

赧皂苷元的收率高、植物药材资源利用充分、产品成本低等优点。

References:

- [1] Rothrock J W, Hammes P A, Mcalleer W J. Isolation of diosgenin by acid hydrolysis of sapogenin [J]. *Ind Eng Chem*, 1957, 49: 186.
- [2] Tang X L, Xu Z L, Xia B, et al. Optimization of spontaneous fermentation and acid hydrolysis of extracting diosgenin from the rhizome of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *J Plant Resour Environm* (植物资源与环境学报), 2004, 13 (3): 35-37.
- [3] Tong L, Zhang S K, Li J, et al. Extraction sapogenins from *Dioscorea zingiberensis* through enzymatic hydrolysis [J]. *J Shaanxi Norm Univ* (陕西师范大学学报), 2003, 31 (2): 81.
- [4] Pan W J, Xiao X H, Yuan H L, et al. Review on study of key technologies in manufacture of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (4): 361-367.
- [5] Zhang L M, Zhang L Y, Du L X. Technology for extracting diosgenin from seeds of *Trigonella foenum-graecum* through enzymatic hydrolysis [J]. *Transact CSAE* (农业工程学报), 2005, 21 (2): 161-164.
- [6] Zhang Y Q, Wang D Q. The method of extracting diosgenin through stepwise biocatalysis [P]. CN: 200510014456.4, 2005-07-11.

抗衰老复方化学配伍关系的色谱指纹谱研究

曹 进, 叶兆波, 车镇涛*

(香港中文大学中医学院, 香港)

摘要:目的 对抗衰老复方形成、配伍以及配制过程的变化进行指纹图谱研究。方法 建立 HPLC-UV 和 LC-MS 指纹图谱, 对图谱结果进行比较分析。结果 以获取的复方指纹图谱 18 个编码指纹峰为基础, 对药材指纹图谱将复方中编码的指纹峰进行来源归属, 其中复方 1、2 号峰来自灵芝 11L、21L 号峰; 复方 4、5 号峰来自女贞子 1N、4N 号峰; 复方 3、8、9、10、11、12、13、14、18 号峰来自五味子 1W、4W、12W、14W、16W、18W、22W、26W、31W 号峰, 而复方 6、7、15、16、17 号峰无药材归属峰。归属显示在该测定方法下, 药材来源的峰在复方中的表达可以划分一定的指纹区域, 其中 6~14 min 主要来自灵芝, 20~30 min 主要来自女贞子, 40 min 以后主要来自五味子, 区域的划分加强了抗衰老复方的化学配伍研究的针对性。结论 药材到复方的形成过程中, 药材会产生两种变化, 一种是不受共存药材的影响; 而另一种是受到影响, 结合在抗衰老复方的配制中, 如果考虑 3 药共煎和药材先后加入的情况, 则五味子的加入顺序会影响最终复方的质量, 而先投入五味子, 后投入女贞子或者灵芝, 产生的复方与 3 药共煎的结果是相同的, 说明在复方配置过程中, 药材的变化受到了药材间配伍关系的影响, 结果为复方的配伍和质量研究提供了可行途径。

关键词:抗衰老复方; 指纹图谱; 配伍

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)05-0691-04

Fingerprint in chemical compatibility of Anti-aging Compound Recipe

CAO Jin, PAUL Ip, CHE Chun-tao

(School of Traditional Chinese Medicine, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China)

Abstract: **Objective** To study the variance of fingerprint peaks in the processes of Anti-aging Compound Recipe formation, compatibility, and preparation. **Methods** Anti-aging Compound Recipe and its herbs' fingerprint chromatogram were studied and validated by HPLC/UV and LC/MS which were used in chemical compatibility. **Results** Based on the 18 code peaks from compound recipe fingerprint and compared with herb fingerprints, 18 code peaks of compound recipe were under the assignment of herb source, that was, No. 1, 2 from *Ganoderma* No. 11L, 21L; No. 4, 5 from *Fructus Ligustri Lucidi* No. 1N, 4N; No. 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18 from *Fructus Schisandrae*. No. 1W, 4W, 12W, 14W, 16W, 18W, 22W, 26W, 31W; and No. 6, 7, 15, 16, 17 were no assignment. The assignment resulted the peaks of herb source could be divided into several fingerprint regions, as anti-aging formulae, 6—14 min mainly from *Ganoderma*, 20—30 min from *Fructus Ligustri Lucidi*, after 40 min from *Fructus Schisandrde*. All of them enhanced what the study on chemical compatibility of Anti-aging Compound Recipe was aimed at. **Conclusion** The two actions have appeared during mixing the crude Chinese

收稿日期: 2005-09-17

基金项目: 香港政府中药材质量标准项目资助

作者简介: 曹 进, 香港中文大学中医学院博士, 助研。

* 通讯作者 车镇涛 Tel: (00852) 26098130 E-mail: chect@cuhk.edu.hk

medicinal materials into a formula recipe, one is no influence among the coexisted raw materials, while the other is with influence each other. In Anti-aging Compound Recipe the three co-decocted raw materials and their sequence put into are considered. Final results present that *Fructus Schisandrae* adding sequence could influence the quality of compound recipe which illustrated the compatibility among herbs and determined the variance of herbs during the preparation of compound recipe. And the results also provide a feasible way to study the compatibility and quality of compound recipe.

Key words: Anti-aging Compound Recipe; fingerprint; compatibility

中药色谱指纹图谱是对中药所含物质成分概况的一种理化表达方式,一般说来仅通过色谱方法得到的中药样品色谱图应该仅为样品的化学轮廓图,必须通过一定的数据处理和多个相关样品比较,指纹峰的归属鉴别等后才可以赋予色谱图以特征性,这时样品的化学轮廓表达也就转变成为样品的指纹图谱。指纹图谱具有一定的化学组成鉴别功能,其中指纹峰间相对比例的变化可以反映出样品在相互配合中物质成分交互关系。在一定的规范操作和固定量比的情况下,建立指纹图谱,可利用指纹图谱变化说明复方中药材之间的相互作用。

抗衰老复方是中国南方民间常用的经验方剂,由五味子、女贞子、灵芝 3 味中药组成,通常将 3 味中药等比例混合进行水煮,取其滤后水溶液服用。按照药材组成,其中成分主要包括蛋白质、内酯、氨基酸、有机酸以及木脂素类成分,以上成分构成显示复方主要成分包括强极性和中等极性两个部分,在强极性部分主要包括蛋白质和氨基酸等,而主要的活性和指标成分集中在中等极性部分,包括有机酸和木脂素类成分,为使用反相色谱测定,比较试验证明采用 60%乙醇进行沉淀滤过后取清液测定,可保留大部分成分,并不减失测定的指纹图谱的特征性,故本实验中使用供试品均按此处理方式得到。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(带有二极管阵列检测器,自动进样装置),离子阱质谱检测器(Agilent 公司,美国),Milli-Q 纯水器(美国 Millipore 公司)。

抗衰老复方(10 批,自制),95%医用乙醇(英国 Unichem 公司),乙腈(Merck 公司,色谱纯),去离子水(自制)。五味子、灵芝、女贞子药材购自安徽亳州药材市场,经香港中文大学中医学院鉴定。

2 方法与条件

2.1 供试品溶液的制备:抗衰老复方对应处方量的药材,粉碎,混合,以 6 倍量水煮提 2 h,滤过,残渣以 3 倍量水重复煮提 1 次,时间为 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至 2 倍量,以 60%乙醇沉淀,放置 24 h,滤

过,清液用 0.45 μm 滤膜滤过,进样。药材样品及缺药材阴性样品均按上述步骤,依据处方量分别提取制备。

2.2 液相色谱条件:色谱柱:Prevail ODS- C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:A 相为水,B 相为乙腈,线性梯度洗脱,0~80 min,A 相由 100%洗脱至 0%;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;体积流量:0.7 mL/min;进样量:20 μL ;检测波长:210、254、280、320、380 nm。

2.3 LC-MS 条件:液相色谱条件同 2.2 项。质谱采用 APCI 源,电极电压 3 000 V,雾化气压 4.1×10^5 Pa,干燥气 5.0 L/min,干燥气温度 325 $^{\circ}\text{C}$,雾化温度 400 $^{\circ}\text{C}$,扫描范围 m/z 50~800 正离子模式。

3 结果与讨论

3.1 方法的验证:复方指纹图谱的测定方法是利用复方供试品溶液进行摸索的,在得到相应的测定方法后,指纹图谱的方法需要进行一定的验证,其中包括精密性、重复性、稳定性以及耐用性等,结果显示方法的指纹峰精密性和重复性保留时间 RSD 均小于 1.5% ($n=6$),峰面积 RSD 均小于 5.5% ($n=6$),供试品溶液在 48 h 内保持稳定,保留时间 RSD<1.5% ($n=6$),峰面积 RSD<6.7% ($n=6$),图谱测定在 0.5~1.0 mL/min 体积流量范围,20~35 $^{\circ}\text{C}$ 的温度范围,以及 80~100 min 的运行时间范围均可以保持指纹图谱的相对稳定,即峰数和峰面积比之间的稳定和相似。

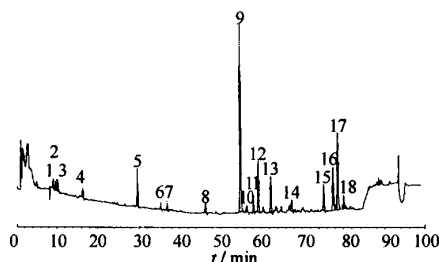
3.2 指纹图谱测定波长的认定:在建立指纹图谱方法的过程中,采用了 210、254、280、320、380 nm 作为测定的检测波长,最后的结果显示,在 254 nm 下得到的指纹峰最多,与其他波长的指纹图谱进行比较,254 nm 显示了大部分的特征响应,其他波长与 254 nm 指纹图谱的差异峰在各自波长下占相应波长下总峰面积均小于 10%,因此实际测定中选择 254 nm 作为指纹图谱的测定波长,用于比较。

3.3 供试品的确定:供试样品测定了药材、药材阴性以及复方的指纹图谱($n=10$),为保证评价的一致性,均采用同样的方法测定。

3.4 供试品图谱的编码与标记:供试品指纹峰是对

样品中可能成分的表达,需要进行编码才可以用于比较,另外必须对峰进行认定,才可以保证评价和判别的准确。以 LC-UV 为准,其中复方标记了 18 个编码指纹峰,五味子、女贞子及灵芝药材分别标记了 31、8、8 个编码指纹峰。按照顺序分别以 n 、 nW 、 nN 、 nL 表示,其中、 n 为峰号,W、N、L 分别表示五味子、女贞子和灵芝。结果见图 1~7。

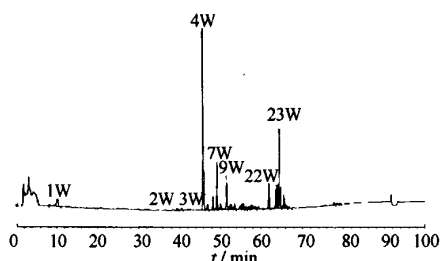
指纹图谱的标记通过紫外和质谱检测两种方式同时进行,对编码的指纹峰分别采取其 LC-UV 图谱的百分峰高和 LC-MS 总离子流图谱各对应 MS 图谱中所含丰度大于 30% 以上 m/z 值,作为该指纹



5-女贞苷 8-五味子素
5-ligustroside 8-schizandrin

图 1 抗衰老复方 HPLC 指纹图谱

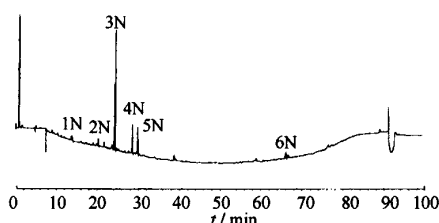
Fig. 1 HPLC Fingerprint of Anti-aging Compound Recipe



4W-五味子素
4W-schizandrin

图 2 五味子 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC Fingerprint of Fructus Schisandrae



4N-女贞苷
4N-ligustroside

图 3 女贞子 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC Fingerprint of Fructus Ligustri Lucidi

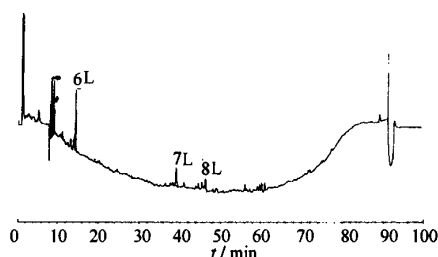


图 4 灵芝 HPLC 指纹图谱

Fig. 4 HPLC Fingerprint of Ganoderma

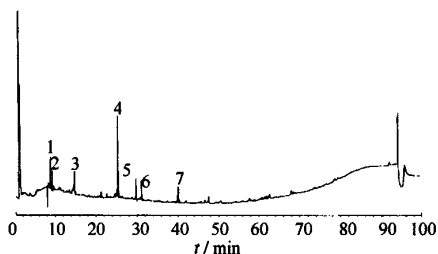


图 5 缺五味子阴性 HPLC 指纹图谱

Fig. 5 HPLC Fingerprint of negative sample without Fructus Schisandrae

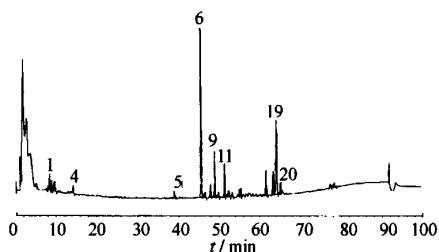


图 6 缺女贞子阴性 HPLC 指纹图谱

Fig. 6 HPLC Fingerprint of negative sample without Fructus Ligustri Lucidi

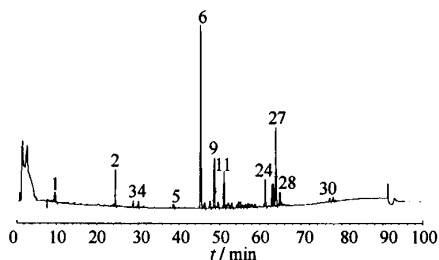


图 7 缺灵芝阴性 HPLC 指纹图谱

Fig. 7 HPLC Fingerprint of negative sample without Ganoderma

峰的标识,这样组成的序列是各个指纹峰所含内容的数字标记,其中由于各个峰的 m/z 值个数不一致,按照由小到大的顺序以 0 补齐,上述结果均经过 10 批样品的测定,取共有数据作为标识结果。另外为考察数据的准确性还分别比较了各供试样品 10 批数据的 LC-UV 和 LC-MS 的 MS 平均谱的相

似性,数据未列出,同时比较了 10 批数据各个指纹峰的在线紫外扫描图,结果表明数据具有一定的准确性,可以表达图谱的专属程度。

3.5 复方指纹峰的归属鉴别:对结果按照保留顺序进行指纹峰匹配后,通过比较复方、药材以及药材阴性图谱,可以将复方中编码的指纹峰进行来源归属,其中复方 1、2 号峰来自灵芝 11 L、21 L 号峰;复方 4、5 号峰来自女贞子 1N、4N 号峰;复方 3、8、9、10、11、12、13、14、18 号峰来自五味子 1W、4W、12W、14W、16W、18W、22W、26W、31W 号峰,而复方 6、7、15、16、17 号峰无药材归属峰。

从归属结果并结合 LC-MS 的平均质谱图比较可以发现,抗衰老复方中的指纹峰是由相应药材来源的峰组成的,同时在该测定方法下,药材来源的峰在复方中的表达可以划分一定的指纹区域,其中 6~14 min 主要来自灵芝,20~30 min 主要来自女贞子,40 min 以后主要来自五味子,区域的划分加强了抗衰老复方的化学配伍研究的针对性。

3.6 复方形成过程的变化研究:在对比中可以发现,虽然复方中的指纹峰可以找到一定的药材来源,但是与同剂量药材图谱比较,其指纹峰之间的比例发生了变化,其中对应五味子 4W、7W、9W、22W、25W 号峰,女贞子 3N、4N、5N 号峰和灵芝 61、71、81 号峰在复方图谱显示中均大大减少甚至不出现,而其他药材图谱量较小的指纹峰如对应五味子 12W、14W、16W 的峰则在复方中得到了加强,这从一方面说明了药材在为复方提供了物质基础的同时,主要的物质变化源于药材间的配伍关系,而另一方面药材相互之间所含的物质成分在配制复方的过程中会促进或者干扰成分转移,甚至会产生无法指定药材归属的成分。进一步为考察比例变化的来源,采取固定两个药材的量变化剩余的一个药材的量,分别考察了减少 1 倍和增加 1 倍的情况,结果发现复方中各药材来源的峰有不同的变化情况,其中五味子来源的峰相对其药材量有明显的改变,12W、14W、16W 号峰随量的增加会增加,而 4W、22W 号则减少,女贞子和灵芝来源的峰则不受量改变的影响,相对比例不变。但是在相同量溶剂提取的过程中,如果共同减少或者增加药材的投药量,各种药材来源的指纹峰却可以在一定范围内保持其比例相对

稳定,具体数据没有在这里列出。

3.7 复方配伍的化学变化考察:配伍化学变化研究需要研究复方组成药材相互之间的干扰和促进的关系,以复方图谱指纹峰间比例出发,各个药材阴性样品的图谱显示,药材会由于共存成分的改变而发生一定的变化,其中五味子和灵芝配伍,五味子的指纹峰 12W、14W、16W 号峰会增加,而其他不变,而与女贞子的配伍中,4W、7W、9W 号会减少,而 14W、16W 号峰会增加,其余不变,女贞子和灵芝配伍则不引起指纹峰大的变化,这个结果说明五味子受共存成分的影响较大,同时在与不同药材配伍过程中的指纹峰的增减情况也恰恰解释了 3.6 项中为什么如果共同减少或者增加药材的投药量,各种药材来源的指纹峰却可以在一定范围内保持其比例相对稳定的问题。

3.8 复方配制中的质量变化:从以上结果可以看出,药材到复方的形成过程中,药材会产生两种变化形式,一种是不受共存药材的影响;而另一种是受到影响,在抗衰老复方的配制中,如果考虑 3 药共煎和药材先后加入的情况,则五味子的加入顺序会影响最终复方的质量,而先投入五味子,后投入女贞子或者灵芝,产生的复方与 3 药共煎的结果是相同的,这点说明了在复方配制过程中,药材的变化受到了药材间配伍关系的影响,因此在解决复方质量问题的过程中,应对药材之间的配伍关系进行研究和考察,在某些复方投药顺序对质量有最终影响的情况下,必须考虑共煎和分煎的关系,从而保证复方的质量。

4 结论

本实验利用抗衰老复方进行了复方化学配伍关系的研究,初步讨论了配伍关系与复方质量变化的关系,需要指出的是,利用指纹图谱进行复方研究的过程中,指纹图谱本身对复方成分的显示程度,以及分析仪器对分析样品的选择性和图谱显示的信息包容情况都应该是研究的重点。在如何从表达复方化学轮廓到形成化学指纹图谱,再利用化学指纹图谱的特征性,结合药物的功效,指明指纹图谱的功能区域,最终形成功能化的指纹图谱的过程中,指纹图谱本身特征信息处理和识别以及表达的全面性将直接影响对复方的阐释和对复方质量的合理评价。