

基于 NMR 代谢组学技术的白芍与赤芍化学成分比较研究

范玛莉, 邢 婕, 李震宇*, 秦雪梅*

山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: 目的 比较白芍与赤芍的化学组成差异, 为其质量控制提供研究依据。方法 采用 ^1H -NMR 代谢组学技术对白芍与赤芍进行分析, 通过多元统计方法找出其化学差异成分, 并分析差异成分之间的相关性。结果 白芍与赤芍核磁共振指纹图谱中共指认出了代谢物 32 种, 多元统计分析显示白芍与赤芍可明显区分, 白芍中精氨酸、苏氨酸、乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、柠檬酸、丁二酸、乳酸、芍药内酯苷、6-O-没食子酰白芍苷、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖以及没食子酸的量较高, 而赤芍中丙氨酸、 α -葡萄糖、蔗糖、芍药苷、儿茶素、 β -谷甾醇、脂肪酸以及丹皮酚的量较高。此外, 二者差异成分之间的相关系数也存在较大差异。结论 本研究从整体化学组成上比较了白芍与赤芍的差异, 不仅为白芍、赤芍质量标准研究提供了一种新思路, 而且为其功效与化学成分的相关性研究提供依据。

关键词: 白芍; 赤芍; NMR 代谢组学; 多元统计分析; 相关性分析; 芍药内酯苷; 丙氨酸

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)22-3230-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.004

Comparison on chemical constituents between *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix* using NMR based metabolomic approach

FAN Ma-li, XING Jie, LI Zhen-yu, QIN Xue-mei

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

Abstract: Objective To compare the chemical constituents of *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix*, and to provide a basis for quality evaluation. **Methods** NMR-based metabolomic approach combined with multivariate statistical analysis was used to investigate the differential metabolites between *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix*. **Results** Thirty-two metabolites were identified in the ^1H -NMR spectra, and the multivariate statistical analysis showed that *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix* could be separated clearly. *Paeoniae Alba Radix* contained more arginine, threonine, acetic acid, aspartic acid, glutamine, GABA, citric acid, succinate, lactate, albiflorin, 6-O-galloyl albiflorin, 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose, and gallic acid, while *Paeoniae Rubra Radix* contained more alanine, α -glucose, sucrose, paeoniflorin, catechin, β -sitosterol, fatty acid, and paeonol. In addition, the Pearson correlations between differential metabolites of *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix* also showed apparent differences. **Conclusion** The results reveal the chemical differences between *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix* in a holistic way, and provide a scientific basis for assessing the quality of *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix*, as well as the correlations between the chemical constituents and pharmacological efficacy.

Key words: *Paeoniae Alba Radix*; *Paeoniae Rubra Radix*; NMR metabolomic approach; multivariate statistical analysis; correlation analysis; albiflorin; alanine

芍药是我国中医临床常用中药材, 历史悠久, 应用广泛, 有白芍与赤芍之分。其中白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根; 赤芍为毛茛科植物芍药或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根^[1]。

白芍主产于安徽、浙江等地, 主要为栽培品, 置沸水中煮后除去外皮或去皮后再煮, 晒干而得。而赤芍主产于内蒙古多伦县附近, 其多为野生品, 以生品入药^[2]。赤芍、白芍来源相近甚至相同, 但临床上

收稿日期: 2014-06-06

基金项目: 山西省科技创新重点团队 (2013131015); 山西省高等学校创新人才支持计划

作者简介: 范玛莉 (1990—), 女, 在读硕士, 研究方向为食品及中药代谢组学研究。E-mail: 249205013@qq.com

*通信作者 李震宇 (1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为食品及中药代谢组学研究。E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

秦雪梅 (1964—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药质量标准及代谢组学研究。E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

却不可混用，白芍、赤芍同为寒性药，具有清热的共性，但白芍属补虚药，长于补血平抑肝阳；赤芍属清热药，功偏清热凉血祛瘀^[2-3]。

近年来的化学研究表明，白芍和赤芍中主要成分是单萜苷及多元酚类化合物。单萜苷类主要包括芍药苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、羟基芍药苷、苯甲酰羟基芍药苷等，多元酚类化合物则包括多种没食子酰葡萄糖、丹皮酚等^[4-6]。对于两者的化学差异，有文献以芍药苷、芍药内酯苷、丹皮酚等指标采用 HPLC 定量测定方法或液相指纹图谱进行了比较，结果显示白芍中芍药内酯苷、芍药苷亚硫酸酯等较多，而赤芍中芍药苷、丹皮酚等较多^[7-10]。

植物代谢组学技术是以组群指标分析为基础，以高通量检测和数据处理为手段，具有整体观的研究思路。基于核磁共振的代谢组学技术近年来开始广泛地应用于中药材的质量分析，如款冬^[11]、柴胡^[12]、远志^[13]、人参^[14]等。相对于液相色谱，核磁共振的优势体现在可以检测大部分的有机化合物，尤其适合于无紫外吸收或色谱柱上不保留的化合物，此外，

核磁共振指纹中的化学位移、耦合常数、峰型等可以给出药材样品的化学结构信息；另外，代谢组学技术与多元统计分析手段结合不仅可以确定样本之间的相似性或均一性，而且可以确定引起组间差异的化学成分。因此，在中药材质量评价与分析中，作为一种整体性分析技术，核磁共振代谢组学分析是液相色谱指纹图谱的有力补充^[15]。

本研究拟采用基于 NMR 代谢组学技术建立白芍与赤芍的核磁共振指纹图谱，并采用多元统计分析技术从整体上阐明白芍与赤芍的化学成分差异，为白芍与赤芍的质量控制及功效与化学成分的相关性研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究收集的白芍和赤芍样品见表 1，每批样品平行备样 2 份。样品经山西大学秦雪梅教授鉴定，赤芍和白芍分别为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 未去皮和经去皮水煮后的干燥根，标本保存在山西大学中医药现代研究中心。

表 1 白芍与赤芍样品

Table 1 Samples of *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix*

编号	产地	批号	厂家	编号	产地	批号	厂家
1	安徽亳州	无	无	7	内蒙古	20130707	安徽盛海堂中药饮片有限公司
2	安徽亳州	无	无	8	内蒙古	20130707	安徽盛海堂中药饮片有限公司
3	安徽亳州	130801	安徽亳州京皖中药饮片厂	9	内蒙古	130504006	北京仟草中药饮片有限公司
4	安徽亳州	130801	安徽亳州京皖中药饮片厂	10	内蒙古	130504006	北京仟草中药饮片有限公司
5	安徽亳州	130901	安徽亳州京皖中药饮片厂	11	内蒙古	20130301	安徽盛海堂中药饮片有限公司
6	安徽亳州	130901	安徽亳州京皖中药饮片厂	12	内蒙古	20130301	安徽盛海堂中药饮片有限公司

1.2 仪器与试剂

Bruker 600-MHz AVANCE III NMR Spectrometer (600.13 MHz 质子频率，德国布鲁克公司 600 兆核磁仪)。超声波清洗器 (KQ5200E，昆山市超声仪器有限公司)，旋转蒸发仪 (RE—52A，上海亚荣生化仪器厂)，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，分析纯甲醇，分析纯氯仿，娃哈哈纯净水，NMR 试剂：重水 (Norell，Landisville 公司，美国)，氘代甲醇、氘代氯仿 (99.8%，Merck 公司，德国)，氘代氢氧化钠 (Armar 公司，瑞典)，三甲基硅烷丙酸钠盐 (TSP，Cambridge Isotope Laboratories Inc.，MA)。

1.3 核磁样品制备

参照文献报道^[16]方法进行供试品制备。精密称

取液氮研磨后的芍药样品粉末各 200 mg，置于 10 mL 离心管中，分别加蒸馏水及甲醇各 1.5 mL，氯仿 3 mL，漩涡混匀 1 min，超声提取 25 min，室温下离心 (3 500 r/min) 25 min，提取液分为 2 层 (上层为水溶性部分即甲醇水相，下层为氯仿相)，用移液枪分别转移至 25 mL 圆底烧瓶中，减压浓缩蒸干。于测定前用 NMR 试剂溶解，其中甲醇水相层用氘代甲醇 400 μ L 与缓冲重氘水 (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 0.1% TSP) 400 μ L 溶解，溶解液分别转移至 1.5 mL 离心管中，离心 (13 000 r/min) 10 min，移取上清液 600 μ L 于 5 mm 核磁管中待测，而氯仿相部分用氘代氯仿 600 μ L 溶解，直接转移到 5 mm 核磁管中待测。

1.4 $^1\text{H-NMR}$ 测定及条件

样品在 25 °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, 傅里叶变换 0.188 Hz, 脉冲间隔 D1 为 1 s, 延迟时间为 5.0 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。

1.5 数据分析

核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Spain) 进行处理。核磁图谱经过定标、相位、基线校准后, 以 δ 0.04 积分段对化学位移区间进行分段积分。甲醇水相核磁图谱中对化学位移 δ 0.74~8.94 进行分段积分, 其中 δ 4.80~5.06 (残余水峰) 和 δ 3.30~3.34 (残余甲醇峰) 不进行积分, 氯仿相核磁图谱中对化学位移 δ 0.66~12.78 进行分段积分, 其中 δ 7.10~7.38 (残余氯仿峰) 不进行积分。将积分后的数据导入 Excel 中, 进行后续分析。

首先将 Excel 中的积分数据导入 SPSS 16.0 软件中进行层次聚类分析 (HCA), 采用组间联结 (Between-groups) 法, 以夹角余弦 (cosine) 作为测度对样品进行分析。然后将其导入 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Umea, 瑞典) 软件中进行主成分分析 (PCA), 再用偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 找出差异代谢产物。根据分析结果, 对差异代谢产物相对峰面积进行 t 检验, 以期找出显著性差异代谢产物。此外, 将差异代谢物数据导入代谢组学分析网站 (<http://www.Metaboanalyst.ca>), 计算出差异代谢产物的 Pearson 相关系数并作图, 以期找出差异物之间的相关性。

2 结果与分析

2.1 代谢组学分析

采用氯仿-甲醇-水 (2:1:1) 两相提取法, 得到芍药样品的甲醇水相和氯仿相提取物。通过对照品对照、文献报道数据以及 BMRB 数据库中的标准物质对照, 从白芍与赤芍图谱中识别出 32 个代谢产物 (图 1)。其中甲醇水相中主要包括极性大的成分 (图 1-A1: 白芍甲醇水相, 图 1-A2: 赤芍甲醇水相), 图谱大致可以分为 3 个区域, 高场端 (δ 3.10~0.00) 主要包括有机酸和氨基酸, 如丙氨酸、精氨酸、缬氨酸、柠檬酸和丁二酸等, 此外还有单萜苷类次生

代谢产物的甲基信号, 包括芍药苷 (δ 1.41, s), 芍药内酯苷 (δ 1.56, s), 苯甲酰芍药苷 (δ 1.25, s), 6-O-没食子酰白芍苷 (δ 1.38, s), 4-O-没食子酰白芍苷 (δ 1.59, s) 等。碳水化合物区 (δ 5.50~3.10) 主要为糖类物质, 包括 α -葡萄糖、 β -葡萄糖以及蔗糖等。低场区 (δ 9.0~5.50) 主要包括芳香化合物, 包括儿茶素、没食子酸、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖以及芍药苷类的苯甲酰基团 (δ 7.53, t, J = 7.8 Hz; 7.68, t, J = 7.8 Hz; 8.05, dd, J = 8.4, 1.2 Hz)。

氯仿相提取物中主要包括芍药的低极性成分 (图 1-B1: 白芍氯仿相, 图 1-B2: 赤芍氯仿相), 通过对图谱的分析, 指认出了脂肪酸 (δ 2.36, t, J = 7.5 Hz; 2.77, t, J = 6.6 Hz; 1.2~1.3, m)、 β -谷甾醇 (δ 0.68, s) 以及一些苯甲酸酯类 (δ 8.07, d, J = 7.2 Hz; 7.93, d, J = 7.8 Hz), 另外还指认出赤芍中的特有成分丹皮酚 (δ 12.76, s; 7.63, d, J = 9.0 Hz; 3.84, s; 2.56, s; 6.43, d, J = 2.4 Hz; 6.43, dd, J = 9.0, 2.4 Hz)。各类化合物的详细核磁数据见表 2。

芍药的化学组成复杂, 所得核磁图谱提供了大量的化学指纹信息, 直观分析显示白芍和赤芍的低极性成分和高极性成分均存在明显差异。下一步采用多元统计分析方法对两者进行深入比较。

2.2 多元统计分析

2.2.1 PCA 分析 PCA 分析是在保留原始变量主要信息的前提下, 通过降维技术把多个具有一定相关性的指标约化为少数几个综合指标的多元统计分析方法, 且随着主成分的增加, 其所包含的信息量越来越少。PCA 分析的得分散点图能直观地显示不同样品之间的整体差异, 且在得分图中, 投影在某主成分上的绝对值越大, 表明该主成分对该类的区分影响越大^[17]。本研究中 PCA 分析所用软件为 SIMCA-P13.0。

首先对白芍、赤芍样品的甲醇水相提取物进行 PCA 分析, 由主成分 1 (PC1: 41.1%) 和主成分 2 (PC2: 26.2%) 为横纵坐标构建的得分散点图可直接观测出, 白芍与赤芍样品可明显分开, 说明二者之间组间差异较大, 即二者化学组成差异大。在氯仿相的 PCA 得分散点图中, 第 1 主成分和第 2 主成分共解释了 54.4% (PC1: 37.9%, PC2: 16.5%) 的原始变量信息, 二者能明显分开, 说明白芍与赤芍的低极性成分也存在较大的差异。不同批次的白芍样品比较聚集, 说明组内差异小, 而赤芍样品比较分散, 说明组内差异较大, 原因可能是白芍大多为

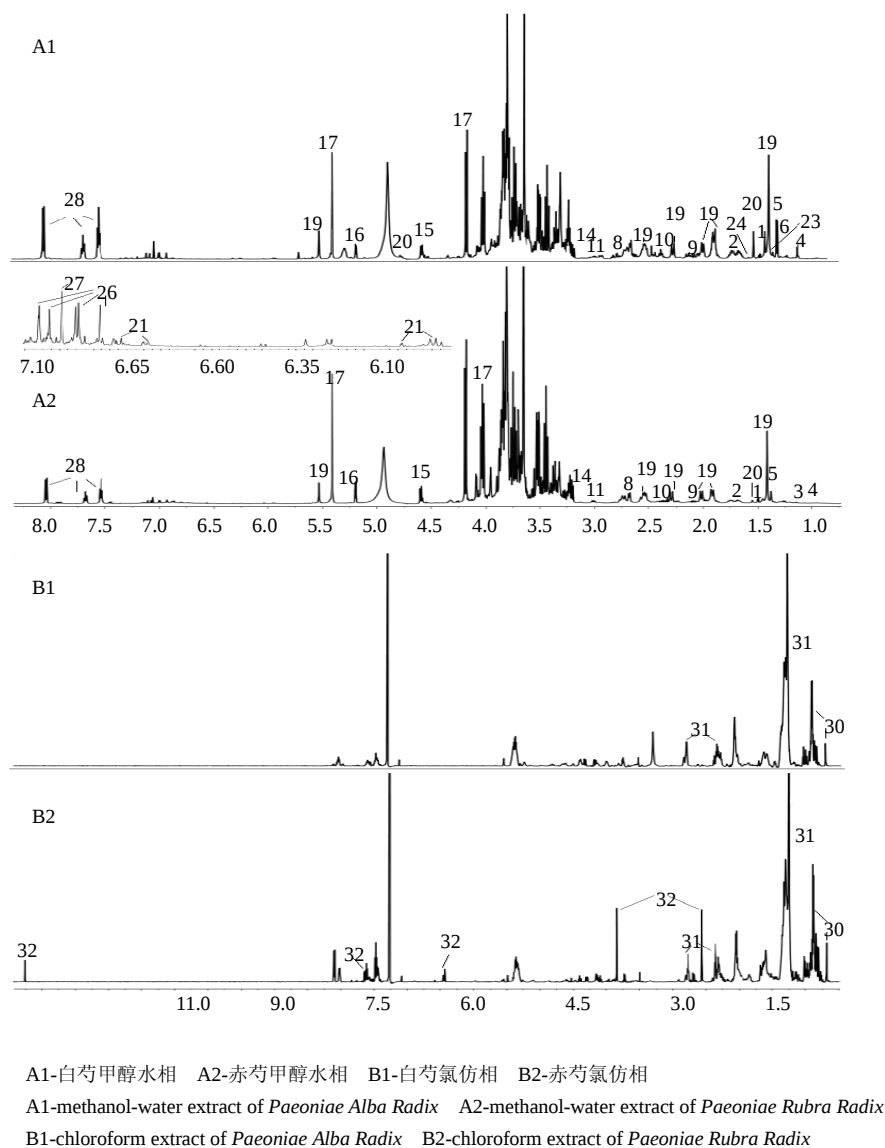


图1 白芍与赤芍的¹H-NMR图谱

Fig. 1 ¹H-NMR spectra of *Paeoniae Radix Alba* and *Paeoniae Radix Rubra*

栽培品，且本研究样品来源于主产区安徽亳州，因此差异相对较小；而赤芍大多为野生品，生长年限不定且分布范围较广所致。进一步采用 HCA 方法对两者的甲醇水相和氯仿相提取物进行分析，结果显示芍药样品明显聚为 2 大类，一类为白芍样品，一类为赤芍样品，与 PCA 分析结果一致。

PCA 分析作为一种无监督的分析方法，只反映了数据的原始状态，观察到试验样品的自然分布和组别关系，但不能忽略组内误差，消除与研究目的无关的随机误差，忽略了数据的整体特征与变化规律，不利于寻找组间差异和差异代谢物。为了确定白芍与赤芍之间的化学差异成分，本研究采用有监督的 PLS-DA 分析和 OPLS-DA 分析对数据进行进

一步分析^[18-19]。

2.2.2 PLS-DA 分析及 OPLS-DA 分析 PLS-DA 分析和 OPLS-DA 分析是有监督的模式识别方法。PLS-DA 分析着重强调组间的差异，而将组内的差异降至最低，更能把握多维数据的整体特征和变异规律。OPLS-DA 分析可以去除与 Y 矩阵（在本研究中 Y 为分组信息）无关的 X 矩阵的变化，从而使 X 矩阵和 Y 变量之间的关系最大化，即使 2 组分类的差别达到最大，从而确定 2 组之间的化学差异成分^[20]。

本研究先对白芍与赤芍进行 PLS-DA 分析，在甲醇水相提取物中，模型参数为 $R^2=91.0\%$ ， $Q^2=95.0\%$ ，氯仿相的模型参数为 $R^2=91.2\%$ ， $Q^2=97.2\%$ 。

表 2 白芍与赤芍中主要化合物的 NMR 数据归属

Table 2 NMR assignments of major metabolites in *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix*

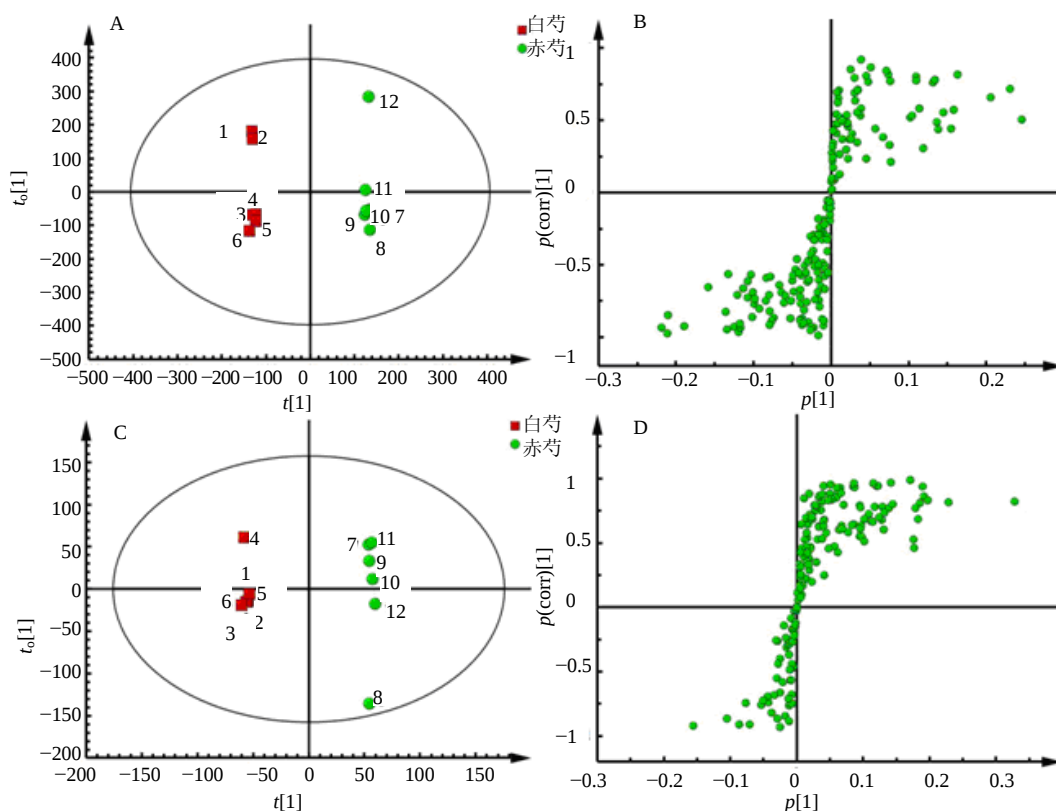
峰号	化合物	δ_{H} (J in Hz)	植物来源
1	丙氨酸	1.49 (d, 7.2), 3.74 (m)	B、C
2	精氨酸	1.68 (m), 1.74 (m), 1.90 (m), 3.24 (t, 7.2)	B、C
3	缬氨酸	1.00 (d, 7.2), 1.06 (d, 7.2)	C
4	亮氨酸	0.95 (t, 7.2)	B、C
5	乳酸	1.34 (d, 6.6), 4.08 (q, 6.6)	B、C
6	苏氨酸	1.34 (d, 6.6)	B、C
7	乙酸	1.96 (s)	B、C
8	天冬氨酸	2.82 (dd, 16.2, 7.8)	B、C
9	谷氨酸	2.10 (m), 2.35 (m)	B、C
10	谷氨酰胺	2.10 (m), 2.45 (m)	B、C
11	γ -氨基丁酸	3.01 (t, 7.2), 2.41 (td, 7.2, 2.4)	B、C
12	柠檬酸	2.72 (d, 16.2)	B、C
13	丁二酸	2.51 (s)	B、C
14	胆碱	3.22 (s)	B、C
15	β -葡萄糖	4.59 (d, 8.4)	B、C
16	α -葡萄糖	5.20 (d, 3.6)	B、C
17	蔗糖	5.41 (d, 4.2), 4.18 (d, 8.4)	B、C
18	甲酸	8.47 (s)	B、C
19	芍药苷	1.41 (s), 1.92 (d, 13.2), 2.01 (d, 10.8), 2.29 (d, 12.5), 5.53 (s), 3.67 (dd, 12, 6.6), 3.86 (dd, 16.4, 3.0), 2.68 (d, 6.0), 2.53 (dd, 10.8, 6.6)	B、C
20	芍药内酯苷	1.56 (s), 2.10 (d, 10.8), 2.05 (d, 15.0), 2.47 (dd, 15.6, 6.6), 4.77 (d, 12)	B、C
21	儿茶素	5.95 (d, 2.4), 6.04 (d, 2.4), 6.79 (d, 8.4), 6.89 (d, 2.4)	B、C
22	苯甲酰芍药苷	1.25 (s)	B、C
23	6-O-没食子酰白芍苷	1.38 (s)	B、C
24	4-O-没食子酰白芍苷	1.59 (s)	B、C
25	<i>N,N</i> -二甲基甘氨酸	2.90 (s)	B、C
26	1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖	6.93 (s), 7.00 (d, 4.8), 7.08 (s), 7.11 (s)	B、C
27	没食子酸	7.05 (s)	B、C
28	苯甲酸酯类	8.07 (d, 7.2), 7.93 (d, 7.8), 7.99 (m), 7.54 (m), 7.43 (m)	B、C
29	葡萄糖苷乙酯	1.21 (s), 1.20 (s), 1.18 (s)	B、C
30	β -谷甾醇	68 (s), 0.92 (d, 6.6), 0.89 (t, 6.6), 0.88 (d, 6.0), 0.87 (d, 7.2)	B、C
31	脂肪酸	2.36 (t, 7.5), 2.77 (t, 6.6), 1.20~1.30 (m)	B、C
32	丹皮酚	12.76 (s), 7.63 (d, 9.0), 3.84 (s), 2.56 (s), 6.42 (d, 2.4), 6.45 (dd, 9.0, 2.4)	C

B-白芍 C-赤芍

B-*Paeoniae Alba Radix* C-*Paeoniae Rubra Radix*

另外, 用外部模型验证方法排列实验来证明模型的有效性。在排列实验中, 蓝色的回归线与纵轴相交并处于零点以下, 左端任何一次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 均小于右端, 且 2 条回归线斜率较大, 最右端的 2 个值差距较小, 说明原始模型的预测能力大于任何一次随机排列 y 变量的预测能力, 即证明了上述模型有效, 可以继续后面差异成分的寻找。图 2-A、图 2-C 分别为甲醇水相提取物和氯仿相提取物的 OPLS-DA 得分散点图, 从图 2 中明显得出,

与无监督的 PCA 分析得分散点图相比, 白芍与赤芍样本有最大程度的分离, 且降低了样品的组内差异, 这样便于更准确地寻找白芍与赤芍之间的化学差异成分。通过 S-plots 图 (甲醇水相: 图 2-B, 氯仿相: 图 2-D) 和 VIP 值 (大于 1), 寻找差异标志物。结果显示白芍中精氨酸、苏氨酸、乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、柠檬酸、丁二酸、乳酸、芍药内酯苷、6-O-没食子酰白芍苷、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖以及没食子酸的质量分数较高,



A、B-甲醇水相的 OPLS-DA 得分图和 S-Plots, C、D-氯仿相的 OPLS-DA 得分图和 S-Plots
OPLS-DA score plots (A) and loading S-plots (B) of methanol-water extract, OPLS-DA score plots (C) and loading S-plots (D) of chloroform extract

图2 白芍与赤芍的多元统计分析

Fig. 2 Multiple statistical analysis of *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix*

而赤芍中丙氨酸、 α -葡萄糖、蔗糖、芍药苷、儿茶素、 β -谷甾醇、脂肪酸以及丹皮酚的量较高。

在 SPSS 16.0 中进一步采用 t 检验对差异成分进行分析,白芍与赤芍中苏氨酸、乙酸、天冬氨酸、柠檬酸以及丁二酸具有显著性差异 ($P < 0.05$),精氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、乳酸、芍药内酯苷、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖、没食子酸、 α -葡萄糖、儿茶素、 β -谷甾醇、脂肪酸以及丹皮酚具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.2.3 差异代谢物的相关分析 为了寻找差异代谢物之间的相互关系,本研究分别计算白芍与赤芍样品差异代谢物的 Pearson 相关系数,并作相关系数图(图3),图3中红色表示正相关,蓝色表示负相关,颜色越深表示相关性越大,反之越小。由图3可见,芍药中差异代谢产物间总体相关性较强,且白芍的相关性大于赤芍。

白芍样品中丙氨酸、精氨酸、苏氨酸、乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、柠檬酸以及丁

二酸等初级代谢物之间的相关性比赤芍样品初级代谢物之间的相关性大,其中白芍中丙氨酸与精氨酸、乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、柠檬酸、丁二酸以及蔗糖呈强的负相关,而在赤芍中相关性较弱且偏向正相关,白芍中苏氨酸与乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、柠檬酸以及丁二酸呈强的负相关,而在赤芍中呈弱的正相关。白芍中 β -谷甾醇与初级代谢产物乙酸、天冬氨酸、谷氨酸、 γ -氨基丁酸、柠檬酸以及丁二酸呈负相关,而在赤芍中呈正相关。另外,芍药内酯苷、儿茶素、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖、没食子酸等次级代谢产物与乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、 γ -氨基丁酸、柠檬酸、丁二酸等初级代谢产物呈现较强的正相关,相关性在赤芍中强于白芍。由此可以说明,白芍与赤芍不仅在初级代谢物相互之间的关系有较大差异,而且初级代谢物与次级代谢物相互之间的关系也有较大的差别。

3 讨论

本研究采用基于核磁共振代谢组学技术对白芍

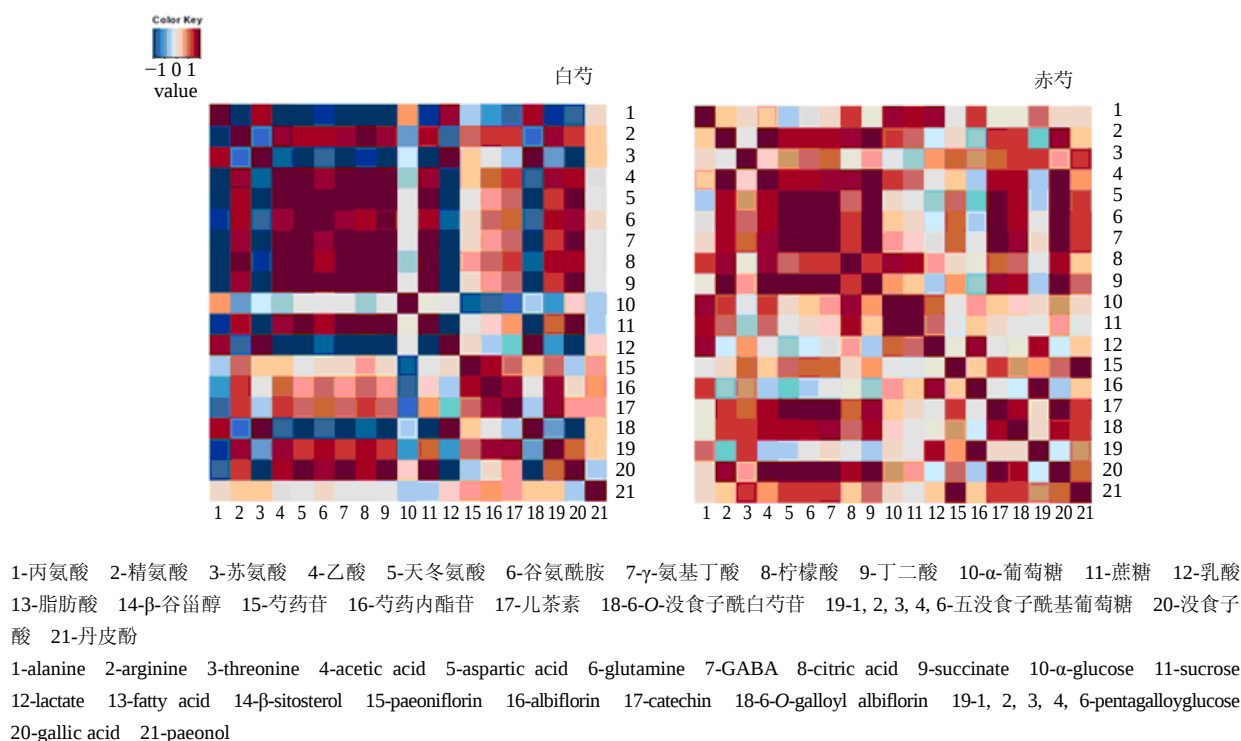


图3 差异代谢物的相关系数图

Fig. 3 Correlation maps of different metabolites

与赤芍的化学差异进行了比较,结果显示,白芍中含有较多的精氨酸、苏氨酸、乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、γ-氨基丁酸、柠檬酸、丁二酸、乳酸、芍药内酯苷、6-O-没食子酰白芍苷、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖以及没食子酸等,而赤芍中含有较多的丙氨酸、α-葡萄糖、蔗糖、芍药苷、儿茶素、β-谷甾醇、脂肪酸以及丹皮酚等。此外,白芍与赤芍两者在差异成分相关系数上也存在较大的差异。植物代谢物的生物合成与其所处的环境密切相关,本研究中的白芍与赤芍均来源于毛茛科植物芍药,两者代谢物的量与相关系数的差异反映了生长方式和生长环境的不同。白芍和赤芍中的芍药内酯苷、儿茶素、1, 2, 3, 4, 6-五没食子酰基葡萄糖、没食子酸等次级代谢产物与乙酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、γ-氨基丁酸、柠檬酸、丁二酸等初级代谢产物存在正相关。

本研究发现两者的次级代谢产物芍药苷、芍药内酯苷、儿茶素等存在一定差异,且丹皮酚为赤芍的特有成分,结果与文献报道一致^[8-10]。芍药化学成分复杂,除了芍药苷等单萜苷类次级代谢产物外,还含有氨基酸、糖类、有机酸等多种初级代谢产物,同时,本研究结果也揭示了白芍与赤芍在初级代谢产物上也存在较大差异,如白芍中含有较多的乳酸,

而赤芍中几乎不含乳酸;白芍中葡萄糖较少,而赤芍中葡萄糖较多。中药在临床多为水煎入药,大量的初级代谢产物(如有机酸、氨基酸和糖类)随次级代谢产物同时煎出并被服用,这些初级代谢产物在芍药功效中发挥的作用值得进一步深入研究。核磁共振技术用于中药材分析,可以同时检测到样品中的次级代谢产物和初级代谢产物。然而核磁共振的灵敏度较低,在代谢组学研究中,多种技术手段的联用有助于样本的全面化学表征,下一步本课题组将采用液质联用技术,并扩大样本量对白芍和赤芍之间的化学差异进一步深入研究,为揭示两者化学差异与功效差异的相关性奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杨 柳, 许舜军, 吴金雄, 等. 白芍、赤芍的比较研究概况 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 577-580.
- [3] 王 瑞, 鲁 岚, 李颖伟, 等. 赤芍与白芍的药理作用比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 112-114.
- [4] 王 巧, 郭洪祝, 霍长虹, 等. 白芍化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 972-976.
- [5] 谭菁菁, 赵庆春, 杨 琳, 等. 白芍化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1245-1248.

- [6] 段文娟, 姜 艳, 靳 鑫, 等. 赤芍的化学成分研究 [J]. 中国药物化学杂志, 2009, 19(1): 55-58.
- [7] 林启寿, 庄 丽, 王慕那, 等. 白芍和赤芍成分的比较 [J]. 药学学报, 1956, 4(1): 17-24.
- [8] 王 巧, 刘荣霞, 于海兰, 等. 白芍与赤芍 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(8): 581-584.
- [9] 高 明, 赵 镭, 赵光树. 白芍和赤芍 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1094-1096.
- [10] 王磊磊, 陈军辉, 王 虹, 等. 赤芍与白芍药材高效毛细管电泳指纹图谱方法学研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2341-2345.
- [11] 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.
- [12] Qin X M, Dai Y T, Liu N Q, *et al.* Metabolic fingerprinting by ¹HNMR for discrimination of the two species used as *Radix Bupleuri* [J]. *Planta Med*, 2012, 78(9): 926-933.
- [13] 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.
- [14] 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*, 2012, 58(1): 19-26.
- [15] 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.
- [16] 何 盼, 李震宇, 范圣此, 等. 基于代谢组学技术和 ITS2 序列的恒山黄芪与川黄芪差异性研究 [J]. 药学学报, 2013, 48(10): 1595-1601.
- [17] 阿基业. 代谢组学数据处理方法-主成分分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学中国药理学会, 2010, 15(5): 481-489.
- [18] 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.
- [19] 田 栋, 李震宇, 范圣此, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的不同产地黄芪水溶性浸出物化学组成分析 [J]. 药学学报, 2014, 49(1): 89-94.
- [20] 漆小泉, 王玉兰, 陈晓亚. 植物代谢组学-方法与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.