

基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 的代谢组学技术对粗茎秦艽不同部位化学成分研究

陈俊可, 曾 锐*

西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘 要: 目的 分析粗茎秦艽 *Gentiana crasicaulis* 不同部位化学成分的差异。方法 运用四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用 (UPLC-ESI-HRMSⁿ) 技术对粗茎秦艽不同部位的化学成分进行采集, 所得数据运用主成分分析 (PCA) 法与正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 处理, 粗茎秦艽不同部位的差异指标成分通过精准的一级质谱质荷比和二级质谱碎片离子同对照品图谱和软件数据库搜索以及相关文献报道成分进行判别分析。结果 共鉴定 36 个成分, 包括环烯醚萜类 12 个、黄酮类 11 个、三萜类 4 个、酯类 2 个、木脂素类 1 个、其他类 6 个, 其中 4 个成分首次在该植物中报道, 通过 OPLS-DA, 筛选出根与地上部分间 16 个差异性较大的化学成分。结论 粗茎秦艽环烯醚萜类差异成分主要分布于根部, 而黄酮类和三萜类差异成分则主要集中于地上部分 (花和茎叶), 为粗茎秦艽资源的综合利用提供了依据。

关键词: 粗茎秦艽; UPLC-ESI-HRMSⁿ; 植物代谢组学; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 差异指标成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2328-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.013

Application of metabolomics approach to study on chemical constituents in different parts of *Gentiana crasicaulis* based on UPLC-ESI-HRMSⁿ

CHEN Jun-ke, ZENG Rui

College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To analyze the difference of chemical constituents in different parts of *Gentiana crasicaulis*. **Methods** An ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UPLC-ESI-HRMSⁿ) was developed to characterize the chemical constituents of different parts in *G. crasicaulis*. The data were analyzed by principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The structures of chemical markers in different parts of the plants were identified based on accurate primary mass spectrometry and secondary mass spectrometry fragment ion, combined with the reference map, software database searching and related literature. **Results** A total of 36 compounds were identified, including 12 iridoids, 11 flavonoids, 4 triterpenes, 2 esters, 1 lignans, and 6 others. Four of them were reported for the first time in *G. crasicaulis*. There were 16 chemical ingredients with significant differences distinguished by the method of OPLS-DA. **Conclusion** The chemical markers of iridoids were mainly distributed in roots, the chemical markers of flavonoids and triterpenes were mainly concentrated in aerial part of the plant. It is suggested that the potential multiple utilization of different parts from *G. crasicaulis*.

Key words: *Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk.; UPLC-ESI-HRMSⁿ; plant metabolomics; PCA; OPLS-DA; potential marker

粗茎秦艽为龙胆科植物秦艽 *Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk. 的干燥根, 在历代《中国药典》中均有收载, 是常用中药秦艽的 4 种基原植物之一^[1]。此外, 秦艽花也是传统藏药, 首载于藏医药著作《四

部医典》, 藏药名为钩西、江毒那保、西当那保等^[2]。其具有祛风湿、止痹痛、清湿热和退虚热的功效。粗茎秦艽中主要活性成分为龙胆总苷, 包含龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷和獐牙菜苦苷^[3]。而这 4

收稿日期: 2018-03-10

基金项目: 科技部中医药现代化研究重点专项 (SQ2017YFC170295); 国家留学基金委资助项目 (CSC201500850007); 四川省科技厅科技支撑计划 (2014SZ0131); 四川省科技厅基础研究项目 (2015JY0009); 西南民族大学 2018 中央高校重点项目 (2018NZD18); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (CX2017SZ087)

作者简介: 陈俊可 (1993—), 硕士研究生。Tel: 18215563329 E-mail: JunkeChen0211@163.com

***通信作者** 曾 锐, 副教授, 主要从事药物制剂及民族药研究。Tel: (028)85522099 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

种成分在根、茎、叶、花不同部位的含量各不相同,不同部位的药理活性也有所差异。粗茎秦艽根临床常用于治疗风湿性关节炎、肝炎、流感病毒等^[4],藏药中粗茎秦艽花常用其治疗胃肠炎、胆囊炎、肝炎等症^[5];全草也入药,具有祛风湿、止痹痛、清湿热和退虚热的功效^[2]。

目前,主要采用高效液相色谱法^[6-7]对粗茎秦艽不同部位的化学成分差异性进行分析,指标性成分仅选用少数环烯醚萜苷,缺乏全面性,无法确定差异指标成分,难以对不同药用部位进行鉴别。而植物代谢组学是对植物某一组织在特定生理时期内所有小分子代谢物同时进行无差别代谢物的分析,从宏观角度研究植物的生化变化,整体全面地对药用植物进行分析^[8-10]。本实验在课题组前期研究基础上^[11-12],采用四级杆-静电场轨道离子阱高分辨液质联用(UPLC-ESI-HRMSⁿ)结合植物代谢组学技术从整体研究角度对粗茎秦艽根、茎叶、花 3 个部位间次级代谢物的差异性进行分析,采用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)等多元统计分析方法,找出区分粗茎秦艽根、茎叶、花的差异指标成分,以期从新角度为粗茎秦艽不同部位的鉴别和合理利用提供参考依据。

1 仪器与材料

UPLC-ESI-HRMSⁿ 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司);Ultimate 3000 超高效液相色谱系统(戴安公司,美国);400Y 型多功能粉碎机(永康市铂欧五金制品有限公司);ESJ200-4 万分之一电子天平(沈阳龙腾电子有限公司);BT25S 十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

甲醇为色谱纯(默克公司,美国),色谱纯甲酸(西格玛奥德里奇,美国),均为 LC-MS 级;水为纯净水(Milli-Q SP Regent Water system, 美国),甲醇为分析纯(质量分数≥99.5%);对照品龙胆苦苷(批号 110902)、槲皮素(批号 110627)、阿魏酸(批号 111020)购自四川省维克奇生物科技有限公司;对照品莫诺苷(批号 25406-64-8)、马钱苷酸(批号 121220)、獐牙菜苷(批号 130401)、獐牙菜苦苷(批号 130402)、异牡荆黄素(批号 151117)、异荭草苷(批号 111974-201401)、山柰酚(批号 120718)、芦丁(批号 153-18-4)购自成都普菲德生物技术有限公司;对照品科罗素酸(批号 4547-24-4)购自

成都克洛玛生物科技有限公司,12 种对照品质量分数均≥98%。粗茎秦艽药材采自四川省阿坝州黑水县,采集信息见表 1。所采集样品经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为粗茎秦艽 *Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk. 全株。粗茎秦艽根、花、茎叶为实验室自制,根去芦头。

表 1 粗茎秦艽采集地信息

Table 1 Sampling site information of *G. crasicaulis*

编号	采集地	海拔/m	采集时间	自制部位
1	沙石多乡甲足村	2 710	2016 年 7 月	根、茎叶、花
2	沙石多乡甲足村	2 710	2016 年 8 月	根、茎叶、花
3	沙石多乡甲足村	2 710	2016 年 9 月	根、茎叶、花
4	芦花镇三打古村	2 950	2016 年 7 月	根、茎叶、花
5	芦花镇三打古村	2 950	2016 年 8 月	根、茎叶
6	卡龙镇才盖村	2 880	2016 年 7 月	根、茎叶、花
7	卡龙镇才盖村	2 880	2016 年 11 月	根、茎叶、花
8	瓦钵乡渔沙沟上组	3 100	2016 年 7 月	根、茎叶、花
9	瓦钵乡渔沙沟上组	3 100	2016 年 8 月	根、茎叶、花
10	瓦钵乡渔沙沟上组	3 100	2016 年 11 月	根、茎叶、花
11	瓦钵乡渔沙沟组	2 900	2016 年 7 月	根、茎叶、花
12	瓦钵乡渔沙沟组	2 900	2016 年 8 月	根、茎叶、花

2 方法

2.1 粗茎秦艽不同部位样品制备

将采集到的 12 批秦艽新鲜样品分为根、茎叶、花(根去芦头)3 部分,药材鲜品放入 50 ℃烘箱中烘干,将药材干品粉碎后过三号筛,称取粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为 ACQUITYUPLCBEHC₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水。梯度洗脱条件为:0~2 min, 5% A; 2~20 min, 5%~12% A; 20~35 min, 12%~40% A; 35~38 min, 40% A; 38~48 min, 40%~80% A; 48~50 min, 80% A; 50~51 min, 80%~5% A; 51~55 min, 5% A。体积流量为 0.3 mL/min,进样室温度 15 ℃,柱温 35 ℃,进样量 2 μL。

2.3 质谱条件

离子源为 ESI 源,负离子检测模式,鞘气压力 206.84 kPa;辅助气体积流量 8 L/min;喷雾电压 2.00

kV; 离子传输管温度 320 °C; 辅助气温度 150 °C; 扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 100~1 200。MS/MS 模式时, 碰撞能为 30 eV。

2.4 数据处理

将采集的原始样品质谱数据和色谱图采用 Progenesis QI V 2.0 软件进行峰提取、峰对齐、峰鉴别及归一化等预处理, 其主要参数设置如下: 保留时间范围为 1~50 min; m/z 100~1 200; 保留时间和 m/z 允许偏差分别为 0.1 min、 5×10^{-6} 。所得数据导入 Simca-p 13.0 软件进行无监督的 PCA, 初步观察不同部位的聚集情况, 再结合 OPLS-DA 模型的 S-plot 结合 VIP 值寻找差异成分, 从整体到部分更全面分析粗茎秦艽不同部位的差异。OPLS-DA 模型通过 CV-ANOVA 验证, $P < 0.05$ 说明该模型预测性能强, 差异具有统计学意义。作图软件为 Graphpad prism 5 软件。

3 结果

3.1 粗茎秦艽不同部位基峰离子流图谱分析

具有代表性的粗茎秦艽根、茎叶、花

UPLC-ESI-HRMSⁿ 基峰离子流图如图 1 所示, 直观显示其不同部位的化学成分之间存在明显差异。将 12 个对照品图谱、软件数据库搜索和相关文献报道化合物同检测到的化合物的保留时间、相对分子质量、碎片离子进行比对, 共鉴定或推断出 36 个代谢物, 包括环烯醚萜类 12 个、黄酮类 11 个、三萜类 4 个、酯类 2 个、木脂素类 1 个、其他类 6 个, 结果见表 2。其中 4 个组分 [芦丁、swertiajaponin、5-(β -D-glucopyranosyl)-2-hydroxybenzoic acid 和 diosmetin] 在龙胆属中已有报道, 但首次在粗茎秦艽中报道。

3.2 多元统计分析结果

图 1 表明粗茎秦艽根、花、叶的化学成分存在差异, 为确定粗茎秦艽不同部位的化学成分差异, 将质谱的原始数据导入 Progenesis QI V 2.0 软件进行峰提取、峰对齐、峰鉴别及归一化等预处理, 将处理所得数据集矩阵导入到 Simca-p 13.0 软件中, 使用 PCA 对数据进行处理, 其中 5 个主成分的特征值 > 1 , 占总方差的 75%。建立粗茎秦艽不同部位的 PCA 得分图进行整体趋势分析观察, 结果见图 2。

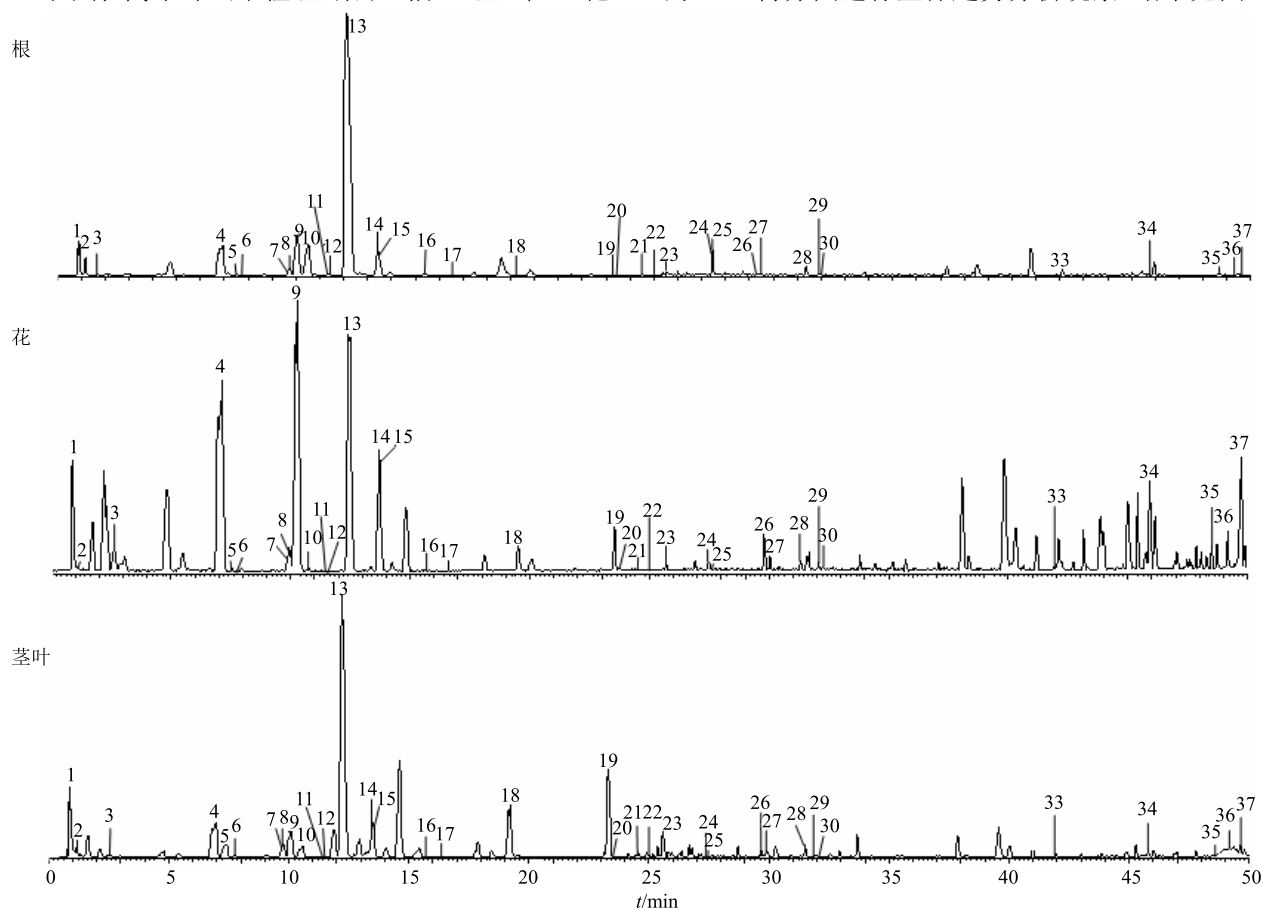


图 1 粗茎秦艽不同部位基峰强度离子流 BPI 色谱图

Fig. 1 Base peak intensity of different parts of *G. crasicaulis*

表 2 粗茎秦艽不同部位化合物鉴定结果

Table 2 Identification of compounds in different parts of *G. crasicaulis*

编号	分子式	M_w	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	t_R/min	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物
1	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.115 7	341.107 8	341.108 7	0.82	-0.57	221.066 3, 179.055 2, 161.044 5, 143.033 8, 131.033 8, 119.033 7, 113.023 2, 71.012 5	蔗糖 ^[12]
2	$C_6H_8O_7$	192.026 5	191.018 6	191.018 8	1.14	-2.83	173.008 0, 154.997 5, 129.018 2, 87.007 4, 67.017 5	柠檬酸 ^[12]
3	$C_9H_{14}O_3$	170.093 7	169.085 9	169.085 9	2.50	-3.43	151.075 2, 169.086 0, 123.080 3, 95.048 9, 57.033 3	isoboonein ^[12]
4*	$C_{16}H_{24}O_{10}$	376.136 4	751.265 5	751.266 4	6.93	0.80	213.076 2, 169.086 0, 151.075 4, 125.059 5, 113.023 1, 95.048 8, 69.033 1, 59.012 4	马钱苷酸 ^[12]
5*	$C_{17}H_{26}O_{11}$	406.147 0	405.139 1	405.140 1	7.53	-0.24	243.087 7, 155.034 0, 141.054 5, 119.033 7, 113.023 1, 101.023 0, 89.023 0, 71.012 4	莫诺苷 ^[12]
6	$C_{22}H_{34}O_{15}$	538.189 2	537.181 4	537.182 6	7.73	1.13	357.120 1, 213.076 3, 169.086 2, 113.023 3, 101.022 8, 59.012 5	loganic acid 11- <i>O</i> - β - glucopyranosyl ester ^[12]
7	$C_{15}H_{22}O_9$	346.125 83	345.118 0	345.118 9	9.74	0.93	165.054 7, 121.064 7, 113.023 1, 89.023 1, 59.012 5	swertiajaposide B ^[12]
8	$C_{16}H_{22}O_{11}$	390.115 7	389.107 8	389.108 9	9.77	1.27	345.118 8, 209.045 5, 183.064 9, 165.054 6, 121.064 6, 59.012 5	secologanoid ^[12]
9*	$C_{16}H_{22}O_{10}$	374.120 7	373.112 9	373.113 8	10.07	-0.71	179.054 7, 149.059 8, 141.018 1, 119.033 8, 101.023 1, 89.023 1, 71.012 5, 59.012 5	獐牙菜苦苷 ^[12]
10	$C_{22}H_{30}O_{14}$	518.163 0	1 035.318 7	1 035.320 5	10.53	0.45	221.066 1, 179.055 2, 193.049 9, 161.044 6, 131.033 7, 119.033 7, 89.023 0	6'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖基龙胆苦 苷 ^[12]
11	$C_{16}H_{22}O_8$	342.130 9	341.123 1	341.124 2	11.47	0.13	179.055 1, 161.044 6, 131.033 4, 89.022 9, 59.012 4	coniferin ^[13]
12	$C_{22}H_{32}O_{14}$	520.178 7	519.170 8	519.171 9	11.50	0.90	221.066 4, 179.055 5, 151.075 2, 113.023 1, 89.023 0, 59.012 4	紫药苦苷 ^[12]
13*	$C_{16}H_{20}O_9$	356.110 2	711.213 1	711.214 1	12.20	-0.34	191.070 5, 173.059 7, 163.075 4, 149.059 7, 119.033 8, 101.023 1, 89.023 1, 71.012 5	龙胆苦苷 ^[12]
14*	$C_{16}H_{22}O_9$	358.125 8	357.118 0	358.126 4	13.50	1.67	195.065 1, 177.055 0, 151.075 2, 125.023 2, 119.033 8, 113.023 1, 101.023 0, 59.012 5	獐牙菜苷 ^[12]
15	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.157 9	593.150 1	593.151 4	13.53	1.26	473.109 3, 431.097 3, 341.066 8, 311.056 0, 282.052 7	皂草黄苷 ^[12]
16	$C_{17}H_{26}O_{10}$	390.152 0	389.144 2	389.145 3	15.87	0.06	181.086 2, 179.055 0, 161.044 1, 119.033 8, 101.022 9	loganin ^[14]
17*	$C_{10}H_{10}O_4$	194.057 4	193.049 5	193.049 8	16.54	-1.44	178.026 1, 149.059 8, 137.022 8, 134.035 9, 93.030 3	阿魏酸 ^[12]
18*	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.100 0	447.092 2	447.093 0	19.22	-0.53	429.082 4, 357.061 5, 327.051 0, 297.039 5, 285.039 9, 133.028 8	异荛草苷 ^[12]

续表 2

编号	分子式	M_w	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	t_R/min	偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物
19*	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432.105 1	431.097 3	431.098 0	23.33	-0.93	341.067 8, 311.056 6, 283.061 2, 269.045 6	异牡荆黄素 ^[12]
20**	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.152 8	609.145 0	609.146 1	23.43	-0.05	301.035 03, 300.027 1, 178.997 6	芦丁 ^[15]
21#	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462.115 7	461.107 8	461.108 9	24.57	1.11	383.077 6, 371.077 4, 353.065 3, 341.066 3, 298.047 6, 161.023 1	swertiajaponin ^[16]
22	$C_{34}H_{46}O_{18}$	742.267 9	741.260 0	741.261 6	25.00	0.55	417.154 2, 179.054 8, 161.045 0, 101.022 9, 89.023 0	liriodendrin ^[17]
23	$C_{26}H_{32}O_{11}$	520.193 9	519.186 1	519.187 1	25.74	-0.19	357.134 5, 342.110 3, 151.038 8, 113.023 2, 71.012 4	6'-O- β -D-葡萄糖基獐牙苔 ^[12]
24#	$C_{13}H_{16}O_9$	316.078 9	315.071 1	315.072 1	27.37	1.39	315.072 1, 153.018 2, 109.027 9	5-(β -D-glucopyranosyl)-2-hydroxybenzoic acid ^[18]
25	$C_{25}H_{34}O_{14}$	558.194 3	557.186 5	557.187 5	27.47	0.92	233.081 5, 161.096 1, 189.091 4, 119.033 7, 101.023 0, 89.023 0, 59.012 5	大叶苷 D ^[12]
26*	$C_{15}H_{10}O_7$	302.042 1	301.034 3	301.035 2	29.28	-0.68	273.040 9, 178.997 3, 151.002 4, 121.028 3, 107.012 4	槲皮素 ^[12]
27	$C_{15}H_{10}O_6$	286.047 2	285.039 4	285.040 3	29.35	-0.39	257.045 0, 243.029 3, 241.013 6, 199.039 44	木犀草素 ^[19]
28	$C_{15}H_{10}O_5$	270.052 3	269.044 4	269.045 4	31.42	-0.50	269.045 1, 117.032 9, 151.002 5	芹菜素 ^[19]
29*	$C_{15}H_{10}O_6$	286.047 2	285.039 4	285.040 3	31.93	-0.47	257.045 5, 241.048 3, 192.005 5, 177.018 4, 151.002 4, 131.012 7, 107.012 4	山柰酚 ^[12]
30#	$C_{16}H_{12}O_6$	300.062 8	299.055 0	299.055 9	31.99	-0.76	299.056 3, 284.032 5, 151.002 2	diosmetin ^[15]
31	$C_{26}H_{28}O_{12}$	532.157 5	531.149 7	531.150 7	33.80	0.77	531.150 6, 315.072 3, 297.061 1, 189.092 0, 153.018 2, 109.028 2	gentiactoside ^[12]
32	$C_{15}H_{12}O_5$	272.067 9	271.060 1	271.061 1	38.53	-0.45	271.061 0, 256.037 4, 228.042 9	柚皮素 ^[19]
33	$C_{30}H_{48}O_4$	472.354 7	471.346 9	471.347 7	41.77	-0.55	471.311 5, 441.335 8, 409.347 3, 407.333 2, 55.107 2	maslinic acid ^[20]
34*	$C_{30}H_{48}O_4$	472.354 7	471.346 9	471.347 7	45.78	0.63	471.347 5, 423.327 6, 223.236 5, 147.289 8	科罗素酸 ^[12]
35	$C_{30}H_{48}O_3$	456.359 8	455.352 0	455.353 0	49.09	-0.12	455.353 9, 413.306 9, 272.216 1, 92.046 0	齐墩果酸 ^[12]
36	$C_{30}H_{48}O_3$	456.359 8	455.352 0	455.352 9	49.63	0.93	455.352 6, 272.216 1, 99.104 7, 92.052 0	熊果酸 ^[12]

*通过对照品图谱对比确认; #首次在粗茎秦艽中报道

*identified by comparing with reference standards; #compositions reported for the first time from roots of *G. crasicaulis*

从图 2 中可以看出, 粗茎秦艽根、茎叶、花得到了明显的区分, 表明粗茎秦艽不同部位所含的化学成分差异显著, 所建立方法可以良好表征不同部位的成分差异。

从图 2 可以看出秦艽地上部分(花、茎叶)和地下部分(根)被 $t[1]$ 轴区分明显, 地上部分位于负半轴, 地上部分位于正半轴。地上部分之间的差

异小于与根的差异, 因此将粗茎秦艽的根与地上部分分为 2 组进行比较。选择 OPLS-DA 模型分析是因其能够增强在 PCA 模型中观察到的根与地上部分的分离情况, 因为 OPLS-DA 模型在为样品组间的差异提供最相关变量方面具有更大的潜力。采用 OPLS-DA 进行比较, OPLS-DA 模型验证结果表明其未过度拟合 ($R^2_X=0.558$, $R^2_Y=0.994$, $Q^2=0.979$,

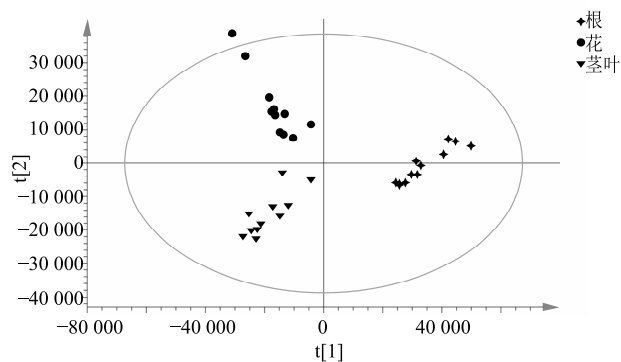


图2 粗茎秦艽不同部位得分散点图

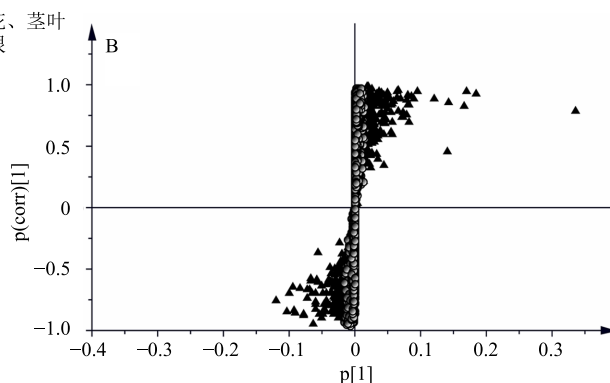
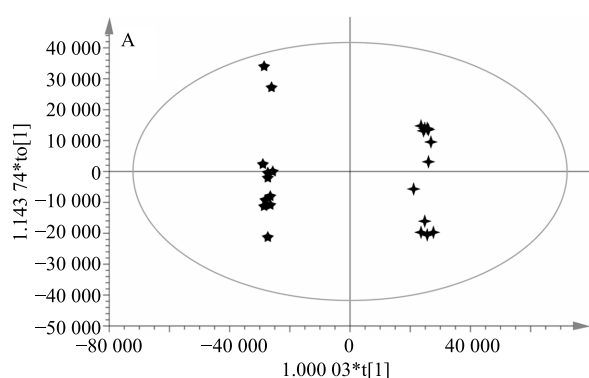
Fig. 2 Score scatter of different parts from *G. crasicaulis*

图3 粗茎秦艽地上与根的 OPLS-DA 得分图 (A) 和 S-plot 图 (B)

Fig. 3 OPLS-DA score plot (A) and S-plot (B) of aboveground and roots from *G. crasicaulis*

m/z 537.182 6)、secologanosi ($t_R=9.77$ min, m/z 389.108 9)、6'- O - β -D-葡萄糖基龙胆苦苷 ($t_R=10.53$ min, m/z 518.163 2)、龙胆苦苷 ($t_R=12.20$ min, m/z 356.110 6)、皂草黄苷 ($t_R=13.53$ min, m/z 593.151 4)、异荭草苷 ($t_R=19.22$ min, m/z 448.100 3)、异牡荆黄素 ($t_R=23.33$ min, m/z 431.098 0)、芦丁 ($t_R=23.43$ min, m/z 609.146 1)、swertiajaponin ($t_R=24.57$ min, m/z 462.006 2)、大叶苷 D ($t_R=27.47$ min, m/z 557.187 5)、科罗素酸 ($t_R=45.78$ min, m/z 471.347 7)、齐墩果酸 ($t_R=49.09$ min, m/z 455.353 0)、熊果酸 ($t_R=49.63$ min, m/z 455.352 9)。其中马钱苷酸、龙胆苦苷、异荭草苷、异牡荆黄素、芦丁、科罗素酸 6 个代谢物通过对照品图谱比对, 其余代谢物则通过相关文献对照推断。

质谱图积分面积可反映化合物的相对含量, 将 16 个差异指标成分进行手动积分, 纵坐标为峰面积, 绘制出粗茎秦艽不同部位代谢差异成分的相对含量图 (图 4), 不同部位化学成分的量之间差异显

$P<0.05$), 质量良好。其 OPLS-DA 得分图如图 3-A 所示, 可以看出粗茎秦艽根与地上部分更明显区分开来。S-plot 图能够通过变量的量级与其可靠性进行比较来预测差异成分, 主要用于从组学数据中筛选出指定的代谢物, 在 S-plot 图中位于“S”两端的变量属于关键变量, 根据 S-plot (图 3-B) 结合变量权重重要性排序 (VIP) 进行筛选, 选择离散度较大 (VIP 值 >2.5) 的点进行筛选分析, 结合已鉴定成分明确 16 个差异指标成分: 蔗糖 ($t_R=0.82$ min, m/z 342.116 0)、柠檬酸 ($t_R=1.14$ min, m/z 192.025 9)、马钱苷酸 ($t_R=6.93$ min, m/z 376.136 7)、loganic acid 11- O - β -glucopyranosyl ester ($t_R=7.73$ min,

著。根据对差异指标成分的分析可知, 环烯醚萜类差异成分在根中含量高, 黄酮类和三萜类差异成分在地上部分含量更高。

4 讨论

粗茎秦艽是我国传统中药秦艽的 4 种基原植物之一, 研究表明秦艽主要具有环烯醚萜类、黄酮类、木脂素类、三萜类及多糖类等多种化学成分, 不同的化学成分功效也具有差异性。如秦艽中环烯醚萜类成分具有抗炎解热、保肝、抗病毒等功效^[21]; 黄酮类成分具有抗菌、抗氧化等功效。以往对粗茎秦艽不同部位差异性研究仅选用少数环烯醚萜^[6-7], 缺乏全面性。本实验采用 UPLC-ESI-HRMSⁿ 结合植物代谢组学技术, 从粗茎秦艽根、花、茎叶中共鉴定出 36 个共有代谢物, 包括环烯醚萜类 12 个、黄酮类 11 个、三萜类 4 个、酯类 2 个、木脂素类 1 个、其他类 6 个。本研究进一步发现了根与地上部分间 16 个差异性较大的化学成分, 其中环烯醚萜类差异成分在根中含量高, 黄酮类和三萜类差异成分在地

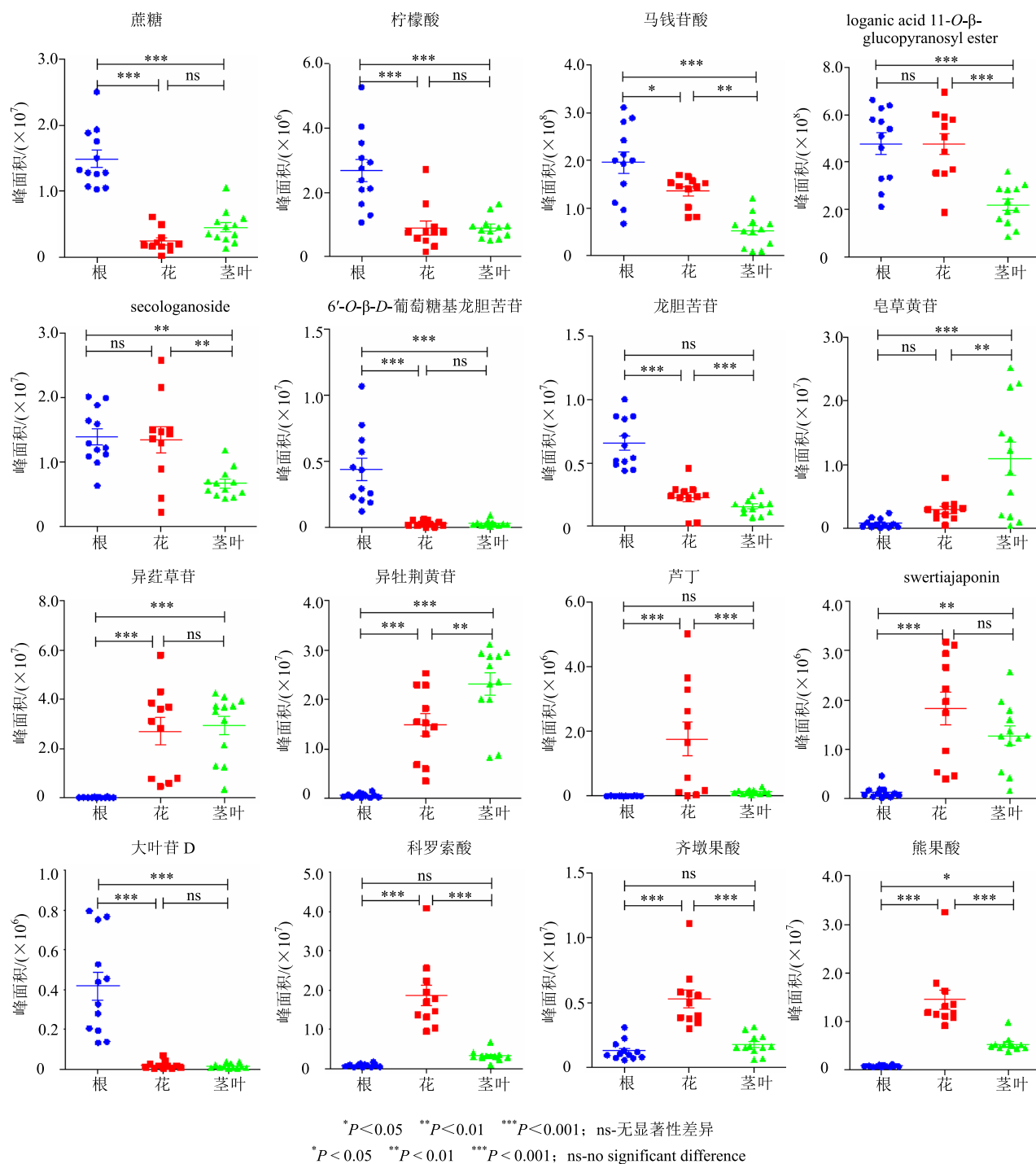


图4 秦艽不同部位化学成分量的差异

Fig. 4 Contents of chemical constituents in different parts of *G. crasicaulis*

上部分含量更高。本实验证实了龙胆苦苷和马钱苷酸确为粗茎秦艽根与地上部分的差异指标成分,且这两种成分在根中含量最高,与曹晓燕等^[6]实验结果一致,表明《中国药典》中规定以龙胆苦苷和马钱苷酸作为秦艽的含量测定指标具有科学性。为防止不法商贩假以秦艽地上部分代替秦艽投料生产中

成药,将来可进一步研究增加其他差异指标成分作为质控指标的可行性。同时,秦艽不同部位之间功效的差异是否与黄酮类、三萜类和环烯醚萜类等的含量有关,值得进一步研究。

随着近年来秦艽资源需求大增,导致野生粗茎秦艽资源已濒临枯竭,价格攀升。粗茎秦艽现被列

为国家三级重点保护植物、北京市二级保护野生植物^[22]。除藏医中使用秦艽的花与全草入药之外,传统中医只使用秦艽的根部入药。野生秦艽一般生长4年以上,仅采挖根茎而将地上部分扔掉,将造成巨大的资源浪费。基于本研究的结果,可将秦艽地上部分用于黄酮类和三萜类成分的提取及相关研究,从而更合理、高效的开发利用秦艽资源。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘 圆, 张 浩, 刘 超, 等. 藏药粗茎秦艽、蓝玉簪龙胆的生药学鉴定 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1631-1633.
- [3] Liang J, Ito Y, Zhang X, *et al.* Rapid preparative separation of six bioactive compounds from *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. using microwave-assisted extraction coupled with high-speed counter-current chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(24): 3934-3940.
- [4] Zeng R, Hu H, Ren G, *et al.* Chemical profiling assisted quality assessment of *Gentianae macrophyllae* by high-performance liquid chromatography using a fused-core column [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(8): 1274-1279.
- [5] 李星炜 贾敏如. 中国民族药志要 (精) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005.
- [6] 曹晓燕, 王政军, 王喆之. 4种秦艽属植物不同器官中4种环烯醚萜苷成分含量的比较分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(1): 58-63.
- [7] 李建民, 李福安, 李向阳, 等. 粗茎秦艽不同部位龙胆苦甙含量的分析 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(3): 225-227.
- [8] 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): 2337-2341.
- [9] 常相伟, 李德坤, 王 彤, 等. 基于 UHPLC-QTOF/MS 的植物代谢组学技术鉴别林下山参的不同部位 [J]. 药学学报, 2016, 51(10): 1609-1615.
- [10] 周永峰, 李瑞煜, 张定堃, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的五味子不同部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1087-1092.
- [11] 王 爽, 董红娇, 王长生, 等. 不同产地麻花秦艽中 5 种环烯醚萜苷成分的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 77-80.
- [12] 王长生, 董红娇, 包雅婷, 等. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3175-3180.
- [13] 聂安政, 林志健, 王 雨, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 597-608.
- [14] Xu M, Zhang M, Zhang Y. J, *et al.* New acylated secoiridoid glucosides from *Gentiana straminea* (Gentianaceae) [J]. *Helv Chim Acta*, 2009 92(2): 321-327.
- [15] Pan Y, Zhao Y. L, Zhang J, *et al.* Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) [J]. *Chem Inform*, 2016, 13(2): 107-150.
- [16] 许传梅, 张春红, 董 琦, 等. 藏药提宗龙胆花的化学成分研究 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(12): 2543-2546.
- [17] Wang Y M, Xu M, Wang D, *et al.* Anti-inflammatory compounds of “Qin-Jiao”, the roots of *Gentiana dahurica* (Gentianaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 147(2): 341-348.
- [18] Li S, Wan C X, He L L, *et al.* Rapid identification and quantitative analysis of chemical constituents of *Gentiana veitchiorum* by UHPLC-PDA-QTOF-MS [J]. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 2016, 27(2): 188-194.
- [19] 张秀艳, 王晓琴, 温爱平. 小秦艽花化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 241-246.
- [20] Fan H, Zang Y, Zhang Y, *et al.* Triterpenoids and iridoid glycosides from *Gentiana dahurica* [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 93(12): 2439-2447.
- [21] 董丽萍, 倪梁红, 赵志礼, 等. 龙胆属环烯醚萜类化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2116-2128.
- [22] 张 美, 方清茂, 周先建. 青藏高原粗茎秦艽资源调查 [J]. 资源开发与市场, 2014, 30(4): 448-450.