

经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究

曹宁宁¹, 杨文静², 林映仙¹, 裴 帅¹, 迟洪新³, 王仁久³, 杨坤坤^{1*}, 肖学凤^{1*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

2. 天士力医药集团股份有限公司, 天津 300410

3. 长白山制药(亳州)产业园有限公司, 安徽 亳州 236800

摘要: **目的** 建立经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱, 结合化学模式识别技术对其进行分析, 并测定泽泻汤中 3 种成分 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 的含量, 为泽泻汤质量控制提供科学依据。**方法** 采用 Waters WAT054275 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 建立 15 批泽泻汤的 HPLC 指纹图谱, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”、SPSS 22.0 及 SIMCA 14.1 软件对 15 批泽泻汤的 HPLC 指纹图谱进行相似度评价及聚类分析 (CA)、偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 等化学模式识别。同时测定 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 的含量。**结果** 建立了 15 批泽泻汤的 HPLC 指纹图谱, 相似度均>0.94, 标定了 18 个共有峰, 指出 3 个色谱峰, 分别为 11 号峰白术内酯 III、15 号峰 23-乙酰泽泻醇 C、16 号峰 23-乙酰泽泻醇 B, CA 和 PLS-DA 将 15 批泽泻汤样品分为 2 类, 同时 15 批泽泻汤中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 的质量分数分别为 0.321~0.569、0.075~0.139、0.106~0.142 mg/g。**结论** HPLC 指纹图谱结合多成分同时测定的方法, 快速、简便、重复性好, 为泽泻汤及其制剂的质量评价提供参考。

关键词: 经典名方; 泽泻汤; HPLC; 指纹图谱; 化学模式识别技术; 23-乙酰泽泻醇 B; 23-乙酰泽泻醇 C; 白术内酯 III; 质量控制; 相似度评价; 聚类分析; 偏最小二乘判别分析; 泽泻; 白术

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2773-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.019

HPLC fingerprint and multi-components determination of classical herbal prescription Zexie Decoction

CAO Ning-ning¹, YANG Wen-jing², LIN Ying-xian¹, PEI Shuai¹, CHI Hong-xin³, WANG Ren-jiu³, YANG Shen-shen¹, XIAO Xue-feng¹

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tasly Pharmaceutical Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. Changbaishan Pharmaceutical (Bozhou) Industrial Park Co., Ltd., Bozhou 236800, China

Abstract: Objective To establish fingerprints of Zexie Decoction (ZXD) by HPLC, analyze them with chemical pattern recognition technology, and determine the contents of 23-acetyl alisone B, 23-acetyl alisone C, and atractylode III in ZXD, in order to provide a scientific basis for its quality control. **Methods** The HPLC fingerprint of ZXD was performed on Waters WAT054275 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile and water. Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2004A edition) was used to evaluate the fingerprints. SPSS 22.0 software and SIMCA 14.1 software was used for cluster analysis and discriminant analysis of partial least squares of those samples. Furthermore, the content of 23-acetyl alisone B, 23-acetyl alisone C, and atractylode III was determined. **Results** The HPLC fingerprint of 15 batches of ZXD was established. The similarity was > 0.94, and 18 common peaks were marked. Three peaks were confirmed, they were: atractylode III (peak 11), 23-acetyl alisone C (peak 15), and 23-acetyl alisone B (peak 16) were confirmed. Cluster analysis and partial least square

收稿日期: 2019-11-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973557); 国家科技重大专项 (2018ZX09737-019); 国家科技重大专项 (2018ZX09303-024)

作者简介: 曹宁宁 (1993—), 女, 在读硕士, 主要从事中药新药和药动学研究。Tel: 16622918788 E-mail: 1659523266@qq.com

*通信作者 肖学凤 (1966—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新药和药动学研究。Tel: (022)59596237 E-mail: kai1219@163.com

杨坤坤 (1984—), 女, 讲师, 主要从事中药成分的胃肠转运与剂型设计研究。Tel: (022)59596237 E-mail: shine2099@163.com

discriminant analysis were used to classify the 15 batches of ZXD samples into two groups. The mass fraction of 23-acetyl alisone B, 23-acetyl alisone C, and atractylode III in 15 batches of ZXD were in the range of 0.321—0.569, 0.075—0.139, and 0.106—0.142 mg/g, respectively. **Conclusion** The combination methods of HPLC fingerprint and simultaneous determinations of multiple components are rapid, simple and reproducible, which can provide reference for the quality evaluation of ZXD and its preparation.

Key words: classical famous prescription; Zexie Decoction; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition technology; 23-acetyl alisone B; 23-acetyl alisone C; atractylode III; quality control; similarity evaluation; cluster analysis; discriminant analysis of partial least squares; *Alismatis Rhizoma*; *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*

经典名方是指目前广泛应用、疗效确切、具有明显特色与优势的清代及清代以前医药典籍中所记载的方剂。2018 年 4 月 16 日, 国家中医药管理局颁布了包括泽泻汤在内的 100 首古代经典名方^[1]。经典名方多为复方, 所含化学成分复杂, 且在一些成分尚未明确的前提下, 仅测定几个成分含量往往难以充分反映和控制经典名方的整体质量, 需选择指纹图谱结合多指标含量测定更好地控制中药复方质量的一致性和优劣评价^[2]。指纹图谱作为一种综合的、可量化的色谱鉴定手段, 能较为客观地反映全方的物质基础和化学成分群的整体性和复杂性^[3]。结合多元统计分析, 如聚类分析 (CA) 和偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 等方法可对复杂的化学数据信息进行充分整合^[4-6], 并通过多指标含量测定, 可辨识经典名方复杂成分信息和其药物质量差异, 进而推动经典名方研究走向标准化。

泽泻汤始载于汉代“医圣”张仲景《金匮要略·痰饮咳嗽病脉证并治》, 云“心下有支饮, 其人苦冒眩, 泽泻汤主之。泽泻五两, 白术二两, 上二味, 以水二升, 煮取一升, 分温再服”。根据《中国古代度量衡图集》对出土的汉代各种“权”实测值及中国历史博物馆收藏的东汉“光和大司农铜权”进行剂量折算, “光和大司农铜权”质量为 2 996 g, 1 权=12 斤, 因此 1 斤约为 250 g^[7]。东汉时期, 1 斤为 16 两, 故 1 两折算为 15.6 g。并参考《张仲景全书》容量折算^[8], 1 升约为 200 mL。故称取泽泻 78.0 g, 白术 31.2 g, 加水 400 mL, 煮至 200 mL, 即得泽泻汤煎液。

泽泻汤虽组成简单, 但疗效显著^[9-10]。方中泽泻甘寒, 渗湿除饮, 为君药; 白术苦甘温, 补脾燥湿, 为臣药。君臣结合, 共奏健脾利水, 燥湿除饮之功。主治头晕目眩、动则加重、泛恶作呕、舌苔白腻、脉沉缓^[11]。现代药理研究表明, 泽泻汤具有调节脂代谢、降低内淋巴积水、改善脑血流量等作用。常用于治疗良性阵发性位置性眩晕、椎基底动脉供血不足眩晕以及高血压、高血脂、中耳炎等疾

病^[12-15], 临床应用广泛。故被列入《古代经典名方目录 (第一批)》所载方剂之一。

目前, 关于泽泻汤的研究多集中在药理作用、临床应用、泽泻与白术饮片质量研究等方面^[16-18], 而有关泽泻汤的指纹图谱研究报道较少, 仅有不同干燥方式泽泻汤指纹图谱研究^[19]。由于饮片的产地、批次及煎煮方式不一致, 使得煎液质量不稳定^[20], 导致临床用药差异。因此, 本研究通过 HPLC 法建立 15 批泽泻汤的指纹图谱, 并采用相似度评价结合 CA 和 PLS-DA 等化学模式识别技术, 分析探讨影响泽泻汤质量的主要色谱峰, 同时测定 3 个指认成分的含量, 反映泽泻汤化学成分的整体性、复杂性及其质量差异, 以期对泽泻汤的质量评价提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-2030C 高效液相色谱仪, 包括 LC-20AD 二元泵, CTO-20AC 柱温箱, SIL-20AC 自动进样器, UV 检测器, LabSolutions 工作站, 日本岛津公司; KQ5200DE 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; XS105DU 分析天平, 美国 Mettler Toledo 公司; TG16-WS 高速离心机, 湘仪 CENCE 公司; LGJ-10F 真空冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司; SHI-D (III) 循环水式真空泵, 河南省予华仪器有限公司; 30E2 煎药砂锅, 潮州市潮安区康雅顺电器有限公司; Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司。

1.2 试剂与试药

乙腈、甲醇, 色谱级, 美国 Sigma 公司; 实验用水为 Milli-Q 超纯水; 对照品 23-乙酰泽泻醇 B (批号 111846-201705, 质量分数≥99.7%)、白术内酯 III (批号 111978-201501, 质量分数≥99.9%) 均购自于中国食品药品检定研究院; 对照品 23-乙酰泽泻醇 C (批号 MUST-17040506, 质量分数≥99.84%), 购自于成都曼斯特生物有限公司; 泽泻、白术饮片均由长白山制药 (亳州) 产业园有限公司提供, 产地及批号具体见表 1。经天津中医药大学

表 1 泽泻和白术饮片产地及批号

Table 1 Origin and batch number of *Alismatis Rhizoma* and *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma*

编号	泽泻		白术	
	产地	批号	产地	批号
S1	江西	1807053	江西	181007
S2	四川	1806283	安徽	181102
S3	四川	1805233	安徽	180520
S4	四川	1811153	安徽	181101
S5	四川	1812043	安徽	181151
S6	四川	181001	安徽	180913
S7	四川	1813042	安徽	181108
S8	江西	201806016	江西	201711034
S9	福建	18042999	福建	180817
S10	江西	18052051	江西	1811151
S11	福建	201805021	江西	20180109
S12	福建	201808001	江西	20180605
S13	四川	180743	安徽	180719
S14	福建	1804233	江西	181028
S15	江西	181010	福建	181130

药用植物学张坚副教授鉴定，产地为四川的泽泻为泽泻科泽泻属植物泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. 的干燥块茎，产地为江西和福建的泽泻为泽泻科泽泻属植物东方泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎；白术为菊科苍术属植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎，均符合《中国药典》2015 年版标准。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 混合对照品溶液 取 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C、白术内酯 III 适量，精密称定，加 50%乙腈制成质量浓度分别为 199、201、219 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，备用。

2.1.2 泽泻汤供试品溶液 称取泽泻 78.0 g，白术 31.2 g，加水 400 mL，浸泡后采用传统砂锅先武火煮沸后文火煎煮至 200 mL，滤过，滤液冷冻干燥，即得泽泻汤样品。精密称取该样品 0.05 g，置于 10 mL 量瓶中，加 50%乙腈超声溶解并定容至刻度，离心，上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得泽泻汤供试品溶液。

2.1.3 阴性样品溶液 分别称取泽泻 78.0 g、白术 31.2 g，按“2.1.2”项下方法分别制备缺白术、缺泽泻的阴性样品溶液。

2.2 泽泻汤 HPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters WAT054275 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水溶液，梯度洗脱：0~15 min, 5%~26%乙腈；15~25 min, 26%乙腈；25~55 min, 26%~51%乙腈；55~65 min, 51%~52%乙腈；65~75 min, 52%乙腈；75~105 min, 52%~68%乙腈；105~120 min, 68%乙腈；检测波长 208 nm；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；体积流量 1 mL/min，进样量 10 μL ；洗脱时间为 120 min。理论塔板数按 23-乙酰泽泻醇 B 计算不低于 3 000。

2.2.2 精密度试验 取同一泽泻汤供试品溶液 (S8)，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。以保留时间居中且分离度较好的白术内酯 III 的保留时间和峰面积为参照，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD，结果 RSD 均<2%，表明该高效液相色谱仪精密度良好，符合指纹图谱要求。

2.2.3 稳定性试验 取泽泻汤样品 (S8) 0.05 g，按“2.1.2”项下方法制备泽泻汤供试品溶液。以“2.2.1”项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、16、24 h 进样，记录色谱图。以保留时间居中且分离度较好的白术内酯 III 的保留时间和峰面积为参照，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD，结果 RSD 均<2.5%，表明泽泻汤供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.4 重复性试验 取 6 份泽泻汤样品 (S8) 0.05 g，按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份泽泻汤供试品溶液。以“2.2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图。以保留时间居中且分离度较好的白术内酯 III 的保留时间和峰面积为参照，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均<2%，表明该方法重复性良好，符合指纹图谱要求。

2.2.5 指纹图谱建立及相似度评价 采用“2.1.2”项下方法制备 15 批泽泻汤的供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进行分析，记录色谱图。将 15 批泽泻汤的 AIA 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 (2012.130723 版本)”，以 S8 样品图谱为参照图谱，多点校正方法匹配色谱峰，采用平均数法生成对照指纹图谱，并得到 15 批泽泻汤的指纹图谱，结果其相似度均>0.94，并标定了 18 个共有峰，根据对照品指认出 3 个色谱峰，其中 11 号峰为白术内酯 III，15 号峰为 23-乙酰泽泻醇 C，16 号峰为 23-乙酰泽泻醇 B，见图 1 和表 2。

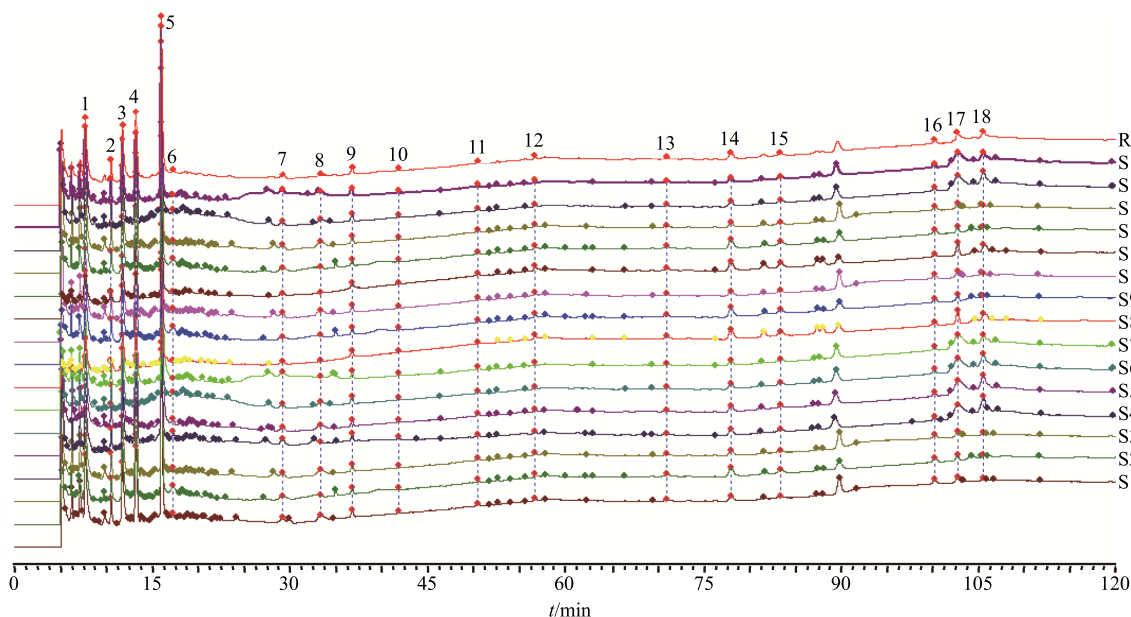


图 1 15 批泽泻汤的指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprint for 15 batches of ZXD and its reference fingerprint (R)

表 2 15 批泽泻汤指纹图谱相似度比较

Table 2 Comparison of similarity of 15 batches of ZXD

样品	相似度															R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
S1	1.000	0.982	0.963	0.974	0.974	0.980	0.975	0.964	0.932	0.969	0.976	0.973	0.967	0.945	0.964	0.988
S2	0.976	1.000	0.961	0.999	0.984	0.951	0.962	0.955	0.919	0.949	0.978	0.984	0.952	0.923	0.955	0.983
S3	0.963	0.993	1.000	0.960	0.992	0.968	0.990	0.989	0.897	0.942	0.961	0.990	0.994	0.93	0.989	0.987
S4	0.974	0.979	0.960	1.000	0.983	0.952	0.963	0.956	0.919	0.949	0.999	0.983	0.953	0.924	0.956	0.983
S5	0.974	0.996	0.992	0.983	1.000	0.972	0.988	0.985	0.913	0.949	0.984	0.994	0.983	0.932	0.985	0.993
S6	0.980	0.982	0.968	0.952	0.972	1.000	0.973	0.978	0.925	0.962	0.951	0.973	0.973	0.947	0.978	0.984
S7	0.975	0.992	0.990	0.963	0.988	0.973	1.000	0.982	0.909	0.948	0.962	0.987	0.994	0.933	0.982	0.989
S8	0.964	0.987	0.989	0.956	0.985	0.978	0.982	1.000	0.917	0.949	0.955	0.984	0.982	0.936	0.998	0.987
S9	0.932	0.920	0.897	0.919	0.913	0.925	0.909	0.917	1.000	0.932	0.919	0.912	0.901	0.917	0.917	0.942
S10	0.969	0.963	0.942	0.949	0.949	0.962	0.948	0.949	0.932	1.000	0.949	0.948	0.947	0.995	0.949	0.974
S11	0.982	0.978	0.993	0.979	0.996	0.982	0.992	0.987	0.920	0.963	1.000	0.995	0.989	0.949	0.987	0.997
S12	0.973	0.995	0.990	0.983	0.996	0.973	0.987	0.984	0.912	0.948	0.984	1.000	0.981	0.932	0.984	0.993
S13	0.967	0.989	0.994	0.953	0.983	0.973	0.994	0.982	0.901	0.947	0.952	0.981	1.000	0.935	0.982	0.985
S14	0.945	0.949	0.930	0.924	0.932	0.947	0.933	0.936	0.917	0.995	0.923	0.932	0.935	1.000	0.936	0.959
S15	0.964	0.987	0.989	0.956	0.985	0.978	0.982	0.995	0.917	0.949	0.955	0.984	0.982	0.936	1.000	0.987
R	0.988	0.983	0.987	0.983	0.993	0.984	0.989	0.987	0.942	0.974	0.997	0.993	0.985	0.959	0.987	1.000

2.2.6 CA 以 15 批泽泻汤样品指纹图谱中 18 个共有峰的相对峰面积为变量, 采用 SPSS 22.0 软件对 15 批泽泻汤样品进行 CA, 并绘制树状图, 见图 2。聚类谱系中, 当判别条件距离为 10 时, 15 批泽泻汤样品总共可以聚为 2 类: S8、S14、S9、S10、S1、S15、S11、S12 批次样品聚为第 1 类, S2、S7、S4、

S3、S13、S5、S6 批次样品聚为第 2 类。其中第 1 类泽泻汤样品中泽泻产地均为四川, 白术产地均为安徽; 第 2 类泽泻汤样品中泽泻和白术产地并不单一, 均为福建、江西, 但仍可聚为一类, 表明福建和江西产地的泽泻和白术质量差异不大。表明 CA 既能全面反映泽泻汤样品之间的相似性, 又能反映

其差异^[21]。

2.2.7 PLS-DA 以 15 批泽泻汤样品指纹图谱中 18 个共有峰的相对峰面积为变量, 构建 15×18 的原始数据矩阵, 采用 SIMCA 14.1 软件对 15 批泽泻汤样品进行 PLS-DA, 得分图、载荷图、变量重要性投影值(variable importance in project, VIP)图见图 3~5。从得分图可看出, 15 批泽泻汤样品被分为 2 类, 与 CA 结果一致, 其原因是 15 批泽泻汤样品所含化学成分的含量差异所致; 在载荷图中, 每个点代表 1 个色谱峰, 距原点 (0, 0) 较远的点, 代表该色谱峰对样品整体质量的贡献越大。从载荷图和 VIP 图可知, 8、13、15、12、14、17、7、11 号峰距原点较远, 且 VIP 值均 >1 , 表明其所代表的成分对泽泻汤样品的整体质量贡献较大。

2.3 泽泻汤中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱条件同“2.2.1”项。

2.3.2 专属性考察 按照“2.2.1”项下色谱条件测定混合对照品溶液、泽泻汤供试品溶液和 2 种阴性

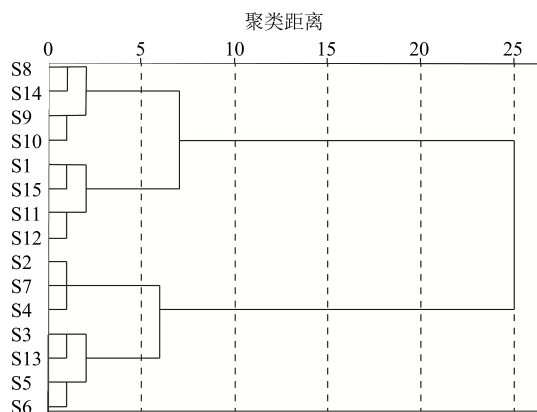


图 2 15 批泽泻汤样品的聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of 15 batches of ZXD

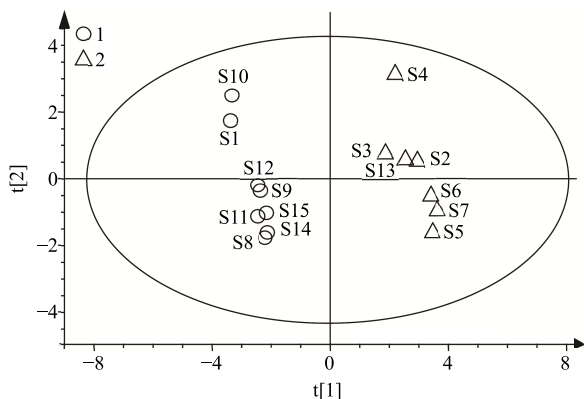


图 3 15 批泽泻汤样品的 PLS-DA 散点得分图

Fig. 3 PLS-DA score plot of ZXD in 15 batches of ZXD drugs

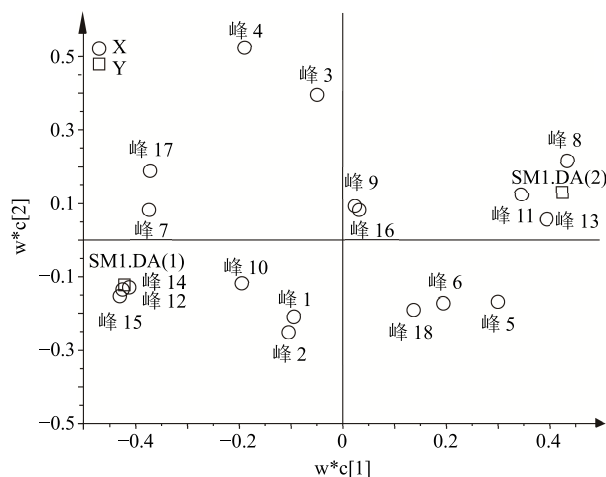


图 4 15 批泽泻汤样品的 PLS-DA 载荷图

Fig. 4 PLS-DA loading plot of ZXD in 15 batches of ZXD drugs

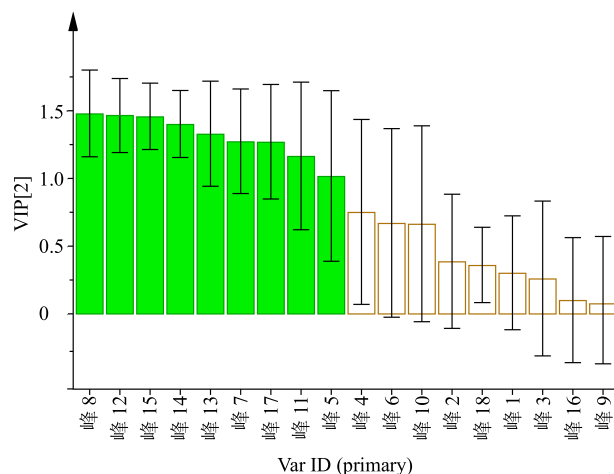


图 5 15 批泽泻汤样品中各活性成分的 VIP 图

Fig. 5 VIP values of different ingredients in 15 batches of ZXD

样品溶液, 结果表明样品中各成分分离度均较好, 且无阴性干扰, 见图 6。

2.3.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.1.1”项下的混合对照品溶液适量, 加 50%乙腈稀释成 6 个质量浓度, 按“2.2.1”色谱条件分析, 记录色谱图及峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 分别绘制标准曲线。23-乙酰泽泻醇 B 的回归方程 $Y=5\,609.6X-5\,098.9$, $r=0.999\,5$, 线性范围 $0.497\,5\sim199\,\mu\text{g/mL}$; 23-乙酰泽泻醇 C 的回归方程 $Y=10\,339X-23\,101$, $r=0.999\,4$, 线性范围 $0.502\,5\sim201\,\mu\text{g/mL}$; 白术内酯 III 的回归方程为 $Y=18\,091X-1\,661.8$, $r=0.999\,8$, 线性范围 $0.109\,5\sim219\,\mu\text{g/mL}$, 结果表明, 各成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

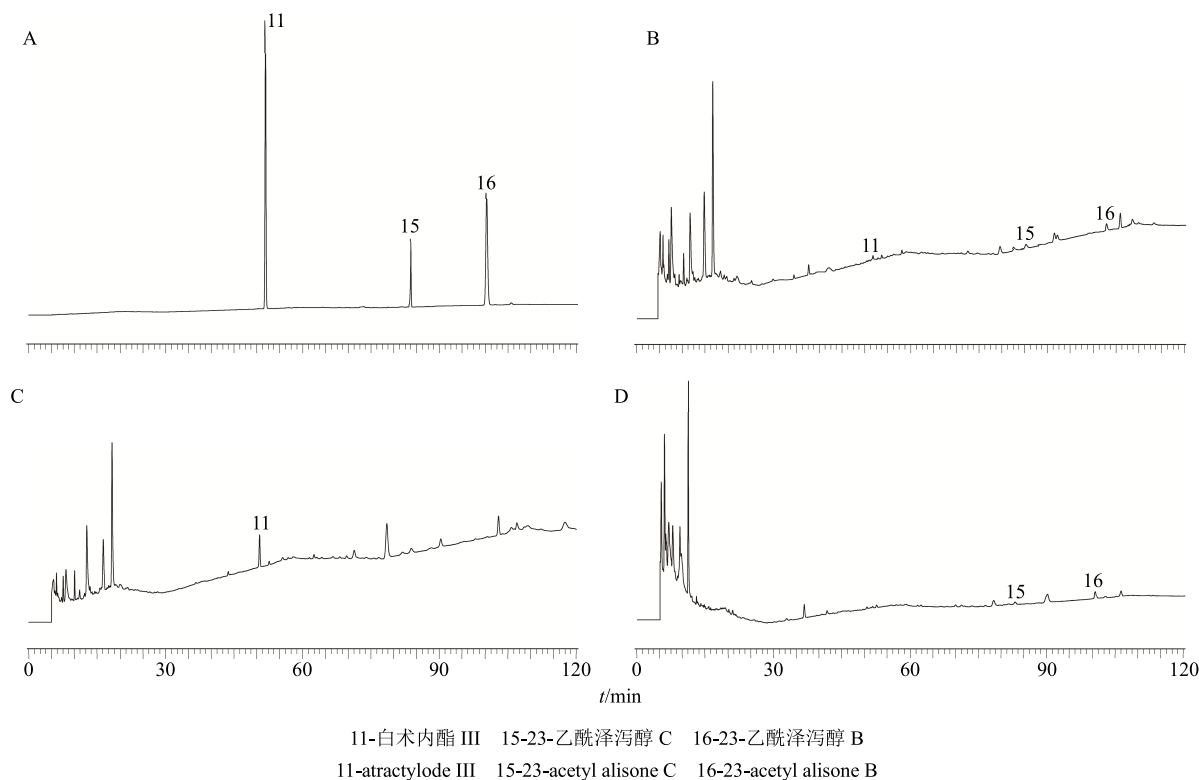


图 6 混合对照品 (A)、泽泻汤供试品 (B)、泽泻阴性 (C) 和白术阴性样品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC of mixed reference substances (A), ZXD (B), negative sample without *Alismatis Rhizoma* (C), and negative sample without *Atractylodis Macrocephalae Rhizoma* (D)

2.3.4 精密度试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，计算 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 峰面积的 RSD 值分别为 0.18%、0.21%、0.12%，表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取供试品溶液 (S8)，按“2.2.1”项下色谱条件，分别在 0、4、8、12、16、24 h 进样，计算 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 峰面积的 RSD 值分别为 0.14%、0.18%、0.22%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.6 重复性试验 取泽泻汤样品 (S8) 0.05 g，按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份泽泻汤供试品溶液。以“2.2.1”项下色谱条件进样，计算 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 峰面积的 RSD 值分别为 0.22%、0.57%、1.01%，表明方法重复性好。

2.3.7 加样回收率试验 按照“2.1.2”项方法制备泽泻汤供试品溶液，并添加比例为 1:1 的 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 对照品，以“2.2.1”项下色谱条件进样，计算泽泻汤供试品溶液中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术

内酯 III 的加样回收率分别为 99.6%、101.4%、98.7%，RSD 值分别为 2.58%、1.12%、0.43%，准确度良好，符合检测要求。

2.3.8 泽泻汤样品含量测定 取 15 批泽泻汤样品冻干粉，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定，计算 15 批泽泻汤供试品中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 的含量，结果见表 3。表明不同批次泽泻汤样品中各成分含量存在一定差异。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

由于不同化学成分极性不同，考察高效液相进样前不同极性复溶溶剂 (80%乙腈、50%乙腈、水) 对泽泻汤样品的溶解能力，结果发现 50%乙腈溶解泽泻汤样品，色谱峰数目较多，峰形较好，且各色谱峰分离度好。《中国药典》2015 年版中，泽泻含量测定的检测波长为 208 nm^[22]，无白术含量测定检测波长。文献报道白术检测波长为 222、240、242 nm^[23-24]，故考察不同波长 (208、220、242、254 nm) 下泽泻汤样品中各个色谱峰的分离情况，结果表明，泽泻汤在 208 nm 波长下出峰数目最多，各色谱峰

表 3 15 批泽泻汤样品中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 的含量测定结果

Table 3 Contents of 23-acetyl alisone B, 23-acetyl alisone C and atractylode III of 15 batches of ZXD

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	23-乙酰泽泻醇 B	23-乙酰泽泻醇 C	白术内酯 III
S1	0.321	0.075	0.134
S2	0.534	0.123	0.110
S3	0.512	0.109	0.107
S4	0.526	0.135	0.109
S5	0.569	0.133	0.113
S6	0.517	0.095	0.106
S7	0.539	0.139	0.108
S8	0.339	0.081	0.129
S9	0.482	0.113	0.142
S10	0.303	0.072	0.137
S11	0.462	0.114	0.134
S12	0.379	0.079	0.136
S13	0.521	0.135	0.104
S14	0.401	0.108	0.138
S15	0.412	0.094	0.124
平均值	0.454	0.107	0.122

分离度较好。此外，考察流动相（甲醇-水、乙腈-水），并优化出以乙腈-水为流动相。

3.2 指标成分的确定

泽泻汤由泽泻、白术组成。方中泽泻为君药，《中国药典》2015 年版泽泻以 23-乙酰泽泻醇 B 为指标性成分，具有利尿、降血糖、调血脂、降血压、调节心血管系统等药理作用^[25-27]，但其加热不稳定，在体内也容易发生生物转化^[28]。故《中国药典》2020 年版关于泽泻的国家药品标准修订草案已公示，增加指标性成分 23-乙酰泽泻醇 C 的含量测定，其具有调血脂、减缓动脉粥样硬化形成、促进葡萄糖摄取及体外抗结石作用等药理作用^[29-30]；方中白术为臣药，《中国药典》2015、2020 年版均无其指标性成分，但其内酯类成分中白术内酯 III，具有调节胃肠运动、利尿、抗炎、降血压等药理作用^[31]。因此，本研究以 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 为指标成分，即符合《中国药典》2020 年版泽泻指标性成分，又填补白术指标性成分空缺。

3.3 测定结果分析

本研究建立 15 批经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱，相似度大于 0.94，标定 18 个共有峰，指认

3 个共有峰，其中 15 号峰和 16 号峰分别为 23-乙酰泽泻醇 C、23-乙酰泽泻醇 B，均来源于君药泽泻；11 号峰为白术内酯 III，来源于臣药白术，较为全面地表征经典名方泽泻汤中各饮片的化学信息，可用于控制其整体质量。15 批泽泻汤中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 的质量分数平均值分别为 0.454、0.107、0.122 mg/g；质量分数波动范围分别为 0.321~0.569、0.075~0.139、0.106~0.142 mg/g，符合《古代经典名方中药复方制剂物质基准的申报资料要求（征求意见稿）》规定含量测定的波动范围不超过均值的 70%~130%要求。故本研究通过控制泽泻汤指纹图谱相似度在 0.9 以上，含量测定结果在其均值的 70%~130%范围内，对泽泻汤质量的波动差异性进行控制。

通过 15 批泽泻汤的 HPLC 指纹图谱，经 CA 和 PLS-DA，将 15 批泽泻汤分为 2 类，结合泽泻汤样品中 3 个指标成分含量测定，辨识 15 批泽泻汤质量差异。推测导致泽泻汤质量差异原因可能有以下 2 种：（1）本研究的泽泻和白术均来自 3 个产地，其与自然环境（采摘地点、气候、时间、温度等）及人为因素（采摘人员，储存时间、方式等）有关，不同批次之间指标成分存在一定差异，其中四川产地泽泻的 23-乙酰泽泻醇 B 的含量均高于福建和江西泽泻，此结果与文献报道一致^[32]；（2）泽泻主要指标性成分 23-乙酰泽泻醇 B 为热不稳定成分，长时间受热使其发生降解、转化等，故泽泻在饮片加工或煎煮过程中会引起 23-乙酰泽泻醇 B 含量波动，引起不同批次泽泻汤质量差异。

综上所述，本研究泽泻汤指纹图谱经相似度评价、CA 和 PLS-DA，确定对泽泻汤样品整体质量贡献较大的成分，结合泽泻汤中 23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 和白术内酯 III 含量测定，既兼顾“质量概貌”，又体现“质量属性”，较为全面地对泽泻汤进行定性及定量研究，从而实现对经典名方泽泻汤及其相关制剂的质量控制。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录（第一批）》的通知 [EB/OL]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>, 2018-04-13/2018-06-10.
- [2] 黄涛, 刘丽, 张笑敏, 等. 夏天无 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2474-2479.
- [3] 周霖, 梁淑红, 孙志, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结

- 合化学模式识别的复方血栓通胶囊质量控制研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(1): 34-38.
- [4] 徐 男, 孙 蓉, 李元媛, 等. 基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1682-1689.
- [5] 刘雯雪, 王昭懿, 赵崇军, 等. 黄丝郁金挥发油含量测定及指纹图谱的建立 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5923-5928.
- [6] 位恒超, 刘雅敏, 韩德恩, 等. 基于多成分同时定量和统计学分析的大黄利胆片质量评价研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4158-4163.
- [7] 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.
- [8] 刘世恩. 张仲景全书 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2007.
- [9] 李莎莎, 钟利群, 夏梦幻. 泽泻汤的相关研究概况 [J]. 现代中医临床, 2017, 24(4): 56-60.
- [10] 李 甜, 廖茂梁, 郑雅楠, 等. 泽泻汤对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的抑制作用 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 772-775.
- [11] 李文瑞. 金匱要略汤证论治 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000.
- [12] 朱广伟, 张贵君, 汪 萌. 不同配伍比例的泽泻汤降血脂作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(1): 189-191.
- [13] 高 怡, 白如玉. 泽泻加味方治疗高血压病临床疗效研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 320-321.
- [14] 田永远, 刘宏建, 张 博, 等. 通气散合泽泻汤加减治疗分泌性中耳炎临床研究 [J]. 中医学报, 2014, 29(11): 1676-1677.
- [15] Brintjes T D, Companjen J, van der Zaag-Loonen H J. A randomised sham-controlled rial to assess the long-term effect of the Epley manoeuvre for treatment of posterior canal benign paroxysmal positional vertigo [J]. *Clin Otolaryngol*, 2014, 39(1): 39-44.
- [16] 李行诺, 马 旭, 楚 楚, 等. 泽泻指纹图谱研究 [J]. 浙江工业大学学报, 2013, 41(2): 143-146.
- [17] 杨有林, 齐武强, 艾 亮. 基于化学计量学的 GC-FID 指纹图谱用于不同炮制品白术的研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(5): 65-68.
- [18] 姚兆敏, 汪电雷, 彭华胜, 等. 白术 UPLC 指纹图谱模式识别及含量测定研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 622-629.
- [19] 伍蕊嗣, 姚运秀, 刘 钱, 等. 不同干燥方式泽泻汤指纹图谱的建立及 2 种成分测定 [J]. 中成药, 2019, 41(8): 1905-1910.
- [20] 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.
- [21] 孙伟杰, 吕 程, 杨重晖, 等. 基于指纹图谱和多指标定量测定的鹿茸饮片质量控制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(22): 5448-5454.
- [22] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [23] 张乐林, 石典花, 孙 蓉. 白术生品与麸炒品 HPLC 指纹图谱及主成分差异分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(5): 1025-1027.
- [24] 刘 青, 申 洁, 肖苏萍, 等. 基于多成分含量测定及色谱指纹图谱技术提升白术药材质量标准 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(8): 1062-1067.
- [25] 张伟云, 刘华欣, 王 青, 等. 23-乙酰泽泻醇 B 对 2 型糖尿病小鼠血糖的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(5): 639-643.
- [26] Jang M K, Han Y R, Nam J S, *et al*. Protective effects of *Alisma orientale* extract against hepatic steatosis via inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26151-26165.
- [27] Li S, Jin S, Song C, *et al*. The metabolic change of serum lysophosphatidylcholines involved in the lipid lowering effect of triterpenes from *Alismatis Rhizoma* on high-fat diet induced hyperlipidemia mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 177: 10-18.
- [28] 丘建芳, 林 婧, 许 文, 等. HPLC-DAD-ELSD 测定泽泻药材中 4 种三萜类成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 42-46.
- [29] 钱增堃, 崔 凡, 凌云熹, 等. 泽泻多糖对糖尿病大鼠肝脏糖脂代谢的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 117-125.
- [30] 李小艳, 李雪君, 刘灿坤, 等. 泽泻三萜单体对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取活性的影响 [J]. 康复学报, 2014, 24(5): 31-33.
- [31] 王 涵, 杨 娜, 谭 静, 等. 白术化学成分、药理作用及临床应用的研究进展 [J]. 甘肃医药, 2018, 37(1): 23-26.
- [32] 金青浩, 侯晋军, 张建青, 等. 中药泽泻药效物质基础研究进展与现存质量问题思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(5): 821-834.