

• 药剂与工艺 •

基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究

王雪洁^{1,2}, 李震宇^{1,2}, 薛水玉^{1,2}, 张福生^{1,2}, 邢 婕^{1,2}, 秦雪梅^{1,2*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要:目的 运用基于¹H-NMR和UPLC的植物代谢组学技术对生远志、蜜远志及甘草制远志进行代谢组学分析。方法 首先采用基于¹H-NMR及UPLC代谢组学技术对生远志及两种炮制品进行分析, 指认初级代谢产物21种, 次级代谢产物8种, 并采用UPLC技术测定三者中细叶远志皂苷的量。结果 生远志与蜜远志、甘草制远志化学成分明显不同; 与蜜远志相比, 生远志与甘草制远志化学成分更加接近; 三者中部分氨基酸、有机酸及糖类等的量变化较大; 与生远志相比, 蜜远志中总皂苷量几乎不变, 甘草制远志则有所上升; 糖酯类化合物3, 6'-二芥子酰基糖酯在甘草制远志中其量降低, 蜜远志中最低, 同时部分次级代谢产物的量也有所不同。结论 从代谢组学整体角度来看, 生远志及其蜜制、甘草制品化学成分差异明显, 说明炮制可改变药性, 导致其功效可能各有不同。

关键词: 远志; 炮制品; ¹H-NMR; UPLC; 代谢组学; 细叶远志皂苷

中图分类号: R283.1; 286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1727-11

Quality control over different processed products of *Polygalae Radix* based on plant metabolomicsWANG Xue-jie^{1,2}, LI Zhen-yu^{1,2}, XUE Shui-yu^{1,2}, ZHANG Fu-sheng^{1,2}, XING Jie^{1,2}, QIN Xue-mei^{1,2}

1. Modern Research Centre for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** Metabolomic analyses of crude, honey-stir-baked (HSB-), and liquorice-stir-boiled (LSB-) *Polygalae Radix* (PR) by using plant metabolomic technology based on ¹H-NMR and UPLC. **Methods** First, a series of metabolites were identified directly from ¹H-NMR spectra and UPLC chromatograms of the above three samples, twenty-one primary and eight secondary metabolites were assigned. Then, the content of tenuifolin in the three samples were determined by UPLC. **Results** The results showed that the chemical constituents in crude PR were obviously different from the processed two samples. Compared with HSB-PR, the chemical constituents in another two samples were similar. The contents of amino acids, organic acid, and carbohydrates changed greatly among the three samples. Compared with crude PR, the content of total saponins in HSB-PR was almost the same but increased in LSB-PR. Meanwhile, the content of 3, 6'-disinapoylsucrose ester in crude PR was the highest, LSB-PR was the second, and the lowest was in HSB-PR. At the same time, the contents of some secondary metabolites were different. **Conclusion** From the metabonomic perspective, chemical constituents in crude, HSB-, and LSB-PR are very different, which shows that the processing may change the medicinal properties so as to lead the various pharmacological activities.

Key words: *Polygalae Radix* (PR); processed drugs; ¹H-NMR; UPLC; metabolomics; tenuifolin

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *P. sibirica* L. 的干燥根^[1], 为临床常用药, 始见于汉·《神农本草经》。性温, 味辛、苦, 归心、肾、脾经, 具安神益智、祛痰开窍、消

收稿日期: 2012-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30900118, 31100244); 山西省国际科技合作项目(2010081070); 山西省太原市科技明星项目(09121003)

作者简介: 王雪洁(1988—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药质量控制研究。Tel/Fax: (0351)7011202 E-mail: xuejiawangsxu@sina.com

*通讯作者 秦雪梅 Tel/Fax: (0351)7011202 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2012-04-27 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120427.0947.001.html>

散痈肿之功效。《雷公炮炙论》记载远志生品有“令人闷”的不良反应,并提出用甘草炮制,《得配本草》也指出远志“生用则刺激人咽喉”,因此远志临床上多使用炮制品。经考证,远志炮制方法可归纳为不加辅料的炒、焙、制炭等和加辅料的甘草制、蜜制、姜汁制、酒制和朱砂制等^[1],根据应用目的不同而采用具体的炮制方法。据考证,蜜制能增强远志化痰止咳作用,而甘草制则减缓其“戟人咽喉”的燥性,协同增加远志补脾益气、安神益智之功效^[2]。临床多使用蜜远志(honey-stir-baked *Polygalae Radix*, HSB-PR)和甘草制远志(liquorice-stir-boiled *Polygalae Radix*, LSB-PR)^[1]。《中国药典》2010年版一部收录的远志炮制品为甘草制远志,说明蜜远志与甘草制远志为应用较广的远志炮制品。

生远志、蜜远志及甘草制远志化学成分的研究多集中在远志酸或远志皂苷元量的对比上^[1,3],结果表明蜜制使远志皂苷元的量有所下降,甘草制则使其量上升。远志皂苷元是远志皂苷酸水解产物,《中国药典》2005年版以远志皂苷元为远志皂苷的定量测定对照品,但由于远志皂苷结构的特殊性,其酸水解产物不单一^[4],因此以远志酸或远志皂苷元等酸水解产物为定量测定对照品不能准确评价远志总皂苷的量。而远志皂苷碱水解产物结构单一,水解产物为细叶远志皂苷,《中国药典》2010年版已将细叶远志皂苷作为远志总皂苷定量测定对照品,对于生远志、蜜远志及甘草制远志中细叶远志皂苷量的对比研究则尚未见报道。

远志化学成分较为复杂,以单一成分为指标无法全面评价远志质量,姜勇等^[5]基于 HPLC 指纹图谱技术结合相似度评价软件对远志不同部位及不同炮制品进行研究,发现蜜制品、甘草制品与生品的指纹图谱未发生明显改变,其认为炮制并不会改变远志中所含化学成分的结构。所采用的 HPLC 技术本身具有选择性,整体性不强,同时相似度评价软件侧重评价相似性,对于炮制引起的细小差异则无法看到,因此需要引入更加整体、更细微的评价方法评价远志生品及其炮制品的质量。

植物代谢组学技术是对植物提取物中代谢组进行无差别代谢成分全分析的高通量分析技术,从不同层面深入阐明初级及次生代谢产物,为中药质量控制打好基础^[6]。核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术由于其具有普适性,能够检测药材中所有含氢代谢产物,但在灵敏度上有一定

的局限性,对质量分数较低且结构复杂的次级代谢产物分析能力较弱。而超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)技术具有较好的分离性能和较高的检测灵敏度,且分析时间短,有机溶剂用量少,检测成本低,方法灵敏、高效、准确^[7],决定其可以有效地对植物中次级代谢产物进行快速、准确地分离鉴定。

因此,本实验采用基于¹H-NMR和UPLC的植物代谢组学技术从整体角度对生远志、蜜远志和甘草制远志代谢组进行代谢组学研究,同时结合UPLC定量测定技术对其细叶远志皂苷的量进行考察,期望从新的角度为远志质量标准制定和传统炮制机制研究提供参考。

1 仪器与材料

Bruker 600 MHz Avance III NMR Spectrometer (600.13 MHz 质子频率,德国布鲁克公司 600 兆核磁仪), Waters Acquity UPLC H-Class (DAD 检测器, Waters 公司)。

重水(Norell, 美国), 氘代甲醇(99.8%, Merck, 德国), 氘代氢氧化钠(Armar, 瑞士), 3-三甲基硅基 [2, 2, 3, 3-*d*₄] 氘代丙酸钠(TSP, Cambridge Isotope Laboratories Inc., MA), 分析纯甲醇(北京化工厂), 色谱纯乙腈、三氟乙酸、甲醇(Tedia, 美国)。细叶远志皂苷为实验室自制,经 HPLC 峰面积归一化法测定其质量分数>98%。

远志样品于 2010 年 10 月采自山西新绛及绛县远志种植基地,经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* Willd. (二年生)的鲜品,阴干、抽心后得生远志。蜜远志及甘草制远志为实验室自制,对新绛及绛县生远志进行蜜制^[1,7]和甘草制^[7],得率分别为 117%、100.7%。样品在 60 °C 下干燥 5 h,液氮研磨,过 40 目筛,保存备用。具体见表 1。

表 1 样品信息
Table 1 Sample information

编号	名 称	来 源	采集时间
1	生远志	山西新绛	2010.10
2	生远志	山西绛县	2010.10
3	蜜远志	山西新绛	2010.11
4	蜜远志	山西绛县	2010.11
5	甘草制远志	山西新绛	2010.11
6	甘草制远志	山西绛县	2010.11

2 方法

2.1 基于¹H-NMR代谢组学技术分析

2.1.1 样品制备 精密称取样品1、3、5粉末各200 mg置10 mL玻璃离心管中,分别加3 mL蒸馏水及3 mL甲醇,加盖漩涡混匀1 min,超声提取25 min,以3 500 r/min室温离心25 min,移取上清液,减压浓缩蒸干。残渣用400 μL氘代甲醇与400 μL缓冲重氘水(缓冲重氘水:KH₂PO₄溶于D₂O中,以1 mol/L氘代氢氧化钠溶液调节pH值至6.0,含0.1% TSP)溶解,以13 000 r/min离心10 min,移取600 μL上清液于5 mm核磁管中,备用。

2.1.2 ¹H-NMR测定 样品在25℃下于600 MHz NMR仪上测定(频率600.13 MHz),扫描次数为64,脉冲宽度为30℃,延迟时间为5.0 s;傅里叶转换线性窗函数为0.3 Hz;相调节、基线调节及峰校正均为手动。所采用测定序列为noesypr1d序列,抑制残余水信号;内标为TSP;以氘代甲醇锁场。

2.1.3 数据分析 核磁图谱采用MestReNova(version 6.2.4, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙)进行处理。以δ 0.04积分段对化学位移区间δ 0.48~10.0进行分段积分,其中δ 4.70~5.02(残余水峰)和δ 3.30~3.38(残余甲醇峰)不进行积分。

积分数据进行归一化后,采用SIMCA-P 11.0(Umetrics, 瑞典)软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA),规格化方法为UV。根据分析结果,找出差异性代谢产物,对其相对峰面积进行 t 检验,以期寻找显著性差异代谢产物。

2.2 基于UPLC代谢组学技术分析

2.2.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈柱(55 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以十八烷基键合硅胶为填充剂;乙腈-0.03%三氟乙酸水溶液为流动相梯度洗脱;运行时间为10 min,洗脱梯度如下:0~1.3 min(11:89),1.3~2.3 min(11:89~19:81),2.3~3.0 min(19:81~27:73),3.0~4.0 min(27:73),4.0~5.0 min(27:73~34:66),5.0~6.0 min(34:66~40:60),6.0~6.5 min(40:60~42:58),6.5~7.5 min(42:58),7.5~8.0 min(42:58~43:57),8.0~9.0 min(43:57),9.0~10.0 min(43:57~11:89);柱温为40℃;体积流量为0.50 mL/min;检测波长为318

nm;进样量为1 μL。

2.2.2 样品制备 取样品1、3、5粉末各约1 g,精密称定,置具塞试管中,加50%甲醇10 mL,称定质量,超声提取40 min,称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,静置,滤过。取续滤液用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 精密度、稳定性和重复性试验 取样品1(生远志)的供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样5次,以考察该方法的精密度;另取该样品供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别在0、3、6、9、12、24 h进样,以考察其稳定性;最后取该样品5份,按“2.2.2”项下制备方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件检测其重复性。上述结果通过数据处理软件分析,结果表明各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,各峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,说明远志样品制备方法的稳定性、超高效液相色谱仪的精密度和检测方法的重复性均良好。

2.2.4 UPLC法测定 分别精密吸取各供试品溶液1 μL,注入超高效液相色谱仪,记录10 min的色谱图,即得。

2.2.5 数据分析 对UPLC色谱图中各色谱峰进行手动积分,记录各色谱峰的峰面积,对峰面积数据进行归一化处理。归一化后数据采用SIMCA-P11.0(Umetrics, 瑞典)软件进行PCA分析,规格化方法为UV。根据PCA分析结果,结合 t 检验,寻找显著性差异代谢产物。

2.3 细叶远志皂苷的定量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈柱(55 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以十八烷基键合硅胶为填充剂,甲醇-0.03%三氟乙酸水溶液(60:40)为流动相等度洗脱,运行时间为6 min,柱温为40℃,体积流量为0.50 mL/min,检测波长为210 nm,进样量为1 μL。理论塔板数按细叶远志皂苷峰计算不低于3 000。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取细叶远志皂苷适量,加甲醇制成5.0 mg/mL对照品溶液。分别精密吸取适量,加甲醇稀释成0.60、1.50、2.40、3.00、3.60、4.50 mg/mL的系列对照品溶液,备用。

2.3.3 供试品溶液的制备^[8] 取各样品粉末约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇10 mL,称定质量,超声处理(功率400 W,频率40 kHz)1 h,放冷,再称定质量,用70%甲醇补

足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL, 置圆底烧瓶中, 蒸干, 残渣加 10% 氢氧化钠溶液 10 mL, 加热回流 2 h, 放冷, 用盐酸调节 pH 值为 4~5, 用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次, 每次 10 mL, 合并正丁醇液, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇适量使溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.3.4 线性关系考察 精密量取质量浓度分别为 0.60、1.50、2.40、3.00、3.60、4.50 mg/mL 的系列对照品溶液各 1 μ L, 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 测定峰面积。以峰面积的积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=1 \times 10^6 X+58\ 206$, $r=0.999\ 5$, 表明细叶远志皂苷在 0.60~4.50 mg/mL 与峰面积值呈良好的线性关系。

2.3.5 精密性、稳定性和重复性试验 精密吸取 5.0 mg/mL 的细叶远志皂苷对照品溶液和样品 1 (生远志) 供试品溶液各 1 μ L, 注入 UPLC 色谱仪, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 5 次, 考察其精密性, RSD 为 1.72%; 取该样品供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 对其进行分析, 考察其稳定性, 测定并计算细叶远志皂苷的量, RSD 为 2.7%, 日内稳定性较好; 取同一批生远志 5 份, 按“2.3.3”项下制备方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件检测其重复性, 测定并计算细叶远志皂苷量的 RSD 为 2.35%。

2.3.6 加样回收率试验 取样品 1 (生远志) 9 份, 每份 0.2 g, 精密称定, 均分为 3 组, 每组分别精密加入一定量对照品溶液 (含细叶远志皂苷分别为 13.02、25.00、39.98 mg), 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定并计算细叶远志皂苷的回收率, 结果平均回收率分别为 100.6%、99.2%、99.7%, RSD 分别为 1.7%、1.5%、1.2%。

2.3.7 样品测定 将样品 1~6 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定。

3 结果

3.1 代谢物指认

3.1.1 $^1\text{H-NMR}$ 结构鉴定 对生远志、蜜远志及甘草制远志的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱进行直观分析, 发现其存在一定差异 (图 1)。分析结果表明, 与生远志相比, 蜜远志 $^1\text{H-NMR}$ 图谱多出的化合物信号主要集中在 $\delta\ 3.21\sim 4.59$, 暗示蜜制所引入化合物主要为糖类化合物, 其中 $\delta\ 4.6$ (d, $J=7.9$ Hz) 为 β -葡萄糖; 甘草

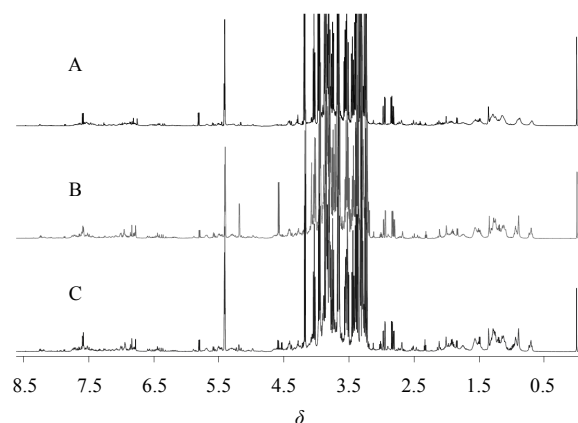


图1 生远志 (A)、蜜远志 (B) 及甘草制远志 (C) 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of crude PR (A), HSB-PR (B), and LSB-PR (C)

制引入的化合物信号主要介于 $\delta\ 4.50\sim 4.60$ 和 $\delta\ 7.34\sim 8.00$ 内, 同样包含 β -葡萄糖 ($\delta\ 4.6$, $J=7.9$ Hz); 此外, $\delta\ 7.34\sim 8.00$ 区为芳香区, 甘草制可能将其中的黄酮类成分引入远志炮制品中。

对生远志提取物 $^1\text{H-NMR}$ 图谱进行结构鉴定, 共指认出 23 种化合物, 其中 21 种为初级代谢产物 (氨基酸类、有机酸类和糖类等, 见表 2) [9-12], 2 种为次级代谢产物。首先, 4 个芳香基质子信号 ($\delta\ 6.5, 6.84, 2\text{H}, \text{s}$) 和 4 个反式烯质子信号 ($\delta\ 6.49, \text{d}, J=15.9$ Hz; $\delta\ 6.47, \text{d}, J=15.9$ Hz; $\delta\ 7.69, \text{d}, J=15.9$ Hz; $\delta\ 7.77, \text{d}, J=15.9$ Hz) 证明 3, 6'-二芥子酰基糖酯的存在 [13]; 同时在图谱中发现五环三萜类皂苷典型的环内双键质子信号 $\delta\ 5.68$ (brs) 和一组角甲基峰信号 $\delta\ 0.75\sim 1.96$ ($\delta\ 1.96, \text{s}, 3\text{H}$; $\delta\ 1.50, \text{s}, 3\text{H}$; $\delta\ 1.04, \text{s}, 3\text{H}$; $\delta\ 0.97, \text{s}, 3\text{H}$; $\delta\ 0.83, \text{s}, 3\text{H}$), 但由于皂苷类结构中酯键所含糖的种类、结构复杂繁多, 无法确认其具体类型, 认为其为五环三萜类皂苷 [14]。

3.1.2 UPLC 指认 从图 2 可看出, 远志生品、蜜制及甘草制品提取物 UPLC 色谱图的差异多集中在峰面积上, 出峰个数差异较小, 说明从 UPLC 角度来看, 炮制并没有引入“外来代谢物”或引入很少, 因此参照文献 [5] 对生远志的 UPLC 图谱中部分色谱峰进行指认, 共指认出 8 种化合物 (见图 3), 其中包括皂苷类化合物: onjisaponin A (峰 26)、onjisaponin K (峰 34) 及 polagalasaponin XXXII (峰 30), 糖酯类化合物: 3, 6'-二芥子酰基糖酯 (峰 10)、tenuifolioside A (峰 13)、tenuifoliose I (峰 18) 及 tenuifoliose H (峰 22), 和咕吨酮类化合物:

表 2 生远志中部分代谢产物 $^1\text{H-NMR}$ 归属
Table 2 $^1\text{H-NMR}$ assignments of major metabolites in crude PR

代谢物	δ_{H}	代谢物	δ_{H}
亮氨酸	0.98 (d, 6.5 Hz), 0.99 (d, 6.5 Hz)	富马酸	6.54 (s)
缬氨酸	1.00 (d, 7 Hz), 1.06 (d, 7 Hz)	对羟基苯甲酸	6.94 (d, 8.8 Hz), 7.92 (d, 8.8 Hz)
苏氨酸	1.33 (d, 6.5 Hz)	甲酸	8.48 (s)
丙氨酸	1.48 (d, 7.2 Hz)	胆碱	3.24 (s)
谷氨酸	2.15 (m), 2.45 (m)	甜菜碱	3.36 (s)
天冬氨酸	2.81 (dd, 16.9, 8.0 Hz), 2.95 (dd, 16.9, 4.0 Hz)	果糖	4.16 (d, 8 Hz)
醋酸	1.93 (s)	α -葡萄糖	5.2 (d, 3.7 Hz)
琥珀酸	2.52 (s)	蔗糖	5.4 (3.7 Hz)
γ -氨基丁酸	3 (t), 2.3 (t, 7.2 Hz)	腺嘌呤	8.22 (s), 8.27 (s)
酒石酸	4.38 (s)	皂苷类	5.68 (brs, H-12), 0.75~1.93 (s, 3H)
马来酸	6.29 (s)	3, 6'-二芥子酰	6.5, 6.84 (s), 6.49 (d, 15.9 Hz), 6.47 (d, 15.9 Hz),
芥子酸	6.41 (d, 16 Hz), 7.55 (d, 16 Hz)	基糖酯	7.69 (d, 15.9 Hz), 7.77 (d, 15.9 Hz)

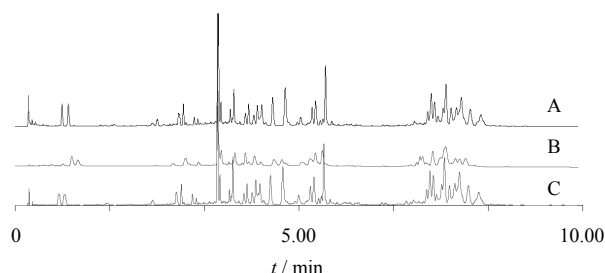


图 2 生远志 (A)、蜜远志 (B) 及甘草制远志 (C) 的 UPLC 色谱图

Fig. 2 UPLC chromatograms of crude PR (A), HSB-PR (B), and LSB-PR (C)

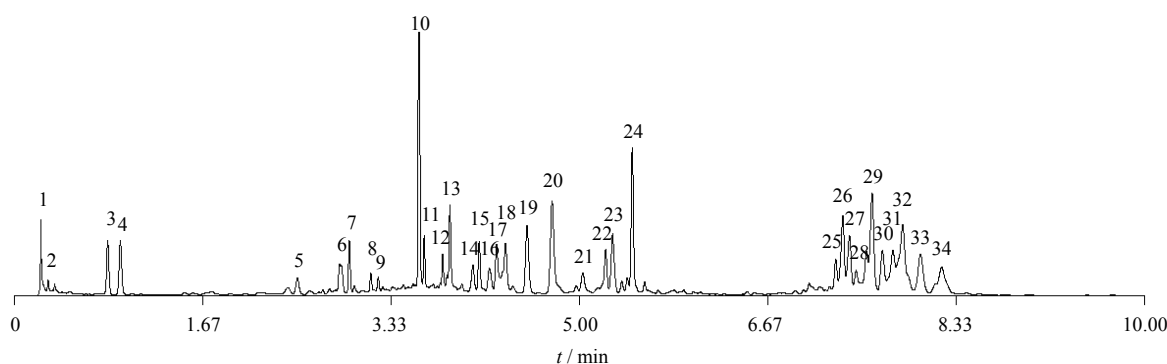


图 3 生远志 UPLC 色谱图

Fig. 3 UPLC chromatogram of crude PR

据处理, 得到 228 个变量, 样品为 3 组 (每组样品数 $n=9$), 得数据矩阵 27×228 , 对其进行 PCA 分析。图 4 为远志生品、蜜制品及甘草制品三者 $^1\text{H-NMR}$ 图谱的 PCA 分析散点图。可以看出, 生远志与两种炮制品明显分开, 说明远志在炮制前后的化

polygalaxanthone IV (峰 15)。

3.2 多元统计分析

对图 1、2 进行直观分析, 可看出生远志、蜜远志及甘草制远志的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱和 UPLC 色谱图存在差异, 特别是三者的 UPLC 色谱图, 保留时间 3.33~5.50 min (咕吨酮苷、蔗糖酯及寡糖酯混合区) 和 6.67~8.00 min (皂苷区) [5] 存在明显不同, 因此对其进行多元统计分析, 能更加准确、客观地寻找差异性代谢产物。

3.2.1 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学分析 根据“2.1.3”项下对远志生品、蜜制及甘草制品 $^1\text{H-NMR}$ 图谱进行数

学组成差异很大, 表明炮制这一操作过程使远志的代谢产物发生了明显改变。还可以看出, 蜜远志与甘草制远志没有完全分开, 部分重叠, 但仍可以看出二者的不同, 表明蜜制品与甘草制品在代谢组上还是存在一定差异。同时, 与蜜制品相比, 甘草制

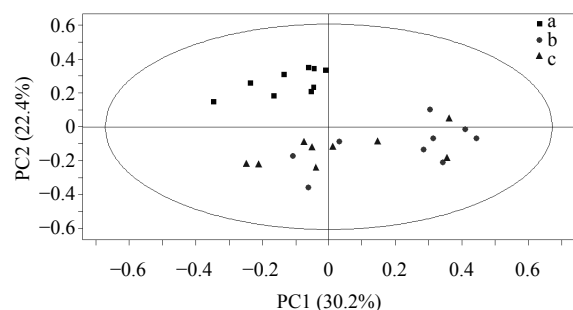


图 4 生远志 (a)、蜜远志 (b) 及甘草制远志 (c) $^1\text{H-NMR}$ 谱图的 PCA 分析散点图

Fig. 4 Scatter plot of PCA analysis on crude PR (a), HSB-PR (b), and LSB-PR (c)

品与生品的距离更短,说明与蜜远志相比,甘草制远志代谢组更接近生远志,化学成分差异更小。

(1) 生、蜜远志 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组差异分析 由“3.2.1”项可知,生远志与蜜远志代谢产物组明显不同,对两者进行进一步 PCA 分析,数据矩阵为 18×228 。图 5 为生远志与蜜远志 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 PCA 分析的散点图和载荷图。从图 5-A 可看出,生远志与蜜远志沿 PC1 轴明显分开,表明两者代谢产物有明显不同,化学成分差异较大。根据载荷图(图 5-B)对差异性代谢成分进行指认,得其差异性成分为缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸、谷氨酸、醋酸、琥珀酸、 γ -氨基丁酸、酒石酸、马来酸、芥子酸、富马酸、胆

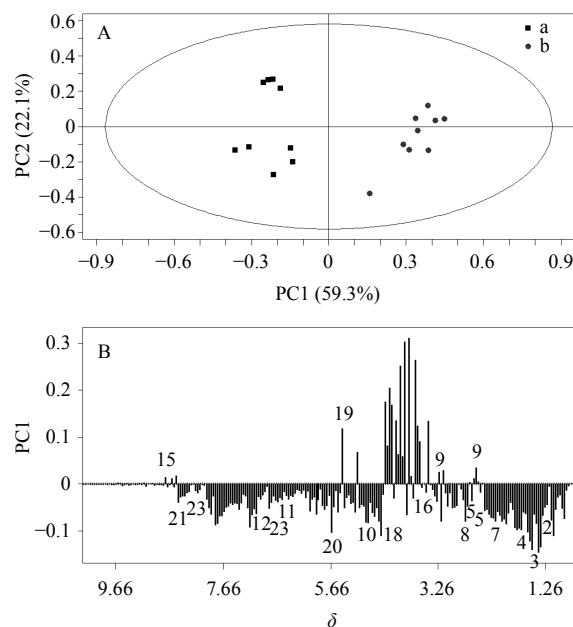


图 5 生远志 (a) 与蜜远志 (b) $^1\text{H-NMR}$ 图谱 PCA 分析的散点图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 5 PCA analysis scatter plot (A) and loading plot (B) in $^1\text{H-NMR}$ spectra of crude PR (a) and HSB-PR (b)

碱、果糖、 α -葡萄糖、蔗糖、腺嘌呤及 3, 6'-二芥子酰基糖酯。对其峰面积进行 t 检验,找出具有显著性差异的代谢产物,结果见表 3。可以看出,与生远志相比,蜜远志中 α -葡萄糖、甲酸的量明显升高,苏氨酸、丙氨酸、果糖和蔗糖的量明显降低,都具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

(2) 生、甘草制远志 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组差异分析 对生远志和甘草制远志的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱进行 PCA 分析,数据矩阵为 18×228 。图 6 为生远志与甘草

表 3 生远志和蜜远志 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中部分显著性差异代谢产物的相对峰面积比较

Table 3 Relative peak areas of significantly different metabolites in $^1\text{H-NMR}$ spectra of crude PR and HSB-PR

代谢物	相对峰面积		变化趋势
	生远志	蜜远志	
苏氨酸	7.47 ± 0.47	$5.32 \pm 1.75^{**}$	↓
丙氨酸	4.76 ± 0.24	$3.28 \pm 0.79^{**}$	↓
甲酸	0.027 ± 0.003	$0.076 \pm 0.031^{**}$	↑
果糖	13.30 ± 0.54	$10.91 \pm 1.41^{**}$	↓
α -葡萄糖	0.60 ± 0.256	$3.50 \pm 1.33^{**}$	↑
蔗糖	18.67 ± 0.955	$14.77 \pm 2.00^{**}$	↓

与生远志相比: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs crude PR

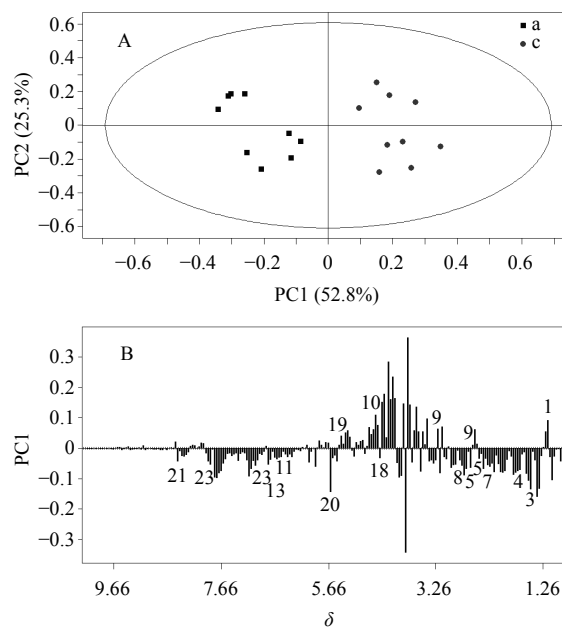


图 6 生远志 (a) 与甘草制远志 (c) $^1\text{H-NMR}$ 图谱 PCA 分析的散点图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 6 PCA analysis scatter plot (A) and loading plot (B) in $^1\text{H-NMR}$ spectra of crude PR (a) and LSB-PR (c)

制远志 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 PCA 分析的散点图和载荷图。图 6-A 表明, PC1 轴将生远志与甘草制远志明分开, 说明两者代谢产物存在差异。根据图 6-B 对差异性代谢产物进行指认, 得其差异性成分为亮氨酸、苏氨酸、丙氨酸、谷氨酸、醋酸、琥珀酸、 γ -氨基丁酸、酒石酸、马来酸、富马酸、果糖、 α -葡萄糖、蔗糖、腺嘌呤及 3, 6'-二芥子酰基糖酯。对其峰面积进行 t 检验, 显著性差异代谢产物的量对比见表 4。可以看出, 与生远志相比, 甘草制远志中亮氨酸与酒石酸的量明显升高, 苏氨酸、丙氨酸、琥珀酸、富马酸和蔗糖的量明显下降, 且亮氨酸、丙氨酸、酒石酸和富马酸具有显著性差异 ($P<0.05$), 苏氨酸、琥珀酸和蔗糖具有极显著性差异 ($P<0.01$)。

表 4 生远志和甘草制远志 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中部分显著性差异代谢产物的相对峰面积比较

Table 4 Relative peak areas of significantly different metabolites in $^1\text{H-NMR}$ spectra of crude PR and LSB-PR

代谢物	相对峰面积		变化趋势
	生远志	甘草制远志	
亮氨酸	2.06 ± 0.88	$3.33 \pm 0.91^*$	↑
苏氨酸	7.47 ± 0.47	$5.60 \pm 1.10^{**}$	↓
丙氨酸	4.76 ± 0.24	$3.89 \pm 0.75^*$	↓
琥珀酸	1.87 ± 0.25	$0.74 \pm 0.25^{**}$	↓
酒石酸	1.16 ± 0.31	$2.08 \pm 0.78^*$	↑
富马酸	0.62 ± 0.18	$0.40 \pm 0.19^*$	↓
蔗糖	18.67 ± 0.955	$15.03 \pm 2.30^{**}$	↓

与生远志相比: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$

$^*P<0.01$ $^{**}P<0.01$ vs crude PR

(3) 蜜制、甘草制远志 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组差异分析 从图 4 得知, PCA 分析可将两种炮制品与生品明显分开, 但这两种炮制品之间则没有完全分开, 因此对蜜远志和甘草制远志的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱进行进一步 PLS-DA 分析, 数据矩阵为 18×228 。图 7 为蜜远志与甘草制远志 $^1\text{H-NMR}$ 图谱 PLS-DA 分析的散点图和载荷图。从图 7-A 可看出, 蜜远志与甘草制远志沿 PC1 轴完全分开, 说明两者的代谢组存在差异, 化学成分有所不同。结合 PLS-DA 分析的载荷图 (7-B), 找出如下差异性代谢产物: 亮氨酸、缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸、醋酸、酒石酸、马来酸、富马酸、果糖、 α -葡萄糖和蔗糖。对差异性成分峰面积数据进行 t 检验, 结果见表 5。可以看出, 与

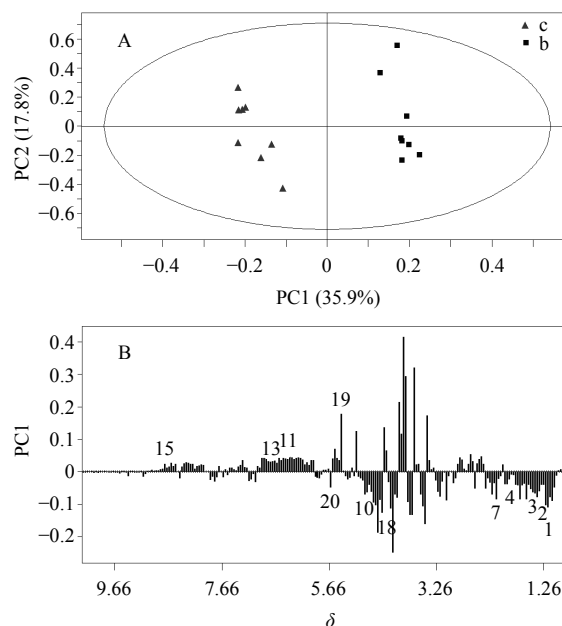


图 7 蜜远志 (b) 与甘草制远志 (c) $^1\text{H-NMR}$ 图谱 PLS-DA 分析的散点图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 7 PCA-DA analysis scatter plot (A) and loading plot (B) in $^1\text{H-NMR}$ spectra of HSB-PR (b) and LSB-PR (c)

表 5 蜜远志和甘草制远志 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中部分显著性差异代谢产物的相对峰面积比较

Table 5 Relative peak areas of significantly different metabolites in $^1\text{H-NMR}$ spectra of HSB-PR and LSB-PR

代谢物	相对峰面积		变化趋势
	蜜远志	甘草制远志	
甲酸	0.076 ± 0.031	$0.034 \pm 0.012^{**}$	↓
α -葡萄糖	3.33 ± 0.67	$1.66 \pm 0.67^{**}$	↓

与蜜远志相比: $^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs HSB-PR

蜜远志相比, 甘草制远志中甲酸和 α -葡萄糖的量明显降低, 且具有极显著性差异 ($P<0.01$)。

3.2.2 UPLC 代谢组学分析 根据“2.2.5”项下对远志生品、蜜制及甘草制品 UPLC 色谱图处理, 得 34 个变量, 样品为 3 组 (每组样品数 $n=6$), 得数据矩阵 18×34 , 对其进行 PCA 分析。图 8 为生远志、蜜远志和甘草制远志 UPLC 色谱图的 PCA 分析散点图。可以看出, 生远志、蜜远志与甘草制远志三者明显分开, 三者代谢组之间存在一定差异, 说明生远志与炮制品之间化学组成存在一定差异, 同时不同的炮制方法对生远志化学组成的改变不同。

(1) 生、蜜远志 UPLC 代谢组差异分析 对生远志与蜜远志的 UPLC 色谱图进行 PCA 分析, 数

据矩阵为 12×34 。图 9 为生远志与蜜远志 UPLC 色谱图 PCA 分析的散点图和载荷图。图 9-A 表明, 生远志与蜜远志沿 PC1 轴明显分开, 二者代谢组明显不同, 化学成分差异较大。对图 9-B 进行分析, 得生远志与蜜远志差异性代谢成分: 3, 6'-二芥子酰基糖酯、tenuifolioside A、tenuifolioside I、tenuifolioside H、polygalaxanthone IV、polagalasaponin XXXII、onjisaponin A 和 onjisaponin K。对其峰面积进行 t 检验, 找出显著性差异代谢产物 (表 6)。可以看出, 与生远志相比, 蜜远志中 tenuifolioside I 与 onjisaponin A

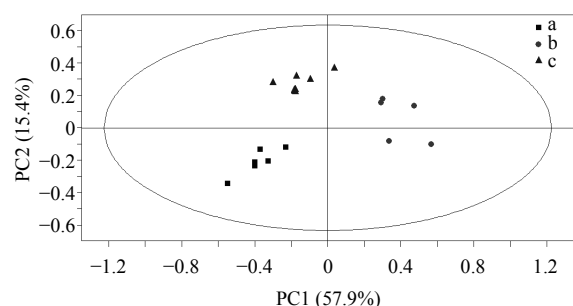
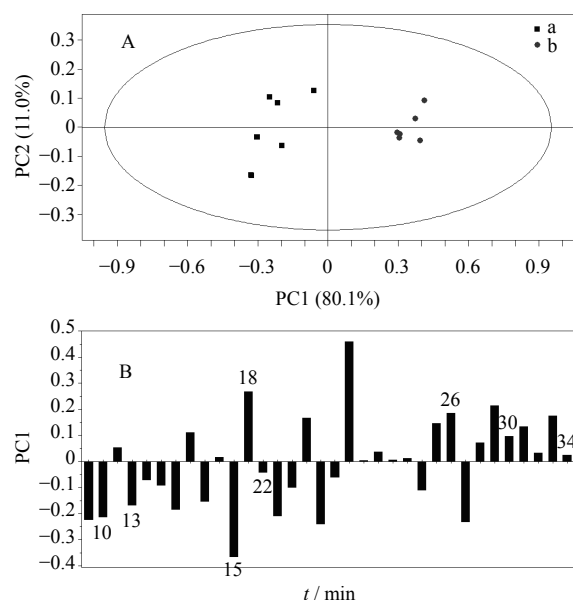


图 8 生远志 (a)、蜜远志 (b) 及甘草制远志 (c) UPLC 色谱图的 PCA 分析散点图

Fig. 8 PCA analysis scatter plot in UPLC of crude PR (a), HSB-PR (b), and LSB-PR (c)



$t=2.76, 3.39, 3.65, 3.70, 3.81, 3.88, 3.92, 4.00, 4.06, 4.11, 4.25, 4.40, 4.51, 4.66, 4.84, 4.91, 5.00, 5.09, 5.20, 5.47, 5.63, 5.69, 6.30, 6.82, 7.03, 7.09, 7.14, 7.20, 7.31, 7.39, 7.45, 7.52, 7.65, 7.81$ min

图 9 生远志 (a) 与蜜远志 (b) UPLC 图谱 PCA 分析的散点图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 9 PCA analysis scatter plot (A) and loading plot (B) in UPLC of crude PR (a) and HSB-PR (b)

表 6 生远志和蜜远志 UPLC 色谱图中部分显著性差异代谢产物的相对峰面积比较

Table 6 Relative peak areas of significantly different metabolites in UPLC of crude PR and HSB-PR

代谢物	相对峰面积		变化趋势
	生远志	蜜远志	
3, 6'-二芥子酰基糖酯	340.01 ± 6.91	275.11 ± 2.22**	↓
tenuifolioside A	32.22 ± 4.31	25.37 ± 0.52*	↓
polygalaxanthone IV	82.43 ± 2.31	57.06 ± 2.45**	↓
tenuifolioside I	34.32 ± 3.30	46.11 ± 10.16**	↑
tenuifolioside H	7.10 ± 0.50	3.57 ± 0.56**	↓
onjisaponin A	2.52 ± 0.38	3.37 ± 0.15**	↑

与生远志相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs crude PR

的量上升, 3, 6'-二芥子酰基糖酯、tenuifolioside A、polygalaxanthone IV 及 tenuifolioside H 的量下降。且 tenuifolioside A 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 3, 6'-二芥子酰基糖酯、polygalaxanthone IV、tenuifolioside I、tenuifolioside H 和 onjisaponin A 具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

(2) 生、甘草制远志 UPLC 代谢组差异分析 对生远志与甘草制远志 UPLC 色谱图进行 PCA 分析, 数据矩阵为 12×34 。图 10 为生远志与甘草制远志 UPLC 色谱图 PCA 分析的散点图和载荷图。图 10-A 显示, 生远志与甘草制远志沿 PC1 轴完全分开, 两者代谢产物存在差异, 化学组成不同。结合图 10-B, 可知其差异性代谢成分为 polygalaxanthone IV、3, 6'-二芥子酰基糖酯、tenuifolioside A、polagalasaponin XXXII、tenuifolioside I、tenuifolioside H、onjisaponin A 和 onjisaponin K。对其峰面积进行 t 检验, 结果见表 7。结果表明, 与生远志相比, 甘草制远志中 tenuifolioside I、polagalasaponin XXXII 和 onjisaponin K 的量上升, polygalaxanthone IV、3, 6'-二芥子酰基糖酯及 tenuifolioside H 的量则下降。且 tenuifolioside I 和 onjisaponin K 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 3, 6'-二芥子酰基糖酯、tenuifolioside H、polagalasaponin XXXII 和 polygalaxanthone IV 具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

(3) 蜜制、甘草制远志 UPLC 代谢组差异分析 从图 8 可看出, PCA 分析可使蜜远志与甘草制远志完全分开, 所以对蜜远志和甘草制远志 UPLC 图谱

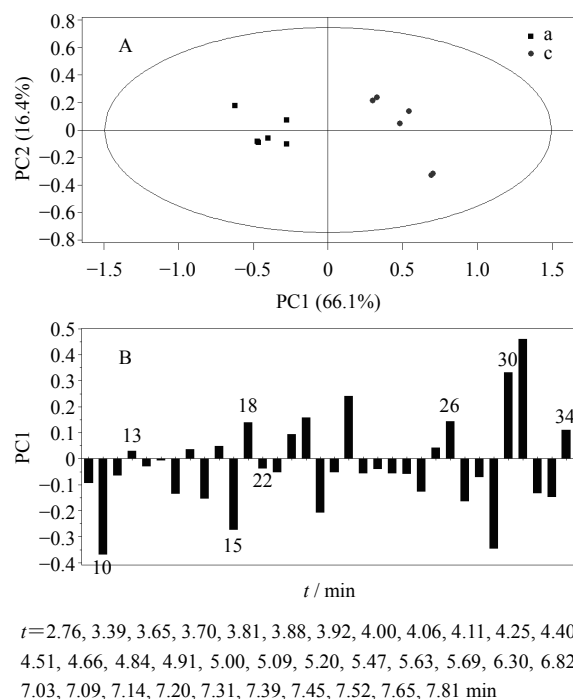


图 10 生远志 (a) 与甘草制远志 (c) UPLC 图谱 PCA 分析的散点图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 10 PCA analysis scatter plot (A) and loading plot (B) in UPLC of crude PR (a) and LSB-PR (c)

表 7 生远志和甘草制远志 UPLC 色谱图中部分显著性差异代谢产物的相对峰面积比较

Table 7 Relative peak areas of significantly different metabolites in UPLC of crude PR and LSB-PR

代谢物	相对峰面积		变化趋势
	生远志	甘草制远志	
3, 6'-二芥子酰基糖酯	340.01 ± 6.91	255.11 ± 27.22**	↓
polygalaxanthone IV	324.3 ± 12.3	210.6 ± 24.5**	↓
tenuifolioside I	4.32 ± 0.85	6.21 ± 0.16*	↑
tenuifolioside H	8.30 ± 0.20	47.17 ± 0.56**	↓
polagalasaponin XXXII	1.14 ± 0.76	7.45 ± 0.71**	↑
onjisaponin K	2.42 ± 0.06	3.17 ± 0.59*	↑

与生远志相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs crude PR

进行多元统计分析, 寻找两种炮制品间化学成分差异, 数据矩阵为 18×228 。图 11 为蜜远志与甘草制远志 UPLC 图谱 PCA 分析的散点图和载荷图。图 11-A 显示, 蜜远志与甘草制远志沿 PC1 轴明显分开, 说明两者代谢组明显不同, 化学成分差异很大,

根据图 11-B 分析结果, 得两者差异性代谢产物有 polygalaxanthone IV、polagalasaponin XXXII、3, 6'-二芥子酰基糖酯、tenuifolioside A、tenuifolioside I、tenuifolioside H、onjisaponin A 和 onjisaponin K。对差异性代谢产物的色谱峰面积进行 t 检验, 结果见表 8。结果表明, 与蜜远志相比, 甘草制远志中 tenuifolioside I、3, 6'-二芥子酰基糖酯的量升高, tenuifolioside H 的量降低。3, 6'-二芥子酰基糖酯质量分数具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 tenuifolioside I 和 tenuifolioside H 则具有极显著性差异 ($P < 0.001$)。

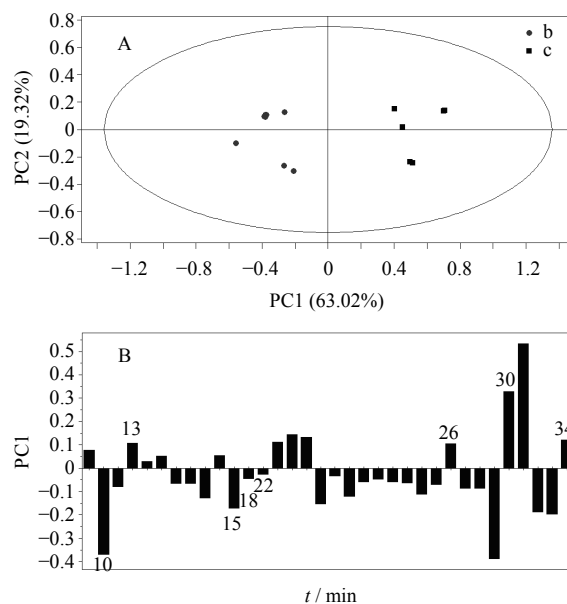


图 11 蜜远志 (b) 与甘草制远志 (c) UPLC 图谱 PCA 分析的散点图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 11 PCA analysis scatter plot (A) and loading plot (B) in UPLC HSB-PR (b) and LSB-PR (c)

表 8 蜜远志和甘草制远志 UPLC 色谱图中部分显著性差异代谢产物的相对峰面积比较

Table 8 Relative peak areas of significantly different metabolites in UPLC of HSD-PR and LSB-PR

代谢物	相对峰面积		变化趋势
	蜜远志	甘草制远志	
3, 6'-二芥子酰基糖酯	275.21 ± 27.22	325.11 ± 2.22*	↑
tenuifolioside I	0.71 ± 0.01	4.91 ± 0.16***	↑
tenuifolioside H	4.72 ± 0.56	0.37 ± 0.06***	↓

与蜜远志相比: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs HSB-PR

3.3 细叶远志皂苷的测定

将远志生品、蜜制及甘草制品按“2.3.7”项下方法测定, UPLC 色谱图见图 12, 并按回归方程 $Y=1 \times 10^6 X+58\ 206$ ($r=0.999\ 5$) 进行计算, 结果见表 9。结果表明, 与生远志相比, 蜜远志与甘草制远志中细叶远志皂苷质量分数均有所变化, 其中, 蜜远志中细叶远志皂苷质量分数与生远志相比稍有下降, 无显著性差异; 而甘草制远志中细叶远志皂苷质量分数则明显上升, 且具有极显著性差异 ($P<0.01$)。说明蜜制对远志总皂苷质量分数影响不大, 而甘草制则使其质量分数显著上升。

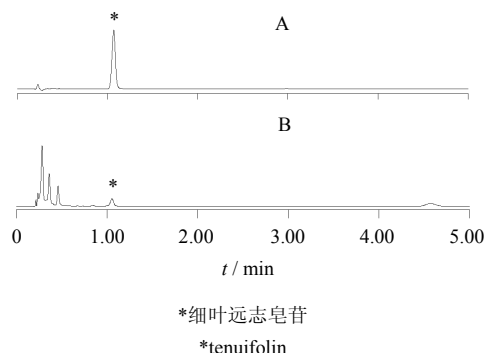


图 12 细叶远志皂苷对照品 (A) 和生远志 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 12 UPLC chromatograms of tenuifolin reference substance (A) and crude PR (B)

表 9 生远志、蜜远志及甘草制远志中细叶远志皂苷的质量分数及其变化趋势 ($n=3$)

Table 9 Content and changes of tenuifolin in crude PR, HSB-PR, and LSB-PR ($n=3$)

编号	样 品	质量分数 / %	RSD / %	变化 趋势
1	生远志 (新绛)	2.63	1.00	
2	生远志 (绛县)	2.61	1.03	
3	蜜远志 (新绛)	2.58	1.20	↓
4	蜜远志 (绛县)	2.56	1.15	↓
5	甘草制远志 (新绛)	3.67**	0.95	↑
6	甘草制远志 (绛县)	3.63**	0.96	↑

与生远志相比: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs crude PR

综上所述, 与生远志相比, 蜜远志总皂苷的量几乎不变, 氨基酸类物质苏氨酸和丙氨酸的量下降; 有机酸类甲酸的量下降; 糖类成分 α -葡萄糖的量升高, 果糖及蔗糖的量下降; 糖酯类化合物 3, 6'-二芥子酰基糖酯、tenuifolioside A 和 tenuifolioside H 的量下

降, tenuifolioside I 的量有所上升; 咕吨酮类化合物 polygalaxanthone IV 的量下降。甘草制远志中总皂苷的量明显上升, 氨基酸类物质苏氨酸和丙氨酸的量降低, 亮氨酸的量有所升高; 有机酸类酒石酸的量上升, 琥珀酸与富马酸的量下降; 糖类蔗糖的量降低; 糖酯类化合物 3, 6'-二芥子酰基糖酯和 tenuifolioside H 的量下降, tenuifolioside I 的量上升; 咕吨酮类化合物 polygalaxanthone IV 的量有所上升。可看出远志生品与蜜制品、甘草制品代谢组存在一定差异, 化学成分有很大不同, 说明炮制会对药材化学成分产生一定影响。

另外, 与蜜远志相比, 甘草制远志中总皂苷类的量显著性增高, 3, 6'-二芥子酰基糖酯、tenuifolioside I 的量明显升高, 甲酸、 α -葡萄糖、tenuifolioside H 的量显著降低。说明蜜远志与甘草制远志化学成分存在一定差异, 提示不同炮制方法对生品代谢组的改变有所不同。

4 结果与讨论

远志炮制方法历代医方本草均有记载, 演变至今以蜜制、甘草制^[15]应用较为广泛。中医炮制理论认为蜜炙有增强远志化痰止咳活性功效, 历来就有“蜜炙甘缓而润肺”之说^[16], 这可能是蜜远志的由来。《雷公炮炙论》指出“去心后, 熟甘草汤浸一宿”, 为远志甘草炮制提供依据。同时, 生远志亦从《本经》时代沿用至今。说明远志生品、蜜制及甘草制品在临床使用都具悠久历史, 本研究旨在为其临床分开应用提供化学支持。

众所周知, 中药中有效成分多为其次级代谢产物。远志中皂苷类成分为最主要的化学成分, 在远志降血糖、镇静及祛痰等药理活性中起到非常重要的作用^[17], 同时糖酯类代表性成分 3, 6'-二芥子酰基糖酯作为远志抗抑郁的主要活性成分^[18], 其量多寡极可能与远志的抗抑郁活性有密切关系, 而咕吨酮类成分活性主要集中在抗菌、止痛等活性上^[19], 但有关 polygalaxanthone IV 的活性研究较少。本研究表明蜜制对于远志中皂苷类成分质量分数影响不大, 糖酯类 3, 6'-二芥子酰基糖酯和咕吨酮类 polygalaxanthone IV 质量分数有所降低; 而甘草制则使远志总皂苷和咕吨酮类成分 polygalaxanthone IV 质量分数升高, 糖酯类 3, 6'-二芥子酰基糖酯质量分数则有所下降。同时, 植物中的初级代谢产物也具有一定的药理活性, 苏氨酸和丙氨酸作为哺乳动物的必需氨基酸, 有助于人体恢复疲劳、促进生

长发育、缓和低血糖及改善身体能量等,蔗糖是重要的能源物质之一,能够为人体提供能量并维持体温,这三者对于人体来说都是非常重要的物质,其在生远志中质量分数较高。另外,蜜远志中质量分数较高的琥珀酸在人体有抑菌、抗溃疡及提高免疫功能等作用。甘草制远志中高质量分数的富马酸可以作为抗氧化剂进行使用。而亮氨酸则能够促进生长激素分泌,并帮助燃烧节食和锻炼极难产生效果的内脏脂肪,其在蜜制及甘草制品中质量分数都较高。

综上所述,生远志、蜜远志及甘草制远志化学成分各不相同,导致其药理活性可能也不尽相同。其中,生远志中3,6'-二芥子酰基糖酯质量分数最高,制远志总皂苷质量分数最高,这可能导致两者具有不同的药理活性;同时蜜远志中总皂苷和3,6'-二芥子酰基糖酯质量分数与生远志相比,都有所下降,其可能更有利于止咳方面的治疗,因此三者在应用时可根据用途不同而适当选取,即所谓的对症下药。实验结果表明,中药成分复杂多变,不同成分的改变可能对应不同的药理活性,同时从化学角度证明炮制可整体改变药性及药效。本研究从新的角度对远志生品及制品进行评价,为传统药物研究提供了新的思路。

参考文献

- [1] 房敏峰,付志玲,王相人,等.炮制对远志中皂苷元类成分的影响[J].药物分析杂志,2009,29(3):452-457.
- [2] 单建学.远志的炮制及临床应用[J].湖南中医药导报,2001,7(2):89.
- [3] 夏厚林,董敏,盛燕,等.远志蜜炙前后化学成分的对比较研究[J].时珍国医国药,2006,17(9):1620-1621.
- [4] 董晓兵,李军,郑颖,等.远志皂苷对照品细叶远志皂苷的制备[J].中药新药与临床药理,2007,18(1):53-54.
- [5] 姜勇,张娜,崔振,等.远志药材的HPLC指纹图谱[J].药学学报,2006,41(2):179-183.
- [6] 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.
- [7] 杨柳,苏芝军,许舜军,等.UPLC法同时测定苍耳子中4种酚酸类成分的含量[J].药学报,2010,45(12):1537-1540.
- [8] 中国药典[S].一部.2010.
- [9] Kim M R, Lee J Y, Lee H H, et al. Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(8): 1299-1307.
- [10] López-Gresa M P, Maltese F, Bellés J M, et al. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21(1): 89-94.
- [11] Lubbe A, Choi Y H, Vreeburg P, et al. Effect of fertilizers on galanthamine and metabolite profiles in *Narcissus bulbs* by ^1H NMR [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(7): 3155-3161.
- [12] Ali K, Maltese F, Toepfer R, et al. Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses [J]. *J Biomol NMR*, 2011, 49(3/4): 255-266.
- [13] Ikeya Y, Sugama K, Okada M, et al. Four new phenolic glycosides from *Polygala tenuifolia* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(10): 2600-2605.
- [14] Sakuma S, Shoji J. Studies on the constituents of the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow. II.¹⁾ On the structures of onjisaponins A, B and E [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, 30(3): 810-821.
- [15] 叶定江,张世臣.中药炮制学[M].北京:人民卫生出版社,1999.
- [16] 姜勇,屠鹏飞.远志研究进展[J].中草药,2001,32(8):759-761.
- [17] 傅晶,张东明,陈若芸.远志属植物的皂苷类成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2006,37(1):144-146.
- [18] Liu P, Hu Y, Guo D H, et al. Potential antidepressant properties of *Radix Polygalae* (Yuan Zhi) [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(10): 794-799.
- [19] 杨学东,徐丽珍,杨世林.远志属植物中吡啶类成分及其药理研究进展[J].天然产物研究与开发,2000,12(5):88-94.