

· 化学与分析 ·

甲嘎松汤 HPLC 特征指纹图谱

熊天琴^{1*}, 赵玉民¹, 泽仁达瓦², 廖嘉仪¹, 谭庆龙¹, 何国林¹, 康萨·索朗其美²
(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 西藏藏医学院, 拉萨 850000)

[摘要] 目的: 建立甲嘎松汤的 HPLC 特征指纹图谱。方法: 选择 6-姜辣素和去氢二异丁香酚为对照成分, 采用 HPLC 测定, 色谱条件为 Platisil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-甲醇-0.3% 磷酸水梯度洗脱, 检测波长 274 nm, 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 年 A 版分析 10 批甲嘎松汤样品的 HPLC 指纹图谱。结果: 共获得 15 个共有峰, 指认了其中 2 个共有峰分别为 6-姜辣素和去氢二异丁香酚。10 批样品的指纹图谱相似度均 > 0.9, 表明相关性较好, 所含化学成分基本一致。结论: 该法操作简便、灵敏度高、准确可靠, 为甲嘎松汤的质量评价提供科学依据。

[关键词] 甲嘎松汤; 特征指纹图谱; 6-姜辣素; 去氢二异丁香酚; 高效液相色谱; 干姜; 肉豆蔻; 豆蔻

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0060-04

[doi] 10.11653/syfy2013220060

HPLC Characteristic Fingerprint of Jiagasong Decoction

XIONG Tian-qin^{1*}, ZHAO Yu-min¹, ZE Rendawa², LIAO Jia-yi¹,
TAN Qing-long¹, HE Guo-lin¹, KANGSA · Suolangqimei²

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Tibet Traditional Medical College, Lhasa 850000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC characteristic fingerprint of Jiagasong decoction. **Method:** Taking 6-gingerol and dehydrodiisoeugenol as control components, which were determined by HPLC, chromatographic conditions were as follows: Platisil ODS column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-methanol-0.3% phosphoric acid solution for gradient elution, detection wavelength 274 nm, column temperature 25 °C, flow rate 1.0 mL·min⁻¹, injection volume 10 μL. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2004A) was used in analysis 10 batches of Jiagasong decoction. **Result:** HPLC characteristic fingerprint of Jiagasong decoction was established, 15 common peaks were received, two of them were identified as 6-gingerol and dehydrodiisoeugenol. Similarity of fingerprint among 10 batches of samples was more than 0.9, indicating a good correlation and basically the same chemical compositions. **Conclusion:** This assay method was simple, sensitive and accurate, this paper could provide scientific basis for quality evaluation of Jiagasong decoction.

[Key words] Jiagasong decoction; characteristic fingerprint; 6-gingerol; dehydrodiisoeugenol; HPLC; Zingiberis Rhizoma; Myristicaceae Semen; Amomi Fructus Rotundus

甲嘎松汤为藏药成方, 又名“三味干姜散”, 收载于《卫生部药品标准·藏药》^[1], 由干姜、肉

豆蔻组成, 为黄褐色粉末, 气芳香, 味苦、辛, 临床用于治疗小儿肝炎、寒性肝炎、肝肿大等症。该复方中

[收稿日期] 20130421(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202997); 广东省科技计划项目(2011B031700075); 广东省自然科学基金项目(S2011010003925)

[通讯作者] *熊天琴, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础及作用机制研究, Tel: 020-39358085, E-mail: xiongtq020@gzucm.edu.cn

成分复杂,化学成分包括挥发油、姜辣素、二苯基庚烷、黄酮醇类及脂肪酸等,具有解热、镇痛、抗炎、抗氧化、保肝等功效^[2-8]。中药复方的药效由其化学成分群的种类及各成分含量共同决定,中药指纹图谱能较全面地反映药物所含化学成分的种类和数量,从而体现中药质量的优劣^[9]。本实验采用 HPLC 建立甲嘎松汤的特征指纹图谱,选择 2010 年版《中国药典》^[10]一部中新规定的干姜对照品 6-姜辣素和肉豆蔻中去氢二异丁香酚为对照成分,进行特征峰的标定,为甲嘎松汤的临床应用及新剂型开发提供参考。

1 材料

P680 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),UV-2400PC 型紫外分光光度计(日本岛津公司),JJ2000 型 1/万电子分析天平(江苏常熟市双杰测试仪器厂),BF211D 型 1/10 万电子天平(Startrius 公司),DFI-200 型手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

去氢二异丁香酚、6-姜辣素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111838-201102,111833-201102),甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,水为怡宝矿泉水,其他试剂均为分析纯。10 批药材分别于不同时间购自广州中医药大学一附院、广东省中医院及广州大学城采芝林药店,经广州中医药大学祝晨蓀研究员鉴定,干姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎,豆蔻为姜科植物白豆蔻 *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep. 的干燥成熟果实,肉豆蔻为肉豆蔻科植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Platisil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-甲醇-0.3% 磷酸水梯度洗脱,洗脱程序见表 1,检测波长 274 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	乙腈	甲醇	0.3% 磷酸水
0	35	25	40
8	42	1	57
60	30	35	35
75	30	40	30
105	35	25	40
118	35	25	40

2.2 对照品溶液的制备 分别取 6-姜辣素和去氢二异丁香酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,配成质量浓度分别为 1.99,0.50 g·L⁻¹ 的对照品溶液。精密移取 2 个成分的对照品溶液各 2.40 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,得混合对照品溶液,于 4 °C 保存备用。

2.3 供试品溶液的制备 取三味干姜散(干姜-豆蔻-肉豆蔻 6:5:4)2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 90% 甲醇 60 mL,密塞,称定质量,超声(100 W,40 kHz)30 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

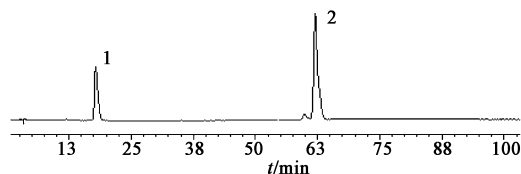
2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测得各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别为 0.02% ~ 0.12%,0.45% ~ 2.18%,相似度均 > 0.95,表明该方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批样品 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,结果各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别未 0.03% ~ 0.11%,0.17% ~ 2.52%,相似度均 > 0.95,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,6,8,12,24,36 h 进样,按 2.1 项下色谱条件测定,结果各共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别在 0.02% ~ 0.12%,0.37% ~ 2.40%,相似度均 > 0.95,表明供试品溶液在 36 h 内较稳定。

2.5 样品测定 取 10 批甲嘎松汤样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件依次进样检测,记录色谱图,共获得 15 个共有峰,指认了其中 2 个共有峰,分别为 6-姜辣素和去氢二异丁香酚,见图 1。



1. 6-姜辣素;2. 去氢二异丁香酚

图 1 混合对照品溶液 HPLC

2.6 特征指纹图谱的建立

2.6.1 参比峰的选择 在各批次样品图谱中去氢

二异丁香酚的色谱峰(9 号峰)分离良好,峰位居中,峰面积较大且为所有样品共有,故确定去氢二异

丁香酚为参照峰。共有峰相对保留时间见表 2,共有峰相对峰面积见表 3。

表 2 10 批甲嘎松汤药材特征指纹图谱中共有峰的相对保留时间($n=10$)

峰号	样品										RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.28	0.29	0.98
2	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.43
3	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.20
4	0.69	0.68	0.68	0.68	0.69	0.68	0.69	0.68	0.68	0.68	0.24
5	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.11
6	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.07
7	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.93	0.08
8	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.15
9(S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
10	1.05	1.05	1.05	1.05	1.04	1.05	1.04	1.05	1.05	1.05	0.15
11	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13	0.05
12	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	0.04
13	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	0.06
14	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	1.51	0.10
15	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	1.57	0.09

表 3 10 批甲嘎松汤药材特征指纹图谱中共有峰的相对峰面积($n=10$)

峰号	样品										RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	0.43	0.41	0.43	0.42	0.44	0.44	0.41	0.42	0.45	0.42	2.76
2	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	2.62
3	0.10	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.52
4	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	1.18
5	0.24	0.24	0.24	0.23	0.24	0.24	0.24	0.24	0.23	0.24	1.89
6	0.12	0.12	0.13	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	1.72
7	0.56	0.56	0.56	0.59	0.53	0.56	0.56	0.57	0.57	0.57	2.40
8	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.19	0.18	2.56
9(S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
10	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	1.04
11	0.26	0.27	0.26	0.27	0.26	0.26	0.27	0.26	0.27	0.26	1.35
12	0.51	0.51	0.50	0.50	0.51	0.51	0.51	0.51	0.54	0.51	2.10
13	0.67	0.63	0.65	0.64	0.64	0.63	0.63	0.64	0.65	0.64	1.69
14	0.60	0.60	0.61	0.58	0.62	0.63	0.60	0.59	0.61	0.59	2.64
15	0.63	0.62	0.63	0.65	0.62	0.61	0.62	0.61	0.61	0.61	1.88

2.6.2 特征指纹图谱的建立及相似度评价 将 10 批甲嘎松汤药材供试品溶液的色谱图数据导出 *.AIA 格式文件,导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版相似度软

件中进行色谱匹配,相似度计算时采用多点校正方式,即采用中位数法生成对照谱,全谱相似度均为 1.000 0,建立的共有模式见图 2,并进行相似度计算。结果表明测得各共有峰的相对保留时间和相对

峰面积比值的 RSD 分别在 0.04% ~ 0.98%, 1.04% ~ 2.76%, 非共有峰的峰面积占总峰面积的百分比 < 10%, 符合指纹图谱技术要求。所测指纹图谱的相似度均 > 0.9, 表明 10 批药材间具有较好的相关性, 所含化学成分基本一致。

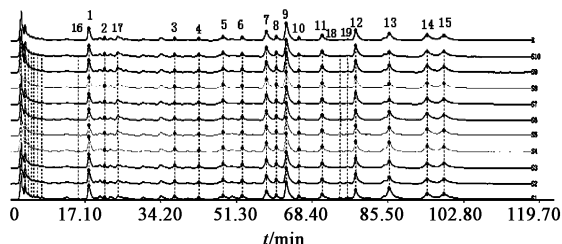


图 2 10 批甲嘎松汤样品 HPLC 指纹图谱

3 讨论

2010 年版《中国药典》中 6-姜辣素、去氢二异丁香酚的检测波长分别为 280, 274 nm。采用 UV-2400PC 型紫外分光光度计在 200 ~ 800 nm 进行全波长扫描, 结果显示 6-姜辣素、去氢二异丁香酚的最大吸收波长分别为 288, 292 nm, 样品的最大吸收波长 297 nm。但在 288 nm 处去氢二异丁香酚不能完全分开, 在 292 nm 处 6-姜辣素的峰面积很小且去氢二异丁香酚几乎无吸收峰; 在 274, 280 nm 处两者均有很好吸收, 但在 274 nm 处出峰最多, 峰形较好, 分离度符合要求, 故特征图谱分析选择检测波长 274 nm。

考察了甲醇、水-乙腈、水作为流动相, 梯度洗脱发现色谱峰不能得到完全分离, 且有拖尾现象; 故选择乙腈、甲醇、0.3% 磷酸水作为流动相, 通过调节不同梯度比例最终得到了较理想的色谱图。曾分别考察用水、乙醇、甲醇超声处理样品, 结果发现用水作溶剂时, 提取出的成分非常少; 用乙醇作溶剂时, 6-姜辣素的峰面积明显偏小且有些峰的峰形不太好;

而甲醇能使去氢二异丁香酚和 6-姜辣素均得到很好的提取且峰形很好, 故选择甲醇为提取溶剂。

结合混合对照品色谱峰的标定可知, 1 号峰属于干姜的 6-姜辣素, 9 号峰属于肉豆蔻的去氢二异丁香酚。图 2 中显示有 19 个相匹配的共有峰, 因 17 号峰的峰形不太好, 16, 18 及 19 号峰的峰面积太小, 故均未被纳入共有峰。除 9 号样品的相似度为 0.908 外, 其余 9 个样品的相似度均 > 0.95, 说明各批样品间相关性较好, 所含化学成分基本相同, 为甲嘎松汤后期的动物试验提供相同的物质基础。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药. 第 1 册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 257.
- [2] 营大礼. 干姜化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(18): 1435.
- [3] 李翔, 王敏, 郭丽红, 等. 正交设计用于干姜中 6-姜酚提取优化的研究[J]. 华北国防医药, 2010, 22(6): 525.
- [4] 李素民, 杨秀岭, 赵智, 等. 干姜和生姜药理研究进展[J]. 中草药, 1999, 30(6): 471.
- [5] 耿涛, 谢梅林, 孙晓飞. 生姜油对急性肝损伤的保护作用研究[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1123.
- [6] 向云亚, 蒋苏贞, 黄兆胜. 姜酚对小鼠肝药酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 208.
- [7] 张蕾, 徐云峰, 沈硕, 等. 肉豆蔻的化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12(6): 16.
- [8] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 3, 8.
- [9] 陈根顺, 徐丽芳, 李鹏. 草珊瑚的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 293.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 13, 126, 156.

[责任编辑 全燕]