

· 专 论 ·

植物代谢组学技术在山西道地药材研究中的应用

李震宇*, 李爱平, 张福生, 秦雪梅*

山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: 以柴胡、款冬花、远志等山西道地中药材为例, 总结植物代谢组学技术在中药材质量评价中的应用。在中药材质量评价中, 代谢组学侧重于对样本的客观分组聚类, 同时可确定差异代谢物, 与指纹图谱技术具有明显的互补性, 可使中药质量标准更体现中药特色, 提高其可控性。分析该技术的优势与应用前景, 指出尚存在的问题和改进建议, 为扩大其应用提供参考。

关键词: 代谢组学; 中药材; 道地药材; 聚类; 质量评价

中图分类号: R282 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2013)07 - 0785 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.001

Application of plant metabolomic technology in study on several Shanxi genuine medicinal materials

LI Zhen-yu, LI Ai-ping, ZHANG Fu-sheng, QIN Xue-mei

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: The application of plant metabolomic technology in the quality evaluation of traditional Chinese medicinal materials (TCMM) was reviewed, using *Bupleuri Radix*, *Farfarae Flos*, *Polygale Radix*, and *Astragali Radix* as genuine medicinal materials. In quality evaluation of TCMM, not only the cluster, but also the differential metabolites between different groups could be revealed simultaneously by metabolomic technology. Thus, plant metabolomic technology is complimentary with fingerprint technology, the characteristics of TCMM could be reflected in quality standards, and the controllability could be also improved. The advantage as well as the prospect is discussed. In addition, the limitations of this technique are pointed and the improvement methods are also suggested.

Key words: metabolomics; traditional Chinese medicinal materials; genuine medicinal materials; cluster; quality evaluation

代谢组学技术是近 10 年来发展的新型组学技术, 可对生物或细胞内所有小分子代谢产物同时进行定性和定量分析, 是系统生物学的重要组成部分。植物代谢产物种类繁多、结构迥异, 传统的分析手段难以满足高通量分析要求。代谢组学技术的出现为这一问题的解决提供了新的方法。指纹图谱和代谢组学技术均能够从整体上对中药所含的化学成分进行全面分析, 获得药材的代谢物指纹, 指纹图谱技术通过相似度计算确定样本之间的相似度, 而代谢组学技术不仅能通过多元统计分析明确不同样本的分组聚类情况, 而且能确定不同组间的差异代谢

产物。代谢组学技术已用于不同生长年限的人参^[1], 不同种属的厚朴^[2]、麻黄^[3], 不同产地的灵芝^[4]等比较研究; 采用相关性分析方法与生物活性相结合, 还可进一步确定活性相关成分, 如雄蕊状鸡脚参 *Orthosiphon stamineus* Benth. 中的腺苷 A1 受体拮抗剂^[5], 金英 *Galphimia glauca* Cav. (*Thryallis gracilis* Kuntze) 中的镇静和抗抑郁活性成分^[6]。本课题组近年来对植物代谢组学技术在中药材中的应用进行了探索研究, 并应用于柴胡^[7]、款冬花^[8-13]、远志^[14]、黄芪^[15]等山西优势中药材中, 本文对这些工作进行简要概述, 并对其应用前景和存在问题进行展望。

收稿日期: 2012-12-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270008, 30570174, 30900118, 31070295, 31100244, 30710103092); 山西省国际科技合作(2010081070, 2008081043)

作者简介: 李震宇(1980—), 男, 副教授, 研究方向为中药活性成分与质量控制。

*通信作者 秦雪梅, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药质量标准及代谢组学研究。E-mail: Qinxm@sxu.edu.cn

李震宇 Tel: (0351)7011202

1 款冬花的代谢组学研究

款冬花为菊科款冬属款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 又称九九花、冬花等, 为中医临床常用中药, 具有润肺下气、止咳化痰的功效。款冬植物广泛分布于全球温带地区, 主产于我国的陕西、山西、河南和甘肃等地。款冬花含有倍半萜、黄酮类、绿原酸类等化学成分。本课题组采用代谢组学技术对其进行了以下几方面的研究。

1.1 不同产地款冬花的代谢组学研究^[16]

目前商品款冬花药材包括栽培和野生两种, 其中野生品较少, 而栽培品占绝大多数。栽培品目前主要产于甘肃漳县、陇西、渭源, 河北蔚县, 内蒙古通辽等地, 其种植区域分别位于我国的西北、华北和东北。野生款冬花主要分布于山西北部、甘肃等地。采用基于 NMR 和 UHPLC 的代谢组学技术对不同产地和不同生长方式的款冬花质量状况进行研究, 共分析不同产地的款冬花药材 21 份, 主成分分析结果显示, 野生与栽培品款冬花的代谢产物明显不同, 即药材质量与栽培方式密切相关; 与栽培品相比, 野生品中含有较多的款冬酮、EMDNT [7β -(3-ethyl-cisrotonoyloxy)- 1α -(2-methylbutyryloxy)-3(14)-dehydro-Z-notonipetranone] 等倍半萜类成分, 以及芦丁、3, 5-O-二咖啡酰奎尼酸、阿魏酸、异阿魏酸、槲皮素等。为了保证临床用药的安全有效, 应对其质量差异性状况进行系统研究。

1.2 款冬花蕾及其掺伪品花梗的比较研究^[8]

近年来, 款冬花种植面积减少而导致款冬花价格升高, 市售款冬花蕾中掺有大量的花梗。采用代谢组学技术对款冬花蕾及花梗的化学成分进行了比较研究, 结果显示其花蕾和花梗的代谢组分明显不同, 花蕾中含有较多的咖啡酸、绿原酸、芦丁、倍半萜类等次生代谢产物, 而花梗中亮氨酸、异亮氨酸、蔗糖、甾体等量较高。小鼠止咳化痰实验结果显示, 款冬花梗无明显止咳化痰作用。传统经验认为款冬花无花梗者质量为优, 本研究结果与传统经验一致。因此, 为了保证中医临床用药安全有效, 作为药用的款冬花中应将花梗剔除, 并在质量标准检查项中规定花梗杂质限量。

1.3 款冬不同部位的代谢组学研究^[9-11]

款冬在东西方都有悠久的药用历史, 我国传统中医药使用的是其未开放的花蕾, 而欧洲传统医学则使用的是叶, 东西方都未将其根作为药用资源。为扩大款冬的药源, 本课题组采用 NMR、GC-MS、

HPLC 3 种分析手段建立了款冬花的代谢组学分析方法, 并对款冬的花蕾、叶、根进行了化学成分和药效学比较。结果显示, 款冬花蕾、叶、根的化学成分明显不同, 与根相比, 花蕾和叶中含有较多的绿原酸、黄酮类、倍半萜类等次生代谢产物, 而根中含有较多的亮氨酸、蔗糖等初级代谢产物, 为其不能入药提供了依据。花蕾与叶相比, 花蕾中倍半萜类成分较多, 而叶中芦丁、绿原酸等成分量较高。小鼠止咳祛痰实验显示花蕾和叶具有显著的止咳祛痰作用, 而根无明显止咳祛痰作用。采用偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 对代谢组学数据与药效学数据进行相关性分析, 结果显示, 芦丁、绿原酸、3, 5-O-二咖啡酰奎尼酸等成分可能与款冬的止咳作用密切相关。目前, 《中国药典》2010 年版中仅以款冬酮作为款冬花的检测指标, 本课题组将对这些化学成分及其不同比例组合的止咳化痰作用进行系统深入研究, 为款冬花的全面质量控制提供依据。

1.4 不同发育阶段款冬花蕾的代谢组学研究^[12-13]

款冬花蕾的发育开始于 8 月下旬或 9 月上旬, 《中国药典》2010 年版中规定, 款冬花蕾 12 月或大地解冻后花尚未出土时采挖, 传统经验认为次年花蕾长大超过 3 cm 则药材质量降低, 而开花后的花蕾则不能入药。为了探讨款冬花整体药效物质基础在发育过程中的动态变化规律, 采用代谢组学技术对 5 个不同发育阶段 (9、10、11、12 月、次年 3 月) 的花蕾进行了代谢组学的动态比较分析, 结果显示, 花蕾的发育初期与中期 (10、11、12 月) 质量明显不同, 而开花后有更大的变化, 虽然发育中期 3 个阶段代谢组成接近, 但仍有区别。本研究结果与传统经验是一致的, 即发育初期和开花后的花蕾均不能入药, 而具体的合理采收期则需药效学实验确定。

2 柴胡的代谢组学研究^[7]

柴胡是中医临床常用中药, 《中国药典》2010 年版规定柴胡来源于伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根, 按药材性状不同, 前者药材习称为“北柴胡”, 后者称为“南柴胡”或“红柴胡”。柴胡的功效主要为解表退热、疏肝解郁、升举阳气等。现代药理研究表明, 柴胡有解热、抗炎、镇痛、保肝等多种功效, 主治感冒发热、寒热往来、胸胁腹痛、月经不调、子宫脱垂等。柴胡植物在我国分布广泛, 因而无传统道地产区。在 20 世纪 80 年代以前, 野生柴胡资源面临枯竭, 经本课题组调查, 目前家种

柴胡的产量以甘肃为最高,其次为山西,再者为陕西,且商品以北柴胡为主。因此,柴胡药材质量均一性和差异性状况需要进行系统评价研究,以保证中医临床疗效。柴胡主要含柴胡皂苷等物质,针对其化学组成特点,本课题组采用 NMR 技术建立了柴胡药材的代谢组学分析方法,鉴定了 34 个代谢产物,包括柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b1 等次生代谢产物,以及缬氨酸、乳酸、葡萄糖等初级代谢产物,并对不同来源的 67 份柴胡药材的均一性和差异性进行了评价。对 56 份北柴胡样品和 11 份红柴胡样本的主成分(PCA)分析结果显示,北柴胡和红柴胡代谢组成明显不同。差异性分析结果显示,北柴胡中含有较多的柴胡皂苷 a、c、d,而红柴胡中含有较多的柴胡皂苷 b1、b2。由于北柴胡和红柴胡均是《中国药典》2010 年版的法定品种,因此如果北柴胡和红柴胡不加区分混用,必然对中药的临床疗效发挥产生一定影响。对于不同产地的北柴胡,其水相提取物差异不大,而有机相提取物存在一定差异,说明北柴胡药材的整体均一性较好,产地、种植方式等对其影响较小。

3 远志的代谢组学研究

远志为多年生草本植物,是远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *P. sibirica* L. 的干燥根。其性温,味苦、辛,归心、肾、肺经,具有安神益智、祛痰、消肿之功效。用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚、咳不爽、疮疡肿毒、乳房肿痛,现代药理研究表明,远志具有抗抑郁、抗老年痴呆、镇静及抗惊厥及止咳祛痰等作用。目前山西新绛及绛县和陕西合阳一带是远志的主产区和道地产区,其产量占到药材市场商品远志的 90% 以上,鉴于远志的产地较为集中,因此本研究未对不同产地的远志进行比较研究。

3.1 远志地上、地下部分的比较研究^[17]

远志的药用部位为根,在采集根后通常遗弃地上部分。为扩大地上部分的资源利用率,采用代谢组学技术对远志的地上与地下部分的化学成分进行比较研究,结果显示,与根相比,茎叶中远志咕吨酮 III、氨基酸类如缬氨酸和谷氨酸、有机酸类如琥珀酸和 γ -氨基丁酸等的量较高;而远志皂苷 onjisaponin A、K,以及 3,6'-二芥子酰基糖酯、sibiricose A₅、sibiricose A₆、tenuifoliside A、tenuifolise I、tenuifolise H 等糖酯类成分,部分初级代谢产物包括苏氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、蔗糖和腺嘌呤等的量

较低。药效学实验结果显示,远志茎叶具有明显的止咳祛痰活性,且止咳活性强于根,而祛痰活性弱于根,说明远志的止咳作用可能与咕吨酮类成分有关,而与皂苷类和糖酯类成分无关。

3.2 远志筒及木心的比较研究^[17]

按照传统经验,远志应抽取木心后入药,称远志筒。而《中国药典》2010 年版中均未规定远志抽芯后使用。本课题组对药材市场中的商品远志药材进行了调查后发现,商品远志药材规格混乱,既有远志筒(抽心远志),也有远志棍(不抽心远志)。远志筒和远志棍若不加以区分使用,必然对临床疗效的发挥产生一定影响。因此,针对远志的不同商品规格远志筒(韧皮部)和木心(木质部)进行了化学成分比较研究。基于 NMR 和 UHPLC 的代谢组学分析结果显示,远志筒和木心代谢组成存在一定差异,与远志筒相比,木心中除氨基酸类成分丙氨酸和寡糖酯类成分 tenuifolise I 外,多数代谢物的量都较低。为了保证远志临床疗效的发挥,还需对远志筒和远志棍的药效学差异进行系统研究。

3.3 制远志、蜜远志及其与生品的比较研究

生远志具有一定的不良反应,因此药用远志多为炮制品,且以制远志(甘草制)和蜜远志为主。采用代谢组学技术对远志不同炮制品与生品进行了比较研究,PCA 分析结果显示,生品、蜜制品和甘草制品分别聚为一类,说明其代谢组成明显不同,即炮制会对远志的代谢组成产生一定影响。蜜制会使远志中 tenuifolise I 和 onjisaponin A 的量升高,而 3,6'-二芥子酰基糖酯、tenuifoliside A、tenuifoliside H 和远志咕吨酮 IV 的量降低;甘草制使远志中 tenuifolise I、tenuifolise H 及 onjisaponin K 的量升高,而 3,6'-二芥子酰基糖酯、远志咕吨酮 IV 和 tenuifoliside H 的量下降。此外,远志蜜制品和甘草制品之间代谢组学也存在差异,与蜜制品相比,甘草制品中 α -葡萄糖、甲酸和 3,6'-二芥子酰基糖酯的量较低,说明不同炮制方法会对生品化学组成产生较大影响^[14]。

4 结论与讨论

4.1 代谢组学技术与指纹图谱技术具有互补性

现行的中药质量控制模式主要是有效(指标)成分的测定和指纹图谱技术,单个或几个指标成分的测定只能反映个别成分量的差异,不能从整体上反映药材之间的质量差异状况。而指纹图谱技术在提取共有峰后只能进行相似度评价,关注的是样本

之间的相似性, 由于忽略了非共有峰而无法评价不同样本之间的差异。由上述实例可以看出, 代谢组学技术不仅能反映样本之间的相似性或均一性, 而且能直观显示不同样本的聚类情况和差异性程度, 更重要的是还能确定引起组间差异的差异性成分。因此, 在中药材质量评价中, 作为一种中药研究的整体性分析技术, 代谢组学技术与指纹图谱技术具有明显的互补性。

4.2 代谢组学技术可用于中药材活性成分的快速确定

中药活性成分不仅是新药先导化合物发现的重要源泉, 也是中药质量评价的指标成分。传统的活性成分研究主要借鉴国外天然产物研究模式, 即分离得到化学单体成分后逐个进行活性测试, 或进行活性导向的追踪分离。运用该模式已阐明一部分中药的活性成分, 并建立了相应的测定方法, 明显提高了中药质量控制水平。然而, 中药所体现的治疗效果往往是多种成分作用于不同靶点的整合效应, 成分分离后彼此间的协同作用消失, 因此这种模式难以完全阐明中药的药效物质基础, 更不能确定协同作用成分。代谢组学技术以中药的整体物质组成进行化学表征和活性测试, 通过统计学的相关性分析方法确定一组与活性相关的化学成分, 再通过植物化学分离手段制备这些活性成分, 组合后进行进一步的活性验证。与传统的化学分离模式相比, 代谢组学技术可最大程度地反映中药化学成分间的协同作用, 因此, 该技术有助于中药活性成分群的快速发现。

4.3 代谢组学技术仍然存在一些亟待解决的技术问题

作为一种新型的组学技术, 代谢组学技术发展至今还不到10年时间, 其在中药材质量评价研究中的应用还有一些亟待解决的技术问题: (1) 中药的化学组成相当复杂, 全面表征中药复杂的物质组成需要多种技术的集成联用; (2) 中药代谢产物复杂多样, 代谢物结构指认难度远大于体液代谢产物, 因此, 植物代谢产物数据库的建立对于其结构指认至关重要; (3) 代谢组学技术的核心是数据的多元统计分析, 其结果的准确性依赖于数据的预处理方法和统计方法的正确选择和应用。多种分析手段将产生海量数据, 如何在数据分析中剔除冗余信息, 以及如何有效整合多种分析技术产生的多维数据, 及其预处理和统计分析均具有极大的难度, 也是今

后工作的重点。

4.4 加强中药材的代谢组学研究, 使其在中药质量评价中发挥更大作用

国内外相关工作已经证明植物代谢组学技术在中药材研究中具有较大的优势, 不仅能确定样本之间的化学差异并找出差异性成分, 而且通过与药理学差异的相关性分析能确定活性相关的化学成分。然而, 目前国内仅有少数课题组开展此类研究, 也只对少数几种中药材开展过代谢组学的探索研究。因此, 呼吁更多的中药研究者能开展中药材的代谢组学研究, 使这一技术在中药质量评价研究中发挥更大作用。

参考文献

- [1] Yang S O, Shin Y S, Hyun S H, *et al.* NMR-based metabolic profiling and differentiation of ginseng roots according to cultivation ages [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 58: 19-26.
- [2] Jiang Y, Vaysse J, Gilard V, *et al.* Phytochemical analysis. quality assessment of commercial magnoliae officinalis cortex by ¹H-NMR-based metabolomics and HPLC methods [J]. *Phytochem Anal*, 2011, doi: 10. 1002/pca. 1369.
- [3] Kim H K, Choi Y H, Erkelens C, *et al.* Metabolic fingerprint of *Ephedra* species using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(1): 105-109.
- [4] Wen H, Kang S M, Song Y G, *et al.* Differentiation of cultivation source of *Ganoderma lucidum* by NMR-based metabolomics approach [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21: 73-79.
- [5] Yuliana N D, Khatib A, Verpoorte R, *et al.* Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: A new bioactivity screening method for plants, adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* Benth. [J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 6902-6906.
- [6] Alexandre T C T, Rogelio P M, Choi Y H, *et al.* Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *Planta Med*, 2008, 74: 1295-1301.
- [7] Qin X M, Dai Y T, Liu N Q, *et al.* Metabolic fingerprinting by ¹H NMR for discrimination of two species used as *Radix Bupleuri* [J]. *Planta Med*, 2012, 78: 926-933.

- [8] Li Z Y, Zhi H J, Xue S Y, *et al.* Metabolomics profiling of the flower bud and rachis of *Tussilago farfara* with antitussive and expectorant effect on mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140: 83-90.
- [9] Zhi H J, Qin X M, Sun H F, *et al.* Metabolic fingerprinting of *Tussilago farfara* using ^1H NMR spectrometry and multivariate data analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23: 492-501.
- [10] Xue S Y, Li Z Y, Zhi H J, *et al.* Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* by GC-MS and multivariate data analysis [J]. *Biochem Systematic Ecol*, 2012, 41: 6-12.
- [11] Li Z Y, Zhi H J, Zhang F S, *et al.* Metabolomic profiling of the antitussive and expectorant plant *Tussilago farfara* L. by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 75:158-164.
- [12] 支海娟, 孙海峰, 支鹏, 等. 基于 NMR 的植物代谢组学技术研究款冬花蕾动态化学成分变化植物研究 [J]. *植物研究*, 2012, 32(4): 458-466.
- [13] 薛水玉, 王雪洁, 孙海峰, 等. 基于气质联用的款冬花蕾动态发育代谢组学特征分析 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(19): 55-61.
- [14] 王雪洁, 李震宇, 薛水玉, 等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(9): 1727-1737.
- [15] 李爱平, 李震宇, 秦雪梅. 基于核磁代谢组学技术的黄芪均一性和差异性评价 [A] // 2012 海峡两岸暨 CSNR 全国第十届中药及天然药物资源学术研讨会论文集 [C]. 兰州: 中药及天然药物资源学术研讨会, 2012.
- [16] 支海娟. 基于 NMR 款冬植物代谢组学研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012.
- [17] 王雪洁. 基于 NMR/UPLC 植物代谢组学技术的远志质量评价研究 [D]. 太原: 山西大学, 2012.