

## 桂枝甘草汤 HPLC 指纹图谱

曹英杰, 原双星, 李彬, 朱明军, 王永霞\*

(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000)

**[摘要]** 目的: 建立桂枝甘草汤的 HPLC 指纹图谱检测方法。方法: 采用 Agilent SB-AQ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对 10 批桂枝甘草汤 HPLC 指纹图谱进行评价。结果: 以桂皮酸为参照峰, 确定了 25 个共有峰, 指认其中 4 个共有峰分别为甘草酸、甘草苷、桂皮酸和桂皮醛。10 批桂枝甘草汤的指纹图谱相似度均 >0.95。结论: 该方法灵敏度高、稳定性和准确性良好, 为桂枝甘草汤质量标准建立提供了可靠的科学依据。

**[关键词]** 桂枝甘草汤; 指纹图谱; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0100-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140100

## HPLC Fingerprint of Guizhi Gancao Decoction

CAO Ying-jie, YUAN Shuang-xing, LI Bin, ZHU Ming-jun, WANG Yong-xia\*

(The First Affiliated Hospital of Henan Institute of Traditional Chinese, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the chromatographic fingerprint for Guizhi Gancao decoction by RP-HPLC-DAD. **Method:** The HPLC fingerprint were determined on Agilent ZORBAX SB-Aq column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), eluted with the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid in gradient mode; flow rate 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; column temperature 25 °C and detection wavelength was set at 254 nm, injection volume 10 μL. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2004A) was used to analysis. **Result:** Twenty five common peaks were selected as the fingerprint peaks of Ramuli Cinnamomi and Glycyrrhizae. And 4 common peaks were determined by the relative time of the standard substance. The similarity of 10 batches of Guizhi Gancao decoction were all more than 0.95. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint of Guizhi Gancao decoction has desirable precision, reproducibility, and can provide a basis for quality evaluation of Guizhi Gancao decoction.

**[Key words]** Guizhi Gancao decoction; fingerprint; HPLC

桂枝甘草汤源自我国汉代著名医家张仲景的《伤寒论》,为温阳益气、治疗心悸的基本方。该书第 64 条对其治疗病症的描述为“发汗过多,其人叉手自冒心,心下悸,欲得按者,桂枝甘草汤主之。”后世医家多以桂枝甘草汤为基础方辨治心悸、心律失常,临床与实验研究均取得很好的疗效<sup>[1]</sup>。现代学者对桂枝甘草汤及其水提和醇提成分进行研究,证

实该方对多种实验性心律失常具有明显的治疗作用<sup>[2]</sup>。经研究证实桂枝甘草汤中甘草次酸具有抗心律失常的药理作用<sup>[3]</sup>,桂皮醛具有降压、解热、镇痛、抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗血小板聚集和抗凝血等多种药理作用<sup>[4]</sup>。本研究采用 HPLC 建立桂枝甘草汤的指纹图谱,为桂枝甘草汤质量控制及效物质研究提供参考。

**[收稿日期]** 20140213(013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102698);河南省高校科技创新团队支持计划项目(13IRTSTHN012);河南中医学院科技创新团队支持计划项目(2010XCXTD10)

**[第一作者]** 曹英杰, 硕士, 药师, 从事中药质量控制及有效物质基础研究, Tel: 0373-66633639, E-mail: ssilienty@163.com

**[通讯作者]** \*王永霞, 博士, 副教授, 从事中西医结合防治心血管疾病研究, Tel: 0373-66633639, 0371-66262960, E-mail: wyxchzq@163.com

## 1 材料

**1.1 试药及试剂** 甘草苷(111610-201106)、甘草酸铵(110731-201116)、桂皮酸(110786-200503)、桂皮醛(110710-201016)对照品均购自中国食品药品检定研究院,乙腈、磷酸为色谱纯(美国 sigma 公司),水为高纯水。

**1.2 仪器** 2695 型高效液相色谱仪(美国沃特世公司,包括 Waters2998 型紫外检测器,Empower 色谱工作站),CF225D 型电子天平(德国赛多利斯集团)。

**1.3 药材饮片** 10 批药材饮片分别购自河南中医学院第一附属医院、第二附属医院、第三附属医院,郑州市中医院,江阴药业有限公司,北京同仁堂(亳州)饮片有限责任公司等,经河南中医学院第一附属医院陈天朝主任药师鉴定所购桂枝均为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝,所购甘草均豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根茎,均符合 2010 年版《中国药典》规定。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 磷酸水梯度洗脱,见表 1,检测波长 254 nm,柱温 25 °C,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸水/%
0.00	5.0	95.0
10.00	20.0	80.0
15.00	23.0	77.0
30.00	32.0	68.0
40.00	32.0	68.0
50.00	38.0	62.0
60.00	48.0	52.0
70.00	65.0	35.0

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取甘草苷、甘草酸铵、桂皮酸、桂皮醛对照品适量,置 10 mL 棕色量瓶中,甲醇溶解并定容置刻度,配置成每 1 mL 含桂皮醛 67.17 μg、肉桂酸 2.90 μg、甘草苷 40.40 μg、甘草酸铵 57.34 μg 的混合对照品溶液,0.45 μm 滤膜滤过。

**2.3 供试品溶液的制备** 依《伤寒论》桂枝甘草汤处方比例,取桂枝 4 g、甘草 2 g,加 10 倍量体积水浸泡 30 min,煎煮至沸腾并维持 20 min,趁热过滤,放

冷,药渣加水 60 mL,煎煮 20 min,趁热过滤,放冷,合并 2 次滤液,至 500 mL 量瓶中,加水至刻度,0.45 μm 滤膜滤过,即得<sup>[5]</sup>。

**2.4 阴性样品溶液的制备** 取桂枝 4 g,按 2.3 项下同法制备缺甘草阴性样品;取炙甘草 2 g,按 2.3 项下同法制备缺桂枝阴性样品。

### 2.5 方法学考察

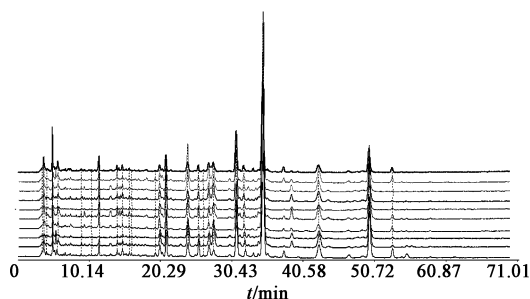
**2.5.1 精密度试验** 取同一桂枝甘草汤供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,分别进样 10 μL,记录色谱图。以桂皮酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.01%,相对峰面积的 RSD 均 < 1.45%,表明本方法精密度良好。

**2.5.2 重复性试验** 取同一批次的桂枝和炙甘草,按 2.3 项下平行制备 5 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定。结果各共有峰相对保留时间 RSD 均 < 1.37%,相对峰面积 RSD 均 < 2.03%,表明本方法重复性良好。

**2.5.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液,在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 h 检测特征指纹图谱,结果各共有峰保留时间 RSD 均 < 1.05%,相对峰面积 RSD 均 < 2.78%,表明本方法稳定性良好。

**2.5.4 专属性试验** 取 2.3 和 2.4 项下的供试品溶液和阴性样品溶液,照 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱图。结果炙甘草色谱图与桂枝色谱图未存在明显干扰,表明本方法对桂枝甘草汤中桂枝和甘草成分的检出都有比较好的专属性。

**2.6 样品测定** 取 1.3 项下饮片随机分组,按 2.3 项下方法制备 10 批桂枝甘草汤供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱图(图 1~3)。



由下至上 S1~S10

图 1 10 批桂枝甘草汤样品 HPLC 指纹谱

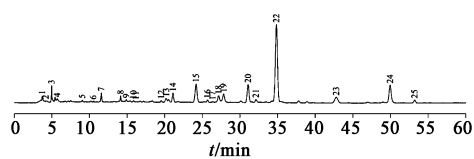


图 2 桂枝甘草汤指纹谱共有模式

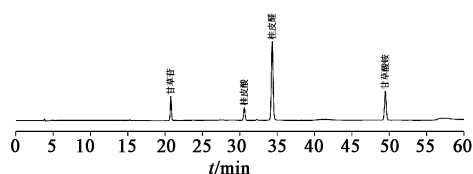


图 3 混和对照品色谱

## 2.7 特征指纹图谱的建立

**2.7.1 参比峰的选择** 在各批样品溶液的指纹图谱中,桂皮酸的保留时间居中,分离度良好,峰面积较大且为桂枝的主要成分之一,故确定 20 号峰桂皮酸为参比峰。

**2.7.2 特征指纹图谱的建立及相似度评价** 将 10 批桂枝甘草汤色谱图数据导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版进行匹配,相似度计算采用自动匹配模式,结果 10 批桂枝甘草汤色谱图相似度均 >0.95(见表 2),同时确定了 25 个共有峰,根据对照品保留时间与紫外光谱图指认了其中的 4 个共有峰分别为甘草苷、甘草酸铵、桂皮酸和桂皮醛,各图谱共有峰相对保留时间无显著差异(见表 4),不同批次的桂枝甘草汤之间存在较好的相关性。

表 2 10 批桂枝甘草汤相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹谱
S1	1.000	0.948	0.947	0.961	0.979	0.957	0.985	0.976	0.962	0.983	0.983
S2	0.948	1.000	0.929	0.995	0.954	0.908	0.968	0.974	0.986	0.957	0.985
S3	0.947	0.929	1.000	0.930	0.973	0.979	0.951	0.958	0.948	0.920	0.963
S4	0.961	0.995	0.930	1.000	0.964	0.919	0.975	0.974	0.983	0.967	0.989
S5	0.979	0.954	0.973	0.964	1.000	0.977	0.986	0.985	0.963	0.970	0.988
S6	0.957	0.908	0.979	0.919	0.977	1.000	0.949	0.958	0.938	0.931	0.958
S7	0.985	0.968	0.951	0.975	0.986	0.949	1.000	0.992	0.970	0.986	0.992
S8	0.976	0.974	0.958	0.974	0.985	0.958	0.992	1.000	0.984	0.984	0.995
S9	0.962	0.986	0.948	0.983	0.963	0.938	0.970	0.984	1.000	0.971	0.99
S10	0.983	0.957	0.920	0.967	0.970	0.931	0.986	0.984	0.971	1.000	0.983
对照指纹谱	0.983	0.985	0.963	0.989	0.988	0.958	0.992	0.995	0.990	0.983	1.000

表 3 10 批桂枝甘草汤相对峰面积

共有峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.082	0.084	0.135	0.103	0.162	0.284	0.045	0.136	0.144	0.132	73.87
2	0.159	0.164	0.261	0.285	0.391	0.605	0.159	0.247	0.300	0.278	69.25
3	0.277	0.228	0.400	0.362	0.539	0.547	0.227	0.329	0.352	0.406	64.58
4	0.019	0.112	0.071	0.113	0.390	0.068	0.133	0.199	0.155	0.171	60.48
5	0.019	0.022	0.050	0.020	0.061	0.074	0.022	0.019	0.029	0.025	75.41
6	0.021	0.018	0.059	0.043	0.035	0.036	0.021	0.015	0.016	0.013	70.49
7	0.133	0.097	0.053	0.291	0.371	0.532	0.227	0.273	0.276	0.010	81.70
8	0.063	0.052	0.110	0.052	0.160	0.144	0.045	0.054	0.152	0.079	66.55
9	0.097	0.058	0.133	0.060	0.097	0.194	0.069	0.076	0.085	0.087	87.02
10	0.049	0.027	0.046	0.055	0.086	0.137	0.046	0.055	0.043	0.041	82.53
11	0.025	0.023	0.047	0.015	0.032	0.050	0.021	0.018	0.011	0.009	91.68
12	0.056	0.021	0.040	0.053	0.047	0.077	0.008	0.021	0.074	0.018	106.41
13	0.241	0.208	0.577	0.337	0.374	0.534	0.180	0.203	0.216	0.161	74.58
14	0.391	0.594	1.512	0.437	1.024	1.364	0.538	0.677	0.397	0.316	67.40
15	0.309	0.525	1.834	0.251	0.501	1.459	0.190	0.581	1.142	0.261	79.88
16	0.269	0.150	0.258	0.084	0.220	0.385	0.142	0.156	0.121	0.137	108.53
17	0.013	0.015	0.109	0.019	0.036	0.177	0.033	0.072	0.049	0.033	114.73
18	0.231	0.328	0.341	0.253	0.245	0.220	0.226	0.271	0.457	0.282	61.36
19	0.115	0.623	1.468	0.356	0.531	0.299	0.403	0.521	0.574	0.279	0.00
20	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	73.53
21	0.119	0.132	0.464	0.174	0.151	0.586	0.107	0.139	0.165	0.139	92.40
22	2.706	6.373	7.217	5.718	4.439	4.972	2.912	3.476	5.163	2.510	49.19
23	0.476	0.492	0.856	0.412	0.639	0.794	0.358	0.473	0.569	0.333	72.14
24	1.144	1.118	4.117	1.286	1.981	2.891	1.008	1.019	1.026	0.704	73.49
25	0.189	0.043	0.099	0.170	0.113	0.122	0.018	0.007	0.169	0.125	124.43

表 4 10 批桂枝甘草汤共有峰相对保留时间

共有峰号	$t_R/\text{min}$										RSD
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	/%
1	0.113	0.112	0.112	0.116	0.113	0.112	0.112	0.112	0.113	0.113	1.20
2	0.120	0.120	0.121	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.36
3	0.160	0.160	0.160	0.160	0.160	0.160	0.160	0.160	0.160	0.160	0.07
4	0.187	0.185	0.184	0.185	0.184	0.183	0.185	0.184	0.184	0.185	0.51
5	0.290	0.291	0.293	0.292	0.291	0.292	0.291	0.291	0.291	0.291	0.28
6	0.337	0.338	0.340	0.336	0.338	0.340	0.338	0.339	0.338	0.338	0.37
7	0.372	0.373	0.373	0.373	0.373	0.373	0.373	0.372	0.373	0.372	0.11
8	0.455	0.455	0.456	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455	0.455	0.06
9	0.479	0.479	0.479	0.479	0.479	0.480	0.480	0.479	0.479	0.479	0.08
10	0.512	0.512	0.512	0.511	0.510	0.512	0.511	0.512	0.510	0.511	0.14
11	0.521	0.522	0.522	0.521	0.521	0.523	0.521	0.521	0.521	0.521	0.14
12	0.629	0.629	0.630	0.629	0.628	0.631	0.628	0.628	0.629	0.628	0.13
13	0.649	0.650	0.650	0.648	0.649	0.650	0.649	0.649	0.650	0.649	0.10
14	0.679	0.680	0.680	0.679	0.678	0.680	0.679	0.679	0.679	0.679	0.08
15	0.778	0.778	0.778	0.777	0.778	0.778	0.778	0.778	0.778	0.778	0.04
16	0.827	0.828	0.827	0.827	0.826	0.827	0.827	0.827	0.827	0.826	0.05
17	0.850	0.849	0.850	0.849	0.850	0.850	0.848	0.850	0.848	0.849	0.09
18	0.874	0.874	0.874	0.874	0.874	0.874	0.874	0.875	0.874	0.874	0.04
19	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.895	0.896	0.895	0.03
20	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
21	1.040	1.037	1.036	1.035	1.035	1.034	1.034	1.034	1.034	1.033	0.22
22	1.121	1.121	1.121	1.121	1.121	1.120	1.121	1.121	1.121	1.121	0.03
23	1.376	1.377	1.376	1.376	1.375	1.376	1.375	1.375	1.377	1.375	0.06
24	1.607	1.606	1.606	1.606	1.607	1.606	1.607	1.607	1.607	1.607	0.03
25	1.712	1.712	1.712	1.712	1.713	1.712	1.715	1.716	1.712	1.713	0.08

### 3 讨论

**3.1 色谱条件的优化** 分别考察了甲醇-水,乙腈-水,甲醇-0.1%磷酸水,甲醇-0.2%磷酸水,乙腈-0.1%磷酸水,乙腈-0.2%磷酸水等流动相体系。结果表明乙腈的分离度优于甲醇,使用磷酸水能够得到更好的峰形,而0.2%的磷酸水同时又造成分离度下降,且pH较低,长期使用会影响柱效,因此选择乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。

**3.2 检测波长的选择** 2010年版《中国药典》桂枝和甘草的检测波长分别为290 nm和237 nm<sup>[6]</sup>,本实验采用二极管阵列检测器对190~400 nm进行了全波长扫描采集,比较了237,254,276,290 nm处的色谱图。在237 nm处梯度洗脱基线漂移较明显,且237,276,290 nm波长处检出的色谱峰明显少于254 nm。因此254 nm能够更好的整体反应桂枝甘草汤的色谱保留行为,选定254 nm为测定波长。

**3.3 指纹图谱相似度评价** 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A版对10批桂枝甘草汤样品指纹图谱进行分析,10批样品指纹图谱的相似度均>0.95,但是部分共有峰的峰面积存在较大差

别,表明不同来源的桂枝和炙甘草制成的桂枝甘草汤化学成分的含量存在较大差异,这些差异可能影响药物的作用效果,因此为了保证桂枝甘草汤处方制剂药效的稳定性,必须对所使用的药材饮片来源和质量进行进行严格控制。

#### [参考文献]

- [1] 王秋,王占石. 桂枝甘草汤温经通脉的药效学研究[J]. 中医药研究,2002,(18)5:41.
- [2] 李冀,赵伟国,李胜志,等. 桂枝甘草汤提取物组份对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响[J]. 时珍国医国药,2009,20(8):2052.
- [3] 谢世荣,黄彩云,黄胜英,等. 甘草次酸抗心律失常作用的实验研究[J]. 医药导报,2004,23(3):141.
- [4] 张荣发. 桂皮醛的药理作用研究进展[J]. 中国药业,2008,17(10):75.
- [5] 陈新阳,毕开顺,易丽昕,等. 双波长切换 HPLC 同时测定桂枝甘草汤中4种成分的含量[J]. 中国现代应用药学,2011,28(3):265.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:80,259.

[责任编辑 顾雪竹]