

银杏花粉中核苷、氨基酸及无机元素的成分分析

任浩¹, 宿树兰¹, 管汉亮¹, 孙光天², 王鑫², 钱大玮¹, 段金廛^{1*}

1. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023

2. 邳州市银杏科学研究所, 江苏 邳州 221300

摘要: **目的** 对银杏花粉中核苷类、氨基酸类及无机元素进行分析评价, 为银杏花粉资源的综合利用提供科学依据。**方法** 采用 UPLC-TQ/MS 技术测定银杏花粉中核苷类和游离氨基酸类成分, 采用 ICP-AES 测定银杏花粉中的无机元素的量。**结果** 测定了银杏花粉中甲硫氨酸、天冬氨酸等 24 种游离氨基酸, 总量高达 62.316 mg/g, 游离的必需氨基酸苏氨酸、赖氨酸等共 6.23 mg/g, 其中天冬氨酸量高达 17.11 mg/g, 也检测到含有少量牛磺酸 0.24 mg/g。核苷类成分分析表明, 银杏花粉中含有 16 种核苷, 其中以尿苷量最高为 251.99 $\mu\text{g/g}$, 其他普遍较低。元素分析结果表明, 银杏花粉中 K 的量最高 26.301 mg/g, 其次 Ca、Fe、Mg 量依次为 7.076、2.545、5.361 mg/g。As、Cd 等重金属元素未检测到。**结论** 基于核苷、氨基酸和矿物质元素的分析结果, 银杏花粉可开发为氨基酸补充剂, 为银杏花粉资源的开发利用提供科学依据。

关键词: 银杏花粉; 核苷; 氨基酸; 无机元素; UPLC-TQ/MS; ICP-AES

中图分类号: R286.22 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)19-2839-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.019.021

Component analysis of nucleosides, amino acids, and mineral elements in pollen of *Ginkgo biloba*

REN Hao¹, SU Shu-lan¹, GUAN Han-liang¹, SUN Guang-tian², WANG Xin², QIAN Da-wei¹, DUAN Jin-ao¹

1. Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing University of Chinese, Nanjing 210023, China

2. Technology Research Institute of Ginkgo, Pizhou 221300, China

Abstract: **Objective** To analyze the nutritional ingredient in the pollen of *Ginkgo biloba* and provide the theoretical basis for the comprehensive utilization of pollen of *G. biloba*. **Methods** The nucleosides and dissociative amino acids in the pollen of *G. biloba* were detected by UPLC-TQM. The content of nucleosides in pollen of *G. biloba* was calculated with the help of UPLC-TQ/MS, and the mineral elements in the pollen of *G. biloba* were determined by ICP-AES. **Results** In pollen of *G. biloba* there were 24 abundant dissociative amino acids accounting for 62.316 mg/g totally. In this number, dissociative essential amino acids accounted for 6.23 mg/g with the highest content of 17.11 mg/g aspartic acid (ASP). Meanwhile, a small quantity of taurine, approximately 0.24 mg/g, has been tested out. Furthermore, there were 16 kinds of nucleosides in the pollen of *G. biloba*. Among those nucleosides, guanosine made up for the highest percent with 251.99 $\mu\text{g/g}$ while other nucleosides accounted for a low percent. In pollen of *G. biloba*, K is the most abundant with 26.301 mg/g, followed by Ca with 7.076 mg/g, Mg with 5.361 mg/g, and Fe with 2.545 mg/g. As to the heavy mental elements, as and Cd were not found in it. **Conclusion** From above analysis, pollen of *G. biloba* can provide the theoretical basis for the development of health-care food with pollen of *G. biloba*.

Key words: pollen of *Ginkgo biloba* L.; nucleosides; amino acids; mineral elements; UPLC-TQ/MS; ICP-AES

花粉是植物有性繁殖的雄性配子体, 其营养、药用成分非常丰富, 有“完全营养素”、“微型营养库”之称^[1], 在国内外已被广泛开发和利用。现代研究表明, 花粉具有抗肿瘤、提高免疫力、抗衰老

作用, 在治疗前列腺和心血管疾病上作用显著^[2-3]。银杏 *Ginkgo biloba* L. 属于裸子植物门银杏纲, 是我国特有的珍贵孑遗树种, 也是世界上最古老的树种之一, 集食用、药用、材用、保健为一体, 是难

收稿日期: 2013-12-27

基金项目: 国家科技支撑计划项目资助 (2011BAI04B03); 国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-09-0163); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2010)

作者简介: 任浩 (1989—), 男, 硕士研究生, 主要从事生物药剂学研究。E-mail: arenhao198909@163.com

*通信作者 段金廛, 教授, 博士生导师。E-mail: dja@njutcm.edu.cn

得的多用途特种经济树种^[4]。银杏花粉富含人体必需氨基酸、维生素、矿物元素等营养成分^[5]。对于银杏花粉的营养成分的研究国内外已有报道,对于游离氨基酸量的测定比较局限,大多经过衍生化处理,过程繁琐,损耗较大^[6]。对其元素的测定使用干灰化法^[7],对其核苷的测定尚未见报道。本实验采用UPLC-TQ/MS方法测定银杏花粉中24种游离氨基酸、16种核苷类成分,采用ICP-AES测定24种元素的量,为银杏花粉资源的综合利用与深入研究提供了科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ACQUITY UPLC 系统(Waters 公司); Xevo TQ 质谱系统(Waters 公司); MassLynxTM 质谱工作站(Waters 公司); Milestone Ethos T 微波消解系统(意大利 Milestone 公司); Optima 2100DV 型电感耦合等离子发射光谱仪(美国 Perkin Elmer 公司); Sartorius BT125D 电子分析天平(德国塞利多斯公司); EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司); KQ—250E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); Anke GL—16G II 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂及试剂

鸟嘌呤(140631-200904)、黄嘌呤(140662-200301)、次黄嘌呤(140661-200301)、尿嘧啶(100469-200401)、胸腺嘧啶(140708-200401)、腺苷(879-200001)、腺嘌呤(886-200001)、尿苷(887-200202)和肌苷(140669-200903)购自中国食品药品检定研究院,供测定用;胞苷(0001446223)、鸟苷(6752)、2'-脱氧胞苷(1000851526)、2'-脱氧腺苷(1000723530)、2'-脱氧鸟苷(1000814345)、2'-脱氧肌苷(5287)、2'-脱氧尿苷(1000943453)、胸苷(1000735425)、甘氨酸、 γ -氨基丁酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、赖氨酸、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、谷氨酸、瓜氨酸、脯氨酸、缬氨酸、酪氨酸、羟脯氨酸、异亮氨酸、组氨酸、精氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、牛磺酸均购自 Sigma 公司,其经 HPLC 检测质量分数均大于 98%;元素标准溶液 Ca、K、B、Na、P、Se、Sr、Pb、Si、Hg 质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$,混合对照品溶液(As、Zn、Bi、Co、Cd、Ni、Ba、Fe、Mn、Cr、Mg、Cu、Al、Ti)质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,均购自国家标准

物质中心;超纯水(EPED 超纯水系统自制);硝酸(优级纯)、过氧化氢(分析纯)均购自上海国药化学试剂公司。乙腈(德国 Merck 公司)为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

样品为邳州银杏研究所提供,经段金廛教授鉴定为银杏 *Ginkgo biloba* L. 的花粉,样品采集后,用去离子水清洗表面,45 $^{\circ}\text{C}$ 烘干,备用。

2 方法与结果

2.1 核苷测定^[8-10]

2.1.1 样品的制备 取 0.5 g 花粉(100 目),精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 20 mL 水,称其质量,静置 1 h 后,室温超声(40 kHz)提取 30 min,称质量,加水补足减失质量,摇匀,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相:10 mmol/L 乙酸胺和 0.8% 乙酸的水溶液(A),含 0.05% 乙酸的乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~6 min, 10% A; 6~8 min, 10%~40% A; 8~9 min, 40% A; 9~11 min, 40%~50% A)。体积流量 0.4 mL/min,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.3 质谱条件 离子化模式:ESI⁺;检测方式:多反应检测(MRM);毛细管电压 3.0 kV;离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气温度 550 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气流量 1 000 L/h;锥孔气流量 50 L/h;碰撞气流量 0.15 mL/min。

2.1.4 样品测定 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 2 μL ,注入 UPLC 仪测定,总核苷量为各核苷量之和,每份样品平行测定 3 次,取平均值,结果见表 1, UPLC-TQ/MS 图见图 1。

由表 1 可知,银杏花粉中总核苷类成分高达 713.06 $\mu\text{g/g}$,其中尿苷量最高为 251.99 $\mu\text{g/g}$,其次为次黄嘌呤、鸟苷和胞苷分别为 124.27、78.9、61.12 $\mu\text{g/g}$,其他核苷类成分相对较低,其中 2'-脱氧肌苷仅含有 0.25 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 氨基酸的测定

2.2.1 样品的制备 样品供试品溶液制备方法参照“2.1.1”项。

2.2.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相:5 mmol/L 甲酸胺-5 mmol/L 乙酸胺-0.2% 甲酸水溶液(A),1 mmol/L 甲酸胺-1 mmol/L 乙酸胺-0.2% 甲酸乙腈溶液(B),

表 1 核苷种类及其质量分数
Table 1 Analysis of nucleosides in samples

编号	核苷	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	编号	核苷	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	次黄嘌呤	124.27	9	2'-脱氧尿苷	1.01
2	鸟嘌呤	46.29	10	2'-脱氧肌苷	0.25
3	黄嘌呤	50.90	11	胸腺嘧啶	39.43
4	腺嘌呤	22.53	12	胸苷	7.76
5	胞苷	61.12	13	尿苷	251.99
6	2'-脱氧胞苷	0.45	14	腺苷	0.86
7	2'-脱氧腺苷	0.59	15	鸟苷	78.99
8	2'-脱氧鸟苷	1.26	16	肌苷	25.28

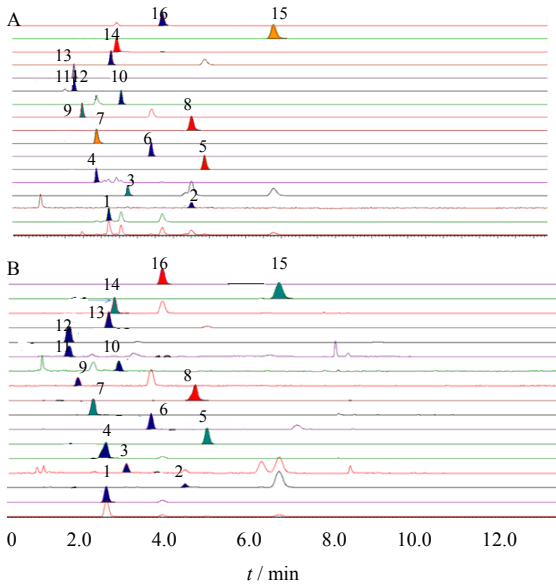


图 1 核苷对照品 (A) 和银杏花粉样品 (B) UPLC-TQ/MS 图谱
Fig. 1 UPLC-TQ/MS of nucleosides reference substance (A) and pollen samples of *G. biloba* (B)

梯度洗脱: 0~6 min, 15%~20% A; 6~10 min, 20%~30% A; 10~11 min, 30%~46% A。体积流量 0.4 mL/min, 柱温 35 ℃。

2.2.3 质谱条件 参照“2.1.3”项。
2.2.4 样品测定 分别精密吸取对照品与供试品溶液各 1 μL , 注入 UPLC 仪测定, 总氨基酸的量为各氨基酸的量之和, 每份样品平行测定 3 次, 取平均值, 结果见表 2, 氨基酸 UPLC-TQ/MS 图谱见图 2。

由表 2 可知, 银杏花粉中游离氨基酸种类较多, 其中必需氨基酸 7.166 mg/g, 总游离氨基酸高达 62.316 mg/g, 其中天冬氨酸高达 17.101 mg/g, 其次为谷氨酰胺、精氨酸、组氨酸分别为 8.884 mg/g、7.066 mg/g、3.128 mg/g, 同时还检测到少量的动物氨基酸牛磺酸为 10.01 $\mu\text{g/g}$, 质量分数较低。

表 2 氨基酸种类及其质量分数
Table 2 Analysis of amino acids in samples

编号	氨基酸	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	编号	氨基酸	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	苯丙氨酸*	771.97	13	苏氨酸	1 842.31
2	色氨酸*	722.27	14	甘氨酸	368.40
3	亮氨酸*	547.33	15	谷氨酸	5 389.45
4	异亮氨酸*	968.69	16	瓜氨酸	2 594.16
5	氨基丁酸	1 984.56	17	谷氨酰胺	8 840.88
6	甲硫氨酸*	56.72	18	天冬酰胺	622.41
7	缬氨酸*	1 748.00	19	丝氨酸	1 600.69
8	鸟氨酸	215.74	20	天冬氨酸	17 101.22
9	络氨酸	277.28	21	精氨酸	7 066.21
10	脯氨酸	1 555.25	22	组氨酸	3 128.59
11	丙氨酸	2 329.66	23	赖氨酸*	2 351.72
12	羟脯氨酸	223.19	24	牛磺酸	10.01

*为必需氨基酸
*essential amino-acid

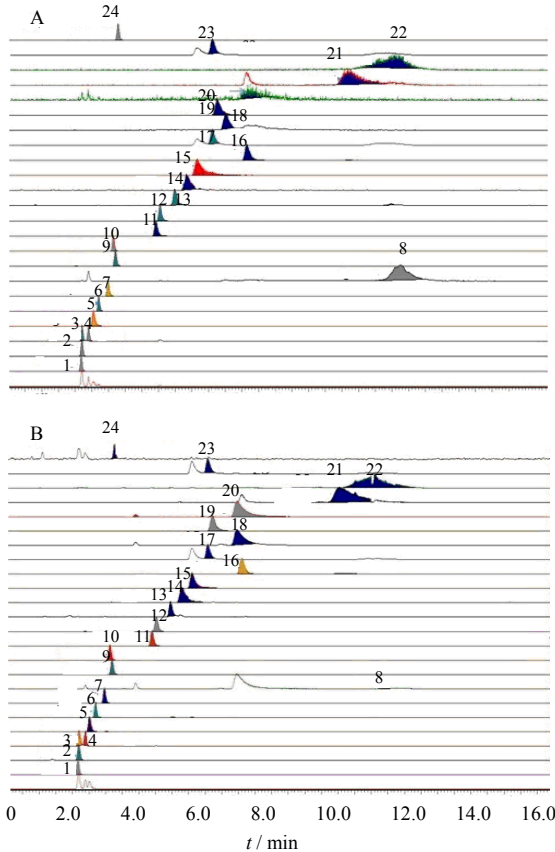


图 2 氨基酸对照品 (A) 和银杏花粉样品 (B) UPLC-TQ/MS 图
Fig. 2 UPLC-TQ/MS of amino acids reference substance (A) and pollen samples of *G. biloba* (B)

2.3 元素测定
2.3.1 样品制备 准确称取 0.5 g 花粉 (100 目) 于聚四氟乙烯消解罐中, 加入 7 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 ,

放入微波消解炉, 10 min 升至 200 °C, 200 °C 保持 10 min, 微波功率 1 000 W, 待消解完全后, 冷却, 转移至 50 mL 量瓶中, 加去离子水至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。同步以 7 mL HNO₃ 和 30% H₂O₂ 1 mL 做空白试验。

2.3.2 电感耦合等离子体-原子发射光谱 (ICP-AES) 测定条件 射频功率 1.3 kW, 雾化气流量 0.8 L/min, 辅助气流量 0.2 L/min, 冷却气流量 15 L/min, 观测方向 Axial, 溶液提升量 0.8 mL/min。

2.3.3 样品测定 实验依据光谱仪对每个元素的测定均同时选择多条特征谱线的特点, 考虑到共存元素的干扰, 每个元素首先选取 2~3 条谱线进行测定, 综合分析强度、干扰情况及稳定性, 最终选择干扰少、精密度和信噪比均较高的谱线作为被测元素的分析谱线。将硝化液进样。每份样品平行测定 3 次, 取平均值, 结果见表 3。

表 3 元素种类及其质量分数
Table 3 Analysis of mineral elements in samples

元素	质量分数 / (μg·g ⁻¹)	元素	质量分数 / (μg·g ⁻¹)
砷	未检出	硅	405.29
硒	未检出	汞	7.58
锌	117.86	锰	67.07
磷	10 083.50	铬	3.59
铅	7.29	镁	5 361.98
铋	0.51	钙	7 076.84
钴	0.61	铜	8.68
镉	未检出	钛	50.89
镍	2.89	铝	1 755.70
钡	25.25	锶	21.56
铁	2 545.70	钠	263.97
硼	18.46	钾	26 302.00

由表 3 可知, 银杏花粉中宏量元素量丰富, K、P、Ca、Mg 分别为 26.302、10.083、7.076、5.361 mg/g, Na 量较低为 0.263 mg/g。银杏花粉中微量元素种类繁多, Fe 的量高达 2.545 mg/g, Al 的量为 1.755 mg/g, 其他质量分数较低。重金属元素 As、Cd 未检测得到, Pb、Hg 量为 0.007 mg/g。

3 讨论

3.1 测定方法学考察

对实验中各种检测方法均进行线性、精密度、稳定性、重复性及加样回收率考察, 结果表明各指标均符合定量测定要求, 适于检测相应成分。

3.2 核苷分析

本实验通过 UPLC-TQ/MS 测定银杏花粉中 18

种核苷的量, 通过表 1 可以得出, 银杏花粉含有 16 种核苷, 其中尿嘧啶和单磷酸胞苷未检测到, 核苷量相比于氨基酸量普遍较低, 总量仅有 0.713 mg/g。尿苷量相对于其他核苷较高, 为 0.251 mg/g, 约占总核苷的 35.20%。

3.3 游离氨基酸分析

本实验通过 UPLC-TQ/MS 测定游离的 24 种氨基酸, 通过表 1 可以得出, 银杏花粉中游离氨基酸量较高, 游离氨基酸总量高达 62.316 mg/g, 必需氨基酸总量也高达 7.166 mg/g, 约占总氨基酸的 11.49%, 说明银杏花粉可以作为高效的氨基酸补充剂。同时可以发现天冬氨酸量高达 17.101 mg/g, 天冬氨酸是生物体内赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸等必需氨基酸及嘌呤、嘧啶碱基的合成前体。它可作为 K⁺、Mg²⁺ 离子的载体向心肌输送电解质, 从而改善心肌收缩功能, 同时降低氧消耗, 在冠状动脉循环障碍缺氧时, 对心肌有保护作用^[11]。精氨酸的量也很高为 7.006 mg/g, 精氨酸作为半必需氨基酸, 对于婴儿来说也属于必需氨基酸, 缺乏精氨酸会导致血氨过高, 影响机体正常的生长和发育^[12]。γ-氨基丁酸 (GABA) 的量高达 1.984 mg/g, 现代研究表明, GABA 具有降低血压、抗焦虑、预防和治疗癫痫、促进睡眠、增强记忆力、解毒等作用^[13]。

3.4 元素分析

本实验通过 ICP-AES 测定银杏花粉中 24 种元素的量, 通过表 3 可以得出, 银杏花粉中含有较丰富的元素, 种类较多。银杏花粉中 K 的量高达 26.302 mg/g, Ca、Fe、Mg 量也较高, 依次为 7.076、2.545、5.361 mg/g。银杏花粉中 Zn 量为 0.117 mg/g, Cu 量为 0.008 mg/g, 锌、铜元素量比值均呈 Zn 高 Cu 低的现象, 这与癌症患者血清中 Zn 低 Cu 高的现象相反, 因此花粉有利于调节体内的铜锌平衡, 可能起到抗癌作用^[14]。同时 As、Cd 等重金属元素没有检测到, Al 元素量较高, 达 1.755 mg/g, 有研究表明人体摄取过量的 Al 可引起缺钙, 体内过高的残留铝还可导致神经退行性疾病^[15], 因此建议在以花粉开发保健品时应注意限定每日服用量, 保证人体的安全。

本实验通过对银杏花粉中核苷、氨基酸以及无机元素分析表明, 银杏花粉基于核苷、游离氨基酸和矿质元素分析, 具有较高的营养价值。实验结果为银杏花粉开发为保健食品及深入研究提供了科学依据。

参考文献

- [1] 李英华, 胡福良, 朱 威, 等. 我国花粉化学成分的研究进展 [J]. 养蜂科技, 2005, 8(4): 7-16.
- [2] 王开发, 严惠芳, 左其芳. 花粉多糖注射剂临床前抗肿瘤药效学预试 [J]. 蜜蜂杂志, 2004(6): 3-4.
- [3] 杨必成, 杨义芳. 花粉治疗前列腺疾病的物质基础研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 144-149.
- [4] 熊 壮, 曹福亮. 银杏花粉研究进展 [J]. 林业科技开发, 2010, 24(4): 6-9.
- [5] 曹福亮. 中国银杏 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2002.
- [6] 王国霞, 曹福亮. 4个银杏主要产区的银杏花粉营养成分比较研究 [J]. 浙江林业科技, 2007, 27(3): 8-11.
- [7] 赵永艳, 曹福亮, 褚生华, 等. 银杏花粉特性的初步研究 [J]. 江苏林业科技, 1997, 24(3): 6-9.
- [8] 曹 琰, 严 辉, 段金廛, 等. 不同产地当归药材核苷类成分的分析 [J]. 药物分析杂志, 2011, 30(11): 2026-2030.
- [9] 孔德平, 钱大玮, 郭 盛, 等. 9种果实、种子类补益中药的核苷类成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 98-101.
- [10] Tao W W, Duan J A, Yang N Y, *et al.* Determination of nucleosides and nucleobases in the pollen of *Typha angustifolia* by UPLC-PDA-MS [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23: 373-378.
- [11] 祝忠群. 谷氨酸、天门冬氨酸与心肌保护 [J]. 心血管病学进展, 1997, 18(1): 47-50.
- [12] 刘兆金, 印遇龙, 邓 敦, 等. 精氨酸生理营养研究 [J]. 氨基酸与生物资源, 2005, 27(4): 54-57.
- [13] 杨胜远, 陆兆新, 吕风霞, 等. γ -氨基丁酸的生理功能和研究开发进展 [J]. 食品科学, 2005, 26(9): 546-551.
- [14] 毛 俐, 谭明雄, 陈振锋, 等. ICP-AES 法测定广西产中药广豆根及千斤拔中的金属元素含量 [J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(9): 2568-2570.
- [15] 张凯松, 周启星. 铝的生态与健康风险研究进展 [J]. 生态科学, 2003, 22(4): 351-355.