

基于¹H-NMR代谢组学比较不同品种海马化学成分差异性

赵晓喆^{1,2}, 赵思俊^{1,3}, 田俊生^{1,2}, 高晓霞^{1,2*}, 梁海东⁴, 郝晋琪⁴, 秦雪梅^{1,2*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006
2. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006
3. 山西省食品药品检验所, 山西 太原 030006
4. 山西广誉远国药有限公司, 山西 太谷 030800

摘要: 目的 应用¹H-NMR代谢组学技术比较线纹海马、大海马、三斑海马中化学成分的差异性, 为中药海马质量评价研究提供依据。方法 采用¹H-NMR代谢组学技术对3个不同品种海马药材进行NMR氢谱分析, 归属、指认图谱中化合物, 通过多元统计分析比较不同品种海马化学成分, 发现其中的差异及其规律。结果 在海马甲醇-水(1:1)提取物¹H-NMR图谱中共指认出33种化学成分; 多元统计分析结果显示线纹海马、大海马化学成分相近, 差异性较小, 而三斑海马相比于线纹海马、大海马, 异亮氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、羟脯氨酸、脯氨酸、精氨酸、半胱氨酸含量降低, 呈显著性差异, 牛磺酸、甘油含量则显著上升。结论 应用代谢组学技术从整体水平比较不同品种海马的化学成分, 发现其中的差异性及其规律, 为中药海马质量控制研究提供了新思路。

关键词: 海马; 核磁共振; 代谢组学; 多元统计分析; 异亮氨酸; 甲硫氨酸; 谷氨酸; 羟脯氨酸; 脯氨酸; 精氨酸; 半胱氨酸
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0536-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.005

Comparison of chemical constituents in *Hippocampus* of different breeds by ¹H-NMR metabolomics approach

ZHAO Xiao-zhe^{1,2}, ZHAO Si-jun^{1,3}, TIAN Jun-sheng^{1,2}, GAO Xiao-xia^{1,2*}, LIANG Hai-dong⁴, HAO Jin-qi⁴, QIN Xue-mei^{1,2}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China
2. Shanxi Key Laboratory of Active constituents Research and Utilization of TCM, Taiyuan 030006, China
3. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030006, China
4. Shanxi Guangyuyuan Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Taigu 030800, China

Abstract: Objective To compare the chemical constituents in *Hippocampus kelloggi*, *H. kuda* and *H. trimaculatus* by ¹H-NMR metabolomics approach, provides the basis for quality evaluation of *Hippocampus*. **Methods** NMR-based metabolomics approach was used to analyze three breeds of *Hippocampus* and identify the chemicals. Multivariate statistical analysis was used to find the difference and regularity in the comparison of chemical constituents in different breeds of *Hippocampus*. **Results** Thirty-three metabolites were identified in the NMR spectra with methanol-ultrapure water (1:1); The multivariate analysis revealed that there were little differences between *H. kelloggi* and *H. kuda*; Compared with them, *H. trimaculatus* has the lower level of isoleucine, methionine, glutamic acid, hydroxyproline, proline, arginine, and cysteine, and the higher content of taurine and glycerin, which existed significant difference. **Conclusion** Compared the chemical constituents of different breeds of *Hippocampus* from the overall level to find their otherness and regularity, providing a new idea to control the quality of *Hippocampus*.

收稿日期: 2017-08-18

基金项目: 山西省实验动物专项资金项目(2014k05); 山西省科技重点研发计划(201603D3113006); 山西省科技创新重点团队(201605D131045-18); 山西省重点实验室(201605D111004)

作者简介: 赵晓喆(1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药质量控制。Tel: 15735175983 E-mail: 541809313@qq.com

*通信作者 高晓霞(1981—), 女, 副教授, 研究方向为中药药动学与药效学相关性研究, 中医药代谢组学研究。

Tel: (0351)7011202 E-mail: gaoxiaoxia@sxu.edu.cn

秦雪梅, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药质量控制与活性成分研究, 中医药代谢组学研究。

Tel: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

Key words: *Hippocampus*; nuclear magnetic resonance (NMR); metabonomics; multivariate statistical analysis; isoleucine; methionine; glutamic acid; hydroxyproline; praline; arginine; cysteine

海马是近陆浅海小型鱼类的一种,既在水族馆作为观赏鱼,亦作为贵细类中药材长期广泛应用于中医药领域。《中国药典》2015 年版收载海马为海龙科动物线纹海马 *Hippocampus kelloggi* Jordan et Snyder、刺海马 *H. histrix* Kaup、大海马 *H. kuda* Bleeker、三斑海马 *H. trimaculatus* Leach 或小海马(海蛆) *H. japonicus* Kaup 的干燥体,具有温肾壮阳、散结消肿的功能^[1]。

海马为多基原中药材,《中国药典》中海马的鉴别主要依靠性状鉴别,对不同品种海马从体长、体色等形态特征进行区分。然而,由于捕获时期或地域不同,可能对海马形态造成一定程度差异,根据经验鉴别可能存在一定误差,更不能通过外观形状直接评价药材的质量。化学成分研究结果显示,氨基酸^[2-3]、甾体^[4]、脂肪酸^[5]、磷脂^[6]以及微量元素是海马中的主要化学成分,但上述成分缺乏专属性与特异性,尚不适宜作为含量测定指标用于海马药材质量控制与评价。因此,为了帮助企业选择有利品种,保证海马相关产品质量均一、稳定,寻找一种新的方法,对海马药材多个品种进行化学成分比较、进而用于其质量控制与评价,合理建议企业选择替换、补充品种,从原料药阶段控制产品质量,显得尤为重要。

代谢组学研究某一时刻样品内所有细胞代谢物的集合,是运用整体、综合分析于一体的集成技术,通过对代谢物图谱的整体分析直接认识机体状态,结合化学信息学分析方法确定内源性小分子成分信息及变化模式^[7-9]。核磁共振技术能够检测样本中所有具核磁矩核素的代谢物,方法便捷、准确,重现性好,且其信号强度能够反映样本中化合物浓度及其相对含量^[10],已广泛应用于中医药代谢组学研究领域。本课题组前期对植物药远志^[11]、款冬^[12]、地黄^[13]以及动物药阿胶^[14]等进行了化学成分分析与质量差异性评价研究,为从整体水平进行中药质量控制研究提供了思路。本实验采用¹H-NMR 代谢组学技术对线纹海马、大海马、三斑海马的化学成分进行测定,结合多元统计分析,比较不同品种海马化学成分差异,为其质量控制研究提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究所用海马样品由山西广誉远国药有限公

司提供,各 6 个样本经山西大学秦雪梅教授鉴定,药材分别为线纹海马 *H. kelloggi* Jordan et Snyder、大海马 *H. kuda* Bleeker、三斑海马 *H. trimaculatus* Leach 未去除内脏的干燥体,粉碎成末后备用,标本保存在山西大学中医药现代研究中心样品留样室。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 Bruker 600-MHz AVANCE III NMR 波谱仪(德国布鲁克公司); Tube Mill 控制型试管研磨机(IKA); BSA124S 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; 超声波清洗器(KQ5200E, 昆山市超声仪器有限公司); SC-3610 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); Neofuge 13R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); STARTER 2100 实验室 pH 计[奥豪斯仪器(上海)有限公司]。

1.2.2 试剂 甲醇、三氯甲烷均为分析纯, NMR 试剂重水(D₂O)、氘代甲醇、氘代氢氧化钠(ALDRICH Chemistry, 美国), 3-(三甲基硅基)丙酸钠盐(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA)。

1.3 方法

1.3.1 供试样品制备 取海马粉末 200 mg 置于 10 mL 离心管中,分别加入超纯水、甲醇各 1.5 mL,三氯甲烷 3 mL,涡旋混匀 1 min,超声提取 25 min,室温下离心(3 500 r/min) 25 min,取上层水溶性部分(即甲醇水相)转移至 25 mL 圆底烧瓶中,减压浓缩至干。测定前,用氘代甲醇 400 μL 与缓冲重水(KH₂PO₄ 溶于 D₂O,以 1 mol/L 氘代氢氧化钠溶液调节至 pH 6.0,含 0.1% TSP) 400 μL 超声溶解,离心(13 000 r/min) 15 min,取上清液 600 μL 于 5 mm 核磁管中待测。

1.3.2 ¹H-NMR 测定条件 25 °C 室温条件下,于 600 MHz NMR 仪上采用 noesygppr1d 脉冲序列测定样品,测定频率为 600.13 MHz,扫描次数 64 次,谱宽 12 345.7 Hz,脉冲时间 14.0 s,采样时间 2.654 2 s,采样数据点 131 072, FID 分辨率 0.094 Hz,以 Methnol-d₄ 进行锁场, TSP 为内标,手动进行相位调节、基线校准。

1.3.3 数据分析 核磁图谱采用 MestReNova 10.0 软件进行处理,以 TSP 位移为基准定标,手动进行

相位调节、基线校准和谱图对齐。对图谱进行初步处理后,以 δ 0.02 为积分单位对化学位移区间 δ 0.52~9.00 进行分段积分,区段 δ 4.80~4.90 (残余水峰)和 δ 3.28~3.34 (残余甲醇峰)剪切,不进行积分。积分数据选用总峰面积进行归一化处理后导出。

所得核磁数据采用 SIMCA-P14.1 (Umetrics, Umea, 瑞典) 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、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)。根据分析结果,结合 VIP 值及组间相对峰面积 t 检验综合分析,以筛选出组间存在显著性差异的化学成分。

2 结果与分析

2.1 代谢组学分析

通过参考文献结果^[15-16],结合 Chenomx NMR Suite (Chenomx Inc., Edmonton, AB, 加拿大) 软件,根据成分化学位移、裂峰情况及偶合常数,对比、匹配 BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank) 数据库中标准物 ¹H-NMR 图谱,从海马甲醇-

水(1:1)提取物核磁图谱中共指认 33 个化学成分,不同品种海马 ¹H-NMR 图谱见图 1, 具体成分归属如表 1 所示。

海马 ¹H-NMR 指纹图谱提供大量生物结构信息,能够同时表征多种化学成分。通过指纹图谱对比 3 个品种海马化学成分,线纹海马、大海马、三斑海马成分种类相同,但各成分信号强度不同,存在含量差异;为了对其进行深入研究,则采用多元统计分析,比较不同品种海马组间差异。

2.2 多元统计分析

2.2.1 PCA 分析 运用 SIMCA-P 软件对积分数据进行处理,采用 PCA 无监督分析法对线纹海马、大海马、三斑海马 ¹H-NMR 图谱数据进行多元统计分析,在最大程度保留原始信息的基础上,将复杂数据简化、降维,分析样本总体分布状态^[17],结果见图 2。由图 2 可看出线纹海马、大海马个体较为接近,两组散点交互存在,且线纹海马组内聚集程度较好;三斑海马则明显区别于前两组,但存在一个样本与组内群体距离较远,说明线纹海马、大海马化学组成更为接近,且线纹海马组内个体间差异

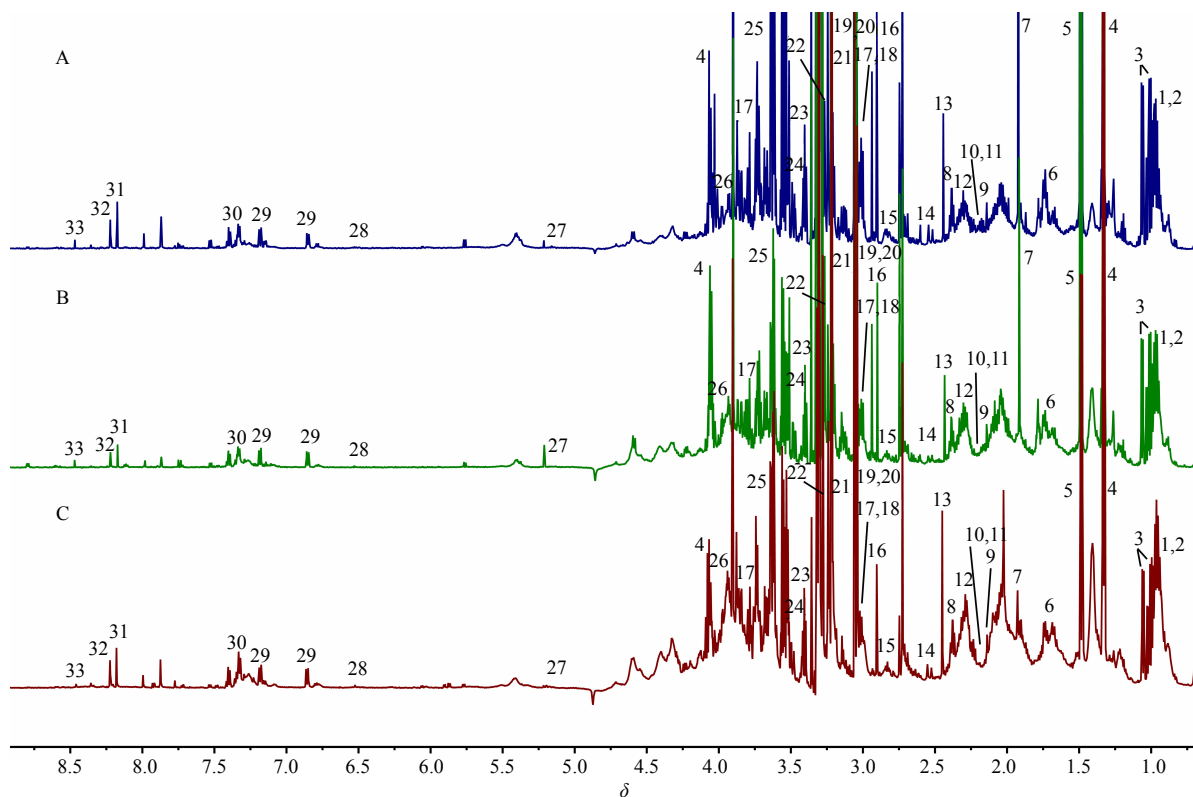


图 1 三斑海马 (A)、大海马 (B)、线纹海马 (C) 的 ¹H-NMR 指纹图谱对比
Fig. 1 ¹H-NMR spectra of *H. trimaculatus* (A), *H. kuda* (B), and *H. kelloggi* (C)

表 1 海马 ¹H-NMR 图谱特征指纹峰归属
Table 1 ¹H-NMR assignments of major metabolites in *Hippocampus*

编号	化合物	基团	δ_{H}
1	异亮氨酸	$\delta\text{CH}_3, \gamma\text{CH}_3$	0.96 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.03 (d, $J = 6.6$ Hz)
2	亮氨酸	$\delta\text{CH}_3, \delta'\text{CH}_3$	0.97 (t, $J = 6.6$ Hz)
3	缬氨酸	$\alpha\text{CH}, \gamma\text{CH}_3$	1.01 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.06 (d, $J = 7.2$ Hz)
4	乳酸	CH_3, CH	1.33 (d, $J = 7.2$ Hz), 4.06 (q, $J = 7.2$ Hz)
5	丙氨酸	αCH_3	1.49 (d, $J = 7.2$ Hz)
6	精氨酸	δCH_3	1.72 (m), 3.74 (t, $J = 6.0$ Hz)
7	乙酸	CH_3	1.93 (s)
8	谷氨酸	$\alpha\text{CH}, \text{CH}_2$	2.10 (m), 2.38 (m)
9	甲硫氨酸	$\text{CH}_3, \delta\text{CH}_2$	2.14 (s), 2.69 (t, $J = 7.8$ Hz)
10	羟脯氨酸	CH	2.14 (m)
11	丙酮	CH_3	2.23 (s)
12	脯氨酸	$\alpha\text{CH}, \text{CH}_2$	2.29 (m), 4.14 (dd, $J = 4.8, 9.0$ Hz)
13	琥珀酸	CH_2	2.45 (s)
14	柠檬酸	$\text{CH}_2(1/2), \text{CH}_2(1/2)$	2.53 (d, $J = 16.2$ Hz), 2.69 (d, $J = 15.0$ Hz)
15	天冬氨酸	$\gamma\text{CH}_2, \beta\text{CH}$	2.65 (dd, $J = 8.4, 16.8$ Hz), 2.83 (dd, $J = 4.2, 17.4$ Hz)
16	二甲基甘氨酸	$N\text{-CH}_3$	2.90 (s)
17	鸟氨酸	$\alpha\text{CH}, \delta\text{CH}_2$	3.00 (t, $J = 7.2$ Hz), 3.80 (t, $J = 6.0$ Hz)
18	赖氨酸	CH	3.02 (t, $J = 7.8$ Hz)
19	肌酸	CH_3	3.04 (s)
20	肌氨酸酐	CH_2	3.06 (s)
21	胆碱	$N(\text{CH}_3)_3$	3.22 (s)
22	甜菜碱	CH_3	3.28 (s)
23	牛磺酸	CH_2	3.41 (t, $J = 6.6$ Hz)
24	甘氨酸	CH_2	3.51 (s)
25	甘油	$\beta\text{CH}_2, \beta'\text{CH}_2$	3.54 (dd, $J = 6.0, 11.4$ Hz), 3.63 (dd, $J = 4.2, 11.4$ Hz)
26	半胱氨酸	αCH	3.94 (t, $J = 6.0$ Hz)
27	乳糖	1-CH	5.19 (d, $J = 3.6$ Hz)
28	延胡索酸	CH	6.53 (s)
29	酪氨酸	3 or 5-CH, 2 or 6-CH	6.85 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.18 (d, $J = 8.4$ Hz)
30	苯丙氨酸	2 or 6-CH, 3 or 5-CH	7.33 (d, $J = 6.6$ Hz), 7.35 (d, $J = 7.2$ Hz), 7.39 (d, $J = 7.8$ Hz)
31	腺嘌呤	CH	8.18 (s)
32	肌昔	CH	8.22 (s)
33	甲酸	CH	8.47 (s)

小, 成分结构较稳定; 三斑海马化学成分则与线纹海马、大海马存在较大差异。

2.2.2 PLS-DA 分析与 OPLS-DA 分析 结合数据整体性质, 有监督性进行分析, 将各组数据组内差异降低、弱化, 突出组间变异规律, 进行 PLS-DA 法分析^[18]。得到线纹海马、大海马、三斑海马化学

成分 PLS-DA 分析结果如图 3 所示, 3 个品种间个体能够在三维立体空间明显区分, 表明其化学成分存在显著性差异。采用排序检验对模型进行验证, 得到右端单个点处于同色最高位置, 说明随机排列产生的 R^2 、 Q^2 均小于原始模型, 且蓝色散点部分的回归线截距为负值, 承认模型有效性。

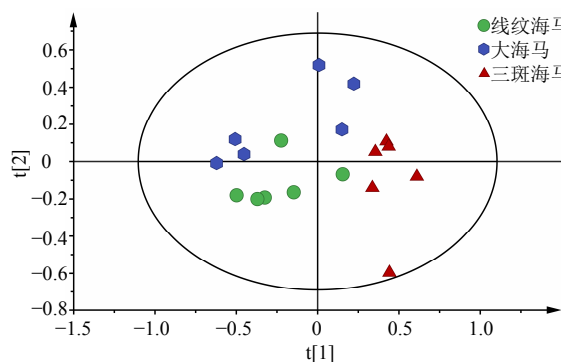


图 2 线纹海马、大海马、三斑海马的 PCA 散点图

Fig. 2 PCA score plots of *H. kelloggi*, *H. kuda*, and *H. trimaculatus*

在 PLS-DA 基础上结合正交信号, 进一步去除不相关差异, 将分组差异最大化, 采用 OPLS-DA 法比较分析不同品种海马化学成分, 集中表现相关信息, 所得结果如图 4 所示, 模型验证结果见图 5。通过 S-plots 找出造成组间差异 VIP 值大于 1 的积分数据, 结合两组单变量方差 *t* 检验 ($P < 0.05$), 寻找具有显著性差异的化学成分 (图 6), 并获得其变化趋势。3 个品种海马间差异性化学成分如表 2 所示, 谷氨酸、甘油在每组比较中都存在显著性差异, 且线纹海马与大海马差异性化学成分种类较少, 而多数氨基酸, 如异亮氨酸、甲硫氨酸、羟脯氨酸、脯氨酸、半胱氨酸等都是三斑海马与线纹海马、大海马之间存在显著性差异的成分, 对造成品种间差异做出较大贡献。

3 讨论

本研究采用 NMR 代谢组学技术对不同品种海马化学成分差异进行比较, 结合多元统计分析, 得到大海马相比于线纹海马, 谷氨酸、天冬氨酸、甘

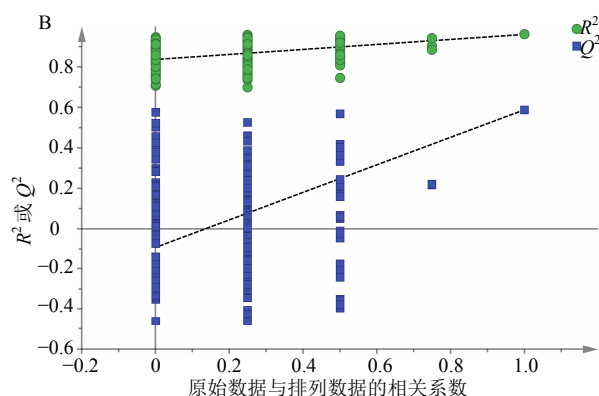
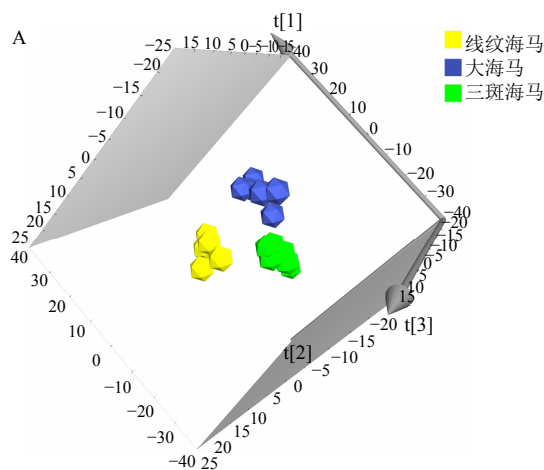
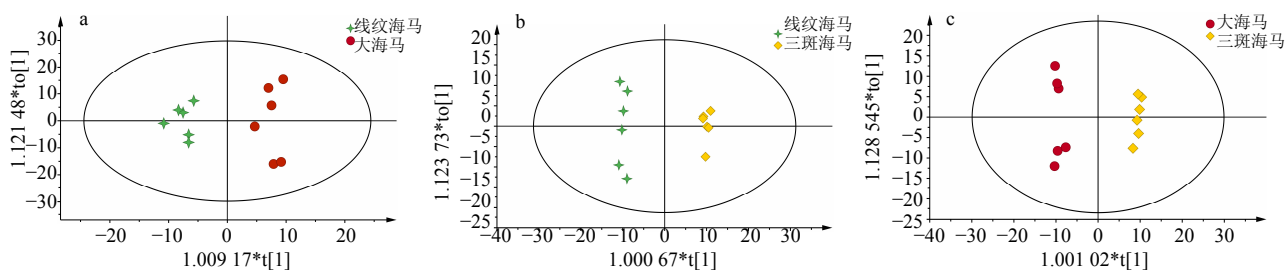


图 3 线纹海马、大海马、三斑海马 PLS-DA 3D 散点图 (A) 及模型验证图 (B)

Fig. 3 3D PLS-DA score plots (A) and permutation test model validation plots (B) of *H. kelloggi*, *H. kuda*, and *H. trimaculatus*

油含量显著降低, 而其他化学成分则较为接近; 三斑海马相比于线纹海马、大海马, 异亮氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、羟脯氨酸、脯氨酸、精氨酸、半胱

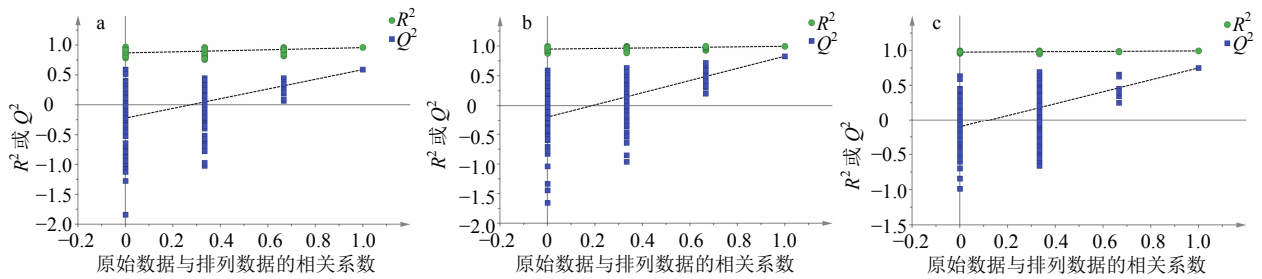


a-线纹海马、大海马 OPLS-DA 得分图 b-线纹海马、三斑海马 OPLS-DA 得分图 c-大海马、三斑海马 OPLS-DA 得分图

a-OPLS-DA score plots of *H. kelloggi* and *H. kuda* b-OPLS-DA score plots of *H. kelloggi* and *H. trimaculatus* c-OPLS-DA score plots of *H. kuda* and *H. trimaculatus*

图 4 线纹海马、大海马、三斑海马 OPLS-DA 得分图

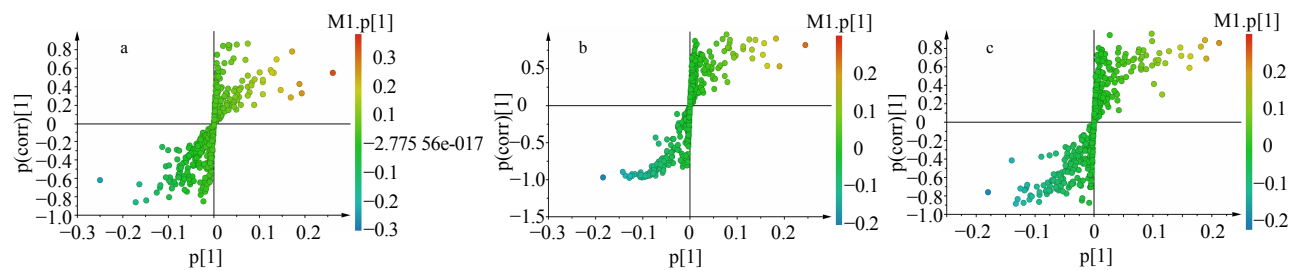
Fig. 4 OPLS-DA score plots of *H. kelloggi*, *H. kuda*, and *H. trimaculatus*



a-线纹海马、大海马 OPLS-DA 模型验证图 b-线纹海马、三斑海马 OPLS-DA 模型验证图 c-大海马、三斑海马 OPLS-DA 模型验证图
a-permutation test model validation plots of OPLS-DA on *H. kelloggi* and *H. kuda* b-permutation test model validation plots of OPLS-DA on *H. kelloggi* and *H. trimaculatus* c-permutation test model validation plots of OPLS-DA on *H. kuda* and *H. trimaculatus*

图 5 线纹海马、大海马、三斑海马 OPLS-DA 模型验证图

Fig. 5 Permutation test model validation plots of OPLS-DA on *H. kelloggi*, *H. kuda*, and *H. trimaculatus*



a-线纹海马、大海马 S-plots 图 b-线纹海马、三斑海马 S-plots 图 c-大海马、三斑海马 S-plots 图
a-loading S-plots of *H. kelloggi* and *H. kuda* b-loading S-plots of *H. kelloggi* and *H. trimaculatus* c-loading S-plots of *H. kuda* and *H. trimaculatus*

图 6 线纹海马、大海马、三斑海马 S-plots 图

Fig. 6 Loading S-plots of *H. kelloggi*, *H. kuda*, and *H. trimaculatus*

表 2 线纹海马、大海马、三斑海马差异性化学成分

Table 2 Significantly different components of *H. kelloggi*, *H. Kuda*, and *H. trimaculatus*

成分	线纹海马 vs 大海马	成分	线纹海马 vs 三斑海马	成分	大海马 vs 三斑海马
谷氨酸	↓	异亮氨酸	↓	异亮氨酸	↓
天冬氨酸	↓	缬氨酸	↓	亮氨酸	↓
甘油	↓	丙氨酸	↑	精氨酸	↓
		甲硫氨酸	↓	甲硫氨酸	↓
		谷氨酸	↓	乙酸	↑
		羟脯氨酸	↓	谷氨酸	↓
		脯氨酸	↓	羟脯氨酸	↓
		二甲基甘氨酸	↑	脯氨酸	↓
		牛磺酸	↑	牛磺酸	↑
		甘油	↑	甘氨酸	↑
		精氨酸	↓	甘油	↑
		鸟氨酸	↑	半胱氨酸	↓
		半胱氨酸	↓		
		乳酸	↑		

↓-含量降低 ↑-含量升高

↓-decrease ↑-increase

氨酸含量降低,呈显著性差异,牛磺酸、甘油等成分则显著上升,品种间化学结构组成存在较大差异,质量不一。氨基酸是蛋白质基本组成单位,异亮氨酸、亮氨酸及甲硫氨酸作为人体必需氨基酸,只能依靠食物获得对机体进行维护、保养;精氨酸则能够调节免疫细胞活性,增强机体免疫力^[19],还能通过一氧化氮途径调节激素和生精细胞的凋亡影响精子形成和发生^[20],多种氨基酸共同作用,发挥更广泛的生化效应,可能影响海马补肾壮阳功效。通过代谢组学分析,比较不同品种间化学成分,评价其质量差异。

本研究前期还对《中国药典》2015年版收载的刺海马、小海马进行核磁共振氢谱分析,得到品种个体间谱图参差不齐,表明这2个品种海马组内个体间化学成分存在较大差异,其异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、甘氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、乳酸、乙酸、胆碱、甘油等成分含量不一,组内均一性较差。因此,选择线纹海马、大海马、三斑海马用于生产更有利于保证产品稳定性;而基于中医学对动物药“血肉有情之品”的认识^[21],同气相求,选择3个品种中化学成分含量较多的品种,更有利于提高产品质量,增强补益效果。

有研究^[22]认为食物的获取对海马生活史会造成很大程度影响,5个不同品种海马在中国四大海域都有不同程度的分布,四大海域从北至南跨越了暖温带、亚热带、热带3个季风气候区,环境条件不同,必然会对生长其中的海马生活条件产生差异,影响其食物来源,进而对海马自身成分造成差异。由此,分析本研究所得结果可能的原因:(1)与资源分布有关,尽管不同品种海马在多个海域都有存在^[23],但资源分布存在差异,分布较为集中的品种,市场来源多为固定海域,化学成分较稳定,而分布较分散的品种,市场来源可能为不同海域混杂,导致品种内差异较大;(2)与环境耐受有关,海马有一定适应环境的能力^[24],但不同品种海马对环境的耐受程度不一定相同,刺海马、小海马可能更易受环境条件影响,造成机体差异,导致不同来源的同品种个体间质量差异较大,而线纹海马、大海马、三斑海马则受物种间基因差异影响更大,品种差异占据主要地位;(3)生长发育存在差异,不同发育阶段可能也会导致海马化学成分异同。

本研究采用核磁代谢组学技术,从整体水平比较不同品种海马化学成分,能够在一定程度对海马

药材质量加以控制,评价品种间差异,找到存在显著性差异成分,得到有益效果。在此基础上,本课题组还将结合市场收售现状,比较不同规格海马商品药材化学成分,让市场依个体大小区分售价有据可循,为临床选择用药提供更多理论基础。且核磁共振技术有检测灵敏度低的问题,后续将结合多种科学技术,检测、分析不同极性提取成分,从不同角度深化剖析样本化学成分。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈维宁,于淑敏,李耀辉,等. 海马提取物中氨基酸和微量元素含量分析 [J]. 潍坊医学院学报, 1997, 19(1): 25-26.
- [3] 朱炎坤,余幸嘉,方飞. 海马提取物中氨基酸种类分析 [J]. 仪器仪表与分析监测, 2005(2): 30-31.
- [4] 杨毅,王真,顾艳玲,等. 短刺海马的化学成分研究 [J]. 中国药房, 2014, 25(19): 1780-1782.
- [5] 宿宇婷,徐永健. 药用大海马的养殖与野生类群脂肪酸组成与差异性分析 [J]. 中国海洋药物, 2015, 34(4): 7-12.
- [6] Shen Q, Dai Z, Huang Y W, et al. Lipidomic profiling of dried seahorses by hydrophilic interaction chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2016, 205: 89-96.
- [7] 赵珊,王鹏程,冯健,等. 代谢组学技术及其在中医药研究中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 756-765.
- [8] 黄晓晨,宿树兰,郭建明,等. 代谢组学在中医药若干科学问题研究中的应用与思考 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 147-153.
- [9] 王斯婷,李晓娜,王皎,等. 代谢组学及其分析技术 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1792-1799.
- [10] 许国旺,路鑫,杨胜利. 代谢组学研究进展 [J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(6): 701-711.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 那丽丹,陈建丽,秦雪梅,等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的阿胶化学成分差异性分析方法初探 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2573-2579.
- [15] Boffo E F, Tavares L A, Ferreira M M C, et al.

- Classification of Brazilian vinegars according to their ^1H NMR spectra by pattern recognition analysis [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2009, 42(9): 1455-1460.
- [16] Zheng P, Gao H C, Li Q, *et al.* Plasma metabonomics as a novel diagnostic approach for major depressive disorder [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(3): 1741-1748.
- [17] 贾伟. 医学代谢组学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011.
- [18] 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.
- [19] 刘兆金, 印遇龙, 邓敦, 等. 精氨酸生理营养研究 [J]. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27(4): 54-57.
- [20] 贺丽萍, 罗红梅, 李美香, 等. 一氧化氮途径对大鼠精子发生的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2002, 22(1): 88-91.
- [21] 邓明鲁, 曲晓波, 张辉, 等. 动物药的特点及长春中医药大学在动物药工作中取得的主要成就 [J]. *长春中医药大学学报*, 2008, 24(5): 489-491.
- [22] Kanou K, Kohno H. Early life history of a seahorse, *Hippocampus mohnikei*, in Tokyo Bay, Japan [J]. *Ichthy Res*, 2001, 48(4): 361-368.
- [23] 韩颂霖. 中国海马的分类、资源、利用与保护 [D]. 南宁: 广西师范大学, 2013.
- [24] 张世义, 伍玉明. 海马和鳗鲡 [J]. *生物学通报*, 2007, 42(11): 16-18.