

HPLC-MS 联用分析不同制法四逆汤中化学成分

王海燕,周严严,容蓉*,王晓莉,蒋海强,杨勇
(山东中医药大学,济南 250355)

[摘要] 目的:采用 HPLC-MS 联用技术对不同提取方法制备的四逆汤中主要化学成分进行结构指认。方法:以传统水提法、有效部位组合法制备四逆汤,采用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈(含 0.01% 醋酸)-2 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(含 0.01% 醋酸)为流动相梯度洗脱,柱温 30 °C;流速 0.6 mL·min⁻¹;进样量 2 μL。质谱条件:正离子模式,干燥器流速:10 L·min⁻¹;雾化气压力:30 psi;碎片电压:70 V。结果:HPLC-MS 共定性出传统水提液 28 个化学成分,有效部位组合液中 30 个化学成分,并对各成分的药材归属进行了确认。结论:为明确四逆汤的药效成分物质基础提供了依据。

[关键词] 四逆汤; 高效液相色谱-质谱联用; 定性分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0103-05

[doi] 10.11653/syfy2013220103

HPLC-MS Analysis of Chemical Constituents in Sini Decoction Prepared by Different Extraction Methods

WANG Hai-yan, ZHOU Yan-yan, RONG Rong*, WANG Xiao-li, JIANG Hai-qiang, YANG Yong
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the structure of the main chemical constituents in Sini decoction prepared by different extraction methods by HPLC-MS. **Method:** The Sini decoction was prepared by boiling water extraction method and combination of active parts method. C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted. The gradient mobile phase consisted of acetonitrile (containing 0.01% acetic acid) and 2 mmol·L⁻¹ ammonium acetate solution (containing 0.01% acetic acid) at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹; the column

[收稿日期] 20130709(012)

[基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(Z09LF31)

[第一作者] 王海燕,在读硕士,从事中药复方活性成分与质量控制研究, Tel:18354155988, E-mail:wanghaiyanml@163.com

[通讯作者] *容蓉,博士后,教授,从事中药复方活性成分与质量控制研究, Tel: 0531-89628593, E-mail:rosierong@163.com

- [4] 张忠立,左月明,杨雅琴,等. 栀子中的黄酮类化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):299.
- [5] 王欣,汪红,王强. 加杨雄花序的化学成分研究[J]. 中国药科大学学报,2000,31(3):171.
- [6] 马俊利,李春钢,张博男,等. 甜荞麦花叶化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):94.
- [7] 王涛,李超,濮社班,等. 泽兰的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):83.
- [8] Yadava R N, Singh A, Reddy K I S. Flavanone glycoside from seeds of *Crotalaria prostrata* [J]. J Inst Chem, 1999,71(6):231.
- [9] 胡永美,杜彰礼,汪豪,等. 芝麻花黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(7):603.
- [10] Liu Y L, Mabry T. Flavonoids from *Artemisia frigida* [J]. Phytochemistry,1981,20(6):1389.
- [11] 田璞玉,王金梅,康文艺. 华丽芒毛苣苔化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(23):1795.
- [12] 张杰,李林玺,刘绣华,等. 白沙蒿化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(2):238.

[责任编辑 邹晓翠]

temperature was 30 °C; the injection volume was 2 μL. MS conditions: positive mode, dryer flow rate: 10 L · min⁻¹, atomizing air pressure: 30 psi, debris voltage: 70 V. **Result:** 28 and 30 chemical constituents were identified in traditional water decoction and active ingredients combined decoction by HPLC-MS respectively. All of the constituents were classified according to their medicinal materials derivation. **Conclusion:** The experiment provide a basis for the determination of the active ingredients in Sini decoction.

[**Key words**] Sini decoction; HPLC-MS; qualitative analysis

四逆汤出自《伤寒论》，由炮附子、干姜、炙甘草 3 味药配伍而成，是中医治疗少阴虚寒、回阳救逆的经典名方。现代研究发现苯甲酰类乌头生物碱、挥发油及黄酮类是四逆汤抗心肌缺血及再灌注损伤、保护心肌的主要药效成分^[1-4]。目前对于四逆汤中化学成分的分析已有少量文献报道，多采用传统提取分离方法^[5-6]，显然难以系统的体现四逆汤中多类成分的复杂性、整体性。近年来，液质联用技术将液相色谱高效的分离能力与质谱的高选择性、高灵敏度的检测能力相结合，可以同时得到化合物的保留时间、相对分子质量以及特征结构碎片等丰富信息，有助于系统地表征四逆汤药效作用的物质基础、质量控制，在四逆汤化学成分分析研究中得到广泛使用^[7-8]。故本研究采用高效液相色谱-离子阱质谱联用的方法，对不同制法四逆汤及单味药提取液中成分进行定性分析，以期阐明不同制法四逆汤的化学组成。

1 仪器与试剂

液相色谱 (Agilent 1200)-质谱 (Agilent 6300 trap) 联用仪; 1/10 万电子天平 (瑞士梅特勒公司, AE240); 超声波清洗器 (群山超声仪器有限公司, KQ-250E); 国华恒温振荡器 (国华仪器有限公司, AG-230); 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂, RE-52C); 循环水式真空泵 (郑州长城科工贸有限公司, SHZ-D)。

药材黑附子、甘草、干姜均购于山东济南建联中药店，经山东中医药大学药系李峰教授鉴定为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根炮制加工品、干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rose. 的干燥根茎、甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎。色谱用水为娃哈哈纯净水，乙腈、甲醇、醋酸铵为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 各单味药水提液的制备 取黑附子、炙甘草粗粉各 12 g，干姜粗粉 8 g，分别加 10 倍量水回流提取 3 次，每次 1.5 h，过滤，合并滤液，浓缩至 60 mL，

即得各单味药的水提液。

2.1.2 各单味药有效部位的制备 黑附子酸水提取液的制备: 黑附子 24 g (过 20 目筛), 24 倍量 pH 1.0 的盐酸水振荡浸提 2 次, 每次 1.5 h, 过滤, 合并滤液^[9], 浓缩至 120 mL。

炙甘草碱水提取液的制备: 炙甘草粗粉 24 g (过 20 目筛), 20 倍量 0.3% 氨水-60% 乙醇加热回流提取 4 次, 每次 2 h, 过滤, 合并滤液^[10], 浓缩至 120 mL。

干姜提油后水溶液的制备: 干姜粗粉 16 g (过 20 目筛), 14 倍量水浸泡 3 h 后水蒸气蒸馏提取 5 h, 蒸馏后水溶液备用, 残渣加 6 倍量水煎煮 1 h, 煎液与上次蒸馏后水溶液合并^[11], 浓缩至 120 mL。

2.1.3 传统法四逆汤的制备 黑附子 12 g, 炙甘草 12 g, 干姜 8 g (均过 20 目筛)。8 倍量水泡 1 h, 煎煮 30 min, 过滤, 残渣加 6 倍量水煎煮 20 min, 过滤, 滤液合并, 浓缩至 60 mL, 冷藏备用。

2.1.4 有效部位组合液的制备 取 2.1.2 项下单味药提取液各 60 mL, 合并, 浓缩至 60 mL, 冷藏备用。

2.2 HPLC-MS 供试品溶液的制备 分别取 2.1 项下不同提取液各 1 mL, 85 °C 水浴蒸干, 用 70% 甲醇转移于 5 mL 量瓶中并定容至刻度, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过作为供试液。

2.3 HPLC-MS 分析条件 色谱条件: Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 流速 0.6 mL · min⁻¹; 进样量 2 μL; 流动相: A-乙腈 (含 0.01% 醋酸), B-2 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液 (含 0.01% 醋酸); 梯度洗脱条件: 0 ~ 90 min: A-B (5:95) → A-B (100:0)。

质谱条件: 正离子模式, 干燥器流速: 10 L · min⁻¹; 雾化气压力: 30 psi; 碎片电压: 70 V; 离子扫描模式: 正离子模式。

2.4 各样品溶液的 HPLC-MS 分析 取 2.2 项下各供试液, 按照 2.3 项下的色谱及质谱条件进样, 在已建立的四逆汤化学成分数据库基础上进行分析^[12], 不同提取方法制备的各单味药、四逆汤的 HPLC-MS

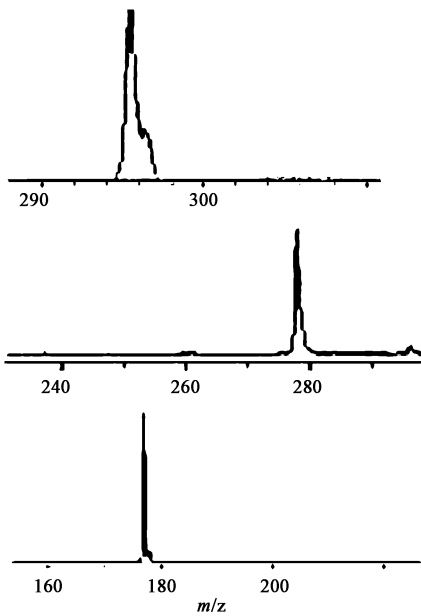


图1 四逆汤中6-姜酚一、二、三级质谱

定性分析结果见表1。

本实验根据质谱数据分析及文献报道^[12]共定性分析出附子水提液中22个化学成分,酸水提取液中25个化学成分;甘草水提液、氨醇提取液各定性出9个化学成分;干姜水提液、提油后水溶液中各定性出8个化合物;复方传统法提取液发现质谱峰66个,分析鉴定化合物28个,有效部位组合法发现质谱峰55个,分析鉴定化合物30个。以下为根据质谱数据对6-姜酚的定性分析过程,其一、二、三级质谱图见图1,裂解过程见图2),鉴定过程如下:

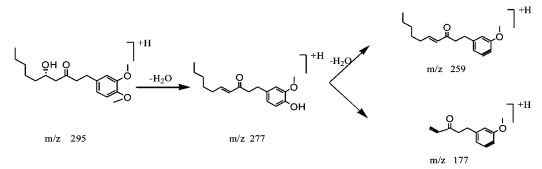


图2 四逆汤中6-姜酚裂解过程示意

表1 四逆汤中化学成分 HPLC-MS 分析鉴定

RT	m/z	化学式	化合物名称	中文名	四逆汤	四逆汤	单味药水提液			单味药有效部位提取液		
					传统水提液	有效部位组合液	附子	甘草	干姜	附子	甘草	干姜
1.3	325.5	C ₂₀ H ₂₁ O ₄	glabridin	光甘草定	√	√	-	√	-	-	√	-
3.7	267	C ₁₅ H ₂₃ O ₄	[4]-gingerol	4-姜辣素	-	√	-	-	√	-	-	√
8.6	486.2	C ₂₄ H ₄₀ NO ₉	mesaconine	新乌头原碱	√	√	√	-	-	√	-	-
9.8	378.1	C ₂₂ H ₃₆ NO ₄	karakoline	卡乌碱	-	-	√	-	-	√	-	-
10	408.2	C ₂₃ H ₃₈ NO ₅	talatizidine	塔拉定	-	-	√	-	-	√	-	-
10.5	500.3	C ₂₅ H ₄₂ NO ₉	aconine	乌头原碱	√	√	√	-	-	√	-	-
10.9	358.2	C ₂₂ H ₃₂ NO ₃	songorine	宋果灵	-	-	√	-	-	√	-	-
11.5	470.2	C ₂₄ H ₄₀ NO ₈	hyaconine	次乌头原碱	√	√	√	-	-	√	-	-
11.8	454.3	C ₂₄ H ₄₀ NO ₇	fuziline	附子灵	√	√	√	-	-	√	-	-
12.8	438.2	C ₂₄ H ₄₀ NO ₆	neoline	尼奥灵	√	√	√	-	-	√	-	-
14.1	484.3	C ₂₅ H ₄₂ NO ₈	4-N-acetyl-6-dideoxy-D-glucosyl 10-deoxymethanolide	4-N-乙酰基-6-O-D-葡萄糖基10-酒霉内酯	-	-	-	-	-	√	-	-
14.4	422.2	C ₂₄ H ₄₀ NO ₅	talatisamine	塔拉萨敏	√	√	√	-	-	√	-	-
14.6	427.3	C ₂₃ H ₃₃ O ₈	3,5-dihydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)heptane	3,5-二羟基-1,7-二(4-羟基-3,5-二甲氧基)庚烷	√	√	-	-	√	-	-	√
14.8	583.3	C ₃₂ H ₄₈ O ₈ Na	methyl-[4]-gingerol	4-甲基姜辣素	√	√	-	-	√	-	-	√
16.3	452.3	C ₂₅ H ₄₂ NO ₆	chasmanine	查斯曼宁碱	√	√	√	-	-	√	-	-
17.8	551.1	C ₂₆ H ₃₁ O ₁₃	neolicuroside	芹糖异甘草苷	√	√	-	√	-	-	√	-
17.9	257.1	C ₁₅ H ₁₃ O ₄	pinocembrin	松属素	√	√	-	√	-	-	√	-
18.5	588.4	C ₃₂ H ₄₆ NO ₉	benzoyldeoxyaconitine	苯甲酰脱氧乌头碱	√	√	√	-	-	-	-	-
18.8	606.4	C ₃₁ H ₄₄ NO ₁₁	10-OH-benzoylmesaconine	10-羟基-苯甲酰中乌头原碱	√	√	√	-	-	√	-	-
19	464.3	C ₂₆ H ₄₂ NO ₆	14-O-acetaltalatizamine	14-O-乙酰塔拉胺	-	-	√	-	-	√	-	-
22.4	590.4	C ₃₁ H ₄₄ NO ₁₀	benzoylmesaconine	苯甲酰中乌头原碱	√	√	√	-	-	√	-	-

续表 1

RT	m/z	化学式	化合物名称	中文名	四逆汤	四逆汤	单味药水提液			单味药有效		
					传统	有效部位	附子	甘草	干姜	部位提取液		
					水提液	组合液				附子	甘草	干姜
24.3	618	C ₃₂ H ₄₆ NO ₁₀	benzoylaconine	苯甲酰乌头原碱	√	√	√	-	-	√	-	-
25.5	616	C ₃₁ H ₄₄ NO ₉	benzoylhyapaconine	苯甲酰次乌头原碱	√	√	√	-	-	√	-	-
25.6	323.3	C ₂₀ H ₁₉ O ₄	licoflavone	甘草黄酮	√	-	-	√	-	-	√	-
28.3	648.3	C ₃₃ H ₄₆ NO ₁₂	beiwutine	北草乌碱	-	-	-	-	-	√	-	-
28.4	403.5	C ₂₁ H ₃₂ O ₆ Na	diacetoxy-[6]-gingerdiol	二乙酰基-6-姜醇	-	√	-	√	-	-	√	-
28.6	425.5	C ₂₅ H ₂₉ O ₆	gancaonin E	甘草宁 E	-	√	-	√	-	-	√	-
28.9	588.4	C ₃₂ H ₄₆ NO ₉	benzoyldeoxyaconitine	苯甲酰脱氧乌头碱	-	-	√	-	-	√	-	-
29.2	618.4	C ₃₃ H ₄₈ NO ₁₀	8-OEt-14-benzoylmesaconine	8-乙氧基-14-苯甲酰基中乌头原碱	-	-	-	-	-	√	-	-
29.8	556.3	C ₃₁ H ₄₂ NO ₈	3,3,6,6-tetramethyl-N-ethyl-9-(4-β-D-O pyranoid los pd-phenyl)- Ten hydrogen around totally-1,8-diketone	3,3,6,6-四甲基-N-乙基-9-(4-β-D-吡喃阿洛糖苷-苯基)-十氢吡啶-1,8-二酮	-	-	√	-	-	-	-	-
30.6	542.4	C ₃₁ H ₄₄ NO ₇	(6R, 25R)-5-O-demetil-28-deoxi-6, 28-epoxi-25-metil milbemicina	(6R, 25R)-5-O-二甲基-28-脱氧-6, 28-环氧树脂-25-甲基桔萆素	-	-	-	-	-	√	-	-
30.8	632.4	C ₃₃ H ₄₆ NO ₁₁	mesaconitine	新乌头碱	-	-	-	-	-	√	-	-
31.1	662.5	C ₃₄ H ₄₈ NO ₁₂	aconifine	10-羟基乌头碱	-	-	-	-	-	√	-	-
31.2	435.4	C ₂₃ H ₃₁ O ₈	3-acetoxy-5-hydroxy-1-(3, 4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) heptane	3-乙酰氧基-5-羟基-1-(3,4-二羟基-5-甲氧基)-7-(4-羟基-3-甲氧基)庚烷	√	-	-	-	√	-	-	√
32	616.4	C ₃₃ H ₄₆ NO ₁₀	hyapaconitine	次乌头碱	√	√	√	-	-	√	-	-
33.3	572.4	C ₃₁ H ₄₂ NO ₉	dehydrated benzoyl mesaconine	脱水苯甲酰中乌头原碱	-	-	√	-	-	-	-	-
33.8	493.5	C ₂₅ H ₃₃ O ₁₀	3, 5-diacetoxy-1, 7-bis (3, 4-dihydroxy-5-methoxyphenyl) heptan	3,5-二乙酰氧基-1,7-二(3,4-二羟基-5-甲氧基)庚烷	√	-	-	-	√	-	-	√
34.2	447.5	C ₂₄ H ₃₁ O ₈	3, 5-diacetoxy-1-(3, 4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) heptane	3,5-二乙酰氧基-1-(3,4-二羟基苯基)-7-(4-羟基-3-甲氧基)庚烷	√	√	-	-	√	-	-	√
34.5	600.4	C ₃₃ H ₄₆ NO ₉	isodelphinine	异翠雀碱	-	-	√	-	-	√	-	-
34.8	630.4	C ₃₄ H ₄₈ NO ₁₀	deoxyaconitine	脱氧乌头碱	√	√	√	-	-	√	-	-
35.3	269.1	C ₁₆ H ₁₃ O ₄	formononetin	芒柄花黄素	√	√	-	√	-	-	√	-
40.7	295.2	C ₁₇ H ₂₇ O ₄	[6]-shogaol	6-姜酚	-	√	-	-	√	-	-	√
42.2	406.5	C ₂₂ H ₃₁ O ₇	3, 5-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) heptane	3,5-二羟基-1-(4-羟基-3,5-二甲氧基)-7-(4-羟基-3-甲氧基)庚烷	√	√	-	-	√	-	-	√

续表1

RT	m/z	化学式	化合物名称	中文名	四逆汤	四逆汤	单味药水提液			单味药有效部位提取液		
					传统水提液	有效部位组合液	附子	甘草	干姜	附子	甘草	干姜
46.7	339.5	C ₂₀ H ₁₉ O ₅	gancaonin C	甘草宁 C	√	√	-	√	-	-	√	-
47.0	385.6	C ₂₁ H ₂₁ O ₇	gancaonin D	甘草宁 D	√	-	-	√	-	-	√	-
47.6	427.1	C ₂₂ H ₂₈ O ₇ Na	3-acetoxy-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)heptane	3-乙酰氧基-5-羟基-1-(4-羟基-3-甲氧基)-7-(3,4-二羟基苯基)庚烷	-	√	-	-	√	-	-	√
47.8	293.3	C ₁₃ H ₂₅ O ₇	1-dehydro-[6]-gingerol	1-脱氢[6]-姜酚	√	-	-	-	√	-	-	√
67.4	367.6	C ₂₁ H ₁₉ O ₆	neoglycyrol	新甘草酚	-	√	-	√	-	-	√	-

(“√”表示该化合物检出,“-”表示未检出)

6-姜酚相对分子质量为 294.2,得到 295 的 [M + H]⁺ 分子离子峰,295 离子峰脱一分子水得 277 碎片离子峰,其三级质谱分别脱去一分子水、1 个 C₅H₁₂ 中性碎片和一分子水形成 259,177 碎片离子峰。

3 小结与讨论

本次实验对单味药提取液、复方提取液在同一色谱和质谱条件下所得 HPLC-MS 总离子流图的分析结果发现,四逆汤传统提取液中有 66 个色谱峰与文献吻合,有 28 个色谱峰与已知化学成分相对应^[12],可以确认其中 14 个色谱峰来自黑附子,7 个色谱峰来自干姜,7 个色谱峰来自炙甘草。有效部位组合液中共发现 55 个色谱峰与文献吻合,有 30 个色谱峰与已知化学成分相对应^[12],其中 14 个色谱峰来自黑附子,8 个色谱峰来自干姜,8 个色谱峰来自炙甘草。分析四逆汤复方提取液 HPLC-MS 总离子流图,较之于单味药材提取液,未发现新的色谱峰。

本次实验传统法提取液比有效部位组合液中多发现 11 个色谱峰,说明传统群药水煎有利于成分的溶出。在已定性出的化合物中,传统法提取液中有 5 个成分在有效部位组合液中没有发现,有效部位组合液中有 6 个成分在传统提取液中没有发现。

离子阱质谱属时间串联质谱,离子扫描范围宽且可以进行多级质谱分析,对复杂的化合物具有很强的解析能力,有助于对未知化合物的解析,偏重于定性。故本次实验采用液相色谱-离子阱型质谱联用方法,对目标色谱峰选择目标质量离子通过碰撞解离得到二级或多级质谱图,对四逆汤中主要化学成分进行定性分析。

四逆汤不同方法提取液的 HPLC-MS 指纹图谱的建立过程中,分别考察了乙腈-水、甲醇-水体系、不同浓度的添加剂等因素对色谱峰分离的影响,结果发现

以乙腈-0.01 mol·L⁻¹醋酸铵溶液(含 0.1% 醋酸)为流动相体系,可实现主要色谱峰的基线分离。

[参考文献]

- [1] 贺金,方艳伟,李永民,等. 四逆汤对心肌缺血损伤的保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(7): 638.
- [2] 吴伟康,苏建文,林曙光,等. 四逆汤防治 PTCA 术后再灌注损伤的作用机制及中医辨证分型的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志,1999(19):23.
- [3] 王立岩,张大方,曲晓波. 附子炮制前后有效部位强心作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 34(12):35.
- [4] 黄雪松,宴日安,吴建中. 姜酚的生物活性述评[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2005, 26(3): 43.
- [5] 刘红霞,林文翰,王晓良,等. 四逆汤活性成分的研究[J]. 中华临床医药杂志,2003, 4(20): 5.
- [6] 刘红霞,林文翰,杨骏山. 复方四逆汤水煎剂的化学成分研究(I)[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 434.
- [7] 谭光国,朱臻宇,李翔,等. 中药复方四逆汤化学成分的分析[J]. 药学实践杂志,2009, 27(4):270.
- [8] 何雷萍,狄斌,杜迎翔,等. 4 种附子配伍方给药后大鼠血浆中 3 个乌头类生物碱的药理学比较[J]. 中国药科大学学报, 2012, 41(1): 55.
- [9] 李书华,陈封政,黄晓辉,等. 附子中生物碱正交提取工艺和吸附树脂的筛选研究[J]. 中成药, 2010(8): 1419.
- [10] 赵炜镭,师清芝,唐星. 甘草中甘草酸和甘草苷的提取纯化工艺研究[J]. 中国药房, 2009, 20(6): 426.
- [11] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等. 正交法优选干姜挥发油提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3):19.
- [12] 李翔. 四逆汤化学成分和抗心肌缺血作用的研究[D]. 上海:第二军医大学, 2008.

[责任编辑 邹晓翠]