

# 干旱胁迫下黄芩代谢变化揭示药材活性成分复杂性的生物学本质

杜虹韦<sup>1,2</sup>, 李孟<sup>3</sup>, 姜志红<sup>4</sup>, 丛微<sup>1</sup>, 关瑜<sup>1</sup>, 孔玲<sup>1</sup>, 孟祥才<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江省中医药科学院, 哈尔滨 150036;

3. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 哈尔滨 150040;

4. 黑龙江省药品检验研究中心, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的:研究黄芩在干旱条件下的差异初生代谢和次生代谢产物含量变化的生物学本质。方法:利用超高压液相色谱-电喷雾串联飞行时间质谱法(UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS)分析代谢变化。结果:在干旱条件下黄芩根部得到具显著差异的化合物11种(VIP值 $\geq 2$ )。干旱条件下柠檬酸含量降低、莽草酸含量升高,表明在逆境条件下初生代谢减弱,次生代谢增强。在次生代谢产物中,干旱处理组通过生物合成和转化提高次生代谢产物的含量,调节各成分含量的比例,黄芩苷,汉黄芩苷,黄芩苷,汉黄芩素,白杨素,圣草酚,5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮,5,8-二羟基-6,7-二甲氧基黄酮,3,5,7,2',6'-五羟基黄酮等生物活性和药理活性较强的多酚羟基的游离黄酮类化合物含量显著升高。黄芩大量的化合物犹如复杂的缓冲溶液,不断通过生物合成和转化来快速精确维持活性氧平衡,从而对不断变化的环境胁迫做出应答。该结果阐明了道地药材质量形成的本质和药材成分复杂的本质原因。结论:含量较低而活性较高的成分也是决定药材质量重要因素,高含量成分和高活性相结合可更好评价道地药材质量。

**[关键词]** 黄芩; 代谢组学; 活性氧; 次生代谢物

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0148-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211511

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211021.1547.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-10-21 18:40

## Biological Essence of Component Complexity in Herbal Medicine: Based on Changed Metabolism of *Scutellaria baicalensis* Under Drought Stress

DU Hong-wei<sup>1,2</sup>, LI Meng<sup>3</sup>, LOU Zhi-hong<sup>4</sup>, CONG Wei<sup>1</sup>, GUAN Yu<sup>1</sup>, KONG Ling<sup>1</sup>, MENG Xiang-cai<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Heilongjiang Academy of Chinese Medical Sciences, Harbin 150036, China;

3. First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

4. Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the biological essence of the content variation of differential primary and secondary metabolites in fresh roots of *Scutellaria baicalensis* under drought stress. **Method:** The changes of metabolites were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass/mass (UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS). **Result:** A total of

**[收稿日期]** 20210806(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81573523);2018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[2018]43号);黑龙江中医药大学校基金面上项目(201808)

**[第一作者]** 杜虹韦,博士,主任药师,从事中药质量的研究,E-mail:du-hongwei6@163.com

**[通信作者]** \*孟祥才,教授,博士生导师,Tel:0451-87266802,E-mail:Mengxiangcai000@163.com

11 differential compounds were identified from the roots of *S. baicalensis* ( $VIP \geq 2$ ). Under drought stress, citric acid content increased and shikimic acid content decreased, indicating that the drought stress weakened the primary metabolism but strengthened secondary metabolism. Drought stress raised the content and regulated the proportion of various secondary metabolites by modulating the biosynthesis and biotransformation of them. To be specific, the content of free flavonoids with many phenolic hydroxyl groups and high biological activity and pharmacological activity, such as baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, chrysin, eriodictyol, 5, 2', 6'-trihydroxy-7, 8-dimethoxyflavone, 5, 8-dihydroxy-6, 7-dimethoxyflavone, and 3, 5, 7, 2', 6'-pentahydroxyflavanone, was significantly increased. The massive compounds, like an intricate buffer, maintain metabolism stable as quickly and accurately as possible through biosynthesis and biotransformation, thus responding to the changing environment, which reveals how the quality of genuine regional drugs is influenced and why compounds in herbal medicine are complex. **Conclusion:** Secondary metabolites with low content but high activity are important influencing factors of medicinal material quality and metabolites with high content and high activity are evaluation indicators of genuine regional drug quality.

**[Keywords]** *Scutellaria baicalensis*; metabolomics; reactive oxygen species; secondary metabolite

动物可以通过移动来躲避各种不利的环境而生存,而植物不能移动,不得不面对高温、干旱、土地贫瘠等各种不利的环境条件。在逆境条件下,由于脱落酸增加导致气孔关闭,降低 $O_2$ 外排,增加浓度,同时降低叶绿体对 $CO_2$ 吸收和捕获,在此条件下过量激发能量和光合电子传递系统过度还原,使得更多的 $O_2$ 被还原为 $O_2\cdot^-$ , $O_2\cdot^-$ 又被进一步转变成 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ 等(米勒反应)<sup>[1]</sup>。在此过程中 $O_2$ 在还原过程中的产生的一系列强氧化作用的中间产物,被称为活性氧(ROS)。研究证明ROS的增加是环境胁迫的必然结果<sup>[1-2]</sup>,在逆境条件下 $H_2O_2$ 增加了10倍, $O_2\cdot^-$ 增加了3倍<sup>[1,4]</sup>。适当水平的ROS通过形成-S-S-键来改变蛋白质的结构(包括酶类),从而调节植物的各种生理反应<sup>[5-6]</sup>,但一旦ROS过量产生,特别是大量产生 $\cdot OH$ 、 $O_2\cdot^-$ 等活性较强的自由基,就会改变细胞相邻的分子结构、降低生物膜稳定性、断裂DNA链、断裂肽链、交联蛋白质,导致代谢紊乱,甚至导致细胞死亡<sup>[7-8]</sup>。在众多ROS中,由于 $H_2O_2$ 活性相对较弱,活性较为稳定,因此可以远距离运输,成为调节代谢的主要信号之一<sup>[9]</sup>。在逆境条件下产生的ROS主要通过超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT),过氧化物酶(POD)等抗氧化酶来消除, $O_2\cdot^-$ 在SOD作用下或自发分解为 $H_2O_2$ ,然后通过CAT或POD分解为 $H_2O$ 和 $O_2$ ,解除毒害。但是抗氧化酶也是蛋白质,SOD有2个亚基,CAT有4个亚基,这些亚基内部及亚基之间需要-S-S-基团来维持(酶的二级结构和三级结构)。如果植物处于严重的非生物胁迫中,这些基团很容易受到伤害,活性降低<sup>[10]</sup>。因此,植物仅依靠抗氧化酶难

以生存,还需要通过次生级代谢产物来维持活性氧的平衡,次生代谢产物在植物适应逆境方面发挥重要作用。

通过超高效液相色谱分析,在菘蓝中共鉴定出447种代谢物<sup>[11]</sup>,西洋参根部鉴定出128种<sup>[12]</sup>,黄芩鉴定出126种<sup>[13]</sup>,其中大多数是次生代谢产物。这些次生代谢产物含量和各成分间的比例因环境条件的变化而变化<sup>[14]</sup>。中药材所含有效成分通常是植物的次生代谢产物,因此中药材有效成分种类繁多,各成分含量和活性差异也较大,科学客观评价药材质量方法也一直是中药学研究的重点和难点。植物含有如此多次生代谢产物,他们之间有什么联系?代谢组学是一种无歧视监测代谢物的方法,是一种用于获取各种代谢物综合信息的研究技术。定量植物代谢组学可以促进研究人员对正常和胁迫条件下植物生化和代谢的理解,是目前检测非生物胁迫中初生和次生代谢物的最有效的方法<sup>[15-18]</sup>。黄芩分布于半干旱草原,其根富含各种不同结构的黄酮类化合物,具有抗炎、抗肿瘤和抗人类免疫缺陷病毒(HIV)活性。干旱是常见的逆境,也是影响黄芩黄酮的主要因素<sup>[19-20]</sup>。中药材质量与植物生长的环境密切相关,因此环境对次生代谢的影响是了解药材质量形成机制的重要切入点,本研究根据环境胁迫前后的差异,对缺水条件下黄芩中黄酮类化合物多样性及它们之间的关系进行研究,阐明药材活性成分多样性的生物学本质,为科学评价药材质量提供理论基础。

## 1 材料

2018年5月从黑龙江中医药大学药用植物园采

集2年生18株黄芩 *Scutellaria baicalensis*, 平均移栽3个花盆, 每株6株。割去花盆底部, 然后埋于地下, 自然生长, 没有任何干预。当年10月(温度在10℃左右), 把花盆从地下取出, 把塑料布放在底部隔绝土壤水分, 然后放回到原来的位置。

轻度干旱处理, 干表土约2 cm时收集样品。重度干旱处理, 干表土约7 cm时收集样品。空白组, 干旱时及时浇水, 始终保持土壤湿润。

从每组花盆中选取5株植物鲜根, 洗净泥土, 冻干, 然后分别磨成40目细粉。

甲醇(色谱纯, 购自Fisher科学公司); 乙腈(HPLC级, 德国默克公司); Milli-Q超纯水净化系统(美国Millipore公司)。甲酸(色谱纯, 科密欧化学试剂公司); 蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料公司); 甲醇(北京精细化学品有限责任公司)。其他试剂均为分析纯。

ACQUITY™ 型UPLC液相色谱仪, Synapt™ G2-Si-HDMS型质谱仪, MassLynx V4.1工作站, Progenesis QI 2.0(美国Waters公司); PBI1510-N型电子分析天平(瑞士梅特勒托利多仪器公司); 0.22 μm微孔滤膜(美国Millipore公司); Nichipet EX型单道微量可调移液器(规格分别为20~200, 100~1 000 μL, 日本NichiRYO公司), Heto PowerDry PL3000型冻干机(美国Thermo公司)。

## 2 方法

**2.1 供试品制备** 将细粉150 mg和70%甲醇50 mL放入锥形瓶中, 超声提取1 h, 补足失重。最后, 用0.22 μm微孔过滤器过滤上清液进行化学成分分析, 以此作为鲜品含量。

**2.2 超高效液相色谱法** 色谱条件为采用Waters ACQUITY UPLC™ BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~1.5 min, 16%~22%A; 1.5~5 min, 22%~30%A; 5~9 min, 30%~40%A; 9~12 min, 40%~70%A; 12~15 min, 70%~100%A); 柱温40℃; 样品仓温10℃; 流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 190~400 nm全波长扫描; 进样体积2 μL; 色谱仪流出液不经分流直接注入质谱仪进行正、负离子扫描分析。所有样品在分析过程中保持4℃。

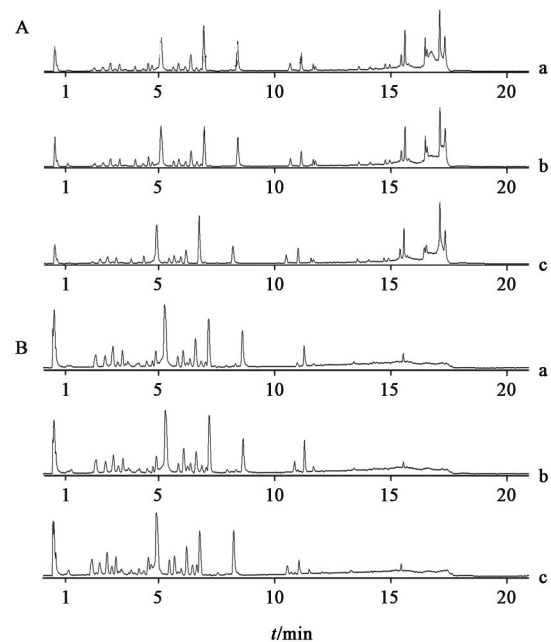
**2.3 质谱** 正离子模式: 毛细管电压2.6 kV; 锥孔采样电压25 V; 锥孔提取电压4.0 V; 去溶剂气温度350℃; 去溶剂气流量600 L·h<sup>-1</sup>; 离子源温度110℃; 准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽([M+H]<sup>+</sup> 556.277 1)溶液, 校正溶液进样速度100 μL·min<sup>-1</sup>,

校正频率为5 s; 质谱数据在全扫描方式下进行采集, 每0.02 s采集一次谱图, 每次采0.4 s, 质量扫描范围 *m/z* 100~1 500。

负离子模式: 毛细管电压2.2 kV; 锥孔采样电压25 V; 锥孔提取电压3.5 V; 去溶剂气温度350℃; 去溶剂气流量600 L·h<sup>-1</sup>; 离子源温度110℃; 准确质量校正采用亮氨酸-脑啡肽([M-H]<sup>-</sup> 554.261 5)溶液, 校正溶液进样速度为100 μL·min<sup>-1</sup>, 校正频率为5 s; 质谱数据在全扫描方式下进行采集, 每0.02 s采集一次谱图, 每次采0.4 s, 质量扫描范围 *m/z* 100~1 500。

## 3 结果

**3.1 黄芩鲜根供试品溶液UPLC-MS图谱采集** 在已优化UPLC-Q/TOF-MS条件下对黄芩鲜根的化学成分进行分析, 分别在正离子和负离子检测模式下采集供试品的色谱, 见图1。图谱中各峰能够达到较好分离, 共识别25个化合物离子峰。将25个化学成分峰分别标记为1~25。在正离子模式下准分子离子峰多以[M+H]<sup>+</sup>的形式被检测, 在负离子模式下化合物的准分子离子峰多以[M-H]<sup>-</sup>形式被检测。应用Waters Masslynx V4.1工作站的Elemental Composition Analysis工具, 根据测定精确质量和同位素峰拟合度计算分子式, 结果所有被识别的化合物峰准分子离子信息见表1。



A. 正离子模式; B. 负离子模式; a. 重度干旱; b. 轻度干旱; c. 空白

图1 黄芩鲜根化学成分UPLC-MS色谱

Fig. 1 UPLC-MS chromatograms of fresh *Scutellaria* root in positive/negative ion mode

表1 UPLC-HDMS表征的黄芩鲜根特征化合物

Table 1 Characterization of compounds in fresh Scutellaria root extract by UPLC-HDMS

峰号	$t_R$ /min	选择离子	测量值 $m/z$	预测值 $m/z$	误差 /ppm	离子碎片 $m/z$	分子式	认定成分
1	0.54	$[M-H]^-$	173.03	173.15	3.3	155, 137, 111	$C_7H_{11}O_5$	莽草酸
2	0.62	$[M-H]^-$	191.15	191.14	2.9	173, 147	$C_6H_7O_7$	柠檬酸
3	2.17	$[M+H]^+$	305.21	305.26	4.0	287, 153	$C_{15}H_{13}O_7$	3,5,7,2',6'-五羟基黄酮
4	2.80	$[M+H]^+$	549.16	549.15	1.6	531, 513, 495, 411, 375	$C_{26}H_{29}O_{13}$	aspenin-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷
5	3.19	$[M+H]^+$	549.16	549.15	0.9	531, 513, 495, 411, 375	$C_{26}H_{29}O_{13}$	白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷
6	4.16	$[M+H]^+$	477.10	477.10	2.1	301, 286	$C_{22}H_{21}O_{12}$	5,7,2'-三羟基-6-甲氧黄酮-7-O-葡萄糖苷酸
7	4.35	$[M-H]^-$	287.19	287.26	2.6	251, 135	$C_{15}H_{11}O_6$	圣草酚
8	4.56	$[M+H]^+$	347.07	347.07	4.0	332, 314	$C_{17}H_{15}O_8$	5,7,2',5'-四羟基-8,6'-二甲氧基黄酮
9	4.92	$[M+H]^+$	447.09	447.12	2.5	271, 253	$C_{21}H_{19}O_{11}$	黄芩苷
10	5.68	$[M+H]^+$	447.09	447.09	4.0	285	$C_{21}H_{19}O_{11}$	千层纸素 A-5-O葡萄糖苷
11	5.83	$[M+H]^+$	447.09	447.09	4.7	271	$C_{21}H_{19}O_{11}$	黄芩苷异构体
12	5.95	$[M+H]^+$	477.10	477.10	4.2	301, 286	$C_{22}H_{21}O_{12}$	5,7,8-三羟基-6-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖苷酸
13	6.19	$[M+H]^+$	461.10	461.10	4.6	285, 270	$C_{22}H_{21}O_{11}$	汉黄芩苷
14	6.20	$[M-H]^-$	429.08	429.08	3.5	253	$C_{21}H_{17}O_{10}$	白杨素-7-O-葡萄糖苷
15	6.44	$[M+H]^+$	477.10	477.10	2.9	301	$C_{22}H_{21}O_{12}$	5,6,7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖苷酸
16	7.01	$[M+H]^+$	315.22	315.30	1.1	282, 285	$C_{17}H_{15}O_6$	5,8-二羟基-6,7-二甲氧基黄酮
17	7.05	$[M-H]^-$	489.10	489.09	0.8	313, 298	$C_{23}H_{21}O_{12}$	5,7-二羟基-6,8-二甲氧基黄酮 e-7-O-葡萄糖苷酸
18	7.97	$[M-H]^-$	329.85	329.88	3.5	299	$C_{17}H_{13}O_7$	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮
19	8.03	$[M+H]^+$	301.07	301.06	3.7	286	$C_{16}H_{13}O_6$	芴黄芩素 II
20	8.21	$[M+H]^+$	271.06	271.05	3.6	253, 241	$C_{15}H_{11}O_5$	黄芩素
21	10.51	$[M+H]^+$	285.07	285.05	4.6	270	$C_{16}H_{13}O_5$	汉黄芩素
22	10.67	$[M+H]^+$	255.06	255.06	4.5	209	$C_{15}H_{11}O_4$	白杨素
23	11.01	$[M+H]^+$	375.18	375.10	4.3	360, 345, 327	$C_{19}H_{19}O_8$	黄芩新素 II
24	11.05	$[M+H]^+$	375.00	375.00	1.1	345	$C_{19}H_{19}O_8$	5,7-二羟基-6,8,2',3'-四甲氧基黄酮
25	11.45	$[M+H]^+$	345.09	345.0	4.3	330, 315	$C_{25}H_{17}O_7$	5,2-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮

3.2 黄芩化学成分的鉴定与结构表征 利用 MassLynx V4.1 工作站,在低碰撞能质谱图中确定准分子离子质谱信息,通过“Elemental Composition”工具对准分子离子进行元素组成分析,<5 ppm的精确质量误差保证了分子式确定的准确。在多级碰撞能(10~30 V)下获得较理想的二级质谱信息,对碎片离子的解析可推出化合物的结构,最后根据黄芩苷根中已知成分的保留时间、质荷比、相对分子质量、结构公式和元素组成<sup>[21-22]</sup>进行匹配,得到可能的化合物结构,完整描绘该准分子离子的裂解途径,进而完成对该峰的鉴定。以代表性成分黄芩苷为例说明各成分裂解规律和结构解析过程。在正离子模式下以 $[M+H]^+$ 形式被检出,见图2。通过“Elemental Composition”工具对  $m/z$  447 的峰进行元素组成分析,结合 Chemspider 化

物数据库及文献报道,得到可能的化合物结构,在9号峰的高碰撞能质谱图中进行靶向筛选,可见 MS/MS 质谱图  $m/z$  271, 253 的峰,为分子离子峰脱去葡萄糖醛酸基(176 Da),  $H_2O$ (25 Da)等碎片离子,最后与化合物数据库中所检索出的化合物结构进行匹配确定9号峰为黄芩苷。根据上述分析方法,共鉴定出两个处理组之间差异表达的25个化学标记,包括正离子模式下的19个候选离子和负模式下的6个候选离子。使用 Waters Masslynx 软件,最终确认了他们与 MS/MS 数据的身分。

3.3 特征多元代谢数据分析 采用主成分分析(PCA)模型识别轻度干旱、重度干旱和空白组之间代谢物的差异。PCA 评分见图2。偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)也被用来区分这两个群体。将群体差异明确划分为3个区域,表明其之间存在显著

的化学差异,同时建立的代谢组学方法可以成功地表征化学特征。使用VIP值来评估变量在OPLS-DA中的贡献。根据组间 $t$ 检验结果( $P < 0.05$ ),选择VIP值 $\geq 2$ 的离子,并将其作为干旱与空白之间最显著的差异化学标记,结果莽草酸,柠檬酸,5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮,5,8-二羟基-6,7-二甲氧基黄酮,3,5,7,2',6'-五羟基黄酮,圣草酚,黄芩苷,汉黄芩苷,黄芩素,汉黄芩素,白杨素呈现出显著差异,见图3。

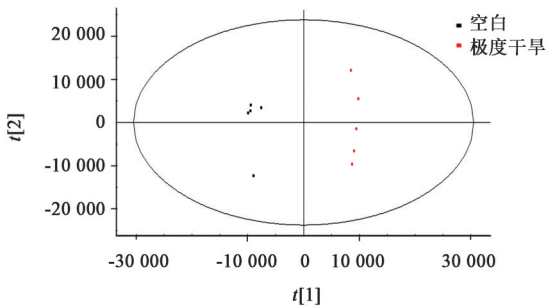


图2 正离子下各组UPLC-Q-TOF-MS数据PCA分析的得分  
Fig. 2 Score plots of UPLC-Q-TOF-MS data generated via PCA in positive ion mode

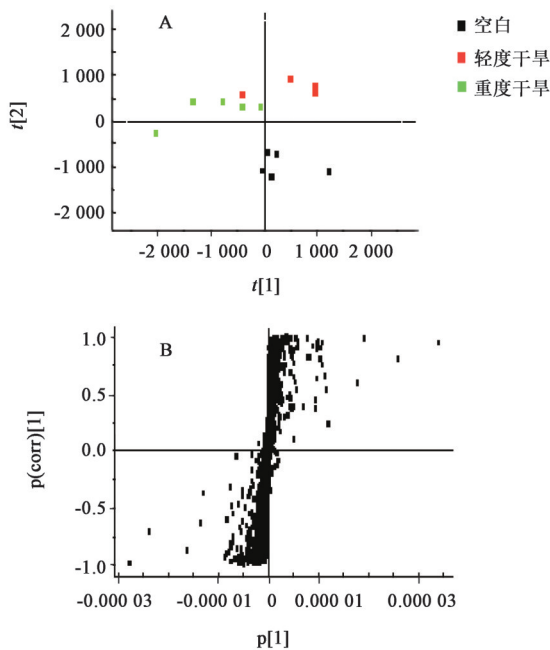


图3 正离子下干旱处理与空白组OPLS-DA分析(A)S-score值(B)  
Fig. 3 S-score values (B) of OPLS-DA (A) detected between drought treatment and control in positive ion model

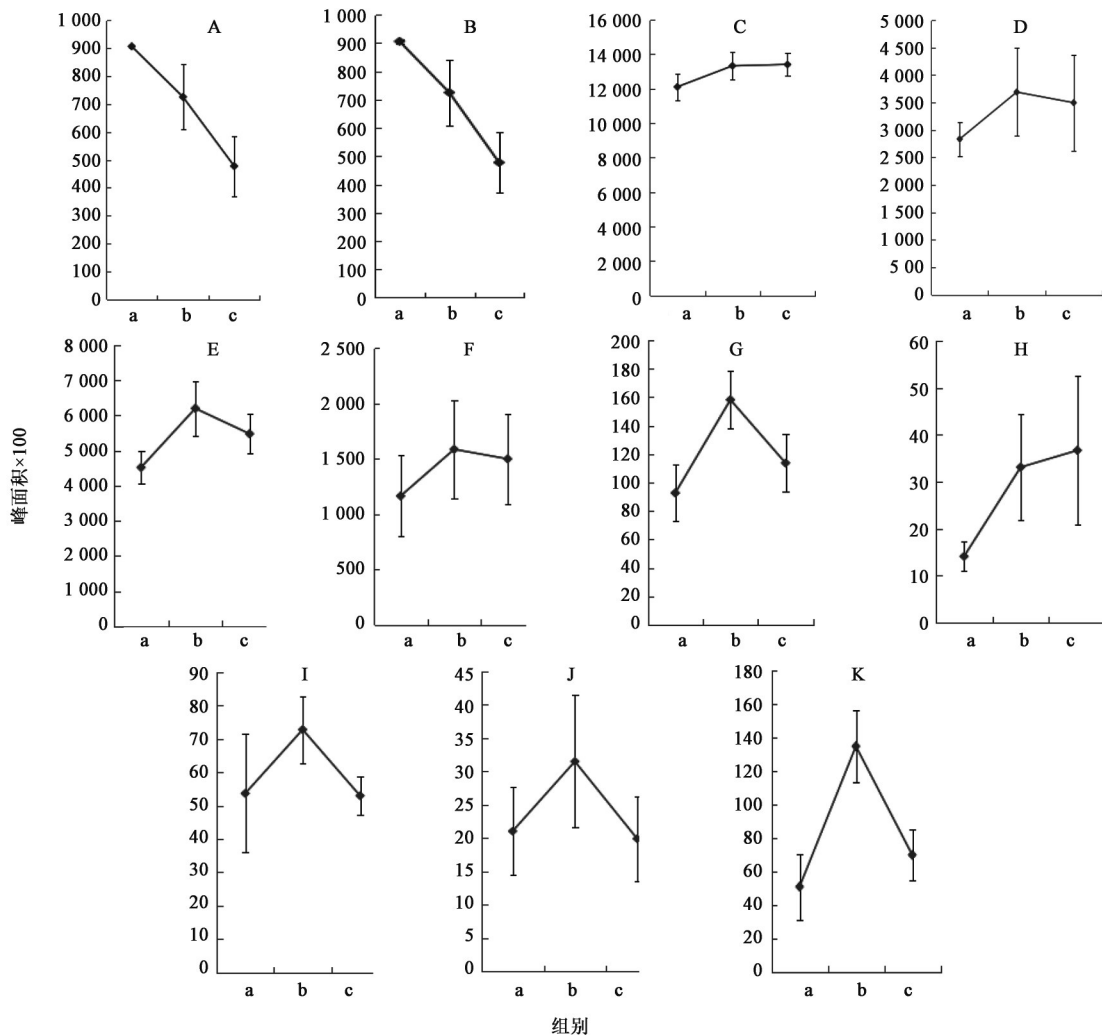
#### 4 讨论

4.1 干旱增强了次生代谢 本研究在质谱数据中只观察到柠檬酸和莽草酸2种初生代谢物。柠檬酸是三羧酸循环中的主要物质,在干旱中显著下降,

表明初生代谢减弱。莽草酸是各种黄酮类化合物的来源,也是初生和次生代谢途径的一个分支点,柠檬酸含量的降低和莽草酸含量的增加表明次生代谢增强。由于次生代谢产物的增加,在干旱条件下9个次生代谢产物含量显著增加(VIP值 $\geq 2$ ),分别为黄芩苷,汉黄芩苷,黄芩素,汉黄芩素,3,5,7,2',6'-戊二羟基黄酮,5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮,白杨素,圣草酚和5,8-二羟基-6,7-二甲氧基黄酮。

苯丙氨酸氨化酶(PAL)广泛存在于植物中,其活性受环境受环境所诱导<sup>[23-24]</sup>,干旱作为一种常见的非生物胁迫,在干旱条件下,促进了黄酮类化合物的生物合成<sup>[25]</sup>。莽草酸位于柠檬酸下游,图4结果表明,莽草酸与严重干旱几乎同步变化,此外,严重干旱地区的柠檬酸严重下降,这意味着更多的莽草酸应转化为次生代谢产物。但除了5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮,所有严重干旱条件下的其他黄酮化合物低于轻度干旱条件下,这可能是由于过度干旱,黄芩在严重干旱下产生更多的活性氧,一些次生代谢物与ROS反应并被消耗<sup>[24-25]</sup>。

4.2 化合物的合成与转化对活性影响的分析 在干旱条件下这些增加的次生代谢物的具有明显的3个特征。首先,多羟基黄酮含量显著增加。次生代谢产物的酚羟基的数量和位置决定了黄酮类化合物的生物学效应。事实证明,B环上羟基的数量直接影响活性,当双键引入C环时,羟基的数量也明显增加<sup>[26]</sup>;在A环中的C-5和C-7位置的羟基及B环上的C-3',C-4'和C-5'位点都能明显增加活性<sup>[27]</sup>;C-6羟基也可以增加黄酮的活性<sup>[28-29]</sup>。其次,除黄芩苷和汉黄芩苷外,其余黄酮类化合物均为游离的非苷类黄酮类化合物。黄酮类化合物生物合成的复合酶位于内质网,由于黄酮苷具有亲水性糖类,很难通过磷脂双层自由地渗透到生物膜和生物膜中,因此生物活性大大降低。黄芩素缺少亲水性的葡萄糖醛酸,其生物可利用约为黄芩苷的7倍<sup>[30]</sup>。研究明黄芩素的抗菌活性是黄芩苷的2~5倍,抑制白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 转换酶是黄芩苷1~3倍<sup>[31]</sup>,动植物的生物膜是相同的,这意味着黄酮苷的作用微乎其微。也有研究表明,当糖基被引入A环时,黄酮的活性就消失了<sup>[32]</sup>,因此类黄酮苷被认为是活性黄酮的贮藏形式,在需要时被转化为游离黄酮类化合物后才发挥作用<sup>[33]</sup>。最后,含甲氧基的黄酮含量也明显增加。黄酮类化合物上的甲氧基具有微弱的失电子能力,在自然状态下表现出较弱的抗氧化性,



A. 柠檬酸; B. 莽草酸; C. 黄芩苷; D. 汉黄芩苷; E. 黄芩素; F. 汉黄芩素; G. 3,5,7,2',6'-五羟基黄酮; H. 5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮; I. 白杨素; J. 圣草酚; K. 5,8-二羟基-6,7-二甲氧基黄酮; a. 空白组; b. 轻度干旱; c. 重度干旱

图4 在正离子模式下,重度干旱与空白之间 OPLS-DA 分析的 11 种化合物含量变化

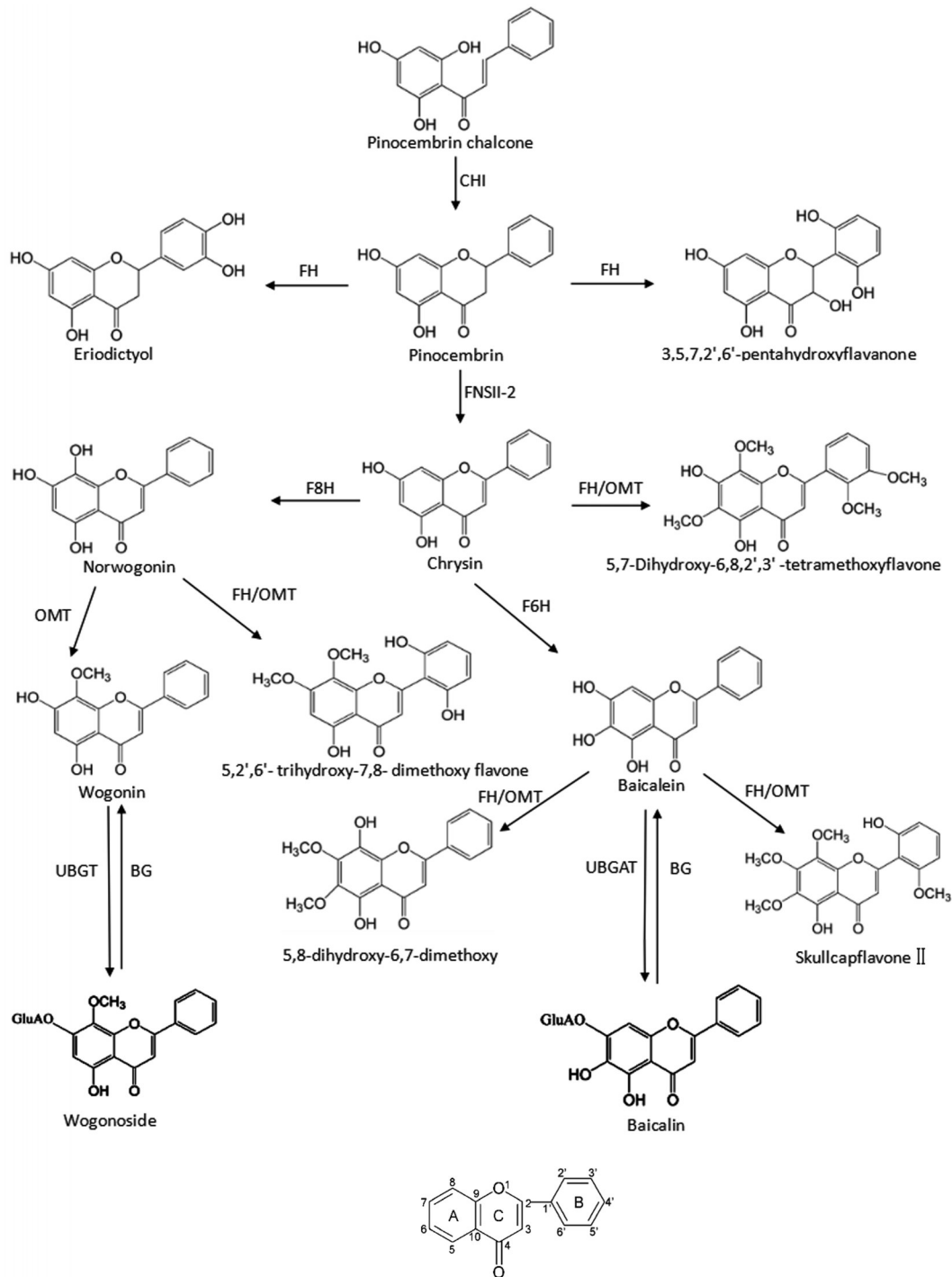
Fig. 4 Changed contents of 11 compounds by OPLS-DA analysis between drought and control in positive ion mode

但在过氧化物酶(POD)的帮助下,其能力显著增强<sup>[34]</sup>。生态胁迫诱导了逆境条件下抗氧化酶 POD 的活性和生物合成,也会显著增加甲氧基黄酮的抗氧化能力。这些成分通常位于黄酮类化合物生物合成的下游或末端,并且化学性质稳定。因此,在环境胁迫,含甲氧基黄酮的活性显著增强。

从图 5 可以看出,这些显著变化的次生代谢产物均具有较高的活性,而在生物体中含量较低,这意味着含量较低的组合物的效果不容忽视。

**4.3 代谢途径的调节分析** 活性氧过量或过少都是有害的,活性氧含量取决于生产和抗氧化剂清除之间的微妙平衡<sup>[1]</sup>。在严重胁迫下,次生代谢物发挥重要作用,使 ROS 保持在一种平衡状态。ROS 产生的越多,黄酮活性就越高。这些黄酮类化合物的生物活性通过这些黄酮化合物的生物合成和相互

转化来调节,即通过调节各黄酮成分的含量和比例来实现。黄芩含有几种羟化酶<sup>[21-22]</sup>,羟基成分的增加显著增加了抗氧化能力<sup>[35]</sup>。当 ROS 升高时,只有 C-5 和 C-7 两个羟基化的白杨素被加入羟基或甲氧基,转化为活性较强的黄芩素,去甲汉黄芩素,5,7-二羟基-6,8,2',3'-四甲氧基黄酮,该反应仅需一步,因此黄芩可快速对环境变化做出反应。ROS 可以增加苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性<sup>[36]</sup>,使黄酮类化合物不断补充。当 ROS 含量降低,多余的黄芩素或汉黄芩素在黄芩素 7-O-葡萄糖醛酸转移酶的作用下被转化为活性较低的黄芩苷和汉黄芩苷,而且由于 2 种苷类成分存在亲水性葡萄糖醛酸,不能自由透过细胞膜,使黄酮类成分仅局限于细胞中的某一区域,难以发挥作用,导致抗氧化能力下降。此外,随着活性氧含量的降低,黄酮类化合物的生物合成



CHI. 查尔酮异构酶; OMT. *O*-甲基转移酶; FNSII-2. 黄酮合成酶; FH. 黄酮羟化酶; F8H. 黄酮8-羟化酶; F6H. 黄酮6-羟化酶; BG.  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶; UBGAT. 葡萄糖醛酸转移酶

图5 黄酮类化合物的分子结构及生物合成示意

Fig. 5 Molecular structure and biosynthesis diagram of flavonoids

也有所下降。根据文献13个活性成分的生物合成和转化途径已经明晰。在本文中只有VIP值 $\geq 2$ 得化学成分被选做显著差异化合物,目前已在黄芩中发现130余种活性成分,必然存在很多通过成分之间转化而改变活性的化学反应,以此快速而精密地调节ROS水平的相对稳定。

次生代谢产物的多样性在植物适应环境方面发挥至关重要的作用。通过这些黄酮类化合物之间的生物合成和转化,犹如复杂的缓冲溶液精准和快速地调节细胞的抗氧化能力,保持活性氧的平衡。这些植物药的有效成分通常为植物的次生代谢产物,黄芩中的多种次生代谢产物含量和比例的

变化也会影响药材的质量,因此在干旱胁迫环境下活性成分多样性本质在某种程度上可阐明道地药材质量形成的本质和药材成分复杂的本质原因,可为药材质量评价方法提供良好的基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 郑荣梁,黄中洋. 自由基生物学[M]. 3版. 北京:高等教育出版社,2007.
- [2] MITTLER R. ROS are good[J]. Trends Plant Sci, 2017,22(1):11-19.
- [3] DEL RÍO LA, LÓPEZ-HUERTAS E. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling[J]. Plant Cell Physiol, 2016, 57(7):1364-1376.
- [4] DAT J, VANDENABEELE S, VRANOVÁ E, et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses[J]. Cell Mol Life Sci, 2000, 57(5): 779-795.
- [5] CONSIDINE M J, MARÍA S L, CHRISTINE H F. Unravelling how plants benefit from ROS and NO reactions, while resisting oxidative stress[J]. Annal Bota, 2015, 116(4):469-473.
- [6] FORMAN H J, MAIORINO M, URSINI F S. Signaling functions of reactive oxygen species[J]. Biochemistry, 2010, 49(5):835-842.
- [7] CZARNOCKAA W, STANISŁAW K. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses[J]. Free Radical Bio Med, 2018, 122:4-20.
- [8] YOU J, CHAN Z L. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants[J]. Front Plant Sci, 2015, 6:1092.
- [9] QIN Y M, HU C Y, ZHU Y X. The ascorbate peroxidase regulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene is involved in cotton fiber cell elongation by modulating ROS homeostasis[J]. Plant Signal Behav, 2008, 3(3): 194-206.
- [10] BAXTER A, MITTLER R, SUZUKI N. ROS as key players in plant stress signalling[J]. J Exp Bot, 2014, 65(5):1229-1240.
- [11] SHI Y H, XIE Z Y, WANG R, et al. Quantitative and chemical fingerprint analysis for the quality evaluation of *Isatis indigotica* based on ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detector combined with chemometric methods[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7):9035-9050.
- [12] LIN H, ZHU H, TAN J. Comprehensive investigation on metabolites of wild-simulated american ginseng root based on ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Agr Food Chem, 2019, 67(20): 5801-5819.
- [13] WANG Z L, WANG S, KUANG Y, et al. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*[J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 465-484.
- [14] 滕中秋,付丹青,贾少华,等. 植物应答非生物胁迫的代谢组学研究进展[J]. 植物生态学报, 2011, 35(1): 110-118.
- [15] 淡墨,高先富,谢国祥,等. 代谢组学在植物代谢研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(22): 2337-2341.
- [16] SUMNER L W, MENDES P, DIXON R A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era[J]. Phytochemistry, 2003, 62: 817-836.
- [17] OBATA T, FERNIE A. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses[J]. Cell Mol Life Sci, 2012, 69(8):3225-3243.
- [18] 张永刚,韩梅,姜雪,等. 环境因子对黄芩光合生理和黄酮成分影响研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10):1761-1766.
- [19] 秦双双,陈顺钦,黄璐琦,等. 水分胁迫对黄芩内源激素与有效成分相关性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):99-101.
- [20] LIN C, MEI H, LI M Y, et al. Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi. under drought stress[J]. Ind Crop Prod, 2018, 122(15): 473-482.
- [21] WANG Z L, WANG S, KUANG Y, et al. A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*[J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 465-484.
- [22] GUO H M, FU X Y, DU H W, et al. Sodium dithionite enhanced quality of radix scutellariae through modification of secondary metabolism[J]. Int J Pharm Investig, 2016, 6(4):225-231.
- [23] SONG Q, CAO WL, JIANG H, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> improves quality of Radix Scutellariae through anti-oxidant effect[J]. Pharmacog Mag, 2016, 12(45):84-91.
- [24] YUAN Y, LIU Y, WU C, et al. Water deficit affected flavonoid accumulation by regulating hormone metabolism in *Scutellaria baicalensis* Georgi roots[J].

- PLoS One, 2012, 7(10): e42946.
- [25] HYUN J, WOO Y, HWANG D S, et al. Relationships between structures of hydroxyflavones and their antioxidative effects[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(18): 5510-5513.
- [26] 梁然, 陈长慧, 艾希成, 等. 黄芩素与黄芩苷抗氧化活性差异的结构原因[J]. 波谱学杂志, 2010, 27(1): 132-140.
- [27] WANG H Y, HUI K M, CHEN Y J, et al. Structure-activity relationships of flavonoids, isolated from *Scutellaria baicalensis*, binding to benzodiazepine site of GABA(A) receptor complex[J]. Planta Med, 2002, 68(12): 1059-1062.
- [28] LI K, FAN H, YIN P, et al. Structure-activity relationship of eight high content flavonoids analyzed with a preliminary assign-score method and their contribution to antioxidant ability of flavonoids-rich extract from *Scutellaria baicalensis* shoots[J]. Arab J Chem, 2018, 11(2): 159-170.
- [29] 刘大明, 蒋学华. 黄芩苷和黄芩素大鼠在体胃、肠的吸收动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 999-1001.
- [30] FENG Z, ZHOU J, SHANG X, et al. Comparative research on stability of baicalin and baicalein administrated in monomer and total flavonoid fraction form of Radix Scutellariae in biological fluids *in vitro* [J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 1177-1184.
- [31] HYUN J, WOO Y, HWANG DS, et al. Relationships between structures of hydroxyflavones and their antioxidative effects[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(18): 5510-5513.
- [32] HIROTANI M, KURODA R, SUZUKI H, et al. Cloning and expression of UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*[J]. Planta, 2000, 210(6): 1006-1011.
- [33] JIANG H, YANG J M, JIA G Z, et al. Physical and ecological impacts of chromones of fresh root of *Saposhnikovia divaricata* exposure to high temperature [J]. Russ J Plant Physl, 2018, 65(5): 680-687.
- [34] SHOIB A B, NASHEEMAN A. Functional characterization of flavonoid 3'-hydroxylase, CsF3'H, from *Crocus sativus* L: Insights into substrate specificity and role in abiotic stress[J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 30(667): 70-78.
- [35] SONG Q, GAO H R, WANG J H, et al. Exogenous intervention with sodium hydrosulfite enhances the quality of Radix Scutellariae by modulating antioxidases and secondary metabolities [J]. Pharmacogn Mag, 2019, 14(60): 107-114.

[责任编辑 顾雪竹]