

基于靶向质谱代谢组学的广陈皮年份鉴别研究

简晓君^{1,2} 李翰祥³ 文倩^{1,2} 陶移文¹ 黄洪波^{*1} 丁博^{*1}

¹(广州医科大学药学院, 广东省分子靶标与临床药理学重点实验室, 广州 511436)

²(广东省药品检验所, 国家药品监督管理局药品快速检验重点实验室, 广州 510663)

³(中国科学院华南植物园公共实验室, 广州 510650)

摘 要 广陈皮的药用价值随着陈化年份增加而逐渐提高,其价格也随之上涨,导致市场上广陈皮年份欺诈问题严重。针对此问题,本研究选取陈化年份为 7~17 年的广陈皮作为研究对象,采用基于靶向质谱代谢组学的方法进行年份鉴别。首先,以《中国药典》规定的橙皮苷、橘皮素和川陈皮素等质量评价指标为靶向分析物,与已有研究结果进行对比,评估样品的真实性;然后,利用靶向质谱代谢组学方法计算广陈皮中 6 种黄酮类化合物的绝对含量以及 63 种黄酮类化合物和 94 种黄酮类与非黄酮类化合物的相对含量,结合正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA),筛选广陈皮中与年份相关的标志代谢物,用以鉴别广陈皮年份。研究表明,仅依赖于中国药典规定的 3 个质量评价指标在内的黄酮类代谢物无法有效鉴别广陈皮的陈化年份,而通过靶向质谱代谢组学方法成功地从广陈皮的 94 种黄酮类和非黄酮类化合物中筛选得到 32 种潜在的年份代谢标志物,其中包括荭草素和诺米林等化合物。这些标志物的发现为区分不同年份的广陈皮提供了参考,有望应用于广陈皮的年份鉴别。

关键词 广陈皮; 年份鉴别; 靶向质谱代谢组学; 年份标志代谢物; 正交偏最小二乘法判别分析

陈皮来源于芸香科植物橘及其栽培变种的成熟果皮,具有抗炎^[1-2]和抗氧化^[3-4]等药理活性。陈皮中的黄酮类化合物是其发挥药效的主要成分,包括黄烷酮、多甲氧基黄酮和黄烷醇等^[5];陈皮中还含有酚酸类和生物碱类等非黄酮类代谢物^[5]。《中国药典》将陈皮药材分为“陈皮”和“广陈皮”^[6],其中,广陈皮是剥离茶枝柑后的果皮,经过晒干或低温干燥储存一定的时间,陈化而成的药材^[7]。传统中医理论认为,广陈皮的药用价值随着陈化年份增加而逐渐提高。因此,广陈皮的价格也随着陈化年份增加而上涨,导致市场上广陈皮年份欺诈事件时有发生。目前,广陈皮年份鉴别主要依靠传统经验,即通过人工判断广陈皮的外观和气味等^[8],实现广陈皮鉴别的标准化和推广仍然面临一定困难。随着仪器技术的进步,仪器分析方法已应用于陈皮的年份鉴别,主要包括红外光谱法^[9]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[10]和气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[4]等。红外光谱法难以获得具体的潜在代谢标志物,GC-MS 法适合检测挥发性和半挥发性代谢物,然而陈皮的活性成分以非挥发性代谢物为主^[5],因此,红外光谱法和 GC-MS 法在检测分析陈皮的活性成分时存在局限性,不适用于在陈皮活性成分中筛选年份标志代谢物。相比之下,LC-MS 法具有高灵敏度和特异性,检测范围广,有利于筛选稳定性高的潜在标志物^[11],因此更适于广陈皮的年份鉴别。

代谢组学方法包括非靶向代谢组学和靶向代谢组学方法两种类型。非靶向代谢组学是一种无偏差性的代谢组学分析方法,可探究生物样本中小分子代谢物的变化。但是,其数据处理耗时长、重复性较差^[12]。相较而言,靶向代谢组学具有更强的针对性和更高的特异性,但传统靶向代谢组学通常依赖标准品,限制了代谢物的覆盖范围。目前,代谢组学研究主要采用质谱分析法和核磁共振法。质谱分析结合代谢组学形成了质谱代谢组学分析方法,扩展了代谢物的覆盖范围,推动了非靶向代谢组学和靶向代谢组学的发展和应用。在质谱代谢组学研究中,质谱仪器的质量分析器对代谢组学分析结果的影响较大。

2023-07-28 收稿; 2024-02-29 接受

广东省药品检验所国家药品监督管理局药品快速检验重点实验室开放课题项目(No. KF2022003)和2022年广东省本科高校教学质量与教学改革工程建设项目(No. YJGH[2023] No.4)资助。

* E-mail: huanghb@gzhmu.edu.cn; dingbo-dmy@gzhmu.edu.cn

其中,轨道阱(Orbitrap)质量分析器能提供特异性强且分辨率高的信息,在代谢物的注释方面具有显著优势^[10,13]。基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS)联用技术的靶向代谢组学方法能够快速实现复杂组分的定性与数据挖掘,该方法不仅可快速鉴别药材真伪,还能够筛选特征标志物,反映同源中药材之间的差异^[13-15]。

本研究以陈化年份为7~17年的广陈皮为研究对象,建立基于UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS靶向代谢组学的广陈皮年份鉴别方法。广陈皮主要成分包含黄烷酮类和多甲氧基黄酮类两大类黄酮类化合物^[16],其中,黄烷酮类代表性化合物包括野漆树苷、柚皮芸香苷和橙皮苷;多甲氧基黄酮类代表性化合物包括川陈皮素、橘皮素和去甲川陈皮素。本研究选取《中国药典》^[6]中陈皮的质量评价指标物质橙皮苷、川陈皮素和橘皮素为分析对象,同时扩展到与药典规定质量评价指标关联性较高的野漆树苷、柚皮芸香苷和去甲川陈皮素3种黄酮类化合物,分析广陈皮中这6种黄酮类化合物的绝对含量,并与文献报道的含量结果进行比较,以评价广陈皮样品的真实性。然后,基于这6种黄酮类化合物的绝对含量构建正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)年份鉴别模型。在此基础上,归纳整理文献报道的陈皮中的代谢物,结合实验获取的广陈皮高分辨质谱信息,以此注释样品中的黄酮类与非黄酮类代谢物,并以其相对含量为依据,应用OPLS-DA等多元统计方法,全面系统地挖掘广陈皮黄酮类和非黄酮类代谢物中潜在的年份标志代谢物。本研究结果为广陈皮年份鉴别提供了理论数据支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 HPLC 高效液相系统和 Q-Exactive-Orbitrap 质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司); 5810R 型台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司); MS205DU 型十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q Reference 型超纯水仪(法国 Millipore 公司); DK-1027HTDS 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

野漆树苷(批号: MUST-21101110; 分子式 $C_{27}H_{30}O_{14}$)、柚皮芸香苷(批号: E1620090; 分子式 $C_{27}H_{32}O_{14}$)、橙皮苷(批号: K6RJEH8Y; 分子式 $C_{28}H_{34}O_{15}$)、川陈皮素(批号: KHZFC6D7; 分子式 $C_{21}H_{22}O_8$)、橘皮素(批号: MUST-21101110; 分子式 $C_{27}H_{30}O_{14}$)和去甲川陈皮素(批号: C10841702; 分子式 $C_{20}H_{20}O_8$)均购自思玛特(广州)生物科技有限公司, HPLC 质量分数 $\geq 97\%$; 甲酸(色谱级,美国 ACS 公司); 甲醇和乙腈(色谱级,美国 Tedia 公司)。实验用水为 Milli-Q 超纯水($18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$)。

12个广陈皮样品购自广东省江门市新宝堂陈皮有限公司,研究的起始年份为2023年,按其陈化时间分为7年、12年和17年(7Y、12Y和17Y),共3组,具体信息见电子版文后支持信息表S1。

1.2 实验方法

1.2.1 标准品溶液的配制

准确称取野漆树苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素和去甲川陈皮素标准品各10 mg,以甲醇溶解并定容至10 mL,获得1 mg/mL的单标母液。将6个单标母液稀释、混合,获得20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间溶液。母液与混合标准中间溶液于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 样品前处理

将广陈皮样品粉碎、过80目筛(筛孔180 μm)后,获得广陈皮粉末样品。准确称取100 mg广陈皮粉末,置于25 mL离心管内,加入20 mL甲醇,超声提取20 min(220 W, 40 kHz),以10000 r/min离心5 min,上清液转移至25 mL容量瓶中,以甲醇定容。样品溶液经0.22 μm 微孔滤膜过滤至1.5 mL进样瓶中,待UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS检测。

1.2.3 色谱条件

Waters Xbridge BEH C_{18} 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B)。梯度洗脱程序如下: 0~8 min, 5%~90% B; 8~12 min, 90% B; 12~12.5 min, 90%~5% B; 12

1.2.4 质谱条件

离子源: HESI 源, 正离子扫描模式, 喷雾电压为 3.5 kV, 毛细管温度为 380 ℃, 气化温度为 350 ℃, 鞘气压力 60 psi (1 psi=6.89 kPa), 辅助气流速 10 L/min, S-lens RF 电压为 50 V。数据获取采用 Full MS/dd-MS² 模式, 一级母离子分辨率为 70000, 一级全扫描范围为 120~1000 Da, 一级自动增益控制值为 10⁶, 一级最大离子注入时间为自动。二级子离子分辨率为 17500, 同位素隔离窗口宽度为 m/z 1.2, 碰撞能量梯度为 20、40 和 60 eV, 二级自动增益控制值为 5×10^4 , 二级最大离子注入时间 100 ms, 相对阈值为 8×10^4 , 顶点激发为 2~10 s, 动态排除 5 s。

1.2.5 数据处理方法

样品的高分辨质谱原始数据采用 Xcalibur 工作站进行峰识别、峰提取与归一化处理, 并采用外标法计算得到 3 个年份组 (7Y、12Y 和 17Y) 中 6 种黄酮的含量。根据质谱信息, 结合文献确定广陈皮中含有的代谢物与对应的分子式, 以 10 ppm (10⁻⁶) 为误差范围, 提取一级和二级质谱峰。基于赛默飞中药成分高分辨质谱数据库 (OTCML)、全球天然产物分子网络平台 (GNPS) 和质谱银行 (Mass Bank) 等质谱数据库, 对广陈皮代谢物进行注释。

在多元统计分析方面, 采用 SIMCA14.1 (瑞典 Umetrics 公司) 进行主成分分析 (PCA) 和 OPLS-DA。通过 OPLS-DA 模型计算得到变量投影重要值 (VIP) 和单因素分析 p 值, 以筛选潜在的标志代谢物。绘图软件为 Origin 2021 (美国 Origin Lab 公司)、GraphPad Prism 9 (美国 GraphPad Software 公司) 和 Metaboanalyst 网站 (<https://www.metaboanalyst.ca/>)。

2 结果与讨论

2.1 样品来源真实性评价

本研究使用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap MS 方法测定广陈皮中 6 种黄酮化合物的绝对含量。由图 1 可知, 随着陈化年份增加, 广陈皮中 6 种黄酮化合物的含量呈下降趋势。为了更直观地体现陈化年份与 6 种黄酮化合物含量之间的相关性, 本研究选取梅江村样品 (序号为 X3、X4、X7、X8、X11 和 X12), 采用皮尔逊 (Pearson) 相关性分析计算 6 种黄酮化合物的绝对含量与陈化年份的相关性 (见电子版文后支持信息图 S1, 其中数值表示 Pearson 相关系数)。相关系数为正值则表示正相关, 负值表示负相关^[17]。结果表明, 柚皮芸香苷的绝对含量与陈化年份变化呈较强正相关, 而野漆树苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素和去甲川陈皮素的绝对含量与陈化年份变化呈负相关。因此, 广陈皮样品中野漆树苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素和去甲川陈皮素的含量随着陈化年份增加而降低; 《中国药典》^[6] 质量评价成分橙皮苷、川陈皮素和橘皮素的含量随着陈化年份增加而降低。这与文献^[5,7]报道的结果一致。由此推测, 本研究收集的广陈皮样品来源真实可靠, 为挖掘潜在的年份标志代谢物奠定了物质基础。

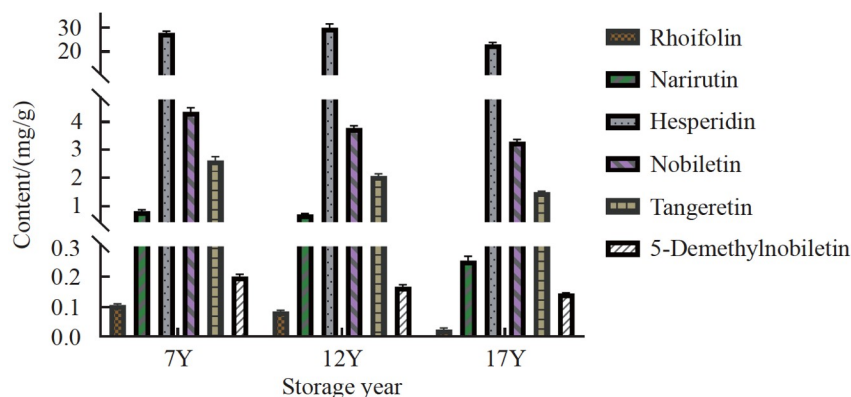


图1 3个年份组的广陈皮中6种黄酮化合物的含量差异($n=3$)

Fig.1 Differences in the contents of 6 kinds of flavonoid compounds in Guang Citri Reticulatae Pericarpium from 3 vintage years groups ($n=3$)

2.2 广陈皮中靶向化合物的注释

代谢物注释在质谱代谢组学研究中占有非常重要的地位。按照代谢物注释结果的准确性分为5个等级: 确定的结构、可能的结构、候选的结构、明确的分子式和精确的质荷比^[18]。其中, 确定的结构和可能的结构两个等级是通过与标准物质的质谱信息、一级质谱母离子、二级质谱子离子和质谱数据库等信息匹配而确定。在质谱代谢组学中, 这两个等级的代谢物注释可归类为靶向化合物。本研究利用6个标准物质信息、一级高分辨质谱和二级高分辨质谱信息, 以及OTCML和GNPS等质谱数据库, 并结合文献中陈皮的代谢物信息, 全面系统地注释得到94种黄酮类和非黄酮类靶向化合物, 并对这些代谢物信息进行归纳整理, 包括名称、分子式、分子式对应的质量理论计算值和实验测量值、质量数相对偏差以及二级碎片离子的质谱数据等信息, 确定其中序号1~63的化合物为黄酮类化合物, 序号64~94的化合物为生物碱等非黄酮类化合物(电子版文后支持信息表S2)。

以川陈皮素绝对含量对应的峰面积为校正参照值, 在广陈皮样品原始质谱数据中通过计算得到94种黄酮类和非黄酮类靶向化合物的相对含量。结果表明, 94种化合物在广陈皮样品中的相对含量存在年份组间差异(电子版文后支持信息图S2)。由图S2的聚类热图可得, 红框内展示的代谢物的相对含量随着陈化年份的增加而有所下降, 呈现一定的规律; 红框内展示的代谢物中除74、71、67、88、86、72、90和78号代谢物外, 其余均属于黄酮类化合物。由此推测, 黄酮类化合物有望作为能够鉴别广陈皮年份的关键化合物。这些结果为挖掘广陈皮中潜在的年份标志代谢物研究提供了有力支持。

2.3 基于靶向化合物绝对含量的广陈皮年份鉴别

在评价广陈皮样品来源的研究中, 发现样品中6种代表性黄酮类化合物的平均含量变化与年份存在关联。为此, 利用多元统计分析方法分析样品中6种黄酮类化合物含量与年份之间的关系, 探究这6种代表性黄酮类化合物是否可作为用于鉴别广陈皮年份的潜在标志代谢物。选取3个年份组广陈皮样品中6种靶向化合物的绝对含量, 分别建立了PCA和OPLS-DA模型。如图2所示, 在PCA得分图和OPLS-DA得分图中清晰地地区分出17Y组的样品与7Y组和12Y组的样品, 但无法区分7Y组与12Y组的样品, 说明这6种代表性黄酮类化合物难以准确区分广陈皮样品的3个年份组, 不能直接作为识别广陈皮的年份的潜在标志代谢物。本研究进一步扩大靶向化合物的数量范围, 构建更全面的多元统计分析模型, 从中挖掘广陈皮中潜在的年份标志代谢物。

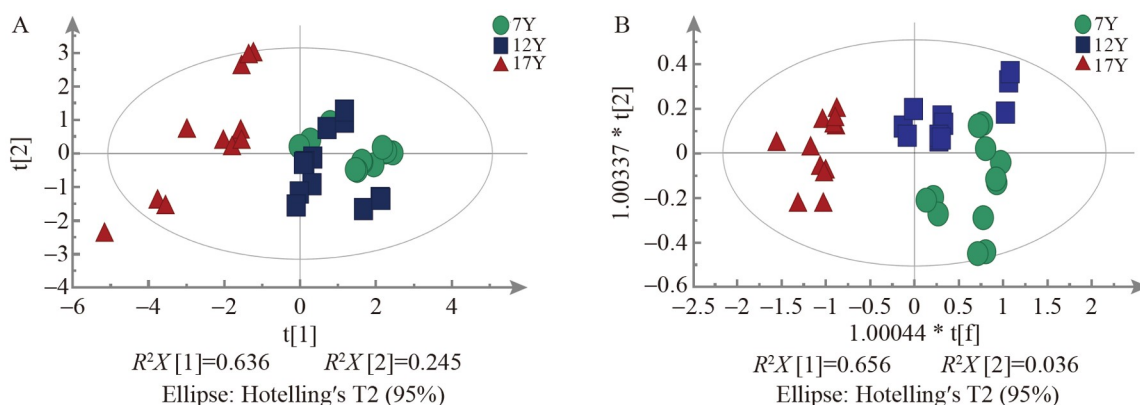


图2 基于6种黄酮靶向化合物的多元统计分析结果: (A) 主成分分析(PCA)得分图; (B) 正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)得分图

Fig.2 Statistical analysis results of 6 kinds of flavonoid target compounds: (A) Principal component analysis (PCA) score plot; (B) Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) score plot

2.4 基于靶向化合物相对含量的广陈皮年份鉴别

2.4.1 广陈皮中黄酮类化合物的年份鉴别研究

黄酮类化合物在广陈皮代谢物总含量中所占比例较大且易于检测, 是广陈皮的主要药效活性成分^[5]。从成分-结构-药效角度出发, 预测了广陈皮中黄酮类代谢物可能含有潜在的年份标志代谢物。为

了挖掘黄酮类化合物的年份标志物。依据 2.2 节中得到的 63 种黄酮类靶向化合物的相对含量构建基于黄酮类靶向化合物的 OPLS-DA 模型(图 3)。结果显示,与图 2B 相比,此 OPLS-DA 模型的组内差异更小,说明扩展靶向化合物的范围有利于展示代谢物的年份差异,但此模型仍无法清晰区分 7Y 组与 12Y 组的样品,说明仅依靠 63 种黄酮类靶向标志物难以区分广陈皮的陈化年份。由此推测,仅以黄酮类化合物为靶向标志物,难以全面展示不同年份广陈皮代谢物的差异。广陈皮中除了含有黄酮类化合物外,还含有如生物碱等非黄酮类化合物^[5],这些非黄酮类化合物可能会对结果产生影响。因此,需要考虑靶向化合物的种类和数量,扩大代谢物范围,从中挖掘潜在的年份标志代谢物。

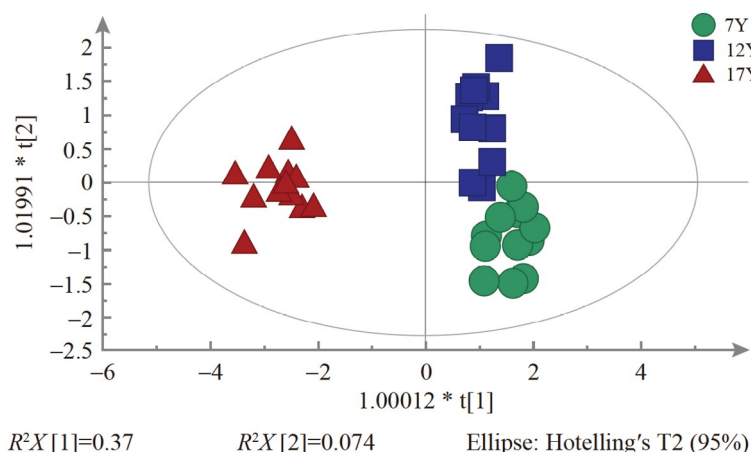


图3 基于 63 种黄酮类靶向化合物相对含量的 OPLS-DA 得分图

Fig.3 OPLS-DA score plot based on the relative contents of 63 kinds of flavonoid-targeted compounds

2.4.2 广陈皮中黄酮类和非黄酮类化合物的年份鉴别研究

研究表明,陈皮中除了黄酮类化合物外,还包含酚酸、生物碱和香豆素等化合物^[19-20],考虑到酚酸类和生物碱类等非黄酮化合物的变化同样受陈化过程的影响,为了更全面地挖掘潜在的年份标志代谢物,本研究在黄酮类靶向化合物基础上增加 31 种非黄酮类化合物,以扩大靶向化合物的覆盖范围。依据 2.2 节中得到的 94 种化合物相对含量构建黄酮类和非黄酮类化合物的 OPLS-DA 模型(图 4A),结果表明,此模型的 R^2X 为 0.80, R^2Y 为 0.96, Q^2 为 0.85,能有效区分 3 个年份组的广陈皮样品。与 OPLS-DA 模型(图 3)相比, OPLS-DA 模型(图 4A)能够显著区分 7Y 组和 12Y 组的样品。此结果表明,基于黄酮类和非黄酮代谢物构建的 OPLS-DA 模型更适用于筛选潜在的年份标志代谢物。进一步以 7Y 组为基准,与 12Y 组和 17Y 组相比较(7Y vs 12Y、7Y vs 17Y),以 OPLS-DA 模型中 VIP 值>1 和 p 值<0.05 为筛选标准,运用维恩图并集分析,从 94 种靶向化合物中挖掘出 32 种潜在的年份标志代谢物(表 1)。这些标志物包括 24 种黄酮类化合物(荭草素和野漆树苷等化合物)、2 种柠檬苦素类化合物(诺米林和柠檬苦素)、2 种氨基酸类化合物(酪氨酸和色氨酸)、1 种酚酸类化合物(阿魏酸)、1 种香豆素类化合物(异橙皮内酯)、1 种核苷酸类化合物(腺苷)和 1 种生物碱类化合物(辛弗林),其中,诺米林、芹菜素、圣草酚、芦丁、柠檬苦素、5,6,7,8-四甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)-2,3-二氢-4H-色烯-4-酮、维采尼-2 和 5-羟基-7,8,3',4'-四甲氧基黄酮这 8 种化合物是文献报道的广陈皮中潜在的年份标志代谢物^[5,21]。

为验证这 32 种潜在的年份标志代谢物能否有效区分 3 个年份组的广陈皮样品,以其为变量重新构建 OPLS-DA 优化模型(图 4B)。此模型的 R^2X 为 0.84, R^2Y 为 0.89, Q^2 为 0.78, 3 个数值均接近 1,表明 OPLS-DA 优化模型良好,与基于 94 种靶向化合物的 OPLS-DA 模型同样能显著区分 3 个年份组样品。此外,对模型进行 200 次置换检验(图 4C),其中 R^2 截距值为 0.28(<0.30), Q^2 截距值为-0.61(<0.05), R^2 和 Q^2 的左边值均小于右边值,说明模型未过度拟合且具有良好的预测能力。由此推测,荭草素和诺米林等 32 种化合物可作为广陈皮的潜在年份标志代谢物,有望应用于广陈皮的年份鉴别。

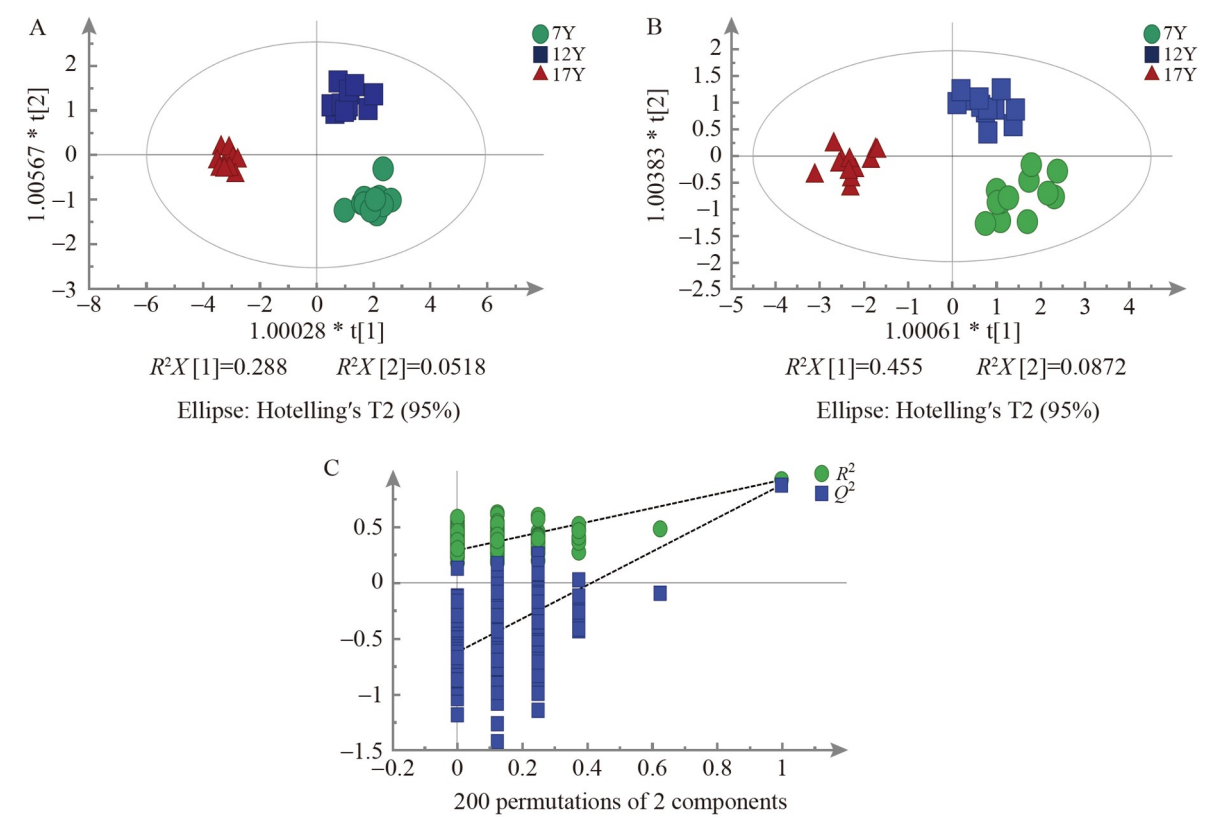


图4 基于黄酮类和非黄酮类化合物相对含量的 OPLS-DA 分析结果: (A) 94 种黄酮类和非黄酮类化合物的 OPLS-DA 得分图; (B) 32 种潜在的年份标志代谢物的 OPLS-DA 得分图; (C) 32 种潜在的年份标志代谢物的 OPLS-DA 模型置换检验图

Fig.4 Results of OPLS-DA analysis based on the relative content of flavonoids and non-flavonoids: (A) OPLS-DA score plot of 94 kinds of targeted flavonoids and non-flavonoids; (B) OPLS-DA score plot of 32 kinds of potential vintage metabolic makers; (C) Permutation test diagram of 32 kinds of potential vintage metabolic makers in OPLS-DA model

表1 32种潜在的年份标志代谢物

Table 1 32 kinds of potential vintage metabolic markers

序号 NO.	化合物 Compound	分子式 Formula	类型 Type	序号 NO.	化合物 Compound	分子式 Formula	类型 Type
1	荜草素 Orientin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	✓	17	柠檬苦素 Limonin	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	
2	诺米林 Nomilin	C ₂₆ H ₃₀ O ₈		18	金圣草黄素 Chrysoeriol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	✓
3	野漆树苷 Rhoifolin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	✓	19	异橙黄酮 Isosinensetin	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	✓
4	阿魏酸 Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	✓	20	5,6,7,8-四甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)- 2,3-二氢-4H-色烯-4-酮 5,6,7,8-Tetramethoxy-2-(4-methoxyphenyl)- 2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	
5	异橙皮内酯 Isomeranzin	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	✓	21	高车前苷 Homoplantagin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	✓
6	芹菜素 Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅		22	金雀花素 Scoparin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	✓
7	柚皮芸香苷 Narirutin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	✓	23	棕矢车菊素 Jaceosidin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	✓

续表1 (Continued to Table 1)

序号 NO.	化合物 Compound	分子式 Formula	类型 Type	序号 NO.	化合物 Compound	分子式 Formula	类型 Type
8	5-羟基-3,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮 5-Hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxy-flavanone	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	✓	24	5,6-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮 5,6-Dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	✓
9	腺苷 Adenosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	✓	25	维采宁-2 Vicenin 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	
10	圣草酚 Eriodictyol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆		26	异荭草素 Isoorientin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	✓
11	六甲氧基黄酮 Hexamethoxyflavone	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	✓	27	5,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮 5,7,8,3',4' - Pentamethoxyflavanone	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	✓
12	芦丁 Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆		28	5,7-二羟基-6,8,3',4'-四甲氧基黄酮 5,7-Dihydroxy-6,8,3',4'-tetramethoxyflavone	C ₁₉ H ₂₀ O ₈	✓
13	色氨酸 Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	✓	29	山奈酚-3-O-芸香糖苷 Kaempferol-3-O-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	✓
14	酪氨酸 Tyrosine	C ₉ H ₁₁ NO ₃	✓	30	木犀草素 Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	✓
15	辛弗林 Synephrine	C ₉ H ₁₃ NO ₂	✓	31	5-羟基-7,8,3',4'-四甲氧基黄酮 5-Hydroxy-7,8,3',4' -tetramethoxyflavone	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	
16	5,6,7,4'-四甲氧基黄酮 5,6,7,4'-Tetramethoxyflavone	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	✓	32	金腰乙素 Chrysosptertin B	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	✓

注: ✓ 为新发现的潜在的年份标志代谢物。
Note: ✓ denotes the newly-discovered potential vintage metabolic markers.

3 结论

本研究采用靶向质谱代谢组学结合 OPLS-DA 分析方法对广陈皮样品中代谢物的注释和年份进行了鉴别,并深入挖掘了广陈皮潜在的年份标志代谢物。结果表明,基于广陈皮中 94 种黄酮类和非黄酮类化合物相对含量所构建的 OPLS-DA 优化模型,可对 3 个年份组的广陈皮样品进行准确的鉴别分析。在此基础上,成功筛选出 32 种化合物,并采用 OPLS-DA 分析方法验证这 32 种潜在的年份标志代谢物可用于广陈皮年份鉴别,结果准确可靠。其中,荭草素和野漆树苷等 24 种化合物是本研究中新发现的潜在的年份标志代谢物。本研究结果表明,基于靶向质谱代谢组学可望实现广陈皮年份鉴别,有效筛选潜在的年份标志代谢物,拓展了靶向代谢组学的研究领域,为解决市场上广陈皮年份鉴别的难题提供了技术参考,也为广陈皮年份鉴别及标准化推广提供了新思路。

References

[1] SHIMAMURA Y, SEI S, NOMURA S, MASUDA S. *J. Clin. Biochem. Nutr.* , 2021, 68(2): 149-155.

[2] ISHFAQ M, AKHTAR B, MUHAMMAD F, SHARIF A, AKHTAR M F, HAMID I, SOHAIL K, MUHAMMAD H. *Curr. Pharm. Biotechnol.* , 2021, 22(8): 1114-1121.

[3] QIAN Y J, GAO Z P, WANG C, MA J, LI G Y, FU F H, GUO J J, SHAN Y. *Front. Nutr*

- [10] WANG X J, ZHANG A H, YAN G L, HAN Y, SUN H. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2014, 63(3): 180-187.
- [11] LI Meng, LU Xi-Cheng, HUANG Yun-Yan, KANG Jia-Xin, WEI Zi-Kai, REN Hao-Wei, LIU Ning. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2021, 49(11): 1864-1875.
李萌, 卢玺丞, 黄云艳, 康佳欣, 魏子凯, 任皓威, 刘宁. *分析化学*, 2021, 49(11): 1864-1875.
- [12] LIU Z H, ZHANG M L, CHEN P, HARNLY J M, SUN J H. *J. Agric. Food Chem.*, 2022, 70(36): 11138-11153.
- [13] ZHONG P, WEI X Q, LI X M, WEI X Y, WU S Z, HUANG W J, KOIDIS A, XU Z L, LEI H T. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2022, 21(3): 2455-2488.
- [14] ZHANG H B, ZHANG Y, ZHANG T J, LIU C X. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2022, 211: 114588.
- [15] WANG Ji-Yang, ZHOU Zhi, XIE Bing, CUI Xing-Yun, LAMAO Zhuo-Ma, WANG Zhong-Hua, ABLIZ Zeper. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2023, 51(3): 390-400.
王纪阳, 周帜, 谢冰, 崔星云, 拉毛卓玛, 王中华, 再帕尔·阿不力孜. *分析化学*, 2023, 51(3): 390-400.
- [16] CAO Xiao-Min, PAN Si-Yi. *Food Sci.*, 2022, 43(23): 305-315.
曹小敏, 潘思轶. *食品科学*, 2022, 43(23): 305-315.
- [17] WU Yin, TIAN Shi-Si, LI Wen-Jie, SUN Ling-Hui, SONG Xi-Lin, ZHAO Ya-Bin, LI Zhan-Ping. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2023, 51(4): 570-578.
吴寅, 田师思, 李文杰, 孙令辉, 宋禧林, 赵雅彬, 李展平. *分析化学*, 2023, 51(4): 570-578.
- [18] SCHYMANSKI E L, JEON J, GULDE R, FENNER K, RUFF M, SINGER H P. *Environ. Sci. Technol.*, 2014, 48(4): 2097-2098.
- [19] WANG F, HU Y, CHEN H P, CHEN L, LIU Y P. *Food Res. Int.*, 2023, 172: 113117.
- [20] CAO X M, SHI K X, XU Y, ZHANG P P, ZHANG H Y, PAN S Y. *Food Res. Int.*, 2023, 174(P1): 113514.
- [21] LUO Y, ZENG W, HUANG K E, LI D X, CHEN W, YU X Q, KE X H. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, 171: 218-231.

Vintage Identification of *Guang Citri Reticulatae Pericarpium* Based on Targeted Mass Spectrometry-based Metabolomics

JIAN Xiao-Jun^{1,2}, LI Han-Xiang³, WEN Qian^{1,2}, TAO Yi-Wen¹, HUANG Hong-Bo^{*1}, DING Bo^{*1}

¹(Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Target & Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

²(Key Laboratory of Rapid Drug Inspection Technology, National Medical Products Administration, Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663, China)

³(Institutional Center for Shared Technologies and Facilities of South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract The medicinal value of *Guang Citri Reticulatae Pericarpium* gradually increases with the increase of storage years, leading to a corresponding rise in its market price. This has resulted in a serious issue of fraudulent misrepresentation of vintage identification in the *Guang Citri Reticulatae Pericarpium* market. To address this issue, the present study focused on *Guang Citri Reticulatae Pericarpium* aged from 7 to 17 years, employing a targeted mass spectrometry-based metabolomics approach for vintage identification. Initially, this study targeted the analysis of quality evaluation indicators, such as hesperidin, naringin, and neohesperidin, as specified in *Chinese Pharmacopoeia*. A comparative analysis with existing results was conducted to assess the authenticity of the samples. Subsequently, the absolute content of 6 kinds of flavonoids and the relative content of 63 kinds of flavonoids, along with 94 kinds of flavonoid and non-flavonoid compounds, in *Guang Citri Reticulatae Pericarpium* were calculated using targeted mass spectrometry-based metabolomics. By integrating orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), the potential metabolites associated with the aging process in *Guang Citri Reticulatae Pericarpium* were identified. The results revealed that relying solely on the three quality evaluation indicators specified in the pharmacopoeia for flavonoids was insufficient to effectively distinguish the aging process of *Guang Citri Reticul*

metabolomics, the potential age-related metabolites in Guang *Citri Reticulatae Pericarpium* were successfully identified. Thirty-two kinds of potential vintage metabolic markers, including compounds such as hesperetin and nobiletin, were selected from a pool of 94 kinds of flavonoid and non-flavonoid compounds. The discovery of these metabolites provided an effective means to differentiate Guang *Citri Reticulatae Pericarpium* of different ages and held promise for potential applications in the authentication of the aging process in Guang *Citri Reticulatae Pericarpium*.

Keywords Guang *Citri Reticulatae Pericarpium*; Vintage identification; Targeted mass spectrometry-based metabolomics; Vintage metabolic markers; Orthogonal partial least squares-discriminant analysis

(Received 2023-07-28; accepted 2024-02-29)

Supported by the Open Project of National Medical Products Administration Key Laboratory of Rapid Drug Inspection Technology, Guangdong Institute for Drug Control (No. KF2022003) and the Undergraduate Teaching Quality and Teaching Reform Project Construction Project of Guangdong Province in 2022- “Guangzhou Medical University and Xinbaotang Company” Practice Teaching Base for Integrating Science, Industry, and Education (No. YJGH[2023] No.4).