

银翘散不同复方配伍 HPLC 指纹图谱

张会敏^{1,2}, 曲新艳³, 张照研³, 周喆³, 王升启^{3*}

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014;
3. 解放军军事医学科学院, 北京 100850)

[摘要] **目的:**建立银翘散(YQS)不同复方配伍组及君(J),臣(C),佐(Z),使(S)关系的 HPLC 指纹图谱,找出配伍前后物质基础变化及复方配伍过程中物质基础相互作用关系,从整体上探讨 YQS 复方配伍关系。**方法:**利用 UltiMate 3000 XRS 型超快速液相色谱仪,Thermo C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.05% 磷酸水梯度洗脱,检测波长 237 nm,流速 1 mL·min⁻¹,对 YQS 及君臣佐(J,C,Z),君臣使(J,C,S),君佐使(J,Z,S),君臣(J,C),J,C,Z,S 不同配伍关系进行 HPLC 指纹图谱研究;利用指纹图谱处理软件对各组间 HPLC 指纹图谱进行数据分析。**结果:**YQS 与各配伍组相似度由高到低为 J,C,S (0.981) > J,C(0.959) > J,C,Z(0.953) > J,Z,S(0.806); YQS 与 J,C,Z,S 组相似度由高到低为 J(0.749) > C(0.573) > Z(0.136) > S(0.104)。YQS 配伍合煎与单煎相加后的指纹图谱相比,14 个峰面积降低,63 个峰面积增加。**结论:**君臣药是 YQS 物质基础主要来源;本文从物质基础组成的角度,对 YQS 中 J,C,Z,S 在全方中的重要性进行了数据分析,使传统方解更具有说服力。

[关键词] 银翘散; 复方配伍; 君臣佐使; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0047-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100047

HPLC Fingerprints of Different Compound Compatibility of Yinqiao San ZHANG Hui-min^{1,2}, QU Xin-yan³, ZHANG Zhao-yan³, ZHOU Zhe³, WANG Sheng-qi^{3*} (1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Pharmacy College, Ji'nan 250355, China; 2. Shandong Academy of TCM, Ji'nan 250014, China; 3. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To find out the changes before and after the material basis of compatibility, and to discover the interaction among the process of compound mixing, through established the HPLC fingerprints of Yinqiao San (YQS) and Jun (J), Chen (C), Zuo (Z), Shi (S). Then investigated the relationship of compound compatibility of YQS on the whole. **Method:** The chromatographic condition was: Ultimate 3000 XRS ultra fast liquid chromatography, thermo C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, methanol-0.05% phosphoric acid water as the mobile phase gradient elution, the detection wavelength was 237 nm and flow rate was 1 mL·min⁻¹. Researched and established the HPLC fingerprint of YQS and other groups, then used the fingerprint processing software to analyse the data of each group HPLC fingerprint. **Result:** The similarities from high to low between YQS and other compatibility groups are: J, C, S (0.981) > J, C (0.959) > J, C, Z (0.953) > J, Z, S (0.806). The similarities from high to low between YQS and J, C, Z, S are: J (0.749) > C (0.573) > Z (0.136) > S (0.104). Compared with the single decoction added, the fingerprint areas of YQS decoction had 14 peaks decreased and 63 peaks increased. **Conclusion:** J and C were the main source of material basis of YQS. In this paper, from the perspective of the material basis composition, the data analysed how important of J, C, Z and S in the whole prescription. This result made the traditional interpretation of prescription more persuasive.

[Key words] Yinqiao San; compound compatibility; Jun Chen Zuo Shi; fingerprint

[收稿日期] 20141009(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81230089);山东省自然科学基金项目(ZR2014HQ046)

[第一作者] 张会敏,在读博士,助理研究员,从事中药化学、分子药理学及分子诊断学研究,Tel:0531-82949830, E-mail: huiminzhang@163.com

[通讯作者] *王升启,研究员,博士生导师,从事分子药理学及分子诊断学研究,Tel:010-66932211, E-mail: sqwang@bmi.ac.cn

银翘散出自清代医家吴鞠通所著《温病条辨》上焦篇,由金银花、连翘、牛蒡子、荆芥穗等 9 味中药组成^[1]。吴鞠通在方中用金银花、连翘为君药,体现了以清热为主的思想;薄荷、牛蒡子有疏散风热,增强解表祛邪的作用,荆芥穗、淡豆豉辛温解表,温而不燥,免伤津之弊,又能透邪外出,为臣药;桔梗、甘草能解毒利咽、宣肺祛痰,竹叶、芦根具有清热生津之功,有助于辅佐君药清在肺之热及逐邪外出,为佐药;甘草调和诸药,为使药。蒋玉珍从桑菊饮、银翘散的组方探讨了辛凉解表剂的配伍结构^[2],席中原从方药组成探讨了银翘散的制方原则^[3],吴振起等从性味配伍探讨银翘散的组方特点^[4]。在项目组前期研究的基础上,本文根据《温病条辨》中银翘散传统方解利用 HPLC 指纹图谱技术,对银翘散及

君臣佐、君臣使、君佐使、君臣、君、臣、佐、使进行 HPLC 指纹图谱研究,利用指纹图谱处理软件对各组间 HPLC 指纹图谱进行数据分析,从而探讨银翘散复方配伍关系。

1 材料

1.1 仪器、试剂 UltiMate 3000 XRS 型超快速液相色谱仪, Thermo C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇色谱纯,超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 试药 对照品绿原酸 (110753-201314), 连翘苷 (110821-201213), 牛蒡苷 (110819-201309), 甘草苷 (111610-201106) 购于中国食品药品检定研究院; 连翘酯苷 A (140303) 购于成都克洛玛生物科技有限公司。银翘散及不同配伍组方均购于北京同仁堂大药房, 配比见表 1。

表 1 银翘散及不同配伍组方配比

Table 1 Experimental materials of Yinqiao San and different compound compatibility

配伍组	简称	组方配比
银翘散	YQS	连翘 30 g, 金银花 30 g, 苦桔梗 18 g, 薄荷 18 g, 竹叶 12 g, 生甘草 15 g, 荆芥穗 12 g, 淡豆豉 15 g, 牛蒡子 18 g 组成, 另芦根 15 g
君臣佐	JCZ	连翘 30 g, 金银花 30 g, 苦桔梗 18 g, 薄荷 18 g, 竹叶 12 g, 荆芥穗 12 g, 淡豆豉 15 g, 牛蒡子 18 g 组成, 另芦根 15 g
君臣使	J,C,S	连翘 30 g, 金银花 30 g, 薄荷 18 g, 生甘草 15 g, 荆芥穗 12 g, 淡豆豉 15 g, 牛蒡子 18 g 组成, 另芦根 15 g
君佐使	J,Z,S	连翘 30 g, 金银花 30 g, 苦桔梗 18 g, 竹叶 12 g, 生甘草 15 g 组成, 另芦根 15 g
君臣	JC	连翘 30 g, 金银花 30 g, 薄荷 18 g, 荆芥穗 12 g, 淡豆豉 15 g, 牛蒡子 18 g 组成, 另芦根 15 g
君	J	连翘 30 g, 金银花 30 g
臣	C	薄荷 18 g, 荆芥穗 12 g, 淡豆豉 15 g, 牛蒡子 18 g
佐	Z	苦桔梗 18 g, 竹叶 12 g, 芦根 15 g
使	S	生甘草 15 g

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Thermo C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A)-0.05% 磷酸水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 1% ~ 2% A; 10 ~ 30 min, 2% ~ 15% A; 30 ~ 50 min, 15% ~ 20% A; 50 ~ 80 min, 20% ~ 40% A; 80 ~ 100 min, 40% ~ 43% A), 检测波长 237 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。

2.2 供试品溶液的制备 《温病条辨》中记载银翘散煎煮方法为“上杵为散,每服六钱,鲜苇根汤煎,香气大出,即取服,勿过煮”。故本文按银翘散组方配比称取适量的粗粉,第一次加 10 倍量水,浸泡 0.5 h,回流提取 20 min,过滤;第二次加 8 倍量水,回流提取 20 min,过滤;合并 2 次滤液,滤液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。君臣佐、君臣使、君佐使、君臣、君、臣、佐、使各配伍组均按照银翘散组方配比称取样品,提取方法同银翘散。

2.3 对照品溶液的制备 精密称定各对照品适量,加甲醇溶解配制成质量浓度分别为绿原酸 0.50 g·L⁻¹, 连翘苷 2.04 g·L⁻¹, 连翘酯苷 A 1.62 g·L⁻¹, 牛蒡苷 1.84 g·L⁻¹, 甘草苷 0.60 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.4 指纹图谱的建立 精密吸取各供试品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,按上述色谱条件操作。银翘散及各不同配伍 HPLC 色谱见图 1 ~ 6。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取银翘散同一供试品溶液,连续进样 6 次,结果共有峰峰面积的 RSD < 10%, 共有峰保留时间 RSD 均 < 3%, 表明仪器的精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取银翘散 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,进样测定,结果共有峰峰面积的 RSD 不超过 10%, 共有峰保留时间 RSD 均 < 3%。

2.5.3 稳定性试验 取同一银翘散供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定,结果共有峰峰面积的

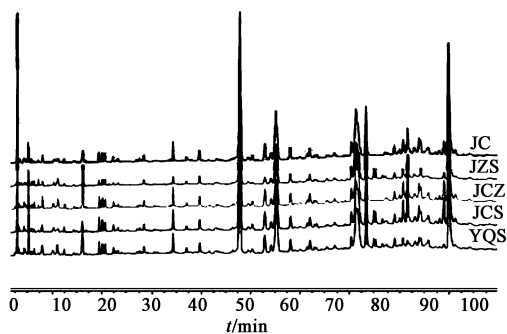


图 1 银翘散及各配伍组指纹谱
Fig. 1 Fingerprint matching graph of Yinqiao San and compatibility groups

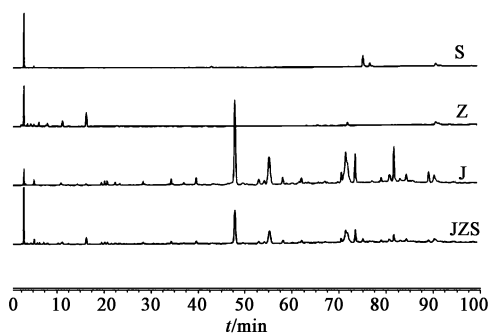


图 4 君佐使组与君、佐、使指纹谱
Fig. 4 Fingerprint matching graph of J, Z, S and J, Z, S compatibility groups

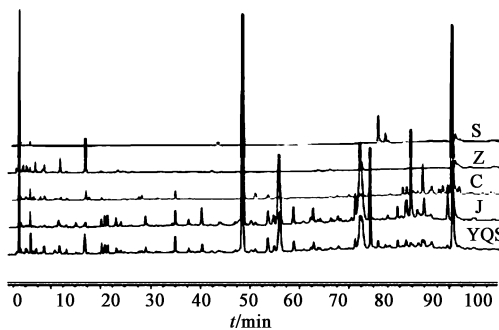


图 2 银翘散与君、臣、佐、使指纹谱
Fig. 2 Fingerprint matching graph of Yinqiao San and J, C, Z, S compatibility groups

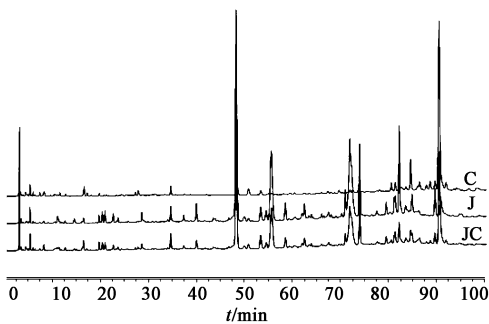


图 5 君臣组与君、臣指纹谱
Fig. 5 Fingerprint matching graph of JC and J, C compatibility groups

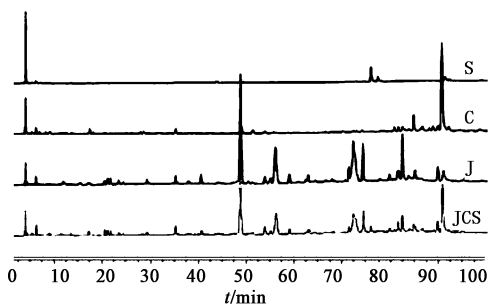


图 3 君臣使组与君、臣、使指纹谱
Fig. 3 Fingerprint matching graph of J, C, S and J, C, S compatibility groups

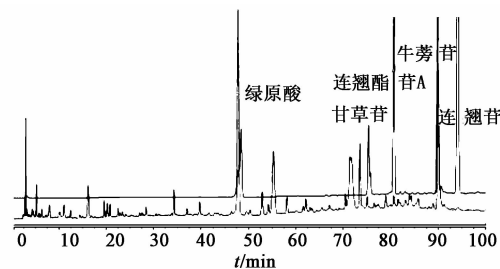


图 6 银翘散与混合对照品匹配
Fig. 6 Matching graph of Yinqiao san and the mixed standard

RSD 不超过 10% ,共有峰保留时间 RSD 均 <3% 。

2.6 指纹图谱软件分析 采用国家药典委员会发布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版对各组图谱进行比对分析,各组指纹图谱匹配结果见表 2,3。

3 结果与讨论

本文所有配伍组供试品溶液的提取条件相同,料液比一致,保证了提取过程中各因素对各样品的影响尽量一致。因此,各配伍组提取液中同一单味

表 2 银翘散及各配伍组 HPLC 指纹图谱相似度

Table 2 HPLC fingerprint similarities of Yinqiao-san and the compatibility groups

	YQS	J,C,S	JCZ	J,Z,S	JC
YQS	1.000	0.981	0.953	0.806	0.959
J,C,S	0.981	1.000	0.947	0.764	0.979
JCZ	0.953	0.947	1.000	0.832	0.949
J,Z,S	0.806	0.764	0.832	1.000	0.762
JC	0.959	0.979	0.949	0.762	1.000

药(例如,金银花)浓度并不一致,故本文对各峰面积进行了换算,使各配伍组提取液中同一单味药各峰面积对应相同药物浓度,保证了数据分析结果更

表3 银翘散及J,C,Z,S组 HPLC 指纹图谱相似度
Table 3 HPLC fingerprint similarities of Yinqiao-san and J, C, Z, S groups

	YQS	J	C	Z	S	与YQS匹配共有峰/个
YQS	1.000	0.749	0.573	0.136	0.104	-
J	0.749	1.000	0.117	0.128	0.041	77
C	0.573	0.117	1.000	0.125	0.066	52
Z	0.136	0.128	0.125	1.000	0.420	41
S	0.104	0.041	0.066	0.420	1.000	22

科学、合理。本文所建立的指纹图谱包含了银翘散君臣佐使中主要药效成分(见图6),绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A、牛蒡苷均有明确的抗流感病毒作用^[6-8]。

银翘散及各配伍组 HPLC 指纹图谱相似度评价结果显示。银翘散与各配伍组相似度由高到低为 J,C,S(0.981) > JC(0.959) > JCZ(0.953) > J,Z,S(0.806),君臣药是银翘散物质基础主要来源,与银翘散全方的相似度高达 0.959。银翘散与君、臣、佐、使组相似度由高到低为 J(0.749) > C(0.573) > Z(0.136) > S(0.104),君、臣、佐、使各组对银翘散物质基础的贡献度与中药配伍原则中君、臣、佐、使在全方中的重要性相一致。

银翘散配伍合煎与单煎相加指纹图谱相比 14 个峰面积降低,63 个峰面积增加。说明配伍可使银翘散大部分主成分煎出率提高,少数成分煎出率降低。

有效成分是方剂治疗疾病的物质基础,单味中药经复方配伍组成方剂后,功效发生变化的本质则是物质基础的改变。因而,方剂物质基础的研究在

方剂配伍研究中占有重要地位^[5],也是近几年来方剂配伍研究的热点课题之一。通过对银翘散及君臣佐、君臣使、君佐使、君臣、君、臣、佐、使各组方进行 HPLC 指纹图谱研究及数据分析,从银翘散物质基础组成的角度对其复方配伍关系有了更进一步的认识,有助于增强传统方解的说服力。银翘散配伍后所发生变化的成分的 HPLC-MS-MS 及化合物归属将在随后进行进一步研究。

[参考文献]

[1] 谢鸣. 方剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:9.

[2] 蒋玉珍. 从桑菊饮、银翘散的组方探讨辛凉解表剂的配伍结构[J]. 江西中医学院学报,1998,10(2):67.

[3] 席中原. 从方药组成探讨银翘散的制方原则[J]. 中国中医急症,2012,21(1):24.

[4] 吴振起,刘光华,王雪峰. 从性味配伍探讨银翘散的组方特点[J]. 中华中医药学刊,2008,26(5):952-953.

[5] 阎姝. 方剂配伍规律的现代研究[J]. 天津药学,2011,23(5):37-39.

[6] Li L, Chang S H, Xiang J F, et al. Screen anti-influenza lead compounds that target the PA(C) subunit of H5N1 viral RNA polymerase[J]. PLoS One,2012,7(8):1-7.

[7] Zhong W T, Wu Y C, Xie X X, et al. Phillyrin attenuates LPS-induced pulmonary inflammation via suppression of MAPK and NF-κB activation in acute lung injury mice[J]. Fitoterapia,2013,90(6):132-139.

[8] Hayashi K, Narutaki K, Nagaoka Y, et al. Therapeutic effect of arctiin and arctigenin in immunocompetent and immunocompromised mice infected with influenza A virus[J]. Biol Pharm Bull,2010,33(7):1199-1205.

[责任编辑 顾雪竹]