

基于SPME-GC-MS结合多元统计的不同产地黄芪挥发性成分差异分析

陈贤双¹, 李科^{1,2*}, 李震宇^{1*}, 秦雪梅^{1*}

(1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006; 2. 中国科学院过程工程研究所, 北京 100190)

摘要:“豆腥气”是黄芪重要的道地性特征之一, 阐明黄芪“豆腥气”物质基础对于研究道地药材特征、建立道地药材质控方法具有重要意义。目前已有报道对不同产地黄芪挥发性成分分析, 但并未进行系统全面的研究。本实验运用了固相微萃取气质联用 (SPME-GC-MS) 技术分析了山西 (仿野生芪)、甘肃 (栽培芪)、内蒙古 (栽培芪) 3 个产地黄芪挥发性成分, 结合多元统计分析的方法探讨 3 个不同产地黄芪挥发性成分的差异, 并通过主成分分析 (PCA)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 进行多元统计分析和评价。结果显示, 利用 SPME-GC-MS 技术对 3 个产地黄芪挥发性成分进行分析, 共鉴定出 76 种挥发性成分; PCA 模型结果表明黄芪中挥发性成分与产地具有相关性; PLS-DA 可以实现 3 个产地黄芪样本的分离, 不同产地黄芪样本中挥发性成分存在较明显差异; 并筛选出己酸、正己醛、2-丁基-2-辛烯醛、正己醇、苯甲醇、2-丁基呋喃这 6 种主要的差异挥发性物质; 并且发现不同产地、栽培方式黄芪中正己醛和己酸比值存在较大差异, 山西仿野生芪中正己醛/己酸平均相对含量比值为 7.8:1, 而内蒙古、甘肃栽培芪中正己醛/己酸的比值分别为 2.3:1 和 0.96:1。本研究鉴定出的挥发性成分不仅为黄芪道地性特征“豆腥气”研究奠定了基础, 也为黄芪质量控制提供了新的思路。

关键词: 黄芪; 挥发性成分; 多元统计分析; 固相微萃取; 气相色谱-质谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-0979-08

Analysis of the volatile components of Astragali Radix from different habitats by SPME-GC-MS combined with multivariate statistical analysis

CHEN Xian-shuang¹, LI Ke^{1,2*}, LI Zhen-yu^{1*}, QIN Xue-mei^{1*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: "Beany flavor" is one of the important authentic characteristics of Astragali Radix. It is important to clarify the material basis of "Beany flavor" in the characterization of authentic medicinal materials and establishing quality control methods for authentic medicinal materials. At present, the analysis of volatile components in different habitats has been reported, but systematic comprehensive research has not been conducted. The SPME-GC-MS technique was used to analyze the volatile components of Astragali Radix from three producing areas: Shanxi (wild-simulated Astragali Radix), Gansu (cultivated Astragali Radix) and Inner Mongolia (cultivated Astragali Radix). Combined with the method of multivariate statistical analysis, the difference of volatile components of Astragali Radix from the three different producing areas is discussed. Multivariate statistical analysis and evaluation was conducted through principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA).

收稿日期: 2019-11-15; 修回日期: 2020-02-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 山西省优秀人才培养科技创新项目 (201605D211030, 201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家重点研发项目 (2019YFC1710800).

*通讯作者 Tel: 86-351-7019297, E-mail: like@sxu.edu.cn;

Tel: 86-351-7018379, E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn;

Tel: 86-351-7018379, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0814

Seventy-six volatile components of Astragali Radix from the three producing areas were identified by SPME-GC-MS. PCA model results showed that the volatile components correlated with their producing areas. PLS-DA demonstrated that the volatile components of Astragali Radix samples from different producing areas were significantly different. Six volatile substances including hexanoic acid, hexanal, 2-butyl-2-octenal, 1-hexanol, benzyl alcohol and 2-butylfuran were quantified. The ratio of hexanal to hexanoic acid in Astragali Radix from different areas and cultivation methods was significantly different: the ratio of hexanal: hexanoic acid in wild-simulated Astragali Radix of Shanxi was 7.8:1, while the ratio of hexanal: hexanoic acid in cultivated Astragali Radix of Inner Mongolia and Gansu was 2.3:1 and 0.96:1, respectively. The volatile components identified in this study provide a foundation for continued research of and quality control of Astragali Radix.

Key words: Astragali Radix; volatile component; multivariate statistical analysis; solid phase microextraction; gas chromatography-mass spectrometry

黄芪 (Astragali Radix) 是豆科植物黄芪属, 广泛分布于全国各地。黄芪为豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根^[1]。黄芪用药历史悠久, 始载于《神农本草经》, 将其列为上品^[2]。黄芪作用广泛, 具有补气固表、利尿托毒、敛疮生肌等功效^[3]。现代药理研究表明, 黄芪具有增强机体免疫功能、强心降压、降血糖、利尿、抗疲劳等功能^[4-8]。黄芪主产于山西、甘肃、内蒙古等地, 受生态环境等影响, 不同产地间黄芪质量存在着差异。

黄芪药材以“豆腥味浓, 质优”被业内所公认, 具有浓的豆腥味是正品优质黄芪的特征^[9]。著名现代名医曹炳章曾道: “山西太原府里陵地方出者, 名上芪, 其货直长糯软而无细枝, 切断有菊花纹, 兼有金井玉栏杆之纹, 为最道地; 又大同府五台山出, 粗皮细硬, 枝短味淡, 为台芪, 略次……”。豆腥味来源于挥发性成分, 挥发性成分在道地药材品质形成中具有潜在作用^[10]。课题组前期使用同步回流提取法结合气相色谱技术分析黄芪挥发性成分中主要成分正己醛, 而且对黄芪豆腥味产生的内在生化基础和外在化学成分的鉴别表征, 以及豆腥味与黄芪有效成分与黄芪活性成分之间的相关性进行分析, 还研究了不同浓淡豆腥味的黄芪主要药效学 (补气、抗疲劳及免疫调节) 的异同^[9]。

随着挥发性成分提取分析技术的发展, Xu 等^[11]采用同步蒸馏萃取法结合气质联用技术分析了鲜黄芪和干黄芪中的挥发性成分, 鲜黄芪中共鉴定出 43 种挥发性成分, 干黄芪中共检测出 44 种挥发性成分。Sun 等^[12]运用同时回流提取结合气质联用的方法对干黄芪中挥发性成分进行分析, 共检测出 65 种化合物。Li 等^[13]分析了山西、内蒙古、甘肃干黄芪中挥发性成分, 发现内蒙古黄芪中的挥发性成分种类最多, 山西次之, 甘肃最少。然而这些研究虽然在黄芪挥发性成分上进

行了指认, 但对道地药材黄芪“豆腥气”的物质组成及比例特点, 以及与不同产地、不同栽培方式黄芪药材的区别, 并没有深入研究。

近年来发展的固相微萃取技术集采样、萃取、浓缩、进样于一体, 具有快速简便, 不使用溶剂, 不破坏样品, 易于与其他技术在线联用等优点^[14]。固相微萃取技术为挥发性成分的分析提供了更为先进的分析手段。因此, 本研究采用固相微萃取结合气质联用技术, 通过对 18 批主流商品蒙古黄芪进行不同产地、不同栽培方式样品 (山西仿野生芪、甘肃在栽培芪、内蒙古栽培芪) 进行比较, 结合代谢组学分析方法, 通过 PCA 和 PLS-DA 分析, 找出挥发性成分间的比例差异, 探讨黄芪产地与挥发性成分的关系, 还进行了相关代谢通路的分析。本研究不仅为黄芪道地性特征“豆腥气”研究奠定了物质基础, 也为黄芪质量控制与评价提供参考。

材料与方法

材料 18 批黄芪药材采集于山西、甘肃、内蒙古 3 个不同产地, 经山西大学中医药研究中心秦雪梅教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的根, 样品用清水洗净, 去除芦头, 自然阴干后密封, 置于冷库保存备用, 详细信息见表 1。

仪器与试剂 Trace Polaris Q 气相色谱-质谱联用

Table 1 The origin information of Astragali Radix

No.	Area	No.	Area
S1	Shanxi Hunyuan	S10	Gansu Weiyuan
S2	Shanxi Hunyuan	S11	Gansu Weiyuan
S3	Shanxi Hunyuan	S12	Gansu Weiyuan
S4	Shanxi Hunyuan	S13	Gansu Weiyuan
S5	Shanxi Hunyuan	S14	Gansu Minxian
S6	Shanxi Yingxian	S15	Gansu Minxian
S7	Shanxi Yingxian	S16	Inner Mongolia
S8	Gansu Weiyuan	S17	Inner Mongolia
S9	Gansu Weiyuan	S18	Inner Mongolia

仪(美国 Thermo Finnigan 公司), 手动进样柄及 75 μm Carboxen/PDMS 萃取头(美国 Supelco 公司), CP214 电子天平(常州奥豪斯仪器有限公司), FW135 中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司), B11-3 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司)。

固相微萃取的操作方法 将气相色谱进样口设置到 250 $^{\circ}\text{C}$, 固相微萃取的萃取头插入进样口老化至无杂峰, 然后取粉碎的样本 1 g 置于 20 mL 样品瓶中, 设置磁力搅拌器温度于 70 $^{\circ}\text{C}$, 待温度稳定后, 将样品瓶置于水浴中平衡 15 min 后, 将老化后的萃取头插入样品瓶的顶空部分, 萃取 60 min, 在温度为 250 $^{\circ}\text{C}$ 的气质联用仪进样口解吸 5 min 后, 进行分析。

GC 条件 HP-INNOWAX 型色谱柱 (30 m \times 250 $\mu\text{m}\times$ 0.25 μm); 载气为氦气 (He), 流速为 1.0 mL \cdot min $^{-1}$; 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 以 5 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min $^{-1}$ 的升温速度升至 100 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 然后以 4 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min $^{-1}$ 的升温速度升至 160 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 最后以 10 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min $^{-1}$ 的升温速度升至 230 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min。

MS 条件 离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$; 电子电离源; 电子能量 70 eV; 质量扫描范围 (m/z) 50~500。

GC-MS 定性定量方法 通过 NIST 谱库检索为主, 结合人工解析质谱图; 通过分离出的挥发性成分的保留时间和质核比与文献值对比, 进行 GC-MS 检测结果的鉴定, 并采用峰面积归一化法对黄芪挥发性成分进行半定量分析。

统计与分析 运用 MetaboAnalyst 绘制挥发性成分热图, 并进行聚类分析; SIMCA-P 软件对 GC-MS 数据进行 PCA 和 PLS-DA 等分析, 利用得分图和载荷图分析挥发性成分在不同产地黄芪分组中的权重影响, 再根据变量对分组的贡献值 (VIP), 找出不同产地间差异的化合物。

结果与分析

1 GC-MS 定性定量分析

本实验对 18 批 3 个不同产地黄芪挥发性成分进行了定性和定量分析。3 个产地黄芪挥发性成分总离子流图见图 1。通过 NIST 商业数据库、质核比和保留时间进一步确定目标化合物, 鉴定出的成分见表 2。运用峰面积归一化法对黄芪挥发性成分进行半定量分析。运用 MetaboAnalyst 绘制不同产地黄芪挥发性成分热图见图 2。

热图的深浅代表化合物的含量多少, 颜色越深含量越高。3 个不同产地黄芪样本中挥发性成分共鉴定出 76 个组分, 主要包括烯烃类 14 种、醇类 11 种、醛类 10 种、酸类 8 种、酮类 7 种、酯类 7 种、酚类 5 种、杂环类

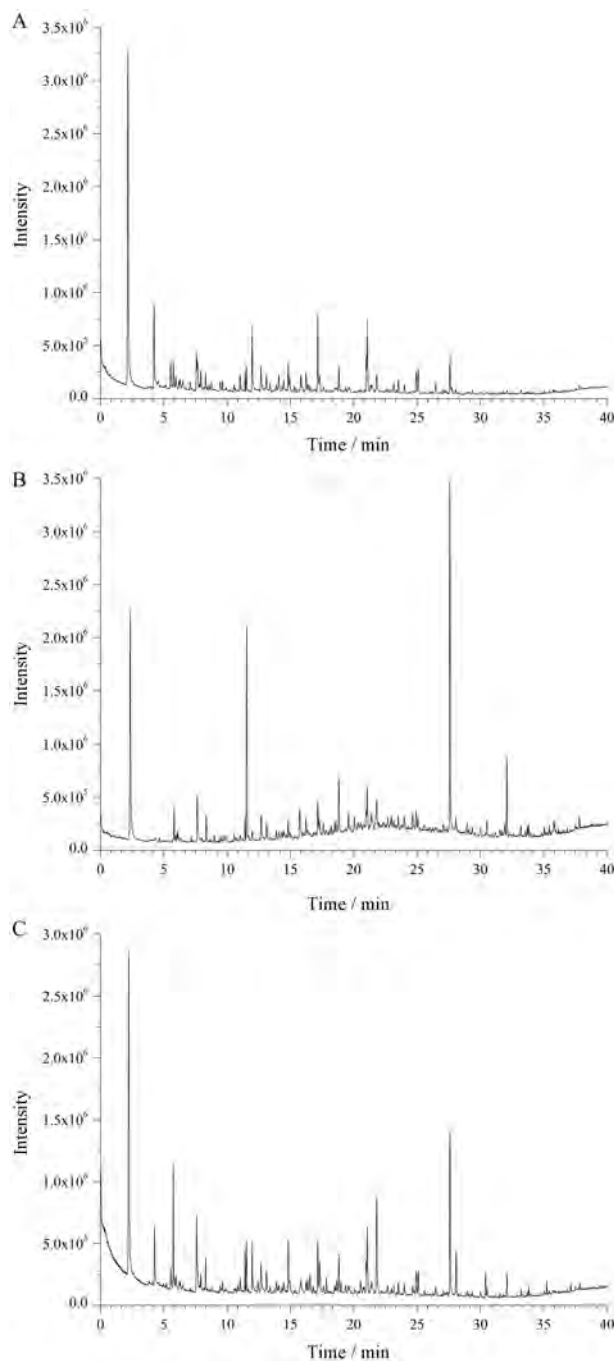


Figure 1 Total ion chromatograms of volatile compounds of Astragali Radix from Shanxi (A), Gansu (B), and Inner Mongolia (C)

4 种及少量其他种类化合物 10 种。热图 Pearson 聚类结果表明 18 个黄芪样本可以分成 3 类, 其中山西地区为一类 (S1~S7); 甘肃地区分为 (S8~S15); 内蒙古地区归为一类 (S16~S18)。

2 挥发性成分 PCA 和 PLS-DA 分析

2.1 PCA 分析 PCA 分析是通过降维的方法将原来变量重新组合成几个新的相互无关的变量, 以达到尽可能多地反映原来变量的信息^[15]。为判别不同地区样

Table 2 Qualitative and quantitative results of metabolites of Astragali Radix from three different producing areas (SX: Shanxi, GS: Gansu, NMG: Inner Mongolia)

No.	t_R /min	m/z	Name	Average relative content/%		
				SX	GS	NMG
1	2.27	44	Hexanal	18.64	12.03	16.07
2	4.3	81	2-Butylfuran	4.85	0.61	2.72
3	5.58	70	Heptanal	1.63	0.08	0.85
4	5.77	74	Methyl acetate	1.52	2.10	3.30
5	6.25	68	Limonene	0.80	0.22	0.30
6	7.11	41	2-Hexenal	0.30	0.22	0.19
7	7.61	81	2-Pentylfuran	3.71	1.90	3.59
8	7.95	71	Terpinene	1.29	0.37	0.56
9	8.32	42	1-Pentanol	0.85	1.12	1.28
10	8.77	119	<i>m</i> -Isopropyltoluene	0.36	0.23	0.18
11	9.46	119	<i>o</i> -Cymene	0.59	0.21	0.40
12	9.64	43	Hexyl acetate	0.54	0.32	0.40
13	10.69	43	2-Octanone	0.13	0.11	0.16
14	10.83	43	Octanal	0.10	0.10	0.23
15	11.02	41	Hexanenitrile	1.05	0.47	0.53
16	11.4	43	Propyl hexanoate	0.56	0.63	0.91
17	11.53	56	1-Hexanol	2.91	5.91	1.72
18	11.97	56	Hexyl formate	2.48	1.17	1.72
19	12.42	121	Alloocimene	0.18	0.10	0.39
20	12.66	67	3-Hexen-1-ol	2.75	1.26	2.07
21	13.1	55	3-Octen-2-one	1.44	0.97	1.15
22	13.37	67	3-Ethyl-2-methyl-1,3-hexadiene	0.55	0.24	0.31
23	14.07	137	2-Isopropyl-3-methoxypyrazine	1.14	0.39	0.40
24	14.33	117	2,4-Dimethylstyrene	0.31	0.31	0.26
25	14.45	146	<i>p</i> -Dichlorobenzene	1.23	0.38	0.79
26	14.92	57	1-Octen-3-ol	3.26	0.88	2.78
27	15.32	43	Acetic acid	0.22	1.99	0.24
28	15.43	95	3-Furaldehyde	0.26	0.09	0.20
29	15.82	161	α -Copaene	1.37	1.52	1.20
30	16.22	81	(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	1.10	1.10	0.77
31	16.36	43	Decanal	1.30	0.09	0.79
32	16.53	138	2-Methoxy-3-(1-methylpropyl)-pyrazine	0.99	0.15	0.83
33	16.84	204	Gurjunene	0.22	0.26	0.29
34	17.14	95	(<i>E,E</i>)-3,5-Octadien-2-one	4.04	2.83	2.62
35	17.28	77	Benzaldehyde	1.45	0.07	2.18
36	17.6	71	Linalol	0.31	0.44	0.38
37	17.83	74	Propanoic acid	0.14	0.25	0.74
38	18.49	56	1-Octanol	0.62	0.52	0.42
39	18.8	95	3,5-Octadien-2-one	1.96	2.14	1.85
40	18.97	81	β -Elemicin	0.20	0.09	0.33
41	19.36	93	Caryophyllene	0.27	0.49	0.47
42	19.57	149	2-Isopropyl-1-methoxy-4-methylbenzene	0.36	0.89	0.60
43	20.04	71	(-)-4-Terpineol	0.58	0.93	0.37
44	21.05	71	Menthol	6.31	3.72	3.88
45	21.4	105	Acetophenone	1.32	1.80	1.35
46	21.79	41	2-Butyl-2-octenal	2.47	2.30	4.81
47	22.32	161	γ -Muurolene	0.11	0.35	0.10
48	22.66	60	Isovaleric acid	0.35	0.53	0.59
49	22.89	85	4-Hexanolide	0.29	0.59	0.37
50	23.13	204	β -Eudesmene	0.43	0.68	0.49
51	23.5	105	α -Muurolene	0.64	0.64	0.51
52	23.98	128	Naphthalene	0.53	0.68	0.57
53	24.63	60	Pentanoic acid	0.28	1.05	0.77
54	24.91	119	Curcumene	1.10	1.41	1.39
55	25.06	120	Benzoic acid	1.48	1.03	1.15
56	26.03	81	2,4-Decadienal	0.12	0.08	0.09
57	26.43	159	(-)-Calamenene	0.61	0.49	0.58
58	27.06	142	2-Methylnaphthalene	0.24	0.31	0.26
59	27.24	43	Nerylacetone	0.19	0.17	0.30
60	27.59	60	Hexanoic acid	2.36	12.48	6.92
61	28.03	79	Benzyl alcohol	0.36	0.73	2.16

Continued

No.	t_R /min	m/z	Name	Average relative content/%		
				SX	GS	NMG
62	28.94	91	Phenylethyl Alcohol	0.21	0.59	0.40
63	29.08	109	Diethyl phenyl phosphine	0.12	0.21	0.12
64	29.35	117	Benzyl nitrile	0.28	0.28	0.33
65	29.98	73	2-Ethyl-hexanoic acid	0.24	0.42	0.31
66	30.39	60	Heptanoic acid	0.44	0.34	1.48
67	31.54	121	<i>ortho</i> -Hydroxypropiofenone	0.12	0.31	0.22
68	31.7	178	Methyleugenol	0.08	0.14	0.07
69	31.93	94	Phenol	0.12	0.64	0.09
70	32.09	85	Prunolide	0.41	2.15	1.16
71	33.17	60	Octanoic acid	0.17	0.48	0.34
72	33.71	107	<i>p</i> -Methylphenol	0.17	0.31	0.18
73	33.81	108	<i>m</i> -Methylphenol	0.14	0.40	0.32
74	35.06	164	Eugenol	0.14	0.33	0.20
75	35.72	208	Elemicin	0.78	0.59	0.30
76	37.83	45	2-Hexadecanol	0.43	0.35	0.53
Total content/%				91.6	82.76	89.88

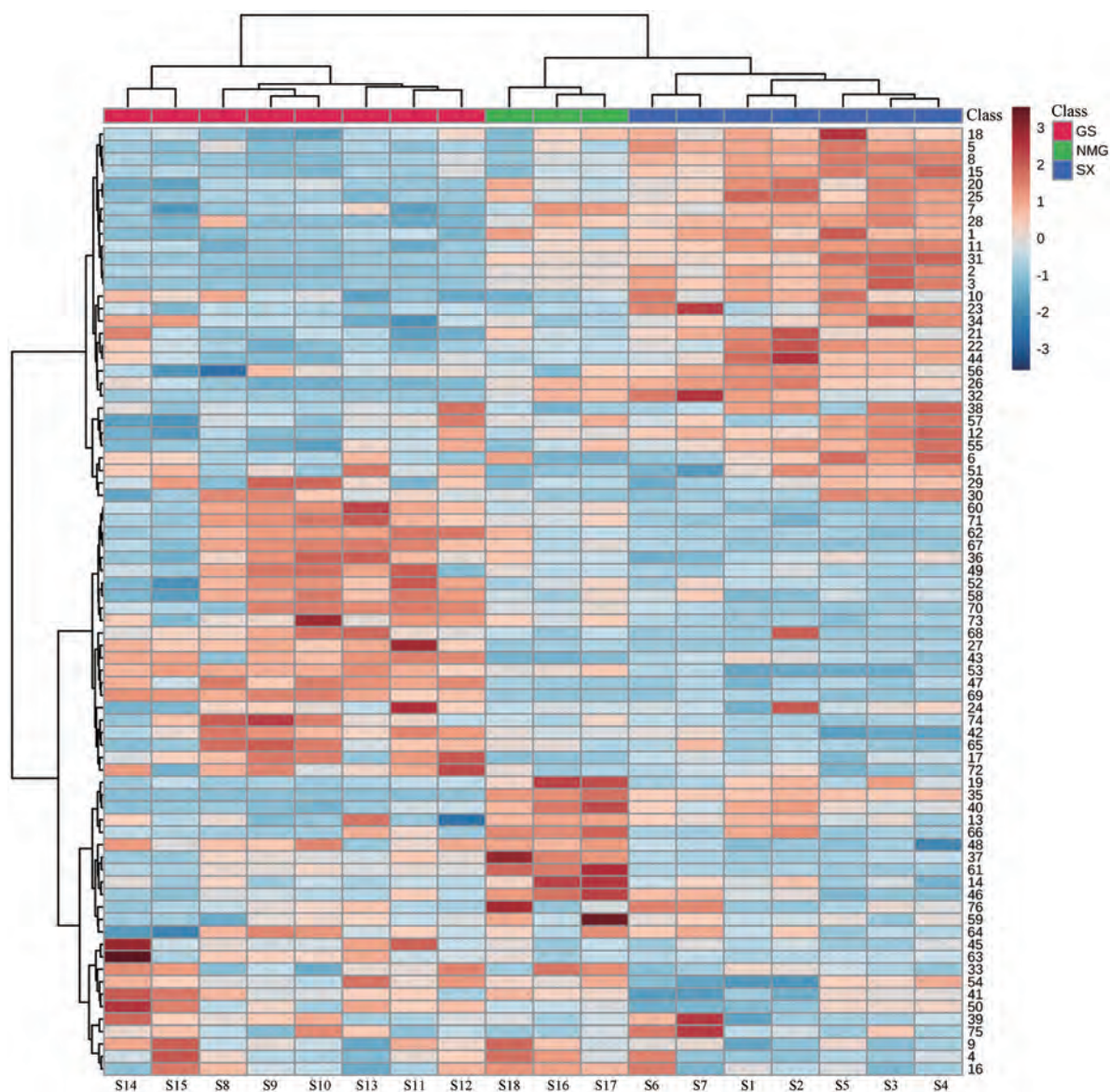


Figure 2 Heatmap of GC-MS determination of volatile components of Astragali Radix from different producing areas (SX: Shanxi; GS: Gansu; NMG: Inner Mongolia)

品间的差异, 利用 SIMCA-P 对 18 批不同产地黄芪的 GC-MS 结果进行 PCA 分析, 共得到 6 个主成分, 累计 $R^2_x = 0.776$ (代表模型的拟合能力), $Q^2 = 0.38$ (代表模型的预测能力), PCA 模型拟合度较好。

由图 3 可见, 18 批黄芪样本沿着 PC1 轴方向具有明显的区分趋势, 不同产地的黄芪样本仍可以有效区分, 与上述聚类分析结果一致, 完全按照其产地进行归类。山西地区为一类 (S1~S7); 甘肃地区分为 (S8~S15); 内蒙古地区归为一类 (S16~S18)。由于 PCA 分析是一种无监督的模型验证方法, 其不能消除组内噪音。所以下面继续进行 PLS-DA 的分析, PLS-DA 是一种有监督的模式, 能寻找隐藏的损坏模型稳健性的特征变量, 更能突出组间差异^[16]。

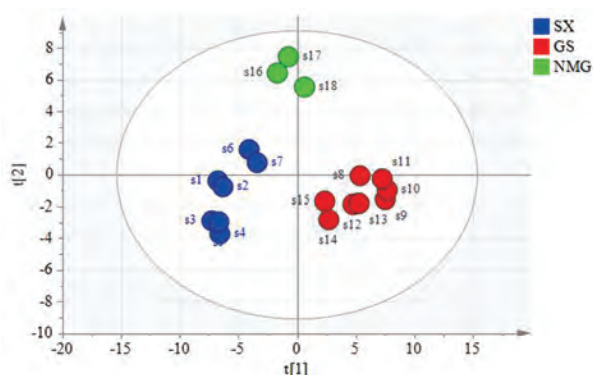


Figure 3 PCA score plot of GC-MS results of volatile components of Astragali Radix from different producing areas (SX: Shanxi; GS: Gansu; NMG: Inner Mongolia)

2.2 PLS-DA 分析 由图 4 可知, 3 个不同产地黄芪样本得到有效区分, 证明不同产地黄芪挥发性成分上存在一定差异。模型的主成分回归系数 $Q^2 = 0.932 > 0.5$, 说明模型预测内能力较强, $R^2_y = 0.981$, 说明模型对因变量变异贡献的百分比为 98.1%, 说明模型拟合度较好。对建立的模型进行 200 次的置换检测, 结果见图 5。由图 5 可知, 位于最右边的 R^2 和 Q^2 值均高于 0.9, 远高于左边的 R^2 和 Q^2 值, 且 Q^2 回归线截距为负值, 表明 PLS-DA 模型结果较好, 能够进行不同产地黄芪挥发性成分分析。

VIP 值通常用来反映 PLS-DA 模型变量的重要性, VIP 值越大, 变量越重要。根据 PLS-DA 模型, 绘制 VIP 图, 见图 6, 进行差异代谢物的筛选, 共筛选出 21 种差异代谢物。进一步对差异代谢物进行筛选, 选出 VIP 值最大的前 6 种差异代谢物。由图 6 可知, 18 批黄芪样本区分贡献较大的挥发性成分为己酸 (VIP = 2.825)、正己醛 (VIP = 2.363)、2-丁基-2-辛烯醛 (VIP = 2.355)、正己醇 (VIP = 2.119)、苯甲醇 (VIP = 2.116)、2-丁基呋喃 (VIP = 1.934) 等。说明己酸、正己醛、2-丁基-2-辛烯醛、正己醇、苯甲醇、2-丁基呋喃是区分山西、

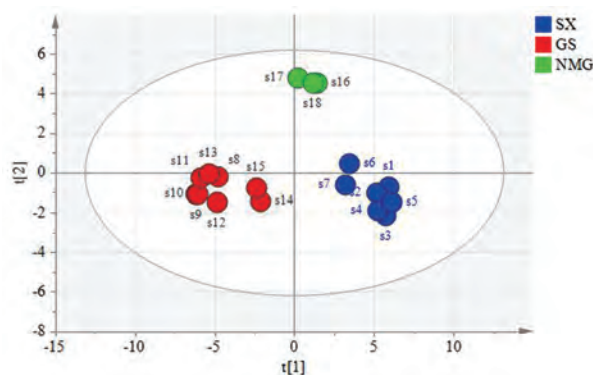


Figure 4 PLS-DA score plot of GC-MS results of volatile components of Astragali Radix from different producing areas (SX: Shanxi; GS: Gansu; NMG: Inner Mongolia)

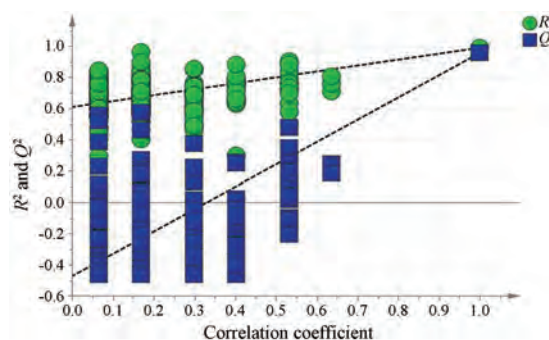


Figure 5 Permutation test result of PLS-DA

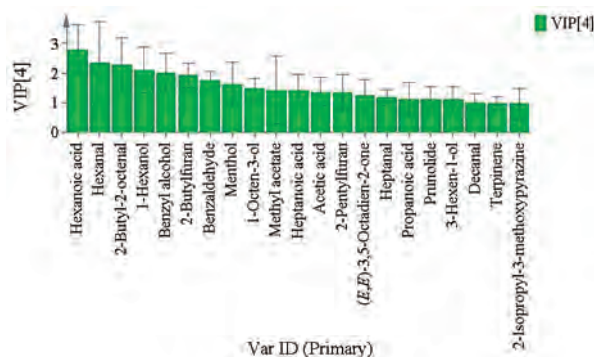


Figure 6 VIP plot of PLS-DA model

甘肃、内蒙古这三个黄芪主产区的特征性挥发性成分。对不同产地样品中这 6 个成分进行分析, 结果见图 7。

由图 7 可知, 山西产黄芪中正己醛、2-丁基呋喃含量均高于其他两个地区; 己酸、正己醇、2-丁基-2-辛烯醛、苯甲醇含量均低于其他两个产地; 正己醇含量高于内蒙古地区, 低于甘肃地区。甘肃产黄芪中己酸、正己醇含量均高于其他两个地区; 正己醛、2-丁基-2-辛烯醛、2-丁基呋喃含量均低于其他两个地区; 苯甲醇含量高于陕西地区, 低于内蒙古地区。内蒙古产黄芪苯甲醇、2-丁基-2-辛烯醛均高于其他两个地区。整体而言, 不同产地、栽培方式黄芪中正己醛和己酸比值存在很大差异, 其中山西仿野生芪中正己醛/己酸平均相对含

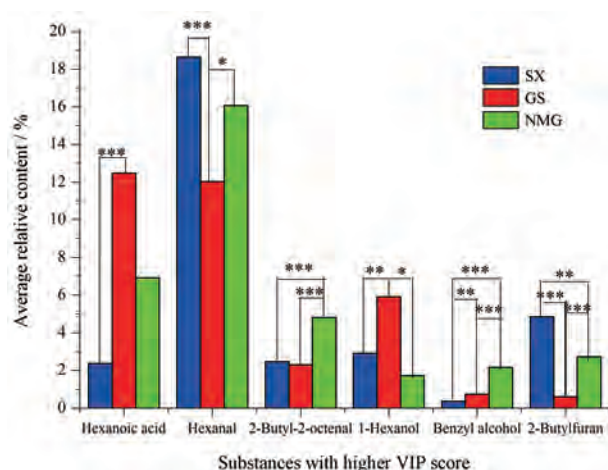


Figure 7 Distribution map of six substances with higher VIP score. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

量比值为7.8:1, 而内蒙古、甘肃栽培芪中正己醛/己酸的比值分别为2.3:1和0.96:1。

黄芪中挥发性成分含量的不同赋予黄芪特殊的豆腥味。黄芪的豆腥味不是一种挥发性成分作用, 是几种甚至十几种挥发性成分对人嗅觉共同作用的结果。6个特征化合物中, 己酸具有奶酪腐臭、油脂腥臭等气息^[17]。己醛具有油脂和青草气, 低浓度己醛具有令人愉悦水果味清香, 高浓度会产生强烈的腐臭味, 有酸败的气味^[18]。2-丁基-2-辛烯醛是熟的果汁香味伴有青香、甜香^[19]。正己醇具有淡青嫩枝叶气息, 微带酒香、果香和脂肪气息。苯甲醇具有苦杏仁味和涩味^[20]。2-丁基呋喃具有温和的果酒甜香。在这些挥发性成分形成过程中, 脂肪氧合酶 (LOX) 和脂过氧化物裂解酶 (HPL) 是形成这些物质的关键性酶。黄芪中的亚油酸、亚麻酸等多不饱和脂肪酸被脂氧合酶 (LOX) 氧化, 生成脂氢过氧化物, 而后再进一步被脂氢过氧化裂解酶 (HPL) 分解成醛类、醇类、酮类、酸类等小分子挥发性化合物。黄芪的挥发性成分是其中多不饱和脂肪酸经酶促反应的产物。本课题前期工作^[9]表明, 山西仿野生黄芪中正己醛的含量和 LOX 活性呈正相关, 正己醛含量与 LOX 活性也有显著的正相关性; 而且正己醛含量与黄芪质量评价的两个重要指标 (黄芪甲苷和多糖) 含量具有明显的正相关性。说明挥发性成分可以成为评价黄芪质量的重要指标。通过挥发性成分与主要活性成分关联研究, 为阐明黄芪道地性科学内涵奠定了基础。

3 差异代谢物通路分析

京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 是整合了基因组、化学和系统功能信息的数据库。MetPA 数据库通过代谢通路富集浓缩和拓扑分析, 能识别出可能受生物扰动的代谢通路, 并且可以对通路进行进一步筛选, 找到与差异代谢物最相关的关键性通路^[21]。为了进一步了解差异代谢物在差异样品中代谢途径变化机制, 所以对差异代谢物进行通路富集浓缩和拓扑分析。将筛选出的21种差异代谢物上传至 Metaboanalyst, 利用 MetPA 数据库根据代谢通路进行富集浓缩, 结果如表3所示。

富集分析共标注到5个重要的代谢途径, 包括维生素K的代谢、长链脂肪酸的氧化反应、短链饱和脂肪酸的线粒体氧化、脂肪酸合成和丙酸的代谢。植物中脂肪酸分布广泛、种类繁多、具有很多重要的功能。细胞膜和细胞器膜主要由脂肪酸组成; 同时脂肪酸还可以帮助植物抵御外来侵袭如环境因素导致的热量和水分散失以及病原菌侵害; 甚至一些脂肪酸可以作为信号分子, 调控植物生长发育^[22-25]。丙酸作为一种短链脂肪酸, 可以有效抑制好氧性细菌的繁殖^[26]。维生素K是植物维生素的重要组成, 有报道表明维生素K₃作为一种新型的植物生长调节剂, 对植物生长具有明显的促进作用, 可使植物更容易适应外部环境变化^[27]。

讨论

黄芪用药以“豆腥味浓者, 为佳”, 其中豆腥味是经验鉴别中一个十分重要的评价指标。黄芪中主要挥发性成分 (正己醛) 与所含的化学成分 (黄芪甲苷和多糖) 含量有直接的关联^[9]。挥发性成分一定程度上能反映药物的内在本质, 是中药外在质量表现与内在物质基础的关联点^[28]。产地与中药道地性形成密不可分, 黄芪挥发性差异化合物与产地密切相关^[29]。本研究以我国3个黄芪主要产地18批蒙古黄芪样本作为研究对象, 首先采用 SPME 结合 GC-MS 技术对不同产地黄芪样本挥发性成分进行分析鉴定, 比较不同产地样品挥发性成分差异。本实验共鉴定出76种挥发性成分, 利用多元统计分析发现不同产地黄芪挥发性成分根据产地的不同可以分成3类。通过 PLS-DA 模型 VIP 值进一步分析发现己酸、正己醛、2-丁基-2-辛烯

Table 3 Details of metabolic pathways which differential metabolites participate in. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes

Metabolite set	Expect	Hits	Raw P	KEGG number
Vitamin K metabolism	0.219	1	0.199	C00163
Beta oxidation of very long chain fatty acids	0.266	1	0.237	C01585
Mitochondrial beta-oxidation of short chain saturated fatty acids	0.422	1	0.35	C01585
Fatty acid biosynthesis	0.547	1	0.429	C01585
Propanoate metabolism	0.656	1	0.491	C00163

醛、正己醇、苯甲醇、2-丁基呋喃是区分不同产地黄芪样本主要差异成分来源,其中不同产地、栽培方式黄芪中正己醛和己酸比值存在较大差异,山西仿野生芪中正己醛/己酸平均相对含量比值为7.8:1,而内蒙古、甘肃栽培芪中正己醛/己酸的比值分别为2.3:1和0.96:1。本文通过黄芪挥发性成分研究为黄芪道地性特征研究奠定了基础,并为黄芪药材的道地性判别提供了新的科学依据。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. 2015 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 302-303.
- [2] Chu C, Qi LW, Liu EH, et al. Radix Astragali (*Astragalus*): latest advancements and trends in chemistry, analysis, pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Curr Org Chem*, 2010, 14: 1792-1807.
- [3] Li Q, Hu JH, Gao B, et al. Advances on immunoregulation effect of *Astragalus polysaccharides* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 199-206.
- [4] Chen SM, Tsai YS, Lee SW, et al. *Astragalus membranaceus* modulates Th1/2 immune balance and activates PPAR γ in a murine asthma model [J]. *Biochem Cell Biol*, 2014, 92: 397-405.
- [5] Li NY, Yu H, Li XL, et al. *Astragalus membranaceus* improving asymptomatic left ventricular diastolic dysfunction in postmenopausal hypertensive women with metabolic syndrome: a prospective, open-labeled, randomized controlled trial [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018, 131: 516-526.
- [6] Liao H, Hu L, Cheng XN, et al. Are the therapeutic effects of huangqi (*Astragalus membranaceus*) on diabetic nephropathy correlated with its regulation of macrophage iNOS activity? [J]. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 1-9.
- [7] Lin N, Pan JQ, Guan N. Diuretic mechanism of *Astragalus* in mice and its material basis [J]. *Pharm Today (今日药学)*, 2014, 24: 481-483, 488.
- [8] Zhang R, Li K, Li AP, et al. ¹H NMR-based metabolomics analysis of the anti-fatigue effects of Astragali Radix based on muscle tissue pubescentis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 782-790.
- [9] Xie DS. Study on the Beany Favor and Its Relevance to the Quality of Astragali Radix (黄芪药材豆腥味与品质关联性研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2010.
- [10] Sun HF, Li ZY, Wu B, et al. Review of recent advances on the production and eco-physiological roles of green leaf volatiles [J]. *Chin J Plant Ecol (植物生态学报)*, 2013, 37: 268-275.
- [11] Xu HD, Zhou Y, Lei T. Volatile analysis in fresh and dried Astragali Radix [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2011, 32: 171-174.
- [12] Sun JW, Li YM, Yang KY, et al. Extraction and analysis of volatile flavor constituents of dried Astragali Radix [J]. *Chem Res Appl (化学研究与应用)*, 2015, 27: 1361-1366.
- [13] Li YM, Yang KY, Sun JW, et al. Volatile compounds analysis of dried Astragali Radix from different areas by SPME-GC-MS [J]. *China Brew (中国酿造)*, 2016, 35: 175-181.
- [14] Ducki S, Miralles-Garcia J, Zumbé A, et al. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products [J]. *Talanta*, 2008, 74: 1166-1174.
- [15] Xiao R, Lin Y, Lei SM, et al. Analyzing crude/processed root of *Polygonum multiflorum* from different habitats by UPLC fingerprint and mode identification methods [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2017, 42: 2305-2310.
- [16] Sun LL, Wang M, Ren XL. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2017, 48: 4339-4345.
- [17] Du X, Plotto A, Baldwin E, et al. Evaluation of volatiles from two subtropical strawberry cultivars using GC-olfactometry, GC-MS odor activity values, and sensory analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59: 12569-12577.
- [18] Varlet V, Knockaert C, Prost c, et al. Comparison of odor-active volatile compounds of fresh and smoked salmon [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 3391-3401.
- [19] Sun BG, Liu YP. Handbook of Edible Spices (食用香料手册) [M]. Beijing: China Petrochemical Press, 2004: 210-211.
- [20] Lu K, Qiao CR, Qiao H, et al. Analysis of aroma composition of litchi ice wine by different extraction fibers [J]. *Food Sci (食品科学)*, 2014, 35: 224-229.
- [21] Ogata H, Goto S, Sato K, et al. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 29-34.
- [22] Farmer EE, Weber H, Vollenweider S. Fatty acid signaling in arabidopsis [J]. *Planta*, 1998, 206: 167-174.
- [23] Weber H. Fatty acid-derived signals in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 217-224.
- [24] Shi Y, An L, Li X, et al. The octadecanoid signaling pathway participates in the chilling-induced transcription of ω -3 fatty acid desaturases in arabidopsis [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49: 208-215.
- [25] Seo JH, Lee SM, Lee J, et al. Adding value to plant oils and fatty acids: Biological transformation of fatty acids into ω -hydroxy-carboxylic, α,ω -dicarboxylic, and ω -aminocarboxylic acids [J]. *J Biotechnol*, 2015, 216: 158-166.
- [26] Hiraoka H, Ishikuro E, Goto T. Simultaneous analysis of organic acids and inorganic anions in silage by capillary electrophoresis [J]. *J Anim Feed Sci Technol*, 2010, 161: 58-66.
- [27] Sun MZ, Chen DY. Experimental study on application of vitamin K3 in vegetable cultivation [J]. *Beijing Agric (北京农业)*, 2007, 12: 6-7.
- [28] Xu SJ, Yang L, XIE PS, et al. Research status and prospect of odor identification of traditional Chinese medicine [J]. *Tradit Chin Drug Res Pharmacol (中国新药与临床药理)*, 2011, 22: 228-231.
- [29] Peng HS, Hao JD, Huang LQ. Evolution and transformation of the forming elements of authentic crude drugs [J]. *Chin Med Mat (中药材)*, 2015, 38: 1750-1755.