经典名方桂枝加葛根汤标准汤剂 HPLC 指纹图谱研究

管咏梅，万鑫浩，吴文婷，孟晓伟，臧振中*，钟凌云，陈丽华，刘义豪，董欢欢，朱卫丰*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室，江西 南昌 330004

摘 要：目的 建立经典名方桂枝加葛根汤物质基准的 HPLC 指纹图谱，结合化学模式识别方法对其质量进行分析与评价，为其质量控制提供参考。**方法** 采用 HPLC 建立桂枝加葛根汤指纹图谱，采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件（2012 年版），并结合聚类分析（clustering analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）与正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）对结果进行分析，评价不同批次桂枝加葛根汤物质基准的质量差异，并找寻造成批间质量差异的主要化学成分。**结果** 建立了桂枝加葛根汤物质基准的 HPLC 指纹图谱，确定了 29 个共有峰，并对各共有峰进行药材归属，其中 3～14、16～19、21～25 号峰来自葛根；26 号峰来自桂枝；1、15 号峰来自白芍，20、27～29 号峰来自甘草，2 号峰来自大枣。通过与对照品比对指认了其中 11 个成分，分别为 1 号峰没食子酸、8 号峰 3′-羟基葛根素、11 号峰葛根素、12 号峰葛根素芹菜糖苷、13 号峰 3′-甲氧基葛根素、15 号峰芍药苷、16 号峰大豆苷、20 号峰甘草苷、22 号峰染料木苷、26 号峰肉桂酸、28 号峰甘草酸铵。15 批桂枝加葛根汤物质基准的 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均＞0.94；3 种化学模式识别方法均可将样品分为 2 类；筛选出了 11 种主要差异成分，其中已指认出的为葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、大豆苷、3′-羟基葛根素、没食子酸。**结论** 建立的指纹图谱分析方法灵敏度高、稳定性强、数据准确可靠，可为经典名方桂枝加葛根汤物质基准的质量评价提供依据。

关键词：经典名方；桂枝加葛根汤；物质基准；指纹图谱；聚类分析；主成分分析；HPLC；质量评价；化学模式识别；正交偏最小二乘法-判别分析；葛根素；大豆苷、没食子酸；芍药苷；甘草苷；染料木苷；肉桂酸；甘草酸铵

中图分类号：R283.6 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2021)18 - 5535 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.007

HPLC fingerprint of classic prescription Guizhi Jia Gegen Decoction

GUAN Yong-mei, WAN Xin-hao, WU Wen-ting, MENG Xiao-wei, ZANG Zhen-zhong, ZHONG Ling-yun, CHEN Li-hua, LIU Yi-hao, DONG Huan-huan, ZHU Wei-feng

Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Preparations, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To establish a HPLC fingerprint of the substance benchmark of classic prescription Guizhi Jia Gegen Decoction (GJGD, 桂枝加葛根汤) and evaluate its quality with chemical pattern recognition method, so as to provide reference for the quality control of GJGD. **Methods** HPLC was used to establish the fingerprint of GJGD, and traditional Chinese medicine (TCM) chromatographic fingerprint similarity evaluation software (2012) combined with clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the quality differences between different batches of substance benchmark of GJGD, and find the main chemical composition causing quality differences between batches. **Results** The HPLC fingerprint of GJGD was established, 29 common peaks were identified, and the medicinal materials of each common peak were assigned, peaks 3—14, 16—19, 21—25 came from Gegen (*Puerariae Lobatae Radix*); peak 26 came from Guizhi (*Cinnamomi Ramulus*); peaks 1 and 15 came from Baishao (*Paeoniae Radix Alba*); peaks 20, 27—29 came from Gancao (*Glycyrrhizae Radix* et *Rhizoma*), and peak 2 came from Dazao (*Jujubae Fructus*). Eleven of them were identified by comparing with the control substance, which were gallic acid (peak 1), 3′-hydroxy puerarin (peak 8), puerarin (peak 11), puerarin

收稿日期：2021-06-11

基金项目：国家重点研发计划重点专项（2017YFC1702904）

作者简介：管咏梅，博士，教授，硕士生导师，从事中药新制剂与新技术及食疗学研究。E-mail: guanym2008@163.com

***通信作者：**朱卫丰，教授，博士生导师，研究方向为中药新剂型与新制剂研究。E-mail: zwf0322@126.com

臧振中（1979—），男，博士研究生，从事中药制剂学研究。Tel: 13330078201 E-mail: Zangzhenzhongvip@163.com

apioside (peak 12), 3′-methoxypuerarin (peak 13), paeoniflorin (peak 15), daidzin (peak 16), liquiritin (peak 20), genistin (peak 22), cinnamic acid (peak 26), monoammonium glycyrrhizinate (peak 28). The similarity between the HPLC fingerprints of 15 batches of GJGD and the control fingerprints was > 0.94. The three chemical pattern recognition methods could divide the samples into two categories. Eleven compounds were screened out, of which puerarin, 3′-methoxypuerarin, mirificin, daidzin, 3′-hydroxypuerarin and gallic acid were identified among them. **Conclusion** The established fingerprint analysis method has high sensitivity, strong stability, accurate and reliable data, which can provide a basis for the quality evaluation of GJGD.

Key words: classical prescriptions; Guizhi Jia Gegen Decoction; benchmark; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; HPLC; quality evaluation; chemical pattern recognition; OPLS-DA; puerarin; daidzin; gallic acid; paeoniflorin; glycyrrhizin; genistein; cinnamic acid; monoammonium glycyrrhizinate

桂枝加葛根汤（Guizhi Jia Gegen Decoction，GJGD）出自东汉•张仲景著《伤寒论》[1]。由葛根四两、桂枝二两（去皮）、白芍二两、甘草（炙）二两、生姜三两、大枣十二枚 6 味药组成。具有解肌发表、升津舒经之功效，主治风寒客于太阳经输，营卫不和证。经典名方是我国中医药宝库中的伟大财富和智慧结晶，历史悠久，源远流长，其研制分为物质基准研制和制剂研制 2 个阶段。然而中药成分的复杂性使得保持其质量一致性成为质量控制的难点。鉴于中药组成的多样性和辨证施治的治疗方案，检测任何一种活性成分均不能代表其整体药效，中药指纹图谱能全面、定量地反映中药所包含的化学信息，是中药质量控制的有效手段，HPLC 指纹图谱法也成为最常见的质量控制手段[2]。

目前，尚未见有关建立 GJGD 指纹图谱的研究报道，中药指纹图谱可以科学、系统、全面地反映中药的复杂化学成分组成[3]，化学模式识别技术可以将多个指标进行综合、降维和分类分析，对指纹图谱中的信息进行表达、识别和处理[4]，二者结合可以更加系统、全面地评价中药的质量，目前已被广泛用于经典名方质量控制。因此本研究通过 HPLC 法建立了 GJGD 标准汤剂指纹图谱，并对其进行相似度评价，同时结合聚类分析（clustering analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）及正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）等化学模式识别方法评价各批次样品间的质量差异，为完善 GJGD 物质基准的质量标准和实现后续相关制剂的深度质量控制提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；BSA124S 分析天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；KQ-500VDE 超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；SIGMA3-18 K 高速冷冻离心机，德国 SIGMA 公司；H22-X2 电陶炉，九阳股份有限公司；3 L 荥经黑砂锅，荥经柴氏砂器文化发展有限责任公司。

1.2 材料

葛根素、葛根素芹菜糖苷、芍药苷、3′-羟基葛根素、3′-甲氧基葛根素、大豆苷、甘草苷和甘草酸铵对照品，成都普菲生物科技有限公司，批号分别为 19011507、21051103、20030901、18102401、21022610、19121801、19082902、19032004，质量分数依次为 98.4%、99.6%、98.2%、98.6%、98.5%、98.51%、98.13%、98.9%；肉桂酸对照品，成都普思生物科技有限公司，批号 PS000800，质量分数 98.6%；没食子酸对照品，大连美仑生物科技有限公司，批号 MB2707-S，质量分数 98.5%；染料木苷对照品，成都克洛玛生物科技有限公司，批号 CHB170223，质量分数 98.9%。

葛根为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根，桂枝为樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝，白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根，甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.的干燥根和根茎，生姜为姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc.的新鲜根茎，大枣为鼠李科枣属植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill.的干燥成熟果实。这 6 味药材均购于江中饮片公司，药材均由江西中医药大学葛菲教授鉴定。各饮片质量经本课题组前期检测均符合要求，采用随机数表法将不同批次药材进行组合，药材批号及产地组合信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

$5C_{18}$-MS-IIC_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-0.1%磷酸水水溶液，梯度洗脱：0～3 min，5%～11%乙腈；3～15 min，11%乙腈；

表 1 15 批 GJGD 物质基准 (S1～S15) 组方药材的批号及产地信息

Table 1 Lot number and origin information of 15 batches (S1—S15) of decoction pieces in GJGD substance benchmarks

编号	葛根		桂枝		白芍		甘草		生姜		大枣	
	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地
S1	210411	湖北黄冈	200717	广西南宁	210115	安徽亳州	200826	内蒙古鄂托克前旗	210111	云南文山	210103	陕西清涧
S2	210412	河南汝阳	210403	广东清远	210414	安徽亳州	210407	新疆哈密	202022	云南文山	202016	陕西清涧
S3	210405	安徽舒城	210405	福建龙岩	210412	浙江东阳	210408	内蒙古鄂托克前旗	202002	云南文山	202011	陕西清涧
S4	210202	湖北黄冈	20201101	广西南宁	201101	安徽阜阳	201101	内蒙古巴彦卓尔	202004	云南文山	202009	陕西清涧
S5	200801	湖北黄冈	20201201329	广西玉林	210105	安徽亳州	20210201	内蒙古巴彦卓尔	202013	江西新干	202018	陕西佳县
S6	210414	安徽安金	210415	广西南宁	210415	安徽亳州	210411	宁夏灵武	210113	江西新干	202017	陕西佳县
S7	210410	河南淅川	210410	云南广南	210406	河南商丘	210410	甘肃怀安	202014	江西新干	191203	陕西佳县
S8	210413	四川广元	210408	海南屯昌	210411	浙江仙居	210401	宁夏池盐	191201	江西新干	202015	陕西佳县
S9	210406	湖北十堰	210404	海南安定	210413	安徽亳州	210409	宁夏中宁	202021	江西上饶	210102	陕西佳县
S10	210401	河南西陕	210402	广西南宁	210404	广东枣庄	210404	新疆三岔口	202003	江西上饶	210101	山东枣庄
S11	210415	安徽黄尾镇	210407	云南文山	210402	安徽亳州	210406	新疆库尔勒	210114	江西上饶	202008	山东枣庄
S12	210404	陕西安康	210412	福建漳州	210405	安徽阜阳	210403	新疆阿克苏	202012	江西上饶	202010	山东枣庄
S13	210402	四川绵阳	210414	广西玉林	210403	安徽阜阳	210405	甘肃阿坞镇	202015	江西吉水	210104	山东枣庄
S14	210403	安徽岳西	210406	广东清远	210408	四川渠县	210413	甘肃哈达铺	202001	江西吉水	202012	河南新郑
S15	210409	安徽六安	201013	福建漳州	210410	浙江磐安	210414	陕西铜川	210112	湖南衡阳	191204	河南新郑

15～25 min，11%～15%乙腈；25～31 min，15%～20%乙腈；31～39 min，20%乙腈；39～43 min，20%～25%乙腈；43～48 min，25%～30%乙腈；48～52 min，30%～35%乙腈；52～57 min，35%～40%乙腈；57～61 min，40%～50%乙腈；61～66 min，50%～5%乙腈；66～67 min，5%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；进样量 20 μL；检测波长：0～30 min，245 nm；30～60 min，280 nm；60～67 min，245 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 GJGD 标准汤剂的制备 《伤寒论》记载 GJGD 原方为“葛根（四两）、芍药（二两）、生姜（三两，切）、甘草（二两，炙）、大枣（十二枚，擘）、桂枝（二两，去皮）上六味，以水一斗，先煮葛根，减二升，去上沫，内诸药，煮取三升，去滓。温服一升，覆取微似汗，不须啜粥，余如桂枝法将息及禁忌。”根据《中国科学技术史·度量衡卷》[5]记载，东汉 1 升约为现今 200 mL，一合约 20 mL。基于“尊古不泥古”理念，通过文献查阅研究可知，古代经典名方应用时，不仅可根据前人考证的量制进行折算，更重要的是依据临床实践，因此结合临床用药，最终确定 1 两为当今 3 g[6]。因此确定 GJGD 标准汤剂的制备方法为取葛根 12 g、桂枝 6 g、白芍 6 g、甘草 6 g、生姜 9 g、大枣 12 枚。无需粉碎过筛，加水 2000 mL，先加入葛根武火煮沸，文火熬去 400 mL，去掉上沫，再加入其他 5 味中药，文火继续煮至 600 mL，4 层 200 目纱布滤过，即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取没食子酸、3′-羟基葛根素、葛根素、3′-甲氧基葛根素、葛根素芹菜糖苷、芍药苷、大豆苷、甘草苷、染料木苷、肉桂酸、甘草酸铵对照品适量，精密称定，加甲醇制成母液，各吸取适量母液于 10 mL 量瓶中，用比例为 5∶95 的乙腈与 0.1%磷酸水定容稀释，得各对照品质量浓度分别为 26.83、27.64、24.29、30.36、28.50、25.90、18.28、36.48、21.44、26.89、26.66 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密量取“2.2.1”项下制备的 GJGD 标准汤剂 5 mL，8000 r/min 离心 10 min，取上清液 1 mL 于 10 mL 量瓶中，超纯水稀释定容至刻度，过 0.22 μm 微孔滤膜即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 稳定性试验 取样品 S5 的供试品溶液适量，分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项下条件测定，以 16 号峰（大豆苷）为参照，结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%，相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.2 精密度试验 取同一份 GJGD 供试品溶液

（S5），按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，记录 HPLC 图，以大豆苷为参照峰，计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1%，相对峰面积的 RSD 值均小于 2.5%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取样品 S5 适量，按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.4”项下色谱条件测定，以 16 号峰（大豆苷）为参照，结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1%，相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%，表明该方法重复性较好。

2.4 GJGD 指纹图谱的建立

取 15 批 GJGD 供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样检测，记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）”进行数据分析，以 S1 为参照图谱，时间窗宽度设定为 0.1 min，采用中位数法，进行多点校正和全谱峰匹配，生成 GJGD 指纹图谱及对照指纹图谱（R），结果见图 1。共标定 29 个共有峰，其中指认 11 个共有峰，分别为 1 号峰没食子酸、8 号峰 3′-羟基葛根素、11 号峰葛根素、12 号峰葛根素芹菜糖苷、13 号峰 3′-甲氧基葛根素、15 号峰芍药苷、16 号峰大豆苷、20 号峰甘草苷、22 号峰染料木苷、26 号峰肉桂酸、28 号峰甘草酸铵。

2.5 共有峰归属

取 GJGD 物质基准样品 S1 以及缺葛根、缺桂枝、缺白芍、缺甘草、缺干姜、缺大枣的阴性样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图。结合色谱峰的保留时间及紫外吸收图，通过对比分析，对 29 个共有峰进行归属，见图 2。结果发现 5 味组方饮片对 GJGD 物质基准指纹图谱均有贡献，其中 3～14、16～19、21～25 号峰来自葛根，26 号峰来桂枝；1、15 号峰来自白芍，20、27～29 号峰来自甘草，2 号峰来自大枣。在 29 个共有峰中，葛根占据 21 个，表明君药葛根对于该复方的化学成分表征非常重要。

2.6 相似度分析

以对照指纹图谱为参照，计算 15 批 GJGD 样品图谱相似度分别为 0.998、0.999、0.999、0.999、0.999、0.965、0.999、0.999、0.998、0.999、0.941、0.997、0.989、0.999、0.976，相似度良好，均在 0.90 以上，表明所建立的 GJGD 标准汤剂指纹图谱质量稳定，可以反映其指纹特征。样品 S6、S11、S13、S15 与对照图谱的相似度均小于 0.990，其他样品都大于 0.990，说明不同批次药材的物质基准存在一定的质量差异。

2.7 HCA

HCA 常用于数据的初步探索性分析，具有直观、结论形式简明的优点[7-8]。采用 SPSS 21.0 数据分析软件，对 15 批样品的共有峰的相对峰面积进行系统聚类，采用组间连接法，测量区间为平方欧氏距离，聚类结果见图 3，结果发现当欧氏距离为 10 时，15 批 GJGD 物质基准可分为 2 类，即样品 S6、S11、S13、S15 为第 1 类，样品 S1～S5、S7～S10、S12、S14 为第 2 类，此结果可与相似度评价结果相互印证。

2.8 PCA[9]

选择 15 批 GJGD 物质基准的 29 个共有峰的峰面积为变量，导入 SIMCA-P＋14.1（Demo）软件进行 PCA 处理，得分矩阵图见图 4。结果发现 15 批 GJGD 物质基准分布能分成 2 组，样品 S6、S11、S13、S15 为一组，样品 S1～S5、S7～S10、S12、S14 为第 2 组，与 HCA 结果一致。

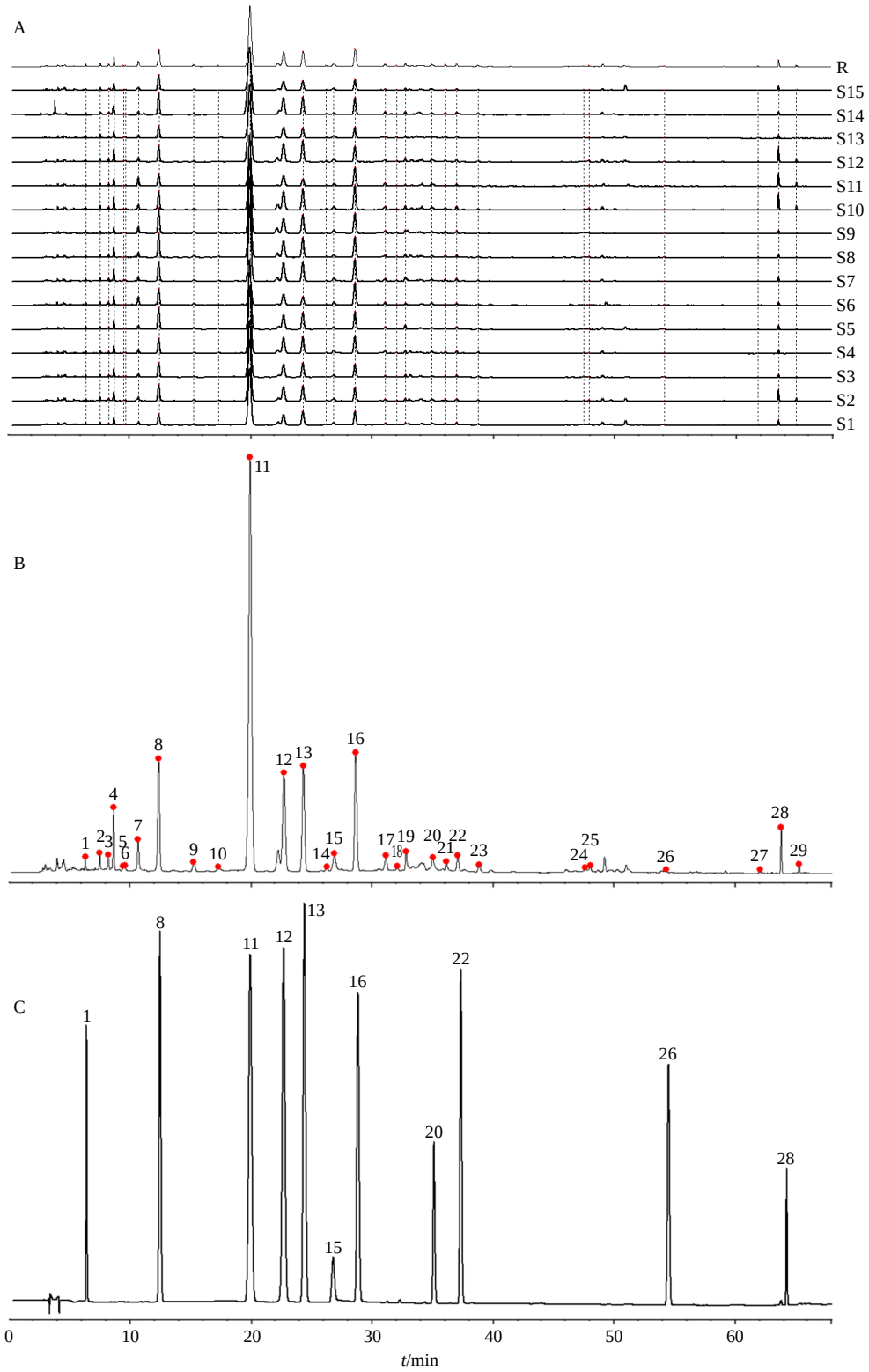
2.9 OPLS-DA[10-12]

将 15 批 GJGD 物质基准的 29 个共有峰的峰面积导入 SIMCA-P＋14.1（Demo）软件进行 OPLS-DA 处理，得分矩阵图见图 5。结果发现 15 批样品聚为 2 类，样品 S6、S11、S13、S15 为一组，样品 S1～S5、S7～S10、S12、S14 为第 2 组，2 组样品聚类效果良好，且与 PCA 和 HCA 结果一致。图 6 中的点离原点越远，表明对应变量（色谱峰）权重值越大[13-14]，结合以变量重要性投影（VIP）值＞1 为判定标准，筛选差异组分，见图 7。结果共找到了 11 个成分，按 VIP 值大小排序分别为 11（葛根素）、13（3′-甲氧基葛根素）、21、12（葛根素芹菜糖苷）、5、22（大豆苷）、19、18、1（没食子酸）、4、8（3′-羟基葛根素）号峰。上述 11 个差异成分中 10 个来自葛根，1 个来自白芍，进一步说明严格控制葛根药材质量是确保 GJGD 物质基准质量稳定的关键。

3 讨论

3.1 色谱条件分析

本实验采用分别考察了在水-乙腈、水-甲醇、0.1%磷酸水溶液-乙腈以及 0.05%磷酸水溶液-乙腈 4 种不同的流动相体系下色谱峰的分离情况，结果显示流动相为水-乙腈、水-甲醇时，色谱峰峰形较差，分离度不好。流动相为 0.1%磷酸水溶液-乙腈以及 0.05%磷酸水溶液-乙腈时，有较好的色谱峰峰形，分离度较好，无明显拖尾，且两者相差不大，



1-没食子酸 8-3′-羟基葛根素 11-葛根素 12-葛根素芹菜糖苷 13-3′-甲氧基葛根素 15-芍药苷 16-大豆苷 20-甘草苷 22-染料木苷 26-肉桂酸 28-甘草酸铵

1-gallic acid 8-3′-hydroxy puerarin 11-puerarin 12-puerarin apioside 13-3′-methoxypuerarin 15-paeoniflorin 16-daidzin 20-liquiritin 22-genistin 26-cinnamic acid 28-monoammonium glycyrrhizinate

图 1 15 批 GJGD 物质基准 (S1～S15) 的 HPLC 指纹图谱 (A) 及其共有模式 (B) 和混合对照品的 HPLC 图 (C)

Fig. 1 HPLC fingerprints (A) and its common mode (B) of 15 batches (S1—S15) of substance benchmarks of GJGD and HPLC of mixed reference substances (C)

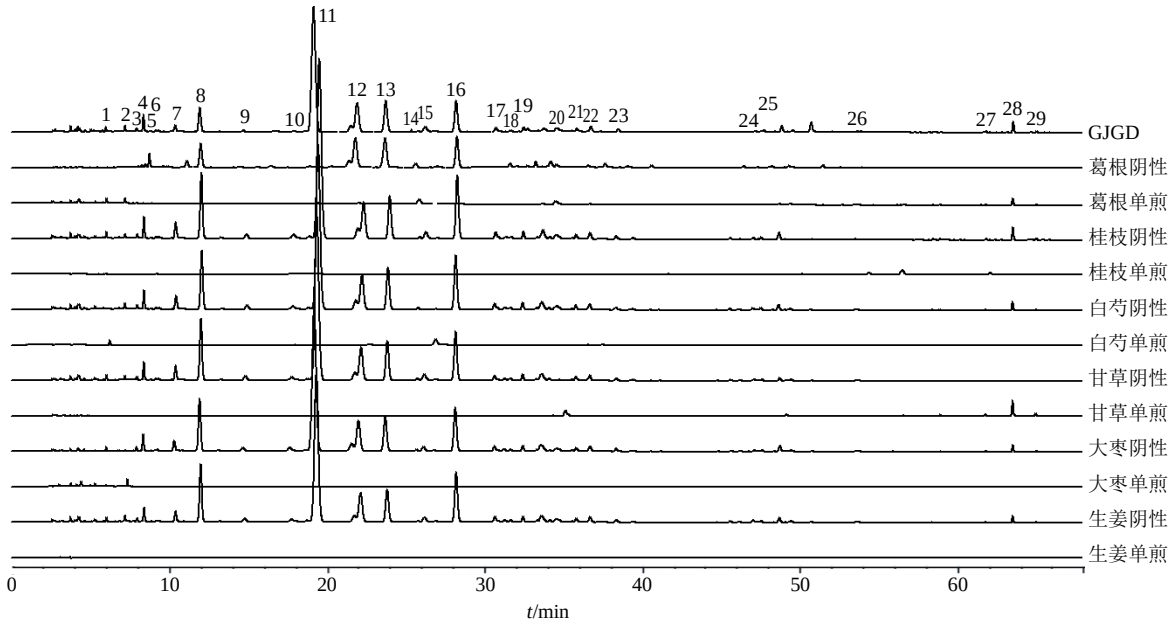


图 2　GJGD 物质基准的特征峰归属

Fig. 2　Attribution of characteristic peaks in substance benchmarks of GJGD

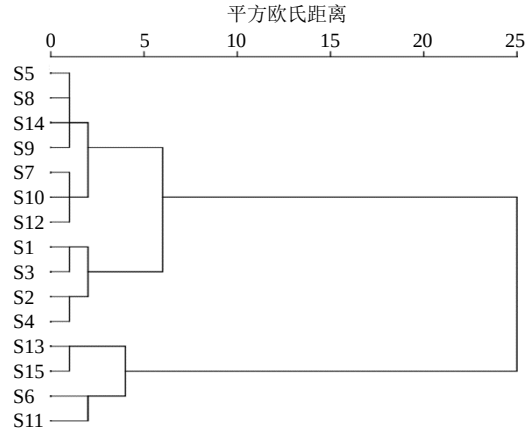


图 3　15 批 GJGD 物质基准的 HCA 树状图

Fig. 3　Dendrogram of 15 batches of GJGD substance benchmarks by HCA

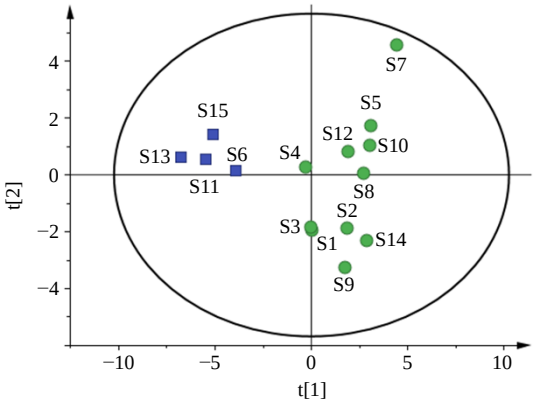


图 4　15 批 GJGD 物质基准的 PCA 得分

Fig. 4　PCA scoring plots of 15 batches of substance benchmarks of GJGD

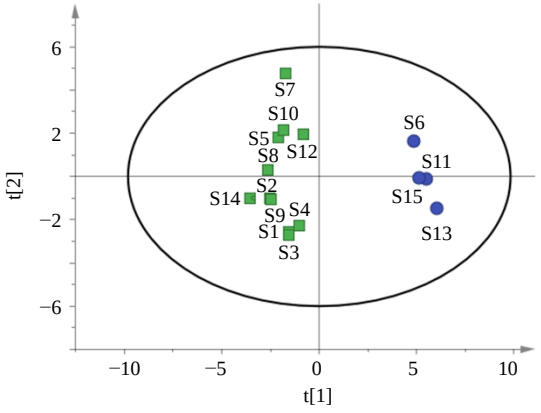


图 5　15 批 GJGD 物质基准 OPLS-DA 的得分矩阵

Fig. 5　OPLS-DA scoring plots of 15 batches of substance benchmarks of GJGD

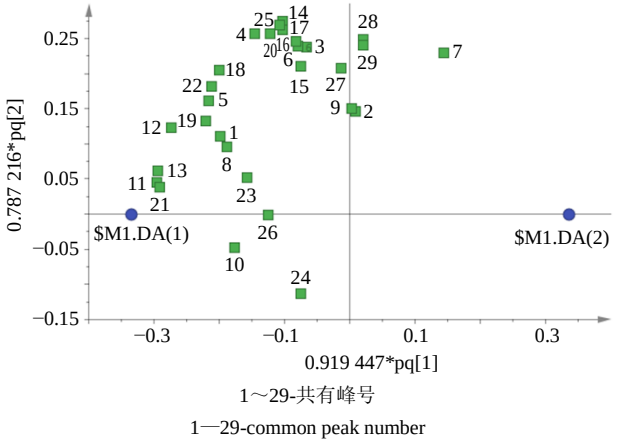


图 6　GJGD 物质基准的 OPLS-DA 载荷散点

Fig. 6　OPLS-DA loading plots of GJGD substance benchmarks

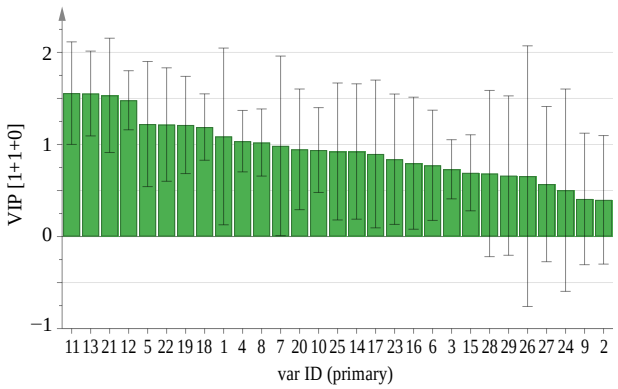


图 7 GJGD 汤物质基准 OPLS-DA 的 VIP 值

Fig. 7 VIP values of OPLS-DA of GJGD substance benchmarks

因此选择 0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相。同时，对 245、255、260、270、280 nm 等不同检测波长进行了考察，发现肉桂酸和甘草苷在 280 nm 处响应值最高，在 245 nm 处偏低，其他各成分在 245 nm 处响应值都较高，各峰响应值较高，综合考虑基线、峰形、峰数、指标成分分离度及响应值等因素，最终确定多波长切换法，分别为 245 nm（0～30 min，60～67 min，色谱峰数最多）、280 nm（30～60 min，检测甘草苷、肉桂酸）。另外，考察了柱温（20、25、30 ℃）对色谱峰分离度的影响，结果发现在 30 ℃条件下，各色谱峰分离度较好。

3.2 指标成分的选择

中药是具有复杂成分的有机整体，药效的发挥并非是单一有效成分的作用，而是其所含多元化活性成分共同作用的结果[15]。建立经典名方物质基准指纹图谱时应综合考虑全方，选择具有代表性且与药效相关性强的成分作为质控指标，使物质基准能准确反映原方质量，以助于更好地发挥物质基准的参照物功能，保证经典名方制剂的质量[16]。GJGD 是由葛根、桂枝、白芍、甘草、生姜、大枣这 6 味药组成，其中葛根为君药，具有解肌退热、透疹、生津止渴、升阳止泻作用。桂枝、白芍均为臣药，桂枝具有发汗解表、散寒止痛、通阳化气作用，白芍具有养血调经，敛阴止汗，柔肝止痛，平抑肝阳。甘草为佐药，大枣、生姜为使药。诸药并用，共奏解肌发表，升津舒经之效。本实验通过对照品共指认出 11 个成分，其中包括葛根中主要有效成分葛根素、葛根素芹菜糖苷、3′-羟基葛根素、3′-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷。桂枝中主要有效成分肉桂酸。白芍中主要有效成分芍药苷、没食子酸。甘草中主要有效成分甘草苷、甘草酸按。在葛根中，解热镇痛的主要成分为异黄酮类成分，已有研究表明，葛根素能起到解热作用，但并不是指在葛根中葛根素是发挥解热作用的唯一有效成分[17]，而葛根素、葛根素芹菜糖苷、3′-羟基葛根素、3′-甲氧基葛根素、大豆苷、染料木苷均属于异黄酮类成分，结合药理作用，能被选择为指标成分之一。桂枝中主要含有桂皮醛、肉桂酸等成分发挥解热、镇痛、抑菌、抗病毒作用[18]。白芍和甘草的主要有效成分芍药苷、没食子酸、甘草苷、甘草酸铵等，均为《中国药典》2020 年版单味药项下规定的指标性成分。因此，本实验对 GJGD 汤物质基准 HPLC 指纹图谱中 11 个色谱峰进行了指认，可为后续含量测定等关键质量控制环节研究奠定基础。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

前期实验考察过取水煎液 25 mL 于锥形瓶中，加等体积的甲醇，称定质量，超声处理 30 min，放冷，用 50%甲醇补足减失的质量，摇匀，离心 10 min（转速为 8000 r/min）；精密吸取上清液 2 mL 于 10 mL 量瓶中，50%甲醇定容，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液作为供试品溶液。发现色谱峰峰形不整齐，且各指标性成分峰面积过小，不利于观察研究。后再次考察直接利用水煎液离心再滤过进样，发现各色谱峰面积过大，葛根素是当中峰面积最大成分，面积超过标准，但其他指标成分和未指认出的色谱峰峰形均良好且面积不小，故再次修改方法，最终确定把水煎液离心后利用超纯水稀释 10 倍后过滤进样，得到的各色谱峰均符合要求。

3.4 总结

经典名方是我国中医药文化宝藏，在国家政策的扶持下，经典名方已经成为当今热点。而经典名方物质基准的制备开发，关键在于现代生产工艺与传统工艺保持“基本一致”，即投料用饮片质量一致，生产工艺条件一致。因此，需要对药材、饮片、中间体及物质基准进行质量控制[19-20]。本研究采用 HPLC 法建立 GJGD 指纹图谱，并结合多元统计分析，能够较为全面地对 GJGD 标准汤剂进行质量评价，为 GJGD 物质基准及后续复方制剂的质量控制研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 《用耳朵学中医系列丛书》编委会. 伤寒论 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 55.

[2] 张越, 陈健, 李洋, 等. 经典名方温经汤标准汤剂

HPLC 指纹图谱建立及 9 种成分含量测定 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4664-4672.

[3] 祝明, 陈碧莲, 石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614.

[4] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.

[5] 丘光明. 中国科学技术史·度量衡卷 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[6] 刘艳, 张国媛, 陈莎, 等. 经典名方麻黄汤的处方考证及历史沿革分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 7-16.

[7] 廖宇娇, 敖明月, 彭颖, 等. 基于指纹图谱及化学模式识别研究盐制对五子衍宗丸化学成分的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3224-3233.

[8] 李新蕊. 主成分分析、因子分析、聚类分析的比较与应用 [J]. 山东教育学院学报, 2007, 22(6): 23-26.

[9] 刘娜, 李军, 李宝国. 多元统计分析在中药质量控制中的应用和思考 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4268-4271.

[10] 项锋, 叶继锋, 侯齐书. 基于 PCA 和 PLS-DA 算法的不同生长阶段贯叶金丝桃药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 568-576.

[11] 袁静, 戴文科, 李京华. HPLC 指纹图谱技术结合 PLS-DA 在辛芩颗粒质量控制中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(2): 304-311.

[12] 陈粲文, 宋粉云, 李华, 等. 安胎丸 UPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 465-472.

[13] 张欣舒, 董金香, 杨净尧, 等. 经典名方保元汤物质基准指纹图谱及多指标量值传递研究 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(2): 345-358.

[14] 聂欣, 庞兰, 江华娟, 等. 经典名方化肝煎物质基准特征图谱及多指标成分含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5177-5186.

[15] 郭红军, 张翼, 曾凤英. 中药复方制剂质量控制中含量测定指标的选择思路 [J]. 中华中西医学杂志, 2008, 6(6): 68-69.

[16] 孟岩, 李焐仪, 单家明, 等. 经典名方小承气汤物质基准的 HPLC 指纹图谱分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 130-136.

[17] 于钦辉, 杜以晴, 孙启慧, 等. 基于功效和物质基础的野葛、粉葛在解热和抗病毒作用研究进展 [J/OL]. 中华中医药学刊, [2021-06-11]. https://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20201202.1559.006.html.

[18] 刘浩. 中药桂枝与肉桂的成分及药理作用比较 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(98): 19398-19399.

[19] 申屠银洪, 李欢欢, 赵晓莉, 等. 经典名方旋覆代赭汤的指纹图谱及功效关联物质预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4825-4836.

[20] 葛威, 刘小康, 王康宇, 等. 经典名方竹叶石膏汤的物质基准量值传递分析 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3239-3248.

[责任编辑 郑礼胜]