

经典名方苓桂术甘汤 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种成分含量测定

陈 蒙¹, 林龙飞², 刘宇灵², 王春民³, 李 慧^{2*}, 杨宇杰^{1*}

1. 承德医学院, 河北 承德 067000

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

3. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000

摘要: **目的** 建立经典名方苓桂术甘汤 HPLC 指纹图谱及 3 种成分含量测定方法, 为经典名方苓桂术甘汤物质基准的研究提供参考。**方法** 色谱柱为 CNW Athena C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈 (A)-0.1%磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~10 min, 5%~10% A; 10~20 min, 10%~15% A; 20~50 min, 15%~30% A; 50~75 min, 30%~40% A; 75~95 min, 40%~50% A; 95~111 min, 50%~95% A), 体积流量为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温 30 ℃。指纹图谱及甘草苷、甘草酸铵含量测定的检测波长为 230 nm, 桂皮醛为 290 nm。采用国家药典委员会出版的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 年版), 建立 10 批苓桂术甘汤指纹图谱, 并使用 HPLC 法同时测定 3 种指标成分含量。**结果** 对 10 批苓桂术甘汤进行研究, 其指纹图谱相似度均大于 0.9, 标定了 24 个共有峰, 各峰分离度较好。含量测定结果表明其甘草苷、甘草酸铵含量较高。经方法学考察, 3 种成分在一定浓度范围内呈良好的线性关系; 精密密度 RSD 值均小于 1.0%; 甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵的平均加样回收率分别为 98.35%、101.51%、102.59%, RSD 均小于 2.5%; 样品在 48 h 内稳定; 方法的重复性良好。**结论** 建立的经典名方苓桂术甘汤指纹图谱及 3 个成分的含量测定方法简便、稳定、准确可靠, 可用于苓桂术甘汤物质基准的质量控制。

关键词: 经典名方; 苓桂术甘汤; 指纹图谱; 甘草苷; 桂皮醛; 甘草酸铵; 含量测定

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)17-4152-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.021

Establishment of HPLC fingerprint and determination of three components of classical Lingui Zhugan Decoction

CHEN Meng¹, LIN Long-fei², LIU Yu-ling², WANG Chun-min³, LI Hui², YANG Yu-jie¹

1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

3. Chengde Jingfukang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengde 067000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of classical named Lingui Zhugan Decoction and determination method of the content of three compounds, and provide reference for the study of the material basis of the classical Lingui Zhugan Decoction. **Methods** The method was performed by high performance liquid chromatography with CNW Athena C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and gradient elution with acetonitrile (A)-0.1% phosphoric acid (B) as the mobile phase, gradient elution: 0—10 min, 5%—10%; 10—20 min, 10%—15% A; 20—50 min, 15%—30% A; 50—75 min, 30%—40% A; 75—95 min, 40%—50% A; 95—111 min, 50%—95% A. The flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 10 μL, and the column temperature is 30 ℃. The fingerprint and the detection wavelength of glycyrrhizin and ammonium glycyrrhizinate were 230 nm, and cinnamic aldehyde was 290 nm. The chromatographic fingerprint evaluation system published by the State Pharmacopoeia Commission (2012 Edition) was used to establish the fingerprint of 10 batches of Lingui Zhugan decoction, and the content of three kinds of index components were determined simultaneously by the established HPLC method. **Results** The research on the 10 batches of Lingui Zhugan soup showed that the fingerprint similarity was greater than 0.9, and 24 common peaks were calibrated, and the peak resolution was good.

收稿日期: 2019-08-16

基金项目: 国家中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-C-JL-25, ZYBZH-C-GZ-10)

作者简介: 陈 蒙 (1994—), 女, 硕士在读。E-mail: 15612484850@163.com

*通信作者 杨宇杰, 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药新药研究与开发。Tel: 13831477909 E-mail: 847272204@qq.com

李 慧, 女, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药新剂型研究与新药开发。Tel: (010)64087670 E-mail: lihuiyiren@163.com

The content determination results showed that the content of glycyrrhizin and ammonium glycyrrhizinate was high. According to the methodological investigation, the three components showed a good linear relationship within a certain concentration range; The precision RSD values were all less than 1.0%; The average recovery rates of glycyrrhizin, cinnamaldehyde and ammonium glycyrrhizinate were 98.35%, 101.51%, and 102.59%, respectively. The RSD is less than 2.5%; The sample is stable within 48 h, and the method has good repeatability. **Conclusion** The fingerprint method and the determination method of three components in the traditional Chinese medicine classical prescription named Linggui Zhugan Decoction established in this study are simple, stable, accurate and reliable, and can be used for the quality control of the Linggui Zhugan Decoction.

Key words: traditional Chinese medicine classical prescription; Linggui Zhugan Decoction; fingerprints; glycyrrhizin; cinnamaldehyde; ammonium glycyrrhizinate; content determination

古代经典名方是指目前仍广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的清代及清代以前医籍所记载的方剂^[1]。经典名方苓桂术甘汤出自东汉张仲景的《金匱要略》，由茯苓、桂枝、白术、甘草 4 味药组成，是温阳化饮的重要方剂，也是后世所称苓桂剂的代表方剂^[2]。方中茯苓健脾养心，利水渗湿；桂枝温阳化水，降逆平冲；白术、甘草补脾益中，培土强源；茯苓、白术相配，增加健脾利水之功；桂枝、甘草相伍更加发挥温通阳气之功。全方主治中焦阳虚、脾胃失运、气不化水、聚湿为饮之证，有拨云见日之功^[3]。

经典名方物质基准是衡量制剂与中医临床所使用的药用物质是否一致的标准，有效成分含量测定、指纹图谱是经典名方物质基准质量控制的 2 个重要手段。本实验利用构建的苓桂术甘汤 HPLC 指纹图谱，同时测定了处方中甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵 3 种成分的含量，为经典名方苓桂术甘汤物质基准的研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪（岛津公司，日本）；色谱柱 Athena C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, CNW 公司)；

XP105 十万分之一分析天平、ML3002 电子天平 [梅特勒托利多仪器（上海）有限公司（精密度 0.01 mg）]；BRANSON5510 超声提取器（上海沪沁仪器设备有限公司）；乐享陶瓷煎药壶（景德镇市乐享陶瓷有限公司）；H22-X3 电陶炉（杭州九阳生活电器有限公司）；EYELA-N1100 旋转蒸发仪（上海爱朗仪器有限公司）。

1.2 材料

对照品桂皮醛（批号 110710-201217，质量分数≥99.5%）、甘草苷（批号 11610-201607，质量分数≥93.1%）、甘草酸铵（批号 10731-201619，质量分数≥93%）购自中国食品药品检定研究院；乙腈色谱纯（Fisher 公司）；甲醇、磷酸（北京化工厂）；水为纯净水（杭州娃哈哈公司）；其余试剂均为分析纯。本研究前期已建立茯苓、桂枝、白术、甘草的质量标准并确定其产地，茯苓、桂枝、白术、甘草药材各研究 10 个批次，分别购于各味药的道地产地及主产区，经中国中医科学院中药资源中心詹志来副研究员鉴定分别为茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf、桂枝 *Cinnamomum cassia* Presl、白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch。苓桂术甘汤共研究 10 个批次，编号为 S1~S10，方中 4 味药的产地信息见表 1。

表 1 10 个批次茯苓、桂枝、白术、甘草的产地信息

Table 1 Origin information of 10 batches of *Poria cocos*, *Cinnamomum cassia*, *Atractylodes macrocephala*, and *Glycyrrhiza uralensis*

批号	配伍药材			
	茯苓	桂枝	白术	甘草
S1	安徽省岳西县	广西省容县	江西省彭泽县	新疆自治乌鲁木齐市
S2	安徽省岳西县	广西省藤县	河北省行唐县	甘肃省乐县
S3	湖南省靖州县	广西省平南县	河南省郸城县	内蒙古自治区喀喇沁旗
S4	安徽省岳西县	广西省容县	浙江省东阳县	内蒙古自治区扎兰屯市
S5	云南省景谷县	广西省藤县	安徽省潜城区	宁夏盐池县
S6	江西省分宜县	广西省平南县	安徽省潜城县	甘肃省酒泉市瓜州县
S7	湖南省靖州县	广西省上思县	河北省行唐县	新疆昌吉市阜康县
S8	湖南省靖州县	广东省活道镇	浙江省磐安县	新疆伊犁市奎屯县
S9	安徽省金寨县	广东省马圩镇	浙江省磐安县	宁夏盐池县
S10	安徽省岳西县	广东省罗定县	浙江省新昌县	宁夏回族自治区吴忠市

2 方法与结果

2.1 煎煮方法

苓桂术甘汤原方记载为“茯苓四两，桂枝、白术各三两，甘草二两。以水六升，煮取三升”。度量衡考证认为东汉时期 1 两等于现今 15.625 g^[4-6]，为方便应用，去掉小数点后位数，则折合 1 两等于 15 g^[7]，1 升等于现今的 200 mL^[8-11]。最终确定苓桂术甘汤的煎煮方法为称取茯苓 60 g，桂枝、白术各 45 g，甘草 30 g，加水 1 200 mL，煎煮至剩余 600 mL，滤过。

2.2 色谱条件

色谱柱为 CNW Athena C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A)-0.1%磷酸水溶液 (B)，梯度洗脱：0~10 min, 5%~10%；10~20 min, 10%~15% A；20~50 min, 15%~30% A；50~75 min, 30~40% A；75~95 min, 40%~50% A；95~111 min, 50%~95% A。指纹图谱的检测波长为 230 nm，含量测定的检测波长为甘草苷、甘草酸铵 230 nm，桂皮醛 290 nm。柱温 30 ℃，体积流量 1.0 mL/min，进样量 10 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密称取桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵适量，加甲醇配制成分别含桂皮醛 1.46 μg/mL、甘草苷 329.00 μg/mL、甘草酸铵 340.00 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 单独对照品溶液的制备 精密称取桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵适量，加甲醇配制成桂皮醛的质量浓度为 0.063 mg/mL、甘草苷的质量浓度为 1.027 mg/mL、甘草酸铵的质量浓度为 1.535 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取一个处方量苓桂术甘汤药材进行煎煮并浓缩至每毫升药液相当于 1 g 生药量。精密量取 2.5 mL 药液，置具塞锥形瓶中，精密加入 22.5 mL 甲醇，密塞，称定质量，超声处理 30 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，静置，取续滤液，即得。

2.4 苓桂术甘汤指纹图谱的方法学考察^[12-13]

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S2)，在“2.2”项的色谱条件下，连续进样 6 次，以甘草苷为参照峰，测得各共有峰的相对保留时间与相对峰面积 RSD 值分别小于 2.0% 和 5.0%，表明该方法精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S2)，在

“2.2”项的色谱条件下，分别在 0、3、6、9、12、24、48 h 进样，以甘草苷为参照峰，测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别小于 2.0% 和 5.0%，表明供试品溶液在 48 h 稳定。

2.4.3 重复性试验 分别取供试品溶液 (S2) 6 份，按“2.2”项色谱条件进行测定，以甘草苷为参照峰，测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%，表明该方法重复性良好。

2.4.4 指纹图谱相似度 取 10 批苓桂术甘汤药材，分别按供试品溶液的制备和检测方法进行检测，记录指纹图谱。因甘草苷峰面积相对较大且稳定，故以其为参照峰。运用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012 版”对 10 批样品的指纹图谱进行分析，设定样品 1 为参照图谱，选取 24 个特征峰生成对照指纹图谱，见图 1。匹配后的 10 批样品色谱图见图 2。进行各样品相似度评价，10 批苓桂术甘汤指纹图谱相似度分别为 0.997、0.997、0.994、0.992、0.998、0.998、0.963、0.961、0.995、0.996。

2.5 多指标成分含量测定的方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL，按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次，分别计算各成分峰面积的 RSD，结果甘草苷、桂皮醛、甘

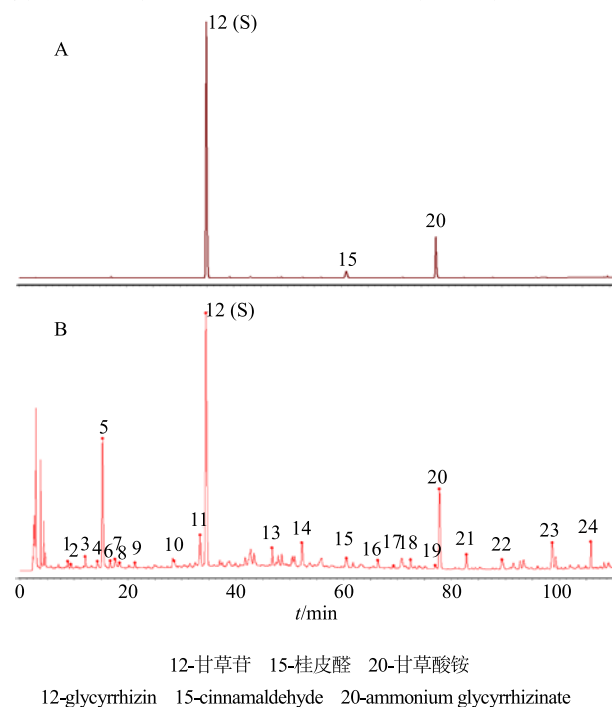


图 1 混合对照品 (A) 和苓桂术甘汤对照 (B) 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of mix control (A) and Linggui Zhugan Decoction (B)

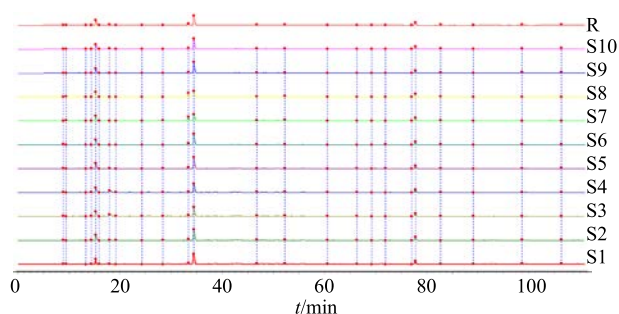


图 2 10 批苓桂术甘汤样品指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of 10 batches of Linggui Zhugan Decoction samples

草酸铵的 RSD 分别为 0.28%、0.17%、0.27%，表明仪器的精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S2)，按“2.2”项下色谱条件分别于 0、3、6、9、12、24、48 h 进样检测峰面积，结果甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 2.43%、4.40%、1.03%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 分别取供试品溶液 (S2) 6 份，按“2.2”项色谱条件进行测定，结果甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵含量的 RSD 分别为 2.09%、1.97%、1.29%，表明该方法重复性良好。

2.5.4 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下配制的混合对照品溶液适量，逐级稀释成一系列不同浓度的溶液，分别按照“2.2”项下色谱条件依次进样，记录色谱峰面积，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线。结果见表 2，表明 3 种成分在相应的范围内线性关系良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密量已测定各成分含量的供试品溶液 (S2) 6 份，每份 1.25 mL，分别加入“2.3.2”项下配制的桂皮醛 1 mL，甘草苷 1 mL，甘草酸铵 1 mL，按“2.3.3”项制备供试品溶液，按“2.2”项色谱条件测定，甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵的平均加样回收率分别为 98.35%、101.51%、102.59%，RSD 分别为 1.67%、2.03%、1.10%。

表 2 线性关系

Table 2 Measurement results of linear relationship

成分	线性方程	线性范围/mg	<i>r</i>
甘草苷	$Y=26\ 077\ 868.86 X+4\ 899.316\ 2$	0.010 28~0.329 0	1.000 0
桂皮醛	$Y=95\ 783\ 881.38 X-2\ 833.656\ 7$	0.000 45~0.014 6	0.999 9
甘草酸铵	$Y=4\ 063\ 064.94 X-22\ 731.932\ 1$	0.021 25~0.340 0	0.999 5

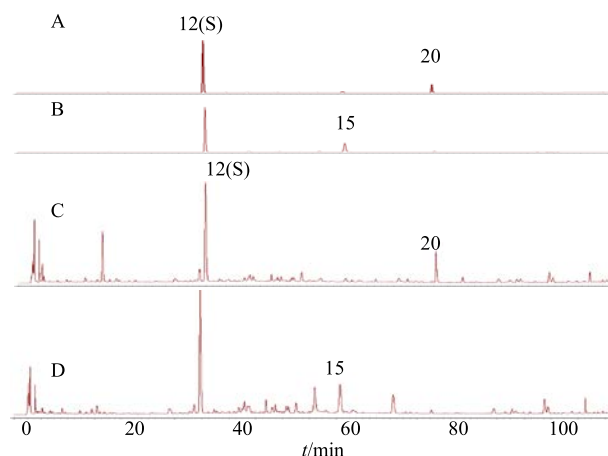
2.5.6 样品的含量测定 取 10 批苓桂术甘汤药材，分别按供试品溶液的制备和检测方法进行检测，计算样品中甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵的含量，结果见表 3。含量测定图谱见图 3。

2.5.7 指纹图谱相似度结果 10 批苓桂术甘汤指纹图谱的相似度结果见表 4。

表 3 样品含量测定 (*n* = 3)

Table 3 Content determination of samples (*n* = 3)

样品批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		
	甘草苷	桂皮醛	甘草酸铵
S1	0.97	0.04	1.64
S2	0.84	0.03	1.41
S3	0.95	0.01	1.51
S4	0.60	0.04	1.51
S5	0.92	0.01	1.42
S6	0.93	0.04	1.57
S7	0.77	0.02	1.47
S8	0.89	0.01	1.56
S9	0.98	0.05	1.51
S10	0.84	0.01	1.45
均值	0.87	0.03	1.51



A-混合对照品 (230 nm) B-混合对照品 (290 nm) C-供试品 (230 nm) D-供试品 (290 nm) 12-甘草苷 15-桂皮醛 20-甘草酸铵
A-mixed reference substance-230 nm B-mixed reference substance-290 nm C-testing sample-230 nm D-testing sample-290 nm 12-glycyrrhizin 15-cinnamaldehyde 20-ammonium glycyrrhizinate

图 3 苓桂术甘汤含量测定图谱

Fig. 3 Determination of content of Linggui Zhugan Decoction

表 4 10 批苓桂术甘汤样品相似度结果

Table 4 Similarity results of 10 batches of Linggui Zhugan Decoction samples

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.998	0.989	0.987	0.998	0.998	0.949	0.946	0.996	0.997	0.997
S2	0.998	1.000	0.991	0.989	0.998	0.998	0.947	0.945	0.997	0.997	0.997
S3	0.989	0.991	1.000	1.000	0.992	0.990	0.946	0.943	0.987	0.991	0.994
S4	0.987	0.989	1.000	1.000	0.990	0.988	0.945	0.943	0.984	0.989	0.992
S5	0.998	0.998	0.992	0.990	1.000	1.000	0.948	0.945	0.998	0.998	0.998
S6	0.998	0.998	0.990	0.988	1.000	1.000	0.947	0.944	0.998	0.998	0.998
S7	0.949	0.947	0.946	0.945	0.948	0.947	1.000	1.000	0.939	0.938	0.963
S8	0.946	0.945	0.943	0.943	0.945	0.944	1.000	1.000	0.936	0.936	0.961
S9	0.996	0.997	0.987	0.984	0.998	0.998	0.939	0.936	1.000	0.999	0.995
S10	0.997	0.997	0.991	0.989	0.998	0.998	0.938	0.936	0.999	1.000	0.996
对照	0.997	0.997	0.994	0.992	0.998	0.998	0.963	0.961	0.995	0.996	1.000

3 讨论

3.1 定量指标的选择

古代由于经典名方的制备方法应与医籍记载一致,故本研究采用水煎煮处方。方中茯苓的主要化学成分为三萜类和多糖类化合物^[14];白术主要含挥发油^[15];桂枝含桂皮醛、肉桂酸等挥发油;甘草中黄酮和皂苷类成分含量较高^[16]。桂枝中的桂皮醛具有明显的抗炎作用^[17];甘草中的甘草苷可用于治疗咽炎、急、慢性咳嗽,甘草酸铵具有抗炎、抗免疫、镇痛等作用^[18]。此 3 种成分均可通过其具有的抗炎作用而达到祛痰的效果,所以最终选择复方水煎液中具有较好水溶性且响应值较大的有效成分甘草苷、桂皮醛、甘草酸铵作为定量指标。

3.2 波长的选择

采用 DAD 检测器对供试品溶液进行全波长扫描,分析发现,在 230 nm 波长条件下,指纹图谱的共有峰数量最多,甘草苷、甘草酸铵的峰形较好,吸收较大,而 290 nm 波长下桂皮醛的吸收最大,故选择 230 nm 作为指纹图谱和甘草苷、甘草酸铵含量测定的检测波长,选择 290 nm 作为桂皮醛含量测定的检测波长。

采取“多指标成分含量测定+指纹图谱”的模式,对制备工艺进行全程把关,对品质进行精确评价,它能较为全面地反映复方中所含化学成分的种类与数量及其内在质量^[19]。由于指纹图谱更多侧重于共有峰的指认及其相似度,所以本研究指纹图谱具体色谱峰的指认较少,具体色谱峰的指认会在以后的实验中用 HPLC-MS 进行定性分析后确定。本

实验建立的经典名方苓桂术甘汤多指标成分含量测定与指纹图谱结合的方法简便、准确,可用于苓桂术甘汤物质基准的质量控制,希望能为此类研究提供研究思路。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. 关于印发中药注册管理补充规定的通知 [EB/OL]. (2008-01-07) [2018-10-03]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0844/27432.html>.
- [2] 汉·张仲景撰;于志贤,张智基点校. 金匮要略 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997.
- [3] 蒙群利, 崔海峰. 经方苓桂术甘汤的临床运用 [J]. 中医研究, 2018, 31(5): 5-7.
- [4] 郝万山. 汉代度量衡制和经方药量的换算 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2005, 3(3): 48-51.
- [5] 柯雪帆, 赵章忠, 张玉萍, 等. 《伤寒论》和《金匮要略》中的药物剂量问题 [J]. 上海中医药杂志, 1983, (12): 36-38.
- [6] 国家计量总局. 中国古代度量衡图集 [M]. 北京: 文物出版社, 1984.
- [7] 李宇航, 郭明章, 孙 燕, 等. 仲景方用药度量衡古今折算标准研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(9): 597-600.
- [8] 郝万山. 汉代度量衡制和经方药量的换算 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2005, 3(3): 48-51.
- [9] 孙 燕, 郭明章, 李宇航. 建立经方药物古今剂量折算标准面临的两大关键问题 [J]. 中医研究, 2009, 22(12): 1-2.
- [10] 李和伟, 王启帆, 付 宇, 等. 关于古今中药药物剂量折算的相关思考 [J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(4): 84-86.

- [11] 姬航宇. 《伤寒论》本源药物剂量探索 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.
- [12] 刘芳, 周小江, 袁志鹰, 等. 基于指纹图谱结合多指标测定的玄参药材等级质量研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1238-1243.
- [13] 殷世宁, 张春辉, 杨晓, 等. 根痛平胶囊指纹图谱及 5 种成分含量测定研究 [J]. 中国药师, 2018, 21(11): 1954-1957.
- [14] 马玲, 尹蕾, 付雪艳, 等. 茯苓研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(12): 55-59.
- [15] 陈华萍, 吴万征. 白术的研究进展 [J]. 广东药学, 2002, 12(5): 19-21.
- [16] 刘育辰, 陈有根, 王文全, 等. 甘草化学成分研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1251-1255.
- [17] 张利青, 张占刚, 付岩, 等. 桂皮醛药理作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4568-4572.
- [18] 韩真真, 邵长森, 张元元, 等. HPLC 法同时测定桂枝加芍药汤中 8 种成分的含量 [J]. 中国药房, 2019, 30(6): 784-788.
- [19] 李莉娜, 杨淑婷, 杨健, 等. 生芪消渴胶囊 UPLC 指纹图谱建立及 6 种成分含量测定 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(18): 2196-2202.