

UPLC-MS 背景扣除法联合代谢组学技术分析柴胡-白芍药对配伍前后化学成分变化

贺晶¹, 高晓霞¹, 田俊生¹, 秦雪梅¹, 杜冠华^{1,2}, 周玉枝^{1*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 中国医学科学院 药物研究所, 北京 100050

摘要: **目的** 探究柴胡-白芍药对配伍前后化学成分的整体变化情况。**方法** UPLC-MS 背景扣除法联合代谢组学技术对柴胡-白芍配伍前后的化学成分进行整体分析, 采用 UPLC-MS 分析柴胡、白芍及柴胡-白芍药对各 8 批提取物的化学成分, 并用质谱背景扣除法将柴胡-白芍药对合提物的质谱数据分别扣除白芍、柴胡单提物的质谱数据得配伍后柴胡、白芍的单提物的质谱数据, 将柴胡、白芍配伍后的化学成分分别与配伍前各自的化学成分进行主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 分析柴胡-白芍药对组成药味柴胡、白芍配伍前后整体化学成分的变化情况。**结果** UPLC-MS 检测柴胡-白芍药对共提物、柴胡及白芍单提物化学成分共 57 个, 结合文献报道指出其中 32 个。多元统计结果显示, 柴胡-白芍药对配伍前后柴胡中含量发生显著变化的成分有 6 个, 鉴定其中 3 个成分; 白芍中含量发生显著变化的成分有 3 个, 鉴定其中 2 个成分。分别为柴胡中柴胡皂苷 a、3"-O-乙酰化柴胡皂苷 a、4"-O-乙酰化柴胡皂苷 a 配伍后含量降低; 白芍中芍药苷、没食子酰基芍药苷或其异构体配伍后含量升高。**结论** 从整体化学组成上比较了柴胡-白芍药对配伍前后的差异, 为其配伍机制的阐释奠定了基础。

关键词: 柴胡-白芍药对; UPLC-MS; 背景扣除; 代谢组学; 多元统计分析; 柴胡皂苷 a; 3"-O-乙酰化柴胡皂苷 a; 4"-O-乙酰化柴胡皂苷 a; 芍药苷; 没食子酰基芍药苷

中图分类号: R284; 285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1779-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.007

Changes of chemical composition of *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* herb pair before and after compatibility by UPLC-MS background subtraction and metabonomics

HE Jing¹, GAO Xiao-xia¹, TIAN Jun-sheng¹, QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua^{1,2}, ZHOU Yu-zhi¹

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

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To explore the overall change of chemical components of *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* herb pair before and after compatibility. **Methods** The change of chemical constituents of *Bupleuri Radix* and *Paeoniae Radix Alba* before and after compatibility were analyzed based on UPLC-MS background subtraction and metabonomics. Chemical constituents of eight batches in *Bupleuri Radix*, *Paeoniae Radix Alba*, and *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* were analyzed by UPLC-MS. Mass spectrometry data of the extracts of *Paeoniae Radix Alba* and *Bupleuri Radix* were respectively subtracted from mass spectrum data of the extracts of *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* herb pair by mass spectrometry background subtraction method, finally mass spectrum data of chemical constituents of *Bupleuri Radix* and *Paeoniae Radix Alba* after compatibility were obtained. The chemical components of *Bupleuri Radix*, *Paeoniae Radix Alba* before and after compatibility were analyzed by PCA and OPLS-DA separately. **Results** A total of 57 constituents of *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* herb pair, *Bupleuri Radix*, and *Paeoniae Radix Alba* were detected by UPLC-MS, and 32 of them were identified by the literature. Multivariate statistics showed that there were six ingredients which had significant changes in *Bupleuri Radix* before and after compatibility and three of them were identified. There were three components

收稿日期: 2018-01-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673572); 山西省应用基础研究项目 (201601D021164); 山西省高校科技创新项目 (2016120)

作者简介: 贺晶 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 18234098412 E-mail: 18234098412@163.com

*通信作者 周玉枝 (1981—), 女, 硕士生导师, 教授, 主要研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0351)7019178 E-mail: zhouyuzhi@sxu.edu.cn

which were significantly changed in *Paeoniae Radix Alba* and two of them were identified. The saikosaponin a, 3'-*O*-acetylation of saikosaponin a, and 4''-*O*-acetylation of saikosaponin A decreased after compatibility in *Bupleuri Radix*, and paeoniflorin, gallic acidpaeoniflorin or their isomers increased after compatibility in *Paeoniae Radix Alba*. **Conclusion** The overall differences of chemical composition in *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* before and after compatibility were compared, which laid the foundation for the explanation of its compatibility mechanism.

Key words: *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba*; UPLC-MS; background subtraction; metabonomics; multivariate statistical analysis; saikosaponin a; 3'-*O*-acetylation of saikosaponin a; 4''-*O*-acetylation of saikosaponin a; paeoniflorin; gallic acidpaeoniflorin

中药复方是中医临床用药的主要形式,药对是中药方剂的重要组成部分,是沟通药物与方剂的桥梁^[1]。研究药对物质基础有助于剖析中药配伍理论及其药理作用机制^[2-3],而中药共煎煮后的化学成分并非各单味药物化学成分的简单相加,其不同之处必然与药对疗效不同于单味药的事实有着本质联系^[4-5]。

药有个性之专长,方有合群之妙用。柴胡-白芍是疏肝解郁、调畅情志最基本的配伍药对,为多个抗抑郁疗效确切的复方如《太平惠民和剂局方》逍遥散^[6-8]、《景岳全书》柴胡舒肝散^[9-11]、《伤寒论》四逆散^[12]等的基础药物,在方中柴胡为君药,白芍为臣药。从中医理论讲,柴胡轻清辛散、透表泄热、疏肝解郁;白芍酸寒收敛,能敛津液而护营血、收阳气而泄邪热,养血以柔肝。从归经理论讲,二者同归肝经^[13];从性味理论讲,二药伍用,以白芍之酸敛,制柴胡之辛散;用柴胡之辛散,又佐芍药之酸敛。二者相互依赖,相互促进,互制其短而展其长^[14],为散收配伍的典型代表。国内外对柴胡的化学组成、药效及质控等研究均较多,认为柴胡皂苷为其抗抑郁主要物质^[15-16],白芍中主要化学成分为单萜及单萜苷类化合物,其中芍药总苷为目前公认的抗抑郁有效成分^[17]。对柴胡、白芍合用后化学成分变化的研究表明二者共煎后能使白芍中有效成分芍药苷煎出量明显提高,有毒成分苯甲酸煎出量明显降低^[18]。苏孝共等^[19]考察白芍与柴胡不同比例配伍共煎时芍药苷的煎出量,发现白芍配伍柴胡有利于芍药苷煎出,从而使芍药苷煎出量增加。李娉婷^[20]研究柴胡药对配伍对皂苷类成分的影响,发现柴胡-白芍药对 1:1 配伍时柴胡皂苷含量下降;杨丽娜等^[21]采用 HPLC-ELSD 法同时测定四逆散不同配伍中柴胡皂苷 a、b₂、c 的含量,发现白芍中的成分可降低柴胡皂苷 a、c 的煎出量。这些只是针对柴胡-白芍配伍前后单一化学成分变化情况的研究,但是二者合煎后对彼此整体化学成分煎出量的变化情况尚不明确。

背景扣除法是质谱数据分析中的一个过程,它

可以从背景或样本中提取离子,并进行检测和扣除,可应用于全扫描数据集,并且不需要对扣除离子的行为或性质做出任何假设。Zhang 等^[22]采用背景扣除技术从非选择性的碰撞诱导解离实验得到干净的目标离子。本实验采用 UPLC-MS 背景扣除法结合代谢组学技术分析柴胡-白芍配伍前后整体化学成分变化。并通过多元统计分析找出含量差异变化显著的化学成分及其变化规律,以期从化学成分变化的角度初步揭示柴胡-白芍药对配伍的科学内涵。

1 材料与仪器

超高效液相色谱与质谱联用仪 (Thermo Scientific Q Exactive LC-MS), 美国 Thermo 公司; 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 十八烷基键合硅胶为填充剂, 美国 Waters 公司; KQ5200E 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; XPE205 分析天平, 梅特勒-托利多国际股份有限公司; 色谱乙腈、色谱甲酸 (Fisher scientific); 纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司); 柴胡、白芍饮片由安徽安国市祁澳中药饮片有限公司提供, 经山西大学秦雪梅教授鉴定为正品。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 柴胡-白芍共煎液的制备 将 8 份柴胡、白芍样品分别粉碎后过 65 目筛。柴胡、白芍按 1:1 (各取 0.5 g, 精密称定) 混和后, 用 10 倍量 70%乙醇煎煮 2 次, 每次 1.5 h, 合并 2 次煎煮液, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得柴胡-白芍合煎液。

2.1.2 柴胡、白芍单煎液制备 制备方法同柴胡-白芍共煎液的制备方法。

2.2 UPLC-MS 分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.1%甲酸水 (B), 梯度洗脱程序: 0~5 min, 5%~10% A; 5~12 min, 10% A; 12~16 min, 10%~20% A; 16~25 min, 20%~35% A; 25~30 min, 35%~

40% A; 30~40 min, 40%~50% A; 40~48 min, 50%~85% A; 48~50 min, 85%~100% A; 50~52 min, 100% A; 52~55 min, 100%~5% A。体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 样品池温度 15 °C, 进样体积 1 μ L。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾正负离子检测的电离模式, 雾化气体为高纯度氮气 (N_2), 碰撞气体为高纯度氦气 (He), 采用全扫描质谱和二级质谱, 质谱扫描范围 m/z 100~1 500, 锥孔电压 40 V, 毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂气体温度 300 °C, 脱溶剂气体流量 600 L/h, 锥孔气体流量 50 L/h, 碰撞能量 (CE) 50~80 V, 采用亮氨酸脑啡肽作为校正溶液, $[M-H]^-$ 554.261 5。

2.2.3 UPLC-MS 背景扣除法 参照文献报道^[23-27]及本实验要求, 设置如下参数: 扫描时间窗口定义控制扫描 1 min; 质量误差离子识别性 5×10^{-6} ; 比例因子应用到最大控制离子强度为 10。

2.2.4 数据分析 各样品组 UPLC-MS/MS 图谱及数据导入 sieve 软件进行峰提取、峰匹配及归一化前处理, 然后采用高分辨质谱 (UHPLC-Q Exactive Orbitrap-MS) 技术中的背景扣除法 (BSA), 将柴胡-白芍共提物的质谱数据扣除白芍 (柴胡) 单提物的质谱数据, 得到共提后源自柴胡 (白芍) 的化学成分质谱数据, 基于代谢组学技术采用 SIMCA-P 13.0 分别将合提后来源于柴胡 (白芍) 的化学成分

质谱数据和柴胡 (白芍) 单提物化学成分的质谱数据进行多元统计分析 [主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)], 根据 VIP (variable importance in the projection) 值和 t 值, 分别提取出柴胡、白芍单提和合提差异较大的贡献成分。最后采用 LC-MS/MS 技术并结合提取分离技术对引起差异的成分进行指认。

3 结果

3.1 柴胡-白芍药对、柴胡、白芍单煎液化学成分鉴定

根据设定的液相色谱及质谱条件, 取供试品溶液进样分析。其在负离子模式下的总离子流色谱图见图 1, 对图 1 的负离子模式总离子流图中主要峰进行标记 (峰 1~57)。在电喷雾一级谱中获得标记峰的相对分子质量信息, 通过多级串联质谱分析并结合保留时间及相关文献对各主要分子离子峰进行指认^[28-42], 最终确定其中 32 种化合物, 对应峰的相关信息见表 1。

3.2 配伍前后差异成分确定

通过对柴胡-白芍配伍前后主成分差异性进行分析, 无监督的模式识别方法——PCA 分析可以反映数据的原始状态, 直观地显示不同样品之间的整体差异。图 2、3 分别为配伍前后柴胡、白芍的总离子流图。分别对配伍前后柴胡、白芍质谱数据进行 PCA 分析, 从图 4 可以看出, 配伍前后柴胡之间存

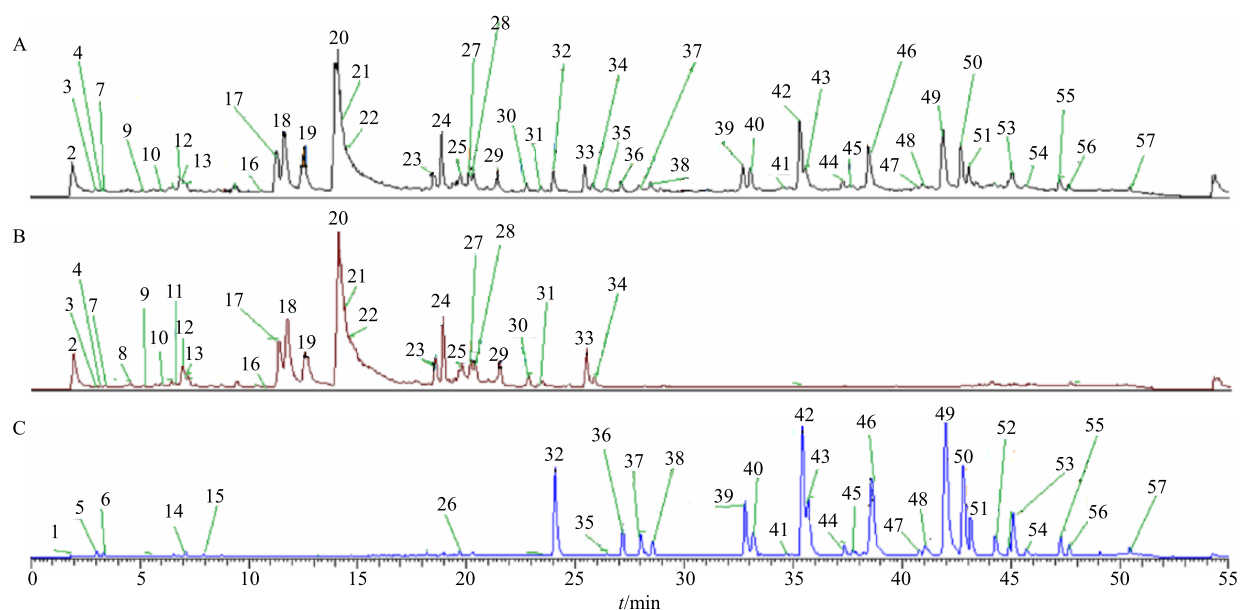


图 1 柴胡-白芍药对醇提液 (A)、柴胡醇提液 (B) 和白芍醇提液 (C) 的总离子流图

Fig. 1 Total ion current of ethanol extract of *Bupleuri Radix-Paeoniae Radix Alba* (A), *Bupleuri Radix* extract (B), and *Paeoniae Radix Alba* extract (C)

表 1 柴胡-白芍药对、柴胡单煎液、白芍单煎液化学成分的保留时间及质谱信息

Table 1 Retention time (t_R) and MS of compounds in ethanol extract of *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba*, single decoction of *Bupleuri Radix*, and single decoction of *Paeoniae Radix Alba*

峰号	t_R/min	MS (m/z)	[M-H] ⁻	MS/MS	化合物	分子式	来源		
							柴胡-白芍	柴胡	白芍
1	1.83	244.899 2	243.899 2	243.899 0, 197.906 0	未知	—	+	+	-
2	1.96	170.021 0	169.013 6	125.023 6	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	+	-	+
3	2.10	360.141 5	405.140 2	359.134 6, 197.081 5	牡丹酮-1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷或异构体	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	+	-	+
4	2.23	494.126 6	493.119 9	169.013 7, 125.023 6	没食子酰蔗糖或异构体	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	+	-	+
5	3.05	316.072 3	315.072 3	315.072 0, 152.010 7	未知	—	+	+	-
6	3.19	147.965 2	146.965 2	146.965 0, 61.987 3	未知	—	+	+	-
7	3.25	344.146 5	389.145 3	343.139 5, 181.087 0, 151.075 3	牡丹皮苷 F	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	+	-	+
8	4.58	184.036 6	183.029 3	168.005 8, 124.015 8	没食子酸甲酯	C ₈ H ₈ O ₅	+	-	+
9	5.68	544.124 5	543.117 7	421.081 2, 375.077 1, 259.028 1, 213.022 4, 121.028 7	芍药苷亚硫酸酯	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₃ S	+	-	+
10	5.98	578.135 1	577.135 1	577.135 7, 451.104 8, 425.087 7, 407.077 2, 289.071 7, 125.023 5	未知	—	+	-	+
11	6.61	322.025 1	321.025 1	169.013 6, 125.023 5	未知	—	+	-	+
12	6.96	290.078 5	289.071 8	245.081 6, 179.034 1	儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	+	-	+
13	7.25	496.157 5	495.150 9	495.151 0, 137.023 7	氧化芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	+	-	+
14	7.89	180.034 4	179.034 4	179.034 3, 135.044 3	未知	—	+	+	-
15	9.24	448.150 8	447.150 8	401.145 3, 269.103 0, 161.044 8	未知	—	+	+	-
16	10.73	850.266 7	849.266 7	803.262 1, 651.213 4, 121.028 6	未知	—	+	-	+
17	11.30	642.215 4	687.214 3	611.200 9, 593.188 1, 489.160 2, 323.098 9	异麦芽糖芍药苷或其异构体	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₆	+	-	+
18	11.70	526.161 4	525.161 4	479.156 2, 121.028 6	未知	—	+	-	+
19	12.55	198.045 1	197.045 1	169.013 4, 125.023 5, 61.987 3	未知	—	+	-	+
20	14.10	480.162 6	525.161 4	479.156 5, 283.081 8, 121.028 7	芍药内酯苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	+	-	+
21	14.52	480.162 6	525.161 4	479.156 5, 121.028 7	未知	—	+	-	+
22	14.84	480.162 6	479.155 8	479.155 9, 357.118 5, 121.028 7	芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	+	-	+
23	18.56	632.173 6	631.167 0	613.158 0, 509.128 7, 169.013 6	没食子酰基芍药苷或其异构体	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	+	-	+
24	18.92	940.117 6	939.111 4	769.089 6, 617.079 0, 465.068 5, 169.013 6	五没食子酰葡萄糖	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	+	-	+
25	19.76	546.057 6	545.057 6	469.051 8, 169.013 6, 125.023 5	未知	—	+	-	+
26	19.90	546.057 5	545.057 5	469.051 9, 169.013 7, 125.023 6	未知	—	+	+	-
27	20.13	464.167 6	509.166 5	463.160 7, 121.028 6	1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖-8- <i>O</i> -苯甲酰芍药苷硫酸酯	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	+	-	+
28	20.32	462.152 0	507.150 8	461.150 4, 339.110 5, 177.055 5	芍药新苷	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	+	-	+
29	21.50	784.184 5	783.177 7	169.013 6, 313.057 0, 465.139 0, 631.166 5	3',6'- <i>di-O</i> -没食子酰基芍药苷	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₉	+	-	+
30	22.80	492.213 6	491.213 6	445.207 9, 293.087 8	未知	—	+	-	+
31	23.41	492.213 5	491.213 5	445.207 9, 293.088 0	未知	—	+	-	+

续表 1

峰号	t_R/min	MS (m/z)	[M-H] ⁻	MS/MS	化合物	分子式	来源		
							柴胡-白芍	柴胡	白芍
33	25.50	584.188 88	629.187 7	583.180 4, 553.171 5, 535.160 8, 431.134 1, 165.054 9, 121.028 7	苯甲酰芍药苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	+	-	+
34	25.83	584.188 8	629.187 7	583.179 3, 121.028 7	苯甲酰芍药内酯苷	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	+	-	+
35	26.47	682.422 0	681.422 0	681.422 9, 635.415 6	未知	—	+	+	-
36	27.17	384.077 3	383.077 3	339.087 3, 333.632 0, 324.063 8, 280.073 9, 265.050 5	未知	—	+	+	-
37	27.99	330.233 4	329.233 4	229.144 1, 211.133 5	未知	—	+	+	-
38	28.74	926.523 3	971.522 0	971.510 2, 779.459 8, 617.404 9	柴胡皂苷 c	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇	+	+	-
39	32.71	780.465 4	825.464 8	779.458 9, 617.406 3, 439.321 7	柴胡皂苷 a	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	+	+	-
40	33.16	780.465 4	779.458 1	779.458 9, 617.405 0	柴胡皂苷 g	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	+	+	-
41	34.62	868.474 5	867.474 5	821.469 1, 779.458 3, 761.447 6, 617.405 6	未知	—	+	+	-
42	35.30	780.465 4	825.464 5	779.458 9, 617.405 8, 439.321 6	柴胡皂苷 b2	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	+	+	-
43	35.59	822.476 0	867.475 0	867.474 3, 779.456 6, 761.448 2, 617.405 8	2"-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
44	37.29	822.476 0	867.474 9	821.468 9, 779.457 8, 761.448 5, 617.405 1	3"-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
45	37.73	822.476 0	867.475 0	867.471 9, 821.470 0, 779.485 1, 761.445 6, 617.405 2	4"-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
46	38.44	822.476 0	867.474 9	821.469 6, 779.457 7, 761.447 3, 617.404 8	6"-O-乙酰化柴胡皂苷 a	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
47	40.77	780.465 4	825.464 9	779.458 5, 617.057, 439.320 6	柴胡皂苷 d	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	+	+	-
48	41.08	822.476 0	867.474 7	821.472 6, 779.459 3, 617.404 4	2"-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
49	41.99	822.476 0	867.474 9	821.469 7, 779.462 1, 761.442 7, 617.406 7	3"-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
50	42.79	822.476 0	867.474 7	821.469 8, 779.455 9, 617.407 0	4"-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
51	43.12	822.476 0	867.474 8	821.470 2, 779.460 4, 761.448 5, 617.406 2	6"-O-乙酰化柴胡皂苷 d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	+	+	-
52	44.23	359.202 5	358.202 5	358.201 5, 287.201 5	未知	—	+	+	-
53	44.86	810.469 7	809.469 7	763.463 4, 601.411 6	未知	—	+	+	-
54	45.36	567.346 4	566.346 4	506.324 9, 281.248 4	未知	—	+	+	-
55	45.83	434.236 1	433.236 1	433.235 8, 152.995 1, 78.958 0	未知	—	+	+	-
56	46.95	852.479 8	851.479 8	805.474 2, 601.410 6	未知	—	+	+	-
57	50.48	280.232 9	279.232 9	279.232 9	未知	—	+	+	-

“+” -存在 “-” -不存在

“+”-exist “-”-not exist

在一定的化学差异, 配伍前后白芍之间也存在一定的化学差异。有监督模式的 OPLS-DA 可以去除与 Y 矩阵无关的 X 矩阵的变化, 从而使 X 矩阵和 Y 变量之间的关系最大化, 即使 2 组分类的差别达到

最大, 从而确定 2 组之间的化学差异成分。为进一步确定配伍前后柴胡、白芍的变化情况, 采用 OPLS-DA 进行单独分析, 得到 OPLS-DA 得分图(图 5)。并根据 S-plot 图(图 6)进一步对差异物进行筛

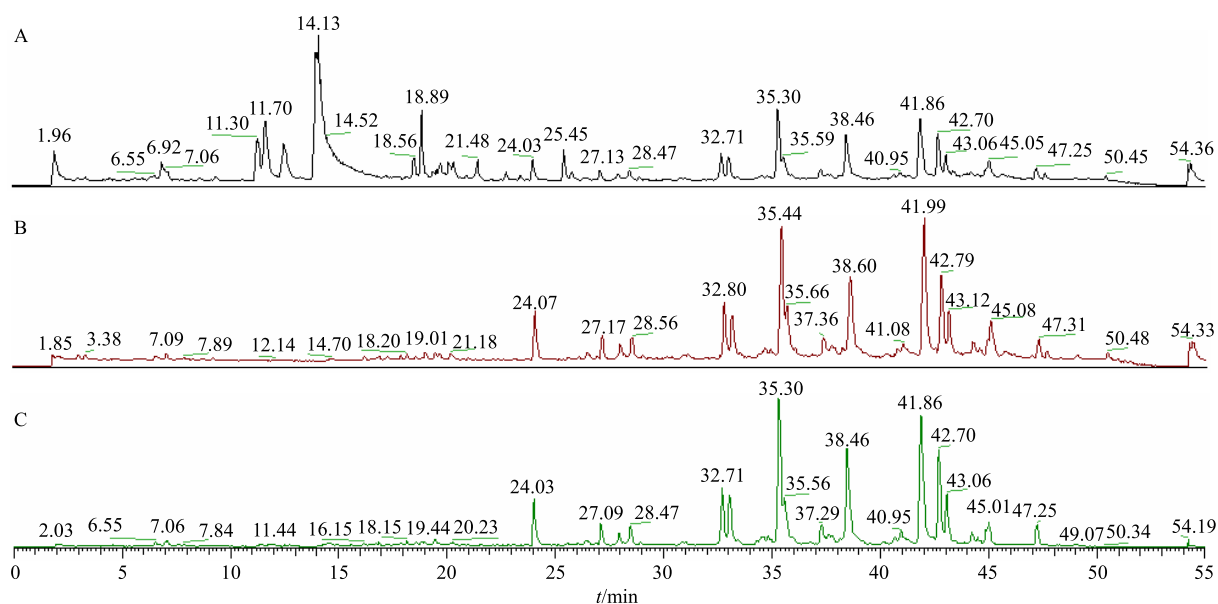


图 2 柴胡-白芍药对醇提液 (A)、配伍前柴胡醇提液 (B) 和配伍后柴胡醇提液 (C) 的总离子流图

Fig. 2 Total ion current of ethanol extract of *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* (A), pre compatibility *Bupleuri Radix* extract (B) and post compatibility *Bupleuri Radix* extract (C)

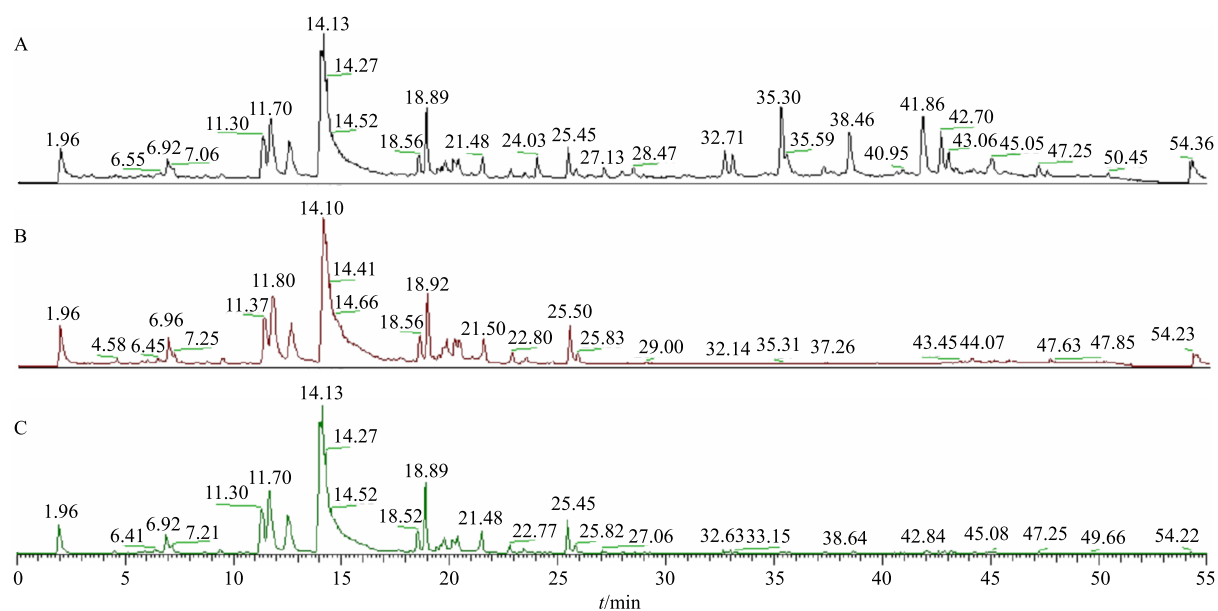


图 3 柴胡-白芍药对醇提液 (A)、配伍前白芍醇提液 (B) 和配伍后白芍醇提液 (C) 的总离子流图

Fig. 3 Total ion current of ethanol extract of *Bupleuri Radix*-*Paeoniae Radix Alba* (A), pre compatibility *Paeoniae Radix Alba* extract (B), and post compatibility *Paeoniae Radix Alba* extract (C)

选, S-plot 图中变量对分类的重要程度由 VIP 值的大小来衡量, 变量离原点越远, VIP 值越大, $VIP > 1$ 作为差异标志物。对上述差异点进行识别, 筛选出差异显著的 9 种标志物: 属于白芍的差异物有 3 个, 分别是峰 16 (t_R 10.73 min)、芍药苷 (峰 22, t_R 14.94

min)、没食子酰基芍药苷或其异构体 (峰 23, t_R 18.26 min); 属于柴胡的差异物有 6 个, 分别是柴胡皂苷 a (峰 39, t_R 32.61 min)、3"-O-乙酰化柴胡皂苷 a (峰 44, t_R 37.23 min)、4"-O-乙酰化柴胡皂苷 a (峰 45, t_R 37.57 min)、峰 53 (t_R 44.82 min)、峰 56 (t_R 46.90

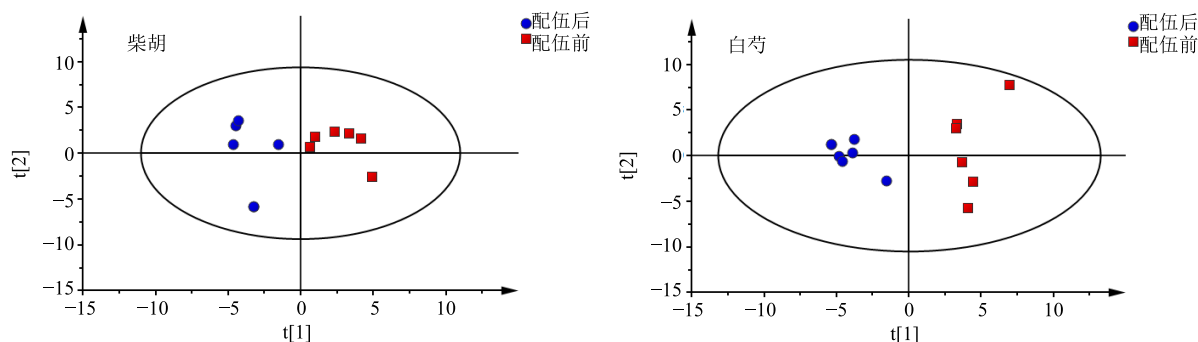


图 4 配伍前后柴胡、白芍在负离子模式下 PCA 图

Fig. 4 PCA diagram of *Bupleuri Radix* and *Paeoniae Radix Alba* in negative ion mode before and after compatibility

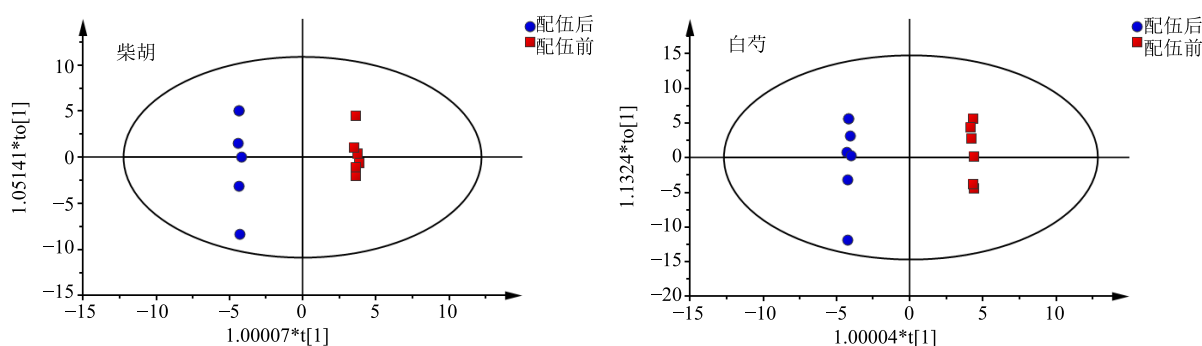


图 5 配伍前后柴胡、白芍在负离子模式下的 OPLS-DA 图

Fig. 5 OPLS-DA diagram of *Bupleuri Radix* and *Paeoniae Radix Alba* in negative ion mode before and after compatibility

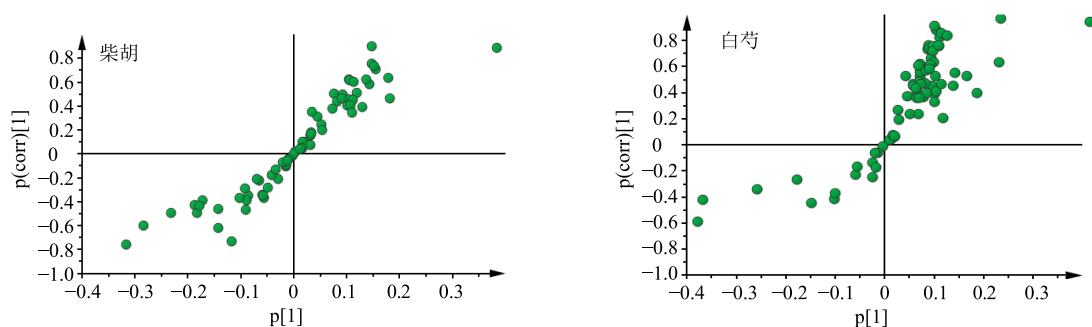


图 6 配伍前后柴胡、白芍在负离子模式下的 S-plot 图

Fig. 6 S-plot diagram of *Bupleuri Radix* and *Paeoniae Radix Alba* in negative ion mode before and after compatibility

min)、峰 57 (t_R 50.47 min)。

3.3 柴胡-白芍配伍前后差异成分量的变化

提取差异成分在各组间对应的峰面积数值以代表其量,对柴胡-白芍配伍前后同一物质峰面积的平均值和标准差进行计算和做图,能够得到 9 种显著差异成分在不同组间的相对含量变化。其中白芍含量差异显著的化合物在配伍前后相对含量变化趋势见图 7;柴胡含量差异显著的化合物在配伍前后相对含量变化趋势见图 8。总体趋势是峰 16、芍药苷、

没食子酰基芍药苷或其异构体、峰 56 配伍后的含量高于配伍前的含量;柴胡皂苷 a、3''-O-乙酰化柴胡皂苷 a、4''-O-乙酰化柴胡皂苷 a、峰 53、峰 57 配伍后的含量低于配伍前的含量。

4 讨论

中药复方是中医临床用药的主要形式,它基于辨证的思想观点,按照“君、臣、佐、使”的组方原则、“相须、相使、相恶”的作用规律,选择恰当的药物定量配伍而成,是中医辨证论治理论的具体

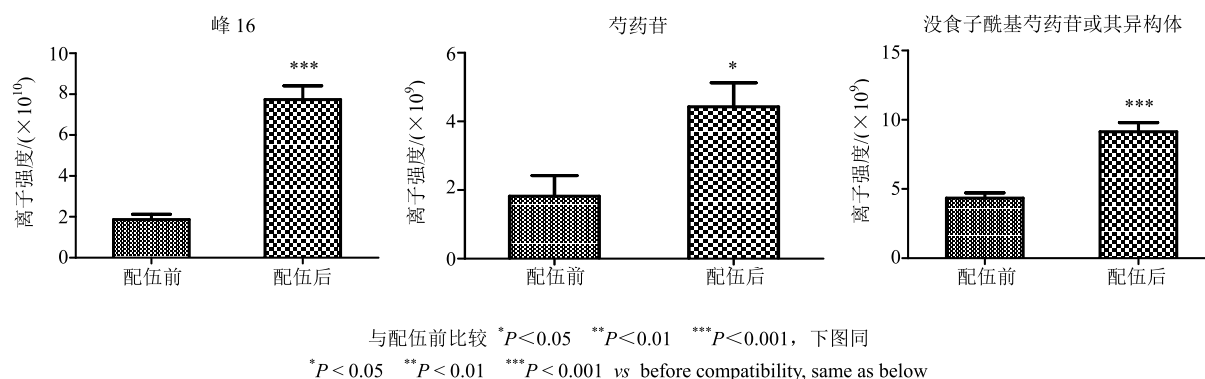


图 7 白芍中含量差异显著的化合物在配伍前后相对含量变化趋势

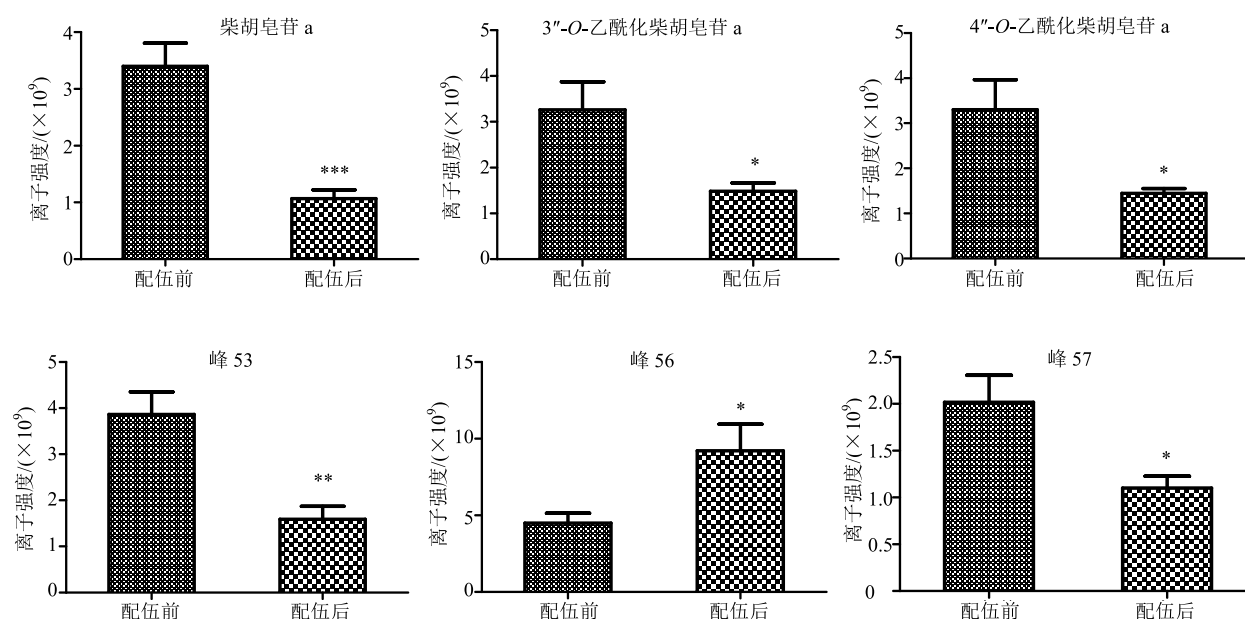
Fig. 7 Trend map of amount of compounds with significant difference in compatibility of *Paeoniae Radix Alba*

图 8 柴胡中含量差异显著的化合物在配伍前后相对含量变化趋势

Fig. 8 Trend map of amount of compounds with significant difference in compatibility of *Bupleuri Radix*

体现和精髓。探求及开展复方的配伍规律研究, 不仅可在更高的层次上认识复方配伍的科学内涵, 揭示复方的作用特点及配伍机制, 还能更有效地指导临床和新药研发。而药对相比于大复方, 由于药味简化, 更有利于阐明药物之间的相互作用机制以及药物共同对机体的作用机制, 同时, 药对作为中药配伍应用的最为常见形式, 本身即为小复方, 可反映复方配伍的特殊规律与内在联系。因此, 以药对为研究的切入点, 开展复方配伍规律研究, 对于揭示方剂配伍的科学内涵, 挖掘和提高中医复方配伍理论, 以及拓展临床用药思路, 都具有十分重要的意义, 同时可为更深入的复方配伍规律研究提供线索和依据。药对配合在一起煎煮过程中伴

随复杂的物理和化学反应, 通过这些化学物质间的相互作用, 使得药对溶出的功效物质发生量变与质变, 从而影响药对整体功效的变化。本实验采用 MS 背景扣除法结合多元统计分析对柴胡-白芍药对配伍前后整体化学成分进行差异性分析。结果显示: 柴胡白芍药对配伍前后柴胡中的差异成分有 6 个, 白芍中的差异成分有 3 个, 共鉴定 5 个。其中柴胡中柴胡皂苷 a、3''-O-乙酰化柴胡皂苷 a、4''-O-乙酰化柴胡皂苷 a 配伍后含量降低, 白芍中芍药苷、没食子酰基芍药苷或其异构体配伍后含量升高。柴胡、白芍配伍后白芍中芍药苷含量升高, 柴胡中柴胡皂苷 a、c 含量降低, 与文献报道一致, 白芍配伍柴胡同煎有促进芍药苷溶

出增强疗效, 从一个方面反映了中药配伍的相使作用, 柴胡与白芍这一传统药对的配伍具有一定科学性。目前本实验只是针对柴胡、白芍配伍前后体外化学成分的整体变化情况进行初探, 后期将对柴胡、白芍配伍前后体内化学成分整体变化情况进行进一步分析, 以阐明二者配伍的化学机制。

参考文献

- [1] 王晓娟, 季宇彬, 李志雄. 药对配伍对其成分药动力学的影响 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(5): 8-10.
- [2] 王曼华, 孙化萍, 梁建卫. 经方“药对”配伍理论研究概况 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(1): 59-60.
- [3] 孙洋, 陈婷, 徐强. 从药对的角度考察复方配伍规律 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2004, 6(1): 17-20.
- [4] 吴笛, 刘法锦, 廖彩霞. 中药配伍对化学成分的影响 [J]. 中成药, 2003, 25(1): 152-154.
- [5] 原思通, 杜海燕, 夏冲. 中药复方汤剂分煎合煎对溶出效果的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(7): 29-32.
- [6] Dai Y, Li Z, Xue L, *et al.* Metabolomics study on the anti-depression effect of xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 482-489.
- [7] Zhou Y, Lu L, Li Z, *et al.* Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 236-244.
- [8] Zhang Y, Han M, Liu Z, *et al.* Chinese herbal formula Xiao Yao San for treatment of depression: A systematic review of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2011, doi: 10.1155/2012/931636.
- [9] Kim S H, Han J, Seog D H, *et al.* Antidepressant effect of Chaihu-Shugan-San extract and its constituents in rat models of depression [J]. *Life Sci*, 2005, 76(11): 1297-1306.
- [10] Wang Y, Fan R, Huang X. Meta-analysis of the clinical effectiveness of traditional Chinese medicine formula Chaihu-Shugan-San in depression [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2): 571-577.
- [11] Zhang Y, Huang X, Wang Y, *et al.* Ferulic acid-induced anti-depression and prokinetics similar to Chaihu-Shugan-San via polypharmacology [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 86(3): 222-228.
- [12] Wang Y T, Tan Q R, Sun L L, *et al.* Possible therapeutic effect of a traditional Chinese medicine, Sinisan, on chronic restraint stress related disorders [J]. *Neurosci Lett*,

- 2009, 449(3): 215-219.
- [13] 殷天照. 配伍对白芍中芍药苷煎出量的影响及对大鼠乳腺增生病作用的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
- [14] 陈少丽, 陈德兴. 柴胡、白芍药配伍的古今应用 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(3): 71-74.
- [15] Li Z Y, Guo Z, Liu Y M, *et al.* Neuroprotective effects of total saikosaponins of bupleurumyin-chowense on corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(3): 794-803.
- [16] Li Z Y, Jiang Y M, Liu Y M, *et al.* Saikosaponin D acts against corticosterone-induced apoptosis via regulation of mitochondrial GR translocation and a GR-dependent pathway [J]. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*, 2014, 53(1448): 80-89.
- [17] Mao Q Q, Ip S P, Ko K M, *et al.* Peony glycosides produce antidepressant-like action in mice exposed to chronic unpredictable mild stress: Effects on hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain-derived neurotrophic factor [J]. *Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psych*, 2009, 33(7): 1211-1216.
- [18] 朱永智, 陈鸿英, 张桂贤, 等. 白芍与柴胡不同比例配伍白芍总苷及苯甲酸水煎出量的比较 [J]. 天津中医药, 2011, 28(1): 78-79.
- [19] 苏孝共, 朱光辉, 王增寿. 白芍与柴胡不同比例配伍芍药苷水煎出量的比较 [J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(3): 256-257.
- [20] 李娉婷. 柴胡药对配伍对皂苷类成分影响及调节 RCT 的实验研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [21] 杨丽娜, 温静, 梁佳佳, 等. HPLC-ELSD 法同时测定四逆散不同配伍中柴胡皂苷 a、b₂、c 的含量 [J]. 中国药师, 2013, 16(9): 1275-1278.
- [22] Zhang H, Grubb M, Wu W, *et al.* Algorithm for thorough background subtraction of high-resolution LC/MS data: Application to obtain clean product ion spectra from nonselective collision-induced dissociation experiments [J]. *Analytical Chem*, 2009, 81(7): 2695.
- [23] Zhu P, Ding W, Tong W, *et al.* A retention-time-shift-tolerant background subtraction and noise reduction algorithm (BgS-NoRA) for extraction of drug metabolites in liquid chromatography/mass spectrometry data from biological matrices [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(11): 1563-1572.
- [24] Zhang H, Yang Y. An algorithm for thorough background subtraction from high resolution LC/MS data: Application for detection of glutathione-trapped reactive metabolites [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2008, 43(9): 1181-1190.
- [25] Zhang H, Ma L, He K, *et al.* An algorithm for thorough

- background subtraction from high-resolution LC/MS data: Application to the detection of troglitazone metabolites in rat plasma, bile, and urine [J]. *J Mass Spectr*, 2008, 43(9): 1191-1200.
- [26] Yan G L, Zhang A H, Sun H, *et al*. An effective method for determining the ingredients of Shuanghuanglian formula in blood samples using high-resolution LC-MS coupled with background subtraction and a multiple data processing approach [J]. *J Sep Sci*, 2014, 36(19): 3191-3199.
- [27] Zhang H, Gan J, Shu Y Z, *et al*. High-resolution mass spectrometry-based background subtraction for identifying protein modifications in a complex biological system: Detection of acetaminophen-bound microsomal proteins including argininosuccinate synthetase [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(4): 775-781.
- [28] 孙健, 张立富, 范斌, 等. 柴胡皂苷类化学成分的LC-MS分析 [J]. 中国药物警戒, 2012, 9(12): 725-727.
- [29] 梁鸿, 赵玉英, 邱海蕴, 等. 北柴胡中新皂甙的结构鉴定 [J]. 药学学报, 1998, 33(1): 37-41.
- [30] Ono M, Yoshida A, Ito Y, *et al*. Phenethyl alcohol glycosides and isopentenol glycoside from fruit of *Bupleurum falcatum* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(6): 819-823.
- [31] 田振坤, 张雅贤. 长白柴胡皂甙成分研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 1993(2): 82-84.
- [32] Ebata N, Nakajima K, Taguchi H, *et al*. Isolation of new saponins from the root of *Bupleurum falcatum* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1990, 38(5): 1432-1434.
- [33] 张如意, 陈喜奎, 杨宪斌, 等. 柴胡皂甙m和柴胡皂甙n的结构鉴定 [J]. 药学学报, 1994, 29(9): 684-688.
- [34] 刘晓帆, 娄子洋, 朱臻宇, 等. 采用HPLC-TOF/MS对中药复方小柴胡汤中化学成分的快速分析鉴别 [J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(8): 941-946.
- [35] Wen X, Huang M, Huang L, *et al*. Chemical profiling and quantification of Gua-Lou-Gui-Zhi decoction by high performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 986: 69-84.
- [36] Wang S, Chen L, Jing L, *et al*. Fragment ion diagnostic strategies for the comprehensive identification of chemical profile of Gui-Zhi-Tang by integrating high-resolution MS, multiple-stage MS and UV information [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 98(11): 22-35.
- [37] Li S L, Song J Z, Choi F F K, *et al*. Chemical profiling of Radix Paeoniae evaluated by ultra-performance liquid chromatography/photo-diode-array/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(2): 253-266.
- [38] Yan Y, Chai C Z, Wang D W, *et al*. HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Ge-Gen Decoction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 80(3): 192-202.
- [39] Chen L, Qi J, Chang Y X, *et al*. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui-Shaoyao-San by HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(2): 127-137.
- [40] Yin Q, Wang P, Zhang A, *et al*. Ultra-performance LC-ESI/quadrupole-TOF MS for rapid analysis of chemical constituents of Shaoyao-Gancao decoction [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(7): 1238-1246.
- [41] 母会丹, 朱靖博, 丁燕, 等. 白芍化学成分的UPLC/Q-TOF-MS分析 [J]. 分析实验室, 2013(7): 113-117.
- [42] Yao Q, Li S, Pi Z, *et al*. Chemical profiling of Wu-tou decoction by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Talanta*, 2014, 118(1): 21-29.