

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的不同品种当归代谢组学分析

荔淑楠¹, 王引权^{1,2*}, 王富胜³, 樊秦¹, 雒军¹, 安培坤¹, 张亚丽¹, 李钦¹, 彭桐¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;

2. 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室培育基地, 兰州 730000;

3. 定西市农业科学研究院, 甘肃定西 743000)

[摘要] 目的: 建立当归不同品种间差异代谢物, 为当归新品种育种、引种、区划栽培和生态种植提供参考依据。方法: 对同一产地、同期采收的5个当归品种岷归1号(MG1), 岷归2号(MG2), 岷归4号(MG4), 岷归5号(MG5)和岷归6号(MG6)进行非靶向代谢组学综合分析。取各品种药材50%甲醇提取物, 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术, 结合软件Progenesis QI, 通过主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)等方法找出各品种间差异代谢物; 依据相对分子质量, 二级碎片, KEGG数据库和HMDB数据库以及相关文献信息, 对差异代谢物进行鉴定。结果: 5个当归品种的代谢物存在明显差异($P < 0.05$), MG2, MG4, MG5和MG6中的绿原酸、阿魏酸、色氨酸、阿魏醛等含量显著低于MG1含量($P < 0.05$), 而藜本内酯、香豆素、牛角苷、棕榈素、原儿茶醛、亚麻酸等含量显著高于MG1($P < 0.05$)。MG2, MG5及MG6中的代谢物相近, 与MG4的代谢物差异较大, 此外, 还鉴定出38个显著差异代谢物, 涉及7种潜在的靶向代谢通路, 不同品种当归都可能通过苯丙素类生物合成、类倍半萜烯类化合物的代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢、核苷酸代谢、类胡萝卜素、亚麻酸、亚油酸等代谢途径调节代谢物的合成。结论: 应用UPLC-Q-TOF-MS和Progenesis QI代谢组学技术从整体水平比较不同品种当归的化学成分, 发现其中的差异性及其规律, 为当归质量控制、引种、栽培及当归育种和生态种植提供参考依据。

[关键词] 当归; 品种; 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱; 代谢组学; 绿原酸; 阿魏酸; 色氨酸

[中图分类号] R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0138-10

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20200611

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191205.1035.001.html>

[网络出版时间] 2019-12-05 11:18

Metabonomics Analysis on Different Varieties of *Angelica sinensis* Based on UPLC-Q-TOF-MS

LI Shu-nan¹, WANG Yin-quan^{1,2*}, WANG Fu-sheng³, FAN Qin¹,

LUO Jun¹, AN Pei-kun¹, ZHANG Ya-li¹, LI Qin¹, PENG Tong¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Gansu Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality and Standard,

Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

3. Dingxi Academy of Agricultural Sciences, Dingxi 743000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish differential metabolites between different varieties of *Angelica sinensis*, and provide reference for breeding, introduction, regional cultivation and ecological cultivation of new varieties of

[收稿日期] 20190723(003)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1700705); 甘肃省高校协同创新科技团队支持计划项目(2016C-05FF09); 国家自然科学基金项目(81660625, 81260616); 甘肃省中药材产业体系项目

[第一作者] 荔淑楠, 在读博士, 从事中药学研究, E-mail: lishunan123456@163.com

[通信作者] *王引权, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药用植物生理生态、质量综合评价研究, Tel: 0931-8765342, E-mail: kjkfpp@163.com

A. sinensis. **Method:** Comprehensive non-target metabolomics analysis was conducted for five new varieties of *A. sinensis* collected at the same time from the same origin: Mingui No. 1 (MG1), Mingui No. 2 (MG2), Mingui No. 4 (MG4), Mingui No. 5 (MG5), and Mingui No. 6 (MG6). The 50% methanol extract of each variety was taken, and then the differential metabolites among varieties were found by using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), software Progenesis Q1, principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA), and non-targeted metabolomics analysis. Differential metabolites were identified based on precise molecular weight, secondary fragments, KEGG database, HMDE database and related literature information. **Result:** The results of UPLC-Q-TOF-MS and multivariate statistical analysis showed that there were significant differences in the metabolites of five *Angelica* varieties. As compared with MG1, the contents of chlorogenic acid, ferulic acid, tryptophan and ferulic aldehyde were significantly lower in MG2, MG4, MG5 and MG6, while the contents of ligustilide, coumarin, bovine keratin, palmitin, protocatechualdehyde and linolenic acid were significantly higher ($P < 0.05$). The results of multivariate statistical analysis showed that the metabolites of MG2 and MG5 were similar with those of MG6, but were significantly different from those of MG4. In addition, 38 distinct metabolites were identified, involving 7 potential targeted metabolic pathways. Different varieties of *A. sinensis* could regulate the synthesis of their metabolites through phenylpropanoid biosynthesis and sesquiterpene-like compounds metabolism, lipid metabolism, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, nucleotide metabolism, carotenoids, linolenic acid, linoleic acid and some other metabolic pathways. **Conclusion:** UPLC-Q-TOF-MS and Progenesis Q1 metabolomics techniques were used to compare the chemical constituents of different varieties of *A. sinensis* from the overall level. The differences and their regularities were found, which could provide reference for quality control, variety sorting, identification, breeding and ecological planting of *A. sinensis*.

[Key words] *Angelica sinensis*; variety; UPLC-Q-TOF-MS; metabolites; chlorogenic acid; ferulic acid; tryptophan

当归为伞形科植物当归的干燥根,具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^[1],是常用的中药大品种之一。甘肃是当归的主产区,年栽培面积为 2.1 万 hm^2 ,总产量达 6 400 吨,约占全国总产量 90% 以上^[2],其中以岷县及其周边县所产质量较好,被认为是当归的道地产区。近年来由于当归新品种选育工作滞后,导致当归连作障碍问题突出,根部病害(如麻口病、根腐病)频发、抗性下降,早期抽薹率增加,药材品质变劣,严重影响着道地当归的市场声誉^[3]。为了解决当归生产存在的品种缺乏问题,定西市农业科学研究院从 1998 年起持续开展当归新品种选育工作,已陆续选育出岷归 2 号、岷归 4 号、岷归 5 号及岷归 6 号等新品种^[4]。目前对当归新品种的评价多数仅从产量表现、农艺学性状、成药等级及少数化学成分(如阿魏酸、藁本内酯、丁烯基苯肽及欧当归内酯 A)等方面进行分析^[5-6],而对当归新品种从整体代谢及代谢途径的解析还缺乏深入研究。

代谢组学是对某一生物体或细胞在一特定时期或条件下所有代谢产物同时进行定性和定量分析,

是运用整体与综合分析于一体的技术,结合化学信息学分析方法确定目标差异代谢物,以此阐明生物体的代谢过程和变化机制^[7]。UPLC-Q-TOF-MS 是代谢组学研究的主要工具,具有分离速度快、进样体积小、准确度高、可以同时分析样品中上百种代谢物,较传统方法获得更丰富、更清晰的信息^[8]。Progenesis Q1 是用于代谢组学差异代谢物鉴定和生物标志物发现的软件,可以快速分析大样本量的多组分^[9]。目前 Progenesis Q1 在基因的代谢组学领域应用较多,而未见应用于当归品种研究;此外,与 UPLC-Q-TOF-MS 结合分析鉴定不同品种当归的差异性代谢物尚未见报道。因此,本研究选择了同一产地、同期采收的当归 5 个新品种为研究对象,采用 UPLC-Q-TOF-MS 和 Progenesis Q1 技术对各品种药材差异性代谢物进行分析,旨在筛选出各品种对应的代谢标志物,并对差异性代谢物进行鉴定,以期对当归药材的育种、引种、栽培和生态种植提供依据。

1 材料

2777C UPLC System 型液相色谱, Xevo G2-XS QTOF 型高分辨串联质谱, Acquity UPLC HSS T3

色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)(美国 Waters); TissueLyser 型研磨仪(上海净信实业发展有限公司); MSU224S-100-DU 型 1/1 万电子天平(德国 Sartorius); AX-205 型 1/10 万电子天平(瑞士 Mettler); KQ-500DB 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司); Milli-Q Integral 型超纯水仪(美国 Millipore); Y36-156 型离心机(德国艾本德股份公司); 乙腈(美国 Fisher 公司); 甲醇(德国 Merck

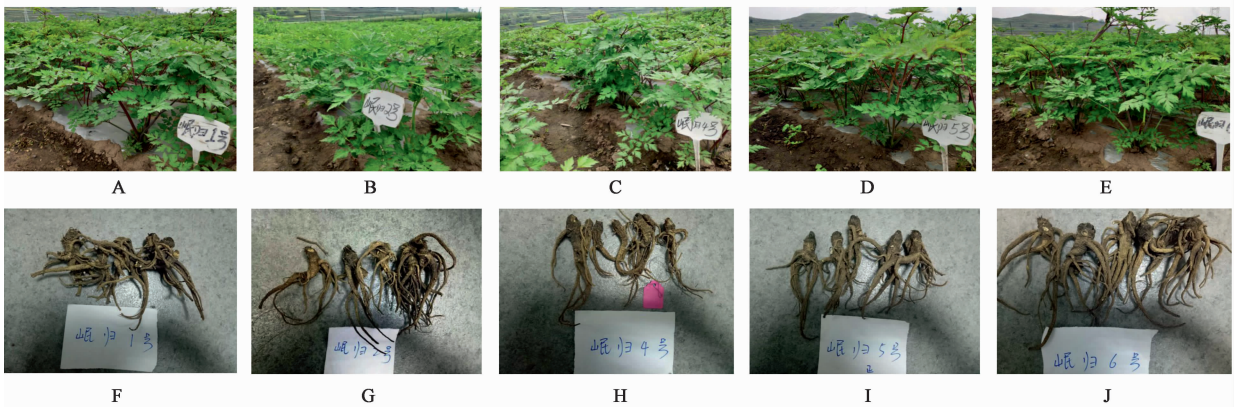
公司)。

供试当归新品种药材于 2018 年 11 月 10 日从定西市农业科学研究院岷县闰井镇试验基地收集,经甘肃中医药大学王引权教授鉴定为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根。测定时随机选取无病害、无机械损伤、无腐烂、无病虫害、且大小相近的代表性根进行粉碎、过 50 目筛后,保存于甘肃中医药大学科研中心 -80 °C 超低温冰箱中。见表 1,图 1。

表 1 当归样品信息

Table 1 Specific information of *Angelica sinensis*

品种	代号	主要植物学性状	药材性状
岷归 1 号	MG1	叶片深绿色,叶柄、茎秆紫色	略呈圆柱形,上粗下细,主根下有数个细小分支,根头具环纹、表面黄棕至棕褐色、断面黄白色,香气浓郁
岷归 2 号	MG2	叶片绿色,叶柄、茎秆绿色	主根下分支较少,表面棕黄至浅棕褐色,断面淡黄棕色,有淡淡香气
岷归 4 号	MG4	叶片绿色,主茎深紫色	主根下分支较少,表面棕黄至浅棕褐色,断面淡黄棕色,有淡淡香气
岷归 5 号	MG5	叶片绿色,主茎、侧茎均为淡紫色	表面灰褐至黄褐色,断面淡黄棕色,香气浓郁
岷归 6 号	MG6	叶片绿色,主茎淡紫色,具蜡粉	根下分支较多,表面黄褐至棕褐色,断面黄白色,香气浓郁



A ~ E. 原植物; F ~ J. 药材

图 1 供试当归品种的原植物及原药材

Fig. 1 Original plants and medicinal materials of tested varieties of *Angelica sinensis*

2 方法

2.1 质谱条件 采用 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 8 μm), 柱温 50 °C, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 流动相 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸甲醇(B), 梯度洗脱(0 ~ 2 min, 0B; 2 ~ 11 min, 0 ~ 100% B; 11 ~ 13 min, 100% B; 13 ~ 15 min, 100% ~ 0B)。进样量为 10 μL。

2.2 Q-TOF-MS 检测条件 利用 Xevo G2-XS QTOF 高分辨串联质谱分别进行正负离子模式采集。正离子模式下,毛细管电压 2.0 kV, 锥孔电压 40.0 V。负离子模式下,毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 40.0 V。采用 MSE 模式进行 centroid 数据采集,

一级扫描范围 m/z 50 ~ 1 200 Da, 扫描时间 0.2 s, 对所有母离子按照 20 ~ 40 eV 的能量进行碎裂, 采集所有的碎片信息, 扫描时间为 0.2 s。在数据采集过程中, 每 3 s 进行实时质量校正。同时, 每隔 10 个样本进行一次混合后质控样本, 用于监测和评估在样本采集过程中仪器状态的稳定性及实验数据的可靠性^[10]。

2.3 UPLC-Q-TOF-MS 的样品提取 精密称取各样品粉末 25 mg, 置于离心管中, 加入 -20 °C 冰箱预冷的 50% 甲醇 800 μL 和两颗小钢珠, 置于组织研磨仪中研磨, 参数设置为 50 Hz, 5 min, 研磨后, 取出钢珠, 在 -20 °C 冰箱中沉淀 2 h, 25 000 r·min⁻¹ 4 °C

离心 15 min, 每个样本取出 650 μL , 置于新的离心管中再次 25 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min; 每个分别吸取 550 μL 上清液转到新的离心管中, 任取 2 个不同组别的样本, 各取出混合成质控(QC)样本 50 μL , 按样品编码顺序将样品放置在离心管架上, 拍照后上传 LC-MS 系统待检测。

2.4 数据分析 将质谱采集到的原始数据导入 Progenesis Q1 (Version 2.2) 软件进行峰对齐, 峰提取、峰鉴定及多元统计分析等过程, 并使用 MetaX^[11] 软件对提取出来的数据使用 KNN 方法进行缺失值填充、去低质量离子(将 QC 样本中缺失超过 50%, 或者实际样本中缺失超过 80% 的离子去除), 之后对数据进行过滤, 即将所有样品中 $\text{RSD} > 30\%$ 的离子过滤掉, 采用多变量 PLS-DA 模型前两个主成分的 VIP 值, 结合单变量分析差异倍数 (Fold-change) 和 Q -value 来筛选差异表达的代谢物。代谢物鉴定基于数据库 KEGG 和 HMDB, 代谢通路分析基于数据库 KEGG。

3 结果

3.1 质控分析 将质控样本 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流图进行重叠比较, 结果表明各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠, 说明在整个实验过程中仪器稳定性较好, 以负离子模式为例, 见图 2。

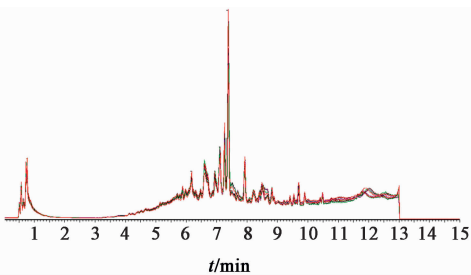


图 2 当归质控样本负离子模式 TIC 重叠

Fig.2 Total ion current chromatograms (TICs) of QC sample of *Angelica sinensis* in negative mode

3.2 代谢组数据多元统计分析 为了分析当归不同品种间代谢物的变化, 对所得的复杂数据用软件 Progenesis Q1 归一化后进行多元统计分析, 首先采用 t 检验和变异倍数分析方法对数据所反映的数量变动进行分析, 见图 3, 横坐标为 \log_2 (差异倍数), 纵坐标为 Q -value 的负对数 $-\log_{10}(Q\text{-value})$, 一个点代表一个变量, $\text{fold change} \leq 0.8333$ 或 ≥ 1.2 且 $Q\text{-value} < 0.05$ 的点标注为红色, 其余点为蓝色, 离原点越远表示该变量在该组含量越高。其次通过降维处理后进行主成分分析(PCA), 见图 4, 可以明显看出, MG2, MG5 和 MG6 组之间重叠, 没有达到明显分离,

和 MG1, MG4 均达到明显分离, 说明 MG2, MG5 和 MG6 的代谢物相似, 而与 MG1 和 MG4 的代谢物有明显差异。最后, 使用 MetaX 软件进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA), 对该模型参数 R^2 和 Q^2 进行了 200 次置换检验, 同时通过计算变量重要性投影(VIP)值来衡量各代谢物表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力, 从而辅助代谢标志物的筛选(通常以 VIP 值 ≥ 1.0 作为筛选条件)^[12-14]。各组是明显分开的, 说明各组的代谢物具有显著性差异, 见图 5。同时, 该模型验证参数 R^2 和 Q^2 都接近 1, 表明当前 PLS-DA 模型稳定可靠, 具有良好的预测性。

3.3 显著性差异代谢物筛选及鉴定 差异代谢物采用多变量 PLS-DA 模型前两个主成分的 VIP 值 ≥ 1 , 结合单变量分析差异倍数 ≥ 1.2 或 ≤ 0.8333 和 $Q\text{-value} < 0.05$ 三者取交集, 得到共有的代谢物即差异代谢物, 以相对峰强度来评价代谢物变化的显著性。差异代谢物鉴定结果见图 6, 在正离子模式下, 与 MG1 相比, 不同品种当归共有 1 083 个相似代谢物, 其中特有代谢物 MG2 有 135 个, MG4 有 728 个, MG5 有 233 个, MG6 有 186 个, 见图 6A; 在正离子模式下, 与 MG1 相比, 不同品种当归共有 624 个代谢物含量上升, 459 个代谢物下调, 其中 MG2 有 94 个特有代谢物上调, 46 个特有代谢物下调, MG4 有 512 个特有代谢物上调, 231 个特有代谢物下调, MG5 有 161 个特有代谢物上调, 77 个特有代谢物下调, MG6 有 77 个特有代谢物上调, 46 个特有代谢物下调, 115 个特有代谢物下调, 见图 6C, D。图 6E, F 表现出了相似的变化趋势, 但差异离子数目不同, 说明不同品种当归的代谢谱的表达有差异, 其中岷归 4 号的特有离子及上下调离子数均最多。表 2 表示已经鉴定出来的部分代谢物, 相对含量见表 3, 与岷归 1 号比较, 岷归 2 号藁本内酯、丁烯基肽内酯、香豆素、茴香脑等代谢物显著升高, 阿魏酸、绿原酸、色氨酸、吡啶酸等代谢物显著降低, 说明不同品种当归的不同可能与这些差异离子有关。

3.4 差异代谢物聚类分析 为了评价所选代谢物合理性、选取层次聚类方法, 当筛选的候选代谢物合理准确时, 同组样本会聚在同一簇中, 聚在同一簇内的代谢物具有相似的表达模式, 可能在代谢过程中处于较为接近的反应步骤中, 本实验结果表明岷归 1 号聚为一类, 岷归 4 号聚为一类, 岷归 5 号、岷归 2 号和岷归 6 号聚为一类, 说明岷归 1 号, 岷归 4 号和岷归 2 号、岷归 5 号、岷归 6 号所得到的代谢物在表达模式有所不同, 见图 7。

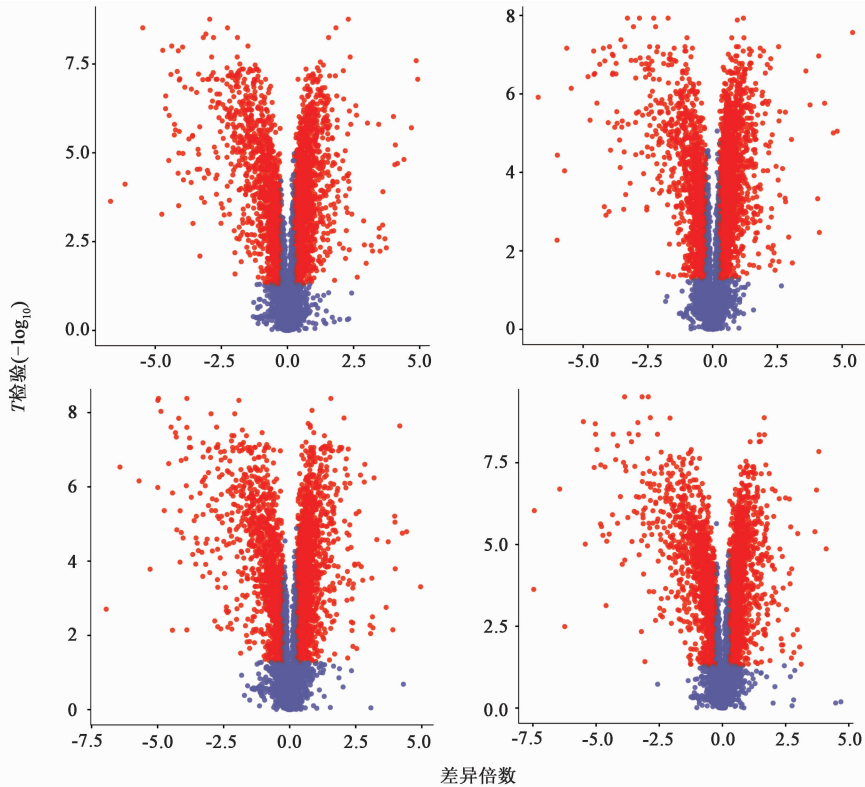
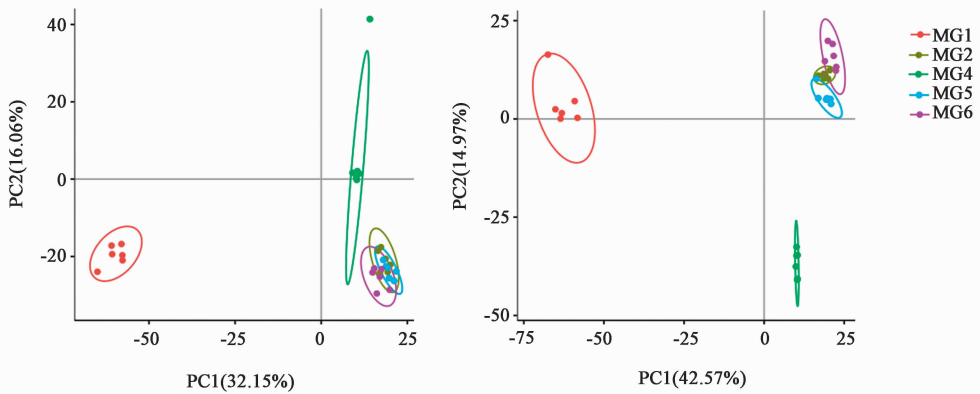


图 3 以正离子模式的数据为例筛选当归不同品种间差异代谢物的火山

Fig. 3 Volcano plot of differential metabolites among varieties of *Angelica sinensis* using positive mode



图中每个点代表一个样品,不同颜色代表不同组别(图 5 同)

图 4 不同品种当归在液质联用正负离子模式下的 PCA

Fig. 4 PCA plots of different varieties of *Angelica sinensis* with LC-MS positive and negativemode

4 讨论

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 结合多元统计方法,对 5 个当归品种进行综合分析,共鉴定出 38 显著差异代谢物,主要参与苯丙烷类代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、萜类化合物和聚酮类化合物的代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素的代谢、核苷酸代谢及苯丙烷类代谢等其他次生代谢通路。

4.1 苯丙烷类代谢 阿魏酸,绿原酸,*L*-苯丙氨酸,香豆素,雌二醇,茴香脑,阿魏醛等活性成分主要

参与当归苯丙烷类代谢途径,其代谢物的积累不仅对植物抗性及着色等具有重要的生理功能,而且对人体健康,尤其对心脏、血栓、人体免疫力、肿瘤、癌症等具有很好的预防与治疗作用^[15-16]。本研究发现,与 MG1 比较,MG2, MG4, MG5 及 MG6 的阿魏酸、绿原酸和 *L*-苯丙氨酸等含量显著下降,针叶醇、花青素、硬脂酸、香豆素等含量升高,说明不同品种当归通过阿魏酸对针叶醇的还原,同时与光合作用和柠檬酸循环等联合起开,从而促进黄酮类、花青

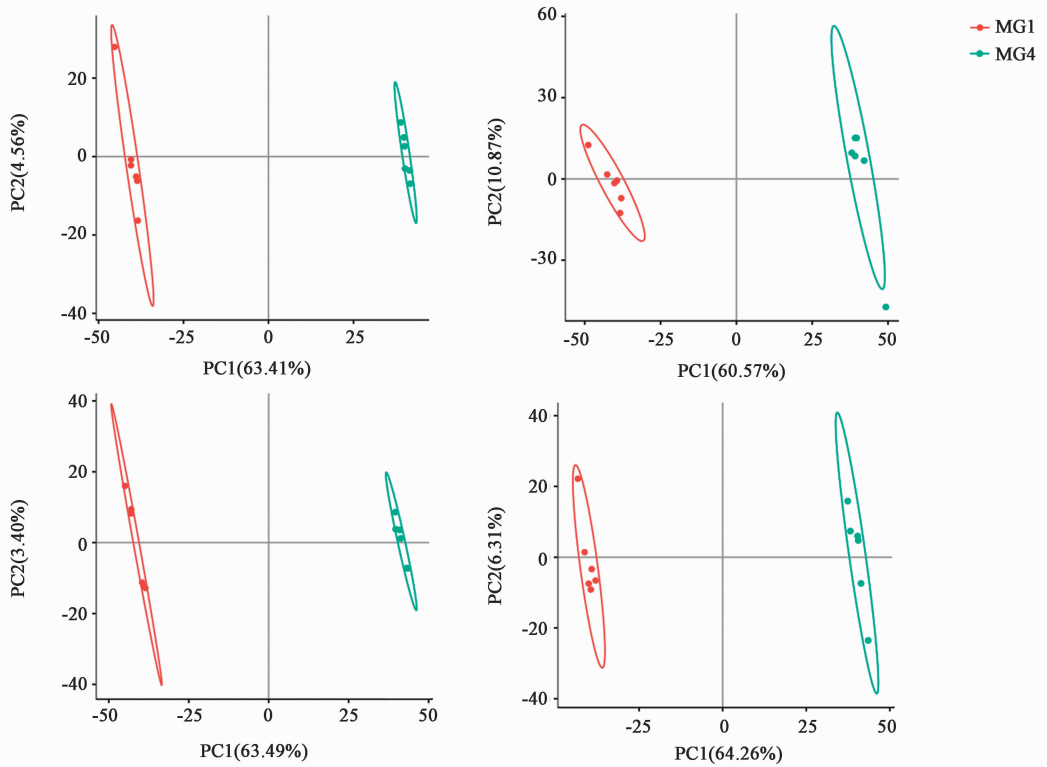
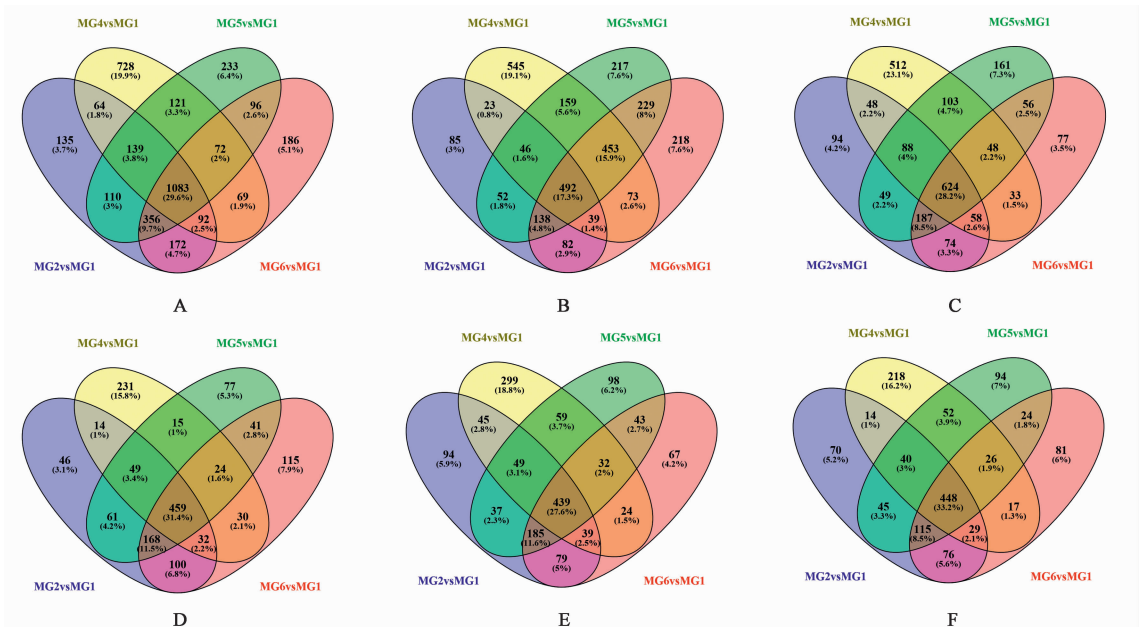


图 5 正离子模式下的 PLS-DA 判别分析模型的得分

Fig. 5 PLS-DA score plots of different varieties of *Angelica sinensis* in positive mode



A. 正离子模式总差异离子; B. 负离子模式总差异离子; C. 正离子模式上调差异离子; D. 正离子模式下调差异离子; E. 负离子模式上调差异离子; F. 负离子模式下调差异离子

图 6 不同品种当归差异代谢物韦恩

Fig. 6 Venny of differential metabolites indifferent varieties of *Angelica sinensis*

素、硬脂酸、香豆素等物质的合成。说明调控苯丙烷类代谢途径是提高植物的抗病、抗逆性,提高当归药材质量,缓解血瘀症状及预防血瘀形成的机制之一。

4.2 脂质代谢 根据 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) 数据库,植物脂质代谢包含花生四烯酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、不饱和脂肪酸、鞘磷脂、甘油

表 2 部分差异性代谢物的鉴定信息

Table 2 Some of metabolites and their identification results

代谢物名称	m/z	t_R /min	分子式	加合离子	δ	VIP 值	P	KEGG ID	趋势			
									MG2 vs MG1	MG4 vs MG1	MG5 vs MG1	MG6 vs MG1
绿原酸	377.08	4.40	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M + Na]^+$	-2.30	3.47	0	C00852	↓	↓	↓	↓
反式-邻羟基苯亚甲基丙酮酸盐	193.05	5.59	$C_{10}H_8O_4$	$[M + H]^+$	-0.11	2.28	0	C06203	↓	↓	↓	↓
阿魏酸	195.06	4.36	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M + H]^+$	-3.75	1.65	0	C01494	↓	↓	↓	↓
苜蓿总黄酮	209.08	6.08	$C_{11}H_{12}O_4$	$[M + H]^+$	0.14	1.04	0.000 4	C09816	↑	↓	↓	↑
3-二甲氧基丙基-4-羟基苯甲酸盐	229.08	5.98	$C_{12}H_{14}O_3$	$[M + Na]^+$	-1.73	1.32	0	C12458	↑	↑	↑	↑
茴香脑	149.10	8.15	$C_{10}H_{12}O$	$[M + H]^+$	1.65	1.61	0	C10428	↑	↑	↑	↑
香豆素	147.04	6.02	$C_9H_6O_2$	$[M + H]^+$	1.05	1.62	0	C05851	↑	↑	↑	↑
牛角苷	338.16	5.42	$C_{17}H_{20}O_6$	$[M + NH_4]^+$	-2.86	2.02	0	C09298	↑	↑	↑	↑
(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-羟基-2-氧代胆碱	169.12	6.01	$C_{10}H_{16}O_2$	$[M + H]^+$	-3.70	2.04	0	C11937	↑	↑	↑	↑
藜本内酯	191.11	8.41	$C_{12}H_{14}O_2$	$[M + H - H_2O]^+$ $[M + Na]^+$, $[M + H]^+$	2.27	1.14	0.000 3	C16987	↑	↓	↑	↑
<i>L</i> -色氨酸	203.08	4.11	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	$[M - H]^+$	-4.69	2.26	0	C00078	↓	↓	↓	↓
γ -亚麻酸	277.22	9.42	$C_{18}H_{30}O_2$	$[M - H]^+$	-1.99	1.42	0	C06426	↑	↑	↑	↑
1-乙酰氧基松脂醇	399.14	5.07	$C_{22}H_{24}O_8$	$[M + H - H_2O]^+$	-5.50	1.00	0.007 0	C10544	↑	↓	↑	↑
木糖酸	338.16	5.42	$C_{12}H_{20}N_2O_8$	$[M + NH_4]^+$	9.70	2.02	0	C15500	↑	↑	↑	↑
棕榈素	397.13	5.42	$C_{20}H_{22}O_7$	$[M + H]^+$, $[M + Na]^+$	-3.77	1.08	0.002 6	C09151	↓	↑	↑	↑
色氨酸	227.08	4.11	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	$[M + Na]^+$	-4.55	2.21	0	C00806	↓	↓	↓	↓
阿魏醛	179.07	5.34	$C_{10}H_{10}O_3$	$[M + H]^+$	-0.97	1.12	0.000 4	C02666	↑	↓	↓	↑
脱落酒精	233.15	6.72	$C_{15}H_{22}O_3$	$[M + H - H_2O]^+$	-9.32	1.04	0.000 8	C13456	↑	↑	↑	↑
甲基-2- α - <i>L</i> -岩藻糖基- β - <i>D</i> -半乳糖苷	339.13	3.56	$C_{13}H_{24}O_{10}$	$[M - H]^-$	-8.07	1.14	0.000 4	C04698	↓	↑	↑	↓
原儿茶醛	151.04	4.13	$C_8H_8O_3$	$[M - H]^-$	-9.49	1.26	0	C04043	↓	↑	↑	↓
对羟基苯甲酸异丁酯	193.09	6.26	$C_{11}H_{14}O_3$	$[M - H]^-$	-7.77	1.70	0	C20342	↑	↑	↓	↑
菊花醇	233.15	7.39	$C_{15}H_{22}O_2$	$[M - H]^-$	-7.04	1.54	0.001 0	C17609	↑	↑	↑	↑
α -锂辛酸	291.19	7.95	$C_{18}H_{28}O_3$	$[M - H]^-$	-6.03	1.45	0.000 2	C08319	↑	↑	↑	↑
甲氧基丙烷	309.24	8.74	$C_{19}H_{34}O_3$	$[M - H]^-$	-8.10	1.50	0	C14308	↑	↑	↑	↑
硬脂酸	275.20	9.95	$C_{18}H_{28}O_2$	$[M - H]^-$	-5.81	1.31	0	C16300	↑	↑	↑	↑
结核酸葡萄糖苷	427.14	5.48	$C_{18}H_{28}O_9$	$[M + K]^+$	-2.40	1.25	0.000 9	C08558	↓	↑	↓	↓
虎杖内酯	203.07	6.27	$C_{12}H_{12}O_4$	$[M + H - H_2O]^+$, $[M + Na]^+$	-3.04	1.06	0.001 4	C09963	↑	↑	↑	↑
丁烯基苯胺	189.09	7.85	$C_{12}H_{12}O_2$	$[M + H - H_2O]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + H]^+$	1.81	1.45	0	C16924	↓	↑	↓	↑
谷氨酸	165.09	6.05	$C_5H_9NO_4$	$[M + NH_4]^+$	3.16	1.07	0	C00025	↓	↓	↓	↓
甘油-3-磷酸	172.01	0.68	$C_3H_9O_6P$	$[M + H - H_2O]^+$, $[M + H]^+$	-4.00	1.40	0	C03189	↓	↓	↓	↓
胆固醇油酸酯	649.59	8.83	$C_{45}H_{78}O_2$	$[M - H]^-$	-5.16	1.81	0.001 4	C14641	↑	↑	↑	↑
α -亚麻酸	277.22	9.42	$C_{18}H_{30}O_2$	$[M - H]^-$	-1.99	1.42	0	C06427	↑	↑	↑	↑
<i>D</i> -甘露醇	217.05	5.95	$C_6H_{14}O_6$	$[M + Cl]^+$	2.27	1.41	0.004 2	C00392	↑	↑	↑	↑
<i>D</i> -半乳糖	215.03	0.66	$C_6H_{12}O_6$	$[M + Cl]^+$	-7.14	1.81	0.000 1	C00124	↓	↓	↓	↓
葡萄糖	215.03	0.66	$C_6H_{12}O_6$	$[M + Cl]^+$	-7.14	1.42	0.000 1	C00031	↓	↓	↓	↓
<i>L</i> -苯丙氨酸	166.09	0.84	$C_9H_{11}NO_2$	$[M + H]^+$	-2.14	1.90	0.000 1	C00079	↓	↓	↓	↓
<i>L</i> -酪氨酸	182.08	2.00	$C_9H_{11}NO_3$	$[M + H]^+$	-4.76	2.01	0	C00082	↓	↓	↓	↓

注:正离子模式指 $[M + H]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$ 等;负离子模式指 $[M - H]^-$, $[M + Cl]^-$ 等。

表 3 不同品种当归部分代谢物峰强度 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

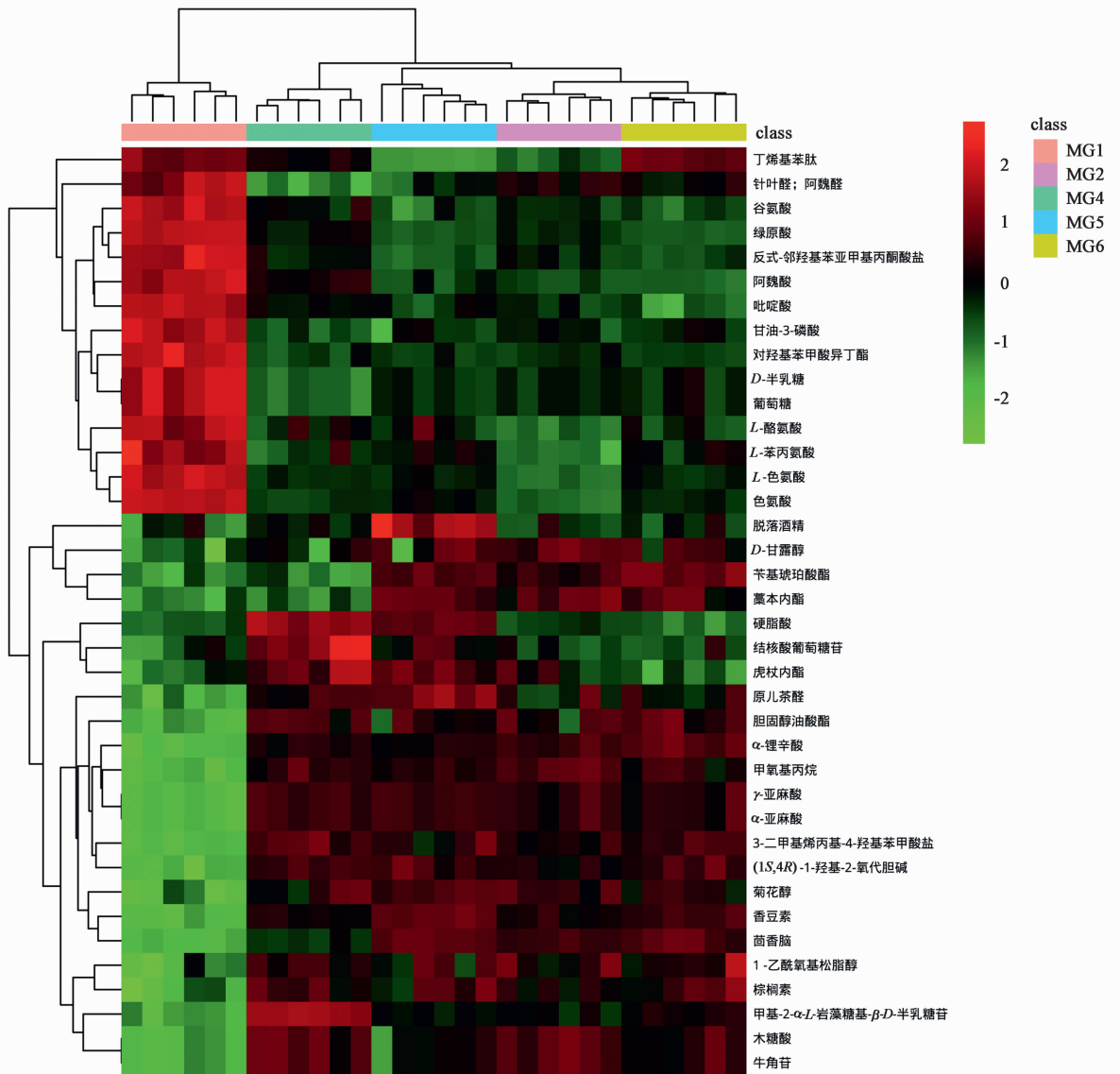
Table 3 Relative content of differential metabolites of different cultivars of *Angelica sinensis* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

化合物名称	岷归 1 号 ($\times 10^4$)	岷归 2 号 ($\times 10^4$)	岷归 4 号 ($\times 10^4$)	岷归 5 号 ($\times 10^4$)	岷归 6 号 ($\times 10^4$)
绿原酸	241.88 ± 28.24	14.40 ± 2.93 ²⁾	21.26 ± 5.35 ²⁾	7.73 ± 0.88 ²⁾	7.39 ± 0.71 ²⁾
反式-邻羟基苯亚甲基丙酮酸盐	12.79 ± 2.45	3.90 ± 0.64 ²⁾	4.19 ± 0.62 ²⁾	2.80 ± 0.31 ²⁾	3.15 ± 0.37 ²⁾
阿魏酸	80.67 ± 5.22	46.97 ± 2.01 ²⁾	57.78 ± 2.04 ²⁾	48.45 ± 4.34 ²⁾	44.19 ± 1.35 ²⁾
苯基琥珀酸酯	102.69 ± 8.73	141.41 ± 6.66 ²⁾	106.18 ± 10.38	150.15 ± 5.69 ²⁾	160.41 ± 8.31 ²⁾
3-二甲基烯丙基-4-羟基苯甲酸盐	90.80 ± 2.80	135.91 ± 5.83 ²⁾	147.36 ± 7.69 ²⁾	137.04 ± 13.67 ²⁾	142.18 ± 6.00 ²⁾
茴香脑	68.68 ± 2.53	119.50 ± 2.56 ²⁾	96.33 ± 5.09 ²⁾	129.42 ± 4.15 ²⁾	126.73 ± 7.96 ²⁾
香豆素	98.73 ± 7.23	179.76 ± 10.53 ²⁾	179.23 ± 6.51 ²⁾	218.19 ± 7.25 ²⁾	197.36 ± 9.13 ²⁾
牛角苷	11.70 ± 1.37	29.12 ± 2.76 ²⁾	29.23 ± 3.50 ²⁾	20.92 ± 4.33 ²⁾	24.55 ± 3.62 ²⁾
(1 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-羟基-2-氧代胆碱	0.37 ± 0.05	0.96 ± 0.11 ²⁾	1.15 ± 0.07 ²⁾	1.17 ± 0.19 ²⁾	1.16 ± 0.18 ²⁾
藁本内酯	6 673.16 ± 512.43	9 365.43 ± 811.52 ²⁾	6 925.64 ± 512.66	9 456.40 ± 408.68 ²⁾	9 048.45 ± 821.89 ²⁾
L-色氨酸	202.75 ± 19.36	59.41 ± 3.64 ²⁾	77.97 ± 3.88 ²⁾	84.48 ± 7.08 ²⁾	81.91 ± 6.83 ²⁾
γ-亚麻酸	223.87 ± 11.04	415.68 ± 26.75 ²⁾	428.80 ± 14.01 ²⁾	426.75 ± 9.10 ²⁾	407.23 ± 35.34 ²⁾
1-乙酰氧基松脂醇	110.06 ± 12.93	143.01 ± 12.16 ²⁾	141.61 ± 5.32 ²⁾	138.11 ± 12.65 ²⁾	143.29 ± 14.66 ²⁾
木糖酸	11.7 ± 1.37	29.12 ± 2.76	29.23 ± 3.50	20.92 ± 4.33	24.55 ± 3.62
棕榈素	122.07 ± 12.29	152.96 ± 6.39 ²⁾	159.78 ± 8.06 ²⁾	158.07 ± 13.60 ²⁾	161.17 ± 12.14 ²⁾
色氨酸	17.34 ± 0.50	7.58 ± 0.37 ²⁾	8.73 ± 0.32 ²⁾	9.82 ± 0.63 ²⁾	9.25 ± 0.37 ²⁾
阿魏醛	256.66 ± 21.06	211.48 ± 9.17 ²⁾	160.37 ± 9.95 ²⁾	184.48 ± 15.71 ²⁾	202.02 ± 10.56 ²⁾
脱落酒精	8.79 ± 0.60	8.98 ± 0.43	9.25 ± 0.21	11.00 ± 0.58 ²⁾	9.10 ± 0.42
甲基-2-α-L-岩藻糖基-β-D-半乳糖苷	2.74 ± 0.38	5.06 ± 0.61 ²⁾	10.18 ± 0.51 ²⁾	5.07 ± 0.28 ²⁾	5.82 ± 0.44 ²⁾
原儿茶醛	1.52 ± 0.11	1.94 ± 0.22 ²⁾	2.08 ± 0.10 ²⁾	2.34 ± 0.15 ²⁾	1.98 ± 0.16 ²⁾
对羟基苯甲酸异丁酯 I	7.42 ± 0.61	3.34 ± 0.24 ²⁾	3.12 ± 0.34 ²⁾	3.22 ± 0.25 ²⁾	3.13 ± 0.08 ²⁾
菊花醇	7.45 ± 1.50	14.12 ± 1.30 ²⁾	13.30 ± 2.01 ²⁾	14.56 ± 0.77 ²⁾	12.86 ± 1.39 ²⁾
柱烯酸	11.39 ± 0.70	24.82 ± 1.47 ²⁾	22.85 ± 1.23 ²⁾	22.46 ± 1.15 ²⁾	27.31 ± 1.85 ²⁾
甲氧基丙烷	1.30 ± 0.10	3.03 ± 0.18 ²⁾	2.73 ± 0.24 ²⁾	2.62 ± 0.12 ²⁾	2.62 ± 0.32 ²⁾
硬脂酸	18.53 ± 1.67	20.75 ± 1.55	47.81 ± 4.38 ²⁾	37.42 ± 2.11 ²⁾	17.35 ± 2.30
结核酸葡萄糖苷	8.79 ± 0.88	9.12 ± 0.71	12.48 ± 1.23 ²⁾	10.11 ± 0.82 ¹⁾	9.00 ± 0.80
虎杖内酯	9.13 ± 0.82	10.46 ± 1.03 ¹⁾	12.26 ± 1.06 ²⁾	11.70 ± 0.65 ²⁾	8.95 ± 0.75
胆固醇油酸酯	9.95 ± 1.33	22.36 ± 7.72 ²⁾	25.40 ± 4.52 ²⁾	19.94 ± 6.32 ²⁾	26.38 ± 5.34 ²⁾
α-亚麻酸	233.87 ± 12.09	415.68 ± 26.75 ²⁾	428.80 ± 15.35 ²⁾	426.75 ± 9.10 ²⁾	407.23 ± 32.26 ²⁾
D-甘露醇	0.54 ± 0.23	1.71 ± 0.36 ²⁾	0.94 ± 0.36	1.39 ± 0.67 ²⁾	1.33 ± 0.39 ²⁾
D-半乳糖	21.74 ± 2.94	10.50 ± 0.63 ²⁾	8.26 ± 0.66 ²⁾	10.12 ± 0.68 ²⁾	10.70 ± 1.25 ²⁾
L-苯丙氨酸	8.18 ± 0.39	4.46 ± 0.36 ²⁾	4.90 ± 0.24 ²⁾	4.56 ± 0.57 ²⁾	3.75 ± 0.56 ²⁾

注:与岷归 1 号比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

酯等生物合成。本研究发现,与 MG1 比较, MG2, MG4, MG5 和 MG6 亚油酸, α-亚麻酸, 棕榈素, 鞘磷脂, 硬脂酸, 柱烯酸等的代谢显著增强, 说明不同品种间当归的脂质代谢发生了变化, 调控脂质代谢是不同品种当归不同表现型的另一调控机制。

4.3 氨基酸代谢 色氨酸、络氨酸、精氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、缬氨酸、牛磺酸等都属于氨基酸代谢, 具有较强的舒张血管作用, 在维持血管张力恒定及调节血压方面起重要作用^[17], 本研究发现, MG2, MG4, MG5 及 MG6 中的色氨酸、谷氨酸、琥珀酸,



图中的每一行代表一个差异离子,每一列代表一个样本,不同颜色表示不同的强度,颜色从绿色到红色,表示强度从低到高

图 7 不同品种当归间显著性差异离子聚类分析

Fig. 7 Hierarchical clustering significant differentially metabolites among different varieties of *Angelica sinensis*

脯氨酸、亮氨酸、缬氨酸等含量均较 MG1 显著上升,说明不同品种当归的氨基酸代谢不同,调节氨基酸代谢是当归不同品种发生作用的另一种机制。

此外,公关毒素、脱落酒酸等参与了萜类化合物和聚酮类化合物代谢,甘露醇、葡萄糖、半乳糖等参与了碳水化合物代谢,萝卜素等生物的合成,说明不同品种当归的总萜类、聚酮类、碳水化合物等代谢物不同,可能对当归生理、病理及药理等方面产生影响。

综上所述,不同品种当归的代谢物有差异,而其作用机制是复杂的,主要与苯丙烷类代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、萜类化合物和聚酮类化合物的代谢、碳水化合物代谢、辅助因子和维生素的代谢、

核苷酸代谢及其他次生代谢产物的合成有关,进而调节差异代谢物发挥不同的作用机制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:133-134.
[2] 龚成文,冯守疆,赵新楠,等. 当归专用肥配方筛选及肥效试验[J]. 西北农业学报,2012,21(5):190-195.
[3] 龚成文,米永伟,谢志军,等. 当归育种研究进展[J]. 中医学报,2018,46(2):105-109.
[4] 王明伟,李硕,李敏,等. 基于熵权 TOPSIS 模型对当归不同栽培品种(品系)药材质量的综合评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):63-68.
[5] 李硕,李成义,李敏,等. 离子辐射选育当归新品种安

- 全性评价[J]. 中草药, 2018, 49(11): 2662-2670.
- [6] 马伟明, 王春明, 刘效瑞, 等. 全息生育适度系数法在当归新品种选育中的应用[J]. 中药材, 2013, 36(1): 13-15.
- [7] 吕尚, 杨世林, 饶毅, 等. 代谢组学及其相关技术在中药研发领域的应用进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(21): 4182-4191.
- [8] XING T T, ZHAO X J, ZHANG Y D, et al. Fast separation and sensitive quantitation of polymethoxylated flavonoids in the peels of Citrus using UPLC-Q-TOF-MS [J]. J Agric Food Chem, 2017, 65(12): 2615-2627.
- [9] ZHANG J, YANG W, LI S, et al. An intelligentized strategy for endogenous small molecules characterization and quality evaluation of earthworm from two geographic origins by ultra-high performance HILIC/QTOF MSE and Progenesis QI [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(14): 3881-3890.
- [10] DUNN W B, BROADHURST D, BEGLEY P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nat Protoc, 2011, 6(7): 1060-1083.
- [11] WEN B, MEI Z, ZENG C, et al. MetaX: a flexible and comprehensive software for processing metabolomics data [J]. BMC Bioinformatics, 2017, 18(1): 183.
- [12] CHEN S, KONG H, LU X, et al. Pseudotargeted metabolomics method and its application in Serum Biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2013, 85(17): 8326-8333.
- [13] BARKER M, RAYENS W. Partial least squares for discrimination [J]. J Chemometrics, 2003, 17(3): 166-173.
- [14] WESTERHUIS J A. Assessment of PLS-DA cross validation [J]. Metabolomics, 2008, 4(1): 81-89.
- [15] LUENGO A E, MAGNUM F D O S, ACEVEDO P, et al. Different levels of UV-B resistance in Vaccinium corymbosum cultivars reveal distinct backgrounds of phenylpropanoid metabolites [J]. Plant Physiol Biochem, 2017, 118(4): 541-550.
- [16] WEN P F, CHEN J Y, KONG W F, et al. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry [J]. Plant Sci (Oxford), 2005, 169(5): 928-934.
- [17] 王珂欣, 高丽, 周玉枝, 等. 苦参碱抗肝癌细胞增殖的¹H-NMR 代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4275-4283.

[责任编辑 顾雪竹]