生姜泻心汤高效液相色谱指纹图谱的建立

章从恩*,王焕君,于小红,张学强,李　月,赵奎君,马致洁#(首都医科大学附属北京友谊医院中药剂科,北京　100050)

中图分类号　R932　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-2124(2021)08-0955-05
DOI　10.14009/j.issn.1672-2124.2021.08.014

摘　要　目的:建立生姜泻心汤高效液相色谱指纹图谱分析方法,为生姜泻心汤的质量控制和临床应用提供参考。方法:收集生姜泻心汤组方药味的不同批次饮片,按药材产地和批号排列组合制备得到10批生姜泻心汤;采用高效液相色谱法对生姜泻心汤水煎液进行分析,并进行指纹图谱分析方法学考察;采用"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)"进行指纹图谱的分析,并通过主要化学成分对照品进行共有峰的指认。结果:指纹图谱方法学研究结果显示,精密度、重复性及稳定性考察结果中,参照峰保留时间的 *RSD* 均<2%,参照峰面积的 *RSD* 均<5%;共标定出41个具有较好分离度的共有峰,通过对照品指认了其中6-姜辣素、绿原酸等9个共有峰;10批生姜泻心汤相似度>0.99。结论:本研究建立的指纹图谱方法具有良好的精密度、重复性和稳定性,可为生姜泻心汤的质量控制、药理学研究等提供依据。

关键词　生姜泻心汤;高效液相色谱;指纹图谱分析;共有峰

Establishment of High Performance Liquid Chromatography Fingerprint of Shengjiang Xiexin Decoction

ZHANG Cong'en, WANG Huanjun, YU Xiaohong, ZHANG Xueqiang, LI Yue, ZHAO Kuijun, MA Zhijie (Dept. of Traditional Chinese Medicine Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To establish the chromatographic fingerprint by high performance liquid chromatography (HPLC) for Shengjiang Xiexin decoction, so as to provide reference for quality control and clinical application of Shengjiang Xiexin decoction. METHODS: Different batches of herbal decoction pieces as ingredients of Shengjiang Xiexin decoction were collected. Ten batches of Shengjiang Xiexin decoction were prepared according to the origin area and batch number. The decoction of Shengjiang Xiexin decoction was analyzed by HPLC, and the fingerprint analysis method was investigated. The fingerprints were analyzed by he Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2004 A), and the common peaks were identified by the main chemical components of the control. RESULTS: The accuracy, reproducibility and stability test showed that the *RSD* of common peaks' retention time (RT) and peak area (PA) were <2% and <5%, respectively. Totally 41 well separated common peaks were found in the fingerprints, in which 9 common peaks were identified as 6-gingerol and chlorogenic acid. The similarity of 10 batches of Shengjiang Xiexin decoction was >0.99. CONCLUSIONS: The fingerprint method established in the study has good precision, reproducibility and stability, which can provide basis for the quality control and pharmacological study of Shengjiang Xiexin decoction.

KEYWORDS　Shengjiang Xiexin decoction; High performance liquid chromatography; Fingerprint analysis; Common peaks

生姜泻心汤是临床常用的经典方剂,出自《伤寒论》第157条"伤寒汗出解之后,胃中不和,心下痞鞕,干噫食臭,胁下有水气,腹中雷鸣下利者,生姜泻心汤主之"[1]。生姜泻心汤由半夏泻心汤减干姜二两,加生姜四两而成,其原方组成为生姜(四两)、半夏(半升)、人参(三两)、黄芩(三两)、甘草(三两,炙)、黄连(一两)、干姜(一两)和大枣(十二枚,劈),共8味药材。方中重用生姜,取其和胃降逆、宣散水气而消痞满;配合黄连、黄芩、半夏和干姜辛开苦降、散结消痞;人参、大枣等补益脾胃;故能治水热互结于中焦、脾胃升降失常所致的痞证[2-4]。目前,生姜泻心汤在临床上的应用非常广泛,主要被用于治疗肠胃炎[5-6]、消化不良[7-8]、呕吐[9-10]、结直肠癌[11]和泄泻(腹泻)[12-14]等症,其治疗消化系统疾病的疗效确切[6,15]。目前对于生姜泻心汤的研究主要集中在临床应用及药理药效方面,对于其质量控制方法尤其是色谱指纹图谱方法未见报道,亟待建立完善的生姜泻心汤质量控制方法,为其临床应用及药理药效研究提供参考。本研究通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,HPLC)建立生姜泻心汤的色谱指纹图谱,为生姜泻心汤的质量控制提供科学参考。

* 主管药师。研究方向:中药消化药理毒理。E-mail: zce820@ccmu.edu.cn
# 通信作者:副主任药师。研究方向:中药消化药理毒理。E-mail: 13811647091@163.com

1 材料

1.1 仪器

液相色谱串联离子阱飞行时间质谱(LC-IT-TOF-MS),自动进样器,柱温箱,UV 检测器(日本岛津公司);LC-MS solution 工作站;5424R 小型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf);XS205 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);Inertsil ODS-SP C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)(日本岛津公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);RE-52 A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);循环水真空泵(上海知信实验仪器技术有限公司);移液器(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 药材

实验所用药材法半夏、炙甘草、黄芩、干姜、黄连和大枣购于首都医科大学附属北京友谊医院中药剂科,人参购于盛实百草药业有限公司,生(鲜)姜购于北京人卫中药饮片厂。经首都医科大学附属北京友谊医院赵奎君教授鉴定,法半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎的炮制加工品;炙甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎的炮制品;黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根炮制品;生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎炮制品;干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎炮制品;黄连为毛茛科植物云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎炮制品;人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey 的干燥根和根茎炮制品;大枣为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。各药材具体来源和批号见表 1。

表 1 8 味药材的产地和批号

Tab 1 Origin areas and batch numbers of 8 kinds of traditional Chinese medicine

药材	编号	产地	批号	编号	产地	批号	编号	产地	批号
生姜	A1	四川	18100803	A2	河南	18100402	A3	山东	18092602
人参	B1	吉林	18051102	B2	吉林	17081204	B3	吉林	17040703
法半夏	C1	甘肃	18040501	C2	山东	17091203	C3	甘肃	18080703
黄芩	D1	山西	18050801	D2	陕西	17062101	D3	河南	16120701
炙甘草	E1	内蒙古	18062303	E2	宁夏	17080702	E3	宁夏	18101202
干姜	F1	河南	18080904	F2	山东	18061102	F3	河南	18100901
黄连	G1	四川	18051006	G2	陕西	18031002	G3	重庆	17072303
大枣	H1	山西	18080304	H2	河南	18091401	H3	河北	18100702

1.3 药品与试剂

对照品:绿原酸(批号为 140730,含量≥98%,成都克洛玛生物科技有限公司);甘草苷(批号为 111610-201607,含量以 93.1%计,中国食品药品检定研究院);姜黄素(批号为 0823-9802,中国食品药品检定研究院);6-姜辣素(批号为 111833-201806,含量≥99.9%,中国食品药品检定研究院);黄芩素(批号为 491-67-8,含量≥98%,中国药品生物制品检验所);汉黄芩素(批号为 153-18-4,含量≥98%,中国药品生物制品检验所);黄芩苷(批号为 110715-201016,含量以 94.0%计,中国药品生物制品检验所);盐酸小檗碱(批号为 110713-201814,含量≥86.7%,中国食品药品检定研究院);黄连碱(批号为 B20560,含量≥98%,上海源叶生物科技有限公司)。水为屈臣氏蒸馏水;甲醇、甲酸为色谱纯(Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-SP C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸甲醇溶液(B),按照表 2 进行梯度洗脱。流速为 0.8 ml/min,检测波长为 254 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 10 μl。

表 2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedures

时间/min	流动相比例/%	
	A	B
0	95	5
3	95	5
8	80	20
13	65	35
26	43	57
43	38	62
58	28	72
63	15	85
66	5	95
76	5	95
80	95	5

2.2 供试品溶液的制备

参照《伤寒论》第 157 条生姜泻心汤药味组成及配比,经过改进后制备生姜泻心汤水提液。准确称取生姜 12 g,人参 9 g,黄芩 9 g,炙甘草 9 g,法半夏 9 g,干姜 3 g,黄连 3 g,大枣 9 g,置于圆底烧瓶中,加 8 倍量水充分浸润,放置浸泡用 3 层纱布过滤,滤渣加 6 倍量水微沸回流提取 20 min,过滤,合并 2 次的滤液,浓缩至 50 ml,得生药质量浓度为 1.26 g/ml,4 ℃冷藏备用。取生姜泻心汤药液,加适量超纯水稀释至 0.1 g/ml,涡旋 1 min,4 ℃下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,得供试品溶液。参考文献,将处方中的 8 种药材按不同产地和批号进行排列组合,投药制备得到 10 批生姜泻心汤[16-17]。排列组合结果见表 3;具体药材来源组成见表 1。10 批生姜泻心汤(S1—S10)分别按照上述方法制备供试品溶液。

表 3 10 批生姜泻心汤药材来源批号随机分组表

Tab 3 Random source table of 10 batches of Shengjiang Xiexin decoction

批次	生姜	人参	法半夏	黄芩	炙甘草	干姜	黄连	大枣
S1	A2	B3	C3	D3	E2	F3	G3	H3
S2	A1	B3	C1	D1	E3	F3	G1	H2
S3	A3	B2	C1	D2	E3	F2	G2	H3
S4	A3	B3	C2	D2	E1	F3	G2	H1
S5	A1	B3	C3	D1	E1	F2	G1	H2
S6	A2	B1	C1	D2	E3	F3	G3	H1
S7	A1	B2	C3	D2	E3	F1	G3	H3
S8	A1	B1	C1	D1	E2	F2	G1	H3
S9	A3	B3	C2	D1	E1	F3	G1	H3
S10	A2	B1	C1	D3	E3	F1	G3	H2

2.3 对照品溶液的制备

取各对照品适量,精密称定,加甲醇配制成对照品溶液(绿原酸 100 μg/ml,甘草苷 70 μg/ml,黄连碱 100 μg/ml,盐酸小檗碱 25 μg/ml,黄芩苷 200 μg/ml,黄芩素 25 μg/ml,汉黄芩素 90 μg/ml,6-姜辣素 30 μg/ml,姜黄素 30 μg/ml),以 0.22 μm 微孔滤膜过滤,4 ℃冷藏备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一供试品溶液(S1),按"2.1"项下色谱条件连续进样 6 次,记录图谱。

2.4.2 重复性试验:按"2.2"项下供试品溶液制备方法,平行制备 S1 生姜泻心汤供试品溶液 6 份(S1-1—S1-6),按"2.1"项下色谱条件进样分析,记录图谱。

2.4.3 稳定性试验:将供试品溶液 S1 分别在 0、2、4、8、12 和 24 h 按"2.1"项下色谱条件进样分析,记录色谱图。

2.5 指纹图谱的建立及相似度评价

将混合对照品溶液按照"2.1"项下的色谱条件进行测定,记录色谱图。取 10 批生姜泻心汤(S1—S10)按照"2.1"项下的方法进行测定,记录色谱图。按照《中药色谱指纹图谱》要求,将 10 批生姜泻心汤供试品溶液的图谱导入"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)"进行分析,对峰面积较大、分离度较好的色谱峰进行标定。

3 结果

3.1 方法学考察结果

3.1.1 参照峰的选择:在生姜泻心汤的指纹图谱中,选择峰面积较大而且稳定、分离度较好的 5 个峰(1 号、6 号、18 号、27 号和 31 号峰)作为指纹图谱方法学考察的参照峰,且上述峰分布在指纹图谱的整个时间段内。在以下的方法学考察研究中,均以各供试品溶液色谱图中的 1 号、6 号、18 号、27 号和 31 号色谱峰为参照峰,计算其保留时间的 *RSD* 和峰面积的 *RSD*。

3.1.2 精密度考察结果:记录 6 次进样的色谱图,将数据导入指纹图谱相似度评价软件进行处理,进行色谱峰匹配,6 次进样的图谱与对照图谱相似度均>0.998。计算各参照峰保留时间的 *RSD*,结果均<0.38%;计算其峰面积的 *RSD*,结果均<2.95%;表明该方法精密度良好,符合特征图谱相关要求。精密度考察结果见表 4—5。

表 4 精密度考察结果(保留时间)($n=6$)

Tab 4 Precision test results(retention time)($n=6$)

进样次数	1 号峰	6 号峰	18 号峰	27 号峰	31 号峰
1	14.915	25.077	41.711	54.166	60.535
2	14.914	25.111	41.736	54.239	60.625
3	14.960	25.104	41.734	54.239	60.610
4	15.069	25.112	41.790	54.270	60.620
5	14.954	25.092	41.740	54.266	60.633
6	14.982	25.087	41.709	54.147	60.545
RSD/%	0.38	0.06	0.07	0.10	0.07

3.1.3 重复性考察结果:记录 6 次进样的色谱图,将数据导入"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)"进行处理,进行色谱峰匹配,6 次进样图谱与对照图谱相似度均>0.995。计算各参照峰保留时间的 *RSD*,结果均<1.30%;计算其峰面积的 *RSD*,结果均<4.81%;表明该方法的重复性好,符合特征图谱相关要求。重复性考察结果见表 6—7。

表 5 精密度考察结果(峰面积)($n=6$)

Tab 5 Precision test results(peak area)($n=6$)

进样次数	1 号峰	6 号峰	18 号峰	27 号峰	31 号峰
1	341 405	750 760	2 216 788	51 552 984	12 287 119
2	345 521	727 189	2 206 618	51 211 836	12 252 137
3	342 624	729 164	2 215 167	51 255 207	12 264 017
4	363 916	719 233	2 215 048	51 347 787	12 261 959
5	341 434	733 048	2 214 005	51 206 479	12 276 961
6	360 893	732 747	2 213 101	51 378 771	12 273 431
RSD/%	2.95	1.43	0.16	0.226	0.10

表 6 重复性考察结果(保留时间)($n=6$)

Tab 6 Repeatability test results(retention time)($n=6$)

进样次数	1 号峰	6 号峰	18 号峰	27 号峰	31 号峰
1	15.623	25.041	41.055	53.530	60.205
2	15.548	25.017	41.141	53.657	60.348
3	15.447	25.211	41.388	53.785	60.396
4	15.628	25.164	41.383	53.821	60.497
5	15.137	25.153	41.410	53.833	60.257
6	15.266	25.146	41.423	53.688	60.171
RSD/%	1.30	0.30	0.39	0.22	0.21

表 7 重复性考察结果(峰面积)($n=6$)

Tab 7 Repeatability test results(peak area)($n=6$)

进样次数	1 号峰	6 号峰	18 号峰	27 号峰	31 号峰
1	341 180	731 081	2 320 179	53 508 520	12 508 602
2	356 554	774 761	2 142 790	50 786 804	11 993 371
3	384 637	791 216	2 121 260	51 438 359	12 675 556
4	375 566	752 309	2 294 971	47 289 565	12 587 481
5	372 430	826 153	2 190 546	50 529 142	12 801 433
6	354 540	732 547	2 250 511	49 926 294	12 205 839
RSD/%	4.42	4.81	3.66	4.01	2.44

3.1.4 稳定性考察结果:记录 6 次进样的色谱图,将数据导入"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2 004 A 版)"进行处理,进行色谱峰匹配,6 次进样图谱与对照图谱相似度均>0.997。计算各参照峰保留时间的 *RSD*,结果均<0.55%;计算其峰面积的 *RSD*,结果均<4.37%;表明供试品溶液在 24 h 内稳定,符合特征图谱相关要求。稳定性考察结果见表 8—9。

表 8 稳定性考察结果(保留时间)($n=6$)

Tab 8 Stability test results(retention time)($n=6$)

进样次数	1 号峰	6 号峰	18 号峰	27 号峰	31 号峰
1	15.227	24.988	41.149	53.667	60.138
2	15.151	25.088	41.414	53.745	60.17
3	15.374	25.097	41.209	53.608	60.169
4	15.27	25.126	41.29	53.569	60.086
5	15.157	25.073	41.186	53.496	60.046
6	15.284	25.161	41.356	53.544	60.034
RSD/%	0.55	0.23	0.25	0.17	0.10

表 9 稳定性考察结果(峰面积)($n=6$)

Tab 9 Stability test results(peak area)($n=6$)

进样次数	1 号峰	6 号峰	18 号峰	27 号峰	31 号峰
1	338 303	744 685	2 193 644	51 144 686	12 710 129
2	348 264	748 171	2 224 202	51 206 181	12 708 610
3	315 785	762 983	2 232 406	54 588 432	11 481 563
4	345 081	745 818	2 206 644	49 732 027	12 602 495
5	338 647	729 330	2 019 966	52 511 871	12 648 511
6	360 785	756 656	2 224 377	49 122 379	11 861 751
RSD/%	4.37	1.54	3.73	3.84	4.29

3.2 指纹图谱的构建

将 10 批药材的供试品溶液在上述色谱条件下进行分析,导入"中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)"进行处理,以 S1 为参照谱,采用平均数法,时间窗宽度设定为 0.1,

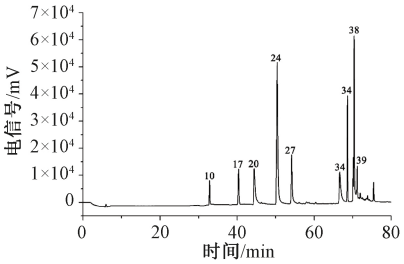
多点校正，色谱峰自动匹配，生成对照指纹图谱，并计算相似度。混合对照品 HPLC 图见图 1。生姜泻心汤 HPLC 指纹图谱见图 2（编号 S1—S10 为 10 批样本的液相色谱，R 为对照指纹图谱），共标定出 41 个共有峰。

3.3 指纹图谱相似度评价

指纹图谱相似度越接近 1，说明色谱图间相似度值越高。10 批生姜泻心汤指纹图谱相似度见表 10。由表 10 可见，10 批样品的相似度都>0.99，表明不同批次生姜泻心汤之间相似度良好，质量稳定，说明用于后期药效实验的生姜泻心汤品具有较好的稳定性，同时该指纹图谱可为生姜泻心汤药理药效实验的重复性提供参考。

4 讨论

本研究中，生姜泻心汤供试品制备方法参考传统煎煮方法。同时，前期考察了不同流动相梯度洗脱系统（乙腈-水、甲醇-水和 0.1%甲酸甲醇-0.1%甲酸溶液）、不同柱温（20、25、30 和 40 ℃）和不同流动相流速（0.6、0.8 和 1 ml/min）。结果发现，流动相为 0.1%甲酸甲醇-0.1%甲酸水，柱温为 40 ℃，流动相流速为 0.8 ml/min 的分离效果最好，故选择上述条件进行分析。



10. 绿原酸；17. 甘草苷；20. 黄连碱；24. 盐酸小檗碱；27. 黄芩苷；33. 黄芩素；34. 6-姜辣素；38. 汉黄芩素；39. 姜黄素

10. chlorogenic acid; 17. glycyrrhizin; 20. baicalin; 24. berberine hydrochloride; 27. baicalin; 33. baicalein; 34. 6-curcumin; 38. wogonin; 39. curcumin

图 1 混合对照品 HPLC 图

Fig 1 HPLC of mixed reference

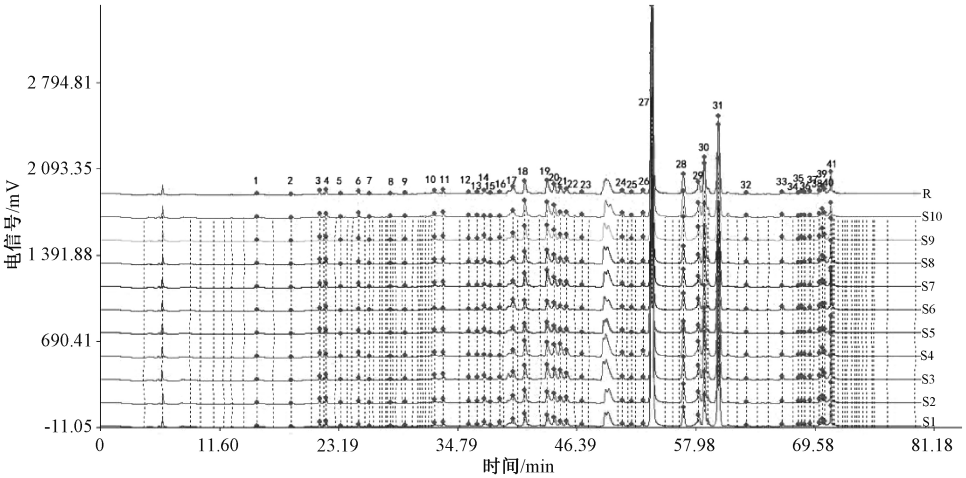


图 2 10 批生姜泻心汤指纹图谱

Fig 2 HPLC fingerprint of 10 batches of Shengjiang Xiexin decoction

表 10 10 批生姜泻心汤指纹图谱相似度

Tab 1 0 Similarity of chromatographic fingerprint of 10 batches of Shengjiang Xiexin decoction

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.997	S6	0.996
S2	0.998	S7	0.997
S3	0.995	S8	0.994
S4	0.995	S9	0.997
S5	0.995	S10	0.995

本研究应用 HPLC 法成功建立了生姜泻心汤指纹图谱，标定了 41 个共有峰，并通过对照品对比确认了绿原酸、甘草苷、黄连碱、盐酸小檗碱、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、6-姜辣素和姜黄素 9 个共有峰；查阅文献可知，绿原酸来自于大枣[18]，甘草苷来自于甘草，黄连碱、盐酸小檗碱来源于黄连[19-20]，黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素来源于黄芩[21]，6-姜辣素、姜黄素来源于生姜和干姜[22]。另外，生姜泻心汤中人参为贵重药材，其成分的指认非常重要，但是本研究中人参主要成分为末端吸收、紫外吸收低且干扰大[23-24]，故暂未进行分析。本研究也未发现半夏的指标性成分，尚不能体现其专属性成分。在后续研究中将进一步采用质谱检测器并重点对亲水性成分进行研究，建立更加全面的生姜泻心汤液相指纹图谱分析方法。

本研究进行了精密度、重复性和稳定性等方法学考察，结果表明，所用色谱方法符合指纹图谱技术定性研究要求；10 批生姜泻心汤相似度>0.95，表明不同批次的生姜泻心汤之间相似度良好，质量稳定。表明该方法可以为生姜泻心汤的质量控制提供参考，保证后期药效学实验所用的生姜泻心汤质量稳定，为实验的重复性作参考，且对生姜泻心汤的临床应用有重要意义。

参考文献

[1] [汉]张仲景. 伤寒论[M]. 上海：上海人民出版社，1976：42.

[2] 周勇，魏盼，周小康. 浅析《伤寒论》之“泻心汤”与“心下痞”[J]. 中医学报，2019，34(2)：248-251.

[3] 毛燕，李立华. 高才达运用泻心汤治疗痞证经验[J]. 世界中医药，2021，16(3)：491-495，499.

[4] 黄博瑜，胡小英. “三泻心汤”临床应用探析[J]. 中国中医药信息杂志，2020，27(1)：111-114.

（下转第 962 页）