·基础研究·

UPLC-MS/MS同时测定宁夏枸杞中香豆素类和苯丙酸类9个成分的含量△

康志欣[1]，袁雪琴[1]，张春阳[1]，杨孟可[1]，王卫华[2]，刘赛[1*]，徐常青[1*]

1.中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所，北京 100193；

2.清华大学 药学技术中心，北京 100084

［摘要］ **目的：**建立超高效液相色谱-质谱法（UPLC-MS/MS）同时测定宁夏枸杞中5个香豆素类化合物（东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮素、秦皮苷、秦皮甲素）、4个苯丙酸类化合物（咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸、绿原酸）的方法，并测定这些成分在不同种植方式（有机、常规）下宁夏枸杞不同部位（青果、中果、红果、叶片、根皮）中的含量。**方法：**采用XSelect HSS T3色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.5 μm），以乙腈（含0.5 mmol·L^{-1}乙酸铵+0.05%甲酸，A）-水（含0.5 mmol·L^{-1}乙酸铵+0.05%甲酸，B）为流动相进行梯度洗脱，流速为0.3 mL·min^{-1}，柱温为35 ℃，进样量为5 μL。质谱采用电喷雾离子源（ESI），正/负离子多反应监测模式，外标法测定。**结果：**上述9个成分在各自的质量浓度范围内线性关系良好，r均大于0.99；稳定性RSD<5.22%；重复性RSD<7.11%；25.00、250.00 ng·mL^{-1}质量浓度下9个成分的精密度RSD<6.10%；平均加样回收率分别为113.04%、115.23%、117.73%、115.93%、123.36%、116.46%、112.73%、117.69%、96.67%，RSD<8.26%。不同种植方式及宁夏枸杞不同部位样品中香豆素类和苯丙酸类9个成分含量差异具有统计学意义。**结论：**该方法简便、灵敏、准确、高效，可为宁夏枸杞香豆素类和苯丙酸类成分研究提供参考。

［关键词］ 宁夏枸杞；超高效液相色谱-质谱法；香豆素；苯丙酸；不同部位；不同种植方式

［中图分类号］ R284 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1673-4890(2022)10-1861-09

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220307003

Simultaneous Determination of the Contents of 9 Components Including Coumarin and Phenylpropionic Acid in *Lycium barbarum* L. by UPLC-MS/MS

KANG Zhi-xin[1], YUAN Xue-qin[1], ZHANG Chun-yang[1], YANG Meng-ke[1], WANG Wei-hua[2], LIU Sai[1*], XU Chang-qing[1*]

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

2. *Center of Pharmaceutical Technology*, *Tsinghua University*, *Beijing* 100084, *China*

[**Abstract**] **Objective**: To establish an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for simultaneous determination of five coumarins (scopoletin, scopolin, fraxetin, fraxin, esculin), and four phenylpropionic acid (caffeic acid, ferulic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid) related to the synthesis of coumarin, and an isomer of scopolin (chlorogenic acid) in *Lycium barbarum*. In addition, the content of the nine components in different tissues (unripe fruit, moderately ripe fruit, ripe fruit, leaf and root bark) of *L. barbarum* under different cultivation patterns (organic or conventional) were determined. **Methods**: The UPLC-MS/MS assay was performed on a XSelect HSS T3 column (100 mm×2.1 mm, 2.5 μm) with 0.5 mmol·L^{-1} ammonium acetate and 0.05% formic acid in acetonitrile (A)-0.5 mmol·L^{-1} ammonium acetate and 0.05% formic acid in water (B) as mobile phase by gradient elution. The flow rate was set at 0.3 mL·min^{-1}. The column temperature was set at 35 ℃ and the injection volume was 5 μL.

△［基金项目］ 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目（2021-I2M-1-031，2016-I2M-3-017）；国家重点研发计划项目（2017YFC1700706）；宁夏回族自治区重点研发计划重大（重点）项目（2019BBF02030）

*［通信作者］ 刘赛，副研究员，研究方向：药用植物病虫害防治；Tel：010-57833180，E-mail：sliu@implad.ac.cn

徐常青，研究员，研究方向：药用植物病虫害防治；Tel：010-57833179，E-mail：cqxu@implad.ac.cn

Mass spectrometry was carried out on electrospray ionization (ESI) in positive/negative multiple reaction monitoring modes. The external standard method was used in the experiment. **Results**: The nine components showed good linear relationship within their respective concentration ranges (r>0.99). The RSDs of stability and reproducibility were less than 5.22% and less than 7.11%, respectively. The RSDs of precision of the nine components at the concentrations of 25.00 ng·mL^{-1} and 250.00 ng·mL^{-1} were less than 6.10%. The average recoveries were 113.04%, 115.23%, 117.73%, 115.93%, 123.36%, 116.46%, 112.73%, 117.69%, and 96.67%, with the RSDs less than 8.26%. The content of the nine components including coumarin and phenylpropionic acid in different parts of *L. barbarum* under different cultivation patterns was statistically significant. **Conclusion**: The method was simple, sensitive, accurate and efficient, which could provide reference for the research of coumarin and phenylpropionic acid in *L. barbarum*.

[**Keywords**]　*Lycium barbarum* L.; UPLC-MS/MS; coumarin; phenylpropionic acid; different tissues; different cultivation patterns

宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 为茄科枸杞属（*Lycium* L.）落叶灌木，其干燥成熟果实（枸杞子）、干燥根皮（地骨皮）、干燥嫩叶（天精草）、干燥花蕾（长生草）均可入药[1-2]，是我国传统名贵中药材，随着市场需求不断扩大，其种植规模[3]及出口总量正逐年递增[4]。由于宁夏枸杞适应性强，具有耐盐碱、耐干旱和耐贫瘠等优良特性，被作为宁夏、青海、甘肃等西北地区产业扶贫、乡村振兴、改善生态环境的先锋树种[5-6]。

香豆素类成分是植物界普遍存在的一类次生代谢物质[7]，通过苯丙烷途径合成[8]，在植物体内易受到环境胁迫（生物或非生物胁迫）诱导合成[9]。近年研究发现，东莨菪内酯和秦皮素等香豆素类成分及其糖基化合物东莨菪苷、秦皮苷、秦皮甲素等在植物适应环境中具有非常重要的生态功能，主要体现在3个方面：1）在植物养分吸收利用方面，香豆素类成分可通过螯合三价铁离子等方式帮助植物吸收铁营养，在缓解碱性土壤导致的铁营养缺乏中起着至关重要的作用[10]；2）在植物-微生物互作方面，香豆素类成分被证实可以介导多种微生物互作，是植物与微生物及环境进行信息交流的关键信号物质，其中东莨菪内酯被证明具有选择性抗菌作用，可以维系健康的根际微生物环境[11]；3）香豆素类成分是重要的酚类植保素及信号分子[12-14]，在植物遭受病、虫害时可大量合成和积累，在植物抗病[15-16]、抗虫[17-19]等响应生物胁迫中也具有重要作用。同时，香豆素类成分具有抗凝血[20]、抗癌[21]、抗病毒[22]和抗炎[23]等多种药理作用，是一类具有重要药理活性的化合物，近年越来越受到关注[24]。

前期研究发现，枸杞各部位如根[25-26]、叶[25]、果实[27-28]、种子[29]中均可检出香豆素类成分，尤其是东莨菪内酯和东莨菪苷，是枸杞子、地骨皮、天精草中重要的有效成分[30-32]，东莨菪内酯被认为是枸杞子中抑制前列腺癌细胞PC3增殖效果最好的活性成分[33]，东莨菪苷则被认为是枸杞叶中抑制宫颈癌细胞HeLa增殖的主要活性成分[32]。此外，宁夏枸杞生长在西北盐碱土壤环境中[34-35]，且生长过程病虫种类多、为害严重[36-37]，推测香豆素类成分在其适应各种生物及非生物胁迫，尤其对根系营养吸收、适应盐碱胁迫、调节根际微生物群落及协助植株抗病虫等方面具有重要作用。本研究采用超高效液相色谱-质谱法（UPLC-MS/MS）同时测定了宁夏枸杞中5个香豆素类化合物（东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮素、秦皮苷和秦皮甲素）、3个与香豆素合成有关的苯丙酸类化合物（咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸）及1个东莨菪苷的同分异构体（绿原酸）共9个成分，并对该方法进行方法学考察。同时还比较了同一种植基地有机种植（不使用任何化学合成的肥料、农药、生长调节剂等物质）和常规种植宁夏枸杞不同部位中各成分含量的差异，以期为宁夏枸杞中香豆素类成分研究提供便捷的检测方法，同时为高品质枸杞定向培育及宁夏枸杞资源开发利用提供参考。

1　材料

1.1　仪器

Elion LC™型超高效液相色谱仪串联Triple Quad 5500+型三重四极杆质谱仪（美国AB SCIEX公司）；XP 26型分析天平（瑞士Mettler-Toledo公司）；5810 R型冷冻高速离心机（德国Eppendorf公司）；MVM25型多管振荡器（QLab公司）；WD-9415C型超声波清洗器（北京市六一仪器厂）；MILLI-Q型超纯水机（德国Merck Millipore公司）；JSP-100型高速多功能

粉碎机（永康市金穗机械制造厂）；WGL-230B型电热鼓风干燥箱（天津市泰斯特仪器有限公司）。

1.2　试药

样品于2021年7月采自宁夏中卫市中宁县鸣沙镇玺赞生态枸杞庄园（常规种植：N37.46°，E105.93°；有机种植：N37.47°，E105.95°），经中国医学科学院药用植物研究所徐常青研究员鉴定为宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L.（宁杞7号）。

在有机和常规2种种植方式的试验地内各任选30株宁夏枸杞（其中每10株为1个生物学重复，共3个生物学重复），分别采收青果、中果、红果、叶片和根，每份样品取鲜样20~50 g，其中青、中、红果为按照果实颜色及大小划分的不同成熟度果实，叶片为叶长≥5.00 cm的功能叶，根为挖开植株后截取的部分植株根系（以主根为主），清洗表面泥土等杂质后用手术刀刮取根皮为待测样品，见图1。

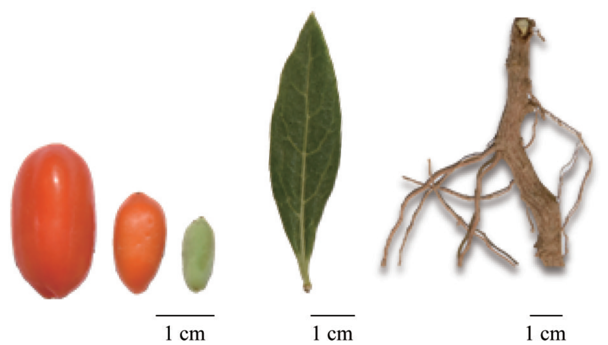


图1　宁夏枸杞红果、中果、青果、叶片和根样品

对照品东莨菪内酯（批号：Z13O11X126864）、秦皮素（批号：Y07D9Q77007）、秦皮苷（批号：Y13N11Q130724）、秦皮甲素（批号：KA0422CA14）均购于上海源叶生物科技有限公司，纯度≥98%；对照品东莨菪苷（批号：CHB201131）、咖啡酸（批号：CHB201217）、阿魏酸（批号：CHB201105）、对香豆酸（批号：CHB210106）、绿原酸（批号：CHB201114）均购于成都克洛玛生物科技有限公司，纯度≥98%；乙腈（批号：210280）、甲醇（批号：211218）、甲酸（批号：207052）、异丙醇（批号：205316）、乙酸铵（批号：191008）均为色谱纯，购于Fisher Chemical公司；二甲基亚砜（分析纯，批号：111115，西陇化工股份有限公司）。

2　方法与结果

2.1　UPLC-MS/MS分析条件

2.1.1　色谱条件　Waters XSelect HSS T3色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.5 μm），以乙腈（含0.5 $mmol\cdot L^{-1}$乙酸铵+0.05%甲酸，A）-水（含0.5 $mmol\cdot L^{-1}$乙酸铵+0.05%甲酸，B）为流动相，梯度洗脱（0~2.0 min，0~20%A；2.0~5.0 min，20%A；5.0~8.0 min，20%~60%A；8.0~10.0 min，60%~100%A；10.0~12.0 min，100%A；12.0~12.1 min，100%~0A；12.1~16.0 min，0A）；流速为0.3 $mL\cdot min^{-1}$；柱温为35 ℃；进样量为5 μL。

2.1.2　质谱条件　正、负离子模式切换电喷雾离子源（ESI），毛细管电压为5.5 kV/−4.5 kV，多反应监测模式（MRM），气帘气压力为206.84 kPa，喷雾气（GS1）压力为379.21 kPa，辅助加热气（GS2）压力为413.69 kPa，离子源温度为550 ℃。9个成分质谱条件见表1。

2.2　溶液的制备

2.2.1　对照品溶液的制备　精密称取对照品东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮素、秦皮苷、秦皮甲素、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸和绿原酸，溶于甲醇（微量二甲基亚砜）中制备成质量浓度为2 $mg\cdot mL^{-1}$的

表1　宁夏枸杞中香豆素类和苯丙酸类9个成分的质谱检测参数

化合物	t_R/min	母离子 *m/z*	子离子 *m/z*	去簇电压/V	碰撞电压/V	碰撞室射出电压/V
秦皮甲素	4.18	339.0	177.0	−60	−25	−15
东莨菪苷	4.71	355.3	193.0	85	10	10
绿原酸	5.00	353.1	191.0	−80	−20	−10
秦皮苷	5.30	369.0	207.2	−100	−25	−14
咖啡酸	5.91	179.0	135.0	−80	−20	−10
秦皮素	6.90	207.0	192.0	−60	−20	−14
对香豆酸	7.58	163.0	119.0	−60	−20	−15
东莨菪内酯	7.74	191.0	176.1	−60	−20	−14
阿魏酸	7.84	193.0	134.0	−60	−20	−10

对照品储备液。精密吸取9个化合物的对照品储备液，用20%甲醇配制成质量浓度为1.00 μg·mL^{-1}的混合对照品溶液。

2.2.2　供试品溶液的制备　样品烘干，打粉过筛（60目），再次将粉末烘至恒重。精密称取样品50.00 mg，加入80%甲醇配制成50.00 mg·mL^{-1}的母液。涡旋3 min（2500 r·min^{-1}），超声提取20 min（100 Hz，200 W，20 ℃），涡旋3 min（2500 r·min^{-1}），离心10 min（8 ℃、13 000 r·min^{-1}，离心半径为9.57 cm），取上清液加入适量20%甲醇稀释后（稀释倍数参考线性范围，保证待测样品测定值符合线性范围），再次离心10 min（8 ℃、13 000 r·min^{-1}，离心半径为9.57 cm），上清液作为供试品溶液。

2.3　方法学考察

2.3.1　专属性考察　取混合对照品溶液及供试品溶液，按**2.1**项下条件进样，即可得各待测成分的总离子流色谱（TIC）图，进行离子对选择后得到各成分的提取离子色谱（XIC）图，见图2。

2.3.2　线性关系和检测限、定量限考察　精密吸取**2.2.1**项下混合对照品溶液，用20%甲醇梯度稀释为0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00、200.00、500.00、1 000.00 ng·mL^{-1}的16个不同质量浓度混合对照品溶液。按照**2.1**项下条件进样分析，以峰面积为纵坐标（Y），对应的质量浓度为横坐标（X）绘制标准曲线，以信噪比（S/N）=10的进样质量浓度为定量限（LOQ），以S/N=3的进样质量浓度为检测限（LOD），结果见表2。

2.3.3　精密度试验　精密吸取**2.2.1**项下混合对照品溶液，用20%甲醇分别配制25.00、250.00 ng·mL^{-1} 2个质量浓度的混合对照品溶液，分别连续进样6次，记录峰面积。结果显示，东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮素、秦皮苷、秦皮甲素、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸和绿原酸在25.00 ng·mL^{-1}时峰面积的RSD分别为1.80%、4.52%、2.44%、1.55%、0.48%、1.52%、2.68%、1.30%、6.10%；在250.00 ng·mL^{-1}时峰面积的RSD分别为0.30%、2.49%、0.75%、0.96%、1.15%、2.23%、0.84%、1.09%、2.11%，结果表明仪器精密度良好。

2.3.4　稳定性试验　取同一份供试品溶液，分别于进样室（10 ℃）和室温（22 ℃）保存，将进样室内的供试品溶液依次于0、2、4、8、16、24 h进样测定，室温下的供试品溶液放置24 h后进样测定。结果显示，东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮素、秦皮苷、秦皮甲素、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸和绿原酸峰面积的RSD分别为1.26%、1.89%、5.22%、1.77%、1.71%、2.12%、3.07%、1.27%、1.75%，结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.5　重复性试验　精密称取6份同一批样品，按照**2.2.2**项下方法制备供试品溶液，按照**2.1**项下条件进样分析。结果显示，东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮素、秦皮苷、秦皮甲素、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸、绿原酸的平均质量分数分别为81.40、368.67、0.22、0.35、0.04、43.58、53.07、12.87、180.33 μg·g^{-1}，RSD分别为0.90%、2.23%、4.44%、7.11%、2.24%、2.63%、1.34%、1.36%、1.52%，结果表明该方法重复性良好。

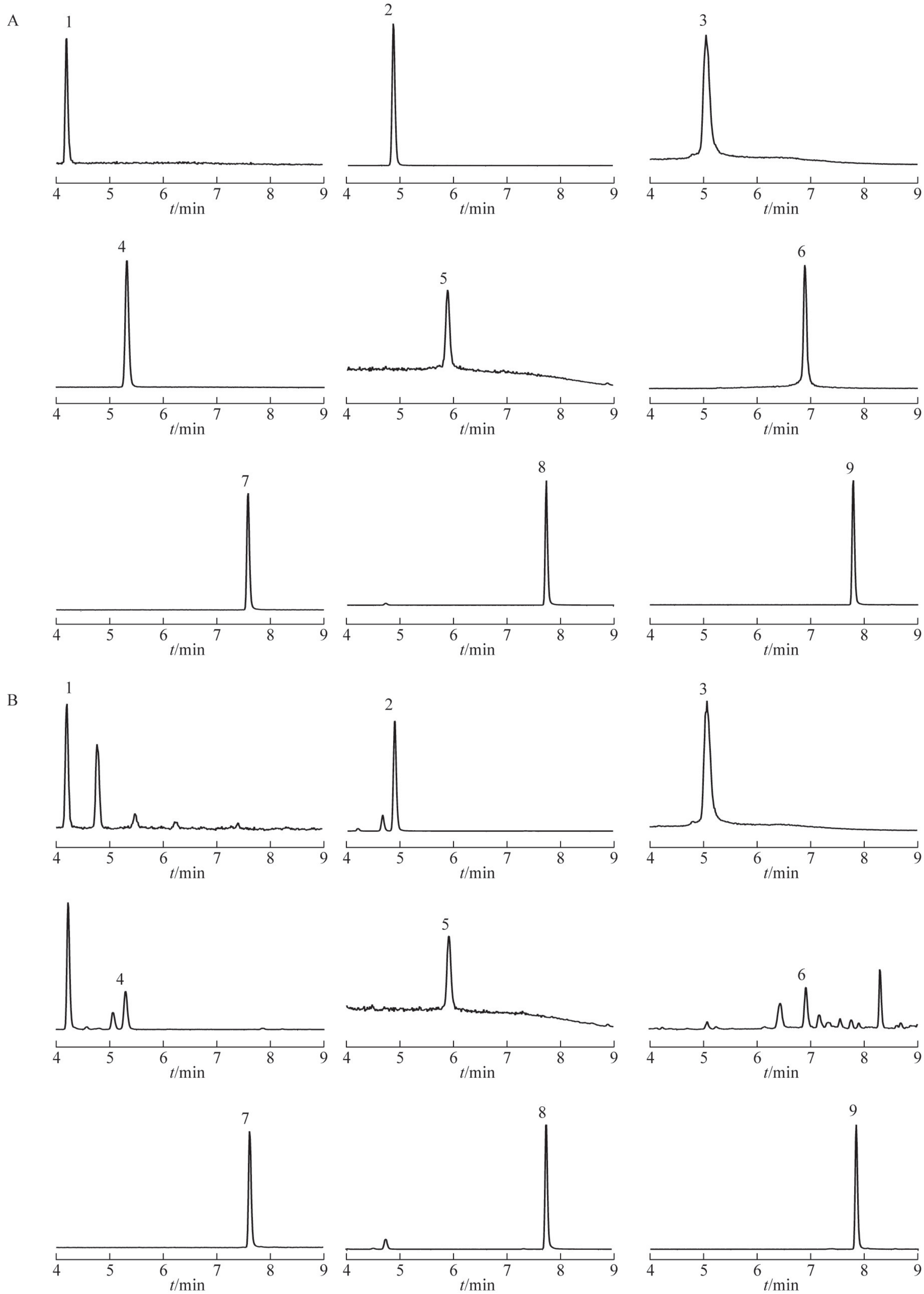
2.3.6　加样回收率试验　将**2.2.1**项下2.00 mg·mL^{-1}的对照品储备液分别用80%甲醇稀释成东莨菪内酯、东莨菪苷、秦皮素、秦皮苷、秦皮甲素、咖啡酸、阿魏酸、对香豆酸和绿原酸质量浓度依次为20.00、20.00、0.20、0.20、0.02、20.00、20.00、2.00、20.00 μg·mL^{-1}的对照品溶液。精密称取已知含量的样品粉末12份，其中6份按照目标成分约100%的含量精密加入相应质量浓度的对照品溶液，按**2.2.2**项下方法同时制备样品供试品溶液及加标样供试品溶液，在**2.1**项下条件测定分析，计算回收率及RSD，见表3。

2.4　统计学方法

采用SPSS 21.0数据处理软件对同一种植基地采集的30份不同种植方式下宁夏枸杞不同部位样品中9个成分含量进行分析，绘制柱形图。其中不同部位样品方差分析采用单因素ANOVA法，方差齐时用S-N-K进行两两比较，方差不齐时用Games-Howell进行两两比较；不同种植方式样品方差分析采用独立样本t检验法。

2.5　不同种植方式下宁夏枸杞不同部位中香豆素类和苯丙酸类成分含量测定

2.5.1　宁夏枸杞不同部位各成分含量　各成分在宁夏枸杞不同部位含量分布差异有统计学意义（图3），东莨菪内酯、秦皮素、秦皮甲素主要分布于青果和叶片中，其中以东莨菪内酯质量分数最高，为242.33~396.00 μg·g^{-1}，且随果实成熟其质量分数显著降低，



注：A. 混合对照品溶液；B. 供试品溶液；1. 秦皮甲素；2. 东莨菪苷；3. 绿原酸；4. 秦皮苷；5. 咖啡酸；6. 秦皮素；7. 对香豆酸；8. 东莨菪内酯；9. 阿魏酸。

图 2　混合对照品溶液和宁夏枸杞供试品溶液的 XIC 图

表2　宁夏枸杞中香豆素类和苯丙酸类9个成分的回归方程、线性范围、LOD和LOQ

成分	线性方程	r	线性范围/ng·mL^{-1}	LOD/ng·mL^{-1}	LOQ/ng·mL^{-1}
东莨菪内酯	Y=71 700 X－270	0.998 9	0.05~1 000.00	0.02	0.09
东莨菪苷	Y=35 100 X+1340	0.999 2	0.20~1 000.00	0.01	0.02
秦皮素	Y=43 900 X－8750	0.993 1	0.50~1 000.00	0.10	0.21
秦皮苷	Y=45 800 X－927	0.999 7	0.20~1 000.00	0.13	0.50
秦皮甲素	Y=77 300 X+845	0.999 8	0.10~1 000.00	0.05	0.15
咖啡酸	Y=65 200 X－38 700	0.996 2	5.00~1 000.00	5.77	21.51
阿魏酸	Y=27 400 X+354	0.999 3	0.05~1 000.00	0.05	0.15
对香豆酸	Y=185 000 X+16 300	0.998 6	0.50~500.00	0.12	0.35
绿原酸	Y=15 800 X－27 500	0.998 9	5.00~1 000.00	6.52	26.32

表3　宁夏枸杞中香豆素类和苯丙酸类9个成分的加样回收率结果

成分	样品中含量/ng	对照品加入量/ng	测得量/ng	平均回收率/%	RSD/%
东莨菪内酯	4 536.67	4 000.00	9 058.33	113.04	1.56
东莨菪苷	21 025.00	18 000.00	41 766.67	115.23	1.02
秦皮素	8.91	10.00	20.69	117.73	0.88
秦皮苷	19.66	18.00	42.89	115.93	2.79
秦皮甲素	1.87	2.00	4.34	123.36	3.77
咖啡酸	2 487.50	2 000.00	4 816.67	116.46	1.96
阿魏酸	2 665.00	2 500.00	5 483.33	112.73	1.98
对香豆酸	716.67	650.00	1 481.67	117.69	1.70
绿原酸	11 958.33	9 000.00	20 658.33	96.67	8.26

注：称样量均为50.00 mg。

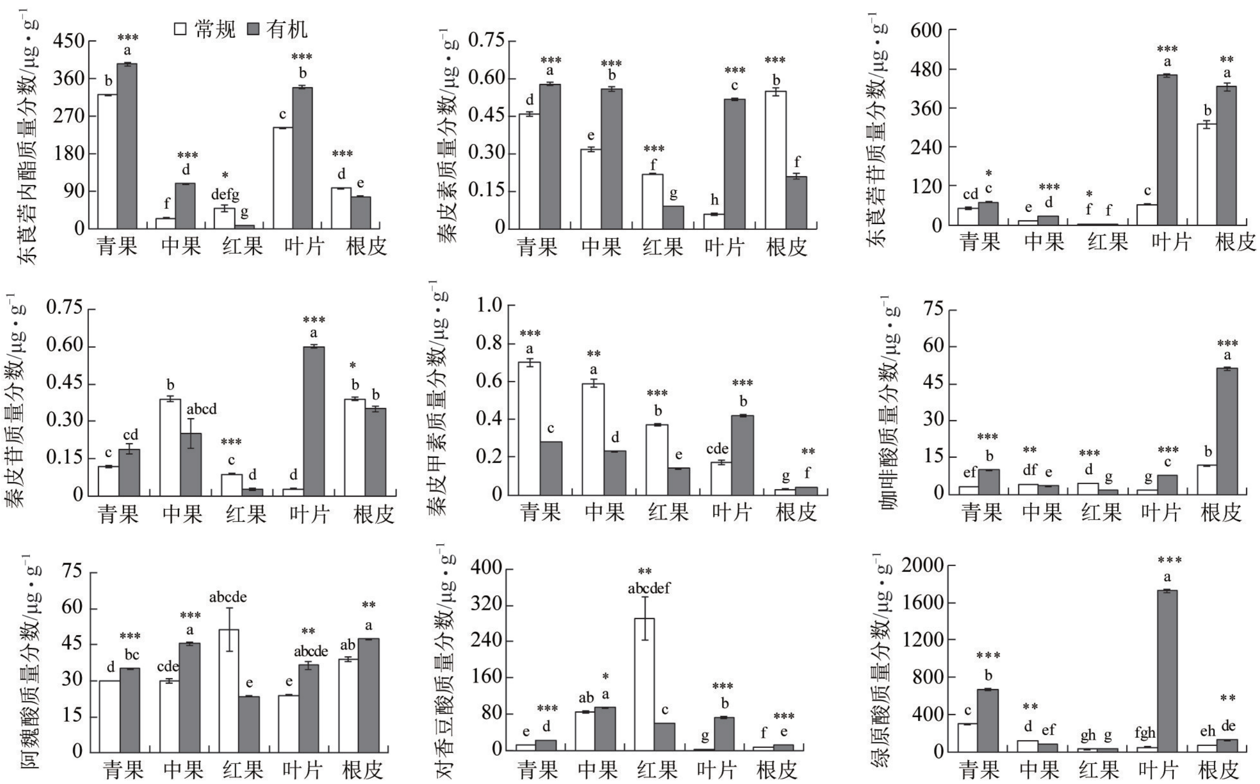
有机青果中东莨菪内酯（396.00 μg·g^{-1}）质量分数是有机红果（9.07 μg·g^{-1}）的43.7倍。秦皮苷、东莨菪苷主要分布于根皮和叶片中，其中东莨菪苷含量最高，质量分数为63.20~460.00 μg·g^{-1}，且随果实成熟其质量分数显著降低，有机青果中东莨菪苷（70.07 μg·g^{-1}）的质量分数是有机红果（0.15 μg·g^{-1}）的467.6倍。苯丙酸类成分分布规律不一致，咖啡酸主要分布于根皮中，质量分数为11.73~51.23 μg·g^{-1}；阿魏酸和对香豆酸主要分布于果实中，质量分数为11.63~291.00 μg·g^{-1}；绿原酸主要分布于叶片和青果中，质量分数为49.00~1 726.67 μg·g^{-1}。其中2个苯丙酸类化合物（阿魏酸和对香豆酸）在果实中的含量则随果实成熟而升高，常规红果中阿魏酸和对香豆酸（质量分数分别为51.20、291.00 μg·g^{-1}）分别比青果（质量分数分别为29.83、11.63 μg·g^{-1}）中质量分数高1.7、25.0倍，差异有统计学意义。

2.5.2　不同种植方式下宁夏枸杞各成分含量　不同种植方式下宁夏枸杞中香豆素类成分含量整体表现为有机种植高于常规种植，其中东莨菪内酯、秦皮素、东莨菪苷、秦皮苷在青果、中果和叶片中均表现为有机种植时含量高于常规种植。东莨菪苷在根皮中含量及秦皮甲素在叶片中含量也呈现出有机种植显著高于常规种植的特点。4个苯丙酸类成分在青果和根皮中也表现为有机种植时样品含量更高的特点，差异均有统计学意义，其他部位中没有明显一致性规律。

3　讨论

3.1　方法学考察结果

宁夏枸杞次生代谢物质种类众多，基质复杂，因此快速测定多个化合物具有一定的难度，本研究通过梳理文献，优化条件，成功建立了一次性定量测定多个物质的方法，且具有快速、稳定、准确的优点。本研究首次定量了宁夏枸杞中的秦皮素、秦皮苷和秦皮甲素，且可以实现东莨菪苷和其同分异构体绿原酸的高效分离，但检测方法在开发过程中也遇到了一些值得关注的问题：1）东莨菪苷与绿原酸相对分子质量完全相同，且在负离子模式下其质谱碎片、出峰时间完全一致，徐小昆等[38]用高效液相色谱法同时检测丁公藤属植物中这2个成分时出峰时间也非常接近，提示在检测这2个成分时应避免相互干扰而出现的假阳性结果。2）已有研究表明，拟南芥在碱性缺铁环境下根皮会分泌大量东莨菪内酯、东莨菪苷，少量秦皮素、秦皮苷和痕量秦皮甲素，虽然这些成分含量差异较大，但在植物铁吸收中均有重要作用[9-10,39-40]。本研究虽在宁夏枸杞中检出秦皮甲素，但其含量较东莨菪内酯与东莨菪苷低2~4个数量级，属痕量成分，在检测时因加入的枸杞提取液基质效应较强，导致本方法中秦皮甲素回收率偏高，但符合《中华人民共和国药典》2020年版（四部）“9101分析方法验证指导原则”中对基质复杂、组分质量分数低于0.01%及多成分等分析的要求，同时建议后续以该物质作为主要研究对



注：不同小写字母表示不同部位样品比较，P<0.05；同一部位2种种植方式样品间比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001。

图3　不同种植方式下宁夏枸杞不同部位中香豆素类和苯丙酸类9个成分质量分数（$\bar{x}\pm s$, n=3）

象时采用内标法以减轻基质干扰。

3.2　样品含量测定结果

基于本研究所建立的方法实现了对宁夏枸杞样品中香豆素类和苯丙酸类成分含量的定量检测，其中东莨菪内酯和东莨菪苷含量较高，而秦皮素、秦皮苷和秦皮甲素含量非常低，在枸杞这种复杂基质内讨论秦皮素、秦皮苷和秦皮甲素的含量差异意义不大。本研究中几种苯丙酸类成分含量分布无明显一致性规律，推测这与此类成分不仅为香豆素类成分合成提供前体，还在其他物质合成中扮演重要角色，且自身也具有一定生物活性有关[41]。

宁夏枸杞是药食同源植物，主要以干燥成熟果实（枸杞子）入药，深受广大消费者喜爱。本研究测得中宁县宁夏枸杞成熟红果中东莨菪内酯质量分数为48.87 μg·g^{-1}，东莨菪苷质量分数为2.96 μg·g^{-1}，咖啡酸质量分数为4.41 μg·g^{-1}，绿原酸质量分数为26.03 μg·g^{-1}，均低于Jarouche等[28]购自悉尼市场的宁夏枸杞果实（商品）中东莨菪内酯（330.00~2 170.00 μg·g^{-1}）、咖啡酸（0~240.00 μg·g^{-1}）及绿原酸（0~7 150.00 μg·g^{-1}）。与徐飞等[42]采自中宁县及购自宁夏药材公司的果实中东莨菪内酯质量分数（27.50~57.30 μg·g^{-1}）一致，而远低于其测定的东莨菪苷质量分数（59.5~167.6 μg·g^{-1}），推测这可能与果实成熟度有关，或与绿原酸干扰有关，有待进一步研究。

东莨菪内酯为茄科植物的重要植保素[12]，是植物遭受病虫侵害时产生的一类防御性次生代谢物质，通常积累于植物亟须保护的幼嫩部位，如未成熟的果实中[43-44]。本研究结果显示青果中东莨菪内酯含量最高，并随果实成熟含量降低，推测东莨菪内酯是保护枸杞青果免受病虫侵害的重要植保素物质。

此外，有研究证实植物通常由根系合成香豆素糖苷化合物，传输至地上部分以香豆素糖苷形式储存于细胞液泡中[8]，当植物受到逆境胁迫时液泡中的香豆素糖苷可以快速转化为香豆素苷元以应对环境胁迫[11]，发挥杀虫[19]、抗菌[16]等作用。本研究发现常规种植条件下宁夏枸杞根皮中东莨菪苷含量高于东莨菪内酯，而在叶片中东莨菪内酯含量高于东莨菪苷，推测这与枸杞叶片亟须抵抗枸杞木虱、枸杞瘿螨、白粉病等病虫害有关[45]，这与杨孟可等[46]研究发现枸杞瘿螨为害后枸杞叶片中东莨菪内酯含量显

著上升的研究结果一致。

有机种植是按照有机标准[47]生产，不使用人工合成的肥料、农药、生长调节剂等物质，对于容易遭受病虫为害的宁夏枸杞而言，有机生产方式下，因其营养相对匮乏，病虫害更加严重。本研究显示，有机种植方式下宁夏枸杞中香豆素类次生物质含量均较高，因此，推测有机种植方式下宁夏枸杞通过根系合成分泌香豆素类成分以提高植株营养吸收能力，并通过提高叶片香豆素类成分含量应对病虫害。

4 小结

药用植物的活性成分主要来自于植物逆境胁迫下所产生的次生物质[48]，次生物质种类及其含量通常还决定了药材的质量及道地性[49]。香豆素类次生代谢物质在植物适应环境中发挥着重要作用[40]，本研究在宁夏枸杞青果、中果、红果、叶片及根皮中均检测到多种香豆素类成分，其中以东莨菪内酯及其糖基化合物东莨菪苷含量最高，这与目前植物界香豆素类物质分布规律相符[10-11,50]，此外，东莨菪内酯和东莨菪苷是枸杞子及地骨皮中具有抗癌作用的重要药理活性成分[25,31,51]，因而本研究结果可以为宁夏枸杞药用资源综合开发利用提供参考，同时对深入研究香豆素类等物质在宁夏枸杞环境适应中的生态作用具有重要意义。

参考文献

[1] 陈雅林，谭芳，彭勇．枸杞叶的研究进展[J]．中国药学杂志，2017，52(5)：358-361.

[2] 国家药典委员会．中华人民共和国药典：一部[M]．北京：中国医药科技出版社，2020：128，260.

[3] 温淑萍，周涵，张静．我国枸杞市场与产业调查分析报告[J]．农产品市场，2021(4)：52-54.

[4] 钱丹，赵振宇，马帅，等．我国枸杞的国际贸易情况及问题分析[J]．中国中药杂志，2019，44(13)：2880-2885.

[5] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会．中国植物志：第42卷[M]．北京：科学出版社，1993：13.

[6] 梁晓婕，王亚军，李越鲲，等．枸杞对盐碱胁迫响应机制的研究进展[J]．宁夏农林科技，2020，61(8)：20-23.

[7] MATOS M J, SANTANA L, URIARTE E, et al. Phytochemicals-Isolation, Characterisation and Role in Human Health[M]. London: InTech, 2015: 113.

[8] STASSEN M J J, HSU S H, PIETERSE C M J, et al. Coumarin communication along the microbiome-root-shoot axis[J]. Trends Plant Sci, 2021, 26(2): 169-183.

[9] ROBE K, CONEJERO G, GAO F, et al. Coumarin accumulation and trafficking in *Arabidopsis thaliana*: A complex and dynamic process[J]. New Phytol, 2021, 229(4): 2062-2079.

[10] SCHMID N B, GIEHL R F H, DÖLL S, et al. Feruloyl-CoA 6′-hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2014, 164(1): 160-172.

[11] STRINGLIS I A, DE JONGE R, PIETERSE C M J. The age of coumarins in plant-microbe interactions[J]. Plant Cell Physiol, 2019, 60(7): 1405-1419.

[12] AHUJA I, KISSEN R, BONES A M. Phytoalexins in defense against pathogens[J]. Trends Plant Sci, 2012, 17(2): 73-90.

[13] GÁLIS I, SIMEK P, VAN ONCKELEN H A, et al. Resistance of transgenic tobacco seedlings expressing the *Agrobacterium tumefaciens C58-6b* gene, to growth-inhibitory levels of cytokinin is associated with elevated IAA levels and activation of phenylpropanoid metabolism[J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43(8): 939-950.

[14] JEANDET P, CLÉMENT C, COUROT E, et al. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7): 14136-14170.

[15] BEYER S F, BEESLEY A, ROHMANN P F W, et al. The *Arabidopsis* non-host defence-associated coumarin scopoletin protects soybean from Asian soybean rust[J]. Plant J, 2019, 99(3): 397-413.

[16] SUN G X, STREBL M, MERZ M, et al. Glucosylation of the phytoalexin *N*-feruloyl tyramine modulates the levels of pathogen-responsive metabolites in *Nicotiana benthamiana*[J]. Plant J, 2019, 100(1): 20-37.

[17] LESZCZYNSKI B, TJALLINGII W F, DIXON A F G, et al. Effect of methoxyphenols on grain aphid feeding behaviour[J]. Entomol Exp Appl, 1995, 76(2): 157-162.

[18] VERA N, POPICH S, LUNA L, et al. Toxicity and synergism in the feeding deterrence of some coumarins on *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. Chem Biodivers, 2006, 3(1): 21-26.

[19] ZHOU H, ZHANG Y Q, LAI T, et al. Acaricidal mechanism of scopoletin against *Tetranychus cinnabarinus*[J]. Front Physiol, 2019, 10: 164.

[20] LOWENTHAL J, BIRNBAUM H. Vitamin K and coumarin anticoagulants: Dependence of anticoagulant effect on inhibition of vitamin K transport[J]. Science, 1969, 164(3876): 181-183.

[21] MENEZES J C, DIEDERICH M. Translational role of natural coumarins and their derivatives as anticancer agents[J]. Future Med Chem, 2019, 11(9): 1057-1082.

[22] MISHRA S, PANDEY A, MANVATI S. Coumarin: An emerging antiviral agent[J]. Heliyon, 2020, 6(1): e03217.

[23] BANSAL Y, SETHI P, BANSAL G. Coumarin: A potential nucleus for anti-inflammatory molecules[J]. Med Chem Res, 2013, 22(7): 3049-3060.

[24] CARNEIRO A, MATOS M J, URIARTE E, et al. Trending topics on coumarin and its derivatives in 2020[J]. Molecules, 2021, 26(2): 501.

[25] POTTERAT O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity[J]. Planta Med, 2010, 76(1): 7-19.

[26] 陈靖枝，卢星，胡运琪，等. 传统中药地骨皮化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志，2021，46(12)：3066-3075.

[27] FORINO M, TARTAGLIONE L, DELL'AVERSANO C, et al. NMR-based identification of the phenolic profile of fruits of *Lycium barbarum* (goji berries). Isolation and structural determination of a novel *N*-feruloyl tyramine dimer as the most abundant antioxidant polyphenol of goji berries[J]. Food Chem, 2016, 194: 1254-1259.

[28] JAROUCHE M, SURESH H, HENNELL J, et al. The quality assessment of commercial *Lycium* berries using LC-ESI-MS/MS and chemometrics[J]. Plants (Basel), 2019, 8(12): 604.

[29] 高聪. 宁夏枸杞籽化学成分的研究[D]. 绵阳：西南科技大学，2016.

[30] 魏秀丽，梁敬钰. 地骨皮化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报，2002，33(4)：271-273.

[31] TANG W M, CHAN E, KWOK C Y, et al. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit[J]. Inflammopharmacology, 2012, 20(6): 307-314.

[32] WANG Y, ZHAO B, MA H R, et al. Two new sesquiterpenoid glycosides from the leaves of *Lycium barbarum*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2016, 18(9): 871-877.

[33] 刘雪莉，孙静芸，李洪玉，等. 枸杞子抑制人前列腺细胞增殖活性成分的提取与分离[J]. 中国中药杂志，2000，25(8)：481-483.

[34] 刘王锁，石建宁，郭永恒，等. 宁夏野生枸杞资源现状[J]. 浙江农业科学，2013，54(1)：17-21.

[35] 徐常青，刘赛，徐荣，等. 我国枸杞主产区生产现状调研及建议[J]. 中国中药杂志，2014，39(11)：1979-1984.

[36] 李建领，刘赛，徐常青，等. 宁夏枸杞主要害虫发生规律与防治策略[J]. 中国现代中药，2017，19(11)：1599-1604.

[37] 于丽，周兴隆，张增福，等. 宁夏枸杞用药现状及规范农药使用的建议[J]. 农药科学与管理，2019，40(8)：20-26.

[38] 徐小昆，陈志永，廖立平，等. 丁公藤属植物中东莨菪苷、绿原酸、东莨菪素、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的含量测定[J]. 中国中药杂志，2015，40(6)：1119-1122.

[39] HARBORT C J, HASHIMOTO M, INOUE H, et al. Root-secreted coumarins and the microbiota interact to improve iron nutrition in *Arabidopsis*[J]. Cell Host Microbe, 2020, 28(6): 825-837.

[40] ROBE K, IZQUIERDO E, VIGNOLS F, et al. The coumarins: Secondary metabolites playing a primary role in plant nutrition and health[J]. Trends Plant Sci, 2021, 26(3): 248-259.

[41] 包伊凡，沈新春，汪芳. 咖啡酸及其主要衍生物的研究进展及开发前景[J]. 天然产物研究与开发，2018，30(10)：1825-1833.

[42] 徐飞，王晓中，张雷，等. HPLC测定宁夏枸杞中东莨菪素和东莨菪苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2012，18(13)：67-70.

[43] SIEGMUND B, LEITNER E, PFANNHAUSER W. Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(8): 3113-3120.

[44] SCHMITZER V, SIRCELJ H, STAMPAR F, et al. Physicochemical characterization of *Cornus kousa* Burg. fruit: Determining optimal maturity for fresh consumption[J]. J Sci Food Agric, 2021, 101(2): 778-785.

[45] 刘赛，徐常青，陈君. 枸杞病虫害防治技术[M]. 北京：中国农业科学技术出版社，2018：4，12-18.

[46] 杨孟可，刘赛，李建领，等. 枸杞瘿螨致瘿后宁夏枸杞叶片代谢组学分析[J]. 中国中药杂志，2020，45(12)：2842-2846.

[47] 国家市场监督管理总局，国家标准化管理委员会. 有机产品生产、加工、标识与管理体系要求：GB/T 19630—2019[S]. 北京：中国标准出版社，2019.

[48] 王升，蒋待泉，康传志，等. 药用植物次生代谢在中药材生态种植中的作用及利用[J]. 中国中药杂志，2020，45(9)：2002-2008.

[49] 黄璐琦，郭兰萍. 环境胁迫下次生代谢产物的积累及道地药材的形成[J]. 中国中药杂志，2007，32(4)：277-280.

[50] KAI K, SHIMIZU B I, MIZUTANI M, et al. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*[J]. Phytochemistry, 2006, 67(4): 379-386.

[51] PERKOWSKA I, SIWINSKA J, OLRY A, et al. Identification and quantification of coumarins by UHPLC-MS in *Arabidopsis thaliana* natural populations[J]. Molecules, 2021, 26(6): 1804.

（收稿日期：2022-03-07　编辑：田苗）