基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱的软枣猕猴桃四种

不同部位差异化学成分分析方法

白璐1*, 侯宇飞2

(1. 西安交通大学大型仪器设备共享实验中心,陕西省 西安市 710049; 2.西安交通大学第 一附属医院榆林医院,陕西省 榆林市 719000)

摘要:由于植物不同部位在化学成分和药理作用上均具有显著差异,如何研究这些差异进 而对不同部位进行充分利用成为植物综合利用的难点和痛点。而超高效液相色谱一四极杆串 联飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术的高分辨率、高灵敏度的定性能力和强大的 结构表征能力,使其在天然产物、食品中主要化学成分的研究中具有广泛应用。本研究针对 软枣猕猴桃(Actinidia arguta, AG)根、茎、叶、果实四种不同部位提取物的化学成分和差异 组分进行深入研究。通过自建质谱数据库、化合物质谱裂解规律,并结合相关文献,对四部 位甲醇提取物中的主要成分进行定性分析。从根、茎、叶和果实中分别鉴定出 35、40、36 及 39 种化合物。结果表明,软枣猕猴桃根部主要含三萜类化合物;地上部分,尤其是叶中 则含更多的黄酮类物质。结合非靶向代谢组学分析,鉴定出软枣猕猴桃根、茎、叶、果实四 种不同部位的 17 种差异化学组分。揭示了软枣猕猴桃不同部位的内在物质基础和不同部位 的差异性成分,为软枣猕猴桃地下及地上不同部位的应用及开发提供了科学依据及理论基 础。

关键词:软枣猕猴桃;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用仪(UPLC-Q-TOF-MS/MS); 化学成分;差异分析

Differential chemical composition analysis of the four distinct parts of

Actinidia arguta based on ultra-performance liquid chromatography -

quadrupole - time-of-flight mass spectrometry

BAI Lu¹, HOU Yufei², MENG Lingjie¹

(1. Instrument Analysis Center of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710048, China; 2. Yulin Hospital, First

Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Yulin 719000, China)

Abstract: Due to the significant differences in chemical composition and pharmacological effects between different parts of plants, how to study these differences and make full use of different parts has become a difficulty in the comprehensive utilization of plants. The high-resolution, high-sensitivity qualitative capabilities and the potent structural characterization abilities of the ultra-high performance liquid chromatography - quadrupole tandem time-of-flight mass spectrometry (UPLC - Q - TOF MS/MS) technology have enabled its extensive application in the research of the principal chemical components in natural products and foods. This study aims to conduct in-depth research on the chemical components and differential components of extracts from four different parts of Actinidia arguta (AG), including roots, stems, leaves, and fruits. The main components in the methanol extracts of the four parts were identified by self-built mass spectrometry database, the fragmentation rules, and relevant literatures. 35, 40, 36, and 39 compounds were identified from the root, stem, leaf, and fruit, respectively. The results indicate that the root of AG mainly contains triterpenoid compounds; the aerial parts, especially the leaves, contain more flavonoids. Combined with non-targeted metabolomics analysis, 17 differential chemical components in the four different parts of AG, namely the root, stem, leaf, and fruit, were identified. This study reveals the intrinsic material basis and differential components of different parts of AG, providing scientific basis and theoretical foundation for the application and development of AG's underground and aerial parts.

Keywords: *Actinidia arguta*; Nontargeted metabolomics; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); chemical composition; difference analysis

1 研究背景

众所周知,植物的不同部位在化学成分和药理作用上都有差异。以马兜铃为例,其果实 用于治疗咳嗽和哮喘,其根具有明显的降压作用,而其茎叶则是治疗类风湿的药物。这种现 象也存在于枸杞、何首乌、瓜蒌、麻黄等其他草本植物中[1]。

猕猴桃属是属于猕猴桃科的一种落叶藤本植物。软枣猕猴桃(Actinidia arguta, AG), 是猕猴桃科、猕猴桃属大型落叶藤本植物,具有耐寒性,可以在包括韩国在内的亚洲种植。 软枣猕猴桃是一种药食同源植物,又被称为软枣子,奇异莓等[2]。这种植物的不同部分, 包括它的果实、叶子、茎和根,传统上也被用来治疗各种疾病。软枣猕猴桃根具有抗炎、免疫调节、抗氧化等多种生物活性,它的茎叶还具有抗炎和抗氧化活性,果实具有养颜、提高 免疫力、抗癌、抗衰老、软化血管、抗肿消炎功能[3-8]。

超高效液相色谱与飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS/MS)具有分辨率高、灵敏度高、 选择性高等优点,已经成为天然药物中化学成分快速分离和鉴定的有力手段[4-5]。而Waters 公司专为研发实验室设计的 UNIFI 软件是一个简单、高效、全面的天然产物分析平台,其 内置的传统中药数据库(WATERS Traditional Medicine Library)中包括 600 多种中药的 6000 多个化合物信息。UNIFI 能够进行数据采集、峰提取、分子式确定、数据库检索及生成报告 等,与 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联合应用已经被应用到传统中药及复方中化学成分的快速鉴定 中。Progenesis QI 也是 Waters 公司开发的质谱软件,能够处理 LC/MS、LC/MS/MS、GC/MS 和 GC/MS/MS 等代谢组学研究的多变量数据,可以执行 PCA 及 OPLS-DA 分析,多维度观 察生物化学模式,从而鉴定出导致数据集中变异的潜在生物标志物。然而,目前还没有关于 使用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术与多元统计分析方法相结合对软枣猕猴桃不同部分进行差 异分析的报道。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合 UNIFI 天然产物分析平台, 对软枣猕猴桃果 实、叶子、茎和根化学成分进行快速、全面的筛查分析, 结合多变量统计分析方法, 对软 枣猕猴桃果实、叶子、茎和根的化学成分进行对比, 研究不同部位的差异性化学组分, 为进 一步阐明软枣猕猴桃中所含化学成分以及全面的质量控制提供指导,并为该药食同源植物作 为潜在的中药新资源开发提供理论依据。

2 研究方法

2.1 材料和试剂

WATERS VION IMS QTOF 型质谱仪(美国 WATERS 公司,包括 UNIFI 1.9.4 数据采集 工作站和 Progenesis QI 2.3 数据分析软件),Milli-Q型超纯水系统(德国默克公司)。

甲醇、乙腈为质谱纯(德国默克公司),甲酸为色谱纯(美国赛默飞世尔公司),其他 试剂均为分析纯。实验用软枣猕猴桃于 2019 年 6 月至 10 月采自陕西省西安市户县,经户县 科技局研究人员鉴定为软枣猕猴桃(Actinidia arguta, AG)的根、茎、叶、果实。凭证标本 (编号 2019121-2019144)保存于西安交通大学分析测试中心 3013 室。

2.2 样品制备

将 AG 不同部位的根、茎、叶和果实分别风干、碾碎并筛分(40 目)以得到均匀的粉末。 然后分别取 200 mg 粉末用 80%甲醇超声提取三次,每次提取 1 小时。过滤后的提取物混合、 浓缩、蒸发至干燥。最后将提取液进行溶解用甲醇稀释至 10.0 mL,用过滤器(0.22μm)过 滤后待用。

2.3 UPLC-QTOF-MS/MS 条件

色谱条件: WATERS UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流速 0.2 m L/min, 进样量 2 μL, 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)。梯度洗脱(0-1 min, 10% B; 1-10 min, 10% -95% B; 10-12 min, 95% B; 12-14 min, 95%-10% B; 14-15 min, 10% B)。 UPLC 色谱柱和自动进样器的温度设为 30℃和 10℃。

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),正、负模式扫描,数据采集方式为MS^E,优化 后的仪器参数为: 2.0kV 毛细管电压(ESI+)或 2.5kV (ESI-),锥孔电压 40v,离子源源温在 120°C,脱溶温度在 500°C,脱溶剂气流量为 800L/h。在 MSE 模式下,碰撞低能函数的能量 设为 6 eV,高能函数的斜坡碰撞能量设为 20-40 eV。为保证质量的准确性和再现性,使用 100ng/mL 亮氨酸脑啡肽 (m/z 556.277,正离子模式;m/z 554.2615,负离子模式)对质谱仪 进行 50-2000 Da 校准。数据采集采用连续模式,所有采集数据均为由 Waters UNIFI v.4.1 软 件控制(Waters, Milford, MA, USA)。

3 研究结果

3.1 化学成分与质谱信息数据库的建立

从中国知网,万方,SciFinder,MassBank,PubChem 等数据库收集软枣猕猴桃及猕猴桃属植物已有文献报道的化学成分名称、结构、质谱信息等,建立拥有420个化学成分的软 枣猕猴桃质谱数据库。

3.2 化学成分的结构鉴定

分别将样品溶液的采集数据和利用前期建立的数据库导入UNIFI软件中进行筛查分析, 根据化学成分保留时间 RT 和准分子离子峰、二级碎片离子峰信息等,结合文献资料,以及 质谱裂解规律等,推断可能的化学成分及其裂解过程,并对化学成分结构类型进行归类,归 属主要碎片离子信息,在正、负离子模式下软枣猕猴桃不同部位共鉴定了 54 个化合物。总 离子流图见图 3.1,化合物的保留时间、分子量等信息见表 3.2。



图 3.1. AG 不同部位的总离子流图 (根 (A, E),枝(B, F),果实(C, G) 和叶 (D, H))

| | Observed | | Neutral | Observed neutral | Mass error | | |
|----|----------|-----------|-----------|------------------|------------|----------|-----------------------------|
| No | RT (min) | Formula | mass (Da) | mass (Da) | (ppm) | Adducts | Component name |
| 1 | 7.96 | C29H46O5 | 474.3345 | 474.3343 | -0.5 | -H | MHT2 |
| 2 | 1.3 | C30H26O12 | 578.1424 | 578.1415 | -1.5 | 2x(+H) | Proanthocyanidin B1 |
| 3 | 8.63 | C30H44O5 | 484.3189 | 484.3185 | -0.9 | -H | FUPENZI acid |
| 4 | 13.82 | C31H52 | 424.4069 | 424.4052 | -3.6 | 2x(+Na) | pseudotaraxasterol |
| 5 | 6.46 | C13H20O2 | 208.1463 | 208.1462 | -0.4 | +NH4, +H | Actinido |
| 6 | 7.7 | C29H48O | 412.3705 | 412.3702 | -0.8 | +Na | TaraxasterolC |
| | | | | | | - | 1,6-dimethyl-5-ethyl |
| 7 | 1.27 | C10H16O7 | 248.0896 | 248.0898 | 0.8 | +NH4 | citrate |
| 8 | 5.06 | C8H12O7 | 220.0583 | 220.0497 | -32.2 | 2x(+Na) | 1,6-dimethyl citrate |
| | | | | | X | | 3-O-trans-p-caffeoyl quinic |
| 9 | 4.77 | C20H26O9 | 410.1577 | 410.1533 | -8.9 | 2x(+K) | acid butyl ester |
| 10 | 10 | C8H14O5 | 190.0841 | 190.0792 | -25.6 | +H | butyl 2-hydroxysuccinate |
| | | C26H29ClO | | | | | Cyanidin-3-O-sambubiosid |
| 11 | 13.87 | 15 | 616.1195 | 616.1171 | -3.8 | +H | e |
| 12 | 11 | C35H48O13 | 676.3095 | 676.3038 | -8.4 | 2x(+H) | Pinoresinol diglucoside |
| 13 | 1.32 | C22H18O11 | 458.0849 | 458.0913 | 12.9 | 2x(+NH4) | Epigallocatechin gallate |
| 14 | 1.31 | С9Н14О7 | 234.074 | 234.0743 | 1.4 | +NH4 | 1-methyl-5-ethyl citrate |
| 15 | 4.51 | C32H50O6 | 530.3607 | 530.3602 | -1 | 2x(+NH4) | eriatieaeid A |
| 16 | 1.37 | C30H42O5 | 482.3032 | 482.3045 | 2.2 | 2x(+K) | catechins-7-phytol |
| 17 | 1.27 | C20H24O12 | 456.1268 | 456.1262 | -1.1 | 2x(+NH4) | argutinoside A |
| 18 | 4.27 | C15H10O8 | 318.0376 | 318.0379 | 1 | +H | Epigallocatechin |
| 19 | 1.36 | C10H8O5 | 208.0372 | 208.0375 | 1.7 | +NH4 | fraxetin |
| 20 | 1.31 | C9H14O7 | 234.074 | 234.0743 | 1.5 | +NH4 | 1,5,6-trimethyl citrate |
| 21 | 13.9 | C35H60O6 | 576.439 | 576.4403 | 2.2 | +Na | Carotin |
| 22 | 1.75 | C4H6O4 | 118.0266 | 118.0272 | 4.7 | +NH4 | Succinic acid |
| 23 | 10.16 | C30H48O4 | 472.3553 | 472.3549 | -0.7 | -H | 23-hydroxyursolic acid |

表 3.2 AG 不同部位所含化学成分的鉴定

| 24 | 13.9 | C32H50O4 | 498.3709 | 498.3707 | -0.4 | -H | 3-O-acetylursolic acid |
|----|----------|-----------|----------|----------|-------|--------|----------------------------|
| | | | | | | | 3-O-trans-p-coumaroyl |
| 25 | 9.05 | C39H52O7 | 632.3713 | 632.3715 | 0.3 | -H | actinidic acid |
| | | | | | | | 5-O-cis-p-caffeoyl quinic |
| 26 | 4.26 | C18H24O8 | 368.1107 | 368.1115 | 2 | -H | acid methyl ester |
| 27 | 7.45 | C30H46O5 | 486.3345 | 486.3342 | -0.7 | -H | actinidic acid |
| 28 | 4.4 | C27H30O16 | 610.1534 | 610.153 | -0.6 | -H | Quercetin-3-O-rutinoside |
| | | | | | | | Quercetin-3-O-rutinoside-7 |
| 29 | 4.55 | C34H42O20 | 770.2269 | 770.2259 | -1.3 | -H | -O-glucoside |
| | | | | | | 5 | Quercetin-3-O-rutinoside-7 |
| 30 | 1.34 | C34H42O19 | 754.232 | 754.2222 | -13.1 | 2x(-H) | -O-rhamnoside |
| 31 | 1.22 | C16H24O5 | 296.1624 | 296.1651 | 8.6 | +Na | rhodioloside |
| 32 | 11.8 | C30H48O3 | 456.3604 | 456.3605 | 0.4 | -H | Betulinic acid |
| | | | | 12 | | | cis-p-Coumaroyl quinic |
| 33 | 4.14 | C16H18O8 | 338.1002 | 338.1012 | 3.2 | -H | acid |
| 34 | 8.15 | C15H14O6 | 290.079 | 290.0801 | 3.7 | -H | Epicatechin |
| 35 | 4.64 | C27H30O15 | 594.1585 | 594.1585 | 0.1 | -H | Keampferol-3-O-rutinoside |
| 36 | 4.61 | C21H20O12 | 464.0955 | 464.0953 | -0.5 | -H | Quercetin-3-O-glucoside |
| | | | T | | | | Isorhamnetin-3-O-neohesp |
| 37 | 4.66 | C28H32O16 | 624.169 | 624.1693 | 0.4 | -H | eridoside |
| 38 | 13.8 | C20H24O11 | 440.1319 | 440.1331 | 2.8 | -H | argutinoside C |
| 39 | 4.57 | C21H26O12 | 470.1424 | 470.1432 | 1.8 | -H | argutinoside B |
| | \wedge | | | | | | 5-O-trans-p-coumaroyl |
| 40 | 1.33 | C20H26O8 | 394.1628 | 394.1596 | -8.1 | -H | quinic acid butyl ester |
| 41 | 3.89 | C21H22O11 | 450.1162 | 450.1169 | 1.6 | -H | astragalin |
| 42 | 4.91 | C8H8O4 | 168.0423 | 168.0429 | 3.6 | -H | vanillic acid |
| 43 | 1.35 | C11H18O7 | 262.1053 | 262.1061 | 2.9 | +NH4 | 1-methyl-6-butyl citrate |
| | | | | | | | 3-O-trans-p-coumaroyl |
| 44 | 1.37 | C16H18O7 | 322.1053 | 322.1036 | -5 | +NH4 | shikimic acid |

| 45 | 1.37 | C10H16O7 | 248.0896 | 248.0899 | 1 | +NH4 | 6-butyl citrate |
|----|------|-----------|----------|----------|------|----------|---------------------------|
| 46 | 5.18 | C11H14O2 | 178.0994 | 178.0997 | 1.6 | +H | actinidiolide |
| 47 | 1.33 | C10H8O5 | 372.1057 | 372.1059 | 0.6 | 2x(+NH4) | Fraxin |
| 48 | 9.51 | C29H50O | 414.3862 | 414.3842 | -4.5 | +Na | Sitosterol |
| | | | | | | | 4,5-O-dicaffeoyl quinic |
| 49 | 5.17 | C26H26O12 | 530.1424 | 530.1483 | 10.2 | 2x(+Na) | acid methyl ester |
| 50 | 1.35 | C10H8O4 | 192.0423 | 192.0433 | 5.4 | 2x(+H) | isoscopoletin |
| 51 | 4.22 | C13H18O8 | 302.1002 | 302.1025 | 7.2 | +Na | tachioside |
| 52 | 6.65 | C15H10O6 | 286.0477 | 286.0483 | 2.1 | -H | kaempferol |
| 53 | 5.81 | C22H22O11 | 462.1162 | 462.1164 | 0.4 | Н | Quercetin-3-O-galactoside |
| 54 | 3.92 | C19H30O8 | 386.1941 | 386.1947 | 1.6 | -H | (6S,9R)-roseoside |

3.3 AG 不同部位差异成分的分析

正、负离子模式下的 PCA 图均显示 4 个部位可被分成 4 个区域,表明组间有显著的区 别。推断 AG 根、茎、叶和果实的化学成分在组成和含量上存在显著差异(见图 3.2)。为 了进一步研究 AG 不同部位的差异性成分,建立了 OPLS-DA 模型,获得了 S-plots 图和 VIP-plots 图。通过 VIP>1(见图 3.3),且 P<0.05的条件进行筛选,得到了 25 个差异性 成分,差异性成分的相对含量可视化热图(见图 3.4),图中蓝色→红色代表含量的增加。 PLS-DA/S-plots 见图 3.5。



ESI-



图 3.2 正、负离子模式下 AG 不同部位的 PCA 图







4 讨论及展望

С

本研究预实验分别进行了正负离子质谱扫描模式测试,数据分析时发现软枣猕猴 桃甲醇提取物的化学成分在正、负离子扫描模式下均具有较好的响应值,可能是由于含 有不同种类的化合物所导致。因此,本研究采用正、负模式分别进行扫描,以期得到更多 的数据点,从而鉴定出更多的化学成分。

本研究建立了软枣猕猴桃甲醇提取物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析方法, 结合 UNIFI 软件中进行筛选分析,通过比较一级精确质荷比和二级碎片信息数据, 再结合文献资料及自建的质谱化学数据库,从 AG 的根、茎、叶和果实中分别鉴定出 35、 40、36 及 39 种化合物。结果表明, AG 根部主要含三萜类化合物;地上部分,尤其是叶中 则含更多的黄酮类物质。本项研究弥补了 AG 地上部分化学成分研究的不足,为软枣猕猴桃 化学成分分析提供了一种快速简便的方法。

其次,采用 Progenesis QI 软件技术结合多元统计分析,从 AG 4 个不同部分中发现了彼此之间显著区别的 17 种差异性成分,主要为黄酮类、三萜类和木质素类成分。具体如下: 根中 3 个差异性成分: Actinido, Pinoresinol diglucoside, Fraxetin; 茎中 7 个差异性成分: TaraxasterolC, 1,6-dimethyl-5-ethyl citrate, 1-methyl-5-ethyl citrate, eriatieaeid A, 1,5,6-trimethyl citrate, Carotin, Succinic acid; 叶中 2 个差异性成分: Isorhamnetin-3-O-neohesperidoside Quercetin-3-O-rutinoside-7-O-rhamnoside; 果实中 4 个差异性成分: Proanthocyanidin B1,

D

Pseudotaraxasterol, Catechins-7-phytol, Rhodioloside。本研究的不足之处在于对于不同部位 差异组分的结构分析,及三萜类和黄酮类化合物的质谱裂解规律未进行深入探讨。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS / MS 技术对软枣猕猴桃根、茎、叶、果实中的化学成分 进行了较为全面系统的分析,丰富了该植物的化学成分信息,从中分析并鉴定出了 17 个差 异组分。不同部位的差异性成分存在,必将导致其生物活性的不同,本研究揭示了软枣猕猴 桃不同部位的内在物质基础,并为其地下及地上不同部位的综合应用及开发提供了科学数 据。本文对植物不同部位主要化学成分和差异化学成分的研究方法,即 UPLC-Q-TOF-MS / MS 技术结合多元统计分析方法,也可拓展并应用至其他植物(或具有复杂体系的样品)中, 对于不同植物的化学成分及差异成分的识别和综合利用具有重要意义。

参考文献:

- [1] Qi, Y.F. The functional differences in different parts from the same plant. Inf. Tradit. Chin. Med. 1988, 3,40–42.
- [2] Latocha P. The Nutritional and Health Benefits of Kiwiberry (Actinidia arguta) a Review[J].
 Plant Foods for Human Nutrition, 2017, 72(4):1-10.
- [3] Richardson D P , Ansell J , Drummond L N . The nutritional and health attributes of kiwifruit: a review [J]. European Journal of Nutrition, 2018.
- [4] Leontowicz, H., Leontowicz, M., Latocha, P., Jesion, I., Park, Y. S., Katrich, E., Gorinstein, S. (2016). Bioactivity and nutritional properties of hardy kiwi fruit Actinidia arguta in comparison with Actinidia deliciosa 'Hayward' and Actinidia eriantha 'Bidan'. Food Chemistry, 196, 281–291.
- [5] Rza, B., Xz, A., Yu, W. A., Lz, A., Jing, Z. A., Gang, C. C., Chong, N. A. (2019). Characterization of polysaccharide fractions from fruit of Actinidia arguta and assessment of their antioxidant and antiglycated activities. Carbohydrate Polymers, 210, 73–84.
- [6] Lim, S., Han, S. H., Kim, J., Lee, H. J., Lee, J. G., & Lee, E. J. (2016). Inhibition of hardy kiwifruit (Actinidia aruguta) ripening by 1-methylcyclopropene during cold storage and anticancer properties of the fruit extract. Food Chemistry, 190, 150–157.
- [7] Wojdylo, A., & Nowicka, P. (2019). Anticholinergic effects of Actinidia arguta fruits and their polyphenol content determined by liquid chromatography-photodiode array

detector-quadrupole/time of flight-mass spectrometry (LC-MS-PDA-Q/TOF). Food Chemistry, 271, 216–223.

- [8] Heo, K.-H., Sun, X., Shim, D.-W., Kim, M.-K., Koppula, S., Yu, S.-H., ... Lee, K.-H. (2018). Actinidia arguta extract attenuates inflammasome activation: Potential involvement in NLRP3 ubiquitination. Journal of Ethnopharmacology, 213, 159–165.
- [9] 魏文峰,王昶,张树明,等. 串联质谱技术在中药化学成分分析中的应用研究进展[J]。 中国实验方剂学杂志,2013,19(14):351-354.
- [10] 雷军,边清泉,罗娅君. 高效液相色谱-质谱联用技术在分析中草药黄酮类化学成分方面的应用[J]。绵阳师范学院学报,2012,31(5):51-56.