

★论著★

ESI-MS和HPLC-UV法研究大黄、黄柏、赤芍炮制前后化学成分变化*

周慧^{1,2}, 宋凤瑞^{1*}, 刘志强¹, 郑毅男², 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022 2. 吉林农业大学, 长春 130118)

摘要 目的: 考察大黄、黄柏、赤芍炮制前后化学成分在质和量方面的变化, 以探讨中药的炮制机理。方法: 利用电喷雾质谱法(ESI-MS)和高效液相色谱法(HPLC-UV), 对大黄、黄柏、赤芍炮制前后的化学成分进行详细研究。质谱: 电喷雾电离源(ESI), 加热毛细管温度为 200 °C, 喷雾电压为 4.5 kV; 液相色谱: 色谱柱为 Agilent Zorbax C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温均为 28 °C。结果: 大黄经酒制和醋制后, 其化学成分的含量变化较大; 黄柏经酒制后巴马汀的含量略有增加, 而小檗碱的含量呈下降趋势; 盐制对于黄柏的化学成分几乎无影响; 赤芍经酒制和炒制后, 芍药苷的含量都呈下降趋势。结论: 不同炮制方法对化学成分的影响不同, 为进一步阐明中药材炮制入药的科学内涵提供了实验依据。

关键词: 大黄; 黄柏; 赤芍; 炮制; ESI-MS; HPLC-UV

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)06-0883-06

Studies on the components of unprocessed and processed Radix et Rhizoma Rhej Cortex Phellodendri and Radix Paeoniae Rubra by HPLC-UV and ESI-MS*

ZHOU Hu^{1,2}, SONG Feng-ni^{1*}, LIU Zhi-qiang¹, ZHENG Yi-nan², Liu Shu-ying¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

2. Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China)

Abstract Objective To analyze the main chemical components existed in the unprocessed and processed Radix et Rhizoma Rhej Cortex Phellodendri and Radix Paeoniae Rubra **Methods** The analysis was carried out by ESI-MS and HPLC-UV methods MS electrospray ionization source; heated capillary temperature of 200 °C, spray voltage of 4.5 kV; LC Agilent Zorbax C₁₈ column(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), column temperature 28 °C. **Results** The contents of chemical components in Radix et Rhizoma Rhej were different between samples processed with wine and vinegar. The content of palmatine in Cortex Phellodendri was increased and the content of berberine was decreased in sample processed with wine, but there was no difference between Cortex Phellodendri unprocessed and processed with salt. The content of paeoniflorin was decreased in processed Radix Paeoniae Rubra **Conclusion** Different processed methods are making a certain different influence on the contents of chemical components in Radix et Rhizoma Rhej Cortex Phellodendri and Radix Paeoniae Rubra

Key words Radix et Rhizoma Rhej Cortex Phellodendri; Radix Paeoniae Rubra; processing technique; ESI-MS; HPLC-UV

中药炮制是根据中医药理论, 依照辨证施治用药需要和药物自身性质, 以及调剂、制剂的不同要求, 所采取的一项制药技术, 这一传统制药技术是根据大量人体临床实践经验得出的, 是中华民族历代

医家智慧的结晶^[1]。运用现代科学技术手段, 系统研究药材炮制前后化学成分的变化规律, 对于揭示中药炮制的科学内涵和化学物质基础具有非常重要的理论意义和应用价值。

* 国家自然科学基金(N o. 30472134); 吉林省科技发展计划重点项目(N o. 20060902)资助

** 通讯作者 Tel: (0431)85262613 E-mail: songfn@ciac.jl.cn

电喷雾质谱 (electrospray ionization mass spectrometry, ESI) 作为一种先进的软电离质谱技术, 由于其样品处理简单、分析速度快且灵敏度高、实验重复性好, 适宜于进行中药材化学成分鉴定^[2-4]。本研究采用 ESI 技术并结合 HPLC 对大黄、黄柏、赤芍炮制前后的主要化学成分的变化进行系统研究, 为探讨中药炮制的药效物质基础提供科学依据。

1 仪器、试剂与药材

Finnigan LCQTM 离子阱质谱仪 (美国 Thermo 公司); Waters 2695 HPLC 仪, 配备 2996 二极管阵列检测器, Empower Pro 工作站; Sanorius BS110S 分析天平 (北京赛多利斯有限公司, 十万分之一); KQ-500DE 医用超声波清洗器 (昆山超声波仪器厂)。

乙腈、磷酸、甲醇均为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 水为二次去离子水。

对照品芦荟大黄素 (批号: 0795-9803)、大黄酸 (批号: 757-200005)、大黄素 (批号: 110756-200110)、大黄酚 (批号: 110796-200311)、大黄素甲醚 (批号: 758-200006)、巴马汀 (批号: 0732-00005)、盐酸小檗碱 (批号: 110713-200208)、芍药苷 (批号: 110736-200628) 均购自中国药品生物制品检定所; 生品药材大黄、黄柏、赤芍于 2007 年 6 月购自北京同仁堂, 经长春中医药大学王淑敏教授鉴定。黄酒、食醋、食盐均为市售品。

2 不同炮制品的制备

取各药材生品按 2005 年版中国药典^[5]方法炮制。

2.1 酒大黄、酒黄柏、酒赤芍 取各生品用黄酒喷淋, 拌匀, 闷润至黄酒全部被吸尽, 置热锅内, 用文火微炒至表面色泽加深, 微带焦斑时取出, 晾干, 即得 (药材与黄酒的比例为 100:10)。

2.2 醋大黄 取净大黄用食醋喷淋, 拌匀, 闷润至食醋全部被吸尽, 置热锅内, 用文火微炒至表面色泽加深, 略带焦斑时取出, 晾干, 即得 (药材与食醋的比例为 100:20)。

2.3 盐黄柏 取净黄柏丝, 每 100 g 加 10% 食盐水溶液 20 mL, 拌匀, 闷润至盐水被吸尽, 文火炒至表面深黄色, 有少量焦斑, 取出放凉, 即得。

2.4 炒赤芍 取赤芍 100 g 用文火炒至颜色微黄, 取出, 备用。

3 溶液的制备

3.1 供试品溶液 本实验分别考察以下供试品溶液制备条件: 提取溶剂类型 (甲醇、乙醇、60% 乙醇)、溶剂用量 (10、30、50 mL)、提取方法 (回流、超

声、热浸方法) 及提取时间 (30、60、90 min), 通过 HPLC 分析结果, 确定的制备方法如下: 取各药材生品及炮制品粉碎后过 40 目筛, 精密称取 0.5 g 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 30 mL, 超声 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得供 HPLC-UV 法用供试品溶液。取上述供试品溶液适量, 用甲醇稀释 10 倍后, 漩涡振荡 1 min, 即得供 ESI-MS 法用供试品溶液。

3.2 对照品溶液 分别取对照品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、巴马汀、盐酸小檗碱和芍药苷适量, 精密称定, 分别加甲醇制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的单一成分溶液, 即得供 HPLC-UV 法用对照品溶液; 取上述对照品溶液适量, 用甲醇稀释 10 倍后, 漩涡振荡 1 min, 即得供 ESI-MS 法用对照品溶液。

4 结果与讨论

4.1 实验条件优化

4.1.1 质谱条件 根据待测化合物的分子结构特征, 选择电喷雾电离 (ESI) 源, 在负离子模式下对大黄生品及炮制品的供试品溶液进行一级质谱分析; 在正离子模式下对黄柏、赤芍的生品及炮制品的供试品溶液进行一级质谱分析。根据各供试品溶液中主要成分的特征准分子离子峰对金属加热毛细管电压、电喷雾电压、壳气流速及碰撞能量等质谱参数进行优化, 使各供试品溶液中特征化合物的准分子离子峰的灵敏度达到最大时定为最佳质谱条件。优化后的质谱条件为: 金属加热毛细管温度 200 °C; 毛细管电压 10 V; 电喷雾电压 4.5 kV; 壳气为氮气, 壳气流速 60 arb; 碰撞能量为 10% ~ 20%; 注射泵流动进样, 流速 5 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。每次实验数据均进行 100 次扫描累加的处理, 以进行炮制前后样品中各主要成分的比较。

4.1.2 色谱条件 对安捷伦、沃特斯等不同公司、不同型号的色谱柱进行了色谱柱选择性实验, 最终选择 Agilent Zorbax C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。通过考察流动相、柱温、洗脱流速, 确定的色谱条件如下: 柱温均为 28 °C。大黄: 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (85:15), 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm; 黄柏: 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液 (27:73), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 265 nm; 赤芍: 流动相为乙腈-水 (80:20); 流速 0.5 mL·min⁻¹; 检测波长 230 nm。进样量 10 μL 。

4.2 大黄生品及炮制品的 ESI-MS 定性分析 将

大黄生品及炮制品按“3.1”项下方法制备溶液后,用电喷雾质谱进行分析,结果示于图 1- A、B、C。本文主要考察中国药典含量测定中规定的 5 种成分: 芦荟大黄素 (芦荟大黄素 (m/z 269), 大黄酸 (m/z 283), 大黄酚 (m/z 253), 大黄素甲醚 (m/z 289)。由于图中的质谱峰是准分子离子峰, 质谱实验数据表明, 大黄酒制和醋制后本文所考察的上述 5 种成分并未发生根本性变化, 只是各成分相对丰度变化较大。

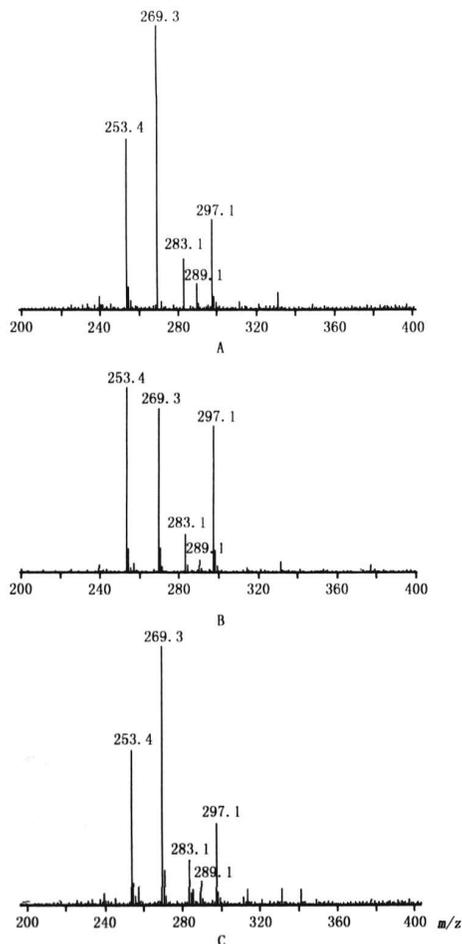


图 1 生品大黄 (A)、酒大黄 (B) 及醋大黄 (C) 的质谱图

Fig 1 Mass spectra of unprocessed Radix et Rhizoma Rhei (A), Radix et Rhizoma Rhei processed with wine (B), and Radix et Rhizoma Rhei processed with vinegar (C)

4.3 大黄生品及炮制品的 HPLC 定量分析 将大

表 1 大黄生品及炮制品所含化学成分的含量 (%)

Tab 1 The contents of chemical components of unprocessed and processed Radix et Rhizoma Rhei

样品 (sample)	芦荟大黄素 (aloe-emodin)	大黄酸 (rhein)	大黄素 (emodin)	大黄酚 (chrysophanol)	大黄素甲醚 (physcion)
大黄 (Radix et Rhizoma Rhei)	0.11	0.28	0.13	0.68	0.29
酒大黄 (Radix et Rhizoma Rhei processed with wine)	0.13	0.32	0.13	0.53	0.24
醋大黄 (Radix et Rhizoma Rhei processed with vinegar)	0.12	0.37	0.15	0.65	0.25

黄生品及炮制品的供试品溶液按大黄的色谱条件进行 HPLC 分析, 图 2 为大黄的色谱图, 经过与对照品色谱图对照, 得知: 1 号峰为芦荟大黄素, 2 号峰为大黄酸, 3 号峰为大黄素, 4 号峰为大黄酚, 5 号峰为大黄素甲醚。各化学成分的含量见表 1。表 1 结果表明, 炮制后芦荟大黄素、大黄酸的含量均有不同程度的增加, 其中, 酒制后分别增加了 0.02%, 0.04%; 醋制后大黄酸、大黄素的含量分别增加了 0.09%, 0.02%; 而炮制后大黄酚和大黄素甲醚的含量均较生品降低, 但不同的是各化学成分含量变化的比例不同。综合质谱与液相色谱的分析结果, 可初步推断大黄在炮制过程中, 由于不同程度的加热及配合不同的辅料处理后, 各成分的含量发生变化, 因而改变了生大黄固有的药性和功效, 使其攻下改变为缓下或无泻下作用, 有的还发挥了其他方面的作用, 如酒大黄具有了清热解毒的作用, 醋大黄具有活血化瘀的功效。

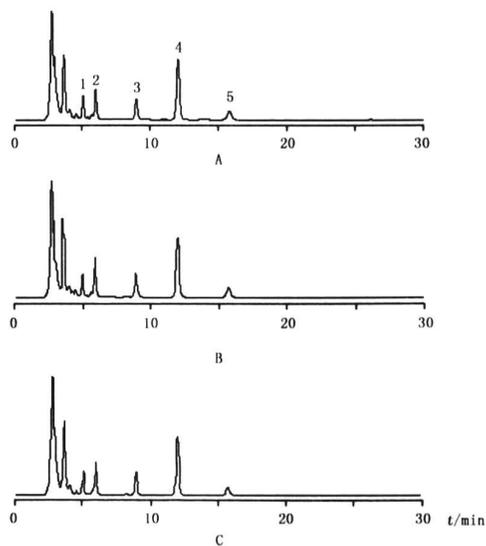


图 2 生品大黄 (A)、酒大黄 (B) 及醋大黄 (C) 的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of unprocessed Radix et Rhizoma Rhei (A), Radix et Rhizoma Rhei processed with wine (B), and Radix et Rhizoma Rhei processed with vinegar (C)

1. 芦荟大黄素 (aloe-emodin) 2. 大黄酸 (rhein) 3. 大黄素 (emodin) 4. 大黄酚 (chrysophanol) 5. 大黄素甲醚 (physcion)

4.4 黄柏生品及炮制品的 ESI-MS 定性分析 分别将生品黄柏、酒黄柏、盐黄柏的供试品溶液按质谱条件依次进行 ESI-MS 分析, 结果见图 3- A、B、C。 m/z 336 为小檗碱的准分子离子峰, m/z 352 为巴马汀的准分子离子峰。黄柏经炮制后未检测到有新化合物生成。

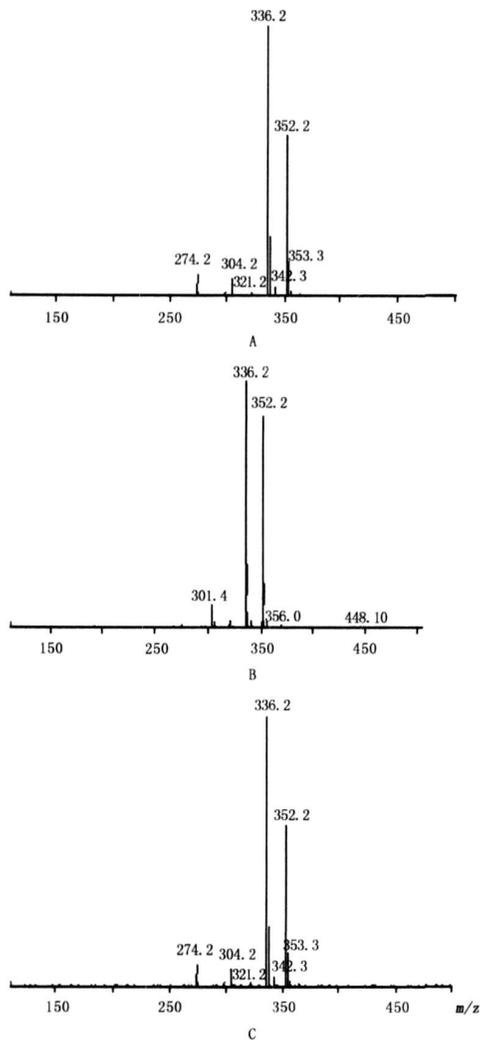


图 3 生品黄柏 (A)、酒黄柏 (B) 及盐黄柏 (C) 的质谱图
Fig 3 Mass spectra of unprocessed Cortex Phellodendri (A), Cortex Phellodendri processed with wine (B), and Cortex Phellodendri processed with salt (C)

4.5 黄柏生品及炮制品的 HPLC 定量分析 将黄柏生品及炮制品的供试品溶液按黄柏色谱条件进行 HPLC 分析, 图 4 为黄柏的色谱图, 经过与对照品色谱图对照, 得知: 1 号峰为巴马汀, 2 号峰为小檗碱, 黄柏药材炮制前后各成分的含量见表 2。通过 ESI-MS 和 HPLC 数据综合分析可知, 黄柏经炮制后未检测到有新化合物生成, 但酒制品中巴马汀的含量较生品略有提高。可能是因为黄柏经过酒制后, 增

加了黄柏中巴马汀的溶出, 说明了黄柏炮制的化学意义。另外, 盐制黄柏中化学成分与生品相当。据报道本品生用清热泻火力较强, 盐制后引药下行入肾, 助其滋肾降火^[6]。这正是大多中药饮片盐制的意义所在。如能采用药代动力学对指标性成分在肾脏的聚集等综合指标说明“盐制入肾”的科学内涵, 将更有助于阐明盐制中药改变疗效的物质基础。

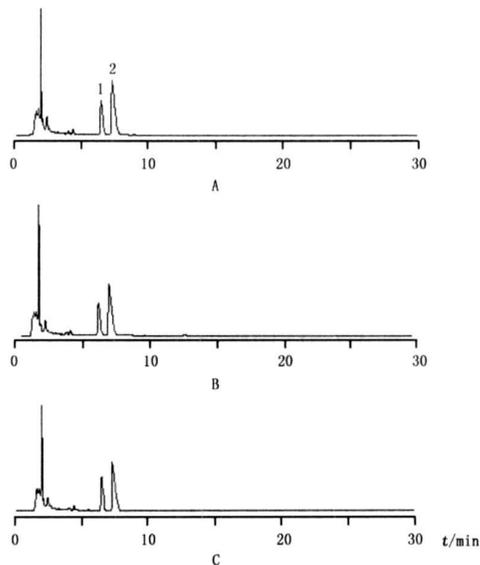


图 4 生品黄柏 (A)、酒黄柏 (B) 及盐黄柏 (C) 的高效液相色谱图
Fig 4 HPLC chromatograms of unprocessed Cortex Phellodendri (A), Cortex Phellodendri processed with wine (B), and Cortex Phellodendri processed with salt (C)
1. 巴马汀 (palmatine) 2. 小檗碱 (berberine)

表 2 黄柏生品及炮制品所含化学成分的含量 (%)
Tab 2 The contents of chemical components of unprocessed and processed Cortex Phellodendri

样品 (sample)	巴马汀 (palmatine)	小檗碱 (berberine)
黄柏 (Cortex Phellodendri)	0.25	0.58
酒黄柏 (Cortex Phellodendri processed with wine)	0.26	0.51
盐黄柏 (Cortex Phellodendri processed with salt)	0.25	0.57

4.6 赤芍生品及炮制品的 ESI-MS 定性分析 分别将生品赤芍、酒赤芍、炒赤芍按质谱条件依次进行 ESI-MS 分析, 结果见图 5- A、B、C。 m/z 503 代表芍药苷的钠离子化峰, m/z 519 代表羟基芍药苷的钠离子化峰。从图中可以看出赤芍炮制前后主要化学成分与炮制前相同。

4.7 赤芍生品及炮制品的 HPLC 定量分析 将赤芍生品及炮制品的供试品溶液按赤芍色谱条件进行 HPLC 分析, 图 6 为赤芍色谱图, 经过与对照品色谱图对照, 得知: 1 号峰为芍药苷。赤芍药材炮制前后

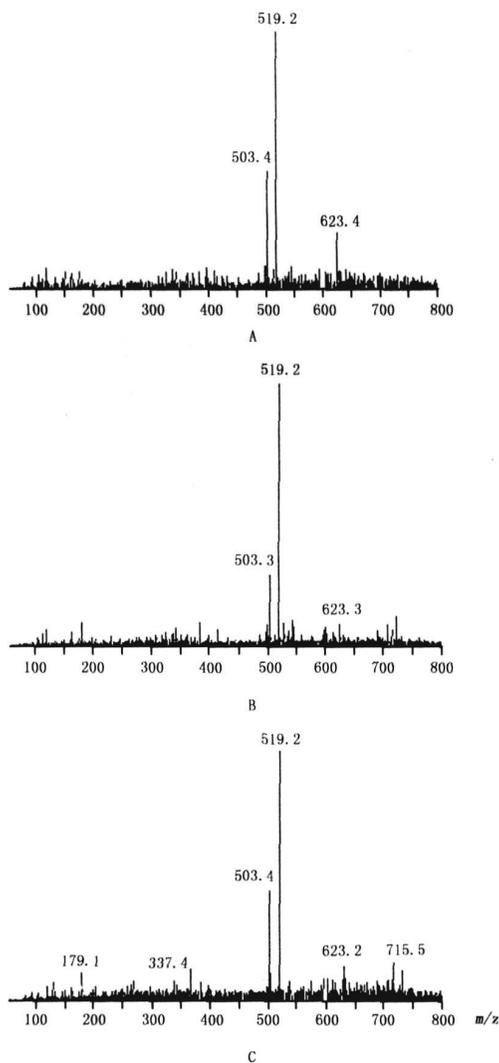


图 5 生品赤芍 (A)、酒赤芍 (B) 及炒赤芍 (C) 的质谱图
Fig 5 Mass spectra of Radix Paeoniae Rubra (A), Radix Paeoniae Rubra with wine (B), and Parched Radix Paeoniae Rubra (C)

芍药苷的含量见表 3。HPLC 的实验结果表明: 赤芍炮制后芍药苷含量均下降, 但降低幅度不一; 炮制后芍药苷的含量: 生品 > 炒制品 > 酒制品。炮制后芍药苷的减少, 是由于芍药苷不稳定, 具挥发性, 而炮制过程中由于温度较高, 使部分芍药苷损失。因此, 芍药苷在不同程度上有所减少, 使芍药性稍缓, 以养血敛阴为主。

表 3 赤芍生品及炮制品所含化学成分的含量 (%)
Tab 3 The contents of chemical components of unprocessed and processed Radix Paeoniae Rubra

样品 (sample)	芍药苷 (paeoniflorin)
赤芍 (Radix Paeoniae Rubra)	8.50
酒赤芍 (Radix Paeoniae Rubra processed with wine)	7.50
炒赤芍 (Parched Radix Paeoniae Rubra)	8.07

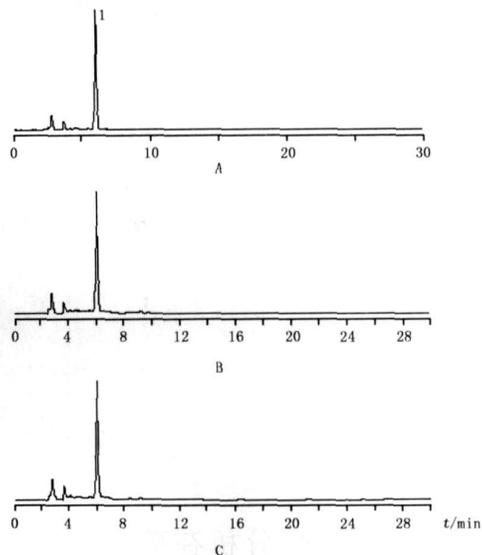


图 6 生品赤芍 (A)、酒赤芍 (B) 及炒赤芍 (C) 的高效液相色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms of unprocessed Radix Paeoniae Rubra (A), Radix Paeoniae Rubra processed with wine (B), and Parched Radix Paeoniae Rubra (C)

1. 芍药苷 (paeoniflorin)

5 结论

本文论述的中药炮制手段包括酒制、醋制、盐水制、炒制。通过实验表明炮制并未改变大黄、黄柏、赤芍中本文所考察化学成分的种类, 但却影响其不同化学成分的溶出率, 进而改变了原药材的药效, 初步探讨了中药炮制的化学物质基础。ESI-MS 和 HPLC-UV 法都比较迅速、简便, 重现性好。特别是质谱图谱, 可以直观地对比中药炮制前后化学成分的变化, 能准确地反映中药炮制的内在信息, 在中药研究领域具有更大的应用前景。

参考文献

- 1 MAO Shu-ji (毛淑杰). Preliminary exploration on essence of intrinsic change of Chinese medicines through preparation (中药炮制机理初探). *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med* (世界科学技术-中医药现代化), 2003, 5(5): 59
- 2 WANG Yong (王勇), SONG Feng-ni (宋凤瑞), JIN Dong-ming (金东明), et al Studies on the Aconitum alkaloids in the Sini decoction by electrospray ionization mass spectrometry (复方中药四逆汤中乌头碱类二萜生物碱的电喷雾串联质谱研究). *Chin J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2004, 25(1): 85
- 3 YU Zhan (于湛), YAN Cun-yu (闫存玉), SONG Feng-ni (宋凤瑞), et al Investigation of chiral recognition of heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin to menthol enantiomers by electrospray mass spectrometry [-(2,6-di-O-甲基)-β-环糊精对薄荷醇对映受体手性识别的电喷雾质谱研究]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2006, 34(5): 671

- 4 LILi(李丽), LIU Chun-ming(刘春明), WU Wei(吴巍), et al. Analysis of saponins in extract of Panax ginseng and Panax quinquefolium by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry(高效液相色谱-电喷雾质谱联用法测定人参和西洋参的皂苷类成分). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2005, 33(8): 1087
- 5 ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): Appendix(附录) II D
- 6 ZHANG Chun-ling(张春玲), WANG Xiao-jun(王晓军). The application of salt in processing traditional Chinese medicine(食盐及盐炙法在中药炮制中的应用). *J Gansu Coll Tradit Chin Med* (甘肃中医学院学报), 2003, 20(4): 46
(本文于 2008 年 11 月 26 日修改回)

热分析在药物及药用材料中的应用学术研讨会征文通知

随着现代科学仪器的发展,热分析在药物及药用材料领域中的应用越来越广泛,中国药典、日本药局方、美国药典、英国药典 2009 年版均收录了热分析方法。在化学药物、生化药物、抗生素、中药化学、药物包装材料、药物质量评价、新药研究中处方筛选及有关制剂的质量分析等方面,热分析法都起着非常重要的作用。为此,药物分析杂志编委会定于 2009 年第四季度在苏州召开全国药物分析及药用材料热分析法学术研讨会。此次会议由江苏省食品药品检验所承办,江苏省热分析专业委员会协办,会上拟请有关专家作专题报告,并开展有关专题讨论。现将会议征文及有关事宜通知如下:

一、征文内容

热分析法在药物研究中的应用;热分析法在药物检验中的应用;热分析法在化学药物、生化药物、抗生素、中药化学及对照品、标准品中的应用;在药物制剂、药用辅料及药物包装材料中的应用;热分析仪器最新进展。

二、论文撰稿要求

- 1 论文应是未公开发表的。综述文章一般不超过 5000 字;研究论文一般不超过 3000 字;每篇文章需附 800 字摘要。并登录 www.ywfxzz.cn 网上投稿(注:“期刊栏目”请选“2009 热分析会议征文”)。
- 2 论文格式请按药物分析杂志 2009 年第一期稿约要求书写;稿件可打印在 A4 上。
- 3 每篇稿件需附单位介绍信及 50 元稿件处理费。
- 4 征文截止日期 2009 年 8 月 30 日(以邮戳为准)。
- 5 论文将在 2009 年药物分析论坛上进行交流,经专家审定后在本刊发表,并酌收版面费。论文是否刊用,一律不退稿,请自留底稿。

三、投稿方式及联系人

- 1 邮寄:邮编 100050 地址:北京天坛西里 2 号中国药品生物制品检定所内药物分析杂志编辑部
- 2 网址: <http://www.ywfxzz.cn>
- 3 电话: (010) 67095201; 传真: (010) 67012819 联系人: 刘小帅
- 4 来稿应注明“会议征文”字样,以便与其他投稿区别,谢谢合作

《药物分析杂志》编辑部