

• 中药现代化论坛 •

代谢组学技术在中药材商品规格研究中的应用思考

李震宇^{1*}, 何盼^{1,2}, 秦雪梅^{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: 药材商品规格标准所依据的是简单易行、直观明了的性状特征, 是药材市场交易定价的基础。然而现有研究尚未阐明药材商品规格标准的科学内涵, 难以证明传统药材商品规格经验划分的科学性。近年来与中医药学的整体观具有相似性的代谢组学技术快速发展, 并在药材商品规格等级研究中显示出广阔应用前景。结合文献以及本课题组的工作对这些研究进行简要分析, 并提出基于代谢组学的中药材商品规格研究思路, 同时对其应用前景和存在问题进行展望。

关键词: 中药材; 商品规格; 等级; 代谢组学; 中医药

中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)07-0943-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.001

Application study of metabolomic approach in commercial specifications of traditional Chinese medicinal materials

LI Zhen-yu¹, HE Pan^{1,2}, QIN Xue-mei¹

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: The commercial specification standards of traditional Chinese medicinal materials (TCMM) are determined on the basis of simple, practicable, and intuitive characteristics, which are the foundation of pricing in the TCMM trade. However, the scientific connotation of commercial specifications of TCMM has not been clearly clarified yet, so that it is difficult to prove the scientific nature on the traditional experiences for commercial specifications of TCMM. In recent years, metabolomics, a rapidly developing technology, which is consistent with the overall concept in the theory of traditional Chinese medicine, reveals potential application prospect in the study on the commercial specifications grade of TCMM. In this study, the results in literatures as well as our previous study were analyzed, and a research idea on the commercial specifications of TCMM based on metabolomics has been put forward. Then its future application and existing problems have also been discussed.

Key words: traditional Chinese medicinal materials; commercial specifications; grade; metabolomics; traditional Chinese medicine

药材商品规格标准是药材市场交易定价的基础, 对药材生产导向具有重要作用。在药材的市场交易中, 药材商品规格标准所依据的是简单易行、直观明了的性状特征。我国著名中药学家谢宗万概括提出“辨状论质”是中药品种传统经验鉴别之精髓的观点^[1]。“辨状”的内容包括辨药材的形状、大小、色泽、表面特征、质地、断面特征及气味等; “论质”则有两方面的内容: 一是药材的真伪, 二是

优劣评判。其中性状项中的大小、色泽、气味、质地等具有量化概念或程度的指标内容, 用于判断药材质量优劣, 一直在发挥重要作用^[2], 特别在药材市场中是划分质量等级规格的基本依据。

中药材具有双重特性, 既有药用属性, 又有商品属性。中药材商品规格即是其内在质量的外在体现。近年来研究人员对中药材商品规格的科学内涵进行了大量研究。段金廛等^[3]以当归为例, 对中药

收稿日期: 2014-11-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270008); 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

*通信作者 李震宇 Tel/Fax: (0351)7011202 E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

秦雪梅 Tel/Fax: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

材商品规格的形成模式进行了探讨;针对药材规格等级传统感官评价方法准确性较差、经验传承困难、评判结果重现性差的问题,肖小河课题组^[4-6]以大黄和黄连为例,提出了中药材感官评价定量化的新思路;康传志等^[7]以太子参的9个外观性状指标结合内在质量的化学成分指标制定了太子参商品规格等级标准。上述工作为中药材商品规格标准科学内涵的阐释提供了新的思路,并奠定了必要的研究基础。然而,与活性成分、种质资源等其他中药现代研究领域相比,现有工作对中药材“辨状论质”科学内涵的理论研究仍然相对较少,传统药材商品规格经验划分的科学性尚有待深入证明,导致管理部门或行业协会在制定药材商品规格标准时缺乏理论依据,无法通过价格杠杆保护优质地道药材。药材商品规格标准的科学性证明需要回答2个问题:(1)不同商品规格或等级的药材在化学物质基础上是否存在显著性差异?差异成分(群)是什么?(2)不同商品规格等级的药材在药效上是否有差异即药材质量的优劣性。

已有研究对中药材的色泽、气味、形状等性状指标与药材化学成分的相关性进行了分析,如大黄、黄柏、紫草、丹参、丹皮、肉桂、麝香、辛夷、鱼腥草、薄荷、细辛、甘草、黄连、薯蓣、乌头、青风藤、厚朴、何首乌、甘草等^[2]。

在药效方面,有研究比较了不同商品规格三七的止血活性^[8],不同商品等级掌叶大黄的泻下作用^[9]。这些前期工作不仅初步证明中药材商品规格的合理性和科学性,也为药材商品规格标准科学内涵的深入研究奠定了基础。然而,对于药材商品规格的科学阐释,已有工作尚存在一定局限性:(1)在化学评价上,中药材化学组成复杂,基于有限成分的定量测定^[10-12]难以从整体物质组的角度阐明不同商品规格或等级的药材在化学组成上的差异性,更无法确定与等级或规格相关的化学差异成分群;(2)在药效评价上,整体动物药效学实验重现性与灵敏度不高,难以反映不同商品规格或等级的药材在药效上的细微差异。

代谢组学是近年来发展的新型组学技术之一,是一种整体性化学分析技术,与突出整体效应的中医药学思想具有天然的相似性,可为中药材商品规格的研究提供新的思路和方法。中药材所含的化学成分非常复杂,而植物代谢组学技术有助于对中药材物质组成的整体化学表征^[13-14],目前已应用

于款冬花^[15]、地黄^[16]、黄连^[17]、厚朴^[18]、白芍^[19]等药材的研究。近年来已有研究采用代谢组学技术对不同商品规格的药材进行了探索研究,本文结合文献以及本课题组的工作对这些研究进行简要分析,并提出基于代谢组学的中药材商品规格研究思路,同时对其应用前景和存在问题进行展望与分析。

1 研究实例分析

1.1 不同性状款冬花的化学比较

款冬花具有润肺下气、止咳化痰的功效,含有三萜皂苷、倍半萜、黄酮、生物碱、绿原酸、挥发油等多种化学成分。传统的用药经验认为紫色花蕾的质量优于黄色花蕾,因此款冬花商品药材依据颜色性状可以分为紫花和黄花2个等级。《常用中药鉴定大全》也指出款冬花的商品规格历史分档中有紫花、黄花2种,以紫花为优。本课题组采用基于核磁共振的代谢组学技术对不同性状款冬花药材进行了化学分析,以期从化学角度阐明款冬花药材按照性状分级的科学性。采用两相提取法(氯仿-甲醇-水 2:1:1)分别获得款冬花的极性和非极性成分后进行核磁共振和多元统计分析。通过核磁共振指纹共检测到款冬花初级和次级代谢产物共40种,多元统计分析结果显示,款冬花紫色花蕾和黄色花蕾间的化学差异客观存在,体现在紫色花蕾中3,5-二咖啡酰奎尼酸、芦丁、咖啡酸、山柰酚类似物、款冬酮等次级代谢产物的量和苏氨酸、脯氨酸、磷脂酰胆碱、肌酐等初级代谢产物的量高于黄色花蕾^[20]。课题组前期研究发现^[21],3,5-二咖啡酰奎尼酸、芦丁等成分与款冬止咳化痰活性相关性较大,为款冬紫色花蕾质量优于黄色花蕾提供了科学依据,也说明代谢组学用于药材商品规格研究是可行的。

1.2 不同生长年限人参的化学及药效比较

人参是中医临床常用药材,具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津养血、安神益智的功效,含有人参皂苷类、糖类、氨基酸等多种物质。传统的用药经验认为,人参的品质与生长年限相关,即年限越长,品质越佳,价格也越高。目前市场上的人参以4~6年生的生晒参为主,5或6年生人参价格明显高于生长年限在4年或4年以下的人参,因此市场中出现了低生长年限冒充高生长年限人参的情况^[22]。性状特征是药材品质的重要判断依据,但仅凭外观性状难以准确区分不同生长年限的人参。Yang等^[22]采用核磁共振技术对2~6年生人参进行了代谢组学分析,检测到氨基酸、有机酸、糖类

23种成分,结果显示2年、3年、4年以及5/6年的人参可明显区分,5/6年生人参含有较多的乙酸、蔗糖、酪氨酸、色氨酸、甲酸等量物质,而2年生人参中谷氨酸,谷氨酰胺,葡萄糖等较高。此外,该研究采用偏最小二乘法(PLS)建立了人参生长年限的判别模型,虽然确定的与人参生长年限相关的差异成分是初级代谢产物,但基于初级代谢产物的数学预测模型仍能准确区分未知人参样品的生长年限。Kim等^[23]采用超高效液相-四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术对1~6年生的人参进行了分析,从其液质指纹谱中检测到1361种代谢物,选择其中的301种代谢物进行聚类分析可准确区分1~6年生人参,对于较难区分的4~6年生人参,随机森林(random forest, RF)、微阵列分析预测(prediction analysis of microarray, PAM)和偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)数学模型均可明显区分,其中PLS-DA的准确率更是达到100%。该研究虽然未能确定与生长年限相关的化学成分(群),但建立的人参药材年限预测模型具有很高的准确率。Hu等^[24]以2型糖尿病大鼠为对象,采用基于IT-TOF-MS的代谢组学分析方法对3~6年生的人参的药理作用进行了比较。通过血糖、血脂等传统生化指标结合脂质代谢组学分析证明6年生人参效果最佳。该研究实例说明在不同等级规格药材药效比较中,引入代谢组学技术,可以更灵敏地反映药效的差异。

1.3 不同等级东当归的化学比较

东当归又名日本当归,来源于伞形科植物*Angelica acutiloba* (Sieb. et Zucc.) Kitag. 的干燥根,具有活血、调经止痛、润燥滑肠的功效,日本和朝鲜以本种的栽培品作当归入药。Tarachiwin等^[25]采用核磁共振分析对传统经验判断为优、中、差3个等级的东当归进行了化学比较。核磁共振指纹可检测到东当归中阿魏酸、茶碱以及氨基酸、有机酸、糖类等代谢产物20余种,由PLS-DA分析散点图可见,不同等级的东当归可明显区分,相应的载荷图显示阿魏酸及某些氨基酸、有机酸与品质密切相关;采用PLS建立的基于核磁图谱(δ 0.78~4.35)的数学判别预测模型,可准确地预测未知样品的品质。此外,该课题组建立的基于裂解-气相色谱/质谱联用(PY-GC/MS)的指纹图谱也可区分和判别不同品质的东当归^[26]。

1.4 杭麦冬和川麦冬药效差异比较

麦冬具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦的功效,为百合科(Liliaceae)沿阶草属多年生草本植物麦冬*Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker -Gawl.的干燥块根,现代临床研究表明麦冬具有抗肿瘤、耐缺氧、抗心律失常、降血糖及抗衰老等作用。麦冬主产于浙江杭州和四川三台,分别称为杭麦冬和川麦冬。本草考证杭麦冬质量优于川麦冬,为道地药材。童菊华等^[27]采用基于UPLC-Q-TOF/MS的代谢组学技术比较了杭麦冬和川麦冬对正常大鼠内源性代谢物干预作用的差异性,结果显示川麦冬低、中剂量组与对照组相近,高剂量组则有明显区别;杭麦冬高、中、低剂量组与对照组差异明显,剂量越大干预作用越强;具有显著性差异的内源性代谢产物为与心血管系统疾病紧密相关的溶血磷脂酰胆碱类物质。与川麦冬给药组相比,杭麦冬组对正常大鼠血浆内源性代谢产物的干预作用更显著。从药效学上看,杭麦冬和川麦冬差异显著。

2 基于代谢组学的中药材商品规格研究思路

代谢组学技术的特点在于可以利用样品的整体化学信息,通过模式识别客观地进行分类,并能寻找出对分类有较大贡献的一组化合物。由上述实例可见,当性状特征与化学成分的相关性不明确时,以药材提取物为分析对象,通过对不同商品规格或等级药材的代谢组进行化学比较分析,能客观准确评价这些不同等级的商品药材在化学组成上是否存在差异,进一步还可以确定差异表现在哪些成分,并可建立基于化学指纹的药材规格等级数学判别模型;从而确定药材商品规格等级的差异是否显著和稳定,以及现有的规格标准或经验判断方法是否具有合理的科学内涵。另一方面,对不同商品规格或等级的药材进行药效比较时,在观测传统常规药效指标的同时,可以动物的体液或组织为对象进行代谢组学分析,通过模式识别统计分析手段比较不同等级规格药材间的生物学效应是否存在差异,作为上述药理学实验结果的补充验证。对传统指标和代谢组学结果进行综合分析,确定不同等级间的药材在生物学效应上是否具有差异,进而明确药材商品等级是否与质量优劣有关。

综上所述,代谢组学技术在中药材商品规格科学内涵研究中具有广阔的应用前景,因此提出基于代谢组学的中药材商品规格研究思路(图1):(1)首先分析不同商品规格药材的性状差异(颜色、大小、直径、

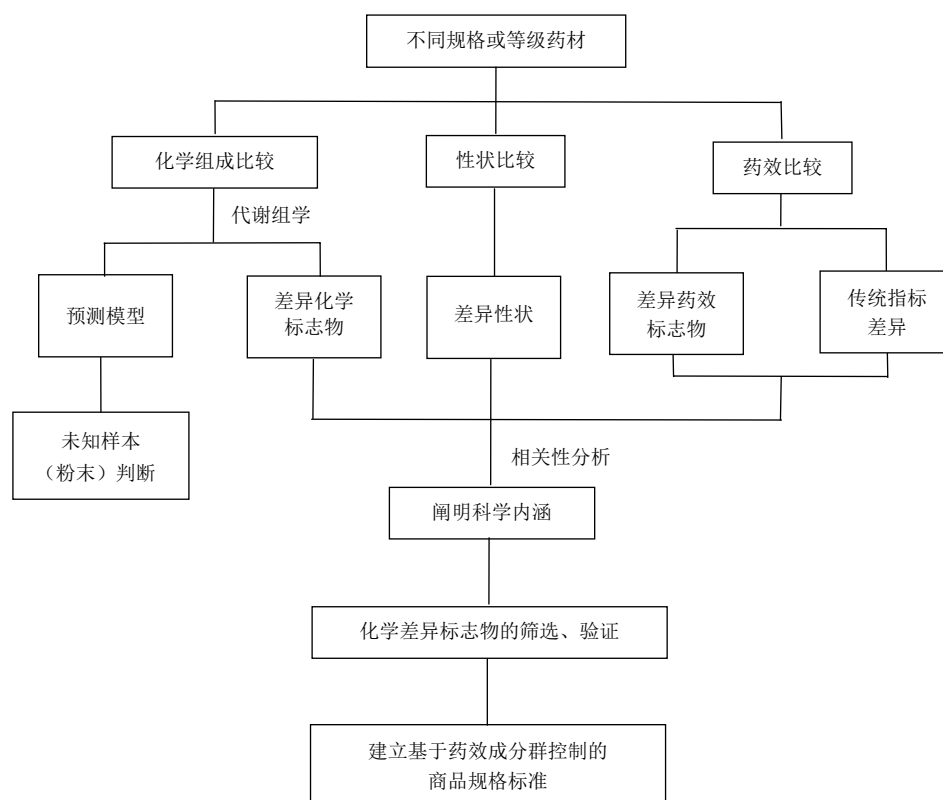


图1 中药材商品规格标准代谢组学研究思路

Fig. 1 Research idea on commercial specifications of TCMM based on metabolomics

气味、质地等); (2) 采用多种具有互补性的分析技术对不同商品规格或等级的药材进行代谢组化学分析, 通过多元统计分析方法确定是否存在化学组成差异, 确定与规格等级相关的差异化学成分(群), 即等级(规格)化学标志物; 并采用多种统计分析手段建立基于药材代谢组化学信息的规格等级数学预测模型, 用于未知样本(尤其是粉末样本)的判断; (3) 然后采用常规的药效学评价指标, 结合受试动物体液和组织的代谢组学分析确定不同商品规格或等级的药材是否存在药效差异, 确定与药效相关的特异性生物标志物, 通过标志物的定量变化描述不同等级药材的药效差异; (4) 对上述确定的等级(规格)相关的化学标志物进行筛选和验证, 建立定量测定方法并提出商品规格标准草案。

3 展望

由于中药材化学组成具有多重功效的复杂性特点, 药材商品规格的制定和内涵研究需要进行多学科系统研究。现有研究表明代谢组学技术在发现与药材规格等级相关的差异化学成分(群)和确定不同规格等级药材的药效差异方面具有独特优势。中药材是典型的化学复杂体系, 全面的化学表

征是准确确定与药材商品规格等级相关的化学成分(群)的前提和基础。核磁共振分析是一种无选择性的普适性分析技术, 可以分析几乎所有的含氢化合物, 但灵敏度较低, 检测到的成分以高浓度成分为主; 液质联用分析技术灵敏度较高, 但难以检测分析色谱柱上不保留的强极性成分; 气质联用技术灵敏度高, 适合于中药挥发油成分的比较研究。因此, 在药材商品规格的化学研究中, 针对复杂的中药物质组成, 需要集成联用具有互补性的多种分析手段。此外, 在针对药材的代谢组化学分析中, 结构指认难度远远大于体液代谢产物。因此, 代谢产物数据库建设对于药材商品规格的研究至关重要。采用代谢组学技术从复杂的中药物质组中确定与药材规格等级相关的化学标志物, 其核心和关键是数据预处理和统计分析方法的正确选择和应用。因此, 为了保证结果的真实准确, 应注意多种统计分析方法的运用和结果的相互验证。

对于中药材的现代研究, 王永炎院士提出了“品、质、性、效、用”一体化研究思路。“品”和“质”是中药发挥“性、效、用”的基础, “品”和“质”不明, 直接影响后期的临床应用。中药材商品

规格等级标准研究就是对“质”的标准化^[28]。中药材商品规格等级的制定可以促进中药材交易的优质优价,保证中药材质量和用药安全,促进交易市场的规范、秩序和合理化。中药材是中医药防病治病的物质基础和载体,质量必须优良才能保证用药安全有效。因此,药材商品规格的制定和科学内涵研究对于保证中医临床疗效的发挥和中医药产业的健康发展具有重要意义。对于中药材商品规格标准的研究提出以下建议:(1)加强基础研究,对现有中药材规格标准进行论证修订;(2)国家医药管理局与卫生部曾在1984年联合发布了《七十六种药材商品规格标准》^[29],品种数目远远低于《中国药典》收载的中药材品种,因此对其余的常用品种也应开展深入研究,并吸收地方或行业标准;(3)依法监督药材商品规格标准的实施,增强标准对中药材市场的规范和指导作用。

参考文献

- [1] 谢宗万. 中药品种传统经验鉴别:“辨状论质”论[J]. 时珍国医国药, 1993, 5(3): 19-21.
- [2] 秦雪梅, 孔增科, 张丽增, 等. 中药材“辨状论质”解读及商品规格标准研究思路[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2093-2098.
- [3] 段金廛, 肖小河, 宿树兰, 等. 中药材商品规格形成模式的探讨——以当归为例[J]. 中国现代中药, 2009, 11(6): 14-17.
- [4] 张学儒, 王伽伯, 肖小河, 等. 从大黄药材商品规格市场现状论中药材感官评价量化研究的必要性[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1225-1230.
- [5] 王伽伯, 张学儒, 楚笑辉, 等. 基于 Delphi 法的大黄药材商品规格感官评价科学性的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2657-2661.
- [6] 楚笑辉, 王伽伯, 孔维军, 等. 基于 Delphi 法的黄连药材商品规格感官评价的重现性研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(2): 321-327.
- [7] 康传志, 周涛, 郭兰萍, 等. 太子参商品规格等级标准研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2873-2880.
- [8] 山丽梅, 赵艳玲, 洪玮, 等. 三七止血活性与商品规格划分的相关分析[J]. 中草药, 2011, 42(9): 1779-1782.
- [9] 李傲, 王家葵, 孟宪丽. 掌叶大黄不同商品规格等级间泻下作用及组分含量的相关性分析[J]. 中国药房, 2010, 21(43): 4036-4038.
- [10] 严辉, 段金廛, 钱大玮, 等. 我国不同产地当归药材质量的分析与评价[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1988-1992.
- [11] 施学骄, 陈林, 彭成. 川芎不同商品规格化学成分比较研究[J]. 四川中医, 2011, 29(4): 58-61.
- [12] 刘威, 李红娟, 张帅, 等. HPLC 测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 134-138.
- [13] van der Kooy F, Maltese F, Choi Y H, et al. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting[J]. *Planta Med*, 2009, 75(7): 763-775.
- [14] Zhang C N, Cheng L, Zhang Y X, et al. Application of plant metabolomics in quality assessment for large-scale production of traditional chinese medicine[J]. *Planta Med*, 2013, 79(11): 897-908.
- [15] 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(5): 492-501.
- [16] He P, Li Z Y, Xing J, et al. ¹H NMR based metabolic profiling of the processing effect on *Rehmanniae Radix*[J]. *Anal Methods*, 2014, 6(8): 2736-2744.
- [17] Fan G, Tao L, Yue Q, et al. Metabolic discrimination of *Rhizoma Coptidis* from different species using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis[J]. *Planta Med*, 2012, 78(6): 641-648.
- [18] Jiang Y, Vaysse J, Gilard V, et al. Quality assessment of commercial *Magnoliae Officinalis Cortex* by ¹H-NMR-based metabolomics and HPLC methods[J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(4): 387-395.
- [19] 范玛莉, 邢婕, 李震宇, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的白芍与赤芍化学成分比较研究[J]. 中草药, 2014, 45(22): 3230-3237.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Kim N, Kim K, Choi B Y, et al. Metabolomic approach for age discrimination of *Panax ginseng* using

- UPLC-Q-ToF MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(19): 10435-10441.
- [24] Hu C, Wei H, Kong H, *et al*. Linking biological activity with herbal constituents by systems biology-based approaches: effects of *Panax ginseng* in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *Mol BioSyst*, 2011, 7(11): 3094-3103.
- [25] Tarachiwin L, Katoh A, Ute K, *et al*. Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by ¹H NMR-based metabolic fingerprinting [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(1): 42-48.
- [26] Tianniam S, Bamba T, Fukusaki E. Pyrolysis GC-MS-based metabolite fingerprinting for quality evaluation of commercial *Angelica acutiloba* roots [J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109(1): 89-93.
- [27] 童菊华, 王玉霞, 孙虹, 等. 基于代谢组学技术的杭麦冬和川麦冬药效差异性研究 [J]. *药学报*, 2014, 49(10): 1451-1456.
- [28] 杨光, 曾燕, 郭兰萍, 等. 中药材商品规格等级标准研究现状及几个关键问题的商榷 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(9): 1733-1738.
- [29] 七十六种药材商品规格标准 [S]. 1984.