

基于超高效液相-飞行时间质谱技术的 中药女贞子代谢组学研究

郭娜, 范斌, 彭娟, 闫寒, 马芳, 于友华*
(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立中药女贞子生品及不同工艺炮制品的代谢组学分析方法, 比较研究其指纹图谱差异, 探讨女贞子炮制机制。方法: 采用超高效液相-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)及多元统计分析技术对生品及不同工艺炮制品进行指纹图谱差异比较分析。结果: 生品和不同炮制品指纹图谱存在明显差异, 且鉴定了一个产生差异的化学成分标志物- ligustalosite B, 其在女贞子炮制品中的含量高于女贞子生品。结论: UPLC-Q-TOF-MS 结合多元统计分析方法可对女贞子药材及其饮片进行质量评价, 同时为炮制机制提供了一定依据。

[关键词] 超高效液相-飞行时间质谱; 女贞子; 代谢组学; 炮制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0131-03

Ultra-performance LC /TOF MS Analysis of Fruits of *Ligustrum lucidum* for Metabolomic Research

GUO Na, FAN Bin, PENG Juan, YAN Han, MA Fang, YU You-hua*

(Experimental Research Centre, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To establish an ultra-performance LC-quadrupole TOF MS (UPLC-Q-TOF-MS) method of the crude and processed fruits of *Ligustrum lucidum* for metabolomic research, comparative study in their metabolite profiling was performed to explore the mechanism of processing the fruits of *L. lucidum*. **Method:** Metabolite profiling of crude and processed fruits of *L. lucidum* were performed using UPLC-Q-TOF-MS and multivariate statistical analysis technique. **Results:** There is significant difference of metabolite profiling among the crude and different processed fruits of *L. lucidum*. The chemical markers such as ligustalosite B for such variations was identified. And its contents in the crude *L. lucidum* was significantly higher than that in the processed one. **Conclusions:** This study indicated that UPLC-Q-TOF-MS coupled with multivariate statistics is able to provide quality control of the crude and processed fruits of *L. lucidum*. While the results provide the basis for the mechanism of processing.

[Key words] UPLC-Q-TOF-MS; *Ligustrum lucidum*; metabolomics; processing

女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum*

Ait. 的干燥成熟的果实, 具有滋补肝肾、明目乌发功能^[1], 现代临床多用于调节免疫、护肝、抗衰老、抗肿瘤等^[2]。女贞子化学成分复杂, 其脂溶性活性成分主要为齐墩果酸等五环三萜类化合物。近年来, 陆续发现女贞子中还含有具有重要生理活性的水溶性成分, 如红景天苷、女贞苷等多种裂环烯醚萜苷且具有较高的含量^[3-5]。古今文献记载多以炮制品入药。女贞子的炮制方法主要有酒蒸、酒炖、清蒸、醋蒸等。女贞子的药理作用是多种有效成分发挥协同作用的

[收稿日期] 2010-04-19

[基金项目] 中国中医科学院医学实验中心自主课题项目
(zz2007002)

[第一作者] 郭娜, 助理研究员, 主要从事中药质量控制及复方配伍机制研究, Tel: 010-64014411-3324

[通讯作者] * 于友华, 教授, Tel: 010-64014411-3320, E-mail: yuyh@mail.cacms.ac.cn

结果,以其中单一成分难以评价其质量。因而,如何全面地评价女贞子药材及其饮片的质量至关重要。

代谢组是指某一组织或者细胞在一特定生理时期内所有低分子量的代谢产物(基因表达终产物),植物代谢组学则是对植物的某一组织或细胞在一特定生理时期内所有低分子量代谢产物同时进行定性和定量分析^[6]。本研究采用先进 UPLC-Q-TOF-MS 技术对女贞子生品与不同工艺炮制品进行整体分析和分类比较,探讨女贞子的炮制机制。

1 仪器与试剂、药材

Waters 超高效液相-飞行时间质谱仪(包括 Waters 超高效液相色谱仪,高压二元梯度泵,可调双波长紫外检测器,柱温箱,Markerlynx 4.1 化学工作站等),Milli-Q system 超纯水纯化系统;甲醇及甲酸(Merck 公司,色谱纯);水为 Milli-Q 超纯水。女贞子药材采于南京,由中国中医科学院中药研究所生药室何希荣主管药师鉴定为木犀科植物女贞 *L. lueidum* Ait. 的干燥成熟果实,ligustalosite B 对照品由中国医学科学院药用植物所药用植物亲缘学研究室提供。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 生品 取原药材,拣去杂质和残留的果梗。成品表面灰黑色或紫黑色。

2.1.2 酒炖品 取净女贞子 100 g,用黄酒 20 g 拌匀,闷 2 h,置适宜的容器内,密闭,隔水加热,炖至辅料完全被吸尽时(4 h),放凉,干燥,50 ℃ 烘干。参考《中国药典》2005 年版。

2.1.3 醋制品 取净女贞子 100 g,加醋 20 g 拌匀,闷 2 h,置适宜的容器内,隔水加热,炖至辅料完全被吸尽时(4 h),放凉,干燥,50 ℃ 烘干。参考《中药炮制经验集成》。

2.1.4 蒸制品 将原药材除去杂质、泥屑及梗,淘净,沥干,置蒸笼内蒸 4 h,取出,干燥,50 ℃ 烘干。参考《上海市中药饮片炮制规范》。

2.2 供试品溶液的制备 取生品及各炮制样品粉末(40 目筛) 0.5 g,精密称定,25 mL 甲醇超声处理(30 min × 2),滤过,合并滤液至 100 mL 圆底烧瓶中,蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用条件 超高效液相色谱 ACQUITY C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100

mm, 1.7 μm),流动相 A 水(0.05% 甲酸);流动相 B 甲醇;梯度洗脱:(0 min, 10% B; 6 min, 40% B; 8 min, 80% B; 14 min, 85% B; 16 min, 100% B),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,检测波长 209 nm,进样 2 μL。

Synapt 型四级杆-飞行时间质谱:采用 V 扫描模式,分辨率为 12 000,采用 MS^E 模式功能;毛细管电压为 3 500 V;取样锥孔电压为 40 V;萃取锥孔电压为 3.0 V。离子源温度为 110 ℃;脱溶剂气温度为 350 ℃;脱溶剂气流量为 600 L·h⁻¹;锥孔气流量为 50 L·h⁻¹;碰撞能量为 6 V。采集频率为 0.2 S;质量扫描范围为 50 ~ 1 500;采用亮氨酸脑啡肽用于精确质量测定,质量浓度为 100 ng·mL⁻¹,流速为 30 μL·min⁻¹。数据分析利用 MarkerLynx (V 4.1) 对采集得到的谱图进行离子对的提取、峰对齐、峰匹配和峰强度校正等操作,并导入到 Simca-P (version 12) 中进行统计分析。

3 结果

图 1 显示了正离子模式下偏最小二乘法分析得到的得分矩阵投影图和载荷图。从图 1(A) 中可以看出,女贞子生品和其他炮制品之间能得到很好的区分,同时组内差异也很小。如图 1(B) 所示,在载荷矩阵投影图中,植物化学成分离子与主要离子簇的位置距离越远,则对样本类别分离的贡献越大,可能成为潜在的样本标志物。正离子模式的载荷矩阵投影如图 1(B) 所示, *m/z* 137, 709, 355, 171 等十几个离子是最有可能的化学成分标志物。从图 2 可以

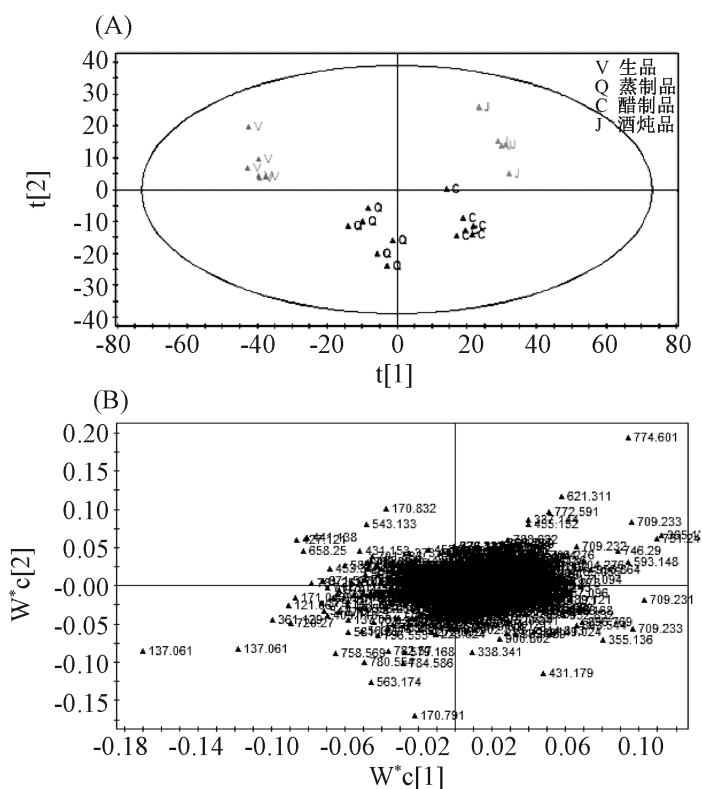


图 1 A. 正离子模式下的得分矩阵投影图
B. 正离子模式下的载荷图

看出, 一个标志物的质谱显示的精确分子质量为 563. 1746, 通过软件对可能的结构式进行模拟计算, 并结合二级质谱和标准品对照, 鉴定为 *ligustalosite B*, 它属于环烯醚萜类物质, 如图 3, 其在生品中的含量低于其他炮制品, 在不同炮制品中的含量差异不大。

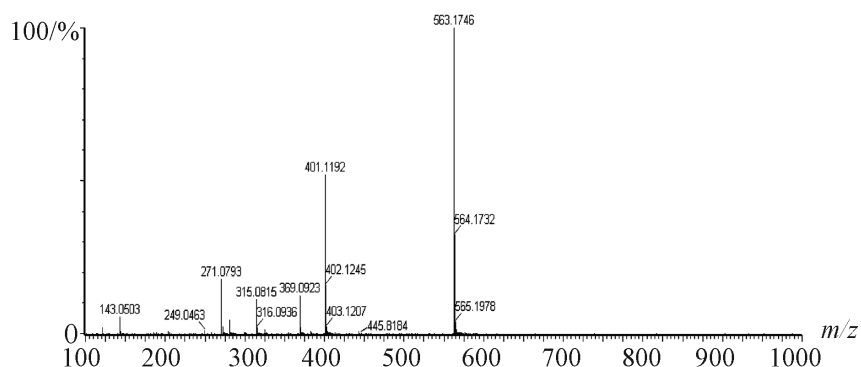


图 2 *ligustalosite B* (m/z 563. 1746) 的质谱图

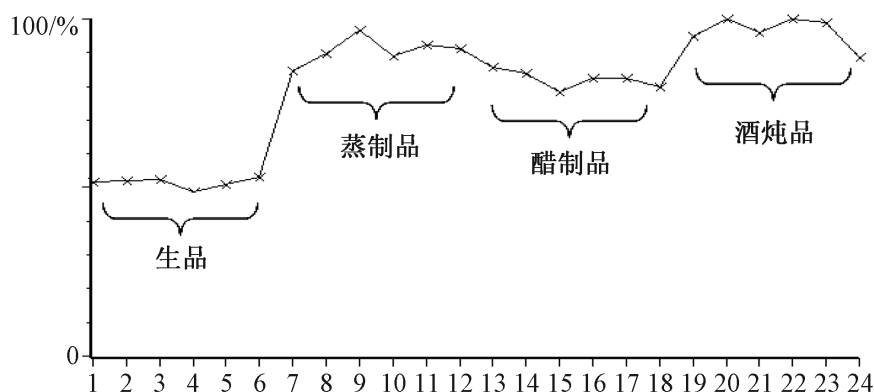


图 3 *ligustalosite B* 在生品及炮制品中的离子强度变化趋势

4 讨论

本试验分别考察甲醇、70% 甲醇、70% 甲醇 (0. 1% 甲酸)、水 4 种溶剂, 同时考察索氏提取 2 h 和超声提取 30 min 2 种提取方法。试验结果表明以甲醇超声提取得到的峰比较多且操作简便。又考察超声提取 15 min 和 30 min 及超声提取 1 次、2 次、3 次, 结果表明超声提取 30 min 比 15 min 的峰面积值高, 提取 2 次与 3 次峰面积值无明显变化, 因此选择超声提取 30 min 2 次。

流动相的选择分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇- 0. 05% 甲酸水、乙腈- 0. 05% 醋酸水 4 个溶剂系统, 结果发现甲醇-0. 05% 甲酸水作为流动相分离度很好, 峰形也较好。质谱离子源中脱溶剂气流量以及温度对化合物的离子化效率有较大影响。以 0. 4 mL·min⁻¹ 的流速时, 脱溶剂气温度为 350 ; 脱溶

剂气流量为 600 L·h⁻¹; 锥孔气流量为 50 L·h⁻¹ 的情况下喷雾效果较好并且稳定。

从 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱比较结果可以看出, 炮制品与生品的不同仅表现为化学成分的含量不同。如 m/z 137 这一可能的化学成分标志物, 其在生品和炮制品中均含有, 只是其在生品中的含量明显高于其他 3 种炮制品, 其他的几种可能的化学成分标志物在生品及炮制品均含有, 只是含量有所不同。如 3 种炮制 (蒸制、醋制、酒制) 后的共同特征是 *ligustalosite B* 含量又较生品中高。虽然目前对于 *ligustalosite B* 这一单成分的药效药理作用等研究未见报道, 但是 *ligustalosite B* 属于环烯醚萜苷类化合物, 这类化合物有很多药理活性, 炮制使其含量明显增加, 提示我们应对 *ligustalosite B* 药理活性开展深入研究, 并探讨其成为考察女贞子炮制品质量标志物的可能性。

本文采用分析速度快、高峰容量和高灵敏度等特点的 UPLC-MS 技术结合主成分分析避免了单纯以某一指标或某几个指标进行定性比较的不确定性, 建立了女贞子生品及其炮制品的代谢组学研究方法, 同时对其质量评价提供一定的参考依据。

[参考文献]

- [1] 张保国. 中药学概论 [M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 2000: 293.
- [2] 郭立忠, 张悦. 女贞子的化学成分及药理作用 [J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24 (6): 662.
- [3] 黄雯, 苏子仁, 毕文川, 等. HPLC 法测定女贞子药材中女贞苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29 (5): 824.
- [4] 蔡溱, 石力夫, 胡晋红, 等. 女贞苷体外对小鼠脾淋巴细胞转化和自然杀伤细胞活性的影响 [J]. 第二军医大学学报, 1998, 19 (1): 76.
- [5] 董娟娥, 张靖. 植物中环烯醚萜类化合物研究进展 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19 (3): 131.
- [6] 淡墨, 高先富, 谢国祥, 等. 代谢组学在植物代谢研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (22): 2337.

[责任编辑 何伟]