

经典名方猪苓汤基准样品质量评价方法研究

王延涛¹, 孔令梅^{1,2}, 程杰¹, 张淹^{2,3}, 王春艳¹, 王中超^{1,3}, 张燕^{1,2}, 马立平^{1,3}, 齐晓丹^{1*}, 刘艳^{4*}

1. 东阿阿胶股份有限公司 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252200
2. 山东省胶类中药技术创新中心, 山东 聊城 252200
3. 山东省胶类中药研究与开发重点实验室, 山东 聊城 252200
4. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

摘要: **目的** 建立经典名方猪苓汤基准样品的定性和定量检测方法, 为其质量标准的建立及复方制剂的开发提供数据支撑和研究基础。 **方法** 建立猪苓汤基准样品 HPLC 特征图谱, 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)计算相似度; 确定基准样品含量测定指标成分并通过 HPLC 建立含量测定方法, 进行相关方法学考察; 研究建立猪苓汤中处方药味薄层鉴别方法; 计算 15 批基准样品的干膏率及指标成分转移率、水分。 **结果** 特征图谱共标定 8 个共有峰, 分别归属泽泻和阿胶, 其中指认 3 个共有峰, 分别为泽泻醇 A (峰 1)、泽泻醇 B (峰 2)、23-乙酰泽泻醇 B (峰 3), 15 批猪苓汤基准样品质量评价结果表明相似度均大于 0.95, 可表征猪苓汤基准样品的质量特性; 含量测定指标成分确定为阿胶中的 L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸, 并建立含量测定方法, 方法学考察均符合要求; 同时建立猪苓、茯苓、泽泻的薄层鉴别方法。计算 15 批猪苓汤基准样品的平均干膏率为 21.53%, 平均水分为 3.64%, 指标成分 L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸平均转移率分别为 90.89%、90.25%、90.29%、91.28%, 所有数据均未出现离散。 **结论** 建立的经典名方猪苓汤基准样品质量标准, 能够较全面的反映基准样品关键质量属性, 综合体现了处方各药味的信息, 为后期经典名方猪苓汤复方制剂的研究提供参考。

关键词: 猪苓汤; 经典名方; 基准样品; HPLC; 特征图谱; 质量评价; 猪苓; 茯苓; 泽泻; 滑石; 阿胶; 泽泻醇 A; 泽泻醇 B; 23-乙酰泽泻醇 B; L-羟脯氨酸; 甘氨酸; 丙氨酸; 脯氨酸; 关键质量属性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)12-3643-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.12.009

Study on quality evaluation method of classical prescription Zhuling Decoction primary standard substances

WANG Yan-tao¹, KONG Ling-mei^{1,2}, Cheng Jie¹, ZHANG Yan^{2,3}, WANG Chun-yan¹, WANG Zhong-chao^{1,3}, ZHANG Yan^{1,2}, MA Li-ping^{1,3}, QI Xiao-dan¹, LIU Yan⁴

1. National Engineering Technology Research Center for Gelatin-based Traditional Chinese Medicine, Dong'e Ejiao Co., Ltd., Liaocheng 252200, China
2. Shandong Technology Innovation Center of Gelatin-based Traditional Chinese Medicine, Liaocheng 252200, China
3. Shandong Key Laboratory of Gelatine TCM Research and Development, Liaocheng 252200, China
4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Objective To establish qualitative and quantitative detection methods for reference samples of the classic famous Zhuling Decoction to provide a data basis for the establishment of its quality standards and the development and utilization of compound preparations. **Methods** The HPLC characteristic map of Zhuling Decoction benchmark samples was established. The similarity was calculated using the “Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System” (2012 edition) published by the

收稿日期: 2021-12-11

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1706306); 山东省重点研发计划项目(2019JZZY020907); 聊城市重点研发计划(重大科技创新工程项目(2021ZD07)

作者简介: 王延涛, 副主任中药师。E-mail: wangyt20160705@163.com

*通信作者: 齐晓丹, 研发工程师, 主要从事中药新药开发研究。Tel: (0635)3265997 E-mail: qixd1991@163.com

刘艳, 副研究员, 主要从事中药质量标准及中药新药开发研究。Tel: (010)64093381 E-mail: yliu1980@icmm.ac.cn

State Pharmacopoeia Commission. The index component content of the benchmark sample was determined and a content determination method by HPLC was established, and the related methodological investigations were conducted. The thin-layer chromatography method for identifying the taste of prescription medicines in Zhuling Decoction was established. The paste yield, index component transfer rate and moisture of 15 batches of benchmark samples were calculated. **Results** A total of eight common peaks were demarcated in the characteristic map, which belonged to Zexie (*Alismatis Rhizoma*) and Ejiao, respectively. Among them, three common peaks were identified, namely alisitol A (peak 1), alisitol B (peak 2), and 23-acetyl alisitol B (peak 3). The quality evaluation results of 15 batches of Zhuling Decoction benchmark samples showed that the similarity was greater than 0.95, which could characterize the quality characteristics of Zhuling Decoction benchmark samples. The content determination index components were determined as *L*-hydroxyproline, glycine, alanine and proline in donkey-hide gelatin. The content determination method was established, and the methodological investigations all met the requirements. At the same time, a thin-layer identification method for Zhuling (*Polyporus*), Fuling (*Poria*) and *Alismatis Rhizoma* was established. The average yield of 15 batches of Zhuling Decoction benchmark samples was calculated to be 21.53%, and the average moisture content was 3.64%. The average transfer rates of the index components *L*-hydroxyproline, glycine, alanine and proline were 90.89%, 90.25%, 90.29% and 91.28%, respectively. All data were not discrete. **Conclusion** The quality standard for the benchmark samples of the classic Zhuling Decoction established in this study can more comprehensively reflect the key quality attributes of the benchmark samples and comprehensively reflect the information of the prescriptions. It can provide a reference for the later study of the classic and famous Zhuling Decoction compound preparations.

Key words: Zhuling Decoction; classical prescription; benchmark sample; HPLC; characteristic map; quality evaluation; *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries; *Poria cocos* (Schw.) Wolf; *Alisma orientale* (Sam.) Juzep.; *Talcum*; Ejiao; alishol A; alishol B; 23-acetyl alisitol B; *L*-hydroxyproline; glycine; alanine; proline; critical quality attribute

猪苓汤出自东汉张仲景所著《伤寒论》，是国家中医药管理局发布的《古代经典方剂目录》的第9方^[1]，由猪苓、茯苓、泽泻、滑石、阿胶5味中药组成，以利水为主，兼以养阴清热，主治水热互结而兼阴虚之证^[2]。方中以猪苓为君药，取其归肾、膀胱经，专以淡渗利水；臣药泽泻、茯苓性味甘淡，益猪苓利水渗湿之力，泽泻性寒兼可泄热，茯苓尚可健脾以助运湿；佐入滑石之甘寒，利水、清热两彰其功；阿胶滋阴润燥，既益已伤之阴，又防诸药渗利重伤阴血。五药合方，利水渗湿为主，清热养阴为辅，体现了利水而不伤阴、滋阴而不碍湿的配伍特点。在现代药理学研究及临床应用，发现猪苓汤主要应用于改善肾功能、抗炎、利尿等^[3-7]。除传统的功能主治外，猪苓汤还可以加减其他药味或方剂治疗肾炎、红斑狼疮性肾炎、心律失常、肝硬化等多种疾病^[8-16]。可见该方应用价值广泛，具有重要开发意义。

对于经典名方的开发目前国家是推广和鼓励的，近年逐渐发布了一系列完善详尽的法规体系^[17-19]。“经典名方基准样品”是经典名方开发的关键一环，是经典名方复方制剂生产的化学基准和生物效应基准^[20]，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，因此，基准样品的质量标准尤其重要。但是目前关于猪苓汤的报道主要集中于临床应用研究及药理研究方面，质量标准相关报道较少。

为了在经典名方开发中有力支撑猪苓汤的工艺确定和标准制定，本研究特开展猪苓汤基准样品的质量研究，为其复方制剂及其他经典名方的开发应用提供参考。

1 仪器与材料

岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪，LC-20AT 串联双柱泵，DGU-20A 在线脱气系统，SIL-20A 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，SPD-M20A 二极管阵列检测器，日本岛津公司；KQ-250DB 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；BGZ-70 鼓风式干燥箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；XP105 型十万分之一电子天平，瑞士梅特勒-托利多公司；Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；ZF-1 型三用紫外分析仪，骥辉分析仪器(北京)有限公司；DK-98-11A 恒温水浴锅，天津市泰斯特仪器有限公司；硅胶 G 薄层板，青岛海洋化工厂分厂，批号 20171029。

对照品 *L*-羟脯氨酸(批号 111578-201602)、甘氨酸(批号 140689-201605)、丙氨酸(批号 140680-201604)、脯氨酸(批号 140677-201507)、23-乙酰泽泻醇 B(批号 111846-201705)，质量分数依次为 99.9%、100%、100%、99.9%、99.7%，购自中国食品药品检定研究院；对照品泽泻醇 A(批号 BCY-000924)、泽泻醇 B(批号 BCTG-0915)，购自江西佰草源生物科技有限公司，质量分数均大于 95%；

茯苓对照药材(批号 121117-201509)、泽泻对照药材(批号 121081-201406)购于中国食品药品检定研究院;猪苓(批号 180504004)购于北京仟草中药饮片有限公司。异硫氰酸苯酯(PITC)购自 MACKLN 公司;乙腈、磷酸,美国 Fisher Chemical 公司,色谱纯;水为娃哈哈纯净水,其他试剂为分析纯。

本研究中所用饮片经中国中医科学院中药研究所何希荣研究员鉴定,猪苓为多孔菌科树花属真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 的菌核;茯苓

为多孔菌科卧孔属真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核;泽泻为泽泻科泽泻属植物东方泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎;阿胶为马科马属动物驴 *Equus asinus* L. 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶;滑石为硅酸盐类矿物滑石族滑石,主含含水硅酸镁 $[Mg_3(Si_4O_{10})(OH)_2]$ 。

15 批次猪苓汤基准样品所用饮片批号及产地信息见表 1,所有饮片均有相关质量标准检测报告,检查结果均符合《中国药典》2020 年版要求。

表 1 15 批猪苓汤饮片信息

Table 1 Information of 15 batches of Zhuling Decoction

序号	猪苓		茯苓		泽泻		滑石		阿胶	
	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	生产厂家
1	20181001	陕西省汉中市佛坪县	20181001	安徽六安金寨县	20181001	四川省彭山县公义镇	180100101	山东省平度市	171003	国胶堂阿胶
2	20181002	陕西省汉中市佛坪县	20181002	安徽安庆岳西县	20181002	四川省彭山县公义镇	180100102	山东省平度市	171010	国胶堂阿胶
3	20181003	陕西省汉中市佛坪县	20181003	云南丽江华坪县	20181003	四川省彭山县公义镇	180100103	山东省平度市	1703018	福牌阿胶
4	20181004	陕西省汉中市佛坪县	20181004	安徽六安金寨县	20181004	四川省彭山县公义镇	180100201	河南省南阳市	1704021	福牌阿胶
5	20181005	河南省南阳市溱平县	20181006	安徽六安金寨县	20181005	四川省彭山县谢家镇	180100202	河南省南阳市	1903004	东阿阿胶
6	20181006	河南省南阳市西峡县	20181007	安徽六安金寨县	20181006	四川省彭山县谢家镇	180100203	河南省南阳市	1903005	东阿阿胶
7	20181007	陕西省汉中市佛坪县	20181008	安徽六安金寨县	20181007	四川省彭山县谢家镇	180100204	河南省南阳市	1903006	东阿阿胶
8	20181009	陕西省汉中市佛坪县	20181009	安徽安庆岳西县	20181008	四川省乐山市夹江县	180100205	河南省南阳市	1903007	东阿阿胶
9	20181010	陕西省汉中市佛坪县	20181010	安徽安庆岳西县	20181009	四川省乐山市夹江县	180100206	河南省南阳市	1903008	东阿阿胶
10	20181011	河南省南阳市溱平县	20181011	安徽安庆岳西县	20181010	四川省乐山市夹江县	180100207	河南省南阳市	1903009	东阿阿胶
11	20181012	河南省南阳市溱平县	20181012	安徽安庆岳西县	20181011	四川省乐山市夹江县	180100208	河南省南阳市	1903011	东阿阿胶
12	20181013	河南省南阳市西峡县	20181013	安徽安庆岳西县	20181012	四川省彭山县公义镇	180100301	广西省桂林市	15100006	太极阿胶
13	20181014	河南省南阳市西峡县	20181014	安徽安庆岳西县	20181013	四川省彭山县谢家镇	180100302	广西省桂林市	16021016	太极阿胶
14	20181015	陕西省汉中市佛坪县	20181015	安徽安庆岳西县	20181014	四川省彭山县公义镇	180100303	广西省桂林市	201604180	同仁堂阿胶
15	20181016	陕西省汉中市佛坪县	20181016	云南丽江华坪县	20181015	四川省乐山市夹江县	180100304	广西省桂林市	201604184	同仁堂阿胶

2 方法与结果

2.1 猪苓汤煎煮方法及样品制备

猪苓汤基准样品对应实物制备过程中,采用 Excel 软件中的 RAND 程序,对每个药味的 15 批饮片进行随机排列,形成不同批次饮片的组合(S1~S15)。

采用陶瓷煎药壶加盖煎煮,武火(功率 2200 W)煮沸,文火(功率 500 W)保持微沸。取猪苓、茯苓、泽泻、滑石各 13.80 g,置 2 L 煎药壶中,加水 800 mL,加盖煮沸(加热约 5 min),保持微沸 45 min,滤过,得滤液;趁热加入阿胶烊化,得猪苓汤汤剂;60 °C 减压浓缩 30 min,浓缩液冷冻干燥 24 h,得猪苓汤基准样品。

按照同样方法制备各单味药样品及缺阿胶、泽

泻、茯苓、猪苓的阴性样品。

2.2 特征图谱方法建立

2.2.1 供试品溶液的制备 按照“2.1”项下方法制备猪苓汤基准样品、单味药样品和各阴性样品。精密称定各样品冻干粉 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加丙酮 50 mL,密塞,超声处理(功率 800 W、频率 40 kHz) 30 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加 80%乙腈溶解,定容至 5 mL,滤过,即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B,加乙腈溶解,制成质量浓度为泽泻醇 A 40 μg/mL、泽泻醇 B 25 μg/mL、23-乙酰泽泻醇 B 23 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱

(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 55%~70%乙腈; 15~30 min, 70%~85%乙腈; 30~35 min, 85%~95%乙腈; 35~45 min, 95%乙腈; 检测波长 208 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。

2.2.4 精密度考察 取同一份猪苓汤基准样品供试品溶液(批号 20181112), 按照“2.2.3”项下方法重复进样 6 次, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果如表 2 所示, RSD≤5.0%, 表明仪器精密度良好。

表 2 特征图谱方法学考察 (n = 6)

Table 2 Methodological investigation of characteristic atlas (n = 6)

色谱峰	精密度 RSD/%		重复性 RSD/%		稳定性 RSD/%	
	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积	相对保留时间	相对峰面积
1	0.040	0.12	0.020	0.69	0.032	0.22
2	0.000	0.00	0.000	0.00	0.000	0.00
3	0.010	0.18	0.030	0.98	0.020	0.11
4	0.050	0.82	0.040	1.80	0.045	1.10
5	0.020	0.10	0.040	0.70	0.044	0.09
6	0.070	0.62	0.050	3.50	0.099	0.99
7	0.020	0.06	0.050	0.89	0.061	0.12
8	0.030	0.37	0.040	1.70	0.098	1.30

2.2.5 重复性考察 平行制备 6 份猪苓汤基准样品的供试品溶液(批号 20181112), 按照“2.2.3”项下方法进样测定, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果如表 2 所示, RSD≤5.0%, 该方法重复性合格。

2.2.6 稳定性考察 取同一份猪苓汤基准样品的供试品溶液(批号 20181112), 分别于制备后 0、2、4、8、10、15、20、24 h, 按“2.2.3”项下方法进样测定, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果如表 2 所示, RSD≤5.0%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 符合要求。

2.2.7 特征图谱的建立与相似度分析 取 15 批猪苓汤基准样品的供试品溶液, 按“2.2.3”项下方法测定, 记录 50 min 色谱图。用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)进行评价, 对 15 批基准样品进行色谱图叠加得图 1-A, 并生成对照特征图谱, 见图 1-B。将特征图谱进行特征峰归属, 对应图谱见图 2、3, 全方共确定 8 个共有峰, 经对照品、猪苓汤样品、单味药样品、各单味药阴性样品相关

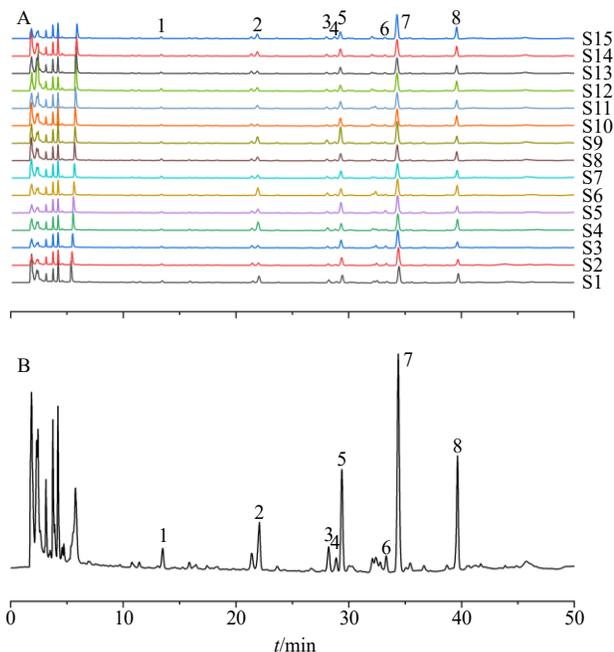


图 1 15 批猪苓汤基准样品的 HPLC 指纹图谱 (A) 和特征图谱 (B)

Fig. 1 HPLC fingerprint of 15 batches of material benchmarks of Zhuling Decoction (A) and its characteristic chromatogram (B)

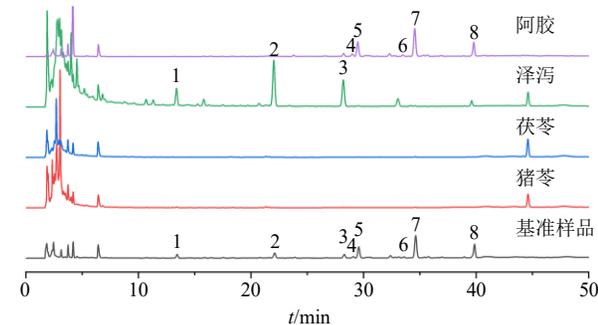


图 2 猪苓汤基准样品与单味药对照图谱

Fig. 2 Reference spectrum of substance benchmark of Zhuling Decoction and sing-flavor drugs

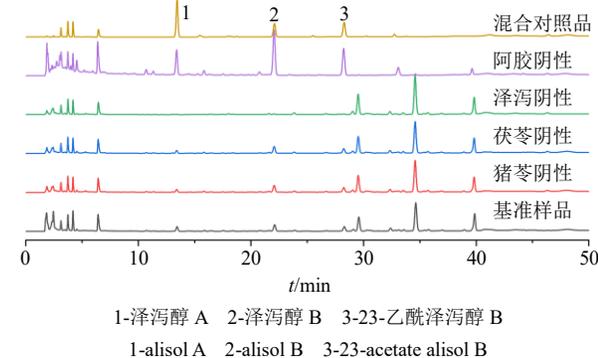


图 3 猪苓汤基准样品与各单味药阴性样品对照图谱

Fig. 3 Reference spectrum of substance benchmark of Zhuling Decoction and negative samples of each single-flavor drugs

图谱色谱峰比对, 峰1~3号峰来自于泽泻, 分别为泽泻醇A、泽泻醇B、23-乙酰泽泻醇B; 4~8号峰来自于阿胶, 通过与相关文献资料对比, 均为阿胶中的脂溶性成分^[21]。

以2号峰为参照峰, 计算其他峰的相对保留时间和相对峰面积; 计算相似度, 计算参数: 以S1为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度0.1, 15批猪苓汤基准样品对应实物(S1~S15)特征图谱与其对照图谱的相似度分别为0.989、0.985、0.985、0.971、0.986、0.970、0.997、0.998、0.968、0.988、0.995、0.990、0.995、0.995、0.990, 均大于0.95, 表明猪苓汤基准样品的制备工艺稳定, 不同批次间的差异较小。

2.3 基准样品含量测定方法建立

本研究以L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸为指标成分, 建立了猪苓汤基准样品的含量测定方法。

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称定L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸适量, 加0.1 mol/L盐酸溶液制成质量浓度为L-羟脯氨酸80 μg/mL、甘氨酸160 μg/mL、丙氨酸70 μg/mL、脯氨酸120 μg/mL的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取猪苓汤基准样品0.2 g, 置25 mL量瓶中, 加0.1 mol/L盐酸溶液20 mL, 超声处理(功率500 W、频率40 kHz)30 min, 放冷后加0.1 mol/L盐酸溶液至刻度, 摇匀。精密量取2 mL, 置5 mL安瓿中, 加盐酸2 mL, 150 °C水解1 h, 放冷, 转移至蒸发皿中, 蒸干, 残渣加0.1 mol/L盐酸溶液溶解, 转移至25 mL量瓶中, 加0.1 mol/L盐酸溶液至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。

2.3.3 衍生化 分别精密吸取上述混合对照品溶液和供试品溶液各1 mL, 置20 mL具塞试管中, 精密加入0.1 mol/L PITC的乙腈溶液0.5 mL, 1 mol/L三乙胺乙腈溶液0.5 mL, 摇匀, 室温放置1 h, 精密加入50%乙腈3 mL, 摇匀。精密加入正己烷3 mL, 振荡, 静置10 min, 取下层溶液, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 色谱条件 色谱柱为Phenomenex Gemini C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1 mol/L醋酸钠水溶液(用醋酸调节pH值至6.5)(7:93)为流动相A, 乙腈-水(4:1)为流动相B, 梯度洗脱: 0~11.0 min, 0~7%B; 11.0~13.9 min, 7%~12%

B; 13.9~14.0 min, 12%~15%B; 14.0~29.0 min, 15%~34%B; 29.0~30.0 min, 34%~100%B; 体积流量0.8 mL/min; 检测波长254 nm; 柱温为43 °C; 理论塔板数按L-羟脯氨酸峰计算应不低于4000, 所得HPLC色谱图如图4所示。

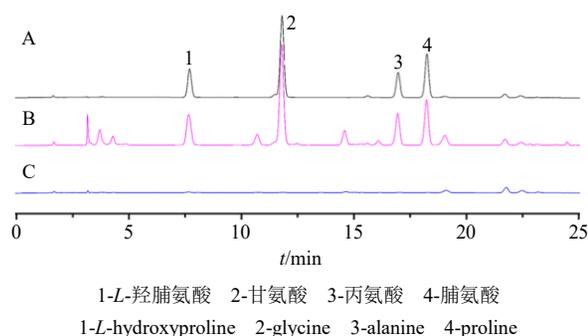


图4 混合对照品(A)、猪苓汤样品(B)和缺阿胶阴性样品(C)的HPLC图

Fig. 4 HPLC of reference substances (A), Zhuling Decoction sample (B) and negative sample without Ejiao (C)

2.3.5 线性关系考察 精密称取L-羟脯氨酸10.52 mg、甘氨酸18.57 mg、丙氨酸13.84 mg、脯氨酸9.14 mg, 分别置于10 mL量瓶中, 加0.1 mol/L盐酸溶液至刻度, 摇匀, 精密量取液L-羟脯氨酸1.6 mL、甘氨酸1.8 mL、丙氨酸1.0 mL、脯氨酸2.6 mL置于同一10 mL量瓶中, 加0.1 mol/L盐酸溶液至刻度, 摇匀, 即得L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸质量浓度分别为168.32、334.26、138.40、237.64 μg/mL的混合对照品溶液。

精密吸取混合对照品溶液, 分别稀释2、4、8、16、32倍, 取混合对照品溶液及稀释后混合对照品溶液各1 mL, 按“2.3.3”项方法衍生化后按“2.3.4”项下色谱条件测定, 测得峰面积。分别以L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得线性回归方程分别为L-羟脯氨酸 $Y=1\ 491\ 243.32 X+15\ 954.32$, $r=0.999\ 9$, 线性范围26.30~841.60 ng; 甘氨酸 $Y=2\ 287\ 191.79 X-28\ 656.61$, $r=0.999\ 9$, 线性范围52.23~1 671.30 ng; 丙氨酸 $Y=1\ 772\ 915.93 X-11\ 323.89$, $r=0.999\ 9$, 线性范围21.62~692.00 ng; 脯氨酸 $Y=1\ 669\ 948.55 X+10\ 809.09$, $r=0.999\ 9$, 线性范围37.13~1 188.20 ng。结果表明, 4种氨基酸在各自线性范围内线性关系良好。

2.3.6 精密度考察 精密量取“2.3.5”项中未稀释的混合对照品溶液, 按“2.3.4”项下色谱条件连续进样6次, 计算4种氨基酸峰面积的RSD, 结果L-

羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸峰面积的RSD分别为0.15%、0.12%、0.10%、0.15%，表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性考察 精密量取同一猪苓汤基准样品供试品溶液（批号20181112），分别于制备后0、2、6、10、15、20、24h按“2.3.4”项下色谱条件进样测定，计算供试品溶液中L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的峰面积的RSD，结果L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸峰面积的RSD分别为0.18%、0.13%、1.03%、0.13%，表明供试品溶液24h内稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 精密称取猪苓汤基准样品（批号20181112），平行制备6份猪苓汤基准样品供试品溶液，按“2.3.4”项下色谱条件进样，计算4种氨基酸质量分数的RSD，结果L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸质量分数的RSD分别为1.22%、1.06%、0.99%、1.39%，表明该方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 精密称取已知L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸含量的猪苓汤基准样品（批号20181112）0.1g，共6份，分别置25mL量瓶中，按照比例加入对照品溶液（对照品溶液质量浓度：L-羟脯氨酸2.7724mg/mL、甘氨酸4.9888mg/mL、丙氨酸1.9668mg/mL、脯氨酸2.8960

mg/mL）各3.0mL，超声10min，放冷，加0.1mol/L盐酸至刻度，摇匀。精密量取2mL，按照“2.3.2”“2.3.3”项方法制备供试品溶液，按“2.3.4”项下色谱条件测定，计算各氨基酸的回收率。结果显示，L-羟脯氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸的平均加样回收率分别为97.7%、97.3%、98.7%、98.0%，RSD分别为2.58%、1.55%、1.42%、1.80%；4种氨基酸加样回收率均符合95%~102%的要求，该方法准确度良好。

2.3.10 有效成分转移率 按照公式计算有效成分转移率，结果如表3所示，L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸平均转移率分别为90.89%、90.25%、90.29%、91.28%，均未出现离散数据（均值的70%~130%）。根据15批基准样品检测结果，确定猪苓汤中L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸的转移率分别为63.62%~118.20%、63.18%~117.30%、63.20%~117.40%、63.90%~118.70%。

$$\text{转移率} = \frac{wm}{WM}$$

w为基准样品中有效成分的质量分数，m为基准样品样品量，W为饮片中有有效成分的质量分数，M为饮片投料量

2.3.11 水分 取15批猪苓汤基准样品的供试品，按照2020年版《中国药典》四部，通则0832第二法测定水分，结果如表3所示，15批基准样品的

表3 猪苓汤饮片基准样品的转移率及干膏率

Table 3 Transfer rate and paste rate of benchmark samples of Zhuling Decoction

编号	阿胶饮片中的质量/g				基准样品中的质量/g				转移率/%				干膏率/水分/%	
	L-羟脯氨酸	甘氨酸	丙氨酸	脯氨酸	L-羟脯氨酸	甘氨酸	丙氨酸	脯氨酸	L-羟脯氨酸	甘氨酸	丙氨酸	脯氨酸	%	%
S1	1.26	2.57	1.07	1.48	1.22	2.39	0.995	1.41	96.74	92.92	93.08	95.14	21.49	4.84
S2	1.31	2.54	1.03	1.48	1.20	2.34	0.957	1.38	91.73	91.92	92.84	93.07	22.30	3.31
S3	1.34	2.49	1.02	1.45	1.22	2.38	0.964	1.36	90.98	95.37	94.83	93.57	22.47	3.64
S4	1.28	2.53	1.03	1.47	1.03	2.19	0.901	1.21	80.81	86.35	87.32	81.96	21.18	4.74
S5	1.29	2.49	1.01	1.41	1.19	2.32	0.945	1.34	92.61	93.05	93.83	95.10	21.59	3.60
S6	1.20	2.33	0.95	1.38	1.13	2.19	0.893	1.30	94.75	94.14	93.69	94.49	22.03	4.25
S7	1.33	2.84	1.16	1.66	1.27	2.46	1.017	1.46	95.24	86.89	87.34	87.86	21.59	4.40
S8	1.29	2.56	1.04	1.48	1.16	2.27	0.943	1.34	89.38	88.68	90.39	90.57	20.72	2.67
S9	1.28	2.54	1.04	1.46	1.21	2.39	0.992	1.42	94.51	94.07	95.44	96.73	21.63	3.00
S10	1.37	2.70	1.11	1.57	1.28	2.48	1.020	1.48	93.16	91.69	92.49	93.96	22.40	3.11
S11	1.26	2.51	1.03	1.46	1.17	2.30	0.950	1.37	93.03	91.74	92.23	93.62	20.77	2.64
S12	1.29	2.57	1.06	1.49	1.05	2.14	0.867	1.22	81.36	83.15	82.18	82.05	20.85	3.38
S13	1.35	2.68	1.09	1.53	1.17	2.32	0.932	1.35	86.95	86.53	85.47	88.42	21.40	2.88
S14	1.36	2.73	1.13	1.57	1.22	2.36	0.952	1.41	90.03	86.47	84.04	89.51	21.15	3.61
S15	1.34	2.62	1.07	1.52	1.23	2.38	0.956	1.42	92.00	90.77	89.15	93.19	21.32	3.55
均值	1.30	2.58	1.06	1.49	1.18	2.33	0.952	1.36	90.89	90.25	90.29	91.28	21.53	3.64

水分分为 2.64%~4.84%。

2.3.12 干膏率 按照公式(2)计算干膏率,结果如表3所示,15批基准样品平均干膏率为21.53%,均未出现离散数据(均值90%~110%)。根据15批基准样品检测结果,确定猪苓汤干膏率为19.37%~23.68%。

$$\text{干膏率} = m \times (1 - \text{水分}) / M$$

m 为基准样品的质量, M 为饮片投料量

2.4 薄层色谱法研究

猪苓、茯苓两药味因存在共同成分,单独鉴别时各自阴性均有影响,因此采用共同鉴别。泽泻鉴别结果显示阴性无干扰,故泽泻单独鉴别。分别处理按照“2.1”项下方法制备的猪苓汤基准样品及各药味阴性样品,进行薄层鉴别研究。

2.4.1 猪苓、茯苓鉴别 称取 2.0 g 样品,加乙醚 50 mL,超声处理 10 min (功率 800 W、频率 40 kHz),滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。另取茯苓对照药材、猪苓对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。分别吸取对照药材溶液 5 μ L,供试品溶液 30 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-醋酸乙酯-甲酸(8:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇,置 365 nm 下检视。供试品溶液在与对照药材溶液相同位置显相同颜色斑点。分别处理猪苓药材、茯苓对照药材、猪苓汤基准样品及缺猪苓、茯苓的猪苓汤样品。结果显示,猪苓汤基准样品中在与药材溶液相同位置显相同颜色斑点,缺猪苓、茯苓的猪苓汤样品无干扰,见图 5。

2.4.2 泽泻鉴别 称取 2.0 g 样品,加甲醇 50 mL,超声处理 30 min (功率 800 W、频率 40 kHz),滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 1 mL 溶解,作为供试品溶液。另取泽泻对照药材 1 g,同法制成对照药材溶液。分别吸取对照药材溶液 2 μ L,供试品溶液 5 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-醋酸乙酯(1:1)为展开剂,展开,晾干,喷以 2% 香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点清晰。供试品溶液在对照药材溶液相同位置呈现相同颜色斑点。分别处理泽泻对照药材、猪苓汤基准样品及缺泽泻猪苓汤样品。结果显示,猪苓汤基准样品中在与对照药材溶液相同位置显相同颜色斑点,缺泽泻猪苓汤样品无干扰,见图 5。

2.4.3 薄层色谱测定结果 取 15 批猪苓汤基准样品,按照猪苓茯苓鉴别、泽泻鉴别方法检测。结

果如图 5 所示,15 批猪苓汤基准样品均可见与对照药材一致的斑点且阴性无干扰。

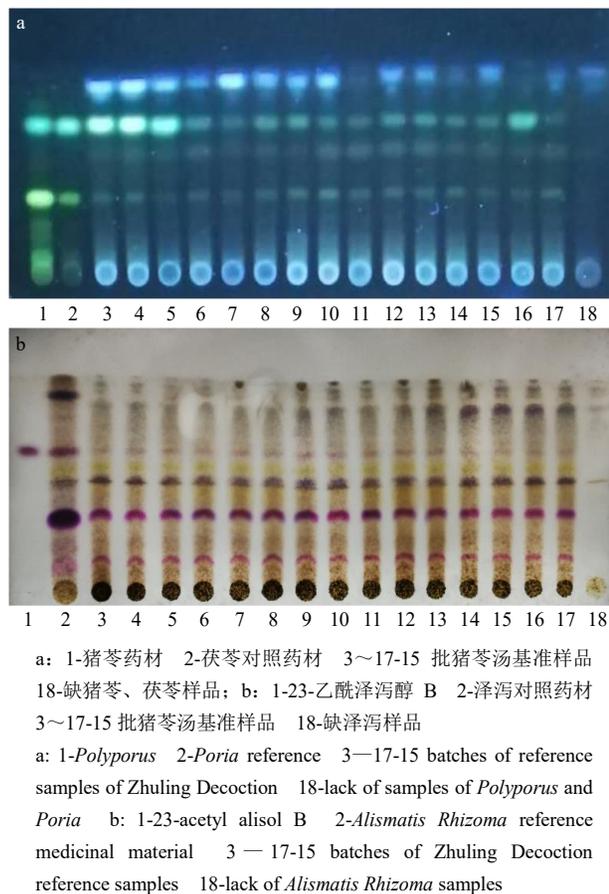


图 5 15 批猪苓汤基准样品的薄层色谱
Fig. 5 Thin-layer chromatograms of 15 batches of Zhuling Decoction benchmark samples

3 讨论

3.1 基准样品处方剂量和制法

猪苓汤来源于汉代张仲景《伤寒论》,原方制法描述为:“猪苓(去皮)、茯苓、泽泻、阿胶、滑石(碎)各一两。上五味,以水四升,先煮四味,取二升,去滓,内阿胶烱消,温服七合,日三服”。基准样品制备方法应与传统的煎煮工艺基本相同^[22],需要将古方中剂量折算成现代剂量以便于经典名方的开发研究。对于经典名方中剂量的折算及应用,需要参考前人考证的量化,也要关注中医理论指导和临床实践结果。多名专家学者曾对汉代剂量进行考证,得出 1 两可折算成 13.8、15.6、7.0 g 等结果^[23-24]。柯雪帆等^[25]和郝万山^[26]通过测定出土的汉代衡器大司农铜权得出汉代 1 两折合 15.6 g 左右、1 斤为 250 g,但这个研究结论缺乏更多佐证资料,且大司农铜权的标称值不确定。后经大量文献资料查阅整

理,发现国家计量总局主编《中国古代度量衡图集》中记载东汉百一十斤权重 23 940 g,折合 1 斤 217.63 g, 1 两为 13.60 g^[27]。邱光明从考古实物佐证、史料记载等全面、综合、真实的考证东汉度量衡史,得出东汉与今天的度量衡单位折算为汉代 1 斤为 220 g, 1 两为 13.8 g。经反复考证和研究,确定汉代“一两”折合现代剂量为 13.8 g。

为考察“1 两折合 15.6 g”实验研究数据在“1 两折合 13.8 g”折算标准中的适用性,比较了以 15.6 g 与 13.8 g 为折算标准所制备样品(S_{15.6}、S_{13.8})的出膏量、干膏率、含量测定指标。结果见表 4,以 13.8 g 和 15.6 g 折算标准所制得样品干膏率和含量指标无明显差异(RSD≤5%)。

表 4 剂量对比研究

Table 4 Dose comparison study

样品	干膏粉 得量/g	干膏 率/%	质量分数/(mg·g ⁻¹)			
			L-羟脯氨酸	甘氨酸	丙氨酸	脯氨酸
S _{13.8}	15.4	22.2	84.7	166	69.7	97.4
S _{15.6}	16.0	20.6	86.0	166	69.4	97.7
RSD/%	4.54	3.19	0.90	0.84	1.05	0.74

经搜集两汉时的量器实测容量折算,以“大司农”器的实测数值为依据,折合每升单位量值在 196~204 mL,用算数平均法求得其单位量值为 199.4 mL,扣除因制造不精而产生的示值误差,每升厘定为 200 mL^[28]。

综上,猪苓汤剂量“一两折合 13.8 g”“一升折合 200 mL”,本研究确定猪苓汤中各药材用量为 13.8 g,总方 69 g,每服 23 g。猪苓汤制法为用水 800 mL,先加入猪苓、茯苓、泽泻、滑石 4 味药煎煮至 400 mL,去掉药渣,再加入阿胶烊化溶解,每次温服约 140 mL,3 次/d。

3.2 含量测定成分选择

本实验研究的猪苓汤基准样品对应实物(冻干粉)为经考察的传统煎煮工艺制备而成汤剂经浓缩干燥后的实物^[29],基准样品的质量标准选择参考《中国药典》成药中含量测定质量指标的选择要求,即指标成分稳定且含量不宜过低。因此,本实验以药味在猪苓汤组方中的君、臣、佐、使地位,首先考察了猪苓中麦角甾醇和泽泻中的 23-乙酰泽泻醇 B。实验结果显示,在猪苓汤样品中未检测出麦角甾醇,而 23-乙酰泽泻醇 B 含量低于万分之一,检测误差大。推测原因是麦角甾醇和 23-乙酰泽泻醇 B

极性小,水提效果较差。因此,麦角甾醇、23-乙酰泽泻醇 B 均不推荐为定量指标的成分。在猪苓汤基准样品中未发现来自于茯苓的定量成分,最终根据指标的稳定性和含量,确定以阿胶中的 L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸为指标成分,建立猪苓汤基准样品的含量测定方法。鉴于《中国药典》2020 年版中泽泻增加了 23-乙酰泽泻醇 C、阿胶增加了特征多肽的含量检测,后续本研究考虑进一步对猪苓汤中的植物药成分、特征多肽含量指标进行深入研究。

3.3 检测项目确定

为确保猪苓汤中各药味都能实现质控,达到国家部门相关规定中“经典名方应加强专属性鉴别和多成份、整体质量控制”的要求^[17],同时也具备确保质量标准的简单实用性,本研究将性状、鉴别、水分检查、特征图谱及含量测定共同作为猪苓汤基准样品质量属性的检测项目。具体检测项目内容如表 5 所示。

3.4 检测结果分析

本研究对猪苓汤基准样品建立了薄层鉴别方法、HPLC 法特征图谱和指标成分含量测定方法。建立的薄层色谱方法实现了猪苓、茯苓和泽泻等药味的鉴别;通过 HPLC 色谱法建立特征图谱,确定了 8 个共有峰,并指认了其中 3 个峰,以 2 号峰泽泻醇 B 为参照峰,15 批猪苓汤基准样品特征图谱与对照特征图谱的相似度均良好。后续将探索更加准确的方法增加各药味的特征信息;通过 HPLC 法建立指标成分含量测定方法,15 批基准样品指标成分平均转移率均在 90%以上。

同时,对猪苓汤的干膏率及水分进行了考察并确定了范围。研究表明,含量测定、干膏率、水分均未现离散数据(平均值的 70%~130%以外),表明制备的 15 批次猪苓汤基准物质对应实物质量基本稳定。

4 结论

猪苓汤用药精炼,组方严谨,本实验研究了猪苓汤基准样品对应实物的制备工艺,并制定了较科学合理的质量标准。建立了简便、可行、重复性良好的特征图谱,可以较全面反映猪苓汤的特征成分信息。通过干膏率、指标成分含量、转移率等的测定,对猪苓汤基准样品进行了质量属性研究,为猪苓汤质量标准制定提供实验数据。同时,建立了猪苓、茯苓、泽泻的薄层色谱鉴别方法,实现了药味

表5 猪苓汤基准样品检测项目

Table 5 Test items of benchmark samples of Zhuling Decoction

检测项目	检测方法	质量要求	相关说明
性状	目测、鼻闻、口尝	浅棕色至棕色粉末，气微，微甜	参考《中国药典》2020年版四部通则 0212
猪苓、茯苓、泽泻鉴别	薄层色谱	与对照药材相同位置呈现相同颜色斑点	参考《中国药典》2020年版四部通则 0502
水分	干燥失重测定法	不超过 5%	参考《中国药典》2020年版四部通则 0831
特征图谱	HPLC 法	供试品特征图谱中应呈现 8 个特征峰，其中 3 个峰应分别与相应的色谱峰保留时间相同，与泽泻醇 B 参照物峰相应的峰为 S 峰，计算各特征峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值±5%以内，规定值为 0.61（峰 1）、1.00（峰 2）、1.28（峰 3）、1.31（峰 4）、1.34（峰 5）、1.52（峰 6）、1.56（峰 7）、1.81（峰 8）	参考《中国药典》2020年版四部通则 0512
含量测定	HPLC 法	每剂中含阿胶以 L-羟脯氨酸计，不得少于 0.8 g；以甘氨酸计，不得少于 1.6 g；以丙氨酸计，不得少于 0.6 g；以脯氨酸计，不得少于 0.9 g	参考《中国药典》2020年版一部阿胶项下含量测定

的鉴别要求。

本研究目前除阿胶外未制定其他药味含量测定方法，后面将持续深入研究其他药味的含量测定方法，以期使猪苓汤颗粒的质量标准体系更加全面；在猪苓汤颗粒的后续开发过程中将尝试采用混批投料的方式，以期减小由于批次间差异所导致的质量差异。综上，本研究对经典名方猪苓汤基准样品初步建立了质量评价方法，以期为经典名方猪苓汤制剂的开发及质量控制提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

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]. [2018-04-16]. <http://kjs.satcm.gov.cn/>.

[2] 陈明. 《伤寒论》第 319 条猪苓汤证探析 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2002, 18(3): 140-142.

[3] 陈明. 刘渡舟运用猪苓汤的经验: 76 例验案分析 [J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(1): 41-42.

[4] 王建红, 王沙燕, 石之麟, 等. 猪苓汤抑制肾结石形成的作用机理研究 [J]. 湖南中医药导报, 2004, 10(6): 80-82.

[5] 王阿芳, 王晴, 刘海红, 等. 猪苓汤加减方治疗气阴两虚、脾肾不足型蛋白尿的临床研究 [J]. 中国临床医生杂志, 2021, 49(5): 611-613.

[6] 张保国, 刘庆芳. 猪苓汤的现代药理研究与临床应用 [J]. 中成药, 2014, 36(8): 1726-1729.

[7] 徐文峰, 何泽云, 唐群, 等. 猪苓汤对阿霉素肾病大鼠肾脏 AQP2 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志,

2013, 14(9): 759-763.

[8] 张珊珊, 王希, 王腾, 等. 猪苓汤治疗慢性肾小球肾炎的 Meta 分析 [J]. 世界中医药, 2020, 15(9): 1306-1311.

[9] 马秀宁, 高晓婧, 苏靖雯. 知柏地黄汤合猪苓汤治疗肾阴亏虚、湿热留恋型慢性肾盂肾炎临床观察 [J]. 河北中医, 2020, 42(9): 1333-1336.

[10] 周洪立, 周红光. 猪苓汤在癌性水肿治疗中的应用 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(2): 54-56.

[11] 潘和长. 猪苓汤加味治疗老年复发性泌尿系感染的临床观察 [J]. 湖北中医学院学报, 2009, 11(4): 50.

[12] 翟雪珍. 炙甘草汤合猪苓汤治疗乙型肝炎肝硬化腹水的临床疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2020, 12(14): 65-67.

[13] 赵润栓, 张敏. 猪苓汤加味治疗肾病综合征 21 例疗效观察 [J]. 国医论坛, 2005, 20(4): 8-9.

[14] 王国瑞. 猪苓汤治疗心律失常验案分析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(24): 204.

[15] 李淑萍. 猪苓汤联合苦参碱栓治疗复发性老年性阴道炎尿道炎 30 例 [J]. 陕西中医, 2009, 30(3): 277.

[16] 付明洁. 知柏地黄丸联合猪苓汤治疗原发性肾病综合征疗效及对炎症因子的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(22): 2453-2455.

[17] 国家药品监督管理局. 古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定 [EB/OL]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2093/228247.html>. 2018-05-29/2019-06-18.

[18] 国家药品监督管理局. 古代经典名方中药复方制剂及其物质基准申报资料要求(征求意见稿)[EB/OL]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2101/335926.html>. 2019-03-22/2019-06-18.

- [19] 陈畅, 程锦堂, 刘安. 经典名方研发策略 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(9): 1814-1818.
- [20] 张星, 张臻, 林夏, 等. 经典名方制剂开发的主要环节关键技术问题探析 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6724-6731.
- [21] 于海英, 周永妍, 程秀民. 阿胶、龟甲胶中脂溶性成分的高效液相色谱指纹图谱 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 447-452.
- [22] 代云桃, 靳如娜, 吴治丽, 等. 基于标准汤剂(物质基准)的经典名方制备工艺和质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2): 164-174.
- [23] 李具双. 汉唐时期药用衡制及量值考 [J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(2): 13-15.
- [24] 张卫, 王嘉伦, 杨洪军, 等. 经典名方的中药基原考证方法与示例 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(24): 4916-4922.
- [25] 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, 17(12): 36-38.
- [26] 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.
- [27] 国家计量总局. 中国古代度量衡图集 [M]. 北京: 文物出版社, 1984: 147-151.
- [28] 范吉平, 程先宽. 经方剂量揭秘 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 96.
- [29] 孙昱, 萧惠来. 对EMA 草药质量标准指南(第3修订版草案)的思考 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(10): 1920-1934.

[责任编辑 郑礼胜]