

基于特征脂肪酸的中药海藻鉴别研究

耿玺承¹, 马善鹏^{1,2}, 陈嘉鹏¹, 陈璐晶¹, 林立东^{3*}, 刘红兵^{1,2,4*} (1. 中国海洋大学, 海洋药物教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 海洋药物与生物制品功能实验室, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 山东 青岛 266237; 3. 温州市洞头区海洋与渔业发展研究中心, 浙江 温州 325700; 4. 国家药品监督管理局海洋中药质量研究与评价重点实验室, 山东 青岛 266000)

摘要:目的 利用植物脂质组学和化学分类学开展羊栖菜与其同属易混马尾藻的鉴别研究。方法 收集 27 批羊栖菜, 靶向建立了脂肪酸气相色谱-质谱(GC-MS)指纹图谱; 运用主成分分析、正交偏最小二乘判别分析等化学模式识别方法, 比较了羊栖菜与同属其他 8 种 22 批马尾藻, 建立了海藻饮片判别模型; 基于羊栖菜与其他马尾藻的差异脂肪酸, 结合脂肪酸合成途径分析, 筛选质量标志物。结果 指纹图谱共标定 29 个共有脂肪酸, 相似度均大于 0.96。化学模式识别法能够很好区分羊栖菜与同属其他 8 种 22 批马尾藻, 以此建立的判别模型能够准确验证 15 批市售海藻饮片。结合差异脂肪酸与脂肪酸合成途径分析, 发现单不饱和脂肪酸在化学分类中的重要作用, 提出比值 C20:1 n-9/C16:1 n-7 可作为羊栖菜鉴别的候选质量标志物, 14 批市售海藻饮片可被准确验证。结论 本研究建立了羊栖菜与同属易混马尾藻的判别模型, 发现了脂肪酸质量标志物, 为中药海藻真伪鉴别方法的制定提供参考。

关键词: 中药海藻; 羊栖菜; 脂肪酸; 化学分类学; 质量标志物

doi:10.11669/cpj.2024.10.005 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)10-0887-09

Chemical Identification of TCM Sargassum Based on Characteristic Fatty Acids

GENG Xicheng¹, MA Shanpeng^{1,2}, CHEN Jiapeng¹, CHEN Lujing¹, LIN Lidong^{3*}, LIU Hongbing^{1,2,4*} (1. Key Laboratory of Marine Drugs, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 3. Marine and Fishery Development Research Center of Dongtou District, Wenzhou 325700, China; 4. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Marine Traditional Chinese Medicine, Qingdao 266000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the identification of *Sargassum fusiforme* and other sargassos (algae from the genus *Sargassum*) by targeted lipidomics combined with chemotaxonomy methods. **METHODS** Twenty-seven batches of *S. fusiforme* were collected and the GC-MS fingerprint of fatty acids (FAs) was established. The principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to compare *S. fusiforme* with other 8 species, total 22 batches of sargassos. Based on the differential FAs between *S. fusiforme* and other sargassos, combined with the analysis of FA biosynthesis pathway, the Q-marker was screened. **RESULTS** A total of 29 common FAs were identified by the fingerprint, and the similarity was greater than 0.96. The chemical pattern recognition method can well distinguish *S. fusiforme* from other 8 species, and the discrimination model established by this method can accurately verify 15 batches of commercial slices. Based on the analysis of differential FAs and FA biosynthesis pathway, monounsaturated fatty acid was found to play an important role in chemical classification. The ratio C20:1 n-9/C16:1 n-7 was proposed to be used as a candidate Q-marker for the identification of *S. fusiforme* and 14 batches of commercial slices can be accurately verified. **CONCLUSION** This study establishes the identification model of *S. fusiforme* and other confused sargassos, finds the Q-marker of FAs, and provides a reference for the establishment of the identification method of TCM SARGASSUM.

KEY WORDS: TCM sargassum; *Sargassum fusiforme*; fatty acid; chemotaxonomy; Q-marker

中药海藻(sargassum)始载于《神农本草经》,性寒、味咸,功能软坚散结,消痰利水,常用于治疗高血脂、冠心病、肿瘤、乳腺增生、淋巴结核等^[1-4],近年来

受到国内外学者较多关注^[5-9]。据 2020 年版《中国药典》一部,中药海藻为褐藻门马尾藻属(*Sargassum*)海蒿子[*S. pallidum* (Turn.) C. Ag]或羊栖菜

基金项目:国家自然科学基金项目资助(81973433);国家药品监督管理局海洋中药质量研究与评价重点实验室课题资助(HYZY-ZZKT-2022002);青岛海洋科技中心专项资助(2022QNL030003-2)

作者简介:耿玺承,女,硕士研究生 研究方向:海洋中药 * 通讯作者:林立东,男,博士,高级工程师 研究方向:基础生物学 Tel: (0577)59386761;刘红兵,女,博士,教授,博士生导师 研究方向:海洋中药药效物质及质量评价研究 Tel: (0532)82031823

[*S. fusiforme* (Harv.) Setch]的干燥藻体。其中,羊栖菜是历史习用品种^[2-3],近年来养殖产量持续位居我国海水藻类第五位^[10],已成为中药海藻的主流药用品种。

马尾藻属(*Sargassum*)在我国沿海物种多样性丰富^[11-12],但这也导致海藻药材品种较为混乱,常见伪品有同属的鼠尾藻、铜藻、海黍子等^[13-15]。马尾藻属物种鉴定一直是藻类分类学研究的难点,因藻体形态和器官组织结构相近、叶和气囊表型随环境变化,生理特征趋同等特点,使得传统的性状鉴别、显微鉴别等方法很难直接鉴定到该属具体物种。DNA分子标记技术准确可靠,尽管已有关于马尾藻属分类修订的研究^[16-17],但距离形成海藻药材DNA分子鉴定体系尚远。鉴于目前海藻真伪鉴别方法有限,课题组聚焦主流品种羊栖菜,从植物脂质组学和化学分类学的角度展开真实性评价相关的理化鉴别研究。

脂质在生物学过程中发挥着广泛而重要的作用。作为代谢组学的分支之一,脂质组学研究在中药药效物质及作用机制研究中已有较多应用^[18]。植物脂质组学能够系统解析植物体脂质组成与表达变化,但甚少见有基于植物脂质组学的中药鉴定研究。马尾藻属的脂质主要包括脂肪酸及其衍生脂(磷脂、糖脂、甘油酯等)、甾醇以及类胡萝卜素类等,具有抗氧化、降血脂、抗炎免疫等生物活性^[19]。其中,脂肪酸是人体营养和健康所必需成分^[20],是重要的活性成分。目前已有脂肪酸作为大型海藻分类标记物的报道^[21-23],本研究基于前期工作聚焦脂肪酸^[24],靶向建立了羊栖菜气相色谱-质谱(GC-MS)指纹图谱,通过化学模式识别比较羊栖菜与同属其他马尾藻的差异,基于脂肪酸生合成途径探讨可用于鉴别羊栖菜的候选质量标志物,以期为中药海藻真伪鉴别提供简单、准确、快速的方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Trace 1300 型气相色谱-ISQ 型单四级杆质谱联用系统(美国 Thermo Fisher 公司);Omegawax 250 毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm, 美国 Supelco 公司);SOX-606 型脂肪测定仪(山东海能科学仪器有限公司);MS3 basic 型涡旋振荡器(广东 IKA 公司);BSM-2204 型电子天平(上海卓精电子科技有限公司)。

1.2 试剂

37 种脂肪酸甲酯混标(纯度 > 99%, 批号

XA22213V, 美国 Sigma-Aldrich 公司);天然鱼油(澳大利亚 Swisse 公司, 每 1 500 mg 天然鱼油中含二十二碳六烯酸 180 mg 和二十二碳五烯酸 270 mg)。正己烷为色谱纯;二氯甲烷、甲醇、浓盐酸、氢氧化钾为分析纯。

1.3 药材

共收集羊栖菜 27 批,同属其他 8 种马尾藻共 22 批。其中,羊栖菜(*S. fusiforme*)、鼠尾藻(*S. thunbergii*)以及铜藻(*S. horneri*)(温州市洞头区海洋与渔业发展研究中心林立东高工提供并鉴定);海蒿子(*S. pallidum*)和海黍子(*S. miyabei*)(中国科学院海洋所孙忠民博士提供并鉴定);少囊马尾藻(*S. oligocystum*)、匍枝马尾藻(*S. polycystum*)、冬青叶马尾藻(*S. ilicifolium*)、宾德马尾藻(*S. binderi*)(泰国农业大学 Mr. Nattasak Suwannasingha 和 Dr. Jantana Praiboon 提供并鉴定)。海藻饮片 15 批(市售),经中国海洋大学刘红兵教授鉴定,具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

供试品溶液的制备:取海藻粉末约 0.75 g,精密称定后,置于脂肪测定仪,加入二氯甲烷-甲醇(2:1) 120 mL, 90 °C 提取 10 次;提取液减压浓缩,干燥得总脂。取总脂,加入 1 mol · L⁻¹ 的 KOH 甲醇溶液 1 mL, 70 °C 热皂化 10 min;再加入 1 mol · L⁻¹ 盐酸甲醇溶液 2 mL, 甲酯化衍生 10 min。在反应液中加入 400 μL 去离子水和 600 μL 正己烷,混匀,吸取有机层;共萃取 3 次,合并有机层,即得供试品溶液。4 °C 保存,待 GC-MS 分析。

对照品溶液的制备:取 25 μL 鱼油,按供试品溶液制备方法进行皂化和衍生化后,取 10 μL, 加入 10 μL 37 种脂肪酸甲酯混标和 20 μL 正己烷,混匀,即得脂肪酸甲酯对照品溶液。

2.2 GC-MS 条件

使用 Omegawax 250 毛细管色谱柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm, 美国 Supelco 公司)。进样口温度 250 °C, 炉温 180 °C;采用程序升温,初始温度设定 180 °C 并保持 3 min,再以 2.5 °C · min⁻¹ 升至 240 °C, 保持 2 min。载气为氦气,流速为 1 mL · min⁻¹;采用分流模式,分流比为 20:1;进样体积 1 μL。质谱离子源为 EI 源,温度 280 °C, 能量 70 eV, 全扫描模式,范围 *m/z* 35 ~ 550。使用 Xcalibur 2.0 处理原始数据,采用面积归一化法计算色谱峰相对含量。

表 1 马尾藻药材及中药海藻饮片样品信息表

Tab. 1 Information of sample of sargassos and Sargassum slices

Sample	Sample number	Place of origin (in Chinese)	Acquisition time	Notes
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF01	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2021. 01	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF02	Rongcheng, Shandong, China(中国山东荣成)	2021. 01	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF03	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2021. 01	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF04	Nan'ao, Guangdong, China(中国广东南澳)	2020. 02	Cultured
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF05	Rongcheng, Shandong, China(中国山东荣成)	2020. 02	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF06	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 02	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF07	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 02	Cultured strain-1
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF08	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 02	Cultured strain-2
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF09	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 02	Cultured strain-3
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF10	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 03	Cultured strain-1
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF11	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 03	Cultured strain-2
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF12	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 03	Cultured strain-3
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF13	Nan'ao, Guangdong, China(中国广东南澳)	2020. 03	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF14	Rongcheng, Shandong, China(中国山东荣成)	2020. 03	Cultured
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF15	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 03	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF16	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 04	Cultured strain-1
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF17	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 04	Cultured strain-2
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF18	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 04	Cultured strain-3
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF19	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 05	Cultured strain-1
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF20	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 05	Cultured strain-2
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF21	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 05	Cultured strain-3
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF22	Nan'ao, Guangdong, China(中国广东南澳)	2020. 12	Cultured
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF23	Rongcheng, Shandong, China(中国山东荣成)	2020. 12	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF24	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 12	Cultured
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF25	Nan'ao, Guangdong, China(中国广东南澳)	2020. 12	Cultured
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF26	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 12	Wild
<i>Sargassum fusiforme</i>	SF27	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 12	Cultured
<i>S. pallidum</i>	SPA01	Yantai, Shandong, China(中国山东烟台)	2022. 06	Wild
<i>S. pallidum</i>	SPA02	Yantai, Shandong, China(中国山东烟台)	2022. 06	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST01	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2021. 01	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST02	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 01	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST03	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 02	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST04	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 03	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST05	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 04	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST06	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 06	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST07	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2022. 05	Wild
<i>S. thunbergii</i>	ST08	Qingdao, Shandong, China(中国山东青岛)	2022. 05	Wild
<i>S. horneri</i>	SH01	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 02	Wild
<i>S. horneri</i>	SH02	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 03	Wild
<i>S. horneri</i>	SH03	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 04	Wild
<i>S. horneri</i>	SH04	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 05	Wild
<i>S. horneri</i>	SH05	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2020. 06	Wild
<i>S. horneri</i>	SH06	Wenzhou, Zhejiang, China(中国浙江温州)	2022. 05	Wild
<i>S. miyabei</i>	SM01	Yantai, Shandong, China(中国山东烟台)	2022. 05	Wild
<i>S. oligocystum</i>	S001	Trat, Thailand(泰国达叻)	2019. 02	Wild
<i>S. oligocystum</i>	S002	Trat, Thailand(泰国达叻)	2019. 02	Wild
<i>S. polycystum</i>	SP01	Chonburi, Thailand(泰国春武里)	2019. 02	Wild
<i>S. ilicifolium</i>	SI01	Ranong, Thailand(泰国拉农)	2019. 01	Wild
<i>S. binderi</i>	SB01	Chantaburi, Thailand(泰国尖竹汶)	2019. 01	Wild
Sargassum slices	YP01	Shandong, China(中国山东)	2018. 05	<i>S. fusiforme</i>
Sargassum slices	YP02	Shandong, China(中国山东)	2019. 05	<i>S. fusiforme</i>
Sargassum slices	YP03	Shandong, China(中国山东)	2021. 05	<i>S. fusiforme</i>
Sargassum slices	YP04	Guangxi, China(中国广西)	2019. 05	<i>S. fusiforme</i>
Sargassum slices	YP05	Shandong, China(中国山东)	2015. 05	<i>S. crassifolium</i>
Sargassum slices	YP06	Zhejiang, China(中国浙江)	2019. 11	<i>S. thunbergii</i>
Sargassum slices	YP07	Shandong, China(中国山东)	2019. 12	<i>S. crassifolium</i>
Sargassum slices	YP08	Fujian, China(中国福建)	2019. 05	<i>S. miyabei</i>
Sargassum slices	YP09	Fujian, China(中国福建)	2017. 03	<i>S. sp.</i>
Sargassum slices	YP10	Zhejiang, China(中国浙江)	2019. 05	<i>S. fusiforme</i>
Sargassum slices	YP11	Zhejiang, China(中国浙江)	2019. 05	<i>S. fusiforme</i>
Sargassum slices	YP12	Zhejiang, China(中国浙江)	2018. 05	<i>S. fusiforme</i>
Sargassum slices	YP13	Zhejiang, China(中国浙江)	2020. 05	<i>S. thunbergii</i>
Sargassum slices	YP14	Shandong, China(中国山东)	2015. 05	<i>S. horneri</i>
Sargassum slices	YP15	Shandong, China(中国山东)	2015. 11	<i>S. horneri</i>

2.3 羊栖菜脂肪酸指纹图谱

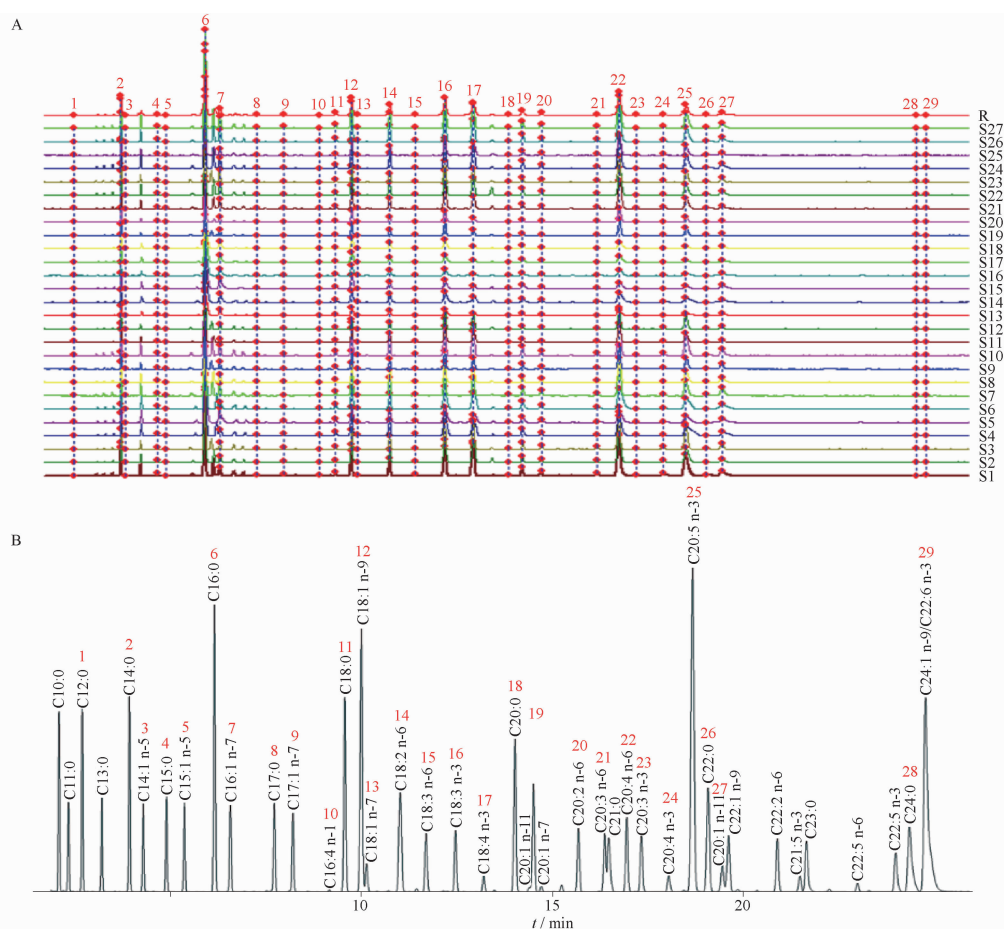
2.3.1 方法学考察 精密度实验:精密称取羊栖菜 SF13 粉末,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下条件连续进样 6 次,以 6 号峰(棕榈酸)为参照,计算共有峰的相对保留时间相对标准偏差(RSD)均小于 1.0%,相对峰面积 RSD 均小于 5.0%,表明仪器精密度良好。

重复性实验:精密称取羊栖菜 SF13 粉末,按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2”项下条件测定,以 6 号峰(棕榈酸)为参照,计算共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 1.0%,相对峰面积 RSD 均小于 5.0%,表明方法重复性良好。

稳定性实验:精密称取羊栖菜 SF13 粉末,分别于制备供试品溶液后 0、2、4、6、8、12、24 h 时,按“2.2”项下条件测定,以 6 号峰(棕榈酸)为参照,计算共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 1.0%,相对峰面积 RSD 均小于 5.0%,表明供试品溶液在 24 h

内稳定性良好。

2.3.2 指纹图谱建立 本研究收集的 27 批羊栖菜样品包括野生品种及养殖品种(又分为 3 个品系);采收时间从 12 月至第二年 5 月收菜,涵盖了羊栖菜藻体的主要生长时期;产地分布从南至北,涉及广东、浙江、山东等 3 省主要产区,具有较强的代表性。取上述 27 批羊栖菜,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2”项下条件测定。将数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版),选择中位数矢量法、时间窗宽度为 0.1 min,经多点校正后进行峰匹配,生成对照指纹图谱,标定了 29 个脂肪酸共有峰,并通过与对照品比对进行鉴定(图 1)。其中,棕榈酸(C16:0,峰 6)保留时间居中、分离度良好,选定为参比峰。计算 27 批羊栖菜的指纹图谱与对照图谱的相似度,相似度大于 0.96,符合一致性要求。指纹图谱相似度结果提示,羊栖菜脂肪酸组成较为稳定。



A - 羊栖菜脂肪酸指纹图谱; B - 脂肪酸甲酯对照图谱峰; 峰 1 ~ 29 - 27 批羊栖菜共有脂肪酸峰; S1 ~ S27 - 羊栖菜 SF01 ~ SF27; R - 对照指纹图谱。

A - fatty acid fingerprint of *S. fusiforme*; B - chromatogram of fatty acid methyl ester reference substance peak; Peak 1 - 29 - common fatty acid peaks of 27 batches of *S. fusiforme*; S1 - S27 - *S. fusiforme* SF01 - SF27; R - reference fingerprint.

图 1 羊栖菜脂肪酸气相色谱-质谱(GC-MS)图

Fig. 1 GC-MS analysis on fatty acids of *S. fusiforme*

2.4 化学模式识别比较

2.4.1 主成分分析 取 22 批同属他种马尾藻, 按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下条件测定。以 29 个脂肪酸共有峰的相对含量为变量, 采用 SIMCA 14.1 对 27 批羊栖菜和 22 批同属马尾藻进行无监督模式的主成分分析

(principal component analysis, PCA), 前六个主成分累计方差贡献率 79.6%, 能够解释大部分样品信息的变化。从 PCA 得分图可见(图 2), 羊栖菜与大多数同属他种马尾藻可以明显分区; 不能与羊栖菜区分的 4 个马尾藻(ST01, ST02, ST04 和 ST05)均为鼠尾藻。

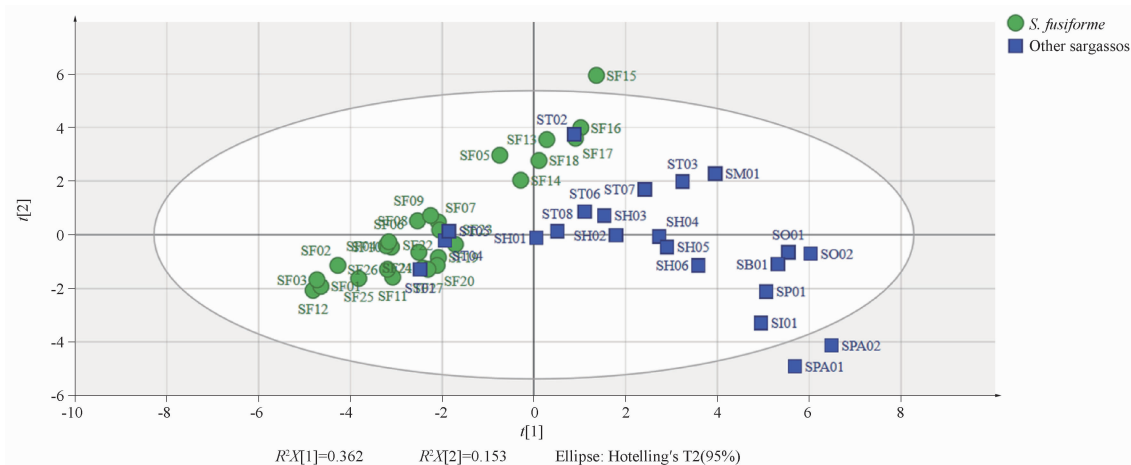
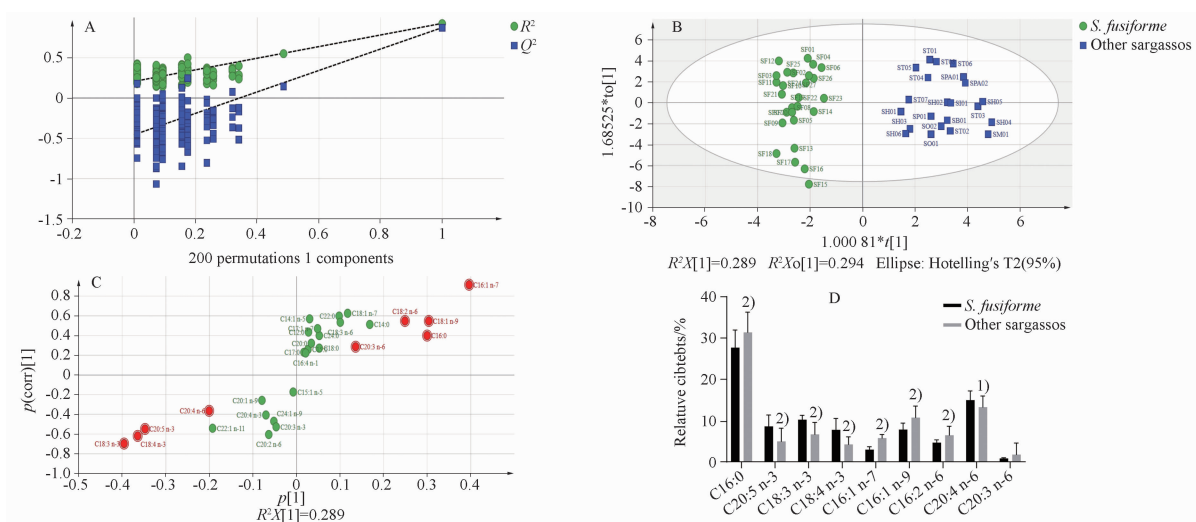


图 2 羊栖菜及同属他种马尾藻脂肪酸的主成分分析(PCA)得分图

Fig. 2 Principal components analysis score plot of *S. fusiforme* and other sargassos

2.4.2 正交偏最小二乘判别分析 为进一步对羊栖菜与同属他种马尾藻进行有效区分, 运用 SIMCA 14.1 进行有监督的正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA), $R^2 X = 82.7\%$, $R^2 Y = 92.7\%$, $Q^2 = 87.5\%$, 说明模型具有较好的解释及预测能力。200 次置换检验结果说明模型未过拟合(图 3A)。

OPLS-DA 结果表明, 羊栖菜及同属他种马尾藻明显分为两类(图 3B), 提示两者脂肪酸组成存在显著差异。以变量投影重要性(variable importance projection, VIP)值 > 1.0 为标准筛选差异脂肪酸(图 3C), 得到 C16:0、C20:5 n-3、C18:3 n-3、C18:4 n-3、C16:1 n-7、C18:1 n-9、C18:2 n-6、C20:4 n-6、C20:3 n-6 等 9 个差异脂肪酸, 具体见图 3D。



A - 置换检验图; B - 得分图; C - S-plot 图; D - 差异脂肪酸含量图; 与羊栖菜相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

A - permutation test; B - OPLS-DA score plot; C - S-plot; D - differential fatty acid contents; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, compared with *S. fusiforme*.

图 3 羊栖菜及同属他种马尾藻脂肪酸的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)图

Fig. 3 Orthogonal partial least squares-discriminant analysis of *S. fusiforme* and other sargassos

使用 15 批海藻饮片验证建立的 OPLS-DA 模型,以 0.5 作为判别指数阈值,所有判别结果正确(表 2)。其中,YP09 实际为几种马尾藻混杂的饮片样品,其判别指数与羊栖菜及同属他种马尾藻的判别指数比较接近,结果与实际情况较为相符。

表 2 海藻饮片 OPLS-DA 模型检验结果

Tab. 2 The verified results on OPLS-DA model of sargassum slices

Sample	Discriminant index	
	<i>S. fusiforme</i>	Other sargassos
YP01	1.010 1	-0.010 1
YP02	1.097 8	-0.097 8
YP03	1.145 9	-0.145 9
YP04	0.883 0	0.117 0
YP05	-0.232 5	1.232 5
YP06	-0.275 0	1.275 0
YP07	-0.090 3	1.090 3
YP08	-0.392 7	1.392 8
YP09	0.340 1	0.659 9
YP10	1.026 9	-0.026 9
YP11	0.708 3	0.291 7
YP12	0.706 8	0.293 2
YP13	-0.468 2	1.468 2
YP14	-0.070 8	1.070 8
YP15	-0.090 3	1.090 3

2.5 分类标志物探讨

脂肪酸是生物膜的重要组成部分,其生合成由遗传物质调控,具有作为化学分类标志物的潜质。

脂肪酸合成从乙酰辅酶 A 开始,见图 4,在酶的催化下经碳循环延长,形成含有 16 和 18 个碳的饱和脂肪酸(saturated fatty acid, SFA),即棕榈酸(C16:0)和硬脂酸(C18:0);继而在 Δ^9 脂肪酸去饱和酶的作用下,分别合成单不饱和脂肪酸(monounsaturated fatty acid, MUFA),如棕榈油酸(C16:1 n-7)或油酸(C18:1 n-9);棕榈油酸可以进一步介导 n-7 系列 MUFA 的合成;油酸主要有两条途径,或是参与 n-9 系列 MUFA 的合成例如生成花生烯酸(C20:1 n-9),或是参与多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的生成,包括 n-6 PUFA(亚油酸等)和 n-3 PUFA(亚麻酸)等^[25-29]。

从上述分析可知,MUFA 在脂肪酸生合成途径中扮演着重要的承上启下角色。例如,棕榈油酸能够反映 n-7 MUFA 的合成水平,油酸能直接及间接反映 n-9 MUFA 以及 PUFA 的合成水平。鉴于上述 2 个 MUFA 分子同时是羊栖菜与同属他种马尾藻的关键差异脂肪酸,故结合脂肪酸生合成途径,基于脂肪酸比值寻找分类标志物。比值 C18:1 n-9/C16:0、C16:1 n-7/C16:0、C16:1 n-7/C18:1 n-9 和 C20:1 n-9/C16:1 n-7 在羊栖菜与鼠尾藻/铜藻中存在显著差异($P < 0.01$)。从具体数值来看,比值 C20:1 n-9/C16:1 n-7 能够明显区分本研究中的羊栖菜与同属他种马尾藻(图 5),而且能够正确判别饮片 YP09 以外的其他 14 批饮片(表 3)。YP09 是含有羊栖菜的掺伪品,可以利用建立的 OPLS-DA 模型准确判别。

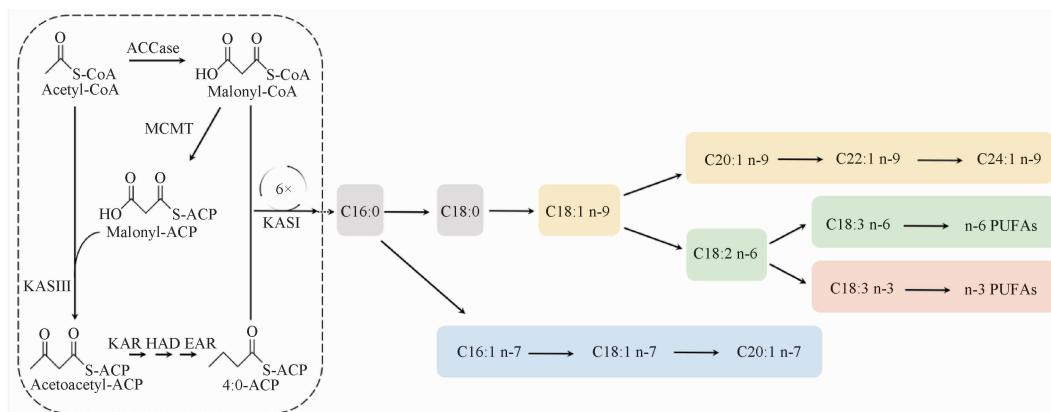
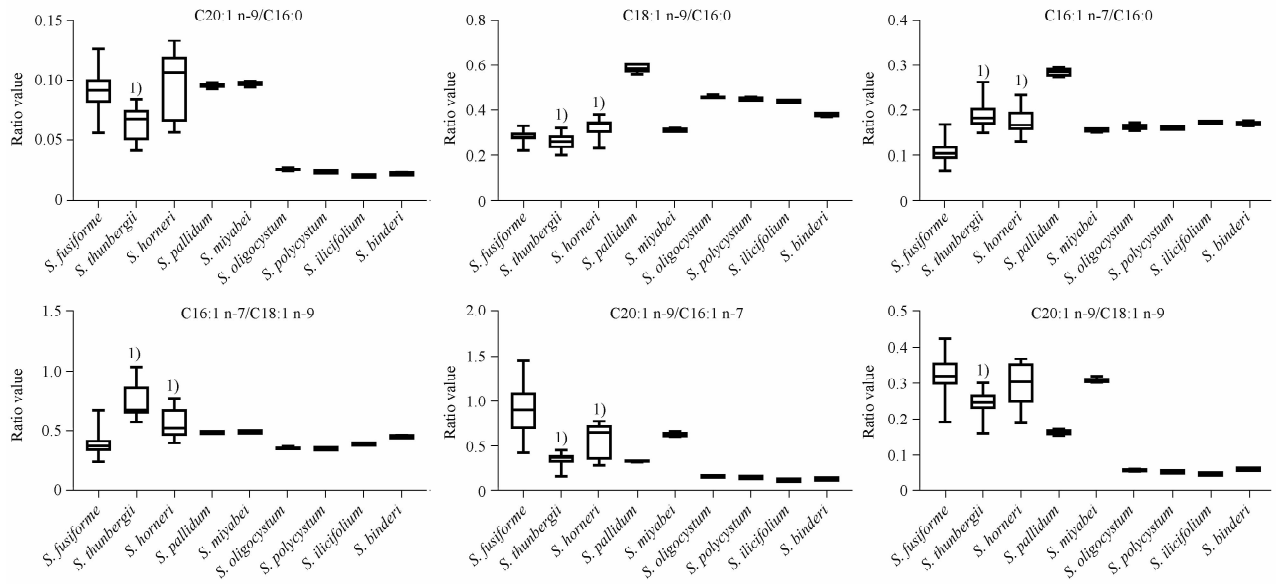


图 4 脂肪酸的生物合成途径主要路线图

Fig. 4 Main road map of fatty acid biosynthesis pathways

此外,本研究还采用文献报道的马尾藻属脂肪酸数据^[30-36],对提出的 C20:1 n-9/C16:1 n-7 比值进行验证。从表 4 可以看出,该比值能够区分羊栖菜与同属马尾藻。以上结果提示,C20:1 n-9/C16:1 n-7 比值

可作为羊栖菜鉴别的候选标志物。需要注意的是,马尾藻中常含有 C20:1 n-9 的同分异构体 C20:1 n-11,文献[37-38]采用的脂肪酸测定方法不能将两者完全分离,导致 C20:1 n-9/C16:1 n-7 比值偏差很大。



与羊栖菜相比, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.01$, compared with *S. fusiforme*.

图5 羊栖菜($n = 27$)与同属他种马尾藻($n = 22$)的单不饱和脂肪酸相关比值. $\bar{x} \pm s$

Fig. 5 Monounsaturated fatty acid ratio of *S. fusiforme* ($n = 27$) and other sargassos ($n = 22$). $\bar{x} \pm s$

表3 海藻饮片的单不饱和脂肪酸相关比值

Tab. 3 Monounsaturated fatty acid ratio of sargassum slices

Sample	Fatty acid ratio			
	C18:1 n-9/C16:0	C16:1 n-7/C16:0	C16:1 n-7/C18:1 n-9	C20:1 n-9/C16:1 n-7
<i>S. fusiforme</i> ($n = 27$)	0.20-0.61	0.07-0.30	0.25-0.67	0.43-1.45
YP01	0.24	0.09	0.40	0.96
YP02	0.27	0.09	0.33	1.26
YP03	0.25	0.09	0.36	1.01
YP04	0.33	0.12	0.37	0.71
YP05	0.23	0.07	0.32	0.12
YP06	0.25	0.07	0.29	0.13
YP07	0.50	0.12	0.24	0.07
YP08	0.29	0.12	0.41	0.09
YP09	0.17	0.07	0.40	0.85
YP10	0.27	0.09	0.35	1.17
YP11	0.30	0.13	0.42	0.80
YP12	0.30	0.12	0.40	0.82
YP13	0.24	0.24	0.98	0.20
YP14	0.57	0.28	0.49	0.35
YP15	0.61	0.29	0.49	0.32

从高等植物到藻类,都有利用脂肪酸比值进行化学分类研究的报道,例如 Barthetca 发现 n-7/n-9 MUFA 可用于区分芸苔属植物^[39], Wu 等^[40]利用 C18:1 n-9/C18:2 n-6 判别掺假油料作物, Khotimchenko 等^[41-42]报道 18:1 n-7/18:1 n-9、C20:5 n-3/C20:4 n-6 分别可用于绿藻门、红藻门的分类研究。

3 结论与讨论

中药海藻是 2020 年版《中国药典》一部收录的

2 种海洋来源藻类中药材之一(另一为昆布)。海蒿子是中药海藻的基原植物之一,主要分布于我国黄渤海近岸岛屿与岛礁,因野生资源量逐年减少,现市场很少见到该种药材。羊栖菜在我国已形成规模化养殖^[43],是当前中药海藻的主流品种,但常有同属他种马尾藻冒充,缺乏简单有效的专属性鉴别方法。

马尾藻属藻类,常统称 Sargassos,属于褐藻门(Phaeophyta)墨角藻目(Fucales)马尾藻科(Sargassaceae),成熟藻体由假根、茎(主茎、侧生茎)、叶

表4 文献报道的马尾藻 C20:1 n-9/C16:1 n-7 比值

Tab.4 Verification of the ratio of C20:1n-9/C16:1n-7 in sargassos

Species	C20:1 n-9	C16:1 n-7	C20:1 n-9/ C16:1 n-7	Reference
<i>S. fusiforme</i>	1.89	3.71	0.51	[30]
<i>S. fusiforme</i>	2.00	4.49	0.45	[30]
<i>S. fusiforme</i>	2.22	3.03	0.73	[30]
<i>S. fusiforme</i>	2.03	3.01	0.67	[30]
<i>S. fusiforme</i>	2.47	4.04	0.61	[30]
<i>S. fusiforme</i>	2.09	4.93	0.43	[30]
<i>S. ilicifolium</i>	0.20	8.20	0.02	[31]
<i>S. polycystum</i>	0.12	3.81	0.03	[32]
<i>S. fulvellum</i>	0.16	4.03	0.04	[33]
<i>S. horneri</i>	0.08	2.97	0.03	[33]
<i>S. boreale</i>	0.21	4.70	0.04	[33]
<i>S. thunbergii</i>	0.17	5.48	0.03	[33]
<i>S. yezoense</i>	0.10	1.85	0.05	[33]
<i>S. muticum</i>	0.58	6.08	0.10	[34]
<i>S. polyschides</i>	0.07	2.17	0.03	[34]
<i>S. tenerimum</i>	0.67	4.83	0.14	[35]
<i>S. sp.</i>	0.36	2.74	0.13	[36]

(气囊)和生殖托(雄托、雌托)等组成。藻体形态受生长周期、环境因素等影响巨大,致使自1820年建属以来,物种鉴别一直是研究难点。完整藻体尚难以区分物种,切段制成饮片后,其鉴别难度更甚,严重影响了中药海藻临床用药的有效性和安全性。本研究以羊栖菜为研究对象,建立了靶向脂肪酸GC-MS指纹图谱,可通过OPLS-DA准确区分羊栖菜与同属他种马尾藻;基于马尾藻物种间的差异脂肪酸,结合生成分析,首次提出比值C20:1 n-9/C16:1 n-7可作为羊栖菜鉴别的候选质量标志物。本研究尚存在样品数量有限等诸多不足之处,结果也有待于大批量样本的检验。研究旨在抛砖引玉,希望引起广大同行对海洋中药质量的关注,共同建设我国蓝色药库。

REFERENCES

[1] Ch. P(2020) Vol I (中国药典2020年版.一部)[S]. 2020: 308.

[2] GUAN H S, WANG S G. *Chinese Marine Materia Medica*(中华海洋本草)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2009:241.

[3] Chinese Herbalism Editorial Board, State Administration of Traditional Chinese Medicine of The People's Republic of China. *Chinese Materia Medica*(中华本草)[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1999:462.

[4] JI Y B, JI C F, WANG C. Effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharides on biochemistry function of erythrocyte membrane in *S*₁₈₀ mice[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2009, 44(1):22-25.

[5] CAO Y, DUAN J A, FAN X S, *et al.* Exploration and analysis of the herbal nature and application characteristics of *Sargassum* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(23):233-238.

[6] LI H Y. Establishment of commercial specification standard of *Sargassum* and its clinical safety evaluation[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022.

[7] LIU L, HEINRICH M, MYERS S, *et al.* Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional Chinese medicine: a phytochemical and pharmacological review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3):591-619.

[8] BOGIE J, HOEKS C, SCHEPERS M, *et al.* Dietary *Sargassum fusiforme* improves memory and reduces amyloid plaque load in an Alzheimer's disease mouse model[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):4908.

[9] SCHEPERS M, MARTENS N, TIANE A, *et al.* Edible seaweed-derived constituents: an undisclosed source of neuroprotective compounds[J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(5):790-795.

[10] BUREAU OF FISHERIES MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL AFFAIRS. *China Fishery Statistics Yearbook in 2022*(2022中国渔业统计年鉴)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022:23.

[11] ZENG C K, LU B R. *Marine Algal Flora of China*(中国海藻志)[M]. Vol 3. Beijing: Science Press, 2000:24-25.

[12] HUANG B X, DING L P, TAN H Q, *et al.* Species diversity and distribution of genus *Sargassum* in China seas[J]. *Oceanol Limnol Sin*(海洋与湖沼), 2013, 44(1):69-76.

[13] CUI Z, LI Y S, ZHAO W R, *et al.* Investigation and identification of the original plants of the commercial medicinal materials of Chinese traditional medicine seaweed[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 1995, 30(8):459-460.

[14] DONG Y, LI Y S, CUI Z, *et al.* Description and histology identification of several algae of *Sargassum* sp. [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2002, (4):239-242.

[15] WANG H X, SUN Z Q, GUO Q M, *et al.* Study on thermal analysis for *Sargassum* and adulterants[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2016, 27(9):2170-2173.

[16] HUANG C H. A taxonomic revision of the genus *Sargassum*(Fucales. Phaeophyceae) in the Yellow Sea and the East China Sea [D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017.

[17] YU S H. Molecular taxonomy of *Sargassum fusiforme* and *Sargassum* genus, and population genetics of *S. horneri* and *S. fusiforme*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2012.

[18] LIAO Q Y, GAO W, LI J, *et al.* Progress on lipidomics analytical methods and their applications in studies of traditional Chinese medicines[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44(9):1760-1766.

[19] CHEN Z, LIU H B. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Sargassum*[J]. *Chin J Mar Drugs*(中国海洋药物), 2012, 31(5):41-51.

[20] CALDER P C. Functional roles of fatty acids and their effects on human health[J]. *J Parenter Enteral Nutr*, 2015, 39:18S-32S.

[21] LI H F, ZHOU H Q. Study on fatty acid composition as a taxonomic marker for macroalgae[C]. Abstracts of the 11th Symposium of the Chinese Algae Society, 2001:106.

- [22] KUMAR P, BIJO A J, MANTIR V A, *et al.* Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives[J]. *Phytochemistry*, 2013, 86:44-56.
- [23] MORI C C, BAGATINI I L, GARCIA S T, *et al.* Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae) [J]. *Phytochemistry*, 2018, 151:9-16.
- [24] CHEN Z, XU Y B, LIU T, *et al.* Comparative studies on the characteristic fatty acid profiles of four different chinese medicinal Sargassum seaweeds by GC-MS and chemometrics [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14(4):68.
- [25] HOLZL G, DORMANN P. Chloroplast lipids and their biosynthesis[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70:51-81.
- [26] LI-BEISSON Y, THELEN J J, FEDOSEJEVS E, *et al.* The lipid biochemistry of eukaryotic algae[J]. *Prog Lipid Res*, 2019, 74:31-68.
- [27] GUSCHINA I A, HARWOOD J L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae[J]. *Prog Lipid Res*, 2006, 45(2):160-186.
- [28] KAZAZ S, MIRAY R, LEPINIEC L, *et al.* Plant monounsaturated fatty acids: diversity, biosynthesis, functions and uses[J]. *Prog Lipid Res*, 2022, 85:101138.
- [29] WANG L M, FU Z Z, GAO J, *et al.* Molecular mechanism of unsaturated fatty acids synthesis and regulation in plant[J]. *Genom Appl Biol*(基因组学与应用生物学), 2020, 39(1):254-258.
- [30] LI Y J, FU X T, DUAN D L, *et al.* Comparison study of bioactive substances and nutritional components of brown algae *Sargassum fusiforme* strains with different vesicle shapes[J]. *J Appl Phycol*, 2018, 30, 3271-3283.
- [31] ROHANI-GHADIKOLAEI K, ABDULALIAN E, NG WK. Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources[J]. *J Food Sci Technol*, 2012, 49(6):774-780.
- [32] MATANJUN P, MOHAMED S, MUSTAPHA N M, *et al.* Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Euclima cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*[J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21:75-80.
- [33] KIM G W, ITABASHI Y. Non-methylene-interrupted fatty acids with $\Delta 5$ unsaturation in *Sargassum* species [J]. *J Oleo Sci*, 2012, 61(6):311-319.
- [34] RODRIGUES D, FREITAS A C, PEREIRA L, *et al.* Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal[J]. *Food Chem*, 2015, 183:197-207.
- [35] KUMARI P, KUMAR M, GUPTA V, *et al.* Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs [J]. *Food Chem*, 2010, 120(3):749-757.
- [36] DEBBARMA J, RAO B M, MURTHY L N, *et al.* Nutritional profiling of the edible seaweeds *Gracilaria edulis*, *Ulva lactuca* and *Sargassum* sp. [J]. *Indian J Fish*, 2016, 63:81-87.
- [37] WANG B, HUANG H, XIONG H P, *et al.* Analysis on nutrition constituents of *S. naozhouense* sp. nov. [J]. *Food Res Dev*(食品研究与开发), 2010, 31(10):195-197.
- [38] SU X, LIU H H, CHEIN K P. Main nutritional contents of 30 Dalian coastal microalgae species [J]. *Chin J Oceanol Limn*, 2004, 22(4):436-439.
- [39] BARTHET V J. (N-7) and (n-9) *cis*-monounsaturated fatty acid contents of 12 Brassica species [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(2):411-417.
- [40] WU W G, LIU Z Z, PENG S M, *et al.* Adulteration identification of edible vegetable oils based on fatty acid profile[J]. *Food Sci*(食品科学), 2013, 34(16):270-273.
- [41] KHOTIMCHENKO S V. Fatty acids of green macrophytic algae from the Sea of Japan[J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(5):1203-1207.
- [42] KHOTIMCHENKO S V, VASKOVSKY V E. Distribution of C20 polyenoic fatty acids in red macrophytic algae [J]. *Bot Mar*, 1990, 33(6).
- [43] LIN L D, SHANG T G, ZHANG T T, *et al.* Supplementary study on reproductive biology and life cycle of *Sargassum fusiforme* (Phaeophyceae) [J]. *J Fish China*(水产学报), 2020, 44(4):581-595.

(收稿日期:2023-03-29)