

基于传统煎药工艺的龙胆饮片标准汤剂制备及质量评价方法研究

朱广伟¹, 李西文¹, 李琦^{2*}, 刘傲雪³, 罗赣¹, 杉田享⁴, 友田健久⁴, 范自全⁵, 王丹丹⁵

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 上海市药材有限公司, 上海 200002

3. 北京中医药大学, 北京 100102

4. 日本国株式会社津村, 东京 107-8521

5. 沃特世科技(上海)有限公司, 上海 201206

摘要: **目的** 建立5产地15批次龙胆饮片标准汤剂质量评价方法, 并以出膏率、指标成分及转移率、指纹图谱为指征进行研究。**方法** 以水为溶剂, 参照传统煎药工艺制备标准汤剂, 采用UPLC-DAD法测定龙胆苦苷量, 计算转移率、出膏率, 采用UPLC/Q-TOF-MS/MS法进行指纹图谱研究并确认共有峰。**结果** 15批次龙胆样品制成的标准汤剂中龙胆苦苷量为1.57~2.81 mg/mL, 龙胆苦苷转移率在50.71%~67.70%, 平均转移率为59.20%, 标准偏差(RE)为7.31%。出膏率为15.72%~25.52%, 平均出膏率为19.20%, RE为2.85%。指纹图谱共有峰10个, 确认10个, 分别为紫丁香酸葡萄糖苷、1-(4-羟基-3-甲氧基)-苯基-1,2,3-丙三醇或异构体、马钱酸、四乙酰开联番木鳖苷、龙胆苦苷、naphtho(2,3-c)furan-1(3H)-one-9-(acetyloxy)-6-methoxy-8-[(2,3,4-tri-O-acetyl-6-O-(2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)oxy] 或异构体、C₄₆H₅₄O₂₈ (未知化合物)、C₄₆H₅₄O₂₇ (未知化合物)、macrophyllside B、isomacrophyllside。**结论** 15批次龙胆饮片标准汤剂制备工艺符合传统汤剂制法, 样品来源具有代表性, 样品批次符合指纹图谱研究要求, 质量评价内容涵盖面广, 所得数据具有代表性, 可用于龙胆饮片标准汤剂的制备及质量评价, 可以为配方颗粒标准的制定及工业化生产提供基础数据支撑。

关键词: 龙胆; 标准汤剂(标准煎液); 配方颗粒; 指纹图谱; UPLC/Q-TOF-MS/MS; 紫丁香酸葡萄糖苷; 马钱酸; 四乙酰开联番木鳖苷; 龙胆苦苷; macrophyllside B; isomacrophyllside

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)20-4253-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.020

Study on preparation and quality evaluation of standard decoction of *Gentiana Radix* based on traditional decocting process

ZHU Guang-wei¹, LI Xi-wen¹, LI Qi², LIU Ao-xue³, LUO Gan¹, Toru Sugita⁴, Takehisa Tomoda⁴, FAN Zi-quan⁵, WANG Dan-dan⁵

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China

2. Shanghai Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Shanghai 200002, China

3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

4. TSUMURA & Co., Tokyo, 107-8521, Japan

5. Waters Technologies (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201206, China

Abstract: Objective To evaluate the extraction ratio, content determination, transfer ratio, and feature maps or fingerprints by establishing 15 batches of standard decoction of *Gentiana Radix* from five different places. **Methods** The *Gentiana Radix* was dissolved in water based on the traditional decoction process, the content of gentiopicroside was determined by UPLC-DAD, the transfer ratio, the extraction ratio, the fingerprints and the common peaks were evaluated by UPLC/Q-TOF-MS/MS. **Results** The determination of gentiopicroside of 15 batches of standard decoction was in the range of 1.57—2.81 mg/mL, the transfer ratio of

收稿日期: 2017-05-19

基金项目: 中国中医科学院中药研究所、上海市药材有限公司、日本国株式会社津村科研合作项目——标准汤剂、中药配方颗粒国家标准和药材DNA条形码鉴定体系研究(H2016021-06)

作者简介: 朱广伟, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药效物质基础研究、中药药效组分评价体系研究。E-mail: gwzhu@icmm.ac.cn

*通信作者 李琦, 上海市药材有限公司, 高级工程师。E-mail: liq@shstem.com

gentiopicroside was in the range of 50.71%—67.70%, the average transfer ratio was 59.20%, and the standard deviation was 7.31%. The extraction ratio was in the range of 15.72%—25.52%, the average extraction ratio was 19.20% and the standard deviation was about 2.85%. Ten peaks of fingerprint were confirmed in this research, such as lilac glucoside, 1-(4-hydroxy-3-methoxy)-phenyl-1,2,3-glycerol or isomer, loganate, secologanoside, gentiopicroside, naphtho(2,3-c)furan-1(3H)-one-9-(acetyloxy)-6-methoxy-8-[(2,3,4-tri-*O*-acetyl-6-*O*-(2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -*D*-xylopyranosyl)- β -*D*-glucopyranosyl)oxy] or isomer, $C_{46}H_{54}O_{28}$ (unknown compound), $C_{46}H_{54}O_{27}$ (unknown compound), macrophyllside B, and isomacrophyllside. **Conclusion** The preparation method in this paper conforms to the traditional decoction method, the analyzed samples had representiveness, the batches fit the fingerprint research requirements, the content of quality evaluation covers a wide range and the data obtained are representative. It can be used for the standard preparation and quality evaluation of traditional Chinese medicine and providing basic data for the quality and the industrialization of dispensing granules.

Key words: *Gentiana Radix*; standard decoction; dispensing granules; fingerprint; UPLC/Q-TOF-MS/MS; lilac glucoside; loganate; secologanoside; gentiopicroside; macrophyllside B; isomacrophyllside

中药饮片古法多以水煎煮成汤入药,包括单味饮片及复方制剂,中药汤剂制法考究、工艺严谨^[1],讲究入药先后,讲究火候文武,讲究水量多寡,以古法制取的汤药多经临床验证且具有确切的疗效。然而,经过数千年的发展和演化,由于度量衡的古今差异,及煎药工艺和设备的创新和改进,传统煎药工艺已无法在现代社会得以完整复制,致使古今汤药工艺悬殊、药效千差万别,也出现了以优化工艺制备中药汤剂的报道^[2],各研究机构也以各自的工艺制备汤剂,导致出现同一饮片或复方呈现不同疗效的问题,这在很大程度上导致了患者对中药疗效的质疑,也使得科研人员对研究结果的不自信,中药汤剂的制备已经成为很多中医药从业人员关注的焦点^[3]。

2009 年,国家中医药管理局印发了《医疗机构中药煎药室管理规范》,首次在现代工艺及设备条件下规范了各类中药的煎煮工艺。2016 年 4 月,笔者课题组(陈士林等)发表了“中药饮片标准汤剂研究策略”^[4]的文章,详细阐述了中药饮片标准汤剂的概念,认为中药饮片标准汤剂是以中医理论为指导、临床应用为基础,参考现代提取方法,经标准工艺制备而成的单味饮片水煎剂,用于标化不同的临床用药形式是否与传统汤剂一致。

2016 年 8 月国家药典委员会在《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》中(以下简称《征求意见稿》),首次以官方文件提出了标准汤剂的概念,这为标准汤剂的研究奠定了坚实基础。中药饮片标准汤剂在传承传统中药煎药工艺的基础上,结合《医疗机构中药煎药室管理规范》(以下简称《规范》)相关规定及现代煎药工艺、设备,根据实际研究结果更进一步地细化了各类饮片煎煮

工艺参数^[4],即根及根茎、种子果实类:头煎加 7 倍量水,二煎加 6 倍量水;枝干皮藤类:头煎加 8 倍量水,二煎加 7 倍量水;花叶全草类:头煎加 12 倍量水,二煎加 10 倍量水。一般饮片头煎 30 min,二煎 20 min;质地坚硬、滋补类头煎 60 min,二煎 40 min。本课题以龙胆为研究对象,以市售 5 个产地 15 批次龙胆饮片为材料,经 DNA 分子鉴定^[5-6],购买的 15 批龙胆样品均为龙胆科龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 的干燥根。以标准化工艺制备龙胆饮片标准汤剂,并考察标准汤剂中龙胆苦苷量、转移率及标准汤剂出膏率范围、指纹图谱,旨在为龙胆饮片标准汤剂质量标准的制定及龙胆配方颗粒的制备提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

ABI 2720 PCR 仪、ABI 3730 基因测序仪、Sartorius-BS-210S (210 g/0.1 mg) 型电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司;KQ-100E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;LD510-2 型(500 g/0.1 g) 电子天平,沈阳龙腾电子有限公司;H1650-W 型台式高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。安捷伦 1290 InfinityII 型超高效液相色谱仪,配备 G7167B 型自动进样系统, G7117A 型 DAD 检测器, G7166B 型柱温箱,美国安捷伦公司;Waters Acquity UPLC H-Class 型高效液相系统和 Xevo G₂-XS 型 Q-TOF 高分辨质谱,美国沃特世公司。

1.2 受试药物

龙胆苦苷,批号 160806,质量分数 $\geq 98\%$,购自成都普菲德生物技术有限公司。龙胆饮片分别产自广西、甘肃、黑龙江、云南、贵州,购自成都荷

花池药材市场(购买时间:2016年12月),经DNA分子鉴定所购15批龙胆样品均为龙胆科植物龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 的干燥根,详细信息见表1,其中饮片规格按照成都荷花池药材市场对中药饮片的分类标准进行划分,是饮片流通过程中制定价格的重要依据。统货指未经筛选,大小货混在一起的一种规格;选货指经过筛选,外观、形状基本一致的一种规格;特选指经过筛选,将外观、形状较好的饮片划分为一类的一种规格。

表1 样品来源
Table 1 Sample source

编号	产地	基原物种	规格	批号
LD01	广西	龙胆科龙胆	选货	20150903006
LD02	甘肃	龙胆科龙胆	选货	20160306015
LD03	甘肃	龙胆科龙胆	特选货	20160306021
LD04	甘肃	龙胆科龙胆	统货	20160306028
LD05	黑龙江	龙胆科龙胆	特选货	20160705121
LD06	黑龙江	龙胆科龙胆	选货	20160705101
LD07	黑龙江	龙胆科龙胆	特选货	20160705117
LD08	黑龙江	龙胆科龙胆	统货	20150610215
LD09	黑龙江	龙胆科龙胆	统货	20150602010
LD10	云南	龙胆科龙胆	选货	20160811015
LD11	云南	龙胆科龙胆	特选货	20160811020
LD12	云南	龙胆科龙胆	统货	20160811031
LD13	贵州	龙胆科龙胆	统货	20160704100
LD14	贵州	龙胆科龙胆	特选货	20160704102
LD15	贵州	龙胆科龙胆	选货	20160704109

2 方法与结果

2.1 基原鉴定

每批次龙胆基原鉴定检测按药材和饮片取样法(《中国药典》2015年版附录IIA)取样,使用DNA测序仪对目的条带进行双向测序,将获得的序列在中药材DNA条形码鉴定系统(<http://www.tcmbarcode.cn>)中应用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 方法进行结果判定。测序后拼接序列经与数据库及龙胆标准参考序列比对,结果显示15批次样品均为龙胆科植物龙胆 *Gentiana scabra* Bge. 的干燥根和根茎。

龙胆 ITS2 检测序列: CGCATCGCGTCGCCCC CCCAACACCGTGCATGAAACATTGCCGGTTGT CAGAGGGGCGGATATTGGCTTCCCGTGCTTCG GTGCGGCTGGCCTAAATGCAAGTCCCTTGCGA

CGGACACGACGACAAGTGGTGGTTGATTGCCT CAACTAAGGTGCTGTGCGCGCTTGCCCCGTCG GATGAGGAGACTTTCATGACCCTAATGCACGT GTCGTCACGACGCCTGCCACGACCG。

龙胆 psbA-trnH 检测序列: GACCTCAGTCTTA ATCCTATAATATAGAATATAGGATTAAGAATTAA AATAAAGGAGCAATAACGCCCCCTTGATAAAA CAAGAAGGGGATTATTGCTCCTTTATTTTAATAT TTTAATTTTATTTTCGGTAAGGATTATTATTATTC GGTAAGGATTATTATTAGAAATTTTATTAGATT ATTTTAATAATCTATATTCAAATATTATCTATATTA AAATATTAGTTACCAATATTGGTAACTAAGATAT AAAGAAGAAAAAGAAGAGTATATTTGAAATGA CATTACAATATAACTAATTCTAAAAAACTAGT AAAACAAAAAAATATAAAAAAGAGTTAAAAA AAGAAAAAAGTATCAAAAATTTAAAGACTAAA AAAATACAGATAGTCAAGGGG。

2.2 定量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 7.4 mg 龙胆苦苷对照品,加甲醇定容至 10 mL,得到质量浓度为 0.74 mg/mL 的龙胆苦苷溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

(1) 饮片供试品溶液制备:精密称取表1中各批次样品 0.5 g,按照《中国药典》2015年版制备供试品溶液。

(2) 标准汤剂供试品溶液制备:精密称取表1中各批次样品 50 g,分别加 7 倍量水,浸泡 30 min,武火煮沸并保持微沸 30 min,滤出煎煮液,再加 6 倍量水煎煮 20 min,合并 2 次煎煮液,减压浓缩至 500 mL,得到质量浓度为 0.1 g/mL 的原药材溶液。精密量取 1 mL 原药材溶液,离心并分离出上清液,得标准汤剂溶液,备用。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Thermo-C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 2.6 μm);流动相为 0.1%醋酸水溶液-乙腈,洗脱梯度: 0~15 min, 5%~15%乙腈; 15~35 min, 15%~45%乙腈;体积流量 0.4 mL/min;进样量 5 μL;柱温 30 °C;检测波长 270 nm。色谱图见图 1。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项中对照品溶液 0.4、0.8、1.4、1.6、1.8、2.0 mL,甲醇定容至 10 mL,再按照“2.2.3”项下色谱条件测定各成分的峰面积,以龙胆苦苷进样量为横坐标(X),270 nm 波长下峰面积为纵坐标(Y)计算回归方程 $Y=2\ 968\ 536.461\ X-2.985$, $R^2=1.000$ 。

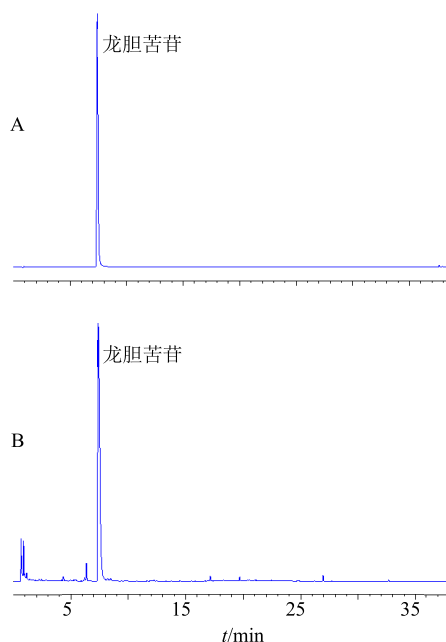


图 1 龙胆苦苷对照品 (A) 和龙胆标准汤剂 (B) 的 UPLC-DAD 图

Fig. 1 UPLC-DAD chromatogram of gentiopicroside (A) and standard decoction of *Radix Gentiana* (B)

2.2.5 精密度试验 取龙胆标准汤剂供试品溶液 (饮片批号 20160811015), 按照“2.2.3”项色谱条件连续进样 6 次, 测定龙胆苦苷峰面积的 RSD 为 1.11%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取龙胆标准汤剂供试品溶液 (饮片批号 20160811015), 按照“2.2.3”项色谱条件, 分别于 0、4、8、10、12、24 h 进样, 经计算, 龙胆苦苷峰面积 RSD 为 1.20%, 表明 24 h 内标准汤剂供试品溶液稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批龙胆饮片 (饮片批号 20160811015), 平行制备 6 份龙胆标准汤剂供试品溶液, 按照“2.2.3”项下色谱条件进样, 经计算, 龙胆苦苷质量浓度的 RSD 为 2.12%, 表明本方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定龙胆苦苷量的龙胆标准汤剂供试品溶液 (饮片批号 20160811015) 6 份, 分别加入相同量的龙胆苦苷, 再按“2.2.3”项色谱条件进样, 龙胆苦苷的平均回收率为 98.49%, RSD 为 1.39%。

2.2.9 测定方法 分别精密吸取“2.2.2”项下各供试品溶液 5 μ L 进样, 按照“2.2.3”项下色谱条件测定峰面积, 根据外标法计算龙胆饮片及标准汤剂中龙胆苦苷量, 结果见表 2。

表 2 龙胆饮片、标准汤剂中龙胆苦苷量及其转移率

Table 2 Content and the transfer rate of gentiopicroside

样品编号	龙胆苦苷量		转移率/%
	饮片/%	标准汤剂/(mg·mL ⁻¹)	
LD01	3.32	1.93	58.18
LD02	3.80	2.65	69.70
LD03	4.62	2.16	46.81
LD04	3.19	1.92	60.21
LD05	4.14	2.81	67.70
LD06	3.98	2.58	64.79
LD07	4.56	2.64	57.93
LD08	3.14	2.10	66.64
LD09	3.07	2.07	67.23
LD10	3.20	1.63	50.88
LD11	3.37	1.74	51.73
LD12	3.08	2.00	64.73
LD13	3.09	1.57	50.71
LD14	3.27	1.79	54.66
LD15	3.23	1.81	56.11

2.3 转移率及出膏率

2.3.1 龙胆苦苷转移率 根据“2.2.4”项测定结果, 按照转移率计算公式 (转移率 = W/M , 其中 W 为汤剂中龙胆苦苷的量, M 为饮片龙胆苦苷的量) 计算龙胆苦苷转移率, 结果见表 2。

2.3.2 出膏率考察 精密量取“2.2.2 (2)”项中标准汤剂供试品溶液 10 mL, 置蒸发皿中, 真空干燥 (40 $^{\circ}$ C) 至恒定质量, 计算出膏率, 结果 LD01~LD15 出膏率分别为 22.18%、18.08%、15.78%、20.24%、25.52%、20.46%、17.80%、19.03%、17.30%、15.72%、23.60%、18.50%、17.88%、16.12%、19.86%。出膏率计算公式: 出膏率 = $wV/(vM)$, 其中 M 为药材量, V 为中药饮片标准汤剂体积, v 为取样体积, w 为取样所得干膏量。

2.4 龙胆标准汤剂指纹图谱研究

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Cortecs C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μ m), 流动相为 0.2% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~7 min, 6%~7.5% 乙腈; 7~12 min, 7.5%~19% 乙腈; 12~17 min, 19%~35% 乙腈; 17~21 min, 35%~40% 乙腈; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 波长 242 nm。

2.4.2 质谱条件 电喷雾电离离子源 (ESI), 离子化模式为正、负离子, 离子源温度 150 $^{\circ}$ C, 脱溶剂气体为高纯度氮气, 温度 550 $^{\circ}$ C, 体积流量 800 L/h,

毛细管电压 1.0 kV, 锥孔电压 30 V, 扫描范围 m/z 50~1 200。

2.4.3 指纹图谱的建立及共有峰的标定 按照“2.4.1”项色谱条件将 15 批龙胆标准汤剂供试品溶

液 1 μL 进样分析, 指纹图谱及其生成的对照指纹图谱见图 2, 其中共有峰 10 个, 通过 UPLC/Q-OF-MS/MS 串联质谱 (Waters 公司提供) 指认 (批号 20150903006), 见图 3 和表 3。

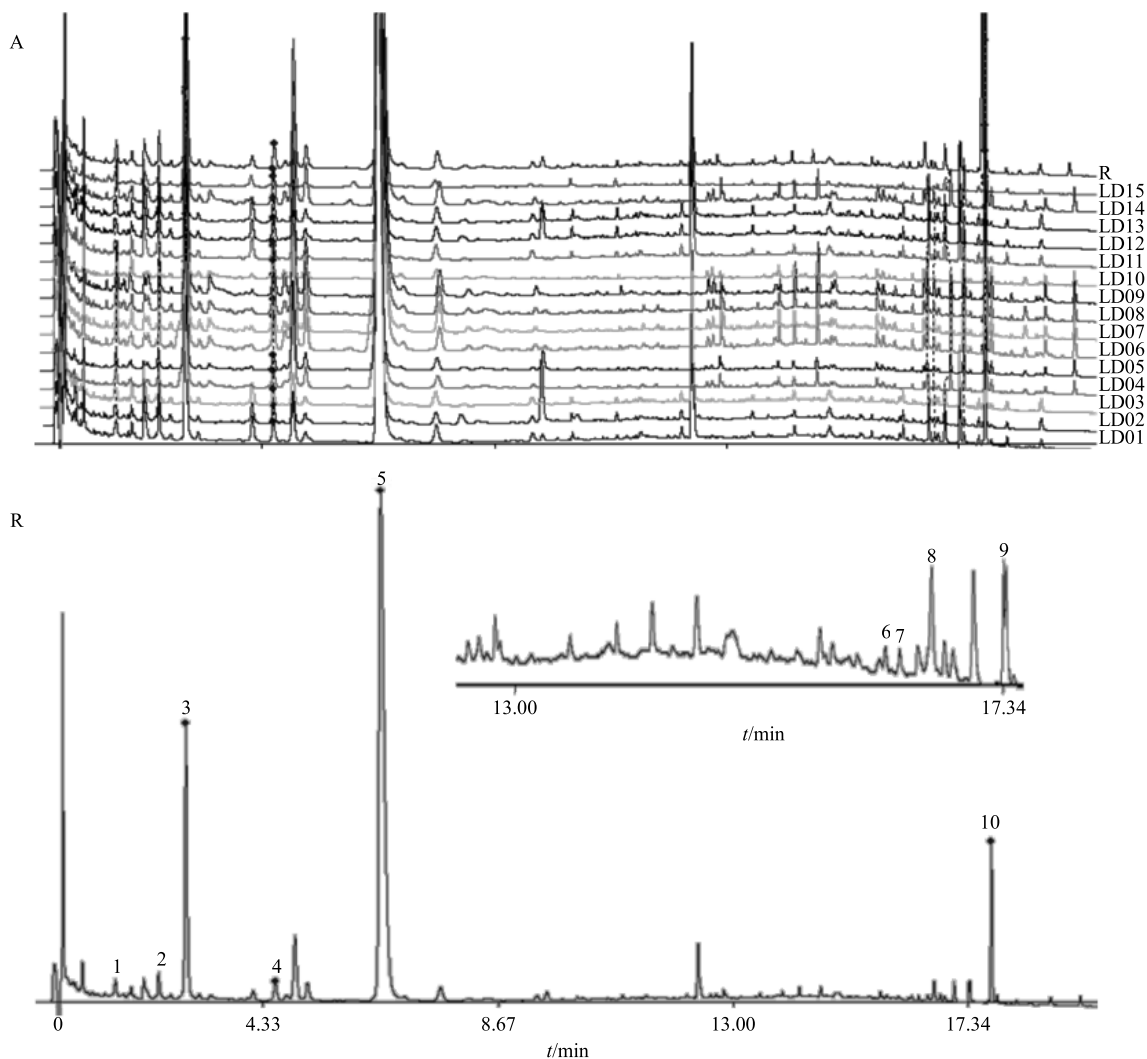


图 2 15 批龙胆标准汤剂供试品溶液 UPLC-DAD 指纹图谱 (242 nm, A) 及其对照指纹图谱 (R)
Fig. 2 Fifteen batches of UPLC-DAD fingerprints of standard decoction (242 nm, A) and its reference fingerprint (R)

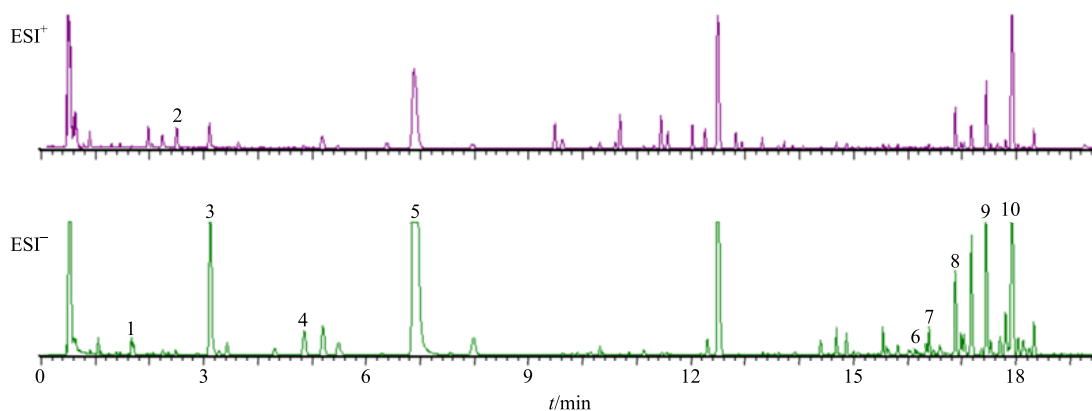


图 3 UPLC-ESI-MS/MS 总离子流 (ESI^+ , ESI^-)
Fig. 3 Total ion current of UPLC-ESI-MS/MS (ESI^+ , ESI^-)

表 3 指纹图谱共有峰鉴定结果

Table 3 Identification of common peaks in fingerprints

峰号	t_R/min	分子式	实测值 (m/z)	化合物名称	偏差	MS/MS	加合物
1	1.67	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	359.097 1	紫丁香酸葡萄糖苷	-1.3	197.044 3, 182.021 0, 153.054 4	-H
2	2.50	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5$	215.092 1	1-(4-羟基-3-甲氧基)-苯基-1,2,3-丙三醇或异构体	0.7	179.070 7, 151.075 6, 133.065 4	+H
3	3.12	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	375.129 1	马钱酸	-0.6	213.075 8, 179.056 1, 169.086 0	-H, +HCOO
4	4.86	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	389.108 1	四乙酰开联番木鳖苷	-0.9	345.118 0, 209.043 1, 165.054 6	-H
5	6.91	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9$	401.108 4	龙胆苦苷	-0.5	193.050 2, 179.055 0, 149.059 4	+HCOO, -H
6	16.33	$\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$	833.213 4	naphtho (2,3-c) furan-1(3H)-one-9-(acetyloxy)-6-methoxy-8-[(2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl-6- <i>O</i> -(2,3,4-tri- <i>O</i> -acetyl- β - <i>D</i> -xylopyranosyl)- β - <i>D</i> -glucopyranosyl)oxy] 或异构体	-1.1	315.071 2, 153.018 0	-H
7	16.39	$\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{O}_{28}$	1 053.272 0	$\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{O}_{28}$ (未知化合物)	-0.5	917.257 4, 593.151 2, 477.124 7, -H 459.114 9	
8	16.88	$\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{O}_{27}$	1 037.278 0	$\text{C}_{46}\text{H}_{54}\text{O}_{27}$ (未知化合物)	-0.2	901.262 6, 577.156 9, 477.124 7, -H 459.114 3	
9	17.45	$\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{O}_{23}$	891.218 7	macrophyllside B	-1.3	755.203 8, 593.151 4, 315.071 2, -H 153.017 9	
10	17.92	$\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{O}_{22}$	875.224 0	isomacrophyllside	-1.2	739.208 7, 577.155 9, 315.071 1, -H 153.017 8	

2.4.4 相对保留时间及相对峰面积的测定 对照指纹图谱中,以龙胆苦苷色谱峰(5号峰)的保留时间为1.000和以马钱酸(3号峰)峰面积为1.000,计算各峰的相对保留时间和相对峰面积,见表4。

2.4.5 指纹图谱相似度评价 采用中药指纹图谱相似度评价系统2004A版进行相似度分析,15批次标准汤剂均符合指纹图谱相似度要求(大于0.900),见表5。LD01~LD15相似度依次为0.990、0.986、

0.989、0.998、0.995、0.998、0.998、0.998、0.997、0.992、0.990、0.988、0.988、0.998、0.985。

2.5 聚类分析

采用SPSS统计软件对所得的UPLC指纹图谱进行系统聚类分析,采用组间连接法,利用夹角余弦作为样品的测度,聚类分析将5个产地15批次的龙胆标准汤剂分为3类(图4),其中S4~S9、S14列为第I类;LD01~LD03、LD11~LD13、LD15列为第II类;LD10列为第III类。经产地溯源发现,第I类饮片来源于甘肃、黑龙江、贵州;第II类饮片来源于广西、甘肃、云南、贵州;第III类饮片来源于云南。经等级溯源发现,黑龙江产的统、选、特选货,甘肃统货,贵州特选货具有较高的品质相似度;广西选货,甘肃选、特选货,贵州统货,云南统、特选货有较高的品质相似度;而云南选货与其他规格者品质相似度较低,单独列为一类(表6)。

3 讨论

通过对入选的15批龙胆饮片进行定量测定,各批次的龙胆苦苷量均符合《中国药典》2015年版要求(龙胆苦苷量 $\geq 3.0\%$),其量分别为广西选3.32%、甘肃选3.80%、甘肃特选4.62%、甘肃统3.19%、黑龙江特选4.16%、黑龙江选3.98%、黑龙江特选

表 4 各共有峰相对保留时间和相对峰面积

Table 4 Relative retention time and relative peak area of common peaks

峰号	保留时间	相对保留时间	峰面积	相对峰面积
1	1.609	0.248	56.849	0.052
2	2.408	0.371	77.525	0.071
3	2.909	0.448	1 093.994	1.000
4	4.558	0.701	87.733	0.080
5	6.499	1.000	4 482.392	4.097
6	16.767	2.580	35.094	0.032
7	17.072	2.627	48.520	0.044
8	17.328	2.666	87.050	0.080
9	17.704	2.724	343.889	0.314
10	17.823	2.742	86.063	0.079

表 5 15 批次龙胆指纹图谱相似度结果
Table 5 Similarity results of 15 batches fingerprints of gentian

样品	相似度															R
	LD01	LD02	LD03	LD04	LD05	LD06	LD07	LD08	LD09	LD10	LD11	LD12	LD13	LD14	LD15	
LD01	1.000	0.996	0.999	0.980	0.974	0.979	0.980	0.980	0.979	0.967	0.999	0.999	0.999	0.980	0.997	0.990
LD02	0.996	1.000	0.994	0.975	0.970	0.974	0.975	0.975	0.973	0.961	0.994	0.999	0.998	0.976	0.994	0.986
LD03	0.999	0.994	1.000	0.978	0.972	0.977	0.977	0.978	0.977	0.966	1.000	0.997	0.997	0.978	0.997	0.989
LD04	0.980	0.975	0.978	1.000	0.998	1.000	0.999	0.999	0.999	0.996	0.979	0.978	0.978	1.000	0.974	0.998
LD05	0.974	0.970	0.972	0.998	1.000	0.999	0.999	0.999	0.998	0.996	0.974	0.971	0.971	0.998	0.966	0.995
LD06	0.979	0.974	0.977	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	0.997	0.979	0.976	0.977	1.000	0.973	0.998
LD07	0.980	0.975	0.977	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	0.998	0.995	0.979	0.977	0.977	1.000	0.972	0.998
LD08	0.980	0.975	0.978	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	0.995	0.979	0.977	0.977	1.000	0.973	0.998
LD09	0.979	0.973	0.977	0.999	0.998	1.000	0.998	0.999	1.000	0.997	0.978	0.975	0.975	0.999	0.973	0.997
LD10	0.967	0.961	0.966	0.996	0.996	0.997	0.995	0.995	0.997	1.000	0.968	0.963	0.963	0.995	0.962	0.992
LD11	0.999	0.994	1.000	0.979	0.974	0.979	0.979	0.979	0.978	0.968	1.000	0.997	0.997	0.979	0.997	0.990
LD12	0.999	0.999	0.997	0.978	0.971	0.976	0.977	0.977	0.975	0.963	0.997	1.000	0.999	0.978	0.997	0.988
LD13	0.999	0.998	0.997	0.978	0.971	0.977	0.977	0.977	0.975	0.963	0.997	0.999	1.000	0.978	0.997	0.988
LD14	0.980	0.976	0.978	1.000	0.998	1.000	1.000	1.000	0.999	0.995	0.979	0.978	0.978	1.000	0.974	0.998
LD15	0.997	0.994	0.997	0.974	0.966	0.973	0.972	0.973	0.973	0.962	0.997	0.997	0.997	0.974	1.000	0.985
R	0.990	0.986	0.989	0.998	0.995	0.998	0.998	0.998	0.997	0.992	0.990	0.988	0.988	0.998	0.985	1.000

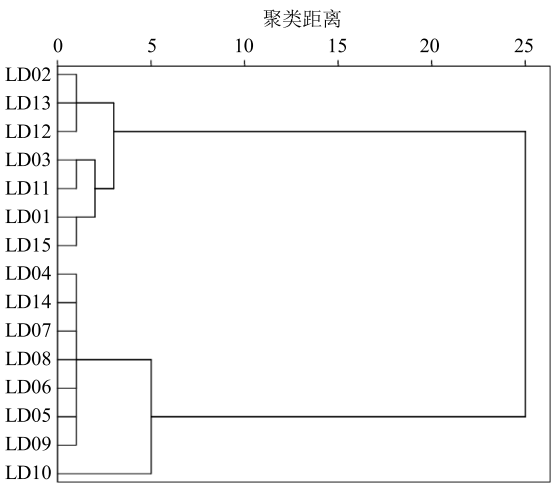


图 4 聚类分析结果
Fig. 4 Cluster analysis

表 6 饮片分类与产地及等级溯源
Table 6 Classification, origin, and grade

I	II	III
黑龙江（统、选、特选）	广西（选）	
甘肃（统）	甘肃（选、特选）	
贵州（特选）	贵州（统）	
	云南（统、特选）	云南（选）

4.56%、黑龙江统 3.14%、黑龙江统 3.07%、云南选 3.20%、云南特选 3.37%、云南统 3.08%、贵州统 3.09%、贵州特选 3.27%、贵州选 3.23%。结果表明，入选的 15 批次不同产地龙胆指标成分量均值为 3.54%，标准偏差为 0.54%，质量分数波动范围较小，品质相对稳定。

对选定的符合《中国药典》2015 年版定量要求的龙胆饮片（龙胆苦苷质量分数 3.07%~4.62%），按照标准化工艺制备成的标准汤剂指标成分质量浓度为 1.57~2.81 mg/mL，转移率为 46.81%~67.70%，平均转移率为 59.20%，标准偏差为 7.31%。出膏率范围为 15.72%~25.52%，平均出膏率为 19.20%，标准偏差为 2.85%。

通过对 15 批次龙胆饮片标准汤剂的指纹图谱研究发现，汤剂的指纹图谱相似度较高，均达到 0.9 以上，共有峰 10 个，其相对保留时间为 0.248、0.371、0.448、0.701、1.000、2.580、2.627、2.666、2.724、2.742。相对峰面积为 0.013、0.017、0.244、0.020、1.000、0.008、0.011、0.019、0.077、0.019，通过 LC-MS/MS 共确认 10 个共有峰。

4 讨论

中药饮片标准汤剂的工艺流程参照传统煎药工

艺,工艺参数在现有《规范》基础上根据各饮片的功能主治及大量研究数据^[7-13]细化而来,在传承传统工艺的同时,融合现代煎药设备及工艺特点,极大地限度地保存传统工艺的完整性。

本研究以龙胆饮片为研究模型,在原料选择上涵盖了5个不同产地,在规格上涵盖了统货、选货、特选货3种不同规格,保证了样本具有代表性、典型性,从结果来看,通过标准化工艺制备的汤剂指纹图谱具有极高的相似性,均在0.9以上,龙胆苦苷的转移率变异范围为均值的79%~118%,出膏率变异范围为均值的82%~128%,均在《征求意见稿》规定的范围(70%~130%)之内,具有较高的集中度,同时,结合聚类分析结果可以看出,对于来源于5产地、15批次的具有较大品质差异的样品,通过标准化工艺制备后,可以分为3大类,这在一定程度上消除了产地、规格等级因素对汤剂品质的影响,提高了产品的均一性。

本研究以5个产地,15批次的龙胆饮片标准汤剂为研究对象,通过测定其指标成分龙胆苦苷的含量、转移率及标准汤剂的出膏率,确定各参数变异范围,本研究可以为后期的龙胆配方颗粒的研究及生产提供基本数据支撑,根据本研究成果小试数据,结合企业现有设备及工艺,可以在一定程度上缩短中试优化时间,减少中试研究成本,最终节约企业的生产成本。

参考文献

[1] 田军军,刘莹,冯广义.中药汤剂煎煮法和有效成分溶出率关系探讨[J].吉林中医药,2008,28(5):

373-374.

- [2] 冯文杰,贾晓斌,刘丹.影响煎煮汤剂质量的多因素分析及规范化管理研究[J].中草药,2014,45(16):2422-2426.
- [3] 刘冲,刘荫贞,乐智勇,等.桂枝饮片标准汤剂质量标准研究[J].中草药,2017,48(8):1577-1583.
- [4] 陈士林,刘安,李琦,等.中药饮片标准汤剂研究策略[J].中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.
- [5] 陈士林,姚辉,韩建萍,等.中药材DNA条形码分子鉴定指导原则[J].中国中药杂志,2013,38(2):54-61.
- [6] 陈士林.中国药典中药材DNA条形码标准序列[M].北京:科学出版社,2015.
- [7] 朱广伟,李西文,陈士林.白芍饮片标准汤剂质量标准研究[J].世界中医药,2016,11(5):753-757.
- [8] 朱广伟,李西文,邬兰,等.赤芍饮片标准汤剂制备及质量标准研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(12):2062-2069.
- [9] 孙宝莹,郭涛,李西文,等.葛根饮片标准汤剂的研究[J].世界中医药,2016,11(8):1586-1589.
- [10] 李琦,章军,崔文金,等.黄芩饮片标准汤剂的制备和质量标准评价[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):36-40.
- [11] 徐姣,赵嵘,代云桃,等.栀子标准汤剂的质量评价方法考察[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):30-35.
- [12] 张鹏,邬兰,李西文,等.人参饮片标准汤剂的评价及应用探讨[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):2-11.
- [13] 刘安.中药饮片标准汤剂制备与质量标准研究方法概述[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(7):1.