基于 ^{1}H-NMR 代谢组学技术评价何首乌炮制品中差异代谢物的研究

王 健[1]，孙 瑜[2*]，陈莉莉[2]，韩真真[2]，孙精通[2]
1. 天津市儿童医院，天津 300074
2. 天津中医药大学，天津 301617

摘 要：目的 采用 ^{1}H-NMR 代谢组学技术评价何首乌炮制品中的差异代谢物。**方法** 建立何首乌的 ^{1}H-NMR 指纹图谱，对黑豆汁制、黄酒制、清水制、黑豆汁加黄酒制何首乌以及生首乌进行分析，同时考察 6、12、18、24、32、36 h 炮制时间，采用主成分分析、偏最小二乘法判别分析等多元统计方法对不同炮制品与生品差异进行比较分析。**结果** 在何首乌生品、炮制品中找到 15 种差异化学成分，其中苏氨酸、脯氨酸、没食子酸、β-葡萄糖、琥珀酸、乳酸、胆碱、甘氨酸含量具有随着炮制而升高趋势；而 γ-氨基丁酸、蔗糖具有降低的趋势；二苯乙烯苷的含量是先升高后降低。**结论** 基于 NMR 技术的代谢指纹图谱可以较好的评价何首乌的不同炮制工艺。

关键词：何首乌；差异代谢物；炮制；核磁共振氢谱；指纹图谱
中图分类号：R969.1 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 5515(2020)08 - 1537 - 07
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.08.007

Significant changed metabolites in processed products of *Polygoni Multiflori Radix* based on fingerprint of ^{1}H-NMR

WANG Jian[1], SUN Yu[2], CHEN Li-li[2], HAN ZHen-zhen[2], SUN Jing-tong[2]
1. Tianjin Children's Hospital, Tianjin 300074, China
2. Tianjin University of TCM, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the significant changed metabolites in processed products of *Polygoni Multiflori Radix* based on fingerprint of ^{1}H-NMR. **Methods** ^{1}H-NMR fingerprint were established. Four processing methods (black bean juice, yellow rice wine, clean water, and black bean juice plus yellow rice wine) and six processing time points (6, 12, 18, 24, 32, and 36 h) of *Polygoni Multiflori Radix* were analyzed. PCA and OPLS-DA analysis were utilized to distinguish the difference among the processed *Polygoni Multiflori Radix* and crude *Polygoni Multiflori Radix*. **Results** 15 Distinguished compounds were found between crude *Polygoni Multiflori Radix* and different processed *Polygoni Multiflori Radix*. The tendency of threonine, proline, gallic acid, β-glucose, succinate, lactate, choline, and glycine were increased along with processing time. However, γ-aminobutyrate and sucrose were decreased significantly. The content of stilbene glycoside was increased at first and decreased finally. **Conclusion** The ^{1}H-NMR fingerprint could be better used for accessing the processing technologies of *Polygoni Multiflori Radix*.

Key words: *Polygoni Multiflori Radix*; changed metabolites ; processing technology; ^{1}H-NMR; fingerprint

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.的干燥块根，临床上有生用和制用之分。生首乌具有解毒消痈、润肠通便、截疟的功效，用于治疗瘰疬疮痈、肠燥便秘、风疹瘙痒、久疟体虚等证。制首乌具有补肝肾、益精血、强筋骨、乌发、化浊降脂的功效，用于治疗血虚萎黄、眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、肢体麻木、崩漏带下、高脂血症等，临床上常作为补虚药。很多研究认为何首乌属特异质肝损伤，即与个体差异关系密切[1]。何首乌中二苯乙烯苷能够下调葡萄糖醛酸转移酶 UDP1A8 的表达，导致大黄素的体内蓄积[2]，而细胞实验已有报道，大黄素类成分对人肝 L02 细胞具有明显的毒性[3]，可见何首乌中很多化学成分存在体内药物－药物相互作用。何首乌不同炮制方法、炮制时间必然引起化学成分组成、比例的变化，而这些成分变化可能导致药物－药物相互作用的变化，

收稿日期：2020-04-02
作者简介：王 健（1980—），男，主管药师，硕士，研究方向为药物分析。E-mail: kingdom_80@sina.com
***通信作者** 孙 瑜（1979—），女，主管药师，博士，研究方向为药代动力学、药理学。E-mail: sunrain806@163.com

对血药浓度产生影响，进而表现出肝损伤，而特异质的肝损伤也可能与不同厂家、不同炮制工艺下生产的制何首乌有关。何首乌的炮制主要是 4 种方法，即黑豆汁制、黄酒制、清水制、黑豆汁加黄酒制[4-7]。由于历版《中国药典》均规定何首乌炮制采用黑豆汁制的方法，因此研究黑豆炮制的文献较多[8-9]；并且成分随炮制时间变化规律研究大多以 10～30 h 为主[10]。因此本实验选取 4 种炮制方法，分别于 6、12、18、24、32、36 h 取样，考察炮制前后、炮制过程中何首乌成分的变化规律。在代谢组学分析方法中，NMR 作为应用最广泛的代谢组学技术之一，具有独特的优势，并且主要对植物中的初级代谢产物（相对分子质量低，丰度高的代谢物）进行分析，样品前处理简单方便，高通量，无偏向性，分析速度快等特点[11]。本实验采用基于 ^{1}H-NMR 技术的代谢指纹谱分析方法，结合代谢组学多元统计分析手段，分析何首乌中含量相对较高的成分，确定差异化合物，总结差异化合物随时间变化规律，为何首乌炮制工艺研究提供参考依据。

1 实验材料

Bruker ASCEND 500 MHz 超导傅里叶变换核磁共振谱仪（瑞士布鲁克公司）；3K15 型高速离心机（Sigma 公司）；XW-80A 型涡旋混合器（上海沪西分析仪器厂）；；KQ-250E 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

重水（D_2O，99.9%D）用于锁场（美国剑桥同位素实验室）；TSP[2,2,3,3,-d_4-3（三甲基硅基）丙酸钠盐，阿法埃莎化学有限公司]用于化学位移定标及定量分析；超纯水（优级，屈臣氏公司）；磷酸氢二钾（天津市光复科技发展有限公司）；磷酸二氢钠（天津市风船化学试剂科技有限公司）；甲酸（美国 ACS 恩科化学）、缬氨酸、苏氨酸、琥珀酸、γ-氨基丁酸、赖氨酸、脯氨酸、苹果酸、胆碱、蔗糖、果糖等均购自上海源叶生物科技有限公司。

首乌药材、黑豆均购自于河北省安国药材市场，为蓼科蓼属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.的干燥块根；黑豆加 8 倍量纯水煮制 4 h，滤过，豆渣加 6 倍量纯水，煮约 3 h，滤过，合并两次滤液，即得黑豆汁[12-14]；黄酒为绍兴产传统型干黄酒（绍兴县第三酒厂）。

2 方法与结果

2.1 炮制品的制备

称取何首乌生品 3.6 kg，平均分成 4 份，每份 900 g，分别向各样品加入 4 种液体辅料清水、黑豆汁、黄酒、黑豆汁和黄酒（1∶2.5），固液比为 1∶1.2[9]，待完全浸透。何首乌各浸泡品隔水蒸制，并分别于 6、12、18、24、32、36 h 取样。晾凉后，放入 75 ℃烘箱至完全干透，取出，粉碎，过四号筛（40 目），得黑豆汁制、清水制、黄酒制、黑豆汁加黄酒制何首乌各炮制品，实验重复 3 次。

2.2 供试品溶液的配制

精确称取何首乌样品粉末约 0.5 g，置于 15 mL 离心管中，精密加入 60%乙醇水溶液 4 mL，摇匀 10 s 后，超声提取 1.5 h，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液，如此重复两次，合并提取液。将所得到的样品溶液精密取出 4 mL，移到 8 mL 蒸发皿中，并在 60 ℃恒温水浴锅中蒸干。将所得到干燥样品，用 600 μL 0.1 mol/L K_2HPO_4-NaH_2PO_4（pH 7.4）、含有 10%重水和 0.4 mmol/L TSP 溶液溶解，涡旋 1 min，10 000 r/min 离心 5 min，取上清置 5 mm 核磁管中，测样。

2.3 方法学试验

2.3.1 精密度试验 黑豆汁制-6 h 样品连续采集 6 次 ^{1}H-NMR 谱图，计算 δ 1.05、1.37、1.96、2.45、3.18、4.69、7.08、8.50 特征峰下的化学位移和相对峰面积的 RSD 值，结果显示：特征峰的化学位移 RSD 值为 0.06 %，相对峰面积 RSD 值为 2.14 %。

2.3.2 稳定性试验 选取黑豆汁制-6 h 样品在 2、4、8、10、12、18、24、36 h 检测特征峰下的化学位移和相对峰面积，计算其 RSD 值，结果特征峰的化学位移 RSD 值为 0.04%，相对峰面积 RSD 值为 3.24%。

2.3.3 重复性试验 黑豆汁制-6 h 样品取 6 份，制备供试品溶液，分别进行 ^{1}H-NMR 测定，计算特征峰相对应的化学位移、相对峰面积，结果特征峰的化学位移 RSD 值为 0.08%，相对峰面积 RSD 值为 4.76%。

2.4 基于 ^{1}H-NMR 何首乌炮制样品指纹图谱的化学指认

采用 Bruker ASCEND 500 MHz 采集 ^{1}H-NMR 谱，反相检测探头（BBI），采集温度为 298 K，NOESYPR1D 脉冲序列。采用预饱和方式压制溶剂峰，从而抑制溶剂信号的检测。循环时间（D1），混合时间（D8）以及 90°脉冲时间（P1）分别为 2 s、0.2 s、12.33 μs，中心激发频率（O1P）为 4.837，预饱和水峰压制功率（PLW9）为 31.01 dB。采样

点数为 32 k，谱宽（SW）为 10.330 Hz，扫描次数（NS）为 128 次。

2D-NMR 谱图均采用标准脉冲序列，其中包括 COSY（^{1}H-^{1}H 相关）、HSQC、（^{1}H-^{13}C 直接相关）HMBC（^{1}H-^{13}C 远程相关）、TOCSY（^{1}H-^{1}H 全相关）、J-RES（J-分辨光谱）。^{1}H-^{1}H COSY 脉冲序列为 cosygpmfqf，梯度恢复时间（D16）为 0.2 μs，F1(^{1}H)和 F2(^{1}H)谱宽均为 4 464.286 Hz，采样点数阵为 $t_2\times t_1$＝2 048×128，NS 为 128 次，2k 数据点。HSQC 脉冲序列为 hsqcetgpsi，其 F1(^{13}C)和 F2(^{1}H) SW 为 20 831.980、4 464.286 Hz，弛豫时间为 1.457 811 s，采集时间为 0.118 834 0 s，采集数据点阵 $t_2\times t_1$＝1 024×256，NS 为 80 次，1k 数据点。HMBC 的脉冲序列为 hmbcgpndqf，其 F1(^{13}C)和 F2(^{1}H) SW 为 27 932.973、4 464.286 Hz，弛豫时间 1.332 064 03 s，采集时间为 0.475 186 0 s，预扫描延迟时间为 6.50 μs，采集数据点阵 $t_2\times t_1$＝4 096×256，NS 为 100 次，4k 数据点。TOCSY 脉冲序列为 mlevphpp，其 F1(^{13}C)和 F2(^{1}H) SW 均为 4 464.286 Hz，弛豫时间为 1.898 965 00 s，采集时间为 0.237 618 0 s，D8 为 0.08 s，采集数据点阵 $t_2\times t_1$＝2 048×256，NS 为 100 次。J-RES 的脉冲序列为 jresqf，弛豫时间为 2 s，采集时间为 0.102 450 0 s，F1 和 F2 维 SW 分别为 20.000、10 000.000 Hz，采样数据点阵为 $t_2\times t_1$＝2 048×256，NS 为 32 次，2k 数据点。

何首乌黑豆汁制、黄酒制、黑豆汁加黄酒制、清水制炮制品和生品的核磁共振图谱见图 1。可以看出 δ 0.05～4.00 为氨基酸及有机酸区，δ 4.00～5.50 为碳水化合物区，δ 5.50～8.70 为芳香区。鉴定代谢产物主要是基于文献报道[15-17]、在线数据库（HMDB）和标准品，并结合 2D NMR 图谱进行分析，共指认出 24 种化合物，其包括 9 种氨基酸、8 种有机酸、4 种糖类、1 种二苯乙烯苷类化合物和 2 种其他类化合物，见表 1。

2.5 主成分分析（PCA）

1D NMR、2D NMR 图谱预处理使用 Topspin（V3.5）软件，包括指数窗函数变换、相位校正、基线矫正、化学位移漂移矫正（一般使用 TSP）。多元统计分析用 ^{1}H-NMR 数据处理采用 MestReNova 9.0.1 软件，线宽因子设为 0.3 Hz，自由感应衰变为零填充到 64k 数据点。除去 TSP δ 分。积分所得数据进行归一化，并转换为二维矩阵，保

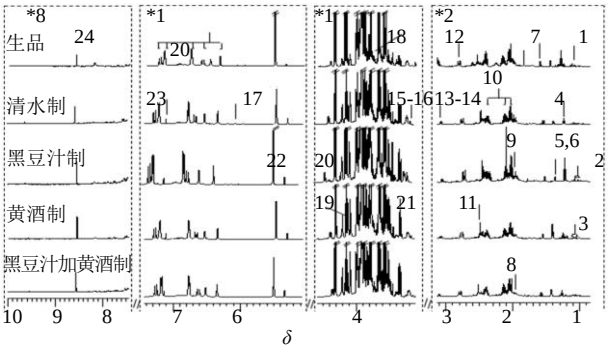

图 1 何首乌 12 h 下不同炮制品和生品的 60%乙醇提取物 NMR 指纹图谱

Fig. 1 NMR fingerprint of 60% ethanol extract from *Polygoni Multiflori Radix* and different processed *Polygoni Multiflori Radix* at 12 h

存为 CSV 格式，使用 SIMCA-P$^+$（v12.0）软件进 0.00～0.02，水峰 δ 4.65～4.85。核磁共振光谱区以 δ 0.003 积分段对化学位移区间 δ 0.45～12.50 进行分段积行多变量分析，主要通过 PCA 和 OPLS-DA 模型进行分析。PCA 模型主要看样本间分组趋势以及样本组内的离散程度；在 OPLS-DA 模型中，主要得到得分散点图和 s-plot 图。在得分散点图中，每一个点代表不同的样本，以样本类别为变量（Y）建立一个 PLS 模型，并获得几个与 Y 不相关的自变量（X）信息并将其替换，从而提高了模型识别能力。其中主要包括 R^2X，R^2Y，Q^2 3 个质量评价指标，越接近于 1，代表预测的结果真实，模型可靠。在 s-plot 中，每一个点代表核磁共振光谱区，从而揭示了不同实验方法中的代谢物的显着变化，数据点离中心越远，代表对分组贡献越大。将 OPLS-DA 模型所给出的每一个变量的 VIP 值中大于 1 的变量作为对模型分组贡献最大，并将此数据导出，结合 t 检验，筛选 VIP＞1 且 P＜0.05 的变量进行分析。

将上述所得到的潜在差异代谢物的信息，通过 2D NMR 谱图，数据库（Human Metabolome Database）检索，以及加入标准品等方法进行结构鉴定。PCA 分析是一种无监督的模式识别方法，是在样品分组信息未知的情况下进行的聚类分析，它能够将具有相关关系的 p 个变量转变为 q（p＜q）个无相关关系，从而有效地对多维数据进行降维，大大简化了数据集。

以何首乌炮制 12 h 为例，制作 PCA 分析的得分图（Score plot），见图 2。PCA 结果表明，何首

表 1 何首乌 60%乙醇提取物核磁鉴定结果

Table 1 NMR identification of 60% ethanol extract from *Polygoni Multiflori Radix*

编号	代谢物	δ	Correlated NMR 图谱
1	亮氨酸*	0.97(t)，3.74(m)	HSQC，J-res
2	异亮氨酸*	0.95(t)，1.02(d)	COSY，HSQC，J-res
3	缬氨酸*	1.00(d)，1.05(d)，2.29(m)，3.63(d)	COSY，HSQC，J-res，HMBC
4	乙醇*	1.22(t)，3.68	J-res，COSY，HSQC，HMBC
5	苏氨酸*	1.36(d)，3.62(d)，4.26(m)	COSY，HSQC，J-res，HMBC
6	乳酸*	1.37(d)，4.10(q)	COSY，HSQC，J-res
7	丙氨酸*	1.52(d)，3.82	J-res，COSY
8	精氨酸	1.94(m)，3.22，3.59	COSY，J-res
9	醋酸乙酯*	1.96(s)	HSQC，J-res，HMBC
10	脯氨酸*	2.00(m)，2.10(m)，2.36(m)，4.16(dd)	COSY，HSQC，J-res，HMBC
11	琥珀酸*	2.45(s)	J-res，HSQC，HMBC
12	苹果酸*	2.36(dd)，2.71(dd)，4.36(dd)	COSY，HSQC，J-res，HMBC，TOCSY
13	γ-氨基丁酸*	3.05(t)，1.92，2.32	COSY，HSQC，J-res，HMBC
14	α-酮戊二酸	3.05(t)，2.40	COSY，HSQC，J-res
15	丙二酸	3.16(s)	HSQC，HMBC，J-res
16	胆碱*	3.18(s)	J-res，HSQC，HMBC
17	蔗糖*	3.51(t)，3.60(dd)，3.72(s)，4.09(t)，4.25(d)，5.45(d)	COSY，HSQC，TOCSY，HMBC，J-res
18	甘氨酸	3.60(s)	J-res
19	果糖*	4.07(dd)	COSY，HSQC，J-res
20	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*-β-*D*-葡萄糖苷*	4.40(d)，6.34(d)，6.56(d)，6.71(d)，6.78(d)，7.23(d)，7.30(d)，3.8(m)	COSY，HSQC，HMBC，J-res，TOCSY
21	β-葡萄糖	4.69(d)，3.29(dd)	COSY，HSQC，HMBC，J-res
22	α-葡萄糖	5.28(d)，3.84(m)	COSY，HSQC，HMBC，J-res
23	没食子酸*	7.08(s)	HSQC，J-res
24	甲酸*	8.50(s)	HSQC，J-res

*与对照品核对

* compared with reference substance

乌生品组与各炮制品分组明显，但各个炮制品组较为接近，因而接下来利用正交偏最小二乘－判别分析进行分组比较分析。

2.6 正交偏最小二乘-判别分析（OPLS-DA）

OPLS-DA 是一种有监督模式识别方法，是利用它们已知分组变量后再寻找组间的差异。它是将 PLS-DA 与正交信号校正分析方法联系起来，从而使不同组别间的差异最大地显现出来。为进一步寻找何首乌炮制前后的变化以及炮制时间的影响，本实验采用 OPLS-DA 统计分析模型寻找何首乌不同炮制品中差异性化学成分，并利用得分图、VIP 和 *p*-value 找出何首乌不同炮制品组间差异化合物，结果见图 3、4。

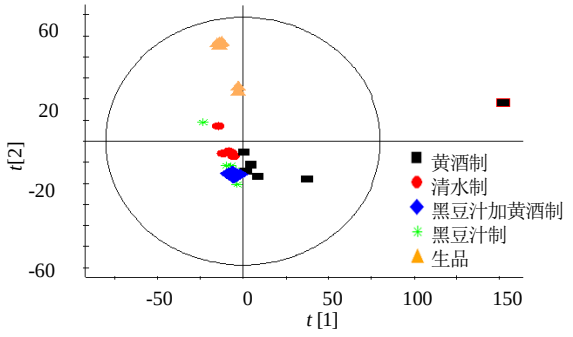

图 2 基于 NMR 何首乌炮制 12 h PCA 的 Score plot 图

Fig. 2 PCA Score plot of PM and different processed *Polygoni Multiflori Radix* at 12 h

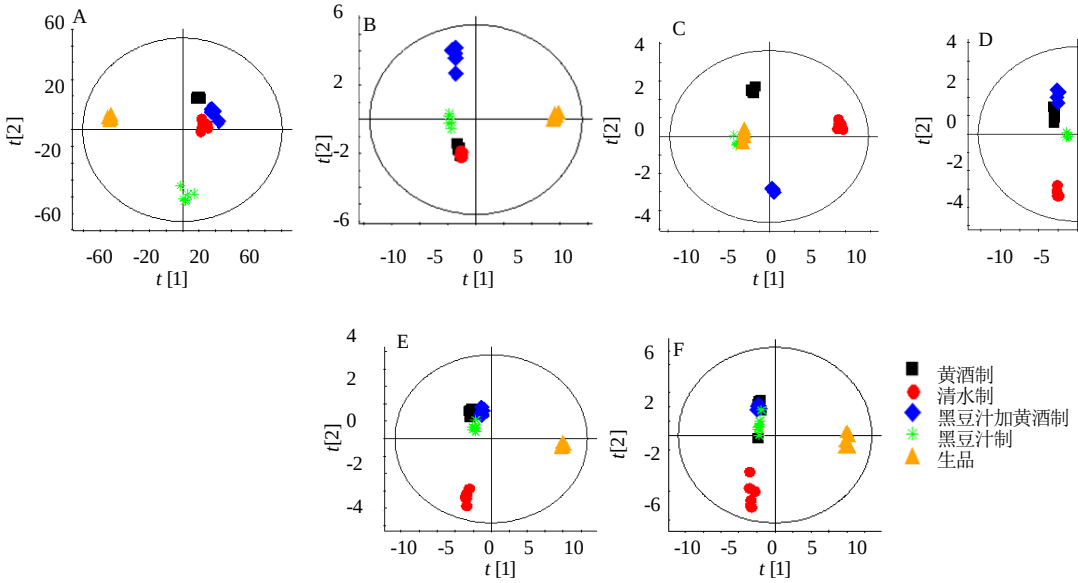

图 3 炮制 6 h（A）、12 h（B）、18 h（C）、24 h（D）、32 h（E）、36 h（F）何首乌炮制品和生品的 OPLS-DA 图

Fig. 3 OPLS-DA plot of *Polygoni Multiflori Radix* and different processed *Polygoni Multiflori Radix* at different processed times

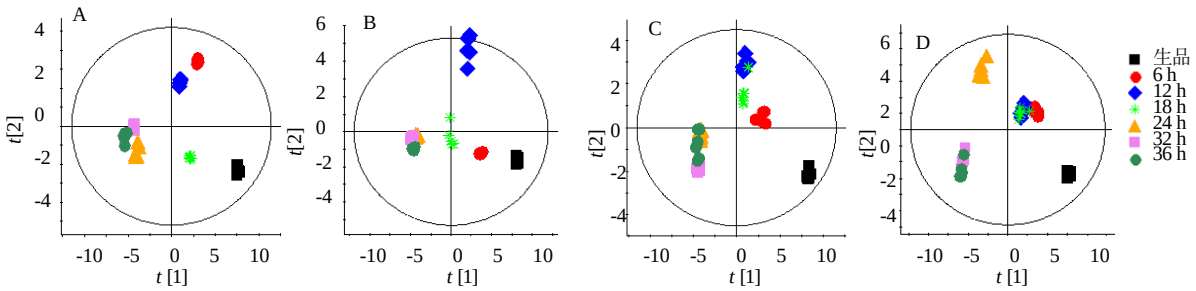

图 4 不同炮制时间黑豆汁制（A）、黄酒制（B）、黄酒加黄酒制（C）和清水制（D）何首乌和生品的 OPLS-DA 图

Fig. 4 OPLS-DA plot of different processed *Polygoni Multiflori Radix* processed with black bean juice (A), yellow rice wine(B), black bean juice plus yellow rice wine (C), and clean water (D) and *Polygoni Multiflori Radix*

2.7 基于 ^{1}H-NMR 差异化学成分鉴定结果

采用 OPLS-DA 分析中的 VIP 值（VIP＞1）作为筛选何首乌不同炮制品间含量差异较大的化学成分，并根据候选差异化学成分在 NMR 数据中的相对峰面积进行 *t* 检验，选择 P＜0.05 作为生物标记物，共得到 15 种生物标志物，大部分为初级代谢产物，少数次级代谢产物，结果见表 2。

2.8 基于 ^{1}H-NMR 何首乌不同炮制方法及炮制时间之间的比较

针对找到的 15 种差异化学成分，利用半定量分析方法，以相对峰面积作为化合物半定量的衡量标准，样品中所含 TSP 作为内标，计算每一个差异化学成分的质量分数，与未炮制组相比，炮制后何首乌中化学成分含量变化的大致趋势如下：在同一炮制时间下，何首乌炮制后化学成分质量分数升高的有苏氨酸、脯氨酸、没食子酸、β-葡萄糖、琥珀酸、乳酸、胆碱；质量分数降低的有乙醇、γ-氨基丁酸、蔗糖；缬氨酸、乙酸、丙氨酸、甘氨酸等代谢物在黑豆汁加黄酒制、黄酒制中含量升高，在黑豆汁制、清水制中含量降低；二苯乙烯苷在何首乌炮制 6 h，4 种炮制品中质量分数比未炮制品高，延长炮制时间，4 种炮制品中二苯乙烯苷的质量分数均低于何首乌生品。

比较何首乌不同炮制时间下差异化学成分的含量变化，共有 6 个炮制时间，分别为 6、12、18、24、32、36 h。将得到差异化学成分的质量分数结果导入到 GraphPad 5.0 软件中以折线图表示，结果见图 5。

表 2 基于 NMR 何首乌炮制后差异化合物

Table 2 Significant changed metabolites of processed *Polygoni Multiflori Radix* based on NMR spectra

编号	代谢产物	*P* 值	编号	代谢产物	*P* 值
3	缬氨酸	＜0.05	13	γ-氨基丁酸	＜0.001
4	乙醇	＜0.001	16	胆碱	＜0.05
5	苏氨酸	＜0.05	17	蔗糖	＜0.001
6	乳酸	＜0.001	18	甘氨酸	＜0.05
7	丙氨酸	＜0.001	20	二苯乙烯苷	＜0.001
9	醋酸乙酯	＜0.001	21	β-葡萄糖	＜0.001
10	脯氨酸	＜0.05	23	没食子酸	＜0.001
11	琥珀酸	＜0.001			

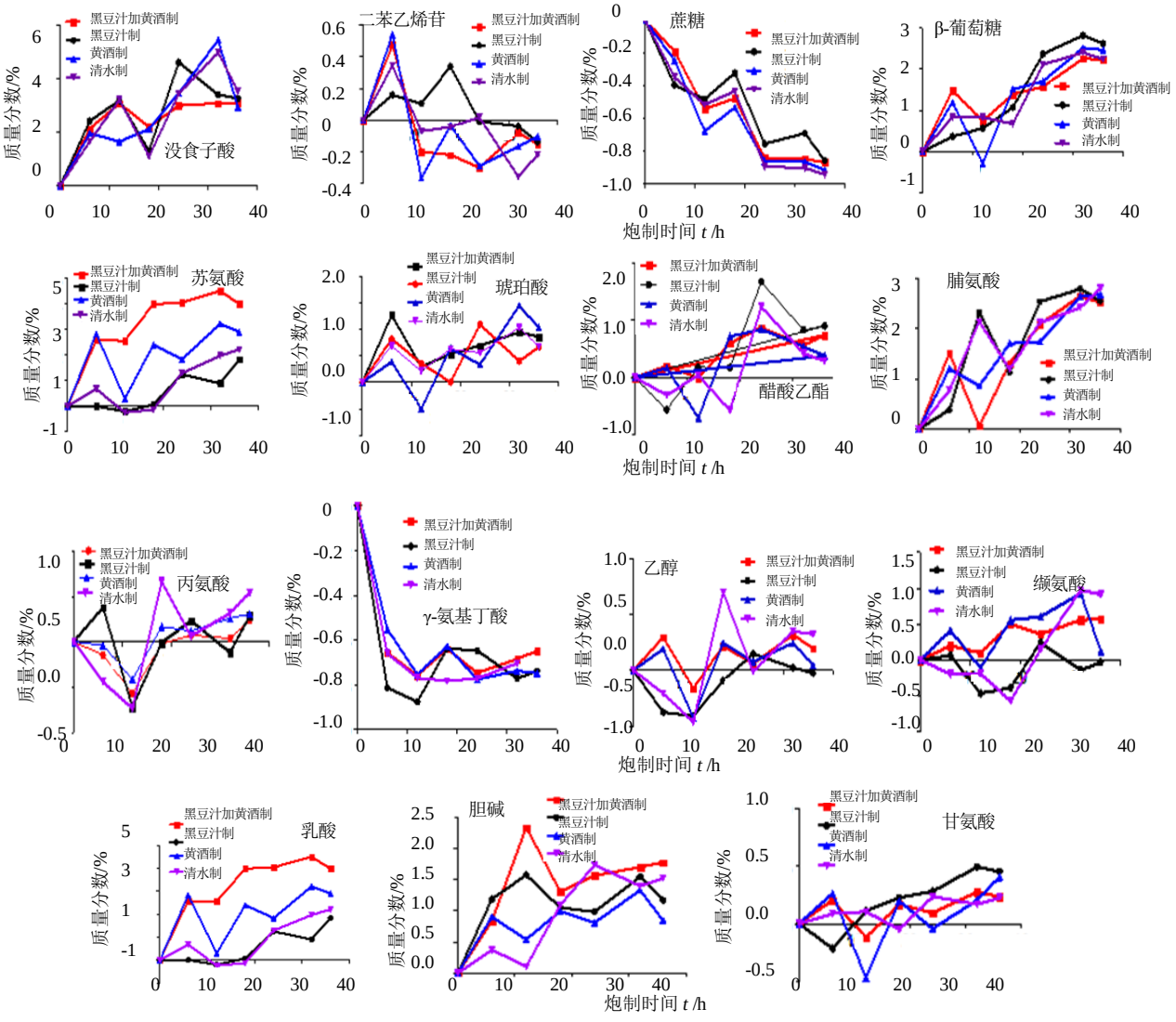

图 5 基于 NMR 何首乌中差异代谢物随炮制时间的变化

Fig. 5 Change of metabolites at various of processing times in different processed *Polygoni Multiflori Radix* based on fingerprint of ^{1}H-NMR

4 种炮制方法随着炮制时间的延长，何首乌中化学成分质量分数变化具有升高趋势的有没食子酸、乳酸、脯氨酸、β-葡萄糖、苏氨酸、胆碱、甘氨酸、琥珀酸；质量分数变化具有降低趋势的是蔗糖、γ-氨基丁酸等；质量分数变化具有先升高后降低趋势的是二苯乙烯苷；先降低后升高的是乙醇、醋酸乙酯、缬氨酸、丙氨酸。

3 讨论

采用 ^{1}H-NMR 植物代谢组学技术对何首乌炮制样品中差异代谢物进行分析比较。利用 2D NMR 图谱、在线数据库（HMDB）、标准品共鉴定出 24 种化合物；利用多变量分析方法（OPLS-DA）共筛选出 15 种差异化学成分，其中大部分成分为初级代谢产物。

根据定量分析方法，比较不同炮制方法在不同炮制时间下差异化合物含量变化，其中何首乌炮制后苏氨酸、脯氨酸、没食子酸、β-*D*-葡萄糖、琥珀酸、乳酸、胆碱、甘氨酸含量具有升高趋势；γ-氨基丁酸、蔗糖具有降低的趋势；二苯乙烯苷的含量是先升高后降低；先降低后升高的是乙醇、醋酸乙酯、缬氨酸、丙氨酸。以上结果表明不同炮制方法、炮制时间均对何首乌中化学成分具有显著的影响，但变化成分与肝毒性之间的关联有待进一步研究，如二苯乙烯苷的含量变化规律为先升高后降低，而有文献报道二苯乙烯苷可以与蒽醌类成分发生药动学上的药物相互作用[18]，这可能与何首乌特异质肝损伤的发生有关系。

参考文献

[1] Li C P, Rao T, Chen X P, *et al*. HLA-B*35:01 allele is a potential biomarker for predicting *Polygonum multiflorum*-induced liver injury in humans [J]. *Hepatology*, 2019, 70(1): 346-357.

[2] Ma J, Zheng L, Deng T, *et al*. Stilbene glucoside inhibits the glucuronidation of emodin in rats through the down-regulation of UDP-glucuronosyltransferases 1A8: application to a drug-drug interaction study in *Radix Polygoni Multiflori* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 162: 61-68.

[3] Lv G P, Meng L Z, Han D Q, *et al*. Effect of sample preparation on components and liver toxicity of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 109: 105-111.

[4] 顾 蘅, 张 毅. 何首乌炮制方法古今研究 [J]. 中医临床研究, 2015, 7(34): 24-26.

[5] 张英华, 胡 馨, 王 平, 等. 何首乌炮制工艺的研究 [J]. 中成药, 2005, 27(8): 916-919.

[6] 李林福, 刘振丽, 宋志前, 等. 何首乌炮制研究进展 [J]. 中国药房, 2007, 18(30): 2377-2379.

[7] 张庆华, 易炳学. 何首乌炮制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 132-136.

[8] 应久皓, 黄德杰, 徐子诚, 等. 何首乌炮制工艺的研究 [J]. 中成药, 1985(11): 1270-1273.

[9] 廖传荣. 何首乌炮制工艺研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2016.

[10] 丘小惠, 马兴田, 闵 江, 等. 何首乌炮制工艺的研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(16): 1270-1273.

[11] Wu X, Li N, Li H, *et al*. An optimized method for NMR-based plant seed metabolomic analysis with maximized polar metabolite extraction efficiency, signal-to-noise ratio, and chemical shift consistency [J]. *Analyst*, 2014, 139(7): 1769-1778.

[12] 周 滢, 罗承娟, 邓中甲. 何首乌炮制历史沿革研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 7(10): 9-10, 38.

[13] 蒋纪洋, 高占秀, 徐淑云. 何首乌古今炮制研究 [J]. 时珍国药研究, 1997(4): 350-352.

[14] 陈 艳, 李 飞, 杨 蕾. 加热时间对何首乌中蒽醌类成分的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(2): 80-82.

[15] 张彩云. 基于植物代谢组学技术的何首乌质量评价研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2016.

[16] 吴香玉. 绿豆萌发的动态代谢组学研究 [D]. 武汉: 中国科学院武汉物理与数学研究所, 2014.

[17] Frédérich M, Wauters J N, Tits M, *et al*. Quality assessment of *Polygonum cuspidatum* and *Polygonum multiflorum* by 1H NMR metabolite fingerprinting and profiling analysis [J]. *Planta Med*, 2010, 77(1): 81-86.

[18] Xing Y C, Wang L L, Wang C X, *et al*. Pharmacokinetic studies unveiled the drug-drug interaction between trans-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-*O*-β-*D*-glucopyranoside and emodin that may contribute to the idiosyncratic hepatotoxicity of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 164: 672-680.