

基于 HPLC-QQQ-MS 技术探讨炮制对肉苁蓉中 5 个活性成分的含量影响

雷慧博[†], 余雅婷[†], 韩璐, 吴岩, 原永芳, 俞晓艳*

上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011

摘要: 炮制一般会对中药材的成分及药效产生重要作用, 本文为了探讨炮制加工对肉苁蓉成分的影响, 建立了同时测定炮制前后肉苁蓉中肉苁蓉苷 F、毛蕊花糖苷、毛蕊花糖苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷和松果菊苷的含量的高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法 (high-performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry, HPLC-QQQ-MS) 的检测方法。采用 50% 甲醇溶液提取药物粉末, 在 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) 的色谱柱上, 以 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 选取负离子多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 以木通苯乙醇苷为内标成分, 以进样量 1 μL, 流速 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 样品管理器温度 8 °C 于 HPLC-QQQ-MS 进行同一批次炮制前后肉苁蓉中这五种成分的含量测定。结果显示 5 种成分在各自范围内线性关系良好, 相关系数 (r) 在 0.992 9 ~ 0.998 5 之间, 平均加样回收率在 98.15% ~ 100.2%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 小于 4.6%。所建立的研究方法简便准确, 可用于肉苁蓉的质量控制, 并用于评价炮制对肉苁蓉含量及药效的影响。

关键词: 肉苁蓉; 炮制; 化学成分; 含量测定; HPLC-QQQ-MS

中图分类号: R927

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)1-0086-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.1.010

Influence of processing on the content of five active components in *Cistanche tubulosa* based on HPLC-QQQ-MS technology

LEI Hui-bo[†], YU Ya-ting[†], HAN Lu, WU Yan, YUAN Yong-fang, YU Xiao-yan*

Department of Pharmacy, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

Abstract: Processing often plays an important role in determining the components and pharmacological effects of Chinese herbal medicines. In order to investigate the impact of processing on the components of *Cistanche tubulosa*, a high-performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-QQQ-MS) method was established to simultaneously determine the content of cistanoside F, acteoside, isoacteoside, 2'-acetylacteoside and echinacoside in *C. tubulosa* before and after processing. The medicinal powder was extracted with a 50% methanol solution. The chromatographic separation was achieved on an Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) using a gradient elution of 0.1% formic acid water (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase. Negative ion multiple reaction monitoring (MRM) mode was selected, with calceolarioside B used as the internal standard. The sample injection volume was 1 μL, flow rate was 0.3 mL/min, column temperature was 35 °C, and the temperature of the autosampler was set at 8 °C during the analysis by HPLC-QQQ-MS for the determination of these five components in *C. tubulosa* before and after processing in the same batch. The results showed good linearity within their respective ranges, with correlation coefficients (r) ranging from 0.992 9 to 0.998 5. The average recovery rates were between 98.15% and 100.2%, and the relative standard deviations (RSD) were less than 4.6%. The established method is simple, accurate, and can be used for quality control of *C. tubulosa*, as well as evaluating the impact of processing on its content and pharmacological effects.

收稿日期: 2023-07-18

接受日期: 2023-11-06

基金项目: 上海交通大学医学院附属第九人民医院基础研究助推计划种子基金 (JYZZ160)

[†] 共同第一作者

* 通信作者 E-mail: annie8234@163.com

Key words: *Cistanche tubulosa*; processing; chemical composition; content determination; HPLC-QQQ-MS

肉苁蓉 (*Cistanche tubulosa*) 为我国补益类珍贵中草药, 收录于《神农本草经》中的上品, 具有补肝肾、益精血、润肠通便、延缓衰老等功效, 用于治疗肾虚、女性不育、便秘、提高记忆力、治疗阿尔茨海默病和提高免疫力^[1-4]。肉苁蓉成分多种多样, 包括苯乙醇苷、苯甲醇苷、环烯醚萜及其苷、木脂素及其苷多糖类等, 其广泛的药理活性, 和它所含的生物活性成分密不可分。例如, 肉苁蓉多糖可很好地清除羟自由基, 有显著的抗氧化活性^[5]。毛蕊花糖苷和松果菊苷等苯乙醇苷类成分, 可通过提高血液的血氧饱和度, 增加机体耐受力, 改善慢性高原病^[6]。松果菊苷已被研究证明具有抗帕金森病的作用^[7]。为深入地探索肉苁蓉的活性成分和药理药效, 我们前期曾对该种属的化学成分和药理作用有过系统的总结^[8]。

由于肉苁蓉明显而显著的药理活性, 对其活性成分的关注也相对较多, 含量测定的研究也多面地开展^[9-14]。不同的研究技术如串联耦合反相-亲水相互作用色谱-串联质谱法曾用于测定肉苁蓉中不同极性和含量范围的成分^[15]。有研究利用一种相对校正因子计算方法, 通过一种标记物对肉苁蓉苯乙醇苷类化合物的多种成分进行了比较分析^[16]。还有采用紫外分光光度法、苯酚-硫酸法和高效液相色谱法对生品肉苁蓉及炮制品中的总苯乙醇苷类、总多糖和 4 种代表性的成分含量的变化进行了分析^[17]。这些研究方法有些不能够绝对定量, 有些则灵敏度不高, 而作为具有低检测限高灵敏度的高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法 (high-performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry, HPLC-QQQ-MS) 技术, 更适合于成分含量低且复杂的肉苁蓉样品的分析中。

中药炮制是中医学中一种独特而独特的制药技术, 在减少副作用、提高药效、改变药材性质甚至改变疗效方面发挥了重要作用。炮制可以使中药关键药效物质基础发生变化, 进而提高药效^[18], 传统中医药理论认为, 酒制可以使补肾类药物更好地发挥药效, 因此肉苁蓉历来用黄酒进行炮制后入药^[19-21]。为更好地评价炮制对肉苁蓉化学物质基础的影响, 我们曾对炮制前后肉苁蓉的入血成分和代谢组学进行过系统的研究^[22], 并在前期对炮制前后肉苁蓉化合物鉴定及筛选质量标志物的基础

上^[23], 本次选取肉苁蓉中 5 个代表性的化合物肉苁蓉苷 F、毛蕊花糖苷、异麦角甾苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷、松果菊苷, 从定量的角度进行分析, 在 HPLC-QQQ-MS 仪器上建立了肉苁蓉化学成分含量测定的方法。该 5 个成分中的肉苁蓉苷 F 属于苯丙烯酰寡糖类化合物, 其余四个为苯乙醇苷类化合物, 均具有较明显的药理活性^[24,25]。毛蕊花糖苷和松果菊苷更是历版《中华人民共和国药典》中作为质量控制的对照品^[26]。本实验将从定量分析的角度, 为后续肉苁蓉炮制增效及其质量评价提供理论依据。

1 材料与材料

1.1 仪器

Milli-Q50 SP 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); Shimadzu LC-20AD XR 液相系统 (日本 Shimadzu 公司); SCIEX 4500QTRAP™ 三重四级杆系统 (美国 SCIEX 公司); Analyst™ 1. 6. 3 数据处理工作站 (美国 SCIEX 公司); MultiQuant™ 定量分析工作站 (美国 SCIEX 公司)。

1.2 材料

对照品松果菊苷 (纯度 ≥ 98%, 批号 B212009)、毛蕊花糖苷 (纯度 ≥ 98%, 批号 B271307) 和异毛蕊花糖苷 (纯度 ≥ 98%, 批号 B271306) (叶源生物科技有限公司); 肉苁蓉苷 F (纯度 ≥ 98%, 批号 Y-200-190568)、2'-乙酰基毛蕊花糖苷 (纯度 ≥ 98%, 批号 Y-200-190422)、内标物木通苯乙醇苷 (纯度 ≥ 98%, 批号 Y-200-190346) (成都曼斯特生物科技有限公司)。同一批次的肉苁蓉生品和炮制品 (批号 2018111102) 由山西广誉远国药有限公司 (中国, 山西) 提供, 药材均经广誉远国药质量部郝晋琪部长鉴定为肉苁蓉 (*Cistanche tubulosa*) 的干燥肉质茎部位。

质谱级甲醇和乙腈 (Fisher Scientific, 美国); 质谱级甲酸 (Sigma-Aldrich, 美国), 其他试剂为分析纯。实验中超纯水由 MilliQ50 SP 纯水系统制备。

2 方法与结果

2.1 肉苁蓉生品与炮制品供试品溶液的制备

肉苁蓉供试品制备方法同《中国药典》2020 年版一部含量测定项下方法^[7], 具体操作如下: 取生肉苁蓉粉末 1.0 g, 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 精密加入 50 mL 50% 的甲醇溶液, 密塞, 摇匀, 称定重量, 室温下浸泡 30 min 后, 超声处理 30 min (功

率 250 W, 频率 20 kHz), 放冷, 再称定重量, 加 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液, 上清液在 4 °C 下以 13 000 r/min 离心 10 min, 然后用质谱级甲醇以 1:100 的比例稀释, 即得。取 1 μ L 用于 HPLC-QQQ-MS 分析。每个提取液平行两次。

炮肉苁蓉供试品溶液的制备方法同生品一致。

2.2 对照品溶液的配制

分别精密称量对照品松果菊苷 5.00 mg、毛蕊花糖苷 5.00 mg、异毛蕊花糖苷 5.08 mg、肉苁蓉苷 F 5.16 mg、2'-乙酰基毛蕊花糖苷 5.15 mg 和木通苯乙醇苷 5.10 mg 分别置于 5 mL 容量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 得 1 mg/mL 的单一对照品储备液。所有储备液均置于 4 °C 冰箱中保存备用。实验前配制混合标准品溶液并用 50% 甲醇稀释得到一系列不同浓度的混合标准品溶液, 所有标准品溶液均 4 °C 下 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 将 1 μ L 混合标准溶液注入 HPLC-QQQ-MS 系统分析。

2.3 液质分析

色谱条件: 为使待测物各色谱峰获得较好的分离效果, 本研究对流动相、色谱柱、柱温、流速和进样量这几个色谱条件进行了优化。通过前期实验考察, 最终确定肉苁蓉含量测定色谱条件为, 仪器: 岛津 LC-20AD 液相色谱仪(二元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器); 色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈(2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μ m); 进样量: 1 μ L; 流动相: 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~6 min, 5% \rightarrow 30%

B; 6~12 min, 30% \rightarrow 33% B; 12~12.1 min, 33% \rightarrow 5% B; 12.1~14 min, 5% \rightarrow 5% B; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 35 °C; 样品管理器温度: 8 °C; 分析时间: 15 min。

质谱条件: 肉苁蓉含量测定所用质谱仪器为 SCIEX 4500 QTRAPTM 三重四级杆质量分析器质谱, 离子源为电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)。AnalystTM 1.6.3 工作站对质谱数据进行采集和处理。实验首先在 SCIEX 4500 QTRAPTM 质谱的针泵系统上对 5 个待测物及内标物的质谱条件进行了优化。接着通过正、负离子全扫描, 发现各待测物及内标母离子在负离子模式下响应较好, 因此选用该模式进行质谱数据的采集, 并确定负离子模式下的母离子。再次, 在子离子扫描模式下确定响应值较高的子离子, 选择用母离子和子离子对来对各待测物进行定量分析。最后, 在高灵敏度的负离子模式下的多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下, 对碰撞能(collision energy, CE)、去簇电压(decustering potential, DP)和出口电压(cell exit potential, CXP)进行优化。优化结果见图 1。最终确定的质谱条件为: 负离子模式下的 MRM 扫描方式。雾化气、干燥气和碰撞气均为氮气; 优化质谱参数为: 干燥气温度(temperature): 550 °C; 雾化气压力(air curtain gas): 40 psi; 碰撞气(collision gas): Medium; 离子喷雾电压(ion spray voltage): 4 500 (-); Gs1: 50 psi; Gs2: 50 psi。各待测成分优化的 MRM 参数见表 1。

表 1 各待测成分和内标的质谱检测参数

Table 1 Mass spectrometry detection parameters of each ingredient and internal standard

成分 Ingredient	监测模式 Monitoring mode	定量离子对 Quantitative ion pairs (<i>m/z</i>)	去簇电压 Declustering potential (V)	碰撞能 Collision energy (eV)	碰撞池出口电势 Cell exit potential (V)
肉苁蓉苷 F Cistanoside F	[M-H] ⁻	487.2 \rightarrow 179.0	-25	-60	-7
毛蕊花糖苷 Acteoside	[M-H] ⁻	623.2 \rightarrow 160.9	-40	-56	-20
异麦角甾苷 Isoacteoside	[M-H] ⁻	623.2 \rightarrow 160.9	-41	-85	-11
2'-乙酰基毛蕊花糖苷 2'-Acetylacteoside	[M-H] ⁻	665.2 \rightarrow 160.9	-41	-60	-15
松果菊苷 Echinacoside	[M-H] ⁻	785.2 \rightarrow 623.2	-90	-80	-15
木通苯乙醇苷 B Calceolarioside B	[M-H] ⁻	477.2 \rightarrow 161.0	-30	-35	-7

2.4 方法学考察

专属性考察: 对照品、肉苁蓉生品和肉苁蓉炮制品的色谱图见图 1。负离子模式下肉苁蓉苷 F、毛蕊花糖苷、异麦角甾苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷、松果菊

苷的保留时间分别是 5.35、7.39、7.13、7.84 和 6.27 min。所有分析物在各自的保留时间内响应良好并且没有明显的干扰。本研究中内标化合物的选择标准是以色谱行为与待测化合物相近, 质谱行为不会

对待测化合物产生干扰为最佳。本实验经过条件考察和查阅文献^[27],选用木通苯乙醇苷为内标化合物,

该化合物和苯乙醇苷类化合物结构相似,且在肉苁蓉生品和炮制品中均未检测到。



图 1 HPLC-QQQ-MS 法在 MRM 模式下 5 个待测物的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of five substances tested by HPLC-QQQ-MS method in MRM mode

注:A:标准品溶液;B:肉苁蓉生品中 5 个待测物溶液;C:肉苁蓉炮制品 5 个待测物溶液。Note:A:Standard solution;B:Five solutions of substances tested in raw *C. tubulosa*;C:Five solutions of substances tested in processed *C. tubulosa*.

线性、检测限、定量限考察:根据待测物的前期预实验考察的结果确定一定的浓度范围,选择浓度适中的 6 个浓度点,以待测物的浓度为(x),待测物与内标峰面积的比值为(y),采用加权最小二乘法拟合线性回归得标准曲线方程,应使待测物的浓度尽量在标准曲线的定量检测范围之内。其中,检测限(limit of detection, LOD)的信噪比(signal to noise

ratio, S/N) 应大于 3。定量限(limit of quantitation, LOQ)的 S/N 应大于 10。肉苁蓉苷 F、毛蕊花糖苷、异麦角甾苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷、松果菊苷的标准曲线、定量限、检测限见表 2。相关系数(r) 在 0.992 9~0.998 5 之间,标准曲线线性关系良好,标准曲线图见图 2。

表 2 HPLC-QQQ-MS 法对肉苁蓉中 5 个待测成分的线性、检测限、定量限的考察

Table 2 Investigation of the linearity, LOD, and LOQ of five ingredients in *C. tubulosa* using HPLC-QQQ-MS method

成分 Ingredient	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range (ng/mL)	相关系数 r	检测限 LOD (ng/mL)	定量限 LOQ (ng/mL)
肉苁蓉苷 F Cistanoside F	$y = 16.591x + 6.8143$	1 230 ~ 8 610	0.998 5	9.84	12.30
毛蕊花糖苷 Acteoside	$y = 25.832x + 27.1$	1 000 ~ 7 000	0.994 3	3.00	10.00
异麦角甾苷 Isoacteoside	$y = 6.0205x + 175.58$	1 640 ~ 26 240	0.992 9	3.28	16.40
2'-乙酰基毛蕊花糖 2'-Acetylacteoside	$y = 11.239x + 87.2$	1 660 ~ 11 620	0.995 6	9.96	16.60
松果菊苷 Echinacoside	$y = 4.0607x + 2.7714$	1 000 ~ 7 000	0.995 7	2.50	10.00

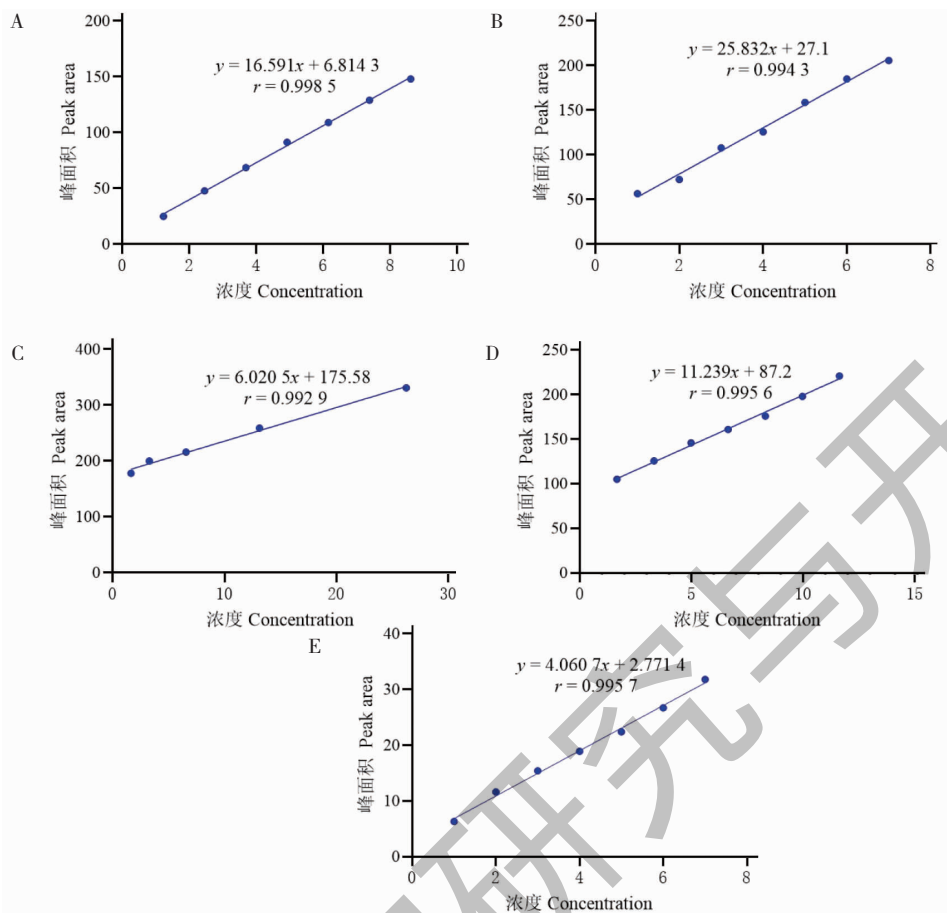


图2 5个待测物的标准曲线图

Fig. 2 Standard curves of five ingredients

注:A:肉苁蓉苷 F;B:毛蕊花糖苷;C:异麦角甾苷;D:2'-乙酰基毛蕊花糖苷;E:松果菊苷。

Note:A:Cistanoside F;B:Acteoside;C:Isoacteoside;D:2'-Acetylacteoside;E:Echinacoside

精密性、重复性、稳定性、加样回收率考察:按“2.2”项下制备高、中、低3个不同浓度的QC样品,每个浓度平行6份进行分析。分别于同一天内和连续3天内完成测定,计算日内精密性,日间精密性。精密性均以RSD表示,应保证其值不超过10%。通过在一天内和连续三天平行六次测量高、中、低三种浓度水平的标准溶液来测定日内和日间的精密性。最终测得日内、日间精密性的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别低于7.41%和7.42%。重复性考察的对象为肉苁蓉生品,按照“2.2”项下对样品进行前处理,每个浓度平行6份,结果表明各个化合物可以在室温下24 h内进行常规分析。用样品溶液来评价稳定性,其结果分别在0、2、4、8、12和24 h内测定。最终稳定性和重复性的RSD分别低于6.1%和6.2%。回收率共制备三组样品,每组样品有高、中、低3个浓度,每个浓度平行3份。三

组样品分别是:对照品溶液(A);标准溶液制备QC样品按“2.1”项下处理样品(B);生品肉苁蓉样品按“2.1”项下处理样品(C)。将三组样品进样分析,通过每组样品响应的峰面积来计算,提取回收率=(实验测得量/理论加入量)×100%。本实验的回收率为98.15%~100.2%,RSD值小于4.6%,具有较高的定量准确度。详细结果见表3和表4所示。

2.5 样品含量测定结果

通过实验条件优化及方法学考察,本节所建立的方法适用于肉苁蓉炮制前后5个化学成分的检测,其详细结果见表5。

3 讨论与结论

本本节所建立的HPLC-QQQ-MS方法主要用于炮制前后肉苁蓉中5个化学成分的测定。实验以中药质量标准理论为指导,根据现代药理研究进行含量测定成分的筛选,最终选择肉苁蓉苷F、毛蕊花糖

表 3 精密度、稳定性、准确性考察

Table 3 Investigation of precision, stability, and accuracy

成分 Ingredient	日内精密度 Intra-day precision RSD(%, n = 6)			日间精密度 Inter-day precision RSD(%, n = 6)			稳定性 Stability RSD (%, n = 6)	重复性 Reproducibility RSD (%, n = 6)
	低 Low	中 Medium	高 High	低 Low	中 Medium	高 High		
	肉苁蓉苷 F Cistanoside F	7.4	3.7	3.0	7.4	4.1		
毛蕊花糖苷 Acteoside	3.1	2.7	4.0	3.0	4.4	3.8	5.5	4.1
异麦角甾苷 Isoacteoside	4.4	5.9	4.2	5.5	5.7	5.2	4.6	4.4
2'-乙酰基毛蕊花糖苷 2'-Acetylacteoside	5.2	4.6	6.0	5.6	4.0	4.7	6.1	5.3
松果菊苷 Echinacoside	4.2	4.9	2.8	3.9	4.2	3.9	4.0	4.3

表 4 加样回收考察

Table 4 Investigation of ingredient recovery

成分 Ingredient	含量 Amount (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Detected amount ($\mu\text{g}, n = 3$)	回收率 Recovery (%, n = 9)	RSD (%, n = 9)
肉苁蓉苷 F Cistanoside F	0.18	0.12	0.29	98.15	4.6
		0.24	0.42		
		0.48	0.65		
毛蕊花糖苷 Acteoside	4.93	2.51	7.44	100.2	2.8
		5.02	9.89		
		10.04	15.17		
异麦角甾苷 Isoacteoside	2.01	1.45	3.44	99.21	2.5
		2.9	4.88		
		5.8	7.83		
2'-乙酰基毛蕊花糖苷 2'-Acetylacteoside	0.47	0.28	0.75	100.2	3.4
		0.56	1.04		
		1.12	1.58		
松果菊苷 Echinacoside	5.92	3.06	8.97	98.93	2.9
		6.12	11.88		
		12.24	18.13		

表 5 HPLC-QQQ-MS 法对肉苁蓉中 5 个化合物的含量测定

Table 5 Determination of the content of five ingredients in *Cistanche tubulosa* using HPLC-QQQ-MS method

成分 Ingredient	含量 Content($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
	生品 Raw product(n = 6)	炮制品 Processed product(n = 6)
肉苁蓉苷 F Cistanoside F	0.334 \pm 0.016	0.453 \pm 0.028
毛蕊花糖苷 Acteoside	24.656 \pm 0.016	20.097 \pm 0.092
异麦角甾苷 Isoacteoside	10.073 \pm 0.131	10.721 \pm 0.187
2'-乙酰基毛蕊花糖苷 2'-Acetylacteoside	2.381 \pm 0.020	2.446 \pm 0.028
松果菊苷 Echinacoside	29.591 \pm 0.099	29.113 \pm 0.081

苷、异麦角甾苷、2'-乙酰基毛蕊花糖苷、松果菊苷为指标成分。实验参照 2020 年版《中国药典》一部中肉苁蓉含量测定项下的提取方法对肉苁蓉生品和炮制品进行样品提取,并对 5 个化学成分的液相和质谱条件进行了优化。实验中所使用的高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪具有高分辨率、高灵敏度、快速分析等优点。能够对化合物进行高效地分离和筛选,并可以对不同的分子进行定量分析,可以检测到极小的分子,并且可对复杂混合化学成分进行高效、快速的分析。因此,凭借该平台建立的研究方法非常适合本实验炮制前后肉苁蓉具有微小含量变化的成分的检测。结合方法学考察结果可以发现,本节所建立的方法具有较高的精密度、准确度及耐用性,因此该方法可以用于炮制前后肉苁蓉中化合物的含量测定,其结果可以用于对炮制前后肉苁蓉的质量评价。

肉苁蓉在炮制过程中,由于受加热的影响,其中有些化合物可能会发生水解、氧化、酶促、异构化反应,使其成分含量降低或增加。如毛蕊花糖苷通过异构化生成异麦角甾苷,使得毛蕊花糖苷含量降低的同时异麦角甾苷的含量随之升高,而松果菊苷在炮制过程中则易发生水解反应使其含量降低。因此,为了更好地发挥药效,中药在炮制过程中要着重关注主要成分的含量变化,避免出现炮制不及或炮制过度的现象。总体来说,本研究的研究结果为后续肉苁蓉的质量评价提供了理论依据,并从定量分析的角度,证明了肉苁蓉炮制的意义。

参考文献

- Morikawa T, Xie HH, Pan YN, et al. A review of biologically active natural products from a desert plant *Cistanche tubulosa* [J]. Chem Pharm Bull, 2019, 67: 675-689.
- Li ZM, Lin HN, Gu L, et al. Herba *Cistanche* (Rou Cong-Rong): one of the best pharmaceutical gifts of traditional Chinese medicine [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 41-48.
- Wu CR, Lin HC, Su MH. Reversal by aqueous extracts of *Cistanche tubulosa* from behavioral deficits in Alzheimer's disease-like rat model: relevance for amyloid deposition and central neurotransmitter function [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 202-212.
- Zhang K, Ma X, He WJ, et al. Extracts of *Cistanche deserticola* can antagonize immune senescence and extend life span in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAM-P8) mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 601383.
- Zhou YS, Cai JJ, Gao LC, et al. Comprehensive evaluation of antioxidant activity of *Cistanche deserticola* polysaccharides by multiple indexes [J]. Gansu Med J (甘肃医药), 2022, 41: 1057-1060.
- Shulipan MLT, Jiang RS, Zhang WY, et al. Therapeutic effect and mechanism of *Cistanche* phenylethanoid glycosides on chronic altitude disease model rats [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2023, 35: 648-655.
- Wang DF, Wang HZ, Gu L. The antidepressant and cognitive improvement activities of the traditional Chinese herb *Cistanche* [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 3925903.
- Lei HB, Wang XY, Zhang YH, et al. Herba *Cistanche* (Rou Cong Rong): a review of its phytochemistry and pharmacology [J]. Chem Pharm Bull, 2020, 68: 694-712.
- Lu DY, Zhang JY, Yang ZY, et al. Quantitative analysis of *Cistanche* Herba using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and high-resolution mass spectrometry combined with chemometric methods [J]. J Sep Sci, 2013: 1945-1952.
- Yang ZY, Lu DY, Yao S, et al. Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Cistanche deserticola* by HPLC-DAD-ESI-MS [J]. J Food Drug Anal, 2013, 21: 50-57.
- Song QQ, Zhou ZZ, Li J, et al. Serial hyphenation of dried spot, reversed phase liquid chromatography, hydrophilic interaction liquid chromatography, and tandem mass spectrometry towards direct chemical profiling of herbal medicine-derived liquid matrices, an application in *Cistanche sinensis* [J]. J Pharm Biomed Anal, 2019, 174: 34-42.
- Ma ZG, Yang ZY, Lu DY, et al. Determination of bioactive components of *Cistanche deserticola* (Roucongong) by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detectors [J]. Anal Lett, 2014, 47: 2783-2794.
- Song QQ, Lia J, Liu X, et al. Home-made online hyphenation of pressurized liquid extraction, turbulent flow chromatography, and high performance liquid chromatography, *Cistanche deserticola* as a case study [J]. J Chromatogr A, 2016, 1438: 189-197.
- Ma ZG, Yang ZL, Li P, et al. Simultaneous determination of eight phenylethanoid glycosides in different species of the genus *Cistanche* by high performance liquid chromatography [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2008, 31: 2838-2850.
- Yan Y, Song QQ, Chen XJ, et al. Simultaneous determination of components with wide polarity and content ranges in *Cistanche tubulosa* using serially coupled reverse phase-hy-

- drophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,2017,1501:39-50.
- 16 Dong YH,Guo Q,Liu JJ,et al. Simultaneous determination of seven phenylethanoid glycosides in *Cistanches Herba* by a single marker using a new calculation of relative correction factor[J]. J Sep Sci,2018,41:1913-1922.
- 17 Zhang Y,Wang YW, Yang S, et al. The difference of chemical components and biological activities of the raw products slices and the wine steam-processed product from *Cistanche deserticola*[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2019,2019:2167947.
- 18 Guo P, Brand E, Zhao ZZ. Chinese medicinal processing: a characteristic aspect of the ethnopharmacology of traditional Chinese medicine[J]. Ethnopharmacology,2015:303-316.
- 19 Zhong XL, Sun J, Geng ZC, et al. Modern research progress on processing of *Cistanches Herba*[J]. Strait Pharm J(海峡药理学),2018,30:51-53.
- 20 Fan YN,Huang YQ,Jia TZ, et al. Research progress on processing of *Cistanches Herba*[J]. Drugs Clin(现代药物与临床),2015,30:737-741.
- 21 Peng F,Xu R, Wang X, Xu CQ, et al. Processing treatment of *Cistanche* species(*Rou Cong Rong*): a review of its history, effect on chemical components and pharmacological activities [J]. Moder Chin Med(中国现代中药),2015,17:406-412.
- 22 Lei HB,Xin JY,Lv YH, et al. Effects of processing on the efficacy and metabolites of *Cistanche tubulosa* using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass [J]. Biomed Chromatogr, 2023, 37: e5621.
- 23 Lei HB, Zhang YH, Zu XP, et al. Comprehensive profiling and potential chemical markers identification in raw and processed *Cistanche tubulosa* by combining ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and MS/MS-based molecular networking[J]. Anal Bioanal Chem,2021,413:129-139.
- 24 Morikawa T, Pan YN, Ninomiya K et al. Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*[J]. Bioorg Med Chem,2010,18:1882-1890.
- 25 Wang YH, Xuan ZH, Tian S, et al. Echinacoside protects against 6-hydroxydopamine-induced mitochondrial dysfunction and inflammatory responses in PC12 cells via reducing ROS production[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2015,2015:189239.
- 26 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M], Beijing: China Medical Science Press, 2020: 11.
- 27 Zhou YF, Deng JH, Huang ZG, et al. Content determination of calceolarioside B in Longdan Xiegan Pills by UPLC-MS/MS [J]. China Pharm(中国药业),2022,31:67-71.