

生地黄 HPLC 指纹图谱的建立及其 HPLC-ESI-MS 分析

宋青青^{1,2}, 赵云芳^{1#}, 张娜^{1,2}, 张倩¹, 刘瑶^{1,2}, 李军¹, 宋月林^{1*}, 屠鹏飞^{1*}

1. 北京中医药大学 中药现代研究中心, 北京 100029

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

摘要: **目的** 建立基于 HPLC 指纹图谱的生地黄的质量评价方法, 并通过 HPLC-ESI-MS 技术对生地黄药材中的化学成分进行定性分析。 **方法** 生地黄样品采用甲醇超声提取, 采用 Agilent Extend C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 检测波长为 215 nm, 对 15 批次不同来源生地黄药材进行相似度评价分析, 并采用 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术对生地黄的化学成分进行全面定性分析。 **结果** 建立 15 批生地黄药材 HPLC 指纹图谱, 获得 10 个共有色谱峰且相似度在 0.910~0.982。通过对照品指认、文献比对以及高分辨质谱数据解析, 初步鉴定了其中 67 个化学成分。 **结论** 所建立的生地黄的 HPLC 指纹图谱专属性强, 并结合液质联用技术的定性分析, 为生地黄药材的质量控制提供了可行的方法。

关键词: 生地黄; 指纹图谱; HPLC-ESI-MS; HPLC; 质量评价

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)23-4247-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.23.022

Establishment of HPLC fingerprint of *Rehmanniae Radix* and its HPLC-ESI-MS analysis

SONG Qing-qing^{1,2}, ZHAO Yun-fang¹, ZHANG Na^{1,2}, ZHANG Qian¹, LIU Yao^{1,2}, LI Jun¹, SONG Yue-lin¹, TU Peng-fei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: Objective To establish a quality assessment method for *Rehmanniae Radix* based on HPLC fingerprint and qualitatively analyze the chemical constituents by HPLC-ESI-MS. **Methods** The methanol extract of *Rehmanniae Radix* by ultrasonication was separated on an Agilent Extend C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with gradient elution. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid. The detection wavelength was 215 nm. The similarity evaluation of 15 batches of *Rehmanniae Radix* from different sources was carried out by the "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprints of TCM" (Chinese Pharmacopoeia Commission, version 2004A). Ultra high-performance liquid chromatography coupled with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometer (UPLC-LTQ-Orbitrap MS) was used to characterize the chemical constituents of the methanol extract of *Rehmanniae Radix*. **Results** The chromatographic fingerprints of 15 batches of *Rehmanniae Radix* were generated with 10 common peaks. The similarity scores between each material batch and the reference fingerprint ranged from 0.910—0.982. A total of 67 components were putatively identified along with six unknown components via referring to reference components and literatures and analyzing MS/MS data. **Conclusion** The established method of fingerprint is specific and can be a reliable method used for quality assessment of *Rehmanniae Radix*.

Key words: *Rehmanniae Radix*; fingerprint; HPLC-ESI-MS; HPLC; quality assessment

地黄 *Rehmannia glutinosa* 为玄参科 Libosch. 的新鲜或干燥块根, 其干燥块根习称为“生地黄”, 而其炮制品为“熟地黄”。生地黄具清热凉

收稿日期: 2016-06-12

基金项目: 国家工信部中药材扶持项目

作者简介: 宋青青 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药物质基础及代谢研究。E-mail: sqq1991qq@163.com

*通信作者 宋月林 Tel: (010)64286100 E-mail: syltwc2005@163.com

屠鹏飞 Tel: (010)82802750 E-mail: pengfeitu@163.com

#并列第一作者

血, 养阴生津之功效, 与熟地黄的功能有所不同, 可能与其在加工炮制过程中化学成分的变化有密切关系^[1-4], 所以分别建立质量控制方法能够保证临床用药的有效性。国内外对于地黄较多研究, 生地黄不同部位以及药材的指纹图谱也已见诸报道^[5-8], 还有针对含有地黄的中药复方的化学成分研究^[9]。但是通过建立指纹图谱与化学成分定性分析相结合对生地黄进行质量控制的研究尚未见报道^[10-11], 并且, 现有的地黄化学成分分析所鉴定的化合物数量少, 难以实现地黄药材化学成分的全面分析。因此目前仍缺乏整体的综合评价地黄质量的方法。本实验通过建立生地黄 HPLC 指纹图谱, 并结合系统的化学成分鉴定, 为生地黄质量综合评价提供可行方法, 并为进一步药效物质基础研究提供依据

1 实验材料

岛津高效液相色谱仪 (配备泵 LC-20AD_{XR}×2, 自动进样器 SIL-20AC, 柱温箱 CTO-20A, 紫外检测器 SPD-M20A, 脱气机 DGU-20A, 控制器 CBM-20A, 日本岛津公司); Accela 600 pump 高效液相色谱-LTQ-Orbitrap XL 质谱联用仪 (美国 Thermo Scientific 公司); Milli-Q 超纯水净化系统 (美国 Millipore 公司); Mettler ME204 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。色谱级和质谱级甲醇、乙腈以及质谱级甲酸均购自美国 Thermo Fisher 公司, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。毛蕊花糖苷由本实验室制备、鉴定所得, 并经 HPLC-DAD 检测, 质量分数均大于 98%。

15 批地黄药材 (表 1) 经北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定均为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根。样本存放于北京中医药大学中药现代研究中心。

表 1 15 批生地黄药材信息

Table 1 Sources of 15 batches of *Rehmanniae Radix*

编号	产地	编号	产地
S1	黑龙江	S9	陕西
S2	河南	S10	陕西
S3	河南	S11	湖南
S4	河北	S12	山西
S5	河北	S13	河北
S6	河南	S14	河南
S7	河北	S15	河南
S8	山西		

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取生地黄切成约 5 mm 的小块, 经 80 °C 减压干燥 24 h 后, 磨成粗粉。取约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20.0 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 40 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取毛蕊花糖苷对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇溶解并稀释成含毛蕊花糖苷 40 μg/mL 的对照品溶液。

2.2 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Agilent Extend C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 柱温 40 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 215 nm, 进样量 5 μL。流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0~15 min, 2%~5% A; 15~29 min, 5%~15% A; 29~50 min, 15%~35% A; 50~55 min, 35%~57% A; 色谱采集时间 55 min。

2.2.2 精密度试验 取地黄粗粉 (S10) 约 2.0 g, 按“2.1.1”制备供试品溶液, 在“2.2.1”所述色谱条件下连续进样 6 次, 将所得的色谱图输入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版)”进行处理, 相似度高于 0.998。以色谱峰 7 (毛蕊花糖苷) 为参照峰, 其他 9 个色谱峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.26%, 相对峰面积 RSD 值均小于 2.23%。

2.2.3 稳定性试验 取供试品溶液分别在 0、2、4、6、8、12 和 24 h 按“2.2.1”所述方法进样分析, 记录指纹图谱。将所得的色谱图输入“2.2.2”项下相似度评价系统软件进行处理, 相似度高于 0.996。以色谱峰 7 (毛蕊花糖苷) 为参照峰, 其他 9 个色谱峰的相对保留时间 RSD 值小于 0.23%, 相对峰面积 RSD 值小于 6.93%。

2.2.4 重复性试验 取地黄粗粉 (S10) 6 份, 每份约 2.0 g, 按“2.1.1”项方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”所述方法进样分析, 记录指纹图谱。将所得的色谱图输入“2.2.2”项下相似度评价系统软件进行处理, 相似度高于 0.975。以色谱峰 7 (毛蕊花糖苷) 为参照峰, 其他 9 个色谱峰的相对保留时间 RSD 值小于 0.16%, 相对峰面积 RSD 值均小于 6.99%。

2.2.5 生地黄指纹图谱的建立与相似度评价 按“2.1.1”项所述方法制备 15 批次样品的供试品溶液, 按“2.2.1”项所述色谱条件进行分析, 得到各批次

药材的 HPLC 指纹图谱, 将所得数据输入“2.2.2”项相似度评价系统软件进行处理, 15 批叠加的 HPLC 指纹图谱见图 1, 同时生成对照指纹图谱 (图 2)。以色谱峰 7 (毛蕊花糖苷) 为参照, 其他 9 个色谱峰的相对保留时间均小于 1.18, RSD 值均小于 0.17%, 表明 10 个共有峰具有较好的保留重现性。计算得到的 15 批样品与对照指纹图谱的相似度结果见表 2。结果表明各批次药材之间具有较好的一致性, 所建立的 HPLC 指纹图谱可用于生地黄的质量评价。

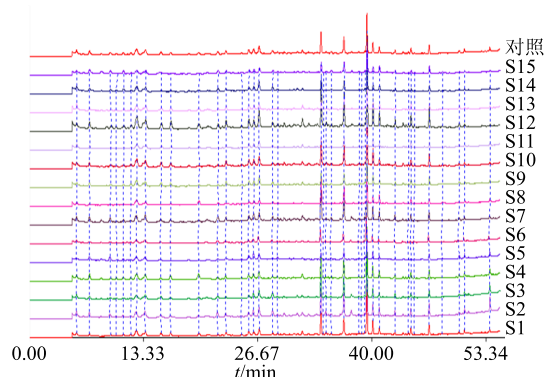


图 1 15 批生地黄药材的 HPLC 指纹图谱 (215 nm)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of *Rehmanniae Radix* (215 nm)

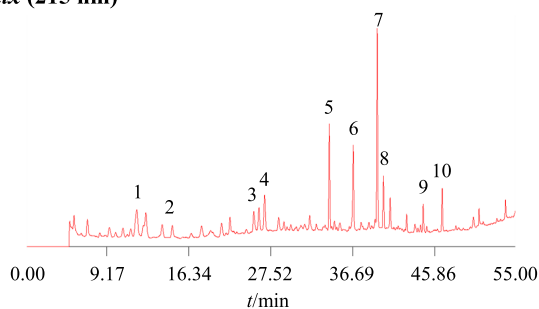


图 2 生地黄药材的对照指纹图谱

Fig. 2 Reference chromatographic fingerprint of 15 batches of *Rehmanniae Radix*

表 2 15 批生地黄相似度结果

Table 2 Similarity results of 15 batches of *Rehmanniae Radix*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.964	S9	0.982
S2	0.925	S10	0.978
S3	0.947	S11	0.957
S4	0.964	S12	0.954
S5	0.915	S13	0.966
S6	0.948	S14	0.955
S7	0.957	S15	0.955
S8	0.910		

2.3 HPLC-ESI-MS 分析条件

2.3.1 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI) 负离子模式检测, 全离子扫描模式, 质量扫描范围 m/z 150~1 000。喷雾电压 3 kV, 毛细管电压 -35 V, 毛细管温度 350 °C, 鞘气流量 40 L/min, 辅助气体流量 20 L/min。一级质谱采用 FT 全扫描, 分辨率为 30 000, 多级质谱采用数据依赖性扫描, 进行碰撞诱导解离 (CID) 模式, 碰撞能设为 35%。

2.3.2 色谱条件 Sigma-Aldrich Supelco Discovery® HS F5-3 色谱柱 (150 mm×3.0 mm, 3.0 μm), 柱温 25 °C, 体积流量 0.5 mL/min, 进样量 5 μL。流动相乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序为 0~8 min, 2%~15% A; 8~15 min, 15%~35% A; 15~17 min, 35%~80% A; 17~20 min, 80%~90% A; 20.1~25 min, 2% A。

2.4 成分鉴定

采用 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 对甲醇超声提取的样品 (S10) 进行化学成分定性分析, 负离子模式下基峰图见图 3, 共检出 73 个化合物。通过对照品、保留时间和质谱信息, 并结合相关文献数据^[11-15]比对进行化学成分确认, 初步鉴定了其中 67 个化合物, 另有 6 个未知化合物, 其中 9 个化合物通过对照品指认, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 指纹图谱色谱条件优化

本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 磷酸水作为流动相, 在 215 nm 检测波长下的结果, 甲醇-水系统洗脱所得到的色谱峰不成形, 乙腈-水条件下色谱峰峰形差, 采用 0.1% 甲酸水虽然改善了峰形, 但会造成基线漂移, 故选用乙腈-0.1% 磷酸水作为 HPLC 指纹图谱的流动相。同时考察了不同流速、柱温、进样量等条件对于生地黄指纹图谱的影响, 以所得色谱信息最多, 满足 HPLC 指纹图谱信息量大的检测要求进行优化。

3.2 指纹图谱实验条件优化

本实验比较了用不同提取溶剂, 如 25% 甲醇、50% 甲醇和甲醇, 在超声、回流、静置条件下提取生地黄样品。通过对比不同方法所得到的色谱峰容量, 并考虑到前处理方法的简便和可靠性, 最终确定甲醇超声提取作为样品处理方法。又分别考察了 15、40、60 min 的超声处理时间, 结果表明提取时间对保留时间在 30 min 前的峰容量影响不大, 而超声提取 40 min 时对于极性稍小的色谱峰的峰容

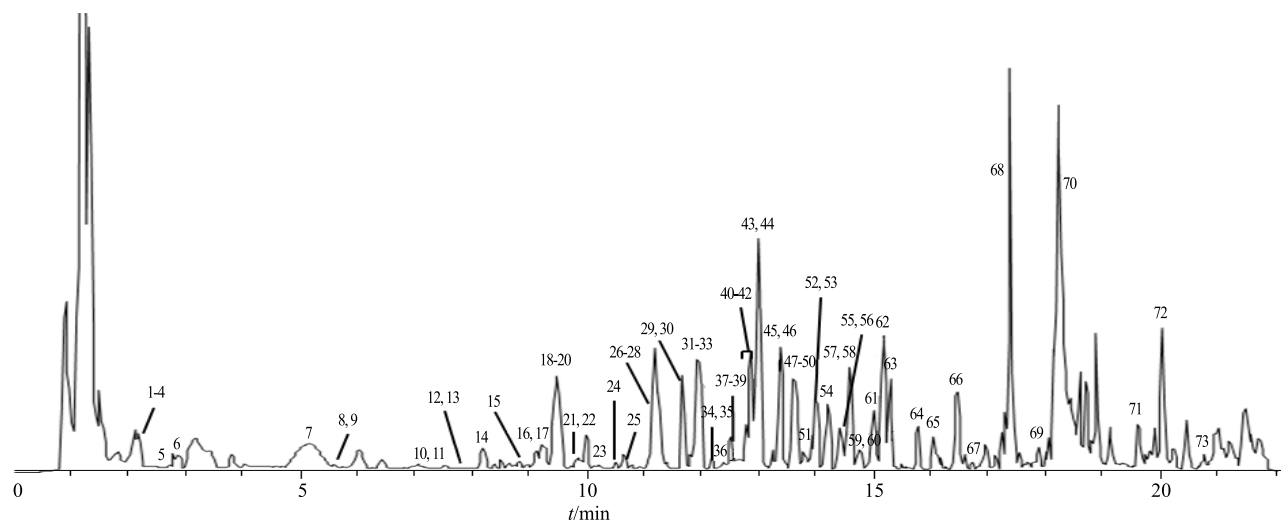


图 3 生地黄甲醇提取样品负离子模式下基峰图

Fig. 3 Base peak chromatogram in negative mode of methanol extract from *Rehmanniae Radix*

表 3 生地黄甲醇提取样品的 HPLC-ESI-MS 化学成分分析

Table 3 Chemical constituents of methanol extract from *Rehmanniae Radix* analyzed by HPLC-ESI-MS

峰号	t_R/min	分子式	误差/ $(\times 10^{-6})$	$[M-H]^-$	MS^2	化合物
1	2.01	$C_{15}H_{22}O_{10}$	-0.286	361.112 8	343.150 7, 301.029 1, 282.942 7, 253.073 8, 223.050 2, 198.933 5	catalpol [#]
2	2.15	$C_{15}H_{23}O_{10}Cl$	0.224	397.089 7	379.034 9, 335.635 3, 276.870 2, 252.108 3, 199.032 1, 143.936 7	glutinoside
3	2.21	$C_{15}H_{24}O_9$	0.292	347.133 8	184.948 6, 167.009 6, 148.907 6	ajugol/leonuride
4	2.31	$C_{16}H_{22}O_{10}$	1.278	373.113 4	327.066 7, 283, 211.023 8, 166.915 8, 122.923 3	geniposidic acid
5	2.57	$C_{16}H_{24}O_{10}$	0.818	375.130 0	356.343 0, 315.046 7, 255.117 0, 212.952 2, 169.020 4, 124.900 1	8-epiloganic acid [#]
6	2.75	$C_{16}H_{26}O_{10}$	0.336	377.144 4	341.082 3, 215.003 9, 178.866 6, 160.804 8	lamiol
7	5.25	$C_{16}H_{24}O_{10}$	-0.329	375.128 5	315.230 0, 213.016 7, 168.941 0, 150.909 0	mussarnosidic acid
8	5.85	$C_{15}H_{22}O_9$	-0.518	345.117 8	327.233 6, 209.066 2, 183.018 8, 138.913 4	aucubin
9	5.91	$C_{20}H_{30}O_{12}$	-0.353	461.165 2	414.850 1, 315.147 4, 297.174 6, 160.918 2, 134.832 0	decaffeoylacteoside
10	7.62	$C_{15}H_{24}O_6$	0.652	299.149 1	281.015 0, 254.972 3, 219.104 5, 183.052 7, 169.025 8, 139.014 3, 120.890 7	frehmaglutoside B
11	7.73	$C_{27}H_{42}O_{17}$	-1.532	637.232 9	619.2579, 491.302 8, 473.129 3, 439.237 5, 305.109 8	kanokoside C
12	7.93	$C_{17}H_{32}O_{13}$	1.453	443.177 3	399.225 3, 357.286 6, 236.890 2	未知
13	7.93	$C_{23}H_{34}O_{15}$	-0.449	549.181 2	517.251 2, 387.145 0, 284.806 9, 225.257 8, 207.010 6, 178.852 2	genipin-gentiobioside/ genameside C
14	8.22	$C_{21}H_{28}O_{13}$	0.283	487.144 9	451.155 4, 325.119 1, 307.115 5, 178.978 3	cistanoside F
15	8.96	$C_{19}H_{34}O_9$	0.077	405.211 9	387.185 7, 369.277 1, 305.411 6, 243.198 2, 194.937 7, 151.042 3	oxyrehmaionoside B
16	9.06	$C_{22}H_{36}O_{13}$	0.242	507.207 3	447.200 8, 341.082 4, 327.096 3, 219.098 5, 178.936 2	未知
17	9.11	$C_{15}H_{24}O_5$	1.482	283.154 4	265.059 1, 203.045 8, 183.045 8, 138.938 8, 98.883 2	sec-hydroxyaeginetic acid
18	9.23	$C_8H_8O_4$	5.297	167.034 8	151.820 8, 122.891 2, 107.864 9	vanillic acid [#]
19	9.27	$C_{14}H_{18}O_8$	0.594	313.090 0	294.904 9, 269.228 8, 229.825 1, 166.894 5, 151.932 4, 122.882 6	rhamnopyranosyl vanilloyl
20	9.28	$C_{21}H_{32}O_{12}$	0.710	475.180 0	329.112 4, 311.073 5, 160.944 3, 142.915 1	darendoside B
21	9.63	$C_{16}H_{26}O_8$	-0.099	345.154 4	301.166 0, 285.124 9, 225.102 1, 178.884 4, 164.903 0	rehmapicroside
22	9.71	$C_{17}H_{26}O_{10}$	-0.317	389.144 1	371.994 1, 317.308 3, 227.049 5, 160.872 5	loganin
23	10.14	$C_{15}H_{20}O_9$	0.004	343.102 4	299.234 5, 263.227 8, 196.926 0, 182.023 2	syringic acid-4-O- α -L-rhamnoside
24	10.40	$C_{22}H_{30}O_{13}$	0.385	501.160 5	483.331 4, 356.974 2, 336.764 6, 259.107 8, 193.028 5, 178.035 0	sibirioside B
25	10.72	$C_{17}H_{24}O_{11}$	0.202	403.123 7	371.045 2, 327.135 2, 241.012 7, 222.929 3, 138.917 8	未知
26	11.12	$C_{35}H_{45}O_{20}$	-1.082	785.249 0	665.229 2, 623.326 5, 461.176 6, 341.230 1	echinacoside [#]
27	11.15	$C_{10}H_{16}O_3$	4.965	183.102 5	138.900 8, 123.003 1, 95.064 0	rehmapicrogenin

续表 3

峰号	t_R/min	分子式	误差/ $\times 10^{-6}$	$[M-H]^-$	MS^2	化合物
28	11.51	$C_{36}H_{48}O_{20}$	-0.863	799.264 8	637.303 5, 623.174 4, 605.229 1, 461.328 9, 307.056 2	jionoside A1/A2
29	11.65	$C_{19}H_{28}O_{10}$	0.690	415.160 2	344.308 2, 293.033 3, 252.836 9, 221.012 8, 190.963 2, 178.690 8, 148.891 7	2-phenylethyl- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside rehmaionoside C
30	11.73	$C_{19}H_{32}O_8$	0.118	387.201 4	207.022 2, 178.884 8, 160.934 2, 142.956 2	β -hydroxyacteoside
31	11.89	$C_{29}H_{36}O_{16}$	-0.111	639.191 9	621.231 0, 529.191 0, 459.167 1, 323.051 3, 246.759 2, 179.049 5	jionoside E
32	11.95	$C_{35}H_{45}O_{19}$	0.227	769.255 1	623.304 8, 605.318 1, 461.093 4, 323.150 5	jionoside A1/A2
33	12.02	$C_{36}H_{48}O_{20}$	-1.164	799.264 6	623.184 8, 605.439 3, 461.235 1, 315.274 5	未知
34	12.20	$C_{31}H_{42}O_{17}$	0.181	685.234 0	599.284 6, 523.372 4, 387.380 7, 353.185 5	cistanoside A
35	12.26	$C_{36}H_{48}O_{20}$	-0.025	799.265 9	637.320 7, 623.297 2, 605.107 3, 475.255 8, 275.068 7	β -hydroxyacteoside
36	12.41	$C_{29}H_{36}O_{16}$	0.280	639.192 1	621.134 9, 529.226 4, 459.209 8, 323.113 3	neo-rehmannioside/ frehmaglutoside H
37	12.46	$C_{21}H_{36}O_9$	1.579	431.228 2	371.154 9, 303.103 2, 178.858 0	jionoside B1/B2
38	12.54	$C_{37}H_{50}O_{20}$	-0.504	813.280 8	795.140 0, 637.304 9, 619.210 4, 491.362 4, 347.497 1	6- <i>O</i> -vanilloylajugol
39	12.58	$C_{23}H_{30}O_{12}$	1.282	497.166 0	479.244 8, 335.127 0, 317.023 0, 166.861 4, 151.988 5	6- <i>O</i> -feruloylcatalpol
40	12.72	$C_{25}H_{30}O_{13}$	0.936	537.160 8	337.134 3, 295.021 2, 216.881 9, 192.915 0, 174.946 8	rehmaglutoside C
41	12.81	$C_{30}H_{42}O_{17}$	-0.098	673.233 8	527.133 9, 389.068 5	6- <i>O</i> -seco-hydroxyaeginetoyl ajugol/rehmaglutoside J/ rehmaglutoside H
42	12.87	$C_{30}H_{46}O_{13}$	0.591	613.285 8	495.288 0, 347.113 5	jionoside B1/B2
43	13.01	$C_{37}H_{50}O_{20}$	-0.504	813.280 8	637.278 6, 619.210 1, 473.206 0, 353.007 8	verbascoside [#]
44	13.10	$C_{29}H_{36}O_{15}$	-0.524	623.196 7	477.324 8, 461.129 7, 443.326 8, 315.197 6, 179.000 5	ferulic acid [#]
45	13.31	$C_{10}H_{10}O_4$	5.049	193.050 5	177.889 8, 148.954 4, 133.888 6	isoverbascoside [#]
46	13.42	$C_{29}H_{36}O_{15}$	0.455	623.197 3	477.255 0, 461.124 8, 443.324 6, 315.054 6, 297.244 3	6- <i>O</i> -vanilloylajugol
47	13.50	$C_{23}H_{30}O_{12}$	-0.629	497.165 0	479.234 9, 335.155 5, 272.244 0, 166.939 6, 151.889 7	6- <i>O</i> -E-cafeoyajugol
48	13.53	$C_{24}H_{30}O_{12}$	0.567	509.165 9	465.304 0, 347.303 5, 216.987 4, 178.847 9, 160.911 6	dunnisinioside
49	13.62	$C_{26}H_{30}O_{13}$	1.352	549.161 0	505.292 4, 337.124 9, 234.909 9	isoverbascoside
50	13.69	$C_{29}H_{36}O_{15}$	-0.620	623.196 7	477.217 0, 461.187 7, 315.184 0, 251.060 2	jicocarotenoside A1/A2
51	13.72	$C_{21}H_{34}O_9$	-0.347	429.211 8	411.116 0, 303.106 5, 267.069 5, 231.013 9, 205.066 6, 142.929 5	isoverbascoside
52	13.82	$C_{29}H_{36}O_{15}$	-0.043	623.197 0	477.222 0, 461.193 9, 315.153 0	rehmaglutoside I
53	13.87	$C_{36}H_{56}O_{17}$	-0.232	759.343 2	579.130 3, 429.222 0, 411.233 9, 347.085 0, 249.183 5	jionoside D/ leucosceptoside A
54	14.08	$C_{30}H_{38}O_{15}$	-0.654	637.212 3	491.144 1, 475.189 2, 461.071 5, 443.235 4	harpagoside [#]
55	14.46	$C_{24}H_{30}O_{11}$	1.042	493.171 5	331.106 9, 313.123 7, 162.927 2	2'-acetylacteoside
56	14.46	$C_{31}H_{38}O_{16}$	0.043	665.207 6	623.242 1, 503.203 1, 461.152 0, 443.291 3, 315.118 9	jionoside C
57	14.71	$C_{29}H_{36}O_{13}$	-2.867	591.204 4	523.265 2, 445.123 9, 391.097 2, 299.120 8	6- <i>O</i> -feruloylajugol
58	14.73	$C_{25}H_{32}O_{12}$	-0.999	523.180 5	508.242 9, 479.136 4, 361.100 2, 343.164 3, 299.182 6, 192.924 3	jionoside D/ leucosceptoside A
59	14.81	$C_{30}H_{38}O_{15}$	-0.371	637.212 5	491.207 8, 461.255 9, 443.222 0, 192.963 5	nigroside I/II
60	14.87	$C_{30}H_{38}O_{14}$	-0.213	621.217 7	475.283 5, 445.282 3, 427.256 9, 391.182 9, 192.958 1, 174.956 3	aegnetic acid 5- <i>O</i> - β -D-quinovoside
61	14.99	$C_{21}H_{34}O_8$	1.732	413.217 7	395.170 6, 313.306 2, 267.270 4, 249.120 4, 186.990 3, 144.920 4	martynoside/isomer
62	15.20	$C_{31}H_{40}O_{15}$	0.358	651.228 5	623.237 8, 505.248 4, 475.244 0, 457.275 0, 265.114 6	martynoside/isomer
63	15.44	$C_{31}H_{40}O_{15}$	-0.118	651.228 3	505.185 1, 475.154 6, 193.059 7	martynoside/isomer
64	15.87	$C_{31}H_{40}O_{15}$	0.159	651.228 5	505.240 1, 475.210 0, 192.892 4	martynoside/isomer
65	16.31	$C_{31}H_{40}O_{15}$	0.066	651.228 4	633.377 6, 505.171 9, 475.294 3, 457.138 5	rehmaglutoside C/isomer
66	16.53	$C_{28}H_{40}O_{10}$	-0.325	535.253 6	373.236 0, 355.223 8, 265.068 8, 205.025 7, 162.834 0	rehmaglutoside F
67	16.68	$C_{30}H_{46}O_{12}$	0.062	597.290 6	579.240 1, 393.060 5, 346.930 7, 249.151 3	rehmaglutoside C/isomer
68	17.39	$C_{28}H_{40}O_{10}$	-0.213	535.253 7	491.419 5, 355.272 8, 307.056 9, 187.050 4, 162.898 6	未知
69	17.87	$C_{31}H_{40}O_6$	-4.702	507.271 7	415.377 9, 279.142 0, 227.061 7, 152.917 7	kaempferol [#]
70	18.15	$C_{15}H_{10}O_6$	1.177	285.039 7	264.847 5, 257.059 2, 228.994 1, 184.957 8, 150.900 3, 106.889 2	ursolic acid/oleanolic acid
71	19.51	$C_{30}H_{48}O_3$	-0.042	455.351 9	434.917 8, 407.358 4, 339.172 3, 307.363 3, 192.913 3	oleanonic acid
72	20.01	$C_{30}H_{46}O_3$	0.503	453.336 6	433.112 5, 407.353 9, 386.939 1	未知
73	20.83	$C_{28}H_{54}O_4$	0.449	453.394 0	435.459 1, 391.475 3	

[#]用对照品指认[#]Confirmed with reference components

量达到最大,故选取 40 min 作为超声处理时间。同时考察了不同甲醇体积所提取样品对于指纹图谱的影响,确定了 2.0 g 地黄加入 20.0 mL 甲醇(1:10)提取。

本研究建立了生地黄药材指纹图谱和化学成分定性分析相结合的质量评价方法。利用中药指纹图谱综合、快速的检测方法,通过其丰富的色谱峰信息以及共有峰相似度的评价,对生地黄药材整体评价。同时通过液质联用技术,采用 LTQ-Orbitrap XL 高分辨质谱,将线性离子阱的多级质谱功能和 Orbitrap 高质量精确度和高分辨能力结合,为生地黄化学成分的鉴定和分析提供了丰富、准确的信息,为所建立的质量评价方法提供更可靠的依据。

参考文献

- [1] 曹建军,梁宗锁,杨东风,等.地黄 HPLC-DAD 多波长指纹图谱的建立及其在熟地黄炮制中的应用[J].中草药,2014,45(2): 265-270.
- [2] 李红伟,孟祥乐.地黄化学成分及其药理作用研究进展[J].药物评价研究,2015,38(2): 218-228.
- [3] 孟祥龙,马俊楠,张朔生,等.熟地黄炮制(九蒸九晒)过程中药效化学成分变化及炮制辅料对其影响研究[J].中草药,2016,47(5): 752-759.
- [4] 张文婷,岳超,黄琴伟,等.地黄生品与炮制品中 8 个糖类成分及不同炮制时间点其量变化分析[J].中草药,2016,47(7): 1132-1136.
- [5] 郭东艳,张丽娟,王梅,等.生地黄止血有效部位 HPLC 指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4): 90-92.
- [6] 高新彪,孙磊,乔善义,等.六味地黄浓缩丸 HPLC 指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2012,37(22): 3411-3415.
- [7] 张杰,刘炯,张萌,等.生地黄低聚糖部位的 HPLC 指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(22): 41-44.
- [8] 余进,王义明,梁琼麟,等.生地黄药材指纹图谱研究[J].江西中医药大学学报,2012,24(4): 40-43.
- [9] Su S L, Cui W X, Zhou W, *et al.* Chemical fingerprinting and quantitative constituent analysis of Siwu decoction categorized formulae by UPLC-QTOF/MS/MS and HPLC-DAD[J]. *Chin Med*, 2013, 8(1): 1-15.
- [10] Gong L L, Xu H Y, Wang L, *et al.* Identification and evaluation of the chemical similarity of Yindan xinnaotong Samples by ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry fingerprinting[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(3): 611-622.
- [11] Zhang N, Song Y L, Song Q Q, *et al.* Qualitative and quantitative assessments of *Aconiti Lateralis Radix praeparata* using high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and hybrid ion trap-time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(6): 888-901.
- [12] Wang H Y, Sun H, Zhang A H, *et al.* Rapid identification and comparative analysis of the chemical constituents and metabolites of *Phellodendri amurensis cortex* and *Zhibai dihuang pill* by ultra-performance liquid chromatography with quadrupole TOF-MS[J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(24): 3874-3882.
- [13] 张艳丽.地黄叶的化学成分研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2013.
- [14] 刘彦飞.地黄活性物质与功能研究[D].北京:北京协和医学院,2013.
- [15] 卢鹏伟.地黄的化学成分和炮制的比较研究[D].开封:河南大学,2008.