

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

Metabolomika vo výskume fytoterapeutík

Metabolomics in research of phytotherapeutics

Katarína Kráľová • Josef Jampílek • Ivan Ostrovský

Došlo 13. listopadu 2011 / Přijato 5. ledna 2012

Súhrn

Farmaceutický a potravinársky výskum sa vo zvýšenej miere zameriava na veľký potenciál rastlinných sekundárnych metabolitov alebo prírodných látok, ktoré možno využiť ako terapeutiká alebo vzorové zlúčeniny pre vývoj nových liečiv. Práca sa venuje využitiu metabolomiky, metabolického profilovania a metabolického „fingerprintu“ pri identifikácii jednotlivých aktívnych fytolátok v rastlinných extraktoch, pri profilovaní unikátnych skupín rastlinných sekundárnych metabolitov, ktoré možno využiť na zlepšenie klasifikácie viacerých druhov liečivých rastlín, ako aj na lepšie charakterizovanie a kontrolu kvality liečivých extraktov, tinktúr a fytofarmaceutických prípravkov pripravených z týchto rastlín. Na identifikáciu metabolitov sa používajú hlavne kombinované analytické metódy a multivariačná štatistická analýza. Liečivé rastliny sa v tomto prípade hodnotia nielen na základe obmedzeného počtu metabolitov, ktoré sú farmakologicky významné zlúčeniny, ale aj na základe fingerprintov menej významných metabolitov a bioaktívnych molekúl.

Kľúčové slová: metabolomika • metabolické profilovanie • metabolický „fingerprint“ • liečivé rastliny

Summary

Pharmaceutical and food industries are increasingly focused on the great potential of plant secondary metabolites or natural substances which can be used as therapeutics or model compounds for development of new drugs. The paper is devoted to the use of metabolomics, metabolic profiling and metabolic “fingerprint” for the identification of individual active phyto-substances in plant extracts, in profiling of unique groups of plant secondary metabolites that can be used to improve the classification of several species of medicinal plants as well as for a better characterization and quality control of

medicinal extracts, tinctures and phytotherapeutic products prepared from these plants. Combined analytical methods and multivariate statistical analysis are used for metabolite identification. Using this approach, medicinal plants are evaluated not only on the basis of a limited number of pharmacologically important metabolites but also based on the fingerprints of minor metabolites and bioactive molecules.

Keywords: metabolomics • metabolic profiling • metabolic „fingerprint“ • medicinal plants

Úvod do metabolomiky

Metabolomikou nazývame vedecké skúmanie chemických procesov zahrňujúcich metabolity, ktoré obsahuje postupy využívané pri analýze metabolómu alebo časti metabolómu, ako je vzorkovanie, príprava vzorky, chemická analýza a analýza údajov. Metabolóm predstavuje úplnú sadu všetkých metabolitov, ktoré sa používajú alebo vytvárajú v bunke v spojení s ich metabolizmom. Je potrebné rozlíšiť endometabolóm, ktorý predstavuje úplnú sadu intracelulárnych metabolitov, od exometabolómu, čiže sady metabolitov vylučovaných do rastového média alebo extracelulárnych tekutín. Analýzu skupiny špecifických metabolitov (napr. skupiny metabolitov, ako sú sacharidy alebo aminokyseliny), ktorá nemusí byť kvantitatívna, ale často je prinajmenšom semikvantitatívna, nazývame metabolickým profilovaním. Metabolickým fingerprintingom nazývame zasa NMR spektrá alebo MS analýzy, ktoré poskytujú fingerprint metabolitov, ktoré produkuje bunka, zatiaľ čo kvantitatívnu analýzu špecifických metabolitov nazývame cieľovou analýzou metabolitu¹⁾.

Analýza metabolómu pokrýva identifikáciu a kvantifikáciu všetkých intracelulárnych a extracelulárnych metabolitov s molekulovou hmotnosťou menšou než 1000 Da použitím rôznych analytických techník. Takéto obmedzenie molekulovej hmotnosti však nie je obvykle veľmi presné, pretože mnoho sekundárnych metabolitov s molekulovou hmotnosťou väčšou ako 1000 Da považujeme tiež za metabolity. Metabolické profilovanie poskytuje priamu fyziologickú informáciu a získané údaje je možné začleniť do metabolických modelov. Metabolický fingerprinting poskytuje odtlačok prstov, ktorý sa dá použiť na zoskupenie rôznych vzoriek, napr. použitím

K. Kráľová • Ivan Ostrovský
Chemický ústav, Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave

doc. PharmDr. Josef Jampílek, PhD. (✉)
Ústav chemických léčiv FaF VFU
Palackého 1–3, 612 42 Brno
e-mail: jampilekj@vfu.cz

klastrovej analýzy. Aj keď konvolučná povaha bunkového metabolizmu, kde sa ten istý metabolit môže zúčastňovať viacerých rôznych dráh, komplikuje interpretáciu metabolických dát, záujem o metabolomiku a/alebo metabolické profilovanie v biológii rastlín neustále rastie. Jej čoraz širšie využívanie umožňuje vývoj a aplikácia necielených multivariačných prístupov na analýzu zloženia rastlinných metabolitov²⁾. Výhodou metabolomiky však je, že nie je závislá od rastlinného druhu³⁾, možno ju aplikovať i na značne sa líšiace druhy a optimalizácia protokolov pre nový druh si vyžaduje iba krátky čas⁴⁾.

Fytoterapeutiká

Z celkového počtu cca 350 000 cievnatých rastlín sa v histórii ľudstva doteraz na liečebné účely použilo asi 35 000 druhov. Na európskom trhu je k dispozícii 2000 druhov liečivých a aromatických rastlín, z ktorých rastie voľne v prírodných podmienkach Európy asi 1200–1300 druhov, pričom 130–140 druhov sa pestuje agrotechnicky. Klimatické a pedologické podmienky v strednej Európe sú vo všeobecnosti veľmi dobré pre pestovanie mnohých druhov liečivých rastlín^{5, 6)}. Nedávno sa tiež zistilo, že biomasu získanú z odpadu liečivých rastlín (zvyšky z farmaceutickej produkcie) možno použiť ako veľmi účinné zelené hnojivo, nakoľko tento materiál obsahuje zlúčeniny, ktoré sú špecificky účinné voči buričom a rôznym škodcom⁷⁾.

Predpokladá sa, že rastlinné metabolómy sú oveľa komplexnejšie ako metabolómy cicavcov: odhady naznačujú, že sa objaví viac ako 200 000 molekúl rastlinných metabolitov⁸⁾. Sekundárne metabolity rastlín, ktoré vznikli prostredníctvom nepretržitej interakcie rastliny s náročným a prevažne nepriateľským okolím, charakterizuje značná rozmanitosť, pričom sa tieto metabolity obvykle vyznačujú špecifickou bioaktivitou súvisiacou s ich chemickou štruktúrou a zapojením do biochemických pochodov⁹⁾. Mnohé známe chemoterapeutické liečivá na liečbu rakoviny sú odvodené od rastlinných sekundárnych metabolitov, ako sú paclitaxel (taxol), camptothecin (irinotecan, topotecan) a podofylotoxíny (etoposid, teniposid). V súčasnosti sa farmaceutický a potravinársky výskum opätovne začal zameriavať na veľký potenciál rastlinných sekundárnych metabolitov a prírodných látok, ktoré možno využiť ako terapeutiká alebo vzorové zlúčeniny pre vývoj nových liečiv¹⁰⁾.

Využívané analytické metódy

Identifikovať jednotlivé aktívne obsahové látky v rastlinných extraktoch je často problematické pre ich relatívne nízke zastúpenie v rastlinách a spektrum farmakologickej účinnosti obvykle narastá iba v dôsledku synergického účinku viacerých zložiek jednej rastliny alebo viacerých rastlín¹¹⁾. Špecifický „podpis“ týchto látok v profiloch exprese génov alebo proteínov môže byť tiež veľmi významný pre farmakologickú štandardizáciu (napr. pri využití v „biologických fingerprintoch“ extraktov liečivých rastlín^{12, 13)}). Metabolomické postupy využívajúce techniky GC–MS, LC–MS, HPLC–MS,

CE–MS alebo 2D NMR sú účinným prostriedkom pre kontrolu kvality liečivých rastlín alebo výrobkov z liečivých rastlín^{14–16)}. Ako príklad možno uviesť použitie postupov komparatívnej metabolomiky na charakterizovanie fytoterapeutík, ktoré použili Shyur et al.¹⁰⁾. Títo autori na analýzu extraktov troch liečivých druhov *Echinacea* (*E. purpurea*, *E. pallida* a *E. angustifolia*) využili špeciálnu prípravu rastlinného extraktu, on-line GC–MS alebo LC–MS/MS-ESI a systémy klastrovania metabolitov.

Na štúdium metabolického profilu rastlín sa používajú predovšetkým kombinované techniky ako napr. HPLC–MS, UHPLC–MS, UPLC–MS a pod. Technika UPLC–MS-TOF, ktorá sa použila na štúdium metabolického profilu rôznych rastlinných orgánov *Panax notoginseng*, umožnila identifikáciu početných saponínov v kvetoch, koreňoch a rizozónoch tejto rastliny¹⁷⁾. Kombinovaná technika HPLC–MS-IT sa použila na získanie fingerprintu u prípravkov z *Ginkgo biloba*¹⁸⁾, ďalšia kombinovaná technika HPLC–MS/MS sa využila na identifikáciu a kvantifikáciu artemisinínu a ďalších zložiek v rastlinách *Artemisia afra*¹⁹⁾, zatiaľ čo systémy HPLC–MS-IT/TOF sa využili na stanovenie flavanolignanov v liečivej rastline *Silybum marianum*²⁰⁾.

Kombinované techniky HPLC–NMR, resp. pokročilé experimenty NMR sú tiež mimoriadne cenným nástrojom pri objasňovaní chemického zloženia komplexnej, bioaktívnej frakcie prírodného pôvodu²¹⁾.

Metabolomické štúdie/metabolické profilovanie liečivých rastlín

Ako modelová rastlina v molekulárnej genetike rastlín bola zvolená *Arabidopsis thaliana* (arábovka Thalova), predovšetkým pre malý jadrový génom²²⁾. Bola preto aj prvou rastlinou, u ktorej sa už v roku 2000 vykonalo sekvenovanie genómu²³⁾. Rastliny tohto druhu sa tiež modelovo využívali na metabolomické štúdie. Tholl et al.²⁴⁾ využili na identifikáciu enzýmov, ktoré sú zodpovedné za syntézu prchavých terpenov v kvetoch *Arabidopsis* a benzénoidných esterov v ich listoch, práve metabolické profilovanie spoločne s profilovaním génovej exprese, ako aj rôzne biochemické metódy. Tato skupina autorov využila kombináciu vyššie popísaných metód aj na identifikáciu enzýmov syntetizujúcich terpeny a metylované fenylypropény v rastlinách bazalky (*Ocimum basilicum*)²⁴⁾. Vo všeobecnosti možno konštatovať, že metabolické profilovanie, ktoré spočíva v súčasnej analýze viacerých metabolitov s čo najmenšími úpravami vzorky, je založené predovšetkým na vzájomnom porovnávaní a nachádzaní rozdielov a neočakávaných zmien. Môže sa využívať na určovanie taxonomicky blízkych rastlín a ich zaraďovanie do skupín. Taktiež ho možno využiť na kontrolu a štandardizovanie rôznych rastlinných extraktov. Niektoré typické príklady sú stručne popísané nižšie.

Hypericum sp.

Filippini et al.²⁵⁾ študovali rôzne fázy dozrievania u troch rôznych poddruhov *Hypericum perforatum* a pomocou metabolického profilovania vyhodnocovali

zmeny v kontexte hlavných sekundárnych metabolitov tejto rastliny. Z výsledkov tohto štúdia vyplynulo, že *H. perforatum*, subsp. *perforatum* obsahuje viac sekundárnych metabolitov ako ďalšie dva študované poddruhy (*H. augustifolium*, *H. veronese*). Tieto tri študované poddruhy sa v jednotlivých štádiách vývinu vyznačujú rozdielnymi metabolickými profilmi, a to hlavne v súvislosti s hypericínom a hyperforínom. Preto je pre produkciu rastlinného liečiva s vyhovujúcim metabolickým profilom nevyhnutný optimálny čas zberu.

Alali et al.²⁶⁾ stanovili hlavné aktívne metabolity (nadtodiantróny a floroglucinoly) v metanolickej extraktoch dvoch druhov *Hypericum* z oblasti Jordánu, a to *H. empetrifolium* a *H. sinaicum*. Na základe LC–UV/VIS profilov, retenčných časov a spektrálnych údajov získaných pomocou MS-ESI techniky skenov TIC alebo SIM sa u oboch študovaných druhov potvrdila prítomnosť hypericínu, protohypericínu a pseudohypericínu. Adhyperforín sa však zistil iba u *H. empetrifolium*, zatiaľ čo hyperforín a protopseudohypericín iba u *H. sinaicum*.

Melissa officinalis

Kim et al.²⁷⁾ použili na metabolomické štúdium zamerané na vplyv sacharózy na metabolizmus rastlín modelovú rastlinu *Melissa officinalis*. Metabolické profily rastlín *M. officinalis* ošetrovaných sacharózou analyzovali prostredníctvom GC–MS a analýzy hlavných komponentov (PCA – principal component analysis). Metabolické profilovanie ukázalo, že aplikácia vyššej koncentrácie sacharózy spôsobila nárast hladín metabolitov, ako sú sacharidy, ktoré sa vzťahujú ku glykolytickej dráhe *M. officinalis*. S nárastom koncentrácie sacharózy sa zvyšovala aj syntéza prolínu a kyseliny jantárovej, ktoré sú spojené s pentózovou fosfátovou dráhou, dráhou kyseliny šikimátovej, ako aj biosyntéza fenylpropanoidov. Výsledkom týchto metabolických zmien vyvolaných sacharózou napokon bola zvýšená produkcia flavonoidov a kyseliny kávovej.

Panax

Lee et al.²⁸⁾ študovali 35 vzoriek ženšenu pochádzajúcich z Kórey a Číny s cieľom vyvinúť metódu vhodnú na rozlíšenie pôvodu ženšenu. Na základe výsledkov multiprvkovej analýzy sa zistili významné rozdiely v prípade horčíka, železa, hliníka a skandia. Na základe údajov získaných z ¹H NMR spektier sa vykonala analýza hlavných komponentov (PCA), ktorá preukázala významné rozlíšenie medzi rastlinami pochádzajúcimi z dvoch rôznych krajín. Hlavné metabolity zodpovedné za toto rozlíšenie boli sacharidy, ako je glukóza, xylóza a sacharóza.

Lee et al.²⁹⁾ pomocou ¹H NMR metabolického fingerprintu a metabolického profilovania hodnotili tiež kvalitu rôznych kultivarov ženšenu, ako aj niektorých komerčných produktov. Analýza hlavných komponentov na základe ¹H NMR spektier spoľahlivo rozlíšila jednotlivé vzorky ženšenu. Hlavné metabolity, ktoré sa testovali v rastlinných vzorkách v rámci tohto štúdia, boli glutamín, arginín, sacharóza, malát a myo-inozitol. Kombináciou metabolického fingerprintu a profilovania

sa zistilo, že viaceré zlúčeniny vrátane glukózy, fumarátu a rôznych aminokyselín môžu slúžiť ako biomarkery pre zaručenie kvality ženšenu.

Chamomilla

Weber et al.³⁰⁾ analyzovali etanolickej extrakt kvetov rastlín *Chamomilla recutita* pomocou kombinovaných techník HPLC-MS a HPLC-NMR s cieľom charakterizovať hlavné zložky v tomto extrakte. Zistili, že hlavnými komponentmi v extrakte sú *cis*- a *trans*-izoméry 2-(glukozylxy)-4-metoxyskoricovej kyseliny a tiež herniarín a apigenín, apigenín-7-*O*-β-glukozid, ako aj niektoré jeho deriváty.

Ricinus

Pigott et al.³¹⁾ skúmali rozdiely v metabolómoch šiestich vzoriek známych kultivarov *Ricinus communis*, ktoré by bolo možné použiť pri určovaní pôvodu, resp. identifikácii kultivaru pomocou ¹H NMR analýzy, s následným využitím multivariačnej analýzy ortogonálnej projekcie metódy čiastočných najmenších štvorcov (OPLS – orthogonal partial least squares). Analýza grafického znázornenia spolu s ďalšími chemickými analýzami extraktov umožnili identifikovať fenylalanín, ricinín, *N*-demetyl a *O*-demetyl analógy ricinínu a sacharózu ako dôležité molekulové markery jednotlivých kultivarov.

Glycyrrhiza sp.

Yang et al.³²⁾ využili metabolomickú techniku založenú na ¹H NMR na klasifikáciu rôznych druhov *Glycyrrhiza*, pričom na multivariačnú štatistickú analýzu súboru dát použili diskriminantnú analýzu čiastočných najmenších štvorcov (PLS). Kľúčovými metabolitmi prispievajúcimi k rozdeleniu „score plots“ (znázornenie rozdielov medzi údajmi, ktoré patria do rôznych tried) u rôznych druhov *Glycyrrhiza* boli kyselina mliečna, alanín, arginín, prolín, kyselina jablčná, asparagín, cholin, glycín, glukóza, sacharóza, kyselina 4-hydroxyfenyloctová a kyselina mravčia. Relatívne vysoké hladiny glukózy a kyseliny 4-hydroxyfenyloctovej sa zistili u *G. glabra*, zatiaľ čo u *G. uralensis* vysoké hladiny dosahovali arginín, kyselina jablčná a sacharóza.

Metabolomika v kontrole kvality fytofarmák

Tinktúry sú rozšírene používané kvapalnú liekovú formu, ktoré sa tradične získavajú maceráciou jednej alebo viacerých liečivých rastlín v etanolickej vodnej roztoku. Výsledkom takéhoto procesu je extrakcia stoviek štruktúrne odlišných zlúčenín s odlišnou polaritou. Vzhľadom k rozsiahlej rozmanitosti štruktúr zložiek, ktoré sa nachádzajú v bylinných tinktúrach, analytické postupy využívané na kontrolu kvality tinktúr sa obvykle optimalizujú iba na detekciu jednej chemickej látky alebo špecifickej triedy zlúčenín.

Politi et al.³³⁾ stanovili priamy metabolický „fingerprint“ komerčných tinktúr pripravených z liečivých rastlín *Echinacea purpurea*, *Hypericum perforatum*, *Ginkgo*

biloba a *Valeriana officinalis* pomocou NMR spektroskopie a MS spektrometrie. Využitie týchto techník umožnilo získať metabolický fingerprint vhodný pre rozlíšenie tinktúr pripravených z rôznych rastlín, a to bez odparenia a separačných krokov, pričom sa potvrdilo, že vyššie spomenuté techniky sú vhodné na rýchlu priamu analýzu liečivých bylinných tinktúr.

Metódy založené na využití NMR sa tiež použili na charakterizovanie extraktov a fytofarmaceutických prípravkov z rastlín *Arnica montana*³⁴⁾, *Artemisia annua*^{19, 35)}, *Matricaria recutita*³⁶⁾, *Cannabis sativa*³⁷⁾, *Panax ginseng*³⁸⁾, *Angelica* sp.³⁹⁾, *Ephedra* sp.⁴⁰⁾.

Perspektívy a využitie

V posledných rokoch stratégie využívajúce klasickú genetiku a molekulovú biológiu (biobalistika, transformácia *Agrobacterium tumefaciens*, rekombinantné enzýmy) na prípravu prírodných látok, ako aj šlachtenie liečivých a aromatických rastlín, prispeli k rozšíreniu a zlepšeniu získavania čistých účinných látok z rastlín. Z tohto aspektu zohrávajú hlavnú úlohu prírodné produkty s vysokou hodnotou využívané na terapeutické a kozmetické účely (napr. silice, paclitaxel, artemisinín, vinca alkaloidy). Akademický výskum a aj priemysel sa preto zameriavajú na vyžitie genetických a biotechnologických techník, ako je metabolické inžinierstvo, miestne ciele mutagenéza a optimalizácia dráh s cieľom znížiť náklady a zvýšiť produktivitu. Nevýhodou využitia rastlinných kultúr a izolovaných enzýmov na komerčné účely je nízka produkcia, v dôsledku čoho sa výskum orientuje vo zvýšenej miere na metabolické inžinierstvo⁴¹⁾.

Zvýšenie dostupnosti účinných liečivých látok z rastlinných zdrojov musí sprevádzať kvalitatívna kontrola obsahových látok využívajúca botaniku, chémiu, biológiu a informatiku. Takéto integrované stratégie zahŕňajú informačné systémy, analýzu genómu, metabolomiku, biotechnológiu, nanotechnológiu, analýzu liečivých rastlín *in situ*, ako aj využitie nových detekčných techník pre produkciu liečivých rastlín obsahujúcich zvýšené hladiny látok s liečivým účinkom⁴²⁾.

Metabolická stratégia je čoraz užitočnejšia pre profilovanie unikátnych skupín rastlinných sekundárnych metabolitov, ktoré možno využiť v chemotaxonomii a pre lepšiu kontrolu kvality liečivých extraktov z týchto rastlín.

Záver

Stratégie rastlinnej metabolomiky poskytujú nové a dôležité informácie pre výskum liečivých rastlín, ktoré spájajú predpokladanú bioaktivitu s hlavnými účinnými obsahovými látkami rastlín využívaných v oblasti fyto medicíny. Je tiež potrebné zdôrazniť, že metabolomiku možno využívať na hodnotenie kvality liečivých rastlín, ktoré je založené na rozmanitosti metabolických fingerprintov získaných na základe multivariačnej analýzy necielenej alebo v značnej miere cielej analýzy metabolitov. Výhodou takéhoto postupu je to, že liečivé rastliny sa hodnotia nielen na základe obmedzeného počtu metabolitov, ktoré sú farmako-

logicky významnými zlúčeninami, ale aj na základe fingerprintov menej významných metabolitov a bioaktívnych molekúl⁴³⁾.

Skratky

CE-MS	– Capillary Electrophoresis – Mass Spectrometry; spojenie kapilárnej elektroforézy s hmotnostnou spektrometriou
2D NMR	– Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance; dvojrozmerná nukleárna magnetická rezonancia
ESI	– Electrospray Ionization; ionizácia elektrosprejom
GC-MS	– Gas Chromatography – Mass Spectrometry; spojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou
HPLC	– High Performance Liquid Chromatography; vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HPLC-MS	– High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry; spojenie vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou
HPLC-NMR	– High Performance Liquid Chromatography – Nuclear Magnetic Resonance; spojenie vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s nukleárnou magnetickou rezonanciou
IT	– Ion Trap; ionová pasca
LC-MS	– Liquid Chromatography – Mass Spectrometry; spojenie kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou
LC-UV/VIS	– Liquid Chromatography – Ultraviolet/Visible; spojenie kvapalinovej chromatografie s UV/VIS detekciou
MS	– Mass Spectrometry; hmotnostná spektrometria
MS/MS (MS ⁿ)	– Tandem Mass Spectrometry; tandemová hmotnostná spektrometria
NMR	– Nuclear Magnetic Resonance; nukleárna magnetická rezonancia
OPLS	– Orthogonal Partial Least Squares; multivariačná analýza ortogonálnej projekcie metódy čiastočných najmenších štvorcov
PCA	– Principal Component Analysis; analýza hlavných komponentov
PLS	– Partial Least Squares; analýza čiastočných najmenších štvorcov
SIM	– Selected Ion Monitoring; selektívny záznam vybraného iónu
TIC	– Total Ion Current; iónový prúd vyvolaný dopadom všetkých elektrónov
TOF	– Time of Flight; analyzátor doby letu
UHPLC	– Ultra High Performance Liquid Chromatography; – ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UPLC	– Ultra Performance Liquid Chromatography; ultra účinná kvapalinová chromatografia

Publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Výskum a vývoj nových technológií chemickej analýzy pre metabonomiku/metabolomiku“ ITMS: 26240220007, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Konflikt záujmov: žiadny.

Literatúra

- Nielsen J., Oliver S. The next wave in metabolome analysis. Trends Biotechnol 2005; 23, 544–546.
- Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R. N., Willmitzer L. Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. Plant J 2000; 23, 131–142.
- Stütt M., Fernie A. R. From measurements of metabolites to metabolomics: an 'on the fly' perspective illustrated by recent studies of carbon–nitrogen interactions. Curr Opin Biotechnol 2003; 14, 136–144.
- Kopka J., Fernie A., Weckwerth W., Gibon Y., Stütt M. Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. Genome Biol 2004; 5, 109.
- Lange D. Europe's medicinal and aromatic plants: their use, trade and conservation. Cambridge UK: Traffic Europe/International 1998.
- Kozłowski R., Braniecki P., Mackiewicz-Talarczyk M. Report from the state of Poland. Forming Part of the IENICA-INFORM Project. Poznań 2004.
- Tóth Š., Šalamon I. Increase of field crop yields by application of medicinal plant wastes and their extracts. In: Cultivation of medicinal and spice plants. Nitra: Agroinstitute 1997; 39–43.
- Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 2002; 48, 155–171.
- Schauer N., Fernie A. R. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. Trends Plant Sci 2006; 11, 508–516.
- Shyur L. F., Yang N. S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. Curr Opin Chem Biol 2008; 12, 66–71.
- Williamson E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomedicine 2001; 8, 401–409.
- Wang C. Y., Chiao M. T., Yen P. J., Huang W. C., Hou C. J., Chung S. C., Yeh K. C., Yang W. C., Shyur L. F., Yang N. S. Modulatory effects of *Echinacea purpurea* extracts on human dendritic cells: a cell and gene-based study. Genomics 2006; 88, 9801–9808.
- Yang N. S., Shyur L. F., Chen C. H., Wang S. Y., Tzeng C. M. Medicinal herb extract and a single-compound drug confer similar complex pharmacogenomic activities in MCF-7 cells. J Biomed Sci 2004; 11, 418–422.
- Zeng Z. D., Liang Y. Z., Chau F. T., Chen S., Daniel M. K., Chan C. O. Mass spectral profiling: an effective tool for quality control of herbal medicines. Anal Chim Acta 2007; 604, 89–98.
- Ye M., Liu S. H., Jiang Z., Lee Y., Tilton R., Cheng Y. C. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy. Rapid Commun Mass Spectrom 2007; 21, 3593–3607.
- Yang S. Y., Kim H. K., Lefeber A. W. M., Erkelens C., Angelova N., Choi Y. H., Verpoorte R. Application of two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to quality control of Ginseng commercial products. Planta Med 2006; 72, 364–369.
- Dan M., Su M., Gao X., Zhao T., Zhao A., Xie G., Qiu Y., Zhou M., Liu Z., Jia W. Metabolite profiling of *Panax notoginseng* using UPLC-ESI-MS. Phytochemistry 2008; 69, 2237–2244.
- Ding S., Dudley E., Plummer S., Tang J., Newton R. P., Brenton A. G. Fingerprint profile of *Ginkgo biloba* nutritional supplements by LC/ESI-MS/MS. Phytochemistry 2008; 69, 1555–1564.
- van der Kooy F., Verpoorte R., Meyer J. J. M. Metabolomic quality control of claimed antimalarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A. afra* and *A. annua* plant extracts. S Afr J Bot 2008; 74, 186–189.
- Shibano M., Lin A. S., Itokawa H., Lee K. H. Separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by liquid chromatography connected with hybrid ion-trap and time-of-flight mass spectrometry (LC-MS/IT-TOF). J Nat Prod 2007; 70, 1424–1428.
- Clarkson C., Madikane E. V., Hansen S. H., Smith P. J., Jaroszewski J. W. HPLC–SPE–NMR characterization of sesquiterpenes in an antimycobacterial fraction from *Warburgia salutaris*. Planta Med 2007; 73, 578–584.
- Bennett M. D., Leitch I. J., Price H. J., Johnston J. S. Comparisons with *Caenorhabditis* (100 Mb) and *Drosophila* (175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be 157 Mb and thus 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of 125 Mb. Annals of Botany 2003; 91, 547–557.
- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 2000; 408, 796–815.
- Tholl D., Chen F., Iijima Y., Fridman E., Gang D. R., Lewinsohn E., Pichersky E. Identifying substrates and products of enzymes of plant volatile biosynthesis with the help of metabolic profiling. Concepts in Plant Metabolomics 2007, 169–182; Nikolau B. J., Wurtele R. S. (ed.).
- Filippini R., Piovan A., Borsarini A., Caniato R. Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. Fitoterapia 2010; 81, 115–119.
- Alali F. Q., Tawaha K., Gharaibeh M. LC-MS and LC-PDA analysis of *Hypericum empetrifolium* and *Hypericum sinaicum*. Z Naturforsch C - J Biosci 2009; 64, 476–482.
- Kim S., Shin M., Hossain M. A., Yun E. J., Lee H., Kim K. H. Metabolite profiling of sucrose effect on the metabolism of *Melissa officinalis* by gas chromatography-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 2011; 399, 3519–3528.
- Lee A. R., Gautam M., Kim J., Shin W. J., Choi M. S., Bong Y. S., Hwang G. S., Lee K. S. Multianalytical approach for determining the geographical origin of ginseng using strontium isotopes, multielements, and ¹H NMR analysis. J Agric Food Chem 2011; 59, 8560–8567.
- Lee E. J., Shaykhutdinov R., Weljie A. M., Vogel H. J., Facchini P. J., Park S. U., Kim Y. K., Yang T. J. Quality assessment of ginseng by ¹H NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis. J Agric Food Chem 2009; 57, 7513–7522.
- Weber B., Herrmann M., Hartmann B., Joppe H., Schmidt C. O., Bertram H. J. HPLC/MS and HPLC/NMR as hyphenated techniques for accelerated characterization of the main constituents in Chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). Eur Food Res Technol 2008; 226, 755–760.
- Pigott E. J., Roberts W., Ovenden S. P. B., Rochfort S., Bourne D. J. Metabolomic investigations of *Ricinus communis* for cultivar and provenance determination. Metabolomics 2011, DOI 10.1007/s11306-011-0355-7.
- Yang S. O., Hyun S. H., Kim S. H., Kim H. S., Lee J., Whang W. K., Lee M. W., Choi H. K. Differentiation of roots of *Glycyrrhiza* species by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate statistical analysis. Bull Korean Chem Soc 2010; 31, 825–828.
- Politi M., Zloh M., Pintadi M. E., Castro P. M., Heinrich M., Prieto J. M. Direct metabolic fingerprinting of commercial herbal tinctures by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. Phytochem Anal 2009; 20, 328–334.
- Bilia A., Bergonzi M. C., Mazzi G., Vincieri F. F. NMR spectroscopy: a useful tool for characterization of plant extracts, the case of supercritical CO₂ *Arnica* extract. J Pharm Biomed Anal 2002; 30, 321–330.
- Bailey N. J., Wang Y., Sampson J., Davis W., Whitcombe I., Hylands P. J., Croft S. L., Holmes E. Prediction of anti-plasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: application of ¹H NMR spectroscopy and chemometrics. J Pharm Biomed Anal 2004; 35, 117–126.
- Wang Y., Tang H., Nicholson J. K., Hylands P., Sampson J., Whitcombe I., Stewart C. G., Caiger S., Oru I., Holmes E. Metabolomic strategy for the classification and quality control of phytomedicine: a case study of chamomile flower (*Matricaria recutita* L.). Planta Med 2004; 70, 250–255.
- Choi Y. H., Kim H. K., Hazekamp A., Erkelens C., Lefeber A. W. M., Verpoorte R. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. J Nat Prod 2004; 67, 953–957.
- Yang S. Y., Kim H. K., Lefeber A. W. M., Erkelens C., Angelova N., Choi Y. H., Verpoorte R. Application of two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to quality control of Ginseng commercial products. Planta Med 2006; 72, 364–369.
- Tarachiwin L., Katoh A., Ute K., Fukusaki E. Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by ¹H NMR-based metabolic fingerprinting. J Pharm Biomed Anal 2008; 48, 42–48.
- Kim H. K., Choi Y. H., Erkelens C., Lefeber A. W. M., Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using ¹H-NMR spectroscopy and principal component analysis. Chem Pharm Bull 2005; 53, 105–109.
- Kayser O. Metabolic engineering strategies for the optimization of medicinal and aromatic plants: expectations and realities. Acta Hort (ISHS) 2010; 860, 199–204.
- Cordell G. A. Sustainable medicines and global health care. Planta Med 2011; 77, 1129–1138.
- Okada T., Afendi F. M., Altaf-Ul-Amin M., Takahashi H., Nakamura K., Kanaya S. Metabolomics of medicinal plants: the importance of multivariate analysis of analytical chemistry data. Curr Comput Aided Drug Des 2010; 6, 179–196.