

· 中药工业 ·

经典名方真武汤的物质基准关键质量属性[△]尚炳娴^{1,2}, 赵振霞², 董慧玲¹, 张佟¹, 苏建², 刘永利^{2*}, 徐冰^{1*}, 雷海民¹

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102400;

2. 河北省药品检验研究院, 河北 石家庄 050200

[摘要] 目的: 建立真武汤物质基准的特征图谱及多指标成分含量测定方法, 并阐明真武汤的关键质量属性, 以期经典名方真武汤物质基准及制剂的质量评价研究提供参考。方法: 使用不同批次饮片制备 15 批真武汤物质基准冻干粉, 采用高效液相色谱法 (HPLC) 建立真武汤特征图谱, 并进行特征峰归属和相似度分析; 以芍药苷、6-姜辣素为指标性成分建立真武汤多成分含量测定方法, 以均值的 70%~130% 为界限设定各质量控制指标的数值范围, 并对 15 批真武汤物质基准进行量值传递分析。结果: 15 批真武汤物质基准的特征图谱共有 11 个特征峰, 指出没食子酸、5-羟甲基糠醛、(+)-儿茶素、芍药苷、苯甲酰芍药苷、6-姜辣素、8-姜酚 7 个色谱峰, 相似度均大于 0.99; 15 批真武汤物质基准中指标性成分芍药苷质量分数 20.01~25.35 mg·g⁻¹, 转移率 49.77%~69.84%; 6-姜辣素质量分数 1.65~2.57 mg·g⁻¹, 转移率 30.11%~58.96%; 出粉率 3.21%~4.57%。结论: 建立的真武汤物质基准 HPLC 特征图谱及多成分含量测定方法简单可行, 重复性、稳定性良好, 可为经典名方真武汤物质基准及制剂关键化学属性的质量评价提供参考。

[关键词] 真武汤; 经典名方; 特征图谱; 含量测定; 物质基准

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)10-1962-07

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20220228002

Key Quality Attributes of Substance Benchmark of Famous Classical Formula ZhenWu Tang

SHANG Bing-xian^{1,2}, ZHAO Zhen-xia², DONG Hui-ling¹, ZHANG Tong¹, SU Jian², LIU Yong-li^{2*}, XU Bing^{1*}, LEI Hai-min¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China;

2. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050200, China

[Abstract] **Objective:** To establish the characteristic chromatogram and the content determination method of index components in substance benchmark of famous classical formula ZhenWu Tang, so as to clarify the key quality attributes of ZhenWu Tang and provide reference for studying the quality evaluation of ZhenWu Tang substance benchmark and preparations. **Methods:** A total of 15 batches of freeze-dried powder of ZhenWu Tang substance benchmark were prepared with different batches of decoction pieces. The HPLC characteristic chromatogram of ZhenWu Tang was established, and the attributes and similarities of the characteristic peaks were analyzed. With paeoniflorin and 6-gingerol as index components, the multi-index content determination method was constructed, and the 70%-130% of the mass average was regarded as the limit for the quantity value range of quality control indexes. In addition, the quantity value transfer of the 15 batches of ZhenWu Tang substance benchmark was analyzed. **Results:** There were 11 characteristic peaks corresponding to the characteristic chromatogram of the 15 batches of ZhenWu Tang substance benchmark, and seven chromatographic peaks [gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, (+)-catechin, paeoniflorin, benzoyl paeoniflorin, 6-gingerol and 8-gingerol] were identified, with the similarity all more than 0.99. The content and transfer rate of index components in the 15 batches of substance benchmarks were as follows: paeoniflorin content 20.01-25.35 mg·g⁻¹ and transfer rate 49.77%-69.84%; 6-gingerol content 1.65-2.57 mg·g⁻¹ and transfer rate 30.11%-58.96%; the powder yield rate was 3.21%-4.57%. **Conclusion:**

[△] [基金项目] “科技助力经济 2020” 重点专项 (2020YFF0426288); 河北省重点研发计划项目 (21372502D)

* [通信作者] 刘永利, 主任药师, 研究方向: 中药质量评价与标准研究; Tel: 0311-69086006, E-mail: liuyongli2008@126.com
徐冰, 讲师, 研究方向: 中药新药研发; E-mail: weichenxubing@126.com

The established characteristic chromatogram and content determination methods of ZhenWu Tang substance benchmark in this study were simple, feasible, reproducible and stable, and could provide reference for further research on the key chemical properties of ZhenWu Tang substance benchmark and preparations.

[Keywords] ZhenWu Tang; famous classical formula; characteristic chromatogram; content determination; substance benchmark

真武汤首见于汉代张仲景所著的《伤寒论》^[1],由茯苓、白芍、生姜、白术和附子5味中药组成,具有温阳利水的功效。现代临床上真武汤主要用于治疗慢性肾炎、肾病综合征、尿毒症及肾积水等阳虚水饮内停证,真武汤系统疾病^[2-5]。该方作为治疗太阳病及少阴病的经典名方,被《古代经典名方目录(第一批)》(以下简称《目录》)^[6]收载。

经典名方物质基准是指以古代医籍中记载的经典名方制备方法为依据制备的中药药用物质的标准,除成型工艺外,其余制备方法应当与古代医籍记载基本一致^[7]。经典名方物质基准既是保证经典名方现代制剂与中医传统临床所用药物一致的参照物,又是现代制剂工艺筛选及标准制订的依据和准绳^[8-11]。物质基准在经典名方研发过程中起到承上启下的作用,是链接中医临床传统用药形式和现代成品复方制剂的桥梁,是保证临床疗效不降低、产品质量稳定一致的核心环节^[12-15]。

《古代经典名方中药复方制剂及其物质基准的申报资料要求(征求意见稿)》(以下简称《意见稿》)^[7]指出,应开展药材、饮片、标准煎液及物质基准的质量研究,确定关键质量属性,实现全过程质量控制,通过物质基准冻干粉出粉率、含量测定、指纹图谱或特征图谱等,确保标准煎液及物质基准的批间质量基本一致及可追溯。本研究采用随机数表法将真武汤5味饮片随机组合成15批真武汤组方,并相应地制备15批真武汤物质基准冻干粉,采用高效液相色谱法(HPLC)建立真武汤特征图谱和指标性成分含量测定方法,分析饮片与物质基准间的指标成分量值传递规律,初步制定真武汤物质基准的质量标准,实现对真武汤物质基准的质量控制,为经典名方真武汤及其相关制剂的研发及生产提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司); UltiMate 3000型高效液相色谱仪(美国Thermo公司); 1260型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);

Pilot5-8M型冷冻干燥机(北京博医康技术有限责任公司); KQ5200DA型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 4L陶瓷锅(潮州市一壶百饮电器实业有限公司); H22-X1型电陶炉(九阳股份有限公司)。

1.2 试药

对照品芍药苷(批号:110736-202044,纯度:96.8%)、6-姜辣素(批号:111833-202007,纯度:99.3%)、没食子酸(批号:110831-200302,纯度:91.5%)、8-姜酚(批号:111993-201601,纯度:93.8%)、(+)-儿茶素(批号:877-200001,纯度:95.1%)、5-羟甲基糠醛(批号:111626-201912,纯度:99.2%)均购于中国食品药品检定研究院;对照品苯甲酰芍药苷(批号:O11GB163260,纯度≥98%)购于上海源叶生物科技有限公司;乙腈为色谱纯;甲醇为分析纯;水为实验室自制超纯水。

真武汤所需药材购自安国聚药堂有限公司,经北京中医药大学刘春生教授鉴定,符合《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版规定,由北京春风药业有限公司按前期研究确定的炮制方法炮制加工成各批次饮片,并按《中国药典》2020年版规定检测,均符合规定。

根据随机数表法将真武汤中的5味饮片进行随机组合及排序,组成15批真武汤组方物质基准(表1)。

2 方法与结果

2.1 15批真武汤物质基准的制备

分别称取茯苓41.4 g、白芍41.4 g、生姜41.4 g、白术27.6 g、炮附子10.0 g,加水1600 mL,浸泡30 min,闭盖,武火(1500 W)煎煮至沸腾,开盖,转文火(600 W)煎煮保持微沸,约60 min,趁热以双层200目滤布滤过并榨干药渣,放冷,定容至600 mL,预冻,真空冷冻干燥(<-40℃, <20 Pa)72 h,即得。

2.2 真武汤物质基准特征图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Waters C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,

表1 15批真武汤物质基准饮片信息

编号	茯苓		白芍		生姜		白术		炮附子	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
S1	安徽潜山	FLYP-08	安徽亳州	BSYP-01	云南曲靖	SJYP-04	安徽亳州	BZYP-07	云南丽江	PFZYP-09
S2	安徽潜山	FLYP-10	安徽亳州	BSYP-05	云南文安	SJYP-09	河北安国	BZYP-01	四川江油	PFZYP-05
S3	安徽岳西	FLYP-03	浙江磐安	BSYP-07	云南罗平	SJYP-11	浙江磐安	BZYP-12	云南丽江	PFZYP-10
S4	云南景谷	FLYP-15	安徽蒙城	BSYP-12	云南文安	SJYP-07	安徽亳州	BZYP-09	四川布拖	PFZYP-12
S5	云南景谷	FLYP-11	安徽亳州	BSYP-02	云南文安	SJYP-10	浙江磐安	BZYP-15	云南丽江	PFZYP-08
S6	安徽岳西	FLYP-02	浙江磐安	BSYP-09	云南曲靖	SJYP-01	河北安国	BZYP-02	云南丽江	PFZYP-07
S7	安徽岳西	FLYP-05	安徽蒙城	BSYP-14	云南曲靖	SJYP-05	安徽亳州	BZYP-06	四川布拖	PFZYP-15
S8	安徽潜山	FLYP-06	安徽蒙城	BSYP-15	云南曲靖	SJYP-03	浙江磐安	BZYP-11	云南丽江	PFZYP-06
S9	安徽岳西	FLYP-01	安徽亳州	BSYP-04	云南文安	SJYP-08	安徽亳州	BZYP-10	四川布拖	PFZYP-14
S10	安徽岳西	FLYP-04	浙江磐安	BSYP-08	云南罗平	SJYP-13	河北安国	BZYP-04	四川布拖	PFZYP-13
S11	云南景谷	FLYP-13	安徽亳州	BSYP-03	云南罗平	SJYP-14	安徽亳州	BZYP-08	四川江油	PFZYP-03
S12	云南景谷	FLYP-14	安徽蒙城	BSYP-11	云南罗平	SJYP-12	河北安国	BZYP-05	四川江油	PFZYP-04
S13	云南景谷	FLYP-12	浙江磐安	BSYP-06	云南文安	SJYP-06	浙江磐安	BZYP-13	四川江油	PFZYP-01
S14	安徽潜山	FLYP-07	浙江磐安	BSYP-10	云南罗平	SJYP-15	河北安国	BZYP-03	四川江油	PFZYP-02
S15	安徽潜山	FLYP-09	安徽蒙城	BSYP-13	云南曲靖	SJYP-02	浙江磐安	BZYP-14	四川布拖	PFZYP-11

5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~7 min, 3%A; 7~16 min, 3%~10%A; 16~31 min, 10%~13%A; 31~37 min, 13%~20%A; 37~62 min, 20%~32%A; 62~81 min, 32%~46%A; 81~86 min, 46%~65%A; 86~98 min, 65%A); 检测波长为230 nm; 柱温为30 $^{\circ}\text{C}$; 流速为1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量为20 μL 。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取真武汤物质基准冻干粉0.1 g, 精密加入50%甲醇25 mL, 超声处理30 min, 6000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径为8.4 cm), 用0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品芍药苷、6-姜辣素、没食子酸4.978、5.092、10.072 mg, 分别加甲醇定容至10 mL; 分别精密称取对照品苯甲酰芍药苷、8-姜酚、(+)-儿茶素、5-羟甲基糠醛5.261、170.920、5.208、6.571 mg, 分别加甲醇定容至25 mL制成相应的对照品储备液。

分别精密吸取8-姜酚对照品储备液1 mL, 芍药苷、6-姜辣素、没食子酸对照品储备液各2 mL, 苯甲酰芍药苷、(+)-儿茶素、5-羟甲基糠醛对照品储备液各5 mL, 混匀后定容至25 mL, 制成混合对照品溶液。

2.2.4 单味药供试品溶液的制备 分别取处方用量的茯苓、白芍、生姜、白术、炮附子饮片, 按2.1项下方法制备单味药物质基准冻干粉; 并按2.2.2项下方法制备单味药供试品溶液。

2.2.5 方法学考察 精密度: 取同一供试品溶液, 按2.2.1项下色谱条件进行HPLC分析, 连续进样6次, 记录色谱图。以5号峰(芍药苷)为参照峰, 计算各峰的相对保留时间和相对峰面积及其RSD, 结果见表2。

表2 真武汤特征图谱方法学考察

峰号	相对保留时间RSD			相对峰面积RSD			%
	精密度	稳定性	重复性	精密度	稳定性	重复性	
1	0.45	0.92	2.80	1.03	2.61	1.58	
2	0.59	0.12	2.75	0.92	2.33	1.65	
3	1.70	0.31	0.61	0.72	1.71	2.50	
9	0.50	0.05	0.62	0.73	0.83	1.67	
10	0.33	0.06	0.24	1.03	1.89	2.85	
11	0.44	0.06	0.38	0.92	1.91	1.86	

稳定性: 取同一供试品溶液, 按2.2.1项下色谱条件进行HPLC分析, 分别于0、2、4、8、12、24 h进样, 记录色谱图。以5号峰(芍药苷)为参照峰, 计算各峰的相对保留时间和相对峰面积及其RSD, 结果见表2。

重复性: 分别精密称取同一批次物质基准粉末0.05、0.10、0.15 g各3份, 按2.2.2项下方法制备供试品溶液, 并按2.2.1项下色谱条件依次进行HPLC分析, 记录色谱图。以5号峰(芍药苷)为参照峰, 计算各峰的相对保留时间和相对峰面积及其RSD, 结果见表2。

2.2.6 15批真武汤物质基准的特征图谱相似度评价 按2.2.1项下特征图谱色谱条件分别称取15批真武汤物质基准0.1 g,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,并进行HPLC测定,得到15批真武汤特征图谱。将15批真武汤物质基准特征图谱依次导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版),以S1为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度为0.1,进行多点校正和色谱峰匹配,生成对照图谱并计算相似度,15批真武汤物质基准的相似度均大于0.99。确定了11个特征峰,15批真武汤物质基准特征图谱叠加图见图1。

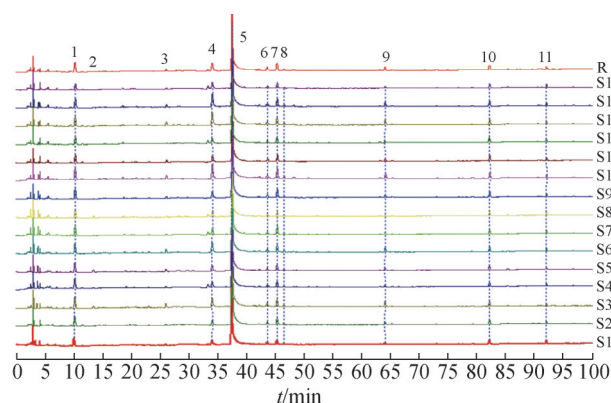
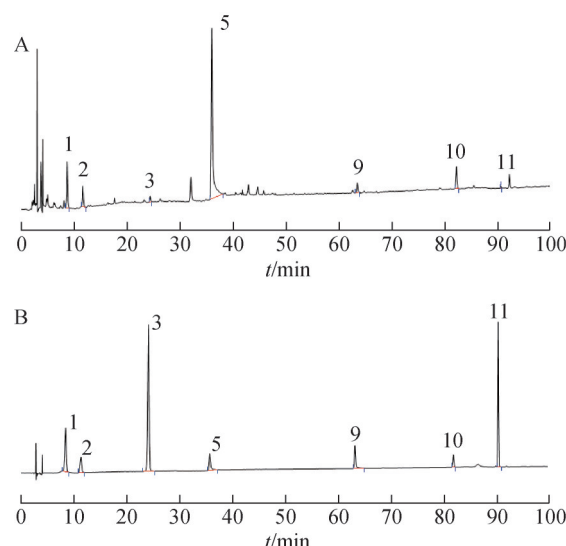


图1 15批真武汤物质基准特征图谱

2.2.7 真武汤物质基准的特征图谱共有峰的指认及归属 将真武汤特征图谱与混合对照品溶液及单味药供试品溶液进行对照,指认出其中7个色谱峰,分别为没食子酸(1号峰)、5-羟甲基糠醛(2号峰)、(+)-儿茶素(3号峰)、芍药苷(5号峰)、苯甲酰芍药苷(9号峰)、6-姜辣素(10号峰)、8-姜酚(11号峰),见图2。其中1号峰、3号峰、5号峰、9号峰来自白芍;2号峰来自炮附子;10号峰、11号峰来自生姜。综合15批真武汤物质基准相对保留时间结果(表3),确定了真武汤物质基准特征图谱鉴别标准,供试品特征图谱中共有11个特征峰,以5号峰芍药苷为参照峰(S峰),计算各特征峰与S峰的相对保留时间,其相对保留时间偏差应在规定值的 $\pm 10\%$ 之内。规定值为0.274(峰1)、0.331(峰2)、0.695(峰3)、0.908(峰4)、1.164(峰6)、1.208(峰7)、1.240(峰8)、1.707(峰9)、2.190(峰10)、2.452(峰11)。

2.3 含量测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 Waters C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈(A)-0.2%磷酸水



注: A. 供试品; B. 对照品; 1. 没食子酸; 2. 5-羟甲基糠醛; 3. (+)-儿茶素; 5. 芍药苷; 9. 苯甲酰芍药苷; 10. 6-姜辣素; 11. 8-姜酚。

图2 真武汤物质基准供试品溶液及对照品溶液特征图谱

表3 15批真武汤物质基准特征峰相对保留时间

编号	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11
S1	0.270	0.307	0.692	0.908	1.164	1.209	1.240	1.708	2.191	2.454
S2	0.273	0.308	0.694	0.908	1.163	1.208	1.240	1.707	2.189	2.452
S3	0.273	0.359	0.695	0.908	1.164	1.209	1.240	1.707	2.190	2.453
S4	0.273	0.307	0.695	0.908	1.164	1.208	1.240	1.708	2.190	2.453
S5	0.274	0.359	0.695	0.908	1.164	1.209	1.241	1.708	2.191	2.454
S6	0.274	0.359	0.695	0.908	1.164	1.208	1.241	1.708	2.191	2.453
S7	0.275	0.360	0.696	0.908	1.164	1.208	1.240	1.707	2.189	2.452
S8	0.275	0.359	0.696	0.908	1.164	1.208	1.240	1.707	2.189	2.452
S9	0.275	0.359	0.696	0.908	1.164	1.209	1.240	1.707	2.190	2.452
S10	0.275	0.307	0.696	0.908	1.164	1.209	1.241	1.708	2.190	2.452
S11	0.275	0.307	0.697	0.909	1.164	1.209	1.241	1.707	2.189	2.451
S12	0.276	0.308	0.696	0.908	1.164	1.208	1.240	1.707	2.190	2.453
S13	0.275	0.307	0.696	0.908	1.164	1.208	1.240	1.708	2.190	2.453
S14	0.276	0.359	0.696	0.908	1.164	1.208	1.240	1.707	2.189	2.451
S15	0.276	0.308	0.696	0.908	1.164	1.208	1.240	1.707	2.189	2.451

溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 15%~17%A; 5~15 min, 17%~19%A; 15~25 min, 19%~55%A; 25~28 min, 55%~62%A; 28~40 min, 62%~90%A);检测波长为230 nm;柱温为30 $^{\circ}$ C;流速为1 mL $\cdot$ min $^{-1}$;进样量为20 μ L。

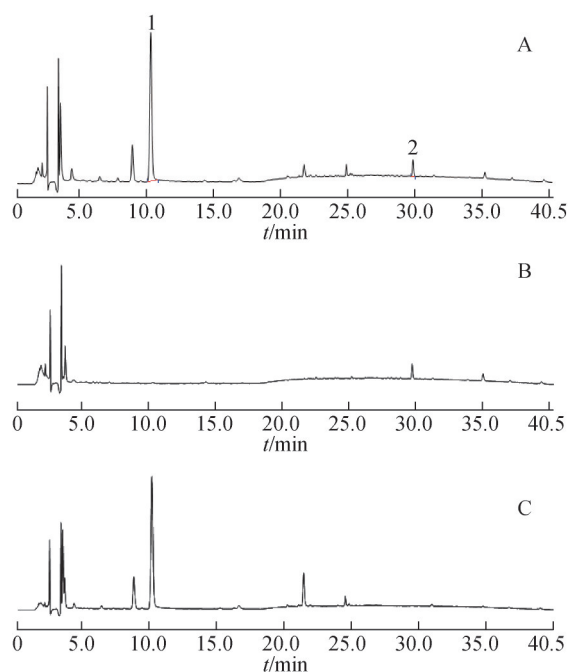
2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取真武汤物质基准冻干粉0.1 g,加入50%甲醇25 mL,超声处理30 min,6000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心5 min(离心半径为8.4 cm),用0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得。

2.3.3 对照品溶液的制备 分别取对照品芍药苷、

6-姜辣素 5.772、3.281 mg，分别加甲醇定容至 10 mL，制成对照品储备液。

分别精密吸取上述 2 个对照品储备液 4 mL，混合，用甲醇定容至 25 mL，分别制成质量浓度为 0.089 4、0.052 1 mg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3.4 方法学考察 专属性：按 2.1 项下方法分别制备不含白芍和生姜的阴性物质基准冻干粉，并按 2.3.2 项下方法分别制备缺白芍、缺生姜的阴性样品溶液；取混合对照品、供试品及阴性样品溶液，按 2.3.1 项下色谱条件进行 HPLC 分析，记录色谱图，结果见图 3。



注：A. 真武汤样品；B. 白芍阴性样品；C. 生姜阴性样品；1. 芍药苷；2. 6-姜辣素。

图3 白芍、生姜专属性考察 HPLC 图

线性关系：分别取芍药苷和 6-姜辣素对照品储备液适量，1:1 混合配制成混合对照品溶液，分别稀释至 1、2、4、8、16、32 倍，按 2.3.1 项下色谱条件进行 HPLC 分析，考察峰面积与质量浓度的线性关系，结果见表 4。

精密度：取同一供试品溶液进行 HPLC 分析，按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 6 次，分别测定芍药苷和 6-姜辣素的峰面积，计算 RSD，结果见表 4。

稳定性：取同一供试品溶液进行 HPLC 分析，按 2.3.1 项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样，测定芍药苷和 6-姜辣素的峰面积，计算 RSD，结果见表 4。

重复性：分别精密称取同一批真武汤物质基准粉末 0.05、0.10、0.15 g 各 3 份，按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液，并按 2.3.1 项下色谱条件进行 HPLC 分析，测定芍药苷和 6-姜辣素的含量，计算 RSD，结果见表 4。

加样回收率试验：精密称取与重复性同一批次物质基准粉末 0.05 g 9 份，分别按已知芍药苷和 6-姜辣素含量的 1.0:0.5、1:1、1.0:1.5 精密称取芍药苷和 6-姜辣素对照品，按 2.3.3 项下方法制备对照品溶液；以对照品溶液为提取溶剂，按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液，每个质量浓度平行 3 份；并按 2.3.1 项下色谱条件依次进行 HPLC 分析，测定芍药苷和 6-姜辣素的含量，计算其加样回收率，结果见表 4。

2.3.5 15 批真武汤物质基准的量值传递分析 取 15 批真武汤物质基准冻干粉，按 2.3.2 项下方法分别制备 15 批真武汤供试品溶液，每批平行 2 份；按 2.3.1 项下色谱条件依次进行 HPLC 分析，计算芍药苷和 6-姜辣素的含量，并计算饮片到物质基准的量值传递，结果见表 5。

根据上述含量测定结果可知，15 批真武汤出粉率为 3.21%~4.57%；15 批物质基准中芍药苷质量分数为 20.01~25.35 mg·g⁻¹，饮片-物质基准转移率为 49.77%~61.84%；6-姜辣素质量分数为 1.65~2.57 mg·g⁻¹，饮片-物质基准转移率为 30.11%~58.96%。参照《意见稿》规定，指标性成分含量范围一般不超过均值的 70%~130%^[7]，根据表 5 可知，15 批真武汤物质基准中芍药苷和 6-姜辣素含量稳定在均值的 70%~130%。

表4 芍药苷和 6-姜辣素含量测定方法学考察

成分	线性方程	<i>r</i>	RSD			加样回收率
			精密度	稳定性	重复性	
芍药苷	$Y=241\,965X+77\,806$	0.999 7	0.09	0.12	1.95	101.19
6-姜辣素	$Y=113\,468X+95\,170$	0.999 5	0.50	2.61	2.26	98.94

表5 15批真武汤出粉率及物质基准中指标成分含量传递

编号	物质基准质量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		饮片-物质基准转移 率/%		出粉率/%
	芍药苷	6-姜辣素	芍药苷	6-姜辣素	
S1	21.52	1.65	50.00	30.11	3.21
S2	24.05	1.85	53.33	50.27	3.64
S3	24.46	2.26	56.98	34.14	4.57
S4	21.04	2.27	55.26	58.96	4.05
S5	23.30	1.97	54.19	39.88	3.28
S6	21.91	2.02	49.77	34.89	4.51
S7	21.46	2.30	58.11	38.40	3.51
S8	20.47	1.67	52.56	33.87	3.63
S9	22.90	2.29	52.05	53.63	3.66
S10	22.59	2.24	50.22	38.42	3.31
S11	25.35	2.57	57.73	41.99	3.81
S12	20.01	2.41	52.63	34.53	3.60
S13	22.16	2.08	52.86	43.33	3.40
S14	21.89	2.42	49.77	40.00	4.07
S15	23.50	2.20	61.84	45.83	3.37

3 讨论

3.1 物质基准制备方法的考察

本研究采用加10倍量水闭盖武火煎煮至沸腾,开盖转文火煎煮保持微沸至煎煮终点的方式制备真武汤物质基准水煎液,所得滤液经过冷冻干燥得到冻干粉,作为物质基准对应实物。在煎煮过程中分别以微沸30、45、60、75 min为煎煮终点,第3份煎煮完后(微沸60 min)的药渣再加8倍量水煎煮40 min,得到二次煎液;共制得5份不同煎煮时间的煎液。以所得水煎液体积为主要依据,对煎煮时间进行考察。结果表明,以微沸45 min为煎煮终点所得煎液体积与真武汤原文记载最为接近。

3.2 供试品溶液制备方法的考察

本研究考察25%甲醇、50%甲醇、75%甲醇3种提取溶剂,结果显示,50%甲醇提取的真武汤供试品溶液中各指标成分含量最高;分别考察0.05、0.10、0.15 g 3种冻干粉取样量,结果显示,在0.05~0.15 g指标成分含量与取样量成正比;考察20、25、50 mL 3种提取溶剂用量,结果显示,25 mL提取溶剂提取的真武汤供试品溶液中各指标成分含量最高;考察回流提取(150℃)、超声提取(200 W, 40 kHz) 2种提取方式,结果显示,2种方式提取后的真武汤供试品溶液中各指标

成分相差不大,且超声提取的样品重复性更好;考察20、30、40 min 3种提取时间,结果显示,提取30 min的真武汤供试品溶液中各指标成分含量最高。故选择取样量为0.10 g,以25 mL 50%甲醇为提取溶剂,超声提取30 min制备供试品溶液。

4 结论

本研究使用不同批次饮片制备15批真武汤物质基准,建立了真武汤HPLC特征图谱,共确定了11个特征峰,指出没食子酸、5-羟甲基糠醛、(+)-儿茶素、芍药苷、苯甲酰芍药苷、6-姜辣素、8-姜酚7个色谱峰,并采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2008版)进行相似度分析,相似度均大于0.99;以芍药苷、6-姜辣素为指标性成分建立真武汤中多成分HPLC含量测定方法,以不超过质量均值的70%~130%为界限设定各含量指标的量值范围,结果表明,15批真武汤物质基准的特征图谱物质基准中芍药苷质量分数为20.01~25.35 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 6-姜辣素质量分数为1.65~2.57 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

参考文献

- [1] 张仲景. 伤寒论[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:27, 40, 65, 88, 104.
- [2] 田中秋,冯冬妹,富荣丽,等. 真武汤对慢性心衰患者射血分数以及NT-proBNP水平影响的研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2022,20(1):94-96.
- [3] 陈仕飞,高芳颖,陆文,等. 真武汤治疗糖尿病肾病临床效果的meta分析[J]. 中国医药导报,2021,18(33):131-134.
- [4] 傅洁,文雅雅,周卫东. 真武汤对脾肾阳虚型桥本甲状腺炎合并甲状腺功能减退症抗体滴度、25羟维生素D、血脂水平的影响[J]. 中医临床研究,2021,13(32):117-121.
- [5] 熊海凤,刘若雅,李任城,等. 基于网络药理学分析真武汤治疗类风湿关节炎的作用机制[J]. 广西医学,2021,43(14):1730-1736.
- [6] 国家中医药管理局. 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]. (2018-04-13) [2021-11-04]. <https://kjis.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.
- [7] 国家药品监督管理局综合司. 公开征求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)意见[EB/OL]. (2019-03-22)[2021-11-04]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/zhqyj/zhqyiyip/20190327150101694.html>.
- [8] 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(2018年第27号)[EB/OL]. (2018-

- 06-01) [2021-11-04]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2138/228247.html>.
- [9] 孙昱. 经典名方研发的现存问题及相关考虑[J]. 药物评价研究, 2020, 43(5): 969-972.
- [10] 黄仕文, 颜媛媛, 嵇晶, 等. 经典名方质量研究及其量值传递关键技术[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(3): 446-449.
- [11] 刘艳, 章军, 杨林勇, 等. 经典名方物质基准研制策略及关键问题分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(1): 1-9.
- [12] 谢辉, 林丽, 李欢欢, 等. 经典名方旋覆代赭汤物质基准特征图谱及指标成分含量测定研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2090-2098.
- [13] 许金国, 夏金鑫, 梅茜, 等. 经典名方当归四逆汤指纹图谱及功效关联物质预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(15): 4507-4518.
- [14] 苗家燕, 罗赣, 高晓燕, 等. 经典名方当归四逆汤物质基准的关键质量属性研究[J]. 分析测试学报, 2021, 40(5): 740-746.
- [15] 毕嘉瑶, 田湾湾, 张翼, 等. 经典名方易黄汤物质基准的量值传递分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 24-31.

(收稿日期: 2022-02-28 编辑: 王笑辉)