

Doi :10.11840/j.issn.1001-6392.2015.06.013

具槽帕拉藻代谢组提取方法的比较研究

于倩^{1,2}, 王清¹, 韩伟³, 张倩^{1,4}, 吴惠丰¹, 赵建民¹

(1. 中国科学院烟台海岸带研究所 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 山东 烟台 264003;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 山东省寿光市海洋与渔业局, 山东 潍坊 262700;

4. 中国农业大学 烟台研究院, 山东 烟台 264670)

摘 要: 代谢组学技术已被广泛应用于环境科学、生物医学、营养学等众多研究领域。以海洋环境指示物种具槽帕拉藻 (*Paralia sulate*) 为研究对象, 采用两种细胞破碎方式和三种溶剂系统对均一生物样本的代谢物进行提取, 结合核磁共振 (Nuclear magnetic resonance, NMR) 波谱分析和主成分分析 (Principal components analysis, PCA), 对不同的代谢物提取系统进行了评估。结果表明: 甲醇/水 (1:1) 与匀浆相结合的方法具有高提取产率、高重现性、易操作和速度快等特性, 是适合具槽帕拉藻代谢物提取的方法, 可为后续代谢途径的研究提供参考。

关键词: 代谢组学; 代谢物提取; NMR; 具槽帕拉藻 (*Paralia sulate*)

中图分类号: S968.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-6932(2015)06-0703-07

Comparison of metabolome extraction strategies from *Paralia sulate*

YU Qian^{1,2}, WANG Qing¹, HAN Wei³, ZHANG Qian^{1,4}, WU Hui-Feng¹, ZHAO Jian-Min¹

(1. Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Remediation, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Oceans & Fisheries Bureau of Shouguang, Shandong Province, Weifang 262700, China;

4. China Agriculture University (Yantai), Yantai 264670, China)

Abstract: Metabolomics has been applied in multiple fields, including environmental sciences, biomedicine, and nutriology. In the present study, the metabolites of *Paralia sulate* are extracted by using three solvent extraction systems and two ways of cell disruption, and then they are assessed with one dimensional proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy combined with principal components analysis (PCA). It is found that the extraction strategy of methanol/water (1:1, homogenized) is preferable for the metabolite extraction due to its highest yield, reproducibility, ease and speed. Validation of extraction protocol provides a reference for further detection of metabolic pathway of *P. sulate*.

Keywords: Metabolomics; metabolite extraction; NMR; *Paralia sulate*

代谢组学是继基因组学和蛋白质组学之后新近发展起来的一门学科。它以组群指标分析为基础, 可对生物体内的所有代谢物特别是小分子代谢物进行定性、定量分析 (Lindon et al, 1999; Griffiths et al, 2007; Zhang et al, 2011)。代谢物是生物体新陈代谢的终端产物, 能够真实地反应生物系统 (例如, 细胞、组织、体液、生物体) 的功能变化

(Lindon et al, 2000; Ji et al, 2001; Viant et al, 2001)。当内源性或外源性干扰作用于生物体时, 机体的代谢过程则会发生相应的变化, 对代谢物进行系统性的分析就能够促进对此变化过程的了解 (Yang et al, 2010; Lu et al, 2012)。近年来, 代谢组学技术已被广泛应用于环境科学、生物医学和毒理学等领域 (Brindle et al, 2002; Bundy et al,

收稿日期: 2015-01-28; 修订日期: 2015-03-12

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (A 类) (XDA11020405)。

作者简介: 于倩 (1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生态毒理研究。电子邮箱: yuqian15225@sohu.com。

通讯作者: 赵建民, 研究员。电子邮箱: jmzhao@yic.ac.cn。

吴惠丰, 研究员。电子邮箱: hfwu@yic.ac.cn。

<http://hytb.nmdis.org.cn>

2004; Wu et al, 2005; Viant et al, 2006)。

代谢组学分析由样品准备、数据采集和主成分分析三部分组成 (Kim et al, 2010)。相比于数据采集和主成分分析等步骤, 样品制备是代谢组学研究的限速步骤 (Lindon et al, 2000; Dettmer et al, 2007; Wu et al, 2008), 也直接决定了代谢物的提取质量和数据分析的精确度 (Huie, 2002; Liu et al, 2011)。

在样品代谢物提取之前, 细胞破碎是提高提取效率的必要步骤。液氮研磨 (Rosenblum et al, 2005; Viant et al, 2005; Lin et al, 2007) 和匀浆 (Warne et al, 2001; Pears et al, 2005) 是最常用的两种细胞破碎方式。传统的液氮研磨方式曾被称为“黄金法则”, 但该过程不仅耗时, 且面临样品解冻、重现性较差等问题。匀浆是比较直接的方法, 但当样品量较少时, 该方法的适用性就会受到限制。

提取样品代谢物时, 提取方法的确定是至关重要的。样品的提取方法包括溶剂提取法 (Traditional solvent extraction, TSE) (Hurlbut et al, 1998)、超声波提取法 (Ultrasonic extraction, UE) (Vinatoru, 2001)、微波辅助提取法 (Microwave-assisted extraction, ME) (Mandal et al, 2007)、加压液相萃取法 (Pressurized liquid extraction, PLE) (Benthin et al, 1999) 等。其中, 溶剂提取法在代谢物提取过程中具有高选择性和热不稳定性, 是被广泛使用的代谢物提取方法 (Huie, 2002)。目前, 甲醇、乙醇、氯仿、乙腈及其与水的混合物组成的混合溶剂提取体系在代谢物提取中最为常见 (Coen et al, 2003; Kim et al, 2004; Stentiford et al, 2005)。在浮游植物的代谢组中, 由于代谢物成分复杂、丰度差别大, 尚没有理想的有机溶剂提取系统能够有效地提取浮游植物中的所有代谢物。

具槽帕拉藻 (*P. sulate*) 是一种广泛分布在温带半咸水沿海区域的底栖硅藻 (McQuoid et al, 2003; Gebuhr et al, 2009; 郭术津等, 2014)。研究发现, 具槽帕拉藻的生长状态和外界环境 (例如: 光照、温度、盐度、营养等因素) 的变化紧密相关 (Gebuhr et al, 2009); 同时, 该物种具有易沉降、难降解的特性, 使其能够在沉积物中得以较好的保存, 常被用作海洋环境的指示物种

(McQuoid et al, 2003; 宁旋旋等, 2014)。目前, 关于具槽帕拉藻的研究主要集中于生态特征方面 (Zong, 1997), 而采用代谢组学技术研究其代谢途径的研究尚未见报道。在本研究中, 主要对具槽帕拉藻代谢组学方法进行探索, 重点解决两个问题: 一是解析具槽帕拉藻的代谢图谱, 二是通过比较四种具槽帕拉藻代谢物提取方法, 建立基于 NMR 检测技术的具槽帕拉藻代谢组学研究方法。

1 材料和方法

1.1 藻种及试剂

实验所用具槽帕拉藻 (*Paralia sulate*) 分离自渤海近岸海域, 并保存于本实验室。藻种采用 f/2+Si 培养基进行培养, 培养条件如下: 温度为 $23.0\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 光照强度为 $3\ 000\ \text{lx}$, 光暗周期为 14:10 h。正式实验前, 通过添加抗生素 (硫酸链霉素与青霉素钠盐混合液) 的方式, 对预接种藻液进行灭菌处理 (Kwon et al, 2013)。

用于代谢物提取的有机溶剂均为色谱级试剂。其中, 甲醇购自 Buidick & Jackson 公司, 氯仿购自国药集团化学试剂有限公司。重水购自 Sigma 公司, 3-trimethylsilyl-2, 2, 3, 3-d₄-propionate (TSP) 购自 Norell 公司。

1.2 藻细胞培养

参照 Harrison 等 (1980) 的方法配制人工海水, 经 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径醋酸纤维滤膜抽滤后, 配制 f/2+Si 培养基, 进行藻细胞培养。收集处于指数生长期的具槽帕拉藻, 经 $6\ 000\ \text{rpm}$ 离心 $15\ \text{min}$ 收集藻细胞, 将藻细胞混匀后放入液氮中速冻, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 代谢物的提取

分别采用 3 种溶剂体系 (甲醇、甲醇/水、甲醇/氯仿/水) 和两种样品破碎方法 (研磨、匀浆) 来提取具槽帕拉藻的代谢物。操作简述如下: (1) 称取 $200\ \text{mg}$ 藻细胞样品 ($n=12$), 采用研钵研磨 (液氮预冷) 进行藻细胞破碎处理; 破碎后的样品按 $3.33\ \text{mg/L}$ 的量加入甲醇/水 (体积比 1:1)。(2) 称取 $200\ \text{mg}$ 藻细胞 ($n=18$), 分别按 $3.33\ \text{mg/L}$ 的量加入甲醇、甲醇/水 (体积比 1:1)、甲醇/氯仿/水 (体积比 1:2:1) 三种有机溶剂体系; 然后

采用 Precellys 24 匀浆器破碎细胞。经涡旋混匀后，4 °C 离心 (3 000 g) 10 min，上清液经真空离心浓缩系统 (UVS 400A and SPD111V, Thermo, USA) 干燥后，置于 -80 °C 保存。

1.4 核磁共振波谱仪检测

将干燥样品加入 600 μ L 重水磷酸盐缓冲液 (100 mM Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 , 0.5 mM TSP, pH 7.0)。待充分溶解后离心 (5 min, 3 000 g, 4 °C)，取 550 μ L 上层液体转移至核磁检测管中，进行 NMR 波谱仪检测。

使用 Bruker AV 500 NMR 波谱仪对具槽帕拉藻代谢组样品进行分析，具体参数如下：一维氢谱观察频率：500.18 MHz，谱宽：6 009.6 Hz，温度：298 K，混合时间：0.1 s，弛豫延迟时间：0.3 s，在弛豫延迟和混合期间采用预饱和方式压制水峰。累加次数：256 次，每个样本核磁扫描均收集到 16 384 个数据点，采用线宽为 0.3 Hz 的指数窗函数进行傅里叶变换，获得 ^1H -NMR 谱图载入 TopSpin 软件 (Version 2.1, Bruker BioSpin, Canada)，对所有的 ^1H -NMR 谱图进行相位校正、基线调整，并以 TSP 内标为化学位移参考峰 (TSP=0.0 ppm)。通过 Chenomx Suite 软件 (Evaluation Version, Chenomx Inc., Canada) 分析代谢物的化学位移，完成主要代谢产物的鉴定 (Lin et al, 2007; Liu et al, 2011)。

1.5 主成分分析

将 δ 0.2–10.0 ppm 内的谱图去除水峰所在的化学位移区域 (4.72–4.96 ppm)，然后使用 Matlab Pro Metab 软件 (Version 7.0; MathsWorks, Natick, MA, USA) (Lin et al, 2007; Viant et al, 2003; Purohit et al, 2004)，以 0.005 ppm 的谱宽对其进行分段并积分。归一化剩余总的谱峰面积，以便比较谱峰之间的强度差异。为了增加低强度峰的权重，在多元统计分析之前，先将所有的核磁谱进行对数化处理，进行 log 转换 (转换因子， $\lambda=6.36\times 10^{-8}$) (Viant et al, 2003; Purohit et al, 2004)。用 PLS Toolbox 4.0 软件 (Eigenvector Research, Manson, WA) 进行主成分分析。主成分分析是一种非监管性的模式识别方法，它能够检测到潜在的离群值和多个 NMR 光谱集之间的相似度。主成分分析结果用得分图 (Scores plot) 及负载图 (Loadings plot) 表示。

2 结果和讨论

2.1 不同抽提方法获得代谢谱图解析

4 种代谢组学提取方法获得的 ^1H NMR 谱图如图 1 所示，代表在不同的抽提策略下具槽帕拉藻代

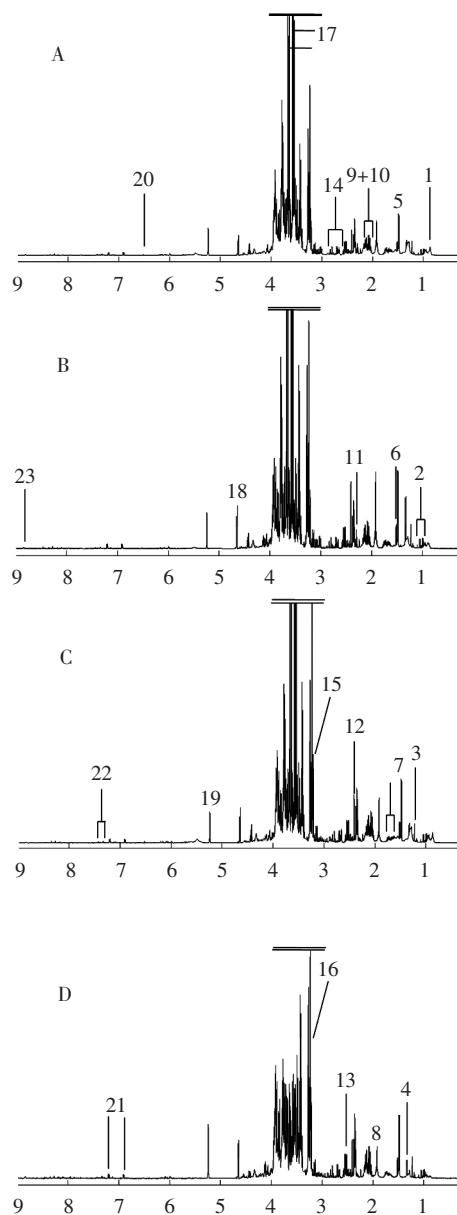


图 1 4 种提取方法下具槽帕拉藻代谢物的核磁共振波谱图 (A) 匀浆、甲醇/水 (1 : 1), (B) 匀浆、甲醇, (C) 研磨、甲醇/水 (1 : 1), (D) 匀浆、甲醇/氯仿/水 (1 : 2 : 1)。代谢物: 1. 脂肪, 2. 支链氨基酸 (缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸), 3. 未知代谢物 1 (1.10 ppm), 4. 乳酸, 5. 丙氨酸, 6. 未知代谢物 2 (1.52 ppm), 7. 精氨酸, 8. 乙酸, 9. 谷氨酸, 10. 谷氨酰胺, 11. 4-氨基丁酸, 12. 琥珀酸, 13. 未知代谢物 3 (2.53 ppm), 14. 天冬氨酸, 15. 磷酸胆碱, 16. 牛磺酸, 17. 甘油, 18. β -葡萄糖, 19. α -葡萄糖, 20. 酪氨酸, 21. 苯丙氨酸, 22. 葫芦巴碱

谢物的代谢谱图。经代谢谱图解析,得到 22 种高丰度化合物,其在 ^1H NMR 谱图上的位置如图 1 所示。 ^1H NMR 谱图可为小分子代谢物提供峰面积、化学位移、峰的裂分情况、耦合常数等重要的结构信息 (Liu et al, 2011)。通过 NMR 波谱仪可鉴定出具槽帕拉藻的不同类型代谢物,包括氨基酸 (丙氨酸、精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)、有机渗透物 (甘油、牛磺酸、葫芦巴碱)、储能化合物 (脂肪、 α -葡萄糖和 β -葡萄糖)、有机酸 (乙酸、乳酸)、三羧酸循环相关代谢物 (琥珀酸、4-氨基丁酸) 等。由图 1 可知:某些具槽帕拉藻代谢物在特定的提取系统中具有很高的丰度,而在其他提取系统中没有出现,这主要是由代谢物提取策略的差异所引起。

图 2 表示 4 种提取策略下,具槽帕拉藻代谢物的主成分分析得分图 (图 2A) 及负载图 (图 2B-C)。如图 2A 所示,4 种提取方法在主成分分析得分图上的位置完全分离,表明这四种提取方法存在很大的差别。由 PC1 负载图 (图 2B) 可知:匀浆、甲醇/水抽提方法能够提取出较高水平的脂肪、甘油和 4-氨基丁酸;然而高丰度的代谢物例如丙氨酸、葡萄糖和谷氨酰胺出现在匀浆、甲醇/氯仿/水抽提方法中 (图 2B)。在 PC2 负载图 (图 2C) 中,匀浆、甲醇的抽提方法能够提取出高含量的 4-氨基丁酸和葡萄糖。PC3 负载图 (图 2D) 显示:研磨、甲醇/水的提取方法能够有效的提取脂肪、谷氨酰胺、磷酸胆碱和甘油。

2.2 4 种具槽帕拉藻代谢物提取方法的评估

代谢物提取前,细胞的破碎是样品准备的限速步骤。细胞破碎的自动化对于提高代谢物样品的通量是非常有必要的。采用溶剂提取法进行代谢物提取时,溶剂体系一般包括单一溶剂体系 (甲醇、乙醇、水、氯仿) 和混合溶剂体系 (甲醇/氯仿/水、甲醇/水)。溶剂体系主要取决于溶剂的理化性质,例如极性、毒性、惰性。其中,溶剂的极性在代谢物提取过程中至关重要,并且遵守“相似相溶”原则 (Kim et al, 2010)。此外,代谢物从生物基质中的释放机制也是溶剂选择时的另一个重要因素。例如,氯仿和乙酸乙酯具有相似的极性,但在对生物碱类物质进行提取时,氯仿的效果要优于乙酸乙

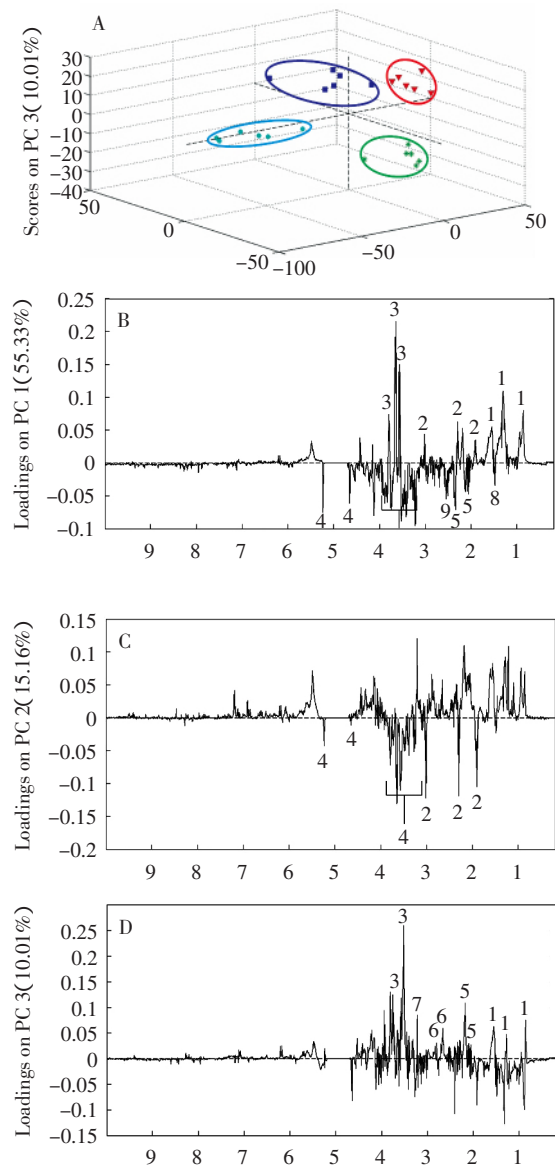


图 2 4 种提取方法下具槽帕拉藻的主成分分析得分图 (A), PC1 负载图 (B), PC2 负载图 (C), PC3 负载图 (D) (○) 匀浆、甲醇/水 (1:1), (*) 匀浆、甲醇, (●) 匀浆、甲醇/氯仿/水 (1:2:1), (■) 研磨、甲醇/水 (1:1)。椭圆代表每种抽提方法的均值 \pm SD。代谢物: 1. 脂肪, 2. 4-氨基丁酸, 3. 甘油, 4. 葡萄糖, 5. 谷氨酰胺, 6. 天冬氨酸, 7. 磷酸胆碱, 8. 丙氨酸, 9. 未知代谢物 3 (2.53 ppm)

酯 (Kim et al, 2010)。因此,对不同的代谢组学提取方法进行评估,从而确定最理想的提取方法具有非常重要的意义。

在本实验中,设计了 2 种细胞破碎方法、3 种溶剂提取体系,分别对具槽帕拉藻代谢物进行提取。通常来说,生物样品代谢组学提取方法的评估标准包括提取效率、方法重现性、易操作性和提取速度 (Lin et al, 2007)。低分子量的代谢物通常会

随着大分子代谢物一起被提取出来，会在 ^1H NMR 谱图上产生较宽的共振态，因此在比较不同提取方法的提取效率时， ^1H NMR 谱图只能为其提供一个大概的信息。在比较各种代谢物提取方法的提取效率时，总的 ^1H NMR 谱图面积应以 TSP 内标进行相位校正。其中，将匀浆、甲醇/水的代谢物提取效率标准化为 1 (表 1)。如表 1 所示，甲醇/水 (匀浆) 提取方法具有最高的提取效率，而甲醇 (匀浆)、甲醇/氯仿/水 (匀浆) 和甲醇/水 (研磨) 3 种方法的提取效率分别只有甲醇/水 (匀浆) 产率的 79%、40% 和 82%。

表 1 代谢物提取方法的产率和重现性的比较

提取方法	产率 ^a	重现性 ^b
甲醇/水 (匀浆)	1.00 ± 0.14	1.00
甲醇 (匀浆)	0.79 ± 0.07	0.08
甲醇/水 (研磨)	0.82 ± 0.11	0.38
甲醇/氯仿/水 (匀浆)	0.40 ± 0.06	0.41

^a均值±SD 为总的光谱面积/TSP/样品质量；^b代谢物提取方法的重现性由主成分分析得分图决定。产率和重现性由甲醇/水 (匀浆) 的提取方法标准化为 1

3 种溶剂提取体系具有不同的极性，因此代谢物提取种类也不完全相同。甲醇/水溶剂体系极性最高，能提取更多含-COOH、-OH 基团的化合物，例如谷氨酰胺、天冬氨酸、4-氨基丁酸、甘油；单溶剂提取系统甲醇的极性小于甲醇/水溶剂系统，也能提取较多含-COOH、-OH 基团的化合物，例如 4-氨基丁酸和葡萄糖。但甲醇/氯仿/水提取方法能够同时提取疏水和亲水的代谢物 (丙氨酸、谷氨酰胺)。比较可见，不同提取策略的提取效率各不相同。与甲醇/水 (匀浆) 的产率相比，甲醇/水 (研磨) 的代谢物提取方法有较低的提取效率，这可能是由于使用液氮研磨和 Precellys 24 匀浆器匀浆时样品的破碎程度不一致所造成。在四种提取策略中，虽然甲醇/氯仿/水 (匀浆) 提取方法能够同时提取亲水和疏水代谢物，但由于提取效率较低，不适合用于具槽帕拉藻代谢物的提取。而甲醇/水溶剂体系能实现对大多数代谢物的提取，如丙氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甘油、酪氨酸、脂肪等。

代谢物提取方法的重现性是由主成分分析得分来判定的，这是评估样本准备过程中的一个重要指

标。主成分分析得分图能客观的评估多个样品重复的代谢指纹谱图之间的相似与不同。如图 2A 所示，椭圆形球体体积的标准差代表样本的重现性，以甲醇/水 (匀浆) 的提取方法重现性标准化为 1，值越大代表重现性越好 (表 1)。结果发现，甲醇/水 (匀浆) 提取方法具有最高重现性；甲醇/水 (研磨) 和甲醇/氯仿/水 (匀浆) 提取方法具有相似的样品重现性 (0.4 左右)；然而甲醇 (匀浆) 提取方法具有极低的重现性 (0.08)。甲醇/水 (匀浆) 和甲醇/水 (研磨) 的提取溶剂虽然相同，但是后者的重现不足前者的一半，说明破碎方式会直接影响样品的重现性。就提取方法的重现性而言，甲醇/水 (匀浆) 的方法最适合具槽帕拉藻基于 NMR 的代谢组学研究。

提取方法的易操作性和速度评估是较为主观的，通常单溶剂比多溶剂提取系统快速，匀浆比液氮研磨快速。甲醇 (匀浆) 的方法方便快捷，但重现性极低，不适合用于代谢物的提取。甲醇/水 (研磨) 重现性和产率相对较高，但样品的研磨费时费力，阻碍了代谢样品的高通量分析。

经过对 4 种提取策略进行比较 (表 2)，基于匀浆、甲醇/水 (1/1) 提取体系的代谢物提取方法在方法重现性、灵敏度等方面是最适合的，为后续研究具槽帕拉藻代谢水平变化提供了可靠的工具。

表 2 代谢物提取方法的总结

提取方法	效率	重现性	易操作性/速度
甲醇/水 (匀浆)	+	+	+
甲醇 (匀浆)	+		+
甲醇/水 (研磨)	+		
甲醇/氯仿/水 (匀浆)			+

参 考 文 献

- Benthin B, Danz H, Hamburger M, 1999. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 837(1): 211-219.
- Brindle J T, Antti H, Tranter G, et al, 2002. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^1H NMR-based metabonomics. *Nature Medicine*, 8(12): 1439-1444.
- Bundy J G, Spurgeon D J, Svendsen C, et al, 2004. Environmental metabonomics: Applying combination biomarker analysis in earthworms at a metal contaminated site. *Ecotoxicology*, 13(8): 797-806.
- Coen M, Lenz E M, Nicholson J K, et al, 2003. An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology*, 16(3): 295-303.
- Dettmer K, Aronov P A, Hammock B D, 2007. Mass spectrometry-based

- metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1): 51–78.
- Fiehn O, Kopka J, D?rmann P, et al. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology*, 18(11): 1157–1161.
- Gebuhr C, Wiltshire K H, Nicole A, et al, 2009. Influence of nutrients, temperature, light and salinity on the occurrence of *Paralia sulcata* at Helgoland Roads, North Sea. *Aquatic Biology*, 7(3): 185–197.
- Griffiths W, 2007. *Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling*. Cambridge :Royal Society of Chemistry, 1–323.
- Harrison P J, Waters R E, Taylor F J R, 1980. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology*, 16(1): 28–35.
- Hobson L A, McQuoid M R, 1997. Temporal variations among planktonic diatom assemblages in a turbulent environment of the southern Strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Marine Ecology Progress Series*, 150 :263–274.
- Huie C W, 2002. A review of modern sample preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bio-analytical Chemistry*, 373(1–2): 23–30.
- Hurlbut J A, Carr J R, Singleton E R, et al, 1998. Solid–phase extraction cleanup and liquid chromatography with ultraviolet detection of ephedrine alkaloids in herbal products. *Journal of AOAC International*, 81 (6):1121–7.
- Ji C L, Wu H F, Liu X L, et al, 2013. The influence of salinity on toxicological effects of arsenic in digestive gland of clam *Ruditapes philippinarum* using metabolomics. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31(2): 345–352.
- Kim H K, Choi Y H, Luijendijk T J, et al, 2004. Comparison of extraction methods for secologanin and the quantitative analysis of secologanin from *Symphoricarpos albus* using ¹H–NMR. *Phytochemical Analysis*, 15(4): 257–261.
- Kim H K, Saifull A H, Khan S, et al, 2010. Metabolic classification of South American *Ilex species* by NMR–based metabolomics. *Phytochemistry*, 71(7): 773–784.
- Kim H K, Verpoorte R, 2010. Sample Preparation for Plant Metabolomics. *Phytochemical Analysis*, 21(1): 4–13.
- Kwon H K, Oh S J, Yang H S, 2013. Growth and uptake kinetics of nitrate and phosphate by benthic microalgae for phytoremediation of eutrophic coastal sediments. *Bioresource Technology*, 129 :387–395.
- Lin C Y, Wu H F, Ronald S T, et al, 2007. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics*, 3(1): 55–67.
- Lindon J C, Nicholson J K, Elaine H, et al, 2000. *Metabonomics : Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids*. Concepts in Magnetic Resonance, 12(5): 289–320.
- Lindon J C, Nicholson J K, Jeremy R E, 1999. NMR Spectroscopy of Biofluid. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 38 :1–88.
- Liu X L, Zhang L B, Yang C Y, et al, 2011. Metabolomic Study on the Halophyte *Suaeda salsa* in the Yellow River Delta. *Clean–Soil Air Water*, 39(8): 720–727.
- Lu S H, Wang J X, Niu Y H, et al, 2012. Metabolic profiling reveals growth related FAME productivity and quality of *Chlorella sorokiniana* with different inoculum sizes. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7): 1651–1662.
- Mandal V, Mohan Y, 2007. Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1 :7–18.
- McQuoid M R, Nordberg K, 2003. The diatom *Paralia sulcata* as an environmental indicator species in coastal sediments. *Estuarine Coastal Shelf Science*, 56(2): 339–354.
- Pears M R, Rubtsov D, Mitchison H M, et al, 2007. Strategies for data analyses in a high resolution ¹H NMR based metabolomics study of a mouse model of Batten disease. *Metabolomics*, 3(2): 121–136.
- Purohit P V, Rocke D M, Viant M R, et al, 2004. Discrimination models using variance–stabilizing transformation of metabolomic NMR data. *Omics—a Journal of Integrative Biology*, 8(2): 118–130.
- Roelofs A K, 1984. Distributional Patterns and Variation of Valve Diameter of *Paralia sulcata* in Surface Sediments of Southern British Columbia Inlets. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 18 (2): 165–176.
- Rosenblum E S, Viant M R, Braid B M, et al, 2005. Characterizing the metabolic actions of natural stresses in the California red abalone, *Haliotis rufescens* using ¹H NMR metabolomics. *Metabolomics*, 1(2): 199–209.
- Stentiford G D, Viant M R, Ward D G, et al, 2005. Liver tumors in wild flatfish: A histopathological, proteomic, and metabolomic study. *Omics—a Journal of Integrative Biology*, 9(3): 281–299.
- Viant M R, Lyeth B G, Marion G et al, 2005. An NMR metabolomic investigation of early metabolic disturbances following traumatic brain injury in a mammalian model. *NMR in Biomedicine*, 18 (8): 507–516.
- Viant M R, Pincetich C A, Hinton D E, et al, 2006. Toxic actions of dinoseb in medaka (*Oryzias latipes*) embryos as determined by in vivo ³¹P NMR, HPLC–UV and ¹H NMR metabolomics. *Aquatic Toxicology*, 76(3–4): 329–342.
- Viant M R, Rosenblum E S, Tjeerdema R S, 2001. Optimized method for the determination of phosphoarginine in abalone tissue by high–performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 765 (1): 107–111.
- Vinatoru M, 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 :303–313.
- Warne M A, Lenz E M, Furukawa M, et al, 2001. Comparative biochemistry and short–term starvation effects on the earthworms *Eisenia veneta* and *Lumbricus terrestris* studied by ¹H NMR spectroscopy and pattern recognition. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (9): 1171–1180.
- Wu H F, Southam A D, Hines A, et al, 2008. High–throughput tissue extraction protocol for NMR– and MS–based metabolomics. *Analytical Biochemistry*, 372(2): 204–212.
- Wu H F, Zhang X Y, Li X, et al, 2005. Studies on the acute biochemical

- effects of $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ using ^1H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(2): 644–650.
- Yang S, Sadilek M, Lidstrom M E, 2010. Streamlined pentafluorophenyl-propyl column liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry and global C^{13} -labeled internal standards improve performance for quantitative metabolomics in bacteria. *Journal of Chromatography A*, 1217(47): 7401–7410.
- Zhang L B, Liu X L, You L, et al, 2011. Metabolic responses in gills of Manila clam *Ruditapes philippinarum* exposed to copper using NMR-based metabolomics. *Marine Environmental Research*, 72(1–2): 33–39.
- Zong Y Q, 1997. Implications of *Paralia sulcata* abundance in Scottish isolation basins. *Diatom Research*, 12(1): 125–150.
- 郭术津, 李彦翹, 张翠霞, 等, 2014. 渤海浮游植物群落结构及与环境因子的相关性分析. *海洋通报*, 33 (1) : 95–105.
- 宁璇璇, 夏炳训, 陈权文, 等, 2014. 2013 年夏季千里岩岛水产种质资源保护区浮游生物的生态特征. *海洋通报*, 33 (5) : 592–598.

(本文编辑:袁泽轶)

2015 年《海洋通报》期刊引证指标 取得历史最好成绩

10月21日,中国科学技术信息研究所发布了2015年版《中国科技期刊引证报告(核心版)》,《海洋通报》继续入选核心期刊。在20种海洋科学核心期刊中,综合排名第6,其中影响因子0.761,在海洋科学核心期刊中位居第1,取得历史最好成绩。

在国内最权威的核心期刊评价体系中,《海洋通报》均为核心期刊。自1992年来,连续入编由北京大学图书馆等发布的《中文核心期刊要目总览》。2015年,首次入选由中国科学院文献情报中心发布的中国科学引文数据库(CSCD)核心库(C库)来源期刊。

<http://hytb.nmdis.org.cn>