

• 药剂与工艺 •

龟龄集中细辛特殊炮制工艺的代谢组学研究

李 艺^{1,2}, 范玛莉^{1,2}, 邢 婕¹, 秦雪梅¹, 李震宇^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 探究细辛在龟龄集中入药时需用老陈醋炮制的科学内涵。**方法** 采用基于 ¹H-NMR 的代谢组学技术结合多元统计手段对细辛及米醋制细辛、老陈醋制细辛的化学成分进行比较分析。**结果** 从细辛 ¹H-NMR 图谱中认出 30 余种代谢产物; 细辛生品与 2 种醋制品可以明显分开, 米醋炮制品和老陈醋炮制品的代谢物也有明显区别。米醋制细辛和老陈醋制细辛在初级代谢产物上的化学差异大于次级代谢产物。**结论** 本研究为龟龄集的特殊炮制工艺的现代研究奠定了基础。

关键词: 龟龄集; 细辛; 老陈醋; 米醋; ¹H-NMR; 多元统计分析

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)16-2385-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.008

Metabolomic studies on special processing of *Asari Radix et Rhizoma* in GuilingjiLI Yi^{1,2}, FAN Ma-li^{1,2}, XING Jie¹, QIN Xue-mei¹, LI Zhen-yu¹

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

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To explore the underlying reasons why *Asari Radix et Rhizoma* (ARR) should be processed by Shanxi aged vinegar when used in Guilingji. **Methods** ¹H-NMR-based metabolomic approach combined with multivariate statistical analysis was used to investigate the differential chemical components among the raw and two vinegar-baked ARR. **Results** More than 30 metabolites were identified in the ¹H-NMR spectra of ARR. Raw and two vinegar-baked ARR could be separated obviously, and the rice vinegar-baked ARR and the Shanxi aged vinegar-baked ARR also differed to each other, in which the primary metabolites showed bigger difference than that of secondary metabolites. **Conclusion** This study laid a basis for the modern research of the special processing technology for Guilingji.

Key words: Guilingji; *Asari Radix et Rhizoma*; Shanxi aged vinegar; rice vinegar; ¹H-NMR; multivariate statistical analysis

龟龄集是明代嘉靖皇帝专为补羸广嗣而主持开发的丹药,因独特工艺和卓著成效而经 500 年不衰。其制作工艺尤其是炮制工序非常繁琐,各原料都有各自不同的炮制方法,如酒制、盐制、醋制、姜汁制、蜜制等^[1]。鹿茸、天雄、细辛等药材在龟龄集中入药时不同于其常规的炮制方法,需用老陈醋进行炮制,即取净药材加入陈醋浸泡闷透后共炒、蒸、煮或晒,目的在于减毒增效:醋能引药入肝,鹿茸醋制后可增强其补益肝肾的作用;天雄的醋制是为将其有毒成分转化成弱酸性盐类以降低其毒性^[2]。

细辛是临床常用中药,始载于《神农本草经》,列为上品。其性辛,温,有解表散寒、祛风止痛、通窍、温肺化饮的功效^[3-4]。已有研究报道细辛中含有挥发油、木脂素、生物碱、有机酸及脂类、氨基酸等成分^[5]。细辛一般入药为生用即洗净后切段,喷淋清水稍润后阴干,但在龟龄集中需将净制切制后的细辛在老陈醋中浸泡一宿,后晒干入药,这一特殊炮制工艺的科学内涵尚不清楚。

植物代谢组学技术借助高通量检测手段,结合多元统计对植物提取物进行全面分析,具有整体观

收稿日期: 2015-04-24

基金项目: 山西省高等学校创新人才支持计划资助项目; 山西省农业攻关科技项目 (20140311023-4); 山西省科技创新重点团队 (2013131015)

作者简介: 李 艺 (1991—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药代谢组学研究。E-mail: liysxu@163.com

*通信作者 李震宇, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药代谢组学研究。Tel: (0351)7011202 E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

的研究思路,适合对中药材等复杂体系进行分析^[6],近年来已成功用于远志^[7]、柴胡^[8]、款冬花^[9]等的化学分析比较。本研究采用基于¹H-NMR的代谢组学技术对细辛生品及老陈醋和米醋炮制品进行化学比较研究,从化学组成角度阐明细辛醋制前后以及2种醋制品的化学差异,为龟龄集特殊炮制工艺的现代研究提供依据。

1 材料与仪器

细辛药材购于太原市长城药店、仁民药店以及荣华药店,共计4个不同批次的细辛饮片,产地均为辽宁,生产批号依次为12120102(河北康派中药材有限公司)、12080101(河北康派中药材有限公司)、100508100(安国市祁澳中药饮片有限公司)、121203(安国市祁澳中药饮片有限公司)。样品经山西大学秦雪梅教授鉴定为马兜铃科植物北细辛 *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* Kitag 的根,标本保存在山西大学中医药现代研究中心。炮制用醋为米醋(统万珍极食品有限公司,生产批号20131218)和山西老陈醋(山西水塔醋业股份有限公司,生产批号20130512)。

NMR试剂重水, Norell, Landisville, 美国; 氘代甲醇、氘代氯仿, 质量分数99.8%, 德国 Merck 公司; 氘代氢氧化钠, 瑞士 Armar 公司; 三甲基硅烷丙酸钠盐(TSP), Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA, 美国; 四甲基硅烷(TMS), 德国 Merck 公司。KQ5200E 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; RE-52A 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; Bruker 600 MHz Avance III NMR Spectrometer, 600.13 MHz 质子频率, 德国布鲁克公司 600 MHz 核磁仪; SC-3610 低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; TGL-16 高速台式冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; pH 计, 奥豪斯仪器有限公司。

2 方法

2.1 食醋的核磁共振分析

首先对炮制所用的米醋和山西老陈醋进行初步¹H-NMR化学分析,以明确不同炮制用醋对细辛醋制成分的影响。实验方法:取食醋样品30 mL,用NaOH溶液(1 mol/L)调pH值至7.0,置于超声中进行15 min的脱气处理;取脱气后的食醋样品600 μ L,加入含0.05% TSP的重水溶液100 μ L,转移到5 mm标准核磁管;样品于600 MHz NMR (25 $^{\circ}$ C) 仪上测定,采用 noesygppr1d 脉冲序列,扫描

次数为64,谱宽12 345.679 Hz,脉冲时间14 μ s,采样时间2.654 s,延迟时间1.0 s,采样数据点共65 536, FID 分辨率0.188 Hz,采样间隔40.5 μ s,内标为TSP。

2.2 细辛的核磁共振分析

2.2.1 细辛醋制 细辛的醋制参照龟龄集中的炮制方法,取细辛饮片50 g,加食醋10 g拌匀,密封闷润10 h后,晒干即得。

2.2.2 样品制备 参照本课题组建立的方法^[7]进行核磁样品制备。分别称取粉碎后的细辛、老陈醋制细辛、米醋制细辛样品粉末200 mg,置于10 mL离心管中,加入蒸馏水和甲醇各1.5 mL、氯仿3 mL,加盖涡旋混匀1 min,超声提取25 min,室温下离心(3 500 r/min)25 min,分别移取上、下层清液至25 mL圆底烧瓶中,减压浓缩蒸干。测定前用NMR试剂溶解,其中氯仿相部分用CDCl₃ 600 μ L溶解,转移至5 mm核磁管中待测;甲醇水相部分取氘代甲醇400 μ L与重水缓冲液(KH₂PO₄溶于D₂O中,以1 mol/L 氘代氢氧化钠溶液调节pH值至6.0,含0.05% TSP)400 μ L溶解,转移至1.5 mL离心管中,离心(13 000 r/min)10 min,取上清液600 μ L于5 mm核磁管中待测。每批样品平行制备2份。

2.2.3 ¹H-NMR 测定及条件 样品在25 $^{\circ}$ C下于600 MHz NMR 仪上测定,测定频率为600.13 MHz,扫描次数为64,谱宽12 345.679 Hz,脉冲时间14 μ s,采样时间2.654 s,延迟时间1.0 s,采样间隔40.5 μ s,相位调节、基线调节及峰校正均为手动。甲醇水相提取物核磁测定采用 noesyppr1d 序列压制水峰,用氘代甲醇进行锁场,内标为TSP。氯仿相提取物核磁测定采用 zg30 序列,用氘代氯仿锁场,内标为TMS。

2.2.4 数据分析 核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙)进行处理。甲醇水相部分以 δ 0.04步长对化学位移区间 δ 0.70~9.50进行分段积分,其中 δ 4.62~5.06(残余水峰)和 δ 3.30~3.38(残余甲醇峰)不进行积分,氯仿相部分以 δ 0.04步长对化学位移区间 δ 0.58~13.22进行分段积分,其中 δ 7.22~7.30(残余氯仿峰)不进行积分。

将积分数据导入SIMCA-P 13.0(Umetrics, 瑞典)软件中进行主成分分析(principal component analysis, PCA),再用偏最小二乘法判别分析(partial

least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal PLS-DA, OPLS-DA) 找出样品间差异代谢产物, 并对差异成分进行 One-Way ANOVA 分析。

3 结果

3.1 代谢物指认

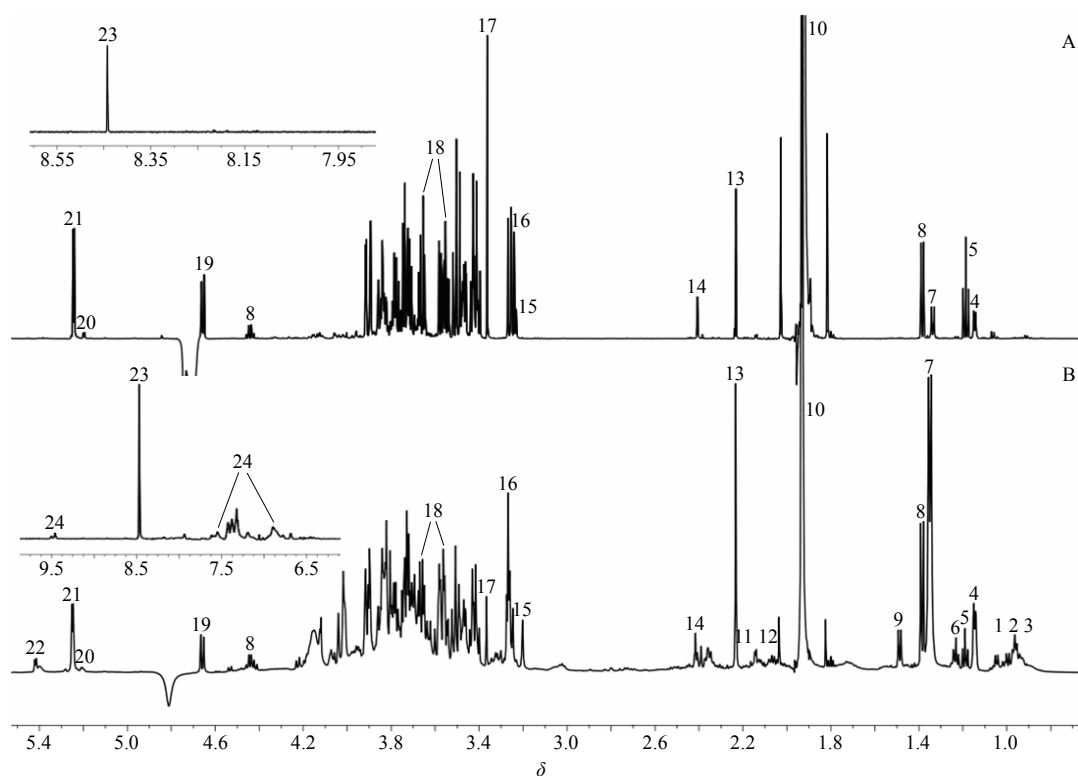
3.1.1 食醋代谢物指认 首先对炮制所用的米醋和山西老陈醋进行初步 $^1\text{H-NMR}$ 化学分析, 以明确不同炮制用醋对细辛醋制成分的影响 (图 1), 通过化学位移、耦合常数、峰形等信息, 并结合文献数据对照^[10], 从米醋和山西老陈醋中辨认出 24 个化合物, 包括氨基酸、有机酸、糖类等。米醋和老陈醋的化学成分存在差异, 山西老陈醋中含有较多的氨基酸成分, 如异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸等。

3.1.2 细辛生品及 2 种醋制品 $^1\text{H-NMR}$ 分析 分别对细辛生品及其 2 种醋制品进行 $^1\text{H-NMR}$ 分析 (图 2 和 3, 以批号为 12080101 的细辛的提取物核磁图谱为代表), 通过对照品比对、文献报道数据^[5,11-13]

以及 BMRB (<http://bmr.b.wisc.edu/>) 数据库中的标准物质对照, 从细辛及其醋制品核磁图谱中共辨认出 31 个代谢产物 (表 1), 其中初级代谢产物有 24 种, 次级代谢产物有 7 种。甲醇水相中主要为高极性成分, 图谱大致可以分为 3 个区域, 高场端 (δ 3.10~1.00) 化合物类型为氨基酸和有机酸, 如亮氨酸、苏氨酸、精氨酸、乳酸、琥珀酸等, δ 5.50~3.10 区域主要为葡萄糖、蔗糖以及胆碱等物质的峰, δ 9.50~5.50 是芳香区, 指认的化合物主要包括腺苷、尿嘧啶、葫芦巴碱 (图 2)。氯仿相中大部分是低极性成分, 主要为脂肪酸和细辛的次级代谢产物, 包括 *L*-细辛脂素、*L*-芝麻脂素、甲基丁香酚、卡枯醇等。

3.2 多元统计分析

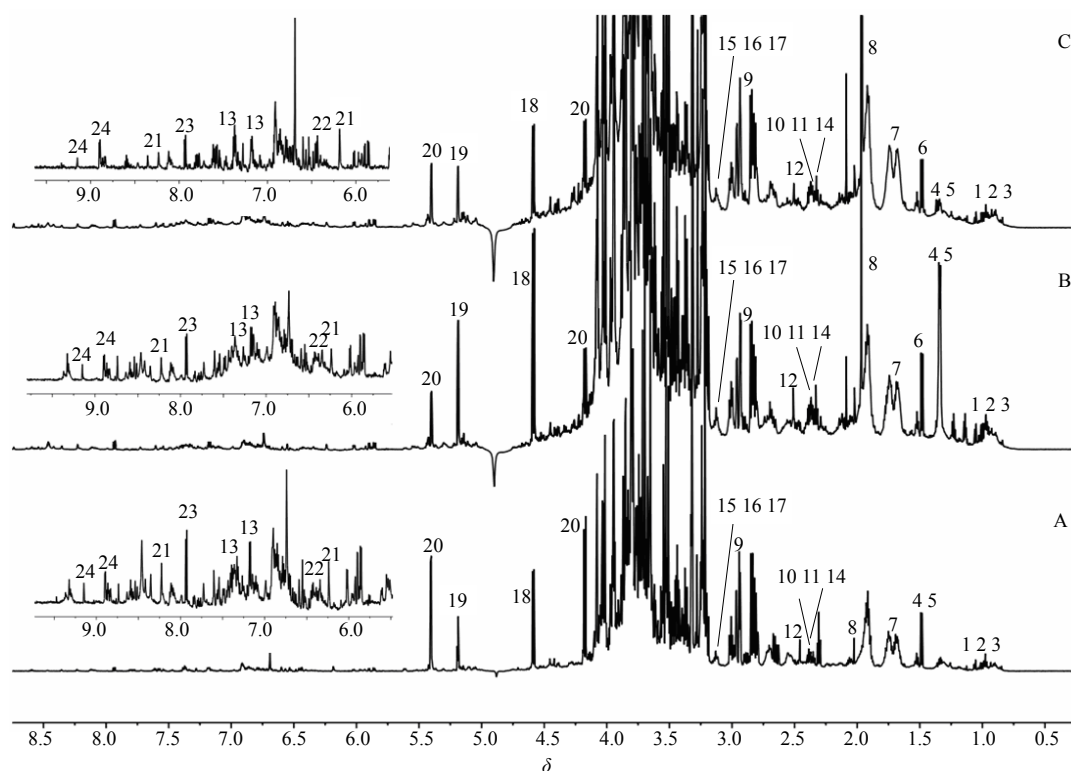
$^1\text{H-NMR}$ 图谱可以提供大量的指纹信息, 但直观分析显示细辛生品及其醋制品化学差异不太明显。因此, 需借助多元统计方法对数据进行深入分析来准确揭示细辛醋制后的化学变化。OPLS-DA 在



1-异亮氨酸 2-亮氨酸 3-缬氨酸 4-3-羟基丁酸 5-乙醇 6-醋酸乙酯 7-苏氨酸 8-乳酸 9-丙氨酸 10-乙酸 11-谷氨酸 12-谷氨酰胺 13-丙酮酸 14-琥珀酸 15-胆碱 16-磷酸胆碱 17-环己醇 18-甘油 19-β-葡萄糖 20-乳糖 21-α-葡萄糖 22-蔗糖 23-甲酸 24-乙酰羟甲基糠醛
1-isoleucine 2-leucine 3-valine 4-3-hydroxybutyrate 5-ethanol 6-ethyl acetate 7-threonine 8-lactic acid 9-alanine 10-acetic acid 11-glutamate 12-glutamine 13-pyruvate 14-succinic acid 15-choline 16-phosphorylcholine 17-inositol 18-glycerin 19-β-glucose 20-lactose 21-α-glucose 22-sucrose 23-formate 24-hydroxymethylfurfural

图 1 米醋 (A) 和山西老陈醋 (B) $^1\text{H-NMR}$ 图谱指认

Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of rice vinegar (A) and Shanxi aged vinegar (B)



各峰号所代表的成分同表1, 下图同

The keys for metabolites are given in Table 1, same as below

图2 生品细辛 (A)、米醋制细辛 (B) 和老陈醋制细辛 (C) 甲醇-水相提取物 ^1H -NMR 图谱指认

Fig. 2 ^1H -NMR spectra of aqueous methanol extracts from raw ARR (A), rice vinegar-baked ARR (B), and Shanxi aged vinegar-baked ARR (C)

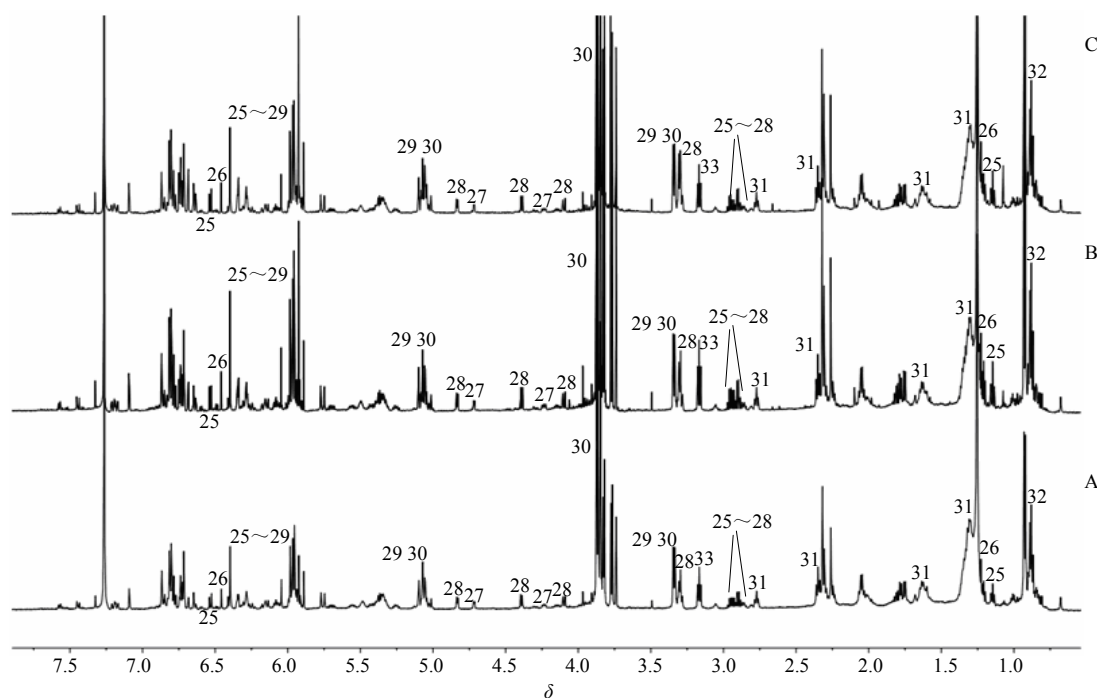


图3 生品细辛 (A)、米醋制细辛 (B) 和老陈醋制细辛 (C) 氯仿相提取物 ^1H -NMR 图谱指认

Fig. 3 ^1H -NMR spectra of chloroform extracts in raw ARR (A), rice vinegar-baked ARR (B), and Shanxi aged vinegar-baked ARR (C)

表 1 细辛中主要化合物的 ¹H-NMR 图谱数据归属
Table 1 ¹H-NMR assignments of major metabolites in ARR

编号	成分	δ	来源
1	亮氨酸	0.97 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz)	A&R&S (M-W)
2	异亮氨酸	0.93 (t, <i>J</i> = 7.8 Hz), 1.03 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	A&R&S (M-W)
3	缬氨酸	1.01 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.06 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	A&R&S (M-W)
4	苏氨酸	1.33 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	A&R&S (M-W)
5	乳酸	1.36 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz), 4.40 (q, <i>J</i> = 6.6 Hz)	A&R&S (M-W)
6	丙氨酸	1.49 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz), 3.74 (m)	A&R&S (M-W)
7	精氨酸	1.68 (m), 1.74 (m), 1.90 (m), 3.24 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz)	A&R&S (M-W)
8	天冬酰胺	2.83 (dd, <i>J</i> = 17.4, 8.4 Hz), 2.95 (dd, <i>J</i> = 16.8, 4.2 Hz)	A&R&S (M-W)
9	乙酸	1.95 (s)	A&R&S (M-W)
10	谷氨酸	2.15 (m), 2.37 (m)	A&R&S (M-W)
11	谷氨酰胺	2.20 (m), 2.37 (m)	A&R&S (M-W)
12	琥珀酸	2.46 (s)	A&R&S (M-W)
13	苯基丙氨酸	7.33 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 7.40 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz)	A&R&S (M-W)
14	γ-氨基丁酸	3.01 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz), 2.31 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz)	A&R&S (M-W)
15	胆碱	3.19 (s)	A&R&S (M-W)
16	磷酸胆碱	3.20 (s)	A&R&S (M-W)
17	甘油磷酸胆碱	3.22 (s)	A&R&S (M-W)
18	β-葡萄糖	4.59 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz)	A&R&S (M-W)
19	α-葡萄糖	5.19 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz)	A&R&S (M-W)
20	蔗糖	5.41 (d, <i>J</i> = 3.6 Hz), 4.17 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	A&R&S (M-W)
21	腺苷	6.02 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 8.24 (s), 8.35(s)	A&R&S (M-W)
22	马来酸	6.19 (s)	A&R&S (M-W)
23	尿嘧啶	5.86 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz), 5.90 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz) 7.93 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	A&R&S (M-W)
24	葫芦巴碱	8.08 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz), 8.86 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 8.85 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 9.15 (s)	A&R&S (M-W)
25	2-甲氧基-4,5-亚甲二氧苯丙酮	1.15 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz), 3.85 (s), 6.54 (s)	A&R&S (C)
26	卡枯醇	1.24 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz), 6.45 (s), 13.12 (s)	A&R&S (C)
27	L-芝麻脂素	4.23 (dd, <i>J</i> = 9.0, 6.6 Hz), 4.71 (d, <i>J</i> = 4.2 Hz), 5.93 (s)	A&R&S (C)
28	L-细辛脂素	3.3 (m), 4.1 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz), 4.4 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz), 4.83 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz)	A&R&S (C)
29	黄樟素	3.33 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 5.02~5.08 (m), 5.92(m)	A&R&S (C)
30	甲基丁香酚	3.33 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz), 3.86 (s), 3.87 (s), 5.02~5.08 (m)	A&R&S (C)
31	脂肪酸	1.28~1.38, 1.6, 2.05, 2.34 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz), 2.77 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz), 5.35	A&R&S (C)
32	未知物 1	0.92 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz)	A&R&S (C)
33	未知物 2	3.16 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz)	A&R&S (C)

A-生品细辛 R-米醋制细辛 S-老陈醋制细辛 M-W-甲醇-水相提取物 C-氯仿相提取物

A-raw ARR R-rice vinegar-baked ARR S-Shanxi aged vinegar-baked ARR M-W-aqueous methanol extracts C-chloroform extracts

PCA 的基础上将与 *Y* 矩阵相关的 *X* 矩阵和与 *Y* 矩阵无关的 *X* 矩阵加以区分并将无关的 *X* 变量加以滤除, 从而更好地地区分组间差异, 提高模型的有效性和解析能力。

3.2.1 细辛生品及其 2 种醋制品差异分析 进行

OPLS-DA 分析之前需对相应的 PLS-DA 模型进行验证, 本研究中生品细辛、米醋制细辛、老陈醋制细辛 3 者比较的 PLS-DA 模型验证成立。从图 4 可见, PLS-DA 模型排列实验中左端随机排列 *y* 变量产生的 R^2 、 Q^2 值均小于右端的原始值 (其中, R^2

和 Q^2 值分别表示在随机化 y 变量模型下对数据的解释程度和对模型的预测能力), 证明模型有效, 可以进行后续分析。OPLS-DA 模型 CV-ANOVA 验证的 P 值小于 0.05 (水相 $P=2.22 \times 10^{-6}$, 有机相 $P=0.008$), 说明 3 者间的差异具有统计学意义。图 5 为细辛及其 2 种醋制品的 OPLS-DA 得分散点图。

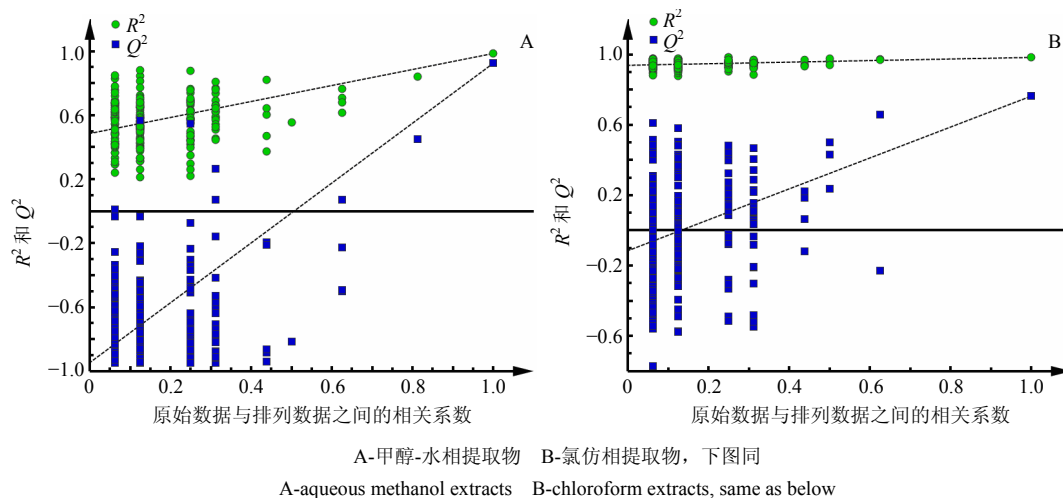


图4 生品细辛、米醋制细辛和老陈醋制细辛 $^1\text{H-NMR}$ 谱 PLS-DA 模型验证图

Fig. 4 PLS-DA model validation of ARR, rice vinegar-baked ARR, and Shanxi aged vinegar-baked ARR based on $^1\text{H-NMR}$ data

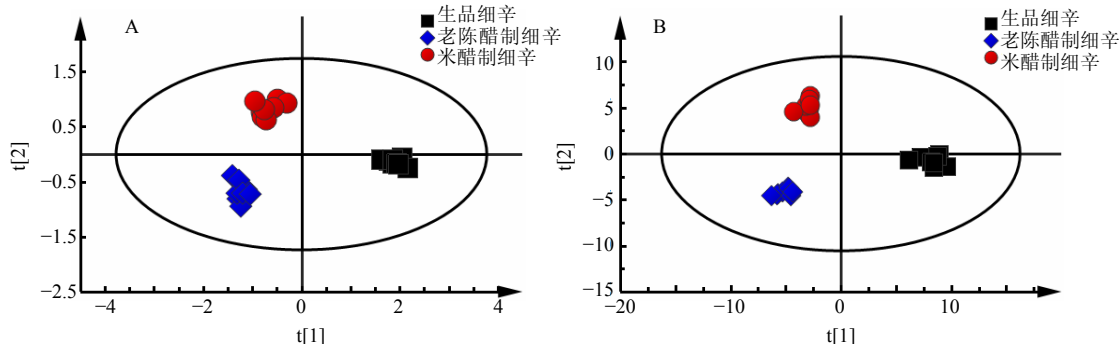


图5 生品细辛、米醋制细辛和老陈醋制细辛 $^1\text{H-NMR}$ 谱 OPLS-DA 散点图

Fig. 5 OPLS-DA Score plots based on $^1\text{H-NMR}$ data of ARR, rice vinegar-baked ARR, and Shanxi aged vinegar-baked ARR

3.2.2 细辛醋制前后化学成分变化分析 由于 2 组醋制品之间的差异小于与生品的差异, 因此将生品和炮制品分别作为一组, 利用有监督的 OPLS-DA (排列实验显示 PLS-DA 模型成立, 图 6) 来确定细辛醋制前后的化学成分变化。图 7-A1 和 B1 为细辛醋制前后 OPLS-DA 得分散点图 (水相 $R^2=0.746$, $Q^2=0.910$, $P=7.53 \times 10^{-6}$; 有机相 $R^2=0.844$, $Q^2=0.752$, $P=0.006$), 通过相应的 S-plot 图 (图 7-A2 和 B2) 与变量权重重要性排序 (variable importance in projection, VIP) 值结合分析确定, 细辛经过醋制后苏氨酸、谷氨酸、丙氨酸、乳酸、琥珀酸的量

甲醇-水相的散点图中生品细辛位于右侧, 细辛的米醋炮制品位于左上方, 细辛的老陈醋炮制品位于左下方, 说明醋制后细辛中的化学成分发生了明显变化; 2 种醋制品的距离小于二者与生品的距离, 说明 2 种醋制品也存在一定化学差异。有机相散点图的分组聚类结果与水相一致。

增加, 蔗糖、天冬酰胺以及脂肪酸的量下降; 氯仿相核磁图谱 δ 5.98~5.95 是细辛苯丙素类成分亚甲二氧基 (OCH_2O) 的特征峰, δ 5.02~5.08 是甲基丁香酚和黄樟素的特征峰, 由 S-plot 图可以看出这类成分的总量在醋制细辛中呈现上升趋势。

3.2.3 2 种醋制细辛的化学成分差异比较 图 8-A1 和 B1 为米醋制细辛与老陈醋制细辛 OPLS-DA 得分散点图 (水相 $R^2=0.897$, $Q^2=0.937$, $P=0.006$; 有机相 $R^2=0.912$, $Q^2=0.928$, $P=0.002$), 相应的 S-Plot (图 8-A2 和 B2) 与 VIP 值相结合分析显示老陈醋制细辛中亮氨酸、丙氨酸、乳酸、苏氨酸的

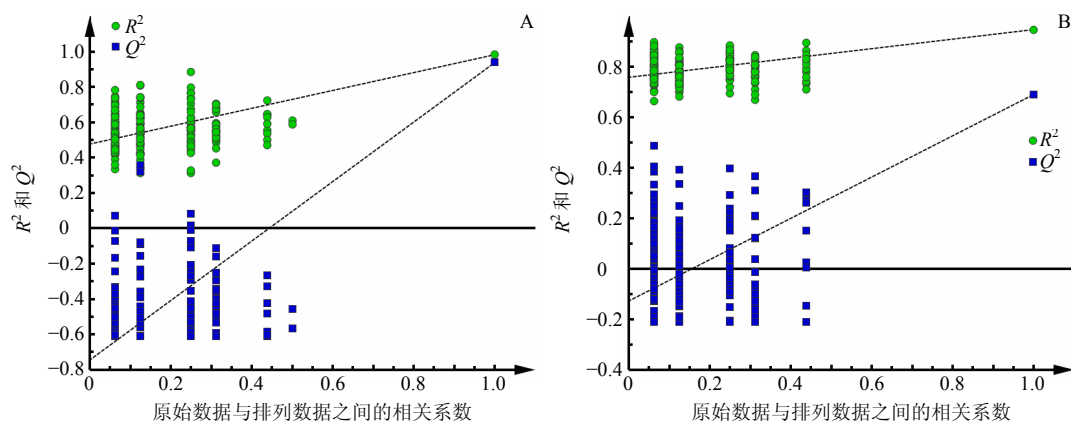


图6 生品细辛和醋制细辛 ¹H-NMR 谱 PLS-DA 模型验证图

Fig. 6 PLS-DA model validation of ARR and vinegar-baked ARR based on ¹H-NMR data

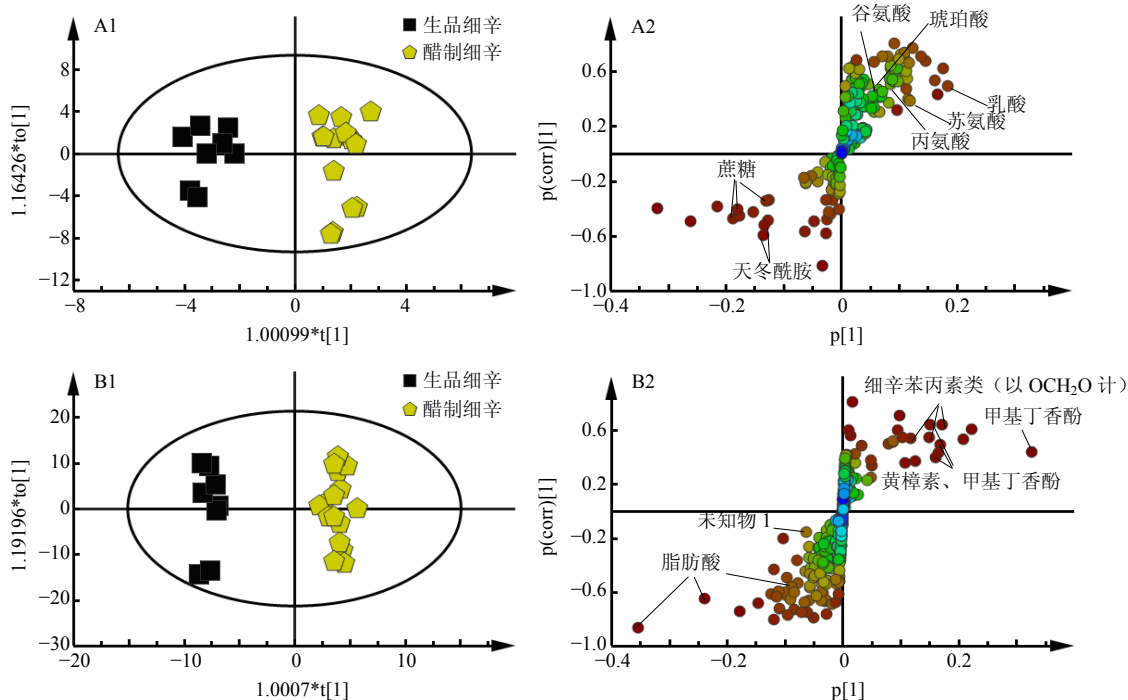


图7 生品细辛和醋制细辛 ¹H-NMR 谱 OPLS-DA 散点图 (1) 及 S-plot 载荷图 (2)

Fig. 7 OPLS-DA score plots (1) and loading S-plot (2) of ARR and vinegar-baked ARR based on ¹H-NMR data

量较高, 而米醋制细辛中含有较多的蔗糖、葫芦巴碱、甲基丁香酚以及细辛苯丙素类次级代谢产物(以 OCH_2O 计)。

3.2.4 差异代谢物单变量分析 核磁图谱的积分面积可以反应物质的相对含量, 因此对上述差异成分及内标 TSP 或者 TMS 进行手动积分, 然后运用 GraphPad PRISM 5.01 软件对差异成分进行单变量分析, 结果见图 9, 与多元统计结果基本一致。

综上, 与生品相比, 细辛醋制后部分化学成分的量有所升高, 如谷氨酸、丙氨酸、琥珀酸及细辛苯丙素类成分(以 OCH_2O 计)的总量; 而部分成分的量下降, 如蔗糖、天冬酰胺、葫芦巴碱以及脂

肪酸。此外, 米醋制细辛与老陈醋制细辛的代谢物也有明显区别。与米醋制细辛相比, 老陈醋制细辛中亮氨酸、丙氨酸、乳酸、苏氨酸、琥珀酸的量较高, 蔗糖、葫芦巴碱、天冬酰胺及次级代谢产物 *L*-细辛脂素的量较低, 说明醋的种类对细辛的醋制有一定影响。

4 讨论

本研究采用基于 ¹H-NMR 的代谢组学技术分析细辛生品及其两种醋制品的化学差异, 结果表明, 细辛醋制后化学组成有较大的改变, 体现在部分初级代谢产物和次级代谢产物的量都发生了明显变化。龟龄集的制法中指出细辛的醋制要用老陈醋,

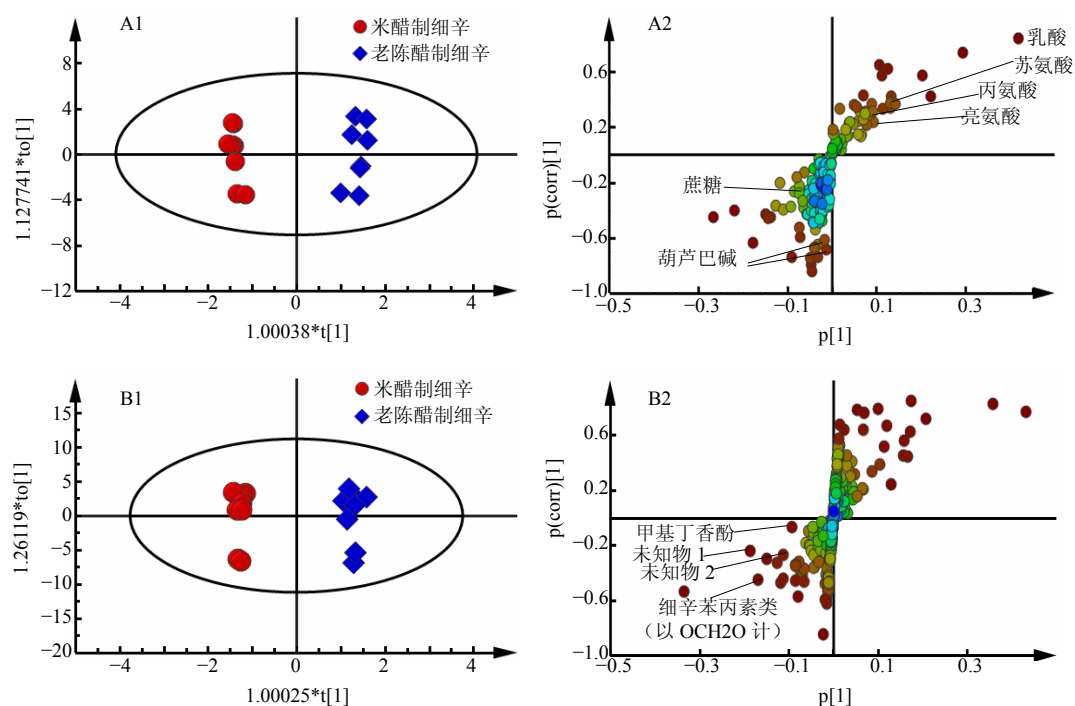


图8 米醋制细辛和老陈醋制细辛 ^1H -NMR 谱 OPLS-DA 散点图 (1) 及 S-plot 载荷图 (2)

Fig. 8 OPLS-DA score plots (1) and loading S-Plot (2) of rice vinegar-baked ARR and Shanxi aged vinegar-baked ARR based on ^1H -NMR data

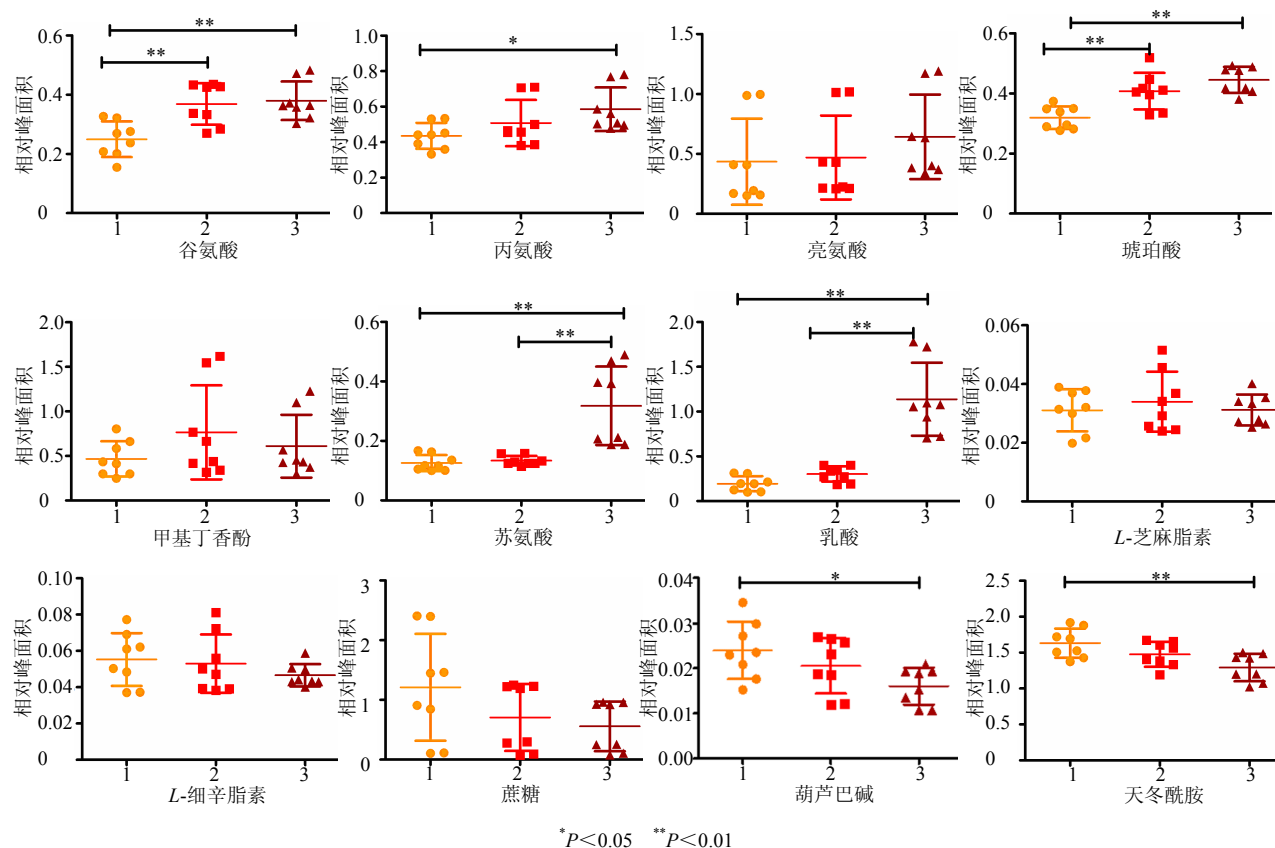


图9 生品细辛 (1)、米醋制细辛 (2) 和老陈醋制细辛 (3) 中的差异代谢物比较

Fig. 9 Quantification of metabolites indentified from raw ARR (1), rice vinegar-baked ARR (2), and Shanxi aged vinegar-baked ARR (3)

本研究结果显示,细辛的老陈醋炮制品和米醋炮制品同样存在显著的化学差异,其中2者在初级代谢产物上的差异大于在次级代谢物上的差异。老陈醋炮制后的细辛中苏氨酸、亮氨酸、丙氨酸等氨基酸的量,以及乳酸、琥珀酸等有机酸的量高于米醋制细辛,原因可能在于老陈醋中含有较多的这类成分。老陈醋炮制后的细辛中这些初级代谢物的变化与细辛在龟龄集中功效发挥的关系值得进一步深入研究。对于次级代谢产物,老陈醋制细辛与米醋制细辛差异主要体现在L-细辛脂素的量,文献报道L-细辛脂素有抗病毒和抗结核杆菌以及免疫调节的作用^[14-15]。但老陈醋炮制后的细辛中L-细辛脂素的量降低幅度更大的原因也还需进一步结合细辛在龟龄集组方中的作用深入研究。此外,细辛中含有肾毒性成分马兜铃酸类成分^[16],由于核磁共振灵敏度较低,本研究中未检测到该类成分,老陈醋炮制是否有助于降低细辛中的这类成分,需要进一步采用液质联用等手段进行分析。对于挥发性成分,则需采用气质联用进一步分析。

龟龄集不仅对中枢神经系统有保护作用,还有调补阳气、强身健脑、补精益髓等功效。对龟龄集的现代研究多集中于药理方面^[17-19],其特殊的炮制工艺,尤其是其特殊的醋制工艺研究较少。中药的成分复杂,醋制引起的化学成分变化同样复杂。植物代谢组学能从整体上系统分析样本间的化学差异,因此适合中药特殊炮制工艺的科学内涵研究。本研究初步探讨了老陈醋炮制细辛的化学变化,为龟龄集的现代炮制研究提供了一定参考。

参考文献

- [1] 程志立,柳惠武,宋歌,等. 龟龄集传统制作工艺与炼丹术 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2097-2100.
- [2] 王若晴. 龟龄集制药工艺及其保护传承研究 [D]. 太原: 山西大学, 2014.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 贾超,刘风云,赵怀清. 细辛的研究进展 [J]. 中南药学, 2009, 7(5): 366-368.
- [5] 吕帅. 辽细辛地下部分化学成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [6] 李震宇,李爱平,张福生,等. 植物代谢组学技术在山西道地药材研究中的应用 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 785-789.
- [7] 王雪洁,李震宇,薛水玉. 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.
- [8] Qin X M, Dai Y T, Liu N Q, et al. Metabolic fingerprinting by ¹H NMR for discrimination of the two species used as *Radix Bupleuri* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(9): 926-933.
- [9] 米霞,李震宇,秦雪梅,等. 基于NMR代谢组学技术的不同性状款冬花药材的化学比较 [J]. 药学学报, 2013, 48(11): 1692-1697.
- [10] 李爱平,李震宇,邢婕,等. 核磁共振代谢组学技术检测食醋化学成分 [J]. 食品科学, 2013, 34(12): 247-253.
- [11] 杨志玲,蒋梅香,李福双,等. 城南细辛的化学成分研究 (II) [J]. 中药材, 2006, 29(2): 130-132.
- [12] Perumalsamy H, Jung M Y, Hong S M, et al. Growth-inhibiting and morphostructural effects of constituents identified in *Asarum heterotropoides* root on human intestinal bacteria [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13: 245. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/245>.
- [13] 蔡少青,王禾. 北细辛非挥发性化学成分的研究 [J]. 北京医科大学学报, 1996, 28(3): 228-230.
- [14] 黄蛟,易进海,刘玉红,等. 炒制对细辛中黄樟醚、甲基丁香酚和细辛脂素含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 90-92.
- [15] 张丽丽,关振中,张竞逵. 细辛脂素体外免疫抑制作用的实验研究 [J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(6): 444-447.
- [16] 臧埔,武晓琳,郜玉钢,等. 不同产地细辛有效成分与毒性成分的比较研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(4): 416-421.
- [17] 任占川,杨迎春,田林. 龟龄集对大鼠小脑皮质和脊髓前角内突触小泡蛋白变化的影响 [J]. 解剖学研究, 2014, 36(6): 433-435.
- [18] 王红梅,王世民. 龟龄集对实验性高胰岛素血症的影响 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(6): 5-7.
- [19] 刘亚明,牛欣,冯前进,等. 龟龄集抗衰老作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2004, 19(2): 10-11.