

基于 UPLC-QTOF MS^E 的代谢组学方法研究 不同采收期银杏叶的化学组分

刘秀斌^{1,2}, 张莹^{1*}, 曾建国², 乔立瑞³, 黄静³, Kate Yu⁴

(1.湖南省检验检疫科学技术研究院, 湖南 长沙 410004; 2.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128;
3.沃特世科技(上海)有限公司, 上海 201206; 4.沃特世科技有限公司, 马萨诸塞州, 美国 01757)

摘要: 为科学制定银杏叶质量控制标准提供依据, 借助代谢组学方法研究不同时期采收的银杏叶中化学组分的变化规律。经过标准的提取工艺得不同采收期(春季、夏季、秋季)银杏叶的提取物, 利用超高效液相色谱与三重四级杆飞行时间质谱联用技术 UPLC-QTOF MS^E 的方法进行数据采集, 借助多元统计的主成分分析方法比较上述银杏叶之间的组分差异。结果表明, 不同采收季节的银杏叶组分差异明显, 并呈现规律性的变化, 尤其是槲皮素对香豆酰基葡萄糖鼠李糖苷等黄酮醇苷类成分含量从春季到夏季、秋季呈下降趋势。

关键词: 银杏; 叶; 代谢组学; 超高效液相色谱与三重四级杆飞行时间质谱联用; 采收时期

中图分类号: S567.1+9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)06-0650-05

Ingredient profiling of fresh leaves of *Ginkgo biloba* over different harvest seasons using UPLC-QTOF MS^E/metabonomics

LIU Xiu-bin^{1,2}, ZHANG Ying^{1*}, ZENG Jian-guo², QIAO Li-rui³, HUANG Jing³, Kate Yu⁴

(1.Technology Center Hunan Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004,China; 2.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agriculture University, Changsha 410128,China; 3.Waters Corporation Shanghai, Shanghai 201206, China; 4.Waters Corporation, Milford, MA,USA 01757)

Abstract: In order to provide the standard for quality control of *Ginkgo biloba* leaves scientifically, metabonomics was used to observe the change rules of chemical components in *Ginkgo* leaves in different seasons. Extract from *Ginkgo biloba* leaves harvested in different seasons (spring, summer and fall) was obtained by the standard extraction technology. The data was acquired by MS^E method using UPLC-QTOF, which was processed to compare the component differences between different groups of *Ginkgo biloba* leaves by means of principal component analysis. The result shows that component differences of *Ginkgo biloba* leaves in different harvest seasons are obvious, and they changed regularly with time, and the content of quercetin 3-O-2''-(6'''-p-coumaroyl) glucosyl rhamnoside showed a clear downtrend from spring to summer and fall.

Key words: *Ginkgo biloba*; leaves; metabonomics; ultra-high performance liquid chromatography couple with time of flight mass spectrum(UPLC-QTOF); harvest seasons

银杏叶为银杏科植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的 降低血黏度、清除自由基等功效, 其主要化学成分
叶。银杏叶性味甘苦涩平, 有益心敛肺、化湿止泻、 为总黄酮醇苷与萜类内酯类^[1-3]。

收稿日期: 2014-10-16

基金项目: 国家质量检验总局项目(2012IK161)

作者简介: 刘秀斌(1988—), 男, 湖南邵阳人, 博士研究生, 主要从事药用植物成分分析研究, alater@139.com; *通信作者, ciqzy2010@126.com

周恩丽等^[4]对不同生长时期银杏叶中的总内酯进行研究的结果表明,5 月银杏叶中的总内酯含量最高,7 月后呈下降趋势。但无论是已报道的文献还是中国药典对银杏叶的采集时间均没有明确的说明与规定。不同采收期银杏叶的化学成分的差异导致银杏叶质量标准难以控制。

以往对药材质量控制研究仅局限于某几个特征成分,忽略了其他成分的变化,而代谢组学从植物生物体系的整体性和动态性出发,研究植物次生代谢产物在生命过程中的动态变化规律,可从整体上科学评价和控制不同生长时期药材的质量。笔者基于 UPLC-QTOF MS^E 的代谢组学研究方法,系统地分析不同采收期银杏叶中化学成分的差异,确定银杏叶的合适采收期,旨在为科学制定银杏叶质量控制标准提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏叶采自湖南浏阳于 2003 年种植的银杏树苗圃。于 2010 年 5 月 1 日到 9 月 15 日,每隔 15 d 采收 1 次样品,得到 10 个不同生长时期的鲜银杏叶样品。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

取新鲜银杏叶,加入约 5 倍水打浆后,在 80 °C 下浸提 2 次,每次提取 2 h,过滤得提取液。合并滤液,用壳聚糖澄清处理,加于已处理好的 AB-8 大孔吸附树脂柱上,依次用 5 倍柱体积水、4 倍柱体积 70%乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,回收乙醇,浓缩成稠膏,真空干燥(55 °C),粉碎,得粉末状样品。将以上得到的粉末状样品溶解到甲醇与丙酮体积比为 9:1 的溶液中,其终质量浓度为 10 mg/mL,然后稀释 10 倍量至 1 mg/mL,准备进样。

1.2.2 样品分析条件

色谱条件:采用 Waters ACQUITY UPLC 系统进行液相分离。色谱柱的型号为 ACQUITY UPLC HSS T3, 1.7 μm, 2.1 mm×100 mm;柱温 55 °C;流

动相 A(0.1% Formic Acid Water)、B(MeOH);流速为 0.5 mL/min;进样量为 5 μL;A 的洗脱梯度为 75%~10% (1~16 min), 16.1~17 min 用 100%B 冲洗色谱柱,17 min 后返回初始浓度平衡色谱柱 4 min。

质谱条件:采用 Waters Xevo Q-TOF Mass Spectrometer、电喷雾离子源负离子模式;毛细管电压 3 kV;锥孔电压 40 V;离子源的温度 150 °C;脱气流速 800 L/h;温度 550 °C;数据采集模式为 MS^E, 设定一低碰撞电压 (Low CE)为 5 eV,高碰撞电压 (High CE)为 15~25 eV。采用亮氨酸脑非肽作为校正溶液, [M-H]⁻: 554.261 5。

1.2.3 数据分析

通过应用软件 MarkerLynx V4.1 对质谱数据进行分析。首先将三维的 LC/MS 数据转换成二维矩阵,将每一个数据点转换成精确质量和保留时间 (EMRT)的数据对;再通过多元统计学分析中相关参数的设置,该变量表可以直接通过 SMICA-P(V11.5)多元统计学分析软件来分析,即可对 A 组内所有样品(A1~A10)进行统计学分析。分析参数设定为:保留时间 1~18 min;质谱范围 50~1 500 amu;质谱允许偏差 0.05 amu;噪音消除水平 6.0;强度阈值 100;质谱窗口 0.05 amu;保留时间 0.2 min。

2 结果与分析

为了更有效地获取银杏叶中化合物的相关信息,需先进行色谱分离条件的系统优化。本研究通过对流动相进行细致的考察,实现了样品中大量化合物的有效分离。从图 1 可以看出,银杏样品的组分极性范围很宽,从高极性到低极性的化合物均能在总离子图中有所体现,如在 0~8 min 主要集中的是极性大的组分;在 12~18 min 主要集中的是极性较小的部分。8~12 min 期间组分峰较少,可能是由于该时间段内化合物较少或组分子离子化程度不高。

通过 UPLC 串联 Q-TOF 的分析方法,并采用了 MS^E 的采集模式,在一次进样分析中,不仅能够得到样品中所有化合物的一级高分辨质谱数据,同时也能够得到对应的二级质谱数据,其中一级高分

辨质谱数据能够提供化合物的母离子信息，二级质谱数据提供相应化合物的子离子的信息。该数据采

集模式的高通量特性为后期的大量化合物数据的分析奠定基础。

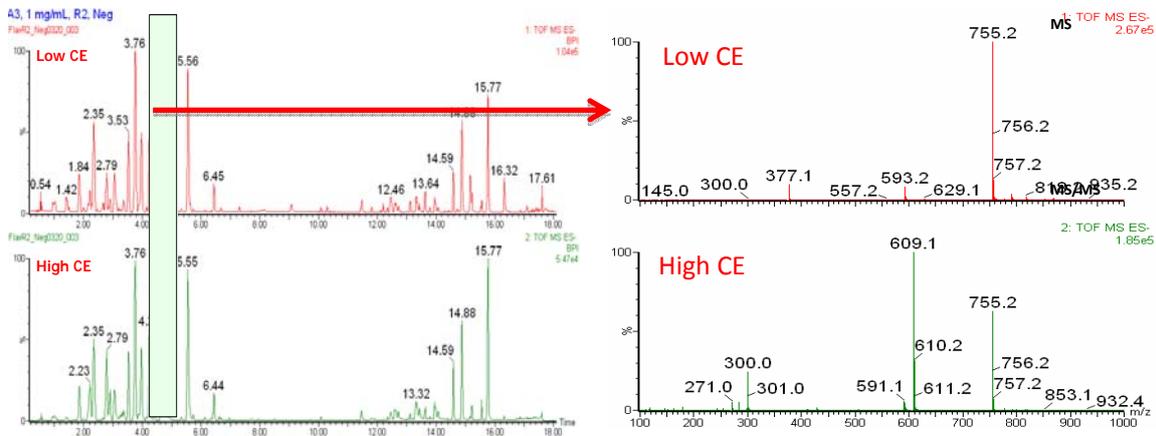


图 1 采用 MS^E 的采集模式同时得到的一级和二级质谱图
Fig.1 MS and MS/MS spectra obtained by MS^E acquisition mode

通过上述方法得到含有三维信息(保留时间、质荷比及响应强度)的数据。每个三维数据信息代表一个化合物，共得到 1 425 个以二维矩阵型式(EMRT)列出的数据对。由于试验得出的银杏叶中化合物的信息量大，采用手动的数据分析方法工作量大、耗时长，因此，使用多元统计的主成分分析法(PCA)^[5-7]对 LC/MS 数据进行分析。

将上述 1 425 个数据对组成的变量表直接通过 SMICA-P 多元统计学分析软件完成不同生长时期内所有样品(A1~A10)的统计分析，如主成分分析(PCA)图 2-A 中所示：从春季到夏季再到秋季，其

对应的样品成分随着季节的不同有着明显的变化规律，每个数据点代表一个样品。通过 PCA 的载荷图(图 2-B)进一步分析造成样品成分变化明显的原因，该图中的每个点代表上述 1 425 个 EMRT 中的 1 个离子对，而每个区域的离子对信息与样品所在的象限是一一对应的。从载荷图中可以看出，距离中心较远的点是造成该季节样品成分变化的主要贡献者，如图中红框标注的 Markers 代表着引起秋季银杏叶样品与夏季、春季银杏叶差异的标志性化合物。同理，黄色框内的代表着春季和秋季样品里有显著差异的 Marker。

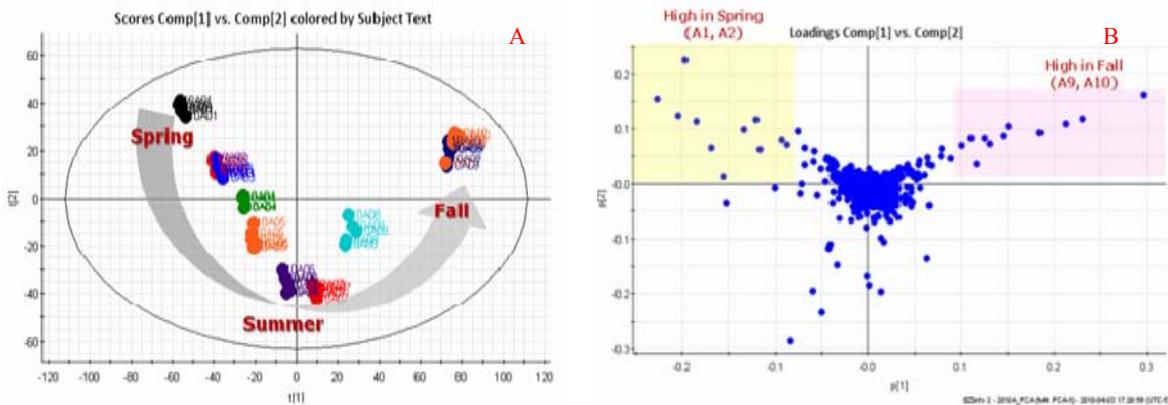


图 2 不同季节新鲜银杏叶水提液的 PCA 主成分分析图(A)和载荷图(B)

Fig. 2 PCA score plot(A) and PCA Loading plot(B) of water extract of Fresh Ginkgo leaf in different seasons

为了深入研究春季与夏季、秋季银杏叶样品间

的组分差异，从图 3-A 可以明显看到这些组分在春

季的含量明显高于其他时节,其中图 3-A 中蓝色框内保留时间为 4.69 min、*m/z* 为 755.183 9 的这个潜在标志物在银杏叶中的含量从春季到夏季、秋季呈

明显的下降趋势(图 3-B)。将这些春季含量高的特征标记物(Marker)用 Excel 文件保存下来(表 1)。

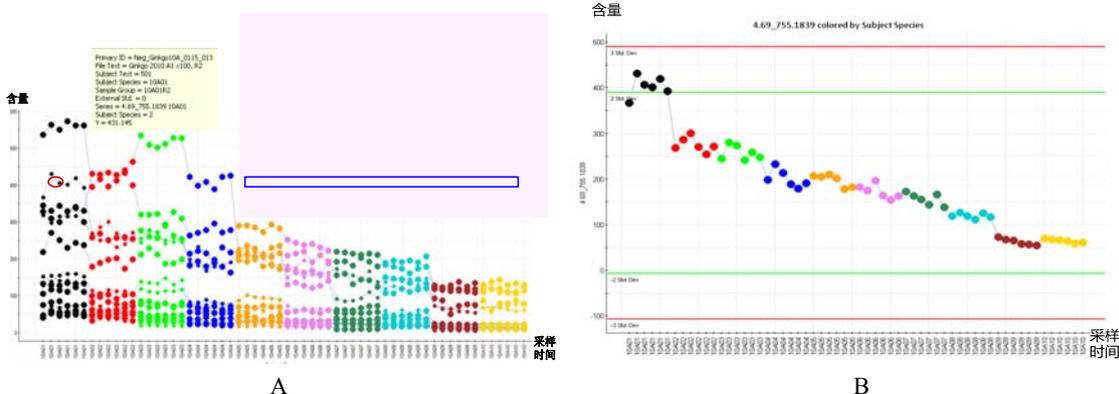


图 3 载荷图黄色框内组分(A)和槲皮素对香豆酰基葡萄糖鼠李糖苷(B)在不同采收季节的含量变化趋势

Fig.3 Change trends of the content of component in yellow box(A) and quercetin 3-O-2''-(6''-p-coumaroyl) glucosylrhamnoside (B) in different harvest seasons

表 1 利用载荷图中获得区分春季和秋季样品差异最高贡献的 12 个精确质量与保留时间的数据对列表

Table 1 List of the 12 quality precision data and retention time contributed highest to the difference that distinguish samples between spring and autumn using the load plot

RT/min	1.86	1.85	5.53	4.69	3.19	4.37	6.46	5.53	2.89	4.69	2.33	3.02	
<i>m/z</i>	163.11	193.12	284.03	300.02	609.14	623.16	739.18	739.18	739.18	755.18	755.20	769.22	
10A01	322.37	55.14	131.91	77.85	246.49	328.51	115.39	562.21	309.36	410.45	140.97	153.50	May 1st
10A02	435.79	64.04	101.12	53.67	192.33	258.07	83.54	414.55	245.01	276.74	77.90	111.08	May 15th
10A03	515.86	73.71	78.19	47.21	202.96	265.83	30.05	313.70	257.70	260.52	112.92	138.37	June 1st
10A04	409.01	54.80	68.40	38.02	180.73	216.73	57.18	279.04	181.23	201.42	78.94	81.23	June 15th
10A05	210.33	30.30	70.33	31.28	185.82	227.97	42.56	285.10	222.37	195.78	62.91	95.31	July 1st
10A06	130.74	19.33	58.41	26.12	169.13	205.77	30.15	235.10	155.34	170.91	34.49	61.98	July 15th
10A07	66.93	9.84	54.05	25.25	140.55	190.27	35.04	213.85	94.60	153.74	21.22	33.06	August 1st
10A08	114.97	17.15	49.02	20.44	140.77	173.19	35.82	196.16	141.56	120.18	43.62	56.64	August 15th
10A09	130.20	20.14	22.59	10.72	72.84	118.30	14.27	114.27	68.40	60.65	15.17	23.89	September 1st
10A10	134.88	20.68	22.94	11.18	76.92	118.33	14.75	111.55	73.19	63.93	15.84	24.53	September 15th
ChangeFold	2.39	2.67	5.75	6.96	3.20	2.78	7.82	5.04	4.23	6.42	8.90	6.26	

表 1 中红色数值是由保留时间和质荷比组成的代表化合物信息的 EMRT 数据对;黑色数值代表每一个化合物的含量;Changefold 表示每个化合物在不同采收时期最高含量与最低含量的比值。

为了对春季含量高的特征标记物进行结构解析,将表 1 中这些 EMRT 数据对重新输入 MarkerLynx 列表中,通过软件中元素组成分析功能计算分子式以及搜索数据库。以保留时间 4.69 min 的这个化合物为例,说明潜在标志物的结构解析过程。[M-H]⁻精确分子量(*m/z*)为 755.183 9,通过计算

该化合物分子式为 C₃₆H₃₅O₁₈,利用 MarkerLynx 软件中自动搜索 Chemspider 数据库的功能及相关的文献^[8]报道,最终推测该化合物可能为槲皮素对香豆酰基葡萄糖鼠李糖苷。根据该化合物的结构特点以及二级碎片,软件 MassFragmentTM 自动地对该化合物的裂解进行推测,如图 4 所示。

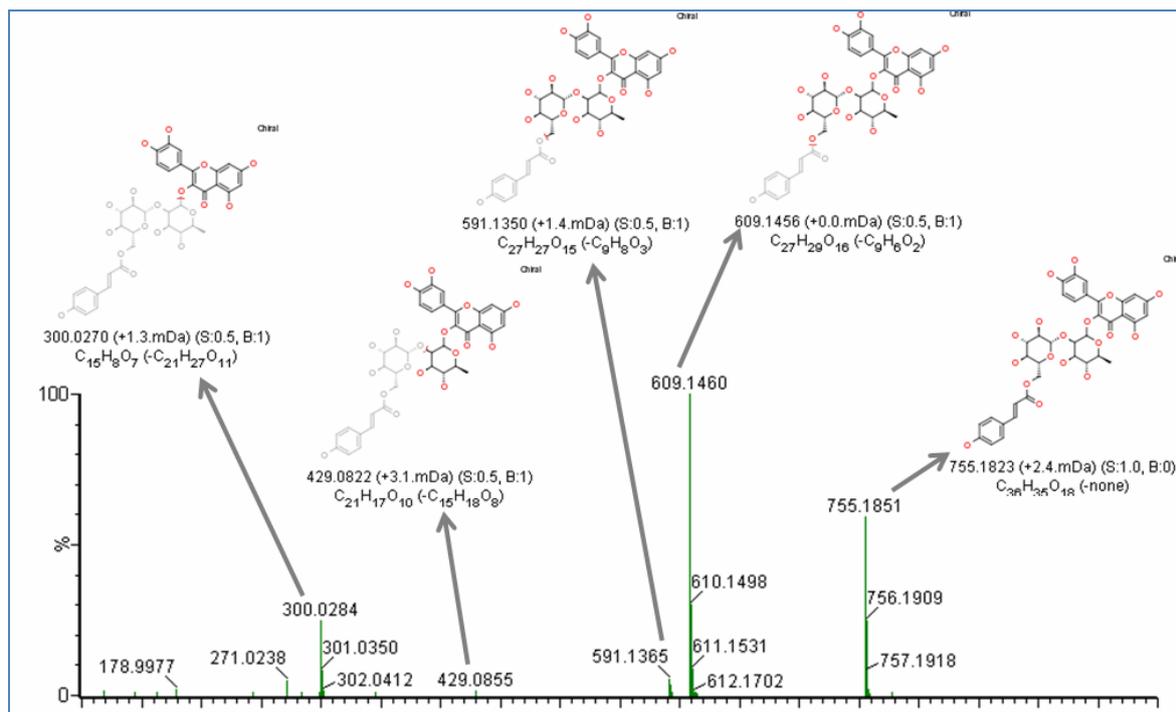


图4 目标化合物的结构裂解推导

Fig. 4 Fragmentation of the target compound structure

3 讨论

本试验探索利用代谢组学技术实现对银杏叶组分进行综合性评价,作了一种有意义的尝试。研究表明,在不同采收季节采集的银杏叶组分差异明显,并呈规律性的变化,槲皮素对香豆酰基葡萄糖鼠李糖苷等黄酮醇苷类成分含量从春季到夏季、秋季呈下降趋势,尤其在春季采收与在秋季采收有明显的不同,因此,应建立规范合理的银杏叶质量标准,采收银杏叶应有季节说明,并加强对上市产品的质量监控。该研究结果可以为后期深入研究银杏叶质量与科学的规定采收时节提供参考和借鉴,同时也为其他中药材的质量评价和控制提供了一种新的模式和手段。

感谢郑亚杰博士在论文修改过程中提供的帮助。

参考文献:

[1] 孔繁莉. 银杏叶成分在临床上的应用[J]. 吉林医学, 2010, 31(12): 1688.

- [2] Teris A B, Paola M. Chemical analysis and quality control of *Ginkgo biloba* leaves, extracts, and phytopharmaceuticals [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216: 2002–2032.
- [3] Tang Y P, Wang Y, Lou F C, et al. Flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2000, 35(5): 363–366.
- [4] 周恩丽. 树龄、采收期和干燥方法对银杏叶中总内酯的影响[J]. *现代药物与临床*, 2012, 7(4): 380–382.
- [5] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15(5): 481–489.
- [6] 王广基, 查伟斌, 郝海平, 等. 代谢组学技术在中医药关键科学问题研究中的应用前景分析[J]. *中国天然药物*, 2008, 6(2): 89–97.
- [7] 齐炼文, 李萍, 赵静. 代谢组学与中医药现代研究[J]. *世界科学技术——中医药现代化*, 2006, 8(6): 79–86.
- [8] Tang Y, Lou F, Wang J, et al. Coumaroyl flavonol glycosides from the leaves of *Ginkgo biloba*[J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(8): 1251–1256.

责任编辑: 苏爱华

英文编辑: 罗维