

# 不同生长年限粉沙参游离氨基酸和核苷类成分分析

柳玲玲, 陈建伟\* (南京中医药大学, 南京 210023)

**摘要:** **目的** 探讨野生粉沙参中氨基酸和核苷类成分的含量与其生长年限的关系。**方法** 采用超快速液相色谱和三重四级杆-线性离子阱串联质谱(UFLC-QTRAP-MS/MS), 对6个不同生长年限粉沙参及其明党参根皮中的氨基酸类和核苷类成分进行含量测定, 并采用主成分分析(PCA)与聚类分析(HCA)对其不同生长年限的差异性及其代表性成分进行了分析。色谱柱为氨基柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-0.2%甲酸水(梯度洗脱), 流速为0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为30 °C; 质谱检测采用电喷雾正离子(ESI<sup>+</sup>)及多反应监测(MRM)模式。**结果** 野生粉沙参中含量最高的是具有化痰止咳功效的天门冬酰胺, 其2~3年生者含量高达2.97%, 且>3年生各生长年限粉沙参中含量均恒定在同一水平[(1.77±0.048)%]; 不同生长年限粉沙参差异代表性成分为2~3年生为天门冬酰胺, 4~5年生和9~15年生均为丙氨酸和鸟苷, 6~8年生为鸟苷和腺苷, 16~18年生为缬氨酸和精氨酸, 19~20年生为甲硫氨酸和天冬氨酸。明党参根皮中氨基酸和核苷类成分含量则随生长年限增加而下降。**结论** 天门冬酰胺为粉沙参主要功效成分之一; 依据差异代表性氨基酸和核苷可以大致判别粉沙参的生长年限; 明党参根皮含有粉沙参同样的氨基酸和核苷类成分, 具有开发利用的价值。

**关键词:** 粉沙参; 明党参根皮; 氨基酸; 核苷类; 生长年限; 液质联用; 主成分分析; 聚类分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)10-1187-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.10.007

引用本文: 柳玲玲, 陈建伟. 不同生长年限粉沙参游离氨基酸和核苷类成分分析[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(10): 1187-1195.

## Analysis of Free Amino Acids and Nucleosides in Different Growth Years of Changii Radix

LIU Lingling, CHEN Jianwei\* (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the relationship between the amino acid and nucleoside contents in Changii Radix with their growth years. **METHODS** Ultra-fast liquid chromatography and triple quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry(UFLC-QTRAP-MS/MS) was used to determine the contents of amino acids and nucleosides in Changii Radix and the root barks of *Changium smyrnioides* with six different growth years, then principal component analysis(PCA) and hierarchical cluster analysis(HCA) were used to analyze the differences of these contents in different growth years and their representative components. The amino column(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) and the mobile phase with acetonitrile-0.2% formic acid were used for gradient elution. The flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup> while the column temperature was 30 °C. Mass spectrometry was performed by positive electrospray ionization(ESI<sup>+</sup>) and multiple reaction monitoring(MRM) modes. **RESULTS** The highest content in Changii Radix was asparagine which had been proved to reduce phlegm and relieve cough, and this content in Changii Radix aged 2-3 was as the highest(2.97%), while that of samples aged above 3 was at the same level [(1.77±0.048)%]. The representative components in different growth years of Changii Radix were: asparaginase in 2-3 years, alanine and guanosine in 4-5 years and 9-15 years, guanosine and adenosine in 6-8 years, proline and arginine in 16-18 years, and finally methionine and aspartic acid in 19-20 years. The content of amino acids and nucleosides in the root barks of *Changium smyrnioides* decreased with increasing growth years. **CONCLUSION** Asparagine is one of the main functional ingredients in Changii Radix; based on the difference of representative amino acids and nucleosides, the growth period of Changii Radix can be roughly determined; the root barks of *Changium smyrnioides* contain the same amino acids and nucleosides as Changii Radix, which means the root barks can be exploited rather than discarded.

**KEYWORDS:** Changii Radix; root barks of *Changium smyrnioides* Wolff; amino acids; nucleosides; growth years; liquid chromatography-mass spectrometry; principal component analysis; hierarchical cluster analysis

基金项目: 国家药典委员会研究项目(YZ-124); 中医药行业科研专项项目(201407002); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2014)

作者简介: 柳玲玲, 女, 硕士生 Tel: 13276627066 E-mail: 506366783@qq.com \*通信作者: 陈建伟, 男, 硕士, 教授, 博导 Tel: (025)85811280 E-mail: chenjw695@126.com

粉沙参又名“土人参”，始载于清·吴仪洛《本草从新》(1757年)“出江浙，俗名粉沙参”<sup>[1]</sup>。清·赵学敏《本草纲目拾遗》(1765年)谓：“土人俟夏月采其根以入药，俗名粉沙参”<sup>[2]</sup>。现载于《上海市中药饮片炮制规范(2008年版)》，为伞形科植物明党参 *Changium smyrnioides* Wolff 去除外皮及须根干燥根，具有润肺生津、化痰和胃的功效<sup>[3]</sup>。同品种以“明党参”药材名收载于中国药典 2015 年版，系 4—5 月采挖明党参根，除去须根，洗净，置沸水中煮至无白心，取出，刮去外皮，漂洗，干燥而得<sup>[4]</sup>。二者系同一物种、同一药用部位，由于产地加工的不同，将其分为 2 种不同的商品药材。前者切面类白色，粉性强，质脆，微香，味微甘；后者切面黄白色，角质样，质硬而脆，气微，味淡。

氨基酸和核苷类成分在药用植物生理生化过程中起着重要的作用，它们除本身具有很强的生理活性外，在植物抗逆性及其他药用成分的合成代谢途径方面亦不可或缺。文献已对明党参的水溶性活性成分进行了分析，表明其所含较高量的天门冬酰胺、 $\gamma$ -氨基丁酸、天冬氨酸、精氨酸与明党参功效有关<sup>[5-6]</sup>。但未见不同生长年限粉沙参中氨基酸及核苷类成分的分析。

本研究采用液质联用技术对明党参道地产区安徽南陵龙山 2~20 年的野生粉沙参中水溶性氨基酸及核苷类成分进行了研究，根据色谱峰和离子流图的分离情况，最终选取 16 种氨基酸和 6 种核苷类成分进行含量测定。旨在探讨生长年限与氨基酸和核苷累积的关系，为粉沙参药材的适宜采收时间及综合质量评价提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

SIL-20A XR 型超快速液相色谱仪(日本岛津公司，包括 LC-20AD 二元输液泵，STL-20A XR 自动进样器和 CTO-20AC 柱温箱)；QTRAP 5500 型三重四极杆线性离子阱质谱仪(美国 AB Sciex 公司，配有电喷雾离子源/三重四极杆串联离子阱质量分析器和 Analyst 1.5.2 软件)；TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)；XW-80A 微型涡旋振荡仪(上海沪西分析仪器厂)；KH-500DB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)；先行者 CP214 型万分之一电子天平(奥豪斯仪器常州有限公司)；XP6 型百万分之一电子天平(梅特勒·托利多国际有限公司)；

DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)；SAGA-10TQ 易普易达超纯水仪(南京易普易达科技发展有限公司)。

对照品： $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA, 批号：Z08A8H33553)、丙氨酸(alanine, Ala, 批号：S20A6G17672)、苯丙氨酸(phenylalanine, Phe, 批号：H20N8H48638)、甲硫氨酸(methionine, Met, 批号：SLBK1770V)、脯氨酸(proline, Pro, 批号：S30J6G1)、甘氨酸(glycine, Gly, 批号：SM0315GA14)、胱氨酸(cystine, Cys, 批号：SM0506GA13)、酪氨酸(tyrosine, Tyr, 批号：SM0503GE13)、色氨酸(tryptophan, Trp, 批号：S02D7I26049)、丝氨酸(serine, Ser, 批号：S04J9I51507)、苏氨酸(threonine, Thr, 批号：S01F4G1)、天冬氨酸(aspartic acid, Asp, 批号：S24A8I34463)、天门冬酰胺(asparagine, Asn, 批号：SM0506GA13)、缬氨酸(valine, Val, 批号：S06D8I49809)、组氨酸(histidine, His, 批号：Z19A9H59384)、精氨酸(arginine, Arg, 批号：MKBD3032V)均购于上海源叶生物科技有限公司；鸟苷(批号：JBZ170302021)、尿苷(批号：JBZ170426025)、胞苷(批号：JBZ170426109)、腺苷(批号：JBZ170302022)、肌苷(批号：JBZ171216059)、2'-脱氧鸟苷(批号：JBZ170316054)均购于南京金益柏生物技术有限公司，质量分数均>98%；甲醇(色谱纯，江苏汉邦科技有限公司)；乙腈(色谱纯，默克股份两合公司)；甲酸(色谱纯，德国默克公司)；水为超纯水；

粉沙参样品：2018 年 5 月中旬采自安徽南陵龙山，经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为明党参 *Changium smyrnioides* Wolff 的新鲜根。由老药农根据传统经验将采集的野生根样品按粗细(直径)和不同生长年限分为 6 档，见图 1，依次编为 S1—2~3 年根；S2—4~5 年根；S3—6~8 年根；S4—9~15 年根；S5—16~18 年根；S6—19~20 年根，按《上海市中药饮片炮制规范(2008 年版)》，洗净，刮去根皮，切厚片，于 60 °C 干燥。不同生长年限明党参根皮分别收集编号：S7—2~3 年根皮，S8—4~5 年根皮，S9—6~8 年根皮，S10—9~15 年根皮，S11—16~18 年根皮，S12—19~20 年根皮，采用新鲜竹刀刮下后于 60 °C 干燥。上述样品装瓶密闭备用。



图1 不同生长年限粉沙参

S1-2~3年; S2-4~5年; S3-6~8年; S4-9~15年; S5-16~18年; S6-19~20年。

Fig. 1 Changii Radix with different growth years

S1-2 to 3 years old; S2-4 to 5 years old; S3-6 to 8 years old; S4-9 to 15 years old; S5-16 to 18 years old; S6-19 to 20 years old.

## 2 方法与结果

本次粉沙参中氨基酸和核苷类成分的分析是基于先前报道的方法学进行的<sup>[7-8]</sup>。

### 2.1 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的对照品适量,置于10 mL量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀制成以下浓度的混合对照品贮备液,分别为 GABA 205.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Ala 236.6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Phe 190.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Met 305.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Pro 93.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Gly 123.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Cys 120.9  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Tyr 247.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Trp 135.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Ser 227.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Thr 165.8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Asp 225.8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Asn 265.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Val 153.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , His 109.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , Arg 147.8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 鸟苷 158.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 尿苷 156  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 胞苷 131.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 腺苷 120.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 肌苷 121.9  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 2'-脱氧鸟苷 122.3  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取不同体积的上述贮备液,加水稀释后制成不同浓度的系列对照品溶液。对照品溶液在注入液相色谱仪前经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过。

### 2.2 供试品溶液的制备

将粉沙参和明党参根皮样品粉碎,过80目筛,保存于干燥器内;取干燥至恒重的各样品粉末(S1~S12),精密称定各不同生长年限样品1 g,分别置具塞锥形瓶内,精密加入超纯水50 mL,称重;超声提取(500 W, 50 kHz)45 min,冷却后称重,加超纯水补足质量;12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,吸取上清液100  $\mu\text{L}$ ,并加入900  $\mu\text{L}$ 乙腈,涡旋后离心,取上清即得供试品溶液,于4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

注入液相色谱仪前经 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过。

### 2.3 色谱与质谱条件

**2.3.1 色谱条件** 岛津 SIL-20A XR 型超快速液相色谱系统进行色谱分离,采用 Waters Acquity UPLC BEH Amide(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )色谱柱;流动相:0.2%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2.5 min, 90% $\rightarrow$ 85%B; 2.5~5 min, 85% $\rightarrow$ 50%B; 5~7 min, 50%B; 7~8 min, 50% $\rightarrow$ 90%B; 8~11.1 min, 90%B);柱温30  $^{\circ}\text{C}$ ;体积流量0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;进样量4  $\mu\text{L}$ 。

**2.3.2 质谱条件** 使用 AB Sciex QTRAP 5500 三重四极杆线性离子阱串联质谱仪在电喷雾正离子(ESI<sup>+</sup>)模式下,进行多反应监测(MRM),气帘气40.00 kPa, Gas1为55.00 kPa, Gas2为55.00 kPa,温度550  $^{\circ}\text{C}$ ,喷雾电压5 500 V;同时对检测离子对、去簇电压(declustering potential, DP),碰撞能量(collision energy, CE),碰撞室出口电压(cell exit potential, CXP)进行了优化。由氨基酸和核苷的选择离子流色谱图可见,所测成分在此模式下均有较强响应且较稳定的色谱峰;16种氨基酸类和6种核苷类成分在较短的时间内得到较好的分离。结果见表1和图2。

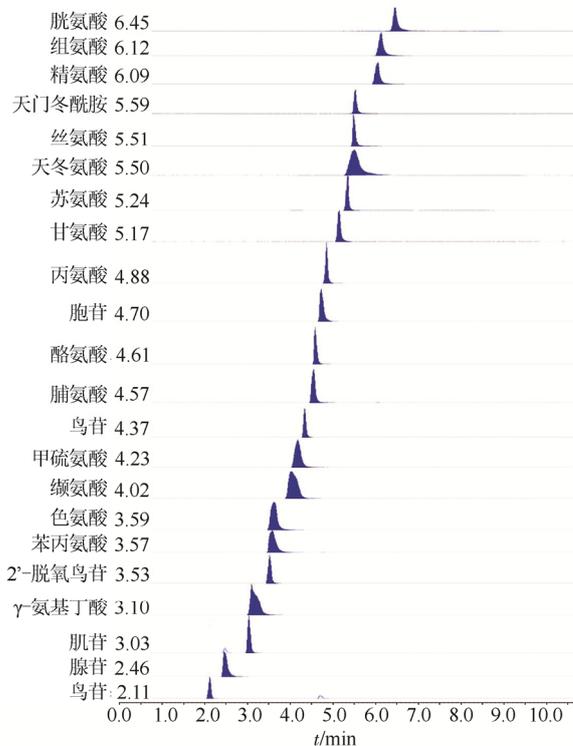


图2 16种氨基酸和6种核苷的MRM图

Fig. 2 MRM diagram of 16 amino acids and 6 nucleosides

表1 粉沙参和明党参根皮中22种氨基酸和核苷类成分的质谱检测参数

Tab. 1 Mass spectrometry parameters of 22 amino acids and nucleosides in Changii Radix

化合物	保留时间/min	质谱参数			
		离子对/m/z	DP/V	CE/eV	CXP/V
γ-氨基丁酸	3.10	104.000/87.000	46	13	12
丙氨酸	4.88	90.090/44.030	71	13.2	6.5
苯丙氨酸	3.57	166.000/120.000	56	17	14
甲硫氨酸	4.23	150.050/56.000	41	21	8
脯氨酸	4.57	115.900/70.050	76	21	8
甘氨酸	5.17	76.000/30.000	50	20.8	14
胱氨酸	6.45	240.802/151.900	61	17	18
酪氨酸	4.61	182.000/136.100	46	17	14
色氨酸	3.59	205.050/188.100	56	13	14
丝氨酸	5.51	106.000/60.000	36	15	8
苏氨酸	5.24	120.000/74.100	27	12.8	12
天冬氨酸	5.50	133.917/73.900	31	17	10
天门冬酰胺	5.59	133.060/73.870	65	14	26
缬氨酸	4.02	118.000/72.100	46	15	18
组氨酸	6.12	156.000/110.000	42	18	10
精氨酸	6.09	175.040/70.050	56	27	8
鸟苷	4.37	284.000/152.000	46	39	16
尿苷	2.11	245.000/113.000	47	13	16
胞苷	4.70	244.000/112.000	21	17	8
腺苷	2.46	267.900/136.100	61	25	18
肌苷	3.03	268.900/137.000	46	15	14
2'-脱氧鸟苷	3.53	268.000/152.100	56	13	12

表2 22种目标化合物的标准曲线、相关系数、线性范围、检测限、定量限和仪器精密度

Tab. 2 Standard curve, correlation coefficient, linear range, detection limit, quantitative limit and precision of instrument for 22 target compounds

化合物	标准曲线	相关系数 <i>r</i>	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检出限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	仪器精密度 RSD/%
γ-氨基丁酸	$Y=7.00\times 10^6 X+2.36\times 10^5$	0.999 4	0.05~6.69	15.52	51.74	1.71
丙氨酸	$Y=3.00\times 10^6 X-8.56\times 10^4$	0.999 8	0.06~11.14	16.52	55.08	1.52
苯丙氨酸	$Y=2.00\times 10^7 X-2.67\times 10^5$	0.999 6	0.01~1.60	3.32	11.05	1.57
甲硫氨酸	$Y=3.00\times 10^6 X-4.21\times 10^4$	0.999 9	0.04~7.20	12.21	40.71	1.46
脯氨酸	$Y=2.00\times 10^7 X-6.29\times 10^5$	0.999 8	0.02~0.96	2.29	7.63	1.12
甘氨酸	$Y=1.12\times 10^5 X+5.95\times 10^3$	0.999 1	0.61~6.58	181.47	604.89	1.51
胱氨酸	$Y=8.23\times 10^5 X-3.72\times 10^4$	0.999 2	0.06~22.18	17.22	57.39	1.61
酪氨酸	$Y=8.00\times 10^6 X-3.94\times 10^4$	0.999 5	0.02~1.13	7.00	23.32	0.91
色氨酸	$Y=3.00\times 10^7 X+4.34\times 10^4$	0.999 0	0.02~2.44	1.96	6.54	2.24
丝氨酸	$Y=1.00\times 10^6 X+6.07\times 10^4$	0.998 8	0.12~6.23	36.68	122.28	2.90
苏氨酸	$Y=1.00\times 10^6 X+4.24\times 10^4$	0.999 1	0.06~6.69	18.04	60.14	1.90
天冬氨酸	$Y=2.00\times 10^6 X-1.33\times 10^5$	0.998 5	0.36~10.34	108.05	360.16	1.06
天门冬酰胺	$Y=2.34\times 10^5 X+2.95\times 10^4$	0.998 7	0.54~30.75	161.96	539.85	1.59
缬氨酸	$Y=2.00\times 10^7 X-1.76\times 10^3$	0.999 8	0.02~4.81	4.98	16.60	2.64
组氨酸	$Y=1.00\times 10^7 X+1.61\times 10^5$	0.999 5	0.05~2.60	14.93	49.77	1.49
精氨酸	$Y=9.00\times 10^6 X+1.00\times 10^6$	0.999 1	0.02~4.80	2.14	7.14	2.77
鸟苷	$Y=4.00\times 10^6 X-8.05\times 10^4$	1.000 0	0.02~2.33	1.74	5.81	3.10
尿苷	$Y=9.29\times 10^5 X-3.23\times 10^3$	0.999 9	0.02~8.92	10.27	34.23	2.54
胞苷	$Y=6.00\times 10^6 X-4.11\times 10^4$	0.999 4	0.02~1.95	2.75	9.16	1.13
腺苷	$Y=3.00\times 10^7 X-7.73\times 10^5$	0.999 7	0.02~1.12	1.24	4.14	1.61
肌苷	$Y=1.00\times 10^7 X-1.53\times 10^5$	0.999 3	0.01~1.51	1.76	5.88	1.83
2'-脱氧鸟苷	$Y=1.00\times 10^7 X-2.51\times 10^5$	0.999 3	0.01~1.85	1.71	5.71	0.00

## 2.4 线性关系、检测限和仪器精密度

取对照品贮备液用水分别稀释成系列浓度的对照品溶液, 进行液质联用测定分析, 以峰面积为纵坐标 *Y*, 对照品浓度为横坐标 *X*, 进行线性回归, 绘制标准曲线, 计算相关系数; 以信噪比  $S/N=3$ , 计算各成分的最低检测限(LOD), 以信噪比  $S/N=10$ , 计算各成分的最低定量限(LOQ)。16种氨基酸和6种核苷类成分在检测的浓度范围内线性关系良好( $r^2>0.9985$ ), 其 LOD 和 LOQ 分别为  $0.00124\sim 0.181\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $0.00414\sim 0.605\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

精密吸取一定浓度的混合对照品溶液, 连续进样6次, 计算各对照品浓度, 16种氨基酸和6种核苷浓度的相对标准偏差为0~3.1%, 见表2。

## 2.5 样品提取方法优化

本次实验中考察了变量粉末粒度(80, 65, 24目)、提取溶剂(水、10%甲醇水、20%甲醇水、30%甲醇水)、溶剂体积(50, 70 mL)、超声时间(30, 45, 60, 75 min)和乙腈样品溶液配比(不加乙腈, 3:7, 1:1, 9:1)对目标成分提取总含量的影响。当1个参数改变时, 其他参数为默认值(粉末粒度: 80目; 提取溶剂: 水; 提取体积: 50 mL; 超声时

间: 45 min; 乙腈样品溶液配比为 9:1), 以 22 种氨基酸和核苷类成分总含量最高进行筛选, 最终确定提取条件: 药材粉末过 80 目筛, 以 50 mL 超纯水超声提取 45 min, 乙腈与样品溶液配比为 9:1。

## 2.6 含量测定

取各样品 S1~S12, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 并分别测定 16 种氨基酸和 6 种核苷类成分的含量。除 16~18 年根皮中未检测到精氨酸, 19~20 年根皮中未检测到精氨酸和丝氨酸, 12 个不同生长年限样品基本可以测得 16 种氨基酸和 6 种核苷类成分, 各不同生长年限间核苷与氨基酸的含量都有明显差异。结果见表 3~4。总氨基酸质量分数为 218.52 mg·g<sup>-1</sup>, 总核苷质量分数为 11.83 mg·g<sup>-1</sup>。

表 3 粉沙参和明党参根皮中 16 种氨基酸和 6 种核苷类成分的含量(n=3)

Tab. 3 Contents of 16 kinds of amino acids and 6 kinds of nucleosides in Changii Radix and the root barks of *C. smyrnioides*(n=3)

对照品名称	刮去外皮的干燥根(粉沙参)						根皮					
	2~3 年	4~5 年	6~8 年	9~15 年	16~18 年	19~20 年	2~3 年	4~5 年	6~8 年	9~15 年	16~18 年	19~20 年
γ-氨基丁酸	872.48	1 183.11	1 082.14	967.57	667.12	492.20	793.11	359.80	279.74	300.42	108.65	112.41
丙氨酸	545.41	757.59	532.11	643.42	535.08	467.72	414.08	227.17	151.76	131.54	94.20	115.71
苯丙氨酸	935.42	791.67	1 000.76	478.54	807.87	841.39	282.68	117.83	132.33	50.45	52.88	17.13
甲硫氨酸	138.63	118.35	138.56	87.91	146.83	212.98	28.12	17.66	14.06	9.68	13.11	7.27
脯氨酸	212.63	263.73	200.30	231.93	112.70	106.13	107.37	68.60	40.40	38.19	29.20	25.94
甘氨酸	75.01	58.32	49.34	60.03	44.70	55.90	83.66	29.45	40.71	42.50	22.68	15.72
胱氨酸	23.96	23.74	23.00	23.96	23.28	23.46	23.91	23.21	23.57	23.57	23.24	22.85
酪氨酸	509.18	275.59	237.87	219.05	320.95	360.02	82.13	29.26	16.33	10.67	10.99	5.71
色氨酸	497.29	412.61	382.27	270.59	470.40	477.70	113.35	48.83	12.99	15.00	4.58	4.12
丝氨酸	1374.17	524.67	484.23	748.70	746.16	941.56	591.80	362.34	254.55	279.00	106.59	-
苏氨酸	1 044.64	968.82	663.22	807.77	909.54	1 030.42	438.39	204.93	201.43	162.63	83.09	56.47
天冬氨酸	309.58	277.07	198.64	292.94	356.65	441.86	1 052.11	691.96	732.60	730.26	409.76	380.96
天门冬酰胺	29 746.26	17 765.65	18 475.85	17 827.98	16 235.68	18 048.13	21 605.85	13 579.02	5 130.42	5 748.79	413.91	204.99
缬氨酸	231.12	260.04	231.59	116.89	343.43	230.53	101.16	58.75	58.79	28.18	18.30	3.27
组氨酸	773.87	434.97	454.56	347.01	544.41	754.48	251.37	97.07	34.96	23.32	8.49	11.35
精氨酸	450.97	365.00	838.13	397.82	374.35	841.67	410.37	276.35	74.12	72.47	-	-
鸟苷	395.97	437.56	468.38	357.09	347.17	302.81	220.85	168.51	237.76	139.47	71.50	13.05
尿苷	309.55	440.54	446.60	342.64	370.42	306.01	237.34	182.05	268.15	195.82	72.81	3.65
胞苷	280.64	184.26	209.91	193.18	203.31	171.20	131.40	128.91	169.35	89.72	41.64	4.20
腺苷	359.79	417.89	440.83	360.76	376.12	333.46	30.84	13.28	101.94	16.82	17.27	13.79
肌苷	30.79	15.62	12.63	20.89	13.16	10.27	130.64	34.00	71.85	52.30	72.59	11.53
2'-脱氧鸟苷	48.18	29.88	32.20	34.88	28.99	25.64	92.36	96.14	118.01	111.06	96.10	14.23

## 3 分析与讨论

### 3.1 不同生长年限粉沙参中氨基酸和核苷类成分累积趋势分析

粉沙参根中氨基酸和核苷类成分在 2~20 年间含量保持相对稳定, 尤以核苷类成分稳定性较强。随年份增长, 根中 16 种氨基酸类成分中有 10 种(Met, Val, Thr, Ser, Asp, His, Arg, Phe, Tyr, Trp)含量有先走低后升高的趋势, 且多以第 8 年前后为拐点; 3 种(GABA, Ala, Pro)有 2~5 年间含量走高第 6 或 9 年起持续走低的趋势; 2 种氨基酸(Gly, Asn)2~3 年时含量较高, >3 年生含量基本维持在同一水平; 1 种氨基酸(Cys)含量始终稳定在同一水平。核苷类成分第 9 年后部分有走低的趋势, 但不明显, 基本维持在同一水平。

表 4 粉沙参和明党参根皮中 16 种氨基酸和 6 种核苷类成分的百分含量(n=3)

Tab. 4 Percentage of 16 kinds of amino acids and 6 kinds of nucleosides in Changii Radix and the root barks of *C. smyrnioides*(n=3) %

对照品名称	刮去外皮的干燥根(粉沙参)						根皮					
	2~3 年	4~5 年	6~8 年	9~15 年	16~18 年	19~20 年	2~3 年	4~5 年	6~8 年	9~15 年	16~18 年	19~20 年
γ-氨基丁酸	0.087 2	0.118 3	0.108 2	0.096 8	0.066 7	0.049 2	0.079 3	0.036 0	0.028 0	0.030 0	0.010 9	0.011 2
丙氨酸	0.054 5	0.075 8	0.053 2	0.064 3	0.053 5	0.046 8	0.041 4	0.022 7	0.015 2	0.013 2	0.009 4	0.011 6
苯丙氨酸	0.093 5	0.079 2	0.100 1	0.047 9	0.080 8	0.084 1	0.028 3	0.011 8	0.013 2	0.005 0	0.005 3	0.001 7
甲硫氨酸	0.013 9	0.011 8	0.013 9	0.008 8	0.014 7	0.021 3	0.002 8	0.001 8	0.001 4	0.001 0	0.001 3	0.000 7
脯氨酸	0.021 3	0.026 4	0.020 0	0.023 2	0.011 3	0.010 6	0.010 7	0.006 9	0.004 0	0.003 8	0.002 9	0.002 6
甘氨酸	0.007 5	0.005 8	0.004 9	0.006 0	0.004 5	0.005 6	0.008 4	0.002 9	0.004 1	0.004 3	0.002 3	0.001 6
胱氨酸	0.002 4	0.002 4	0.002 3	0.002 4	0.002 3	0.002 3	0.002 4	0.002 3	0.002 4	0.002 4	0.002 3	0.002 3
酪氨酸	0.050 9	0.027 6	0.023 8	0.021 9	0.032 1	0.036 0	0.008 2	0.002 9	0.001 6	0.001 1	0.001 1	0.000 6
色氨酸	0.049 7	0.041 3	0.038 2	0.027 1	0.047 0	0.047 8	0.011 3	0.004 9	0.001 3	0.001 5	0.000 5	0.000 4
丝氨酸	0.137 4	0.052 5	0.048 4	0.074 9	0.074 6	0.094 2	0.059 2	0.036 2	0.025 5	0.027 9	0.010 7	-
苏氨酸	0.104 5	0.096 9	0.066 3	0.080 8	0.091 0	0.103 0	0.043 8	0.020 5	0.020 1	0.016 3	0.008 3	0.005 6
天冬氨酸	0.031 0	0.027 7	0.019 9	0.029 3	0.035 7	0.044 2	0.105 2	0.069 2	0.073 3	0.073 0	0.041 0	0.038 1
天门冬酰胺	2.974 6	1.776 6	1.847 6	1.782 8	1.623 6	1.804 8	2.160 6	1.357 9	0.513 0	0.574 9	0.041 4	0.020 5
缬氨酸	0.023 1	0.026 0	0.023 2	0.011 7	0.034 3	0.023 1	0.010 1	0.005 9	0.005 9	0.002 8	0.001 8	0.000 3
组氨酸	0.077 4	0.043 5	0.045 5	0.034 7	0.054 4	0.075 4	0.025 1	0.009 7	0.003 5	0.002 3	0.000 8	0.001 1
精氨酸	0.045 1	0.036 5	0.083 8	0.039 8	0.037 4	0.084 2	0.041 0	0.027 6	0.007 4	0.007 2	-	-
鸟苷	0.039 6	0.043 8	0.046 8	0.035 7	0.034 7	0.030 3	0.022 1	0.016 9	0.023 8	0.013 9	0.007 1	0.001 3
尿苷	0.031 0	0.044 1	0.044 7	0.034 3	0.037 0	0.030 6	0.023 7	0.018 2	0.026 8	0.019 6	0.007 3	0.000 4
胞苷	0.028 1	0.018 4	0.021 0	0.019 3	0.020 3	0.017 1	0.013 1	0.012 9	0.016 9	0.009 0	0.004 2	0.000 4
腺苷	0.036 0	0.041 8	0.044 1	0.036 1	0.037 6	0.033 3	0.003 1	0.001 3	0.010 2	0.001 7	0.001 7	0.001 4
肌苷	0.003 1	0.001 6	0.001 3	0.002 1	0.001 3	0.001 0	0.013 1	0.003 4	0.007 2	0.005 2	0.007 3	0.001 2
2'-脱氧鸟苷	0.004 8	0.003 0	0.003 2	0.003 5	0.002 9	0.002 6	0.009 2	0.009 6	0.011 8	0.011 1	0.009 6	0.001 4

Asn 是粉沙参中含量最高的，以百分含量计，2~3 年: 2.97%; 4~5 年: 1.77%，且>3 年粉沙参(根)中 Asn 维持在同一水平。根皮亦含根同样的氨基酸和核苷类成分，且随着生长年限增加，其含量逐渐减少，某些氨基酸，如 Arg、Ser 在 16 年后，或 19 年后消失。

### 3.2 聚类分析(HCA)

采用 simca 14.1 软件 (Sartorius Stedim Biotech) 对根和根皮部位 22 种氨基酸及核苷类成分进行聚类分析。结果显示，聚类差异具有较好的生长年限连续性。从根部结果来看，以 3 年生和 15 年生为分界点可分为 3 类，2~3 年生、4~15 年生、16~20 年生样品各聚为一类。就根皮而言，以 3 类分，则 3 年生和 18 年生可为分界点，2~3 年生、4~18 年生、19~20 年生样品各聚为一类，见图 3~4。

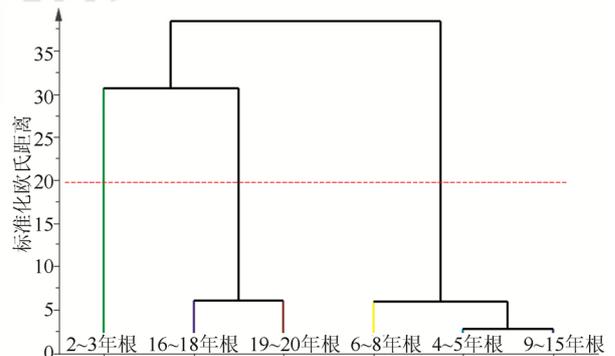


图 3 不同生长年限粉沙参中 16 种氨基酸和 6 种核苷类成分聚类分析结果

X 轴代表样本，Y 轴代表样本点间的距离，Y 轴数值越小，代表样本点间的距离越小，2 个样本越相似。

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis results of 16 amino acids and 6 nucleosides in Changii Radix with different growth years

The X-axis represents the sample, while the Y-axis represents the distance between sample points. The smaller the Y-axis value is, the smaller the distance between sample points is, and the more similar the two samples are.

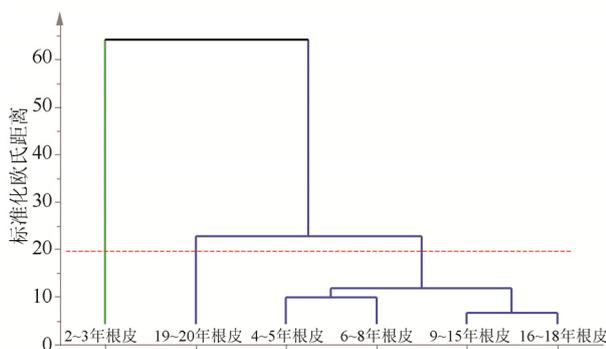


图4 不同生长年限明党参根皮中16种氨基酸和6种核苷类成分聚类分析结果

X轴代表样本, Y轴代表样本点间的距离, Y轴数值越小, 代表样本点间的距离越小, 2个样本越相似。

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis results of 16 amino acids and 6 nucleosides in the root barks of *Changium smyrnioides* with different growth years

The X-axis represents the sample, while the Y-axis represents the distance between sample points. The smaller the Y-axis value is, the smaller the distance between sample points is, and the more similar the two samples are.

聚类结果按不相似性分析, 根及根皮部位2~3年生样品均与对应的4~15年生样品具有足够不相似性, 体现在聚类结果分布在较远分支上, 类似地, 19~20年生样品与相应的4~15年生亦具有较明显差异。

同时应注意15~18年生样品在根和根皮部位的聚类结果上具有不同的倾向, 提示 $\geq 16$ 年生氨基酸与核苷含量在根和根皮部位可能出现较大分化, 结合含量测定数据可知这种分化主要体现在9种氨基酸含量的变化上, 其中必需氨基酸占比较大(77.78%), 具体表现为 $\geq 16$ 年生样品中碱性氨基酸(His, Arg)、芳香族氨基酸(Phe, Tyr, Trp)、侧链含硫氨基酸(Met)、侧链含羟基的氨基酸(Ser, Thr)和侧链为双甲基的氨基酸(Val)在根中含量有较明显的上升趋势而在根皮中含量呈持续下降趋势, 即这9种成分在根和根皮部位含量在第16年起含量差距相较15年以前显著增大。

最后从根部结果来看, 16~18年生与19~20年生聚为一类, 此阶段可能为根中淀粉大量聚集至稳定的状态, 根中各成分含量趋于稳定。而根皮部位16~18年生样品虽与9~15年生聚为一类, 但相近生长年限样本总能聚为一类且氨基酸和核苷类成分总含量随生长年限增加而降低, 可能为根皮部位随木栓化部位增厚, 活性成分含量逐步下降而呈现差异性。

### 3.3 主成分分析(PCA)

采用simca 14.1(Sartorius Stedim Biotech)对数据结果进行PCA分析, 以期通过降维的方式对原始数据进行解释和概览, 整合得分图(每一个点相当于一个样本)与载荷图(每一个点相当于一个变量), 结果得Biplot图5~6。图5为根部数据PCA模型, 拟合优度为0.702, 模型建立良好; 图6为根皮部数据PCA模型, 拟合优度为0.919, 预测优度为0.705, 建立模型为优秀模型, 且预测良好。所有数据点均落在95%置信区间内, 说明2个模型均无明显异常值存在。PCA模型结果判别方式为若样本点与变量点具有相同位置分布则两者呈正相关, 距离越近则越相关, 稍远则相关性减弱, 至方向相反则呈负相关。

由图5(根部)可知, 样本分布情况按各样本点间距离来看, 可将2~3年生、4~15年生、16~20年生样品各分为一组, 组内样本点具有正相关性。同时, 22个变量点明显分为左右两边, 不同生长年限根部具有标志性氨基酸或核苷类成分。按该变量在该生长年限样本中具有相较在其他生长年限样本中最高含量, 即与该样本点距离最近的变量点, 确定各生长年限样本标志性氨基酸或核苷成分, 2~3年生为Asn, 4~5年生和9~15年生均为Ala和鸟苷, 6~8年生为鸟苷和腺苷, 16~18年生为Val和Arg, 19~20年生为Met和Asp。

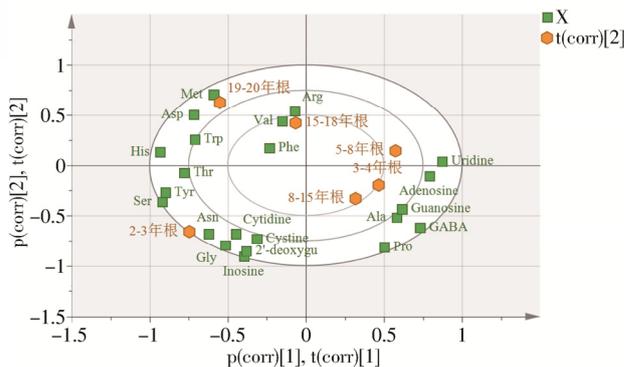


图5 粉沙参氨基酸和核苷类主成分分析Biplot图

t(corr)[2]表示样本点, 不同生长年限样本; X代表变量点, 氨基酸或核苷; 最外圈椭圆为95%置信区间, 模型拟合优度为0.702, 模型建立良好。

Fig. 5 Biplot diagram of amino acid and nucleoside content in the samples of *Changii Radix*

t(corr)[2] represents observations samples with different growth years; X represents variables, amino acids or nucleosides; the outermost ellipse was the 95% confidence interval, and the goodness of fit of the model was 0.702, indicating that the model was well established.

由图 6(根皮部)可知, 22 个变量点分布较为集中, 且多聚集在 2~3 年生根皮样本附近。按距离而言, 15 种氨基酸(除 Cys)均紧密排布在 2~3 年生样本点附近, 4~20 年生根皮中随生长年限增加变量点与样本点距离增加, 说明根皮中氨基酸类成分随生长年限增加而逐步减少。6 种核苷类成分和胱氨酸分布在较外围, 靠近 4~5 年生和 6~8 年生样品且距离相似, 说明在 4~8 年生根皮中这 7 种成分稳定存在。

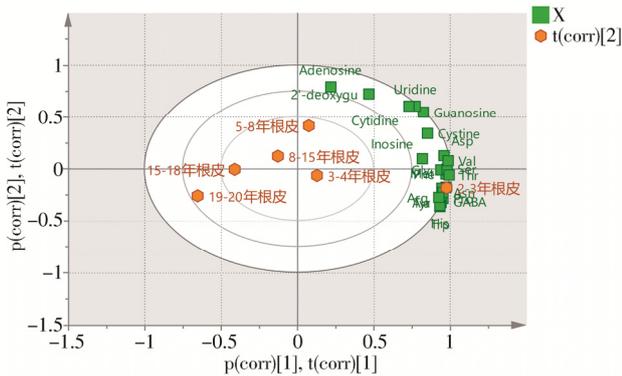


图 6 明党参根皮中氨基酸和核苷类成分分析 Biplot 图  
t(corr)[2]表示样本点, 不同生长年限样本; X 代表变量点, 氨基酸或核苷; 最外圈椭圆为 95%置信区间, 模型拟合优度为 0.919, 预测优度 0.705, 模型优秀且预测良好。

Fig. 6 Biplot diagram of amino acid and nucleoside content in the root bark samples of *C. smyrnioides*  
t(corr)[2] represents observations, samples with different growth years; X represents variables, amino acids or nucleosides; the outermost ellipse was 95% confidence interval; the goodness of fit of the model was 0.919; the goodness of prediction was 0.705. The model was excellent and the prediction was good.

综上所述, 粉沙参样品聚类明显, 不同生长年限具有代表性氨基酸或核苷类成分; 明党参根皮样品中氨基酸类成分在 2~3 年生样品中具有明显优势, 核苷类成分在前 2~8 年中保持稳定, 随生长年限增加, 氨基酸和核苷类成分的含量逐步下降。

### 3.4 讨论

明党参为国家二级保护植物<sup>[9]</sup>。粉沙参是我国华东地区特产珍稀名贵地道药材, 主产于浙江一带, 亦收载《浙江省中药饮片炮制规范》(2015 年版)<sup>[10]</sup>。鉴于植物中游离氨基酸和核苷类成分为重要生物元件<sup>[11]</sup>, 具有参与植物应激反应中信号转导等作用<sup>[12]</sup>。故本研究以氨基酸和核苷类成分为切入点, 对珍稀中药材粉沙参中活性氨基酸和核苷类成分的代谢规律进行了探讨。

由图或表可知, 粉沙参中氨基酸和核苷类成分在 2~20 年间总含量能够保持相对稳定; 不同生长年限的根部样品分别具有代表性成分, 2~3 年生为 Asn, 4~5 年生和 9~15 年生均为 Ala 和鸟苷, 6~8 年生为鸟苷和腺苷, 16~18 年生为 Val 和 Arg, 19~20 年生为 Met 和 Asp。已知明党参中 Asn 为其主要止咳化痰功效成分, 栽培品含量达 1.07%<sup>[5]</sup>, 与本实验结果一致。野生粉沙参中 Asn 的含量最高(2~3 年: 2.97%), 说明野生品 2~3 年含量比栽培品高。由表或图可见, 野生粉沙参中>3 年的 Asn 含量维持在同一水平, 提示游离的 Asn 在>3 年根中代谢稳定, 根增粗生长, 或淀粉的积聚, 并不影响 Asn 的含量, 因此, 不管生长年限多长, 粉沙参润肺化痰的功能不变, 表明栽培>3 年明党参兼顾了产量与质量双效的科学性与合理性。GABA 具有抗焦虑<sup>[6]</sup>和改善学习记忆力<sup>[13]</sup>等作用, 已知江苏栽培明党参中 GABA 含量为 0.034%~0.116%<sup>[6]</sup>, 与本实验结果一致。粉沙参中 GABA 的含量在 4~5 年生含量最高(0.118%), 2~15 年生含量维持在相近水平, 亦说明粉沙参传统采收年限具有合理性。

明党参根皮为加工废弃物, 已知从中分离得香豆素、酚酸类等多种活性成分<sup>[14]</sup>。明党参根皮含有与粉沙参相同的 22 种氨基酸和核苷类成分, 2~20 年生根皮中氨基酸和核苷类成分总量是 63.30 mg·g<sup>-1</sup>, 其中 2~5 年生者占比较大达 69.58%。由图表可知, 明党参根皮中各成分总量随生长年限增加呈下降趋势, 但与粉沙参中各成分生长年限积累不同。故认为, 该药材废弃根皮包含活性氨基酸和核苷类成分, 具有再开发利用价值。

### REFERENCES

- [1] 吴仪洛. 本草从新·卷一[M]. 北京: 人民出版社, 1990: 5.
- [2] 赵学敏. 本草纲目拾遗·卷三草部[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 76-77.
- [3] 上海市食品药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范 2008 年版[S]. 2008: 130-130.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2015: 210.
- [5] LI X, CHEN J, SUN J, et al. Isolation, identification and quantitative analysis of water soluble active principle in the roots of *Changium smyrnioides* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 1995, 7(2): 1-5.
- [6] BU D, DUAN Z, LI E, et al. Study on  $\gamma$ -aminic acid cumulation from roots of cultivated *Changium smyrnioides* Wolff in Jiangsu [J]. Chin Med J Res Pract(现代中药研究与实践), 2012, 26(6): 26-28.

- [7] LI Y, HU P, ZHANG Y, et al. PCA and TOPSIS analysis and determination of amino acids and nucleosides in seeds of *Annona squamosa* from different producing areas by QTRAP-UFLC-MS/MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2018, 49(11): 2671-2677.
- [8] HU P, ZHANG Y, CAI J, et al. Simultaneous determination of amino acids, nucleosides and nucleobases in different parts of *Metaplexis japonica* (Thunb.) Makino processed by different methods by UFLC-QTRAP-MS/MS [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2017, 52(13): 1177-1182.
- [9] 中华人民共和国生态环境部, 中国科学院. 中国生物多样性红色名录—高等植物卷[S]. 2013: 118.
- [10] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药饮片炮制规范 2015 年版[M]. 北京: 中国医学科技出版社, 2015: 78.
- [11] CHEN S L, ZHU X X, LI C F, et al. Genomics and synthetic biology of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharmacol Sin*(药理学学报), 2012, 47(8): 1070-1078.
- [12] ZEIER J. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways [J]. *Plant Cell Environ*, 2013, 36(12): 2085-2103.
- [13] LI L E, TANG T, LI Y G, et al. Research progress of the relationship between  $\gamma$ -aminobutyric acid system and learning memory in Alzheimer's disease and aging [J]. *J Kunming Univ Sci Technol Nat Sci Ed*(昆明理工大学学报 自然科学版), 2017, 42(6): 81-85.
- [14] BAI G G, YUAN F, MAO K J, et al. Chemical constituents in root bark of *Changium smyrnioides* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2014, 45(12): 1673-1676.

收稿日期: 2019-05-03

(本文责编: 李艳芳)

中国现代应用药理学  
http://www.chinjmap.com