

• 药材与资源 •

基于植物代谢组学技术的干旱及盐胁迫对黄芩中黄酮类成分影响的研究

管仁伟^{1,2}, 郭瑞齐¹, 林慧彬^{1*}, 林建强^{3*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

3. 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266108

摘要: 目的 分析干旱及盐胁迫对黄芩 *Scutellaria baicalensis* 中黄酮类成分的影响。方法 运用超高压液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱 (UHPLC-QTOF-MS) 技术对不同干旱及盐胁迫处理组黄芩根部位的化学成分进行分析, 运用主成分分析 (principal components analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 和单变量分析 (univariate analysis, UVA) 的统计学方法对代谢组数据进行分析, 结合文献和二级质谱数据库, 依据 UHPLC-QTOF-MS 矩阵中的保留时间、质荷比及碎片离子对黄芩中的代谢产物进行分析鉴定, 筛选差异代谢产物。结果 共分析鉴定出 44 个黄酮类成分, 差异代谢物共筛选出 18 个黄酮类成分; 且主要黄酮类代谢产物相对定量值随干旱及盐胁迫程度增强呈现先升高后降低的变化趋势。结论 干旱及盐胁迫会引起黄芩黄酮类成分含量和差异成分种类的改变, 适度干旱胁迫促进黄芩黄酮类成分的合成积累, 但促进程度是有限的。

关键词: 黄芩; UHPLC-QTOF-MS; 干旱; 盐胁迫; 木犀草苷; 黄芩苷; 野黄芩苷; 木蝴蝶苷 B; 汉黄芩苷; 黄芩素; 植物代谢组学
中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1504-08

DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.026

Effects of drought and salt stress on flavonoids in *Scutellaria baicalensis* based on plant metabolomicsGUAN Ren-wei^{1,2}, GUO Rui-qi¹, LIN Hui-bin¹, LIN Jian-qiang³

1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

2. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266108, China

Abstract: **Objective** To analyze the effects of drought and salt stress on flavonoids in Huangqin (*Scutellaria baicalensis*). **Methods** The ultrahigh liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS) technique was used to analyze the chemical components of the roots of *S. baicalensis* in different drought and salt stress treatment groups. The principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) and univariate analysis (UVA) were used to analyze metabolome data, combined with literature mining and secondary mass spectrometry database, based on retention time, mass-to-charge ratio and fragment ion analysis and identification of metabolites in *S. baicalensis*, the differential metabolites were screened. **Results** A total of 44 flavonoid components were identified and 18 different flavonoid components were screened out; and the relative quantitative values of the main flavonoid metabolites increased first and then decreased with the degree of drought and salt stress change trend. **Conclusion** Drought and salt stress can change the content and the different types of flavonoids in *S. baicalensis*. Moderate drought stress promotes the synthesis and accumulation of flavonoids in *S. baicalensis*, but the degree of promotion is limited.

收稿日期: 2021-09-03

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2017MH023, ZR2018PH040); 国家重点研发计划 (2017YFC1701500, 2017YFC1701502, 2017YFC1701504, 2017YFC1702700, 2017YFC1702701); 中央本级重大增减支项目 (2060302); 国家标准化建设项目 (ZYBZH-Y-SD-33); 2017 年中医药公共卫生服务补助专项“全国中药资源普查项目”(财社[2017]66 号); 2018 国家中医药管理局全国中药资源普查项目 (GZY-KJS-2018-004); 泰山学者工程 (ts201511107); 山东省中医药科技发展计划 (2019-0987, 2019-0988, 2017-519)

作者简介: 管仁伟 (1985—), 男, 助理研究员, 研究方向为中药资源与质量控制。Tel: (0531)82949822 E-mail: guan369happy@163.com

***通信作者:** 林慧彬, 研究员, 博士研究生导师, 从事中药资源与质量控制研究。Tel: (0531)82949822 E-mail: linhuibin68@163.com

林建强, 教授, 博士研究生导师, 从事分子生物学研究。Tel: (0531)88365218 E-mail: jianqianglin@sdu.edu.cn

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; UHPLC-QTOF-MS; drought; salt stress; luteolin-7-*O*-glucoside; baicalin; scutellarin; wogonoside; wogonoside; baicalein; plant metabolomics

黄芩为唇形科 (Lamiaceae) 植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根^[1], 始载于《神农本草经》, 列为中品。黄芩具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效, 是传统经典名方及临床组方中的常用药味, 其临床功效与黄芩药材品质密切相关, 而黄芩药材的品质形成又与其栽培生长环境密切相关。目前, 黄芩栽培品已成为临床用药的主要来源, 黄芩种植区多位于干旱丘陵地带, 干旱及盐胁迫是影响黄芩生长最普遍的非生物逆境, 且对黄芩药材品质存在不同程度的影响。干旱在短时间内会使得植物应激合成大量的黄酮类物质来抵抗细胞氧化损伤^[2], 适度干旱有利于黄芩生物量向根部转移, 提高根生物量的分配比值, 但重度干旱会影响黄芩正常的生理生长^[3], 土壤含水量是影响黄芩 4 种黄酮类成分 (黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素) 含量的主要生态因子^[4]。而有关干旱及盐胁迫对黄芩药材黄酮类成分影响的全面分析报道极少。

黄酮类成分是黄芩的主要药效成分和品质表征, 干旱及盐胁迫是影响黄芩生长和药材品质的关键生态因子。目前利用植物代谢组学技术分析化学成分的种类及含量变化情况来探讨影响药材质量的因素, 已成为一种可行的技术方法和研究思路^[5-7]。因此, 本实验运用超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱 (UHPLC-QTOF-MS) 技术对不同干旱及盐胁迫处理组黄芩根部位的化学成分进行分析, 运用多元统计分析手段解析干旱及盐胁迫对黄芩黄酮类成分的影响, 为黄芩药材品质提升提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Nexera UHPLC LC-30A 型超高效液相色谱仪 (日本岛津公司), Triple TOF 5600 型高分辨质谱仪 (美国 AB Sciex 公司), Thermo Heraeus Fresco17 型微量冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), BSA124S-CW 天平 (德国 Sartorius 公司), JXFSTPRP-24 型组织研磨仪 (上海净信科技有限公司), 明澈 D24 UV 型纯水仪 (Merck Millipore), YM-080S 型超声仪 (深圳市方奥微电子有限公司), ST3000+ 型土壤水分速测仪 (德国 STEPS 公司)。

1.2 材料

黄芩材料为不同干旱及盐胁迫处理后的黄芩

根, 放入液氮速冻, 然后置于 -80°C 低温冰箱中保存。甲醇 (CNW Technologies, LC-MS 级), 乙腈 (CNW Technologies, LC-MS 级), 甲酸 (CNW Technologies 公司, LC-MS 级), *L*-2-氯苯丙氨酸 (质量分数 $\geq 98\%$, 上海恒柏生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 干旱及盐胁迫处理实验

选取生长良好、大小一致的 1 年生黄芩植株, 移栽至陶土花盆, 土壤质地为壤土: 营养土 (10:1), 每盆装 10 kg。每盆 3 穴, 每穴 1 株, 移栽后正常浇水, 适当喷淋茎叶, 植株正常生长管理 1 个月后, 开始干旱及盐胁迫实验处理。干旱及盐胁迫等级划分参考国家标准 GB/T32136-2015《农业干旱等级》及《中国盐渍土》中土壤盐化分级指标^[8-10]。

干旱胁迫分别设置供水良好 (CK1, $60\% \leq$ 土壤相对湿度 $< 70\%$), 轻度胁迫 (C1, $50\% \leq$ 土壤相对湿度 $< 60\%$), 中度胁迫 (C2, $40\% \leq$ 土壤相对湿度 $< 50\%$), 重度胁迫 (C3, $30\% \leq$ 土壤相对湿度 $< 40\%$), 共 4 个水平, 每水平设置 3 个重复。采用自然耗水与人工补水相结合的方法控制土壤含水量, 土壤含水量采用 ST3000+ 型土壤水分速测仪进行监测控制, 控水期间每日 8:00 采用 ST3000+ 型土壤水分速测仪测定土壤含水量, 并补充失去的水分, 使各处理组保持设定的土壤相对湿度范围, 干旱胁迫处理 1 个月后, 于 7 月 17 日从每个花盆 3 株黄芩中随机采集 1 株黄芩根, 放入液氮迅速冷冻, 备用。

盐胁迫试验分别设置对照组 (CK2), 轻度胁迫 (T1, 土壤含盐量为 0.2%), 中度胁迫 (T2, 土壤含盐量为 0.4%), 重度胁迫 (T3, 土壤含盐量为 0.6%), 共 4 个水平, 每水平设置 3 个重复。盐胁迫处理 6 d 后, 于 6 月 20 日从每个花盆 3 株黄芩中随机采集 1 株黄芩根, 放入液氮迅速冷冻, 备用。

2.2 供试品溶液制备

分别称取 100 mg 样本, 加入 500 μL 含有内标 *L*-2-氯苯丙氨酸的提取液 (甲醇-水 = 4:1, 内标质量浓度 5 $\mu\text{g/mL}$), 加入小钢珠, 匀浆 4 min; 冰水浴超声处理 1 h; -20°C 静置 1 h; 将样本 4°C , 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液 300 μL 于 2 mL 进样瓶中; 所有样品另取 40 μL 上清液混合成质控 (quality control, QC) 样品, 供 UHPLC-QTOF-MS 检测分析^[11-15]。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱条件: 0~3.5 min, 5%~15% B; 3.5~6 min, 15%~30% B; 6~6.5 min, 30% B; 6.5~12 min, 30%~70% B; 12~12.5 min, 70% B; 12.5~18.0 min, 70%~100% B; 18~22 min, 100% B。体积流量 400 μL/min, 柱温 35 °C, 进样体积 5 μL。

2.4 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI), 质谱扫描模式采用正离子扫描模式。轰击能量: 40 eV, 碰撞能差: 20 eV, 15 张二级谱图/每 50 ms。ESI 离子源参数: 雾化气压 (GS1): 55 Psi (1 psi=6.895 kPa), 辅助气压: 55 psi, 气帘气压: 35 psi, 温度 550 °C, 喷雾电压 5500 V。

2.5 数据处理

使用 Progenesis QI 软件将质谱原始数据导入, 进行保留时间校正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等原始数据预处理, 得到标准化处理后数据。使用 SIMCA 软件 V15.0.2 (Sartorius Stedim Data Analytics AB, Umea, Sweden) 对数据进行建模分析, 进行主成分分析 (principal components analysis, PCA), 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 等多元变量统计分析。结合相关文献并利用二级质谱数据库及相应裂解规律匹

配法对 MS 数据峰进行物质分析鉴定。

3 结果与分析

3.1 总离子流图及黄酮类成分辨识

按上述实验条件进样, 得到 QC 样品的 UHPLC-QTOF-MS 总离子流图 (total ion chromatogram, TIC), 见图 1。结合文献和二级质谱数据库, 依据 UHPLC-QTOF-MS 矩阵中的保留时间、质荷比及碎片离子对黄芩中的代谢产物进行辨识, 共分析鉴定出 44 个黄酮类成分 (表 1), 主要有木犀草苷、黄芩苷、野黄芩苷、槲皮素、木蝴蝶苷 B、白杨素-6-C-吡喃葡萄糖苷、5,7,2',5'-四羟基黄酮、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷、异鼠李素、白杨素-8-C-葡萄糖苷、二氢去甲汉黄芩素、柚皮素-4'-O-β-D-葡萄糖醛酸、汉黄芩素-5-葡萄糖苷、汉黄芩苷、黄芩素等。

3.2 多变量统计分析

3.2.1 PCA QC 样本 (蓝色圆点) 紧密聚集在一起, 表明本实验的仪器分析系统稳定性较好, 实验数据稳定可靠。其余样本基本处于 95% 置信区间 (Hotelling's T-squared ellipse) 内, 表明实验样本数据可信度高, 具有统计学意义。干旱胁迫组、盐胁迫组基本各聚为一类, 表明干旱及盐胁迫处理对黄芩药材品质产生了不同的影响, 且样本分组趋势基本可以说明不同干旱及盐胁迫处理组样本的组间差异性。见图 2。

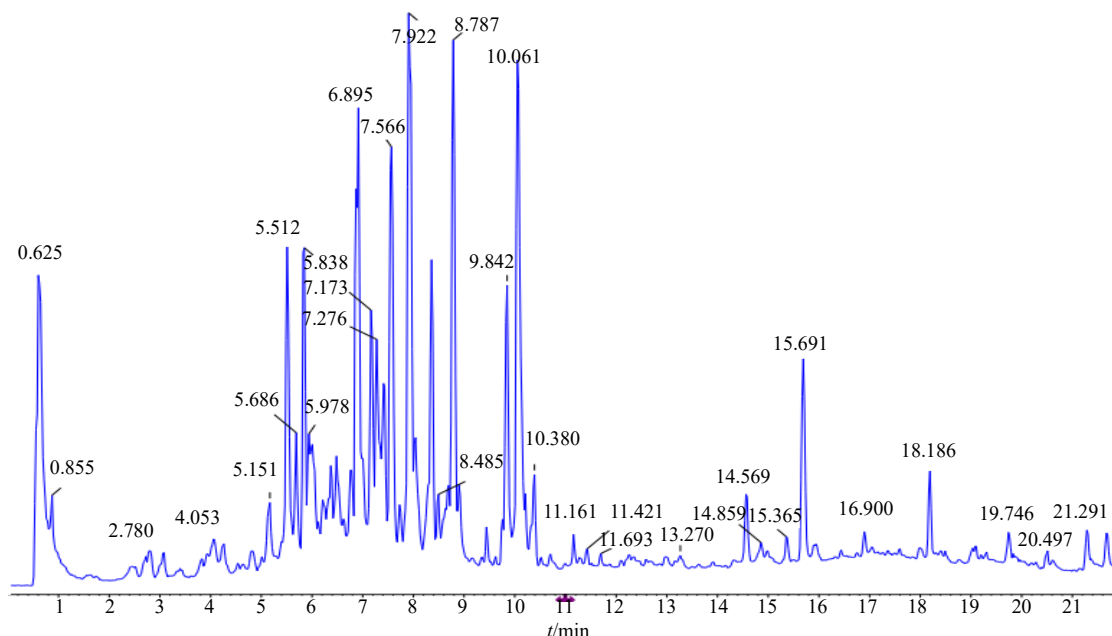


图 1 QC 样品 UHPLC-QTOF-MS 检测正离子模式总离子流图

Fig. 1 Total ion current diagram of positive ion mode for detection of QC sample by UHPLC-QTOF-MS

表 1 黄芩中主要黄酮类代谢产物

Table 1 Main flavonoid metabolites in *S. baicalensis*

编号	t_R/min	名称	质荷比(m/z)	加合物	分子式	误差($\times 10^6$)
1	3.42	3,5,7,2',6'-五羟基黄酮-2'-葡萄糖苷	465.102 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	0.08
2	4.24	木犀草苷	448.100 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	-0.02
3	4.69	夏佛塔苷	564.148 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	0.13
4	5.37	异牡荆黄素	433.112 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	-0.87
5	5.53	黄芩苷	447.092 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	-0.38
6	5.53	野黄芩苷	463.086 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	-0.38
7	5.69	5,7,3',6'-四羟基-8,2'-二甲氧基黄酮-6'-葡萄糖苷	508.121 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$	-0.07
8	5.83	白杨素-6-C-葡萄糖苷-8-C- α -L-阿拉伯吡喃果糖苷	548.152 8	$[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{H}_2\text{O}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	-0.36
9	5.85	5,7,2'-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖苷	462.115 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	-0.92
10	6.17	槲皮素	303.050 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	0.99
11	6.19	木蝴蝶苷 B	594.158 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	-0.83
12	6.21	白杨素-6-C-吡喃葡萄糖苷	416.110 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-0.23
13	6.26	5,7,2',5'-四羟基黄酮	286.046 9	$[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{H}_2\text{O}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	-2.81
14	6.32	千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷	461.107 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	-0.65
15	6.37	5,2',6'-三羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮-2'-葡萄糖苷	522.137 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	-0.44
16	6.46	怪柳黄素	317.065 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	-1.12
17	6.48	香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷	462.115 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	-0.84
18	6.64	异鼠李素	317.065 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	0.03
19	6.82	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮-2'-葡萄糖醛酸	506.105 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$	-0.30
20	6.98	白杨素-8-C-葡萄糖苷	416.110 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-0.06
21	7.16	二氢去甲汉黄芩素	272.068 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	0.38
22	7.16	柚皮素-4'-O- β -D-葡萄糖醛酸	448.100 0	$[\text{M}+\text{H}]^+ - \text{H}_2\text{O}$, $[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	-1.23
23	7.41	5,7,4'-三羟基-3,8,3'-三甲氧基黄酮	360.084 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	-0.15
24	7.43	5,7,2'-三羟基-6-甲氧基黄酮	301.071 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	1.11
25	7.52	汉黄芩素-5-葡萄糖苷	447.127 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	-2.36
26	7.57	汉黄芩苷	461.107 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	-0.95
27	7.73	高车前素-7-O- β -葡萄糖醛酸	476.095 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	-0.49
28	7.75	5,7,2',3'-四羟基黄酮	286.048 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	0.87
29	7.91	芫花素	284.068 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	0.87
30	8.02	5,7-二羟基-8,2'-二甲氧基黄酮-7-葡萄糖醛酸	490.111 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	0.22
31	8.27	4'-羟基-3'-甲氧基黄酮	268.073 3	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	-1.13
32	8.40	5,2'-二羟基-7,8,6'-三甲氧基黄酮-2'-O-葡萄糖醛酸	523.144 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	-1.00
33	8.49	3,7,8,2'-四羟基黄酮	286.047 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	-0.05
34	8.49	5,2'-二羟基-7,8,6'-三甲氧基黄酮-2'-葡萄糖醛酸	520.121 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$	-0.31
35	8.79	黄芩素	270.052 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	0.09
36	9.35	苜蓿素	330.074 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	0.49
37	9.44	3,3',4'-三甲氧基黄酮	312.100 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$	1.29
38	9.76	5,7-二羟基-3',4',5'-三甲氧基黄酮	344.089 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	0.56
39	10.12	黄芩素-7-甲醚	284.068 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	1.09
40	10.12	3,7-二羟基-3',4'-二甲氧基黄酮	315.086 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	0.45
41	10.39	岩豆素	344.089 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	0.34
42	11.00	5-羟基-6,7-二甲氧基黄酮	298.083 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$	-0.75
43	11.25	3-羟基-3',4'-二甲氧基黄酮	298.084 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$	-0.02
44	11.38	去甲基川陈皮素	389.122 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$	-0.66

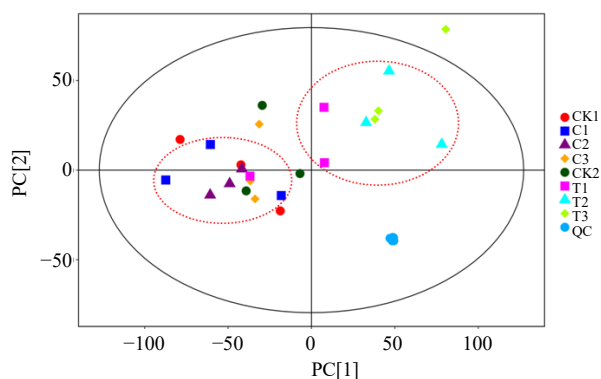
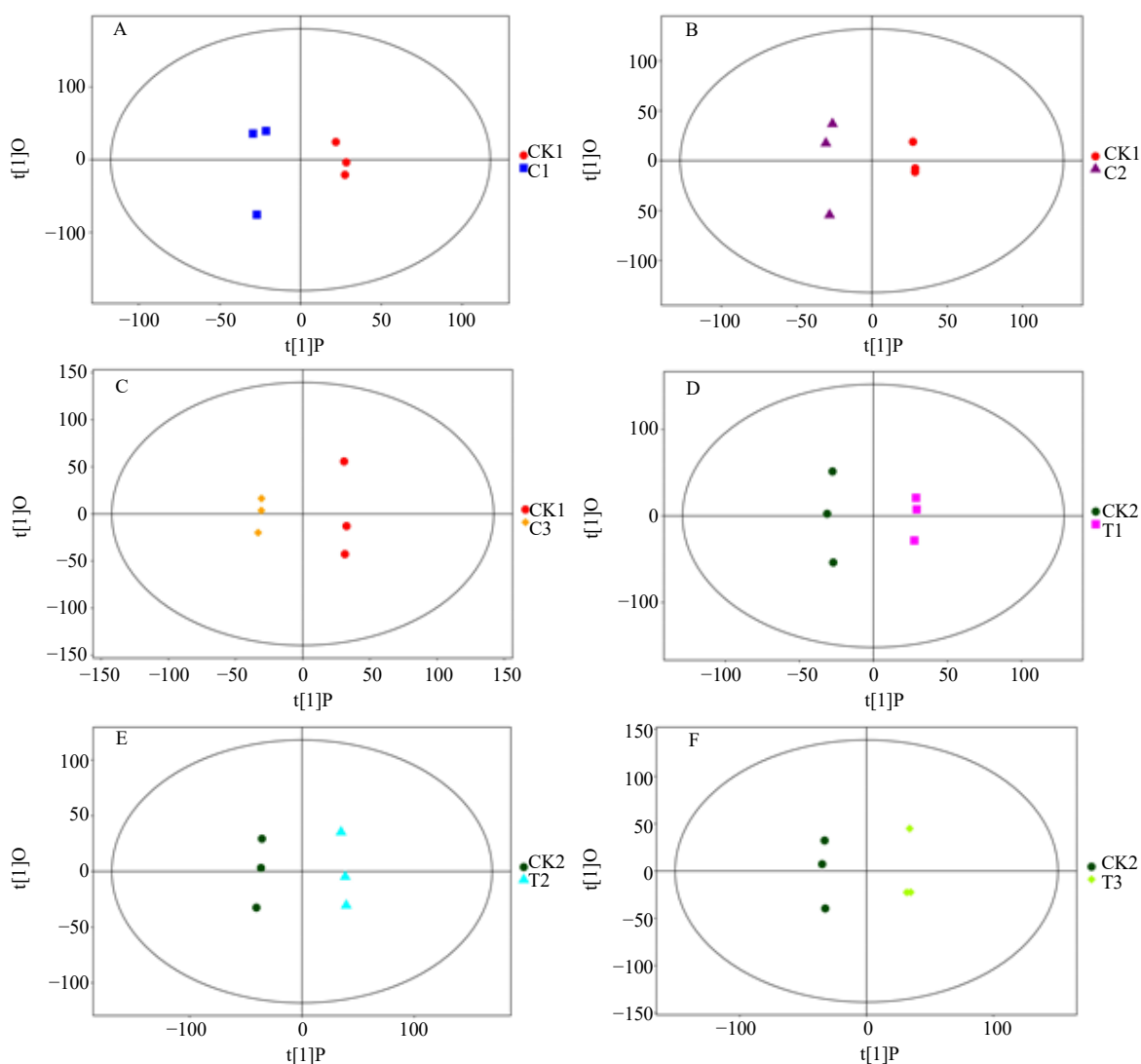


图 2 全部样本 (包括 QC 样本) 的 PCA 得分图

Fig. 2 PCA scores of all samples (including QC samples)

3.2.2 OPLS-DA 从 OPLS-DA 得分图结果可看出,不同干旱及盐胁迫处理的样本与对照组样本区分比较明显,各组样本全部处于 95% 置信区间内。表明各胁迫处理组样本与对照组之间存在明显差异,干旱及盐胁迫处理对黄芩药材品质产生了不同程度的影响。见图 3-A~F。

3.2.3 差异代谢物的筛选 差异代谢物的筛选采用单变量统计分析方法 (univariate analysis, UVA) 对代谢组数据进行分析,比较代谢物水平的独立变化情况。本实验使用的卡值标准为 t 检验 (Student's t -test) 的 P 值 (P -value) 小于 0.1,同时 OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 (variable



A-C1 vs CK1 B-C2 vs CK1 C-C3 vs CK1 D-T1 vs CK2 E-T2 vs CK2 F-T3 vs CK2

图 3 各实验组的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA scores of each experimental group

importance in the projection, VIP) 大于 1。共筛选出 18 个差异黄酮类成分, 见表 2。结果表明, 随着干旱及盐胁迫程度的加剧, 黄酮类差异代谢物增多, 且黄酮类差异成分种类发生改变, 黄芩药材品质的物质基础发生变化, 而黄酮类成分物质基础的变化会直接影响黄芩药材质量的稳定性。

表 2 各实验组黄芩中黄酮类差异成分

Table 2 Differential components of flavonoids in *S. baicalensis*

组别	名称	分子式	误差($\times 10^6$)
C1vsCK1	5,7,4'-三羟基-3,8,3'-三甲氧基黄酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-0.15
C2vsCK1	去甲基川陈皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	-0.66
	苜蓿素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	0.49
C3vsCK1	黄芩素-7-甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	1.09
	3,7-二羟基-3',4'-二甲氧基黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	0.45
	3,7,8,2'-四羟基黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-0.05
T1vsCK2	岩豆素	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	0.34
	去甲基川陈皮素	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	-0.66
	白杨素-6-C-吡喃葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	-0.23
	5,2',6'-三羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮-2'-葡萄糖苷	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	-0.44
T2vsCK2	夏佛塔苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	-0.04
	白杨素-6-C-葡萄糖苷-8-C- α -L-阿拉伯吡喃果糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	-0.36
	5,7,2',5'-四羟基黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-2.81
	3,3',4'-三甲氧基黄酮	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	1.29
T3vsCK2	3,7-二羟基-3',4'-二甲氧基黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	0.45
	3,5,7,2',6'-五羟基黄酮-2'-葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-1.37
	木犀草苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0.02
	异鼠李素	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	0.03
	4'-羟基-3'-甲氧基黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	-1.13
	5,2'-二羟基-7,8,6'-三甲氧基黄酮-2'-葡萄糖醛酸	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₃	-0.31

3.2.4 主要黄酮类成分相对含量变化分析 选取代表性黄酮类成分黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、二氢去甲汉黄芩素、木犀草苷、柚皮素-4'-O- β -D-葡萄糖醛酸、白杨素-6-C-吡喃葡萄糖苷、白杨素-8-C-葡萄糖苷、5,7,2',5'-四羟基黄酮。结果显示不同干旱及盐胁迫处理组主要黄酮类成分整体呈先升高后降低但并不十分规则的倒“V”变化趋势, 但白杨素-6-C-吡喃葡萄糖苷、白杨素-8-C-葡萄糖苷、5,7,2',5'-四羟基黄酮在干旱胁迫组中呈现出一定的上升趋势, 表明适度干旱胁迫有助于黄芩黄酮类成分的合成积累, 但是促进程度是有限的。见图 4。

黄芩苷在对照组与干旱及盐胁迫处理组中的相对含量整体均较低, 而黄芩素的相对含量整体

均较高, 这可能与黄芩生长期有关(盐胁迫组 6 月 20 日、干旱胁迫组 7 月 17 日取样)。根据黄芩黄酮类成分生物合成途径, 黄芩素经 UDP-葡萄糖醛酸: 黄芩素 7-O-葡萄糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronate: baicalein 7-O-glucuronosyl transferase, UBGAT)转化为黄芩苷, 推断该时期黄芩根中的 UBGAT 活性可能相对较低。经查阅文献, 已有研究表明不同采收期(4 月 1 日~10 月 15 日)对黄芩药材有效成分含量及关键酶活性表达量存在较大影响, 其中黄芩苷和黄芩素在不同采收月份的含量呈现较大幅度的波动, 且在 6 月 30 日~7 月 15 日期间黄芩苷含量为波谷期, 黄芩素含量为波峰期^[16]。黄芩栽培生长过程(4~10 月)中 UBGAT 表达水平在 7 月份为低谷期, 8 月份达到高峰^[17], 秋季(9 月 11 日~10 月 26 日) UBGAT 相对表达量整体较高^[4], 表明黄芩素向黄芩苷的转化与黄芩生长期具有显著相关性, 且干旱及盐胁迫也对黄芩苷和黄芩素的含量变化产生一定的影响。

不同干旱及盐胁迫引起的黄芩黄酮类成分含量和动态变化差异, 与黄芩黄酮生物合成途径中关键酶的表达直接相关, 适度的干旱及盐胁迫能够提高相关合成酶的活性, 利于黄酮类成分的合成积累, 但是当胁迫程度加剧, 超过黄芩自身生理调节功能后又会转为抑制作用, 影响黄芩黄酮类成分的转化。

4 讨论

黄芩药用历史悠久, 临床应用广泛, 是传统常用大宗道地药材。相关研究主要集中于黄芩种质资源、化学成分分离、质量评价和药理作用等内容, 只有少部分研究涉及逆境对黄芩药材化学成分与合成积累的影响, 但也仅关注主要黄酮类成分(黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素)的变化, 没有不同干旱及盐胁迫对黄芩黄酮类成分影响的全面分析和系统性的研究报道。本实验采用 UHPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术对不同干旱及盐胁迫黄芩根中黄酮类成分进行了详细比较, 筛选差异代谢产物, 分析了干旱及盐胁迫对黄芩主要黄酮类成分影响的变化规律, 阐释了干旱及盐胁迫对黄芩药材品质影响的物质基础变化, 表明生态环境直接影响黄芩药材的品质, 为深入研究生态因子与药材品质的关系提供参考和借鉴, 同时为黄芩栽培生产提供了一定的科学依据。

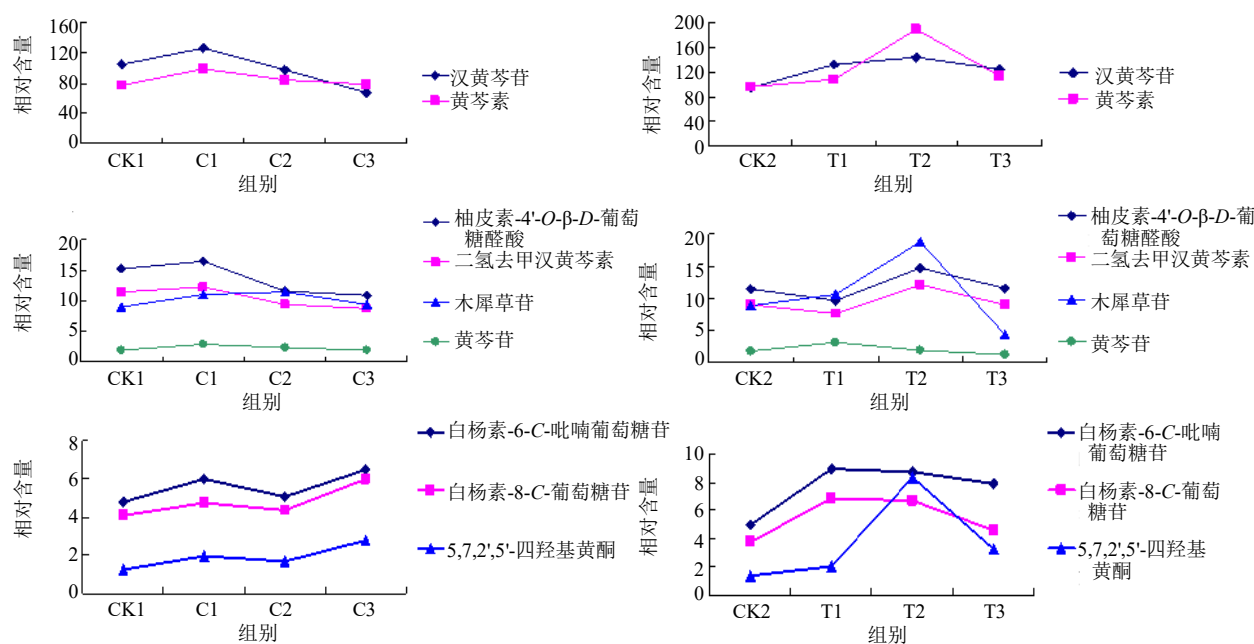


图 4 黄芩主要黄酮类成分的变化趋势

Fig. 4 Change trend of flavonoids in *S. baicalensis*

黄酮类次生代谢产物是黄芩药材品质的物质基础, 外界环境刺激是开启黄芩次生代谢途径的重要条件。依据 UHPLC-QTOF-MS 分析结果表明, 干旱及盐胁迫会引起黄芩黄酮类成分含量和黄酮类成分种类的改变, 适度干旱胁迫促进黄芩黄酮类成分的合成积累, 可以通过合理控制田间水分提高药材品质, 但是促进程度是有限的, 同时应该要注意采收期对黄芩药材品质的影响。

次生代谢产物是植物在相关酶的作用下基因表达的终产物, 与合成代谢通路中关键酶密切相关, 关键酶基因的表达与转录调控因子密切相关。转录因子是一类基因调控蛋白, 影响被调控基因的转录与表达, 其中 APETALA2/ 乙烯响应因子 (APETALA2/ethylene responsive factor, AP2/ERF)、碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH)、碱性亮氨酸拉链 (basic region/leucine zipper motif, bZIP)、WRKY (因含有由 WRKYGQK 7 个氨基酸组成的保守序列而得名, 简称为 WRKY。W=色氨酸, R=精氨酸, K=赖氨酸, Y=酪氨酸, G=甘氨酸, Q=谷氨酰胺)、v-myb 禽骨髓母细胞增多症病毒癌基因同源物 (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB)、生长素响应因子 (auxin response factors, ARF) 类转录因子是植物响应逆境

的重要转录调控因子^[18-19], 且黄芩黄酮类成分的合成积累与 MYB、ARF 类转录因子关系密切^[20-21]。因此, 基于已有的研究和相关报道为基础, 进一步对黄芩主要黄酮类成分合成代谢相关调控基因进行分析, 挖掘其关键转录调控因子和调控途径, 结合转录组学-代谢组学关联分析技术, 从基因表达-代谢物积累角度深入分析, 有助于解析黄芩对干旱及盐胁迫的逆境响应机制与黄酮类成分合成代谢的调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 301-302.
- [2] 蔡葛平. 光周期、土壤水分及外源激素对黄芩中黄酮类成分累积的影响及其分子机制 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [3] 赵胜楠. 水因子对黄芩药材质量及产量的影响研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [4] 张甜, 程林, 杨林林, 等. 生态因子及关键酶基因表达对秋季黄芩采收期主要药效成分合成的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 936-944.
- [5] 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.
- [6] 常相伟, 王博然, 王彤, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的

- 植物代谢组学技术鉴别林下山参的生长年限 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(19): 3609-3614.
- [7] 陈俊可, 曾锐. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 的代谢组学技术对粗茎秦艽不同部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(10): 2328-2335.
- [8] 吕贻忠, 李保国. 土壤学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 42-47.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家标准, 农业干旱等级 [S]. GB/T 32136-2015, 2015.
- [10] 王遵亲. 中国盐渍土 [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 130-346.
- [11] Wang W, Zhao L, He Z, *et al.* Metabolomics-based evidence of the hypoglycemic effect of Ge-Gen-Jiao-Tai-Wan in type 2 diabetic rats via UHPLC-QTOF/MS analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 219: 299-318.
- [12] Tan W, He J, Deng J, *et al.* Small molecule metabolite biomarkers for hepatocellular carcinoma with bile duct tumor thrombus diagnosis [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 3309.
- [13] Lu J Y, Peng J H, Ma X J, *et al.* Metabolic perturbations of post-load hyperglycemia vs. fasting hyperglycemia [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(2): 216-221.
- [14] 吴福林, 李平亚, 董庆海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析止痛化微胶囊的入血成分 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4339-4346.
- [15] 魏文峰, 刘焯, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析大鼠口服芩苈清肺浓缩丸后肺组织中的化学成分 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1115-1122.
- [16] 缪晓素, 宋国虎, 刘容秀, 等. 不同栽培年限及采收期对黄芩药材有效成分含量的影响研究 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(8): 836-839.
- [17] 王玮, 陈家宽, 周铜水. 栽培黄芩生长过程中 CHS 和 UBGAT 表达及黄芩苷积累动态研究 [J]. 复旦学报: 自然科学版, 2006, 45(5): 674-678.
- [18] 李晓艳, 周敬雯, 严铸云, 等. 基于转录组测序揭示适度干旱胁迫对丹参基因表达的调控 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1600-1608.
- [19] 何江峰, 王力伟, 房永雨, 等. 干旱胁迫和复水处理后梭梭转录因子的转录组分析 [J]. 华北农学报, 2020, 35(1): 36-43.
- [20] Yuan Y, Qi L J, Yang J, *et al.* A *Scutellaria baicalensis* R2R3-MYB gene, SbMYB8, regulates flavonoid biosynthesis and improves drought stress tolerance in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2015, 120(3): 961-972.
- [21] Gharari Z, Bagheri K, Danafar H, *et al.* Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Scutellaria bornmuelleri* by elicitor induced over-expression of MYB₇ and FNSII2 genes [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 148: 35-44.

[责任编辑 时圣明]