

• 药剂 •

## 桂枝汤 A 部分有效成分指纹图谱归属(二)

曹 进<sup>1</sup>, 戴德舜<sup>1</sup>, 王义明<sup>1</sup>, 罗国安<sup>1</sup>, 孙玉茹<sup>2</sup>  
霍海如<sup>2</sup>, 孙友富<sup>2</sup>, 姜廷良<sup>2</sup>  
(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:** 利用 LC/MS 联用技术对桂枝汤 A 部分及组成桂枝汤的五味单味药的 A 部分进行了多维全息化学特征谱的指认。通过质谱的质荷比(M/Z)值及高效液相色谱中峰保留时间的相互对照, 将桂枝汤 A 部分中的主要成分进行了归属, 方法重现性好, 准确性高。

**关键词:** 桂枝汤 A 部分; 多维全息化学特征谱

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)03-0001-04

### Assignment of Components in Active Fraction A of *Guizhitang* by Fingerprint Profile( II)

CAO Jin<sup>1</sup>, DAI De-shun<sup>1</sup>, WANG Yi-min<sup>1</sup>, LUO Guo-an<sup>1</sup>  
SUN Yu-ru<sup>2</sup>, SUN Youfu<sup>2</sup>, HUO Hai-ru<sup>2</sup>, JIANG Ting-liang<sup>2</sup>

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

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

**Abstract:** The components in fraction A of *Guizhitang* which contained five herbal medicines, i. e. ramulus cinnamomi, radix paeoniae alba, rhizoma zingiberis recens and fructus jujubae, were assigned by comparison of corresponding part of each herbs with HPLC-MS method. From the ionic fragments of MS and the retained time of each peaks in HPLC, the main component of fraction A were assigned.

**Key words:** Active fraction A of *Guizhitang*; HPLC-MS

### 1 引言

桂枝汤是《伤寒杂病论》中的群方之魁, 主要作用为解肌发表、调和营卫。由桂枝、芍药、生姜、炙甘草和大枣五药组成, 虽为解表之剂, 亦属助阳滋阴之方<sup>[1]</sup>。中医学认为: 其中桂枝、芍药主调和营卫; 桂枝、生姜主卫; 芍药、大枣主营; 桂枝伍甘草辛甘合化为阳; 芍药配甘草酸甘合化为阴, 五药相伍, 以调和气血阴阳表里, 使机体恢复阴平阳秘的状态。根据先前的研究中可知桂枝汤的有效部分 A 对大鼠体温有双向调节作用, 并发现方中君药桂枝、臣药芍药既能解热又能使体温加速恢复, 甘草亦呈一定的双向作用; 然而生姜仅能促进低体温恢复, 大枣仅有较弱的解热, 同时桂枝、芍药和甘草的双向调节作用较之全方均较弱; 另外, 经药对的药效学试验发现, 仅桂枝与芍药配伍有较弱的双向作用。因此说明了各个单味药中的部分 A 之间必然形成了具有双向调节的

有效部分群。全方的体温双向调节作用是由几个单味药配合而产生的综合效果。这样就有必要对复方 A 部分各个单味药 A 部分进行对应指认, 以确认复方中是否产生了新的化合物或保留了单味药的那些主要成分, 各个单味药中的化合物在复方中是否全部存在, 这将为进一步的分离鉴定提供一定依据。

本文从实际出发对具有双向调节作用的桂枝汤 A 部分、五个单味药 A 部分以及各单味药 A 按照收率和组方的用量配比制得的 A 部分进行了指纹图谱的测定, 将主要成分的来源进行了归属的探讨, 并且就其质量控制进行了阐述。本文力图用 HPLC/MS/MS 等对有效部分进行成分分离分析后, 建立指纹图谱供定性鉴别, 将指纹图谱阐述为多维全息化学特征谱, 亦即用保留时间, 峰响应, 全紫外波长扫描, 母离子 M/Z 值, 特征碎片 M/Z 值等多个参数描述图谱信息, 用一个综合指数标定质量, 建立对全谱的质量控制标准。本文系阶段性研究成果, 仅采用了保留时间, 峰响应及母离子 M/Z 值进行表达, 同时选择在

一定浓度下的图谱中特征成分峰响应比作为定量指标。这样通过有效部分、药效相结合,在药物(复方、药材)、有效部分之间的两个化学层次,对全方A部分的质量控制,及有效成分鉴定提供了方法和一定的物质基础,希望能通过单味药与全方A部分的比较,找到其最终有效部分,乃至成分,以利于下一步提取<sup>[1-4]</sup>。

## 2 实验

**2.1 实验仪器及试剂** Beckman公司的GOLD系统化学工作站,包括406型接口板、166型紫外检测器、110B型高压液相泵、系统混匀器。Perkin Elmer公司的API 3000型LC/MS/MS液质联用仪。天津特纳250mm×4.6mm, Kromasil 5μ的C18 HPLC柱, C18 5μ的预柱。HPLC级乙腈(Fisher公司)二次蒸馏水(自制)

桂枝汤A部分双向调节作用样品由中国中医研究院中药研究所提供。

单味药A部分自制,并按照产率和组方配成有效部分A样品。单味药由中国中医研究院中药研究所提供,包括大枣、炙甘草、芍药、桂枝、生姜,经鉴定,质量均等于或优于95版药典标准。

## 2.2 实验方法

1) 桂枝汤有效部分A、单味药A部分以及组配的A部分分离的HPLC梯度条件(Beckman仪器条件):

流速: 0.5ml/min, 检测波长: 254nm, 进样量: 20μl							
	0	5	20	25	100	105	120(min)
水(%)	90	90	80	80	50	0	0
乙腈(%)	10	10	20	20	50	100	100

2) 桂枝汤有效部分A分离的正负离子MS条件:(LC/MS中梯度条件见《桂枝汤A部分指纹图谱的确定和比较》一文)

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 条件确定** 首先在桂枝汤A部分双向调节样品的指纹谱鉴定,利用理论塔板数及每个主峰所含分子量和分子量数目的双重指标,进行了条件的确立和方法的重建,使其不与上次测定有大的差异,以保证指纹谱测定的可靠性。另外针对不同的高效液相色谱系统,及时调整条件(包括梯度时间及陡度),使出峰最佳,并且不致引起出峰顺序的变化。

**3.2 提取工艺的确认** 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,乙醚提取去脂溶性部分,酸水层用10% NH<sub>4</sub>OH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。本文对桂枝汤A部分双向样品的制备过程进行了讨论和验证,通过大鼠药效实验认定了提取工艺的可靠性。单味药A部分的制备与上述方法相同。本文对药材质量进行了固定化,在保证提取工艺的稳定性基础上,得到了单味药A部分,并试图作为全过程质量跟踪的监控方法的基础,整体试验尚需进一步完成。

**3.3 测定结果的讨论** 经双向调节作用样品(简称全方A)、各个单味药A部分以及按照产率和组方配成有效部分A(简称配A)的多维全息化学特征谱的测定(参见图1~7,仅附HPLC图谱,LC/MS图见《桂枝汤A部分指纹图谱的确定和比较》一文)后,发现桂枝、芍药、甘草的大多数峰在全方A部分指纹谱中存在,但同浓度下显示的响应值,全方谱与三个单味药之间有较大差异;生姜及大枣的色谱峰则在全方谱中显示较弱,由于在确定整个方法时考虑了响应值与含量的关系(见前文),因此响应值在一定程度上反映了含量的多少,可以肯定的是桂枝、芍药、甘草三味药的提取物在全方中含量较多,而生姜及大枣中的物质则较少进入全方,另外通过LC/MS指纹谱的分析也证明了这一点;经观察发现,在全方谱中,有少数峰在单味药谱中比对不出,而单味药中亦有不少峰在全方谱中显示不出,特别是生姜及大枣较为明显,这些说明在药物煎煮,提取过程中,各物质之间相互助溶、促溶、阻溶以及萃取率的不同,产生复配反应等各种复杂的物理和化学过程,使得最终结果产生了较为复杂的局面。但这一结果肯定了

对单味药及药对进行的药效研究的结论,即桂枝、芍药、甘草三味药有双向调节作用,但不如全方强,全方的双向作用来自多味药物的相互作用。单味药A部分与配A的液相色谱图信息表明两者之间在量和物质对应关系上关系依然不清晰,大枣和甘草进入该方配A较多,说明在药效作用中同样不能忽略两者因素,同时揭示了中药复方的协同作用和因此说明了各个单味药中的部分A之间必然形成了具有双向调节的有效部分群。

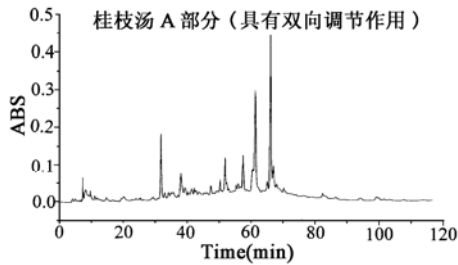


图1 具有双向调节作用的桂枝汤A部分色谱图

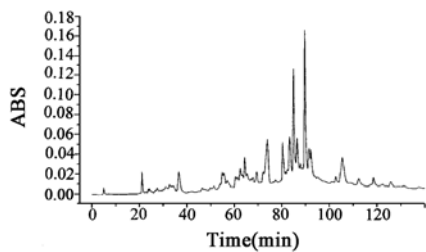


图2 按照产率和组方配成有效部分A色谱图

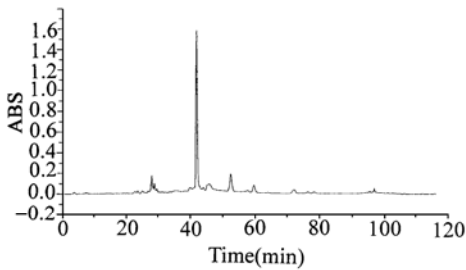


图3 桂枝A部分色谱图

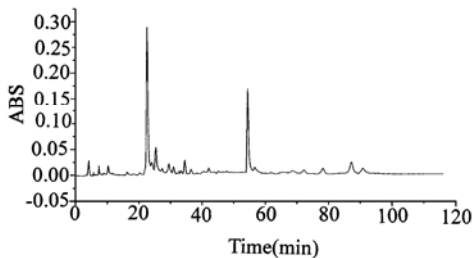


图4 芍药A部分色谱图

#### 4 结论

从结果看,桂枝汤A部分对体温的双向调节作用,来自于物质之间复杂的物理化学作用,这点仍需从单味药与全方之间的谱图对比,找出物质差异,通过对其的制备,最终确定相互作用的物质基础。多

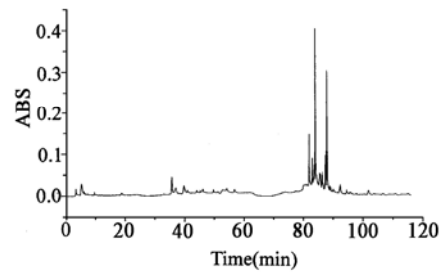


图5 大枣A部分的色谱图

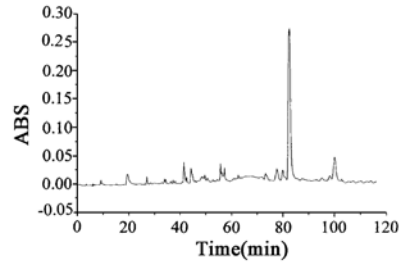


图6 生姜A部分色谱图

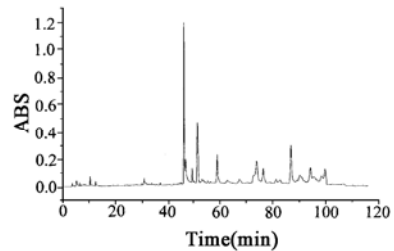


图7 甘草A部分色谱图

维全息化学特征谱提供的大量信息较好地反映了复方药物及单味药的物质信息,它所显示的各个参数如能配合一定指标成分的信息将成为复方质量控制有效指标,并可在一定程度上可作为药效特征的有力指针。同时结论的复杂性提示对物质基础的分离分析应充分结合对制备工艺的探讨及论证,以及单味药材的全过程质量跟踪,以抓住各个变化点,从而才能有在稳定的药效基础上的,具有稳定物质基础的中药复方。

#### 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): 12-15.

- [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, 1999, 2, 19(2): 115-116.
- [9] 罗佳波, 余林中, 谭晓梅. 方剂配伍规律研究思路 [J]. 中药药理与临床, 1999, 15(3): 48-49.
- [10] 王忠, 杨明均. 中药复方药理群论、层次论和优化论模型 [J]. 中药药理与临床, 1998, 14(3): 44-46.
- [11] 祝世讷. 中药方剂现代研究的两条道路 [J]. 山东中医药大学学报, 1997, 21(5): 322-326.