

栀子甘草豉汤的 LC-PDA-MS/MS 分析及抗抑郁作用研究

乐文, 冯芳*, 王娅

(中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

摘要 目的: 建立栀子甘草豉汤的 LC-PDA-MS/MS 分析方法, 研究该传统经方的化学组成; 初步探讨该经方的抗抑郁作用。方法: 通过 LC-PDA-MS/MS 系统分离分析化合物, 色谱柱为 ODS_{C₁₈} 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 1% 乙酸水溶液和甲醇; 梯度洗脱; 利用 ESI-MS/MS 技术和 UV 特征光谱归属主要色谱峰对应的化合物; 采用小鼠悬尾实验 (TST) 和强迫游泳实验 (FST) 模型, 考察栀子甘草豉汤的抗抑郁作用。结果: 有效分离了栀子甘草豉汤中的成分, 鉴定出其中 10 个化合物, 这些成分分别属于环烯醚萜苷类、黄酮类和三萜皂苷类; 首次发现该经方在小鼠悬尾和强迫游泳模型中具有抗抑郁作用。结论: LC-PDA-MS/MS 方法能有效分离和鉴定栀子甘草豉汤中的主要化学成分; 栀子甘草豉汤具有抗抑郁作用, 其药效物质成分与已识译出的化学成分群之间的关系有待进一步探讨。

关键词 栀子甘草豉汤; 化学成分; LC-PDA-MS/MS; 抗抑郁

中图分类号 R917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2009)04-0342-06

LC-PDA-MS/MS analysis and anti-depressant study of Zhizi-Gancao-Chi decoction

LE Wen, FENG Fang*, WANG Ya

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To establish an analytical method to study the chemical components in Zhizi-Gancao-Chi (ZGC) decoction, and investigate its anti-depressant effect. Methods: An LC-PDA-MS/MS method was established and applied. The separation was performed on an ODS_{C₁₈} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution. The mobile phase consisted of water/acetic acid (1%, v/v) and methanol. The main components were identified according to the UV and MS. The anti-depressant effect was evaluated with mice tail-suspension test and forced swimming test. Results: The components of the ZGC decoction were separated isolated and ten of them were identified. These compounds are classified to iridoid glycosides, flavonoids and triterpene saponins. In addition, its anti-depressant effect was observed for the first time. Conclusion: The LC-PDA-MS/MS method can effectively separate and identify the components of ZGC decoction, which has significant anti-depressant effect. The relationship between the chemical component and its anti-depressant effect needs further study.

Key words Zhizi-Gancao-Chi decoction; chemical constituents; LC-PDA-MS/MS; anti-depression

栀子甘草豉汤出自汉代张仲景所著《伤寒论》, 为治疗“发汗吐下后, 虚烦不得眠”并“少气”之良方, 全方由栀子、甘草和淡豆豉 3 味药材水煎而成。文献 [1-3] 分别对各单味药材的水提取成分进行了研究, 但关于全方煎煮后的化学成分存在情况尚未见研究报道。文献 [4-5] 发现栀子苷和甘草苷分别有抗焦虑和抗抑郁作用, 但关于栀子甘

草豉汤的抗抑郁作用尚未见研究报道。本文首次采用动物行为绝望模型, 初步探讨其抗抑郁作用; 建立 LC-PDA-MS/MS 分析方法, 在无需中药标准品的情况下, 归属了方中的主要化学成分, 这些研究有利于栀子甘草豉汤这一经典中药复方的药效物质基础深入研究的开展。

材 料

1.1 药材和试剂

本研究所用药材均购于南京市同仁堂大药房。栀子(江西),经中国药科大学中药学院秦民坚教授鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥果实;甘草(蒙古)鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根;淡豆豉 *Sojae Praeparatum* 为豆科植物大豆的发酵产物。盐酸阿米替林片剂(AM I,常州四药制药有限公司,批号 0702134)。

甲醇(特级纯,批号 81646)购于江苏汉邦科技有限公司,乙醇(分析纯,批号 061010883)和乙酸(分析纯,批号 070710518)均购于南京化学试剂有限公司。

1.2 仪 器

FinniganTM TSQ Quantum Discovery Maxim LC-MS/MS 系统,具电喷雾离子源(ESI)、Finnigan Surveyor 液相泵、自动进样器、柱温箱和 PDA 检测器;TGL-16B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);AEU-210 电子分析天平(日本岛津公司)。数据采集与处理采用 Xcalibur 2.0 软件。

1.3 动 物

清洁级昆明种小鼠,雄性,体重(20±2)g,由扬州大学比较医学中心提供,动物合格证号:SCXK(苏 2007-0001)。饲养条件:室温(25±2)℃,保持 12 h 昼夜节律,自由饮水进食,适应环境 7 d。

方 法

2.1 LC-PDA-MS/MS 分析

2.1.1 供试品溶液的制备 取粉碎的栀子 4.5 g,甘草 15.6 g,淡豆豉 25.0 g,加入水 360 mL,浸泡 0.5 h,水浴回流提取 1 h,提取 2 次,四层纱布过滤,合并滤液,浓缩至 50 mL。取 1 mL 加入 95%乙醇沉淀,醇沉浓度约为 70%,静置 24 h,取上清液高速离心(16 000 r/min) 15 min,进样 20 μL。

2.1.2 液相色谱条件 色谱柱:Lichrospher C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:25℃;流速:1 mL/min。1%乙酸水溶液(A)/甲醇(B)梯度洗脱,洗脱程序如下:0 min, 10%B; 25 min, 40%B; 35 min, 43%B; 52 min, 60%B; 76 min, 72%B; 81 min, 74%B,柱后分流,分流比为 1/4。PDA 检测器记录 230~400 nm 的

光谱数据,选择 250 nm 作为紫外检测波长。

2.1.3 质谱条件 LC/MS 系统采用 ESI 离子源,在正离子模式与负离子模式下分别采集数据。数据采集范围 m/z 100~1 500。离子源参数:毛细管温度 350℃,源喷雾电压 4 500 V,鞘气(N₂)压 4.35 kPa,源内碰撞诱导解离(CD)电压 10 V,碰撞能 30 eV。

2.2 抗抑郁作用实验

2.2.1 供试品溶液制备 按照“2.1.1 项下水煎液制备方法制备栀子甘草豉汤水煎液,高、中、低 3 个剂量的生药浓度分别为 0.60, 0.30 和 0.15 g/mL。

2.2.2 动物分组及给药方式 雄性小鼠随机分成 5 组,每组 10 只,每日上午 8:00 给药 1 次,连续给药 7 d,第 7 天给药后 1 h 进行实验。阳性对照组给药剂量为 12.5 mg/kg;给药组高、中、低剂量组分别为 30, 15, 7.5 g/kg 空白组给予蒸馏水 1 mL/20 g,以上均灌胃给药。

2.2.3 小鼠悬尾实验 小鼠空腹灌胃实验药或蒸馏水后 1 h,将小鼠尾部 2 cm 的部位用胶布固定于铁架台边缘,使小鼠头向下悬挂。保持室内温度(25±2)℃,室内为自然光线照射,并保持安静。小鼠活动时开动秒表,观察 6 min,记录后 5 min 内累积不动时间。

2.2.4 小鼠强迫游泳实验 将小鼠放进一个有限的空间使之游泳,开始时拼命游动力图逃脱,很快就变成漂浮不动状态,四肢偶尔划动以保持身体不沉,这种状态视作不动状态。水温(23±2)℃,放入小鼠使游泳 6 min,记录后 5 min 内累积不动时间。

2.2.5 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,进行统计学分析,显著性检验采用 SPSS 12.0 统计软件进行 One-Way ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异, $P < 0.01$ 认为有非常显著性差异。

结果与讨论

3.1 栀子甘草豉汤的 LC-MS 色谱分析条件的建立

本文建立了 LC-MS 色谱分析方法,该方法能使栀子甘草豉汤中化学成分得到良好的分离。在比较了等度洗脱和梯度洗脱后发现,梯度洗脱程序使样品中不同极性的组分获得了分离,并且在 90 min 内即可完成一个复杂样本的分析,大大缩短

了分析时间。因本方含有黄酮和有机酸类,并根据 LC-MS 对流动相的要求,在流动相的水相中加入适量乙酸以改善峰形。结果表明,加入 1% 乙酸后,各峰峰形良好,各成分得到较好的分离,并且在正离子检测模式下得到良好的信号。

3.2 梔子甘草豉汤中化学成分的归属与鉴别

在实验过程中,用 PDA 检测器对 210~400 nm 各波长下的色谱图进行全扫描,选择 250 nm 作为紫外检测波长,得到了 UV 色谱图(图 1,A)。

由于中药复方成分复杂,为获得全面的信息,采用在正、负离子模式下对梔子甘草豉汤的样本进行扫描,分别得到正、负总离子流色谱图(图 1,B~C)。结合 ESI 正、负离子检测模式所得的加合离子信息,可以确定主要色谱峰对应化合物的分子质量,再根据加合离子和碎片离子的存在状态和 PDA 测得的光谱特征(表 1),归属了 10 个色谱峰对应的化合物,它们的结构见图 2~4,分别系环烯醚萜苷类、黄酮类和三萜皂苷类。

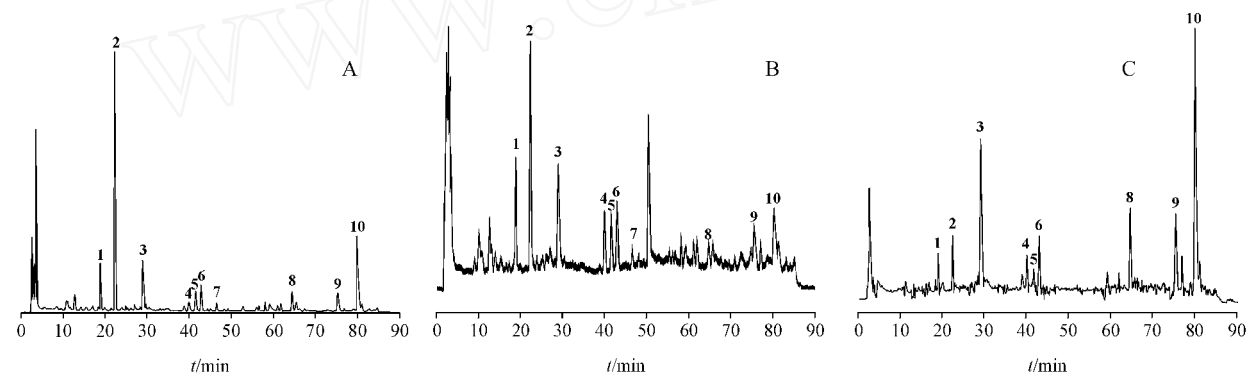


Figure 1 HPLC-PDA chromatograms of Zhizi-Gancao-Chi (ZGC) decoction at 250 nm (A), the total ions chromatogram in positive mode (B) and negative mode (C)

Table 1 MS/MS data of (+) ESI-MS and (-) ESI-MS, and the identification results of the constituents of ZGC decoction

Peak	t_R /min	Identification	MS		λ_{max} (UV)
			Positive ion (m/z)	Negative ion (m/z)	
1	18.98	Genipin-1- β -D-gentiobioside	573 [M + Na] ⁺ , 551 [M + H] ⁺ , 389 [M + H-glc] ⁺ , 371 [M + H-glc-H ₂ O] ⁺ , 227 [(M + H) -2 $\times$ glc] ⁺ , 209 [(M + H) -2 $\times$ glc-H ₂ O] ⁺	549 [M - H] ⁻ , 387 [M - H - glc] ⁻ , 225 [M - H - 2 $\times$ glc] ⁻ , 207 [M - H - 2 $\times$ glc-H ₂ O] ⁻	241
2	22.38	Geniposide	799 [2M + Na] ⁺ , 411 [M + Na] ⁺ , 389 [M + H] ⁺ , 227 [M + H - glc] ⁺	447 [M + CH ₃ COO] ⁻ , 387 [M - H] ⁻ , 225 [M - H - glc] ⁻	222, 239
3	28.89	Liquiritin	441 [M + Na] ⁺ , 419 [M + H] ⁺ , 257 [M + H - glc] ⁺	417 [M - H] ⁻ , 255 [M - H - glc] ⁻	234, 277, 312
4	39.93	6- ¹⁴ O- <i>p</i> -Coumaroylgenipin-gentiobioside	719 [M + Na] ⁺ , 697 [M + H] ⁺ , 309 [M + H - gen] ⁺	777 [M + CH ₃ COO] ⁻ , 695 [M - H] ⁻	242, 314
5	41.48	Isoliquiritin apioside	573 [M + Na] ⁺ , 419 [M + H - ap1] ⁺	549 [M - H] ⁻ , 417 [M - H - ap1] ⁻ , 255 [M - H - ap1 - glc] ⁻	250, 308, 363
6	42.79	Isoliquiritin	441 [M + Na] ⁺ , 419 [M + H] ⁺ , 257 [M + H - glc] ⁺	417 [M - H] ⁻ , 255 [M - H - glc] ⁻	236, 279, 321, 362

Continue					
Peak	t_R /min	Identification	MS		λ_{max} (UV)
			Positive ion (m/z)	Negative ion (m/z)	
7	46.54	Daidzein	255[M + H] ⁺ , 237[M + H - H ₂ O] ⁺ , 227[M + H - CO] ⁺ , 209[M + H - CO ₂] ⁺ , 199[M + H - 2CO] ⁺ , 181[M + H - 2CO - H ₂ O] ⁺	253[M - H] ⁻	250, 291
8	64.52	Licorice-saponin A3	985[M + H] ⁺ , 809[M + H - gluA] ⁺ , 615[M + H - 2 × gluA - H ₂ O] ⁺ , 453[M + H - 2 × gluA - H ₂ O - glc] ⁺	983[M - H] ⁻	251
9	75.34	Licorice-saponin G2	839[M + H] ⁺ , 487[M + H - 2 × gluA] ⁺ , 469[M + H - 2 × gluA - H ₂ O] ⁺	837[M - H] ⁻	251
10	79.93	Glycyrrhizinic acid	845[M + Na] ⁺ , 823[M + H] ⁺ , 647[M + H - gluA] ⁺ , 471[M + H - 2 × gluA] ⁺ , 453[M + H - 2 × gluA - H ₂ O] ⁺	821[M - H] ⁻	251, 337

Note: glc = glucose; ap1 = apiose; gen = gentiobiose; gluA = glucuronic acid

3.2.1 环烯醚萜苷类 环烯醚萜苷类化合物具有羰基与双键构成的共轭体系,若含有 β 不饱和羰基官能团、共轭双键有一个在环内,则在 230~240 nm 波长范围内有最大吸收^[6]。1、2 和 4 号峰的紫外吸收峰形十分相似,最大吸收波长在 239~242 nm 的范围内,且除末端吸收外只具有一个最大吸收波长,故证实这 3 个化合物同为环烯醚萜苷类。

化合物 1 和化合物 2 分别有 m/z 573 和 551、 m/z 411 和 389 的碎片离子,二者相对分子质量相差 22,由分子加 Na 和 H 离子产生,并且都产生中性丢失葡萄糖基 (162 D) 的系列碎片,再结合文献^[7]可归属京尼平-1- β -D-龙胆二糖苷 (1) 和栀子苷 (2)。在化合物 4 的 MS 图中也存在类似的情形,有加合离子 m/z 719 [M + Na]⁺ 和 697 [M + H]⁺, m/z 697 [M + H]⁺ 离子经碰撞诱导解离 (CID) 丢失 388 D 得到碎片离子 m/z 309,为脱去龙胆二糖基所得,根据分子离子信息可推断为 6"-O-对香豆酰京尼平龙胆二糖苷 (4)。

3.2.2 黄酮类 黄酮类化合物因分子中存在桂皮酰基及苯甲酰基组成的交叉共轭体系,故其甲醇溶液在 200~400 nm 的区域内存在两个主要的紫外吸收带,称为峰带 I (300~400 nm) 及峰带 II (220~280 nm)。而二氢黄酮和异黄酮因 B 环不与吡

喃酮环上的羰基共轭,故带 I 较弱,仅在主峰的长波方向有一肩峰。二氢黄酮的主峰在 270~295 nm 范围内,异黄酮的主峰在 245~270 nm 范围内^[6]。据此可知,7 号峰在 250 nm 处有一个最大吸收波长,为异黄酮类,而 3、6 号峰分别在 277 nm 和 279 nm 处有最大吸收波长,5 号峰由于多了一个共轭体系引起波带红移,故最大吸收波长在 308 nm 处,可知 3、5、6 号峰为二氢黄酮类。

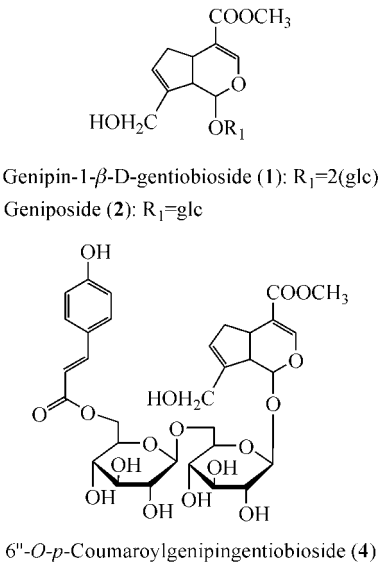


Figure 2 Structures of iridoid glycosides in ZGC decoction

化合物 3 和化合物 6 的碎片离子几乎一致,都有 m/z 441 $[M + Na]^+$ 、419 $[M + H]^+$ 、257 $[M + H - glc]^+$ 和 m/z 417 $[M - H]^-$ 、255 $[M - H - glc]^-$ 等分子离子峰和碎片离子峰,故推测二者为同分异构体甘草苷和异甘草苷。再根据文献 [8] 报道和紫外光谱的差异,可知由于异甘草苷的结构中多一个共轭双键,使最大吸收波长红移,确定两者为甘草苷 (3) 和异甘草苷 (6)。化合物 5 在正、负离子模式下的主要碎片离子分别为 m/z 573 $[M + Na]^+$ 、419 $[M + H - apl]^+$ 、549 $[M - H]^-$ 、417 $[M - H - apl]^-$ 、255 $[M - H - glc]^-$, 结合文献 [8] 可知此化合物是相对分子质量为 550 的芹糖异甘草苷 (5)。淡豆豉中的大豆苷元 (7) 为大豆异黄酮的主要组成成分,在正离子模式下易脱掉 CO 、 CO_2 、 H_2O 等中性小分子。

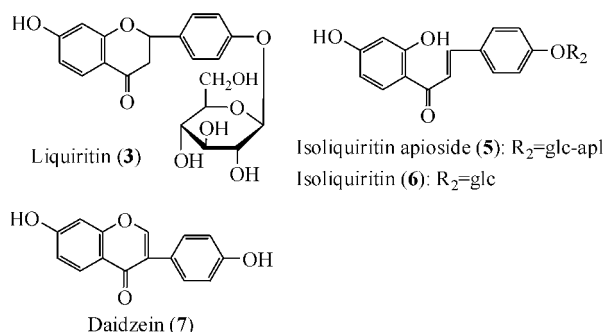


Figure 3 Structure of flavonoids in ZGC decoction

3.2.3 三萜皂苷类 三萜皂苷只有一个与羰基共轭的双键,紫外吸收强度较弱,最大吸收波长应在 210~250 nm 范围之内。由 PDA 检测图可知,8、9、10 号峰都只有一个最大吸收波长 251 nm,吸收强度较弱,并且都来源于甘草,极性较小,故推测为三萜皂苷类。

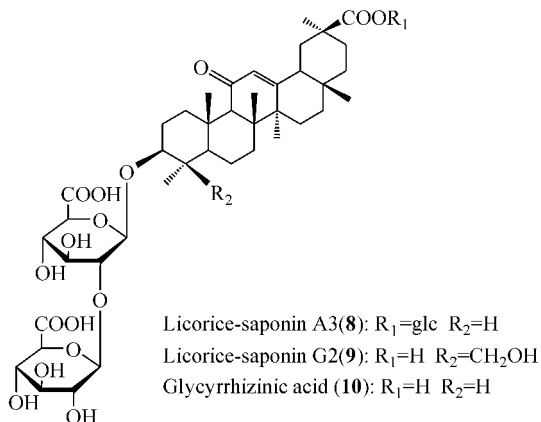


Figure 4 Structure of triterpene saponins in ZGC decoction

化合物 8、9 和 10 在正离子模式下脱去葡萄糖醛酸 (176 D),产生一系列碎片离子,而在负离子模式下只有一个减去 H^+ 的分子离子峰,根据各自的相对分子质量可知分别为甘草皂苷 A3 (8)、甘草皂苷 G2 (9) 和甘草酸 (10)。

3.3 栀子甘草豉汤的抗抑郁作用

小鼠悬尾实验 (TST) 和强迫游泳实验 (FST) 广泛用于抗抑郁药物的初筛,方法简便、快捷、可靠 [9-10]。TST 和 FST 结果见表 2,可知与空白组比较,栀子甘草豉汤高、中剂量在给药 7 d 后显著缩短小鼠悬尾不动时间和游泳不动时间,证实了栀子甘草豉汤的抗抑郁作用。

Table 2 Effect of ZGC decoction and amitriptyline (AMI) ig for 7 days on mice duration of immobility in tail-suspension test (TST) and forced swimming test ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	Dose/ (g/kg)	Duration of immobility/s	
		TST	FST
Control		124.8 $\pm$ 43.1	121.0 $\pm$ 54.7
AMI	0.012 5	32.6 $\pm$ 23.6	30.8 $\pm$ 24.9
ZGC decoction	30	57.9 $\pm$ 32.6 **	32.5 $\pm$ 27.0 **
	15	78.2 $\pm$ 31.4 **	52.7 $\pm$ 23.3 **
	7.5	99.8 $\pm$ 44.9	76.3 $\pm$ 56.6

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

结 论

在中药有效成分的分析过程中,质谱起着越来越重要的作用。将 LC-PDA-MS 联用获得的信息进行综合分析,可以在没有对照品的情况下识译出分析样本中的有关成分,一定程度上可以解决中药复杂体系中化学成分缺少对照品的瓶颈问题。本文初步探讨了栀子甘草豉汤的抗抑郁作用并分离归属了方中的主要成分,其活性成分与已识译出的化学成分群之间的关系有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 陈 红 (Chen H), 肖永庆 (Xiao YQ), 李 丽 (Li L), 等. 栀子化学成分研究 [J]. 中国中药杂志 (China J Chin Mater Med), 2007, 32 (11): 1 041 - 1 043.
- [2] 白 虹 (Bai H), 窦德强 (Dou DQ), 裴玉萍 (Pei YP), 等. 栽培甘草的化学成分研究 [J]. 中草药 (Chin Tradit Herb Drugs), 2005, 36 (5): 652 - 654.
- [3] 毛俊琴 (Mao JQ), 黄晓瑾 (Huang XJ), 周月芬 (Zhou YF), 等. 高效液相色谱法测定淡豆豉药材中异黄酮的含量 [J]. 药物分析杂志 (Chin J Pharm Anal), 2004, 24 (6): 587 - 590.
- [4] Dinesh D, Amandeep S. Antidepressant-like activity of Glycyrrhiza glabra L. in mouse models of immobility tests [J]. Prog Neuro-

- psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006, **30**(3): 449 - 454.
- [5] Kazuo T, Hiroko K, Noriko O, *et al*. Anxiolytic effect of *Gardenia Fructus*-extract containing active ingredient from *Kamishoyosan* (KSS), a Japanese traditional Kampo medicine [J]. *Life Sci*, 2005, **77**(24): 3 010 - 3 020.
- [6] 吴立军 (Wu LJ). 天然药物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 252.
- [7] Hongxia L, Lin G, Mian L, *et al*. Characterization and determination of genipin-1- β -D-gentiobioside in *Gardenia* fruit by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection following electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Microchem J*, 2006, **84**(1): 38 - 43.
- [8] 闫永红 (Yan YH). 不同来源甘草的质量特征及评价研究 [D]. 北京中医药大学博士研究生学位论文. 2006.
- [9] Steru L, Chermat R, Thierry B, *et al*. The tail suspension test: a new method for screening anti-depressants in mice [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, **85**(3): 360 - 370.
- [10] Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1977, **229**(2): 327 - 336.

· 新信息 ·

全球正在研发的药品新制剂

1. 复方制剂

● 局部用黏膜制剂 比马前列素 + 噻吗洛尔 (timolol), 前列腺素 F₂ α 激动剂, β 肾上腺素受体拮抗剂, 前列腺素 FP受体激动剂, 用于治疗青光眼。研发单位: Allergan公司

● 药物复方制剂, 卡泊三醇 + 倍氯米松 (calcipotriene + beclomethasone), 维生素 D受体激动剂, 糖皮质激素激动剂, 花生四烯酸拮抗剂, 用于银屑病治疗。研发单位: Leo公司

● 口服药物复方制剂, 奥美沙坦 + 氨氯地平 + 氢氯噻嗪 (olmesartan + amlodipine + hydrochlorothiazide), 血管紧张素 II拮抗剂, 钙通道拮抗剂, 噻嗪类利尿药, 用于 II期高血压治疗。研发单位: Daiichi Sankyo公司

2. 微囊制剂

● 24 h以上缓释制剂, 纳曲酮 (naltrexone), 阿片 μ , κ 受体拮抗剂, 酒瘾戒断药。研发单位: Alkermes公司

● 口服, 24 h缓释微囊制剂, 卡维地洛 (carvedilol), β_1 、 β_2 、 α_1 肾上腺素受体拮抗剂, 用于高血压, 心力衰竭。研发单位: GlaxoSmithKline公司

3. 植入剂

● 眼内注射, 24 h以上缓释制剂, 更昔洛韦 (ganciclovir), DNA引导的 DNA聚合酶抑制剂, 巨细胞病毒感染, 抗病毒药。研发单位: Bausch & Lomb公司

4. 透皮制剂

● Oxylcholine compounds, 氧化剂, 糖尿病并发症, 皮肤病感染。研发单位: Oculus Innovative Sciences公司

5. 干粉吸入剂

● 局部用吸入剂, 糠酸莫米松 (mometasone furoate), 糖皮质激素激动剂, 花生四烯酸拮抗剂, 免疫抑制剂, 平喘药。研发单位: Schering-Plough公司

(本刊编辑部)