

· 中药工业 ·

银翘散水提物主要化学成分峰的来源归属研究[△]宋健¹, 张会敏^{2*}

(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014)

[摘要] **目的:** 通过建立银翘散及其各单味药水提物的 UPLC 指纹图谱, 对银翘散水提物中各主要化学成分峰进行对比分析及归属, 为进一步阐明银翘散物质基础及诠释组方配伍原理奠定基础。**方法:** 采用 UltiMate 3000 XRS UPLC, Thermo(250 mm×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ 柱; 色谱条件: 甲醇-0.05% 磷酸水为流动相梯度洗脱; 柱温: 30 ℃; 检测波长 237 nm; 流速: 1 mL·min⁻¹; 分析时间: 100 min。建立了银翘散及其各单味药水提物进行 UPLC 指纹图谱, 并利用指纹图谱处理软件对银翘散及其各单味药 UPLC 指纹图谱进行数据分析。**结果:** 在银翘散水提物的 34 个主要成分峰中, 其中 18 个成分峰来源于君药金银花, 8 个成分峰来源于君药连翘, 5 个成分峰来源于薄荷, 各有 4 个成分峰来源于荆芥、牛蒡子、竹叶, 3 个成分峰来源于甘草, 未见来源于淡豆豉、芦根、桔梗 3 味药的成分峰。并归属了绿原酸、连翘苷、牛蒡子苷等 7 个成分峰。**结论:** 有助于阐释银翘散物质基础及组方配伍原理。

[关键词] 银翘散; 水提物; 指纹图谱

Study on Main Components in Aqueous Extract of Yinqiao-San

SONG Jian¹, ZHANG Hui-min^{2*}

(1. Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. Shandong Academy of TCM, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** By establishing the UPLC fingerprint of Yinqiao-San and its individual extracts, the main chemical composition peaks were compared and analyzed, which could lay a foundation for further clarifying the material basis and interpreting the principle of compatibility of Yinqiao-San. **Methods:** The UltiMate 3000 XRS UPLC and Thermo (250 mm×4.6 mm, 5 μm) C₁₈ column were used. The chromatographic conditions were: the mobile phase gradient elution was methanol-0.05% phosphoric acid, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 237 nm, the flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the analysis time was 100 min. Then, the aqueous extracts UPLC fingerprints of Yinqiao-San and all single medicines were established, which were analyzed by the fingerprint processing software. **Results:** In the 34 main component peaks of aqueous extract of Yinqiao-San, there were 18 component peaks from Lonicerae Flos, 8 component peaks from Forsythiae Fructus, 5 component peaks from Menthae Haplocalycis Herba. And there were 4 component peaks from each of Schizonepetae Herba, Arctii Fructus and Bambosae Folia. There were only 3 component peaks from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma. There were no component peaks from Sojae Semen Praeparatum, Phragmitis Rhizoma and Platycodonis Radix. 7 component peaks were belonged. **Conclusion:** The results help to explain the material basis and compatibility principle of Yinqiao-San.

[Keywords] Yinqiao-San; aqueous extract; fingerprint

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20170904004

中药复方是中医临床药物治疗的主要手段, 遵循中医“理法方药”理论确立, 按照“君臣佐使”结构组成, 形式上表现为药物组合, 内涵上反映了中医药理论。如果说疗效是方剂配伍的结果, 那么物质基础则是方剂产生疗效的根本。中药复方配伍

的优势在于方中各药配伍后可起到协同或拮抗的作用, 从而对机体进行整体调节, 其化学成分并不等于单味药化学成分的简单相加, 配伍使原有的某些成分发生了量的变化或是产生了新的化合物, 使配伍表现出了减毒、增效甚至产生单味药不具备的药

[△] [基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2014HQ046); 山东省中医药科技发展计划项目(2015-175)

* [通信作者] 张会敏, 助理研究员, 研究方向: 中药化学、分子药理学等; E-mail: huiminzhang@163.com

理活性。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10味中药组成^[1]。现代研究已经发现了银翘散大量的活性成分,为解析复方的组成做出了巨大贡献^[2-4]。尽管如此,现阶段中药复方化学成分研究依然是一项具有挑战性的工作。总体而言,明确化学成分是解析方剂配伍工作的前提基础,是考察中药复方化学反应、药物代谢和药效机制的前提^[5]。

在项目组前期研究的基础上^[6],本文利用能够体现中医理论整体观特色的UPLC指纹图谱技术,对银翘散及其各单味药水提物进行UPLC指纹图谱研究,并利用对照品对照、指纹图谱处理软件对各UPLC指纹图谱进行数据处理,分析银翘散中各主要化学成分的来源药材,为进一步诠释银翘散物质基础及组方配伍原理奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 XRS UPLC, Thermo (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) C₁₈柱;旋转蒸发仪(上海亚荣);XS205 DualRange 电子天平(METTLER TOLEDO);0.45 μm 微孔滤膜、0.21 μm 针头滤器(Thermo);Milli-Q 超纯水仪(德国 Millipore 公司)。

1.2 材料

银翘散组方各单味药(组方配比:连翘30 g、金银花30 g、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、芦根15 g)饮片均购于北京同仁堂大药房。连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根,薄荷为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分,竹叶为禾本科毛竹属植物淡竹 *Phyllostachys nigra* (Lodd, ex Lindl.) Munro var. *henonis* (Mitf.) Stapf ex Rendle 等的叶,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎,荆芥穗为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥花穗,淡豆豉为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子的发酵

加工品,牛蒡子为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实,芦根为禾本科植物芦苇 *Phragmites communis* Trin. 的新鲜或干燥根茎,由山东中医药大学药学院中药鉴定教研室鉴定。

绿原酸(110753-201314,含量以96.6%计)、连翘苷(110821-201213,含量以95.3%计)、牛蒡苷(110819-201309,含量以95.7%计)、甘草苷(111610-201106,含量以93.7%计)、芦丁(080-9002,含量以98.0%计)、橙皮苷(110721-201014,含量以95.1%计)购于中国食品药品检定研究院,连翘酯苷A(140227,含量以98.0%计)购于成都克洛玛生物科技有限公司;色谱甲醇(天津市四友精细化学品有限公司出品,批号:501066-09064);磷酸等。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Thermo(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) C₁₈柱,流动相:甲醇-0.05% 磷酸水梯度洗脱;检测波长:237 nm;柱温:30 ℃;流速:1 mL·min⁻¹;分析时间:100 min。梯度洗脱条件为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。

2.2 供试品溶液的制备

按银翘散组方配比称取适量的粗粉,第一次料液比为1:10,浸泡半小时,回流提取20 min,补足失重,过滤;第二次料液比为1:8,回流提取20 min,补足失重,过滤;合并两次滤液,滤液经0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。金银花、连翘等各单味药均按照相同提取方法制备供试品溶液。

2.3 对照品的制备

精密称取各对照品,加适量甲醇溶解配制对照品溶液。绿原酸质量浓度为0.50 mg·mL⁻¹、连翘苷质量浓度为2.04 mg·mL⁻¹、连翘酯苷A质量浓度为1.62 mg·mL⁻¹、牛蒡苷质量浓度为1.84 mg·mL⁻¹、甘草苷质量浓度为0.60 mg·mL⁻¹、芦丁质量浓度为0.50 mg·mL⁻¹、橙皮苷质量浓度为0.50 mg·mL⁻¹。

2.4 指纹图谱的建立

精密吸取各供试品10 μL注入液相色谱仪,按上述色谱条件操作,考察了供试品溶液120 min内的色谱分离情况,100~120 min几乎无色谱峰,故选择记录了100 min内色谱图,见图1。

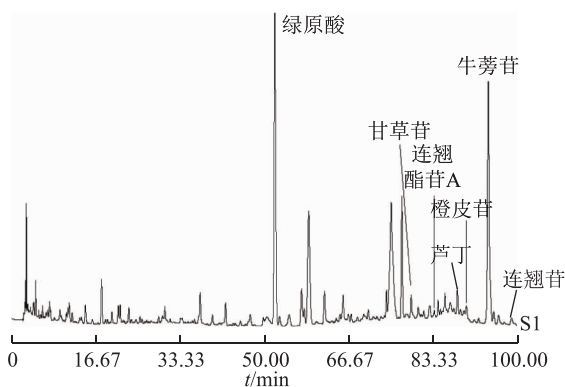


图1 银翘散 UPLC 指纹图谱

2.5 方法学考察

为了考察分析方法的可靠性，以银翘散为例，对仪器的精密度、方法重复性以及稳定性做了相应的考察。

2.5.1 精密度试验 取银翘散同一供试品溶液，按照 2.1 色谱条件连续进样 6 次，用中药指纹图谱相似度计算软件计算，所得相似度为 0.998、0.997、0.999、0.996、0.995、0.999，相似度极高，结果峰面积占总峰面积 10% 以上的共有峰峰面积的 RSD 不超过 10%，共有峰保留时间 RSD 均小于 3%，表明精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取银翘散 6 份，分别按供试品溶液制备方法制备，分别进样 10 μ L，按照 2.1 色谱条件检测指纹峰，用中药指纹图谱相似度计算软件计算，所得相似度为 0.994、0.987、0.995、0.992、0.983、0.985，结果峰面积占总峰面积 10% 以上的共有峰峰面积的 RSD 不超过 10%，共有峰保留时间 RSD 均小于 3%，说明方法的重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取银翘散同一供试品溶液，分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样，按照 2.1 色谱条件检测指纹峰，用中药指纹图谱相似度计算软件计算，所得相似度为 0.998、0.997、0.999、0.996、0.995、0.989，结果峰面积占总峰面积 10% 以上的

共有峰峰面积的 RSD 不超过 10%，共有峰保留时间 RSD 均小于 3%。

2.6 样品测定及指纹图谱软件分析

取上述供试品各 10 μ L，按照 2.1 色谱条件检测指纹峰，考察 100 min 内色谱分离情况，根据各活性组分及单味药在特征指纹图谱中色谱保留时间信息，从而实现相同的实验条件下所得的色谱指纹图谱中单味药与复方活性组分的相对归属分析。采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》A 版对各组图谱进行比对分析，银翘散 UPLC 与各对照品、银翘散与各单味药 UPLC 指纹图谱匹配图，见图 2~3；银翘散 UPLC 与各单味药及各对照品指纹图谱匹配数据见表 1。

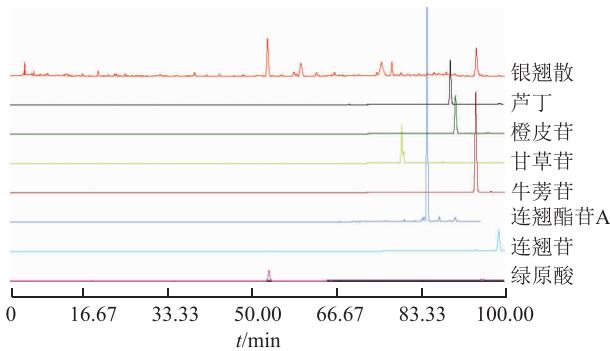


图2 银翘散与各对照品 UPLC 指纹图谱匹配图

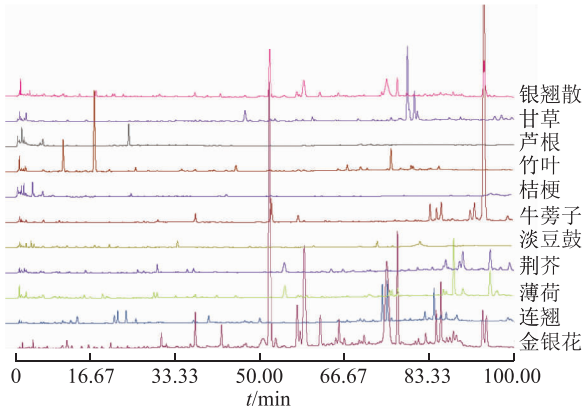


图3 银翘散与各单味药 UPLC 指纹图谱匹配图

表 1 银翘散主要成分峰的来源归属

编号	保留时间/min	峰面积	来源药材	编号	保留时间/min	峰面积	来源药材
1	3.157	477 602.0	—	18	74.075	375 609.5	连翘
2	4.581	243 638.8	—	19	75.042	3 870 303.0	金银花、连翘、竹叶
3	4.989	240 168.8	—	20	77.092	1 535 929.0	金银花、薄荷
4	17.958	456 877.4	—	21	78.999	564 877.7	金银花、薄荷、甘草
5	37.432	313 422.7	金银花、薄荷、牛蒡子	22	80.341	362 542.9	甘草(甘草苷)
6	42.369	278 859.1	—	23	82.558	419 067.0	金银花、连翘

表 1(续)

编号	保留时间/min	峰面积	来源药材	编号	保留时间/min	峰面积	来源药材
7	50.505	381 258.1	—	24	83.482	207 528.6	金银花、牛蒡子
8	52.004	4 803 751.0	金银花(绿原酸)	25	84.226	329 719.4	连翘(连翘酯苷 A)
9	54.911	281 480.1	金银花、薄荷、荆芥	26	85.601	488 073.8	金银花、连翘、牛蒡子
10	57.366	542 771.7	金银花	27	86.548	561 776.8	荆芥、竹叶
11	57.925	243 004.8	金银花	28	87.278	271 940.0	甘草
12	58.783	2 389 635.0	金银花	29	88.049	508 008.6	金银花、薄荷
13	61.899	505 432.7	金银花	30	88.669	245 755.2	金银花、连翘(芦丁)
14	65.442	534 770.9	竹叶	31	89.285	220 997.3	荆芥
15	68.277	229 204.2	金银花、竹叶	32	89.718	301 747.9	连翘(橙皮苷)
16	69.545	206 115.4	金银花	33	94.034	4 064 132.0	荆芥、牛蒡子(牛蒡子苷)
17	70.513	230 651.2	金银花、连翘	34	98.595	231 340.0	连翘(连翘苷)

注:“—”未归属。

3 讨论

3.1 样品制备

《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”。结合古今文献对煎煮方法的记载和报道,本文所建立的指纹图谱是在前期优选的色谱条件下建立的^[6],其中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A、牛蒡苷等主要药效成分均有明确的抗流感病毒作用^[7-9]。

3.2 成分峰归属

通过采用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》A 版对各组图谱进行比对分析(见图 2~3),对银翘散水提物中 34 个主要成分峰的原药材来源进行了归属,并与对照品图谱比对归属了 7 个成分(见表 1)。由表 1 可见,在银翘散水提物的 34 个主要成分峰中,有 18 个成分峰来源于君药金银花,8 个成分峰来源于连翘,5 个成分峰来源于薄荷,各有 4 个成分峰来源于荆芥、牛蒡子、竹叶,3 个成分峰来源于甘草,未检测到来源于淡豆豉、芦根、桔梗 3 味药的成分峰。分析原因可能为淡豆豉、芦根、桔梗在水提液中溶出的成分含量较低,不能被检测到。此外,银翘散中仍有 6 个成分峰没有归属来源,这 6 个峰在银翘散水提液中被检测到,但未在任何单味药水提液中检测到。大量文献研究证实,方剂配伍能够改变复方化学成分^[5]。本研究

结果为进一步对银翘散药效物质基础的深入研究及组方配伍原理的阐释提供了参考。

参考文献

- [1] 谢鸣.方剂学[M].北京:人民卫生出版社,2002.
- [2] 石钺,石任兵.银翘散抗流感病毒有效部位各组分变化及归属分析[J].药学报,2007,42(2):192-196.
- [3] 石钺,石任兵,刘斌,等.银翘散抗流感病毒有效部位群化学成分的分离与鉴定[J].中国中药杂志,2003,28(1):43-47.
- [4] 石钺,石任兵,刘斌,等.银翘散抗流感病毒有效部位群中的黄酮二糖苷[J].中草药,2003,34(8):676-678.
- [5] 徐砚通.方剂配伍的现代科学内涵探讨[J].中草药,2015,46(4):465-469.
- [6] 张会敏,曲新燕,张照研,等.银翘散不同复方配伍 HPLC 指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(10):47-50.
- [7] 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.
- [8] Zhong W T, Wu Y C, Xie X X, et al. Phillyrin attenuates LPS-induced pulmonary inflammation via suppression of MAPK and NF- κ B activation in acute lung injury mice[J]. Fitoterapia, 2013, 90(6):132-139.
- [9] 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.

(收稿日期 2017-09-04)