

甲酸为标准,绘制标准曲线,以 85%乙醇配制的对照品溶液线性关系最好,故选用波长为 227 nm。

通过对 PVA 微囊制备的单因素考察,温度、搅拌时间、交联剂和 pH 值等因素则对成囊粒度影响比较大,从而优选出最佳的制备工艺,为 PVA 微囊的制备提供了进一步的参考依据。

从药物的释放曲线可以看出,白芍总苷微囊在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中,达到了药物的缓释效果,可见白芍总苷微囊在体内生理环境条件下可以产生缓释、长效的药理作用。

采用悬浮界面交联法制备 PVA 微囊是一种具有很强临床应用潜力的生物材料,其生物相容性好、毒性小、强度高、操作简便且成本低廉,除了应用一般治疗之外,还可以通过包埋其他微生物病种来治疗更多的疾病^[7],因此 PVA 口服微囊的研制具有

更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 吴英华,任凤莲,蔡小华,等.紫外分光光度法测定白芍总苷的含量[J].分析测试,2007,36(8):822-824.
- [2] 牟善松,屠美,丁珊,等.不同材料包裹的肝素缓释微囊生物相容性评价[J].材料导报,2003,17(5):79-81.
- [3] 高虹,俞耀庭,王满燕.以聚乙烯醇为载体制备微囊化脲酶基因工程菌的研究[J].离子交换与吸附,2003,19(6):540-546.
- [4] Prakash S, Chang T M S. Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats [J]. *Nature Med*, 1996, 2(8): 883-887.
- [5] 刘玉红,陈燕,易进海. HPLC 测定白芍总苷的含量[J]. 华西药理学杂志,2002,17(4):295.
- [6] Chen K C, Lin Y F. Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(1): 79-83.
- [7] 王满燕,俞耀庭, Chang T M S. 新型聚乙烯醇微囊的制备及其结构性能研究[J]. 高等学校化学学报,2005,26(5):865-869.

薄层扫描法评价六味地黄丸(胶囊)质量的模式识别研究

刘征辉^{1,2}, 孟宪生^{3*}, 叶挺祥^{1,2}, 赵洪芝^{1,2}, 程奕^{1,2}, 罗国安³

(1. 天津海世达检测技术有限公司,天津 300381; 2. 天津市现代中药质量检验中心,天津 300381; 3. 清华大学 化学系,北京 100084)

摘要:目的 研究建立六味地黄丸(胶囊)的薄层扫描指纹图谱,为质量控制及科学评价提供简便可靠方法。方法 采用薄层色谱法建立了六味地黄丸(胶囊)的指纹图谱,收集不同厂家的 27 批产品进行了测定,并使用聚类分析法和主成分分析法对指纹图谱进行了模式识别研究。结果 27 个样本基本可分为 3 类,不同剂型的六味地黄丸薄层指纹图谱存在明显的差异。结论 此方法可较系统地用于六味地黄丸(胶囊)的质量控制。

关键词:六味地黄丸(胶囊);薄层扫描;指纹图谱;模式识别

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2009)11-1743-04

六味地黄丸是滋补肾阴的经典名方,由宋代钱乙在《小儿药证直诀》中首创,由熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、泽泻、山药、茯苓 6 味药材组成;用于肾阴亏损,头晕耳鸣,腰膝酸软,骨蒸潮热,盗汗遗精,消渴等症。《中国药典》2005 年版规定检测牡丹皮中的丹皮酚和山茱萸中马钱苷作为质量控制指标。虽然此方法简单易行,但尚不能全面控制六味地黄丸的内在质量。由于六味地黄丸的成分十分复杂,生产厂家众多,为全面评价其质量,需借助现代分析仪器和化学计量学方法进行研究,建立科学简便的评价方法并为临床药效评价提供科学依据。因

此本研究建立了六味地黄丸的薄层指纹图谱,并结合聚类分析法和主成分分析法等模式识别方法^[1-5],为六味地黄丸的质量评价提供一种更为直观、简便、高效的手段。

1 仪器与试剂

CAMAG Linomat 5 半自动点样仪;CAMAG ADC 2 薄层展开系统;CAMAG Reprostar 3 数码成像系统;CAMAG TLC Scanner 3 薄层色谱扫描仪;硅胶 G 高效板(20.0 cm×10.0 cm)(青岛海洋化工厂);其他试剂为分析纯。六味地黄丸各味药材品种经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定,符合《中国药典》2005

收稿日期:2009-02-19

基金项目:天津市科技发展计划项目(05SYSGX25000)

作者简介:刘征辉(1982—),男,河北保定人,研究实习员,主要从事中药质量控制及化学计量学方面的研究。

Tel: (022) 27950255 Fax: (022) 27950378 E-mail: liuzhenghui_2008@163.com

* 通讯作者 孟宪生 Tel: (010) 62772263 Fax: (010) 62781688 E-mail: mxsvvv@126.com

年版项下规定。六味地黄丸(胶囊)样本均为市售,共收集了 15 个生产厂家的 27 个样本,见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编 号	生 产 厂 家	批 号	剂 型	编 号	生 产 厂 家	批 号	剂 型
1	A	20070426	浓缩丸	15	J	109426	大蜜丸
2	B	060701	浓缩丸	16	J	109429	大蜜丸
3	C	97060379	浓缩丸	17	K	6032931	水蜜丸
4	D	061274	浓缩丸	18	K	7031337	水蜜丸
5	E	070101	浓缩丸	19	L	B058220	水蜜丸
6	F	20060918	浓缩丸	20	L	B058207	水蜜丸
7	F	20070539	浓缩丸	21	L	B058227	水蜜丸
8	F	20070611	浓缩丸	22	I	6420009	水蜜丸
9	G	060503	胶囊	23	I	6420011	水蜜丸
10	G	071001	胶囊	24	M	0506028	水蜜丸
11	H	070301	胶囊	25	J	111409	水蜜丸
12	H	071001	胶囊	26	N	0605707	水蜜丸
13	I	6400005	大蜜丸	27	O	051102	水蜜丸
14	I	6400006	大蜜丸				

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:水蜜丸、浓缩丸切碎,研细成粉;大蜜丸剪碎,加硅藻土适量,研匀。水蜜丸取 6.0 g;大蜜丸取 9.0 g;浓缩丸取 2.6 g;胶囊取 1.2 g,分别置圆底烧瓶中,加入乙醚 40 mL,加热回流提取 1 h,放冷,滤过,收集滤液并挥去乙醚,残渣加丙酮 1.0 mL 使溶解,即得。

2.2 色谱条件:硅胶 G 高效板(20.0 cm×10.0 cm);点样量:2 μ L,半自动点样仪喷雾带状点样;展开剂:环己烷-醋酸乙酯(3:1),上行展开;温度:21.7 $^{\circ}$ C;控制相对湿度:36.0%;展距:80 mm;显色剂:10%硫酸乙醇溶液,100 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。

2.3 扫描条件:D2 & W 灯,双波长扫描: $\lambda_s = 366$ nm, $\lambda_R = 450$ nm,滤光片 K400,狭缝 6.00 mm×0.30 mm,扫描速度:20 mm/s。CAMAG Wincats 薄层色谱扫描及评价软件自动进行数据处理。

2.4 样品测定:取不同厂家的 27 批样品,分别制备供试品溶液,展开并进行扫描分析,确定 8 个主要色谱峰为指纹峰。由于样本数量较多,本实验用 3 张薄层板在同样条件下分析所有样品,TLC 色谱图见图 1。

鉴于篇幅有限,本实验仅以第一张(1~8 样本)薄层板 TLCS 指纹图谱为例进行说明,其薄层色谱扫描轮廓图见图 2。

2.5 系统适用性试验:在相同温湿度条件下,选择 E 厂家批号为 070101 的样品 6 份,制备供试品溶液,扫描测定,考察各斑点 Rf 值的重现性,并计算各斑点的分离度,结果见表 2。各斑点 Rf 值的 RSD 和分离度数据表明重现性和分离度良好。

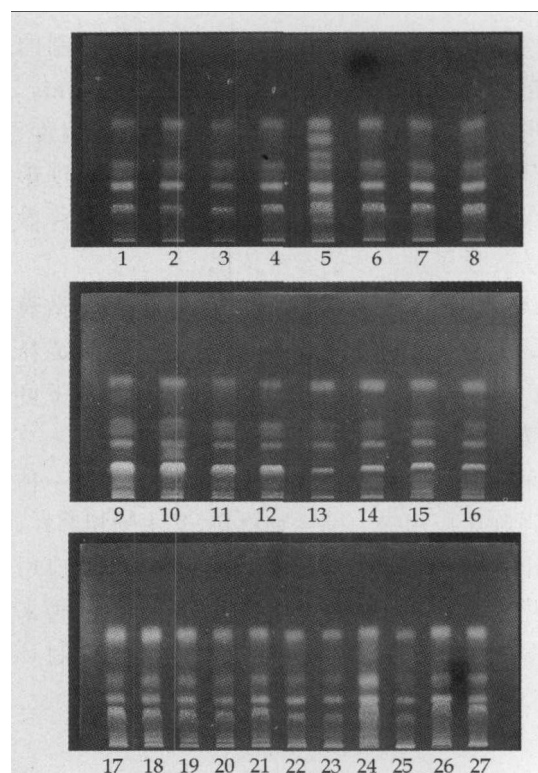


图 1 样品的薄层色谱图

Fig. 1 TLC Chromatograms of samples

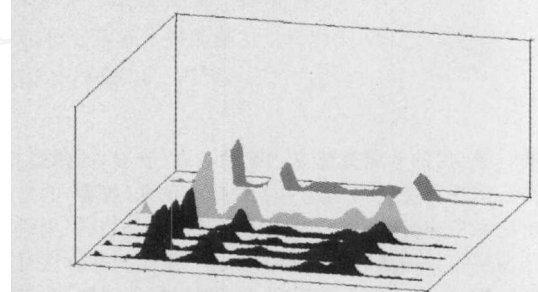


图 2 薄层色谱扫描轮廓图谱

Fig. 2 TLCS Chromatograms of samples

表 2 各斑点 Rf 值的重现性结果

Table 2 Reproducibility of Rf value at spots

编号	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8
1	0.04	0.21	0.37	0.45	0.50	0.56	0.65	0.74
2	0.04	0.20	0.35	0.43	0.48	0.54	0.63	0.72
3	0.04	0.21	0.36	0.44	0.49	0.56	0.65	0.74
4	0.04	0.21	0.36	0.44	0.50	0.56	0.66	0.74
5	0.04	0.21	0.36	0.44	0.50	0.56	0.66	0.75
6	0.04	0.21	0.37	0.44	0.51	0.57	0.67	0.75
RSD	0	1.9%	2.1%	1.4%	2.1%	1.8%	2.1%	1.5%
分离度	5.7	2.5	1.1	1.0	0.9	1.3	1.1	/

2.6 峰归属的研究:对六味地黄丸各味药材分别按照供试品溶液的制备方法制备成相应样品溶液,并与六味地黄丸样品溶液色谱峰进行比对,得到峰 1 来自熟地黄+山茱萸+牡丹皮 3 味药材;峰 2 来自山茱萸药材;峰 3 来自熟地黄+山茱萸+牡丹皮 3 味药材;峰 4 来自山茱萸药材;峰 5 来自山茱萸+牡

丹皮;峰 6 来自熟地黄;峰 7 来自山茱萸+牡丹皮;峰 8 来自熟地黄+山茱萸+牡丹皮 3 味药材。可见熟地黄和山茱萸贡献较大,牡丹皮次之,山药、茯苓和泽泻没有贡献。

2.7 模式识别研究

2.7.1 聚类分析:以 27 批不同厂家和批次的六味地黄丸(胶囊)为研究对象,进行指纹图谱研究,获得 8 个特征色谱峰,以其峰高作为数据参变量,得到 27×8 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 统计分析软件对其进行系统聚类分析,利用皮尔逊相关系数(Pearson correlation)作为样本的测度,采用类间平均链锁法(between-groups linkage)进行聚类,将 27 个样本分为 3 类,见图 3。

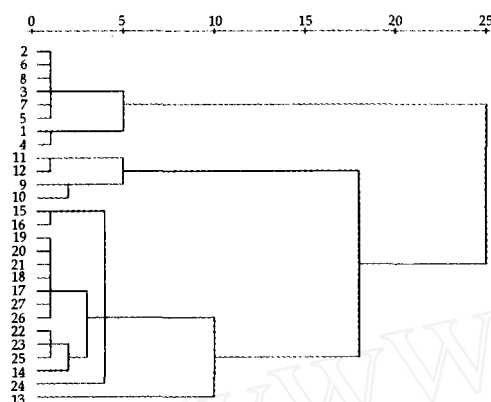


图 3 六味地黄丸(胶囊)样本的聚类谱系图

Fig. 3 Hierarchical cluster dendrogram of Liuwei Dihuang Pills (Capsulas)

可以看出,27 个样本总共可以分为 3 类,其中,2、6、8、3、7、5、1、4 为第 1 类,均为浓缩丸;11、12、9、10 为第 2 类,均为胶囊制剂;15、16、19、20、21、18、17、27、26、22、23、25、14、24、13 为第 3 类,均为蜜丸,包含大蜜丸和水蜜丸。其中 I 厂家的样本(13、14、22、23)、J 厂家(15、16、25)无论大蜜丸和水蜜丸均为在第 3 类中,说明 I 厂家和 J 厂家的产品质量相近,而水蜜丸和大蜜丸质量相差并不大。而所取的 F 厂家样本(6、7、8 号)比较紧凑,证明这几个批号六味地黄丸质量比较稳定。11、12、9、10 号为胶囊制剂在聚类谱图中距离非常相近并独自聚为一类,说明胶囊制剂与其他剂型差异较大。浓缩丸均在第 1 类中,而蜜丸均在第 3 类中,说明生粉直接入药的浓缩丸和以不同比例蜂蜜为辅料的蜜丸(含水蜜丸和大蜜丸)之间质量存在一定差异。

2.7.2 主成分分析:主成分分析作为数据挖掘的一种方法能够用于中药指纹图谱的统计分析。本研究应用 SPSS 统计分析软件对此 27 个样本进行了主

成分分析,即将它们投影至低维空间来看它们之间的微细差别,先将 27×8 的原始数据矩阵经标准化处理,再对其进行运算,主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前 m 个主成分。结果第 1 主成分的特征值 $\lambda_1 = 3.725$,方差贡献率为 46.560%;第 2 主成分的特征值 $\lambda_2 = 1.375$,方差贡献率为 17.190%;第 3 主成分的特征值 $\lambda_3 = 1.019$,方差贡献率为 12.744%。3 个主成分的累计方差贡献率为 76.494%,故选取前 3 个主成分得分矢量来作图。3 个主成分的得分图见图 4,图中每个点对应 1 个样本。可知此 27 个样本可分为 3 类,与聚类分析结果一致,即可验证聚类结果图,聚类结果合理。

初始因子载荷矩阵见表 3,每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数。将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便得到两个主成分中每个指标所对应的系数,经计算可得主成分的模型为:

$$F_1 = 0.167X_1 + 0.426X_2 + 0.440X_3 + 0.440X_4 - 0.067X_5 + 0.436X_6 - 0.303X_7 - 0.341X_8$$

$$F_2 = -0.501X_1 - 0.081X_2 + 0.319X_3 + 0.129X_4 + 0.679X_5 - 0.137X_6 + 0.242X_7 - 0.293X_8$$

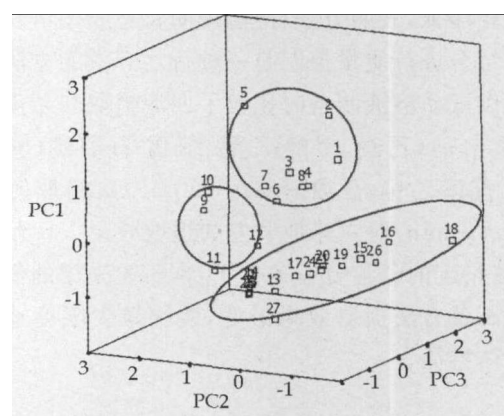


图 4 主成分得分图

Fig. 4 Score figure of principal components

表 3 初始因子载荷矩阵

Table 3 Matrix of initial factor

特征色谱峰	主成分		
	1	2	3
峰 1	0.323	-0.587	0.642
峰 2	0.822	-0.094 7	0.102
峰 3	0.849	0.374	0.141
峰 4	0.850	0.151	0.205
峰 5	-0.130	0.796	0.456
峰 6	0.842	-0.161	-0.315 8
峰 7	-0.584	0.284	0.330
峰 8	-0.659	-0.343	0.465

$$F_3 = 0.636X_1 + 0.101X_2 + 0.140X_3 + 0.203X_4 + 0.452X_5 - 0.031X_6 + 0.327X_7 + 0.461X_8$$

F_1 、 F_2 、 F_3 分别表示 3 个主成分, X_1 、 X_2 …… X_8 分别表示各个色谱峰(峰 1、2……8)的经过标准化处理的值,因为在实际应用中,往往存在指标的量纲不同,本研究所采用的数据就存在量纲影响,所以在计算之前须先消除量纲的影响,而将原始数据 Z 标准化。

主成分分析在不损失样本特征值的数量和信息前提下,采用降维模式分类方法,将反映六味地黄丸薄层指纹图谱多维多信息特征的 27×8 维参数用 3 个主成分来描述原有数据特征,不仅表明主成分分析确实能够起到降维作用,同时使繁多的求解目标简化,便于数据分析,而且原有信息损失少,适用于中药指纹图谱的数据挖掘。

3 讨论

中成药为复方制剂,其化学成分甚为复杂,其作用往往是多种成分协同作用的结果,而不仅仅是其中某几个有效成分的个别功效。本研究建立了六味地黄丸(胶囊)的薄层指纹图谱,并对收集到的 27 个样本进行测定,使用聚类分析及主成分分析化学模式识别的方法,对其进行了研究,两种方法分类结果可以互相印证,表明方法合理,说明将指纹图谱和模式识别结合进行质量控制是一种行之有效的方法。

在供试品溶液制备时比较了回流提取和超声提取、提取溶剂(乙醚、甲醇-乙醚、氯仿-石油醚(60~90℃)、醋酸乙酯-石油醚(60~90℃))、提取时间(30、60、90 min)对六味地黄丸的提取效果^[6]。结果表明,在指定的色谱分析条件下,本实验采用的供试品溶液制备方法提取效果最好,能够最大限度地反映其总体特征。

在色谱条件优化中,最终确定了环己烷-醋酸乙酯(3:1)的展开体系,样品得到较好的分离。为了使尽量多的化合物被检测,展开完毕后喷以 10% 硫酸乙醇溶液于 100℃ 烘至斑点显色清晰,并采用 CAMAG Scanner 3 薄层色谱扫描系统,提取各色谱成分最大吸收的色谱图与不同波长的色谱图进行比较,当选择 366 nm 为检测波长时,色谱成分检出率最多,满足了信息量最大化的原则,故选择 366 nm 为扫描波长。

中药指纹图谱技术作为一种表征中药所含成分与其质量关系的有效手段,现已成为国内外广泛接受的中药质量评价模式。本实验运用薄层色谱法测定了不同厂家不同批次的六味地黄丸(胶囊)的指纹图谱,多指标同时测定并结合聚类和主成分分析法综合评价产品质量,并反映出了样本之间的共性和差异性。

经过本实验数据分析,六味地黄丸不同剂型间成分存在明显差异,成分量的差异将会影响到药物疗效,建议在剂型改革过程中,药物疗效进行重新评价,进而达到中药质量控制的最终目标保证药物临床安全有效。

参考文献:

- [1] 高 鹏,代 龙. 薄层色谱法在中药指纹图谱研究中的应用[J]. 山东医药工业,2002,21(6):17-19.
- [2] 王喜军,张 宁,孙 晖. 六味地黄丸指纹图谱的研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(10):1004-1005.
- [3] 陈 菲,李群力. 六味地黄丸的质量控制方法研究进展[J]. 中国医药导报,2008,5(7):19-21.
- [4] 于承浩,吕青涛,王 晶. 聚类判别分析方法评价六味地黄丸质量的研究[J]. 山东中医药大学学报,2002,26(5):375-378.
- [5] 覃洁萍,王智猛,李梦龙. 化学计量学方法在中药鉴别及质量控制方面的应用[J]. 数理医药学杂志,2004,17(4):351-355.
- [6] 何作民,吴子超,钟向红,等. 六味地黄丸薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2002,11(9):36-37.

茵柏颗粒的喷雾干燥工艺研究

潘旭旺¹,田 静¹,蒋小琴¹,刘金城¹,程巧鸳²

(1. 杭州市第六人民医院 药物实验室,浙江 杭州 310014; 2. 浙江省食品药品检验所 中药室,浙江 杭州 310004)

摘 要:目的 对茵柏颗粒的喷雾干燥工艺进行优化。方法 以含水率和吸湿率为指标,并参考其流动性优选了加入浸膏的辅料;采用正交设计法,以复方中吸湿率和绿原酸质量分数作指标,确定了最佳工艺条件,并考察浸膏干粉含水率、流动性和临界相对湿度。结果 加入 1% 的微粉硅胶、14% 的可溶性淀粉,可以极大地降低浸膏粉

收稿日期:2009-02-20

基金项目:浙江省中医药科技计划资助项目(2007CA115)

作者简介:潘旭旺(1982—),浙江浦江人,中药师,硕士,主要致力于药物新剂型、新制剂研究。

Tel/Fax:(0571)85463956 E-mail:pxuwan@163.com