

人参白术药对配伍前后化学成分变化研究

李孟璇¹, 孙 林¹, 孟兆青^{1,2}, 丁 岗¹, 王振中¹, 萧 伟^{1*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

摘 要: 目的 以人参 *Ginseng Radix* 和白术 *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* 药对为研究对象, 分析人参、白术单煎液与合煎液的化学成分变化, 以期从化学成分角度阐明人参-白术药对配伍的科学内涵。方法 采用 HPLC 法, Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-水溶液; 梯度洗脱程序: 0~35 min, 5%~35%乙腈; 35~40 min, 35%乙腈保持; 40~80 min, 35%~95%乙腈; 检测波长 203 nm; 柱温 25 ℃; 体积流量 1 mL/min。结果 经 HPLC 指纹图谱分析人参、白术单煎液与合煎液化学成分存在明显差异, 人参-白术合煎液中的人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rd 和白术内酯 I 的量明显增加, 并出现了 1 个新色谱峰, 其他成分无明显变化。结论 人参与白术配伍可促进人参中皂苷类成分的溶出, 并产生了 1 个新的色谱峰, 可能是该药对配伍的科学依据之一。

关键词: 人参; 白术; 配伍; 成分变化; 高效液相色谱法; 人参皂苷; 白术内酯

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)24-3549-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.009

Content changes of chemical constituents in *Ginseng Radix* and *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* before and after compatibility

LI Meng-xuan¹, SUN Lin¹, MENG Zhao-qing^{1,2}, DING Gang¹, WANG Zhen-zhong¹, XIAO Wei¹

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To discuss the synergistic mechanism of compatibility of *Ginseng Radix* (GR) and *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (AMR), and to determine the compounds in GR and AMR before and after compatibility using HPLC method. **Methods** Hypersil ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was acetonitrile (A) and water (B) for gradient elution (0—35 min, 5%—35% A; 35—40 min, 35% A; 40—80 min, 35%—95% A). The detection wavelength was set at 203 nm. The column temperature was 25 ℃. The flow rate was 1 mL/min. **Results** The HPLC analysis suggested the extracts before and after compatibility were different on contents of GR and AMR. In GR and AMR co-decoction, the contents of ginsenosides Rg₁, Re, Rf, Rd, and butenolide I increased obviously, and a new chromatographic peak appeared. There was no obvious change in other components. **Conclusion** The synergistic mechanism of the compatibility of GR and AMR can be proved with the increased dissolution of ginsenoside and a new chromatographic peak.

Key words: *Ginseng Radix*; *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*; compatibility; component changes; HPLC; ginsenoside; butenolide

药对是复杂方剂的基础单位, 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^[1-2], 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^[3-4], 药对是研究中药配伍规律的有效途径。

人参 *Ginseng Radix* (GR) 与白术 *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (AMR) 药对, 主治脾胃气

收稿日期: 2014-07-11

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台 (2013ZX09402203)

作者简介: 李孟璇, 硕士研究生。E-mail: mengxuan2009@gmail.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: wzzh-nj@163.net

虚诸证,出自《和剂局方》中的四君子汤,在后世的许多健胃方剂中应用非常广泛,一般用人参 10~15 g,白术 10~15 g^[5-6]。目前,围绕人参、白术单味药材的物质基础及药理活性研究较多^[7-8],但其配伍后化学成分研究很少,一些文献报道了人参与其他药材配伍的化学成分变化^[9-10],因此本研究以人参、白术这一经典药对为对象,比较人参、白术合煎液与单煎液化学成分及其量的差异,以期从化学成分变化的角度初步揭示人参-白术药对配伍的科学内涵。

1 材料与仪器

美国 Agilent 公司 Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 型色谱柱; Agilent 1100 型高效液相色谱仪,二元梯度泵,自动进样器、柱温箱和 VWD 检测器, Agilent 科技有限公司; AL204 型电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司; Agilent 1290 液相色谱-质谱联用仪, LC-MS, DAD 检测器和 Q-TOF 6538 质谱仪; Milli-Q 超纯水系统,美国 Millipore 公司。

人参、白术药材由康缘大药房提供,经江苏康缘药业股份有限公司王振中研究员鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的干燥根和菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎。甲醇(分析纯)购自南京化学试剂有限公司;乙腈(色谱纯)购自美国 Tedia 公司;超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制得。白术内酯 I (I, 批号 121127, 质量分数≥98%)、白术内酯 II (II, 批号 121220, 质量分数≥98%)、白术内酯 III (III, 批号 121105, 质量分数≥98%)、人参皂苷 Rc (Rc, 批号 121022, 质量分数≥98%)、人参皂苷 Rf (Rf, 批号 121024, 质量分数≥98%) 对照品购自成都菲普德科技有限公司;人参皂苷 Re (Re, 批号 110754-201324, 质量分数 92.7%)、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁, 批号 110704-200420, 质量分数≥98%)、人参皂苷 Rg₁ (Rg₁, 批号 110703-201128, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Rb₂ (Rb₂, 批号 111715-201203, 质量分数 93.8%)、人参皂苷 Rd (Rd, 批号 111818-201202, 质量分数 94.2%) 对照品购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水溶液; 梯度洗脱: 0~35 min,

5%~35%乙腈; 35~40 min, 35%乙腈保持; 40~80 min, 35%~95%乙腈; 检测波长为 203 nm; 柱温为 25 ℃; 体积流量为 1 mL/min, 进样量为 20 μL。

2.2 混合对照品溶液与供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称定经干燥 24 h 的 I、II、III 对照品各 5.0 mg, 置 10 mL 的量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 制成白术内酯混合对照品储备液, -4 ℃冰箱放置, 备用。

精密称定经干燥过的 Rd、Rc、Rb₁、Rb₂、Re、Rg₁、Rf 对照品各 5.0 mg, 置 10 mL 的量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 制成人参皂苷混合对照品储备液, -4 ℃冰箱放置, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 人参、白术按 1:1 (各取 50 g) 混和后, 用 10 倍量水浸泡 60 min 后, 煎煮 2 次, 每次 1 h; 合并 2 次煎煮液, 滤过, 加水补足至 20 倍量, 即得人参-白术合煎液; 制备人参、白术单煎液, 方法同上; 将 2 种单煎液按 1:1 混合, 即为人参-白术合并液。精密量取合煎液、合并液与单煎液各 100 mL, 至水浴 60 ℃挥干后, 加入适量 50%甲醇溶解后, 转移至 25 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 摇匀, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取人参、白术合煎供试品溶液, 连续进样 5 次, 根据“2.1”项色谱条件测定, 选择 22 个共有峰进行比较, 结果表明各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一批人参、白术药材按“2.2.2”项供试品溶液制备方法平行操作, 制备 5 份人参-白术合煎供试品溶液, 根据“2.1”项色谱条件测定, 结果各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 各色谱峰峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同批人参-白术合煎供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、24 h 进样测定, 对各色谱峰进行比较, 结果各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 各色谱峰的峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 且色谱峰数目无变化, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4 色谱峰归属

将人参、白术合煎液与单煎液、人参皂苷混合对照品及白术内酯混合对照品的图谱进行对比, 对

人参-白术合煎液中各色谱峰进行初步归属,见图 1。通过与混合对照品及人参、白术单煎液各色谱峰的保留时间比较,可知 8~14 号色谱峰为 Rg₁、Re、Rf、Rb₁、Rc、Rb₂、Rd; 15、17、18 号色谱峰为 I、III、II; 1、3~5、7、19、20、22 号色谱峰为人参、白术共有峰,人参和白术药材中共有化合物较少,该共有峰可能为在此液相条件下出峰位置相同的化合物; 2、6、16 号色谱峰为人参特有, 21 号色谱峰为新出现的色谱峰。

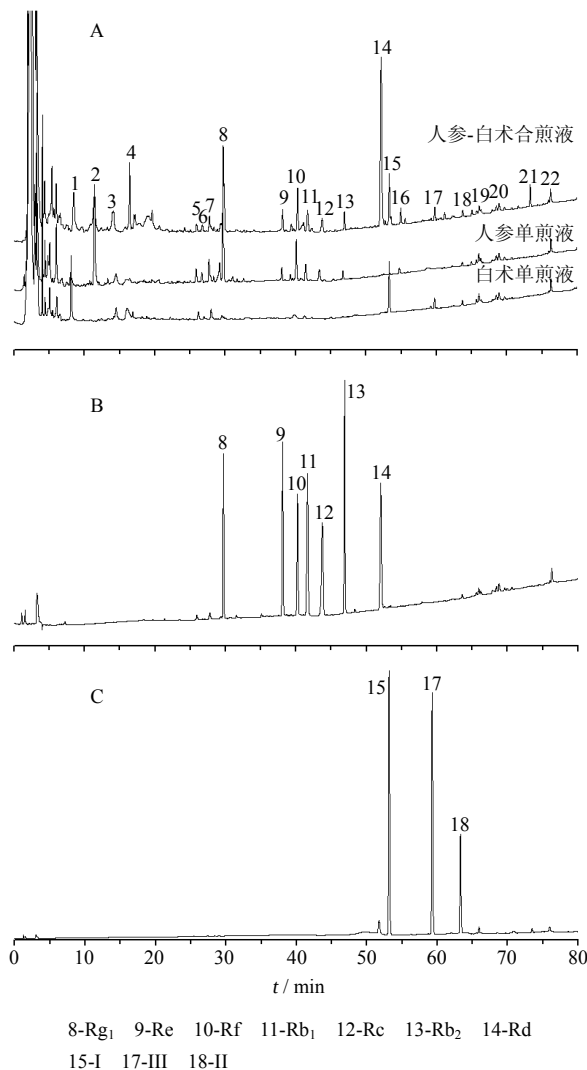


图 1 不同煎煮液样品 (A) 和人参皂苷 (B)、白术内酯 (C) 混合对照品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of different decoctions (A), ginsenosides (B), and butenolide (C) reference substances

2.5 配伍前后化学成分变化

将人参-白术合煎液与合并液的图谱(图 2)进行比较,合煎液中 4、8~10、14、15 号色谱峰峰面积明显增加, 2 号色谱峰面积减少,其

他色谱峰面积无明显变化,而合并液图谱中未见 21 号色谱峰,具体变化见表 1。相关成分变化情况的计算公式为变化比例=(合并液中峰面积-合煎液中峰面积)/合并液中峰面积。

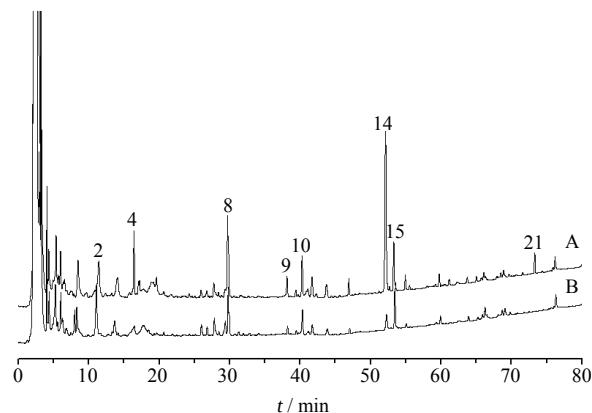


图 2 人参-白术合煎液 (A) 与合并液 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of GR-AMR co-decoction (A) and GR-AMR mixed decoction (B)

表 1 人参-白术合并液与合煎液化学成分
Table 1 Chemical constituents of co-decoction and mixed decoction of GR and AMR

色谱峰	t_R / min	相对峰面积		差值	变化比例 / %
		合并液	合煎液		
2	11.412	356.1	303.6	-52.5	-14
4	16.416	108.4	265.3	156.9	145
8 (Rg ₁)	29.696	254.3	533.3	279	110
9 (Re)	38.135	33.8	96.4	62.6	185
10 (Rf)	40.266	126.7	177.7	51.0	40
14 (Rd)	52.122	91.8	997.6	905.8	987
15 (I)	53.283	175.6	213.8	38.2	22
21	73.299	0.0	78.1	78.1	新峰

2.6 质谱分析

质谱测试条件: ESI 离子源; 离子化方式: ESI (+/-); 干燥气温度 350 °C; 干燥气流量 10 L/min; 雾化气压力 344.5 kPa; 毛细管电压 +4 000 V/-3 500 V; 毛细管出口电压 100 V, 锥孔电压 65 V; 扫描范围 m/z 100~1 500。

21 号色谱峰浓缩液的质谱分析结果见图 3, 其中 $t_R=73.299$ min, 分子式为 C₄₂H₇₀O₁₂, 相对分子质量为 766.48, 分子离子峰 m/z : 784.52 [M+NH₄]⁺, 767.49 [M+H]⁺, 749.48 [M+H-H₂O]⁺, 879.47 [M+TFA-H]⁻, 811.48 [M+HCOOH-H]⁻, 765.48 [M-H]⁻。

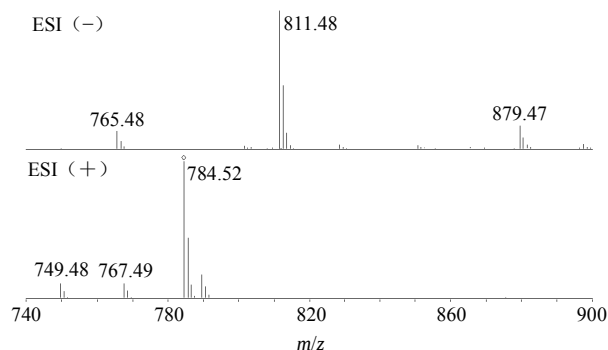


图3 21号色谱峰ESI-MS谱
Fig. 3 ESI-MS spectrum of peak 21

3 讨论

本实验采用HPLC法,比较了人参与白术药对配伍前后人参皂苷和白术内酯等成分的变化,发现配伍后 R_{g1} 、 R_d 、 R_e 明显增加, R_f 、 I 略有增加,表明2味药材合煎可增加人参皂苷成分及白术内酯等有效成分的提取率。通过合煎液与单煎液HPLC图的对比,发现合煎条件下产生了1个新色谱峰(峰21),而在合并液未见上述变化,表明合煎是导致人参皂苷类成分增加及化学成分变化的原因,从化学成分变化的角度初步揭示了人参、白术药对配伍的科学内涵,复方化学成分不是各单味药的简单加和,而是发生了变化;这种变化不仅有成分量的变化,也有化学成分种类的变化。

本实验在此基础上运用MS检测出21号峰分子离子峰 m/z 767.49 $[M+H]^+$,参考相关文献报道^[11]推断该物质为人参皂苷 F_4 或人参皂苷 R_{g6} ,由人参皂苷 R_{g2} 分解得到。后续可通过LC-MS、NMR等手段对共煎液中新产生的化学成分及未知成分进行辨析,明确共煎液中的主要成分,对其药理作用进

行研究,进一步阐明化学成分与其生物效应之间的关系,并研究不同比例配伍对化学成分的影响,反映其变化规律。还可从吸收、代谢等角度对人参、白术配伍前后进行研究,全面阐明其药对配伍的科学性,揭示药对配伍的科学内涵。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 王鸿燕.人参药对功用探析[J].中华中医药学刊,2009,27(3):649-651.
- [6] 王付.伤寒论现代研究丛书:经方药对[M].北京:学苑出版社,2005.
- [7] 黎阳,张铁军,刘素香,等.人参化学成分和药理研究进展[J].中草药,2009,40(1):164-附2.
- [8] 陈文,何鸽飞,姜曼花,等.白术的研究进展[J].中草药,2008,39(5):附4-附6.
- [9] 丁选胜,戴德哉,汤晓赞.人参白虎汤配伍规律研究—不同配伍条件下钙离子含量变化[J].中草药,2004,35(2):156-158.
- [10] 汤响林,易剑峰,梁乾德,等.人参-附子配伍比例对人参皂苷成分溶出变化研究[J].中草药,2013,1(1):36-41.
- [11] 吴彦君.人参皂苷 R_e 碱降解产物的成分研究[D].长春:吉林大学,2008.