

基于“初生-次生代谢产物”互作途径的大果沙棘和中华沙棘差异性研究

杨兴晶¹, 刘妍如^{1*}, 唐志书^{1,3*}, 宋忠兴¹, 周 蓬¹, 常百金², 赵艳婷¹, 刘长乐¹

1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 陕西 咸阳 712083

2. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

3. 中国中医科学院, 北京 100700

摘要: 目的 分析大果沙棘 *Hippophae rhamnoides* vat. sp L. 与中华沙棘 *H. rhamnoides* 初生/次生代谢物的差异, 并对其生物合成途径变化进行分析。方法 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 法对 2 个种属的沙棘进行初生及次生代谢产物表征, 基于二水平析因-星点设计法 (plackett burman-central composite design, PB-CCD) 设计对沙棘 UPLC-DAD 指纹图谱进行研究, 优化液相方法, 指认共有峰; 以偏最小二乘-判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)、聚类分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析对大果沙棘、中华沙棘进行差异初生代谢物筛选及相关代谢通路富集; 进一步采用质谱多反应检测 (multiple reaction monitoring, MRM) 对筛选得到具有差异的初生代谢物和次生代谢物进行定量分析; 最后, 对 2 个品种沙棘的差异性成分进行分析并对其进行生物合成途径的关联和阐释。结果 基于成分表征和 PLS-DA 初步鉴定出中华、大果沙棘含量差异较大的成分有 11 个, 其中包括 2 个氨基酸类初生代谢物和 9 个黄酮类次生代谢物。结论 建立的方法能鉴定出中华沙棘、大果沙棘中的差异性成分。分析结果显示, 总黄酮在中华沙棘中含量较高, 说明中华沙棘在药用功效上可能强于大果沙棘; 其次异鼠李素在大果沙棘中含量较高, 说明其对临床的质控和应用可能不太适用。

关键词: 沙棘; 中华沙棘; 大果沙棘; L-酪氨酸; L-苯丙氨酸; 水仙苷; 异鼠李素-3-O-葡萄糖苷; 槲皮素; 木犀草素; 柚皮素; 山柰酚; 异鼠李素; 鼠李素; 二水槲皮素

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)07-2383-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.024

Difference between *Hippophae rhamnoides* vat. sp and *Hippophae rhamnoides* based on “primary-secondary metabolite” interaction pathway

YANG Xingjing¹, LIU Yanru¹, TANG Zhishu^{1, 3}, SONG Zhongxing¹, ZHOU Peng¹, CHANG Baijin², ZHAO Yanting¹, LIU Changle¹

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To analyze the differences of primary/secondary metabolites of *Hippophae rhamnoides* vat. sp and *H. rhamnoides*, and analyze the changes of their biosynthetic pathways. **Methods** Firstly, the ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) technology was utilized to characterize the primary and secondary metabolites of two species of *Hippophae Fructus*. Then, based on the plackett burman-central composite design (PB-CCD), the UPLC-DAD fingerprint of *Hippophae Fructus* was studied, the liquid phase method was optimized, and the

收稿日期: 2023-11-03

基金项目: 内蒙古自治区 2019 年度重大科技专项 (2019ZD005); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-21)

作者简介: 杨兴晶 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。Tel: 18329582125 E-mail: 2368433851@qq.com

*通信作者: 刘妍如 (1985—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药质量控制及物质基础研究。Tel: (029)38182207

E-mail: yanzi_2203@aliyun.com

唐志书, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药制剂新技术与中药质量分析研究。Tel: (010)64089180

E-mail: tzs6565@163.com

common peaks were identified. Next, partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), cluster analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were conducted for the differential primary metabolites screening and related metabolic pathways enrichment of *H. rhamnoides* vat. sp and *H. rhamnoides*. At the same time, multiple reaction monitoring (MRM) was used to quantitatively analyze the primary and secondary metabolites with differences. Finally, the differential components of the two species of *Hippophae Fructus* were analyzed and their biosynthetic pathways were correlated and explained.

Results Based on component characterization and PLS-DA, a total of 11 components with large differences in the content of two species of *Hippophae Fructus* were preliminarily identified, including two amino acid primary metabolites and nine flavonoid secondary metabolites. **Conclusion** The method established in this study can identify the different components in two species of *Hippophae Fructus*. The results showed that the content of total flavonoids was higher in *Hippophae Fructus*, indicating that *Hippophae Fructus* may have stronger medicinal efficacy than *H. rhamnoides* vat. sp L.; secondly, the determination result of isorhamnetin was higher in *Hippophae rhamnoides* vat. sp L., indicating that it may not be suitable for clinical quality control and application.

Key words: *Hippophae Fructus*; *Hippophae rhamnoides* L.; *Hippophae rhamnoides* vat. sp L.; L-tyrosine; L-phenylalanine; narcissoside; isorhamnetin-3-O-glucoside; quercetin; luteolin; naringenin; kaempferol; isorhamnetin; rhamnetin; quercetin dihydrate

沙棘 *Hippophae Fructus* 为胡颓子科植物中华沙棘 *Hippophae rhamnoides* L. 的干燥成熟果实, 本品系蒙古族、藏族习用药材^[1], 也是一种重要的药食同源药材^[2]。其具有可健脾消食、止咳祛痰、活血散瘀的功能^[3]和调血脂、降血糖、抗癌等功效^[4]。沙棘含有黄酮^[5]、鞣质、萜类、多糖、维生素等多种活性成分, 其中黄酮类成分是沙棘的主要功效物质^[3]。

大果沙棘 *Hippophae rhamnoides* vat. sp L. 原产自俄罗斯, 是近年来中国从俄罗斯引进的新品种和杂交选育的品种, 表现出枝条无刺或少刺、果实大、果柄长、单株产量高等特性。其果实中含有黄酮、氨基酸、维生素等多种生物活性物质^[6], 具有广泛的食用、美容和药用开发价值^[7]。

沙棘许多药用功效都是通过黄酮类化合物发挥作用才实现的, 其含有的黄酮糖苷、苷元等一些生物活性成分比较丰富, 在将沙棘果实作为保健和药用方面有着十分广阔的前景^[8]。大果沙棘作为俄罗斯引进的选育良种的沙棘, 其在国内的研究多以种植、栽培和杂交为主^[9-11], 而中华沙棘在药用上使用较多, 且已有研究表明引进沙棘(大果沙棘)的黄酮类化合物含量较低^[8,12], 安雄韬等^[13]、付依依等^[14]对不同品种大果沙棘果实与不同品种的沙棘总黄酮含量进行分析, 结果表明总黄酮含量最高的均是中华沙棘, 所以中华沙棘在药用方面的使用频率要大于大果沙棘。由于品种不同, 药用植物中化学成分含量不同, 高韵等^[15]用红外光谱对不同种属、不同产地的黄精进行鉴别研究, 李国卫等^[16]利用多元统计分析对不同柯子属药材进行多指标成分含

量测定, 得到不同种黄精属、柯子属药材间所含化学成分及含量亦存在明显差异, 结果都可系统、全面地为药材的质量评价提供科学依据。

植物代谢物组学研究不同物种、不同基因类型或不同生态类型的植物在不同生长时期或受某种刺激干扰前后的所有小分子代谢产物, 对其进行定性、定量分析, 并找出代谢变化的规律^[17]。本研究采收了不同产地中华沙棘和大果沙棘, 借鉴植物代谢组学的思路, 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对中华沙棘、大果沙棘的差异性成分进行分析, 通过多元统计分析与定量分析找出其中差异显著的化学成分及其变化规律, 最后通过化学成分的含量差异对生物合成途径的进行分析。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1290 型高效液相色谱串联 AB Sciex 4500 Qtrap 三重四级杆线性离子阱质谱仪(美国 Agilent 公司, 美国 AB Sciex 公司); Waters Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱串联 Triple TOF™ 5600 三重四级杆飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司, 美国 AB Sciex 公司); KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 十万分之一电子天平(Sartorius 科学仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); TQ-200 型高速多功能粉碎机(上海市天祺盛世科技有限公司), Milli-Q 型水纯化系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 材料

对照品鼠李素(批号 wkq21083007, 质量分数

98%)、二水槲皮素(批号 wkq-21080908, 质量分数 97%)、木犀草苷(批号 wkq18032905, 质量分数 98%) 购自四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品异鼠李素(批号 MUST-21082713, 质量分数 99.27%)、木犀草素(批号 MUST-21072311, 质量分数 98.52%)、水仙苷(批号 MUST-20101407, 质量分数 99.99%) 购自成都曼斯特生物科技有限公司; 异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷(批号 HR2711W2, 质量分数 98%)、山柰酚(批号 HR1832W2, 质量分数 98%) 购自宝鸡辰光生物科技有限公司; 异槲皮苷(批号 111809-201403, 质量分数 92.9%)、金丝桃苷(批号 111521-201809, 质量分数 94.9%)、槲皮苷(批号 111538-202007, 质量分数 93.5%)、槲皮素(批号 100081-201610, 质量分数 99.1%)、芦丁(批号 100080-201811, 质量分数 91.7%)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷(批号 112007-202103) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品 *L*-酪氨酸(批号 0609-0109)、*L*-苯丙氨酸(批号 624-200104) 购自中国食品药品检定研究院; 柚皮素(批号 200824, 质量分数 98%) 购自成都植标化纯生物技术有限公司。甲醇(分析级, 成都市科隆化学品有限公司), 乙腈(质谱级, 批号 205179, 赛默飞世尔科技有限公司公司), 甲醇(色谱级, 德国默克公司), 甲酸(批号 205775, 赛默飞世尔科技有限公司公司), 水为超纯水(密理博 Milli-Q Integral 5 超纯水机制备)。

样品为不同产地沙棘(表 1), 经陕西中医药大学药学院白吉庆副教授鉴定为胡颓子科植物中华沙

棘 *H. rhamnoides* L. 和大果沙棘 *H. rhamnoides* vat. sp L. 的干燥成熟果实。

2 方法

2.1 样品的干燥

取各批次中华沙棘和大果沙棘果实进行清洗, 分别取各批次 2 种果实适量, 进行标记, 装入不锈钢托盘中均匀摊开, 所有样品在 60 °C 烘箱中干燥 12 h, 干燥后粉碎, 过三号筛, 装袋保存。

2.2 总黄酮含量测定^[1]

2.2.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品 20 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 60%乙醇适量, 置水浴上微热使溶解, 放冷, 加 60%乙醇至刻度, 摇匀。精密量取 25 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.2 mg/mL 芦丁对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粗粉约 2 g, 精密称定, 加 60%乙醇 30 mL, 加热回流 2 h, 放冷, 滤过, 残渣再分别加 60%乙醇 25 mL, 加热回流 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 置 100 mL 量瓶中, 残渣用 60%乙醇洗涤, 洗液并入同一量瓶中, 用 60%乙醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取 25 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加 30%乙醇至 6.0 mL, 加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL, 混匀, 放置 6 min, 再加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 min。加氢氧化钠试液 10 mL, 再加 30%乙醇至刻度, 摇匀, 放置 15 min, 以相应试剂为空白, 照紫外-可见分光光度法(通则 0401), 在 500 nm 的波长处测定吸光度(*A*)值, 以 *A* 值为纵坐标(*Y*), 质量浓度为横坐标(*X*), 绘制标准曲线。

2.2.4 总黄酮的测定 按“2.3.2”项下方法测定 *A* 值。根据标准曲线计算沙棘中总黄酮的含量。

2.4 成分表征测定

2.3.1 对照品溶液的制备 分别精密称取芦丁、槲皮苷、异鼠李素、鼠李素、水仙苷、槲皮素、木犀草素、金丝桃苷、柚皮素、木犀草苷、山柰酚、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷、二水槲皮素、*L*-苯丙氨酸、*L*-酪氨酸对照品适量, 制成质量浓度分别为 0.15、0.21、0.21、0.16、0.11、0.13、0.12、0.20、0.17、0.10、0.10、0.11、0.14、0.13、0.16、0.14 mg/mL 的对照品储备液。储备液于 4 °C 条件下保存备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取“2.1”项下 14

表 1 各批次沙棘信息

Table 1 *Hippophae Fructus* information for each batch

编号	样品	批号	产地
S1	中华沙棘	20201204	新疆
S2		20200105	山西代县
S3		20200627	山西朔城
S4		20200105	黑龙江孙吴县
S5		20200105	黑龙江嫩江县
S6		20201105	延安吴起县
S7		20201107	延安志丹县
S8		20201107	陕西靖边县
S9		20201204	山西宁武县
S10		20201210	山西吕梁
S11		20210913	通辽市庆和镇
S12	大果沙棘	20210912	通辽市科尔沁区
S13		20210913	通辽市庆和镇-黄果
S14		20210913	通辽市庆和镇-红果

批产地的沙棘药材粉末各 1.5 g 于锥形瓶中, 分别加入 60% 甲醇 30 mL, 85 °C 水浴回流 1 h, 放冷, 滤过, 取续滤液, 过膜, 备用。

2.3.3 UPLC 色谱条件 采用 5600 型质谱仪进行成分表征, 色谱柱为 Acquity UPLC® BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸-水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~1 min, 6% B; 1~8 min, 6%~20% B; 8~30 min, 20%~95% B; 30~32 min, 95% B; 32~33 min, 95%~5% B; 33~35 min, 5% B; 柱温 35 °C, 体积流量 0.3 mL/min, 进样量为 5 μL。

2.3.4 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI), 负离子模式下, 采用信息依赖采集(IDA)、动态背景扣除(DBS)和高灵敏度模式采集数据。离子扫描范围 m/z 100~2 000, 负离子模式下源喷射电压为-4 500 V, 裂解电压(decustering potential, DP)为 80 V, 碰撞能量(collision energy, CE)为 35 eV, 负离子模式下, 雾化气(ion source gas 1, GS1)和辅助气(ion source gas 2, GS2)为氮气, 均为 344.7 kPa, 气帘气(curtain gas, CUR)为 241.3 kPa, 雾化温度(temperature, TEM) 550 °C。

2.4 二水平析因(plackett burman, PB)-星点设计(central composite design, CCD)法(PB-CCD)实验设计

2.4.1 影响因子设计 采用比例特定的乙腈-水

混合洗脱系统, 以不同比例甲酸调节流动相系统 pH 值。选用不同色谱柱类型、检测波长、柱温、线性梯度时间、体积流量、乙腈初始比例和进样体积作为考察变量, 以 2 峰分离度之和($\sum R_s$)、归一化分离因子(r^*)、色谱信息量(Φ)和色谱分层响应效能(HCRF)作为响应因子^[18], 因素水平见表 2。

表 2 影响因子及响应因子设计

Table 2 Impact factor and response factor design

影响因子	水平 (-1)	水平 (+1)
检测波长/nm	254	370
柱温/°C	25	35
线性梯度时间/min	20	45
进样体积/μL	1.0	5
体积流量/(mL·min ⁻¹)	0.3	0.5
乙腈初始比例/%	2	10
甲酸比例/%	0.1	0.2
色谱柱类型	50 mm×3.0 mm, 1.8 μm	100 mm×2.1 mm, 1.8 μm

2.4.2 数据分析 以各因素无相互作用且对设计结果干扰少作为设计前提, 采用 Design-Expert Version 8.0.7 统计软件, 首先对检测波长、柱温、梯度时间、进样体积、体积流量、酸浓度、乙腈初始比例和色谱柱类型进行 PB 因子筛选; 然后以 CCD 响应曲面法对重要因素进行寻优, 以确定最优的参数设置, 见表 3。

表 3 Plackett-Burman 设计实验方案 ($n=3$)

Table 3 Plackett-Burman design experimental scheme ($n=3$)

编号	检测波长/nm	柱温/°C	线性梯度/min	进样体积/μL	体积流量/(mL·min ⁻¹)	乙腈初始比例/%	甲酸/%	色谱柱类型
1	370	25	45	5	0.5	2	0.1	50 mm×3.0 mm, 1.8 μm
2	254	35	45	5	0.3	2	0.1	100 mm×2.1 mm, 1.8 μm
3	254	35	45	5	0.5	2	0.2	100 mm×2.1 mm, 1.8 μm
4	254	25	45	1	0.5	10	0.1	100 mm×2.1 mm, 1.8 μm
5	370	35	20	5	0.5	10	0.1	50 mm×3.0 mm, 1.8 μm
6	370	25	45	5	0.3	10	0.2	100 mm×2.1 mm, 1.8 μm
7	370	25	20	1	0.5	2	0.2	100 mm×2.1 mm, 1.8 μm
8	254	25	20	1	0.3	2	0.1	50 mm×3.0 mm, 1.8 μm
9	254	35	45	1	0.5	10	0.2	50 mm×3.0 mm, 1.8 μm
10	254	25	20	5	0.3	10	0.2	50 mm×3.0 mm, 1.8 μm
11	370	35	45	1	0.3	2	0.2	50 mm×3.0 mm, 1.8 μm
12	370	35	20	1	0.3	10	0.1	100 mm×2.1 mm, 1.8 μm

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 UPLC 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸-水溶液(A)-乙腈溶液(B), 梯度洗脱程序:

0~3 min, 2%~9% B; 3~20 min, 9%~15% B; 20~26 min, 15%~16.5% B; 26~30 min, 16.5%~23% B; 30~33 min, 23%~24% B; 33~42 min, 24%~38% B; 42~43 min, 38%~95% B; 43~45

min, 95%~5% B。检测波长 370 nm, 柱温 35 ℃, 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 5 μL。

2.5.2 指纹图谱方法学验证 按照《中国药典》2020 年版一部对中药质量控制方法的规定, 对优化结果进行精密度、重复性、稳定性等方法学验证。以金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、木犀草苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、水仙苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素为对照, 鉴定指纹图谱中共有成分。

2.6 沙棘差异性成分聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)及偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)

2.6.1 HCA 为了初步说明样品与样品间是否存在一定关系, 本研究选用 HCA 进行建模分析。首先对中华、大果沙棘样品进行色谱分析, 再将处理后的峰面积导入 simca-p 14.1 版软件, 最后采用 HCA 方法对各批数据进行分析。

2.6.2 PLS-DA 为了更直观地评价模型对样品的分类能力, 对各样品数据进行降维处理, 将数据导入 simca-p 14.1 版软件, 采用 PLS-DA 方法观察样品差异情况。本研究对中华、大果沙棘样品进行成分鉴定与色谱分析, 将测定后的中华沙棘、大果沙

棘相同的成分的峰面积进行处理, 将处理并分组后的数据采用 PLS-DA 进行分析。

2.7 差异代谢物定量分析

2.7.1 定量 UPLC 色谱条件 采用 4500 型质谱仪进行成分定量, 色谱条件同“2.6.1”项指纹图谱色谱条件。

2.7.2 质谱条件 定量质谱分析采用 ESI 负离子模式进行扫描, 检测模式为多反应检测 (MRM)。离子化参数为离子喷雾电压, 负离子模式-4 500 V; 雾化气和辅助气为氮气; 离子源温度 550 ℃, 雾化气和辅助为 413.7 kPa, 气帘气压力为 241.3 kPa, 离子扫描范围 m/z 100~1 000, 扫描速率: 200 Da/s, 化合物离子对, 优化后的采集参数: 去簇电压 (declustering potential, DP)、碎裂能量 (collision energy, CE) 和碰撞池出口电压 (cell exit potential, CXP) 等信息见表 4。

2.8 统计分析

SPSS 26.0 用于统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据的比较采用独立样本 t 检验。将所得实验结果导入 R 3.6.3 软件, 载入 tidyverse、ggplot2 程序包进行 t 检验和可视化, Adobe illustrator 2021 绘图。

表 4 沙棘中 11 种黄酮类、氨基酸化合物多反应检测参数

Table 4 Multiple reaction parameters of 11 kinds of flavonoids and amino acids in *Hippophae Fructu*

编号	化合物	保留时间/min	母离子	子离子	DP/V	CE/V	CXP/V
1	<i>L</i> -酪氨酸	1.54	180.00	119.10	-70.79	-22.88	-5.97
2	苯丙氨酸	2.88	164.00	103.00	-60.00	-22.00	-6.00
3	水仙苷	27.14	623.20	314.90	-136.09	-40.88	-16.96
4	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	27.91	477.00	314.10	-116.07	-36.33	-5.35
5	槲皮素	33.52	301.00	151.00	-86.79	-28.60	-8.73
6	木犀草素	33.75	285.00	151.00	-101.28	-35.09	-11.54
7	柚皮素	36.87	271.00	119.00	-94.83	-30.79	-8.03
8	山柰酚	38.21	285.00	187.10	-117.13	-39.04	-5.54
9	异鼠李素	39.02	315.00	300.00	-122.86	-29.18	-11.80
10	鼠李素	39.03	315.10	300.00	-103.73	-28.81	-5.20
11	二水槲皮素	44.37	337.10	123.10	-134.35	-36.88	-9.87

3 结果与分析

3.1 总黄酮含量测定结果

按“2.3.3”项下方法绘制标准曲线, 得到线性回归方程为 $Y=12.491 X+0.003 8$ ($r^2=0.999 3$), 线性范围为 0.008 0~0.048 0 mg/mL。按“2.3.3”项下方法对 14 批沙棘样品进行总黄酮含量的测定, 结果见表 5。

3.2 成分表征测定结果

通过 Peakview 2.2 查看采集数据, 以 AB Sciex

表 5 不同产地中华沙棘、大果沙棘总黄酮含量测定结果 ($n=6$)

Table 5 Determination results of total flavonoids of *H. rhamnoides* and *H. rhamnoides* vat. sp from different producing areas ($n=6$)

编号	平均吸光度	总黄酮/%	编号	平均吸光度	总黄酮/%
S1	0.219 0	7.18	S8	0.171 0	5.59
S2	0.132 0	4.27	S9	0.234 0	7.66
S3	0.096 0	3.08	S10	0.087 7	2.80
S4	0.079 9	2.54	S11	0.144 0	4.67
S5	0.277 0	9.11	S12	0.023 3	0.65
S6	0.317 0	10.44	S13	0.033 9	1.00
S7	0.179 0	5.84	S14	0.022 9	0.64

master view 1.1.0.0 中药成分数据库 (TCM library 1.0) 作为中华沙棘和大果沙棘的成分匹配库。通过比对精确质量数、同位素峰度比以及碎片离子裂解规律等信息, 初步鉴定出中华沙棘和大果沙棘中含量差异较大的有 9 个黄酮类成分和 2 个氨基酸成分并对其进行分析, 见表 6, 总离子流图见图 1。

表 6 中华沙棘、大果沙棘中 11 个重要共有成分
Table 6 A total of 11 important common components in *H. rhamnoides* and *H. rhamnoides* vat. sp

峰号	<i>t</i> _R /min	化合物名称	化学式	相对分子质量	母离子(<i>m/z</i>)	碎片离子(<i>m/z</i>)	文献
1	0.84	<i>L</i> -酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.073 9	180	136 ([<i>M</i> -CO ₂ -H] ⁻)	3, 19-23
2	1.23	<i>L</i> -苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.078 9	164	119([<i>M</i> -CHO ₂ -H] ⁻), 103 ([<i>M</i> -CO ₂ NH ₃ -H] ⁻)	
3	9.02	水仙苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.169 0	623	314 ([<i>M</i> -C ₁₂ H ₂₂ O ₉ -H] ⁻), 299 ([<i>M</i> -C ₁₃ H ₂₅ O ₉ -H] ⁻)	22, 24
4	11.62	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478.111 1	477	314 ([<i>M</i> -C ₆ H ₁₁ O ₅ -H] ⁻)	22
5	11.64	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.042 7	301	273 ([<i>M</i> -CO-H] ⁻), 179 ([<i>M</i> -C ₇ H ₆ O ₂ -H] ⁻), 151 ([<i>M</i> -C ₈ H ₆ O ₃ -H] ⁻)	19-20
6	11.83	木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.047 7	285	151 ([<i>M</i> -C ₈ H ₆ O ₂ -H] ⁻), 135 ([<i>M</i> -C ₈ H ₆ O ₃ -H] ⁻)	23
7	12.82	柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.068 5	271	151 ([<i>M</i> -C ₈ H ₈ O-H] ⁻), 119 ([<i>M</i> -C ₇ H ₄ O ₄ -H] ⁻)	3, 21
8	12.95	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.047 7	285	257 ([<i>M</i> -CO-H] ⁻), 228 ([<i>M</i> -C ₂ H ₂ O ₂ -H] ⁻), 183 ([<i>M</i> -C ₃ HO ₄ -H] ⁻)	19-20
9	13.32	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.058 3	315	300 ([<i>M</i> -CH ₃ -H] ⁻), 283 ([<i>M</i> -CH ₄ O-H] ⁻), 151 ([<i>M</i> -C ₉ H ₈ O ₃ -H] ⁻)	
10	13.33	鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.058 3	315	300 ([<i>M</i> -CH ₃ -H] ⁻), 165 ([<i>M</i> -C ₈ H ₆ O ₃ -H] ⁻)	对照品比对
11	22.76	二水槲皮素	C ₁₅ H ₁₄ O ₉	338.063 8	337	123 ([<i>M</i> -C ₉ H ₁₀ O ₆ -H] ⁻)	

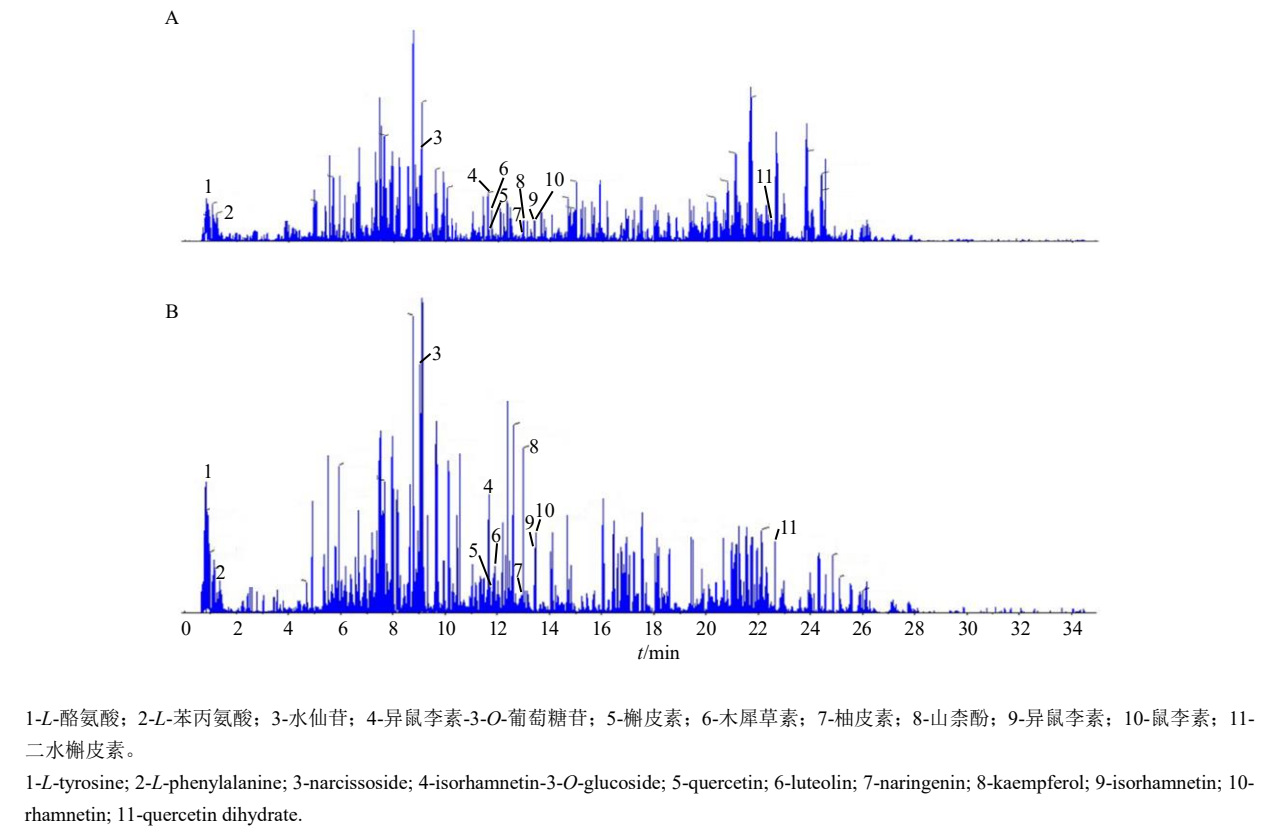


图 1 中华沙棘 (A) 和大果沙棘 (B) 化学成分表征的 UPLC-MS/MS 总离子流图
Fig. 1 UPLC-MS/MS total ion flow maps of characterization of chemical constituents of *H. rhamnoides* (A) and *H. rhamnoides* vat. sp (B)

3.3 PB-CCD 实验设计结果

3.3.1 液相色谱优化因子选择 由于甲醇和分析物间氢键的相互作用, 可能引入额外的共振结构并可能引起拖尾峰, 因此, 选择乙腈作为有机相。另外,

色谱柱温度也是影响极性化合物保留时间的重要参数, 一般温度升高, 扩散系数也升高, 这样会导致更窄的峰和更高的分离效率。为了增加色谱柱使用寿命, 将柱温优化范围设置为 25~35 ℃。

3.3.2 PB 试验设计 为了在最少试验次数下获得最佳的参数设置,选择因子设计中的 PB 法作为筛选设计方法,以 CCD 响应曲面法对优化后的因素进行进一步优化,以 $\sum R_s$ 、 r^* 、 Φ 、 $HCRF$ 评价样品的分离效能,见公式 (1)~(3)。结果见表 7。

$$r^* = \prod_{i=0}^{n-1} \left(\frac{R_{s,i+1}}{R_s} \right) \quad (1)$$

$$\Phi = \sum_{i=0}^n (\log_2 A_i + 0.5 \times \log_2 R_i + 0.25 \times \log_2 n_i) \quad (2)$$

$$HCRF = 1\,000\,000\,n + 10\,000\,R_{\min} + (t_m - t_1) \quad (3)$$

R 表示 2 峰间分离度; n 为理论塔板数; $R_{\min}$ 为最小分离度; $t_m - t_1$ 为最大与最小保留时间差; A 为色谱峰面积。 $\sum R_s$ 、 r^* 是用于评价色谱分离质量的参数; Φ 值指色谱信息量值,是用于评价色谱交互信息的参数; $HCRF$ 为分层色谱响应值,用于评价方法中分离峰个数、分离度和分析时间性能

表 7 PB 响应因子结果

Table 7 PB response factor results

样本	$\sum R_s$	r^*	Φ	$HCRF$
1	161.97	2.73×10^{-11}	646.29	6.21×10^7
2	166.18	7.44×10^{-9}	1 216.78	1.18×10^8
3	137.77	5.11×10^{-8}	1 028.58	9.10×10^7
4	223.82	1.34×10^{-13}	469.27	4.51×10^7
5	86.53	7.94×10^{-6}	550.16	5.20×10^7
6	173.48	1.10×10^{-12}	973.44	8.00×10^7
7	124.58	7.57×10^{-14}	397.43	4.20×10^7
8	103.00	3.71×10^{-5}	644.70	6.10×10^7
9	186.58	1.00×10^{-14}	382.05	3.91×10^7
10	75.55	1.17×10^{-4}	748.54	6.00×10^7
11	138.91	1.61×10^{-9}	430.13	4.21×10^7
12	114.02	6.08×10^{-6}	512.13	4.51×10^7

PB 试验的 ANOVA 结果显示, Φ 和 $HCRF$ 项的 P 值分别为 0.030 9 和 0.039 2, 均小于 0.05, 说明各变量与 $HCRF$ 回归方程的关系显著。拟合系数 (R-Squared) 分别为 0.970 9 和 0.965 7, 说明模型拟合度好。

根据各影响因子对各响应因子的最大值运算结果, 将影响不显著的影响因子进行最大值预测并作为固定条件: 检测波长为 370 nm, 柱温为 35 °C, 体积流量为 0.3 mL/min; 甲酸浓度为 0.1% 进样量为 5 μ L, 色谱柱类型为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m)。

3.3.3 CCD 试验设计 在 PB 设计结果的基础上,

通过对 Φ 和 $HCRF$ 影响显著的因子检测波长、进样体积和流速进行寻优。试验采用通用旋转组合设计 (Rotatable=6), 以 Φ 和 $HCRF$ 作为响应因子进行 3 水平 CCD 试验 (表 8)。根据试验结果, 找到 Φ 和 $HCRF$ 最大值。

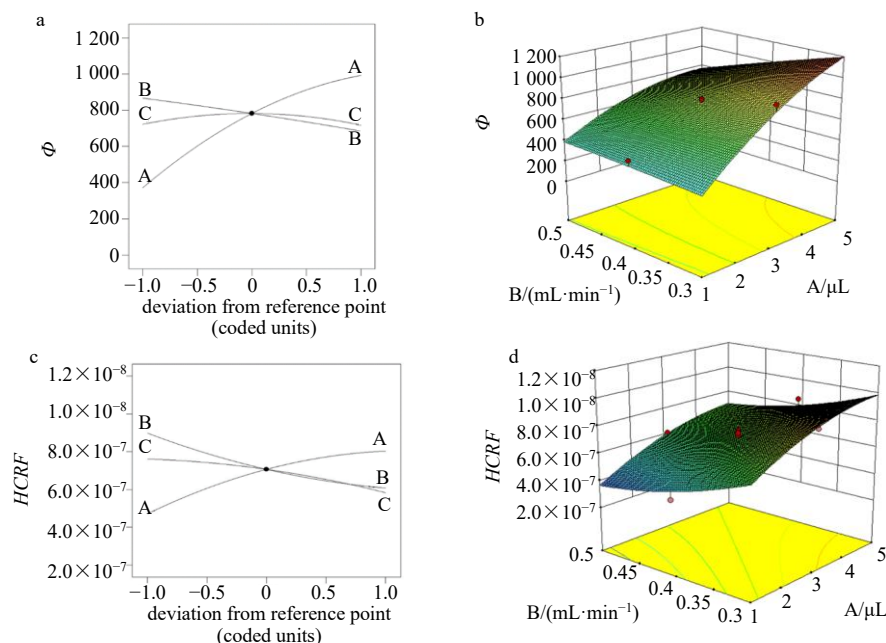
从 Φ 和 $HCRF$ 项的 ANOVA 表中变量显著性 P 值的大小可以确定对 Φ 和 $HCRF$ 的影响大小, 对 Φ 影响显著的因素为进样体积 ($P=0.004\,8$)、体积流量 ($P=0.042\,3$) 和色谱柱类型 ($P=0.030\,5$); 对 $HCRF$ 影响显著的因素为进样体积 ($P=0.007\,6$)、乙腈初始比例 ($P=0.048\,3$) 和色谱柱类型 ($P=0.037\,6$)。从 Φ 和 $HCRF$ 主效应图 (图 2-a、c) 可以看出, 3 因素交互作用显著, 进样体积 (因素 A) 越大, 图谱 Φ 和 $HCRF$ 越高; 体积流量 (因素 B) 越大, 图谱 Φ 和 $HCRF$ 越低。

根据该筛选的结果, 在设计水平范围内对响应因子做最大值计算。因此, 根据评价结果, 得到最后的优化参数, 用 3 次重复试验来验证因子分析结果, 得到初步的色谱分析条件为: 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 检测波长 370 nm, 柱温 35 °C, 梯度时间 45 min,

表 8 CCD 响应因子结果

Table 8 CCD response factor results

样本	A/ μ L	B/(mL $\cdot$ min ⁻¹)	C/%	Φ	$HCRF$
1	5	0.3	10	1 056.92	8.80×10^7
2	3	0.4	6	721.77	6.50×10^7
3	5	0.3	2	1 193.61	1.01×10^8
4	3	0.4	6	776.78	7.11×10^7
5	3	0.4	6	751.87	6.80×10^7
6	3	0.3	6	929.77	8.82×10^7
7	3	0.5	6	641.15	6.11×10^7
8	1	0.5	10	306.39	3.20×10^7
9	3	0.4	2	803.73	7.41×10^7
10	3	0.4	6	805.62	7.51×10^7
11	1	0.5	2	351.97	3.71×10^7
12	5	0.5	10	656.02	5.80×10^7
13	5	0.5	2	815.68	7.40×10^7
14	5	0.4	6	964.26	8.51×10^7
15	1	0.3	10	484.74	4.51×10^7
16	3	0.4	10	655.60	5.90×10^7
17	1	0.3	2	912.32	8.51×10^7
18	3	0.4	6	793.66	7.31×10^7
19	3	0.4	6	806.60	7.40×10^7
20	1	0.4	6	418.86	4.11×10^7



a- Φ 分离效果影响因素主效应图; b- Φ 响应曲面分析图; c-HCRF 分离效果影响因素主效应图; d-HCRF 响应曲面分析图 (A-进样体积, B-体积流量, C-乙腈初始比例)。

a-Main effect diagram of influencing factors of Φ separation effect; b- Φ response surface analysis diagram; c-Main effect diagram of influencing factors of HCRF separation effect; d-HCRF response surface analysis diagram. (A-Injection volume, B-Flow rate, C-Initial ratio of acetonitrile).

图 2 分离效果影响因素主效应及响应曲面分析图

Fig. 2 Main effect diagrams of influencing factors of separation effect and response surface analysis diagrams

进样体积 5 μL , 体积流量 0.3 mL/min, 乙腈初始比例 2%, 甲酸浓度 0.1%。

3.4 指纹图谱结果

3.4.1 精密度试验 取同一产地沙棘供试品溶液, 按“2.6.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录 370 nm 波长下色谱图。对 10 个共有峰以均值法进行差异性评价, 结果表明 10 个共有峰相对保留时间 RSD 为 0.006%~0.061%, 皆小于 1.5%。共有峰相对峰面积 RSD 为 0.232%~2.701%, 皆小于 3%。精密考察结果符合指纹图谱的要求。

3.4.2 稳定性试验 取同一产地沙棘供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、9、12、15、18、24 h 按“2.6.1”项下色谱条件进样, 记录 370 nm 色谱图。共有峰以均值法进行评价, 结果表明各共有峰相对保留时间 RSD 为 0.015%~0.134%, 皆小于 1.5%。各共有峰相对峰面积 RSD 为 0.325%~2.789%, 皆小于 3%, 证明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.4.3 重复性试验 取同一产地沙棘供试品 6 份, 分别制备供试品溶液, 按“2.6.1”项下色谱条件进样, 记录 370 nm 下色谱图。对其共有峰分别进行差异性评价, 结果表明, 各主要成分共有峰相对保留时间 RSD 为 0.007%~0.103%, 皆小于 1.5%。共有

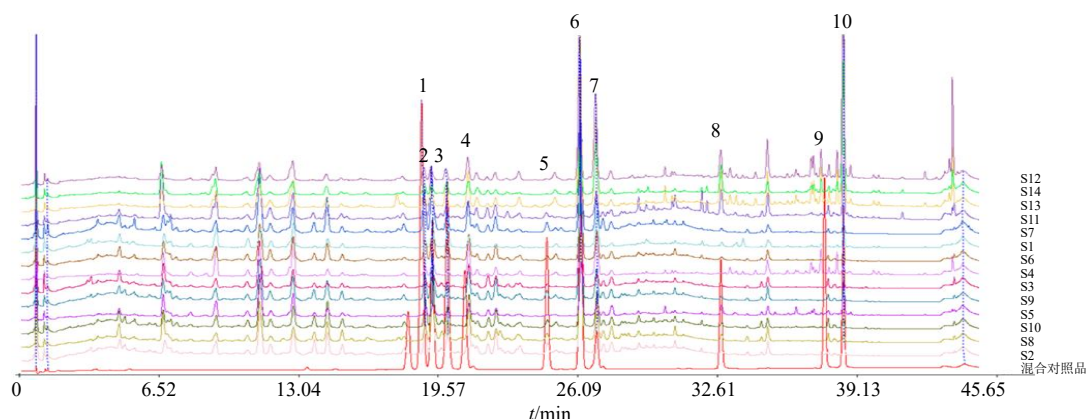
峰相对峰面积 RSD 为 0.104%~2.877%, 皆小于 3%, 重复性考察结果符合指纹图谱的要求。

3.4.4 沙棘共有峰鉴定 取 14 批沙棘及对照混标, 按“2.1”项下方法分别制备供试品溶液, 进样, 记录色谱图。通过与混合对照品图谱比较, 确定 10 个共有峰, 分别为金丝桃苷、芦丁、异槲皮苷、木犀草苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、水仙苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素, 各批次样品叠加图与对照图谱见图 3。

3.5 沙棘差异性成分 HCA 及 PLS-DA 结果

3.5.1 聚类分析 得到树状图结果见图 4-A。结果表明, 沙棘样品主要分为 2 类, 中华沙棘样品归为一类, 大果沙棘样品聚为一类。说明中华沙棘和大果沙棘的样品在成分上存在一定的差异。

3.5.2 PLS-DA 结果得到前 2 个主成分的贡献度为 93.1%, 包含差异信息最多, 模型拟合度为 90.0%, 模型拟合度良好, 故选取前 2 个主成分进行模型预测, 反映出不同种属间样品的基本特征。以 2 个主成分建立投影, 得到散点图 (图 4-B)。由图可以看出所有中华沙棘样品分为一类, 所有大果沙棘样品分为另一类, 这一结果与聚类分析 (图 4-A) 结果一致。说明中华沙棘、大果沙棘在成分上有明显的



1-金丝桃苷; 2-芦丁; 3-异槲皮苷; 4-木犀草苷; 5-山柰酚-3-*O*-芸香糖苷; 6-水仙苷; 7-异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷; 8-槲皮素; 9-山柰酚; 10-异鼠李素。

1-hyperoside; 2-rutin; 3-isoquercitrin; 4-luteoloside; 5-kaempferol-3-*O*-rutinoside; 6-narcissoside; 7-isorhamnetin-3-*O*-glucoside; 8-quercetin; 9-kaempferol; 10-isorhamnetin.

图 3 各批次沙棘和混合对照品溶液指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of each batch of *Hippophae Fructus* and mixed control solution

差异。利用 VIP (variable importance in projection) 值 (VIP>1) 与 MetaboAnalyst 分析平台 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 将处理后的数据进行差异初生代谢物的筛选与 KEGG 通路富集分析, 通过 VIP 值筛选到 19 个差异代谢物, KEGG 通路富集分析得到 14 条代谢途径 (图 4-D)。结果得到 2 个重要的差异代谢物 *L*-苯丙氨酸与 *L*-酪氨酸与 3 个重要代谢途径: 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成代谢、苯丙氨酸代谢与酪氨酸代谢。

3.6 差异代谢物定量分析结果

根据 PLS-DA 分析中得到的差异代谢物信息, 对已鉴定得到的重要差异初生代谢物及其次生代谢物进行定量方法学考察。

3.6.1 标准曲线、定量限和检测限试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品储备液, 配制为不同体积的对照品储备液, 按照优化的液质条件进行测定。将对照品储备液按梯度体积稀释, 精密吸取 11 个稀释成不同质量浓度梯度的混合对照品溶液, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以标准溶液中化合物质量浓度横坐标 (*X*), 峰面积为纵坐标 (*Y*), 绘制标准曲线, 计算各成分的回归方程和线性范围。中华沙棘、大果沙棘中 11 个不同化合物的线性范围为 0.003 6~30.00 μg/mL, 且相关系数均大于 0.999, 表明各对照品线性关系良好。各种化合物的线性方程、相关系数、线性范围及方法定量限、检测限见表 9。

3.6.2 精密度试验 取同一产地中华沙棘的供试品溶液, 按“2.8.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测

得异鼠李素、山柰酚、槲皮素、金丝桃苷、芦丁、*L*-酪氨酸、*L*-苯丙氨酸等 11 个成分各色谱峰的峰面积, 计算中华沙棘中 11 种化合物峰面积的 RSD 在 1.12%~3.99%, 表明仪器精密度良好。

3.6.3 稳定性试验 取同一产地中华沙棘的供试品溶液, 按“2.8.1”项下色谱条件分别于制备后 0、2、4、6、10、14、20、24 h 进样, 测得异鼠李素、山柰酚、槲皮素、金丝桃苷、芦丁、*L*-酪氨酸、*L*-苯丙氨酸等 11 个成分各色谱峰面积, 计算中华沙棘中 11 种化合物峰面积的 RSD 在 1.42%~4.87%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.6.4 重复性试验 取同一产地中华沙棘药材粉末 6 份, 按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按“2.8.1”项下色谱条件, 进样, 测得异鼠李素、山柰酚、槲皮素、金丝桃苷、芦丁、*L*-酪氨酸、*L*-苯丙氨酸等 11 个成分各色谱峰面积, 计算中华沙棘中 11 种化合物质量分数的 RSD 在 2.27%~4.82%, 表明此方法重复性良好。

3.6.5 加样回收率试验 精密称取同一产地中华沙棘的供试品各约 1.5 g, 共 6 份, 置于 150 mL 锥形瓶中, 分别精密加入与中华沙棘样品含量等同量的混合对照品溶液 (异鼠李素、山柰酚、槲皮素、*L*-酪氨酸、*L*-苯丙氨酸等 11 个成分), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.8.1”项色谱条件下进样, 计算加样回收率。各成分含量、加入量以及最后得到的平均加样回收率和 RSD 的结果, 异鼠李素、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚、槲皮素、

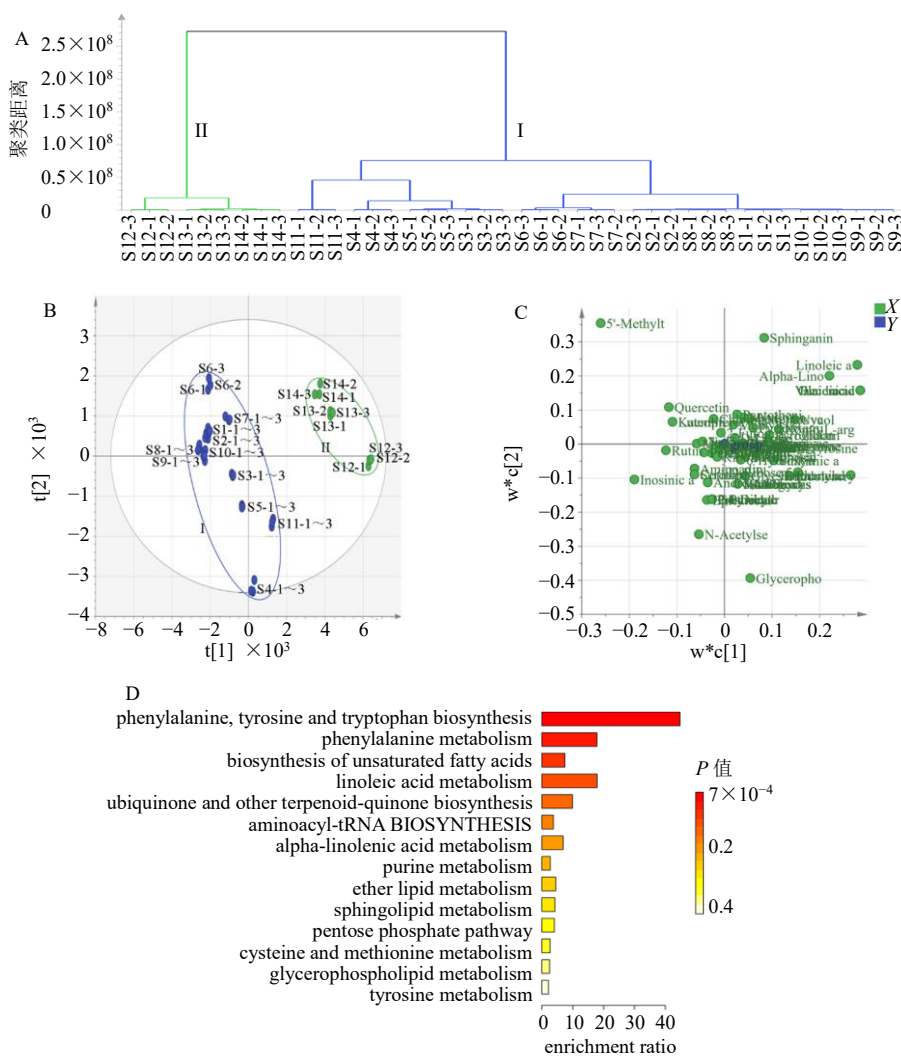


图 4 中华沙棘、大果沙棘 PLS-DA、聚类与 KEGG 结果 (A、B 图中 I 代表中华沙棘; II 代表大果沙棘)。A-HCA cluster plot; B-PLS-DA scatter plot; C-Loading plot; D-KEGG pathway enrichment bar chart of 19 differential metabolites; (In A and B, I represents *H. rhamnoides* L.; II represents *H. rhamnoides* vat. sp.)

图 4 中华沙棘、大果沙棘 PLS-DA、聚类与 KEGG 结果

Fig. 4 PLS-DA, cluster analysis and KEGG results of *H. rhamnoides* and *H. rhamnoides* vat. sp

表 9 11 种黄酮类、氨基酸化合物同时测定方法线性方程, 线性范围、定量限和检测限结果

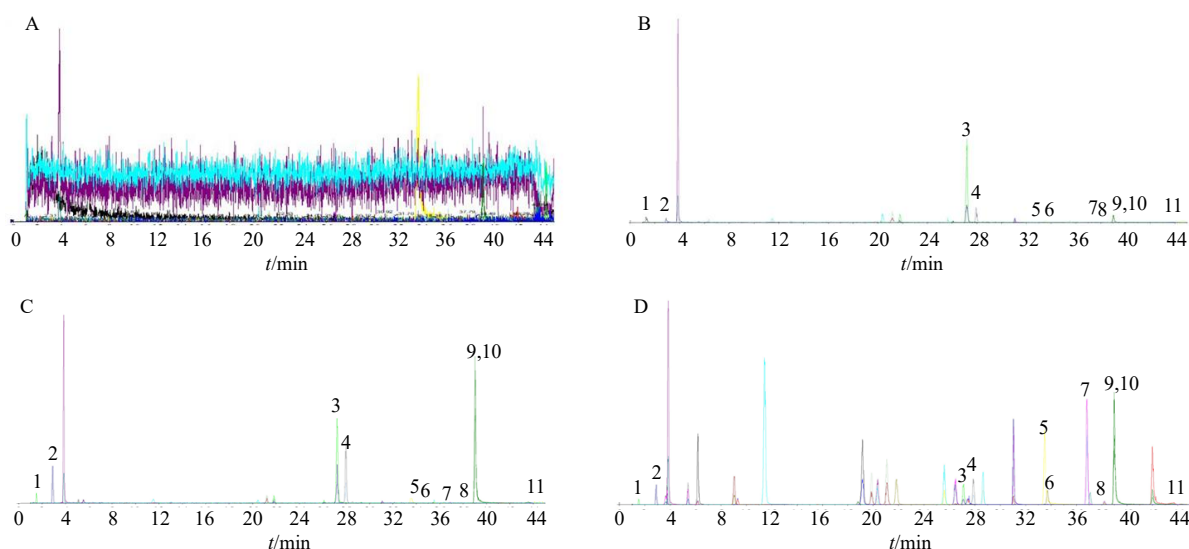
Table 9 Linear equation, linear range, quantitative limit and detection limit results of simultaneous determination methods for 11 flavonoids and amino acids

化合物	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)
槲皮素	$Y=4.60 \times 10^{11} X + 1.31 \times 10^8$	0.999 1	0.07~0.40	0.99×10^{-3}	1.24×10^{-4}
<i>L</i> -酪氨酸	$Y=4.72 \times 10^8 X - 18\ 958.71$	0.999 0	0.05~0.24	1.03×10^{-3}	5.42×10^{-5}
<i>L</i> -苯丙氨酸	$Y=6.86 \times 10^8 X + 25\ 700.82$	0.999 8	0.44~2.60	0.98×10^{-3}	0.70×10^{-4}
异鼠李素	$Y=1.64 \times 10^{10} X + 2.05 \times 10^6$	0.999 1	0.37~1.76	1.20×10^{-4}	1.20×10^{-5}
异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1.61 \times 10^9 X + 557\ 005.55$	0.999 0	1.68~10.00	500.00	0.50
山柰酚	$Y=9.91 \times 10^9 X + 15\ 877.67$	0.999 2	0.02~0.13	0.07	0.70×10^{-3}
木犀草素	$Y=3.69 \times 10^{10} X + 31\ 785.93$	0.999 4	0.003 36~0.02	1.00	1.00×10^{-3}
柚皮素	$Y=5.21 \times 10^6 X - 1\ 344.97$	0.999 2	5.37~25.60	6.50×10^{-3}	6.50×10^{-4}
水仙苷	$Y=1.91 \times 10^9 X + 2.57 \times 10^7$	0.999 2	6.29~30.00	5.50×10^{-3}	5.50×10^{-4}
鼠李素	$Y=2.09 \times 10^9 X + 230\ 156.52$	0.999 3	0.20~0.74	0.55×10^{-4}	5.50×10^{-6}
二水槲皮素	$Y=1.54 \times 10^6 X + 47\ 464.60$	0.999 3	3.86~23.00	1.00×10^{-4}	1.00×10^{-5}

L-酪氨酸、*L*-苯丙氨酸、柚皮素、水仙苷、鼠李素、二水槲皮素、木犀草素平均加样回收率分别为 95.32%、103.30%、95.46%、99.28%、95.26%、101.22%、104.61%、101.41%、98.86%、102.62%、96.48%；RSD 分别为 3.42%、3.67%、1.37%、2.07%、0.87%、2.10%、0.72%、2.75%、1.31%、2.84%、3.12%。

3.6.6 差异成分含量测定 为了更准确地应用定

性数据，针对 PLS-DA 中得到的差异代谢物信息，将已鉴定得到的差异初生代谢物及其次生代谢物进行定量分析，以精确研究中华沙棘与大果沙棘成分的差异性，按“2.8.1”项下的色谱条件和“2.8.2”项下的质谱条件，采用 MRM 模式进行定量分析(表 4)，标准化合物、样品、空白溶液 MRM 提取离子流图见图 5，结果见图 6。



1-*L*-酪氨酸；2-*L*-苯丙氨酸；3-水仙苷；4-异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷；5-槲皮素；6-木犀草素；7-柚皮素；8-山柰酚；9-异鼠李素；10-鼠李素；11-二水槲皮素。
1-*L*-tyrosine；2-*L*-phenylalanine；3-narcissoside；4-isorhamnetin-3-*O*-glucoside；5-quercetin；6-luteolin；7-naringenin；8-kaempferol；9-isorhamnetin；10-rhamnetin；11-quercetin dihydrate.

图 5 空白 (A)、中华沙棘样品 (B)、大果沙棘样品 (C) 和 11 种对照品 (D) 负离子模式 MRM 提取离子图

Fig. 5 Blank (A), *H. rhamnoides* (B), *H. rhamnoides* vat. sp (C), and 11 standards (D) MRM extracted ion chromatograms under negative ion mode

4 讨论

4.1 沙棘中黄酮类成分的生物合成途径分析及验证

根据“3.2”项成分表征得到含量差异较大的 9 个黄酮类成分和 2 个氨基酸成分，分别为异鼠李素、山柰酚、槲皮素、*L*-酪氨酸、*L*-苯丙氨酸等。黄酮类成分的合成主要以 *L*-苯丙氨酸和 *L*-酪氨酸为前体物质，通过不同的分支合成途径合成黄酮类成分^[25]，见图 7，通过对中华沙棘和大果沙棘的代谢产物分析，发现 2 个沙棘中的 *L*-苯丙氨酸和 *L*-酪氨酸的含量有区别，大果沙棘中的 2 种代谢物的含量大于中华沙棘，通过含量测定得到了大果沙棘中 9 种黄酮类成分和 2 种氨基酸的含量要大于中华沙棘，也进一步验证了不同种属的沙棘，其黄酮类成分的含量有明显的不同。

4.2 中华沙棘、大果沙棘中总黄酮含量分析

总黄酮含量显示，中华沙棘中总黄酮含量要大于大果沙棘中总黄酮含量。成分表征结果初步得到

沙棘中 26 个黄酮类成分，其中含量差异较大的黄酮类成分有 9 个，其在大果沙棘中含量较高，其余已确定的黄酮类化合物含量均是中华沙棘大于大果沙棘。

分析原因一可能是总黄酮含量显示在中华沙棘中较高，而实验中所测得在大果沙棘中含量较高、差异较大的 9 个黄酮类成分，是为研究不同种类沙棘差异显著的化学成分及其变化规律，其并不能代表大果沙棘中总黄酮含量，由于表征出的黄酮类成分较少，所以 2 个种类之间更多的差异成分还有待深究；原因二可能与黄酮类成分的生物合成途径有关，大量实验证实，植物黄酮类生物合成的前期途径是相同的，都是以丙二酸单酰 CoA 与香豆酰 CoA (coumaroyl-CoA) 为直接前体^[26]，其分别与糖代谢、脂质代谢以及氨基酸代谢有关。本研究实验以氨基酸代谢为主要代谢途径，由于 KEGG 结果表明苯丙氨酸代谢途径较为显著，所以实验中所测得在大果

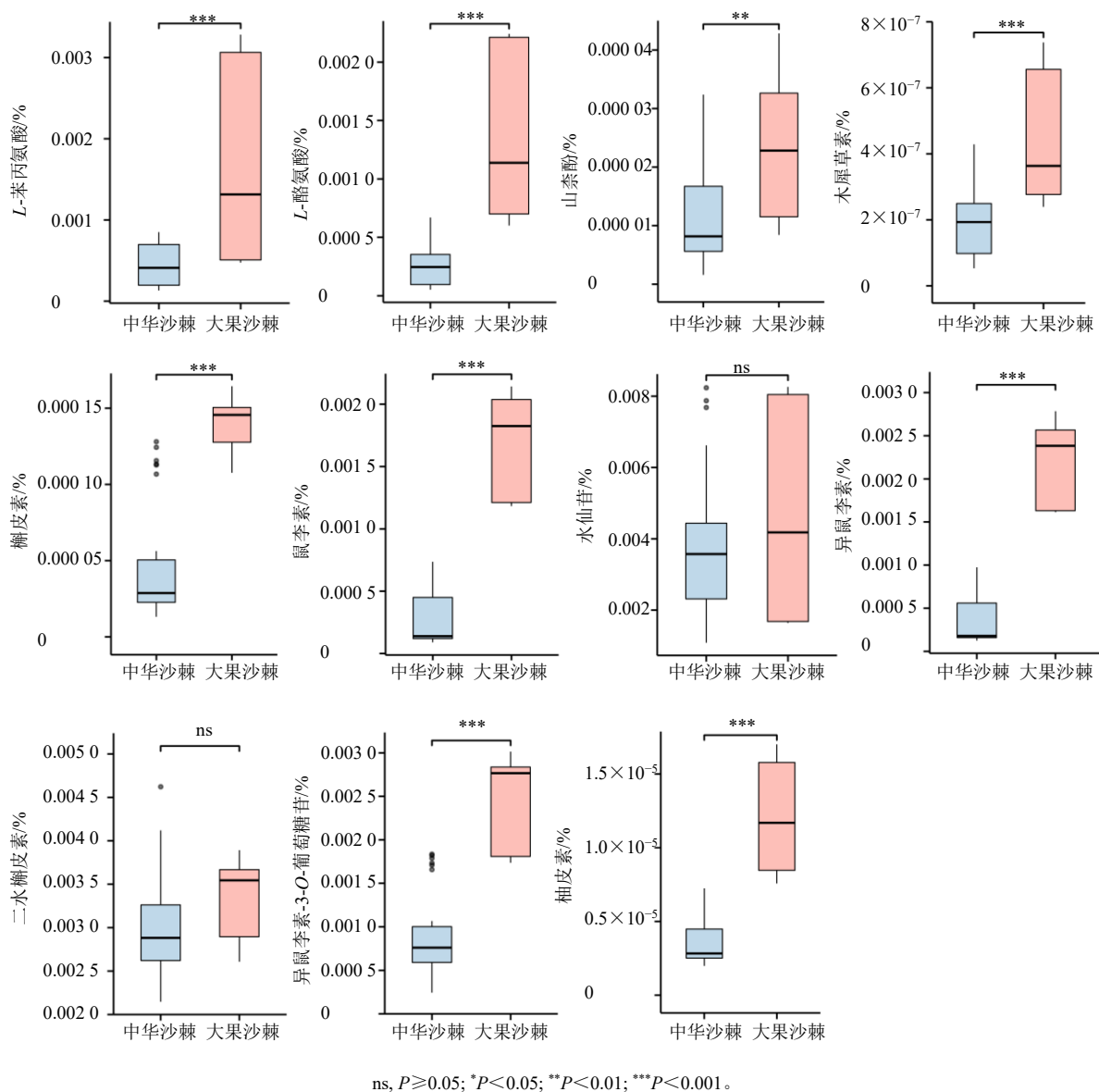


图 6 中华沙棘、大果沙棘中 11 种黄酮类、氨基酸化合物含量测定结果

Fig. 6 Determination results of 11 flavonoids and amino acids in the *H. rhamnoides* and *H. rhamnoides* vat. sp

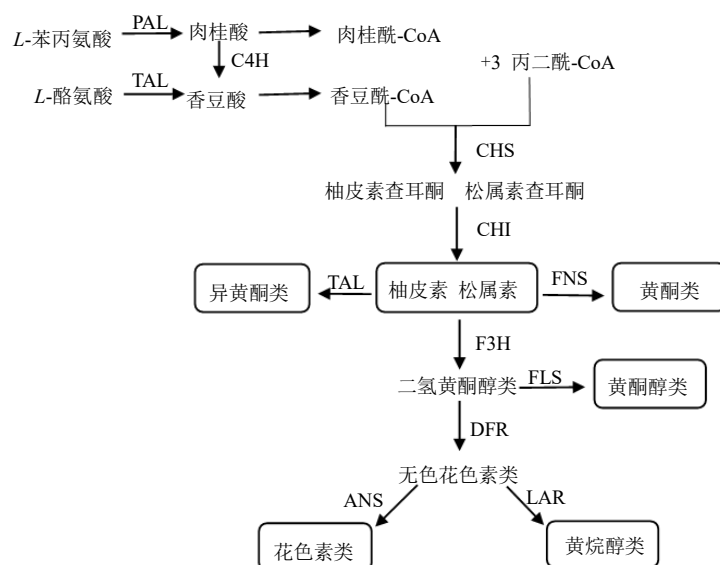
沙棘中含量较高、差异较大的 9 个黄酮类成分可能通过苯丙氨酸代谢途径进行合成。有研究表明, 苯丙氨酸代谢途径还涉及常被认为是黄酮类化合物生物合成途径限速酶之一的 C4H^[27], 所以可能导致大果沙棘中总黄酮含量较中华沙棘低, 而实验中所测得的 9 个黄酮类成分含量较高。

4.3 中华沙棘、大果沙棘在功效上的评价

由于沙棘许多药用功效都是通过黄酮类化合物发挥作用来实现的, 其含有的黄酮糖苷、苷元等一些生物活性成分比较丰富, 国内大果沙棘的研究多以种植和杂交为主, 其常用于食品、化妆品和医疗保健品方面^[7]; 而中华沙棘多作为药用, 以两者中

总黄酮含量结果来看, 中华沙棘在功效上可能强于大果沙棘。

综上所述, 不同品种沙棘的黄酮类成分在含量上是有差异的, 首先其总黄酮含量在中华沙棘中含量较高, 说明中华沙棘在药用功效上可能强于大果沙棘; 其次异鼠李素测定结果在大果沙棘中含量较高, 说明其对临床的质控和应用可能不太适用。实验结果表明可以通过植物代谢组学研究不同品种植物的小分子代谢产物, 对其生物合成途径进行分析, 并通过定性、定量分析找其初生及次生代谢产物的代谢变化的规律, 从而对植物进行更加合理的分类, 以上研究方法和结果可以为不同品种沙棘药性、药



PAL-苯丙氨酸解氨酶; TAL-酪氨酸解氨酶; C4H-肉桂酸 4-羟化酶; CHS-查耳酮合成酶; CHI-查耳酮异构酶; FNS-黄酮合酶; F3H-黄酮-3-羟化酶; FLS-黄酮醇合酶; DFR-二氢黄酮醇-4-还原酶; ANS-花色素合成酶; LAR-无色花色素还原酶。

PAL-phenylalanine ammonia lyase; TAL-tyrosine ammonia lyase; C4H-cinnamate 4-hydroxylase; CHS-chalcone synthase; CHI-chalcone isomerase; FNS-flavone synthase; F3H-flavanone 3-hydroxylase; FLS-flavanol synthase; DFR-dihydroflavonol-4-reductase; ANS-anthocyanidin synthase; LAR-leucoanthocyanin reductase.

图 7 黄酮类化合物合成途径

Fig. 7 Synthetic pathway of flavonoids

效差异的物质基础提供依据, 并对其成分分析、质量评价的研究提供技术支持和科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 191-192.
- [2] Zhang D, Wu G D, Hao H M, *et al.* Effect of total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* L. on the activity and mRNA expression of CYP450 in rats [J]. *Phcog Mag*, 2022, 18(77): 82.
- [3] 杨志刚, 郑文惠, 张凯雪, 等. 沙棘叶中鞣质类成分及其抗炎和抗肥胖活性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2809-2816.
- [4] 李娜, 王佳乐, 刘建国, 等. 沙棘营养成分及药理活性研究现状 [J]. *中国果菜*, 2020, 40(5): 20-25.
- [5] 郝娟. 沙棘果实和叶片中黄酮类物质测定方法研究进展 [J]. *食品安全导刊*, 2021(18): 81-83.
- [6] 劳斐, 李杰, 王翻红. 阿勒泰地区大果沙棘营养成分研究 [J]. *食品安全导刊*, 2021(21): 122-123.
- [7] 张国琳, 张锋伦, 胡星麟, 等. 大果沙棘功能性成分测定 [J]. *中国野生植物资源*, 2013, 32(6): 31-34.
- [8] 胡建忠. 引进俄罗斯第三代沙棘无性系果实黄酮类化合物研究 [J]. *食品与营养科学*, 2022(1): 11-20.
- [9] 唐克. 沙棘有性杂交育种研究 [J]. *黑龙江农业科学*, 2021(5): 5-7.
- [10] 王纯华. 大兴安岭林区俄罗斯大果沙棘苗木培育技术 [J]. *现代农业科技*, 2020(8): 158.
- [11] 王梓贞. 俄罗斯大果沙棘林地丰产栽培技术 [J]. *果树实用技术与信息*, 2019(12): 10-11.
- [12] 唐克. 沙棘不同部位总黄酮含量比较 [J]. *黑龙江农业科学*, 2022(3): 64-67.
- [13] 安雄韬. 不同品种大果沙棘果实品质研究 [J]. *绿色科技*, 2021, 23(3): 78-80.
- [14] 付依依, 苑鹏, 夏凯, 等. 沙棘的功效成分及生物学功效评价研究进展 [J]. *现代食品*, 2021(7): 39-42.
- [15] 高韵, 司雨柔, 王元媛, 等. 不同产地、不同种属黄精的红外光谱鉴别研究 [J]. *化学试剂*, 2020, 42(3): 275-279.
- [16] 李国卫, 索彩仙, 吴文平, 等. 基于多元统计分析的不同诃子属药材多指标成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(1): 23-33.
- [17] 刘祥东, 罗国安, 王义明. 代谢组学应用的领域之二: 植物代谢组学 [J]. *中成药*, 2006, 28(10): 1515-1517.
- [18] 刘妍如, 吕杨, 宋忠兴, 等. 基于 PB-CCD 设计的固肠止泻丸 HPLC-DAD 指纹图谱研究 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17(6): 590-595.
- [19] 宁志雪, 牛广财, 朱立斌, 等. 沙棘活性成分、生理功

- 能及开发利用研究进展 [J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 221-227.
- [20] 李倩茹, 李生茂, 黄婷, 等. 沙棘清除 DPPH 自由基动力学特性研究及活性成分筛选 [J]. 食品科技, 2021, 46(1): 225-231.
- [21] 周浩楠, 胡娜, 董琦, 等. 沙棘化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2020, 35(2): 211-217.
- [22] 郑文惠, 白海英, 王丽瑶, 等. UPLC-QTOF-MS 法分析沙棘果实、叶和枝的成分 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 2940-2947.
- [23] 蔡爽, 阮成江, 杜维, 等. 沙棘叶片、果肉和种子中黄酮类成分的差异 [J]. 植物资源与环境学报, 2019, 28(4): 58-67.
- [24] 孙燕, 冯峰, 黄特辉, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive 技术结合 OTCML 数据库快速分析沙棘的功效成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(7): 1192-1202.
- [25] 邹丽秋, 王彩霞, 匡雪君, 等. 黄酮类化合物合成途径及合成生物学研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4124-4128.
- [26] Schijlen E G W M, Ric de Vos C H, van Tunen A J, *et al.* Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(19): 2631-2648.
- [27] Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 355-366.

[责任编辑 时圣明]