

丹参-赤芍配伍的化学成分动态变化研究*

□黄浩** 周琳 姜标

(中国科学院上海有机化学研究所现代合成化学研究室 上海 200032)

摘要:选择丹参、赤芍药对为研究对象,以 HPLC 等色谱为研究工具,研究了不同比例配伍的丹参-赤芍共煎液与单煎混合液化学成分的异同,重点关注因两味药共煎煮而产生的化学成分动态变化现象,并运用现代科技手段分离和鉴定了变化明显的化学成分,总结了化学成分动态变化与药材配伍不同比例之间的关系。

关键词:丹参 赤芍 共煎液 单煎混合液 化学成分 动态变化

运用现代科技阐明中药物质基础和作用机制是中药现代化的瓶颈问题。突破这两个问题将有助于从根本上促进中药实质意义上的现代化和国际化^[1-3]。近年来,国内外非常重视中药复方的作用原理。中药的应用形式多为复方,其有效性是经过数千年的临床实践和上亿人次的临床运用所证明的。数以万计的有效复方是开发新药的巨大资源,从中开发新药具有命中率高、花费少、周期短等优势。现代药效学的微量模型与分析化学微量检测手段的发展为中药复方研究提供了可能。中药复方的药效物质基础一旦被搞清,就完全可以建立科学合理的质量控制方法和标准,运用科学术语阐明其作用和用途,并由此开发出可与西药媲美的现代剂型,减少剂量,增强药效。更重要的是可获得专利等知识产权保护,

从而产生巨大经济效益。中药现代化的目标是使人类及时用上安全性更高,疗效更好,质量更稳定,使用更方便的中药。具体而言,未来现代化中药产品必须通过有关“安全,有效,稳定”的各项检测指标。基本讲清中药的化学成分,基本讲清药效和其作用机制是实现上述目标的基础。不论中药单方还是复方药,其临床疗效都是通过方中的活性成分或活性成分群来发挥作用的,而复方在多药共煎煮过程中发生的化学成分变化及其与方中单味药物质基础简单相加的不同之处必然与复方疗效优于单味药的事实有着内在本质的关联^[4-6]。从此着手研究复方,抓住其中增效物质基础这一主要矛盾,当是中药复方现代化研究的一条有效途径。但中药大复方药味过多,相互作用过于复杂,在诸多基础研究尚不充分时即开展中药大复方的研究可能陷入物质基础、作用机制均说不清的两难境地。我们认为从具有确切疗效

收稿日期:2005-04-27

修回日期:2005-05-25

* 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(CIAC-12-16):组分库的化学构建和 NMR 筛选,负责人:姜标

** 联系人:黄浩,副研究员,研究方向:天然产物研究,Tel:021-54925183,E-mail:huangh2003@mail.sioc.ac.cn

18 [World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

的中药对药方入手,揭示两味药复配后疗效优于单味药的本质原因,运用现代科技证明其组合配伍规律和相互作用机制,是中药复方现代化研究的最佳切入点之一^[7~8]。

所谓对药方,是专指由两味中药组成的方剂,也是可以单独使用的方剂。对药方是中药复方最简单、最基本的形式。对药方是多味复方的组方基础。配伍是中医方剂的核心问题,历代的对药方涵盖了中药复方配伍的各种基本形式,如君臣、反佐、相须、相使、阴阳、寒热、补泻、散敛、升降、开合、刚柔、润燥、动静等^[9]。对药方为更为复杂的方剂配伍提供了最基本、最简洁、最明确、最可靠的依据。从对药方角度探究中药复方疗效优于单味药的本质原因,阐明在复方中化学成分量和质的变化,包括由多个药材相互作用产生的新活性有效物质^[10],对复方中药作用原理的揭示和新药的开发都有不可低估的价值。

本研究选择丹参-赤芍药对,选择依据如下:丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是活血化瘀的要药,常用于妇科病、冠心病、缺血性中风、动脉粥样硬化、肝炎、肝硬化等症的治疗。赤芍是毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)的干燥根,归肝经,具有清热凉血,散瘀止痛的功能;主要用于温毒发斑、吐血、目赤肿痛、肝郁胁痛,经闭痛经等症^[11]。两药相须、相使为伍见诸许多方剂,如:精致冠心病片、丹参散(太平圣惠方)、丹参膏(刘涓子鬼遗方)、活血降红汤(中国中医秘方大全)、丹参饮、赤槐丸、赤芍退黄汤等方剂中^[12]。此外,两药伍用成为对药方用于治疗肝损伤、外用止痛也有良好的效果^[13~14]。

一、实验部分

1. 材料

丹参是唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)的干燥根;所购赤芍药材系毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall)的干燥根(购自上海城隍庙童涵春堂药店)。由上海复旦大学竺叶青教授鉴定。

色谱分析用乙腈、三氟乙酸(色谱纯,美国TE-DIA公司);水(HPLC溶剂用水)SPARKLING蒸馏

水;超纯水由MilliQ制得。

2. 样品制备

丹参-赤芍合煎液:按照其在方剂配伍中的比例混合后在砂锅中经浸渍(30min)、煎煮(头煎30min、二煎20min),合并煎液浓缩至1g/2ml,然后取100 μ l稀释至1ml离心10min(12000rpm/s),取上清液待用。

丹参单煎液:称取丹参药材20g,处理方法同上。

赤芍单煎液:称取赤芍药材20g,处理方法同上。

丹参-赤芍单煎混合液:按照该药对在方剂配伍中的比例混合,取100 μ l稀释至1ml离心10分钟(12000rpm/s),取上清液待用。

3. 色谱分离

Varian Model SD-1 Ser. No. 05283 05281 高效液相系统(Varian Model 320 Ser. No. 01546 紫外检测器、四元梯度泵、自动进样器),德国默克LiChrospher RP-18e 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m);流动相为乙腈(A)-0.1%TFA水溶液(B);A由5%(V:V)保持15min,15~50 min线性升到100%(V:V),梯度结束平衡30 min后进入下一个样品分析;流速为1.0ml/min;进样量为20 μ l;检测波长:254nm、325nm、214nm。

4. 不同波长比较

为选择最优化HPLC分析条件,我们分别选用214、254和325nm的检测波长,对不同提取液进行指纹图谱的直观比较,结果发现254、325nm检测波长所得图谱分离较好(图1)。因此,对于丹参、赤芍药对我们也选择在254、325nm检测波长进行HPLC分析。

二、结果和讨论

1. 合煎液与单煎混合液的HPLC比较

本文重点研究了丹参、赤芍配伍前后化学成分的同异,发现两药共煎煮导致某些化学成份产生明显的量变,这种变化在两药分别煎煮,再按配伍比例混合的单煎混合液中未见发生,表明共煎煮是导

致化学成分发生明显变化（下称化学成分动态变化）的原因。我们选择了丹参 - 赤芍配伍的 5 种比例为：3: 2、1: 1、1: 4、3: 4 和 2: 1。结果表明，在选用的 HPLC 分析条件下，不同比例配伍的丹参 - 赤芍合煎

液与单煎混合液相比，有明显的化学成分动态变化（表 1）。

以两药比例 3: 2 为例：合煎液经乙酸乙酯萃取、HPLC 分析，发现合煎液在 254nm 保留时间约为

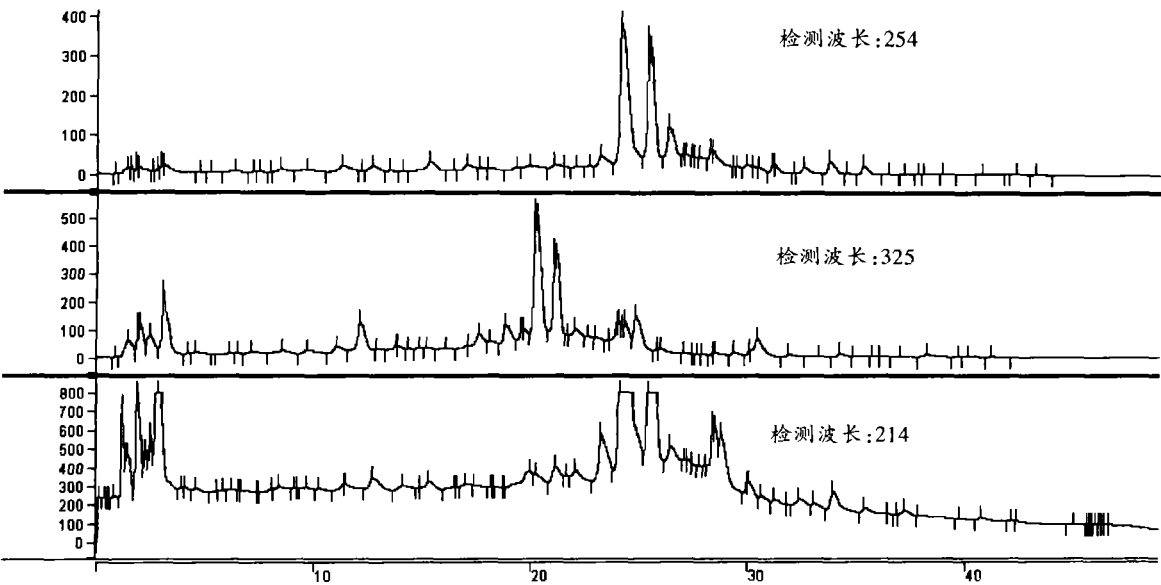


图 1 不同检测波长下相同中药水煎液的 HPLC 指纹图谱

表 1 丹参 - 赤芍不同比例共煎煮前后化学成分量变结果

比例	λ (nm)	保留时间 (min)	单煎混合液 (面积百分比%)	合煎液 (面积百分比%)	差值 (%)
1: 1	254	15	5. 98	10. 66	4. 68
	325	20	35. 5	40. 31	4. 81
1: 4	254	15	15. 24	12. 52	- 2. 72
	325	20	23. 5	26. 88	3. 38
2: 1	254	15	3. 96	6. 69	2. 73
	325				
3: 2	254	20	17. 56	28. 99	11. 43
	325	20	34. 96	56. 58	21. 62
3: 4	254	15	14. 69	17. 27	2. 58
		20	7. 21	10. 49	3. 28
	325	20	29. 39	35	5. 61

20min 时其峰面积占全谱的 28.99%，而单混液中，该峰对应化学成分的峰面积仅为 17.56%，所以合煎液中保留时间约为 20min 的峰所对应的化学成分在共煎煮过程中产生了明显的量的变化(见图 2)。两药配伍比例不同时该峰对应化学成分的动态变化也随之不同,其规律见表 2。

不难看出，保留时间在 20min 的化学成分含量与丹参 - 赤芍用量比例相关，增加的数量依次为以下比例为：3: 2> 3: 4> 1: 1> 1: 4。表明两药用量比为 3: 2 时该峰的溶出量最大。

化学成分含量发生共煎煮动态变化的还有

HPLC 谱图上保留时间为 15min 所对应的峰。其含量变化随两药比例而变化的规律见表 2。

保留时间在 15min 的成分溶出量与丹参 - 赤芍的用量比例密切相关，增加量的多少与药对比例间关系：1: 1> 2: 1> 3: 4> 1: 4。表明当丹参 - 赤芍用量相等时该峰的溶出率最大。

2. 化学分离和结构鉴定

对保留时间在 20min 和 15min 对应的化学成分分离纯化。首先结合柱层析,以及 HPLC 制备,我们对保留时间在 20min 的峰进行了化学成分分离和鉴定研究。经多次硅胶柱层析、HPLC 制备分离得一单体

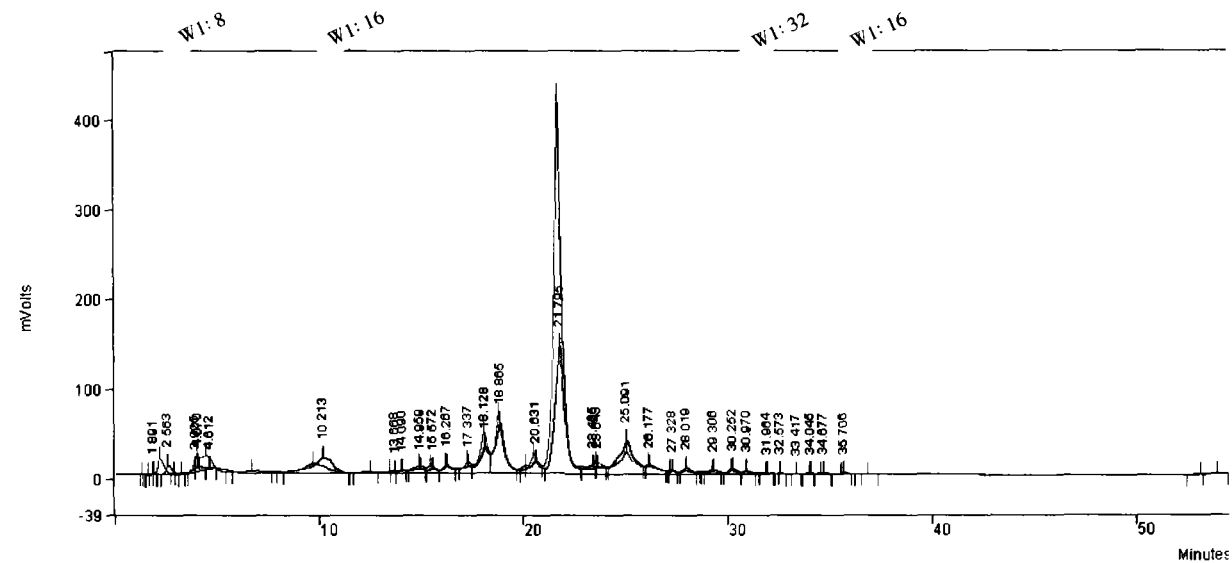


图 2 丹参 - 赤芍 (3: 2) 药对 HPLC 分析谱图 (254nm)

表 2 保留时间 15min、20min 峰所对应成分共煎煮前后的变化规律 (%)

丹参 - 赤芍比例	254nm		325nm
	15min	20min	20min
1: 1	(+) 4.68		(+) 4.81
2: 1	(+) 2.73		
3: 2		(+) 11.43	(+) 21.62
3: 4	(+) 2.58	(+) 3.28	(+) 5.61
1: 4	(-) 2.72		(+) 3.38

化合物，经 LC - MS、NMR 测试，并与标准品波谱数据比对鉴定该化合物为丹酚酸 B(salvianolic acid B)^[15]。以 HPLC 分析结合硅胶柱层析及制备 TLC,并经 NMR、EI - MS 以及与标准物波谱数据对照，鉴定出对应于保留时间 15min 的成分为苯甲酸^[16]。

三、讨 论

运用 HPLC，结合化学分离手段较细致地研究了丹参 - 赤芍药对不同比例在共煎煮前后化学成分和量的变化情况。在不同比例的丹参 - 赤芍合煎

液中没有发现新成分的产生。但发现化学成分含量的变化较为普遍和明显。两药配伍后,合煎液与单煎混合液相比,其 HPLC 谱图中大部分峰的峰高变化不明显,而峰高发生显著变化的峰分别是对应于保留时间为 15min 和 20min 的两个峰。我们利用柱层析、制备 TLC 等分离纯化,并鉴定了两个化合物分别为苯甲酸和丹酚酸 B。试验结果表明中药配伍后的化学成分不同于单味药化学成分简单加和,而是在配伍后共煎煮过程中发生了化学成分的变化,各成分间由此产生不同于单味药化学成分简单加和的相互比例和各自的浓度范围。在此基础上,对包含丹参-赤芍药对的更深入的复方化学成分研究,有可能从本质上阐明复方作用的物质基础,进而探示中药方剂配伍的科学内涵。

参考文献

- 1 罗国安,王义明,饶毅. 中药中成药现代化进程. 中成药,2000, 22 (1):71.
 - 2 甘师俊,李振吉,邹健强. 中药现代化发展战略[M]. 北京:科学技术文献出版社,1998: 36.
 - 3 胡之璧. 中药研究与开发综述[M]. 北京:科学出版社,2000:45.
 - 4 赵建荣,李晓玫. 中药复方物质基础研究的现状与进展. 中草药, 2003,34(11):963~966, 1010.
 - 5 梁国刚. 中药复方化学研究方法的探讨. 中国中药杂志,1999, 24 (2):67~69.
 - 6 吴迪,刘法锦,廖彩霞. 中药配伍对化学成分的影响. 中成药, 2003, 25(2):153~155.
 - 7 苗明三,王智民. 对药的化学药理与临床[M]. 北京:军事医学科学出版社,2002.
 - 8 胥庆华. 中药药对大全[M]. 北京:中国中医药出版社,2001.
 - 9 耿建国,王代娣.《伤寒论》药对配伍规律与特点. 江苏中医,2000, 21(9):6~7.
 - 10 朱丹妮,李志明,严永清,等. 生脉散复方化学动态变化与药效关系的研究一生脉散复方化学的研究(II). 中国中药杂志,1998, 23 (5):291~293.
 - 11 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典 1995 年版 [M]. 62, 142.
 - 12 中药辞海编辑委员会. 中药辞海[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000. Vol 1: 37~42;Vol 1:1204~1219.
 - 13 戚心广. 丹参、赤芍对实验性肝损伤肝细胞保护作用的机理研究. 中西医结合杂志,1991, 11(2):102~104.
 - 14 覃桂成,刘小红,邓秋媚,等. 丹参赤芍酒精浸液外敷消除静滴甘露醇引起疼痛的护理与体会. 现代护理,2002, 8(1):60.
 - 15 Li-Min Zhao, Xiao-Tian Liang and Lian-Niang Li. Prionitides A and B, two phenolic glycosides from *Salvia prionitis*. Phytochemistry, 2003, 42(3): 899~901.
 - 16 金昌东,徐国钧,金蓉鸾,等. 反相 HPLC 法测定 13 种芍药根中甙类和苯甲酸的含量. 中国药科大学学报,1989, 20(3): 139~142.
- (责任编辑:刘维杰)

(上接第 17 页)

- 9 Zubieta JK, Heitzeg MM, COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. Science. 2003 Feb 21; 299 (5610): 1240~1243.
- 10 Shulman R, Griffiths J. Catechol-O-methyl transferase activity in patients with depressive illness and anxiety states. Br J Psychiatry. 1978 Feb; 132: 133~138.
- 11 Mathew RJ, Ho BT. Catechol-O-methyltransferase and catecholamines in anxiety and relaxation. Psychiatry Res. 1980 Sep; 3(1): 85~91.
- 12 Korutla L, Neustadter JH, et. al. NAC-1, a POZ/BTB protein present in the adult mammalian brain, triggers apoptosis after adenovirus-mediated overexpression in PC-12 cells. Neurosci Res. 2003 May; 46 (1): 33~39.
- 13 Kalivas PW, Duffy P, et. al. Interrupted expression of NAC-1 augments the behavioral responses to cocaine. Synapse. 1999 Aug; 33 (2): 153~159.
- 14 Mackler SA, Korutla L, et. al. NAC-1 is a brain POZ/BTB protein that can prevent cocaine-induced sensitization in the rat. J Neurosci. 2000 Aug 15; 20(16): 6210~6217.
- 15 Jiang H, Xie T, et. al. Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol. Neuropharmacology. 2003 Dec; 45 (7): 1011~1018.
- 16 Umehara T, Horikoshi M. Transcription initiation factor HD-1: interactive histone chaperone CIA-II implicated in mammalian spermatogenesis. J Biol Chem. 2003 Sep 12; 278(37): 35660~35667. Epub 2003 Jul 02.
- 17 Lee YC, Komatsu K, et. al. Structural and functional characterization of estrogen sulfotransferase isoforms: distinct catalytic and high affinity binding activities. Mol Endocrinol. 1994 Dec; 8(12): 1627~1635.
- 18 Falany JL, Krasnykh V. Isolation and expression of an isoform of rat estrogen sulfotransferase. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995 Jan; 52 (1): 35~44.

(责任编辑:许有玲)

tissues are conducted step by step. 2 – dimensional electrophoresis and silver staining are made after the quantitiveness of protein and the spectra of protein obtained is analyzed by the 2 – DE software for image analysis. More than 30 proteins with differential expression have been identified by the method of MALDI – TOF – MS. Result (1) Rats with liver fibrosis due to the injection of CCl₄ assume the general reflection of their biological activities, such as the decrease in weight and activity; (2) There exists disturbance of protein synthesis and the metabolism of matters in the process of liver fibrosis; (3) The result of mass spectra due to the change of proteome shows that proteins related to the metabolism of matters, such as perchloric acid soluble protein, phosphatidylinositol transfer protein, phosphoglycerate kinase and ER – 60 protease and protein molecules related to neuroendocrine, such as catechol – O – methyltransferase, estrogen sulfotransferase isoform 6, transcription initiation factor TFIID 28 KD2 subunit and NAC – 1 protein are identified in the differentially expressed proteins of the liver tissues of the rats with liver fibrosis and the normal ones. Conclusion Protein molecules constitute the material foundation on which liver links to the functions and pathology of other viscera. Liver fibrosis represents a process of generally pathological change which refers to multiple functions. The material foundation which brings about the change of the whole functions of organs, however, is protein molecules.

Key Words: liver fibrosis, display of protein differentiation, relationship between the five internal organs, physiological and pathological relations

Study on Dynamic Change of Chemical Components

Salvia miltiorrhiza Bunge and *Paeonia lactiflora* Pall in Their Compatibility of

Huang Hao, Zhou Lin and Jiang Biao

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

This article presents the study by means of HPLC of the change of chemical components of both the decoctions made by *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Peoria lactiflora* Pall together at different rate of the two medicinal herbs and those mixed by the liquids prepared by the two respectively, emphasizing the dynamic change of chemical components of the decoctions, which occurs from the co – decoction of the two medicinal herbs, isolating and identifying the chemical components with noted changes by modern scientific and technical ways and means and summarizing the relationship between the dynamic change of chemical components of the decoctions and the rate of compatibility of different medicinal materials.

Key Words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *Paeonia lactiflora* Pall, co – decoction, a decoction mixed by decoctions made of different medicinal materials respectively, chemical component, dynamic change

Study of Correlationship between Calcium Antagonism and Protection of Optic Nerves in Traditional Chinese Medicine

Zhang Yi, Meng Xianli, Sheng Yanmei (Chengdu Institute of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610083)

Long Yi, Zhang Jing and Duan Junguo

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610083)