

基于 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术研究“杀青”对连翘化学成分的影响

贾金萍^{1,2}, 张福生², 李震宇², 马开庆², 罗 辉³, 张立伟^{1*}

1. 山西大学分子科学研究所, 山西 太原 030006

2. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

3. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘 要: **目的** 采用核磁共振的代谢组学技术研究“杀青”对连翘 *Forsythia suspense* 化学成分的影响。**方法** 对连翘生品与杀青品的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱进行分析; 将核磁数据导入 SMICA-P 软件进行多元统计分析, 寻找二者的差异代谢物; 并通过生物合成途径分析主要差异代谢物的降解途径。**结果** 共指认 24 个代谢物, 主成分分析 (PCA) 显示连翘生品与杀青品能明显区分, 说明它们的代谢物组成有显著差异。正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 的 S-plot 结合变异权重参数 (VIP) 显示生品与杀青品的化学差异主要涉及 10 个代谢物, 杀青品中连翘酯苷 A、连翘酯苷 C、连翘苷、芦丁、蔗糖的量较高, 而生品中连翘环己醇、连翘环己醇苷、连翘环己醇酮、 α -葡萄糖、 β -葡萄糖的量较高。并推测生品中连翘酯苷 A 大幅降低的原因在于降解为连翘环己醇。**结论** 从整体代谢物轮廓分析“杀青”对连翘化学组成的影响, 证实了传统连翘产地加工“杀青”环节的合理性和必要性, 也为连翘的活性成分群研究和多指标质量标准建立奠定了基础。

关键词: 连翘; $^1\text{H-NMR}$; 代谢组学; 杀青; 多元统计分析; 连翘酯苷 A

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)08-1375-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.022

Effect of deactivation of enzymes on chemical composition of *Forsythiae Fructus* using $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics approach

JIA Jin-ping^{1,2}, ZHANG Fu-sheng², LI Zhen-yu², MA Kai-qing², LUO Hui³, ZHANG Li-wei¹

1. Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

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

Abstract: Objective To investigate the effect of deactivation of enzymes on chemical composition of *Forsythiae Fructus* using NMR based metabolomics approach. **Methods** $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics approach combined with multivariate statistical analysis was used to investigate the differential metabolites between raw *Forsythiae Fructus* (RF) and *Forsythiae Fructus* with deactivation of enzymes (DF). And degradation pathway of significant metabolites was inferred by biosynthetic pathway. **Results** Twenty-four metabolites were identified in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of *Forsythiae Fructus*, and principal component analysis (PCA) showed clear separation between RF and DF. The S-plot of orthogonal partial least square discriminate analysis (OPLS-DA) revealed that ten compounds contributed to the separation of RF and DF, and the levels of forsythiaside A, forsythiaside C, phillyrin, rutin, and sucrose were higher in DF than those in RF, while the levels of rengyol, rengyoside, rengyolone, α -glucose, and β -glucose were higher in RF than those in DF. Moreover, the degradation of forsythiaside A into rengyol was proposed. **Conclusion** This study reveals the chemical effect of deactivation of enzymes on *Forsythiae Fructus* in a holistic manner, which confirms rationality and necessity of deactivation of enzymes during the processing of *Forsythiae Fructus*. This study also serves as a basis for the bioactive compounds and quality standards research of *Forsythiae Fructus*.

Key words: *Forsythiae Fructus*; $^1\text{H-NMR}$; metabolomics; deactivation of enzymes; multivariate statistical analysis; forsythiaside A

连翘始载于《神农本草经》,列为下品,历版《中国药典》均有收载,被李时珍誉为“疮家圣药”,是

我国 40 种常用大宗药材品种之一,也是清热解毒类中成药如双黄连、银翘解毒片等的重要原料。连翘

收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 科技部科技支撑计划项目 (2011BAI07B06); 山西省科学技术发展计划项目 (20110313001-1); 山西省科技创新重点团队 (2013131015)

作者简介: 贾金萍,女,博士研究生,研究方向为中医药代谢组学研究。Tel: (0351)7019297 E-mail: jiajp@sxu.edu.cn

*通信作者 张立伟,男,教授,博士生导师,研究方向为天然产物研究。Tel: (0351)7018113 E-mail: lwzhang@sxu.edu.cn

味苦、性微寒，归肺、心、小肠经，具有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功效^[1-2]。现代药理研究表明其具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、调血脂等作用。连翘主要含苯乙醇苷类、木脂素类、三萜类、黄酮类、C₆-C₂ 天然醇类及挥发油类等成分^[3-5]。《中国药典》2015 年版收载的连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实，依据果实的成熟度分为青翘（秋季果实初熟尚带绿色时采收，除去杂质，蒸熟，晒干）和老翘（果实熟透时采收，晒干，除去杂质）^[1]。连翘广泛分布于我国山西、河南、河北、陕西、湖北、四川等地，其中市场上 50% 以上的连翘药材资源由山西供给^[6-7]，目前市场上青翘为连翘药材的主要商品来源。

青翘是指连翘初熟尚带绿色的果实经过蒸熟、晒干等产地初加工过程而形成，这一蒸熟、晒干的过程习称为“杀青”。“杀青”是药材初加工的重要环节，该环节对青翘品质有重要影响，其是通过一定的方法和条件破坏鲜活药材中的各类酶活性，从而抑制化学成分的酶促反应及水解反应^[8-9]。常采用的“杀青”方法有晒青、蒸制及煮制。关于这方面的文献报道主要集中在不同的“杀青”技术比较及工艺的优化^[10-15]。而关于生品与杀青品化学成分的比较研究报道较少，本课题组前期研究发现连翘生品与杀青品相比，连翘酯苷 A 显著降低^[16-17]，上述研究在一定程度上解释了连翘杀青环节的重要性，但由于连翘药材的化学成分复杂，仅以连翘酯苷 A 为检测指标无法全面评价“杀青”对连翘化学成分的影响，仍需对其进行整体化学组成分析。

代谢组学是一种以高通量检测和数据处理为手段，对代谢物进行无差别全面分析的技术，适合于植物尤其是传统中药等复杂体系分析^[18]。基于核磁共振氢谱（¹H-NMR）的代谢组学分析技术具有备样方法简单、重现性好、分析时间短、可以获得几乎全部含氢化合物信息的优点^[19]，目前已成功应用于人参^[20]、当归^[21]、白芍^[22]、远志^[23]等多种药材的化学分析。因此，本研究拟采用基于 ¹H-NMR 的代谢组学技术从整体化学物质组成角度研究“杀青”对连翘化学成分的影响，阐释连翘药材产地初加工“杀青”环节对于连翘药材品质的重要性及科学性。

1 材料

本实验所用连翘果实于 2014 年 8 月 27 日采摘于山西太原山西大学校园 6 株连翘，样品经山西大

学张立伟教授鉴定为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb) Vahl 的未完全成熟果实（青翘），采集后样品分成 2 份，一份直接阴干备用（生品，RF）；另一份按本课题组建立的杀青工艺^[24]，加水量为鲜连翘的 6 倍，沸水煮 8 min，平摊开，阴干后备用（杀青品，DF）；标本保存在山西大学分子科学研究所。NMR 试剂 D₂O 购于 Norell (Landisville, 美国)；Methanol-d₄ (99.8%) 购于 Merck (Darmstadt, 德国)；NaOD 购于 Armar (Dottingen, 瑞典)；3-(三甲硅烷基)丙酸-d₄ 钠盐 (TSP) 购于 Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA)，其余试剂均为分析纯。

Bruker AVANCE III 600 MHz NMR spectrometer (600.13 MHz proton frequency, 德国布鲁克公司 600 MHz 磁仪)；SC-3610 低速离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）；TGL-16 高速台式冷冻离心机（湖南湘仪离心机仪器有限公司）；超声波清洗器（KQ5200E，昆山市超声仪器有限公司）；旋转蒸发仪（RE-52A，上海亚荣生化仪器厂）。

2 方法

2.1 样品制备

分别称取各样品粉末 300 mg，置于 10 mL 具塞离心管中，加入甲醇和水各 3 mL，先涡旋混匀 1 min，再超声提取 25 min 后，室温下离心（3 500 r/min）30 min，移取上清液至 25 mL 圆底烧瓶中，减压浓缩蒸干，置干燥器中。于测定前用氘代甲醇 400 μL 与重水缓冲液（KH₂PO₄ 溶于 D₂O 中，以 1 mol/L NaOD 溶液调节 pH 值至 6.0，含 0.05% TSP）400 μL 溶解，然后转移至 1.5 mL 离心管中，低温离心（13 000 r/min）10 min，取上清液 600 μL 于 5 mm 核磁管中，待测。

2.2 ¹H-NMR 测定

样品于 600 MHz NMR (25 °C) 仪上测定，采用 noesygppr1d 脉冲序列，扫描次数为 64，谱宽 12 345.7 Hz，脉冲角度 90°，采样时间 2.654 2 s，延迟时间 1.0 s，采样数据点 65 536，采样间隔 40.5 μs，内标为 TSP。

2.3 数据分析

核磁图谱采用 MestReNova (version 8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 进行处理。核磁图谱经过定标、手动相位、基线校准后，以 0.04 积分段对化学位移 δ 0.5~10.0 进行分段积分，其中 δ 4.76~4.94（残余水峰）和 δ

3.30~3.38 (残余甲醇峰) 不进行积分。将积分数据导入 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Sweden) 软件中进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 再用偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal PLS-DA, OPLS-DA) 找出差异代谢物, 并用 SPSS16.0 软件对代谢物采用独立样本 t 检验进行分析。

3 结果

3.1 $^1\text{H-NMR}$ 代谢物指认

连翘生品与杀青品的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱如图 1 所示, 通过与对照品、BMRB (www.bmr.b.wisc.edu.com) 数据库中的标准物质及文献报道数据^[25-29]对照, 共指认出 24 个代谢产物 (表 1)。 $^1\text{H-NMR}$ 图谱可以大致分为 3 个区域: 有机酸和氨基酸区 (δ 3.10~0.00) 主要包括缬氨酸、丙氨酸、精氨酸、苹果酸、琥珀酸等, 此外该区还有苯乙醇苷类及 $\text{C}_6\text{-C}_2$ 天然醇类次生代谢产物的甲基信号, 如连翘酯苷 A (δ 1.22, d)、连翘酯苷 C (δ 1.25, d)、连翘环己醇 (δ 1.73, t)、连翘环己醇苷 (δ 2.02, t)、芦丁 (δ 1.14, d)、棘木苷 (δ 2.12, t) 等。糖区 (δ 5.50~3.10) 鉴定的成分包括 α -葡萄糖、 β -葡萄糖、蔗糖、木糖和棉籽糖等。芳香区 (δ 9.50~5.50) 主要是苯乙醇苷类、 $\text{C}_6\text{-C}_2$ 天然醇类、木脂素、黄酮类化合物及含苯环的氨基酸类的信号, 主要包括连翘酯苷 A (7.63, d; 7.16, d; 7.06, dd; 6.90, d;

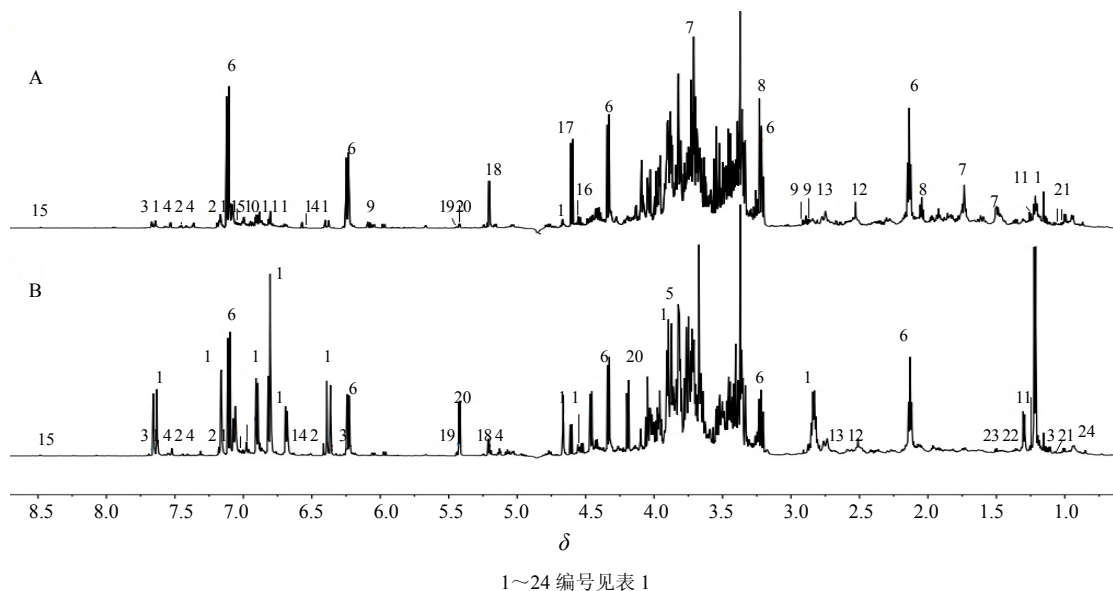
6.81, d; 6.68, dd), 连翘酯苷 C (7.62, d; 6.41, d), 芦丁 (δ 7.69, d), 连翘苷 (δ 7.18, d), 棘木苷 (δ 7.11, d; δ 6.24, dd), 连翘环己醇酮 (δ 6.05, d), 没食子酸 (δ 7.00, s) 以及苯丙氨酸 (δ 7.40, m; 7.31, d) 等。

直观分析显示“杀青”对连翘药材化学成分的影响主要表现在芳香区苯乙醇苷类的信号, 说明“杀青”可明显抑制苯乙醇苷类尤其是连翘酯苷 A 的降解; 而连翘生品中蔗糖信号显著降低, 葡萄糖信号明显增强。以下采用多元统计分析进一步揭示连翘生品与杀青品的化学差异。

3.2 多元统计分析

PCA 分析是最早且最广泛应用于代谢组学领域的多元统计分析方法, 是采用线性投影将原来的多个变量转换转化为一组新的正交变量的一种无监督的模式识别方法。通过对原始数据降维, 降低了问题的复杂性, 能反映数据的原始状态, 可获取数据的可视化总览^[30]。但是 PCA 不能忽略与研究目的无关的组内误差和随机误差, 因而分类判别能力弱于有监督的模式识别方法 (PLS-DA 和 OPLS-DA)^[31]。为了阐明“杀青”导致的连翘化学成分变化, 对连翘生品和杀青品进行 PCA、PLS-DA 及 OPLS-DA 分析。

图 2-A 为生品和杀青品的 PCA 散点图, 由主成分 1 (t[1]: 45.3%) 和主成分 2 (t[2]: 14.9%) 为坐标构建的二维得分散点图, 生品和杀青品可明显



Numbers of 1—24 corresponded with those in Table 1

图 1 连翘生品 (A) 与杀青品 (B) 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ spectra of RF (A) and DF (B)

表 1 连翘生品与杀青品中部分代谢产物 $^1\text{H-NMR}$ 数据归属Table 1 Assignments of $^1\text{H-NMR}$ spectral peaks obtained from RF and DF

编号	化学位移 (δ_{H})	代谢物	VIP 值
1	7.63 (d, $J = 16.2$ Hz), 7.16 (d, $J = 2.0$ Hz), 7.06 (dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz), 6.81 (d, $J = 8.4$ Hz), 6.68 (dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz), 6.37 (d, $J = 16.2$ Hz), 4.66 (d, $J = 1.2$ Hz), 4.46 (d, $J = 7.8$ Hz), 2.84 (m), 1.22 (d, $J = 6.0$ Hz)	连翘酯苷 A ^a	3.91
2	7.62 (d, $J = 15.6$ Hz), 7.16 (d, $J = 1.8$ Hz), 6.80 (d, $J = 8.4$ Hz), 6.68 (dd, $J = 1.8, 7.8$ Hz), 6.41 (d, $J = 16.2$ Hz), 4.53 (d, $J = 8.4$ Hz), 1.25 (d, $J = 6.6$ Hz)	连翘酯苷 C ^a	2.05
3	7.69 (d, $J = 1.8$ Hz), 6.31 (d, $J = 2.0$ Hz), 6.53 (d, $J = 2.0$ Hz), 5.01 (d, $J = 7.7$ Hz), 4.52 (d, $J = 2.0$ Hz), 1.12 (d, $J = 6.1$ Hz)	芦丁 ^a	1.62
4	7.53 (brs), 5.16 (d, $J = 6.0$ Hz), 4.01 (d, $J = 9.6$ Hz), 4.01 (d, $J = 9.6$ Hz), 3.91 (d, $J = 10.2$ Hz), 3.67 (dd, $J = 6.6, 9.6$ Hz)	五福花苷酸 ^a	0.34
5	7.18 (d, $J = 8.4$ Hz), 7.08 (d, $J = 1.8$ Hz), δ 7.0 (m), 4.57 (d, $J = 6.6$ Hz), 4.16 (d, $J = 9.6$ Hz)	连翘苷 ^a	1.47
6	7.11 (d, $J = 10.2$ Hz), 6.24 (dd, $J = 1.8, 10.2$ Hz), 4.33 (d, $J = 7.8$ Hz), 2.13 (t, $J = 6.6$ Hz)	棘木苷 ^c	1.99
7	3.75 (t, $J = 7.2$ Hz), 1.73 (t, $J = 7.8$ Hz), 1.60 (m), 1.46 (m)	连翘环己醇 ^c	3.41
8	4.36 (d, $J = 7.2$ Hz), 3.92 (t, $J = 7.2$ Hz), 3.20 (t, $J = 8.0, 9.0$ Hz), 2.02 (t, $J = 7.2$ Hz)	连翘环己醇苷 ^c	1.77
9	6.05 (d, $J = 10.2$ Hz), 4.24 (ddd, $J = 1.8, 4.8, 6.0$ Hz), 4.12 (dt, $J = 7.2$ Hz), 2.83 (dd, $J = 5.4, 16.8$ Hz), 2.65 (dd, $J = 5.4, 16.8$ Hz)	连翘环己醇酮 ^c	1.00
10	7.00 (s)	没食子酸 ^a	0.03
11	2.56 (m), 1.25 (d, $J = 6.6$ Hz)	3-羟基丁酸 ^c	0.68
12	2.46 (s)	琥珀酸 ^{b, c}	0.33
13	4.30 (dd, $J = 9.6, 3.6$ Hz), 2.71 (dd, $J = 15.6, 3.6$ Hz), 2.30 (dd, $J = 15.0, 9.6$ Hz)	苹果酸 ^{b, c}	0.29
14	6.55 (s)	富马酸 ^c	0.21
15	8.48 (s)	甲酸 ^c	0.23
16	4.55 (d, $J = 9$ Hz)	β -木糖 ^{b, c}	0.23
17	4.60 (d, $J = 7.8$ Hz)	β -葡萄糖 ^{b, c}	2.17
18	5.20 (d, $J = 3.8$ Hz)	α -葡萄糖 ^{b, c}	1.73
19	4.97 (d, $J = 3.6$ Hz), 5.43 (d, $J = 4.2$ Hz)	棉籽糖 ^{b, c}	0.68
20	5.42 (d, $J = 3.6$ Hz), 4.19 (d, $J = 8.4$ Hz),	蔗糖 ^{b, c}	1.76
21	2.27 (m), 1.06 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.02 (d, $J = 7.2$ Hz)	缬氨酸 ^{b, c}	0.26
22	1.33 (d, $J = 6.6$ Hz)	苏氨酸 ^{b, c}	0.91
23	1.50 (d, $J = 7.2$ Hz)	丙氨酸 ^{b, c}	0.98
24	7.40 (m), 7.31 (d, $J = 6.6$ Hz)	苯丙氨酸 ^{b, c}	0.28

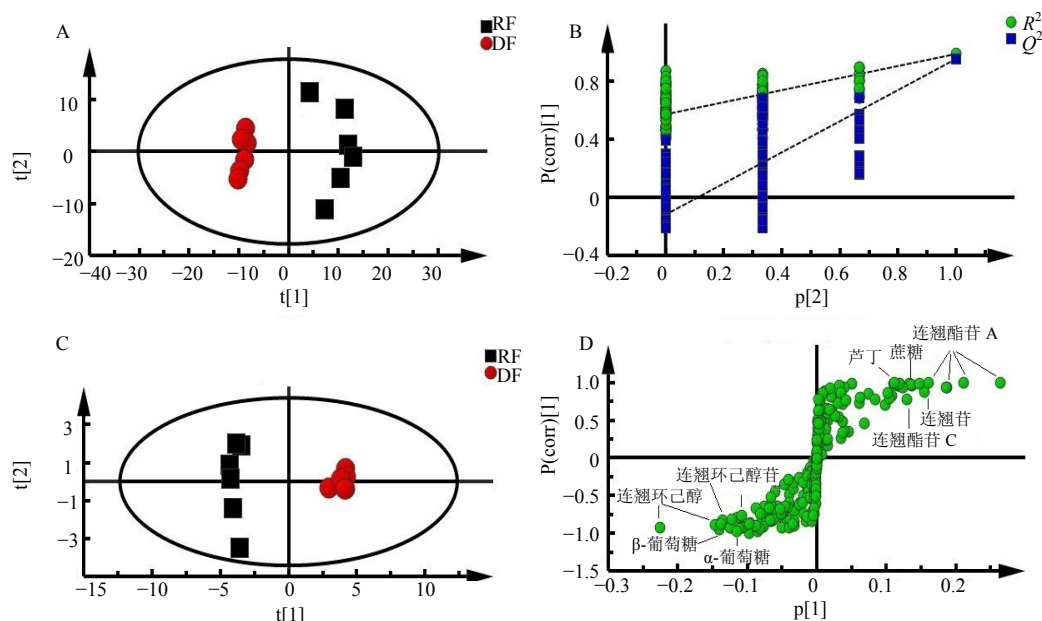
a-通过与对照品对照指认代谢物 b-通过与 BMRB (Biological Magnetic Resonance Data Bank) 数据库中标准物质对照指认代谢物 c-通过与文献报道数据对照指认代谢物

a-metabolites identified by comparison with authentic standards b-metabolites identified by comparison with the biological magnetic resonance data bank c-metabolites identified by comparison with the literature

区分, 而且“杀青”后的连翘样本更集中, 即组内差异小于生品, 说明经过“杀青”处理可提高连翘药材的均一性。然后通过有监督的模式识别分析方法 OPLS-DA 确定生品和杀青品连翘样本的差异代谢物。首先以 PLS-DA 分析的排列实验对模型进行有效性验证, 可见原始模型的预测能力大于任何一次随机排列变量(y)的预测能力(图 2-B), 即模型有效可靠, 可进一步通过 OPLS-DA 分析寻找差异代谢物^[32]。图 2-C 为生品和杀青品 OPLS-DA 得分散点图 ($R^2=0.787$, $Q^2=0.975$,

CV-ANOVA 验证的 $P=7.92 \times 10^{-6}$), 通过相应的 S-plot 图(图 2-D)与 VIP 值 ($\text{VIP} > 1.0$) 结合分析确定, 杀青品中连翘酯苷 A、连翘酯苷 C、连翘苷、芦丁、蔗糖的量较高, 而生品中连翘环己醇及其苷、连翘环己醇酮、 α -葡萄糖、 β -葡萄糖的量较高。

此外, 以 TSP 为内标, 对上述差异代谢物通过积分面积进行半定量分析, 并用 SPSS 16.0 软件进行独立样本 t 检验 ($n=6$), 结果与多元统计分析一致(图 3)。



A-PCA 得分图, B-置换检验, C-OPLS-DA 得分图, D-S-Plot 图

A-PCA score plots, B-permutation test with 200 permutations of PLS-DA model, $R^2 = (0.0, 0.574)$, $Q^2 = (0.0 \sim 0.118)$, C-OPLS-DA score plots, D-S-plot

图 2 连翘生品 (RF) 与杀青品 (DF) 的多元统计分析

Fig. 2 Multiple statistical analysis of RF and DF

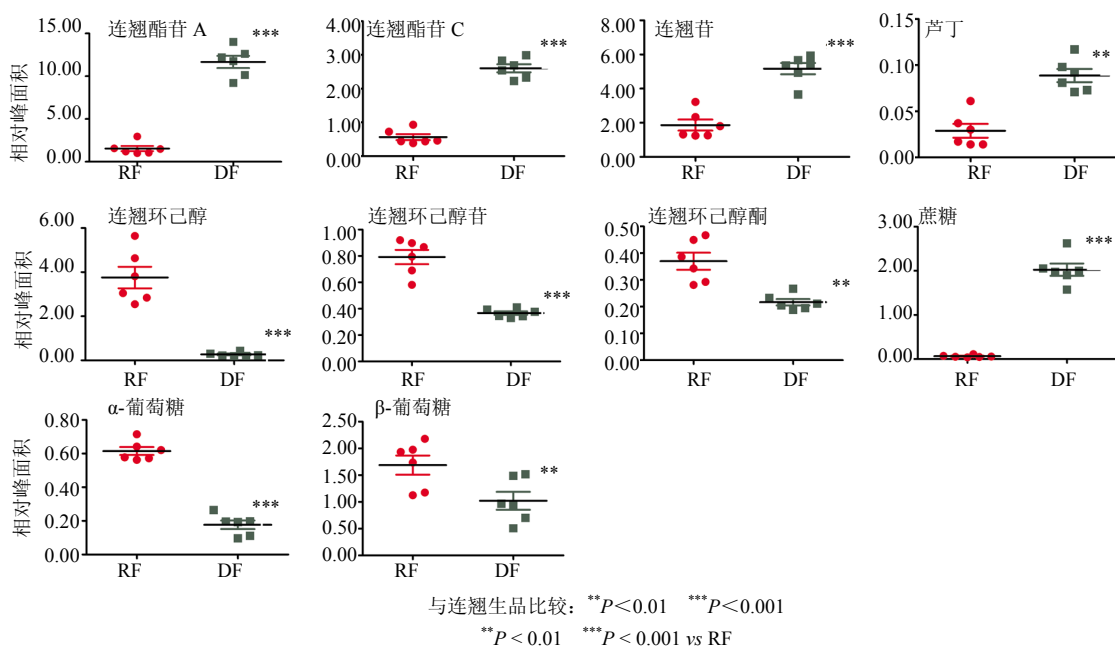


图 3 连翘生品 (RF) 和杀青品 (DF) $^1\text{H-NMR}$ 图谱中差异代谢物的相对峰面积

Fig 3 Scatter-plot of relative peak areas of significant metabolites in $^1\text{H-NMR}$ spectra of RF and DF

3.3 连翘酯苷 A 降解途径分析

连翘酯苷 A 是目前从连翘中分离得到的活性最高的化合物之一, 具有较好的抗氧化、抗菌及抑制碱性磷酸酶等活性, 且连翘酯苷 A 也是评价连翘质量的指标性成分之一^[33]。前期研究证实连翘中确实含有一类降解连翘酯苷 A 的酶, 而高温蒸煮可使这

类酶失去活性, 所以“杀青”是使这类酶迅速失去活性的重要环节^[17], 从而抑制连翘酯苷 A 发生降解。并且通过比较连翘生品和杀青品的化学成分, 显示生品中连翘环己醇、连翘环己醇苷、连翘环己醇酮等 $\text{C}_6\text{-C}_2$ 天然醇类的量明显升高, 而这些化合物与连翘酯苷 A 在生源上密切相关。因此, 结合文

献中这类成分的生物合成途径^[34-35],推测了连翘酯苷 A 可能的降解途径:首先在糖苷酶的作用下先水解失去咖啡酸转变成连翘酯苷 E,进而在另一种糖苷酶的作用下失去鼠李糖,转变成 3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷,再在一系列转移酶和还原酶系的作用下转化成连翘环己醇苷,而后在糖苷酶的作用下最终转化为连翘环己醇。

4 讨论

本研究采用基于核磁共振的代谢组学技术研究了“杀青”对连翘代谢物轮廓及代谢产物的影响,并结合多元统计分析确定了连翘生品与杀青品的 10 个差异成分:连翘杀青品中连翘酯苷 A、C 和连翘苷、芦丁及初生代谢物蔗糖的量高于生品,而连翘环己醇及其苷、连翘环己醇酮、 α -葡萄糖、 β -葡萄糖的量低于连翘生品。连翘生品中这些成分升高的原因可能是连翘酯苷 A、C、连翘苷、芦丁及蔗糖被鲜果中水解酶、裂解酶等酶解所致,即“杀青”这一产地加工过程可有效避免连翘中苯乙醇苷类如连翘酯苷 A,木脂素类如连翘苷,黄酮类如芦丁,以及一些初级代谢物(如蔗糖)被酶解。这些在“杀青”过程得以保存的成分与连翘功效的相关性有待进一步研究。连翘中连翘酯苷 A 的量较高,在连翘生品与杀青品中的差异也最为显著,本研究结合这类成分的生物合成途径首次推测了连翘酯苷 A 可能的降解途径。

核磁共振技术可以同时表征药材中的初级和次级代谢物,获得药材中相对完整的化学信息,适合于中药材中多种成分的同时分析,但其灵敏度较低,量相对较低的代谢物难以检测。在后续的工作中还将通过多种分析联用技术如 LC-MS 等进行全面的化学表征,进一步阐释“杀青”对连翘药材品质的影响及其科学内涵。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王 宁. 连翘的本草考证 [J]. 中药材, 2013, 34(4): 670-674.
- [3] 支旭然, 苑 霖, 生 宁, 等. HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3231-3235.
- [4] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展 [J]. 中药材, 2000, 23(10): 657-660.
- [5] 付云飞, 李 清, 毕开顺. RP-HPLC 法同时测定不同产地连翘中的 7 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1043-1046.
- [6] 滕训辉. 山西野生连翘资源保护与可持续利用研究 [J]. 中国医药导报, 2010, 7(34): 81-82.
- [7] 王进明, 王瑞娜, 范圣此. 野生连翘资源调查与分析 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(15): 8483-8484.
- [8] 段金彪, 宿树兰, 严 辉, 等. 药材初加工“杀青”环节的科学性与适宜性分析 [A] // 全国第 9 届天然药物资源学术研讨会论文集 [C]. 广州: 中国自然资源学会天然药物资源专业委员会, 2010.
- [9] 段金彪, 宿树兰, 严 辉, 等. 药材初加工“杀青”环节与药材品质形成的探讨 [J]. 中药材, 2011, 34(1): 1-4.
- [10] 卢玉兰. 不同炮制方法对连翘中连翘苷含量的影响 [J]. 西部中医药, 2011, 24(8): 23-24.
- [11] 赵 超, 郑伶俐, 胡亚刚, 等. 陕西道地药材连翘鲜品蒸煮工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 438-440.
- [12] 张淑蓉, 裴香萍, 梁学伟, 等. 青翘炮制方法的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 33-35.
- [13] 张 涛, 陈学松. 连翘不同炮制品中连翘苷的 HPLC 测定 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1339-1340.
- [14] 周改莲, 辛 宁, 张守平, 等. 连翘不同部位及不同炮制方法的活性成分比较 [J]. 中国中医药信息, 2008, 15(1): 30-31.
- [15] 白吉庆, 王小平, 曹林林, 等. 产地加工方法对青翘中连翘苷、连翘酯苷 A 的影响 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3258-3261.
- [16] 薛智民, 张立伟. 炮制方法对连翘主要化学成分连翘酯苷的影响 [J]. 化学研究与应用, 2011, 63(5): 606-609.
- [17] 侯雅楠, 许 佳, 陈廷贵, 等. 连翘鲜果粗酶对连翘酯苷 A 的酶解作用 [J]. 化学研究与应用, 2013, 25(5): 660-664.
- [18] 李震宇, 李爱平, 张福生, 等. 植物代谢组学技术在山西道地药材研究中的应用 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 785-789.
- [19] Schripsema J. Application of NMR in plant metabolomics techniques, problems and prospects [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21(1): 14-21.
- [20] Yang S O, Shin Y S, Hyun S H, *et al.* NMR-based metabolic profiling and differentiation of ginseng roots according to cultivation ages [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 58(2): 19-26.
- [21] Li Z Y, Zhang Z Z, Du G H, *et al.* Comparative analysis of Danggui and European Danggui using nuclear magnetic resonance-based metabolic fingerprinting [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 103(16): 44-51.
- [22] 李震宇, 范玛丽, 秦雪梅. 基于 NMR 代谢组学技术的白芍及其醋制品的化学比较 [J]. 药学报, 2015,

- 50(2): 211-217.
- [23] 王雪洁, 李震宇, 薛水玉, 等. 基于植物代谢组学技术的远志不同炮制品质量控制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 785-789.
- [24] 姜涛, 许佳, 秦臻, 等. 连翘炮制工艺研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 1000-1003.
- [25] Endo K, Hikino H. Structures of rengyol, rengyoxide and rengyolone, new cyclohexylethane derivatives from *Forsythia Suspensa* fruits [J]. *Can J Chem*, 1984, 62(10): 2011-2014.
- [26] Kobler C, Effenberger F. Chemo enzymatic synthesis of rengyol and isorengyol [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(20): 4823-4828.
- [27] Liu N Q, Cao M, Fr  d  rich M, *et al.* Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of *Artemisia afra* with NMR spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(1): 230-235.
- [28] Georgiev M I, Ali K, Alipiev K, *et al.* Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72(16): 2045-2051.
- [29] Kim H S, Park S J, Hyun S H, *et al.* Biochemical monitoring of black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel) fruits according to maturation stage by ¹H NMR using multiple solvent systems [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(7): 1977-1987.
- [30] 漆小泉, 王玉兰, 陈晓亚. 植物代谢组学-方法与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- [31] 徐国旺. 代谢组学方法与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [32] Eriksson L, Trygg J, Wold S. CV-ANOVA for significance testing of PLS and OPLS models [J]. *J Chemom*, 2008, 22(11/12): 594-600.
- [33] Wang G N, Pan R L, Liao Y H, *et al.* An LC-MS/MS method for determination of forsythiaside in rat plasma and application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(1): 102-106.
- [34] Kuwajima H, Takai Y, Takaishi K, *et al.* Synthesis of ¹³C-labeled possible intermediates in the biosynthesis of phenylethanoid derivatives, cornoside and rengyosides [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46(4): 581-586.
- [35] Seya K, Endo K, Hikino H. Structures of rengyosides A, B and C, three glucosides of *Forsythia suspensa* fruits [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(5): 1495-1498.