

基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析百合珠芽化学成分 及其薯蓣皂苷元抗肿瘤活性研究

袁志鹰^{1,2}, 罗林明¹, 陈乃宏^{1,2,3}, 梁 昶⁴, 周小江^{1,2*}, 黄惠勇^{1*}, 陈妍羽¹

¹湖南中医药大学; ²湖南省中药饮片标准化与功能工程技术中心, 长沙 410208;

³中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; ⁴湖南省药品检验研究院, 长沙 410001

摘要:为建立超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)快速鉴定百合珠芽中10种化学成分的分析方法,并对薯蓣皂苷元进行抗肿瘤研究。实验采用Thermo Hypersil Gold C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm);乙腈(A)-0.5%乙酸(B)为流动相,梯度洗脱;电喷雾离子源(ESI),正负离子同步监测。采用CCK8法进行薯蓣皂苷元抗肺肿瘤A549细胞、胃肿瘤HGC-27细胞的药效筛选。结果表明,通过二级高分辨质谱分析结合相关文献,共鉴定对香豆酸、薯蓣皂苷、槲皮素等10个化合物。药理研究显示,薯蓣皂苷元对肺癌A549细胞增殖只有微弱的抑制活性,而对胃癌HGC-27细胞增殖表现出较强的抑制作用。本试验证实UPLC-Q-TOF-MS/MS可从保留时间、紫外吸收光谱、精确相对分子质量、分子式和二级结构碎片等方面对百合珠芽的主要成分进行定性分析,为寻找百合珠芽中活性物质提供一种快速准确的分析方法,且揭示百合珠芽中鉴定得到的单体成分可能具有较强的抗肿瘤活性。

关键词:超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱法;百合珠芽;薯蓣皂苷元;抗肿瘤

中图分类号:R284.1; R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)5-0808-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.5.011

Rapid analysis of chemical constituents of Lily Bulbil by UPLC-Q-TOF-MS and the antitumor activity of diosgenin

YUAN Zhi-ying^{1,2}, LUO Lin-ming¹, CHEN Nai-hong^{1,2,3}, LIANG Sheng⁴,
ZHOU Xiao-jiang^{1,2*}, HUANG Hui-yong^{1*}, CHEN Yan-yu¹

¹Hunan University of Chinese Medicine;

²Hunan Engineering Technology Center of Standardization and Function of Chinese Herbal Decoction Pieces, Changsha 410208, China;

³Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

⁴Hunan Institute for drug control, Changsha 410001, China

Abstract: To establish a method for rapid identification of 10 components in bulbil of *Lilium lancifolium* Thunb. by UPLC-Q-TOF-MS, and carry out research of tumor cell proliferation study of diosgenin. A Thermo Hypersil Gold C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile (A)-0.5% acetic acid (B) by gradient elution. Positive and negative ions were simultaneously monitored by electro-spray ionization (ESI), and CCK-8 assay was used to screen the effect of diosgenin on lung cancer A549 cells and gastric cancer HGC-27 cells. Based on the fragmentation pattern and reference results, the structures of 10 compounds including *p*-coumaric acid, diosgenin and quercetin were identified. The pharmacological study showed that diosgenin had only a weak inhibitory activity on the proliferation of A549 cells in lung cancer, and had a strong inhibitory effect on the proliferation of HGC-27 cells in gastric cancer. These results suggested that UPLC-Q-TOF-MS/MS can be used in the qualitative analysis of the main components of bulbil of *Lilium lancifolium* Thunb. from retention time, UV absorption spectrum, precise relative molecular weight, molecular formula and secondary fragment ions, and so

收稿日期:2018-07-09 接受日期:2019-03-13

基金项目:湖南省自然科学基金青年项目(2019JJ50446);国家自然科学基金面上项目(81403206);长沙市科技局项目(kq1801044);湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心开放基金(2018-02-01);中央引导地方科技发展专项资金(2019XF-5024)

*通信作者 E-mail:huanghy68@126.com, gale9888@163.com

on. Meanwhile, diosgenin have a strong inhibitory effect on the proliferation of gastric cancer HGC-27 cells. This research provided a scientific basis for the uses of bulbil of *Lilium lancifolium* Thunb¹.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS; bulbil of *Lilium lancifolium* Thunb.; diosgenin; anti-tumor

百合(*Lili bulbus*)为多年生草本植物,始载于汉朝《神农本草经》,2015 版《中国药典》收录为卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb.)、百合(*Lilium broumii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker)、细叶百合(*Lilium pumilum* DC.)3 个品种^[1~2]。百合药用部位主要为鳞茎及其珠芽(百合子),百合鳞茎研究报道较多,而百合珠芽由于研究较少,资源浪费严重。现代研究显示,百合珠芽中含有黄酮类、多酚类和生物碱等多种活性成分,具有抗氧化的生物活性^[3]。

目前分析百合鳞茎、珠芽中化学成分的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[4,5]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[6]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS)等方法^[7],其中 HPLC 法操作简便,目前主要用来测定百合鳞茎中酚酸甘油酯、没食子酸等成分。GC-MS 法主要用于分析百合鳞茎中挥发性成分,具有一定局限性。HPLC-Q-TOF-MS 法灵敏度高,并且可以用来鉴定复杂基质中的化学成分^[8,9],但分析速度一般。UPLC-Q-TOF-MS 法具有快速、准确和灵敏度高的特点,成为中药分析领域重要技术手段^[10~12]。目前,采用 UPLC-Q-TOF-MS 法快速分析百合珠芽中化学成分尚未见于报道。近年来,肿瘤已成为中国死亡率最高的疾病之一^[13],而薯蓣皂苷属于甾体皂苷,可显著抑制肺癌 A549、NCI-H460 和 NCI-H446 细胞增殖,在体外具有较强的抗肺癌作用^[14],同时还能明显抑制人胃癌细胞 MGC-803、SGC-7901 的增殖并诱导其凋亡^[15,16]。薯蓣皂苷水解即可得到薯蓣皂苷元,而目前采用 CCK8 法研究薯蓣皂苷元抗肺肿瘤 A549 细胞、胃肿瘤 HGC-27 细胞的药效筛选以及百合珠芽中是否含有薯蓣皂苷尚未见报道,值得我们去探讨。

本试验在前期对百合鳞茎研究的基础上,采用 UPLC-Q-TOF-MS 联用技术可快速分析鉴定百合珠芽中主要化学成分,并采用 CCK-8 法进行薯蓣皂苷元肿瘤细胞增殖分析研究,对百合珠芽产品生产、加工和利用具有深层次指导意义。

1 仪器与试药

1.1 仪器

202 型电热恒温干燥箱(北京中兴伟业仪器有限公司);Waters ACQUITY UPLC/Xevo G2 QTof/MS

(美国 Waters 公司);Agilent UPLC 2010(安捷伦科技公司);METTLER TOLEDO ML204 电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司),KM-250DE 台式超声波清洗仪(昆山美美超声仪器有限公司),80-1 型电动离心机(城西晓阳电子仪器厂);96 孔板(美国 corning 公司)、CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、超净台(苏州安泰空气技术有限公司)、ELx 800 酶标仪(美国 Bio Tek 公司)。

1.2 药品与试剂

百合珠芽采于湖南龙山和顺百合种植基地,经湖南中医药大学周小江教授鉴定为百合科植物卷丹(*Lilium lancifolium* Thunb.)的珠芽部分。薯蓣皂苷元(B2117,上海源叶生物科技有限公司);甲醇(色谱纯,德国默克公司);乙腈(色谱纯,德国默克公司),王百合苷 A(0252-DT01,上海 standard 科技公司)。人胃癌细胞 SGC-7901、人胃癌细胞 HGC-27、人肺癌细胞 A549(中科院上海细胞库);高糖 DMEM 培养基、FBS、PBS、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液(美国 Gibco 公司);顺铂(CDDP,美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒(上海七海复泰生物科技有限公司);青霉素链霉素(美国 HyCLone 公司)。

2 方法与结果

2.1 UPLC-Q-TOF-MS 分析百合珠芽中化学成分

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm);流动相:乙腈-0.5% 乙酸,梯度洗脱,流速:0.2 mL/min,柱温 30 °C,波长:309 nm,进样体积:2.00 μL。采用 UPLC-MS/MS(正离子、负离子模式),离子化方式:电喷雾离子化(ESI),ESI⁺毛细管电压 2.8 kV,锥孔电压 28 V,锥孔气流 50 L/h;ESI⁺毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 30 V,锥孔气流 50 L/h。ESI⁺,ESI⁻离子化干燥气温度均为:T = 350 °C,V = 600 L/h。流动性梯度洗脱程序见表 1。

2.1.2 供试品溶液的制备

将采集的百合新鲜珠芽,洗净,再放入 60 °C 鼓风干燥箱中 60 min,得干百合珠芽,粉碎过 100 目,精密称定过筛的样品 1.0 g 至量瓶中,加入 50 mL 80% 乙醇,用超声仪提取 40 min。冷却至室温,精密称定,补足 80% 乙醇,滤过,滤液旋蒸至干,加入

表 1 梯度洗脱程序表
Table 1 Gradient elution program

时间 Time (min)	流动相 A:乙腈 Mobile phase A: acetonitril(%)	流动相 B:乙酸 Mobile phase B: 0.5% acetic acid (%)
0	2	98
13	2	98
15.2	5	95
17.5	5	95
19.5	12	88
22	25	85
25	50	50
27	90	10
29	95	5
31.05	2	98
32	2	98

10 mL 80% 乙醇溶解过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 既得。

2.1.3 对照品溶液的制备

精密平行称取 2 份王百合苷 A 标准品适量, 用 80% 乙醇溶解, 稀释配制成 0.556、0.68 mg/mL 的王百合苷 A 对照品溶液。

2.1.4 超声提取优化试验

按 2.1.2 项下方法得到干百合珠芽, 精密称定 1.0 g 干百合珠芽粉至量瓶中, 加入 50 mL 80% 乙醇, 用超声仪在不同提取时间条件下(10、20、30、40、50 min)处理后, 冷却至室温, 精密称定, 补足 80% 乙醇, 摆匀过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 既得待测液。在前期研究中, 课题组发现与其他成分比较, 百合珠芽中王百合苷 A 含量较高, 因此选用王百合苷 A 的提取率作为百合珠芽药材的化学成分提取考核指标。将待测液注入 Agilent UPLC 2010, 测定王百合苷 A 的含量。王百合苷提取率计算方法: 提取率(%) = 提取液浓度 × 体积 / 原料质量 × 100%。

2.2 薯蓣皂苷元抗肿瘤实验

2.2.1 细胞培养

从 -80 °C 冰箱内取出需要复苏的肺癌 A549 细胞, 置于恒温水浴锅内 37 °C 快速解冻, 用移液枪迅速将冻存管内的解冻后的细胞液移至含 4 mL 的 10% FBS、1% 双抗(青霉素、链霉素)DMEM 完全培

养液的 15 mL 离心管中, 以 800 rpm 速率离心 5 min, 上清液弃去, 加入 6 mL DMEM 完全培养液, 混匀, 将细胞液移至 100 mm 培养皿中, 晃动培养皿使细胞液均匀分散, 置于含 5% CO₂、37 °C 的培养箱内培养。细胞培养 3~4 天传代 1 次。

2.2.2 细胞增殖抑制试验

2.2.2.1 细胞铺板

待培养细胞生长到对数生长期后, 将细胞消化制成细胞悬液, 计数, 然后在 96 孔板中按 100 μL/孔的比例接种细胞悬液(8.0×10^4 ~ 1.0×10^5 个/mL), 将培养板放在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

2.2.2.2 加药干预

从培养箱中取出培养板, 吸出旧培养液, 每孔加入 100 μL 无血清含双抗 DMEM 培养液, 饥饿 12 h 后去掉培养液, 5 个实验组分别加入事先配置好的含不同浓度待测药物的 DMEM 完全培养液, 溶剂对照组加入完全培养液, 阳性对照组加入含 4 μg/mL CDDP 的完全培养液, 每孔 100 μL, 每组设置 5 个副孔。置于培养箱中继续培养 24 h。

2.2.2.3 加入 CCK-8 显色

取出培养板, 吸弃每孔中的细胞培养液, 避光加入 CCK-8 溶液与含双抗 DMEM 培养液, 以 10:100 比例新鲜配置的显色液, 每孔 100 μL, 置于培养箱中孵育 0.5~1.0 h。

2.2.2.4 检测吸光值

将处理好的培养板置于酶联免疫检测仪中, 在波长为 450 nm 处的检测其 OD 值。

2.2.2.5 计算细胞增殖抑制率

根据每组测得的 OD 值, 计算出药物对受试细胞的增殖抑制率。计算方法如下:

$$\text{增殖抑制率}(\%) = (1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$$

3 结果与讨论

3.1 超声提取条件的选择

进行了超声提取 10、20、30、40、50 min 的比较试验, 发现 40、50 min 效果最佳, 二者提取效率相当, 故将超声提取时间设定为 40 min。具体见表 2。

3.2 液相色谱条件优化

对样品超声提取液进行 UPLC-DAD 测定, 结果为 309 nm 时百合珠芽中多种有效成分有较大吸收峰, 故选择百合珠芽定性分析检测波长为 309 nm,

表 2 不同超声提取时间下的王百合苷 A 提取效率

Table 2 Extraction efficiency of regaloside A under different ultrasonic extraction time

序号 No	超声时间 Time (min)	样品量 Sample amount (g)	平均含量/王百合苷 A Average content/ regaloside A (mg/g)	提取率 Extraction rate (%)
1	10	0.981 4	0.029 7	0.003
		0.991 6		
2	20	1.001 3	0.174 8	0.017
		1.001 8		
3	30	1.004 5	1.037 7	0.100
		1.000 9		
4	40	1.040 0	1.205 0	0.120
		1.021 3		
5	50	0.995 1	1.191 7	0.120
		1.000 1		

(见图 1)。同时考察了 thermo C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.5 μm), Agilent C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), waters acquity UPLC BEH-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 3 种色谱柱的峰形、柱效和分离度,结果显示,以 thermo C₁₈ 为最佳,这有利于质谱定性分析。

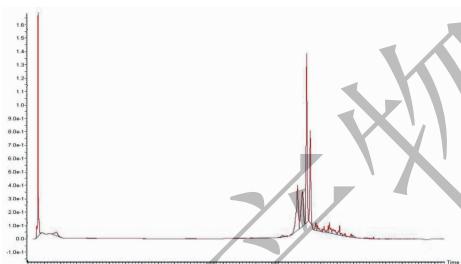


图 1 百合珠芽液相色谱图(309 nm)

Fig. 1 Chromatography of lily bulbil (309 nm)

3.3 质谱条件优化

在实验中发现,单独用 UPLC 图无法很好地分离鉴定百合珠芽中复杂的化学成分。但是采用二级质谱离子流图可以较好地分离百合珠芽中主要化学成分。质谱条件的选择:ESI⁻模式下,毛细管电压从 2.5 kV ~ 3.5 kV,锥孔电压从 20 V ~ 40 V;ESI⁻模式下,毛细管电压从 2.0 kV ~ 3.2 kV,锥孔电压从 20 V~35 V 进行选择。最后发现,在 ESI⁻模式下,毛细管电压 2.8 kV,锥孔电压 28 V;ESI⁺模式下,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 30 V,TIC 图得到的有效信息较多。

实验采用正、负离子模式同时扫描样品,其中在

负离子模式条件下,王百合苷 A、王百合苷 B、王百合苷 C、王百合苷 E、王百合苷 F、1-O-p-香豆酰甘油、1-O-阿魏酰香-3-O-p-豆酰甘油色谱峰响应值较高,而在正离子模式条件下,对香豆酸、槲皮素、薯蓣皂苷色谱峰响应值较高,为增大物质推断的可靠性,实验选用正、负离子模式同时测定样品,最大程度地获取质谱信息,见图 2~3。

3.4 化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定

在拟定分析条件下,电喷雾电离源正离子模式和负离子模式对色谱流出物进行检测,四级杆飞行时间串联质谱法对各主要色谱峰进行归属,通过一、二级质谱图进行分析,根据其反相色谱保留行为、紫

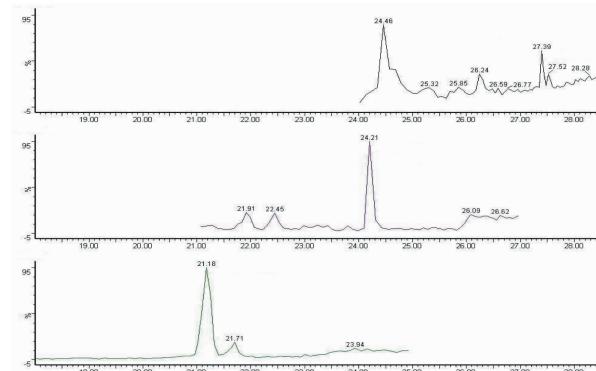


图 2 二级质谱离子流图(正离子模式)

Fig. 2 Daughter ion flow graph of the MS-MS spectrogram in positive ion modes

注:t = 21.18 min, 对香豆酸;

t = 24.21 min, 槲皮素;t = 27.39 min, 薯蓣皂苷。

Note:t = 21.18 min, p-coumaric acid;

t = 24.21 min, quercetin;t = 27.39 min, dioscin.

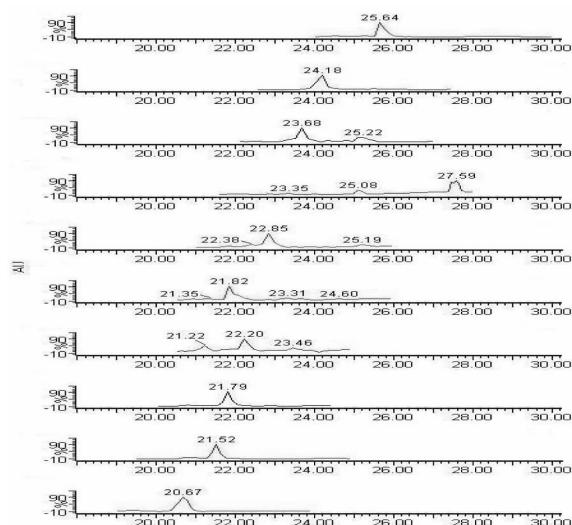


图3 二级质谱离子流图(负离子模式)

Fig. 3 Daughter ion flow graph of the MS-MS spectrogram in negative ion modes

注:t = 20.67 min, 王百合苷 C; t = 21.52 min, 王百合苷 A;
t = 21.79 min, 1-O-p-香豆酰甘油; t = 21.82 min, 王百合苷 F;
t = 22.2 min, 王百合苷 E; t = 22.85 min, 王百合苷 B;
t = 25.08 min, 1-O-阿魏酰香-3-O-p-豆酰甘油。
Note: t = 20.67 min, regaloside C; t = 21.52 min, regaloside A;
t = 21.79 min, 1-O-p-coumaroylglycerol;
t = 21.82 min, regaloside F; t = 22.2 min, Regaloside E;
t = 22.85 min, regaloside B; t = 25.08 min,
1-O-feruloyl-3-O-p-coumaroylglycerol.

外检测和质谱特征,结合文献报道,进行结构鉴定。在负离子模式下,共推测鉴定出7个化学成分;在正离子模式下,共推测鉴定出3个化学成分。具体质荷比和碎片离子信息见表3。

3.5 薯蓣皂苷元(Dio)对肿瘤细胞增殖的影响

3.5.1 Dio 对肺癌细胞增殖的影响

Dio 在浓度范围 5 ~ 100 μM 对肺腺癌 A549 细胞增殖具有弱抑制作用,其抑制率在 8.11 ~ 15.03 % 范围内。具体结果见表3。

3.5.2 Dio 对胃癌细胞增殖的影响

5 ~ 100 μM Dio 对胃癌 HGC-27 细胞增殖具有抑制作用,其抑制率在 11.04 ~ 30.59% 范围内,其中 25 ~ 100 μM 浓度组与对照组相比具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。具体结果见表5。

4 结论

本文建立了百合珠芽中主要化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定方法,方法快速简便,能为百合珠芽的质量控制及标志性成分分析提供技术参考。本文通过 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定出了百合珠芽中薯蓣皂苷等 10 种化学成分,证实了百合珠芽中含有薯蓣皂苷,而薯蓣皂苷属于甾体皂苷,水解即可得到薯蓣皂苷元。在此基础上,进行了薯蓣皂苷元抗肿瘤药效实验,研究发现,薯蓣皂苷元对肺癌 A549 细胞增

表3 百合珠芽 UPLC-Q-TOF-MS 分析结果
Table 3 UPLC-Q-TOF-MS analysis results of lily bulbil

时间 Time (min)	电离模式 Ionization mode	质荷比 Mass-to-charge ratio (m/z)	二级碎片离子 Fragment ion of MS-MS	推断鉴定化合物 Conjectured compounds
20.67	ESI-	415.133 9	179.053 0, 161.058 0	王百合苷 C ^[11] Regaloside C ^[11]
21.52	ESI-	399.138 3	163.041 3, 145.052 3	王百合苷 A ^[11,17] , 对照品指认 Regaloside A ^[11,17] , identification by reference
21.79	ESI-	237.075 0	163.038 0, 145.054 1, 119.045 7	1-O-p-香豆酰甘油 ^[11] 1-O-p-coumaroylglycerol ^[11]
22.2	ESI-	457.135 8	397.146 0, 161.058 0, 179.060 0, 135.068 7	王百合苷 E ^[11] Regaloside E ^[11]
21.82	ESI-	429.141 6	193.052 3, 175.077 1	王百合苷 F ^[11] Regaloside F ^[11]
22.85	ESI-	441.145 5	163.041 3, 381.116 5, 175.047 1	王百合苷 B ^[11,17] Regaloside B ^[11,17]
25.08	ESI-	413.120 4	193.052 3, 163.041 3, 235.058 1	1-O-阿魏酰香-3-O-p-豆酰甘油 ^[11] 1-O-feruloyl-3-O-p-coumaroylglycerol ^[11]
21.18	ESI +	165.052 7	147.044 8, 119.047 9, 91.054 4	对香豆酸 ^[18] p-Coumaric Acid ^[18]
24.21	ESI +	303.049 2	274.019 2, 257.046 5, 229.047 3, 201.035 2, 165.018 8	槲皮素 ^[19] Quercetin ^[19]
27.39	ESI +	869.498 7	723.344 6, 577.379 2	薯蓣皂苷 ^[20] Dioscin ^[20]

表 4 Dio 对肺癌 A549 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 4 Effects of diosgenin on the proliferation of A549 cells in lung cancer($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别 Group	浓度 Concentration(μM)	OD 值 Value of OD($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition ratio(%)
对照 Control	-	1.341 ± 0.083	-
CDDP	13	$0.934 \pm 0.038^{* * *}$	30.37
Dio	5	1.161 ± 0.028	13.44
	25	1.160 ± 0.046	13.50
	50	1.232 ± 0.058	8.11
	100	1.140 ± 0.020	15.03

注:与对照组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ 。

Note: compared with the control group, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$.

表 5 Dio 对胃癌 HGC-27 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)Table 5 Effects of diosgenin on the proliferation of HGC-27 cells in gastric cancer ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别 Group	浓度 Concentration(μM)	OD 值 Value of OD($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition ratio(%)
对照 Control	-	0.788 ± 0.070	-
CDDP	13	$0.482 \pm 0.043^{* * *}$	38.82
Dio	5	0.701 ± 0.059	11.04
	25	$0.634 \pm 0.098^*$	19.56
	50	$0.581 \pm 0.028^{* *}$	26.25
	100	$0.547 \pm 0.050^{* * *}$	30.59

注:与对照组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ 。

Note: compared with the control group, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$.

殖只有微弱的抑制活性,而对胃癌 HGC-27 细胞增殖表现出较强的抑制作用,其 IC_{50} 值约为 627.86 μM ,并且展现出浓度依赖性。因此,有必要对百合珠芽化学成分进行深层次的药效研究,课题组将继续对鉴定出来的其他物质进行药效试验研究,为更好利用百合资源提供实验依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:132.
- 2 Fu CY, Liu YH, Li MJ, et al. Extraction and purification techniques and antidepressant activity of total saponins from bulbs of *Lilium brownii* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2012, 24:682-686.
- 3 Zhu Y. Extraction, purification, identification and antioxidant activity of the active ingredients from the bulbil and bulb of *Lilium brownii* var. *viridulum* by LC-ESI-MS/MS [D]. Nanjing: Jiangsu University(江苏大学), 2016.

- 4 Yuan ZY, Liu XD, Pei G, et al. Contents determination of p-coumaric acid and gallic acid in *lili* bulb by HPLC [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志), 2018, 25(5):82-85.
- 5 Guo QP, Gao Y, Li WM. HPLC fingerprint of *Lilium brownii* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33:1280-1285.
- 6 Zhang ZJ, Cai BC, Li L, et al. GC/MS fingerprint of *Bulbus lili*. [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28:625-627.
- 7 Wang TT. Studies on chemical constituents of *Lilium* and *Pyrus* cultivars [D]. Tianjin: Tianjin University(天津大学) 2015.
- 8 Zhang M, Duan C, Zang Y, et al. The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar *Citrus grandis*, (L.) Osbeck and the grapefruit cultivar *Citrus paradisi* from China [J]. Food Chem, 2011, 129:1530-1536.
- 9 Xiang Q, Wang XH, Lin H, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents in *Yinhuang* granules by HPLC-DAD-Q-TOF-MS / MS [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2015, 37:105-112.

(下转第 831 页)