N₂)体积流量为60 L/h，脱溶剂气(N₂)体积流量为600 L/h；碰撞能量(CE)为30 V，质量校正质核比为 m/z 556.266 4。

2.5 数据分析

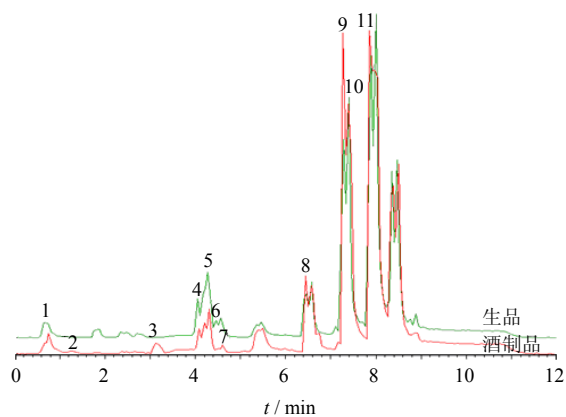
采用MarkerLynx 4.1软件对正离子模式下肉苁蓉生品和肉苁蓉酒炙品的质谱峰进行分析，利用PCA和OPLS-DA分析化合物之间的差异，得到潜在的化学标记物。

2.5.1 酒炙肉苁蓉及生品肉苁蓉总离子流图比较 正离子模式下离子峰的鉴别见表1^[14-16]，由肉苁蓉酒炙品及肉苁蓉生品总离子流图(图1)可见肉苁蓉酒炙前后化学成分变化显著。图1正离子模式下肉苁蓉酒炙品与生品相比，酒炙品中，1、2、6、8、9、10号离子峰的量升高，即多糖类化合物蔗糖(t_R 0.759 min, m/z 365.105 2)，核苷类化合物次黄嘌呤核苷(t_R 1.005 min, m/z 268.104 3)，苯乙醇苷类化合物松果菊苷(t_R 4.234 min, m/z 787.319 5)、毛蕊花糖苷(t_R 6.502 min, m/z 625.476 6)，甾醇类化合物β-谷甾醇(t_R 7.344 min, m/z 437.340 2)，皂苷类化合物胡萝卜苷(t_R 7.679 min, m/z 599.428 8)质量分数升高。其中以苯乙醇苷类化合物松果菊苷、毛蕊花糖苷最显著。3、4、7号离子峰的量降低，即有机酸类化合物8-表马钱酸(m/z 625.476 6)、丁二酸(t_R 4.180 min, m/z 119.034 4)、环烯醚萜葡萄糖苷类化合物京尼平苷(t_R 4.614 min, m/z 411.267 0)

表 1 正离子模式下离子峰鉴别

Table 1 Identification of quasi-molecular ions in positive ion mode

编号	t_R / min	选定离子	分子式	m/z			化合物归属
				实际值	理论值	误差	
1	0.759	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	365.105 2	342.296 5	0.2	蔗糖 ^[14-15]
2	1.005	$[\text{M}]^+$	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$	268.104 3	268.230 0	1.3	次黄嘌呤核苷 ^[14-15]
3	2.517	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	399.126 7	376.360 0	0.2	8-表马钱酸 ^[14-15]
4	4.180	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	119.034 4	118.090 0	1.5	丁二酸 ^[14-15]
5	4.212	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{17}\text{H}_{50}\text{O}_{20}$	814.279 3	814.800 0	0.3	肉苁蓉苷 A ^[16]
6	4.234	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{O}_{20}$	787.319 5	786.730 0	2.3	松果菊苷 ^[16]
7	4.614	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	411.2670	388.370 0	0.6	京尼平苷 ^[14-15]
8	6.502	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$	625.476 6	624.610 0	0.8	毛蕊花糖苷 ^[16]
9	7.344	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$	437.342 0	414.690 0	0.7	β -谷甾醇 ^[14-15]
10	7.679	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$	599.428 8	576.850 0	0.5	胡萝卜苷 ^[14-15]
11	8.199	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$	453.342 7	430.420 0	1.5	芒柄花苷 ^[14-15]



1~11 与表 1 相对应

Peaks 1-11 in Fig. 1 corresponding with those

图 1 肉苁蓉及其酒炙品 UPLC-QTOF/MS 谱图

Fig. 1 UPLC-QTOF/MS chromatograms of crude and wine-fried *Cistanches Herba* by UPLC-Q-TOF/MS

质量分数降低。

2.5.2 MarkerLynx 结果分析

应用 MarkerLynx 4.1 软件对肉苁蓉酒炙品及其生品两组数据的整体的差异性做进一步 PCA 和 OPLS-DA 分析。结果见图 2、3。图 2 显示酒炙品与生品能够明显区分。图 3 中两组数据的差异是由炮制前后成分的质量分数差异造成的，由此可见酒炙前后成分质量分数具有显著性差异。在 S 型曲线两端的数据点分别代表了样品中可信度最高的特征化合物，即纵坐标绝对值越大，可信度越高，横坐标绝对值越大，化合物质量分数越高。右上方代表了肉苁蓉酒炙品中质量分数较高的化合物，左下方代表了肉苁蓉生品中质量分数较高的化合物。因此点 a (松果菊苷)、b (8-表马钱酸)、c (毛蕊花糖苷)、d (丁二酸)、e (蔗糖)、f (京尼平苷) 代表了肉苁蓉酒炙品与生品相比差异显

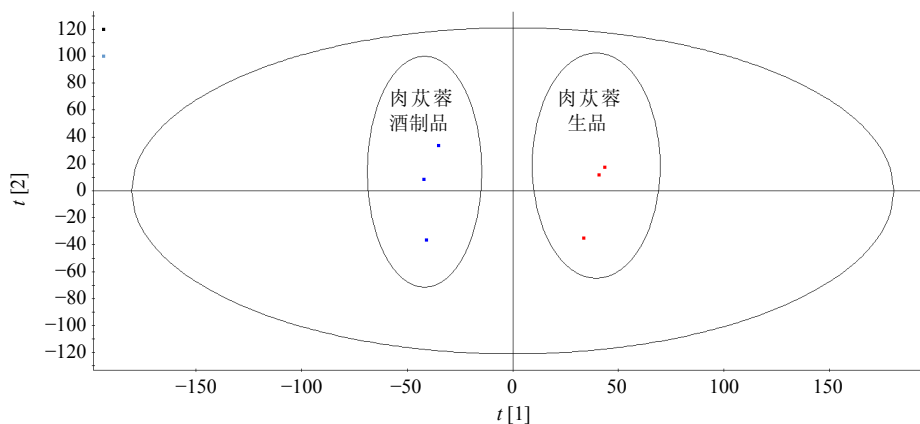


图 2 肉苁蓉生品与酒炙品正离子模式下 PCA 法差异成分分析

Fig. 2 Analysis of different constituents in crude and wine-fried *Cistanches Herba* using PCA in positive ion mode

著的化学成分，可作为潜在的标记物，为肉苁蓉酒炙品与生品的鉴定提供依据。在正离子模式 OPLS-DA/S-Plot 图中，a、b、c、d、e、f 可作为区分肉苁蓉

酒炙品与生品最显著的标记化合物，图 4 为 MarkerLynx 4.1 分析得到的酒炙品与生品差异较显著的特征化合物的离子强度变化趋势。

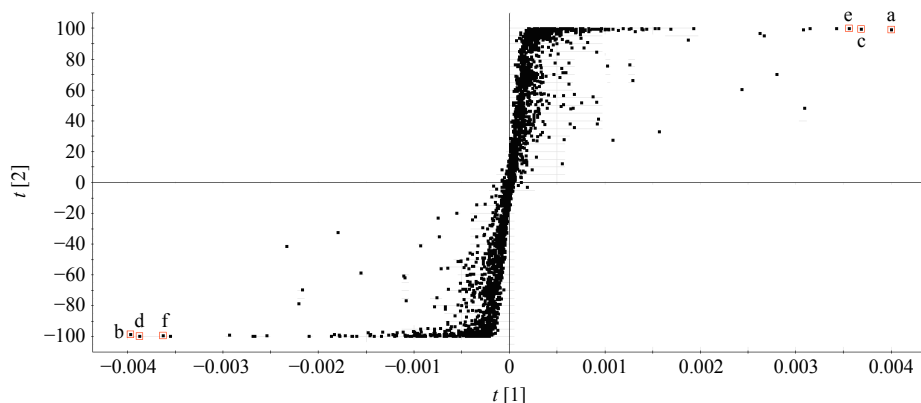


图 3 肉苁蓉生品与酒炙品正离子模式下 OPLS-DA 法差异成分分析结果的散点图

Fig. 3 S-Plot of different constituents in crude and wine-fried *Cistanche Herba* using OPLS-DA method in positive ion mode

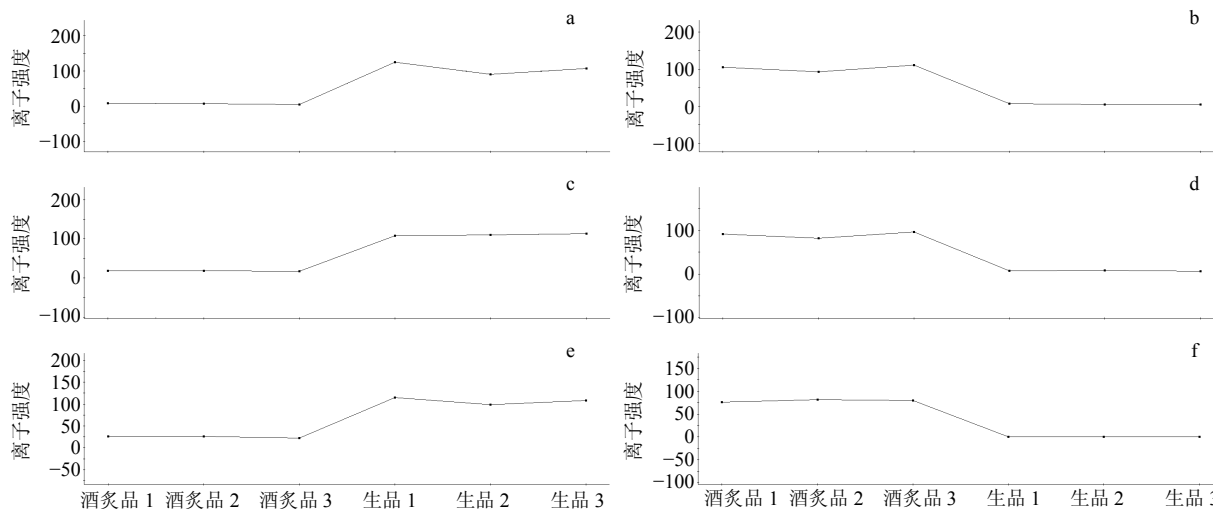


图 4 肉苁蓉生品与酒炙品差异显著的特征化合物的离子强度变化趋势图

Fig. 4 Ion intensity trend plots of characteristic constituents in crude and wine-fried *Cistanche Herba* in positive ion mode

3 讨论

传统中药炮制认为，肉苁蓉酒炙后上行作用加强，温补肾阳之功效增强。基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术对肉苁蓉酒炙品和生品进行化学成分分析，结果表明酒炙肉苁蓉中苯乙醇苷类松果菊苷、毛蕊花糖苷的量明显升高。现代药理研究表明苯乙醇苷具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老、免疫调节、增强记忆和性功能等作用，尤以松果菊苷及毛蕊花糖苷效果最为明显。同时，蔗糖的量也有所增加，其具有抗病毒、抗肿瘤等多方面药理作用^[6]。8-表马钱酸、丁二酸的量降低，此类成分属于有机酸类，大多能溶于水，炮制过程中闷润时间

对其影响较大，可能导致有机酸的流失。

通过 PCA 和 OPLS-DA 分析结果得出区分肉苁蓉酒炙品与生品最显著的标记化合物为 a (松果菊苷)、c (毛蕊花糖苷)、e (蔗糖)、b (8-表马钱酸)、d (丁二酸)、f (京尼平苷)。a、c、e 为酒炙后增加的成分，b、d、f 为酒炙后减少的成分。a、c、b、d 可将其作为区分酒炙品与生品的指标性成分。

本研究比较了在正负离子检测下，样品的出峰情况。结果表明正离子出峰的数量多，峰形较好。由于甲酸作为流动相，有助于形成正离子，对负离子有一定的抑制作用，响应值较负离子高，所以本实验采用正离子模式进行检测。

本实验基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析了肉苁蓉酒炙前后化学成分变化情况, 研究表明肉苁蓉酒炙前后成分差异显著, 其化学成分的变化是酒炙后增效的物质基础, 因而可通过合理的炮制应用于临床治疗。本实验的研究成果对于研究酒苁蓉的炮制原理具有重要意义, 同时也为酒苁蓉药效物质基础的阐明提供了重要依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王彩平. 中药肉苁蓉的研究进展 [J]. 甘肃中医学院学报, 2009, 26(3): 46-48.
- [3] 胡佳琦, 冯佳媛. 肉苁蓉的化学成分和药理作用 [J]. 中医临床研究, 2012, 4(15): 26-28.
- [4] 赵晶晶, 李 薇, 张丽娟, 等. 采籽前后肉苁蓉不同部位中有效成分含量测定 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(8): 89-91.
- [5] 沈映冰, 朱彩燕, 佃少娜, 等. 复方肉苁蓉补肾颗粒药材提取纯化工艺研究 [J]. 中药材, 2011, 34(5): 805-807.
- [6] 颜贵卉, 田金虎, 龙本文, 等. 肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的研究进展 [J]. 中南药学, 2012, 10(9): 692-695.
- [7] 陈 靖, 李 宁, 张秀兰, 等. RP-HPLC-DAD 法测定酒制肉苁蓉中松果菊苷含量 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(8): 931-933.
- [8] 张瑞环, 安薇薇, 王 慧. 浅析中药炮制对药物毒性的影响 [J]. 齐鲁药事, 2006, 25(6): 355-356.
- [9] 张柄鑫. 中药古今炮制演变评述 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [10] 张 勇, 吴 煊. 肉苁蓉炮制历史的沿革 [J]. 中国中药杂志, 1992, 17(4): 213-214.
- [11] Li S L, Lai S F, Song J Z, *et al.* Decoction-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(4): 946-957.
- [12] 高 洋, 陈海敏, 徐继林, 等. κ -卡拉胶寡糖的反相离子对-超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱研究 [J]. 分析化学, 2009, 37(11): 1590-1595.
- [13] 徐 钢, 单国顺, 鞠成国, 等. 狗脊升华与挥发性成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2308-2312.
- [14] 俞培忠. 肉苁蓉化学成分及其生物活性研究 2. 椭圆叶花锚化学成分的研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [15] 张慧文. 盐生肉苁蓉的化学成分及指纹图谱研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古学院, 2008.
- [16] 王义明, 张思巨, 罗国安, 等. 用 LC/ESI2MS/MS 研究肉苁蓉与其代用品中的苯乙醇苷类化合物 [J]. 药学学报, 2000, 35(11): 839-842.