

基于 NMR 的代谢组学技术在药用植物研究中的应用

刘霞, 王映红*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 基于核磁共振的代谢组学技术已普遍应用于植物学方面的研究。植物代谢产物复杂多样, 代谢组学的方法能够描述植物整体代谢轮廓、跟踪有价值的代谢产物, 为植物生理状态、代谢途径及功能基因等方面研究提供信息。本文主要介绍的是基于 NMR 的代谢组学技术在药用植物中的应用, 包括探究药用植物次级代谢产物合成机制、辅助药用植物的生产、提高药用植物的产量和质量、开发有效活性成分、物种鉴定及中药质量控制等方面的应用, 并对今后的发展潜力进行分析。

关键词: 核磁共振技术; 植物代谢组学; 次级代谢产物; 质量控制

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0541-09

The application of NMR-based metabolomics technique to medicinal plants

LIU Xia, WANG Ying-hong*

(State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: NMR-based metabolomics technique has been applied to botanical studies in recent years. The plant metabolites are complicated and various, metabolomics method can detect the global metabolomic profile of the plant to track valuable metabolites, and provide information for the research of plant physiology, metabolic pathways and functional genes. This paper reviews the application of NMR-based metabolomics technique in medicinal plants, including the biosynthetic mechanism and production of secondary metabolites, the improvement of yield or quality of medicinal plants, the development of effective active ingredient, the identification of medicinal plant species, and the quality control of herbal medicine. In addition, the potential development of this technique in future is discussed.

Key words: NMR technique; plant metabolomics; secondary metabolite; quality control

在过去的几十年中, 代谢组学发展迅猛, 成为继基因组学、转录组学、蛋白质组学之后又一热门研究领域^[1, 2]。植物代谢组学是代谢组学的一个分支, 可为植物生理、代谢途径、功能基因和物种鉴定等方面研究提供信息, 是生命科学研究不可缺少的一部分。相关研究文献自 2006~2016 上半年间国内外发

文量呈逐年递增的趋势, 在 2015 年已接近 7000 篇。本文阐述的是基于 NMR 的代谢组学技术^[3-6], 这种技术为探究药用植物重要次级代谢产物合成机制、提高药用植物的产量和质量及中药质量控制等方面提供了一种有效方法。

1 植物代谢组学

1.1 简介

植物代谢组学是对植物的某一组织或细胞在一定生理时期内所有低分子量代谢产物同时进行定性和定量分析的一门学科^[7, 8]。植物代谢物复杂多样,

收稿日期: 2016-11-14; 修回日期: 2016-12-12.

基金项目: 863 计划国家支撑项目 (2014AAQ00362).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165217, E-mail: wyh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1001

其中具有活性的次级代谢物是生物化学药品的主要来源,对人类健康发挥着重要作用,如植物青蒿中治疗疟疾的青蒿素^[9]、红豆杉中具有抗肿瘤作用的紫杉醇^[10]、长春花属植物中的抗肿瘤活性成分长春花碱和长春新碱^[11]等都是具有生物活性的次级代谢物。植物代谢组学能够从整体的角度研究代谢产物,发现关键代谢物及其通路,对研究和开发相关活性成分具有重要意义。

1.2 植物代谢组学的研究流程

植物代谢组学的一般流程主要包括样品前处理、利用分析仪器进行数据采集和数据统计分析 3 个步骤^[12]。常用的分析技术包括气相色谱-质谱联用技术 (GC-MS)、高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS)、核磁共振技术 (NMR) 等,随着技术的发展后期形成以色谱-质谱联用和 NMR 波谱等为主的两大技术平台。常用的统计分析方法有主成分分析 (PCA)、偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)、正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA) 等,同时根据相应的代谢物或代谢途径数据库查找相应数据,最后对数据进行整合分析。

1.3 应用于植物代谢组学的分析技术

1.3.1 基于色谱-质谱联用的技术分析平台

色谱-质谱联用技术主要包括 GC-MS、HPLC-MS 和 CE-MS 等。色谱技术能够帮助分离多种多样的代谢物,质谱能够测定相关代谢物的分子量,从而分离分析复杂生物体系中的代谢产物。基于 GC-MS 的联用技术主要用来分析具有挥发性和热不稳定的代谢物,分离效率较高,但样品前期需要进行衍生化处理。基于 HPLC-MS 技术分析的样品范围广,针对不同极性的化合物采用相应的方法分析,样品前处理相对简单。基于 CE-MS 技术主要用于分析氨基酸、有机酸等离子型代谢物,分离效率高,分析时间短,样品一般不需要进行预处理^[13,14]。质谱具有较高的灵敏度,但重复性差,在化合物结构鉴定方面,对数据库及标准物质依赖性较高。应用于色谱-质谱联用的分析软件主要有 XCMS、AMIDS、MET-IDEA 等,主要的数据库有 MassBank、METLIN、NIST、PubChem 等。

1.3.2 基于核磁共振波谱技术的分析平台

近年来随着高兆数核磁共振仪,超低温、微量探头技术,高通量技术以及相关联用技术的出现促进了 NMR 技术的发展。NMR 技术重现性好;可同时检测多种代谢物,并对所有化合物的灵敏度一致;图谱中的信号峰强度与其浓度成正比,可直接比较相应浓度,进行定量分析。它的最大优势在于能提供丰富的结构信息,

用于化合物结构鉴定。

NMR 技术能够测试多种类型的谱图,从最简单的 1D-NMR 谱 (one-dimensional NMR spectroscopy) 中可以获得大量化合物信息,包括 ¹H 谱中获得氢信号的化学位移和偶合常数关系,¹³C 谱和 DEPT 谱中可以发现碳信号个数和类型,此外还有 ³¹P、¹⁵N、¹⁹F 谱等。代谢组学中常用的水峰压制氢谱,能够除掉水峰信号的干扰,显示水峰周围的化合物信号。

同时一系列 2D-NMR 谱,包括同核相关谱 (COSY)、总相关谱 (TOCSY)、二维 NOE 谱 (NOESY)、异核单量子相关谱 (HSQC)、异核多键相关谱 (HMBC) 等,可以提供化合物各官能团间的连接关系并结合文献或数据库进行结构确证。2D-NMR 谱应用非常广泛,最近有研究将类叶升麻属植物中三萜成分的 HMBC 谱总结分析建成数据库,每种萜类成分都有相应的谱图即形成一个“条形码”,采用这种“条形码”即可快速鉴定类叶升麻属植物中三萜类成分^[15,16]。此外,¹H 与 ¹⁵N 形成的二维谱主要是应用于含氮代谢物如氨基酸类的鉴定^[17]。植物代谢物复杂多样,需要依靠 1D 与 2D NMR 技术相结合共同进行结构鉴定。

随着 NMR 技术的发展,基于 NMR 的代谢流技术也应用广泛,生物体内的代谢网络复杂多样,重叠相关,研究代谢通路关键在于理清初始主干成分是如何逐级代谢直到最后的形态,代谢流分析即是对组织或细胞前期进行同位素标记的碳源饲喂,然后采用 NMR 技术进行含同位素物质的碳谱与二维谱的检测,鉴定被标记主成分的代谢物,从而确定主成分的代谢途径^[18]。Nargund 等^[19]进行了针对植物代谢组学的同位素标签设计实验,介绍了统计学设计的同位素标签实验方法,采用不同碳标记方式和不同检测方式对磷酸戊糖途径和 4-氨基丁酸支途径代谢流量进行分析,该优化方法能够提高对植物复杂代谢网络流量的定量分析能力。这也促进了代谢流技术在植物代谢组学中的应用。

NMR 的发展对于代谢物的结构鉴定至关重要。但 NMR 技术的灵敏度比质谱低,对于一些含量较低的化合物检测不到。当前分析技术各具有一定局限性,尚未有一种技术能较为完美地独立完成代谢轮廓分析,因此对植物代谢组学研究,采用单一的分析技术会造成代谢物分析的欠缺,不利于相关代谢途径及网络的发现。不同技术的联用是解决这一问题的有效方法,LC-NMR (液相色谱-核磁联用) 技术可用于复杂体系中微量物质的结构鉴定, Braunberger

等^[20]采用 LC-NMR 和 LC-MS 技术共同鉴定茅膏菜中黄酮类和鞣酸衍生物, 通过液相色谱将复杂的物质分离并富集, 然后通过联用的 NMR 技术直接将相应保留时间的峰信号的氢谱采出, 进行二维谱检测, 采用 LC-MS 从分子质量的角度共同实现化合物的鉴定, 最终共鉴定 13 种化合物, 其中 7 种为新发现化合物。随着低温探头等的出现扩大了该联用技术的应用范围。

2 基于 NMR 的代谢组学技术在药用植物中的应用

2.1 探究药用植物次级代谢产物合成机制

从野生药用植物中提取药物有效成分不但成本高, 而且对环境造成极大破坏, 人工培育药用植物及合成其有效成分是解决这一问题的有效途径, 因此研究初、次级代谢在生长中的相互关系及次级代谢物的合成途径成为急需解决的关键问题。传统研究植物代谢物的方法针对的是已知的几种代谢物, 无法综合展现植物的整体代谢水平, 而随着技术的发展, “组学”研究理念的出现, 代谢组学显示出在以上研究领域的应用潜力。植物代谢组学通过与基因和相关代谢物的结合对于一些天然产物如黄酮类、萜类、生物碱的生物合成途径的阐明起到了非常重要的作用^[21, 22]。

植物学家一般通过干扰或刺激的手段来研究代谢产物合成途径, 因为植物在受外界干扰或刺激后, 会使防御系统激活, 产生一些具有生物活性的次级代谢产物, 其中的大部分化合物具有药用功效^[23]。通常情况下的干扰或刺激主要有细菌感染^[24]、真菌或病毒感染^[25]、诱导子的刺激^[26]、金属离子^[27]的积累等, 其中各种诱导子的刺激是热点研究方向。

在药用植物细胞培养物中, 加入酵母提取物或茉莉酸甲酯 (MeJA) 等诱导子, 能够激发植物防御基因的表达, 促使细胞合成积累具有药用活性的次级代谢产物。Hendrawati 等^[26]采用基于 NMR 的代谢组学研究模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 植株的整体代谢途径的变化, 对 MeJA 处理 24 h 后的样品进行检测, 与对照组相比, 诱导组所含的色氨酸等氨基酸类和一些重要次级代谢产物如吲哚芥子油苷、芥子酰基苹果酸盐和黄酮类 (山柰酚和槲皮素) 等含量升高; 苹果酸、谷氨酰胺和碳水化合物等含量减少。诱导组中色氨酸含量增加, 色氨酸为吲哚类芥子油苷的前体, 吲哚类芥子油苷含量也相应增加, 从而证明 MeJA 能促进吲哚类芥子油苷的合成。

水飞蓟 (*Silybum marianum*) 是一种常用药用植物, 主要活性成分为黄酮木脂素类成分水飞蓟素,

具有抗炎、抗氧化、保肝、利胆等作用。Sánchez-Sampedro 等^[28]采用一维、二维核磁技术研究在水飞蓟的细胞培养物中分别加入酵母提取物和 MeJA 诱导子后代谢产物的变化及其对水飞蓟素生成的影响, 1D 与 2D NMR 用于帮助鉴定化合物结构, 结果表明两种诱导子都能对氨基酸和碳水化合物的代谢产生影响, 不同的是酵母提取物处理的细胞与对照组相比含有较高的胆碱、 α -亚麻酸以及苯丙烷类代谢物, 而肌醇和蔗糖的含量降低。苯丙烷类是合成水飞蓟素类的前体, 它的改变说明与水飞蓟素合成相关的代谢途径、硬脂酸途径和苯丙烷途径发生了变化。

罂粟 (*Papaver somniferum*) 生物碱的合成途径是近年来的研究热门。Zulak 等^[29]前期研究中采用傅里叶变换离子回旋共振质谱 (FT-ICR-MS) 技术研究真菌诱导子处理的罂粟细胞, 发现血根碱、二氢血根碱和乌药碱等生物碱含量升高, 但对于与生物碱合成相关的其他代谢物的发现较少。随后该团队采用基于 ¹H NMR 的代谢组学技术来探究在真菌诱导子处理的罂粟悬浮细胞中初级与次级代谢之间发生的变化。未检测到生物碱成分, 可能由于生物碱难溶于水, 致使其难以达到核磁检测限, 但在对照和诱导子处理的罂粟细胞中通过 100 h 的时间进程检测到 42 种含量发生变化的代谢物。碳水化合物、有机酸和非蛋白氨基酸在诱导组的前期变化明显, 而在对照组的后期苯丙氨酸和酪氨酸变化明显, 呼吸代谢产生的磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 和赤藓糖-4-磷酸 (E4P) 是莽草酸合成的前体, 而莽草酸代谢又影响着芳香族氨基酸的代谢如苯丙氨酸和酪氨酸, 它们是苯基异喹啉生物碱与苯丙烷类代谢途径的前体。结果说明, 初、次级代谢之间存在广泛且密切的联系, 通过诱导发现与生物碱合成相关的代谢物, 进而推导出相关代谢网络, 为后期研究生物碱的合成途径提供有用信息^[30]。

Hagel 等^[31]基于上述研究将代谢组学与基因组学相结合, 着重研究了与罂粟生物碱合成途径相关的基因, 基于 NMR 的代谢组学用于分析分别采用氯仿与水提取的 6 个不同罂粟品种的根与乳汁代谢物, 总共鉴定根中 34 个、乳汁中 21 个代谢物, 其中重复的有 14 个代谢物, 多变量统计结果显示, 在乳汁水相与氯仿相提取物中能够明显区分高生物碱品种与低生物碱品种, 高生物碱品种中含有较高的可待因、吗啡、蒂巴因等生物碱, 而低生物碱品种中含有较高的生物碱合成前体酪胺和较低的糖类与氨基酸等; 根的提取物无明显变化。通过结合实时定量 PCR 技术, 研

究了与生物碱合成相关的 42 个基因包括初级代谢 30 个和次级代谢 12 个, 在一些低生物碱品种中与生物碱合成相关的酶如 TyDC (tyrosine/dopa decarboxylase)、COR (codeinone reductase) 等表达量减少, 从而影响着生物碱的合成。此研究将代谢物与相关基因的表达相结合, 为生物碱的合成提供基因信息。

2.2 辅助培育药用植物并且开发其有效成分

药用植物对人类来说是至关重要的药用资源, 许多从植物中提取出来的活性物质被开发成药物。怎样提高药用植物的产量和品质, 高效开发其有效成分是目前的一大难题, 代谢组学近年来在分析此类问题中发挥着重要作用。

大麻 (*Cannabis sativa* L.) 特指雌性植株干燥的花和毛状体, 常用作麻醉剂。大麻的毛状体是腺体结构, 主要负责大麻独特化学成分大麻素的生物合成, 在毛状体的开花期, 大麻素类成分含量明显升高, 为探明其原因, Happyana 等^[32]采用基于 NMR 代谢组学技术对大麻毛状体开花期最后 4 周的代谢轮廓进行监控, 同时与实时定量 PCR 相结合研究相关基因表达的变化。为综合展现整体代谢物的变化, 分别用氯仿与水提取大麻毛状体的代谢物, 多变量统计结果发现氯仿提取部分的代谢物四氢大麻酚酸和大麻二酚酸等重要大麻素类成分能使开花期最后 4 周明显区分, 而天冬酰胺、谷氨酰胺、果糖、葡萄糖是水提部分主要差异物质。PCR 结果显示, 与大麻素合成相关的如大麻聚酮合酶的基因表达量增加可促进大麻中大麻素类积累, 说明在开花期的某种生长信号促使与大麻素合成相关的基因表达量增加, 从而提高了大麻素类的含量。Jia 等^[33]整合转录组学与代谢组学研究黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 在不同干旱条件下的代谢反应, 对 2 年生黄芪植物进行干旱培养 14 天, 中间每隔两天取一次样进行多变量统计分析, 结果显示蔗糖、脯氨酸、苹果酸等是主要差异性成分, 一些主要的代谢途径如糖酵解、三羧酸循环、脯氨酸的合成、糖代谢等由于干旱影响而发生显著变化。转录组分析表明, 干旱基因的表达取决于黄芪所受的干旱程度, 分析差异表达基因与代谢物关系发现, 受干旱影响显著的代谢途径有糖酵解、三羧酸循环、谷氨酸介导的脯氨酸合成和天冬氨酸家族代谢等, 其中发生差异表达的基因通过自身的上调或下调影响着代谢物的增加或减少, 例如与正常组相比, 在干旱条件下编码鸟头酸水合酶的基因上调, 影响着 TCA 循环; 编码糖酵解酶的基因上调, 影响着糖酵解过程, 最终影响植物的主要代谢途径。分析主干通路的转录

组与代谢组揭示了由于不同干旱条件引起的特殊基因型表达, 这种应对干旱条件的分子调整策略有助于了解黄芪和其他植物是如何适应干旱条件, 为培养抗旱植物提供研究方向。

2.3 区分药用植物的不同种属

药用植物的种属鉴定是其发展过程中面临的一个主要问题, 主要的鉴定手段有显微鉴定, 色谱、光谱鉴定和 DNA 鉴定等。基于 NMR 的代谢组学鉴定技术能宏观分析植物代谢产物, 找到标志代谢物, 最终得以区分不同种属。

2.3.1 药用植物不同基原的区分 藏红花 (*Crocus sativus* L.) 是一种常用药材, 其药用部位为红色柱头具有活血生血的功效。Cagliani 等^[34]采用基于 NMR 的代谢组学技术与多变量统计方法相结合, 研究道地品种和商业品种藏红花之间的化学成分差异。结果显示, 氘代二甲基亚砷提取的道地品种中含有较高的藏红花苦苷和藏红花素, 而商业品种中这两种活性成分含量微乎其微, 而包含较多的脂肪酸。说明采用 NMR 技术能够用于不同品种药材的鉴别。

在随后的代谢组学发展中将 HPLC-MS 与 NMR 技术相结合共同应用于天竺葵^[35]、丹参^[36]等相似药用植物的区别, HPLC-MS 技术用于分析含量较少的次级代谢物, 更易于相似药材的区分。Dai 等^[36]采用核磁与液质相结合的方式分析 3 种不同表型的丹参样品整体代谢轮廓。共鉴定 28 个初级代谢产物包括糖类、氨基酸、羧酸和 4 个多酚类次级代谢产物, 不同品种间的差异主要取决于丹酚酸 B、迷迭香酸、胆碱、天冬氨酸和脯氨酸等差异代谢物。

2.3.2 药用植物不同产地的区分 植物的生长状态易受周围环境影响, 导致有效活性成分的含量发生差异。同一品种的药材放在不同的产地培育, 其药用价值也会出现差异。Jiang 等^[37]将 ¹H NMR 代谢物轮廓分析与统计方法相结合, 探究不同地域丹参样品的代谢产物的变化, 结果共鉴定出 26 个初、次级代谢产物, 其中的丙二酸盐和琥珀酸盐被认为是可能的关键标记物用于区分不同地域来源的丹参样品。Tian 等^[38]采用相同的方式分析不同产地黄芪水溶浸出物的化学成分差异, 统计分析发现山西黄芪浸出物中含有较多的天冬氨酸、琥珀酸、谷氨酸、胆碱等, 而甘肃产地的含有较多的蔗糖、精氨酸和富马酸等。同样的方法也应用于芍药^[39]、款冬花^[40]等药材。

Nguyen 等^[41]在研究前期采用了基因组学技术, 分析了中韩两国不同人参 (*Panax ginseng*) 样本中的叶绿体基因间隔区, 发现他们具有相似的基因组

成, 而基因组学只有在植物的基因组是独特的时候进行分析才有效, 所以不利于进行种类鉴别, 研究者进而采用基于 NMR 的代谢组学技术与统计学相结合的方法, 分析中韩两地来源的人参品种的代谢物的差异, 结果发现 7 种差异代谢物, 在韩国人参中含有较高的戊二酸、琥珀酸、苹果酸、胆碱、葡萄糖和蔗糖, 而中国人参中含有较高的谷氨酰胺, 这 7 种代谢物可以作为标志物来区分不同产地的人参。研究者进而建立了基于此方法的研究模型, 用于掺假药材的鉴别。

2.3.3 药用植物不同生长周期的区分 Yang 等^[42]采用 ^1H NMR 法对不同生长周期的共 27 个当归 (*Angelica sinensis*) 样品进行分析, 归属其中的主要成分, 并对其含量变化进行分析。结果表明, 此方法能够反映出当归植株不同生长时期相应的代谢产物变化, 其中以当归主要活性成分阿魏酸、藁本内酯、当归多糖为主要差异代谢产物。Xue 等^[43]采用 UPLC-QTOF-MS (超高压液相色谱-飞行时间质谱) 与 NMR 相结合的手段分析研究不同生长周期的远志 (*Polygala tenuifolia* Willd.) 药材质量, 共检测到 24 个初级代谢物如糖类、氨基酸和有机酸等和 36 个次级代谢物如皂苷类和糖酯类等。后续结合多变量统计分析, 发现基于 MS 技术检测到 9 个差异代谢物如蔗糖酯和低聚糖酯等, 基于 NMR 技术检测到 5 个差异代谢物如甘氨酸、果糖和胆碱等。1 年与 2、3 年生的远志药材根据这 14 种差异代谢物得以区分, 为中药材的质量鉴定提供了新的研究方向。

连翘 (*Forsythia suspensa*) 干燥的果实是具有清热解毒功能的中药, 其主要活性成分为苯乙醇苷类、木脂素类、黄酮类、萜类、生物碱和挥发油等。连翘果实根据不同成熟阶段分为青果与熟果, 均可用于中药处方, 但青果与熟果之间的不同和相似之处仍需进一步研究^[44, 45]。Jia 等^[46]采用基于 NMR 的代谢组学联合高效液相色谱和紫外光谱技术研究连翘两种不同成熟阶段果实的代谢差异, 同时体外检测两者提取物的抗氧化性与抗菌性。结果共鉴定 27 种代谢物, 青果中的连翘苷 A、C 和芦丁等代谢物高于熟果并且含有较低量的连翘环己醇等。两者在抗菌活性上无明显差异, 但青色果实具有较高抗氧化活性, 酚类化合物含量与抗氧化活性成正比, 连翘苷 A、C 和芦丁等都属于酚类化合物, 因此青果的抗氧化活性较熟果高。相似的研究还有药材接骨木^[47]与地黄^[48]等。

2.4 中药质量控制及安全性评价

近年来中药市场中的假药问题屡屡出现, 中药

的质量及安全是其发展过程中面临的主要问题, 应用基于 NMR 的代谢组学技术对药用植物代谢物进行整体分析, 发现相关的标志代谢物及建立特征代谢轮廓是解决这一问题的有效办法。

2.4.1 不同规格等级的中药材质量鉴定 红景天 (*Rhodiola rosea* L.) 是常用药用植物, 生长在北半球高寒无污染地带, 具有极强的抗恶劣环境的能力, 其药用价值在于抗氧化、提高智力及人体机能的恢复等。野生红景天资源稀缺, 再加之市场需求量大, 导致市场中出现以人工种植质量较低的品种作为掺假药材, 严重影响中药市场。Booker 等^[49]结合 NMR 与高效薄层色谱 (HPTLC) 技术研究市场中存在的 5 种不同品种的红景天药材的化学成分差异, HPTLC 方法是一种用于检测红景天中化学成分的标准方法, 能够与 NMR 技术相互印证, 共同证明红景天昔和酪醇为区分标志物, 并且建立了混合成分中的含量鉴定的方法, 为区分掺假药材提供方法依据。

根据传统药理学书籍的记载, 款冬花的紫色花蕾比黄色花蕾的质量更高, 但是并无实际依据能够证明这一观点。Mi 等^[50]通过代谢组学技术分析这两种不同性状款冬花蕾之间的质量差异, 采用 NMR 技术进行整体代谢物鉴定, 最终共鉴定 40 种代谢物, 紫色花蕾比黄色花蕾含有较高氨基酸、款冬酮、芦丁、山柰酚等。从科学的角度明确指出不同性状间的差异, 也为药材商品规格标准的建立奠定基础。

2.4.2 中药安全性评价 中草药在世界范围内应用广泛, 其在治疗疾病的同时也会带来不良反应, 因此对中药的安全性评价是一项亟待解决的任务。

关木通为东北马兜铃 (*Aristolochia manshuriensis* Kom.) 的干燥藤茎, 具有清心去火、利便的功效, 因其含有致肾损伤的马兜铃酸而备受争议, 影响其应用。Zhao^[51]采用基于 NMR 的代谢组学技术研究中草药关木通的肾毒性, 通过大鼠灌胃给予关木通水煎剂不同剂量与不同时间的方法, 研究马兜铃酸对大鼠肾脏的影响, 通过对血、尿的核磁共振及生化分析发现, 对照组与给药组随着时间及给药剂量的增加能明显分开, 其中主要的标志代谢物为柠檬酸、牛磺酸、肌氨酸等, 分析这些代谢物的代谢途径, 有助于发现关木通毒性发生的原因, 也为关木通药材的使用剂量及时间提供参考依据。通过基于 NMR 的代谢组学技术可为中药关木通的安全性评价提供一种新标准。Sun 等^[52]基于 ^1H NMR 的代谢组学技术研究甘草对附子毒性的缓解作用, 对大鼠的尿样进行 ^1H NMR 检测并对血样进行生化指标检测, 多变量统

计结果发现甘草和附子汤剂饲喂组与附子汤剂饲喂组能显著区分, 甘草能够降低氧化三甲胺、甜菜碱、牛磺酸、3-羟基丁酸等毒性标志代谢的含量, 从而缓解毒性, 血液生化指标从另一个侧面证明甘草缓解毒性的作用, 基于 NMR 的代谢组学技术为中药配伍方剂的安全性及重要性提供依据。

2.5 不同加工炮制方法的中药质量鉴定

中药炮制是中药使用中的一大特色, 炮制的方法分为修制、水制、火制、水火共制等, 其目的在于增强药物功效, 减少不良反应及毒性。不同炮制方法的药品其临床药效不同。Li 等^[53]采用基于 NMR 的代谢组学技术对款冬花 (*Farfarae Flos*) 生品和蜜炙品之间的化学成分进行比较, 结合统计学数据分析, 结果显示生品中含有较多的氨基酸类及绿原酸等, 蜜炙品包含较多糖类、款冬酮和芦丁等, 而蜜炙品具有润肺止咳的功效, 说明款冬酮及芦丁等可能是促发这类功效的主要物质, 有助于研究蜜炙药品的科学内涵。类似的研究还有药材远志^[54]等。

Lee 等^[55]采用基于 NMR 的代谢组学技术与多变量统计分析相结合研究不同干燥方式下水生含羞草 (*Neptunia oleracea*) 的代谢轮廓变化, 含羞草具有清热解暑、抗菌消炎的功效。此外, 还发现其具有较高抗氧化活性与 α -葡萄糖苷酶抑制活性。研究通过对其叶片与茎采用 3 种不同的干燥方式即冻干、晾干、烘干来研究代谢产物变化, 共鉴定 18 种代谢物质并通过多变量统计分析发现冻干叶片含较高槲皮素、山柰酚、儿茶酸、咖啡酸等代谢物, 大部分属于酚酸类化合物, 因此具有较高的抗氧化活性, 冻干茎中含有较多的葡萄糖、蔗糖等糖类, 所以 α -葡萄糖苷酶抑制活性较低, 这与活性检测结果相符。冻干的条件可以使样品含有较高的活性, 发挥其药效。Dai 等^[56]采用核磁技术与液质技术相结合调查不同干燥方式下, 丹参 (*Salvia miltiorrhiza*) 药材代谢轮廓变化。NMR 技术用于检测初级代谢物, MS 技术用于次级代谢物的鉴定。研究发现不同干燥方式下, 代谢物的积累是不同的, 晾干、晒干与冻干相比都能够增加丹参酮的积累, 提高脯氨酸的合成并影响着碳水化合物与氨基酸的代谢; 晾干能够促进莽草酸介导的多酚酸类成分的合成, 但是晒干会抑制多酚酸生成。

3 总结与展望

基于 NMR 的代谢组学技术以 NMR 及其联用技术为检测手段, 以多变量统计为分析方法, 在探究药用植物次级代谢产物合成机制方面, 通过检测因诱导子等作用引起的植物代谢产物变化, 分析初、次级

代谢产物之间的上下关系, 明确重要次级代谢产物合成途径, 并通过与基因、蛋白等组学的结合, 分析相关基因与酶的含量或活性变化, 揭示代谢网络调控机制, 为一些重要的植物次级代谢产物的生物合成提供线索。在辅助植物育种方面, 植物易受周围环境影响发生代谢变化, 采用该技术从宏观角度观察植物中整体代谢产物的变化, 转录组学的加入有助于分析产生差异表达的基因, 构建基因-代谢产物关系, 从而发现热点代谢途径, 并进行人工干预, 使植物更好地应对外界环境的变化, 提高有效成分含量。在区分药用植物的不同种属方面, 采用 NMR 技术分析药用植物中含量较高的初级代谢产物和个别次级代谢产物, 用以 MS 为主的技术分析更多的次级代谢物, 两者相互补充提供更全面的植物代谢物信息, 找到种属差异标志物, 区别药用植物的不同种属, 同时它还可以弥补 DNA 鉴定的不足之处, 区别基因差别较小的植物物种; 在中药质量控制及安全性评价中, NMR 技术对鉴定药材真伪、药效差异原因探究、药材质量等级划分及中药本身或配伍方剂的安全性评价等方面发挥着不可替代的作用。

当前该技术已经成为生命科学领域中相当重要的一个研究方向, 在受到关注的同时, 也带来了更多的机遇和挑战。采用 NMR 技术鉴定植物复杂多样的代谢物, 面临灵敏度有待提高的问题, 当前的解决方法是将 NMR 与不同技术联用, 建立快速、精准、定性、定量分析代谢物的方法, 以达到解决代谢物化学结构多样、鉴定困难这一影响植物代谢组学有效应用的难点。其次是建立植物代谢物数据库^[57], 植物代谢物由于种类繁多, 初级代谢物鉴定起来相对容易, 已有相关标准品或数据库, 但对于一些植物特有的次级代谢物, 由于缺少相应的标准品, 而无法鉴定识别, 所以有针对性地建立植物次级代谢物库是至关重要的。最后, 植物代谢组学还将进一步实现与其他组学(基因组、转录组、蛋白组、表型组等)数据相整合^[58], 以便更好地阐述植物相关代谢过程, 发现重要次级代谢产物的合成机制。在未来的发展中, 植物代谢组学依据自身优势并且与其他技术相结合, 能够在系统生物学研究中占有不可替代的重要地位。

References

- [1] Hong J, Yang L, Zhang D, et al. Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 767.
- [2] Jia W. Medical Metabonomics (医学代谢组学) [M].

- Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2011: 5.
- [3] Ritota M, Marini F, Sequi P, et al. Metabolomic characterization of Italian sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) by means of HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 9675–9684.
- [4] Clausen MR, Bach V, Edelenbos M, et al. Metabolomics reveals drastic compositional changes during overwintering of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 9495–9501.
- [5] Wu C, Kim HK, van Wezel GP, et al. Metabolomics in the natural products field – a gateway to novel antibiotics [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2015, 13: 11–17.
- [6] Ward JL, Baker JM, Beale MH. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics [J]. *FEBS J*, 2007, 274: 1126–1131.
- [7] Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 48: 155–171.
- [8] Dan M, Gao XF, Xie GX, et al. Application of metabolomics in research of plant metabolites [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2007, 32: 2337–2341.
- [9] Muangphrom P, Seki H, Fukushima EO, et al. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of *Plasmodium parasites* [J]. *J Nat Med*, 2016, 70: 318–334.
- [10] Bakrania AK, Variya BC, Patel SS. Novel targets for paclitaxel nano formulations: hopes and hypes in triple negative breast cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 577–591.
- [11] Pan QF, Mustafa NR, Tang KX, et al. Monoterpenoid indole alkaloids biosynthesis and its regulation in *Catharanthus roseus*: a literature review from genes to metabolites [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15: 221–250.
- [12] Issaq HJ, Van QN, Waybright TJ, et al. Analytical and statistical approaches to metabolomics research [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32: 2183–2199.
- [13] Jiao XW, Zhao SJ. The research progress of medicinal plant metabolomics [J]. *J Guangdong Pharm Univ (广东药学院学报)*, 2007, 23: 228–231.
- [14] Qi XQ, Wang YL, Chen XY. *Plant Metabolomics: Methods and Applications (植物代谢组学: 方法与应用)* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2011: 120–181.
- [15] Qiu F, McAlpine JB, Lankin DC, et al. 2D NMR barcoding and differential analysis of complex mixtures for chemical identification: the *Actaea* triterpenes [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 3964–3972.
- [16] Bingol K, Brüsweiler R. Knowns and unknowns in metabolomics identified by multidimensional NMR and hybrid MS/NMR methods [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2016, 43: 17–24.
- [17] Mesnard F, Ratcliffe RG. NMR analysis of plant nitrogen metabolism [J]. *Photosynth Res*, 2005, 83: 163–180.
- [18] Jouhten P, Maaheimo H. Labelling analysis for ¹³C MFA using NMR spectroscopy [M]//Krömer JO. *Metabolic Flux Analysis*. New York: Springer New York, 2014: 143–164.
- [19] Nargund S, Sriram G. Designer labels for plant metabolism: statistical design of isotope labeling experiments for improved quantification of flux in complex plant metabolic networks [J]. *Mol Biosyst*, 2013, 9: 99–112.
- [20] Braunberger C, Zehl M, Conrad J, et al. LC-NMR, NMR, and LC-MS identification and LC-DAD quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in *Drosera peltata* [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 932: 111–116.
- [21] Nagana Gowda GA, Raftery D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? [J]. *J Magn Reson*, 2015, 260: 144–160.
- [22] Sumner LM, Lei Z, Nikolau BJ, et al. Modern plant metabolomics: advanced natural product gene discoveries, improved technologies, and future prospects [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32: 212–229.
- [23] Leiss KA, Choi YH, Verpoorte R, et al. An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10: 205–216.
- [24] De-la-Peña C, Loyola-Vargas VM. Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity [J]. *Plant Physiol*, 2014, 166: 701–719.
- [25] Balmer D, Flors V, Glauser G, et al. Metabolomics of cereals under biotic stress: current knowledge and techniques [J]. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 82.
- [26] Hendrawati O, Yao QQ, Kim HK, et al. Metabolic differentiation of *Arabidopsis* treated with methyl jasmonate using nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Plant Sci*, 2006, 170: 1118–1124.
- [27] Jahangir M, Abdel-Farid IB, Choi YH, et al. Metal ion-inducing metabolite accumulation in *Brassica rapa* [J]. *J Plant Physiol*, 2008, 165: 1429–1437.
- [28] Sánchez-Sampedro A, Kim HK, Choi YH, et al. Metabolomic alterations in elicitor treated *Silybum marianum* suspension cultures monitored by nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *J Biotechnol*, 2007, 130: 133–142.
- [29] Zulak KG, Cornish A, Daskalchuk TE, et al. Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and

- secondary metabolism [J]. *Planta*, 2007, 225: 1085–1106.
- [30] Zulak KG, Weljie AM, Vogel HJ, et al. Quantitative ^1H -NMR metabolomics reveals extensive metabolic reprogramming of primary and secondary metabolism in elicitor-treated opium poppy cell cultures [J]. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 5.
- [31] Hagel JM, Weljie AM, Vogel HJ, et al. Quantitative ^1H nuclear magnetic resonance metabolite profiling as a functional genomics platform to investigate alkaloid biosynthesis in opium poppy [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1805–1821.
- [32] Happyana N, Kayser O. Monitoring metabolite profiles of *Cannabis sativa* L. trichomes during flowering period using ^1H NMR-based metabolomics and real-time PCR [J]. *Planta Med*, 2016, 82: 1217–1223.
- [33] Jia X, Sun CS, Zuo Y, et al. Integrating transcriptomics and metabolomics to characterise the response of *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongolicus* (Bge.) to progressive drought stress [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 188.
- [34] Cagliani LR, Culeddu N, Chessa M, et al. NMR investigations for a quality assessment of Italian PDO saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. *Food Control*, 2015, 50: 342–348.
- [35] Viljoen AM, Zhao JP, Sandasi M, et al. Phytochemical distinction between *Pelargonium sidoides* (“Umckaloabo”) and *P. reniforme* through ^1H -NMR and UHPLC-MS metabolomic profiling [J]. *Metabolomics*, 2015, 11: 594–602.
- [36] Dai H, Xiao CN, Tang HR, et al. Combined NMR and LC-DAD-MS analysis reveals comprehensive metabolomic variations for three phenotypic cultivars of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9: 1565–1578.
- [37] Jiang MM, Wang CH, Zhu Y, et al. Sparse partial-least-squares discriminant analysis for different geographical origins of *Salvia miltiorrhiza* by ^1H -NMR-based metabolomics [J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25: 50–58.
- [38] Tian D, Li ZY, Fan SC, et al. NMR-based analysis of water soluble extracts of different *Astragali Radix* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2014, 49: 89–94.
- [39] Fan ML, Xing J, Li ZY, et al. Comparison on chemical constituents between *Paeoniae Alba Radix* and *Paeoniae Rubra Radix* using NMR based metabolomic approach [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2014, 45: 3230–3237.
- [40] Petrakis EA, Cagliani LR, Polissiou MG, et al. Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ^1H -NMR metabolite fingerprinting [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 890–896.
- [41] Nguyen HT, Lee DK, Choi YG, et al. A ^1H NMR-based metabolomics approach to evaluate the geographical authenticity of herbal medicine and its application in building a model effectively assessing the mixing proportion of intentional admixtures: a case study of *Panax ginseng* metabolomics for the authenticity of herbal medicine [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 124: 120–128.
- [42] Yang YW, Wang YL, Sa RN, et al. Chemical fingerprinting of *Angelica sinensis* at different growth stages by ^1H NMR [J]. *Chin J Magn Reson (波谱学杂志)*, 2013, 30: 69–79.
- [43] Xue Y, Li XW, Li ZY, et al. UPLC/Q-TOF MS and NMR plant metabolomics approach in studying the effect of growth year on the quality of *Polygala tenuifolia* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 340–347.
- [44] Xia YG, Yang BY, Wang QH, et al. Quantitative analysis and chromatographic fingerprinting for the quality evaluation of *Forsythia suspensa* extract by HPLC coupled with photodiode array detector [J]. *J Sep Sci*, 2009, 32: 4113–4125.
- [45] Guo H, Liu AH, Li L, et al. Simultaneous determination of 12 major constituents in *Forsythia suspensa* by high performance liquid chromatography-DAD method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43: 1000–1006.
- [46] Jia JP, Zhang FS, Li ZY, et al. Comparison of fruits of *Forsythia suspensa* at two different maturation stages by NMR-based metabolomics [J]. *Molecules*, 2015, 20: 10065–10081.
- [47] Zahmanov G, Alipieva K, Simova S, et al. Metabolic differentiations of dwarf elder by NMR-based metabolomics [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 11: 404–409.
- [48] He P, Li ZY, Xing J, et al. ^1H -NMR based metabolic profiling of the processing effect on *Rehmanniae Radix* [J]. *Anal Methods*, 2014, 6: 2736–2744.
- [49] Booker A, Zhai LX, Gkouva C, et al. From traditional resource to global commodities: a comparison of *Rhodiola* species using NMR spectroscopy-metabolomics and HPTLC [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 254.
- [50] Mi X, Li ZY, Qin XM, et al. Monitoring of chemical components with different color traits of *Tussilago farfara* using NMR-based metabolomics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1692–1697.
- [51] Zhao JY. Applications of NMR-Based Metabonomics on the Studies of the Nephrotoxicity of *Aristolochia manshuriensis* (基于核磁共振的代谢组学方法在中药关木通肾毒性研究中的应用) [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2008.
- [52] Sun B, Wang XB, Cao RL, et al. NMR-based metabonomics study on the effect of Gancao in the attenuation of toxicity in rats induced by Fuzi [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 617–626.
- [53] Li J, Zhang S, Qin XM, et al. Comparison on chemical constituents in raw and honey baked *Farfarae Flos* by NMR-based metabolomic approach [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*

- (中草药), 2015, 46: 3009–3016.
- [54] Wang XJ, Li ZY, Xue SY, et al. Quality control over different processed products of *Polygalae Radix* based on plant metabolomics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43: 1727–1737.
- [55] Lee SY, Abas F, Khatib A, et al. Metabolite profiling of *Neptunia oleracea* and correlation with antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities using ^1H NMR-based metabolomics [J]. *Phytochem Lett*, 2016, 16: 23–33.
- [56] Dai H, Xiao CN, Tang HR, et al. Combined NMR and LC-MS analysis reveals the metabonomic changes in *Salvia miltiorrhiza* Bunge induced by water depletion [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9: 1460–1475.
- [57] Fishedick JT, Johnson SR, Ketchum Raymond EB, et al. NMR spectroscopic search module for Spektraris, an online resource for plant natural product identification-taxane diterpenoids from *Taxus* × media cell suspension cultures as a case study [J]. *Phytochemistry*, 2015, 113: 87–95.
- [58] Yang DF, Du XH, Yang ZQ, et al. Transcriptomics, proteomics, and metabolomics to reveal mechanisms underlying plant secondary metabolism [J]. *Eng Life Sci*, 2014, 14: 456–466.