

• 药剂与工艺 •

盐补骨脂标准汤剂质量评价体系的建立

沈晓宇¹, 刘雪松¹, 毕宇安², 徐桂红², 栾连军^{1*}

1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要: **目的** 建立盐补骨脂标准汤剂质量评价体系。**方法** 收集了 15 批合格的补骨脂药材, 炮制成符合《中国药典》2015 年版规定的盐补骨脂饮片, 制备盐补骨脂标准汤剂冻干粉, 建立 HPLC 指纹图谱, 对共有色谱峰进行指认, 并结合飞行时间质谱确定其主要化学组成。**结果** 苯并呋喃苷类和呋喃香豆素类为盐补骨脂标准汤剂的主要成分。测定 15 批标准汤剂的出膏率为 16.31%~20.59%, 指标成分补骨脂素、异补骨脂素总量为 1.17%~1.50%, 转移率为 13.55%~23.57%, 且指纹图谱相似度均大于 0.9。**结论** 建立了稳定、可靠的盐补骨脂标准汤剂全面质量评价方法, 为盐补骨脂配方颗粒及相关制剂的质量控制提供参考。

关键词: 盐补骨脂; 标准汤剂; 配方颗粒; 指纹图谱; 质量评价; 补骨脂素; 异补骨脂素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)01-0100-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.014

Quality evaluation system for standard decoction of salt-processed *Psoraleae Fructus*SHEN Xiao-yu¹, LIU Xue-song¹, BI Yu-an², XU Gui-hong², LUAN Lian-jun¹

1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: **Objective** To establish a quality evaluation system for standard decoction of salt-processed *Psoraleae Fructus* (PF). **Methods** Fifteen batches of crude drugs were collected and processed into decoction pieces with salt complied with the 2015 Edition of the *Chinese Pharmacopoeia*, and then the standard decoctions of salt-processed PF were prepared as freeze-dried powders. Based on the established HPLC fingerprint, seven common peaks were recognized and the main chemical constituents were identified in combination with time-of-flight mass spectrometry. **Results** Benzofuran glycosides and furanocoumarins turned out to be the main composition of standard decoction of salt-processed PF. The dry extract yielding rate varied from 16.31% to 20.59%, while the total contents of psoralen and isopsoralen were 1.17%—1.50% with a transfer rate ranging from 13.55% to 23.57%, and the fingerprint similarity of 15 batches of samples were all higher than 0.9. **Conclusion** This stable and reliable method of comprehensive quality evaluation for standard decoction of salt-processed PF may provide reference for quality control of salt-processed PF dispensing granules and related preparations.

Key words: salt-processed *Psoraleae Fructus*; standard decoction; dispensing granules; fingerprints; quality evaluation; psoralen; isopsoralen

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 始载于《开宝本草》, 其在中医临床上的应用可追溯至唐宋年间^[1], 主要用于肾

虚作喘、腰膝冷痛、阳痿遗精、五更泄泻等。具有纳气平喘、温肾助阳、温脾止泻的功效, 可预防或治疗骨质疏松, 促进成骨细胞增殖、分化^[2], 外用

收稿日期: 2017-08-22

基金项目: 国家“重大新药创制”专项课题 (2014ZX09301308-007)

作者简介: 沈晓宇 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药质量控制与工艺研究。Tel: 13968670839 E-mail: ferrieswheel@126.com

*通信作者 栾连军 (1962—), 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为药品质量评价与控制及中药新药研发。

Tel: 13758217913 E-mail: lljun@zju.edu.cn

还可治疗白癜风、斑秃^[3]。目前,补骨脂中已分离鉴定出 40 余种化合物,主要为苯并呋喃苷类、香豆素类、黄酮类、单萜酚类^[4-6]。其中,补骨脂素、异补骨脂素及其糖苷类成分补骨脂苷、异补骨脂苷(苯并呋喃苷类)为主要药理活性成分,且研究发现补骨脂苷、异补骨脂苷在动物体内可快速吸收,并可转化为补骨脂素和异补骨脂素^[7-8],因而可将这 4 种药效物质作为质量控制的指标成分。但补骨脂生品性燥,临床上内服多以炮制品为主,其中盐炙法已被《中国药典》2015 年版收录。补骨脂盐炙后入药,不但可缓和燥性,还可引药入肾,增强补肾纳气的作用^[9]。

随着时代进步与科技发展,中药配方颗粒因其服用方便、卫生快捷、易于携带、随症加减等诸多优点在多种新型中药饮片形式中脱颖而出,可满足现代社会对药物“三效、三小、五方便”的基本要求,因而在近几年广受关注,也越来越多地被医生和患者接受。然而,中药配方颗粒与传统中药饮片汤剂在临床应用中是否等效备受争议,且尚无统一的制备工艺和质量标准^[10],仍需进一步规范和完善。为解决中药配方颗粒发展面临的问题,2016 年 8 月,国家药典委员会发布《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》,提出中药配方颗粒的药学研究须与标准汤剂进行对比,以保证与标准汤剂质量一致。

中药饮片标准汤剂(或称中药标准煎液)以中医药理论为指导,以临床应用为基础,参考现代化提取方法,是经标准化工艺制备而成的单位中药饮片水煎剂,用于标准化临床用药,可保障用药的准确性和剂量的一致性^[11-12]。中药饮片标准汤剂可作为一种标准物质和标准体系,建立不同用药形式之间的剂量关系,有利于保障临床疗效的一致性,为中药配方颗粒的标准化制备工艺和产品质量的一致性提供参照^[11]。由于汤剂不易携带和贮藏,且多为悬浊液,难以保证均匀取样,因此根据技术要求规定,一般采用冷冻干燥或适宜的方法进行干燥,将标准汤剂制成质量稳定、易于溶解且无辅料添加的标准浸膏粉^[11]。以标准汤剂为参考体系,对配方颗粒原料、中间体和成品的指纹图谱或特征图谱以及指标成分进行合理评价,体现了饮片到配方颗粒的质量传递规律^[13],也为配方颗粒产品质量的一致性提供依据。

本实验以盐补骨脂为研究对象,选用 4 个产地

的 15 批补骨脂药材,根据《中国药典》2015 年版炮制通则进行炮制,并参照《医疗机构中药煎药室管理规范》中规定的工艺参数,制备了 15 批饮片标准汤剂,并考察了标准汤剂出膏率、指标成分量及转移率等参数,建立了盐补骨脂标准汤剂 HPLC 指纹图谱,为盐补骨脂标准汤剂的质量评价及盐补骨脂配方颗粒质量标准研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器设备

Agilent1260 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;AB TripleTOF 5600+质谱系统,美国 AB SCIEX 公司;Mettler AL204 万分之一电子分析天平、Mettler XS105 十万分之一电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;飞鸽牌 TGL-16C 离心机,上海安亭科学仪器厂;超声波清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 药材及试剂

补骨脂对照药材(批号 121056-200904)、对照品补骨脂素(批号 110739-201416,质量分数 99.9%)、异补骨脂素(批号 110738-201614,质量分数 99.9%),购自中国食品药品检定研究院;对照品补骨脂苷(批号 170301,质量分数 98.65%)、异补骨脂苷(批号 160827,质量分数 99.43%),购自上海融禾医药科技发展有限公司。娃哈哈纯净水,杭州娃哈哈集团;色谱级乙腈、甲醇,天地科技有限公司;色谱级磷酸,赛默飞世尔科技有限公司;其余试剂为分析纯。

15 批(S1~S15)补骨脂药材均购自亳州市国一堂中药饮片有限公司,分别产自云南省的云县、凤庆县、永德县和镇康县,另有 3 批(S16~S18)广西产的盐补骨脂饮片,购自亳州市国一堂中药饮片有限公司,1 批(S19)河南产的盐补骨脂饮片,购自苏州市天灵中药饮片有限公司,经浙江大学徐娟华副教授鉴定为豆科补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实及其炮制品。根据《中国药典》2015 年版一部补骨脂项下有关规定进行检测,水分和定量测定数据见表 1,结果显示 15 批药材的补骨脂素和异补骨脂素总量均大于 0.70%,全部符合药典标准。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 补骨脂药材的炮制 分别取 15 批补骨脂药材各 1 kg,加盐水拌匀,闷润 12 h,待盐水被吸尽

后, 置炒制容器内, 文火加热, 炒至微鼓起, 有香气、噼啪声响, 倒出放凉, 即得盐补骨脂饮片。按照《中国药典》2015 年版盐补骨脂的定量测定和水

分检查项进行检测, 结果显示各批炮制品均符合规定 (表 2), 可作标准汤剂原料使用。

2.1.2 标准汤剂的制备 称取盐补骨脂饮片 100 g

表 1 补骨脂药材及市售盐补骨脂饮片地域信息和质量评价

Table 1 Regional information and quality assessment of 15 batches of crude drugs of PF and four batches of commercially available decoction pieces of salt-processed PF

编号	批号	产地	水分量/%	补骨脂素/%	异补骨脂素/%	编号	批号	产地	水分量/%	补骨脂素/%	异补骨脂素/%
S1	PY1610121	云南云县	7.50	0.63	0.54	S11	PY1610134	云南永德县	7.81	0.64	0.53
S2	PY1610122	云南云县	7.50	0.62	0.52	S12	PY1610137	云南镇康县	7.45	0.67	0.56
S3	PY1610123	云南云县	7.47	0.61	0.53	S13	PY1610138	云南镇康县	7.36	0.73	0.59
S4	PY1610124	云南云县	7.38	0.61	0.52	S14	PY1610139	云南镇康县	7.54	0.70	0.57
S5	PY1610126	云南凤庆县	7.42	0.67	0.56	S15	PY1610140	云南镇康县	7.16	0.64	0.52
S6	PY1610127	云南凤庆县	7.64	0.65	0.55	S16	PYP1701221	广西	4.77	0.43	0.34
S7	PY1610128	云南凤庆县	7.53	0.64	0.54	S17	PYP1701222	广西	4.21	0.43	0.35
S8	PY1610129	云南永德县	7.54	0.61	0.53	S18	PYP1701223	广西	3.95	0.47	0.37
S9	PY1610132	云南永德县	7.44	0.69	0.57	S19	Y160824	河南	4.61	0.39	0.35
S10	PY1610133	云南永德县	7.58	0.69	0.56						

表 2 盐补骨脂饮片中补骨脂素与异补骨脂素含量及标准汤剂理化特征参数

Table 2 Contents of decoction pieces and physicochemical parameters of standard decoction of salt-processed PF

批号	出膏率/ %	(补骨脂素+异补骨脂素)/%			总转移 率/%	批号	出膏率/ %	(补骨脂素+异补骨脂素)/%			总转移 率/%
		饮片	煎剂	冻干粉				饮片	煎剂	冻干粉	
PY1610121	16.76	1.12	0.02	1.23	18.17	PY1610132	16.99	1.13	0.03	1.33	20.00
PY1610122	16.89	1.02	0.03	1.33	20.53	PY1610133	17.35	1.15	0.03	1.32	19.11
PY1610123	18.29	1.07	0.04	1.17	19.00	PY1610134	17.96	1.06	0.03	1.24	14.51
PY1610124	16.31	1.08	0.03	1.43	21.00	PY1610137	17.93	1.17	0.03	1.39	17.52
PY1610126	17.82	1.16	0.03	1.50	23.09	PY1610138	18.14	1.17	0.03	1.24	18.87
PY1610127	18.33	1.12	0.03	1.34	21.24	PY1610139	20.59	1.17	0.02	1.34	13.55
PY1610128	18.37	1.11	0.02	1.42	22.91	PY1610140	17.96	1.09	0.03	1.20	18.03
PY1610129	18.55	1.05	0.03	1.35	23.57	平均值	17.88	1.11	0.03	1.32	19.41

(碾碎破皮), 加水煎煮 2 次。第 1 次加入 800 mL 水, 浸泡 30 min, 煮沸后再煎煮 60 min, 用 150 目筛网趁热滤过, 滤液迅速冷却备用; 药渣再加水 600 mL, 煎煮 50 min, 用 150 目筛网趁热滤过, 合并 2 次滤液, 快速冷却, 混匀; 减压浓缩至 60~90 g 的流浸膏, 置冷冻冰箱 (-20 ℃) 过夜, 用冷冻干燥机冷冻干燥, 即得标准汤剂冻干粉。

2.1.3 指纹图谱供试品溶液的制备 取本品粉末 0.15 g (约相当于饮片 1.0 g), 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度线, 摇匀后离心, 上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得。

2.1.4 定量测定供试品溶液的制备 取本品粉末 75 mg (约相当于饮片 0.5 g), 精密称定, 置于 100

mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀后离心, 上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液即得。

2.2 参照物溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂苷、异补骨脂苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成分别含补骨脂素 30 μg/mL、异补骨脂素 20 μg/mL、补骨脂苷 80 μg/mL、异补骨脂苷 80 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.2.2 对照药材溶液的制备 取补骨脂对照药材粗粉约 1.0 g, 精密称定, 置于 100 mL 锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL 后称定质量, 超声 40 min, 取出放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀后离心, 上清液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3 HPLC 指纹图谱分析

2.3.1 色谱条件 AkzoNobel Kromasil 100-5- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 10%~18% 乙腈; 5~20 min, 18%~20% 乙腈; 20~25 min, 20%~46% 乙腈; 25~35 min, 46%~54% 乙腈; 35~48 min, 54%~58% 乙腈; 48~55 min, 58%~65% 乙腈; 55~65 min, 65%~70% 乙腈; 65~75 min, 70%~85% 乙腈; 体积流量为 1 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长为 245 nm; 进样量 10 μ L。

2.3.2 质谱条件 采用 UPLC-Triple-TOF 5600⁺ 飞行时间液质联用仪; 离子化模式为正、负离子扫描模式; 扫描范围: m/z 100~1 500; 雾化气 (GS_1): 344.75 kPa (50 psi); 干燥气 (GS_2): 344.75 kPa (50 psi); 气帘气 (CUR): 241.325 kPa (35 psi); 离子源温度 (TEM): 550 $^{\circ}$ C; 离子源电压 (IS): -4 500 V; 一级扫描: 去簇电压 (DP): 80 V; 聚焦电压 (CE): 10 V; 二级扫描: 使用 TOF MS-Product Ion-IDA 模式采集质谱数据, CID 能量为 -20、-40、-60 V, 进样前, 用 CDS 泵做质量轴校正, 使质量轴误差小于 2×10^{-6} 。

2.3.3 精密度试验 取同一样品 (批号 PY1610121), 按“2.1.3”项下供试品溶液制备方法操作, 按“2.3.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录共有峰的出峰时间和峰面积。以补骨脂素峰 (峰 3) 为参照, 计算各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明相对保留时间 $RSD<0.18\%$, 相对峰面积 $RSD<0.88\%$, 说明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.3.4 重复性试验 取同一批标准汤剂冻干粉 (批号 PY1610121), 按“2.1.3”项下供试品溶液制备方法操作, 平行制备 6 份, 按“2.3.1”项下色谱条件测定, 记录共有峰的出峰时间和峰面积。以补骨脂素峰为参照, 计算各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明相对保留时间 $RSD<0.25\%$, 相对峰面积 $RSD<0.96\%$, 说明该方法重复性良好, 符合指纹图谱要求。

2.3.5 稳定性试验 取同一样品 (批号 PY1610121), 按“2.1.3”项下供试品溶液制备方法操作, 按“2.3.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、12 h 进样检测, 记录共有峰的出峰时间和峰面积。以补骨脂素峰为参照, 计算各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 相对保留时间

$RSD<0.26\%$, 相对峰面积 $RSD<0.97\%$, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定, 符合指纹图谱要求。

2.3.6 样品指纹图谱的采集与分析 取 15 批盐补骨脂标准汤剂冻干粉, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取 10 μ L 对照品溶液、对照药材溶液和供试品溶液, 注入液相色谱仪, 测定, 采集参照物溶液 (图 1) 及 15 批样品的 HPLC 指纹图谱 (图 2)。将图谱导入药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012A), 进行全谱峰匹配, 以平均数法生成共有模式对照指纹图谱 (图 2), 可识别 7 个共有特征峰。选择出峰时间稳定且相对居中的补骨脂素峰作为参比峰, 以其保留时间和峰面积为 1, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 (表 3)。

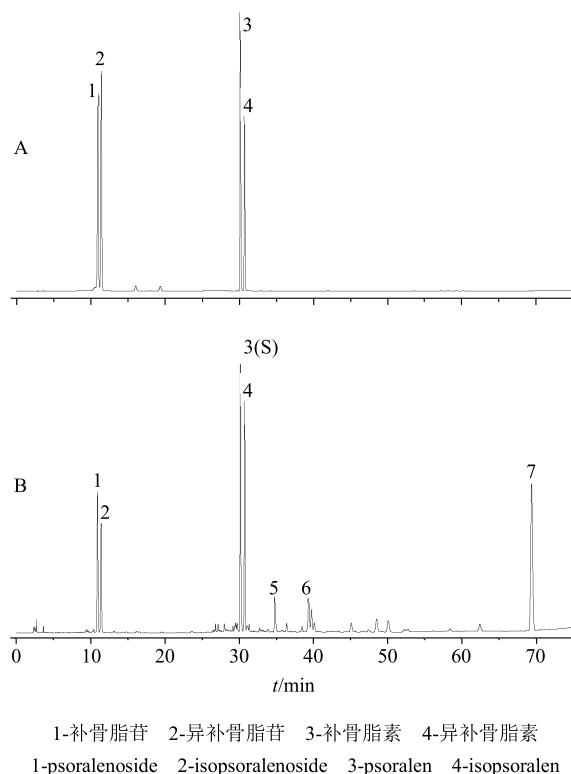


图 1 混合对照品 (A) 及对照药材 (B) HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of reference substances (A) and standard PF (B)

根据色谱峰匹配结果进行相似度分析, 15 批标准汤剂与对照图谱之间的相似度均大于 0.9, 符合指纹图谱相似度要求, 具体结果分别为 S1 1.000、S2 0.998、S3 0.998、S4 0.999、S5 0.994、S6 0.998、S7 0.997、S8 0.998、S9 0.994、S10 0.996、S11 0.997、S12 0.998、S13 0.997、S14 0.997、S15 0.997。

2.3.7 指纹图谱共有峰指认 按照“2.3.2”项下质

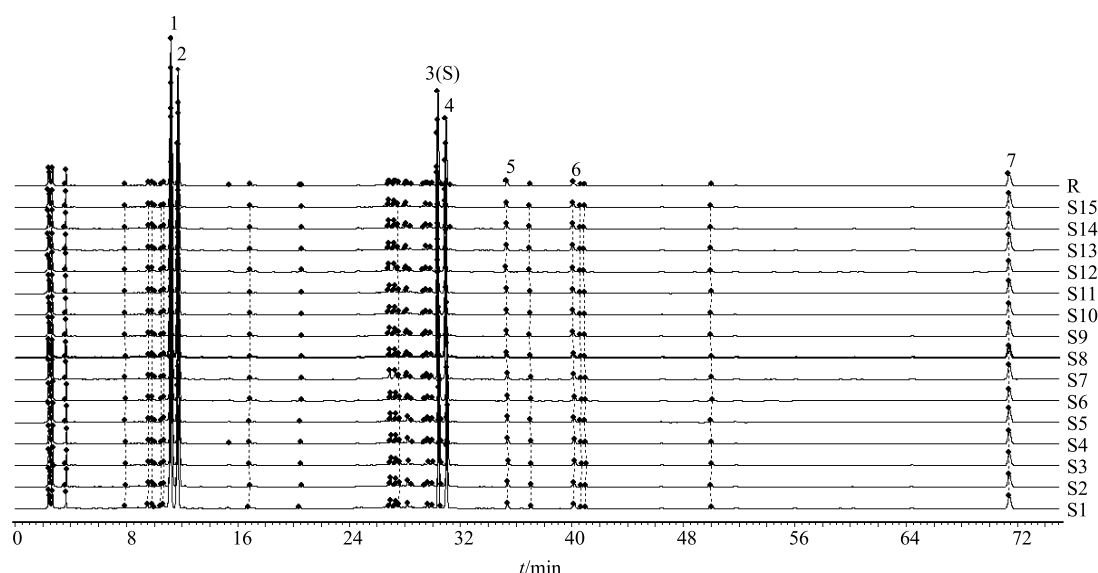


图 2 15 批盐补骨脂标准汤剂指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 2 HPLC fingerprints of 15 batches of standard decoctions of salt-processed PF and reference fingerprint (R)

表 3 盐补骨脂标准汤剂共有峰指标参数

Table 3 Parameters of common peaks of the standard decoction of salt-processed PF

峰号	t_R/min	相对保留时间	峰面积/mAU	相对峰面积
1	11.194	0.369	4 767.194	1.889
2	11.707	0.386	3 965.183	1.578
3	30.362	1.000	2 522.632	1.000
4	30.951	1.019	1 976.096	0.785
5	35.314	1.163	202.934	0.081
6	40.092	1.321	238.702	0.095
7	71.387	2.351	750.594	0.300

谱条件获得供试品溶液的质谱信号, 导入 PeakView 软件进行数据处理, 通过比对精确相对分子质量和可能分子式, 结合特征碎片峰、Reaxys 数据库检索结果以及文献报道^[14-16], 鉴定出盐补骨脂标准汤剂中 7 个主要特征峰, 分别为补骨脂苷 (峰 1)、异补骨脂苷 (峰 2)、补骨脂素 (峰 3)、异补骨脂素 (峰 4)、新补骨脂异黄酮 (峰 5)、补骨脂宁 (峰 6)、补骨脂酚 (峰 7), 结果见表 4。

2.4 定量测定

2.4.1 HPLC 色谱条件 定量测定色谱条件同《中国药典》2015 版规定的补骨脂药材定量测定项下条

表 4 正离子模式下盐补骨脂特征峰成分鉴定

Table 4 Identification of chemical components in standard decoction of salt-processed PF in positive ionization mode

峰号	$[M+H]^+ (m/z)$			$MS^n (m/z)$	分子式	成分
	实测值	理论值	误差/ $(\times 10^{-6})$			
1	367.101 7	367.102 4	-1.8	390 $[M+H+Na]^+$, 228 $[M-Glu+H+Na]^+$, 185 $[M-Glu-H_2O-H]^+$	$C_{17}H_{18}O_9$	补骨脂苷
2	367.101 6	367.102 4	-2.1	389 $[M+Na]^+$, 227 $[M-Glu+Na]^+$, 185 $[M-Glu-H_2O-H]^+$	$C_{17}H_{18}O_9$	异补骨脂苷
3	187.037 8	187.039 0	-6.3	143 $[M+H-CO_2]^+$, 131 $[M+H-2CO]^+$, 115 $[M+H-CO_2-CO]^+$	$C_{11}H_6O_3$	补骨脂素
4	187.037 8	187.039 0	-6.3	131 $[M+H-2CO]^+$, 115 $[M+H-CO_2-CO]^+$	$C_{11}H_6O_3$	异补骨脂素
5	323.127 0	323.127 8	-2.4	267 $[M+H-C_4H_8]^+$, 255 $[M+H-C_5H_8]^+$, 239 $[M+H-C_4H_8-CO]^+$	$C_{20}H_{18}O_4$	新补骨脂异黄酮
6	321.111 5	321.112 1	-2.0	279 $[M+H-C_3H_6]^+$, 137 $[M+H-C_3H_6-C_7H_8O_3]^+$	$C_{20}H_{16}O_4$	补骨脂宁
7	257.189 3	257.190 0	-2.7	201 $[M+H-C_4H_8]^+$, 173 $[M+H-C_6H_{12}]^+$, 107 $[M+H-C_{11}H_{18}]^+$	$C_{18}H_{24}O$	补骨脂酚

件,即以 AkzoNobel Kromasil 100-5- C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)为固定相;以甲醇-水(55:45)系统为流动相;检测波长为 246 nm;柱温为 30 $^{\circ}$ C, 体积流量 0.8 mL/min;进样量为 5 μ L。

2.4.2 线性关系考察 精密称取补骨脂素对照品 10.92 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇适量,振摇使溶解,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 1 090.9 μ g/mL 的补骨脂素对照品储备液;精密称取异补骨脂素对照品 11.25 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇适量振摇使溶解,再加甲醇至刻度,摇匀,即得 1 123.9 μ g/mL 的异补骨脂素对照品储备液。分别精密量取补骨脂素、异补骨脂素对照品储备液各 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mL,分置 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件测定,以进样质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。结果补骨脂素的回归方程为 $Y=49.766\ 9\ X-4.341\ 7$, $r^2=1.000\ 0$, 线性范围为 2.182~87.272 μ g/mL, 异补骨脂素的回归方程为 $Y=50.113\ X-4.573$, $r^2=1.000\ 0$, 线性范围为 2.248~89.912 μ g/mL。

2.4.3 精密度试验 取混合对照品溶液(含补骨脂素 8.727 μ g/mL、异补骨脂素 8.991 μ g/mL),按“2.4.1”项下色谱条件连续进样 6 次,结果补骨脂素峰面积 RSD 为 0.34%, 异补骨脂素峰面积 RSD 为 0.36%, 说明仪器精密度良好,符合定量测定要求。

2.4.4 重复性试验 取同一批标准汤剂冻干粉(批号 PY1610121),按“2.1.4”项下供试品溶液制备方法操作,平行制备 6 份,按“2.4.1”项下色谱条件测定,分别计算 6 份供试品中补骨脂素和异补骨脂素的量。结果补骨脂素质量分数的 RSD 为 1.42%, 异补骨脂素质量分数的 RSD 为 1.89%, 表明该方法重复性较好。

2.4.5 稳定性试验 取同一样品(批号 PY1610121),按“2.1.4”项下供试品溶液制备方法操作,按“2.4.1”项下色谱条件,分别于 0、2、4、8、12 h 进样检测,结果补骨脂素峰面积 RSD 为 0.02%, 异补骨脂素峰面积 RSD 为 0.02%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定,符合定量测定要求。

2.4.6 加样回收率试验 称取已知指标成分含量的同一批次样品(批号 PY1610121, 含补骨脂素 0.725%、异补骨脂素 0.537%),分别按 1:0.5、1:1、1:1.5 的比例精密加入适量对照品,按照“2.1.4”

项下方法制备供试品溶液,各质量浓度平行制备 3 份,并按“2.4.1”项下色谱条件进样检测,记录补骨脂素和异补骨脂素峰面积,分别计算高、中、低不同质量浓度的加样回收率,结果补骨脂素的平均加样回收率为 100.85%, RSD 为 2.19%, 异补骨脂素的回收率为 97.95%, RSD 为 1.87%, 表明该方法可准确测定二者的量。

2.4.7 样品定量测定 分别精密吸取“2.4.3”项下对照品溶液以及 15 批供试品溶液各 10 μ L,按“2.4.1”项下色谱条件测定,根据外标一点法计算补骨脂素和异补骨脂素的总量,结果如表 2 所示。图 3 为对照品及供试品的液相色谱图。

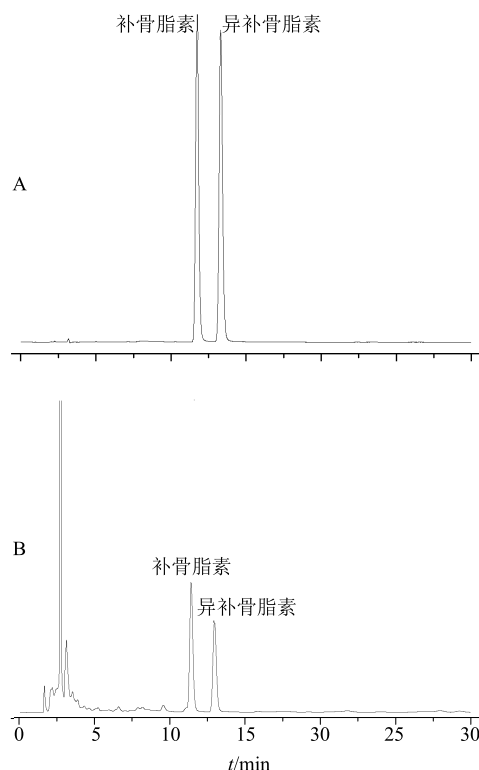


图 3 混合对照品 (A) 及供试品 (B) 定量测定 HPLC 图
Fig. 3 Quantitative determination of HPLC of reference substances (A) and test sample (B)

2.5 盐补骨脂标准汤剂质量评价指标参数的测定

2.5.1 出膏率 盐补骨脂标准汤剂的出膏率按冷冻干燥后最终得到的干膏粉质量(m)与投料量(m_0)之比计算,即出膏率= m/m_0 。计算结果见表 2, 15 批标准汤剂的平均出膏率为 17.88%, 不同批次之间出膏率相差不大。

2.5.2 转移率 分别测得盐补骨脂饮片和标准汤剂中补骨脂素和异补骨脂素的含量后,按下列公式计算指标成分的总转移率:转移率= $(m \times c)/(m_0 \times c_0)$ 。

其中, m 和 m_0 分别为盐补骨脂冻干粉和盐补骨脂饮片的质量, c 和 c_0 分别为盐补骨脂标准汤剂和盐补骨脂饮片中指标成分的总量。转移率计算结果见表 2, 15 批标准汤剂的平均转移率为 19.41%。

2.5.3 盐补骨脂标准汤剂质量评价参数确定 15 批盐补骨脂标准汤剂的出膏率为 16.31%~20.59%, 平均值为 17.88%。指标成分暂定为补骨脂素和异补骨脂素, 以二者的总量计, 15 批标准汤剂的量为 $(1.32 \pm 0.09)\%$, 转移率为 $(19.41 \pm 2.78)\%$ 。除 PY1610134 和 PY1610139 两批由于浓缩液密度稍大, 所得冻干粉量较小导致转移率偏低外, 其余各批次之间转移率相差不大, 而 15 批冻干粉的指标成分量无明显差异。但在实际生产中, 考虑到原料质量差异和制备工艺等因素的影响, 可将标准汤剂出膏率和指标成分的量、转移率的可接受范围设为均值的 70%~130%, 则盐补骨脂标准汤剂出膏率范围应为 12.52%~23.25%, 补骨脂素和异补骨脂素总量应为 0.92%~1.72%, 转移率应为 13.58%~25.23%。

3 讨论

3.1 标准汤剂制备工艺合理性

补骨脂道地产区为河南、四川、重庆等地, 国内野生资源主要来自云南省, 广西地区野生资源稀少, 有少量栽培种植^[17]。本研究所用标准汤剂原料均为云南产区, 经自行炮制后与广西 (S16~S18) 以及河南 (S19) 产的市售盐补骨脂饮片进行了比较, 发现河南所产 (S19) 饮片的补骨脂素和异补骨脂素总量最低, 为 0.74%, 广西的 3 批饮片总量为 0.77%~0.84% (表 1), 而以云南的补骨脂药材为原料炮制的饮片总量均在 1.00% 以上 (表 2), 其差异可能是由不同地区的不同环境及气候条件造成的, 也可能与采收、加工、炮制以及贮藏有关。由于无法对市售盐补骨脂饮片的原药材进行资源评估和完全追溯, 故选择将原料药材可追溯且总量测定结果更高的 15 批自制盐补骨脂饮片用作标准汤剂的制备。

中国古代汤剂制法讲究, 工艺严谨, 对煎药器具、入药形式、加水量、煎煮时间、煎煮顺序等均有详细规定, 说明古代医家对药物煎煮的重视。为适应中药煎剂的现代应用, 保证中药煎药质量, 国家和地方先后颁发了《医疗机构中药煎药室管理规范》《中药饮片煎煮规范》《上海中药行业零售药店中药煎药服务管理规范》等^[11], 其中对加水量、煎煮时间等都有规定, 如加水量一般以浸过药面 2~5

cm 为宜, 头煎煎煮时间一般为 20~30 min, 解表、清热、芳香类药物为 15~20 min, 滋补类药物为 40~60 min, 二煎时间比头煎略缩短^[13]。但由于不同品种、所用容器、投料量、操作者等差异, 在实际操作中会产生较大误差。而中药饮片标准汤剂既然遵循传统的中医药理论, 根据药用部位按比例设计加水量, 根据不同饮片药效和药性差异来确定煎煮时间, 明确一般饮片头煎煎煮时间为 30 min, 二煎为 20 min; 质地坚硬、滋补类药物应先用武火煮沸后改用文火慢煎 60 min, 二煎时间略缩短。盐补骨脂属于滋补类中药, 药用部位为果实种子类, 虽为果实入药, 但其果皮与种子不易分离, 所以按照中药煎煮“逢子必捣”传统, 先将其碾碎再加水浸泡煎煮, 头煎加 8 倍量水, 沸后煎煮 60 min, 二煎加 6 倍量水, 沸后煎煮 50 min, 既符合中药汤剂煎煮传统, 又满足现代生产需求。

标准浸膏粉作为中药配方颗粒工艺和质量研究的参考基准物质, 其性质和分量应尽可能与标准汤剂保持一致, 减少浓缩、干燥过程中的损失, 一般宜采用低温干燥的方式。目前中药浸膏的干燥方式主要有真空干燥箱干燥、真空带式干燥、喷雾干燥等, 应根据中药浸膏的不同性质和用途选择合适的干燥方法^[18]。

此外, 真空冷冻干燥技术在中药领域的应用也越来越广泛, 通过低温低压下的传热传质, 使药物彻底脱水, 保存性好, 且有效成分的分解和损失最小^[19], 非常适合用于中药配方颗粒标准汤剂的干燥。在前期研究中, 课题组进行放大试验, 比较了不同干燥方式得到浸膏粉中补骨脂素和异补骨脂素总量的差异, 结果表明喷雾干燥 (转移率 10.24%)、真空干燥箱干燥 (转移率 10.35%) 和真空带式干燥 (转移率 13.87%) 的转移率均低于冷冻干燥的转移率 (转移率 15.65%), 盐补骨脂中有效成分虽非热敏性, 但高温或干燥时间过长还是可能造成一定的损失, 故标准汤剂应选择冷冻干燥的方式。盐补骨脂标准汤剂是由饮片分别加 8 倍量和 6 倍量水直接煎煮两次制得的合并液, 药液量大, 所以煎剂中补骨脂素和盐补骨脂素总浓度相对饮片要小得多, 而冻干粉经过浓缩和干燥 2 个步骤, 基本已除去多余水分, 主要有效成分得到富集, 故其量远高于煎剂中的量 (表 2)。因此, 这也为研究中用盐补骨脂冻干粉代替标准汤剂煎液作为参照体系提供了一定科学依据。

3.2 指纹图谱条件考察

本实验进行指纹图谱条件摸索时,考察了不同流动相、检测波长、柱温、体积流量、色谱柱等因素的影响。结果发现用乙腈-0.1%磷酸系统作流动相时,洗脱能力较强,峰形较好,且在 75 min 之后无其他峰出现,故最终确定分析时间为 75 min。比较了同一供试品溶液在 210、245、254、280、310 nm 波长下的指纹图谱,结果显示补骨脂素、异补骨脂素及补骨脂苷、异补骨脂苷在 245 nm 下响应值最大,故以此作为指纹图谱的检测波长。

3.3 供试品溶液制备方法考察

盐补骨脂标准汤剂为盐补骨脂饮片加水煎煮制得,其主要成分多为水溶性物质,而盐补骨脂饮片中的多数脂溶性成分在标准汤剂中的量较少。前期试验发现,对于盐补骨脂饮片和标准汤剂的共有成分,甲醇的提取效果高于水提效果,更能充分反映样品的化学信息,因而选择甲醇作为提取溶剂。同时考察了超声、回流和直接定容的方式,结果发现三者的提取效果无明显差异,主要色谱峰的峰面积均相近,因此采用直接定容的方式制备供试品溶液,更加快捷、方便。

3.4 指标成分的选择

对盐补骨脂标准汤剂进行定量分析时,参照《中国药典》2015 年版对盐补骨脂饮片的规定,以补骨脂素和异补骨脂素作为指标成分,且试验证明其量测定方法用于标准汤剂中二者成分的测定同样准确可靠。结果显示 15 批标准汤剂冻干粉中补骨脂素和异补骨脂素的总量为 1.17%~1.50%,转移率为 13.55%~23.57%。然而,比较盐补骨脂饮片(以批号 PY1610121 样品为例)和标准汤剂的指纹图谱(图 4),可以看出苯并呋喃苷类成分(即峰 1、2)与呋喃香豆素类(即峰 3、4)的比例发生明显变化,推测该现象可能有 2 方面的原因:(1)游离香豆素类在水中的溶解性不如香豆素苷类,而盐补骨脂标准汤剂为水煎剂,对补骨脂苷和异补骨脂苷的提取率高于补骨脂素和异补骨脂素;(2)盐补骨脂标准汤剂在煎煮、浓缩、干燥过程中,可能存在成分相互转化,部分补骨脂素、异补骨脂素分别生成了补骨脂苷、异补骨脂苷。而在 35~65 min 的色谱峰主要为黄酮类成分,难溶于水,故标准汤剂指纹图谱中峰面积明显减小。利用指纹图谱方法,测定标准汤剂中 4 种成分的总量为 7.13%~8.72%,转移率为 46.8%~78.0%,方法学试验证明用该方法可准确测

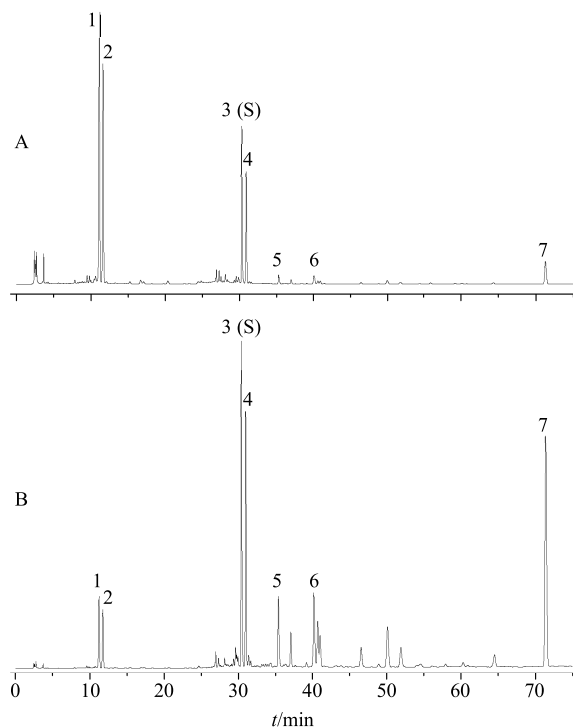


图 4 盐补骨脂标准汤剂 (A) 和饮片 (B) 指纹图谱比较
Fig. 4 Fingerprint comparison between standard decoction (A) and decoction pieces (B) of salt-processed PF

定补骨脂苷、补骨脂素、补骨脂素、异补骨脂素的量,精密度和稳定性 RSD 均小于 2%,重复性 RSD 小于 3%,加样回收率分别为 101.07%(RSD 2.36%)、100.00% (RSD 2.32%)、100.55% (RSD 2.93%)、100.13% (RSD 2.73%)。然而,盐补骨脂标准汤剂在制备过程中,各成分发生的具体变化及机制仍不明确,有待进一步探索。现代研究证明补骨脂苷和异补骨脂苷是补骨脂水提液(汤剂)中的主要活性成分,可促进成骨细胞增殖与分化,预防或治疗骨质疏松^[8,20],且在动物体内可快速吸收,代谢转化为补骨脂素和异补骨脂素^[7-8]。因此,从苯并呋喃苷类和呋喃香豆素类的相互转化关系及药理角度考虑,可将补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素和异补骨脂素的总量作为盐补骨脂饮片及标准汤剂的评价指标。

3.5 小结

本研究以 15 批盐补骨脂饮片的标准汤剂为研究对象,通过指纹图谱分析发现其中主要药效物质呋喃香豆素类及苯并呋喃苷类成分的相对变化,并计算了指标分量、转移率和标准汤剂出膏率,从而确定质量评价的各参数范围,为盐补骨脂配方颗粒质量标准研究提供数据基础。中药标准汤剂作为

标准参照物,一方面有利于中药配方颗粒的规范化生产及质量标准的建立,另一方面可保证配方颗粒与传统汤剂实现临床等效。然而,目前标准汤剂的概念和应用尚未得到推广,原因可能是其与传统汤剂的关联性、差异性等基础研究尚不充分,因此今后还需从药效物质基础、药理活性、临床疗效等多方面进行研究,评价中药标准汤剂与传统汤剂的一致性,为中药配方颗粒质量控制体系的发展提供支撑依据。

参考文献

- [1] 曾莉萍,张金莲,范晖,等. 中药补骨脂商品药材的应用及市场概况 [J]. 亚太传统医药, 2014, 10(9): 40-41.
- [2] Wong R W, Rabie A B. Systemic effect of *Fructus Psoraleae* extract on bone in mice [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(10): 1578-1580.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] Qiao C F, Han Q B, Song J Z, *et al.* Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Fructus Psoraleae* by high-performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(6): 813-818.
- [5] Tan G, Yang T, Miao H, *et al.* Characterization of compounds in *Psoralea corylifolia* using high-performance liquid chromatography diode array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(9): 1455-1462.
- [6] 李凯,许梦莹,周宁,等. 炮制时间对盐补骨脂中10种化学成分的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 710-713.
- [7] Wang Y F, Liu Y N, Xiong W, *et al.* A UPLC-MS/MS method for *in vivo* and *in vitro* pharmacokinetic studies of psoralenoside, isopsoralenoside, psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 609-617.
- [8] 颜冬梅,高秀梅,康立源,等. 补骨脂中苯并呋喃苷类成分在大鼠血浆中的移行特征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 85-88.
- [9] 陶益,蒋妍慧,李伟东,等. 炮制对补骨脂中12种化学成分含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 6-9.
- [10] 杨蓉,曹俊岭,郑虎占,等. 中药配方颗粒与传统汤剂对比性研究概述 [A] // 2013年药房管理分会学术年会论文汇编 [C]. 北京: 中华中医药学会, 2013.
- [11] 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.
- [12] 李远辉,伍振峰,李延年,等. 基于粉体学性质分析浸膏干燥工艺与中药配方颗粒制粒质量的相关性 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 1930-1935.
- [13] 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.
- [14] Yan D M, Chang Y X, Kang L Y. Quality evaluation and regional analysis of *Psoraleae Fructus* by HPLC-DAD-MS/MS plus chemometrics [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 216-223.
- [15] Tan G, Yang T, Miao H, *et al.* Characterization of compounds in *Psoralea corylifolia* using high-performance liquid chromatography diode array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(9): 1455-1462.
- [16] Chen Q, Li Y, Chen Z, *et al.* Separation, identification, and quantification of active constituents in *Fructus Psoraleae* by high-performance liquid chromatography with UV, ion trap mass spectrometry, and electrochemical detection [J]. *J Pharm Anal*, 2012, 2(2): 143-151.
- [17] 周睿,李敏,田蜜,等. 补骨脂药用资源与生产现状调查 [J]. 中药与临床, 2011, 2(6): 4-7.
- [18] 詹娟娟,伍振峰,尚悦,等. 中药浸膏干燥工艺现状及存在的问题分析 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2365-2370.
- [19] 刘苗苗,叶利春,陈立军,等. 真空冷冻干燥技术在中药研究中的应用 [J]. 中药材, 2014, 37(5): 909-911.
- [20] 安亚兰,王建舫,许水明,等. 补骨脂水提液及补骨脂素对体外培养成骨细胞的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40(2): 266-271.