

基于 UPLC 特征指纹图谱和指标成分定量测定研究炮姜的炮制工艺

韩燕全¹, 洪燕², 高家荣¹, 桂洁², 汪永忠¹, 夏伦祝^{1*}, 郑礼胜³

1. 安徽中医学院第一附院 国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 安徽 合肥 230031

2. 安徽中医学院, 安徽 合肥 230031

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 从 UPLC 特征指纹图谱和 6-、8-、10-姜酚量的角度, 选择炮姜的最佳炮制温度和炮制时间。方法 采用砂烫法, 从 180~200 °C 间隔 5 °C 共 5 个温度, 每个温度下分别炒制 6、7、8 min, 共得到 15 份样品; 采用超高效液相色谱法 (UPLC) 分析各样品指纹图谱相似度; 同时采用 UPLC 法测定不同炮制品中 6-、8-、10-姜酚的量。结果 195 °C 7 min 和 195 °C 8 min 2 份样品的相似度最大, 分别为 0.995 和 0.994; 6-、8-、10-姜酚的总量最低, 分别为 5.792、5.412 mg/g。结论 综合指纹图谱相似度和 6-、8-、10-姜酚量的测定结果以及炮制品外观, 确定炮姜砂烫炮制以 195 °C 7 min 为宜。

关键词: UPLC; 指纹图谱; 炮姜; 姜酚; 砂烫法

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)01-0000-00

Processing technology of *Zingiberis Rhizoma Praeparata* based on UPLC fingerprints and quantitative determination of index components

HAN Yan-quan¹, HONG Yan², GAO Jia-rong¹, GUI Jie², WANG Yong-zhong¹, XIA Lun-zhu¹, ZHENG Li-sheng³

1. Grade 3 Laboratory of Traditional Chinese Medicine Preparation, State Administration of Traditional Chinese Medicines, The First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China

2. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To optimize the processing temperature and time of *Zingiberis Rhizoma Praeparata* (ZRP) according to ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprints and the contents of 6-, 8-, and 10-gingerol. **Methods** Samples were treated by stir-baking in sand method at 180, 185, 190, 195, and 200 °C, stirred for 6, 7, and 8 min at each temperature, respectively. Then the fingerprint similarity of the samples and the contents of 6-, 8-, and 10-gingerol were determined by UPLC method. **Results** The similarities of the two samples at 195 °C for 7 min and at 195 °C for 8 min were the highest, 0.995 and 0.994; While the contents of 6-, 8-, and 10-gingerol of the two samples were the lowest, 5.792 and 5.412 mg/g, respectively. **Conclusion** According to the similarities of the fingerprint, the contents of 6-, 8-, and 10-gingerol, and the appearance of the processed products, ZRP should be better processed by stir-baking in sand method at 195 °C for 7 min.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography; fingerprint; *Zingiberis Rhizoma Praeparata*; gingerol; stir-baking in sand method

姜是姜科植物 *Zingiber officinale* Rosc. 的根茎, 其临床常用的炮制品有干姜、炮姜 (*Zingiberis Rhizoma Praeparata*, ZRP) 等。干姜是姜的晒干或低温干燥炮制品, 性热、味辛, 具有温中祛寒、回阳通脉的作用; 炮姜则是干姜经砂烫后而制成的炮制品, 其功效温经止血、温中止痛, 用于阳虚失血、

吐血崩漏、脾胃虚寒等证。前人对于生、干、炮姜的药性与药效一直有“生姜走而不守, 干姜能走能守, 炮姜守而不走……”的精辟概括^[1]; 金元时期著名的“补土派”医家李杲也提到:“干姜, 生辛炮苦, 阳也, 生用逐寒邪而发表, 炮则除胃冷而守中……”。

收稿日期:

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102811); 安徽省自然科学基金项目 (10040606Q40)

作者简介: 韩燕全 (1977—), 男, 博士, 主管药师, 主要从事中药炮制和质量控制研究。E-mail: hyquan2003@163.com

*通讯作者 夏伦祝 E-mail: xialunzhu@sohu.com

炮姜性味由干姜的“辛”变为“苦”，与其炮制前后药效物质基础变化必定息息相关，因而对炮姜的炮制工艺进行现代化研究具有重要意义。《中国药典》2010年版项下规定：炮姜的炮制工艺为按照附录的“烫法”进行炮制，主要过程为^[2]：将净河砂置炒制容器内，用武火炒至滑利状态，再加入干姜饮片或块，不断翻动，烫至鼓起，表面棕褐色，取出，筛去砂，放凉。砂烫法的具体时间和温度多少为宜？炮制过程对炮姜整体化学成分变化和指标成分含量影响又如何？笔者至今未见文献报道。本实验采用 UPLC 法，探讨不同砂烫时间和温度对炮姜特征指纹图谱以及 6-、8-、10-姜酚量的影响，为炮姜的砂烫炮制工艺提供参考。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC H-Class System, 配备有 Acquity UPLC QSM、Acquity UPLC Sample Manager FTN、Acquity UPLC PDA Detector 以及 Empower 2 工作站等；KQ3200DB 型超声清洗器（江苏昆山超声仪器有限公司）；DZF6050 型真空干燥箱（上海博讯医疗设备厂）；SQ2119B 型多功能食品粉碎机（上海帅佳电子科技有限公司）；电子万用炉（2 kW/220 V），其他器具包括不锈钢炒锅，锅铲、20 目铁筛、温度计、计时器等。

6-姜酚（批号 23513-146）、8-姜酚（批号 23513-088）、10-姜酚（批号 23513-157）对照品购于鼎瑞

化工（上海）有限公司，经 ¹H-NMR、¹³C-NMR、MS、IR 和 UV 等光谱检测确认其结构；按本实验方法色谱条件，峰面积归一化法测得 6-、8-、10-姜酚质量分数分别为 98.79%、98.81%、99.13%。0.2 μm 微孔滤膜（上海陆纳生物科技有限公司）；乙腈为色谱纯（美国 Tedia 公司）；屈臣氏蒸馏水；乙醇等试剂均为分析纯。生姜药材购于安徽省合肥市周谷堆蔬菜批发市场（产地为山东省昌邑县），经安徽中医学院第一附院主管药师韩燕全博士鉴定为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎。

2 方法与结果

2.1 样品制备

将总质量 20 kg 的鲜姜洗净，切厚片（长度 5.0~6.0 cm、宽度 1.5~2.5 cm、厚度 0.3~0.4 cm），称取一定量，按《中国药典》2010 年版附录 VIII 项下水分测定法，以甲苯法测定含水率，剩余姜片放在室内通风阴凉处 2 周左右，自然晾干至连续称定 3 次（每次间隔 12 h）电子天平 0.1 g 位数字不再变化，得干姜饮片，备用。

称取上述干姜饮片每份 100 g，共计 15 份。具体炮制方法：将已洗好的 10 倍量细砂置于铁锅内，武火加热炒至沙子滑利、微变色状态，测定离锅底 1.0 cm 处温度设定为炒制温度，再加入干姜饮片，不断翻炒至试验设定时间（表面呈棕褐色），急出锅，筛去砂子，放凉，15 份样品炮制工艺见表 1。

表 1 15 份炮姜饮片的炮制工艺

Table 1 Processing technologies of 15 batches of ZRP

样品	炒制温度/℃	炒制时间/min	样品	炒制温度/℃	炒制时间/min	样品	炒制温度/℃	炒制时间/min
S1	180	6	S6	185	8	S11	195	7
S2	180	7	S7	190	6	S12	195	8
S3	180	8	S8	190	7	S13	200	6
S4	185	6	S9	190	8	S14	200	7
S5	185	7	S10	195	6	S15	200	8

2.2 不同炒制时间、炒制温度炮姜样品的 UPLC 指纹图谱建立

2.2.1 色谱条件^[3-6] 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为乙腈-水溶液，梯度洗脱：0~10 min，3：97；10~15 min，85：15；15~18 min，100：0；18~20 min，97：3），检测波长 280 nm，体积流量 0.35 mL/min，柱温 35 °C，进样量 2.0 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取姜酮、6-

姜酚、8-姜酚和 10-姜酚对照品适量，制成对照品母液冷藏备用；再分别吸取对照品母液一定量，加甲醇制成质量浓度分别为姜酮 28.65 μg/mL、6-姜酚 87.55 μg/mL、8-姜酚 13.82 μg/mL、10-姜酚 34.20 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取干姜和各份炮姜饮片适量，粉碎后过 80 目筛。取过筛粉末约 0.25 g，精密称定，分别置具塞锥形瓶中，加入甲醇 10 mL 称定质量，超声（150 W，40 Hz）25 min，放冷，

称量, 加甲醇补足损失质量, 摇匀, 0.2 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 精密度考察 精密吸取 S1 (180 °C、6 min 炮姜) 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。结果 14 个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 0.3% 和 1.5%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 取 S15 (200 °C、8 min 炮姜) 样品 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。结果表明, 主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 0.3% 和 2.5%, 符合指纹图谱测定要求。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取 S1 (180 °C、6 min 炮姜) 供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录色谱图。结果表明, 14 个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别小于 0.5% 和 3.0%, 表明供试品溶液 24 h 内基本稳定。

2.3 6-、8-、10-姜酚的测定

2.3.1 色谱条件 参照文献方法^[3-6]对本课题组前期研究的色谱条件进一步优化, 得到最佳色谱条件: 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈-水溶液, 梯度洗脱: 0~1 min, 40:60; 1~6 min, 65:35; 6~7 min, 70:30; 7~9 min, 40:60; 检测波长 280 nm, 体积流量 0.25 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 2 μL。

2.3.2 对照品溶液与供试品溶液的制备 分别精密量取“2.2.2”项下 6-姜酚、8-姜酚和 10-姜酚对照品母液适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 6-姜酚 87.55 μg/mL、8-姜酚 13.82 μg/mL 和 10-姜酚 34.20 μg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液的制备同“2.2.3”项。

2.3.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.3.2”项混合对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μL, 自动进样器进样, 测定峰面积, 以各色谱峰面积积分值 (Y) 对其质量浓度 (X) 进行线性回归, 结果表明 6-姜酚在 87.55~525.3 μg/mL ($r=0.9999$), 8-姜酚在 13.82~82.92 μg/mL ($r=0.9999$), 10-姜酚在 35.20~205.20 μg/mL ($r=0.9998$), 质量浓度与峰面积成良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验 吸取混合对照品溶液 2 μL, 连续进样 6 次, 6-、8-、10-姜酚峰面积的 RSD 分别为

0.37%、0.66%、1.80%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取 S1 (180 °C、6 min 炮姜) 供试品溶液, 在 0~12 h 内每隔 2 h 进样 1 次, 计算 6-、8-、10-姜酚峰面积的 RSD, 结果分别为 0.68%、1.15%、1.25%, 表明供试品溶液中 3 种姜酚成分在 12 h 内稳定。

2.3.6 重复性试验 取 S15 (200 °C、8 min 炮姜) 样品 6 份, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项下色谱条件测得 6-、8-、10-姜酚质量分数的 RSD 分别为 0.20%、1.07%、0.65%, 表明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 称取 S11 (195 °C、7 min 炮姜) 样品 0.2 g, 精密称定, 共 6 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 加入各对照品溶液适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 计算得 6-、8-、10-姜酚的平均回收率分别为 96.11%、98.10%、97.92%, RSD 分别为 1.33%、1.65%、1.88%。

2.4 结果分析

2.4.1 特征指纹图谱测定 取 15 批炮姜饮片, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2.1”项下色谱条件依次进样检测, 记录色谱图, 共获得 14 个共有色谱峰, 指认其中 4 个共有峰, 分别为姜酮 (2 号峰)、6-姜酚 (5 号峰)、8-姜酚 (6 号峰) 和 10-姜酚 (10 号峰)。混合对照品和炮姜样品共有模式的 UPLC 色谱图见图 1。

2.4.2 6-、8-、10-姜酚定量测定 按照“2.3.1”项

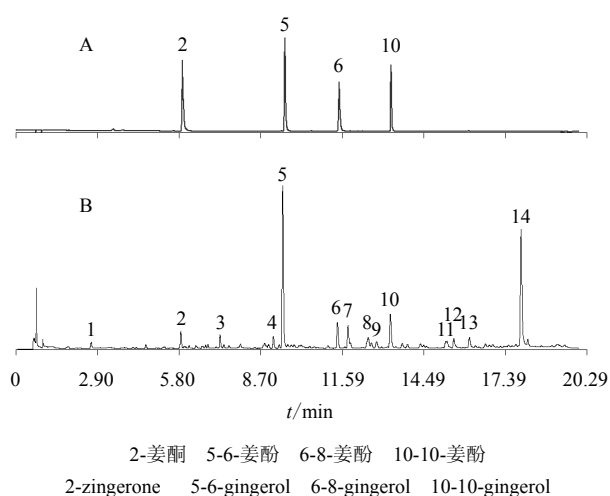


图 1 混合对照品 (A) 和炮姜样品共有模式 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and common mode of ZRP (B)

下色谱条件, 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 2 μL, 自动进样器进样, 记录色谱图, 结果表明, 此色谱条件下 6-、8-、10-姜酚与其他成分分离度良好, 混合对照品和 S3 炮姜样品色谱图见图 2。

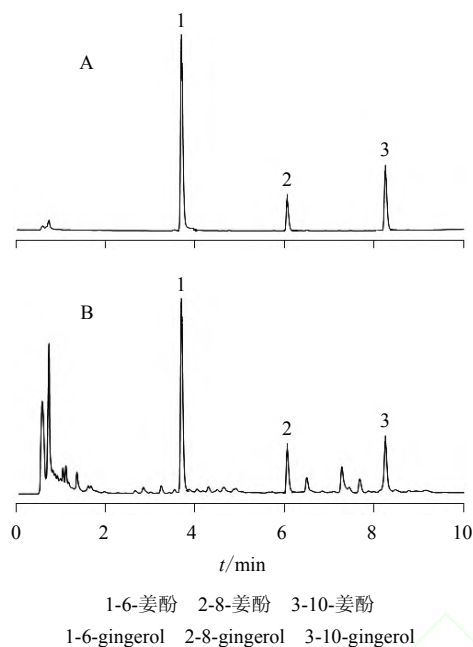


图 2 混合姜酚对照品 (A) 和 S3 炮姜样品 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 3 UPLC chromatograms of mixed gingerol reference substances (A) and ZRP sample S3 (B)

2.4.3 UPLC 特征指纹图谱的建立、相似度评价及定量测定结果^[8] 将 15 批炮姜饮片供试品溶液按“2.2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 得到的 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A) 版》软件, 以第 S1 号样品图谱作为参照谱进行指纹匹配, 对各样品色谱图的原始数据文件进行分析, 确定了 14 个共有峰, 并进行了相似度计算, 结果见表 2 和图 3; 并按照“2.3.1”项下方法对干姜和 15 批炮姜饮片进行 6-、8-、10-姜酚定量测定, 结果见表 2。

从图 3 的结果可以看出, 15 份炮姜样品的 UPLC 指纹图谱中 2 号峰 (姜酮) 为炮制过程中出现的新色谱峰, 随着炮制时间和温度的变化, 姜酮的峰面积也随之变化, 这与文献报道的结果一致^[7]。相似度评价结果可见, 炒制 195 °C 7 min 和 195 °C 8 min, 2 份样品的相似度最大, 均大于 0.99, 说明从内在成分整体质量上来看与对照指纹图谱最为接近。实验中对干姜饮片中的 6-、8-、10-姜酚的量进行了测定, 3 种姜酚的总量为 8.384 mg/g。从表 2

表 2 15 份炮姜样品的特征指纹图谱相似度和 3 种姜酚量
Table 2 Similarity and contents of three kinds of gingerols in 15 batches of ZRP samples

样品	相似度	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
		6-姜酚	8-姜酚	10-姜酚	姜酚总量
S1	0.986	5.041	1.135	1.132	7.308
S2	0.961	4.637	1.179	1.217	7.033
S3	0.977	4.578	1.032	1.751	7.361
S4	0.952	5.025	1.125	1.293	7.443
S5	0.990	3.842	1.092	1.579	6.513
S6	0.977	4.608	0.983	1.088	6.679
S7	0.985	4.719	1.019	0.953	6.691
S8	0.987	4.347	0.919	1.255	6.521
S9	0.988	4.263	0.820	0.954	6.037
S10	0.984	4.048	0.895	1.124	6.067
S11	0.995	3.358	1.132	1.302	5.792
S12	0.994	3.442	0.852	1.118	5.412
S13	0.938	4.524	1.061	1.337	6.922
S14	0.990	4.06	0.800	1.284	6.144
S15	0.974	4.41	0.975	1.002	6.387

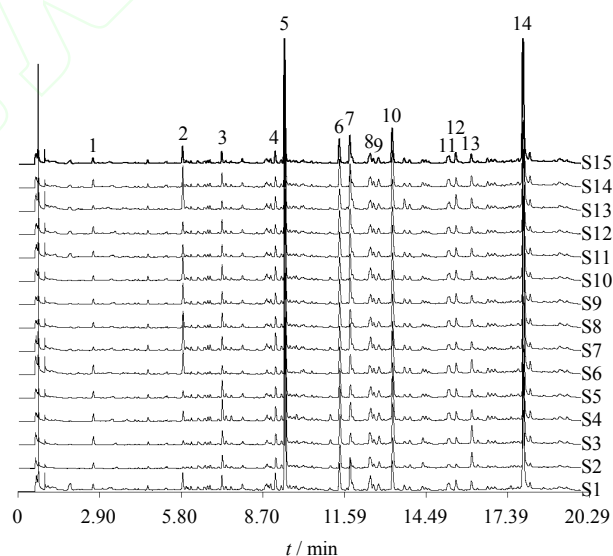


图 4 15 份炮姜样品的 UPLC 特征指纹图谱

Fig. 4 UPLC fingerprints for 15 batches of ZRP samples

结果可见, 炮姜饮片中 6-、8-和 10-姜酚的量随着炮制温度的增加, 3 种姜酚的总量呈现逐渐下降的趋势, 相似度较高的 195 °C 7 min 和 195 °C 8 min 2 份样品的 3 种姜酚总量也最低。就特征指纹图谱相似度和 3 种姜酚含量测定的结果, 结合《中国药典》。2010 年版一部炮姜“表面棕褐色, 鼓起”的要求^[2], 确定炮姜的最佳工艺为 195 °C 7min 为佳。

2.5 验证试验

为了对本工艺进行验证,又另取同批干姜3份,每份100g,按照最佳工艺即195℃砂烫7min,并按照前法制备供试品溶液进行UPLC指纹图谱测定。结果3份样品与对照指纹图谱的相似度分别为0.995、0.996、0.995;3种姜酚的总量分别为5.633、5.548、5.788mg/g,表明本工艺稳定、可靠,重复性好。

3 讨论

《中国药典》2010年版一部规定炮姜饮片以6-姜酚含量不得少于0.30%^[2],标准相对较低。中药的药效是通过其所含化学成分群的综合作用而发挥的,因此从整体成分群的变化情况和多指标成分定量测定角度评价中药的质量更加科学、合理。中药经过炮制前后,所含的化学成分会在“质”和“量”两方面产生不同程度的改变,因而药性、功效、临床疗效随之发生改变,这也是中医临床选择不同炮制品入药的依据。姜酚是姜中辣味成分的主要组分之一,也是姜的重要活性部位。20世纪80年代至今,国内外学者对姜酚及其同系物的分子结构、药理作用做了大量研究,证实姜酚具有强心、降压、降血脂等广泛的药理作用^[8]。研究表明,姜酚对二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)、肾上腺素、胶原引起的血小板聚集有良好的抑制作用,明显抑制血小板环氧合酶活性和血栓素合成^[9]。体外研究显示,姜酚是一类新型、有潜力、可望替代阿司匹林的血小板活性抑制剂^[10]。干姜经过炒制成为炮姜后,其辛燥之性减弱并具有止血的功效,这应该与姜酚类成分在炮制过程中其量降低,导致其抑制血小板聚集能力减弱有相关。炮制过程中产生的姜酮具有抗消化道溃疡、镇痛、解热等作用^[11],这也为炮姜温中止痛功效提供了依据。

实验中对砂烫的时间和温度进行了预试验考察,当河砂温度在180℃以下时,需要炒制20min以上才能达到《中国药典》2010年版项下的规定。对于砂烫的温度和时间主要实验过程分别考察了甲

醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-水和乙腈-0.1%磷酸水溶液4种流动相系统,结果以乙腈-水较为佳;同时对体积流量、柱温、波长、色谱柱类型和长短等相关条件进行了考察,最终确定文中的色谱条件分离度较好,基线较平,适合特征指纹图谱建立和3种姜酚的同时测定。本实验建立的炮姜UPLC特征指纹图谱和同时测定3种姜酚类成分的方法对于制定姜的炮制工艺具有一定的参考意义,从炮制品的特征指纹图谱比较结果、外观和3种姜酚量来分析,不应简单以姜酚量高的炮制时间和炮制温度作为姜炮制的工艺参数,而应该综合考虑。

参考文献

- [1] 韩燕全,洪燕,姜蕾,等.姜的炮制、质控和药理研究进展[J].中国现代中药杂志,2011,13(4):50-53.
- [2] 中国药典[S].一部.2010.
- [3] 韩燕全,夏伦祝,洪燕,等.干姜和炮姜的质量比较及提高研究[J].中国民族民间医药,2011,20(4):30-33.
- [4] 刘珂弟,乔雪,梁永红,等.骨碎补的HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2011,42(3):510-514.
- [5] 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):293-296.
- [6] 单鸣秋,陈超,姚晓东,等.基于UPLC指纹图谱相似度的侧柏炭烘制工艺研究[J].中国中药杂志,2010,35(17):2258-2260.
- [7] 王维皓,李娟,高慧敏,等.从HPLC特征图谱分析姜在炮制过程中的化学成分变化[J].药物分析杂志,2009,29(8):1248-1252.
- [8] 蒋苏贞,宓穗卿,王宁生.姜酚心血管药理作用研究进展[J].时珍国医国药,2007,18(1):229-221.
- [9] 蒋苏贞,宓穗卿,王宁生.姜酚抗血小板作用及其药效动力学研究[J].中药药理与临床,2010,26(3):10-13.
- [10] Nurtjahja-Tjendraputra E, Ammit A J, Roufogalis B D, et al. Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger [J]. *Thromb Res*, 2003, 111(4/5): 259-265.
- [11] 黄小桃,宓穗卿,王宁生.姜酮大鼠在体肠吸收动力学研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(5):432-434.