

山茱萸与熟地配伍时山茱萸中主要组分变化规律研究

周莉莉^{1,2}, 杨士斌³, 刘志强¹, 张 卉², 胡 梅², 祝建华²

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心, 吉林 长春 130022;

2. 山东省产品质量监督检验研究院, 山东 济南 250100; 3. 中国航天科工集团 731 医院, 北京 100074)

摘要: 为了研究山茱萸与熟地两种药物不同比例配伍时山茱萸中主要组分的变化规律, 利用高效液相色谱 (HPLC) 法和电喷雾质谱 (ESI-MS) 法比较山茱萸和熟地药材单煎液、合煎液和单煎合并液中山茱萸主要组分的含量变化和各溶液的谱学行为。在一定质量比例内 ($m(\text{山茱萸}) : m(\text{熟地}) \leq 4 : 8$), 山茱萸与熟地共煎有相互协同溶出的效应。合煎液中山茱萸莫诺苷、马钱苷和没食子酸组分的百分含量随熟地配伍比例的增加均呈现线性变化规律。不同的配伍方式 (合煎与单煎合并) 会产生不同的新物质。结果表明, 熟地组分的存在对山茱萸组分的溶出有较大影响, 但该影响不受温度的限制。

关键词: 山茱萸; 熟地; 配伍; 高效液相色谱; 电喷雾质谱

中图分类号: O 657. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2012)03-0074-07

Studies on Contents Variation of Main Components in *Fructus Corni* after Combination with *Radix Rehmanniae Preparata*

ZHOU Li-li^{1,2}, YANG Shi-bin³, LIU Zhi-qiang¹,
ZHANG Hui², HU Mei², ZHU Jian-hua²

(1. Changchun Center of Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;

2. Shandong Provincial Institute of Product Quality Supervision & Inspection, Ji'nan 250100, China;

3. Aerospace 731 Hospital, Beijing 100074, China)

Abstract: To study the contents variation of main components in *Fructus Corni* (FC) after combination with *Radix Rehmanniae Preparata* (RRP). The reciprocity of FC with RRP were investigated by means of high performance liquid chromatography (HPLC) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) technique in the negative ion mode. FC with RRP was decocted separately, and then the separate aqueous extracts were combined partly. Different proportions of FC with RRP were decocted together. The contents of Morroniside, Loganin and Gallic acid in these samples were analyzed, synchronously, mass action of these samples were examined. FC with RRP promoted each other in dissolving percents in certain suitable quality proportion ($FC : RRP \leq 4 : 8$). Together-decocted and

收稿日期: 2011-09-21; 修回日期: 2011-12-14

基金项目: 国家自然科学基金(20173057)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213-06)资助

作者简介: 周莉莉(1981~), 女(汉), 江苏盐城人, 博士, 从事天然产物化学与有机质谱学研究。E-mail: zll811128@126.com

通信作者: 刘志强(1962~), 男(汉), 吉林长春人, 研究员, 从事天然药物化学与有机质谱学研究。E-mail: liuzq@ciac.jl.cn

single-decocted merger can produce different new materials. The existence of RRP has great influence on the dissolution of components in FC which would not be restricted by temperature. It provides a certain science basis for the reasonable Chinese herbal medicine.

Key words: *Fructus corni*; *Radix Rehmanniae Preparata*; combination; HPLC; ESI-MS

中药山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Seib et Zucc. 除去种子的干燥成熟果肉,最早见于《神农本草经》,具有补益肝肾、涩精固脱等功效^[1]。莫诺昔、马钱苷等环烯醚萜苷类化合物是山茱萸中主要的水溶性组分,生物免疫抑制活性很强^[2-4]。没食子酸是山茱萸水溶液中主要的收敛抗炎组分,大量的研究已证实没食子酸具有抗肿瘤、杀锥虫、抗病毒和收缩血管^[5]等生物学作用,安全性好^[6]。

山茱萸、熟地药对见于《小儿药证直诀》地黄丸、《金匱要略》肾气丸、《医学衷中参西录》滋脾饮等方。山茱萸固涩气阴,平补肝肾,性平和;熟地黄善补精血,益肝肾,性滋腻。熟地黄有止血功能,可增山茱萸固崩止血之力;熟地黄得山茱萸平补之助,滋养肝肾之力更强。二药配伍,互补互使,养血补精、止血涩精功力增加。用量山茱萸 6~15 g,熟地黄 9~30 g,经典配伍质量比例为 $m(\text{山茱萸}) : m(\text{熟地}) = 4 : 8$ 。赵进喜^[7]针对糖尿病、肾病皆有肾虚、精微不固病机,经常选用二药,补肾固肾,对于肾虚精微不固所致的腰膝酸痛、尿频量多、眩晕耳鸣、自汗盗汗、阳痿遗精等症收效显著。但目前还没有对这组药配伍的化学研究报道。

本实验以不同方式、不同比例的山茱萸熟地配伍,通过溶出率、高效液相色谱(HPLC)、电喷雾质谱(ESI-MS)等分析手段研究药材单煎、合煎和单煎合并过程中的溶出行为,从不同角度阐明山茱萸熟地配伍时,山茱萸中主要组分的变化规律和两药材间的明显相互作用。

1 实验部分

1.1 仪器和设备

Waters(Milford, MA, USA) 2695 HPLC 系统,二极管阵列(DAD)检测器,Waters 自动进样器;美国 Waters 公司产品;LCQ™ 型电喷雾多级串联质谱仪;美国 Finnigan 公司产品。

1.2 试剂与材料

乙腈、甲醇、醋酸(色谱纯);美国 Fisher 公司产品;其余试剂均为分析纯;北京化工厂产品;水为超纯水(18.2 MΩ·cm);0.45 μm 滤膜;美国 Agilent 公司产品。

山茱萸 (*Cornus officinalis* Seib et Zucc.), 熟地 (*Radix Rehmanniae Preparata*): 购自同仁堂,由长春中医药大学王淑敏教授鉴定。莫诺昔、马钱苷、没食子酸标准品:购自中国药品生物制品检定所。

1.3 实验方法

1.3.1 样品液的制备 单味中药山茱萸与熟地分别用水单煎;山茱萸与熟地按 4 : 1, 4 : 2, 4 : 4, 4 : 8, 4 : 12 的质量比合煎;单煎液按经典比例合并。1)单煎:称取一定量的山茱萸和熟地,各自称取煎煮前的质量,并分别用纱布包扎,放入烧杯中,加入 250 mL 蒸馏水热浸 30 min,急火烧开后保持微沸并计时,煎煮 2 次,每次 45 min,合并滤液,减压浓缩并定容,得山茱萸与熟地的单煎液。所得药渣于 40 °C 下烘干至恒重,并称取煎煮后的质量。2)合煎:将按质量比准确称得的山茱萸和熟地包在同一块纱布中,按单煎的条件同样煎得合煎液。药渣分离后,分别于 40 °C 下烘干至恒重,并分别称得煎煮后的质量。3)单煎合并:分别取山茱萸单煎液和熟地单煎液,按生药量浓度相等换算,按山茱萸熟地质量比 4 : 8 配得单煎合并液。

1.3.2 质谱条件 质量扫描范围 m/z 100~1 500,喷雾电压 5 kV,壳气为氮气,壳气压 6 MPa,金属毛细管温度 250 °C,电压 10 V,质谱检测采用负离子模式。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Capcell Pak C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm×5 μm);莫诺昔、马钱苷测定:V(乙腈) : V(水) = 15 : 85 的混合溶液,检测波长 240 nm;没食子酸测定:V(甲醇) : V(乙腈) : V(0.3%醋酸) = 5 : 6 : 89 的混合溶液,检测波长 270 nm;流速 0.7 mL/min;柱温 35 °C。山茱萸与熟地共煎液样品色谱图示于图 1。

1.4 方法学考察

1.4.1 线性关系考察 分别取 2、4、6、8、10 μL 3 种标准品溶液进样,以标准品含量(x)对相应峰面积积分值(y)进行回归,得回归方程和线性范围。

莫诺昔: $y = 2.08 \times 10^6 x + 1.35 \times 10^4$, $r = 0.9997$, 线性范围 0.4~2.02 μg。

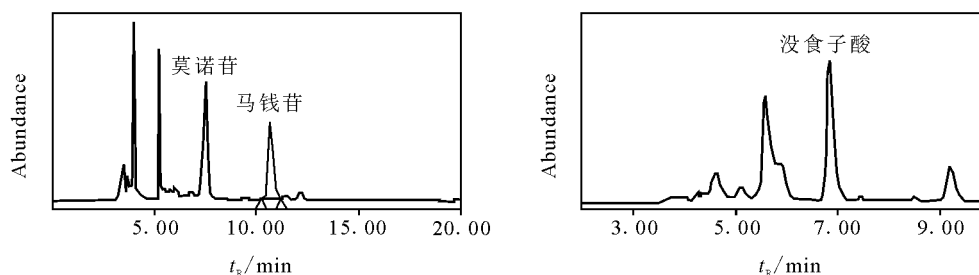


图 1 山茱萸与熟地共煎液样品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the decoction of *Fructus Corni* with *Radix Rehmanniae Preparata*

马钱昔: $y = 4.25 \times 10^6 x + 3.36 \times 10^4$, $r = 0.9996$, 线性范围 $0.52 \sim 2.60 \mu\text{g}$ 。

没食子酸: $y = 5.84 \times 10^6 x + 2.36 \times 10^4$, $r = 0.9999$, 线性范围 $0.112 \sim 0.56 \mu\text{g}$ 。

1.4.2 精密度实验 取同一份样品液, 连续进样 5 次, 3 个色谱峰保留时间 RSD 分别为 0.15%、0.14%、0.18%, 峰面积 RSD 分别为 0.25%、0.23%、0.28%。

1.4.3 稳定性实验 取同一份样品液, 每隔 4 h 进样 1 次, 共测定 5 次, 3 个色谱峰保留时间 RSD 分别为 0.52%、0.46%、0.58%, 峰面积 RSD 分别为 0.84%、0.94%、1.07%。

1.4.4 重现性实验 将山茱萸和熟地单煎液按质量比 4:8 合并, 得到 5 份单煎合并液。分别按 1.3 方法进样分析, 3 个色谱峰保留时间 RSD 分别为 1.58%、1.25%、1.97%, 峰面积 RSD 分别为 1.92%、1.80%、1.61%。

1.4.5 加标回收率实验 精密称取 5 份适量样品, 分别加入一定量的莫诺昔、马钱昔和没食子酸标准品, 按样品分析方法进行处理, 并各平行测定 2 次。3 种成分的平均加标回收率分别为

99.98%、100.57%、100.24%, RSD 分别为 2.84%、2.36%、2.74%。

2 结果与分析

2.1 协同溶出效应

山茱萸和熟地单煎、合煎前后质量变化及溶出率, 列于表 1, 数据均为 3 次重复实验的平均值, 相对标准偏差 ($n=3$) 在 0.7%~3.0% 之间。可以看出: 对山茱萸而言, 山茱萸单煎时其溶出率为 67.61%, 山茱萸与熟地配伍时, 除过大质量比 (4:12) 外, 合煎后山茱萸的溶出率都比单煎时增加, 但随着熟地比例的增加, 山茱萸溶出率呈线性下降, 合煎质量比为 4:8 时, 与单煎的溶出率相近; 对熟地而言, 合煎比例较小时, 合煎后熟地的溶出率比单煎时增加, 合煎比例过大时, 则反之。分析原因可能是, 熟地中含有大量寡糖, 合煎比例过高后煎液粘度过大, 抑制了溶出程度。溶出实验结果表明, 在一定质量比例内 ($m(\text{山茱萸}) : m(\text{熟地}) \leq 4:8$), 山茱萸与熟地可相互促进组分在水中的溶出, 有相互协同溶出的效应, 说明山茱萸和熟地间存在相互作用。

表 1 山茱萸与熟地溶出率结果
Table 1 Result of dissolving percentage

		$m(\text{山茱萸}) : m(\text{熟地})$						
		4:0	0:4	4:1	4:2	4:4	4:8	4:12
煎前质量/g	山茱萸	12.0015	—	3.9999	4.0015	3.9996	3.9999	4.0008
	熟地	—	5.9996	0.9998	2.0021	4.0008	8.0018	12.0039
煎后质量/g	山茱萸	3.8868	—	1.1200	1.1633	1.2887	1.2941	1.5755
	熟地	—	1.4184	0.1372	0.3778	0.8287	2.0331	4.1552
溶出率/%	山茱萸	67.61	—	72.00	70.93	67.78	67.65	60.62
	熟地	—	76.36	86.28	81.13	79.29	74.59	65.38

2.2 样品含量测定

按 1.3 方法操作,进样 10 μL ,测定山茱萸与熟地不同配伍比例各样品中莫诺昔、马钱昔和没食子酸的含量,结果列于表 2。从表 2 可知,熟地中不含有这 3 种组分,测定结果数据均来源于山茱萸中成分。山茱萸中这 3 种组分的百分含量和配伍比例之间的关系示于图 2。从表 2 和图 2 可以看出:1)合煎液山茱萸中莫诺昔和马钱昔组分的百分含量随熟地配伍比例的增加呈线性增大,但均低于山茱萸单煎液;没食子酸含量变化趋势则相反,合煎液山茱萸中没食子酸组分的百分含量随熟地配伍比例的增加呈线性下降,但均高于山茱萸单煎液;2)按经典配伍比例配制的 $m(\text{山茱萸}):m(\text{熟地})=4:8$ 单煎合并溶液中,莫诺昔、马钱昔的含量低于同样质量比例的合煎液,没食子酸的含量高于同样质量比例的合煎液,这与这 3 种组分百分含量在不同配伍比例时的变化趋势吻合。这两点均表明,熟地对山茱萸中各有效组分的溶出均有较大影响。采用先对单味药材进行煎煮,然后对单煎液进行配伍的思路,可以消除药材共煎过程中山茱萸组分和熟地组分之间的相互作用。对比结果说明,熟地对山茱萸组分的影响不仅仅在煎煮过程中进行,常温下也可以进行。在实验过程中,未发现合煎液或者单煎合并液出现沉淀。从化学成分角度考虑,组分含量的变化可能是因为熟地中的主要成分为寡糖和环烯醚萜苷类,熟地中某种成分促进了没食子酸的溶出,而熟地中的环烯醚萜苷类成分与山茱萸中环烯醚萜类——莫诺昔和马钱昔存在溶出竞争,引起莫诺昔和马钱昔溶解度下降,或者部分形成新的化合物而减少了莫诺昔和马钱昔的含量检出。

表 2 各样品中莫诺昔、
马钱昔和没食子酸的质量百分含量
Table 2 Percentage of Morroniside,
Loganin and Gallic acid in samples

$m(\text{山茱萸}):m(\text{熟地})$	莫诺昔	马钱昔	没食子酸
0:4	0	0	0
4:0	1.068	0.473	0.078 5
4:1	0.568	0.282	0.194
4:2	0.679	0.298	0.171
4:4	0.701	0.340	0.140
4:8	0.724	0.386	0.135
4:12	0.790	0.453	0.134
单煎合并(质量比 4:8)	0.607	0.244	0.157

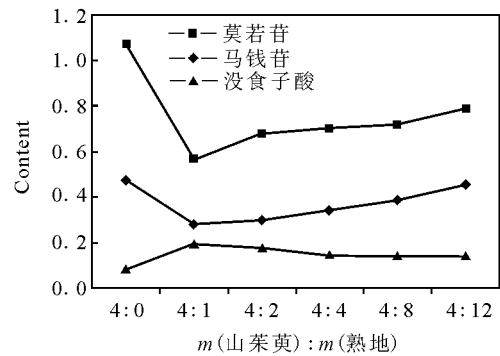


图 2 3 种组分的配伍比例与百分含量之间的变化趋势
Fig. 2 Variations of fractional contents of Morroniside,
Loganin and Gallic acid at different proportions

2.3 电喷雾质谱分析

电喷雾质谱仪采用电喷雾电离(ESI),属于软电离质谱技术,通常不形成碎片离子,只形成分子离子峰,因此可以认为,采用电喷雾质谱一级全扫描得到的谱图中的各峰反映了样品中的不同组分。山茱萸单煎液样品(a)、熟地单煎液样品(b)、经典配伍比例 4:8 的合煎液样品(c)和 4:8 单煎合并溶液样品(d)负离子模式下的电喷雾一级全扫描图示于图 3。比较各质谱图中分子离子峰的质荷比和相对峰强度,并对山茱萸中已知的化合物进行归属,结果列于表 3。可以看出:1)除了 m/z 837 的峰,其它在山茱萸单煎液中可以检测到的质谱峰,在合煎液和单煎合并液中都可以检测到;而部分在熟地单煎液中可以检测到的质谱峰,未在合煎液或者单煎合并液中出现。2)在合煎液中出现了在单煎液中找不到的 m/z 623、879 和 1418 峰,在单煎合并液中找到了在单煎液中未曾出现的 m/z 1143 和 1305 峰。这些结果表明,定性分析山茱萸与熟地配伍时,山茱萸中化学成分受到的影响较小,而熟地化学成分受到了更多的影响,二药的相互作用使得原本在单煎过程中可以很好地溶出组分在合煎和单煎合并过程中不再溶出,煎出液中产生了新的物质,并且在合煎液和单煎合并液中发生了不同的化学反应。

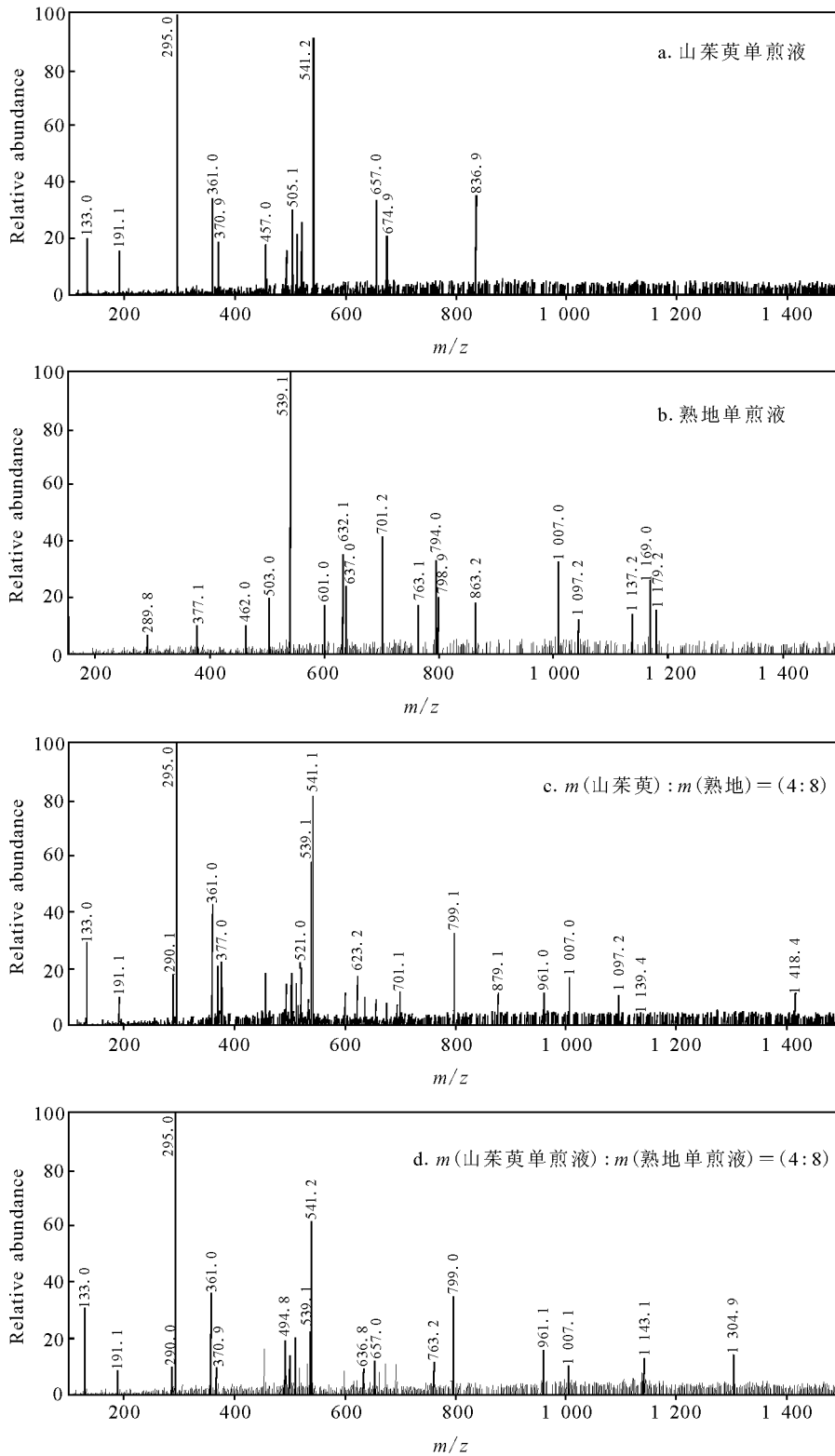


图 3 典型样品的电喷雾负离子全扫描质谱图

Fig. 3 ESI full mass spectra of typical samples in the negative ion mode

表 3 典型样品的质谱数据

Table 3 ESI full mass spectral data of typical samples in the negative ion mode

山茱萸单煎液	熟地单煎液	$m(\text{山茱萸}) : m(\text{熟地})$ = 4 : 8 共煎液.	山茱萸熟地 单煎合并液(4 : 8)	鉴定
133 (19)		133 (29)	133 (30)	Malic acid
191 (15)		191 (10)	191 (8)	Citric acid
	290 (6)	290 (18)	290 (10)	
295 (100)		295 (100)	295 (100)	
361 (34)		361 (42)	361 (36)	7- <i>O</i> -Galloyl- <i>D</i> -sedoheptulose
371 (19)		371 (20)	371 (9)	
	377 (10)	377 (22)	377 (6)	
		379 (13)	379 (7)	
457 (16)		457 (18)	457 (16)	Trihydroxyolean-12-ene
	462 (9)			
495 (15)		495 (14)	495 (19)	
	503 (19)	503 (14)	503 (14)	
505 (30)		505 (18)	505 (10)	
513 (21)		513 (14)	513 (20)	1,7-Di- <i>O</i> -Galloyl- <i>D</i> -glucose
521 (25)		521 (20)	521 (9)	
	539 (100)	539 (57)	539 (23)	
541 (90)		541 (80)	541 (61)	Cornuside I
	601 (17)	601 (11)	601 (8)	
		623 (17)		
	632 (35)			
	637 (24)	637 (10)	637 (9)	
657 (33)		657 (8)	657 (12)	
675 (21)		675 (7)	675 (11)	
	701 (41)	701 (12)	701 (9)	
	763 (17)		763 (11)	
	794 (33)			
	799 (20)	799 (32)	799 (34)	
837 (35)				
	863 (18)			
		879 (11)		
		961 (11)	961 (16)	
	1 007 (32)	1 007 (16)	1 007 (10)	
	1 097 (13)	1 097 (10)	1 097 (5)	
	1 137 (14)			
	1 139 (11)	1 139 (16)	1 139 (8)	
			1 143 (13)	
	1 169 (24)			
	1 179 (15)			
			1 305 (14)	
		1 418 (11)		

3 小结

采用先对单味药材进行煎煮,然后对单煎液进行配伍的思路可以消除药材共煎过程中山茱萸组分和熟地组分之间的相互作用。按经典配伍比例配制的山茱萸熟地 4:8 单煎合溶液中,莫诺昔、马钱昔的含量低于 4:8 合煎液,没食子酸的含量高于同比例合煎液,这与该 3 种组分百分含量在不同配伍比例时的变化趋势吻合,说明熟地组分对山茱萸组分的影响在常温下也可以进行。

本研究通过山茱萸与熟地单煎、合煎溶出率的比较,发现山茱萸与熟地有协同溶出效应;通过 HPLC 法检测不同方式、不同比例的配伍溶液中山茱萸有效成分——莫诺昔、马钱昔和没食子酸的含量,发现这 3 种有效成分的含量随着熟地配伍比例的增加均呈现线性变化规律;通过 ESI-MS 法观察各配伍溶液的质谱行为,发现山茱萸与熟地之间的作用不仅可以产生单煎液中不存在的新物质,还可以抑制熟地中部分组分的溶出。在二药的共煎与单煎合并过程中,发生了不同的反应,产生了不同的新物质。熟地对山茱萸的作用不受煎煮过程和温度的影响。中药配伍过程中变化的方法为深入研究中药作用机理、

加速中药现代化提供了一条新的思路。

参考文献:

- [1] 赵友仁. 山茱萸的本草考证[J]. 中药材, 1987, (5): 51-54.
- [2] 戴岳, 杭秉茜, 黄朝林, 等. 山茱萸对小鼠免疫系统的影响[J]. 中国药科大学学报, 1990, 21(4): 226-228.
- [3] 付桂香, 李建民, 周勇, 等. 山茱萸总苷抗炎免疫抑制作用及其机理的大鼠实验研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(4): 316-320.
- [4] 赵武述, 张玉琴, 占志农, 等. 山茱萸总甙的免疫药理研究 II: 总甙部分抑制免疫反应的体外效应[J]. 中日友好医院学报, 1991, 5(2): 71-75.
- [5] SAKAGAMI H, SATOH K. Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and Gallic acid[J]. Anticancer Res, 1997, 17(1A): 221-224.
- [6] NIHO N, SHIBUTANI M, TAMURA T, et al. Subchronic toxicity study of Gallic acid by oral administration in F344 rats [J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39 (11): 1 063-1 070.
- [7] 杨敏. 中药药对治疗糖尿病肾病临证撷菁[J]. 辽宁中医杂志, 2006, 33(4): 462-463.

2012 年第四届世界华人质谱研讨会的通知

第四届世界华人质谱研讨会将于 2012 年 6 月 28 日~7 月 1 日在台湾台南成功大学医学院举行。会议主题包括以下领域:

1. Fundamental; 2. Instrumentation (Ionization, hyphenate, interface...); 3. Imaging MS; 4. Inorganic MS; 5. Environmental MS; 6. Pharmaceutical and Biosimilars; 7. Food Safety and Forensic Science; 8. Proteomics and Glycomics; 9. Metabolomics; 10. Clinical and Medical MS; 11. MS for sustainable Topics (biofuel, energy...); 12. Others.

有意参加本次会议的代表请自行到会议网站 <http://www.tsms.org.tw> 注册报名,并将报名信息抄送到质谱学会秘书处。

中国物理学会质谱分会秘书处