

• 药剂 •

桂枝汤 A 部分指纹图谱的确定及比较(一)

戴德舜¹, 曹进¹, 王义明¹, 罗国安¹, 孙玉茹²

孙友富², 霍海如², 姜廷良²

(1 清华大学药物研究所, 北京 100084;

2 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 本文利用液质技术对桂枝汤 A 部分的双向调节样品与单向升温样品进行了指纹图谱的确定。应用质谱中质荷比(M/Z)值及 HPLC 图峰响应比比较了两者的差异, 对桂枝汤 A 部分产生双向调节作用的物质基础进行了初步讨论。

关键词: 桂枝汤 A 部分; 指纹图谱; HPLC/MS

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)02-0001-04

Determination and Comparison of Active Fraction A of Guizhi Tang (I)

DAI De-shun¹, CAO Jin¹, WANG Yi-ming¹, LUO Guo-an¹

SUN Yu-ru², SUN You-fu², HUO Hai-ru², JIANG Ting-liang²

(1. Pharmaceutical Research Institute, Tsinghua University, Beijing 100084

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700)

Abstract: High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectroscopy (HPLC/MS) was applied to compare two kinds of active fraction A of Guizhi Tang, single-directional thermoregulation sample and dual-directional one. Mass-to-charge ratio (M/Z) of MS and HPLC responds were used to obtain the fingerprint chromatography and identify both of the distinctions. The substances base of dual-directional thermoregulation of active fraction A of Guizhi Tang was discussed at the first time.

Key words: Active fraction A of Guizhi Tang; fingerprint chromatography; HPLC/MS

1 引言

中药方剂的最大特征是其整体性和复杂性。整体性体现了中医药理论的精髓。中药材的四气、五味、升降浮沉和归经以及中药方剂配伍理论等无一不在整张方剂中得以体现^[1-4]。中药方剂的优良疗效, 来自于其物质基础——三大类化学成分(无机物、有机小分子、生物大分子)的综合作用。

目前有许多先进分离分析、鉴定方法, 例如薄层扫描法(TLC)、高速逆流色谱(HSCCC)、高效液相色谱(HPLC)以及高效毛细管电泳(HPCE)等, HPLC/MS/MS 联用技术更是一种有效的方法。本文针对桂枝汤有效部分 A 进行了 LC/MS 方法的探索和研究, 对桂枝汤 A 部分进行了指纹图谱的测定, 讨论了其双向作用可能的物质基础。但对中药方剂有效部分

和有效成分的分离分析鉴定还是存在许多具体困难, 如何阐释方剂配伍、怎样有效控制方剂的质量标准, 都是中药现代化进程中所产生的实际问题^[6-8]。

桂枝汤是张仲景《伤寒杂病论》中的群方之魁, 主要作用为解肌发表、调和营卫^[1]。本方由桂枝、芍药、生姜、炙甘草和大枣五种中药组成, 虽为解表之剂, 亦属助阳滋阴之方。最终确定的提取桂枝汤有效部分工艺是: 按照组方用量配全方, 水提两次得浸膏, 用 80% 的乙醇溶液沉淀多糖, 可溶部分回收成膏, 用 10% HCl 溶液调节 pH= 5~6, 乙醚脱脂, 酸水层用 10% NH₄OH 溶液碱化调节 pH= 8~9, 经氯仿反复萃取并脱水得桂枝汤 A 部分。先前的研究发现桂枝汤有效部分 A 对大鼠体温有双向调节作用。由于全方系五药组成, 各个单味药中的某些部分必然形成了具有双向调节的有效部位群。这样就有必要对复方 A 部分进行 HPLC 指纹分离通过对应指认, 以确认复方作用的物质基础。本文力图用 HPLC/MS/MS 对有效部分 A 进行分离分析, 建立指纹图谱提供

收稿日期: 2000-05-10

基金项目: 国家“九五”攀登计划预选项目“中药现代化关键问题的基础研究”No: 970211018

定性鉴别,通过对一个单向升温样品及一个双向样品指纹图谱的比较,阐明桂枝汤A部分对体温双向调节的物质基础。

2 实验

2.1 实验仪器及试剂 Perkin Elmer 公司的 API3000 型 LC/MS/MS 联用仪。天津特纳 250mm × 4.6mm, Kromasil5 μ 的 C18HPLC 柱, C185 μ 的预柱。HPLC 级乙腈(Fisher 公司提供)。二次蒸馏水(自制)。桂枝汤A部分由中国中医研究院中药研究所提供,其中单向升温样品一个,双向样品一个。

2.2 实验方法

2.2.1 桂枝汤有效部分A分离最终的HPLC梯度条件 流速: 0.5ml/min; 检测波长: 254nm; 进样量: 20 μ l。

0 10 25 30 80 90 110 120 125 135(min)

水(%) 90 90 80 80 50 50 30 30 0 0

乙腈(%) 10 10 20 20 50 50 70 70 100 100

2.2.2 桂枝汤有效部分A分离分析的正负离子LC/MS/MS条件:

正离子扫描MS条件:

IS	4000	NC	0	TEM	300	OR	26
RNG	130	Q0	- 10	IQ1	- 10	ST	- 15
RO1	- 11	IQ2	- 20	RO2	- 60	ST3	- 80
RO3	- 62	DF	- 200	CEM	2000	NEB	5
CUR	10	CAD	0	QPE	0	POL	0
VCM	0	IPE	0				

负离子扫描MS条件:

IS	- 3800	NC	0	TEM	300	OR	- 60
RNG	- 300	Q0	10	IQ1	10	ST	15
RO1	11	IQ2	20	RO2	100	ST3	120
RO3	102	DF	200	CEM	2000	NEB	6
CUR	12	CAD	0	QPE	0	POL	0
VCM	0	IPE	0				

3 实验结果及讨论

3.1 流动相选择 鉴于样品均为氯仿提取干燥后所得,通过样品溶解度试验后,进行了流动相摸索,分别试验了正己烷/甲醇;正己烷/乙腈;甲醇/水;乙腈/水四种二元体系,考虑到与MS联用,最终确立采用乙腈和水作为流动相的二元多台阶梯度洗脱的色

谱条件。

3.2 波长选择 通过对一定浓度下桂枝汤A部分乙腈溶液的UV图谱的测定,发现在210~310nm有较大吸收,存在多个吸收峰,选定较有代表性的230、254 280nm三个波长下均进行HPLC测定,发现在254nm下,吸收峰出峰最多,且在MS正负离子图中各主要离子峰响应强弱与HPLC中UV下峰响应强弱相应。因此选择254nm作为HPLC指纹图谱的响应波长。

3.3 方法的重现性 在固定色谱柱,保持一定的柱效情况下,进行测定,方法具有很好的重现性,指纹图谱在同一液相系统下较为稳定,但在不同色谱系统中,由于流动相梯度较多,重现性受梯度滞后时间的影响,梯度条件需要稍加改变,但这并不影响在同一系统中的重复,结果可以进行样品间比较。通过HPLC指纹谱的测定(图谱参见图1~2),及MS正负离子扫描(结果见附表),发现指纹图谱分离情况理想,较多数主峰中所含分子量值仅1~2个,少数含三个分子量,说明分离状况较好,可以作为指纹图谱用于鉴别。同时我们也将各个峰所含分子量及其个数,与柱效一起用于判定分离情况。

3.4 样品对比结果 在桂枝汤A部分提取工艺的摸索过程中,得到一份单向升温的样品以及一份双向调节的样品,通过对两个样品HPLC指纹图谱的分析,并对照两者的质谱图也可以发现各离子流峰之间的峰响应存在一定的差异,但是总的出峰情况很相似。由于HPLC分离两种样品主要有三个梯度台阶,可将总峰数分为三个极性部分。这三个极性段大致可分为强极性段0~40min、中极性段40~90min和弱极性段90~135min,双向样品与单向升温样品的差异存在于强极性和中极性段。按照极性分段,对每段谱图进行分子离子棒线图的分析比较,发现主要峰对应的可能分子量均一致,因而发现单向样品与双向样品的主要差别,不在于物质的差别,而是量上的差异,通过对一定浓度样品的测定,进行了有效峰之间峰响应的对比,参见附表。从结果可以看出双向调节与单向样品差别来源主要是在煎煮,提取过程中不同物质溶解率,萃取率的不同,使得各个物质在最终样品中含量的不同,导致了药效的不同。这提示了桂枝汤A部分的提取工艺的研究,应作进一步的考察,建立切实有效的质量控制方法,以保证最终质量的稳定。实验同时分析了MS总离子流图和HPLC谱图主峰对应的可能分子量,再根据药典

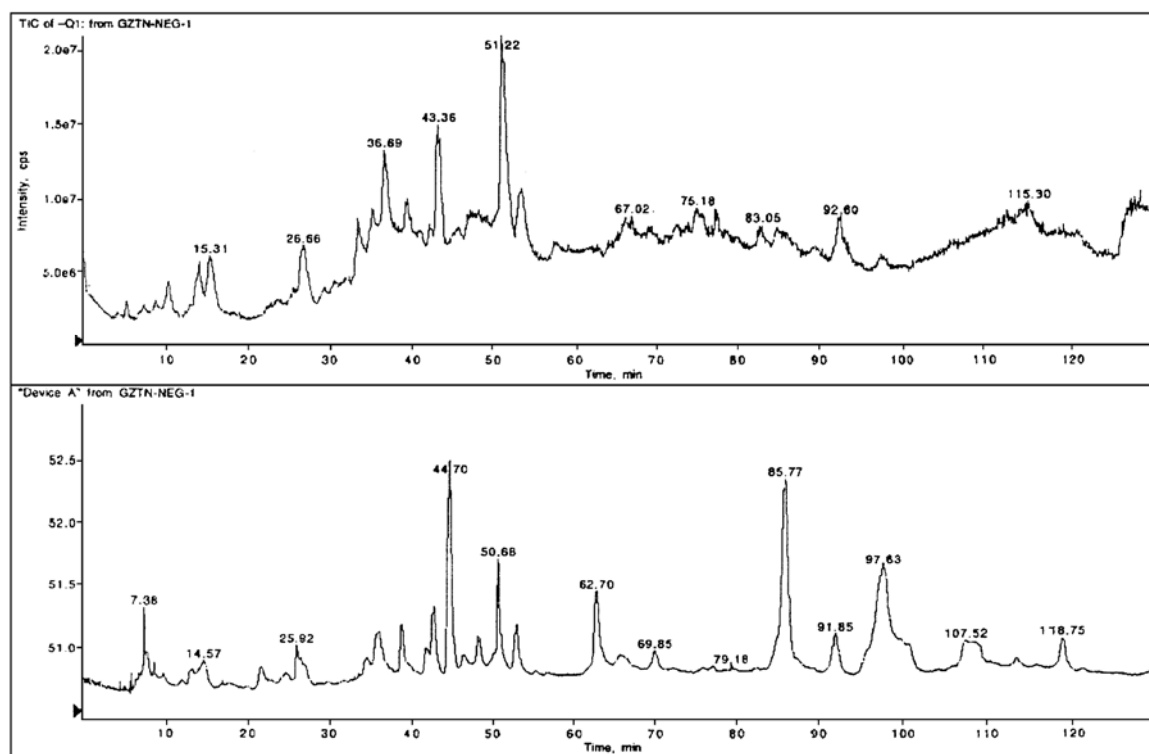


图 1 具有双向调节作用的桂枝汤 A 部分 LC/MS 谱图

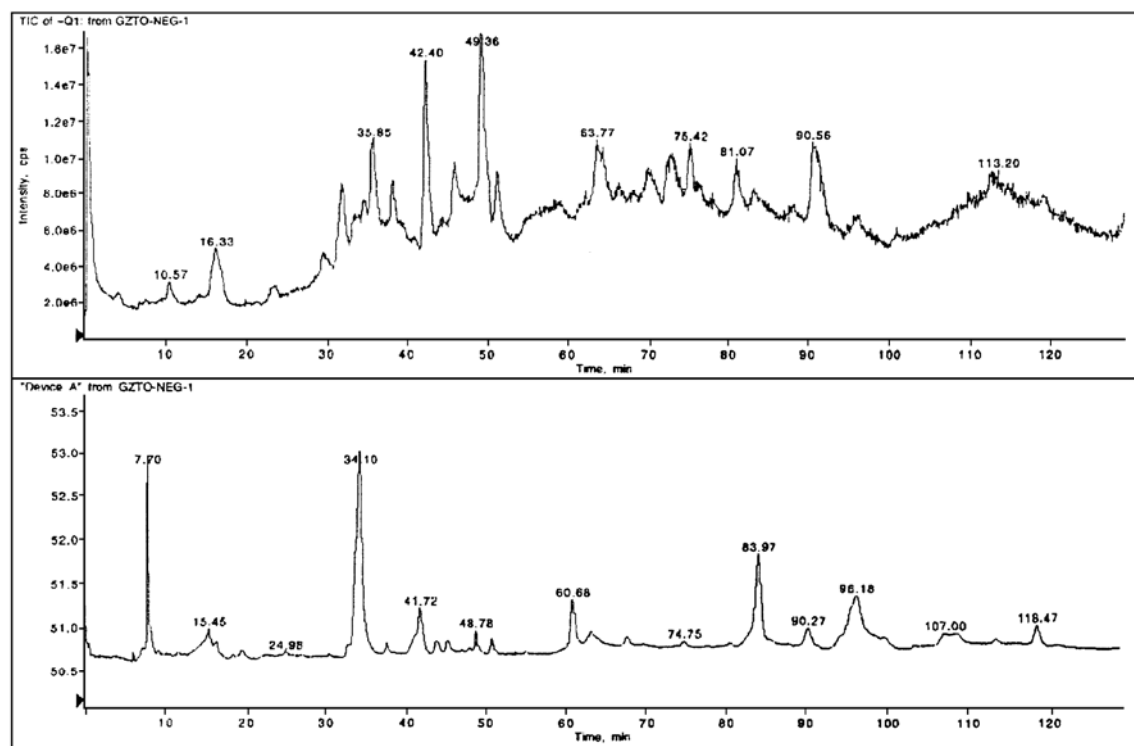


图 2 单向升温调节作用的桂枝汤 A 部分 LC/MS 谱图

和五种单味药有效成分相关资料,推测桂枝汤A部分双向调节作用样品物质基础可能对应的单味药物质来源,参见附表。

4 结论

本文通过锁定色谱峰中主要分子量的方法对照

了桂枝汤 A 部分两份不同药效样品,通过指纹图谱与 MS 离子流图相结合的方式分析了产生双向调节作用的物质基础,确认了样品中所含物质成分在量上的差异,最终决定了药效作用的走向,为进一步的研究提供了有效途径。

表 1 桂枝汤有效部分 A LC/MS 总结表

峰号	包含分子 量	对应保留时间 区段(min) ±1	可能物质 (可能归属)	该段主峰高比	
				OD	NS
1	241(+) 122(-) 165(-) 200(-) 256(-) 290(-)	7.5	苯甲酸 L-苯丙氨酸(大枣) 月桂酸(桂枝) 甘草素(甘草) 姜酮(生姜)	1.60	0.40
2	278(+) 497(+) 121(+) 162(+) 382(-) 450(-) 480(-) 516(-) 602(-) 960(-)	14~ 15	姜酮酚(生姜) 甲氧基桂皮醛(桂枝) 芍药甙(芍药)	0.20	0.10
3	204(+)	17	姜烯(生姜)	0.10	0.018
4	414(+) 633(+)	21	薯蓣皂甙元(生姜) 北乌碱(甘草)	0.060	0.09
5	437(+) 694(-) 742(-)	25		0.030	0.20
6	448(+) 187(+)	33		0.090	0.071
7	434(+) 329(+) 480(+) 362(-) 434(-) 508(-)	34	樟醇(生姜) 甙类(甘草或大枣)	1.60	0.20
8	430(+) 577(+) 267(-) 330(-) 416(-) 630(-)	39		0.060	0.23
			麦角酰胺(大枣) 园瓣姜花素 A(生姜) 1-乙酰氧基松脂酚(大枣)		
9	256(+) 192(+)	41		0.36	0.12
10	606(+) 256(-)	43		0.090	0.32
11	418(-)	44		0.090	1.0
12	601(+)	46		0.090	0.036
13	677(+)	48		0.18	0.14
14	584(-) 630(-)	50	苯甲酰芍药甙(芍药)	0.090	0.50
15	384(-) 330(-)	52		0	0.23

16	721(+) 765(+)	60		0.30	0.36
17	264(+) 298(-)	62	鱗叶甘草素 C(甘草)	0.090	0.036
18	268(+) 368(+) 312(-)	67	高良姜素 3,5,7-三甲醚(生姜)	0.060	0.071
19	382(+) 428(+) 218(+) 460(-) 828(-)	84~ 85		0.66	0.87
20	270(-)	90	高良姜素(生姜)	0.12	0.20
21	262(+) 282(-) 332(-)	96~ 98	白杨素 5,7-二甲醚(生姜) 异戊烯二氢赤松素(甘草)	0.39	0.5
22	266(+) 306(+) 332(-)	107	异戊烯二氢赤松素(甘草)	0.090	0.12
23	402(+) 306(+)	114~ 120	异戊烯二氢赤松素(甘草)	0.12	0.14

注: OD 为升温单向; NS 为双向, 从峰高比已排除浓度等因素, 并以双向样品的最高峰为 100%, 计算; 分子量后+、- 分别表示正、负离子方式。在一个保留时间区段含有几个分子量值, 主峰系指其中双向样品 UV 响应最大, MS 正负离子也响应最大, 亦即含量较大的物质峰。

参考文献:

[1] 罗国安, 王义明. 中药复方的化学研究体系[J]. 中药现代化杂志, 1999, (1): 16—19.

[2] 罗国安, 王义明. 中药复方物质基础和药效相关性研究[J]. 中药现代化杂志, 1999, (1): 11—15.

[3] 罗国安, 王义明. 中药复方有效部分研究方法及其理论初探[J]. 中成药, 1997, 19(8): 44—46.

[4] 谢光, 张士卿. 论中药现代研究中保持特色与发挥优势问题[J]. 甘肃中医学院学报, 1999, 16(2): 12—14.

[5] 陈红, 周爱香, 郭淑英, 等. 桂枝汤方中药对体温双向调节的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(1): 12—51.

[6] 陈可冀, 史大卓. 中药临床开发研究和国际接轨的问题[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(5): 304—307.

[7] 姜廷良. 论中药复方药效物质基础和作用机理研究的问题[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(4): 195—196.

[8] 刘建利. 复方配伍中的新成分、质量监控的理想指标[J]. 中国中西医结合杂志, 1992, 12(2): 115—116.