

## 基于多组分分析的百合地黄汤古、今组方化学成分差异性研究\*

贾福康<sup>1</sup>, 冯健辉<sup>1</sup>, 王碧莹<sup>1</sup>, 刘荣崴<sup>1</sup>, 陈随清<sup>1,2,3</sup>, 付钰<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 河南中医药大学 药学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学 豫药全产业链研发河南省协同创新中心, 郑州 450046;

3. 河南中医药大学 呼吸病协同创新中心, 郑州 450046)

**摘要** 目的: 采用多组分分析法研究百合地黄汤古代与现代临床组方化学成分差异。方法: 采用蒽酮-硫酸-紫外分光光度计法在 580 nm 紫外光下对百合地黄汤多糖提取液进行测定。采用高效液相色谱串联电喷雾检测器(UPLC-CAD), 使用 Agilent Infinity Lab Poroshell 120 HILIC-Z(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 流动相 A 为 0.2% 氨水-乙腈, 流动相 B 为 0.2% 氨水-纯水, 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 35 °C, CAD 检测器雾化器温度 70 °C, 分别对百合地黄汤古代方和现代方中 6 个单、寡糖成分进行定量分析。采用高效液相色谱-四极杆串联飞行时间质谱(UPLC-Q TOF MS/MS) 及高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UPLC-QQQ MS), 分析百合地黄汤古代方与现代方的差异性成分, 并对 9 个差异性成分进行定量分析。结果: 百合地黄汤多糖与 6 个单寡糖及 9 个差异性成分在各自的测定范围内线性关系良好( $r > 0.999$ ), 平均加样回收率在 97.7%~104.9%, RSD ≤ 3.1%。精密度、重复性、稳定性均符合要求。结果表明百合地黄汤古代方与现代方的多糖、单寡糖含量以及 9 个差异性成分含量均具有显著性差异( $P < 0.05$ )。结论: 本实验从多种化学成分角度明确了百合地黄汤古、今组方的差异。所采用方法均准确灵敏, 稳定性和重复性好, 可为百合地黄汤的临床应用与高品质中药制剂的开发提供参考。

**关键词:** 百合地黄汤; 多糖; 单寡糖; 超高效液相色谱法; 差异性成分; 古今差异

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)09-1535-16

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0123

## Study on chemical composition difference between ancient and modern Baihe Dihuang decoction based on multi-component analysis\*

JIA Fu-kang<sup>1</sup>, FENG Jian-hui<sup>1</sup>, WANG Bi-ying<sup>1</sup>,LIU Rong-wei<sup>1</sup>, CHEN Sui-qing<sup>1,2,3</sup>, FU Yu<sup>1,2\*\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-medicine, Henan Province, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

3. Collaborative Innovation Center for Respiratory Diseases, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract Objective:** To study the difference of chemical composition between ancient and modern clinical prescriptions of Baihe Dihuang decoction by multi-component analysis. **Methods:** The polysaccharide extract of Baihe Dihuang decoction was determined by anthrone-sulfuric acid-ultraviolet spectrophotometer under 580 nm ultraviolet light. Six monosaccharides and oligosaccharides in the ancient and modern Baihe Dihuang decoction

\* 2023 年河南省青年骨干教师培养计划(2023GGJS081); 河南省高等学校重点科研项目计划(23A360002)

\*\* 通信作者 Tel: 15138671610; E-mail: fuyucpu@163.com

第一作者 Tel: 17638186173; E-mail: 1246266482@qq.com

were determined by UPLC – CAD. An Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC – Z (3.0 × 100 mm, 2.7 μm) column was used. The mobile phase was consisted of A 0.2% ammonia in acetonitrile and 0.2% ammonia in water with gradient elution. The flow rate was 0.8 mL · min<sup>-1</sup>, the column temperature 35 °C and the CAD detector nebulizer temperature was 70 °C. Data acquisition frequency was 10 Hz and the filter was 1.05 s. The injection volume was 2 μL. The non – polar components were qualitatively and quantitatively analyzed by high performance liquid – quadrupole tandem time – of – flight mass spectrometry (UPLC – Q TOF MS/MS) and high performance liquid – phase tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC – QQQ MS), respectively. The differential components of ancient and modern Baihe Dihuang Decoction were analyzed and 9 components were determined.

**Results:** The linear relationship of 6 mono – oligosaccharides/polysaccharides and 9 differential components was good ( $r > 0.999$ ). The average recoveries ranged from 97.7% to 104.9% with RSDs ≤ 3.1%. Precision, repeatability and stability met the requirements. The results showed that the contents of all the analytes in ancient and modern Baihe Dihuang decoction were significantly different ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The methods used in this experiment are accurate, sensitive, stable and reproducible, which can provide reference for the quality control and pharmacodynamic material basic research of Baihe Dihuang Decoction.

**Keywords:** Baihe Dihuang decoction; ancient and modern differences; polysaccharides; monosaccharides; UPLC; different components

百合地黄汤(BDD)源自汉代张仲景著《金贵要略·百合狐惑阴阳毒病脉证治第三》,由百合与地黄2味中药组成,有养阴清热、补益心肺的功效,是治疗百合病的主方<sup>[1]</sup>。该方历史悠久,疗效确切,沿用至今。为2018年国家中医药管理局颁布的第1批《古代经典名方目录》收录方剂。但在该方传承过程中,清代以前(古代)与现代临床应用有诸多不同。百合地黄汤在古代(汉至清代)以鲜百合和鲜地黄汁组方<sup>[2-3]</sup>,主要治疗由阴虚内热而引发的百合病<sup>[4-5]</sup>。而在现代临床中,为了方便保存药材以及保证药材质量的均一性,以干百合与生地黄组方,主要用于治疗抑郁<sup>[6]</sup>、焦虑等神经性疾病<sup>[7-8]</sup>。该方剂古代组方与现代组方在化学成分上有何差异,两者功效上是否等同,都关系到该方合理的临床应用与高水平中药制剂的研发。

百合地黄汤中地黄具有较高含量的水苏糖、梓醇与益母草苷,有多篇文献报道,水苏糖具有改善肠道菌群结构和改善脂代谢的能力<sup>[9]</sup>,梓醇与益母草苷具有神经保护作用以及抗氧化、抗衰老的活性<sup>[10]</sup>。百合以王百合苷A等酚酸甘油酯类化合物为主要的非极性小分子成分,其中王百合苷A、王百合苷C具有改善抑郁症的药效活性<sup>[12]</sup>。现阶段,虽然多数学者认为百合地黄汤古、今用法有所不同,但对古代组方与现代组方化学成分及药效的差异性分析研究鲜有报道。多数研究也只关注于百合地黄汤中的非极

性成分,对于含量较高的极性成分研究较少。本研究采用紫外分光光度仪、高效液相色谱串联电喷雾检测器(UPLC – CAD)及液质联用(UPLC – MS)仪,分别从多糖、单寡糖及非极性成分3个方面,全面阐述百合地黄汤古代方与现代方化学成分差异,以期为该方的高品质中药产品开发及临床应用提供依据。

## 1 仪器与试剂

Vanquish – F 超高效液相色谱仪联合电喷雾检测器(Thermo Fisher Scientific 公司),超高效液相色谱 – 四极杆飞行时间串联质谱仪(Agilent 公司,6546HPLC – Q – TOF – MS 系统),6475HPLC – QQQ MS 超高效液相色谱 – 三重四极杆串联质谱仪(Agilent 公司),Milli – Q 超纯水机(Millipore 公司),赛多利斯百万分之一分析天平(赛多利斯科技仪器有限公司),Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机(Eppendorf 公司),KQ – 500DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),FDU – 1200 冷冻干燥机(东京理化有限公司)。

甲醇、乙腈(MREDA 公司)、异丙醇(赛默飞世尔科技有限公司)均为质谱级;超纯水为实验室自制。

对照品D – 果糖(纯度 ≥ 98%,批号 B74571)、葡萄糖(纯度 ≥ 98%,批号 S11022)、蔗糖(纯度 ≥ 98%,批号 B21647)、蜜二糖(纯度 ≥ 98%,批号 B20866)均购自上海源叶生物科技有限公司;棉子糖

(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 E1309084)购自上海 Aladdin 公司;水苏糖(纯度 $\geq 95\%$ ,批号 GSXA-7SK4)购自中国食品药品检定研究院;梓醇(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 Z-005-180315)、地黄苷 A(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 D-083-170310)均购自北京中科质检生物有限公司;地黄苷 D(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 AF20120402)购自成都埃法科技有限公司;益母草苷(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 MUST-21121010)、王百合苷 A(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 MUST-21083118)、王百合苷 B(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 MUST-21031701)、王百合苷 C(纯度 $\geq 98\%$ ,批号

D18GB171918)、王百合苷 E(纯度 $\geq 98\%$ ,批号 D21GB172076)均购自成都曼思特生物科技有限公司。

新鲜百合、新鲜地黄、生地黄、干百合均从产地购买,经河南中医药大学中药资源与鉴定教研中心陈随清教授鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜及干燥块根,百合科植物百合 *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker 的新鲜及干燥鳞茎。根据随机数表法分别将百合地黄汤古代方、现代方中的 2 味药材随机组合及排序,分别组成 15 批样品,对应药材批次及产地如表 1、2 所示。

表 1 15 批百合地黄汤现代方药材信息

Tab. 1 Information of 15 batches of medicinal materials in modern BDD

样品批号 (sample No.)	干百合 (Lilii Bulbus)		生地 (Rehmanniae Radix)	
	批号 (No.)	来源 (source)	批号 (No.)	来源 (source)
BDD-M1	LY-11	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-1	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M2	LY-1	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	SDH-2	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M3	LY-2	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-3	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M4	LY-10	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-4	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M5	LY-9	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	SDH-5	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M6	LY-6	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	SDH-6	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M7	LY-8	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	SDH-7	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M8	LY-4	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-8	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M9	LY-11	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-9	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M10	LY-7	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-10	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M11	LY-5	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-11	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M12	LY-3	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-12	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M13	LY-11	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-13	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M14	LY-12	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-14	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD-M15	LY-13	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	SDH-15	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)

## 2 方法与结果

### 2.1 百合地黄汤现代临床用法文献研究

**2.1.1 文献来源** 万方数据库、维普数据库、中国知网所收录文献以“百合地黄汤”、“临床应用”为主题词进行检索。

**2.1.2 纳入标准** 文献为临床研究性论文,使用百合地黄汤原方或在原方基础上加味的文献,处方中各药物的剂量必须明确,百合地黄汤联合其他治疗方式的文献。

**2.1.3 排除标准** 动物实验研究类文献,百合地黄汤作为阳性对照的文献,理论研究、综述类文献,体外细胞实验研究类文献,会议论文,无药物剂量或药物剂量不明确的文献;重复文献。

**2.1.4 文献研究结果** 将以上文献库进行文献剔除,并按照纳入与排除标准对文献进行筛选,将所纳入文献按序号录入处方组成、剂量、主治病证、文献来源、文献名称等字段,对现代百合地黄汤临床应用研究共 137 篇文献进行分析,其中有 125 篇使用生干地黄与干百合配伍,对比干百合与生干地黄处方配伍不同比例与剂量的使用频次,其中生干地黄与干百合用量比例为 1:1 的频率达 40 次,在此基础上干百合与生干地黄剂量应用以 30 g 较多,频次达 13 次,如图 1 所示,同时使剂量上与《金贵要略》所载的“分温再服”保持一致,故研究采用 30 g 干生地黄与 30 g 干百合为百合地黄汤现代组方。

表 2 15 批百合地黄汤古代方药材信息

Tab. 2 Information of 15 batches of medicinal materials in ancient BDD

样品批号 (sample No.)	鲜百合 (Lilii Bulbus)		鲜地黄 (Rehmanniae Radix)	
	批号 (No.)	来源 (source)	批号 (No.)	来源 (source)
BDD - A1	XLY - 1	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 10	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A2	XLY - 4	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 4	山西临汾 (Linfen, Shanxi)
BDD - A3	XLY - 5	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 14	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A4	XLY - 9	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 2	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A5	XLY - 10	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	DH - 3	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A6	XLY - 14	江西吉安 (Ji'an, Jiangxi)	DH - 15	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A7	XLY - 1	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 17	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A8	XLY - 15	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	DH - 17	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A9	XLY - 4	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 14	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A10	XLY - 5	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 10	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A11	XLY - 9	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 15	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A12	XLY - 10	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	DH - 4	山西临汾 (Linfen, Shanxi)
BDD - A13	XLY - 14	江西吉安 (Ji'an, Jiangxi)	DH - 2	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)
BDD - A14	XLY - 15	湖南邵阳 (Shaoyang, Hunan)	DH - 4	山西临汾 (Linfen, Shanxi)
BDD - A15	XLY - 4	江西宜春 (Yichun, Jiangxi)	DH - 10	河南焦作 (Jiaozuo, Henan)

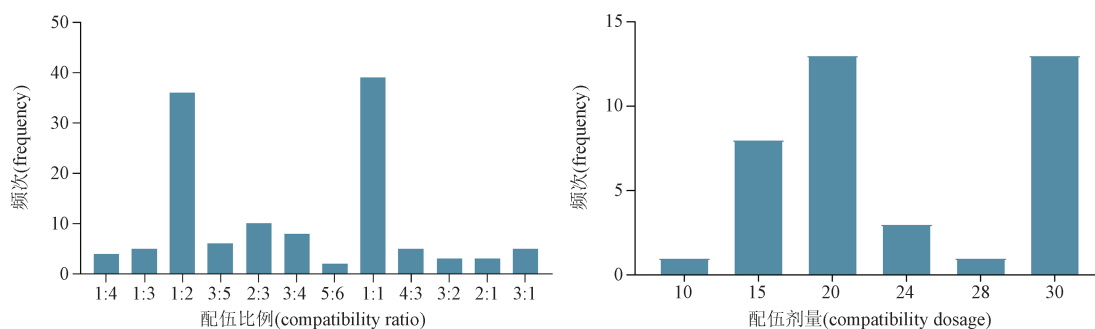


图 1 百合地黄汤现代临床应用配伍比例、剂量的使用频次

Fig. 1 Compatibility ratio and dosage of BDD in modern clinical application

## 2.2 百合地黄汤古代及现代方剂制备

**2.2.1 百合地黄汤现代方** 依照“2.1.1”项下文献考察结果,结合前期研究制备百合地黄汤现代方剂。称取生地黄 30 g,置于砂锅,加纯净水 400 mL,煮沸后继续煎煮 40 min,至煎液 200 mL,过滤,滤液以纯净水补足体积得地黄滤液,备用。另取干百合 30 g,同法煎煮,得百合滤液。百合及地黄滤液混合后,置于砂锅,煎煮至 300 mL,以 200 目滤网过滤,补足体积。冻干即得现代方(BDD - M)供试品。

**2.2.2 百合地黄汤古代方** 根据国家中医药管理局发布的第四批《古代经典名方关键信息表》与本课题组前期研究<sup>[14]</sup>,制备百合地黄汤古代方剂:取鲜百合 245 g,置于砂锅,加纯净水 400 mL,以武火煮沸改

文火煎煮至 200 mL,过滤,滤液以纯净水补足体积得百合煎液。百合煎液中加入鲜地黄汁 200 mL(鲜地黄榨汁),以武火煮沸,文火煎煮至 300 mL,趁热过 200 目滤网,收集滤液,冻干即得古代方(BDD - A)供试品。

## 2.3 百合地黄汤古、今方多糖总量的测定

**2.3.1 对照品溶液的制备** 取葡萄糖对照品适量,精密称定,以超纯水溶解,定容,稀释成含量为  $1.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液,备用。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密称定百合地黄汤古代方与现代方冻干粉各 30 mg,以超纯水定容,涡旋,超声(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,以  $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,移取上清液 1.5 mL 置于 15 mL 离

心管中,加无水乙醇 7.5 mL,涡旋,静置 2 h,8 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,弃去上清液得百合地黄汤总多糖沉淀。沉淀以超纯水溶解,定容至 10 mL,得百合地黄汤多糖溶液。精密量取多糖溶液 1 mL,用超纯水定容于 10 mL 量瓶中,即稀释至线性关系范围内,超声混匀备用。

**2.3.3 多糖测定方法** 采用蒽酮-硫酸法进行多糖含量测定。取待测溶液 1 mL 于棕色具塞试管中,加入 0.2% 蒽酮-硫酸溶液 4 mL,充分震荡混匀,沸水浴 20 min,冰水浴 10 min 后在紫外分光光度计 580 nm 波长下测定吸收度,代入标准曲线,计算各供试品多糖含量。

**2.3.4 多糖测定方法学考察** 线性关系及范围:取 2.3.1 项对照品溶液适量,用超纯水分别稀释为 0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的线性对照品溶液,按“2.3.3”项方法测定吸收度,以吸收度  $Y$  为纵坐标,以质量浓度  $X$  为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程:

$$Y = 8.882X - 0.0865 \quad r = 0.9990$$

质量浓度在 0.03 ~ 0.09  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  与吸收度呈线性关系。

精密度、重复性、加样回收率考察:按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液,精密量取 BDD-M2 多糖供试品溶液 1 mL,依照“2.3.3”项方法平行测定 6 次,结果峰面积的 RSD 为 1.1%,精密度良好;按照“2.3.2”项方法制备 6 份供试品溶液,依照“2.3.3”项方法测定吸收度计算含量并计算 RSD,得平均含量为  $(15.50 \pm 0.48)\%$ ,RSD = 3.3%,重复性良好;精密称取已知含量的百合地黄汤冻干粉,按照“2.3.2”项方法平行制备 6 份,分别加入 100% 含量的对照品溶液,按照“2.3.3”项方法进行测定,计算多糖的平均加样回收率为 97.7%,RSD 为 3.0%,准确度良好。

**2.3.5 多糖含量测定结果** 按照“2.3.2”项下的方法分别制备百合地黄汤古代方与现代方待测供试品溶液,按照“2.3.3”项的多糖测定方法对其进行测定。采用标准曲线法进行计算,结果如图 2 所示,15 批现代方多糖含量为 3.2% ~ 19.6%,平均值为  $(8.79 \pm 5.22)\%$ ,组内差异较大。而古代方多糖含量为 2.6% ~ 6.1%,平均值为  $(4.5 \pm 1.13)\%$ ,明显低于现代方多糖含量,说明百合地黄汤古、今用法中多糖组分差异较大。

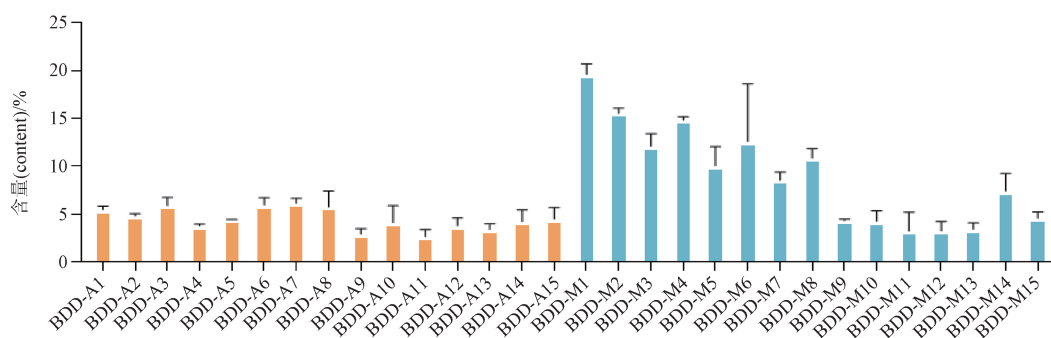


图 2 百合地黄汤古代方与现代方多糖含量测定结果

Fig. 2 Determination of polysaccharide content in BDD-A and BDD-M

## 2.4 百合地黄汤古、今方单、寡糖含量的测定

**2.4.1 对照品溶液的制备** 取各单、寡糖对照品适量,精密称定,使用超纯水溶解并定容,分别制成含果糖  $0.57 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、蔗糖  $5.95 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、棉子糖  $2.69 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、蜜二糖  $1.27 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘露三糖  $2.98 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、水苏糖  $10.87 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液。

**2.4.2 供试品溶液的制备** 精密称取“2.3.2”项百合地黄汤现代方与古代方冻干粉各 30 mg,分别以超

纯水定容至 2 mL 量瓶中,涡旋 3 min,超声(功率 250 W,频率 40 kHz) 15 min,13 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,经  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后备用。

**2.4.3 色谱条件** Agilent Infinity Lab Poroshell 120 HILIC-Z 色谱柱(100 mm  $\times$  3.0 mm,  $2.7 \mu\text{m}$ ),流动相 A 为 0.2% 氨水-乙腈,流动相 B 为 0.2% 氨水-纯水,梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% B; 5 ~ 45 min, 5% B  $\rightarrow$  35% B; 45 ~ 50 min, 35% B  $\rightarrow$  5% B; 50 ~ 60 min, 5% B),流量为  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温为  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,CAD 温度

为 70 °C, 滤波为 1.05 s, 数据采集频率为 10 Hz, 进样量为 2 μL。

**2.4.4 单寡糖含量测定方法学考察** 线性关系及范围: 精密称取果糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品适量, 分别制成不同浓度梯度的对

照品溶液, 按照“2.4.3”项色谱条件进样, 以对照品质量浓度  $X$  为横坐标, 峰面积  $Y$  为纵坐标, 绘制标准曲线(其中果糖和蔗糖以对照品质量浓度的对数为横坐标, 峰面积的对数为纵坐标), 绘制标准曲线, 如表 3 所示, 各成分在各自浓度范围内线性关系良好。

表 3 线性关系考察结果

Tab. 3 The results of linearity

成分(component)	回归方程(regression equation)	$r$	线性范围(linear range)/(mg · mL <sup>-1</sup> )
果糖(fructose)	$Y = 0.8849X + 1.137$	0.999 4	0.031 3 ~ 4.006
蔗糖(sucrose)	$Y = 0.7269X + 1.0838$	0.999 7	0.086 1 ~ 5.509
蜜二糖(melibiose)	$Y = 8.7726X + 0.5967$	0.999 2	0.032 2 ~ 2.064
棉子糖(raffinose)	$Y = 5.1481X + 0.1562$	0.999 9	0.077 9 ~ 4.986
甘露三糖(mannitriose)	$Y = 4.1125X - 0.2219$	0.999 4	0.078 7 ~ 5.037
水苏糖(lupeose)	$Y = 2.5151X + 0.9625$	0.999 1	0.169 ~ 10.808

**精密度考察:** 使用“2.4.1”项方法制备对照品溶液, 在“2.4.3”项色谱条件连续进样 6 次, 结果表明各成分峰面积 RSD 均小于 2.0%, 说明仪器精密度良好。

**重复性:** 使用“2.4.2”项方法制备供试品溶液 6 份, 在“2.4.3”项色谱条件连续进样, 通过峰面积计算各成分含量并计算 RSD, 结果显示各成分含量的 RSD 均小于 2.0%, 说明本实验中采用的单、寡糖含量测定方法重复性较好。

**稳定性:** 使用“2.4.2”项方法制备供试品溶液, 在“2.4.3”项色谱条件下分别于 2、4、6、8、12、24 h 进样测定, 计算得到各成分峰面积的 RSD 均小于 2.0%, 说明本实验制得供试品溶液的稳定性良好。

**加样回收率:** 精密称取 BDD - M10 样品 30 mg, 按照“2.4.2”项方法平行制备 6 份, 分别加入 100% 浓度的果糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖对照品溶液, 按照“2.4.3”项色谱条件进样测定, 计算果糖、蔗糖、蜜二糖、棉子糖、甘露三糖、水苏糖的平均加样回收率分别为 98.8%、100.4%、100.3%、102.1%、97.9%、98.4%, RSD 为 1.2%、2.9%、1.7%、1.1%、2.5%、1.5%, 结果说明单、寡糖的测定方法准确度良好。

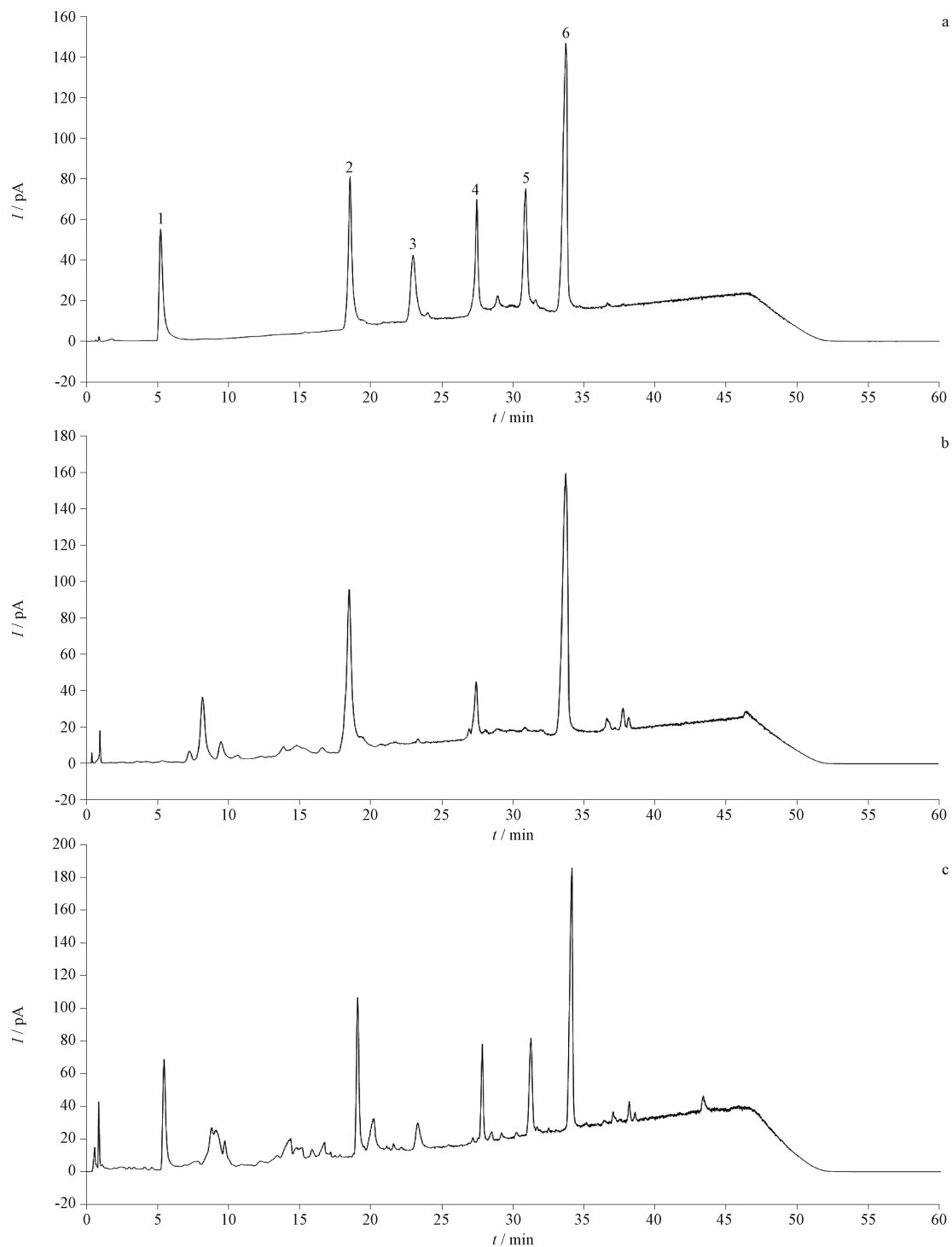
**2.4.5 各供试品单、寡糖含量测定** 按“2.4.3”项条件对供试样品进行分析, 结果显示百合地黄汤古代方与现代方均含有蔗糖、棉子糖和水苏糖。现代方同时检测到果糖、蜜二糖及甘露三糖, 而

上述 3 种糖类在古代方中均存在未检出, 如图 3 所示。

分别采用外标一点法与外标两点对数法测定各供试品溶液中 6 个糖类含量, 表 4 为 6 个糖类成分在各方剂中的分布情况; 可知, 百合地黄汤现代方中单、寡糖的种类较古代方多。但在单、寡糖总量上, 古代方为 (81.59 ± 4.44)%, 现代方为 (65.56 ± 8.20)%, 古代方显著高于现代方。在 6 个糖类中水苏糖在古代方中含量均值为 (60.65 ± 4.51)%, 而在现代方中含量 (35.79 ± 5.09)%, 说明该糖是引起糖类在古、今方中差异的主要因素。蔗糖在古代方和现代方中含量分别为 (15.24 ± 2.18)% 和 (15.56 ± 5.65)%, 棉子糖在古代方和现代方中含量分别为 (5.55 ± 0.85)% 和 (5.89 ± 0.84)%, 说明此 2 种糖类在古、今方剂中无明显差别。果糖在 15 批现代方中平均含量为 (3.26 ± 1.19)%。蜜二糖, 甘露三糖在现代方组中含量均值分别为 (1.16 ± 0.32)% 和 (3.87 ± 2.09)%, 但二者在古代方中均未检出。结果说明百合地黄汤古代方和现代方在单、寡糖的种类和含量上有明显差异。

## 2.5 百合地黄汤古、今方非极性成分 HPLC - Q TOF MS 分析

**2.5.1 对照品溶液制备** 分别取梓醇、地黄苷 D、地黄苷 A、益母草苷、王百合苷 C、王百合苷 A、王百合苷 B、王百合苷 E、王百合苷 F 的对照品适量, 精密称定, 以超纯水溶解, 定容于 10 mL 量瓶, 得各对照品质量浓度约为 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 备用。



a. 混合对照品 (mixed reference substance) b. BDD - A c. BDD - M

1. 果糖(fructose) 2. 蔗糖(sucrose) 3. 蜜二糖(melibiose) 4. 棉子糖(raffinose) 5. 甘露三糖(manninotriose) 6. 水苏糖(lupeose)

图3 百合地黄汤现代方和古代方中单糖、寡糖色谱图

Fig. 3 Chromatograms of monosaccharides and oligosaccharides in Baihe Dihuang decoction modern and ancient formulations

**2.5.2 供试品溶液制备** 精密称取各批次百合地黄汤古代方与现代方冻干粉 15 mg, 用超纯水定容于 1 mL 量瓶中, 超声 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min,

13 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清, 备用。分别取各批次提取物 0.1 mL, 混匀后备用作为质控样品。

**2.5.3 HPLC - Q TOF MS 分析** 色谱条件: 采用

表4 百合地黄汤古代方与现代方单、寡糖含量结果(%)

Tab.4 Contents of monosaccharides and oligosaccharides in BDD - A and BDD - M

样品编号 (sample No.)	含量(content)/%					
	果糖 (fructose)	蔗糖 (sucrose)	蜜二糖 (melibiose)	棉子糖 (raffinose)	甘露三糖 (mannitriose)	水苏糖 (lupeose)
BDD - A1	/	14.75	/	5.54	/	58.92
BDD - A2	/	18.43	/	6.04	/	54.69
BDD - A3	/	17.59	/	6.78	/	59.01
BDD - A4	0.15	18.32	/	5.38	/	63.73
BDD - A5	/	17.64	/	5.60	/	61.52
BDD - A6	0.15	14.08	/	5.22	/	65.67
BDD - A7	/	13.92	/	5.32%	/	66.67
BDD - A8	/	14.93	/	5.40	/	65.86
BDD - A9	/	13.00	/	6.37	/	59.54
BDD - A10	/	14.20	/	5.07	/	59.65
BDD - A11	0.20	11.13	/	4.99	/	59.20
BDD - A12	0.17	18.11	/	6.48	/	53.52
BDD - A13	0.21	14.22	/	4.99	/	60.51
BDD - A14	/	14.87	/	4.76	/	53.94
BDD - A15	/	14.88	/	5.26	/	67.29
BDD - M1	3.70	8.80	0.72	3.95	4.45	31.12
BDD - M2	3.93	10.61	1.06	5.86	5.07	30.86
BDD - M3	3.61	16.44	0.90	5.84	4.29	35.66
BDD - M4	2.92	10.28	1.03	6.00	2.95	29.84
BDD - M5	3.33	20.59	0.83	5.68	3.64	38.51
BDD - M6	2.99	22.34	1.20	6.16	2.67	33.56
BDD - M7	4.16	16.08	1.36	4.96	6.78	38.00
BDD - M8	3.04	8.40	1.14	5.64	3.47	33.50
BDD - M9	3.99	12.74	2.00	5.66	4.65	29.25
BDD - M10	2.76	19.01	1.10	5.99	2.35	32.82
BDD - M11	1.32	19.65	0.82	6.46	1.65	42.60
BDD - M12	1.59	17.86	1.05	7.65	1.98	43.60
DD - M13	6.35	8.95	1.68	5.32	9.91	44.48
BDD - M14	2.38	14.28	1.15	6.98	2.69	39.92
BDD - M15	2.80	27.29	1.24	6.27	2.08	33.14

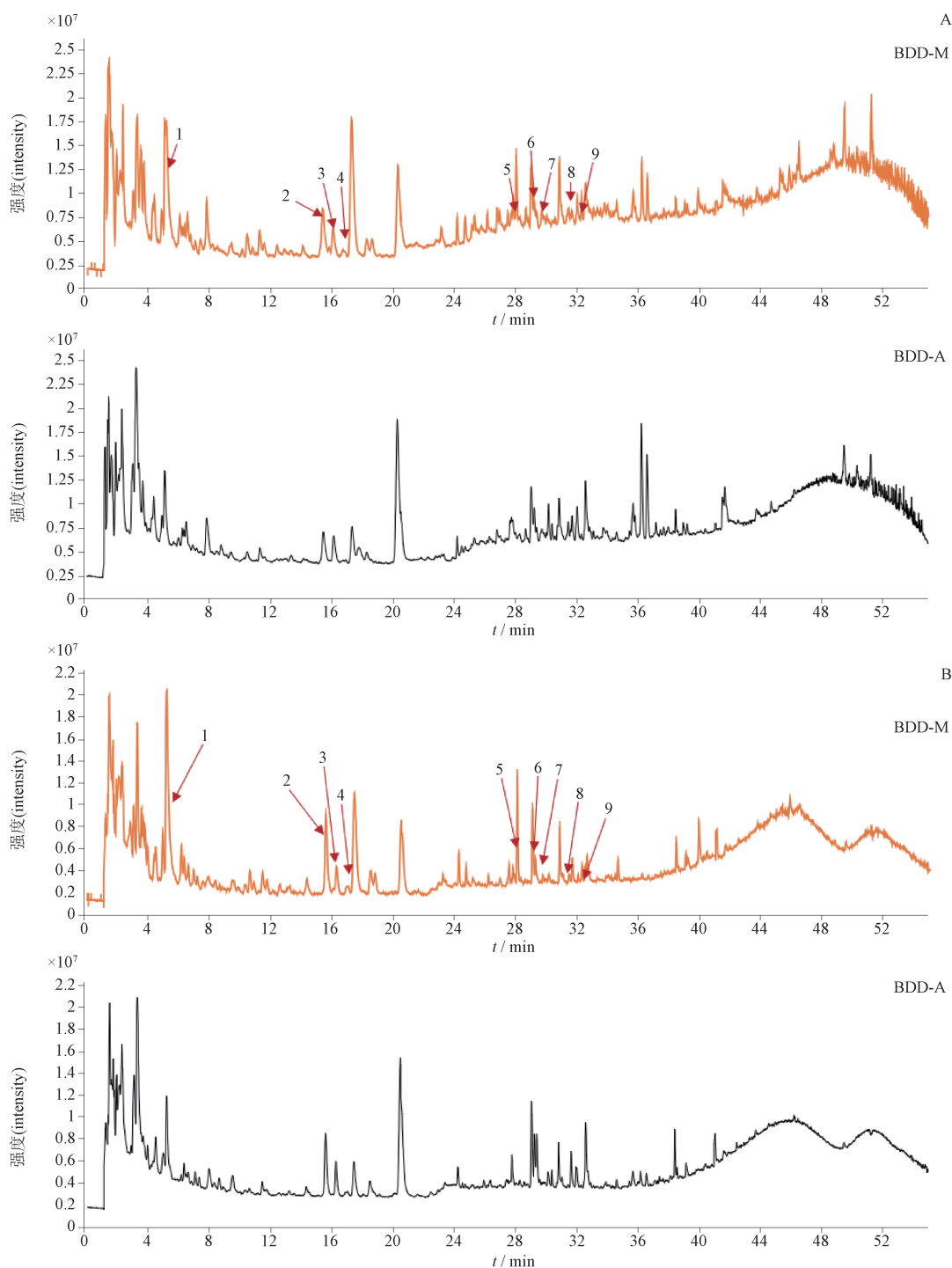
Agilent Infinity Lab Poroshell 120 SB - C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 1%B→5%B; 20 ~ 35 min, 5%B→30%B; 35 ~ 55 min, 30%B→100%B), 体积流量 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 5 μL。质谱条件: 采用电喷雾离子源 (Dual AJS ESI) 正、负离子模式采集质谱数据。鞘气流速为 11 L · min<sup>-1</sup>, 温度为 350 °C, 氮气流速为 9 L · min<sup>-1</sup>, 毛细管温度为 320 °C, 毛细管电压为 3 500 V (正) 和

4 000 V (负), 扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 500, 碰撞能量为 25 eV。

**2.5.4 数据的采集处理** 将供试品溶液按照所设定的色谱质谱条件进行分析和数据采集, 数据运用 Agilent Profinder 10.0 软件 (Agilent 公司) 对所得质谱数据进行峰对齐及峰提取等处理。将处理所得的峰面积、保留时间、Mass 值组建为三维数据并导入 SIMCA 14.1 软件 (Umetrics 公司), 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二

乘法判别分析(orthogonal partial leastsquares discrimination analysis, OPLS - DA)。同时将数据导入 Agilent Mass Profiler Professional (MPP, Agilent

Technologies) 软件进行  $t$  检验及差异倍数分析, 最终选取  $VIP \geq 1.5$ 、 $P < 0.05$  且差异倍数 fold change  $> 2$  的成分作为显著差异性成分。



1. 梓醇(catalpol) 2. 地黄苷 D(rhmannioside D) 3. 地黄苷 A(rhmannioside A) 4. 益母草苷(ajugol) 5. 王百合苷 C(regaloside C) 6. 王百合苷 A(regaloside A) 7. 王百合苷 F(regaloside F) 8. 王百合苷 E(regaloside E) 9. 王百合苷 B(regaloside B)

图4 正(A)、负(B)离子模式下百合地黄汤古代方及现代方的总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatograms of ancient and modern BDD in positive(A) and negative(B) ion modes

**2.5.5 百合地黄汤古代方及现代方非极性成分分析** 百合地黄汤古代方及现代方经 HPLC - Q TOF MS 分析后得总离子流图(图 4),由化学轮廓图可知,古代方和现代方非极性成分基本相同,主要在化合物含量上存在差异。为进一步探明 2 种方剂的差异成分,使用 SIMCA 14.1 软件对数据进行标准化处理,运用 PCA 法分别对正、负离子模式下百合地黄汤现代方和古代方样品进行分析(图 5)。从正、负离子模式下 PCA 图可知,古代方和现代方明显分离,说明二者存在明显差异。为获得 2 种方剂间的差异信息,进一步采用 OPLS - DA,如图 5 所示,在正离子模式下,2 种方剂有较好的区分, $R^2 X = 0.662$ ,

$R^2 Y = 0.996$ ,  $Q^2 = 0.982$ ;负离子模式下亦有较好的区分, $R^2 X = 0.624$ ,  $R^2 Y = 0.998$ ,  $Q^2 = 0.986$ 。同时,分别对正、负离子 OPLS - DA 模型参数  $R^2$  和  $Q^2$  进行了 200 次的置换验证, $Q^2$  和  $R^2$  的最终值接近 1,说明模型建立有效。

差异化合物采用多变量 OPLS - DA 模型前 2 个主成分的 VIP 值  $\geq 1.5$ ,结合单因素分析 fold change  $> 2$  和  $P < 0.05$  三者取交集,得到潜在差异化合物。最终,根据化合物含量、对照品获取情况、文献研究情况等选取梓醇、益母草苷、地黄苷 D、地黄苷 A、王百合苷 A、王百合苷 B、王百合苷 C、王百合苷 E、王百合苷 F 等 9 个成分进行进一步研究。

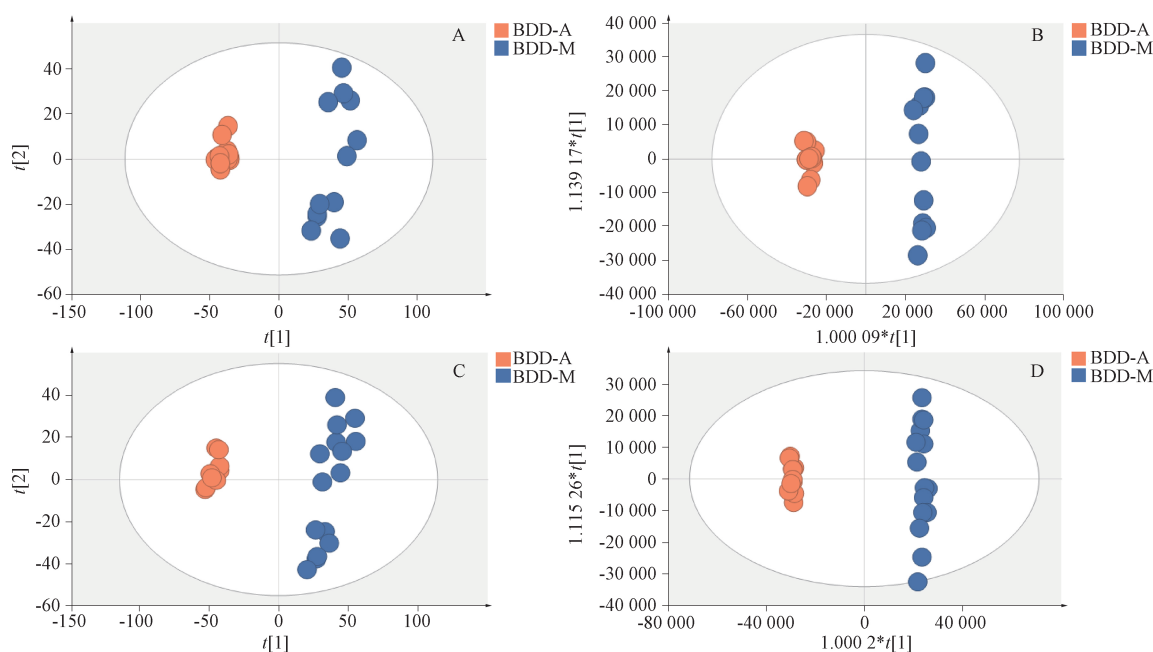


图 5 正离子模式下 PCA (A) 及 OPLS - DA (B) 结果;负离子模式下 PCA (C) 及 OPLS - DA (D) 结果

Fig. 5 Results of PCA (A) and OPLS - DA (B) analysis in positive ion models; Results of PCA (C) and OPLS - DA (D) analysis in negative ion mode

**2.6 百合地黄汤差异性成分 HPLC - QQQ MS 定量分析**

**2.6.1 混合对照品溶液的制备** 以“2.5.1”项下对照品溶液制备方法,制备梓醇、益母草苷、地黄苷 A、地黄苷 D、王百合苷 A、王百合苷 B、王百合苷 C、王百合苷 E、王百合苷 F 混合对照品溶液,用超纯水分别逐级稀释后,备用。

**2.6.2 供试品溶液的制备** 精密称取各批次百合地黄汤古代、现代方冻干粉 20 mg,用超纯水定容于 2 mL 量瓶中,超声溶解(功率 250 W,频率 40 kHz)

30 min,在 13 000  $r \cdot \min^{-1}$  离心 15 min,取上清,备用。

**2.6.3 内标溶液的制备** 精密称定 7 - O - 甲基莫诺苷对照品适量,用超纯水制成 304.7  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标溶液,于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用;供试品溶液进样前,等体积加入上述内标溶液。

**2.6.4 色谱条件** 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱;以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A,乙腈溶液为流动相 B,梯度洗脱 (0 ~ 27 min, 0 ~ 35% B; 27 ~ 28 min, 35% B  $\rightarrow$  100%

B; 28 ~ 32 min, 100% B), 体积流量 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 进样量 2 μL。

**2.6.5 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI)正、负离子 Scan 模式采集待测定成分的质谱母离子信息。鞘气流量为 11 L · min<sup>-1</sup>, 雾化气压力为 0.241 MPa, 温

度为 350 °C; 干燥气流量为 11 L · min<sup>-1</sup>, 干燥气温度为 325 °C, 鞘气温度为 350 °C; 毛细管电压为 3 500 V (正)和 4 000 V (负); 导入母离子信息后, 优化多重反应监测(MRM)采集模式参数见表 5; 谱图信息如图 6。

表 5 优化后 MRM 采集模式参数

Tab. 5 Optimized MRM acquisition mode parameters

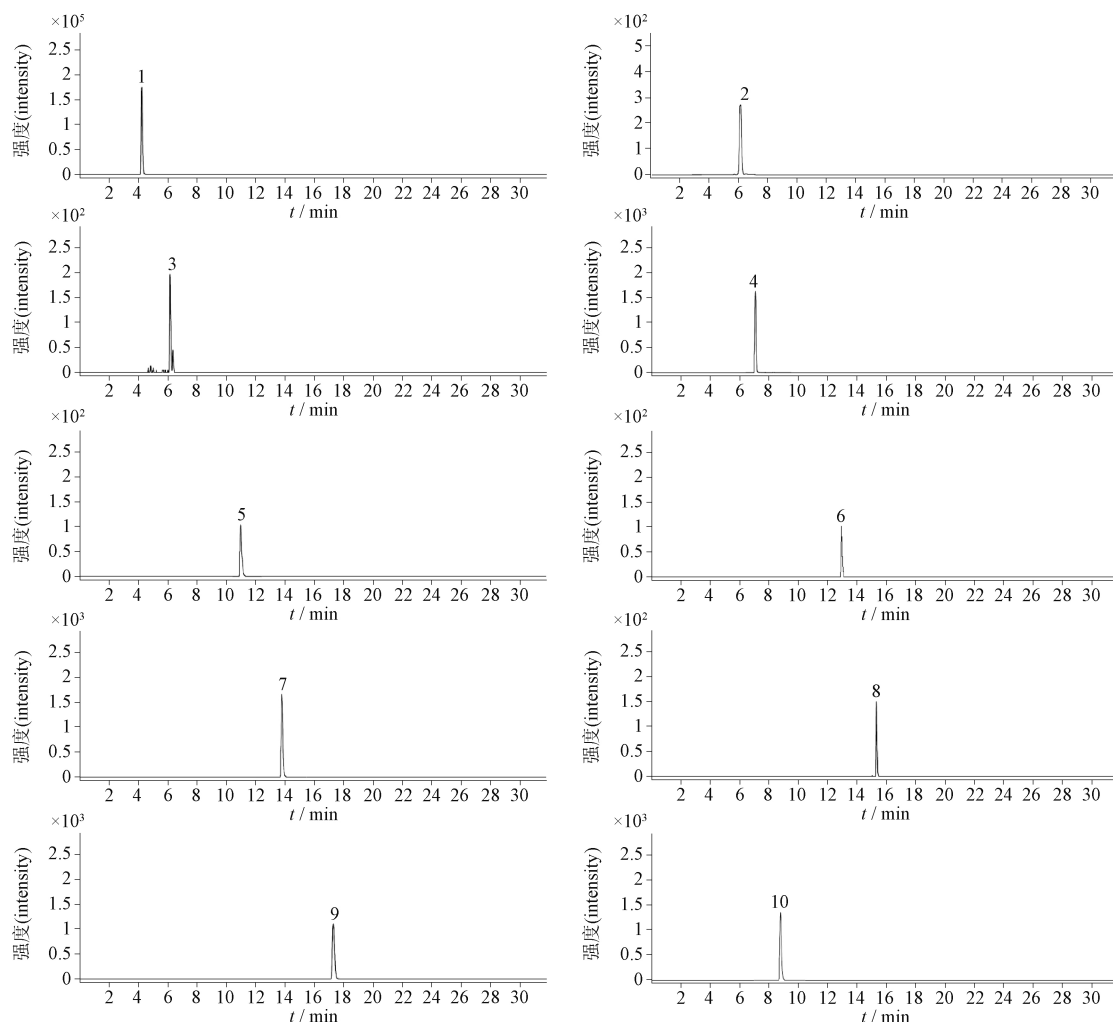
编号 (No.)	成分 (component)	t <sub>R</sub> / min	前体 (precursor) m/z	碎片离子 (product) m/z	裂解电压 (fragmentor)/V	CE/ eV
1	梓醇(catalpol)	4.582	380.1	165.0	81	10
				183.0	81	8
2	地黄苷 D(rhmannoside D)	6.162	709.2	365.2	230	38
				203.2	230	40
3	地黄苷 A(rhmannoside A)	6.378	547.2	367.0	190	32
				203.2	190	36
4	益母草苷(ajugol)	7.285	393.1	45.0	110	22
				347.1	110	10
5	王百合苷 C(regaloside C)	11.309	415.1	135.1	156	34
				161.0	156	28
6	王百合苷 A(regaloside A)	13.109	399.1	119.1	143	38
				163.1	143	22
7	王百合苷 F(regaloside F)	13.983	429.1	134.0	143	40
				193.0	143	22
8	王百合苷 E(regaloside E)	15.45	457.1	161.0	164	34
				397.0	164	22
9	王百合苷 B(regaloside B)	17.562	441.1	145.0	154	28
				381.0	154	22
内标(IS)	7-O-甲基莫诺苷(7-O-methyl morroniside)	8.628	465.1	239.1	110	14
				159.1	110	20

**2.6.6 方法学考察及结果** 线性关系及范围: 取“2.6.1”项下各梯度浓度混合对照品溶液加入“2.6.3”项下等体积内标溶液, 按“2.6.4”项下液相色谱条件与“2.6.5”项下质谱条件进样分析。分别以各对照品峰面积与内标峰面积的比值  $Y$  为纵坐标, 以各分析物质量浓度  $X$  为横坐标, 进行线性回归, 结果表明各分析化合物在相应范围内线性关系良好 ( $r > 0.9992$ ), 符合本方法学要求, 具体结果见表 6。

精密性、重复性、稳定性: 取“2.6.1”项下的混合对照品溶液, 同一天内连续平行进样 6 次测定日内精密性, 连续 3 d 平行进样 6 次测定日间精密性, 计算各成分峰面积的日内及日间 RSD 均小于 2.8%, 说明仪器精密性良好。按照“2.6.2”项下方法取同

一批样品平行制备 6 份供试品溶液, 并制备随行标准曲线系列梯度浓度混合对照品溶液, 加入“2.6.3”项下等体积内标溶液, 依次平行进样, 计算各成分的含量及 RSD, RSD 均小于 2.7%, 说明样品测定方法重复性良好。按照“2.6.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 平行进样, 通过峰面积计算各成分的 RSD, RSD 均小于 2.8%, 说明本实验制备的供试品溶液稳定性良好, 结果见表 7。

加样回收率: 取已知含量的供试品, 精密称定 6 份, 根据已知各成分含量 1:1 加入各对照品溶液, 按照“2.6.2”项下方法制备供试溶液, 进行含量测定, 各成分平均加样回收率在 98.1% ~ 104.9% 范围内, RSD 均小于 2.3%, 见表 7, 说明本实验方法有良好的定量准确度。



1. 梓醇(catalpol) 2. 地黄苷 D(rhmannioside D) 3. 地黄苷 A(rhmannioside A) 4. 益母草苷(ajugol) 5. 王百合苷 C(regaloside C) 6. 王百合苷 A(regaloside A) 7. 王百合苷 F(regaloside F) 8. 王百合苷 E(regaloside E) 9. 王百合苷 B(regaloside B) 10. 7-O-甲基莫诺苷(7-O-methyl morroniside)

图6 百合地黄汤9个成分多重反应监测(MRM)谱图

Fig. 6 Multi-reaction monitoring (MRM) spectra of 9 components in BDD

表6 9个成分的回归方程、相关系数、浓度范围、LOQ

Tab. 6 Regression equation, correlation coefficient, concentration range and LOQ of 9 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/(ng · mL <sup>-1</sup> )	LOQ/ (ng · mL <sup>-1</sup> )
梓醇(catalpol)	Y = 344.6X - 43.01	0.999 6	95.215 ~ 3 087.875	0.288
地黄苷 D(rhmannioside D)	Y = 2 376X + 68.07	0.999 4	106.445 ~ 3 406.25	0.263
地黄苷 A(rhmannioside A)	Y = 3 630X + 11.02	0.999 9	50.928 ~ 1 629.688	0.255
益母草苷(ajugol)	Y = 1 038X - 17.54	0.999 8	115.332 ~ 3 690.625	0.287
王百合苷 C(regaloside C)	Y = 262.5X - 30.22	0.999 5	49.414 ~ 1 581.25	0.247
王百合苷 A(regaloside A)	Y = 249.4X - 30.40	0.999 3	99.219 ~ 3 175	0.252
王百合苷 F(regaloside F)	Y = 167.4X - 13.01	0.999 9	30.566 ~ 3 912.5	0.306
王百合苷 E(regaloside E)	Y = 174.5X - 27.72	0.999 2	38.257 ~ 2 448.438	0.383
王百合苷 B(regaloside B)	Y = 240.7X - 46.59	0.999 8	49.656 ~ 3 178	0.248

表7 精密性、重复性、稳定性、平均回收率试验结果

Tab.7 Precision, repeatability, stability and average recovery results

成分 (component)	精密性 (precision), RSD/%		RSD/%		平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
	日内 (intra-day)	日间 (inter-day)	重复性 (repeatability)	稳定性 (stability)		
梓醇 (catalpol)	1.7	2.0	1.8	2.3	104.9	1.4
地黄苷 D (rhmannioside D)	1.7	2.6	2.1	1.8	104.2	2.2
地黄苷 A (rhmannioside A)	1.3	2.1	1.4	2.1	98.4	1.6
益母草苷 (ajugol)	2.1	1.9	1.8	1.4	102.5	1.1
王百合苷 C (regaloside C)	1.1	1.9	1.7	2.8	103.2	2.1
王百合苷 A (regaloside A)	1.5	2.5	1.6	2.7	102.1	1.8
王百合苷 F (regaloside F)	1.8	2.8	1.1	1.5	98.1	1.4
王百合苷 E (regaloside E)	1.0	1.3	2.7	2.2	99.1	2.3
王百合苷 B (regaloside B)	0.75	1.7	0.89	1.3	104.1	1.5

**2.6.7 百合地黄汤古代方与现代方中9个差异性成分含量测定结果** 采用 HPLC-QQQ MS 法对各批次方剂中的9个差异性成分进行含量测定,测得9个差异性成分在古代方中的平均总量为2.75%,在现代方中平均总量为1.84%,且均具有显著性差异,  $P < 0.05$ 。在百合地黄汤中梓醇含量明显高于其他8个测定成分含量,其在古代方中平均含量为  $(2.025 \pm 0.2284)\%$ ,现代方中平均含量为  $(1.0595 \pm 0.5219)\%$ ,可知百合地黄汤古代方中梓醇含量明显高于现代方含量;益母草苷、王百合苷 F、王百合苷 E、王百合苷 C 与地黄苷 A 在古代方中含量明显高于现代方,王百合苷 A、地黄苷 D 与王百合苷 B 在现代方中含量明显高于古代方;各差异性成分含量结果如表8所示。

### 2.7 差异性成分整合分析

对百合地黄汤古代方及现代方中多糖、单寡糖、非极性成分进行整合分析,如图8所示。结果显示,本研究所分析的多糖、6个单、寡糖及9个非极性差异成分在百合地黄汤中约占比80%。3个成分在现代方和古代方中均存在明显差异,其中单、寡糖类是引起百合地黄汤古代方和现代方差异的主要组分。

### 3 讨论

百合地黄汤自汉代记载后,被历代医家沿用。文献调研发现<sup>[9]</sup>清代及之前,均沿用《金匱要略》中“百合七枚(擘),生地黄汁一升”的计量,各朝代间没有显著变化。其中地黄采用鲜药捣汁入药,用量为150~300 mL,以200 mL居多。本研究亦对地黄榨汁出汁率进行了考察<sup>[14]</sup>,发现每100 g新鲜地黄

榨汁可出汁50 mL,古代方中200 mL地黄汁所用鲜地黄约为400 g。在国家中医药管理局发布的第4批《古代经典名方关键信息表》中百合地黄汤中百合的用量为245 g,古代用法中两药材用量比介于1:1和1:2之间,与现代用法中两药材比例接近。

单、寡糖是引起百合地黄汤古代方及现代方成分差异的主要因素,该类成分在15批现代方中含量差异较大,RSD为12.1%,而在15批次古代方中较为稳定RSD为5.5%,说明干燥过程会影响地黄和百合中单、寡糖类成分的含量及均一性。古代方中水苏糖占比60.65%,而果糖、甘露三糖、蜜二糖由于含量低于检测限未检出;现代方中水苏糖占比为36.17%,且6个糖类成分均有检出。推测为药材的干燥引起单寡糖之间的相互转化。文献报道鲜地黄在加工为生地黄的过程中,鲜药中的寡糖会因加热发生水解,其中水苏糖会脱去果糖生成甘露三糖<sup>[15]</sup>,棉子糖则会脱去果糖生成蜜二糖<sup>[16]</sup>,故在现代方中均能检测到果糖、蜜二糖及甘露三糖。在使用 HPLC-CAD 进行定量时发现通过调节 pH 稳定在10左右可以获得分离度与对称性良好的色谱峰<sup>[19]</sup>,其中果糖在氨性环境中变旋现象消失,从而使其色谱峰从变旋后的立体异构双峰变为单峰<sup>[20]</sup>。

古代方与现代方多糖含量差异明显,推测为在鲜药材干燥过程中大量的苷类、寡糖类<sup>[21]</sup>等物质裂解生成单糖,从而进一步聚合成多糖,导致多糖的含量增加<sup>[22]</sup>。也有文献报道,新鲜药材的炮制易导致细胞膜破坏从而使多糖溶出<sup>[23]</sup>,增加药材水煎液中多糖的含量。

表 8 百合地黄汤 9 个差异性成分的含量  
Tab.8 Content of 9 components in BDD

样品编号 (sample No.)	含量(content)/( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )								
	梓醇 (catalpol)	益母草苷 (ajugol)	王百合苷 A (rhmannioside A)	地黄苷 D (rhmannioside D)	王百合苷 F (rhmannioside F)	王百合苷 B (rhmannioside B)	地黄苷 A (rhmannioside A)	王百合苷 C (rhmannioside C)	王百合苷 E (rhmannioside E)
	BDD - A1	20 613.09	3 471.77	700.94	2 405.68	242.16	6.21	223.31	33.08
BDD - A2	23 392.64	3 443.63	647.22	2 544.35	205.28	5.98	273.18	29.35	4.11
BDD - A3	18 792.29	3 122.78	808.83	2 547.73	194.88	15.03	233.07	72.60	6.96
BDD - A4	23 732.08	3 374.48	805.88	2 488.93	256.44	16.00	239.26	68.23	6.51
BDD - A5	18 765.42	3 276.42	701.10	2 512.36	142.25	18.37	245.48	64.35	4.62
BDD - A6	21 386.63	4 400.85	478.46	2 432.21	79.94	3.31	209.94	14.96	0.90
BDD - A7	18 691.73	3 945.73	637.43	2 503.37	82.15	4.91	236.07	31.28	1.73
BDD - A8	21 186.31	4 121.58	482.39	2 536.23	30.44	5.54	224.15	28.63	0.89
BDD - A9	21 879.94	3 654.64	436.05	2 477.63	143.40	10.23	257.36	48.52	7.46
BDD - A10	21 689.26	4 029.87	615.86	2 461.52	222.07	12.43	266.13	46.59	6.96
BDD - A11	20 744.50	3 308.39	719.81	2 454.89	257.71	31.57	172.23	85.36	8.56
BDD - A12	20 462.81	3 379.26	810.80	2 363.87	312.21	20.17	160.59	62.04	8.60
BDD - A13	14 470.98	3 438.17	894.93	2 555.69	387.76	11.65	191.73	79.88	12.55
BDD - A14	19 278.69	3 773.11	714.32	2 401.82	119.11	8.97	192.19	36.67	2.33
BDD - A15	18 641.31	3 614.02	921.64	2 339.06	95.46	8.36	180.16	50.71	2.64
BDD - M1	6 582.13	656.32	1 992.76	3 426.26	47.46	627.38	88.56	57.76	8.48
BDD - M2	2 937.51	433.42	1 034.67	4 402.39	20.50	274.51	95.66	18.69	2.10
BDD - M3	8 609.94	882.45	1 406.43	4 764.62	20.94	174.72	83.86	53.92	3.08
BDD - M4	9 744.35	1 046.60	1 863.20	4 997.52	59.85	598.53	62.45	59.46	7.32
BDD - M5	6 696.56	922.78	1 449.28	4 666.29	35.95	177.06	97.61	43.26	1.69
BDD - M6	4 036.55	172.14	1 333.68	4 429.22	25.67	79.60	75.88	29.49	0.55
BDD - M7	10 882.75	966.40	1 032.07	4 479.09	36.07	129.37	75.32	52.44	1.40
BDD - M8	10 234.70	1 376.84	1 105.73	3 454.28	10.30	343.82	123.95	16.08	3.87
BDD - M9	13 542.70	1 515.77	1 987.86	4 554.10	9.51	761.49	62.10	7.50	1.34
BDD - M10	20 914.54	2 181.56	1 639.49	5 212.70	27.39	565.21	121.49	31.36	5.04
BDD - M11	18 765.05	2 197.17	879.22	5 676.04	10.00	276.77	127.31	5.58	1.01
BDD - M12	17 245.04	2 296.85	1 002.93	5 715.55	7.27	323.07	125.73	4.84	1.23
BDD - M13	7 206.03	931.72	1 683.19	4 064.98	25.16	574.31	113.99	32.78	6.45
BDD - M14	9 050.25	1 182.94	1 186.04	5 080.54	6.58	370.81	79.85	3.92	0.72
BDD - M15	12 472.75	1 349.07	1 689.44	4 475.28	8.68	673.40	66.20	11.38	3.27

对百合地黄汤古、今方中 9 个非极性差异性成分进行含量测定,结果表明各成分含量差异明显。梓醇、益母草苷、地黄苷 D 与地黄苷 A 为环烯醚萜苷类化合物,均来自于地黄。文献报道<sup>[24]</sup>,梓醇与益母草苷为环烯醚萜单糖苷,热稳定性较差,加热易发生降解,推测鲜地黄加工成生干地黄的过程是导致现代方中梓醇与益母草苷含量降低的重要原因,且梓醇含量在现代方组内也有较大差异,可能与鲜地黄

加工成为生干地黄的工艺条件存在差异有关。王百合苷 A、B、C、E、F 为酚酸甘油酯类化合物,均来自于百合。推测该类成分在鲜药中易被酶解而含量降低,经过加工可使酶失活<sup>[24]</sup>,从而维持该类成分在现代方中含量的稳定。也有文献报道<sup>[25]</sup>,在加工过程中细胞快速破裂,释放出大量的酚酸甘油酯类成分,但同时也破坏了热敏感的酚酸甘油酯类物质,使得该类成分含量在古、今方中产生差异。

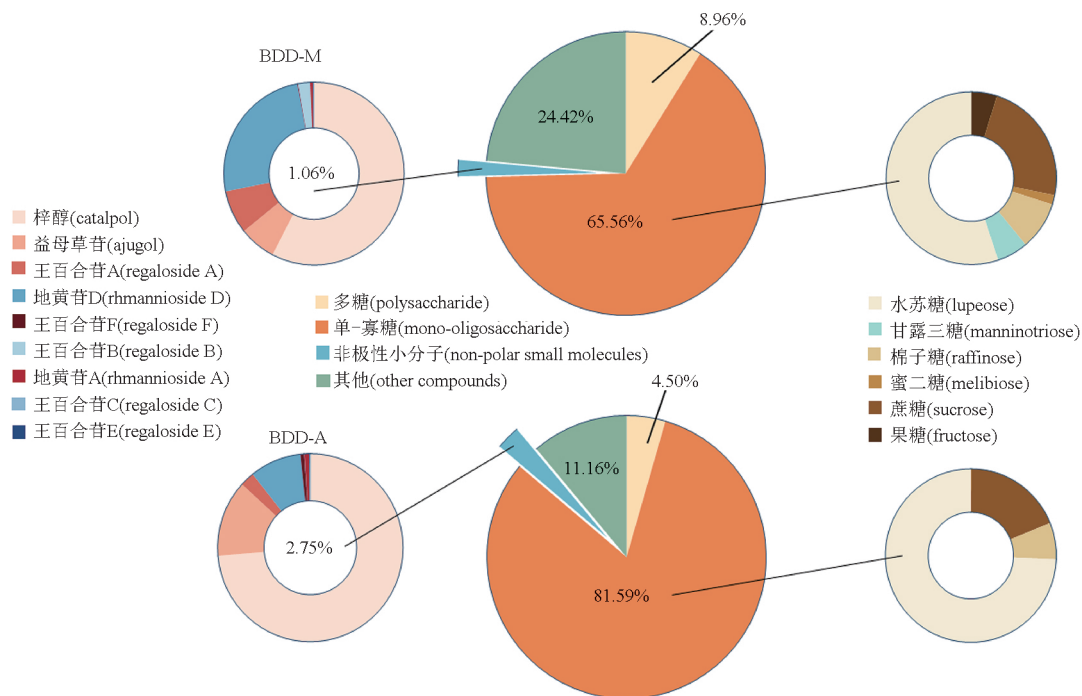


图7 百合地黄汤多糖组分、单、寡糖组分与9种差异性成分占比图

Fig. 7 The proportion of polysaccharides, monosaccharides, oligosaccharides and 9 differential components in BDD

综上所述,本文通过比较百合地黄汤古代方与现代方中多糖含量、单寡糖含量以及非极性小分子含量,可知百合地黄汤古代方与现代方的化学成分组成存在较大差异,但其疗效与相关的作用机制是否存在较大差异仍需要进一步研究阐明。

参考文献

[ 1 ] 张仲景. 金匮要略[M]. 北京:中国古籍出版社, 2018:125  
ZHANG ZJ. Synopsis of the Golden Chamber [M]. Beijing: Ancient Books Publishing House, 2018: 125

[ 2 ] 佚名. 神农本草经[M]. 北京:人民卫生出版社, 1956  
YI M. Sheng Nong's Herbal Classic [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1956

[ 3 ] 李艳, 郭晖, 苗明三. 中药鲜用的药理作用及临床应用分析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5691  
LI Y, GUO H, MIAO MS. Pharmacological effects and clinical application analysis on fresh use of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(12): 5691

[ 4 ] 宋如珺, 韩赟, 胡芳, 等. 温病医著中鲜药的应用规律研究[J]. 北京中医药, 2022, 41(1): 54  
SONG RJ, HAN Y, HU F, et al. Study on the application of fresh herbal medicines based on literature about febrile diseases [J]. Beijing J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 41(1): 54

[ 5 ] 王梦溪, 吴启南, 乐巍, 等. 中药鲜药的应用与现代研究[J]. 中草药, 2015, 46(20): 3125

WANG MX, WU QN, YUE W, et al. Application and modern research on fresh herbs of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(20): 3125

[ 6 ] 高宇. 百合地黄汤治疗脑卒中术后昼夜节律睡眠-觉醒障碍心肺阴虚证的临床观察[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2022  
GAO Y. Clinical Observation of Baihe Dihuang Decoction in Treating Cardiopulmonary Yin Deficiency Syndrome of Circadian Rhythm Sleep - Wake Disorder After Stroke [D]. Changsha: Hunan University Traditional Chinese Medicine, 2022

[ 7 ] 褚雪菲, 刘道龙, 周军怀, 等. 四逆散合百合地黄汤加减干预焦虑性失眠的临床观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(8): 1295  
CHU XF, LIU DL, ZHOU JH, et al. Clinical observation of Sini San combined with Baihe Dihuang decoction in the intervention of anxiety insomnia [J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2021, 27(8): 1295

[ 8 ] 刘伟群, 吴松鹰. 百合地黄汤治疗神志病研究概况[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(10): 1816  
LIU WQ, WU SY. Research progress of Baihe Dihuang decoction in the treatment of psychiatric diseases [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2019, 31(10): 1816

[ 9 ] LI C, CAO H, HUAN Y, et al. Berberine combined with stachyose improves glycometabolism and gut microbiota through regulating colonic microRNA and gene expression in diabetic rats [J]. Life Sci, 2021, 284: 119928

[ 10 ] ZHANG B, ZHOU N, ZHANG Z, et al. Study on the neuropro-

- tective effects of eight iridoid components using cell metabolomics [J]. *Molecules*, 2024, 29(7): 1497
- [11] ZHANG Y, WU MX, LI HM, *et al.* Potential benefits of *Rehmanniae Radix* after ancient rice – steaming process in promotion of antioxidant activity in rats' health [J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(9): 5532
- [12] 彭修娟, 杨新杰, 陈衍斌, 等. 基于中药整合药理学平台的百合地黄汤治疗抑郁症的作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(7): 1338
- PENG XJ, YANG XJ, CHEN YB, *et al.* Action mechanism of Baihe Dihuang decoction on depression based on integrative pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2018, 43(7): 1338
- [13] 但济修, 周永全, 詹常森. 百合地黄汤处方剂量研究 [J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3402
- DAN JX, ZHOU YQ, ZHAN CS. Study on prescription dose of Baihe Dihuang decoction [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(10): 3402
- [14] 王碧莹, 付钰, 张欣亚, 等. 指纹图谱联合多元统计分析的百合地黄汤物质基准质量评价及量值传递规律研究 [J]. *中医学报*, 2024, 39(1): 1674
- WANG BY, FU Y, ZHANG XY, *et al.* Quality evaluation and quantity transfer rule of Baihe Dihuang decoction combining fingerprint and multivariate statistical analysis [J]. *J Acta Chin Med*, 2024, 39(1): 1674
- [15] 钱艳艳. 地黄不同炮制品糖类成分理化特性及高压蒸制条件优化研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2022
- QIAN YY. Study on Physicochemical Properties of Saccharides from Different Processed Products of *Rehmannia glutinosa* and Optimization of High Pressure Steaming Conditions [D]. Zhengzhou: Henan Agriculture University, 2022
- [16] MONTILLA A, OLANO A, MARTINEZ – VILLALUENGA C, *et al.* Study of influential factors on oligosaccharide formation by fructosyltransferase activity during stachyose hydrolysis by pectinex ultra SP – L [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(19): 10705
- [17] ZHANG W, DU F, WANG L, *et al.* Hydrolysis of oligosaccharides by a thermostable  $\alpha$  – galactosidase from *Termitomyces eurhizus* [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 29226
- [18] 徐双双, 吴思佳, 卢文旭, 等. HPLC – CAD 法同时测定铁皮石斛中单糖和寡糖类成分的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(8): 1302
- XU SS, WU SJ, LU WX, *et al.* Simultaneous determination of monosaccharides and oligosaccharides in *Dendrobii officinalis caulis* by HPLC – CAD [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(8): 1302
- [19] 陈蓉, 马冬阳, 郭彬, 等. HPLC – CAD 法结合化学计量学同时测定甘草中多种糖类 [J]. *中国药师*, 2021, 24(10): 1932
- CHEN R, MA DY, GUO B, *et al.* Simultaneous quantification of saccharides in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* by HPLC. CAD combined with chemometrics [J]. *China Pharm*, 2021, 24(10): 1932
- [20] 贾秀梅, 张振凌. HPLC – ELSD 法测定鲜地黄及其炮制加工品中水苏糖的含量 [J]. *新疆中医药*, 2022, 40(5): 53
- JIA XM, ZHANG ZL. Determination of content of stachyose in fresh *Rehmannia* root and its processed products by HPLC – ELSD [J]. *J Xinjiang Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 40(5): 53
- [21] 田家屹, 马芳, 韩玲玉. 基于红外光谱的鲜地黄、生地黄和熟地黄成分差异分析 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2022, 42(10): 3203
- TIAN JY, MA F, HAN LY. Analysis of composition differences of fresh *Radix Rehmanniae*, crude *Radix Rehmanniae* and processed *Radix Rehmanniae* using infrared spectroscopy [J]. *Spectrosc Spect Anal*, 2022, 42(10): 3203
- [22] 赵婧含, 李雪, 吴文轩, 等. 熟地黄的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2023, 51(6): 110
- ZHAO JH, LI X, WU WX, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Radix Rehmanniae Preparata* [J]. *Acta Chin Med*, 2023, 51(6): 110
- [23] 王新民, 黄小婉, 杨影影, 等. 怀地黄不同炮制品中 5 种成分差异的研究 [J]. *现代牧业*, 2023, 7(3): 8
- WANG XM, HUANG XW, YANG YY, *et al.* Study on the difference of five components in different processed products of *Rehmanniae Radix* [J]. *Mod Anim Husb*, 2023, 7(3): 8
- [24] 陈佳妮, 罗耀华, 孔慧, 等. 热激处理对鲜切百合鳞茎片贮藏品质的影响 [J]. *食品科学*, 2024, 45(1): 1
- CHEN JN, LUO YH, KONG H, *et al.* Effect of heat shock treatment on the storage quality of fresh – cut lily bulb slices [J]. *Food Sci*, 2024, 45(1): 1
- [25] LIU F, CHANG X, HU X, *et al.* Effect of thermal processing on phenolic profiles and antioxidant activities in *Castanea mollissima* [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2017, 52(2): 439

(本文于 2024 年 2 月 27 日收到)