

• 代谢组学专栏 •

中药材质量评价的挑战与代谢组学应用于中药材质量评价的研究进展

李震宇, 崔伊凡, 秦雪梅*

山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: 中药材是中医药防病治病最重要的物质手段, 其内在质量关乎中医药的临床疗效和安全用药。针对中药材质量优劣性评价的难点, 以黄芪、款冬花、柴胡等山西道地药材为研究对象, 探索了代谢组学技术在中药材质量优劣性评价中的应用。对近 10 年来代谢组学应用于中药材质量评价的研究进展进行总结, 并对其应用前景和下一步的研究重点进行展望, 以期中药材质量精准评价及质量标准的进一步提升奠定基础。

关键词: 代谢组学; 中药材; 质量评价; 中医药; 质量标准

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)10-2221-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.001

Challenge of quality evaluation of traditional Chinese medicinal materials and application progress on metabolomic approach in its quality valuation

LI Zhen-yu, CUI Yi-fan, QIN Xue-mei

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

Abstract: Traditional Chinese medicinal materials (TCMM) are the material basis for traditional Chinese medicine (TCM), and the quality of the herbals was closely related with the efficacy and safety of TCM in clinic. Aiming at the difficulty in the quality evaluation of TCMM, some genuine herbals in Shanxi province, such as *Astragali Radix*, *Farfarae Flos*, and *Buplerui Radix*, were used as example, to investigate the application potential of the metabolomic approach. In order to lay the foundation for the accurate quality evaluation and further improvement of quality standard of TCMM, the studies in the recent ten years were summarized, and the prospect as well as the future research focus was also discussed.

Key words: metabolomics; traditional Chinese medicinal materials; quality evaluation; traditional Chinese medicine; quality standard

中医药是中华民族的文化瑰宝, 为中华民族的繁荣昌盛做出了重要贡献。中药材是中医药防病治病最重要的物质手段, 其本身的内在质量直接关乎中医药的临床疗效和安全用药。化学成分是中药材发挥药效作用的物质基础, 与化学合成药物不同, 中药材是由多种化学成分构成的复杂体系, 其特点是化学成分种类繁多、结构多样、含量差异大, 所包含的成分既有活性成分、协同成分, 还有无效成分甚至毒性成分。这些成分都有可能因种质资源、掺伪、生态环境、栽培方式、采收时间、加工炮制、贮存条件等因素发生变化进而影响药材质量, 即中

药材的优劣性是客观、必然存在的, 这也一直是中药质量控制的难点。

作为一种特殊商品, 自古以来中药材形成了“看货评级, 分档议价”的经验质量评价方法, 即中药材商品规格。我国著名中药学家谢宗万提出“辨状论质”是中药材品种传统经验鉴别之精髓的观点。“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。其中大小、色泽、气味、质地等具有量化概念或程度的性状特征, 在判断药材质量优劣中一直发挥着重要作用,

收稿日期: 2018-02-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31770362, 31570346, 31270008, 30900118, 31100244); 山西省科技创新重点团队(201705D131028-17)

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

*通信作者 秦雪梅 Tel/Fax: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.com

是药材市场划分质量等级规格的基本依据^[1]。然而,目前对中药材“辨状论质”科学内涵的理论研究不足,尚未证明传统药材商品规格经验划分的科学性。此外,传统的“辨状论质”主要依靠外观性状特征,其指标难以客观准确的量化,导致经验传承困难和评判准确性较差。

现行的中药材质量控制模式主要依靠有效(指标)成分含量测定和指纹图谱技术,与传统的外观性状评价相比,新技术的发展极大地提高了中药材的可控性。然而,对有限成分的含量测定并不能全面、准确地反映药材质量的优劣;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,无法将相似度与优劣性进行关联。因此,如何建立基于化学或生物分析模式的中药材优劣性评价方法一直是中药质量控制的研究热点。国内外研究人员在这方面也开展了大量的创新性研究,如刘昌孝院士^[2]提出了中药质量标志物、肖小河课题组^[3-4]提出了品质综合指数、效应当量等新概念,并进行了大量的探索性研究,为中药质量优劣性评价提供了新的思路,为提升中药材的有效性控制奠定了基础。

由于中药具有多成分、多靶点、协同作用的特点,所以应将中药所含的全部化学成分作为一个整体进行质量评价。代谢组学技术是近 10 年来发展起来的新型组学技术,是系统生物学的重要组成部分。药用植物的代谢产物在时间和空间上具有高度动态性,种类繁多、结构迥异,而代谢组学技术的发展为中药质量研究提供了新的思路。代谢组学技术的最大优势在于不仅能通过样本的分组聚类情况客观、准确地反映样本之间的均一性和差异性,更重要的是还能通过多元统计分析确定引起组间差异的一群差异性成分。因此,在中药材质量评价中,代谢组学技术与指纹图谱技术具有明显的互补性。2008 年秦雪梅教授在荷兰莱顿大学留学期间,率先将代谢组学技术应用于柴胡质量均一性评价^[5],回国后在多项国家自然科学基金以及山西省级项目的支持下,针对中药材质量控制的难点问题,带领课题组成员以黄芪、款冬花、远志、黄芩等山西道地药材为研究对象,探索了代谢组学技术在中药材优劣性评价中的应用。

课题组研究工作大致分为 2 个阶段:第 1 阶段以中药的代谢组化学分析为主,主要是针对影响中药材质量的因素(如产地、种植方式、基原、掺伪、

采收期等)进行分析,并探索了代谢组化学分析在中药材传统商品规格等级科学内涵和中药材浸出物化学比较中的应用;第 2 阶段针对中药材的优劣性评价,主要探索代谢组化学分析与其他技术的结合,如与药理药效指标、给药后内源性代谢物以及分子生物学(包括生物合成途径关键酶、关键基因、转录组学等)的结合。本文对课题组近 10 年的研究工作进行分析,以期对中药质量的有效性评价及标准提升奠定基础。

1 代谢组化学分析

中药材是典型的化学复杂体系,药材质量的优劣与化学成分的积累和变化密切相关。在这一阶段,本课题组主要采用代谢组化学分析手段对影响中药材质量的关键因素,如种质资源、生长环境、栽培与炮制加工方式等进行分析。

1.1 代谢组学分析基原对药材质量的影响

多基原药材在《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)中广泛存在,来源于 2~3 种,甚至 4 种或 5 种的多基原情况约占《中国药典》药材品种的三分之一。多基原现象的存在会影响药材的化学差异,进而对质量优劣产生较大影响。

柴胡是中医临床常用中药材,《中国药典》2015 年版规定柴胡来源于伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根,前者药材习称为“北柴胡”,后者习称为“南柴胡”或“红柴胡”。柴胡在我国分布广泛,但野生柴胡资源面临枯竭,家种柴胡主要分布于甘肃、山西、陕西、河北、内蒙古等地。针对柴胡多基原、产地分布广的特点,本课题组收集了 67 份柴胡药材,采用核磁共振(NMR)技术建立了柴胡药材的核磁指纹分析方法,鉴定了 34 个代谢产物,多元统计分析结果显示,北柴胡和红柴胡化学组成明显不同,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^[5]。进一步采用 GC-MS 代谢组学技术对北柴胡和红柴胡的挥发油组成进行了分析,结果显示,北柴胡与红柴胡不仅在挥发油含量上差别较大,组成上也有很大差别^[6]。由于北柴胡和红柴胡均是《中国药典》的法定品种,如果不加以区分混用,必然对中药材的临床疗效发挥产生一定影响,为保证中医药临床疗效,2 种基原柴胡药材的质量差异和优劣状况还需要进行系统评价。

黄芪来源于豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪

A. membranaceus (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。四川产的同属植物梭果黄芪 *A. ernestii* Comb.、多花黄芪 *A. folridus* Benth.、金翼黄芪 *A. chrysopterus* Bge., 统称为川黄芪, 已被收载入四川省中药材地方标准。目前市场上的川黄芪以梭果黄芪为主, 其功能主治与《中国药典》中黄芪的描述基本一致, 在四川药用历史悠久, 在部分地区作为黄芪的代用品使用。红芪为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的干燥根, 主产于甘肃陇南地区。传统中医理论认为黄芪和红芪的性味、归经、功效和主治基本相同, 我国西北一些地方曾将红芪作为黄芪使用, 中国的台湾、香港、澳门及东南亚一些地区认为红芪是黄芪的优质品种。《中国药典》1977 年版曾将红芪、蒙古黄芪与膜荚黄芪作为正品黄芪的三大来源, 但之后各版《中国药典》将红芪单列。本课题组采用代谢组化学分析对黄芪的多基原状况以及存在地方代用品的现象进行研究^[7-9], 结果显示蒙古黄芪和膜荚黄芪的种间差异不大, 而种植方式对黄芪品质的影响较大; 此外, 虽然蒙古黄芪、川黄芪和红芪三者功效接近, 但化学成分差异较大, 尤其体现在皂苷类成分。说明《中国药典》将黄芪与红芪分列, 且不收载梭果黄芪是合理的, 但三者之间功效的相似性以及功效与化学成分的相关性还需进行系统研究。

1.2 代谢组学分析产地、种植方式对药材质量的影响

不同的药材物种对气候、土壤有着不同的要求, 纬度、海拔高度、地形和地貌等地理、生态因素, 都会通过光照、气温、土壤和降水等因素影响中药材的生长和质量。道地药材是指经实践证明质量优、疗效高、地域性强的中药材, 如吉林人参、内蒙古甘草、辽宁细辛、云南三七、山西黄芪, 四川川芎、川乌、川贝母, 重庆黄连等。也有药材对环境的要求不高, 分布区域广泛, 如柴胡、黄芩等广泛分布于我国西北、华北各省。近年来, 随着中成药生产规模的扩大, 为解决中药材供应短缺问题, 各地广泛栽培引种, 中药材的道地性逐渐淡化, 对药材质量产生一定的潜在影响。

款冬花为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 具有润肺下气、止咳化痰的功效。目前款冬植物主要分布于河北、山西、内蒙古、陕西等省, 商品款冬花药材来源包括野生品和栽培品 2 种, 近年来野生资源的枯竭, 款冬花商品药材主要来源于栽培品。款冬花栽培品目前主要产于甘肃的漳县、

陇西、渭源, 河北蔚县, 内蒙古通辽等地; 而野生品零星分布于山西北部、甘肃、陕西等地。为了明确不同产地款冬花的质量差异状况, 本课题组采用 NMR 代谢组学技术对 21 份不同来源款冬花药材进行化学比较^[10], 结果显示款冬花药材的质量与产地分布关系不大, 而栽培品和野生品之间存在一定的差异, 野生品中咖啡酸、绿原酸、芦丁、款冬酮等次级代谢产物含量高于栽培品, 这与传统经验认为的野生品质量较优一致。肝毒性吡咯里西啶生物碱肾形千里光碱 (senkirkine) 在不同来源款冬花药材中也存在较大差异, 相关性分析结果显示该成分与 3,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、山柰酚类似物等活性成分存在正相关性。

此外, 本课题组还研究了产地对北柴胡^[5]、蒙古黄芪^[7,11]等药材质量的影响, 发现北柴胡药材整体均一性较好, 产地、种植方式等对其影响较小; 蒙古黄芪质量与产地关系不大, 而种植方式对其有较大影响。

1.3 代谢组学分析采收期对药材质量的影响

《名医别录》中提到“其根物多以二月、八月采者, 谓春初津润始萌, 未充枝叶, 势力淳浓也; 至秋枝叶干枯, 津润归流于下也。春宁宜早, 秋宁宜晚。花实茎叶, 各随其成熟尔”。《用药法象》也提及“凡诸草木昆虫, 产之有地, 根叶花实, 采之有时, 失其地则性味少异, 失其时则性味不全”。“三月茵陈四月蒿, 五月砍来当柴烧”则更是形象地说明了采收期对植物药材质量有很大的影响。

黄芩为唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效。黄酮类化合物是黄芩的主要成分, 包括黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素、黄芩新素等。《中国药典》规定黄芩于春、秋二季采挖, 民间也流传“知母黄芩全年刨, 唯有春秋质量高”, 说明黄芩的质量与采收期有着密切的关系。本课题组以 1 年生和 2 年生的黄芩为研究对象, 采用 UHPLC-MS/MS 代谢组学对其化学成分种类和含量的动态变化进行了分析^[12], 结果显示不同采收期的黄芩化学成分呈现规律性的变化。若以黄芩素等黄酮苷元类成分为目标成分, 建议采收时间为 5 月; 若以黄芩苷等黄酮苷类成分为目标成分, 建议最佳采收时间在 7~8 月。该研究结果为根据黄芩药材的不同用途确定最佳采收期提供了依据。

款冬为多年生草本，于种植当年立冬前后、花蕾尚未出土苞片呈紫红色时采收。在生产实践中也有种植当年来不及采收，而在次年春天花尚未出土时采挖的，但花开后则不能入药。本课题组首先采用基于 NMR 和 GC-MS 的代谢组学技术研究了款冬花花蕾的动态发育特征^[13-14]，然后对种植当年冬天采收的花蕾（F1）、次年春天采收的花蕾（F2）及盛花期的花（F3）进行了化学组成和止咳化痰作用比较^[15]，结果显示花开后款冬花的化学组成发生较大变化，而且无止咳化痰作用；款冬花蕾 F1 和 F2 的化学组成也有一定差异，但止咳化痰作用接近，即次年春天采收对药材质量影响不大。该研究为款冬花采收期的确定提供了依据。

1.4 代谢组学分析掺伪对药材质量的影响

以伪品冒充正品或掺入伪品的现象主要集中在正品来源较少、资源稀少的中药材品种，多为同属近似种或性状相似的品种。如非《中国药典》品种藏柴胡、锥叶柴胡等冒充柴胡，滇枣仁、枳椇子冒充酸枣仁等。药材掺伪会对药材的有效性和安全性产生严重影响。

驴皮为马科动物驴 *Equus asinus* L. 的干燥皮或鲜皮，从宋代开始就一直是制备传统中药阿胶的原料。在唐代以前制作阿胶的原料以牛皮为主，兼用猪、驴、马等皮，宋代转为驴皮为主。近年来，阿胶市场需求快速增长，驴皮货源紧缺导致市场上劣质皮甚至伪品（如马 *E. caballus* Linn. 皮、骡 *E. ferus × asinus* 皮）等纷纷出现，严重影响阿胶及其复方制剂产品的质量。本课题组采用 NMR 代谢组学技术对驴皮及其伪品（马皮、骡皮）进行鉴别。驴皮及其伪品去毛后提取水溶性成分后进行核磁共振氢谱（¹H-NMR）分析，共指出 42 种水溶性成分。结果显示，骡皮和马皮与驴皮化学组成明显不同，与驴皮相比，马皮中含较多醋酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸，而乳酸、丝氨酸、焦谷氨酸、肌酸较少；骡皮中含较多乳酸、肌酸、丙氨酸、胆碱，而甘油、醋酸较少。该研究为阿胶原料驴皮与其伪品的真伪鉴别研究提供了依据^[16]。

1.5 基于代谢组学的新品种选育对药材质量的影响

优良的品种是生产优质药材的基础。只有选育出优良的栽培种，才能从源头上对中药材的质量把好关。远志是我国常用的传统大宗中药材之一，具有安神益智、交通心肾、祛痰、消肿等功效，其主要化学成分为皂苷类、吡啶类和糖酯类。远志来源

于远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *P. sibirica* L. 的干燥根，其中又以远志为目前商品远志药材的主要来源。晋远 1 号（JY1）是山西省农业科学院经济作物研究所选育的第 1 个远志新品种，已于 2012 年通过了山西省品种审定委员会的审定，而汾远 2 号（FY2）是该研究所近年来选育的第 2 个远志新品种。课题组采用基于 UPLC/Q-TOF MS 代谢组学技术对这 2 个远志新品种与传统汾阳产远志（FY）进行了比较^[17]。结果显示，JY1 及 FY2 与 FY 相比均存在一定化学差异，蔗糖酯类（sibiricoses A5、tenuifoliside B 等）及低聚糖类（tenuifoliose K 等）对主成分分析（PCA）分类贡献较大；FY2 与 JY1 也存在一定化学差异，其差异体现在蔗糖酯类（tenuifoliside B、tenuifoliside A 等）及低聚糖类（tenuifoliose A 等）。JY1 与 FY2 这 2 个远志新品种在化学物质基础上存在一定差异，而且各具优势，为今后远志的良种定向选育（即以体内某种或某几种活性物质含量高低为依据）提供了研究依据。

1.6 代谢组学分析炮制辅料对中药炮制品质量的影响

炮制是中医药的特色之一，是中药材增效减毒的重要手段，炮制品的质量关乎中医药临床疗效的发挥。在众多的炮制手段中，中药醋制历史源远流长，系将净药材或生片与定量的米醋混合后，稍闷润，使米醋渗入药材组织内部，再经炒制、煮制或醋淬制等加热处理的一种炮制方法。中药醋制一般选择米醋，米醋是由米、麦、高粱及酒糟等酿制而成。《本草纲目》云：“醋有数种，有米醋、麦醋、曲醋、糠醋、糟醋、桃醋……唯米醋二三年者入药，余之可啖，不可入药”。现行的《中国药典》只规定醋制应选择米醋，但目前国内市场米醋种类繁多，炮制用醋的选择可能会对醋制品质量产生较大影响。

本课题组前期曾对不同种类的米醋进行过化学比较，发现米醋中除了醋酸之外，还含有多种有机酸、氨基酸等，且不同种类的醋存在较大化学差异^[18]。为了分析炮制用醋的种类对炮制品质量的影响，本课题组分别以 2 种米醋为辅料制备了醋柴胡，并采用代谢组学技术对柴胡醋制前后的化学成分及药理作用进行了比较^[19]。在柴胡核磁指纹图谱中共检测到 44 个代谢物，多元统计分析显示柴胡和醋制柴胡可以明显区分，柴胡经醋制后柴胡皂苷 b₁、柴

胡皂苷 b_2 、乙酸、苹果酸等含量升高, 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、蔗糖等含量降低, 而且陈醋制柴胡(S-VBRB)和米醋制(R-VBRB)柴胡也存在一定差异。HPLC 测定结果显示醋制后柴胡皂苷 a 和 d 含量降低, 柴胡皂苷 b_1 和 b_2 的含量升高, 2 种醋制柴胡中 4 个皂苷的含量也存在着一定差异。进一步采用四氯化碳小鼠肝损伤模型比较了柴胡生品及 2 种醋制品的保肝作用, 柴胡生品及 2 种醋制品均有明显的肝保护作用, 表现为病理病变的改善, 生化指标丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平的回调, 即醋制后柴胡保肝作用增强, 且陈醋制柴胡的效果略优。

此外, 本课题组还研究了炮制用醋对醋白芍^[20]、醋细辛^[21]质量的影响, 结果均显示炮制用醋的种类对醋制有较大的影响。为了保证醋制饮片的标准, 需要对炮制用醋的影响进行深入研究, 进而规范炮制用醋的种类。

1.7 代谢组学分析中药浸出物的化学组成

浸出物是中药材质量标准的重要指标, 根据药材化学成分的不同, 包括水溶性浸出物、醇溶性浸出物和挥发性醚浸出物。目前的药材质量评价仅对药材浸出物进行量的分析, 因此可能不同来源药材的浸出物含量接近, 但浸出物的化学组成却未必相同。中药材的浸出物也属于多成分复杂体系, 本课题组采用 NMR 代谢组学技术对黄芪、款冬花浸出物的化学组成进行了比较, 为扩展浸出物在中药材质量评价中的应用提供了一种新的思路。

水溶性浸出物是黄芪质量评价的重要指标。本课题组对山西野生黄芪和甘肃栽培黄芪的浸出物含量和化学组成进行了比较。参照《中国药典》方法测定 2 种黄芪的浸出物含量, 栽培黄芪的浸出物质量分数(37.80%)明显高于野生黄芪(32.13%)。然后对浸出物进行核磁共振分析, 核磁图谱显示黄芪浸出物中含有的主要成分为蔗糖, 此外还检测到氨基酸、有机酸等 18 种物质; 多元统计分析结果显示, 山西野生黄芪浸出物中含有较多的胆碱、琥珀酸、柠檬酸、谷氨酸、牛磺酸、天冬氨酸, 甘肃栽培黄芪浸出物中含有较多的蔗糖、精氨酸、富马酸, 说明山西野生和甘肃栽培黄芪的浸出物不仅在含量上有差别, 而且在化学组成上也有显著差异^[22]。

本课题组还对 4 个不同产地款冬花药材的醇溶性浸出物进行了比较, 结果显示不同产地款冬花浸出物含量接近, 但化学组成明显不同。沁县样本含

有较多的绿原酸、咖啡酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸; 张家口样本中含有较多的蔗糖、款冬酮、款冬花素; 和政样本中含有较多的腺嘌呤、乙基葡萄糖、 7β -(3-ethyl-cis-crotonoyloxy)-1 α -(2-methylbutyryloxy)-3(14)-dehydro-Z-notonipetranone(EMDNT), 说明不同来源的款冬花药材虽然浸出物含量接近, 但在化学组成上存在显著差异^[23]。

1.8 代谢组学分析传统商品规格等级科学内涵

简单易行、直观明了的性状特征是药材传统商品规格等级制定的依据, 也是药材市场交易定价的基础。然而现有研究尚未证明药材传统商品规格等级的科学内涵, 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药材。

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。传统药用经验认为紫色花蕾的质量优于黄色花蕾, 《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 NMR 的代谢组学技术对不同性状款冬花药材进行了化学分析^[24], 以期从化学角度阐明款冬花药材性状分级的科学性。采用两相提取法(三氯甲烷-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。通过核磁共振指纹图谱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的化学差异客观存在, 体现在紫色花蕾中 3,5-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、咖啡酸、山柰酚类似物、款冬酮等次级代谢产物和苏氨酸、脯氨酸、磷脂酰胆碱、肌酐等初级代谢产物水平高于黄色花蕾。课题组前期研究发现, 3,5-二咖啡酰奎宁酸、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, 也为采用代谢组学技术阐明药材传统商品规格划分的科学性和药材的优劣性评价提供了新的思路。

从上述结果可以看出, 在中药材的化学分析方面, 代谢组学具有明显的优势, 可客观、准确、快速地确定中药材中因种质资源、掺伪、生态环境、栽培方式、采收时间、加工炮制、贮存条件等因素而发生变化的一群差异成分, 既包括次级代谢产物, 也包括初级代谢产物, 而正是这些成分的变化决定了药材的优劣。一般认为中药材的活性成分为次级

代谢产物,其质量评价指标也多为次级代谢产物。然而,中药材中还存在着大量的初级代谢产物,如氨基酸、糖类、有机酸和脂肪酸等。按照中医传统,中药材多以水煎入药,在煎出次级代谢产物的同时,大量初级代谢产物也被一同煎出。这些大量的初级代谢产物不仅影响药材的化学均一性,而且可能影响活性成分在煎煮过程中的溶出或体内吸收。有研究报道^[25],一些氨基酸、有机酸和糖类可能作为天然低共溶溶剂(natural deep eutectic solvents, NADES)大量存在于生物细胞中。植物细胞中次级代谢产物大多为中等极性的化合物,如芦丁、槲皮素等,其高浓度时既不溶于水也不溶于脂类(细胞膜),而该研究发现芦丁在NADES中的溶解度是水中的50~100倍。因此,药用植物的初级代谢产物可能与中药材的药效无直接关系,但其可能发挥的协同药效作用及其对药材质量的影响需要进一步深入研究。

2 代谢组学与其他技术的整合分析

中药材的生物效应即药效学指标,是中药材优劣性评价最直接的反映。因此,通过代谢组学技术对中药材的整体物质组进行化学表征,获得与产地、种植方式、采收期等影响药材质量因素或规格等级相关的化学成分后,应进一步与生物效应进行关联分析。此外,中药材次级代谢产物的积累与其生物合成途径密切相关,代谢组学化学分析还应与分子生物学进一步结合用于生物合成途径分析和功能基因挖掘。

2.1 代谢组化学分析与药效学指标的关联分析

活性成分是中药质控指标选择的重要依据。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。但中药材所体现的药效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材的药效物质基础,更不能确定协同作用成分。将代谢组化学分析与药效学指标关联,可进一步确定一组与活性相关的化学成分,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,所确定的一组活性成分群可用于中药质量的精准评价。

现行的《中国药典》以专属性成分款冬酮作为款冬花药材的质量评价指标。本课题组采用NMR代谢组学分析方法对款冬的花蕾、叶、根进行了化

学成分和药效学比较^[26]。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、倍半萜类等次级代谢产物,而根中含有较多的亮氨酸、蔗糖等初级代谢产物。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)对代谢组化学分析与药效学数据进行相关性分析,结果显示,绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸等成分可能与款冬的止咳作用密切相关。这些成分随后被报道证实具有明显的止咳化痰作用^[27],说明这些成分应作为款冬花的质量控制指标成分。本研究通过相关性分析方法确定了款冬活性成分群,为中药活性成分研究提供了一种新的模式。与传统的活性导向分离方法比较,该模式快速高效,而且可体现中药协同作用特点,确定的活性相关成分既包括活性成分也包括协同成分,为中药材的全面质量控制提供了依据。

本课题组通过市场调查发现市售款冬花药材中往往掺有大量的花梗。课题组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^[28],结果显示其花蕾和花梗的化学组成明显不同,花蕾中含有较多的咖啡酸、绿原酸、芦丁、倍半萜类等次级代谢产物,而花梗中亮氨酸、异亮氨酸、蔗糖、甾体等成分含量较高。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。为了保证中医药临床应用安全有效,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的杂质限量。针对市场上出现的欧当归掺伪当归的现象,本课题组采用代谢组学技术对当归和欧当归进行了化学和药理作用比较^[29-30],结果发现欧当归和当归含有相似的化学成分,但在含量上存在显著的差异,虽然欧当归含有更高的阿魏酸和藁本内酯,但其补血作用却明显弱于当归。《中国药典》以阿魏酸作为当归的质量评价指标,掺伪欧当归后化学检测可能合格,但药效作用却会大大降低,影响当归临床疗效的发挥。提示应建立欧当归的专属性鉴别方法,用于其掺伪鉴别;另一方面阿魏酸和藁本内酯等一般认为的当归活性成分与其补血作用并非密切相关,当归的质量评价指标还需要进一步的深入研究。

2.2 代谢组化学分析与内源性代谢的关联分析

药效学差异是生物学差异最直接的评价方式,也是药材质量差异性评价中核心和关键所在。当传统的药理学指标敏感性较低时,可进一步通过代谢

组学技术的内源性代谢物(或标志物)用于不同来源中药材的药效学差异的辅助比较;当缺乏相应的药理学模型时,可对健康动物给药后的体液及脏器进行代谢组学分析,通过内源性成分的变化间接反映药物的生物效应差异。

黄芪是中医临床和中药工业常用药材。产于山西北部恒山山脉及其周边地区的野生或半野生蒙古黄芪俗称“恒山黄芪”,2 年生的育苗移栽黄芪主要种植于甘肃、内蒙,是目前主要的商品黄芪药材来源。这 2 种生长模式的黄芪在外观性状具有明显差异。本课题组采用基于 $^1\text{H-NMR}$ 的代谢组学技术对 2 种生长模式的黄芪进行了系统比较^[31],结果显示山西野生黄芪和甘肃移栽黄芪存在显著的化学差异。进一步将 2 种黄芪分别 ig 给予小鼠,并采用代谢组学技术对给药后小鼠的血液、肺、肝、脾进行比较,结果显示,给予黄芪后小鼠的内源性代谢物发生明显改变,与两者的化学差异相比,两种生长模式黄芪分别给药导致的体内差异不大,主要体现在血清、肝脏以及脾脏中的部分代谢物。黄芪对小鼠能量代谢、脂质代谢和胆碱代谢等代谢途径产生影响,2 种黄芪对机体代谢影响的差异主要体现在能量代谢,其中山西黄芪对能量代谢的促进作用略强于甘肃黄芪。此外,本课题组采用类似的思路比较了 3 批不同产地款冬花药材的化学和体内效应差异^[32]。

2.3 代谢组学与中药材代谢产物生物合成途径关键基因的关联分析

药用植物代谢产物的合成和积累与其生物合成途径密切相关,阐明中药活性成分的生物合成途径可进一步通过合成生物学实现中药资源的可持续利用。远志皂苷是远志中重要的次生代谢产物。本课题组采用基于 UPLC-Q-TOF MS 的代谢组学技术对远志不同部位(根、茎、叶和种子)的化学成分进行了比较,结果显示共有 7 个皂苷类成分在不同组织部位中含量有显著性差异。利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术筛选到 GAPDH 作为远志不同部位基因表达的内参基因,发现甲羟戊酸(MVA)途径在远志皂苷生物合成途径中比甲基赤藓糖醇磷酸化(MEP)途径具有更重要的作用。将 qRT-PCR 与代谢组学数据进行比较发现角鲨烯合成酶(SQS)、角鲨烯单加氧酶(SQE)以及 β -香树脂醇合酶(β -AS)与三萜类化合物的含量高度相关,推测可能与远志皂苷的生物合成密切相关^[33]。本研究

为使用基因工程过表达 SQS、SQE 和/或 β -AS 来增加远志三萜皂苷的产量提供了依据,也说明基于 UPLC/Q-TOF MS 的代谢组学技术与基因表达量分析相结合的方法可用于三萜皂苷生物合成的机制分析,并为远志功能基因的发掘提供有效信息。

3 结语与展望

本课题组近 10 年来对代谢组学技术在中药材质量评价中的应用进行了探索,研究对象以山西道地或优势药材为主,品种涉及黄芪、款冬花、远志、黄芩、当归、白芍、赤芍、驴皮、细辛、绿豆皮等。在代谢组化学分析方面,主要对基原、产地、种植方式、采收期、加工炮制、掺伪等影响药材质量的关键因素进行了分析,确定了一组与药材质量变化相关的化学成分群;通过款冬花化学成分与传统性状特征的相关性研究,为中药材传统商品规格等级的科学内涵研究提供了思路;对款冬花、黄芪浸出物的代谢组化学分析为扩展浸出物在中药质量评价中的应用提供了新的思路;在代谢组学技术与其他技术的结合方面,通过代谢组化学分析与药理药效学的结合,确定了与款冬花止咳化痰作用相关的一组活性成分,为其质量控制标志物的选择和精准质量控制提供了依据;通过代谢组化学分析与内源性代谢物的结合,为中药材的体内生物效应差异分析提供了新的思路;通过代谢组化学分析与分子生药学的结合,为远志皂苷的生物合成途径分析和功能基因挖掘奠定了基础。

本课题组通过近 10 年的研究,认为代谢组学技术可作为现有药材质量评价手段的有力补充。针对中药材质量评价面临的挑战,今后采用代谢组学技术应重点开展以下几方面的工作。

3.1 中药材质量控制指标成分研究

现行的《中国药典》中部分药材的质量控制指标缺乏专属性或与活性的相关性不大,如多种药材采用绿原酸为指标、白芍和赤芍均采用芍药苷为指标、板蓝根检测精氨酸的含量。课题组前期研究显示代谢组学技术在揭示中药的活性成分和专属性成分方面具有一定优势。

3.2 中药材质量差异性评价

由于中药材大多来源于植物,其化学组成容易受到多种因素的影响,即化学差异客观且存在,这样必然对其药效作用产生一定影响。课题组前期研究显示代谢组学技术不仅可以从化学组成的角度客观反映中药材的化学差异,更重要的是可以通过对内源性代

谢物的分析客观反映药效学或生物效应的差异。

3.3 中药材传统商品规格等级的科学性研究

中药材化学组成复杂而且容易受多种因素影响而波动,导致其优劣性是客观存在的。下一步将以传统的商品规格等级划分为基础重点开展中药材的优劣性评价。通过对不同规格或等级药材的代谢组化学分析,客观准确评价不同等级商品药材在化学组成上是否存在差异,揭示性状特征与化学成分的相关性;并以常规药效指标结合内源性代谢物的变化,分析不同等级的商品药材在生物学效应上是否存在差异,为进一步的修(制)定中药材等级标准提供依据。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [3] 张海珠,肖小河,王伽伯,等. 中药质量评控的第一要义: 效应当量一致性 [J]. 中草药, 2015, 46(11): 1571-1575.
- [4] 张定堃,王伽伯,杨明,等. 中药品质整合评控实践: 附子品质综合指数 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2582-2588.
- [5] 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(9): 926-933.
- [6] 章莎莎,邢婕,李震宇,等. 基于 GC-MS 代谢组学技术对不同品种柴胡挥发油的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 84-87.
- [7] Li A P, Li Z Y, Qu T L, *et al.* Nuclear magnetic resonance based metabolomic differentiation of different *Astragali Radix* [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(5): 363-374.
- [8] 焦美丽,李震宇,张福生,等. 基于分子标记和代谢组学技术的黄芪与红芪比较研究 [J]. 药学报, 2015, 50(12): 1625-1631.
- [9] 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]. 药学报, 2013, 48(10): 1595-1601.
- [10] 张争争,支海娟,秦雪梅,等. 基于 NMR 代谢组学技术的不同来源款冬花的化学比较 [J]. 药学报, 2015, 50(5): 599-604.
- [11] 熊一峰,万燕晴,李科,等. 山西恒生地区蒙古传统黄芪和移栽黄芪的质量差异研究 [J]. 中草药, 2017,

48(8): 1635-1643.

- [12] 庞溢媛,薛立英,郑艳红,等. 基于 UHPLC-MS/MS 代谢组学技术的不同采收期黄芩质量比较研究 [J]. 药学报, 2017, 52(12): 1903-1909.
- [13] 支海娟,孙海峰,支鹏,等. 基于核磁共振的植物代谢组学技术研究款冬花蕾动态化学成分变化 [J]. 植物研究, 2012, 32(4): 458-466.
- [14] 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特征分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 55-61.
- [15] Li J, Zhang Z Z, Lei Z H, *et al.* NMR based metabolomic comparison of the antitussive and expectorant effect of *Farfarae Flos* collected at different stages [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 150: 377-385.
- [16] 田俊生,那丽丹,向欢,等. 基于核磁代谢组学的驴皮与其伪品的鉴别研究 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 255-261.
- [17] 白璐,许晓双,张福生,等. 基于 UPLC/Q-TOF MS 代谢组学技术研究远志不同品种间的化学差异性 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1819-1824.
- [18] 李爱平,李震宇,邢婕,等. 核磁共振代谢组学检测食醋化学成分 [J]. 食品科学, 2013, 34(12): 247-253.
- [19] Li Z Y, Sun H M, Xing J, *et al.* Chemical and biological comparison of raw and vinegar-baked *Radix Bupleuri* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 165: 20-28.
- [20] 李震宇,范玛莉,秦雪梅. 基于 NMR 代谢组学技术的白芍及其醋制品的化学比较 [J]. 药学报, 2015, 50(2): 211-217.
- [21] 李艺,范玛莉,邢婕,等. 龟龄集中细辛特殊炮制工艺的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2385-2393.
- [22] 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]. 药学报, 2014, 49(1): 89-94.
- [23] Tian D, Li Z Y, Jia J P, *et al.* Characterization of *Farfarae Flos* by proton nuclear magnetic resonance fingerprinting and chemometrics [J]. *Anal Lett*, 2015, 48(1): 127-136.
- [24] 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]. 药学报, 2013, 48(11): 1692-1697.
- [25] Choi Y H, van Spronsen J, Dai Y T, *et al.* Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(4): 1701-1705.
- [26] 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(5): 158-164.
- [27] Wu Q Z, Zhao D X, Xiang J, *et al.* Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara* [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(7): 1117-1124.
- [28] Li Z Y, Zhi H J, Xue S Y, *et al.* Metabolomics profiling of the flower bud and rachis of *Tussilago farfar* with antitussive and expectorant effect on mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(1): 83-90.
- [29] Li Z Y, Zhang Z Z, Du G H, *et al.* Comparative analysis of Danggui and European Danggui using nuclear magnetic resonance-based metabolic fingerprinting [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 103: 44-51.
- [30] Zhang Z Z, Fan M L, Hao X, *et al.* Integrative drug efficacy assessment of Danggui and European Danggui using NMR-based metabolomics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 120: 1-9.
- [31] Li A P, Li Z Y, Sun H F, *et al.* Comparison of two different *Astragali Radix* by ¹H NMR based metabolomic approach [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(5): 2005-2016.
- [32] Li Z Y, Li J, Zhang Z Z, *et al.* NMR-based metabolomic analyses for the componential differences and the corresponding metabolic responses of three batches of *Farfarae Flos* [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2017, 165: 1-10.
- [33] Zhang F S, Li X W, Li Z Y, *et al.* UPLC/Q-TOF MS-based metabolomics and qRT-PCR in enzyme gene screening with key role in triterpenoid saponin biosynthesis of *Polygala tenuifolia* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): 1-15.