

· 药学基础 ·

# 基于高分辨质谱分析的经典名方百合地黄汤中生地黄汁的 制备工艺

魏梦佳<sup>1</sup>, 陈凤鸣<sup>1</sup>, 张志杰<sup>1\*</sup>, 赵一帆<sup>1</sup>, 李烧烧<sup>1</sup>, 李鹏<sup>2</sup>, 何倩灵<sup>2</sup>

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 扬子江药业集团 江苏龙凤堂中药有限公司, 国家中医药管理局 中药质量控制重点实验室,  
江苏泰州 225321)

**[摘要]** 目的:对参照历代本草和医籍中记载的生地黄汁4种制备方法进行研究,以期找到最符合百合地黄汤方义的生地黄汁制备方法。方法:经古籍文献考证,已知制备生地黄汁的4种方法分别是鲜地黄捣汁、鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁、生地黄煮汁。采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS),分析4种方法制备得到的生地黄汁的化学成分,采用主成分分析技术(PCA)对其质谱数据进行分析。结果:①从4种生地黄汁共鉴定出27个化学成分,包括10个环烯醚萜苷类、14个苯乙醇苷类、2个酚酸和1个紫罗兰酮。4种生地黄汁中共有的化学成分有15个,包括7个环烯醚萜苷类、7个苯乙醇苷类和1个酚酸。②4种生地黄汁共有的化学成分,经对照品比对的有5个,分别为梓醇、桃叶珊瑚苷、地黄苷D、益母草苷和洋地黄叶苷C。③毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷在鲜地黄捣汁中未检测到,但在鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁、生地黄煮汁中均检测到,说明毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷是鲜地黄受热后产生的,并非鲜地黄的原有成分。④通过对洋地黄叶苷C和毛蕊花糖苷的一级、二级碎片离子比对分析,结合两者及异毛蕊花糖苷3种化学成分的空间结构异同,认为毛蕊花糖苷是由洋地黄叶苷C受热断裂糖苷键,脱去一分子甘露糖转化而来。⑤毛蕊花糖苷可异构化生成异毛蕊花糖苷,异毛蕊花糖苷的相对含量随着鲜地黄受热时间的增加而增加,但毛蕊花糖苷和洋地黄叶苷C的相对含量却并未相应减少,推测洋地黄叶苷C也是由其上成分转化而来。结论:鲜地黄捣汁与其他3种方法制备得到的“生地黄汁”在成分方面有显著区别,其他3种方法制备的“生地黄汁”化学成分组成较相似。虽然4种方法均可用于制备“生地黄汁”,但以鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁和生地黄煮汁作为百合地黄汤中“生地黄汁”的制备方法更合适。

**[关键词]** 生地黄汁; 鲜地黄; 百合地黄汤; 洋地黄叶苷C; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0133-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220616

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220310.0925.002.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-11 11:54

## Preparation of Rehmanniae Radix Juice for Baihe Dihuangtang Based on UPLC-Q-TOF-MS

WEI Meng-jia<sup>1</sup>, CHEN Feng-ming<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-jie<sup>1\*</sup>, ZHAO Yi-fan<sup>1</sup>,

LI Rao-rao<sup>1</sup>, LI Peng<sup>2</sup>, HE Qian-ling<sup>2</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,  
Beijing 100700, China;

2. Institute of Chinese Medicine Research, Yangtze River Pharmaceutical Group Jiangsu Longfeng Tang  
Traditional Chinese Medicine (TCM) Co. Ltd., The National Key Laboratory of TCM Quality Control,  
National Administration of TCM, Taizhou 225321, China)

**[收稿日期]** 2022-02-22

**[基金项目]** 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A03707)

**[第一作者]** 魏梦佳,在读硕士,从事中药质量控制研究,E-mail:weimengjia2018@163.com

**[通信作者]** \* 张志杰,研究员,从事中药质量控制与中药新药研究,E-mail:zzjtem@126.com

**[Abstract]** **Objective:** To compare the four preparation methods of Rehmanniae Radix juice described in ancient literature and find the method that is most suitable for the preparation of Rehmanniae Radix juice used in Baihe Dihuangtang. **Method:** The ancient medical books record four methods for preparing Rehmanniae Radix juice: crushing fresh Rehmanniae Radix for juice, steaming fresh Rehmanniae Radix for juice, boiling fresh Rehmanniae Radix for juice, and boiling dry Rehmanniae Radix for juice. Ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was employed to detect the compounds in the four juice samples, followed by principal component analysis (PCA). **Result:** ① Totally 27 compounds were identified in the juice samples, including 10 iridoid glycosides, 14 phenylethanoid glycosides, 2 phenolic acids, and 1 irisone. Among them, 15 common compounds were shared by the four juice samples, including 7 iridoid glycosides, 7 phenylethanoid glycosides, and 1 phenolic acid. ② Five common compounds in the four juice samples can be matched with the reference standards, which were catalpol, aucubin, rehmannioside D, ajugol, and purpureaside C. ③ Verbascoside and isoacteoside were not detected in the juice prepared by crushing fresh Rehmanniae Radix, while it was detected in the other three juice samples, which indicated that the two components were produced after heating rather than being the original components in fresh Rehmanniae Radix. ④ The comparison of the ion fragments demonstrated that verbascoside was produced from purpureaside C after the cleavage of the glycosidic bond and removal of a molecule of mannose. ⑤ Isoacteoside could be isomerized from verbascoside, and its relative content increased with the extension of heating time. However, the relative content of verbascoside and purpureaside C did not decrease significantly. Therefore, it was hypothesized that purpureaside C was produced from its upstream component. **Conclusion:** The juice prepared by crushing fresh Rehmanniae Radix has the chemical composition significantly different from the juice samples prepared with the other 3 methods, while the latter 3 juice samples had similar chemical composition. Although all the four methods can be used, it is more suitable to prepare Rehmanniae Radix juice by steaming fresh Rehmanniae Radix, boiling fresh Rehmanniae Radix, and boiling dry Rehmanniae Radix.

**[Keywords]** Rehmanniae Radix juice; fresh Rehmanniae Radix; Baihe Dihuangtang; purpureaside C; verbascoside; isoacteoside

生地黄汁是地黄饮片中一种最特殊的饮片类型。其特殊性在于其是由地黄制备得到的液体饮片,且临床应用的历史悠久。百合地黄汤出自张仲景《金匱要略》,原方记载:“百合病,不经吐、下、发汗,病形如初者,百合地黄汤主之。百合七枚(擘),生地黄汁一升。上以水洗百合,渍一宿,当白沫出,去其水,更以泉水二升,煎取一升,去滓,内地黄汁,煎取一升五合,分温再服。中病,勿更服,大便当如漆。”<sup>[1]</sup>方中以生地黄汁入方:“生地黄汁一升”,但却未载明生地黄汁的制法。张仲景用药,非常重视药物炮制与煎服法,同一味药在不同处方中常因治疗目的不同而炮制方法迥异;另一方面,百合地黄汤简便有效,一直受到临床医生的喜爱,其临床应用自张仲景一直延续到当代,在历朝历代的应用中,其用法、用量、加减也会临证微调,且都取得了良好的效果。要做好经典名方百合地黄汤的研究,非常有必要对历代百合地黄汤的处方用法进行梳理,尤其是其中的生地黄汁,因原方未载明制备方法,必

须对其制法进行考证和研究。

本课题组对历代本草和医书中记载的生地黄和生地黄汁的制法进行了考证。总体考证结果,历代本草和医书中记载的生地黄有2种,①是现今的鲜地黄,②是现今的生地黄。由此,历代用于制备生地黄汁的地黄也有两种,现代的鲜地黄和现代的生地黄;历代生地黄汁的制备方法经考证共有以下4种,①用鲜地黄捣汁的制备方法;②用鲜地黄蒸汁的制备方法;③用鲜地黄煮汁的制备方法;④用生地黄煮汁的制备方法。

基于以上研究结果,制备得到4种不同的生地黄汁,根据地黄形态和制汁方法的不同,分别命名为鲜地黄捣汁、鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁和生地黄煮汁,并采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间-质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS)技术对4种生地黄汁的化学成分进行对比研究。

## 1 材料

2998型超高效液相色谱仪和Xevo G2-S Q-

TOF型高分辨飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司), Masslynx 工作站、FA1004 型 1/1 万分析电子天平(上海良平仪器有限公司), AYW120D 型 1/10 万电子天平(岛津菲律宾工厂), JYZ-V919 型九阳智能原汁机(九阳股份有限公司), 101-1AB 型电热鼓风干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司), PFR-1000 型预制冷冻机、ALPH 1-2/LD-Plus 型冷冻干燥机(上海博励行仪器有限公司), C21-WT2118 型电磁炉(上海美的生活电器制造有限公司), FTS-10H 型液体加热器、分体式煎药锅(潮州市一壶百饮电器实业有限公司), SK7210HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯(赛默飞世尔科技有限公司), 磷酸为色谱纯(北京迈瑞达科技有限公司), 水为纯净水。

地黄苷 D、桃叶珊瑚苷、异毛蕊花糖苷、益母草苷对照品(成都普思生物科技股份有限公司, 批号分别为 PS011176、PS020259、PS001059、PS020361, 纯度均 $\geq 98\%$ ); 梓醇、毛蕊花糖苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110808-211711、111530-201914, 纯度均 $\geq 95.2\%$ ); 松果菊苷、洋地黄叶苷 C 对照品(成都埃法生物科技有限公司, 批号分别为 AF20051710、AF22011601, 纯度均 $\geq 99.8\%$ )。

3 批鲜地黄购自地黄道地主产区河南省武陟县, 经中国中医科学院中药研究所生药研究中心张志杰研究员鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的新鲜块根, 符合 2020 年版《中华人民共和国药典》一部收录的鲜地黄来源。

## 2 方法

**2.1 供试样品的制备** 鲜地黄捣汁: 取鲜地黄 325 g, 清水冲洗泥沙, 除去表面浮水, 切制成 3~4 cm 厚片, 用九阳智能原汁机榨汁, 200 目筛过滤, 得到鲜地黄捣汁约 200 mL。将鲜地黄捣汁真空冷冻干燥, 得到鲜地黄捣汁的冻干粉, 干燥器保存, 备用。

鲜地黄蒸汁: 取鲜地黄 325 g, 清水冲洗泥沙, 除去表面浮水, 切制成 3~4 cm 厚片, 放入蒸锅, 水沸腾后, 隔水蒸制 30 min, 将地黄取出用纱布绞汁, 200 目筛过滤, 得到鲜地黄蒸汁约 200 mL。将鲜地黄蒸汁真空冷冻干燥, 得到鲜地黄蒸汁的冻干粉, 干燥器保存, 备用。

鲜地黄煮汁: 取鲜地黄 325 g, 清水冲洗泥沙, 除去表面浮水, 切制成 3~4 cm 厚片, 放入锅中, 加水 1 000 mL, 水沸腾后, 煎煮 30 min, 将地黄捞出用纱布绞汁, 与煎煮液合并, 200 目筛过滤, 得到合并液

约 600 mL, 浓缩至约三分之一, 得到鲜地黄煮汁约 200 mL。将鲜地黄煮汁真空冷冻干燥, 得到鲜地黄煮汁的冻干粉, 干燥器保存, 备用。

生地黄煮汁: 取鲜地黄 325 g, 清水冲洗泥沙, 除去表面浮水, 40 °C 温度下, 缓缓烘至八成干, 得生地黄。取生地黄, 加水 600 mL, 浸泡 40 min 后, 武火煮沸后改文火煎煮 70 min, 趁热过滤, 得生地黄煮液①; 药渣加水 400 mL, 武火煮沸后文火煎煮 50 min, 趁热过滤, 得生地黄煮液②, 合并煮液①和②, 200 目筛过滤, 得到生地黄煮汁约 200 mL。将生地黄煮汁真空冷冻干燥, 得到生地黄煮汁的冻干粉, 干燥器保存, 备用。

**2.2 供试品溶液的制备** 取 4 种供试品的冻干粉约 0.4 g, 精密称定, 分别加 50% 甲醇, 超声溶解 15 min (功率 280 W, 频率 53 kHz), 定容 10 mL, 摇匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜, 即得, 备用。

**2.3 对照品溶液的制备** 分别精密称取毛蕊花糖苷、地黄苷 D、异毛蕊花糖苷、梓醇、益母草苷、桃叶珊瑚苷、松果菊苷、洋地黄叶苷 C 对照品 6.0、7.6、5.8、5.2、5.5、5.7、5.1、5.7 mg, 分别以 50% 甲醇溶液溶解, 定容 10 mL, 摇匀, 制备得毛蕊花糖苷、地黄苷 D、异毛蕊花糖苷、梓醇、益母草苷、桃叶珊瑚苷、松果菊苷、洋地黄叶苷 C 对照品储备液。从各对照品储备液中分别定量吸取 0.5 mL 于 5 mL 量瓶中, 并以 50% 甲醇稀释至刻度, 制备毛蕊花糖苷、地黄苷 D、异毛蕊花糖苷、梓醇、益母草苷、桃叶珊瑚苷、松果菊苷、洋地黄叶苷 C 质量浓度分别为 0.060、0.076、0.058、0.052、0.055、0.057、0.051、0.057  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液, 摇匀, 过 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜, 即得, 备用。

**2.4 UPLC-Q-TOF-MS 分析条件** 液相色谱条件: 以 Waters Acquity UPLC HSS T3  $\text{C}_{18}$  色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ), 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0.1~4.0 min, 1%A; 4.0~7.5 min, 1%~8%A; 7.5~8.5 min, 8%~10%A; 8.5~12.5 min, 10%~16%A; 12.5~16.0 min, 16%~20%A; 16.0~18.0 min, 20%~25%A; 18.0~22.0 min, 25%~50%A; 22.0~28.0 min, 50%~95%A; 28.0~29.0 min, 95%A; 29.0~33.0 min, 1%A), 体积流量 0.4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温 30 °C, 进样量 3  $\mu\text{L}$ 。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); 毛细管电压正离子 3.0 kV, 负离子 2.5 kV; 干燥气温度 450 °C; 干燥体积流量 800 L $\cdot\text{h}^{-1}$ ; 碰撞电压 15~40 eV 动态变化; 正负离子模式下扫描检测, 质量扫描范围  $m/z$  50~1 800; 采用

0.1% 甲酸、 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  亮氨酸脑啡肽的 50% 乙腈水溶液进行实时校正。

### 3 结果

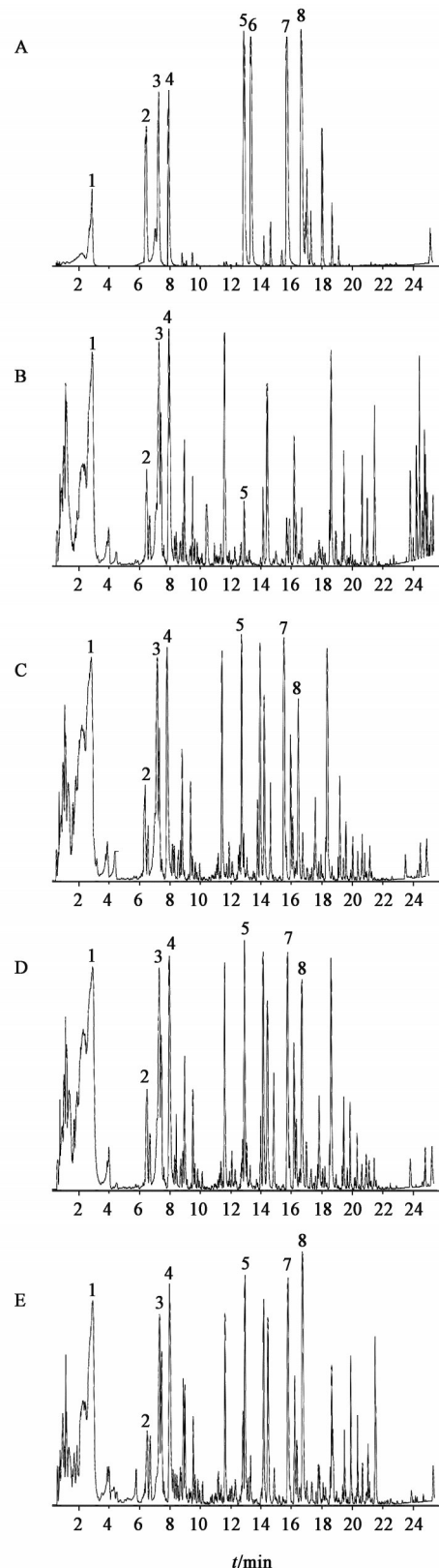
**3.1 UPLC-Q-TOF-MS 成分分析** UPLC-Q-TOF-MS 技术对鲜地黄捣汁、鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁、生地黄煮汁的供试品溶液分别进行化学成分定性分析,其负离子模式下的总离子流图见图 1。

结合文献[2-13]数据对比进行化学成分确认,从 4 种生地黄汁初步鉴定出来 27 种化学成分,包括 10 种环烯醚萜苷类成分、14 种苯乙醇苷类成分、2 种酚酸成分和 1 种紫罗兰酮。其中 4 种生地黄汁共有的化学成分有 15 个,包括 7 个环烯醚萜苷类成分、7 个苯乙醇苷类成分和 1 种酚酸成分。经 8 个对照品比对,指出 7 种化学成分,包括梓醇、桃叶珊瑚苷、地黄苷 D、益母草苷 4 种环烯醚萜苷类成分,洋地黄叶苷 C、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷 3 种苯乙醇苷类成分,其中 4 种生地黄汁共有的化学成分有 5 种,分别为梓醇、桃叶珊瑚苷、地黄苷 D、益母草苷和洋地黄叶苷 C,在鲜地黄捣汁中未检测到毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷。

**3.2 鲜地黄与生地黄中苯乙醇苷类化学成分的转化** 经对照品指认的苯乙醇苷类化学成分有 3 个,分别为洋地黄叶苷 C、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷。结果表明,①4 种生地黄汁中均检测到洋地黄叶苷 C;②鲜地黄捣汁中未检测到毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷,但在鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁和生地黄煮汁中均检测有毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷,说明毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷是鲜地黄受热后产生。

洋地黄叶苷 C、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷均属于咖啡酰基苯乙醇苷类,通过空间结构对比,三者的母核结构一致,均为咖啡酰基与  $\beta$ -葡萄糖共同构成。三者结构上的主要区别为①洋地黄叶苷 C 和毛蕊花糖苷的咖啡酰基位于  $\beta$ -葡萄糖的 C-4 位,而异毛蕊花糖苷的咖啡酰基位于  $\beta$ -葡萄糖的 C-5 位;②洋地黄叶苷 C 和毛蕊花糖苷的区别为,洋地黄叶苷 C 的  $\beta$ -葡萄糖的 C-5 位末端为甘露糖,而毛蕊花糖苷在该位的取代为羟基取代,③毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷为同分异构体。见增强出版附加材料。

本实验选用碰撞能 15~40 eV 动态变化,在负离子模式下,洋地黄叶苷 C 的分子离子为  $[\text{M-H}]^{-}$  ( $m/z$  785.252 3),其二级碎片离子有  $m/z$  623.218 6、 $m/z$  315.107 8、 $m/z$  461.165 1、 $m/z$  161.024 0、 $m/z$  133.028 8 等,其分子离子与二级碎片离子  $m/z$  623 的质量数相差 162。分析洋地黄叶苷 C 的分子结构,其二级



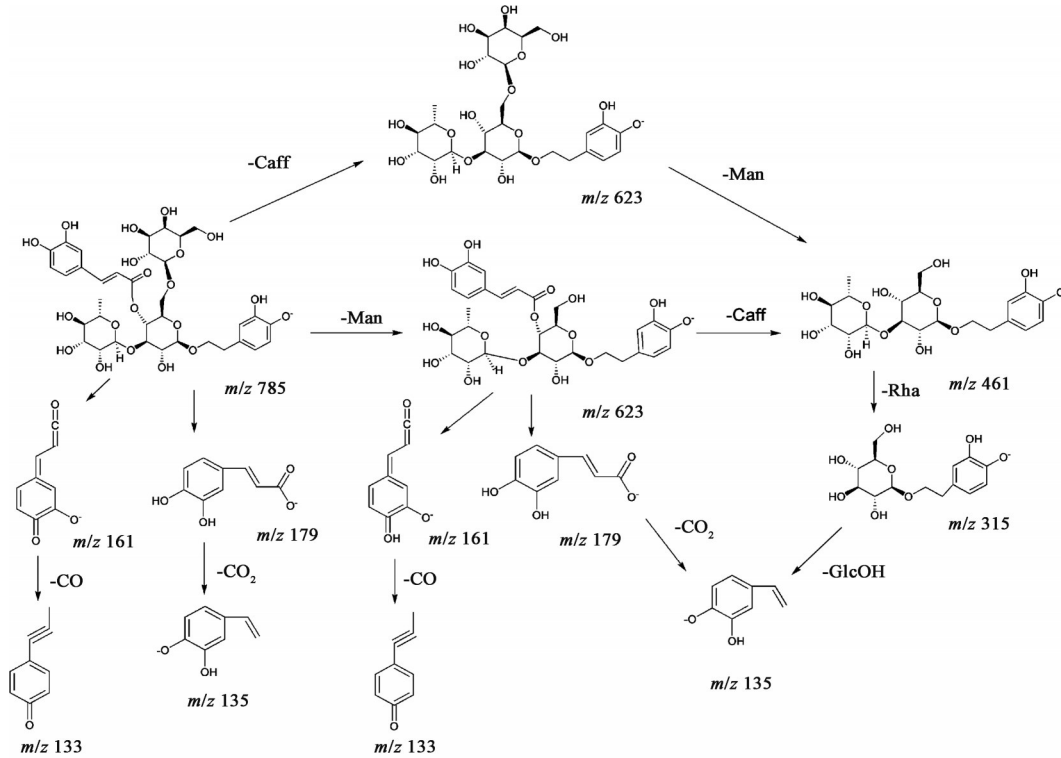
注:1. 梓醇;2. 桃叶珊瑚苷;3. 地黄苷 D;4. 益母草苷;5. 洋地黄叶苷 C;7. 毛蕊花糖苷;8. 异毛蕊花糖苷;A~E. 分别为对照品混标、鲜地黄捣汁、鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁、生地黄煮汁

图 1 生地黄煮汁在负离子模式下的总离子流

Fig. 1 Total ion flow chart of boiling dry Rehmanniae Radix for juice in negative ion mode

碎片离子  $m/z$  623 理论上可能通过脱去 1 个甘露糖基 (162 Da) 或 1 个咖啡酰基 (162 Da) 两条裂解途径得到。进一步, 观察到洋地黄叶苷 C 的三级质谱图发现  $m/z$  179、61 的碎片离子, 该 2 个碎片离子均为具有咖啡酰基特征的离子碎片<sup>[14]</sup>。毛蕊花糖苷对照品的分子离子为  $[M-H]^-$  ( $m/z$  623.201 4), 其二级离子碎片有  $m/z$  315.107 7、461.165 6、161.024 2、133.028 9。洋地黄叶苷 C 和毛蕊花糖苷的裂解的一

级、二级质谱见增强出版附加材料。从二级质谱可知, 洋地黄叶苷 C 脱去 1 个甘露糖基 (162 Da), 生成了二级碎片离子  $m/z$  623.218 6, 该碎片离子与毛蕊花糖苷的分子离子  $[M-H]^-$  ( $m/z$  623.201 4), 相对分子质量接近; 同时, 两者有多个基本相同的二级碎片离子, 如  $m/z$  315.107、 $m/z$  461.165、 $m/z$  161.024、 $m/z$  133.028 等, 说明洋地黄叶苷 C 脱去甘露糖基后生成了毛蕊花糖苷。见图 2。



注: Caff. 咖啡酰基; Glc.  $\beta$ -葡萄糖; Rha. 鼠李糖; Man. 甘露糖

图 2 洋地黄叶苷 C 裂解的理论途径

Fig. 2 Possible fragmentation pathway of purpureaside C

毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷是同分异构体, 但毛蕊花糖苷的咖啡酰基与  $\beta$ -葡萄糖的连接位置与洋地黄叶苷 C 一致, 而异毛蕊花糖苷与其取代位置不同, 可以判定洋地黄叶苷 C 糖苷键断裂, 脱去 1 个甘露糖基转化生成的是毛蕊花糖苷。毛蕊花糖苷可异构化生成异毛蕊花糖苷<sup>[15-17]</sup>。推测洋地黄叶苷 C、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的转化过程, 见图 3。

本实验中可以判断洋地黄叶苷 C 断裂糖苷键, 生成了毛蕊花糖苷, 但该转化发生的条件是蒸煮等高温加热方式, 且是在水溶液情况下发生, 而在之前的报道中, 鲜地黄经产地加工成的生地黄中也普遍含有毛蕊花糖苷, 说明产地的加工条件 (约 50 °C 烘焙 3 d 左右) 下也可发生该转化过程, 该转化发生的边界条件有待进一步研究确认。负离子模式下 4 种生地黄汁中化学成分分析结果, 见表 1。

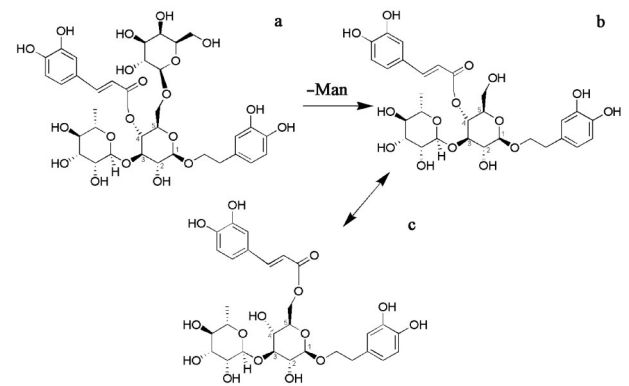


图 3 地黄中洋地黄叶苷 C(a) 裂解生成毛蕊花糖苷(b), 毛蕊花糖苷异构化生成异毛蕊花糖苷(c) 的示意

Fig. 3 Possible conversion process of purpureaside C (a), verbasin (b) and isoacteoside (c)

3.3 7 个化学成分的数据分析 将经对照品指认的 7 个化学成分 (梓醇、桃叶珊瑚苷、地黄苷 D、益母草

表1 在负离子模式下4种生地黄汁中化学成分分析

Table 1 Analysis results of chemical compounds in four kinds of Rehmanniae Radix juice in negative ion mode

No.	$t_R$ /min	化学成分	分子式	实测值	离子模式	$\delta$ /ppm	二级碎片离子	归属
1	2.860	梓醇 <sup>1)</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	407.119 0	[M+HCOO] <sup>-</sup>	0.0	361.113 3, 199.060 8, 169.049 6, 151.039 9	abcd
2	6.440	桃叶珊瑚苷 <sup>1)</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	391.124 0	[M+HCOO] <sup>-</sup>	0.3	345.118 0, 183.065 4, 139.039 5, 116.928 6	abcd
3	6.663	蜜力特苷/地黄苷 A	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	523.166 3	[M-H] <sup>-</sup>	0.0	179.055 0, 343.102 4	d
4	7.244	地黄苷 D <sup>1)</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>20</sub>	731.224 5	[M+HCOO] <sup>-</sup>	-0.3	505.158 4, 263.082 4, 387.113 4, 181.050 4	abcd
5	7.899	益母草苷	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	393.140 5	[M+HCOO] <sup>-</sup>	2.0	167.071 6, 329.119 8, 179.056 4, 267.015 0	abcd
6	8.810	decaffeoyl-verbascoside	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	461.165 8	[M-H] <sup>-</sup>	-0.2	135.044 1, 161.053 0	bcd
7	8.909	8-表番木鳖酸	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	375.128 8	[M-H] <sup>-</sup>	-0.3	169.085 3, 125.063 4	abcd
8	9.190	京尼平苷酸	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	373.112 5	[M-H] <sup>-</sup>	-2.7	123.047 3	abc
9	9.264	肉苁蓉苷 F	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	487.145 0	[M-H] <sup>-</sup>	-0.2	179.034 1	a
10	10.062	rhamnopyranosyl vanilloyl	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	313.091 9	[M-H] <sup>-</sup>	-1.3	167.034 4, 152.010 2, 123.049 7	abcd
11	10.867	syringic acid-4-O- $\alpha$ -L-rhamnoside	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	343.101 9	[M-H] <sup>-</sup>	-2.9	182.025 9, 197.046 5	bcd
12	12.732	地黄苦苷元	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	183.101 9	[M-H] <sup>-</sup>	-1.1	139.112 4, 119.049 3	bcd
13	12.853	洋地黄叶苷 C <sup>1)</sup>	C <sub>35</sub> H <sub>46</sub> O <sub>20</sub>	785.252 3	[M-H] <sup>-</sup>	1.5	623.218 4, 477.163 3, 392.123 5, 161.022 8	abcd
14	14.077	焦地黄苯乙醇苷 A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> O <sub>20</sub>	799.265 6	[M-H] <sup>-</sup>	-0.6	623.218 0, 605.216 6, 461.158 1	abcd
15	14.781	焦地黄苯乙醇苷 A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> O <sub>20</sub>	799.265 3	[M-H] <sup>-</sup>	-1.0	623.222 5, 605.221 6, 461.163 8	abcd
16	15.679	毛蕊花糖苷 <sup>1)</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	623.201 4	[M-H] <sup>-</sup>	0.5	461.165 6, 315.108 3, 161.024 1, 135.044 5	bcd
17	16.262	6-O-香草酰基筋骨草醇	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub>	497.166 0	[M-H] <sup>-</sup>	0.2	167.033 0, 152.012 7, 317.109 7	abcd
18	16.119	焦地黄苯乙醇苷 B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub>	C <sub>37</sub> H <sub>50</sub> O <sub>20</sub>	813.281 9	[M-H] <sup>-</sup>	-0.2	637.234 9, 619.224 5, 175.039 5	abcd
19	16.625	异毛蕊花糖苷 <sup>1)</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	623.202 0	[M-H] <sup>-</sup>	1.4	461.165 8, 315.113 6, 161.024 1, 133.028 3	bcd
20	17.678	焦地黄苯乙醇苷 D	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>15</sub>	637.213 5	[M-H] <sup>-</sup>	0.5	491.107 3, 461.164 7, 175.039 6	bcd
21	17.739	jiocarotenoside A <sub>1</sub> /A <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	429.211 9	[M-H] <sup>-</sup>	-1.4	411.118 4, 142.915 4	ad
22	18.148	kanokside C	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>17</sub>	637.213 3	[M-H] <sup>-</sup>	0.2	491.157 0, 161.023 7	abcd
23	18.270	米团花苷 A	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>15</sub>	637.212 7	[M-H] <sup>-</sup>	-0.8	161.022 9, 475.183 0	bc
24	18.550	6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	523.181 9	[M-H] <sup>-</sup>	0.6	193.049 9, 343.117 5	abcd
25	17.685	nigroside I / II	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>14</sub>	621.182 1	[M-H] <sup>-</sup>	0.3	175.040 1, 193.049 6	a
26	19.390	地黄苷/异地黄苷	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> O <sub>15</sub>	651.228 9	[M-H] <sup>-</sup>	0.0	475.180 5, 175.039 2, 193.049 8	abcd
27	19.796	地黄苷/异地黄苷	C <sub>31</sub> H <sub>40</sub> O <sub>15</sub>	651.229 2	[M-H] <sup>-</sup>	-0.5	475.180 5, 175.039 4, 193.050 0	abcd

注: <sup>1)</sup>表示经对照品指认; a. 鲜地黄捣汁; b. 鲜地黄蒸汁; c. 鲜地黄煮汁; d. 生地黄煮汁

苷、洋地黄叶苷 C、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷)在 4 种不同生地黄汁中与含量相关的质谱数据 (Masslynx 工作站积分得到峰面积) 导入 SIMC-P 14.1 分析软件中, 进行统计分析, 得到 4 种生地黄汁的主成分分析 (PCA) 得分图, 见图 4 [ $R^2 X(cum)=0.902, Q^2(cum)=0.487$ ]。结果表明, 在 95% 的置信区间内, 12 个样品均没有出现离散数据, 且同种生地黄汁的离散性较小, 表明生地黄汁的组内一致性较好。从图 4 可知, 4 种不同生地黄汁在负离子模式下明显分为 3 类, 鲜地黄蒸汁与鲜地黄煮汁聚为一类, 说明 2 种生地黄汁没有明显差异, 与另外 2 类鲜地黄捣汁和生地黄煮汁具有明显的差异, 鲜地黄捣汁和生地黄煮汁也有明显不同。从 PCA 载荷图可

知 4 种不同生地黄汁中 7 个成分的基本分布情况。

对 7 个化学成分在 4 种不同生地黄汁中与含量相关的质谱数据分析, 绘制得到与含量相关的柱形图, 见图 5。4 个环烯醚萜苷类化学成分在 4 种不同生地黄汁之间的相对含量变化不明显, 3 个苯乙醇苷类化学成分在 4 种不同生地黄汁中的含量变化较显著, 尤其是毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷。鲜地黄捣汁中未检测到毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷, 洋地黄叶苷 C 含量也较低, 甚至检测不到。其他 3 种生地黄汁中均检测到毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和洋地黄叶苷 C, 且相对含量高于鲜地黄捣汁。如前所述, 洋地黄叶苷 C 转化生成了毛蕊花糖苷。

从图 5 可知, 随着受热时间的增加, 除鲜地黄捣

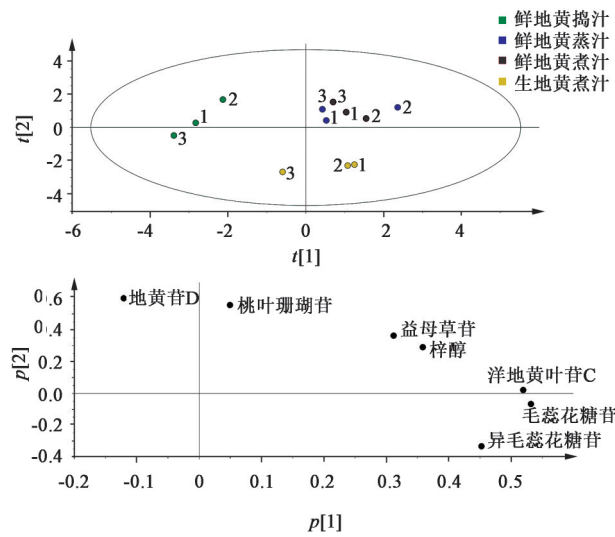


图4 4种生地黄汁PCA得分(a)和7个化学成分在4种生地黄汁的载荷(b)

Fig. 4 Score scatter plot (a) and Loading plot of seven chemical compounds in four kinds of Rehmanniae Radix juice

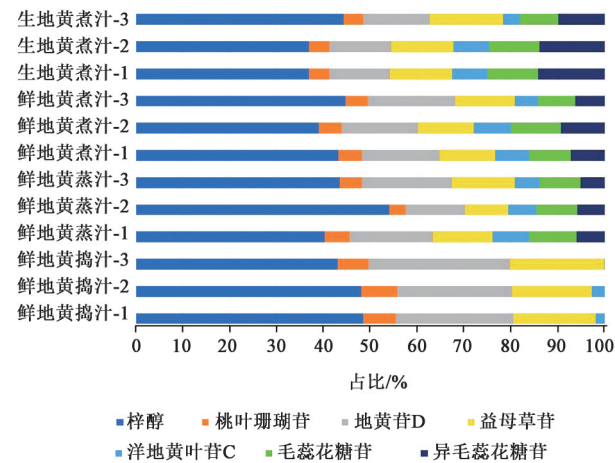


图5 7个化学成分在4种生地黄汁中的相对含量  
Fig. 5 Relative contents of seven chemical compounds in four kinds of Rehmanniae Radix juice

汁外,其他3种生地黄汁中毛蕊花糖苷和洋地黄叶苷C的相对含量变化不明显,而异毛蕊花糖苷在4种生地黄汁中的相对含量变化较明显,鲜地黄捣汁(未测到)<鲜地黄蒸汁≤鲜地黄煮汁<生地黄煮汁。从结构上可以认定,洋地黄叶苷C脱去甘露糖首先生成了毛蕊花糖苷,而且从异毛蕊花糖苷相对含量在4种生地黄汁中的变化,即随着鲜地黄受热时间的增加,异毛蕊花糖苷相对含量也增加,说明毛蕊花糖苷异构化生成异毛蕊花糖苷的反应发生于洋地黄叶苷C转化生成毛蕊花糖苷之后。另一方面,毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷通常被同时检测到,说明毛蕊花糖苷异构化生成异毛蕊花糖苷的条件较温和,异构化反应易于发生。随着异毛蕊花糖

苷的相对含量增加,毛蕊花糖苷和洋地黄叶苷C的相对含量减少却并不明显,说明除了洋地黄叶苷C转化生成毛蕊花糖苷,洋地黄叶苷C应该也是由其上游成分转化产生的,来源需要进一步实验证明。

鲜地黄捣汁-3中未检测到洋地黄叶苷C,可能是因为洋地黄叶苷C是由其上游成分转化而来的,鲜地黄捣汁-3中洋地黄叶苷C的含量太低,未检测到,而另外2批鲜地黄捣汁样品中均检测有洋地黄叶苷C,故认为鲜地黄捣汁中的确有洋地黄叶苷C。另一方面,鲜地黄蒸汁-2中梓醇的相对含量较高,相对百分含量与另2批样品有差异,经对比,发现是Masslynx工作站中自动积分产生误差造成的。

#### 4 结论

从4种生地黄汁共鉴定27个化学成分,包括10个环烯醚萜苷类、14个苯乙醇苷类、2个酚酸和1个紫罗兰酮,共有的化学成分15个,包括7个环烯醚萜苷类、7个苯乙醇苷类和1个酚酸。经7个对照品比对,指认4个环烯醚萜苷化学成分(梓醇、桃叶珊瑚苷、地黄苷D、益母草苷)和3个苯乙醇苷化学成分(洋地黄叶苷C、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷)。4种生地黄汁共有的化学成分分别为梓醇、桃叶珊瑚苷、地黄苷D、益母草苷和洋地黄叶苷C。

毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷在鲜地黄捣汁中未检测到,但在鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁、生地黄煮汁中均检测到,说明毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷是鲜地黄受热后产生的,并非鲜地黄的原有成分。

通过对洋地黄叶苷C、毛蕊花糖苷的一级、二级质谱分析,经二级离子碎片比对后,判定洋地黄叶苷C,受热断裂糖苷键,脱去一分子甘露糖转化生成毛蕊花糖苷。而毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷为同分异构体,易发生异构化,受热后,毛蕊花糖苷可异构化生成异毛蕊花糖苷。随着鲜地黄受热时间的增加,异毛蕊花糖苷相对含量增加,而毛蕊花糖苷和洋地黄叶苷C的相对含量并没有明显的减少,故推测洋地黄叶苷C也由其上游成分转化而来。

#### 5 讨论

对历代本草和医书中记载的总体考证结果,可知生地黄汁的制备方法有4种:①现今的鲜地黄捣汁的制备方法;②现今的鲜地黄蒸汁的制备方法;③现今的鲜地黄煮汁的制备方法;④现今的生地黄煮汁的制备方法。虽然鲜药捣汁是鲜药使用的主要形式,但张仲景《金贵要略》的制备方法即为现今的鲜地黄蒸汁。对4种生地黄汁的化学成分对比后,可知鲜地黄捣汁与其他3种制备方法得到的生

地黄汁的成分有显著区别,而其他3种制备方法的生地黄汁化学成分组成较相似。故认为虽然4种方法都可以用于制备生地黄汁,但以现今的鲜地黄蒸汁、鲜地黄煮汁和生地黄煮汁的制备方法更适合。

洋地黄叶苷C尚有同分异构体成分松果菊苷,两者结构母核一致,区别为 $\beta$ -葡萄糖的C-5位取代的六碳糖不同,洋地黄叶苷C为甘露糖,而松果菊苷为葡萄糖。有研究认为毛蕊花糖苷是由松果菊苷断裂糖苷键,丢掉一分子葡萄糖转化生成的<sup>[18]</sup>。但本研究通过洋地黄叶苷C与松果菊苷的对照品进行比对,确认4种生地黄汁中均没有松果菊苷,从而排除毛蕊花糖苷为松果菊苷转化而得的可能。

从《神农本草经》记载的“生者尤良”,到魏晋南北朝的《肘后备急方》,以至现代中医药研究,鲜药的应用贯穿了中医药的发展全过程。但是鲜药效佳的物质基础和机制并不明确,从苯乙醇苷类成分变化的角度,为鲜药效佳的机制研究提供了1个切入点。苯乙醇苷类化合物广泛存在于双子叶植物中,从植物中分离得到得的苯乙醇苷类化合物已经超过200种,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、免疫调节和保肝等多方面的生物活性,受到的药学研究者的高度重视<sup>[19-21]</sup>。但是,苯乙醇苷类化合物,成分复杂,生物利用度低,稳定性差。研究发现主要产生药效作用的是有效成分的原型和经体内代谢产生的活性代谢产物<sup>[22-24]</sup>,鲜用的药材,苯乙醇苷类化合物的结构形态与其活性之间的关系,值得深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 张仲景. 金匱要略[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997: 8.  
[2] 宋青青, 赵云芳, 张娜, 等. 生地黄 HPLC 指纹图谱的建立及其 HPLC-ESI-MS 分析[J]. 中草药, 2016, 47(23): 4247-4252.  
[3] 周菲, 林美斯, 李锐, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析百合地黄汤的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 15-22.  
[4] 陶益, 蒋妍慧, 唐克建, 等. 地黄炮制前后化学成分的 UHPLC-Q-TOF/MS 比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(1): 102-106.  
[5] 樊晓荃, 付娟, 胡军华, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速分析六味地黄糖片化学成分[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6473-6484.  
[6] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分[J]. 中成

药, 2016, 38(5): 1104-1108.  
[7] 丁腾, 孙宇宏, 杜霞, 等. 经典名方百合地黄汤的化学成分与网络药理学研究[J]. 中草药, 2019, 50(8): 1848-1856.  
[8] 朱建平, 陈保祯, 高萌萌, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 法对鲜、干百合地黄汤化学成分的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(11): 1698-1704.  
[9] 赵新峰, 李平, 孙毓庆. 熟地黄的高效液相色谱/电喷雾电离-质谱分析[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(6): 874-876.  
[10] 范锡玲, 刘晏灵, 曹彦刚, 等. 怀中1号鲜地黄化学成分研究[J]. 药学学报, 2021, 56(11): 3097-3103.  
[11] 杨福燕, 许如玲, 钮炜, 等. 经典名方一贯煎标准煎液 UPLC-Q-TOF-MS 化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2022, doi: 10. 19540/j. cnki. cjcmm. 20211214. 302.  
[12] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(6): 1772-1784.  
[13] 董天骄, 崔元璐, 田俊生, 等. 天然环烯醚萜类化合物研究进展[J]. 中草药, 2011, 42(1): 185-194.  
[14] 刘影. 苯乙醇苷类化合物及其混合物组分群的质谱分析方法以及 LC-MS/NMR 相关谱分析方法研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.  
[15] 张超, 华悦, 廉婧. 肉苁蓉炮制过程中苯乙醇苷类成分含量变化规律研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, doi: 10. 19879/j. cnki.  
[16] 李佳阳, 刘峰, 林玉梅, 等. 蒸制对中药化学成分的影响研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 128-131.  
[17] 王中华, 窦志英, 王洋, 等. 基于毛蕊花糖苷含量分析陈皮和砂仁在熟地黄炮制中的影响性研究[J]. 天津中医药, 2019, 36(12): 1234-1240.  
[18] LI X, XIE Y, LI K, et al. Antioxidation and cytoprotection of acteoside and its derivatives: Comparison and mechanistic chemistry[J]. Molecules, 2018, 23(2): 498.  
[19] 郑晓珂, 刘媛媛, 冯卫生, 等. 天然苯乙醇苷类化合物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(3): 230-234.  
[20] 靖会, 佐建锋, 李教社. 苯乙醇苷类化合物的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 440-441.  
[21] 赵微, 潘英妮. 肉苁蓉苯乙醇苷类成分药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(5): 77-79.  
[22] 刘贵玉, 丁晶鑫, 胡扬, 等. 苯乙醇苷类成分的体内 ADME 研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2019, 35(2): 149-151.  
[23] 薛景, 王英爱, 贾献慧, 等. 苯乙醇苷类化合物的分类及研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(5): 282-290.  
[24] 宋光西, 马玲云, 魏锋, 等. 苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 169-171.

[责任编辑 顾雪竹]