

# 姜不同炮制品对苓甘五味姜辛汤 4 种成分含量的影响

冉 珊<sup>1,2</sup>, 孙方方<sup>1,2</sup>, 宋 燕<sup>1,2</sup>, 潘凌宇<sup>1,2</sup>, 洪 燕<sup>1</sup>, 韩燕全<sup>2</sup>

(1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学第一附属医院 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 安徽 合肥 230031)

**[摘要]**目的 探明姜不同炮制品对苓甘五味姜辛汤指标成分含量的影响。方法 分别用生姜、干姜、炮姜配伍成苓甘五味(生)姜辛汤、苓甘五味(干)姜辛汤、苓甘五味(炮)姜辛汤各 10 批, 采用超高效液相色谱法对其进行含量测定分析。色谱条件: Acquity BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm×100 m, 1.7 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 280 nm。结果 姜不同炮制品组成的苓甘五味姜辛汤中甘草苷、甘草酸铵、6-姜酚、五味子醇甲 4 种成分的线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 8; 4 种成分的平均加样回收率分别为 98.01%、99.78%、96.69% 和 98.36%, RSD 分别为 2.15%、2.47%、2.79% 和 2.34%。结论 姜的不同炮制品对苓甘五味姜辛汤成分含量有不同程度的影响。

**[关键词]**姜; 炮制; 苓甘五味姜辛汤; 超高效液相色谱法; 含量测定

**[中图分类号]**R283.4 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.06.025

中药炮制是中药传统制药技术的集中体现和核心,“饮片入药,生熟异用”是中药治疗疾病的重要原则。中药生熟(制)药性、功效差异的本质是其所含化学成分发生变化,从而导致药理和临床作用范围不同,因而只有探明中药生和熟(制)之间的化学物质基础变化,才有助于明确炮制的原理<sup>[1]</sup>。近年来,中药炮制、药性研究在化学物质基础、药理学及代谢组学等方面都取得了较为显著的成果<sup>[2]</sup>。但是,这些研究多以单味饮片为对象,所得出的药性、药效变化结果与复方配伍、整体用药的临床实际之间仍有一定差异。

姜根据炮制形式不同可分为生姜、干姜和炮姜。其中生姜长于散寒解表、止呕化痰,干姜温肺散寒、温运脾阳,炮姜善温经止血、温中止痛<sup>[3]</sup>。苓甘五味姜辛汤出自《金匮要略》,由茯苓、干姜、细辛、五味子、甘草 5 味中药组成,是临床治疗寒饮伏肺的经典方剂。方中姜炮制品选择的依据为何?姜不同炮制品配伍后对苓甘五味姜辛汤化学成分及姜的指标性成分 6-姜酚的影响如何?基于上述问题,本研究分别用生姜、干姜、炮姜配伍成苓甘五味姜辛汤,采用超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)比较苓甘五味姜辛汤替换生姜及

其不同炮制品后的其余 4 种化学成分变化,分析姜不同炮制品对苓甘五味姜辛汤成分含量的影响。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 超高效液相色谱仪:美国 Waters Acquity H-Class, 包括四元梯度泵自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器以及 Empower 2 工作站; ME55 型十万分之一分析天平:梅特勒-托利(上海)有限公司; KQ3200DB 型超声仪:江苏昆山超声仪器有限公司; 0.2 μm 微孔滤膜:上海陆纳生物科技有限公司。

1.2 试剂 茯苓、甘草、细辛、五味子由安徽中医药大学第一附属医院中药房提供,经韩燕全副主任中药师鉴定符合 2015 版《中华人民共和国药典》规定,为正品药材;生姜购于合肥家乐福超市。

实验用对照品的批号与来源:甘草苷(批号 551-15-5)、甘草酸单铵盐(批号 53956-04-0)购于成都普思生物科技股份有限公司,6-姜酚(批号 13012303)购于成都曼思特生物科技有限公司,五味子醇甲(批号 110857-200709)购于中国药品生物制品检定所,经氢核磁共振波谱法、<sup>13</sup>C 核磁共振波谱法、紫外可见分光光度法、红外分光光度法和质谱法等光谱检测确认其结构。甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯,水为蒸馏水。

## 2 方法与结果

2.1 样品制备 按照《中华人民共和国药典》2015 版干姜炮制方法,将生姜除去杂质,略泡,洗净,润透,切厚片,低温真空干燥而得干姜样品;按照《中华人民共和国药典》2015 版(附录 II D)项下砂烫法,结合课题组前期优化的工艺炮制而得炮姜样品。

**基金项目:**安徽省自然科学基金项目(1708085MH196);安徽省卫生计生委中医药科研课题(2016zy03);国家中医药管理局临床中医学重点学科建设项目(国中医药人教发[2012]32 号)

**作者简介:**冉珊(1993-),女,硕士研究生

**通信作者:**韩燕全, [hyquan2003@163.com](mailto:hyquan2003@163.com)

按照《金匱要略》组方配伍,取茯苓 12 g,甘草、干姜各 9 g,细辛、五味子各 5 g,加入 300 mL 水浸泡 30 min,武火煎沸,文火维持 40 min,过滤。药渣加水 200 mL,武火煎沸,文火维持 30 min,过滤。合并滤液,浓缩,放冷后定容至 20 mL,重复制备过程,共得 10 批苓甘五味(干)姜辛汤。将组方中的干姜分别替换成等量的生姜和炮姜,重复以上制备过程,分别得 10 批苓甘五味(生)姜辛汤和 10 批苓甘五味(炮)姜辛汤;生姜、干姜、炮姜单味药材均按同等工艺水提。

**2.2 色谱条件** Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);柱温:30 ℃;以乙腈为流动相 A,0.1%磷酸水溶液为流动相 B,进行梯度洗脱。洗脱顺序:0~4 min,3% A;4~8 min,3%~20% A;8~12 min,20% A;12~18 min,20%~80% A;18~19 min,80%~3% A;19~22 min,3% A。

**2.3 标准品溶液的制备** 取甘草苷、甘草酸铵、6-姜酚、五味子醇甲对照品适量,精密称定,加甲醇

制成每毫升分别含 0.101 mg 甘草苷、0.204 mg 甘草酸铵、0.049 mg 6-姜酚、0.092 mg 五味子醇甲的混合标准品溶液。

**2.4 供试品溶液的制备** 取 5 mL 苓甘五味(生)姜辛汤水提液加甲醇定容至 10 mL,混匀静置。取上层溶液于 6 000 r/min 离心机中离心 10 min,上清液过 0.2 μm 滤膜供 UPLC 分析用,依法制备 10 批苓甘五味(生)姜辛汤样品溶液、10 批苓甘五味(干)姜辛汤样品溶液和 10 批苓甘五味(炮)姜辛汤样品溶液。

**2.5 方法学考察**

**2.5.1 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 0.5、1、2、3、4、5 μL,依次进样,按“2.2”项下方法进行检测,测定峰面积。分别以甘草苷、甘草酸铵、6-姜酚、五味子醇甲的量为横坐标(*x*),以峰面积为纵坐标(*y*)进行线性回归,绘制标准曲线,计算回归方程。结果表明 4 种成分的线性关系良好。见表 1。

表 1 4 种成分回归方程

| 成分    | 线性范围/μg       | 回归方程                          | <i>r</i> |
|-------|---------------|-------------------------------|----------|
| 甘草苷   | 0.050 5~0.505 | $y=5\ 000\ 000x-63\ 203$      | 0.999 9  |
| 甘草酸铵  | 0.102 0~1.020 | $y=202\ 821.732x-1\ 883.3$    | 0.999 9  |
| 6-姜酚  | 0.024 5~0.245 | $y=6\ 000\ 000x-30\ 808$      | 0.999 9  |
| 五味子醇甲 | 0.046 0~0.460 | $y=912\ 047.101\ 4x-7\ 948.8$ | 0.999 8  |

**2.5.2 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液 1 μL,按照“2.2”项下方法重复进样 6 次,测定甘草苷、甘草酸铵、6-姜酚、五味子醇甲的峰面积,峰面积的 RSD 分别为 1.34%、1.46%、1.45%、2.28%,表明仪器精密度良好。

**2.5.3 重复性试验** 取 6 份苓甘五味(干)姜辛汤处方药材,按照“2.4”项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品 1 μL,在上述色谱条件下进样,测定供试品 4 种成分的峰面积积分值,计算其 RSD,甘草苷 RSD 为 2.14%,甘草酸铵 RSD 为 1.81%,6-姜酚 RSD 为 2.50%,五味子醇甲 RSD 为 2.64%,表明该方法重复性表现良好。

**2.5.4 稳定性试验** 精密吸取苓甘五味(干)姜辛汤样品溶液 1 μL,按照“2.2”项下方法定时进样测定,时间间隔为 0、2、4、8、12、16 h,记录峰面积,计算 RSD,甘草苷 RSD 为 1.10%,甘草酸铵 RSD 为 0.47%,6-姜酚 RSD 为 1.24%,五味子醇甲 RSD 为 2.16%,表明样品溶液在 48 h 内稳定。

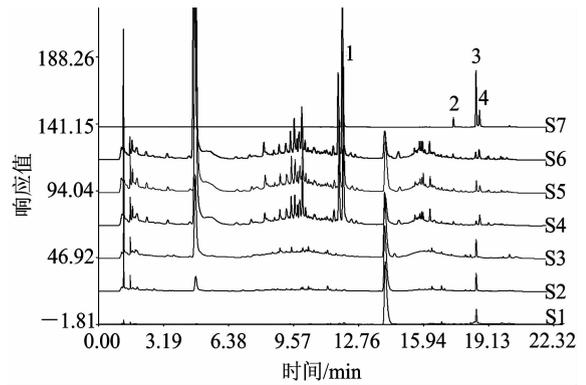
**2.5.5 加样回收率试验** 按照“2.1”项下样品制备方法,平行制备,取已知浓度的苓甘五味(干)姜辛汤 6 份,每份 0.5 mL,分别精密加入混合标准品 0.5

mL,混合均匀,按“2.2”项下方法进样 1 μL,计算回收率,甘草苷、甘草酸铵、6-姜酚、五味子醇甲的平均回收率分别为 98.01%、99.78%、96.69%、98.36%,RSD 分别为 2.15%、2.47%、2.79%、2.34%,说明该方法准确度较好。见表 2。

**2.6 含量测定** 将供试品溶液分别取 1 μL,按照“2.2”项下方法注入超高效液相色谱仪,记录色谱图,见图 1。按外标法计算甘草苷、甘草酸铵、6-姜酚、五味子醇甲的含量,4 种成分的含量存在明显差异。与苓甘五味(干)姜辛汤相比,苓甘五味(生)姜辛汤中甘草苷、甘草酸铵和 6-姜酚含量有所减少,其中 6-姜酚含量减少 78.81%,而五味子醇甲含量则略有增加;苓甘五味(炮)姜辛汤中甘草苷含量有所减少,而甘草酸铵、6-姜酚及五味子醇甲含量均有增加,其中甘草酸铵和五味子醇甲含量增幅明显。与干姜相比,炮姜中 6-姜酚含量略有减少;而生姜中 6-姜酚含量则有明显减少。与单味姜中 6-姜酚含量比较,复方中生姜的 6-姜酚含量降低最多,达 77.97%,而干姜、炮姜 6-姜酚含量降低率接近,分别为 22.62%和 17.00%。见表 3。

表2 苓甘五味姜辛汤4种成分的加样回收率测定结果

| 成分    | 样品含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD/% |
|-------|---------|--------|--------|--------|---------|-------|
| 甘草苷   | 0.328   | 0.470  | 0.784  | 96.87  | 98.01   | 2.15  |
|       | 0.327   | 0.470  | 0.797  | 99.96  |         |       |
|       | 0.325   | 0.470  | 0.796  | 100.02 |         |       |
|       | 0.329   | 0.470  | 0.798  | 99.68  |         |       |
|       | 0.329   | 0.470  | 0.781  | 96.04  |         |       |
|       | 0.325   | 0.470  | 0.774  | 95.50  |         |       |
| 甘草酸铵  | 0.245   | 0.240  | 0.495  | 100.87 | 99.78   | 2.47  |
|       | 0.248   | 0.240  | 0.499  | 101.28 |         |       |
|       | 0.247   | 0.240  | 0.487  | 96.81  |         |       |
|       | 0.248   | 0.240  | 0.490  | 97.41  |         |       |
|       | 0.244   | 0.240  | 0.490  | 99.07  |         |       |
|       | 0.245   | 0.240  | 0.500  | 103.22 |         |       |
| 6-姜酚  | 0.051   | 0.055  | 0.107  | 101.65 | 96.69   | 2.79  |
|       | 0.052   | 0.055  | 0.104  | 95.28  |         |       |
|       | 0.054   | 0.055  | 0.106  | 95.12  |         |       |
|       | 0.055   | 0.055  | 0.107  | 94.05  |         |       |
|       | 0.051   | 0.055  | 0.105  | 97.28  |         |       |
|       | 0.052   | 0.055  | 0.105  | 96.78  |         |       |
| 五味子醇甲 | 0.268   | 0.246  | 0.512  | 99.08  | 98.36   | 2.34  |
|       | 0.267   | 0.246  | 0.509  | 98.51  |         |       |
|       | 0.268   | 0.246  | 0.503  | 95.59  |         |       |
|       | 0.266   | 0.246  | 0.507  | 98.02  |         |       |
|       | 0.266   | 0.246  | 0.518  | 102.28 |         |       |
|       | 0.268   | 0.246  | 0.506  | 96.66  |         |       |



注: S1. 生姜; S2. 干姜; S3. 炮姜; S4. 苓甘五味(生)姜辛汤; S5. 苓甘五味(干)姜辛汤; S6. 苓甘五味(炮)姜辛汤; S7. 混合标准品; 1. 甘草苷; 2. 甘草酸铵; 3. 6-姜酚; 4. 五味子醇甲

图1 各样品的UPLC图

### 3 讨论

复方配伍和辨证用药是中医临床用药的特色,炮制和配伍都会对中药的化学成分产生影响。因此,在复方配伍中研究中药炮制前后对复方物质基础变化的影响较为符合中医临床用药的实际<sup>[4]</sup>。本研究将姜的不同炮制品(生姜、干姜、炮姜)按照《金匱要略》中的经典组方分别配伍成苓甘五味(生)姜辛汤、苓甘五味(干)姜辛汤和苓甘五味(炮)姜辛汤,采用UPLC法,对复方中的4种指标性成分进行含量对比分析,为苓甘五味姜辛汤临床实际用药提供实验依据,为中医复方临床合理选用炮制品提供实验支持。

表3 10批苓甘五味(生)姜辛汤、苓甘五味(干)姜辛汤和苓甘五味(炮)姜辛汤中4种成分含量测定结果

| 方剂组成       | 成分    | 含量/(mg/g) |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 平均值/(mg/g) |
|------------|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
|            |       | 1         | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |            |
| 苓甘五味(生)姜辛汤 | 甘草苷   | 3.054     | 2.788 | 2.788 | 2.952 | 3.519 | 2.571 | 2.793 | 2.643 | 3.294 | 2.976 | 2.925      |
|            | 甘草酸铵  | 1.088     | 1.261 | 1.213 | 0.932 | 1.290 | 1.230 | 0.816 | 0.804 | 2.038 | 1.040 | 1.171      |
|            | 6-姜酚  | 0.043     | 0.071 | 0.050 | 0.034 | 0.041 | 0.054 | 0.031 | 0.046 | 0.091 | 0.039 | 0.050      |
|            | 五味子醇甲 | 1.993     | 1.618 | 1.557 | 2.177 | 2.148 | 1.819 | 2.027 | 1.818 | 2.472 | 2.004 | 1.963      |
| 苓甘五味(干)姜辛汤 | 甘草苷   | 2.963     | 3.678 | 3.833 | 3.618 | 4.859 | 3.283 | 2.691 | 3.664 | 3.693 | 3.928 | 3.621      |
|            | 甘草酸铵  | 1.063     | 1.069 | 0.861 | 1.566 | 1.547 | 2.477 | 2.335 | 1.083 | 0.908 | 1.700 | 1.461      |
|            | 6-姜酚  | 0.177     | 0.098 | 0.096 | 0.376 | 0.093 | 0.520 | 0.412 | 0.099 | 0.107 | 0.382 | 0.236      |
|            | 五味子醇甲 | 1.230     | 1.457 | 1.151 | 1.781 | 1.757 | 2.691 | 4.084 | 1.479 | 1.150 | 1.774 | 1.856      |
| 苓甘五味(炮)姜辛汤 | 甘草苷   | 4.928     | 3.615 | 2.646 | 2.059 | 2.078 | 1.783 | 3.912 | 2.812 | 2.351 | 3.078 | 2.926      |
|            | 甘草酸铵  | 1.578     | 2.648 | 2.442 | 1.868 | 1.779 | 1.494 | 1.901 | 1.177 | 0.802 | 1.658 | 1.735      |
|            | 6-姜酚  | 0.086     | 0.527 | 0.397 | 0.386 | 0.328 | 0.269 | 0.135 | 0.071 | 0.132 | 0.159 | 0.249      |
|            | 五味子醇甲 | 1.806     | 2.669 | 4.098 | 2.450 | 3.494 | 3.344 | 2.121 | 1.958 | 1.080 | 1.908 | 2.493      |

本实验中,样品提取时为保证与传统煎剂相符,故采用水为提取溶剂。在课题组前期研究及查阅相关文献<sup>[5-8]</sup>的基础上对样品进行全波长扫描,结果发现在280nm处检测的图谱信息量较多,峰形较好,且各色谱峰的分度度较好,基线较平稳,故选择该波长作为检测波长。同时,本实验考察了甲醇-水、乙

腈-水、甲醇-0.1%磷酸和乙腈-0.1%磷酸4个流动相系统的梯度洗脱条件,最终以乙腈-0.1%磷酸作为流动相系统时各色谱峰的分度度较好,且基线平稳,有利于特征指纹的分析。

本实验测定了姜不同炮制品组成的苓甘五味姜辛汤中4种指标成分的含量,结果差异明显,尤其是

复方中姜的指标性成分 6-姜酚与单味姜中 6-姜酚的含量差异显著,这说明姜不同炮制品对苓甘五味姜辛汤的化学成分产生了不同程度的影响,姜的指标性成分含量在炮制配伍中也受到影响。今后应进一步研究方中其他成分、指纹图谱变化以及对应的药性、药效变化。

#### 参考文献:

- [1] 张凡,林桂梅,贾天柱. 中药生熟异用饮片的应用与管理调查[J]. 中国药事,2014,28(7):741-745.
- [2] 孙娥,徐凤娟,张振海,等. 中药炮制机制研究进展及研究思路探讨[J]. 中国中药杂志,2014,39(3):363-369.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:101,14-15.
- [4] 吴梓君,张静怡,罗琛艳,等. 延胡索生熟饮片在复方配伍后药效成分溶出规律研究[J]. 天津中医药大学学报,

2014,33(3):181-184.

- [5] 韩燕全,洪燕,左冬,等. 不同干燥工艺干姜的 UPLC 特征指纹图谱比较研究[J]. 中成药,2012,34(6):987-990.
- [6] 韩燕全,洪燕,桂洁,等. 不同产地生、干、炮姜的 UPLC 指纹图谱比较研究[J]. 中成药,2013,35(2):356-359.
- [7] LI Y, HONG Y, HAN Y, et al. Chemical characterization and antioxidant activities comparison in fresh, dried, stir-frying and carbonized ginger[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1011: 223-232.
- [8] 周倩,戴衍朋,王亮,等. HPLC 法测定生甘草、炙甘草中 6 种成分[J]. 中成药,2016,38(2):378-382.

(收稿日期:2017-04-28;编辑:张倩)

## Effect of Different Types of Processed Ginger on the Content of Four Constituents in Linggan Wuwei Jiangxin Decoction

RAN Shan<sup>1,2</sup>, SUN Fang-fang<sup>1,2</sup>, SONG Yan<sup>1,2</sup>, PAN Ling-yu<sup>1,2</sup>, HONG Yan<sup>1</sup>, HAN Yan-quan<sup>2</sup>

(1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine Grade 3 Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China)

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of ginger processed by different methods on the content of major constituents in Linggan Wuwei Jiangxin Decoction. **Methods** Fresh, dried, or processed ginger was used to prepare ten batches of Linggan Wuwei Jiangxin Decoction, and ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was used for content determination. UPLC was performed on an Acquity BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 100 m, 1.7 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid for gradient elution at a flow rate of 0.2 mL/min, a column temperature of 30 °C, and a detection wavelength of 280 nm. **Results** In Linggan Wuwei Jiangxin Decoction prepared by fresh, dried, or processed ginger, liquiritin, ammonium glycyrrhetate, 6-gingerol, and schisandrin had a good linear relationship (all  $r > 0.999$ ) with average recovery rates of 98.01%, 99.78%, 96.69%, and 98.36%, respectively (relative standard deviation = 2.15%, 2.47%, 2.79%, and 2.34%). **Conclusion** Ginger processed by different methods has varying degrees of effect on the content of constituents in Linggan Wuwei Jiangxin Decoction.

**[Key words]** Ginger; Processing; Linggan Wuwei Jiangxin Decoction; Ultra-performance liquid chromatography; Content determination