

四种姜黄属药用植物根茎和块根挥发性代谢物的多元数据比较分析

孙敬茹^{1,2}, 卜俊玲¹, 赵欢¹, 毛亚平¹, 曾雯¹, 郭娟^{1*}, 黄璐琦^{1*}

(1. 中国中医科学院中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;

2. 中国中医科学院博士后研究中心, 北京 100700)

摘要: 常用传统中药莪术和郁金是中药中多基源现象的典型代表, 其基源植物关系错综复杂。本研究以中药姜黄、郁金、莪术的基源植物姜黄 (*Curcuma longa*)、广西莪术 (*Curcuma kwangsuensis*)、温郁金 (*Curcuma wenyujing*) 和蓬莪术 (*Curcuma phaeocaulis*) 为研究材料, 通过多元数据分析方法对比 4 种药用植物根茎和块根的挥发性代谢物。结果表明, 来源于同一物种的根茎和块根的挥发性代谢物种类相似但含量存在差异; 植物姜黄根茎 (药材姜黄的基源) 与其他 3 种植物根茎的挥发性代谢物差异大; 除植物姜黄根茎外的其他 3 种植物根茎 (药材莪术的基源) 含有多种共有成分, 但 3 种根茎挥发性代谢物差异均达到了显著水平; 4 种植物块根 (药材郁金的基源) 含有多种共有单萜类化合物, 但总体挥发性代谢物差异也达到了显著水平。本研究从挥发性代谢物角度揭示了中药姜黄、郁金、莪术基源植物的共有代谢物及代谢差异, 能够为这 3 种中药的临床用药提供参考, 具有重要理论意义。

关键词: 姜黄属药用植物; 挥发性代谢物; 多元数据分析; 根茎; 块根

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 08-1215-10

Multivariate data analysis of volatile metabolites in rhizomes and radices of four medicinal plants from *Curcuma* L.

SUN Jing-ru^{1,2}, BU Jun-ling¹, ZHAO Huan¹, MAO Ya-ping¹, ZENG Wen¹,
GUO Juan^{1*}, HUANG Lu-qi^{1*}

(1. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Center for Post-doctoral Research, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: The commonly used traditional Chinese medicines Curcumae Rhizome (Ezhu) and Curcumae Radix (Yujin), are representatives of multi-plant sources. The relationship among the original source plant species is intricate. In this study, by using multivariate data analysis, volatile metabolites in rhizomes and radices of source plants of Curcumae Longae rhizome (Jianghuang), Yujin and Ezhu in traditional Chinese medicine were compared and analyzed. The source plants included *Curcuma longa*, *Curcuma kwangsuensis*, *Curcuma wenyujing* and *Curcuma phaeocaulis*. The results indicated that: ① volatile metabolites were similar in quality but variation in quantity for rhizomes and radices origin from the same plant species; ② volatile metabolites of *C. longa* rhizomes showed bigger difference compared with others; ③ although common volatile

收稿日期: 2018-05-03; 修回日期: 2018-05-31.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603244); 中国博士后科学基金资助项目 (2015M571252); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设”项目 (2060302).

*通讯作者 Tel: 86-10-64087469, E-mail: guojuanzzy@163.com; huangluqi01@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0408

metabolites were observed in rhizome of *C. kwangsuensis*, *C. wenyujing* and *C. phaeocaulis*, the difference among them were significant; and ④ significant differences were observed for the four kinds of radices. Results in this study revealed the differences of the four source plants species, and similar metabolites in source plants of Curcumae Rhizome (Ezhu) and Curcumae Radix (Yujin) from the level of volatile metabolites. These results provided a reference for the clinical use of the three kinds of traditional Chinese medicine.

Key words: medicinal plants from *Curcuma*; volatile metabolites; multivariate data analysis; rhizome; radices

常用传统中药郁金、莪术均为中药中一药多基源的典型代表, 中药姜黄、郁金、莪术均来源于姜科姜黄属药用植物, 基源植物种类交叉, 关系错综复杂, 并随时代不同存在基源变迁。依据谢宗万^[1]对这 3 种中药进行的本草考证, 《唐本草》表明药材姜黄来源于多个品种并与莪术混称, 据《唐本草》、《本草图经》、《本草衍义》、《本草纲目》等记载, 明代以前郁金的基源是植物姜黄的根茎, 而清末明初的《增订伪药条辨》对郁金的描述则表明郁金的基源转换为姜黄属植物的块根。2015 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 收载药材姜黄基源 1 种, 为姜科植物姜黄 (*Curcuma longa* L.) 的干燥根茎; 莪术基源 3 种, 为姜科植物蓬莪术 (*Curcuma phaeocaulis* Val.)、广西莪术 (*Curcuma kwangsuensis* S. G. Lee et C. F. Liang) 或温郁金 (*Curcuma wenyujing* Y. H. Chen et C. Ling) 的干燥根茎; 郁金基源 4 种, 为这 4 种姜科植物的干燥块根^[2]。因而, 中药姜黄、郁金、莪术在我国药用历史上不仅基源部位发生了变化, 基源植物种类也存在差异, 目前临床用药过程中, 药材郁金和莪术往往不根据基源植物做区分, 对 4 种药用植物入药部位物质基础的研究能够为其临床用药提供研究基础。

姜黄素类化合物和挥发油类化合物是中药姜黄、郁金和莪术的药效活性成分, 但中药莪术和郁金中姜黄素类化合物含量很低^[3]。挥发油类化合物为抗肿瘤、消炎、抗病毒的重要药效成分, 如中药姜黄倍半萜 β -倍半水芹烯对白白血病、多发性骨髓瘤和结肠直肠癌细胞具有与姜黄素相似水平的抗增殖能力^[4], 中药莪术和郁金中 β -榄香烯、 δ -榄香烯、呋喃二烯、呋喃二烯酮、莪术醇、吉马酮、莪术酮、莪术二酮都具有较好的抗癌药效活性^[5]。早期的研究表明, 姜黄属药用植物根茎挥发油代谢物中存在多种共有代谢物, 但主要组分存在差异^[6]。中药姜黄、郁金、莪术基源植物根茎和块根挥发性代谢物的系统性比较和多元数据分析能够为 3 种中药基源的识别和临床用药提供帮助。

鉴于中药长期以来对药材道地性的认可, 为了分析药材姜黄、郁金、莪术 3 种中药差异的物质基础, 本研究以采自各自道地产区的 4 种基源植物为实验材料。通过气相色谱和质谱联用仪器 (GC-MS), 对比分析了 4 种药用植物根茎和块根的挥发性代谢物。通过分析这 4 种姜黄属植物根茎和块根间药效活性物质种类和含量的差异将为探究其不同部位存在药效差别现象提供基础, 也为药材郁金和莪术的一药多基源现象提供科学依据。

材料与方法

仪器与试剂 Thermo fisher Trace 1310 气相色谱仪与 Thermo Scientific TSQ8000 质谱仪 (Thermo Scientific, Germany) 串联仪器。Xcalibur 3.2 软件; Metalign 软件, 甲基叔丁基醚为色谱纯 (Aladdin)。

植物材料 2015 年 12 月从 4 种姜黄属药用植物的道地产区采集 4 种姜黄属植物的根茎和块根, 姜黄 (*Curcuma longa* L.) 根茎和块根采自四川乐山犍为, 广西莪术 (*Curcuma kwangsuensis* S. G. Lee et C. F. Liang) 根茎和块根采自广西南宁药用植物园, 温郁金 (*Curcuma wenyujing* Y. H. Chen et C. Ling) 根茎和块根采自浙江温州瑞安, 蓬莪术 (*Curcuma phaeocaulis* Val.) 根茎和块根采自四川双流。样品采集由全国第四次中药资源普查工作人员协助, 采集后孙敬茹根据《中国药典》和《中国植物志》对 4 种药用植物的描述, 进行了严格鉴定。完整健康根茎连同块根被采集后, 用自来水清洗, 吸水纸吸干后切为小块, 迅速丢入液氮淬灭, 样品经液氮预冻后快速用球磨机磨粉, 然后进行挥发性代谢物提取。

样品提取 称取 1 g 样品粉末, 加入甲基叔丁基醚 2 mL, 涡旋 2 min 后, 200 r·min⁻¹ 摇动过夜提取, 然后 12000 ×g 离心 20 min, 吸取上清, 经 0.2 μ m 聚四氟乙烯 (PTFE) 滤膜过滤后进行挥发性代谢物测定。

GC-MS 检测 样品检测均在 Thermo 三重四级

杆气质联用仪上进行, 气相为 Trace1310, 质谱为 MS TSQ8000。测定用 Thermo TG-5 MS 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 进样口温度 250 °C, 氦气流速 1 mL·min⁻¹, 程序升温的起始温度为 70 °C, 保持 3 min, 然后 8 °C·min⁻¹ 升温到 230 °C, 20 °C·min⁻¹ 升温到 300 °C, 保持 2 min。扫描质量 (*m/z*) 50~600。电子轰击离子源 (EI), 电子电离能量 70 eV。

数据处理 代谢物通过质谱图与 NIST 质谱库比对和相关参考文献来鉴定, 与 NIST 谱库比对进行化合物鉴定中, 只有色谱峰强度 >1×10⁵, 质谱图与 NIST 质谱库质谱图正向比对大于 800 的峰才确定为鉴定物质。GC-MS 扫描数-峰高数据通过 metalign 软件进行提取, 提取的有效数据 (*R*_t = 5~42 min) 用于多元数据分析。自动质谱解卷积和识别系统 (Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System, AMDIS) 软件用于自动去卷积后分析色谱峰的纯度和保留时间-特征离子列表的获取, 代谢组学离子数据提取算法软件 (Metabolomics Ion-based Data Extraction Algorithm, MET-IDEA) 按照 AMDIS 软件获得的保留时间-特征离子提取峰面积。

本研究所用主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 均通过 SIMCA-P (Umetrics, 11.5) 进行, PCA、OPLS-DA 建模前, 数据进行 pareto 预处理, PLS-DA 建模前数据进行 UV 预处理。峰面积的方差分析 (ANOVA) 和组间比较通过 SPSS (IBM, 13.0) 软件进行, 箱线图用 sigmaplot 绘制。

结果

1 挥发性代谢物鉴定

通过将质谱图与 NIST 库及参考文献^[7-10] 对比, 本研究从 4 种姜黄属药用植物根茎和块根中共鉴定出 80 种次生代谢物 (表 1), 包括烷烃、醇、单萜和倍半萜类化合物, 其中单萜和倍半萜类化合物为主

要成分。

植物广西莪术、温郁金和蓬莪术根茎样品含有多种共有单萜和倍半萜类代谢物, 但含量存在差异, 这些共有的代谢物包括 2-庚醇 (2-heptanol)、1*R*- α -蒎烯 (1*R*- α -pinene)、莰烯 (camphene)、 β -侧柏烯 (β -thujene)、(-)- β -蒎烯 [(-)- β -pinene]、 β -蒎烯 (β -pinene)、正癸烷 (decane)、柠檬烯 (limonene)、桉叶油醇 (cineole)、 β -顺-罗勒烯 (β -*cis*-ocimene)、十一烷 (undecane)、芳樟醇 (linalool)、(+)-樟脑 [(+)-camphor]、异龙脑 (isoborneol)、内型冰片 (endo-borneol)、(-)-4-萜烯醇 [(-)-terpinen-4-ol]、 α -松油醇 (α -terpineol)、1,3-二叔丁基苯 (1,3-ditertiarybutylbenzene)、 δ -榄香烯 (δ -elemene)、 β -榄香烯 (β -elemene)、石竹烯 (caryophyllene)、 γ -榄香烯 (γ -elemene)、蛇麻烯 (humulene)、吉马烯 D (germacrene D)、莪术烯 (curzerene)、吉马烯 A (germacrene A)、3,7(11)-芹子二烯 [3,7(11)-selinadiene]、绿花白千层醇 (viridiflorol)、吉马酮 (germacrone)。4 种块根中也含有一些共有的挥发性代谢物, 这些代谢物包括 1*R*- α -蒎烯 (1*R*- α -pinene)、莰烯 (camphene)、(-)- β -蒎烯 [(-)- β -pinene]、柠檬烯 (limonene)、桉叶油醇 (cineole)、 γ -松油烯 (γ -terpinene)、十一烷 (undecane) 和十二烷 (dodecane)。

2 4 种植物根茎和块根挥发性代谢物比较分析

为了获取 4 种植物根茎和块根代谢物的关系, 首先对样品进行了无监督的主成分分析 (PCA), PCA 得分图表明 (图 1A) 样品大致沿两个方向分布, 植物姜黄根茎和块根沿一个方向分布, 植物广西莪术、温郁金和蓬莪术根茎样品沿另一方向分布, 而植物广西莪术、温郁金和蓬莪术的块根样品分布在两个方向的交叉部位。PCA 载荷图 (图 1B) 中代谢成分也按照相似的两个方向分布。因而, 植物姜黄根茎和块根成分与其他 3 种植物根茎和块根代谢物差异较大, 而植物温郁金、广西莪术和蓬莪术根茎存在较多相似的代谢物。

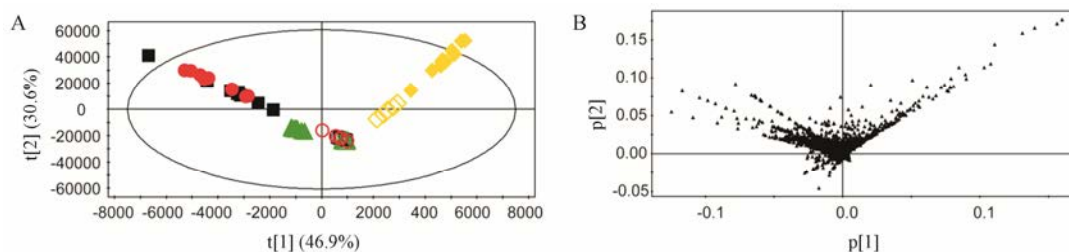


Figure 1 Score and loading plot of principal component analysis obtained from all rhizomes and radices. A: Score plot; B: Loading plot. Yellow diamond: Rhizomes of *C. longa*; Yellow open diamond: Radices of *C. longa*; Red dot: Rhizomes of *C. wenyujing*; Red circle: Radices of *C. wenyujing*; Black square: Rhizomes of *C. kwangsuensis*; Black open square: Radices of *C. kwangsuensis*; Green triangle: Rhizomes of *C. phaeocaulis*; Green open triangle: Radices of *C. phaeocaulis*

Table 1 Identified volatile metabolites in *C. longa*, *C. kwangsuensis*, *C. wenyujing* and *C. phaeocaulis*

t_R /min	Compounds	Formula	t_R /min	Compounds	Formula
Alkanes and alcohols			Sesquiterpenes		
6.25	2-Heptanol	C ₇ H ₁₆ O	18.95	δ -Elemene	C ₁₅ H ₂₄
9.53	Undecane	C ₁₁ H ₂₄	20.88	β -Elemene like	C ₁₅ H ₂₄
13.49	Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	21.17	β -Elemene	C ₁₅ H ₂₄
16.6	Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	21.72	(-)-Zingiberene like	C ₁₅ H ₂₄
Aromatic compounds			22.23	Caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄
15.59	1,3-Ditertiarybutylbenzene	C ₁₄ H ₂₂	22.85	γ -Elemene	C ₁₅ H ₂₄
Monoterpenes			22.91	<i>trans</i> - α -Bergamotene	C ₁₅ H ₂₄
6.7	Cyclene	C ₁₀ H ₁₆	23.44	α -Gurjunene	C ₁₅ H ₂₄
6.82	3-Thujene	C ₁₀ H ₁₆	23.62	Humulene	C ₁₅ H ₂₄
6.95	1 <i>R</i> - α -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	23.77	<i>cis</i> - β -Farnesene	C ₁₅ H ₂₄
7.27	Camphene	C ₁₀ H ₁₆	24.74	Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄
7.8	β -Thujene	C ₁₀ H ₁₆	24.8	Ar-Curcumene	C ₁₅ H ₂₂
7.86	(-)- β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	24.94	β -Selinene/ β -Eudesmene	C ₁₅ H ₂₄
8.16	β -Pinene	C ₁₀ H ₁₆	25.35	(-)-Zingiberene	C ₁₅ H ₂₄
8.44	α -Phellandrene	C ₁₀ H ₁₆	25.39	Curzerene	C ₁₅ H ₂₀ O
8.57	3-Carene	C ₁₀ H ₁₆	25.69	Germacrene A	C ₁₅ H ₂₄
8.7	α -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	25.85	β -Bisabolene	C ₁₅ H ₂₄
8.87	<i>o</i> -Cymene	C ₁₀ H ₁₄	26.12	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	C ₁₄ H ₂₂ O
8.95	Limonene	C ₁₀ H ₁₆	26.35	δ -Elemene	C ₁₅ H ₂₄
8.99	Cineole	C ₁₀ H ₁₈ O	26.44	β -Sesquiphellandrene	C ₁₅ H ₂₄
9.34	β - <i>cis</i> -Ocimene	C ₁₀ H ₁₆	26.61	3,7(11)-Selinadiene	C ₁₅ H ₂₄
9.58	γ -Terpinene	C ₁₀ H ₁₆	27.59	7- <i>epi</i> - <i>cis</i> -sesquisabinene hydrate	C ₁₅ H ₂₆ O
10.22	Terpinolene	C ₁₀ H ₁₆	27.69	γ -Elemene	C ₁₅ H ₂₄
10.47	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	28	(\pm)- <i>trans</i> -Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O
11.68	(+)-Camphor	C ₁₀ H ₁₆ O	28.88	Viridiflorol	C ₁₅ H ₂₆ O
12.1	Isoborneol	C ₁₀ H ₁₈ O	28.99	<i>cis</i> -Sesquisabinene hydrate 1	C ₁₅ H ₂₆ O
12.38	endo-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	29.19	β -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O
12.74	(-)-Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	29.53	β -Elemenone	C ₁₅ H ₂₂ O
13.01	<i>p</i> -Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O	29.89	<i>cis</i> -Sesquisabinene hydrate 2	C ₁₅ H ₂₆ O
13.21	α -Terpinol	C ₁₀ H ₁₈ O	32.47	α -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O
			30.54	<i>cis</i> -Sesquisabinene hydrate 3	C ₁₅ H ₂₆ O
			30.56	γ -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O
			31.23	β -Eudesmol like	C ₁₅ H ₂₆ O
			31.8	Ar-tumerone	C ₁₅ H ₂₀ O
			32	Tumerone	C ₁₅ H ₂₂ O
			32.8	Curzerene	C ₁₅ H ₂₀ O
			32.92	Germacrene	C ₁₅ H ₂₂ O
			33.15	Curlone	C ₁₅ H ₂₂ O
			33.74	Curdione	C ₁₅ H ₂₄ O ₂
			34.93	Curdione like	C ₁₅ H ₂₄ O ₂
			35.22	Ledene oxide-(II)	C ₁₅ H ₂₄ O
			36.34	Velleral	C ₁₅ H ₂₀ O ₂

3 相同植物来源根茎和块根挥发性代谢物比较分析

4 种姜黄属药用植物的根茎和块根入药后名称和药效不同, 本研究首先分析了相同植物来源的根茎和块根挥发性代谢物的差异。相同植物来源根茎和块根的挥发性代谢物指纹总离子流图比较 (图 2A~D) 表明, 同种植物根茎和块根的挥发性成分相似, 但含

量存在差异, 根茎的挥发性代谢物含量总体都较高, 而块根挥发性代谢物总体含量低, 只有少数几种挥发性化合物在块根中含量高于根茎。4 组根茎和相应块根的 PLS-DA 模型 200 次排列交叉验证表明, 这 4 种药用植物的根茎和块根的挥发性代谢物之间都存在显著性差异, 得分图和载荷图为图 2E~L, OPLS-DA

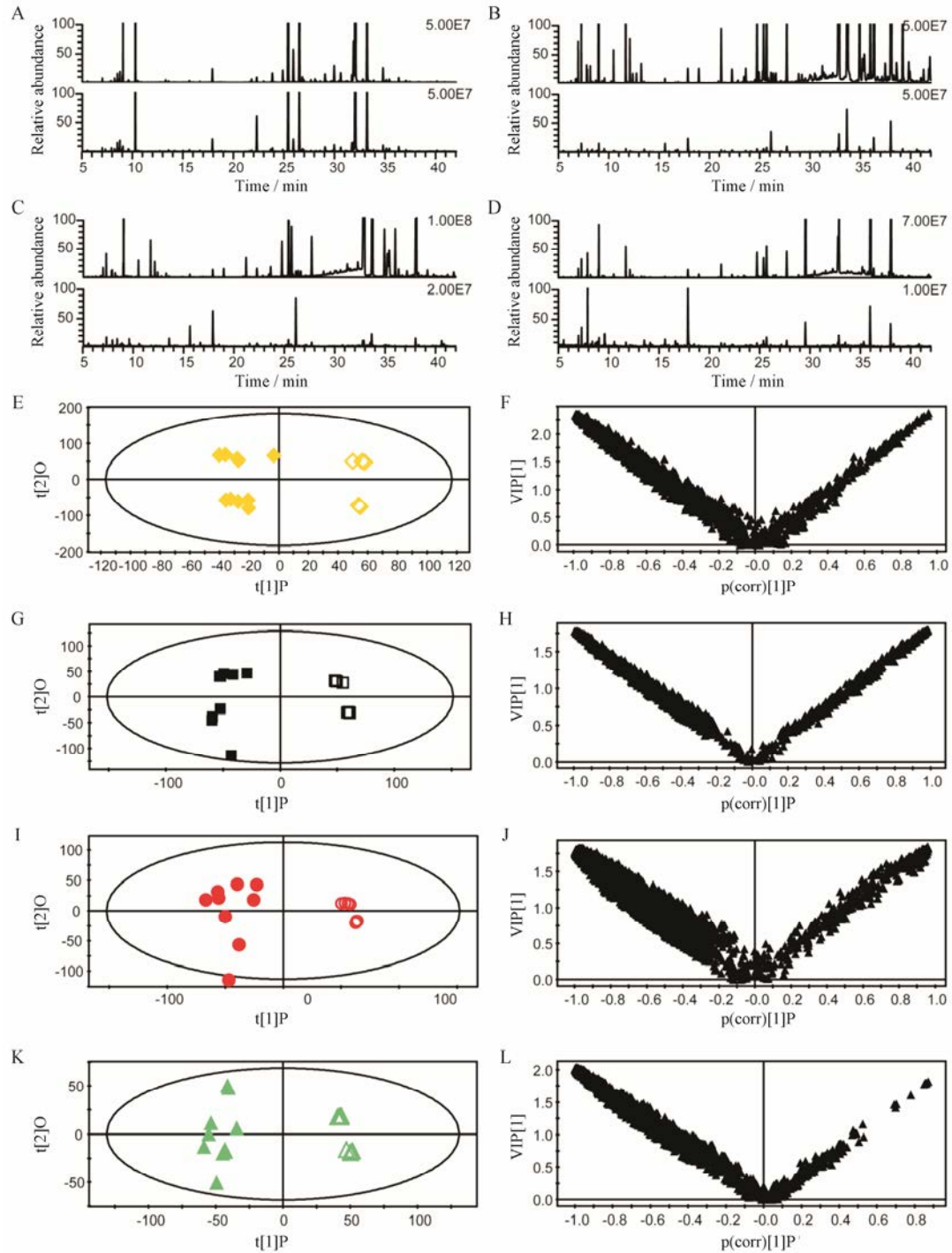


Figure 2 Comparison of rhizomes and radices origin from the same plant species. A: Representative total ion chromatograms of rhizomes and radices from *C. longa*; B: Representative total ion chromatograms of rhizomes and radices from *C. kwangsuensis*; C: Representative total ion chromatograms of rhizomes and radices from *C. wenyujing*; D: Representative total ion chromatograms of rhizomes and radices from *C. phaeocalis*; E: OPLS-DA score plot of rhizomes and radices of *C. longa*; F: OPLS-DA loading plot of rhizomes and radices of *C. longa*; G: OPLS-DA score plot of rhizomes and radices of *C. kwangsuensis*; H: OPLS-DA loading plot of rhizomes and radices of *C. kwangsuensis*; I: OPLS-DA score plot of rhizomes and radices of *C. wenyujing*; J: OPLS-DA loading plot of rhizomes and radices of *C. wenyujing*; K: OPLS-DA score plot of rhizomes and radices of *C. phaeocalis*; L: OPLS-DA loading plot of rhizomes and radices of *C. phaeocalis*. In A, B, C and D the above total ion chromatograms are for rhizomes and the below total ion chromatograms are for radices

模型的第一主成分 VIP 值 ($VIP > 1$) 用于分析差异化化合物。

植物姜黄块根与根茎相比, $1R-\alpha$ -蒎烯、蒾烯、 β -蒎烯、桉树脑、石竹烯和几种未鉴定结构的萜类化合

物含量较高, 而其他代谢物含量较低。植物广西莪术块根癸烷、十一烷、十二烷、十三烷、1,3-二叔丁基苯、2,4-二叔丁基苯酚、乙酸冰片酯、保留时间为 25.38 和 40.61 min 的两种未鉴定结构倍半萜、及保留时间为 5.48 和 15.97 min 两种烷烃含量较高, 而其他代谢物均含量较低。植物温郁金块根与根茎相比, 癸烷、十一烷、十二烷、1,3-二叔丁基苯、2,4-二叔丁基苯酚和保留时间为 5.48、16.62、21.51 min 的 3 种烷烃含量较高, 其他代谢物含量低。植物蓬莪术块根与根茎相比只有 γ -松油烯含量较高。

4 植物姜黄根茎与其他 3 种根茎挥发性代谢物比较分析

基于所有样品的 PCA 得分图分组关系 (图 1A), 以姜黄的根茎为一组样品, 其他 3 种药用植物根茎为一组样品, 进行 PLS-DA 分析, 200 次排列交叉验证表明, 姜黄根茎与其他 3 种植物的根茎样品的挥发性成分存在显著性差异。PLS-DA 模型的前两个主成分解释了 4 种植物根茎挥发性代谢物方差和的 43.7%, 而预测了样品分组信息差异的 94.2% (图 3A), 模型质量较好, 具备较好的预测能力。

VIP 和相关系数的载荷图 (图 3B) 分析表明, 植物广西莪术、温郁金、蓬莪术的根茎中含有较高的单萜、倍半萜、烷烃及一些苯丙素类化合物, 包括 2-庚醇、3-崖柏烯、1R- α -蒎烯、桉烯、 β -侧柏烯、(-)- β -蒎烯、 β -蒎烯、正癸烷、 β -cis-罗勒烯、芳樟醇、(+)-樟脑、异龙脑、endo-龙脑、4-萜烯醇、 α -萜品醇、1,3-叔丁基苯、乙酸龙脑酯、 δ -榄香烯、 β -榄香烯类似物、

β -榄香烯、 γ -榄香烯、 γ -榄香烯类似物、香树烯、蛇麻烯、吉马烯 D、 α -瑟琳烯、 β -瑟琳烯、2-异丙基-4a、8-二甲基-1,2,3,4a,5,6,7-八氢萘、莪术烯、吉马烯 A、 α -古芸烯类似物、2,4-二叔丁基苯酚、 β -榄香酮、 α -桉叶油醇、 β -桉叶油醇、 γ -桉叶油醇、 β -桉叶油醇类似物、莪术烯类似物、吉马酮、莪术二酮、莪术二酮类似物、喇叭烯氧化物 (II)、绒白乳菇醛和一些未鉴定的化合物。而植物姜黄根茎中另外的多种倍半萜和单萜含量较高, 这些化合物为 α -水芹烯、 α -萜烯、*o*-环烯、柠檬烯、桉树脑、 β -cis-罗勒烯、 γ -萜烯、对-聚伞花素醇-8、姜烯类似物、反式- α -香柠檬烯、 α -古芸烯、顺- β -法尼烯、芳姜黄烯、姜烯、 β -甜没药烯、 β -倍半水芹烯、3,7(11)-芹子二烯、7-表-顺式-倍半香桉烯水合物、橙花叔醇、芳姜黄酮、姜黄新酮、3 种倍半萜香桉烯水合物和一些没有鉴定结构的化合物。

分层聚类分析热图 (图 3C) 表明, 植物姜黄根茎样品挥发性成分与其他 3 种根茎样品间存在明显差异, 而其他三种根茎样品间挥发性代谢物也存在差异。

5 莪术基源植物根茎挥发性代谢物比较分析

植物广西莪术、温郁金和蓬莪术根茎挥发性成分间的分析表明, 3 种根茎间的差异都达到了显著性水平。3 组根茎样品的 PLS-DA 模型得分图 (图 4A) 表明, 植物蓬莪术根茎样品的组内差异较小且与植物广西莪术及温郁金根茎的差异较大, 而后两种植物根茎的挥发性代谢物差异较小。进一步分析这个模型的载荷图 (图 4B) 可见, 相对于蓬莪术, 广西莪术和

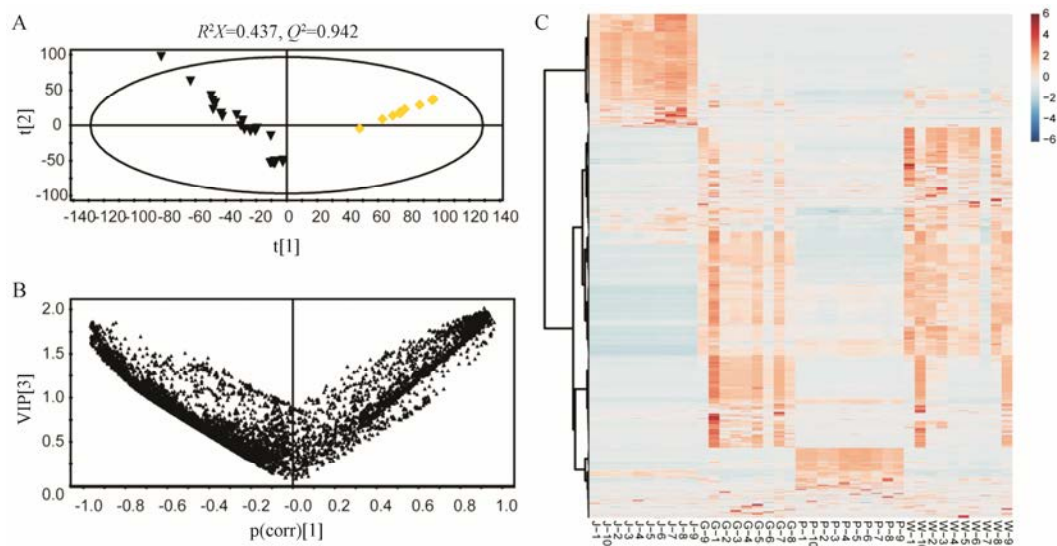


Figure 3 Score, VIP loading plot and heatmap of rhizomes from *C. longa* and other three kinds of rhizomes. A: PLS-DA score plot; B: PLS-DA loading plot; C: Heatmap. In figure A, yellow diamond: Rhizomes of *C. longa*; black inverted triangle: Other three kinds of rhizomes; in figure C, J: *C. longa*, G: *C. kwangsuensis*, P: *C. phaeocaulis*, W: *C. wenyujing*

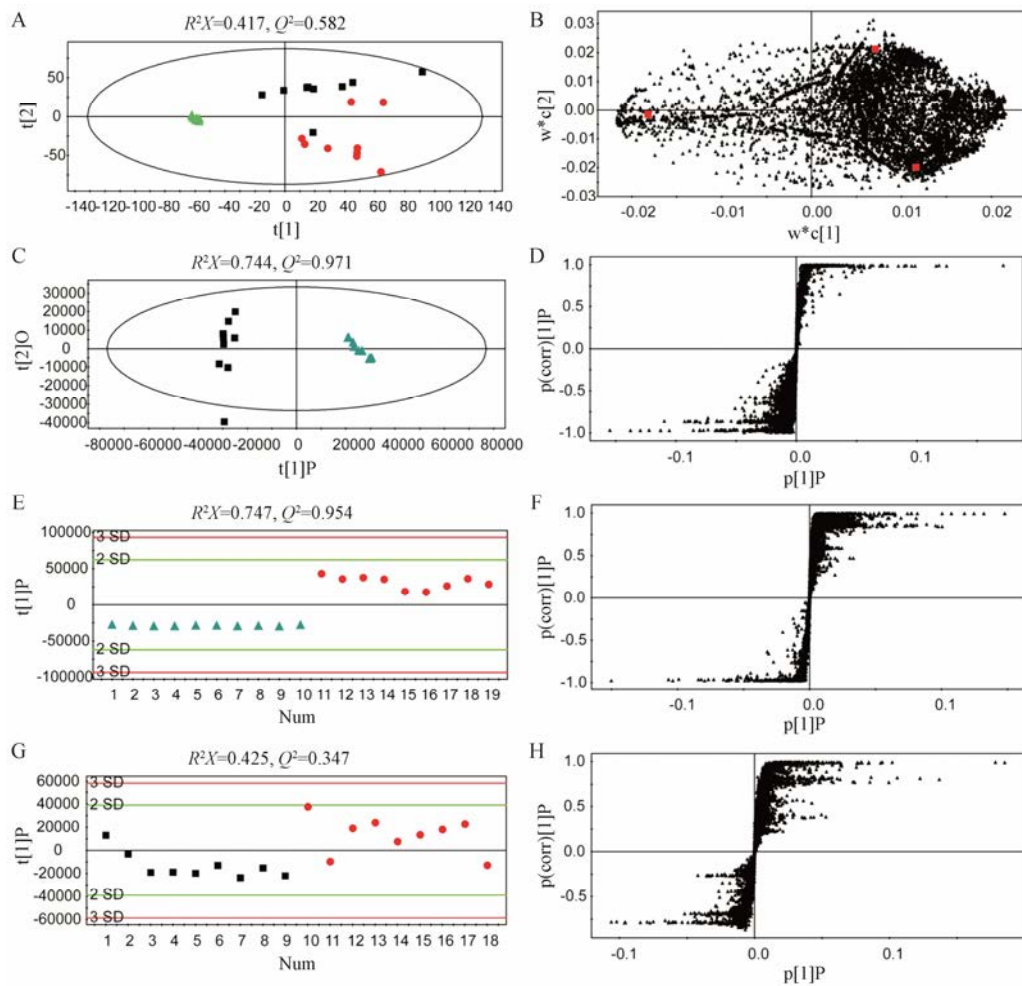


Figure 4 Score and loading plots of PLS-DA model and OPLS-DA model. A: Score plot of PLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis*, *C. wenyujing* and *C. phaeocaulis*; B: Loading plot of PLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis*, *C. wenyujing* and *C. phaeocaulis*; C: Score plot of OPLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis* and *C. phaeocaulis*; D: Loading plot of OPLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis* and *C. phaeocaulis*; E: Score plot of OPLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis* and *C. wenyujing*; F: Loading plot of OPLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis* and *C. wenyujing*; G: Score plot of OPLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis* and *C. wenyujing*; H: Loading plot of OPLS-DA model for rhizomes of *C. kwangsuensis* and *C. wenyujing*

温郁金根茎中的多种化合物含量都较高。

3种植物根茎两两比较的 OPLS-DA 模型用于分析 3 种根茎间差异代谢物。两两比较的得分图中, 来源于不同物种的根茎存在分组趋势 (图 4C、E、G)。植物蓬莪术根茎与广西莪术根茎样品比较的载荷图 (图 4D) 表明, 与植物蓬莪术根茎相比, 植物广西莪术根茎中桉树脑、绒白乳菇醛、莪术二酮和一种与莪术二酮碎裂模式一致的倍半萜含量较高, 而植物蓬莪术根茎中两种未鉴定结构的氧化倍半萜类化合物含量较高, 这两种化合物的保留时间分别为 29.54 和 36.00 min。而与植物温郁金根茎相比, 植物蓬莪术含量高的化合物依旧是保留时间为 29.54 和 36.00 min 的两个倍半萜, 而植物温郁金根茎含有较多的桉树脑、(+)-樟脑、莪术烯、莪术烯类似物、莪术二酮、莪术二酮类似物和一种氧化倍半萜 (保留时间为

38.09 min) (图 4F)。而与植物广西莪术相比, 植物温郁金根茎中莪术烯、莪术烯类似物、吉马烯 A、 γ -榄香烯类似物、吉马酮和一种结构未鉴定的氧化倍半萜 (保留时间为 38.09 min) 含量较高, 而绒白乳菇醛和一种结构未知保留时间为 39.21 min 的氧化倍半萜含量较低 (图 4H)。

6 4 种郁金的代谢差异

4 种植物块根样品挥发性代谢物的 PLS-DA 模型分析表明, 4 种块根挥发性代谢物之间存在显著性差异。载荷图分析表明, 对 4 种块根差异贡献大的代谢物包括单萜类化合物、倍半萜类化合物、烷烃和苯丙素类化合物。

为了进一步了解植物姜黄块根与其他 3 种块根的单萜和倍半萜含量差异, 对已鉴定单萜和倍半萜类化合物中总离子流图峰纯度 > 50% 的化合物进行

了相对含量分析。单萜相对含量分析表明，植物姜黄块根中特异性含有芳樟醇 (linalool)、 α -水芹烯 (α -phellandrene) 和 α -松油烯 (α -terpinene)，累积了较多的 β -蒎烯 (β -pinene) 和邻伞花烃 (*o*-cymene)，而其他 3 种块根中单萜含量存在差异，两种块根中炭烯 (camphene) 和樟脑 [(+)-camphor] 含量显著性比植物姜黄块根高 (图 5)。倍半萜的分析表明，姜黄块根特异性含有石竹烯 (caryophyllene)、芳姜黄烯 (ar-curcumene)、姜烯 (zingiberene)、 β -倍半萜水芹烯 (β -sesquiphellandrene)、芳姜黄酮 (ar-tumerone)、 α -姜黄酮 (α -tumerone) 和 β -姜黄酮 (β -tumerone)，而吉马酮 (germacrone)、莪术二酮 (curdione)、绒白乳菇醛 (velleral) 虽然特异性地存在于广西莪术、温郁金和蓬莪术的块根中，这些化合物含量在 3 种块根间存在差异 (图 6)。此外， β -榄香烯、 δ -榄香烯、蛇麻烯、

吉马烯 D、吉马烯 A、3,7(11)-芹子二烯也特异性存在于广西莪术、温郁金和蓬莪术中，但由于含量低，峰纯度较低，没有进行这些化合物相对含量的比较。

讨论

本研究的研究对象虽然不是中药材，但其基源植物采收期入药部位的代谢差异在一定程度上也能够为中药的临床应用提供理论依据。本研究结果中，植物姜黄块根与植物广西莪术、温郁金和蓬莪术块根挥发性成分差异大的结果与药材黄丝郁金与桂郁金、温郁金、绿丝郁金挥发油成分差异大的结果一致 (黄丝郁金、桂郁金、温郁金和绿丝郁金的基源分别为植物姜黄、广西莪术、温郁金和蓬莪术的块根)^[10, 11]。植物姜黄块根不含有吉马酮而其他 3 种药用植物块根中有较高含量吉马酮，这与黄丝郁金挥

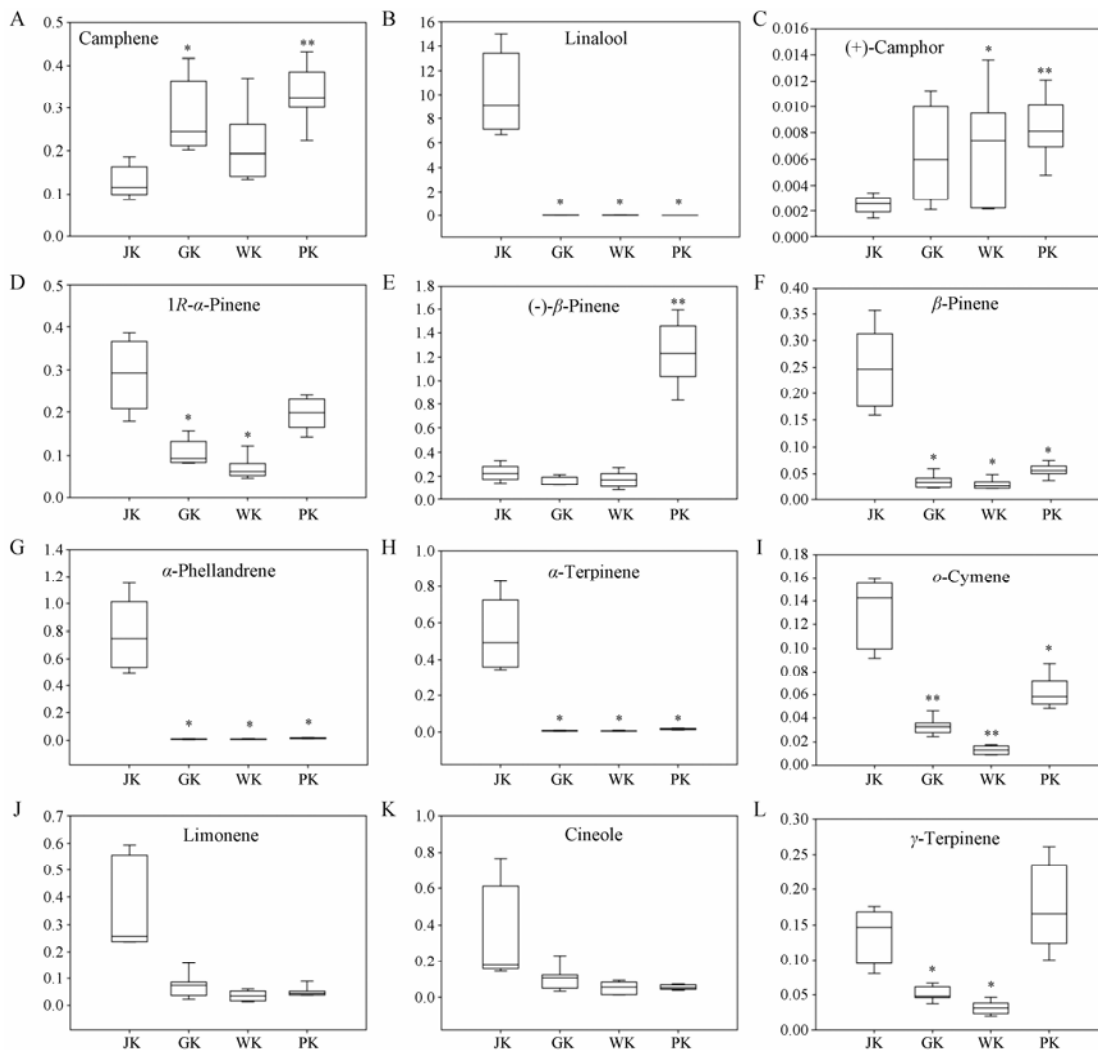


Figure 5 Peak areas of monoterpenes in the four kinds of radices. Peak areas of monoterpenes in radices of *C. kwangsuensis*, *C. wenyujing* and *C. phaeoaulis* were compared with those in *C. longa* radices and significant symbol “*” were labeled for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$

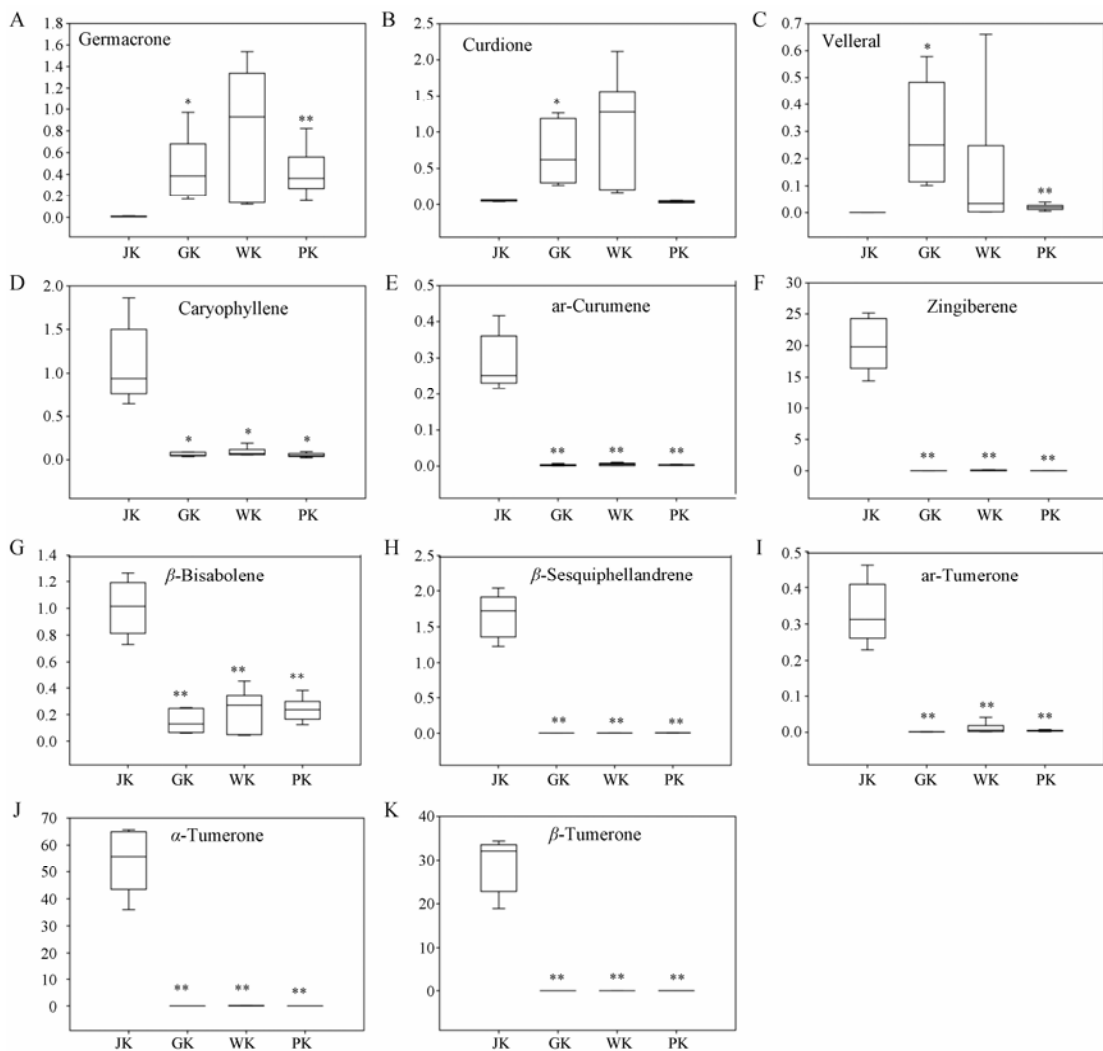


Figure 6 Peak areas of sesquiterpenes in the four kinds of radices. Peak areas of sesquiterpenes in radices of *C. kwangsuensis*, *C. wenyujing* and *C. phaeoaulis* were compared with those in *C. longa* radices and significant symbol “*” were labeled for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$

发油不含吉马酮而其他 3 种郁金吉马酮含量较高相符^[10]。植物姜黄根茎与其他 3 种植物根茎的显著性差异可能是药材姜黄和莪术差异的基础, 植物广西莪术、温郁金、蓬莪术根茎含有的多种共有挥发性代谢物则可能是其作为中药莪术的物质基础, 而植物姜黄、广西莪术、温郁金、蓬莪术根茎与相应块根挥发性代谢物种类相似而含量存在差异可能是其入药后药效不同的原因。

4 种药用植物根茎和块根间药效活性物质种类和含量的差异可能是其药效差异的原因。目前的研究表明, 姜黄素可能是药材姜黄、莪术、郁金寒热药性差异的物质基础^[3], 挥发性代谢物对这 3 种中药药性差异的影响还不清楚。目前的研究表明, 姜黄属药用植物精油中的部分单萜和倍半萜能够抗癌、消炎、抗病毒, 这些药效活性代谢物包括植物姜黄根茎和

块根中特异性含有的芳姜黄烯^[4]、姜烯^[12]、 β -倍半水芹烯^[4]、芳姜黄酮^[13], 也包括植物蓬莪术、广西莪术和温郁金根茎中共有部分单萜和 δ -榄香烯、 β -榄香烯、 γ -榄香烯、莪术烯、 β -桉叶油醇、吉马酮、莪术二酮^[5]等。随着这些药效活性物质药效机制的逐步解析, 这些代谢物可能成为药材姜黄、郁金、莪术抗癌、消炎、抗病毒药理差异的物质基础。

4 种姜黄属药用植物挥发性代谢物主要为单萜和倍半萜。植物通过 MEP 途径合成萜类共同底物二甲基丙烯基焦磷酸 (DMAPP) 和异戊二烯基焦磷酸 (IPP), 之后二者缩合产生的牻牛儿基焦磷酸 (GPP) 在单萜合酶的作用下形成多种单萜的骨架, 细胞色素 P450 酶等催化修饰后形成具有生物活性的单萜类代谢物。倍半萜类代谢物通过 MVA 途径合成萜类底物 DMAPP 和 IPP, 二者缩合产生法尼基焦磷酸 (FPP),

FPP 经倍半萜合酶催化形成倍半萜的多种骨架, 经细胞色素 P450 酶等催化修饰形成具有生物活性的倍半萜类代谢物。相同植物来源根茎和块根萜类挥发性代谢物种类相似, 含量有明显差异, 推测其单萜合酶、倍半萜合酶及下游细胞色素 P450 酶等可能相同, 但表达水平不同, 而不同来源的根茎和块根挥发性代谢物种类差异显著, 推测其单萜合酶、倍半萜合酶及下游细胞色素 P450 酶等存在较大差异。本实验数据, 为寻找新的萜类合酶及下游细胞色素 P450 酶等提供支持。

中药长期以来注重道地性, 道地性是中药材的“品质标杆”, 道地性包含了诸多环境因素的影响^[14]。外在环境因素是植物次生代谢物累积差异的重要影响因素^[15, 16], 中药长期以来的道地性则将中药基源植物生长过程中的光照、温度、水分、空气、土壤、取食昆虫、共生菌等影响因素进行了综合, 是保证中药品质的重要因素。如连续两年对温州 7 个温郁金道地产区温郁金药材挥发油、吉马酮和莪术醇的监测表明, 各批次温郁金药材均符合中国药典 2010 年版标准要求^[17]。本研究中 4 种药用植物均采自各自的道地产区, 挥发性代谢物的差异包含了物种本身的差异也包含了环境因素引起的差异, 材料具备典型性。

References

- [1] Xie ZW. Differences and similarities of medicinal plant species and medicinal parts in ancient and modern for Yujin, Jianghuang, Pianjianghuang and Ezhu [J]. Tradit Med Sin Pharmacol Res (中医药研究), 1988, 5: 24–27.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part 1. (中华人民共和国药典: 第一部) [S]. 2015ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 208, 264, 274.
- [3] Wang Z, Lei TK, Wang L, et al. Relationship between hot & cold characteristics and curcumin content in *Curcumae Longae* Rhizoma, *Curcumae Radix* and *Curumae Rhizoma* [J]. China Pharm (中国药师), 2017, 7: 1173–1176.
- [4] Tyagi AK, Prasad S, Yuan W, et al. Identification of a novel compound (beta-sesquiphellandrene) from turmeric (*Curcuma longa*) with anticancer potential: comparison with curcumin [J]. Invest New Drugs, 2015, 33: 1175–1186.
- [5] Lu JJ, Dand YY, Huang M, et al. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from Rhizoma Curcumae--a review [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143: 406–411.
- [6] Fang HJ, Yu JG, Chen YH, et al. Study on Chinese Curcuma II. Comparison of the chemical components of essential oils from the rhizome of five sepecies medicinal *Curcuma* plants [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1982, 17: 441–447.
- [7] Ma X, Gang DR. Metabolic profiling of *in vitro* micropropagated and conventionally greenhouse grown ginger (*Zingiber officinale*) [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 2239–2255.
- [8] Jiang H, Xie Z, Koo HJ, et al. Metabolic profiling and phylogenetic analysis of medicinal *Zingiber* species: tools for authentication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc) [J]. Phytochemistry, 2006, 67: 1673–1685.
- [9] Yang FQ, Li SP, Chen Y, et al. The fingerprint of Ezhu by GC-MS [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 1013–1018.
- [10] Zhang J, Wang L, Shi DH, et al. Analysis of volatile oil in Curcumae Radix pieces from four different sources by GC-MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae (中国实验方剂学杂志), 2017, 13: 1–7.
- [11] Weng JY, Zhang CC, Chen XX, et al. Comparative analysis of the volatile oils chemical composition in Curcuma Wenyujin from different origin by GC-MS [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2015, 4: 981–985.
- [12] Sharifi-Rad M, Varoni EM, Salehi B. Plants of the genus *Zingiber* as a source of bioactive phytochemicals: from tradition to pharmacy [J]. Molecules, 2017, 22: E2145.
- [13] Oh S, Han AR, Park HR, et al. Suppression of inflammatory cytokine production by ar-turmerone isolated from *Curcuma phaeocalis* [J]. Chem Biodivers, 2014, 11: 1034–1041.
- [14] Bian LH, Kang CZ, Xu ZX, et al. Study on ecological regionalization of shandong *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. based on ecological factors [J]. Shandong Agric Sci (山东农业科学), 2018, 2: 68–75.
- [15] Nishida R. Chemical ecology of insect-plant interactions: ecological significance of plant secondary metabolites [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 78: 1–13.
- [16] Ludwig-Müller J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? [J]. Biotechnol Lett, 2015, 37: 1325–1334.
- [17] Tao ZM, Jiang W, Wu ZG, et al. Comparison of active ingredients of Wenyujin from different areas [J]. Zhejiang Agric Sci (浙江农业科学), 2015, 10: 1583–1586.