

基于 ^1H -NMR 代谢组学技术的中药质量评价*

范 刚, 罗尚华, 李 艳, 谭 尔, 张 艺**

(成都中医药大学民族医药学院 成都 611137)

摘 要: 中药是现代药物的重要组成部分,应用现代分析技术鉴别中药材的真伪、评价质量的优劣,是中药现代化、国际化发展的重要内容。本文介绍了 ^1H -NMR 代谢组学技术的发展和特点,以及在中药品种鉴定、道地药材评价、炮制加工、适宜采收期等研究中的应用。并在课题组前期研究基础上,对中药质量评价的 ^1H -NMR 代谢组学研究的技术方法、关键问题进行了详细的论述,为中药等天然药物的品种鉴定与质量评价提供了方法学参考。

关键词: 中药 ^1H -NMR 代谢组学 品种鉴定 质量评价

doi: 10.11842/wst.2013.09.001 中图分类号: R284 文献标识码: A

中医药是我国人民在长期同疾病作斗争的过程中形成的极为丰富的经验总结,中药的真伪、优劣直接关系到临床用药的安全性和有效性。因此,中药的质量控制和评价一直是中药现代化研究的重要内容。近年来,分析化学发生了巨大的变化,各种新方法、新技术得到迅猛发展,为中药现代化研究提供了更加灵敏、更加准确的分析方法,如液相色谱-质谱联用、气相色谱-质谱联用、高效毛细管电泳、核磁共振等先进分析技术。利用现代科学技术探索中药质量控制和评价的新思路与新方法,有利于促进药材质量标准的完善与提高,这对于提升中药的科技水平,推动中药的质量监控及其产业化发展均具有重要的意义。

本文对近 10 年发展起来的 ^1H -NMR 代谢组学技术及其在中药整体化学成分分析、品种鉴定、道地性评价、炮制加工等研究中的应用进行了综述和总结,并在课题组前期研究基础上,对中药质量评价的 ^1H -NMR 代谢组学研究的技术方法、技术路线、关键问题等进行了论述,以供读者参考。

1 ^1H -NMR 代谢组学技术的发展

代谢组学 (Metabolomics) 是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后新兴的组学技术,是系统生物学的重要组成部分。代谢组学在发展过程中,逐步形成了两个主要的研究方向:①检测分析机体生物体液(如尿液、血浆等)中的内源性代谢物,通过机体代谢物变化的系统分析直接认识生理病理及药物的疗效、毒性和作用机制^[1,2]。②利用代谢组学研究思想和分析技术,整体分析不同生长阶段药用植物或不同来源药材的初生和次生代谢产物^[3,4]。众所周知,中药有效成分多为其次生代谢产物,如生物碱类、黄酮类成分,而氨基酸、糖类等初生代谢产物则为药用植物生长过程中重要的营养物质,与药材质量的形成密切相关。因此,利用代谢组学技术对药材中的整体代谢物组(化学成分组)进行系统分析,有利于全面反映中药材的“内在质量”。

目前,代谢组学研究的分析技术主要有气相色谱-质谱联用 (GC-MS)、高效液相色谱-质谱联用 (HPLC-MS) 和氢核磁共振 (^1H -NMR) 3 种,每种技术均有其独特的优缺点和适用范围。GC-MS 适合分

收稿日期: 2013-11-04

修回日期: 2013-11-18

* 国家自然科学基金委青年基金项目 (81303310) 基于 DNA 条形码和 ^1H -NMR 代谢组学技术的多基源藏药小檗皮二维鉴定体系的构建,负责人: 范刚,四川省教育厅四川省省属高校科研创新团队建设计划 (11TD004) 中藏药资源保护与利用,负责人: 张艺。

** 通讯作者: 张艺,研究员,博士生导师,主要研究方向: 中药药效物质基础及质量标准化。

析药材中的挥发性成分,如香豆素类、脂肪酸类成分,不宜分析对热不稳定和难挥发的次生代谢产物^[5]。LC-MS 具有较高的灵敏度和选择性,适宜于分离分析药材中不易挥发的次生代谢成分,如皂苷类、生物碱类成分,但该方法重现性相对较差,用于未知化合物结构鉴定的质谱数据库仍然较少^[6,7]。与 LC-MS、GC-MS 等色谱分析方法相比,¹H-NMR 代谢组学技术具有多方面的优势^[7,8] ①该方法单次测量就能同时检测分析药材中的初生和次生代谢产物,因此更能体现方法的整体性和系统性;②二维核磁共振(2D-NMR)具有强大的结构推导和鉴定能力,可解析未知代谢成分的结构;③样品制备简单,可直接用氘代试剂提取药材样品;④分析快速,通常在 10 min 以内;⑤只要代谢成分含有质子就能够被检测分析,因此该方法属于无偏向性检测,具有良好的普适性。

基于 ¹H-NMR 分析技术的代谢组学研究提供了一个整体、宏观的分析平台,它不但能最大程度地提取、检测中药有效成分信息,而且有利于全面明晰药材代谢物质群体的化学组成,这对于建立符合整体性作用特点的药材质量控制方法与模式,保证药材质量稳定可控,临床使用安全有效等都具有重要的意义^[9]。目前,¹H-NMR 代谢组学技术以及 PCA、PLS-DA 等多元模式识别方法已经在中药的品种鉴定、质量评价及道地性评价等研究领域得到了广泛的应用。

2 ¹H-NMR 代谢组学技术在中药质量评价中的应用

2.1 中药品种鉴定及种间化学成分差异研究

药材的准确鉴定是中药质量控制的首要环节。目前,由于“同名异物、同物异名”现象、不同地区用药习惯差异、资源量逐渐匮乏等因素,中药在实际流通和应用过程中常出现地区习用品、替代品或伪品,使得市场上药材的质量参差不齐,而在使用过程中仍然缺乏行之有效的方法对不同药材品种进行准确鉴定,因此中药材的客观、准确鉴定仍然是一项重要而艰巨的任务。将体现整体性的 ¹H-NMR 代谢组学技术应用到中药品种鉴定,可以从整体代谢物组角度鉴定药材的真伪,遏制其混淆代用,促进药材使用的安全性和质量的稳定性。

Jung 等^[10]应用 ¹H-NMR 技术和化学计量学方法,系统研究了 3 种蒲公英(朝鲜蒲公英 *T. core-*

anum、西洋蒲公英 *T. officinale* 和台湾蒲公英 *T. platycarpum*) 的整体代谢物组差异,¹H-NMR 数据的偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)使 3 个品种得到很好的区分,表明所建立的方法可应用于蒲公英的品种鉴定。另外,本课题组^[11]采用 ¹H-NMR 代谢组学技术,建立了道地药材黄连的整体代谢物指纹图谱(图 1),并结合化学计量学方法,首次从代谢物组水平上研究了黄连 3 个品种(味连 *Coptis chinensis*、雅连 *C. deltoidea* 和云连 *C. teeta*) 的初生和次生代谢产物差异。结果鉴定了 16 个初生和次生代谢产物,并且发现味连、雅连和云连药材的代谢成分有明显的差异,味连含有更多的黄连碱、非洲防己碱、表小檗碱、巴马汀和脂肪酸类成分,而云连含有最多的绿原酸,雅连含有最多的蔗糖。其它相关的研究实例见表 1。

2.2 加工炮制对药材化学成分的影响研究

炮制是中医药最具特色的传统技法。中药需要经过加工炮制成饮片后才能应用于临床,而依据不同的炮制方法制备而成的不同炮制品,其化学成分、毒性及疗效往往不同。因此,利用体现整体性的 ¹H-NMR 代谢组学技术监测中药不同炮制过程中药材化学成分的变化,有利于揭示中药炮制前后物质基础的变化规律,阐明中药炮制的科学内涵。

Chang 等^[17]运用 ¹H-NMR 代谢组学技术研究了地黄(*Rehmannia glutinosa*)炮制前后的代谢成分变化,结果发现梓醇、棉子糖和水苏糖的含量在黄酒蒸制过程中逐渐降低,而半乳糖和葡萄糖的含量在炮制品中更高,表明地黄在炮制过程中主要发生了水解反应,药材中的多糖逐渐水解为单糖。Kim 等^[18]研究了人参蒸制和醋制过程中的非挥发性代谢成分的变化规律,结果发现在炮制过程中随着温度的升高,缬氨酸、精氨酸、葡萄糖和蔗糖的含量逐渐降低。另外,对比于其它炮制品,醋制人参中的乳酸盐、葡萄糖和果糖的含量更高。王雪洁等^[19]对远志不同炮制品进行了 ¹H-NMR 代谢组学研究,结果发现生远志与蜜远志、甘草制远志的代谢成分有明显的差异,说明炮制可改变药材的整体化学成分,最终导致远志各炮制品的药性及药效作用各有不同,该研究为蜜制、甘草制远志的“增效减毒”炮制原理提供了科学依据。

2.3 不同产地药材的质量评价研究

中药向来重视药材的产地,历代医家早意识到

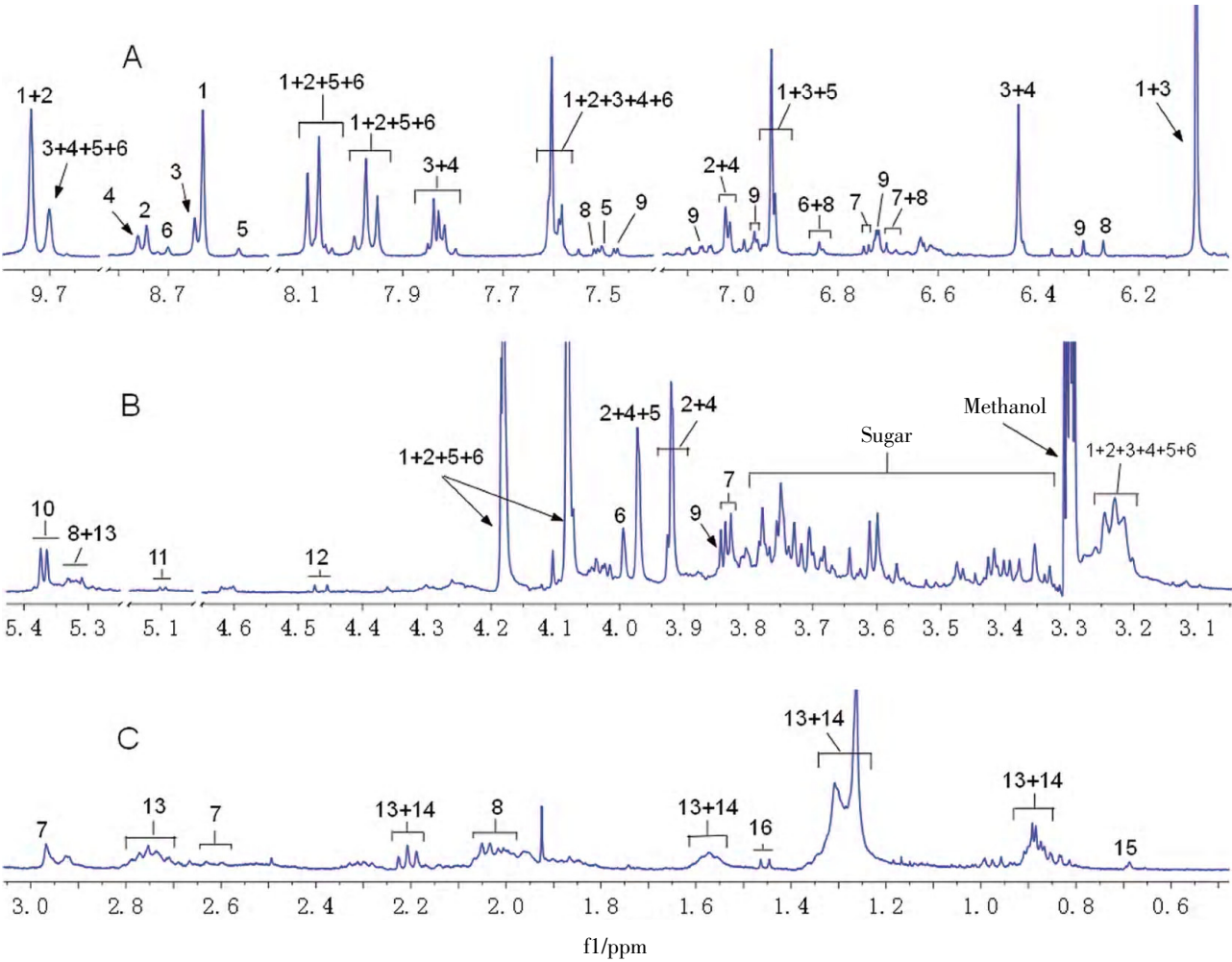


图1 黄连(味连)药材的¹H-NMR 指纹图谱

注：1.小檗碱,2.巴马汀,3.黄连碱,4.表小檗碱,5.非洲防己碱,6.药根碱,7.木兰花碱,8.绿原酸,9.阿魏酸,10.蔗糖,11. α-葡萄糖,12. β-葡萄糖,13.不饱和脂肪酸类,14.饱和脂肪酸类,15.甾醇类,16.丙氨酸。

表1 中药品种鉴定及种间代谢成分差异研究实例

药材	主要研究内容	鉴定的代谢成分数量	统计方法
柴胡 ^[12]	研究北柴胡 <i>B. chinense</i> 和红柴胡 <i>B. scorzonrifolium</i> 的代谢成分差异。	36	PCA
大麻 ^[13]	研究大麻 <i>Cannabis sativa</i> 12 个栽培品系的代谢成分差异。	13	PCA
人参 ^[14]	研究人参 <i>Panax ginseng</i> 不同品种、不同变种、不同商业产品的代谢物差异,并鉴定引起差异的代谢标志物。	33	PCA PLS-DA ANOVA
麻黄 ^[15]	研究麻黄 3 个品种的代谢成分差异(草麻黄 <i>Ephedra sinica</i> 、中麻黄 <i>E. intermedia</i> 和双穗麻黄 <i>E. distachya</i> var. <i>distachya</i>)。	6	PCA
姜黄 ^[16]	研究姜黄属 2 种药材(姜黄 <i>Curcuma longa</i> 和郁金 <i>C. aromatica</i>) 的代谢成分差异。	21	PCA OPLS-DA

产地对于药材质量形成的重要性。如陈嘉谟《本草蒙筌》载：“地产南北相殊，药力大小悬隔”。随后，“道地药材”概念的提出正是这种“产地优质性”的高度概括，如川黄连、浙贝母、怀牛膝等道地药材由于产于特定的地区而被公认为疗效佳的优质药材。不同产地中药常由于外部生长环境（土壤、气候等因素）的差异，而使得药材内部化学成分出现种内差异性，最终影响其临床疗效^[20,21]。因此，利用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术，揭示与药材道地性相关的特征标志物（Markers），有利于从代谢物组层面上评价不同产地药材的质量差异，阐明中药“道地性”的本质和形成机制。

Kim 等^[22]应用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术，系统研究了来自韩国 3 个产地的朝鲜当归（*Angelica gigas*）药材的初生和次生代谢产物差异。结果 $^1\text{H-NMR}$ 数据的 PCA 及 PLS-DA 分析能够使 3 个产地的药材得到明显的区分，而与药材产地相关的标志物被鉴定为紫花前胡苷、异紫花前胡内酯等成分。本课题组^[23]采用基于 $^1\text{H-NMR}$ 的代谢组学方法，对不同产地泽泻药材进行了地缘区分和质量评价，最终鉴定了 4 个代谢成分，PLS-DA 分析和定量结果表明不同产地泽泻药材有明显的差异，四川产地的泽泻药材质量最优。其它相关的研究实例见表 2。

2.4 采收时间对药材化学成分的影响研究

中药科学、合理的采收（适宜时间）是药材优质生产的关键技术之一。元代李东垣指出：“…根、叶、花、实，采之有时…失其时，则气味不全”。现代研究表明，不同的采收时间对药材化学成分的含量有较大的影响。因此，“适时采集”是保证中药材质量和临床疗效的重要途径。利用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术

研究中药在生长发育过程中整体化学成分的动态变化，有利于确定药材的最佳采收期，推动药用植物的 GAP 规范化种植和优质生产。

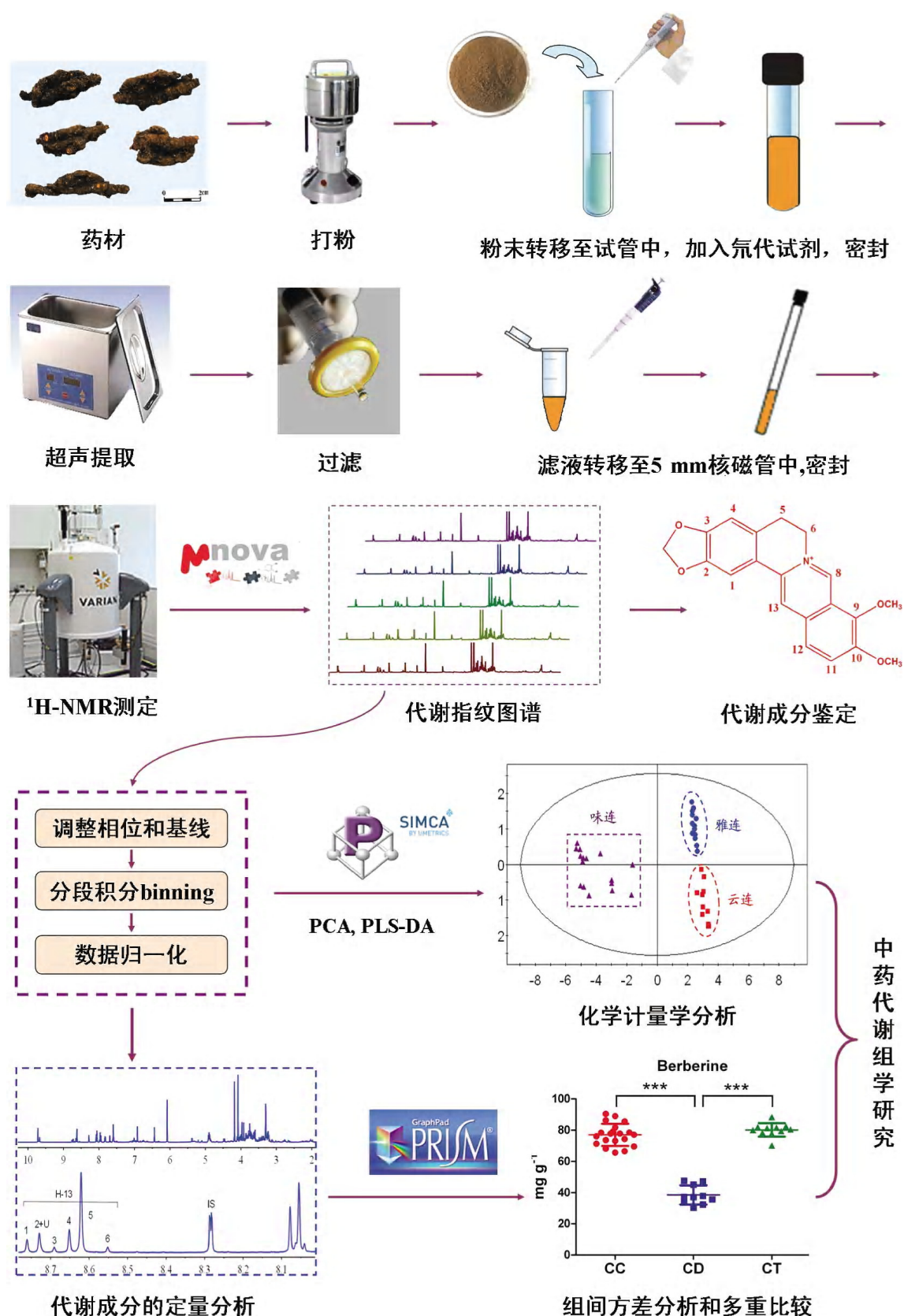
Kim 等^[28]采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术，研究了不同采收期（5 月、8 月、10 月和 12 月）番石榴（*Psidium guajava*）叶药材的代谢成分和自由基清除活性差异。对比于 10 月和 12 月，采自于 5 月和 8 月的番石榴叶药材具有更好的自由基清除活性，并且发现这些样品含有更多的柠檬酸、3-羟基丁酸、顺式乌头酸、天冬酰胺等成分。支海娟等^[29]对不同生长发育阶段的款冬花（*Tussilago farfara*）进行了 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究，共鉴定了 40 个代谢产物，与 10 月、11 月和 12 月相比，采自于 3 月和 9 月的药材成分差异较大，从而说明了款冬花传统用药经验（花蕾发育初期和开花后期不宜入药）的科学性和合理性。Xiao 等^[30]采用 $^1\text{H-NMR}$ 分析技术，从迷迭香（*Rosmarinus officinalis*）中鉴定了 33 个代谢成分，并结合多变量统计分析研究了不同时间（2 月、4 月、6 月和 8 月）采集的迷迭香药材中代谢成分的含量差异。结果发现，2~8 月迷迭香酸盐和奎尼酸盐成分的含量逐渐增加，而蔗糖含量逐渐降低。

3 中药质量评价的 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究的技术方法

中药 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究主要包括供试品溶液制备、 $^1\text{H-NMR}$ 测定条件优化、信号归属及代谢成分鉴定、 $^1\text{H-NMR}$ 信号预处理及化学计量学分析（相位和基线调整、分段积分、PCA 等）、代谢成分的定量分析、不同来源药材 $^1\text{H-NMR}$ 测定及结果分析等步骤（技术路线见图 2）。具体方法如下。

表 2 不同产地药材的质量评价研究实例

药材	主要研究内容	鉴定的代谢成分数量	统计方法
黄芩 ^[24]	研究来自中国 and 韩国的黄芩（ <i>Scutellaria baicalensis</i> ）药材的代谢物差异。	17	PCA OPLS-DA
灵芝 ^[25]	研究不同产地（中国和韩国）灵芝（ <i>Ganoderma lucidum</i> ）药材的代谢成分差异，并建立了产地溯源判别模型。	9	PCA OPLS-DA
红景天 ^[26]	建立红景天（ <i>Rhodiola rosea</i> ）代谢指纹图谱，评价不同产地、不同采收期药材的代谢成分差异。	2	PCA
丹参 ^[27]	研究不同产地、不同品系丹参（ <i>Salvia miltiorrhiza</i> ）药材之间的代谢成分差异。	30	PCA OPLS-DA

图2 中药 ^1H -NMR 代谢组学研究的技术路线示意图

3.1 供试品溶液的制备

代谢组学研究的目标是尽可能检测分析更多的代谢产物,因此在供试品溶液制备的时候必须考察不同溶剂的提取效率。目前, ^1H -NMR 代谢组学研究采用的提取溶剂主要有高氯酸、水、甲醇、含水甲醇、二甲基亚砜或含水甲醇与氯仿组成的两相体系^[31]。每种溶剂均有其独特的优势和使用范围,应根据目标成分的溶解度选择最佳的提取溶剂。

为了减少时间,避免溶剂蒸发、残渣再溶解过程中化学成分的损失或变化,在供试品溶液制备时可直接用氘代试剂(如 CD_3OD 、 CDCl_3 、 D_2O 或 $\text{DM-SO}-d_6$) 作为提取溶剂。其中, CD_3OD 能提取绝大部分的次生代谢产物,而 D_2O 可提取糖类、氨基酸等初生代谢产物,因此 CD_3OD 和 D_2O 的混合溶剂是目前供试品溶液制备最常用的提取溶剂。另外,为了防止由于不同样品代谢物浓度差异而引起 ^1H -NMR 信号化学位移变化,常在提取溶剂中加入 KH_2PO_4 缓冲盐控制样品溶液的 pH 值,同时加入一定量的 3-(三甲基硅基)-2,2,3,3-四氘代丙酸钠盐(TSP)用于化学位移校正,并且 TSP 可作为内标用于每个代谢成分的定量分析。

3.2 ^1H -NMR 测定条件的选择

脉冲延迟时间、采样次数、采样时间等实验参数均在一度程度上影响 ^1H -NMR 测定的灵敏度和准确度,因此对于 ^1H -NMR 代谢组学研究,优化测定条件、选取合适的信号采集和处理参数是保证结果准确的前提条件。例如,应该设置足够长的脉冲延迟时间($d1$)以保证 ^1H -NMR 信号尤其是定量信号弛豫完全,而加大采样次数(nt)对于提高信号的灵敏度和信噪比至关重要。然而, $d1$ 和 nt 值越大, ^1H -NMR 测定时间越长,违背了代谢组学的快速、简便、高通量研究目标,与其它代谢组学技术相比也将失去 ^1H -NMR 快速测量的竞争优势。因此,为了保证结果的准确性,同时尽可能减少测定时间,在样品 ^1H -NMR 代谢组学研究时应根据待测成分的种类和实际浓度,充分优化脉冲延迟时间和采样次数,选取最佳的 ^1H -NMR 测定条件。

3.3 信号归属及代谢成分鉴定

在获得样品 ^1H -NMR 谱图的基础上,对各信号峰进行归属,鉴定供试品溶液中的代谢成分,是中药 ^1H -NMR 代谢组学研究的核心内容。首先,可以采取“加标准品定性试验”进行信号归属,即在供试

品溶液中加入该药材含有的化学成分的高纯度标准品,通过仔细比对加标前后的 ^1H -NMR 图谱,归属相关信号。其次,随着高磁场 NMR 仪器的发展,二维核磁共振(HMBC、HSQC、J-分辨谱、DOSY、TOCSY、 ^1H - ^1H COSY 等)技术已经被用于复杂混合物的 ^1H -NMR 信号归属及成分鉴定^[7, 32-35]。另外,Robert Verpoorte 课题组通过长期植物 ^1H -NMR 代谢组学研究,总结了供试品溶液在 pH6.0 条件下,常见的糖类、氨基酸类、有机酸类等代谢产物的化学位移和耦合常数^[7, 34],如蔗糖 $\delta 5.40$ (d, $J=3.8$ Hz), $\delta 4.17$ (d, $J=8.5$ Hz); 丙氨酸 $\delta 1.48$ (d, $J=7.2$ Hz); 甲酸 $\delta 8.46$ (s),而 Chatterjee S. 等^[36]报道了常见的脂肪酸类成分的化学位移和多重态,这些数据可供中药提取物 ^1H -NMR 代谢成分鉴定时参考。

3.4 ^1H -NMR 信号预处理及化学计量学分析

利用 MestReNova、AMIX 等信号处理软件将测得的 ^1H -NMR 自由感应衰减信号(FID 信号)进行傅立叶转换,仔细调整相位和基线,以 TSP 峰($\delta=0.00$)为基准校正化学位移。然后,对整个图谱进行分段积分(为了减少信号波动的影响,一般以 0.04 ppm 为分段单位),扣除残留溶剂峰,并以总峰面积进行归一化处理,最终得到各化学位移段及其与之相对应的信号峰面积值。

然后,将获得的数据矩阵(n 个样品 $\times n$ 个变量)导入 Unscrambler、SIMCA-P 等软件进行主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)等化学计量学研究^[37]。最终,根据 PCA 或 PLS-DA 的投影图和载荷图,发现不同样品的分类特性,揭示样品间的初生和次生代谢产物差异。

3.5 代谢成分的定量分析

利用 PCA、PLS-DA 等化学计量学方法,能够从大量多维数据中寻找出贡献于分类的主要差异成分,提高分析效率。然而,采用载荷图发现组间差异代谢物是较宏观的方法,并不能判断观察到的差异是否具有统计学意义(显著性)。因此,有必要采用其他方法进一步验证化学计量学的研究结果。由于 ^1H -NMR 信号的峰面积直接与引起该信号的质子数目成正比^[38, 39],因此以 TSP $\delta 0.00$ (s) 为内标,待测成分选择无干扰的特征定量信号(常选择单峰或双峰)进行手动积分,根据内标法按照如下的公式即可计算供试品溶液中各代谢成分的含量:

$$m_X = m_{ST} \times (A_X / A_{ST}) \times (MW_X / MW_{ST}) \times (N_{ST} / N_X)$$

其中, A_x 为待测成分特征定量信号的积分面积, MW_x 为待测成分的分子量, N_x 为待测成分中引起该特征定量信号的质子数, A_{ST} 为内标物定量信号的积分面积, MW_{ST} 为内标物的分子量, N_{ST} 为内标物中引起该定量信号的质子数, m_{ST} 为称取的内标物重量, m_x 为待测成分的含量。

然后, 将获得的含量数据导入 PASW Statistics、GraphPad Prism 等软件进行组间方差分析和 Tukey 多重检验, 从而评价代谢成分在不同来源药材间的差异是否具有显著性。

3.6 样品 $^1\text{H-NMR}$ 测定及结果分析

按照上述方法, 对所有样品进行 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学研究, 综合分析 PCA、PLS-DA 等化学计量学和方差分析结果, 确定与药材品种、产地、采收期或炮制加工等相关的特征标志物 (Markers), 并以 Markers 的种类和含量为指标进行中药品种鉴定和质量评价研究。

4 展望

目前, 中药质量控制及评价的研究角度、思路和方法需要总结和创新。将体现整体性的 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学方法应用到中药质量评价研究中, 充分利用其“定性定量相结合”、“初生与次生代谢产物同表征”的方法学优势, 有利于从整体代谢物组角度建立符合整体性作用特点的中药质量评价方法, 为药材内在质量的综合评价提供技术平台。最终建立的代谢物指纹图谱, 发现的代谢标志物, 对于中药的品种鉴定、道地性形成机制、炮制原理、适宜采收、质量标准制定及其临床合理利用等都将有重要的意义。

然而, 我们也必须意识到, 目前 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术仍然面临着巨大的挑战, 如该分析方法的灵敏度较低, 很难检测低浓度的代谢成分, 信号重叠、信号扭曲等因素可能干扰多变量统计分析结果^[40]。因此, 鉴于中药化学成分的复杂性和多样性, 采用 LC-MS、GC-MS 等高灵敏度、高分辨技术与体现整体性的 $^1\text{H-NMR}$ 技术联用的策略, 将是今后代谢组学分析技术发展的必然趋势^[41]。各种分析方法的联用与整合有利于发挥每种技术的优势, 弥补各自方法学上的缺陷, 最大程度的定性定量分析药材中的整体代谢物组。同时, 融合多学科理论与方法, 将 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学与网络药理学、基因组学、转录组

学及蛋白质组学进行有机整合, 也是系统生物学时代中药质量评价的重要研究内容。联合运用多种分析技术、多种组学技术对中药品种和质量进行系统分析与评价, 有利于找出基因变异、蛋白表达差异和代谢物变化之间的内在联系, 为实现中药内在质量的综合评价和整体效应物质的全面控制奠定重要的基础。

参考文献

- 1 盛龙生. 代谢组学与中药研究. 中国天然药物, 2008, 6(2): 98~102.
- 2 Buriani A, Garcia-Bermejo M L, Bosio E, et al. Omic techniques in systems biology approaches to traditional Chinese medicine research: present and future. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(3): 535~544.
- 3 淡墨, 高先富, 谢国祥, 等. 代谢组学在植物代谢研究中的应用. 中国中药杂志, 2007, 32(22): 2337~2341.
- 4 Krishnan P, Kruger N J, Ratcliffe R G. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *J Exp Bot*, 2005, 56(410): 255~265.
- 5 Lisee J, Schauer N, Kopka J, et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc*, 2006, 1(1): 387~396.
- 6 Zhou J L, Qi L W, Li P. Herbal medicine analysis by liquid chromatography/ time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(44): 7582~7594.
- 7 Kim H K, Choi Y H, Verpoorte R. NMR-based metabolomic analysis of plant. *Nat Protoc*, 2010, 5(3): 536~549.
- 8 Kooy van der F, Maltese F, Choi Y H, et al. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Med*, 2009, 75(7): 763~775.
- 9 范刚, 周林, 赖先荣, 等. 基于代谢组学技术的中药质量控制研究思路探讨. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(6): 870~875.
- 10 Jung Y, Ahn Y G, Kim H K, et al. Characterization of dandelion species using $^1\text{H-NMR}$ and GC-MS-based metabolite profiling. *Analyst*, 2011, 136(20): 4222~4231.
- 11 Fan G, Tao L H, Yue Q H, et al. Metabolic discrimination of *Rhizoma Coptidis* from different species using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and principal component analysis. *Planta Med*, 2012, 78(6): 641~648.
- 12 Qin X M, Dai Y T, Liu N Q, et al. Metabolic fingerprinting by $^1\text{H-NMR}$ for discrimination of the two species used as *Radix Bupleuri*. *Planta Med*, 2012, 78(9): 926~933.
- 13 Choi Y H, Kim H K, Hazekamp A, et al. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy and principal component analysis. *J Nat Prod*, 2004, 67(6): 953~957.
- 14 Lee E J, Shaykhtudinov R, Weljie A M, et al. Quality assessment of ginseng by $^1\text{H-NMR}$ metabolite fingerprinting and profiling analysis. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(16): 7513~7522.

- 15 Kim H K, Choi Y H, Erkelens C, *et al.* Metabolic fingerprinting of Ephedra species using ^1H -NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(1):105~109.
- 16 Jung Y, Lee J, Kim H K, *et al.* Metabolite profiling of Curcuma species grown in different regions using ^1H -NMR spectroscopy and multivariate analysis. *Analyst*, 2012, 137(23):5597~5606.
- 17 Chang W T, Choi Y H, Heijden der R, *et al.* Traditional processing strongly affects metabolite composition by hydrolysis in Rehmannia glutinosa roots. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59(5):546~552.
- 18 Kim S H, Hyun S H, Yang S O, *et al.* ^1H -NMR-based discrimination of thermal and vinegar treated ginseng roots. *J Food Sci*, 2010, 75(6):577~581.
- 19 王雪洁,李震宇,薛水玉,等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究. *中草药*, 2012, 43(9):1727~1737.
- 20 黄璐琦,郭兰萍,华国栋,等. 道地药材的属性及研究对策. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(2):44~46.
- 21 张艺,范刚,耿志鹏,等. 道地药材品质评价现状及整体性研究思路. *世界科学技术-中医现代化*, 2009, 11(5):660~664.
- 22 Kim E J, Kwon J, Park S H, *et al.* Metabolite profiling of Angelica gigas from different geographical origins using ^1H -NMR and UPLC-MS analyses. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(16):8806~8815.
- 23 罗尚华,吴四维,范刚,等. 基于 ^1H -NMR 对泽泻药材地缘区分和质量评价的代谢组学研究. *第三军医大学学报*, 2013, 35(10):996~1000.
- 24 Kang J, Choi M Y, Kang S, *et al.* Application of a ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) metabolomics approach combined with orthogonal projections to latent structure-discriminant analysis as an efficient tool for discriminating between Korean and Chinese herbal medicines. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(24):11589~11595.
- 25 Wen H, Kang S, Song Y, *et al.* Differentiation of cultivation sources of Ganoderma lucidum by NMR-based metabolomics approach. *Phytochem Anal*, 2010, 21(1):73~79.
- 26 Ioset K N, Nyberg N T, Diermen DV, *et al.* Metabolic profiling of Rhodiola rosea rhizomes by ^1H -NMR spectroscopy. *Phytochem Anal*, 2011, 22(2):158~165.
- 27 Dai H, Xiao C N, Liu H B, *et al.* Combined NMR and LC-DAD-MS analysis reveals comprehensive metabonomic variations for three phenotypic cultivars of Salvia miltiorrhiza Bunge. *J Proteome Res*, 2010, 9(3):1565~1578.
- 28 Kim S H, Cho S K, Hyun S H, *et al.* Metabolic profiling and predicting the free radical scavenging activity of Guava (Psidium guajava L.) leaves according to harvest time by ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(6):1090~1097.
- 29 支海娟,孙海峰,支鹏,等. 基于 NMR 的植物代谢组学技术研究款冬花蕾动态化学成分变化. *植物研究*, 2012, 32(4):458~466.
- 30 Xiao C N, Dai H, Liu H B, *et al.* Revealing the metabonomic variation of rosemary extracts using ^1H -NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(21):10142~10153.
- 31 Kim H K, Verpoorte R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem Anal*, 2010, 21(1):4~13.
- 32 Gilard V, Balayssac S, Malet-Martino M, *et al.* Quality control of herbal medicines assessed by NMR. *Curr Pharm Anal*, 2010, 6(4):234~245.
- 33 Ludwig C, Viant M R. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. *Phytochem Anal*, 2010, 21(1):22~32.
- 34 Verpoorte R, Choi Y H, Kim H K. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem Rev*, 2007, 6(1):3~14.
- 35 张芳,谢狄霖,陈忠. 扩散排序核磁共振法研究丹参混合液中的药效物质. *分析仪器*, 2003, 6(1):30~34.
- 36 Chatterjee S, Srivastava S, Khalid A, *et al.* Comprehensive metabolomic fingerprinting of Withania somnifera leaf and root extracts. *Phytochemistry*, 2010, 71(10):1085~1094.
- 37 Okada T, Afendi F M, Altaf-Ul-Amin M, *et al.* Metabolomics of medicinal plants: the importance of multivariate analysis of analytical chemistry data. *Curr Comput-Aid Drug*, 2010, 6(3):179~196.
- 38 Rundlöf T, Mathiasson M, Bekiroglu S, *et al.* Survey and qualification of internal standards for quantification by ^1H -NMR spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(5):645~651.
- 39 Fan G, Zhang M Y, Zhou X D, *et al.* Quality evaluation and species differentiation of Rhizoma coptidis by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Chim Acta*, 2012, 747:76~83.
- 40 Defernez M, Colquhoun I J. Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using ^1H -NMR spectra. *Phytochemistry*, 2003, 62(6):1009~1017.
- 41 朱超,梁琼麟,王义明,等. 代谢组学的整合化发展及其新进展. *分析化学*, 2010, 38(7):1060~1068.

Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine by ^1H -NMR-based Metabolomics

Fan Gang, Luo Shanghua, Li Yan, Tan Er, Zhang Yi

(College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

Abstract: Traditional Chinese medicine (TCM) is an important part of modern medicine. Application of modern analytical techniques to identify the authenticity of TCM and evaluate its quality is an important and critical content in

the process of the modernization and internationalization of TCM. This paper described the development and characteristics of a ^1H -NMR-based metabolomics technology, and reviewed its application in the species identification, quality evaluation of "*Daodi Yaocai*" (i.e., genuine medicinal materials), processing theory and the best harvest time of TCM. Besides, based on previous work, further discussion was given on technical methods and key question of the ^1H -NMR metabolomics method. This paper provided a methodological reference for the species identification and quality evaluation of TCM and other herbal medicines.

Keywords: Traditional Chinese medicine, ^1H -NMR, metabolomics, species identification, quality evaluation

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)