

基于广泛靶向代谢组学的地黄与菊芋蒸制前后代谢产物差异比较



申国玺¹, 李超², 李孟芝², 张超云²

1. 河南金方源药业有限公司, 河南省中药材产地加工及质控工程技术研究中心 (河南南阳 473000)
2. 南阳理工学院张仲景国医国药学院 (河南南阳 473004)

【摘要】目的 探究地黄与菊芋蒸制前后的代谢产物差异, 为二者鉴别提供理论依据。**方法** 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 的广泛靶向代谢组学技术对代谢产物进行检测, 并结合主成分分析、层次聚类分析、正交偏最小二乘法判别分析等方法对代谢产物进行分析。**结果** 共检测到 12 类 2 474 种代谢产物, 其中以酚酸类、生物碱类、萜类、黄酮类等为主; 生地黄、生菊芋蒸制后甘露三糖、棉子糖、D-果糖等糖类及香草酸、丁香酸、柠檬酸等酚酸类成分含量显著增加; 熟地黄中梓醇、松果菊苷、毛蕊花糖苷等苷类成分含量显著低于生地黄。熟地黄 vs. 生地黄组的差异代谢产物以氨基酸类和环烯醚萜苷类为主, 其中乙酰梓醇、L-色氨酸和 L-赖氨酸等成分含量在生地黄蒸制后显著降低; 熟菊芋 vs. 生菊芋组的差异代谢产物以氨基酸类和酚酸类为主, 其中鸟氨酸、L-色氨酸和 L-赖氨酸等成分在生菊芋中显著富集; 生地黄 vs. 生菊芋组的差异代谢产物以氨基酸类和环烯醚萜苷类为主, 其中乙酰梓醇在生地黄中显著富集, 1-O-阿魏酰奎宁酸和 4-O-阿魏酰奎宁酸在生菊芋中显著富集; 熟地黄 vs. 熟菊芋组中的差异代谢产物以酚酸类为主, 其中 4-O-对香豆酰奎宁酸和 3,5-二咖啡酰奎尼酸等成分在熟菊芋中显著高于熟地黄。对差异代谢产物进行京都基因与基因组百科全书代谢通路富集分析, 主要富集于氨基酸生物合成、植物次生代谢产物生物合成、萜类生物合成等途径。**结论** 本研究揭示了地黄与菊芋蒸制前后代谢产物特征, 从代谢谱角度为熟地黄、熟菊芋鉴别研究提供参考依据。

【关键词】 地黄; 菊芋; 蒸制; 广泛靶向代谢组学; 代谢产物

【中图分类号】 R93

【文献标识码】 A

Comparative analysis of metabolite differences in *Rehmannia glutinosa* and *Helianthus tuberosus* before and after steaming based on widely targeted metabolomics

SHEN Guoxi¹, LI Chao², LI Mengzhi², ZHANG Chaoyun²

1. Henan Jinfangyuan Pharmaceutical Co. Ltd., Henan Province Engineering Technology Research Center for Origin Processing and Quality Control of Chinese Medicinal Materials, Nanyang 473000, Henan Province, China

2. Nanyang Institute of Technology, Zhang Zhongjing School of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Nanyang 473004, Henan Province, China

Corresponding author: ZHANG Chaoyun, Email: chaoyun2016@163.com

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202604125

基金项目: 河南省中央引导地方科技发展资金项目 (Z20241471092); 河南省重点研发专项 (241111313700)

通信作者: 张超云, 硕士, 教授, Email: chaoyun2016@163.com

【Abstract】Objective To investigate the differences in metabolites between *Rehmannia glutinosa* and *Helianthus tuberosus* before and after steaming to provide a theoretical basis for their identification. **Methods** A widely targeted metabolomics technology approach based on UPLC-MS/MS was employed to detect their metabolite components. Principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were combined to analyze the metabolites. **Results** A total of 2,474 metabolites belonging to 12 categories were detected, among which phenolic acids, alkaloids, terpenoids, and flavonoids were dominant. After steaming, the content of sugars—such as manninotriose, raffinose, and *D*-fructose—and phenolic acids including vanillic acid, syringic acid, and citric acid increased significantly in both raw *R. glutinosa* and raw *H. tuberosus*. In contrast, the levels of glycosides, including catalpol, echinacoside, and acteoside, were significantly lower in steamed *R. glutinosa* than in its raw form. The significantly differential metabolites between the steamed *R. glutinosa* vs. raw *R. glutinosa* group were predominantly amino acids and iridoid glycosides, among which the contents of components such as acetylcatalpol, *L*-tryptophan, and *L*-lysine decreased significantly in the steamed samples. The differential metabolites between the steamed *H. tuberosus* vs. raw *H. tuberosus* group were mainly amino acids and phenolic acids, with components such as ornithine, *L*-tryptophan, and *L*-lysine being significantly enriched in raw samples. The significantly differential metabolites between the two raw materials, were primarily amino acids and iridoid glycosides, among which acetylcatalpol was enriched in raw *R. glutinosa*, while 1-*O*-feruloylquinic acid and 4-*O*-feruloylquinic acid were significantly enriched in raw *H. tuberosus*. The significantly differential metabolites between the steamed *R. glutinosa* vs. steamed *H. tuberosus* group were mainly phenolic acids, with components such as 4-*O*-*p*-coumaroylquinic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid being significantly higher in steamed *H. tuberosus* than in steamed *R. glutinosa*. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis of differential metabolites revealed that the metabolites were primarily annotated and enriched in pathways such as amino acid biosynthesis, plant secondary metabolite biosynthesis, and terpenoid biosynthesis. **Conclusion** This study elucidates the metabolic characteristics of *R. glutinosa* and *H. tuberosus* before and after the steaming process, offering insights from a metabolic profiling perspective for distinguishing between steamed *R. glutinosa* and steamed *H. tuberosus*.

【Keywords】 *Rehmannia glutinosa*; *Helianthus tuberosus*; Steaming; Widely targeted metabolomics; Metabolites

地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 为玄参科地黄属植物, 块根入药, 作为“四大怀药”之一, 《神农本草经》将其列为上品^[1]。相关研究表明, 地黄的主要成分为糖类、萜类、酚酸类、生物碱类等^[2], 具有清热解毒、滋阴补肾、抗疲劳、降血糖等功效^[3]。地黄根据加工方法不同, 分为鲜地黄、生地黄和熟地黄3种规格。熟地黄作为药食同源目录中具有代表性的大宗品种, 市场需求旺盛。然而, 当前流通环节中以次充好、混淆品替代等质量参差不齐之乱象频发, 严重扰乱了市场秩序。

菊芋 (*Helianthus tuberosus* L.) 又名洋姜、鬼子姜^[4], 为菊科向日葵属多年生草本植物, 块茎中的菊糖、酚酸、黄酮、萜类等成分具有增强免疫力、抗肿瘤、抗氧化、降血糖等多种药理作用^[5-6],

截至目前, 尚未被《中国药典》收载。菊芋块茎中菊糖含量丰富, 占菊芋干重的55%~83%, 是目前自然界中已知菊糖含量最高的植物^[7]。菊糖具有调节血糖、抗氧化、抗癌、调节免疫力的功效, 主要应用于食品行业、工业生产、医药行业等^[7-8]。

生地黄和生菊芋性状特征区别较大, 易于辨识, 而蒸制后的熟地黄和熟菊芋辨识特征不明显, 仅凭肉眼难以辨别。前期市场调研中发现, 在售的熟地黄中有掺杂熟菊芋的现象, 严重扰乱了中药材市场秩序。目前对于地黄和菊芋的研究主要为新品种培育、化学成分、药理作用等方面, 而关于二者代谢产物特征的研究尚未见相关报道^[9]。广泛靶向代谢组学技术具有覆盖率高、准确率高以及灵敏度高等优点, 可以同时量化数百种化合物, 是一种较全面的检测方法^[10-11]。基

于此, 本研究以不同产地地黄和菊芋为研究对象, 利用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术, 对生地黄、生菊芋、熟地黄和熟菊芋中代谢产物特征进行分析, 筛选差异代谢产物进行代谢通路解析, 以期为熟地黄和熟菊芋的鉴别提供数据支撑。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

ExionLC™ AD 超高效液相色谱和 TripleQuad 6500+ 串联三重四极杆质谱仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司)、电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI)、Agilent SB C₁₈ 色谱柱 (安捷伦科技有限公司); Scientz-100F 型冻干机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); MM 400 型研磨仪 (德国 Retsch 公司); 5424R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); MS105DM 型电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究共采集 5 批地黄样品和 5 批菊芋样品 (表 1), 经南阳理工学院张仲鸣教授鉴定为玄参科 (*Scrophulariaceae*) 地黄属 (*Rehmannia*) 植物地黄 (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 和 菊 科 (*Asteraceae*) 向日葵属 (*Helianthus*) 植物菊芋 (*Helianthus tuberosus* L.)。将采集到的鲜菊芋和鲜地黄样品分别洗净, 55 °C 烘干, 得到生地黄和生菊

芋。各取一份样品粉碎后过四号筛, 置于干燥器中保存; 另取一份样品置蒸屉中, 加适量水, 按照《中国药典》2025 年版附录 IV 0213 炮制通则蒸法^[12] 隔水蒸制, 每次蒸 6 h, 取出, 55 °C 干燥 12 h, 共蒸制 6 次, 蒸液与药材拌匀, 取出, 即得熟地黄和熟菊芋, 晾晒至约八成干时, 切成小块, 55 °C 干燥, 粉碎后过四号筛, 置于干燥器中保存^[13-14]。

生地黄与生菊芋外观区别: 生地黄呈不规则团块状或长条形, 表面为灰棕色至棕黑色, 具有明显的皱缩纹理和细小横皮孔; 生菊芋呈类球形或不规则瘤状, 表面为浅黄棕色至淡褐色, 较光滑或有浅皱纹。熟地黄与熟菊芋外观区别: 熟地黄为深黑褐色, 表面油润光亮, 质地软且带黏性; 熟菊芋为深黑褐色, 表面无明显油润感, 不具黏腻感。

由于不同产地的地黄和菊芋差异较大, 为提高检测结果的可靠性和代表性, 分别称取 5 批样品, 各 1.0 g, 充分混匀后作为代谢组学检测样品。按照上述方法分别制备生地黄样品 (标记为 DH-1、DH-2、DH-3)、熟地黄样品 (标记为 SDH-1、SDH-2、SDH-3)、生菊芋样品 (标记为 JY-1、JY-2、JY-3)、熟菊芋样品 (标记为 SJY-1、SJY-2、SJY-3) 各 3 份。

甲醇、乙腈为色谱级 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 其余试剂为分析级 (天津市富宇精细化工有限公司); 水为娃哈哈纯净水。

表 1 菊芋和地黄样品采集信息

Table 1. Sample collection information of *R. glutinosa* and *H. tuberosus*

编号	药材	品种	采样地点	编号	药材	品种	采样地点
S1	地黄	地方品种	河南省灵宝市	S6	菊芋	地方品种	河南省南召县
S2	地黄	北京 3 号	河南省温县	S7	菊芋	地方品种	河南省桐柏县
S3	地黄	金九	河南省孟州市	S8	菊芋	地方品种	甘肃省武威市
S4	地黄	地方品种	河南省南阳市	S9	菊芋	青芋 7 号	青海省西宁市
S5	地黄	地方品种	河北省邯郸市	S10	菊芋	定芋 1 号	甘肃省白银市平川区

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent SB-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B), 洗脱梯度 (0 ~ 10 min, 5%→95% B; 10~11 min, 95% B; 11 ~ 14 min, 95%→5% B; 14~20 min, 5% B); 流速: 0.35 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 2 μL^[15]。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI) 温度为 500 °C, 离子喷雾电压 5 500 V (正离子模式) / -4 500 V (负离子模式)。离子源气体 I, 气体 II 和气帘气的压力分别为 50、60 和 25 psi, 碰撞诱导电离参数设置为高 (每个代谢产物都有各自的碰撞能, 一般指 35 eV 以上)。三重四极杆扫描使用多反应监测模式, 并将碰撞气体 (氮气) 设置为 7~9 mTorr^[15]。

2.3 样品处理

将样品真空冷冻干燥, 研磨至粉末状, 精密称取 50 mg, 加入 1 200 μ L 的 70% 甲醇水内标提取液, 每 30 min 涡旋 1 次, 每次持续 30 s, 共 5 次; 离心 ($13\,524\times g$) 3 min 分离上清液, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤样品, 用于后续分析。

2.4 数据处理

基于武汉迈维代谢自建数据库, 根据二级谱信息对代谢产物进行定性。运用 Analyst 1.6.3 软件处理质谱数据。在分析过程中, 除去同位素信号、重复信号及干扰信号, 以提高定性的准确性。利用 MultiQuant 软件对色谱峰进行积分, 用峰面积表示对应物质的相对含量。根据保留时间和峰型对代谢产物进行校正, 并对数据进行 Z-score 标准化处理。将代谢产物数据进行归一化处理, 利用 R 4.4.1 软件进行主成分分析

(principal component analysis, PCA)、正交最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 及层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)。差异代谢产物筛选标准为差异倍数 (fold change, FC) ≥ 8 或 ≤ 0.12 及 $P < 0.001$, 变量重要性投影 (variable importance in the projection, VIP) 值 > 1 [16]。差异代谢产物采用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 进行代谢通路的注释和富集分析。

2.5 样本质控分析

将 12 个样品的提取物进行混合, 制成质控样品, 对质控样品进行总离子流图叠加分析 (图 1)。结果显示, 代谢产物检测总离子流的曲线重叠性高, 表明质谱对同一样品不同时间检测的信号稳定性较好。

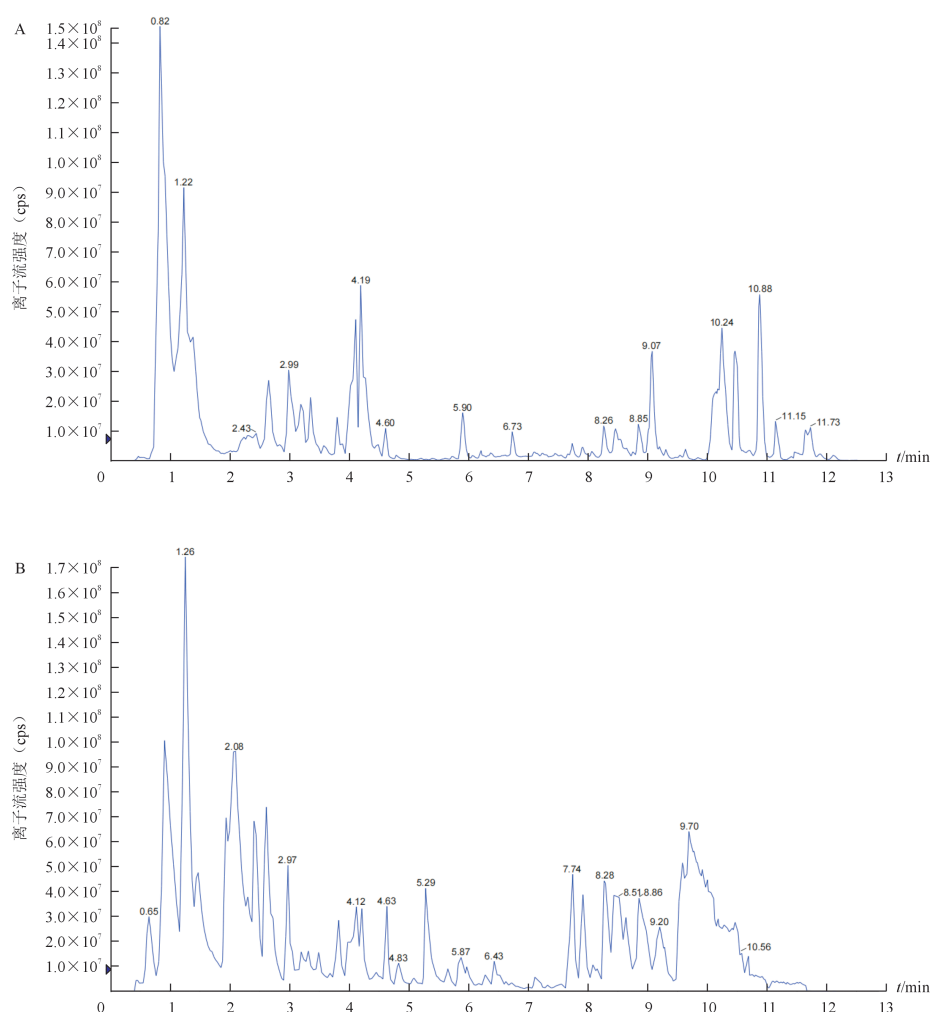


图 1 质控样品总离子流图的负离子 (A) 和正离子 (B) 模式叠加图

Figure 1. Negative ion mode superposition (A) and positive ion (B) mode superposition of the total ion chromatogram of quality control samples

2.6 PCA和HCA热图分析

为对比生菊芋、熟菊芋、生地黄、熟地黄代谢产物的差异,以检测的所有代谢产物为指标进行PCA和HCA。PCA结果(图2)显示,PC1解释了原始数据集的41.06%特征,PC2解释了原始数据集的30.44%特征。其中3个生菊芋样品、3个熟菊芋样品、3个生地黄样品、3个熟地黄样品和3个质控样品分别在组内聚集、组间离散,说明各组样本存在较大差异,样本重复性较好;熟地黄 vs. 生地黄组代谢产物具有明显差异,PC1和PC2的方差解释率分别为69.09%和12.12%;熟菊芋 vs. 生菊芋组代谢产物有明显差异,PC1和

PC2的方差解释率分别为75.17%和10.96%;生地黄 vs. 生菊芋组代谢产物有明显差异,PC1和PC2的方差解释率分别为76.45%和10.35%;熟菊芋 vs. 熟地黄组代谢产物有明显差异,PC1和PC2的方差解释率分别为74.18%和11.51%。对检测到的代谢产物含量数据进行单位方差标准化处理,样品HCA热图(图3)表明:代谢产物主要为萜类、黄酮类、氨基酸及其衍生物、酚酸类、生物碱类、有机酸类、脂类等,其中萜类化合物、氨基酸及其衍生物、脂类、酚酸类、生物碱类、黄酮类化合物在总代谢谱中占比较大,分别为18.23%、12.13%、11.36%、10.79%、10.20%、5.66%(图4)。

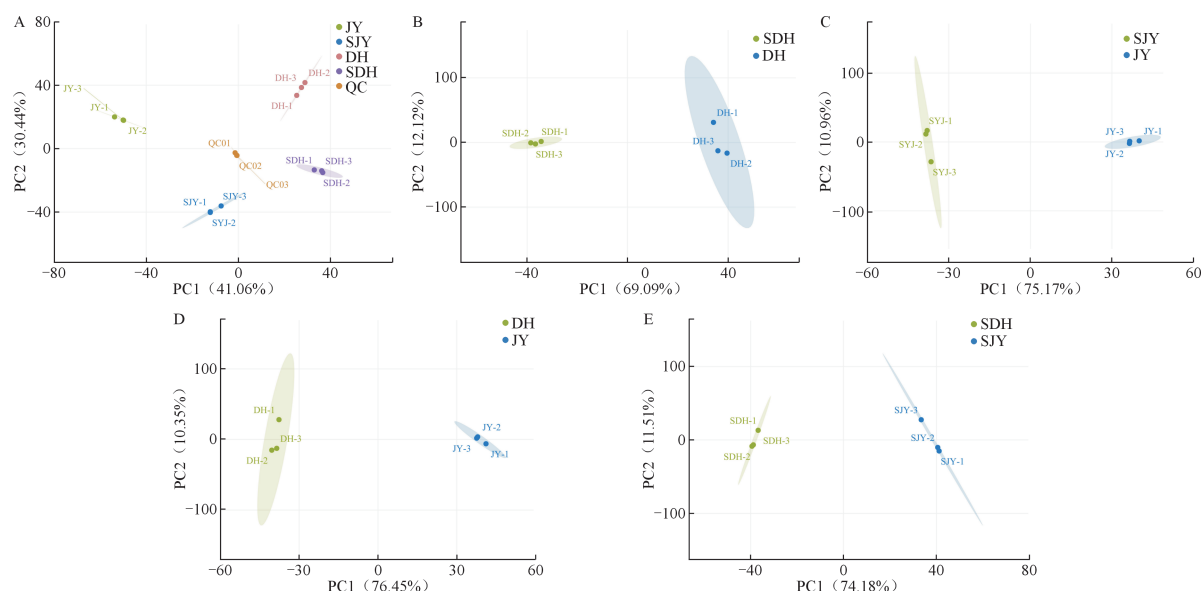


图2 PCA得分

Figure 2. PCA score plot

注: A. 各组样品 vs. 质控样品; B. 熟地黄 vs. 生地黄; C. 熟菊芋 vs. 生菊芋; D. 生地黄 vs. 生菊芋; E. 熟地黄 vs. 熟菊芋; JY. 生菊芋; SJY. 熟菊芋; DH. 生地黄; SDH. 熟地黄; QC. 质控样品。

2.7 生菊芋、生地黄蒸制前后代谢组学分析

为了研究不同代谢产物对判别结果的贡献,进一步筛选差异代谢产物。对生菊芋、熟菊芋、生地黄、熟地黄的代谢组数据进行OPLS-DA。OPLS-DA与PCA分析结果一致,熟地黄 vs. 生地黄组、熟菊芋 vs. 生菊芋组、生地黄 vs. 生菊芋组、熟地黄 vs. 熟菊芋组可明显区分(图5),表明各组的代谢产物存在明显的差异。模型评价参数指标:熟地黄 vs. 生地黄, $R^2X = 0.791$, $R^2Y = 1$, $Q^2 = 0.987$ ($P < 0.005$);熟菊芋 vs. 生菊芋, $R^2X = 0.87$, $R^2Y = 1$, $Q^2 = 0.995$ ($P < 0.005$);生地黄 vs. 生菊芋, $R^2X = 0.876$, $R^2Y = 1$, $Q^2 = 0.994$ ($P <$

0.005);熟地黄 vs. 熟菊芋, $R^2X = 0.864$, $R^2Y = 1$, $Q^2 = 0.994$ ($P < 0.005$),结果提示OPLS-DA模型构建出色且可靠(图6),可根据VIP值进行差异代谢产物筛选。

2.8 生菊芋、生地黄蒸制前后关键代谢产物分析

生地黄和生菊芋蒸制前后关键代谢产物分析结果表明:熟地黄和熟菊芋中的甘露三糖、棉子糖、毛蕊花糖等糖类成分含量显著高于生地黄和生菊芋;生地黄炮制为熟地黄后,梓醇、松果菊苷、地黄苷C、地黄苷D、毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷A1/B1、6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇等苷类成分含量显著降低,酚酸类成分香草酸和丁香

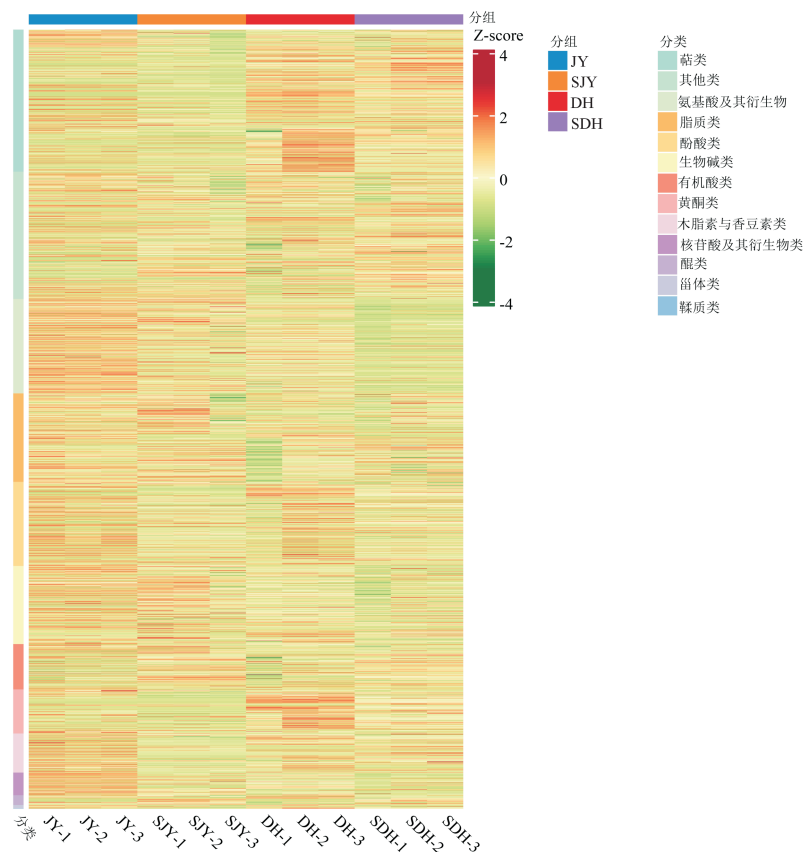


图3 HCA热图

Figure 3. Heatmap of HCA

注：JY.生菊芋；SJY.熟菊芋；DH.生地黄；SDH.熟地黄。

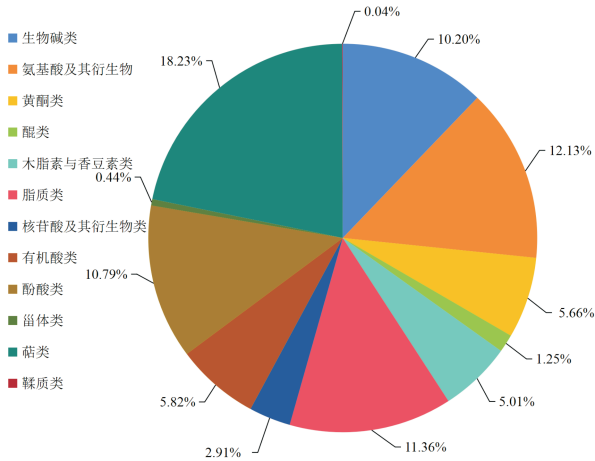


图4 各类化合物在总代谢谱中的占比

Figure 4. Proportion of various compounds in the total metabolic profile

酸含量显著增加；生菊芋炮制为熟菊芋后，柠檬酸含量显著增加；美拉德反应的关键产物2-呋喃甲酸含量在生地黄酒和生菊芋高温蒸制后显著增加（表2）。

2.9 显著差异代谢产物分析

为了鉴定生地黄酒与生菊芋、熟菊芋与生菊

芋、熟地黄与生地黄酒、熟菊芋与熟地黄的差异代谢产物，基于OPLS-DA结果，结合 $FC \geq 8$ 或 $FC \leq 0.12$ 及 $P < 0.001$ ， $VIP > 1$ ，进一步筛选差异代谢产物。如图7所示，熟地黄vs.生地黄酒组差异代谢产物121个（上调35个、下调86个）；熟菊芋vs.生菊芋组差异代谢产物117个（上调32个、下调85个）；生地黄酒vs.生菊芋组差异代谢产物144个（上调63个、下调81个）；熟地黄vs.熟菊芋组差异代谢产物有114个（上调57个、下调57个）。

各组差异倍数前20位的差异代谢产物见图8。熟地黄vs.生地黄酒组：*L*-色氨酸、 γ -谷氨酰-亮氨酸、*L*-赖氨酸等在地黄酒中显著富集，熟地黄中环烯醚萜苷类成分乙酰梓醇含量显著降低；熟菊芋vs.生菊芋组：3,4,5,5-四甲基环戊-1,3-二烯-1-羧酸和4,5,8-三羟基- α -四氢萘酮-5-*O*-[6'-*O*-(4"-乙酰苯甲酰基)]葡萄糖苷等在熟菊芋中显著富集，鸟氨酸、*L*-色氨酸、*L*-赖氨酸等氨基酸及其衍生物在生菊芋中显著富集；生地黄酒vs.生菊芋组：乙酰梓醇、 α -氢化胡桃叶醌葡萄糖苷、布

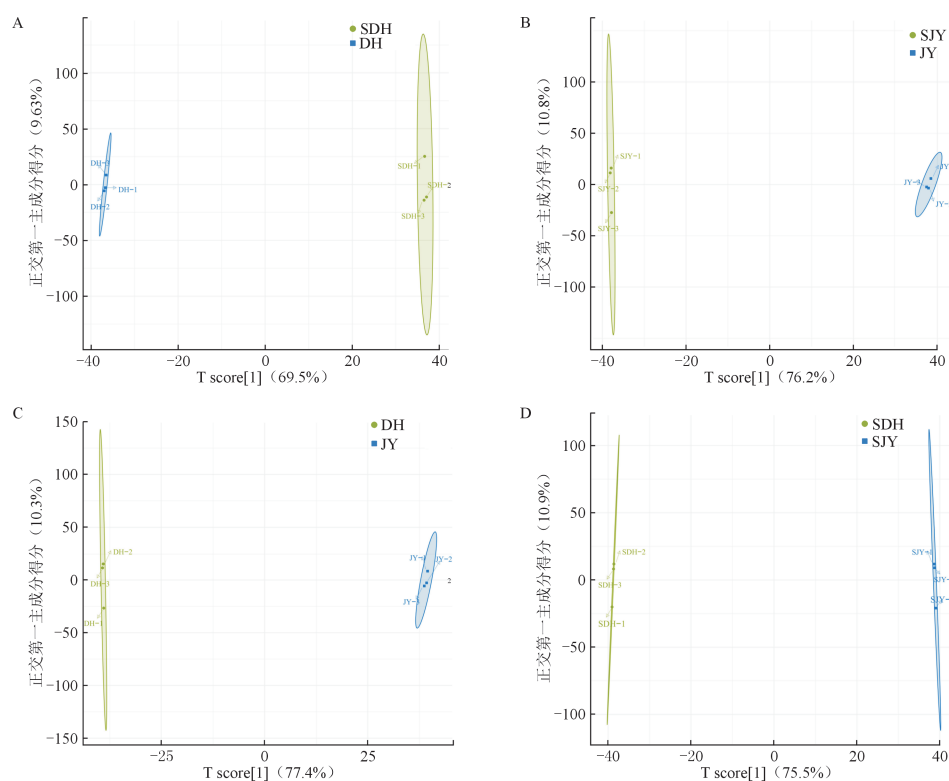


图5 代谢产物OPLS-DA得分图

Figure 5. OPLS-DA score plot of metabolites

注：A. 熟地黄 vs. 生地黄；B. 熟菊芋 vs. 生菊芋；C. 生地黄 vs. 生菊芋；D. 熟地黄 vs. 熟菊芋；JY. 生菊芋；SJY. 熟菊芋；DH. 生地黄；SDH. 熟地黄。

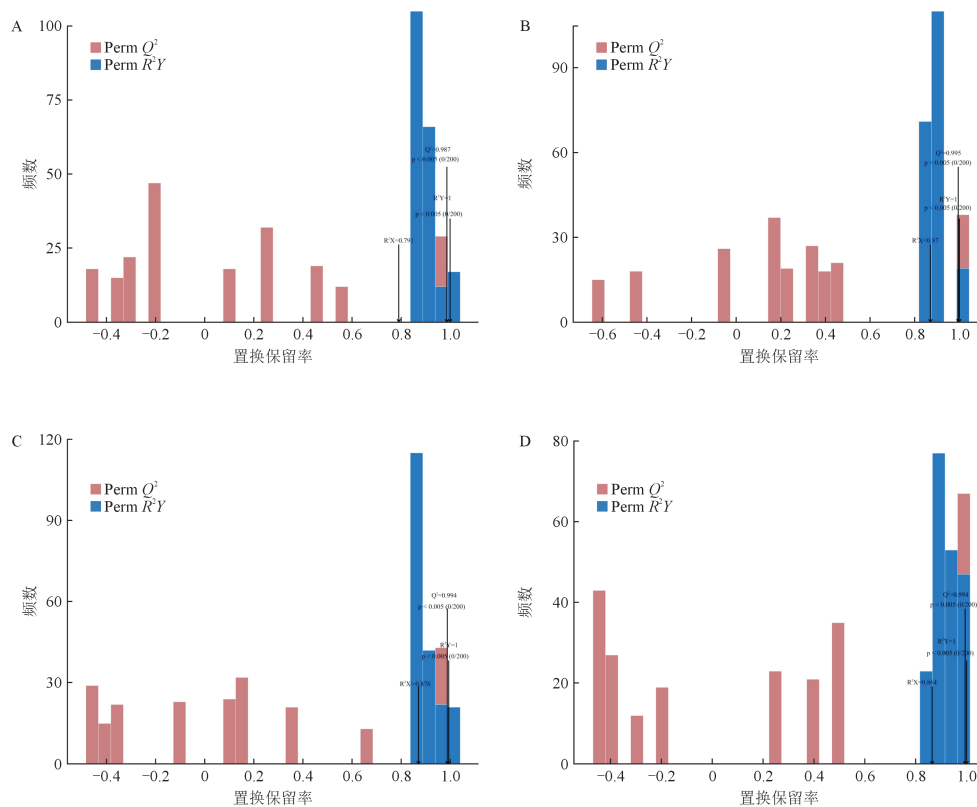


图6 代谢产物OPLS-DA模型验证

Figure 6. Validation of the OPLS-DA model for metabolites

注：A. 熟地黄 vs. 生地黄；B. 熟菊芋 vs. 生菊芋；C. 生地黄 vs. 生菊芋；D. 熟地黄 vs. 熟菊芋。

表2 生地黄、生菊芋蒸制前后关键代谢产物的两两比较

Table 2. Pair-wise comparison of key metabolites in raw *R. glutinosa* and raw *H. tuberosus* pre-and post-steaming

物质	熟地黄 vs. 生地黄			熟菊芋 vs. 生菊芋			生地黄 vs. 生菊芋			熟地黄 vs. 熟菊芋		
	Log ₂ FC	P	VIP	Log ₂ FC	P	VIP	Log ₂ FC	P	VIP	Log ₂ FC	P	VIP
棉子糖	3.67	0.000 0	1.18	1.35	0.000 9	1.11	1.16	0.109 7	0.97	3.48	0.000 2	1.15
甘露三糖	3.81	0.000 4	1.19	4.61	0.000 3	1.14	5.63	0.014 6	1.13	4.83	0.000 9	1.15
D-半乳糖	1.98	0.000 0	1.20	1.91	0.001 9	1.14	-0.25	0.016 8	1.09	-0.18	0.085 6	0.99
D-果糖	2.14	0.000 0	1.19	1.89	0.007 6	1.14	-0.34	0.074 2	0.89	-0.09	0.474 3	0.42
毛蕊花糖	2.59	0.001 0	1.20	0.04	0.542 4	0.36	0.19	0.104 2	0.88	2.74	0.001 2	1.15
香草酸	1.35	0.000 8	1.15	0.23	0.119 2	0.87	1.80	0.025 0	1.11	2.91	0.001 5	1.15
丁香酸	2.25	0.006 6	1.18	-0.59	0.112 1	0.94	-0.94	0.046 2	1.00	1.90	0.010 7	1.14
柠檬酸	0.56	0.032 8	1.06	1.70	0.004 6	1.09	2.02	0.006 6	1.09	0.88	0.000 1	1.15
焦地黄苯乙醇苷B ₁	-0.98	0.010 7	1.14	1.22	0.422 6	0.51	7.09	0.006 0	1.14	4.88	0.005 0	1.10
梓醇	-6.01	0.022 7	1.19	1.11	0.326 1	0.21	8.79	0.022 1	1.14	2.78	0.029 8	1.14
地黄苷D	-1.62	0.000 7	1.19	2.51	0.006 5	1.14	8.58	0.001 6	1.14	4.45	0.003 9	1.15
地黄苷	-1.45	0.031 8	1.16	7.01	0.008 6	1.12	12.54	0.014 3	1.13	4.08	0.002 8	1.15
焦地黄苯乙醇苷A ₁	-1.48	0.013 4	1.16	2.67	0.027 8	1.13	9.03	0.008 6	1.14	4.88	0.007 6	1.15
焦地黄苯乙醇苷C	-0.94	0.127 5	0.97	2.55	0.008 0	1.14	8.09	0.034 6	1.13	4.60	0.001 0	1.15
焦地黄苯乙醇苷D	-1.82	0.063 5	1.13	0.47	0.440 8	0.50	6.55	0.035 0	1.10	4.26	0.001 1	1.15
毛蕊花糖苷	-1.17	0.002 9	1.13	4.80	0.013 0	1.14	10.49	0.004 0	1.14	4.51	0.015 2	1.14
地黄紫罗兰苷A	-0.72	0.039 8	1.10	2.18	0.000 7	1.12	6.86	0.008 5	1.13	3.96	0.002 8	1.15
洋地黄叶苷B	-1.92	0.047 1	1.15	4.03	0.162 5	1.06	9.66	0.028 1	1.14	3.70	0.006 7	1.08
松果菊苷	-1.95	0.042 8	1.16	3.73	0.098 5	1.08	9.67	0.025 1	1.14	3.99	0.002 9	1.11
地黄苷C	-6.56	0.001 6	1.20	3.51	0.085 8	1.10	11.31	0.001 6	1.14	1.24	0.039 4	0.89
6-O-E-阿魏酰筋骨草醇	-4.64	0.021 5	1.19	2.53	0.006 9	1.14	11.26	0.019 9	1.14	4.09	0.011 7	1.15
2-呋喃甲酸	4.52	0.000 0	1.19	4.67	0.000 3	1.04	-0.12	0.877 1	0.22	-0.27	0.044 5	1.06

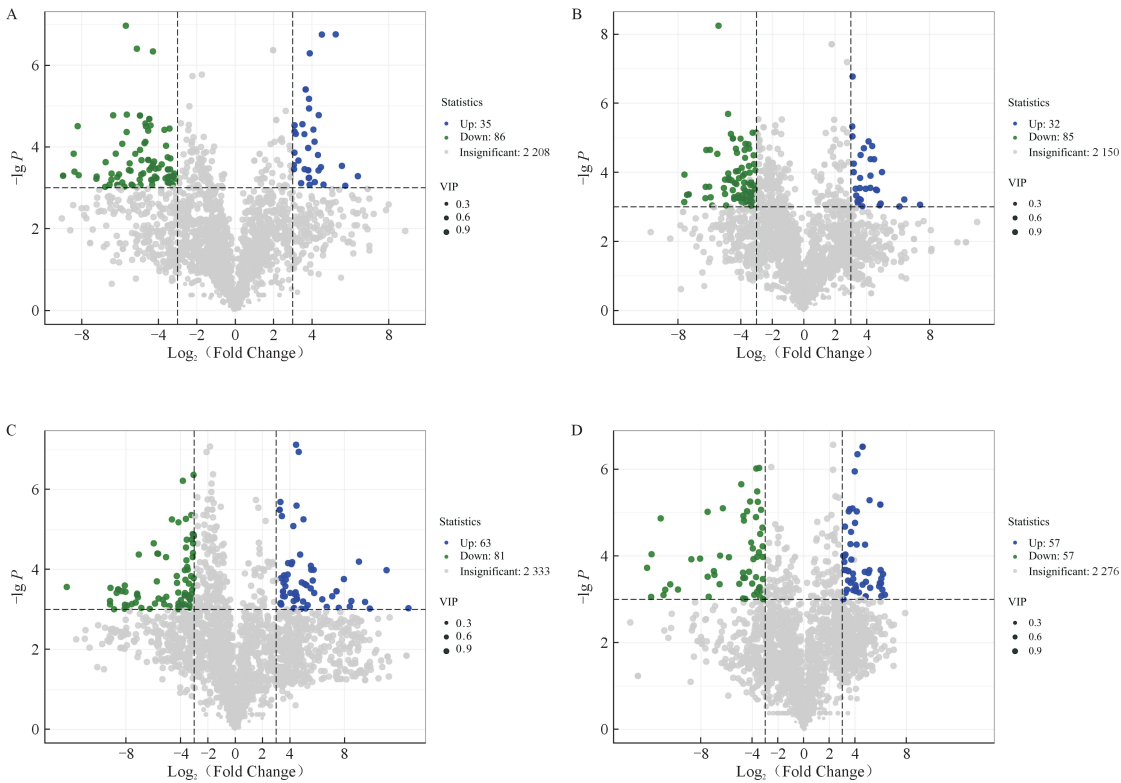


图7 显著差异代谢产物火山图

Figure 7. Volcano plot of significantly different metabolites

注：A. 熟地黄 vs. 生地黄；B. 熟菊芋 vs. 生菊芋；C. 生地黄 vs. 生菊芋；D. 熟地黄 vs. 熟菊芋；蓝色点代表显著上调的差异代谢产物；绿色点代表显著下调的差异代谢产物；灰色点代表无显著差异的代谢产物。

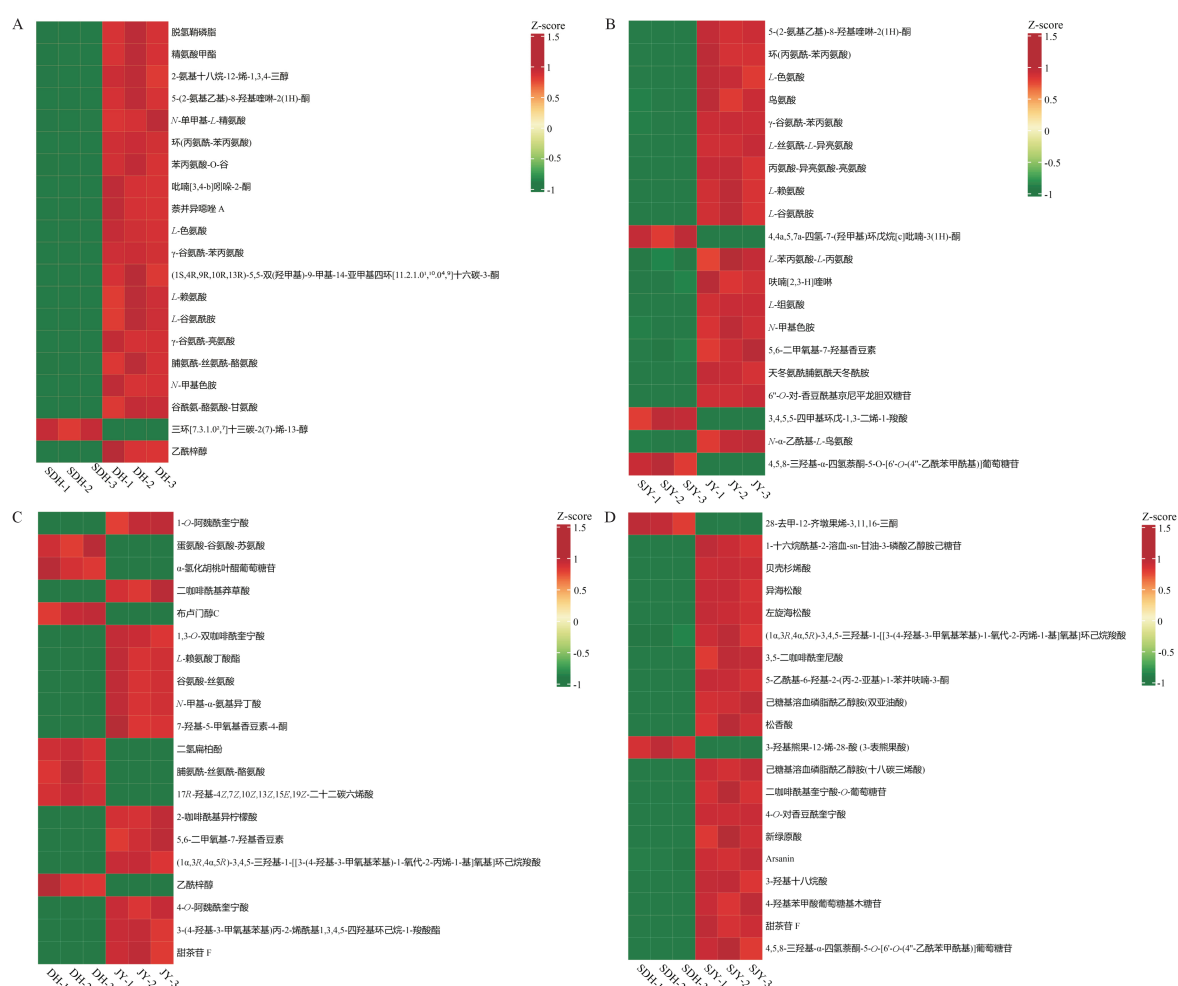


图8 差异倍数前20位的差异代谢产物热图

Figure 8. Heatmap of the top 20 differential metabolites ranked by fold change

注: A. 熟地黄 vs. 生地黄; B. 熟菊芋 vs. 生菊芋; C. 生地黄 vs. 生菊芋; D. 熟地黄 vs. 熟菊芋; JY. 生菊芋; SJY. 熟菊芋; DH. 生地黄; SDH. 熟地黄。

卢门醇C等在生地黄中显著上调表达, 生地黄中含有较高的乙酰梓醇, 1-O-阿魏酰奎宁酸、4-O-阿魏酰奎宁酸等在生菊芋中显著上调表达; 熟地黄 vs. 熟菊芋组: 3-羟基熊果-12-烯-28-酸(3-表熊果酸)和28-去甲-12-齐墩果烯-3, 11, 16-三酮在熟地黄中显著富集; 4-O-对香豆酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、新绿原酸等酚酸类成分在熟菊芋中显著富集。

2.10 差异代谢产物的代谢通路分析

利用KEGG对熟地黄与生地黄、熟菊芋与生菊芋、生地黄与生菊芋、熟地黄与熟菊芋的差异代谢产物 ($FC \geq 8$ 或 $FC \leq 0.12$ 及 $P < 0.001$, $VIP > 1$) 进行通路分析, 气泡图显示了前20条最小P值通路(图9)。熟地黄 vs. 生地黄组, 差异代谢产物显著富集于代谢途径、氨基酸生物合成和ATP结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporter, ABC转运蛋白)等通路; 熟菊芋 vs.

生菊芋组, 差异代谢产物显著富集于代谢途径、次生代谢产物合成和氨基酸生物合成等通路; 生地黄 vs. 生菊芋组中, 差异代谢产物显著富集于ABC转运蛋白、D-氨基酸代谢、氨基酸生物合成和植物次生代谢产物生物合成等通路; 熟地黄 vs. 熟菊芋组, 差异代谢产物显著富集于植物次生代谢产物生物合成、ABC转运蛋白和氨基酸生物合成等通路; 本研究中, 熟地黄 vs. 生地黄组和熟菊芋 vs. 生菊芋组的差异代谢产物在氨基酸生物合成途径富集较多。

2.11 KEGG代谢通路整体变化分析

差异丰度得分(differential abundance score)可以反映某一代谢通路中所有代谢产物的整体变化趋势, 得分为1表示该通路中所鉴定到的代谢产物表达呈上调趋势, 得分为-1表示呈下调趋势^[2]。选择P值排名前20条的通路进行分析, 绘制差异丰度得分图(图10)。熟地黄 vs. 生地黄组

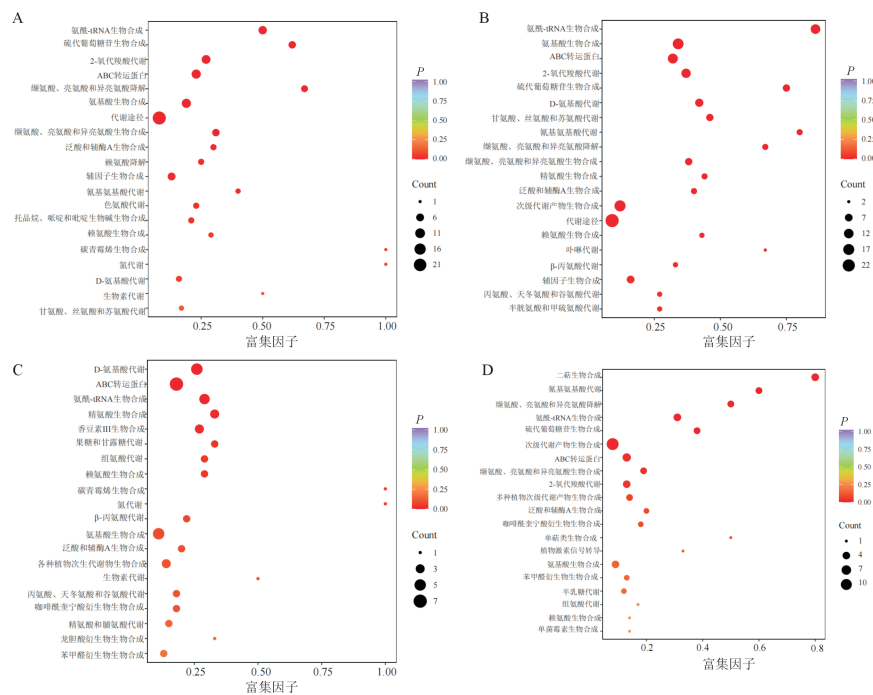


图9 差异代谢产物的KEGG富集气泡图

Figure 9. KEGG enrichment bubble plot of differential metabolites

注：A. 熟地黄 vs. 生地黄；B. 熟菊芋 vs. 生菊芋；C. 生地黄 vs. 生菊芋；D. 熟地黄 vs. 熟菊芋。

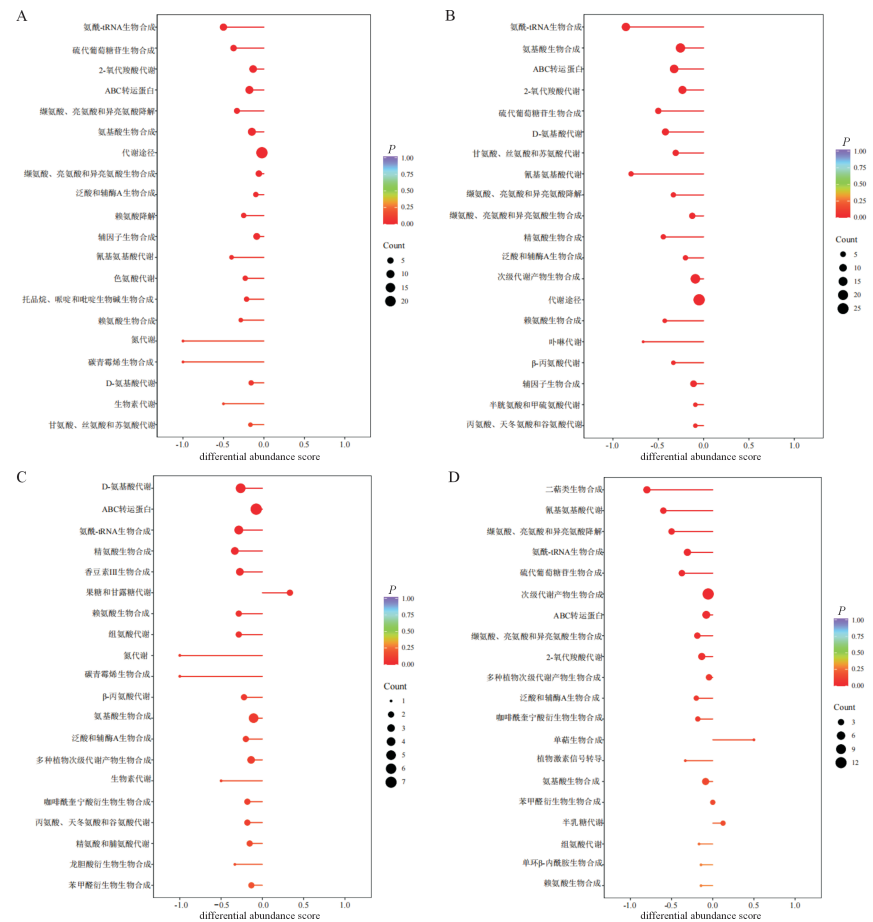


图10 差异丰度得分图

Figure 10. Differential abundance score plot

注：A. 熟地黄 vs. 生地黄；B. 熟菊芋 vs. 生菊芋；C. 生地黄 vs. 生菊芋；D. 熟地黄 vs. 熟菊芋。

和熟菊芋 vs. 生菊芋组：前 20 条显著富集通路中差异代谢产物均倾向下调表达；生地黄 vs. 生菊芋组：前 20 条显著富集通路中 19 条代谢通路中差异代谢产物倾向下调表达；熟地黄 vs. 熟菊芋组：前 20 条显著富集通路中大部分代谢通路中差异代谢产物倾向下调表达；其中单萜类化合物的生物合成代谢通路倾向于上调表达。

3 讨论

本研究揭示了苷类成分的“热解”规律：梓醇、松果菊苷、毛蕊花糖苷等苷类成分在生地黄中显著富集，经过高温蒸制成为熟地黄，苷类成分含量显著降低，因为苷类成分易水解成相应的苷元，本结果与周国洪等^[17-18]的研究一致，该发现为传统炮制“减寒存温”提供了物质基础解释。本研究中生地黄和生菊芋经高温蒸制后甘露三糖成分含量显著增加，因为在高温蒸制过程中部分多糖发生水解生成寡糖，寡糖易分解产生甘露三糖^[13]；蒸制处理同样能够显著促进滇黄精^[19]中糖类成分的含量升高，这与本研究中所观察到的现象一致；蒸制处理对糖类成分的累积效应，可作为表征“蒸制”这一共性炮制工艺的潜在化学标志物。

研究表明，鸟氨酸、L-色氨酸、L-赖氨酸等氨基酸类成分高温蒸制后的熟菊芋和熟地黄含量显著降低，另外，美拉德反应的中间产物 2-呋喃甲酸含量在熟菊芋和熟地黄含量显著增加，此现象与糖类和苷类成分水解时会产生的还原糖，还原糖和氨基酸类成分进一步发生美拉德反应有关^[20-21]，为熟地黄加工过程中非酶褐变反应提供了直接的代谢产物证据。菊芋含有丰富的酚酸类成分^[22]，高温蒸制后的熟菊芋中的 4-O-对香豆酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、新绿原酸、柠檬酸等酚酸类成分显著富集；相关研究证实，高温会导致酚类成分某些内源酶失活，阻止了酚类物质进一步被氧化，因此多酚的含量在蒸制处理后增加^[23-24]。

本研究中熟地黄与生地黄、熟菊芋与生菊芋比较，差异代谢产物在氨基酸的生物合成途径中富集较多，可能与生地黄和生菊芋在高温蒸制过程中氨基酸成分参与美拉德反应，导致部分氨基酸成分含量发生变化有关；蒸制过程中菊芋多酚类成分的显著上调，伴随咖啡酰奎宁酸衍生物生

物合成通路的协同富集，提示该代谢响应可能构成“黑菊芋”发挥肠道菌群调节作用的化学物质基础。

综上所述，本研究采用 UPLC-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术系统描述了地黄和菊芋蒸制前后的代谢谱。通过差异代谢产物筛选了地黄和菊芋的专属特征物：环烯醚萜苷类成分的乙酰梓醇在生地黄中显著富集；酚酸类成分和甜茶苷类成分在生菊芋中显著富集；环烯醚萜苷类成分的乙酰梓醇和多个氨基酸类成分在熟地黄中显著降低；多个酚酸类成分在熟菊芋中显著富集。通过 KEGG 富集分析，首次将氨基酸的生物合成途径与地黄、菊芋的蒸制过程深度关联，阐明氨基酸作为美拉德反应底物的消耗机制，同时指出植物次生代谢产物及二萜类生物合成途径为区分两类药材的关键代谢网络。该研究从代谢组学的角度为生地黄与生菊芋和熟地黄与熟菊芋的鉴别提供理论依据。

参考文献

- 1 曾梦楠, 张宇涵, 郭彭莉, 等. 怀 1 号地黄中 2-phenylethyl-beta-glucopyranoside 通过调节 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 通路对低氧性肺动脉高压的影响[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(14): 3857-3867. [Zeng MN, Zhang YH, Gu PL, et al. Effect of 2-phenylethyl-beta-glucopyranoside isolated from Huaizhong No.1 *Rehmannia glutinosa* on hypoxic pulmonary hypertension by regulating PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2024, 49(14): 3857-3867.] DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20240412.701.
- 2 陈亚曼, 刘蕊, 王庆婷, 等. 基于 LC-MS 结合多元统计分析的栽培地黄与野生地黄中代谢产物特征分析[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(20): 5706-5716. [Chen YM, Liu R, Wang QT, et al. Metabolite characteristics analysis of cultivated and wild *Rehmannia glutinosa* based on LC-MS combined with multivariate statistical analysis[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2025, 50(20): 5706-5716.] DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250604.101.
- 3 徐璐, 狄瑞毅, 薛淑娟, 等. 基于“药效-化学成分群”及“质控系数”的地黄质量评价标准研究[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(20): 5717-5732. [Xu L, Di RY, Xue SJ, et al. Quality evaluation standards of *Rehmanniae Radix* based on the pharmacological activity-chemical component group and quality control coefficient[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2025, 50(20): 5717-5732.] DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250616.101.
- 4 赵孟良, 任延靖, 刘颖. PEG-6000 模拟干旱胁迫下菊芋 HD-Zip 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2025, 53(15): 37-44. [Zhao ML, Ren YJ, Liu Y. Identification and expression analysis of the HD-Zip gene family in *Helianthus tuberosus* under drought stress simulated by PEG-6000[J]. Jiangsu Agricultural Sciences,

- 2025, 53(15): 37–44.] DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2025.15.006](#).
- 5 田敏, 宗爱珍, 刘丽娜. 菊芋菊糖的特性及应用研究进展[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(7): 14–16. [Tian M, Zong AZ, Liu LN. Research progress on characteristics and application of inulin from *Jerusalem artichoke*[J]. *Cereals & Oils*, 2022, 35(7): 14–16.] DOI: [10.13194/j.issn.1008-9578.2022.07.004](#).
- 6 王莹, 李娟, 孙雪梅. 菊芋 *HtMYB2* 基因 VIGS 体系构建与功能验证[J]. 中国农学通报, 2024, 40(24): 116–121. [Wang Y, Li J, Sun XM. *HtMYB2* gene of *Helianthus tuberosus* L.: VIGS system construction and functional validation[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2024, 40(24): 116–121.] DOI: [casb2023-0749](#).
- 7 Qamar TR, Syed F, Nasir M, et al. Novel combination of prebiotics galacto-oligosaccharides and inulin-inhibited aberrant crypt foci formation and biomarkers of colon cancer in wistar rats[J]. *Nutrients*, 2016, 8(8): 465. DOI: [10.3390/nu8080465](#).
- 8 汪悦, 薛夫光, 蒋林树, 等. 菊芋饲料的营养价值、生物活性及其对动物生理功能的调控作用[J]. 动物营养学报, 2020, 32(2): 497–507. [Wang Y, Xue FG, Jiang LS, et al. Nutritional value and biological activity of *Jerusalem artichoke* feed and its regulation effects on animal physiological function[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(2): 497–507.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-267x.2020.02.003](#).
- 9 张紫怡, 张来宾, 吕洁丽. 地黄的主要化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报, 2024, 41(10): 979–986. [Zhang ZY, Zhang LB, Lu JL. Research progress on the main chemical constituents and pharmacological actions of *Rehmannia glutinosa*[J]. *Journal of Xinxiang Medical University*, 2024, 41(10): 979–986.] DOI: [10.7683/xyxyxb.2024.10.015](#).
- 10 Sawada Y, Akiyama K, Sakata A, et al. Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants[J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(1): 37–47. DOI: [10.1093/pcp/pcn183](#).
- 11 Wu CS, Gao QH, Kjelgren RK, et al. Yields, phenolic profiles and antioxidant activities of *Ziziphus jujube* Mill. in response to different fertilization treatments[J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 12029–12040. DOI: [10.3390/molecules181012029](#).
- 12 中国药典 2025 年版. 四部[S]. 2025: 32.
- 13 张晓亚, 徐金娣, 许军, 等. 整合糖组与代谢组学方法比较蒸制和酒炖熟地黄化学成分[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1591–1600. [Zhang XY, Xu JD, Xu J, et al. Integrating glycomics and metabolomics to compare chemical profiles of steaming and wine-stewing processed *Rehmanniae Radix Praeparata*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52(6): 1591–1600.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.006](#).
- 14 Zhou L, Xu JD, Zhou SS, et al. Integrating targeted glycomics and untargeted metabolomics to investigate the processing chemistry of herbal medicines, a case study on *Rehmanniae Radix*[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1472: 74–87. DOI: [10.1016/j.chroma.2016.10.043](#).
- 15 杨思雨, 池玉洁, 张海琼, 等. 基于广泛靶向代谢组学分析不同基原黄连根茎次生代谢产物差异[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(20): 5441–5450. [Yang SY, Chi YJ, Zhang HQ, et al. Widely targeted metabolomics reveals differences of secondary metabolites in rhizomes of different *Coptis* species[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2024, 49(20): 5441–5450.] DOI: [10.19540/j.cnki.cjcmm.20240714.102](#).
- 16 Zheng PF, Zhang M, Fang X, et al. Analysis of the fruit quality of pear (*Pyrus* spp.) using widely targeted metabolomics[J]. *Foods*, 2022, 11(10): 1440. DOI: [10.3390/foods11101440](#).
- 17 冯卫生. 地黄化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2025, 40(329): 2035–2055. [Feng WS. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of Dihuang (*Rehmannia glutinosa* Libosch.)[J]. *Acta Chinese Medicine*, 2025, 40(329): 2035–2055.] DOI: [10.16368/j.issn.1674-8999.2025.10.322](#).
- 18 周国洪, 赵珍东, 汪小根, 等. 基于植物代谢组学的地黄蒸制前后化学成分变化研究[J]. 海峡药学, 2020, 32(7): 34–37. [Zhou GH, Zhao ZD, Wang XG, et al. Metabolomics study of changes of *Rehmannia glutinosa* before and after steaming[J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2020, 32(7): 34–37.] DOI: [10.13194/j.issn.1673-842X.2020.07.012](#).
- 19 管彦辉, 梁正维, 施扬, 等. 滇黄精炮制前后化学成分变化研究[J]. 中草药, 2024, 55(6): 3647–3658. [Guan YH, Liang ZW, Shi Y, et al. Differences in chemical constituents of *Polygonatum kingianum* before and after processing[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2024, 55(6): 3647–3658.] DOI: [10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.008](#).
- 20 Zhou L, Xu JD, Zhou SS, et al. Chemomics-based marker compounds mining and mimetic processing for exploring chemical mechanisms in traditional processing of herbal medicines, a continuous study on *Rehmanniae Radix*[J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1530: 232–240. DOI: [10.1016/j.chroma.2017.11.036](#).
- 21 孟祥龙, 王勃, 胡聪, 等. 基于 HPLC-MS 及网络药理学探讨熟地黄炮制过程与美拉德反应的相关性[J]. 中药材, 2020, 43(1): 61–70. [Meng XL, Wang B, Hu C, et al. Study on the correlation between the processing of *Rehmanniae Radix* Praeporata and the Maillard reaction based on HPLC-MS and network pharmacology[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2020, 43(1): 61–70.] DOI: [10.13863/j.issn1001-4454.2020.01.013](#).
- 22 杨庆丽, 张旭, 魏连会, 等. 黑菊芋加工过程中成分变化研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(2): 70–74. [Yang QL, Zhang X, Wei LH, et al. Changes of main components in the production process of black *Jerusalem artichoke*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(2): 70–74.] DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2018.02.014](#).
- 23 张志毅. 菊芋中咖啡酰奎宁酸的分离与抗氧化作用研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2024.
- 24 Wojdylo A, Figiel A, Oszmiański J. Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(4): 1337–1343. DOI: [10.1021/jf802507j](#).

收稿日期: 2026 年 04 月 30 日 修回日期: 2026 年 08 月 08 日
本文编辑: 周璐敏 洗静怡