

## 甘草干姜汤 HPLC 指纹图谱及多成分定量测定研究

邵海艳, 刘 娜, 黄文新, 蔡文昊\*

天津和治药业集团有限公司, 天津 301700

**摘要:** 目的 建立甘草干姜汤(Gancao Ganjiang Decoction, GGD)的 HPLC 指纹图谱及多成分测定分析方法, 为 GGD 质量评价提供依据。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱 Hubble-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.05%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 230 nm, 对 15 批 GGD 进行指纹图谱测定, 并结合中药色谱指纹图谱相似度评价系统、聚类分析(cluster analysis, CA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)对 15 批 GGD 样品进行全面分析评价。以乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为 35 ℃; 检测波长 230 nm; 对蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸、6-姜烯酚多成分进行定量测定。结果 建立了 GGD HPLC 指纹图谱, 有 14 个共有峰, 指纹图谱相似度>0.998; 通过对照品指认 8 个特征性成分, 分别为蔗糖甘草苷、甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、6-姜酚、6-姜烯酚; 当平方欧式距离为 10 时, 15 批样品通过聚类分析分成 2 类。定量测定中蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸、6-姜烯酚进样量在 76.5~1 529.1、25.7~514.1、10.3~206.6、229.4~4 587.8、21.8~435.7 ng 线性关系良好( $r=0.9991$ ); 平均回收率在 96.0%~102.2%, RSD 均<2%; 15 批 GGD 中蔗糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸、6-姜烯酚的质量分数分别为 2.27~5.60、1.12~2.70、0.29~0.72、9.13~15.43、0.16~0.46 mg/g。结论 建立的 HPLC 指纹图谱及定量测定方法适用于 GGD 的全面质量评价, 该方法操作简便、准确可靠、重复性好, 为 GGD 的质量控制提供了有效手段。

**关键词:** 甘草干姜汤; HPLC; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 相似度; 质量评价; 含量测定; 甘草苷; 蔗糖甘草苷; 甘草酸; 6-姜烯酚

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)12-4262-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.12.010

## HPLC fingerprint and multi-component content determination of Gancao Ganjiang Decoction

SHAO Haiyan, LIU Na, HUANG Wenxin, CAI Wenhao

Tianjin Hezhi Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 301700, China

**Abstract: Objective** To establish HPLC fingerprint and the multi-component content determination method of Gancao Ganjiang Decoction (GGD, 甘草干姜汤), providing a basis for quality evaluation of GGD. **Methods** HPLC was used with a Hubble-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); Acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution was used as the mobile phase for gradient elution; The column temperature was 30 ℃; The flow rate was 0.8 mL/min; The detection wavelength was 230 nm. The fingerprint spectra of 15 batches of GGD were determined, and a comprehensive analysis and evaluation of the 15 batches of GGD samples were conducted using a traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system, cluster analysis (CA), and principal component analysis (PCA). The content determination of multiple components including liquiritin apioside, liquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid, and 6-shogaol was carried out using acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution as the mobile phase with gradient elution; The flow rate was 1.0 mL/min; The column temperature was 35 ℃; The detection wavelength 230 nm. **Results** The fingerprint spectrum of GGD was established, and a total of 14 common peaks were matched, with a fingerprint similarity greater than 0.998. A total of eight characteristic components were identified by reference standards, including liquiritin apioside, liquiritin, isoliquiritin apioside, isoliquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid, 6-gingerol, and 6-shogaol. When the squared Euclidean distance was 10, the 15 batches of samples were divided into two categories by clustering analysis. In the content determination, the inlet

收稿日期: 2025-04-26

作者简介: 邵海艳, 天津和治药业集团有限公司质量总监, 主要负责产品开发与质量控制。E-mail: aikangtj@163.com

\*通信作者: 蔡文昊, 天津和治药业集团有限公司总经理, 主要负责产品的开发和生产。E-mail: wenhao1212@163.com

quantity of liquiritin apioside, liquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid and 6-shogaol had good linear relationships ( $r = 0.999\ 1$ ) in the range of 76.5—1 529.1, 25.7—514.1, 10.3—206.6, 229.4—4 587.8, 21.8—435.7 ng. The average recovery rate was 96.0%—102.2%, and RSD < 2%. The mass fractions of liquiritin apioside, liquiritin, liquiritigenin, glycyrrhizic acid and 6-shogaol were 2.27—5.60, 1.12—2.70, 0.29—0.72, 9.13—15.43 and 0.16—0.46 mg/g, respectively. **Conclusion** The established fingerprint spectrum and content determination method are suitable for the comprehensive quality evaluation of GGD. This method is easy to operate, accurate, reliable, and has good repeatability, providing an effective means for the quality control of GGD.

**Key word:** Gancao Ganjiang Decoction; HPLC; fingerprint spectrum; cluster analysis; principal component analysis; similarity; quality evaluation; content determination; liquiritin; liquiritin apioside; glycyrrhizic acid; 6-shogaol

甘草干姜汤 (Gancao Ganjiang Decoction, GGD) 方由甘草、干姜 2 药组成, 出自东汉张仲景所著《伤寒杂病论》, 用于治疗阴阳两虚证与肺痿病, 属经典名方。现代研究认为, GGD 可用于治疗肺阳虚证, 医家应用 GGD 在治疗咳嗽、咯血、肺癌、过敏性鼻炎等、肺系疾病以及多唾、遗尿等非肺系疾病中都取得较好疗效, 临床用途广泛<sup>[1-2]</sup>。由于甘草和干姜均为药食同源品种, 可作为运动营养补充食品, 据此天津和治药业集团有限公司研制了 GGD 特殊膳食产品, 用于治疗阴阳两虚证与肺痿病的补充营养。

目前, 关于该汤剂的研究集中在药理作用与临床应用方面, 对于整体汤剂的质量控制研究相对较少<sup>[3]</sup>, 杨颜芳等<sup>[4]</sup>研究建立了同时测定 GGD 中 8 种化学成分的 HPLC 检测方法。辛雨濛等<sup>[5]</sup>通过“疾病-基因-靶点-药物”的相互作用网络研究发现甘草苷、6-姜酚、6-姜烯酚、甘草素可能是 GGD 中抗乳腺癌主要活性成分之一。牛璐等<sup>[6]</sup>采用 UPLC Q-TOF/MS 高分辨质谱技术对经方 GGD 的化学成分进行定性分析, 结果共鉴定得到 116 种成分, 主要是姜酚类、三萜皂苷和黄酮类等成分, 同时结合分子对接技术构建 GGD“核心成分-靶标-疾病”网络, 探讨了 GGD 治疗呼吸系统疾病的药效物质基础为多成分-多靶点的特点。由此说明, 中药的药效是由多种成分、多靶点共同作用的结果, 仅以个别指标成分作为质量控制指标, 不能全面反映制剂物质基础特征。

刘昌孝院士<sup>[7-8]</sup>于 2016 年提出中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念和核心理论, 建立了中药质量控制系列共性关键技术, 构建中药质量研究新模式。阳长明等<sup>[9]</sup>提出中药是一个复杂体系, 具有多成分、多靶点, 整体发挥作用的特点, 每个药味本身及所含化学成分复杂, 均具有多种功效和药理作用, 且成分之间存在复杂交互作用, 中药质量控制应加强整体质量

表征和多元化控制。根据中华中医药学会立项制订《中药质量标志物研究技术指南》<sup>[10]</sup>中对中药 Q-Marker 的发现和确定的原则、研究路径和技术方法规范和要求指导下, 按照“Q-Marker 五原则”<sup>[11-12]</sup>, 即质量传递与溯源、特有性、有效性、可测性及复方配伍适应性, 综合上述文献研究基础, 本实验采用 HPLC 法建立 GGD 特殊膳食产品的指纹图谱, 并选取特征明显、有代表性的、可检测的化学成分进行含量测定, 用于 GGD 特殊膳食产品的质量控制在, 为本品的质量提供保障。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; AL104 型电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 集团; JP-080S 型超声仪, 深圳市洁盟清洗设备有限公司; Hubble C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 美国欧姆尼基因公司。

### 1.2 试药

对照品蔗糖异甘草苷 (批号 14820, 质量分数 99.1%)、蔗糖甘草苷 (批号 18396, 质量分数 98.4%)、异甘草苷 (批号 19061-G24071, 质量分数 99.6%)、甘草素 (批号 16605, 质量分数 99.5%)、8-姜酚 (批号 18550, 质量分数 98.8%)、10-姜酚 (批号 18552, 质量分数 98.2%)、6-姜烯酚 (批号 17012-G240701, 质量分数 98.2%) 均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 对照品甘草苷 (批号 111610-202209, 质量分数 95.2%)、甘草酸铵 (批号 110731-202122, 质量分数 94.4%)、甘草次酸 (批号 110723-202316, 质量分数 98.1%)、6-姜辣素 (批号 111833-202007, 质量分数 99.3%) 均购自中国食品药品检定研究院。

色谱纯乙腈 (批号 240508)、色谱纯甲醇 (批号 240802)、分析纯甲醇 (批号 240711), 均购自天津市康科德科技有限公司; 娃哈哈纯净水, 批号 20241207, 购自高碑店娃哈哈宏振饮用水有限公司; 分析纯磷酸, 批号 20231203, 天津市试剂三厂。

### 1.3 材料

甘草提取物(批号 20240403)、干姜提取物(批号 20221231),均购自汉中天然谷生物科技股份有限公司;15 批次 GGD 特殊膳食样品均为天津和治药业集团有限公司生产,批号分别为 0100223A、0100224A、0300222A、0200223A、0200224A、0300223A、0300224A、0400223A、0400224A、0500224A、0900222A、0600224A、0600222A、0700224A、0800224A,编号分别为 S1~S15。

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱研究

**2.1.1 对照品溶液的制备** 分别称取蔗糖甘草苷、甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸铵、甘草次酸、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚对照品适量,精密称定,分别加 75%甲醇溶解并稀释制成质量浓度分别为 238.9、26.77、76.9、291.0、258.3、213.9、284.4、52.0、360.4、355.0  $\mu\text{g/mL}$  的单一对照品溶液(甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7);另取 6-姜烯酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释制成质量浓度为 2.72  $\text{mg/mL}$  的对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取 GGD 样品,研细,取约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80%甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用 80%甲醇补足减失的质量,摇匀,提取液经 13 000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。

**2.1.3 甘草提取物溶液的制备** 取甘草提取物样品,研细,取约 0.2 g,精密称定,按照“2.1.2”项下方法操作制备,即得甘草提取物溶液。

**2.1.4 干姜提取物溶液的制备** 取干姜提取物样品,研细,取约 0.2 g,精密称定,按照“2.1.2”项下方法操作制备,即得干姜提取物溶液。

**2.1.5 色谱条件** 色谱柱为 Hubble  $\text{C}_{18}$  柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );检测波长 230 nm;体积流量 0.8 mL/min;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量 10  $\mu\text{L}$ ;流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,梯度洗脱:0~8 min, 16%乙腈;8~22 min, 16%~26%乙腈;22~37 min, 26%~38%乙腈;37~55 min, 38%~51%乙腈;55~65 min, 51%~90%乙腈。

**2.1.6 精密度试验** 取 GGD 样品,研细,取约 1.0 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.5”项下色谱条件进行测定,精密吸取供试品溶液 10

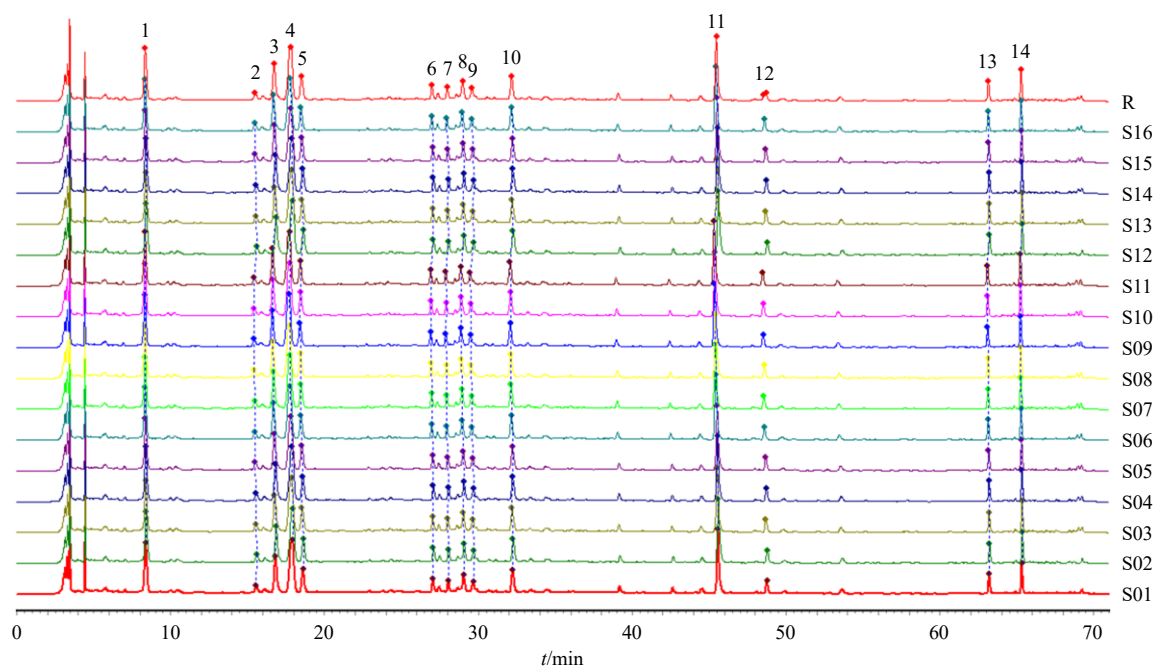
$\mu\text{L}$ ,连续进样 6 次,以 11 号色谱峰(甘草酸)为参照峰,计算其他共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD,结果 14 个共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 5%,符合指纹图谱的要求。

**2.1.7 稳定性试验** 取 GGD 样品,研细,取约 1.0 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、12、16、24 h,按照“2.1.5”项下色谱条件进行测定,以 11 号色谱峰(甘草酸)为参照峰,计算其他共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD,结果 14 个共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 5%,符合指纹图谱的要求,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.1.8 重复性试验** 取 GGD 样品,研细,取 6 份,每份约 1.0 g,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.5”项下色谱条件进行测定,以 11 号色谱峰(甘草酸)为参照峰,计算其他色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD,结果 14 个色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 5%,符合指纹图谱的要求。

**2.1.9 指纹图谱的建立及相似度评价** 取 15 批 GGD 样品(S1~S15),按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1.5”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将所得图谱依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版)进行处理,以 S1 为参照,设置时间窗为 0.15 min,采用平均数法和基准峰校正法,生成对照指纹图谱(R)。共标示 14 个共有峰,其中 11 号峰(甘草酸)稳定性好,色谱响应高,保留时间适中,故选择该色谱峰为参照峰(S)。15 批样品(S1~S15)的指纹图谱及其对照指纹图谱见图 1。15 批样品(S1~S15)与 R 的相似度计算结果分别为 0.999、0.999、0.999、0.999、0.998、0.998、0.998、0.998、0.998、0.998、0.999、0.999、0.999、0.999、0.998,相似度均大于 0.998,表明各批次之间相似度良好。

**2.1.10 共有峰的指认** 取“2.1.1”项下各个对照品溶液,按“2.1.5”项下色谱条件进样测定,得各个对照品溶液及混合对照品溶液的色谱图见图 2。通过与供试品溶液色谱峰的保留时间比对,可指认 GGD 共有峰 4、5、6、8、10、11、13、14 分别为蔗糖甘草苷、甘草苷、蔗糖异甘草苷、异甘草苷、甘草素、甘草酸、6-姜酚、6-姜烯酚。另外,GGD 指纹图谱中还有 8-姜酚、10-姜酚、甘草次酸色谱峰被指认,只是色谱峰比较小,量微,未计入共有峰中。

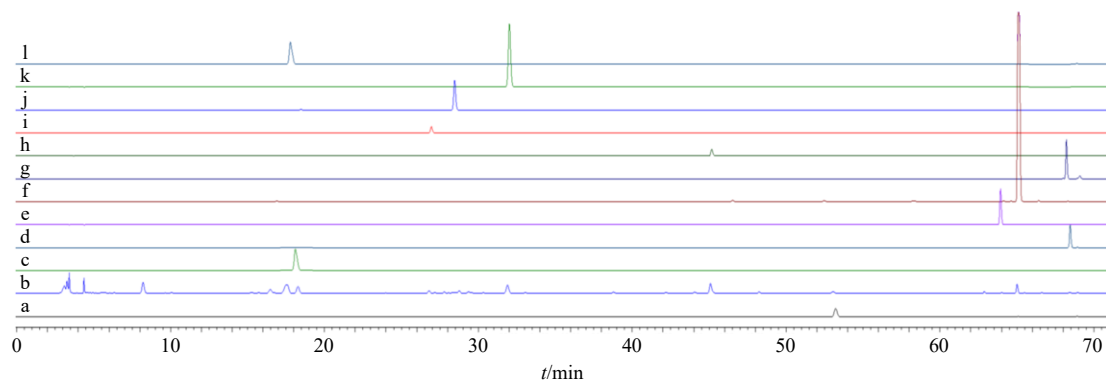


4-芹糖甘草苷; 5-甘草苷; 6-芹糖异甘草苷; 8-异甘草苷; 10-甘草素; 11-甘草酸; 13-6-姜酚、14-6-姜烯酚。

4-apigenin; 5-liquiritin; 6-liquiritin apioside; 8-isoliquiritigenin; 10-glycyrrhizin; 11-glycyrrhizic acid; 13-6-gingerol; 14-6-shogaol.

图 1 GGD 的 HPLC 指纹图谱 (S1~S15) 和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches (S1—S15) of GGD and reference fingerprint (R)



a-6-姜酚; b-GGD 样品; c-甘草苷; d-甘草次酸; e-8-姜酚; f-6-姜烯酚; g-10-姜酚; h-甘草酸; i-芹糖异甘草苷; j-异甘草苷; k-甘草素; l-芹糖甘草苷。

a-6-gingerol; b-GGD sample; c-liquiritin; d-glycyrrhetic acid; e-8-gingerol; f-shogaol; g-10-gingerol; h-glycyrrhizic acid; i-isoliquiritin apioside; j-liquiritin; k-liquiritigenin; l-liquiritin apioside.

图 2 GGD 指纹图谱与各对照品色谱图比较

Fig. 2 Comparison between GGD fingerprint and chromatogram of each reference substance

**2.1.11 聚类分析** 聚类分析能够从整体角度分析并比较不同样品间的相似性,排除相关性较差变量的影响<sup>[10]</sup>。对 15 批 GGD 样品的数据采用聚类分析法进行分析以探索其差异性。使用 SPSS 26.0 软件,以 15 批 GGD 样品指纹图谱的 14 个共有峰的峰面积作为变量,选择平方欧式距离为测度,采用组间均联法进行系统聚类,对其进行聚类分析。结果显示,当平方欧式距离为 10 时,15 批样品可以被分为 2 类, S5、S15、S7、S10、S9、S4、S14、S2、

S12、S6、S8、S1、S11 为第 1 类, S3、S13 为第 2 类,聚类分析树状图见图 3。表明 15 批 GGD 样品之间存在一定差异,可能与原料来源不同时间和批次存在差异有关。提示在今后的生产中可以固定原料产地、厂家,从源头控制原料的质量,以保证制剂质量的均一稳定。

**2.1.12 主成分分析 (principal component analysis, PCA)** PCA 也称主分量分析,是一种常见的降维技术,用于减少原始数据的复杂性并保持最大量的

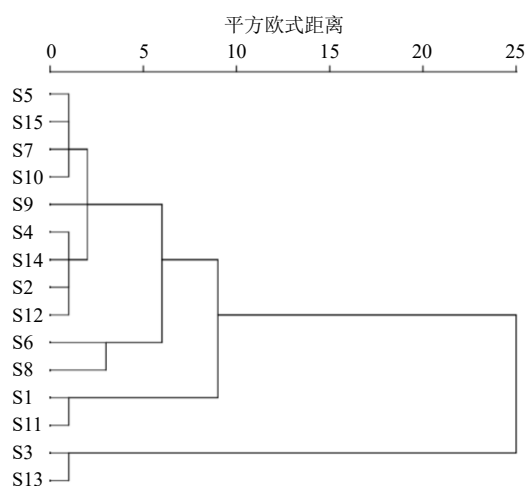


图 3 聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis tree diagram

信息。通过 PCA, 可以有效地识别样本之间的差异, 并评估样本重复性的质量<sup>[10]</sup>, 能够进一步寻找 GGD 样品不同批次质量的差异性变量。将 15 批 GGD 样品指纹图谱的 14 个共有峰的峰面积作为变量进行标准化处理后, 采用 SPSS 26.0 软件, 以特征值及累积方差贡献率为依据, 对 15 批 GGD 样品指纹图谱 14 个共有峰进行 PCA, 结果见表 1。以特征值 > 1 为提取标准, 共得到 3 个主成分因子, 特征值分别为 8.844、2.620、1.444, 方差贡献率分别为 63.172%、18.714%、10.316%, 累积方差贡献率为 92.202%, 当折线由陡峭突然变得平稳时, 陡峭到平稳对应的因子个数即为参考提取因子个数。碎石图 (图 4) 中前 3 个特征值的变化曲线陡峭, 几乎囊括了指纹图谱大部分信息, 提示这 3 个主成分因子能

表 1 特征值及方差贡献率

Table 1 Eigenvalue and variance contribution rate

| 主成分因子 | 特征值   | 方差贡献率/% | 累积方差贡献率/% |
|-------|-------|---------|-----------|
| 1     | 8.844 | 63.172  | 63.172    |
| 2     | 2.620 | 18.714  | 81.887    |
| 3     | 1.444 | 10.316  | 92.202    |

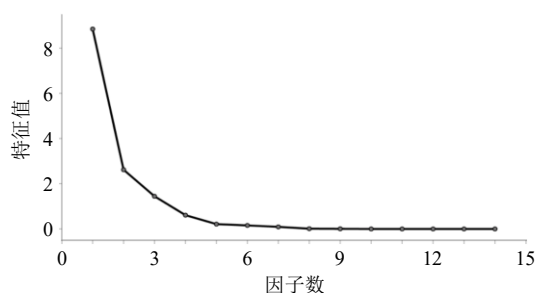


图 4 成分分析碎石图

Fig. 4 Scree plot of principal component analysis

够充分体现 14 个共有峰的基本特征值和主要信息, 反映出引起不同批次样品间差异的信息, 这 3 个主成分可以作为 GGD 样品质量的差异性变量反映其整体质量的评价指标。

## 2.2 多成分定量测定

在指纹图谱研究基础上, 根据刘昌孝院士<sup>[6-7]</sup>提出的中药 Q-Marker 理论“五要素”中的特有性、可测性、有效性及中药配伍理论关联性原则, 选取 GGD 样品中含量高同时又是组成药味甘草和干姜具有代表性的化学成分甘草苷、甘草酸、芹糖甘草苷、甘草素、6-姜烯酚进行定量测定研究, 用于中药的质量控制。

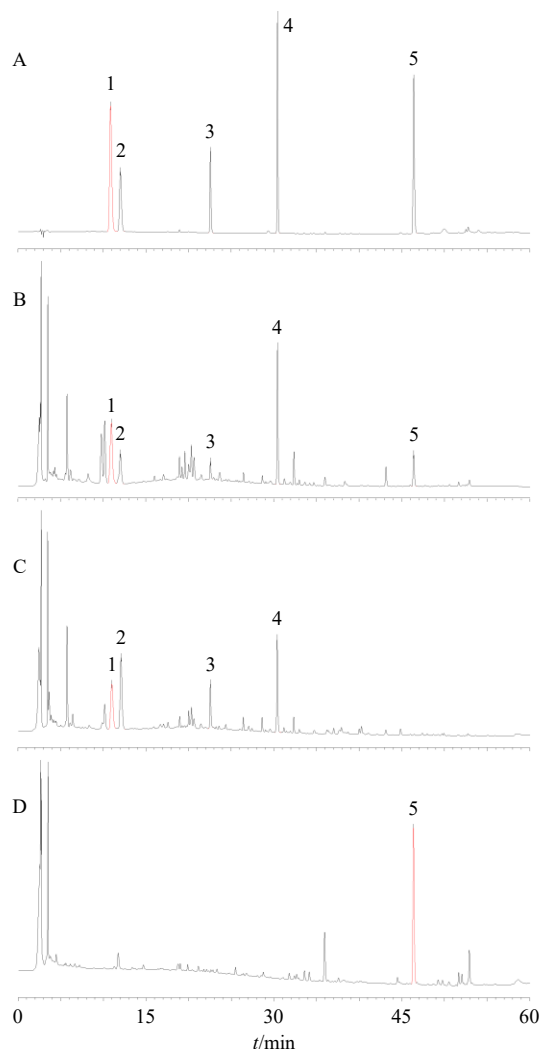
**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵、6-姜烯酚对照品适量, 用 80% 甲醇溶解并稀释, 制成含芹糖甘草苷 38.22  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 12.85  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草素 5.17  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵 114.70  $\mu\text{g/mL}$ 、6-姜烯酚 10.88  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取 GGD 样品, 研细, 取约 0.6 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 静置, 取上清液, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液。

**2.2.3 阴性样品溶液的制备** 按处方配比, 分别取除甘草、干姜外的其他药材, 按 GGD 工艺制成制剂, 再按照“2.2.2”项下方法制备, 分别制得缺甘草、缺干姜阴性样品溶液。

**2.2.4 色谱条件** 色谱柱为 Hubble C<sub>18</sub> 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 检测波长 230 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 流动相为乙腈-0.05% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~8 min, 18% 乙腈; 8~45 min, 18%~66% 乙腈; 45~49 min, 66%~80% 乙腈; 49~55 min, 80% 乙腈。混合对照品和 GGD 样品的色谱图见图 5。

**2.2.5 线性关系考察** 称取芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵、6-姜烯酚对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇分别制成含芹糖甘草苷 38.22  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 12.85  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草素 5.17  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草酸铵 114.70  $\mu\text{g/mL}$ 、6-姜烯酚 10.88  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液。分别精密吸取 2.0、5.0、10.0、20.0、40.0  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 按照“2.2.2”项下色谱条件



1-芹糖甘草苷; 2-甘草苷; 3-甘草素; 4-甘草酸铵; 5-6-姜烯酚。  
1-liquiritin apioside; 2-liquiritin; 3-liquiritigenin; 4-ammonium  
glycyrrhizinate; 5-6-shogaol.

图 5 混合对照品 (A)、GGD 样品 (B)、缺干姜阴性对照 (C)、缺甘草阴性对照 (D) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of mixed reference substances (A), GGD sample (B), negative control without *Zingiberis Rhizoma* (C), negative control without *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (D)

进行分析, 分别测定各自峰面积, 以对照品进样量为横坐标 ( $X$ ), 峰面积值为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程: 芹糖甘草苷  $Y=1\,550\,876.55X+48\,115.65$ ,  $r=0.999\,4$ ; 甘草苷  $Y=2\,327\,306.95X+7\,151.15$ ,  $r=0.999\,1$ ; 甘草素  $Y=4\,558\,416.02X-4\,249.78$ ,  $r=0.999\,9$ ; 甘草酸铵  $Y=434\,513.29X+4\,590.42$ ,  $r=0.999\,9$ ; 6-姜烯酚  $Y=5\,206\,913.79X-14\,557.05$ ,  $r=1.000\,0$ ; 结果表明, 芹糖甘草苷进样量在  $76.5\sim1\,529.1\text{ ng}$ 、甘草苷进样量在  $25.7\sim514.1\text{ ng}$ 、甘草素进样量在  $10.3\sim206.6$

ng、甘草酸铵进样量在  $229.4\sim4\,587.8\text{ ng}$ 、6-姜烯酚进样量在  $21.8\sim435.7\text{ ng}$  与峰面积呈良好的线性关系。

**2.2.6 精密度试验** 取同一批 (S5) GGD 样品, 按照“2.2.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 样品中芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵和 6-姜烯酚峰面积的 RSD 分别为 0.29%、0.25%、0.35%、0.26%、0.26%。

**2.2.7 稳定性试验** 取同一批 (S5) GGD 样品, 按照“2.2.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 分别在制备后 0、2、4、8、12、24、36、48 h 进样测定, 结果芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵和 6-姜烯酚峰面积的 RSD 分别为 1.51%、1.53%、1.95%、1.52%、1.34%, 结果表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.2.8 重复性试验** 取同一批 (S5) GGD 样品, 按照“2.2.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 进样测定, 结果芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵、6-姜烯酚质量分数的 RSD 分别为 0.44%、0.40%、1.57%、0.59%、0.82%, 结果表明该实验重复性良好。

**2.2.9 加样回收率试验** 取已测知含量的批号 S5 的 GGD 样品 0.3 g, 平行 6 份, 精密称定, 分别精密加入芹糖甘草苷对照品 (质量浓度  $238.9\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 4.0 mL、甘草苷对照品 (质量浓度  $107.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 3.50 mL、甘草素对照品 (质量浓度  $258.3\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 0.30 mL、甘草酸铵对照品 (质量浓度  $1\,911.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 2.20 mL、和 6-姜烯酚对照品 (质量浓度  $217.6\text{ }\mu\text{g/mL}$ ) 0.60 mL, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各成分的加样回收率, 结果芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵、6-姜烯酚的平均加样回收率分别为 102.2%、100.8%、96.0%、101.0%、96.4%, RSD 分别为 0.89%、0.88%、1.38%、1.29%、0.71%。

**2.2.10 样品测定** 取 15 批 (S1~S15) GGD 样品, 按照“2.2.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素、甘草酸铵、6-姜烯酚的含量, 结果见表 2。结果显示, 15 批 GGD 样品 (S1~S15) 中成分芹糖甘草苷质量分数为  $2.27\sim5.60\text{ mg/g}$ , 甘草苷质量分数为  $1.12\sim2.70\text{ mg/g}$ , 甘草素质量分数为  $0.29\sim0.72\text{ mg/g}$ , 甘草酸质量分数为  $9.13\sim15.43\text{ mg/g}$ , 6-姜烯酚质量分数为  $0.16\sim0.49\text{ mg/g}$ , 结果表明产品工艺稳定。

表 2 GGD 样品测定结果

Table 2 Determination results of GGD samples

| 编号  | 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> ) |      |      |       |       |
|-----|----------------------------|------|------|-------|-------|
|     | 芹糖甘草苷                      | 甘草苷  | 甘草素  | 甘草酸   | 6-姜烯酚 |
| S1  | 2.45                       | 1.90 | 0.30 | 9.81  | 0.16  |
| S2  | 2.33                       | 2.70 | 0.38 | 9.13  | 0.25  |
| S3  | 2.27                       | 1.30 | 0.33 | 10.61 | 0.20  |
| S4  | 3.38                       | 1.93 | 0.70 | 11.57 | 0.45  |
| S5  | 3.55                       | 2.11 | 0.72 | 11.62 | 0.44  |
| S6  | 3.52                       | 1.85 | 0.50 | 12.37 | 0.40  |
| S7  | 3.15                       | 1.44 | 0.62 | 11.39 | 0.37  |
| S8  | 3.79                       | 1.36 | 0.31 | 15.15 | 0.43  |
| S9  | 3.43                       | 1.22 | 0.30 | 14.00 | 0.40  |
| S10 | 3.32                       | 1.17 | 0.29 | 13.70 | 0.38  |
| S11 | 5.47                       | 1.34 | 0.39 | 14.43 | 0.44  |
| S12 | 5.25                       | 2.18 | 0.44 | 15.43 | 0.39  |
| S13 | 2.58                       | 1.14 | 0.65 | 13.04 | 0.41  |
| S14 | 5.60                       | 1.33 | 0.59 | 15.27 | 0.46  |
| S15 | 2.62                       | 1.12 | 0.64 | 12.96 | 0.40  |

### 3 讨论

#### 3.1 指标成分的选定

GGD 方由甘草、干姜二药组成，甘草味甘，性平，归肺、心、脾、胃经；干姜味辛，性热，归肺、胃、肾、心经。甘草补益，干姜散寒，用量甘胜于辛，使甘守而津回，两药配伍，可以温肺扶阳，使肺阳渐兴，津液得布，肺脏得养，诸恙得痊<sup>[13]</sup>。选定的 5 种指标性成分药理作用明确、分析方法成熟可行。芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素为甘草中的黄酮类，该类化合物具有镇咳祛痰<sup>[14-15]</sup>，抗炎<sup>[16-17]</sup>、抗纤维化<sup>[18]</sup>、抗氧化<sup>[19]</sup>等作用；甘草酸为甘草中三萜皂苷类化合物具有抗炎、解毒、免疫调节、抗病毒、保肝和稳定细胞膜等作用<sup>[20-21]</sup>。上述化学成分均为甘草发挥其“清热解毒，祛痰止咳”功效和抗炎、抗菌、抗病毒、肝脏保护等药理作用的主要生物活性成分。姜酚类物质是干姜中主要成分，对心脏有兴奋作用，并可扩张血管，促进血液循环等作用<sup>[22]</sup>。本实验测定 GGD 样品中 5 种药效成分用以作为控制 GGD 质量的指标，为建立与疗效相对应且安全、有效、稳定的中药质量评价体系，也为全面控制 GGD 的质量提供科学依据。

#### 3.2 色谱峰的归属

将 GGD 与甘草提取物和干姜提取物指纹图谱进行比较分析，进行色谱峰与药材的相关性研究，寻找保留时间一致的色谱峰，确定色谱峰归属，峰

1~12 号色谱峰皆来于甘草提取物，13、14 号色谱峰来源于干姜提取物。

#### 3.3 色谱条件的优化

本研究以色谱峰信息量最大化、方法稳定为宗旨优化了色谱条件，对流动相配比、柱温、体积流量和波长等进行筛选，以色谱峰分离度和峰面积为考察目标确定了最佳色谱条件。本研究在条件摸索过程中，利用在多波长的色谱图对比，结果在 230 nm 波长处，色谱峰数量较多，色谱峰尖锐、分离度较好，故指纹图谱的检测波长选择为 230 nm。流动相体系考察方面，先后考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水溶液等流动相体系，从混合对照品和样品中被测成分的分离情况、基线的稳定性以及分析时间因素等综合考量，优选了最佳梯度洗脱程序。在指纹图谱的基础上，对含量测定的梯度洗脱条件又进一步的优化，使被测定成分色谱峰与相邻色谱峰分离度均大于 2.0，符合《中国药典》2020 年版规定的分离度应大于 1.5 的要求。

#### 3.4 提取条件

对供试品提取方法进行考察，兼顾提取溶剂选择及提取效率 2 方面因素，最终确定提取以 80% 甲醇为提取溶剂，超声提取（250 W、40 kHz）30 min 为供试品溶液制备方法。指纹图谱及含量测定实验考察了供试品溶液的提取方式（超声处理、加热回流）、提取溶剂（60%、80%、100% 甲醇及 75% 乙醇）、提取时间（10、20、30、40 min），指纹图谱提取溶剂量（10、20、50 mL）、定量测定提取溶剂量（25、50 mL）对各成分提取效率的影响，综合考虑，最终确定供试品溶液制备方法。

综上所述，本实验建立的 HPLC 指纹图谱及含量测定方法操作简便，重复性好，建立的对照指纹图谱中二种药味均有体现，15 批 GGD 样品指纹图谱的相似度达在 0.99 之上，表明 GGD 生产工艺稳定，质量一致性较好。含量测定指标成分覆盖了两个原料的主要成分。该方法可用于 GGD 质量的全面评价，为建立 GGD 特殊膳食产品全新的质量管理体系提供科学依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 王明新. 甘草干姜汤的研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(21): 152-154.
- [2] 孟伟亭, 刘现磊, 纪秋如, 等. 甘草干姜汤古今组方用药规律分析 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(6): 1358-

- 1371.
- [3] 王雪芙, 孙国祥. 甘草干姜汤的质量研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2021, 38(2): 145-149.
- [4] 杨颜芳, 张贵君, 王晶娟, 等. 甘草干姜汤中 8 种药效组分的含量测定 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(5): 810-814.
- [5] 辛雨濛, 梁桓熙, 余悦华, 等. 基于网络药理学和分子对接法预测甘草干姜汤抗乳腺癌的主要活性成分及作用机制 [J]. 癌变·畸变·突变, 2022, 34(1): 7-13.
- [6] 牛璐, 李伟霞, 张辉, 等. 经方甘草干姜汤成分的快速分析及其治疗呼吸系统疾病的作用 [J]. 中成药, 2021, 43(8): 2204-2218.
- [7] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [8] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [9] 阳长明, 杨平, 刘乐环, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究进展及对中药质量研究的思考 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2519-2526.
- [10] 中华中医药学会《中药质量标志物研究技术指南》编写组. 中药质量标志物研究技术指南 [J]. 中草药, 2025, 56(7): 2249-2252.
- [11] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-Marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [12] Zhang T J, Bai G, Liu C X. Innovation theory, technical methods and industrial application of quality marker of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(1): 84-86.
- [13] 刘璇, 贾新华, 张心月, 等. 甘草干姜汤治疗肺阳虚类病证临床研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(3): 411-415.
- [14] Kuang Y, Li B, Fan J R, *et al.* Antitussive and expectorant activities of licorice and its major compounds [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26(1): 278-284.
- [15] Wei W, Gao X P, Zhao L, *et al.* Liquiritin apioside (LA) attenuates apneic responses to stimulation of laryngeal chemoreceptors but not mechanoreceptors in rat pups [J]. *FASEB J*, 2019, 33(S1): 733.7.
- [16] 杨晓露, 刘朵, 卞卡, 等. 甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(1): 99-104.
- [17] 王海强, 刘一宁, 陆晓燕, 等. 甘草中抑制脂多糖诱导小鼠 RAW264.7 产生 NO 的活性成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4155-4159.
- [18] Zhang Y, Zhang L, Zhang Y, *et al.* The protective role of liquiritin in high fructose-induced myocardial fibrosis via inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1337-1349.
- [19] 降瑞婵, 刘海亮. 甘草中 5 种活性物质对人脂肪间充质干细胞的抗衰老作用 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2021, 42(2): 179-186.
- [20] 韩瑶聘, 王彬, 王政雨, 等. 甘草酸药理作用的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(21): 2499-2505.
- [21] Guo X X, Yang W N, Dong B S, *et al.* Glycyrrhetic acid-induced miR-663a alleviates hepatic stellate cell activation by attenuating the TGF- $\beta$ /smad signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 3156267.
- [22] Bischoff-Kont I, Primke T, Niebergall L S, *et al.* Ginger constituent 6-shogaol inhibits inflammation and angiogenesis-related cell functions in primary human endothelial cells [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 844767.

[责任编辑 郑礼胜]