

基于标准汤剂的三颗针配方颗粒质量评价研究 (I)

徐玉玲¹, 贾裕杰^{1,2}, 张文文³, 杨俊莉¹, 曾奇璐¹, 曾立¹, 刘涛^{1*}

1. 成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106

2. 成都大学张澜学院, 四川 成都 610106

3. 成都大学四川抗菌素工业研究所, 四川 成都 610052

摘要: **目的** 建立三颗针标准汤剂质量评价体系。**方法** 根据标准汤剂的制备要求, 制备 15 批三颗针标准汤剂冻干粉, 以薄层色谱法鉴别三颗针标准汤剂中的指标成分, 采用 HPLC 法对指标成分进行含量测定, 并计算指标成分转移率和出膏率; 采用红外光谱仪分别扫描 15 批三颗针标准汤剂, 建立红外指纹图谱, 采用双指标序列分析法分析各批次间相关性; 采用紫外可见分光光度计分别扫描 15 批三颗针标准汤剂, 建立紫外对照图谱, 利用 SPSS 软件分析样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度。**结果** 15 批标准汤剂的出膏率为 3.42%~6.36%, 盐酸小檗碱质量分数为 7.53%~13.98%, 总转移率为 39.64%~73.62%; 三颗针标准汤剂与盐酸小檗碱对照品、三颗针对照药材溶液在同一硅胶 G 薄层板相同位置显相同颜色的荧光斑点; 红外指纹图谱共有峰率下限为 50.0%, 变异峰率为 0~62.5%; 紫外指纹图谱相似度均大于 0.9, 变异可接受范围为 0.768~1.000。**结论** 建立了稳定、可靠的三颗针标准汤剂全面质量评价方法, 为三颗针配方颗粒的质量控制提供参考。

关键词: 三颗针; 标准汤剂; 配方颗粒; 质量评价; 双指标序列分析法; 相似度

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4535-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.011

Quality evaluation research of *Berberidis Radix* formulations based on standard decoction (I)

XU Yu-ling¹, JIA Yu-jie^{1,2}, ZHANG Wen-wen³, YANG Jun-li¹, ZENG Qi-lu¹, ZENG Li¹, LIU Tao¹

1. School of Pharmacy and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

2. Zhang Lan College, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. Chengdu University Sichuan Antimicrobial Industry Research Institute, Chengdu 610052, China

Abstract: **Objective** To establish the quality evaluation system of *Berberidis Radix* (BR) standard decoction. **Methods** According to the preparation requirements of BR standard decoction, 15 batches of BR standard decoction powder was prepared, and the index components in BR standard decoction was identified by using TLC chromatography. The content of index components was then detected by using HPLC, and the transfer rate of the index composition and the yield of the paste were calculated. Using infrared spectrometer to scan 15 batches of three standard decoctions. The infrared fingerprint spectrum was established, and the correlation between each batch was analyzed by using the two-index sequence analysis method. UV-vis spectrophotometer was used to respectively scan 15 batches of three needle standard medicinal broth for, establishing ultraviolet control map. The similarity between the fingerprint of sample and control was analyzed by SPSS software. **Results** The yield of 15 batches of standard decoction was 3.42%—6.36%. The content of berberine hydrochloride was 7.53%—13.98%, and the total transfer rate was 39.64%—73.62%. The same colored fluorescent spots were appeared at the corresponding positions of BR standard decoction, the berberine hydrochloride control, and BR control solution and the spots were in the same position of the same silica gel G thin layer. The lower limit of total peak rate of IR fingerprint was 50.0%, and the variation peak rate was 0.0%—62.5%. The similarity of UV fingerprints was all greater than 0.9, and the variation acceptable range was 0.768—1.000. **Conclusion** A stable and reliable method for the

收稿日期: 2018-04-09

基金项目: 四川省千人计划项目 (2013332); 四川省科技厅 2018 年科技项目 (2018TJPT0049, 2018ZR0107); 成都大学教改项目 (cdjgy2017010)

作者简介: 徐玉玲 (1975—), 女, 云南曲靖人, 硕士, 副教授, 从事中成药开发及再评价研究。Tel: (028)61302236 E-mail: xuyuling@cdu.edu.cn

*通信作者 刘涛 (1976—), 男, 四川南充人, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中成药新药开发及再评价工作。

Tel: (028)61302236 E-mail: liutao0578@sina.com

comprehensive quality evaluation of BR standard decoction was established, which can provide reference for the quality control of BR formula granules.

Key words: *Berberidis Radix*; standard decoction; formula granule; quality evaluation; two-index sequence analysis method; similarity

三颗针 *Berberidis Radix* 为小檗科植物拟豪猪刺 *Barberis soulieana* Schneid.、小黄连刺 *Berberis wihonae* Hemsl.、细叶小檗 *Berberis poiretii* Schneid. 或匙叶小檗 *Berberis verna* Schneid. 等同属数种植物的干燥根^[1]。该属植物在我国有 200 多种, 且主要分布在我国西北和西南地区^[2], 是提取小檗碱的主要原料^[3]; 近年的研究发现, 三颗针中主要有效成分小檗碱具有广谱抗菌、增加白细胞吞噬功能、利胆、刺激促肾上腺皮质激素 (ACTH) 分泌及降压等作用, 主要用于治疗赤痢、黄疸、咽痛、目赤、跌打损伤。

中药配方颗粒是以符合炮制规则的中药饮片为原料, 经现代工业提取、浓缩、干燥、制粒而成的中药系列产品, 作为新的饮片形式替代中药饮片供临床辨证论治、随症加减、配方使用^[4-9]。标准汤剂系遵循中医药理论, 按照临床汤剂煎煮方法规范化煎煮, 固液分离, 经适当浓缩制得或经适宜方法干燥制得, 作为衡量中药配方颗粒是否与临床汤剂基本一致的标准参照物^[10-11]。

本研究收集 15 批不同产地、不同采收时间三颗针药材, 根据标准汤剂相关要求, 制备 15 批三颗针标准汤剂冻干粉, 建立了三颗针标准汤剂质量评价体系, 包括出膏率、红外指纹图谱、紫外指纹图谱、薄层色谱 (TLC)、物理指纹图谱、HPLC 指纹图谱、水分等指标, 可从整体上评价三颗针标准汤剂质量, 为三颗针配方颗粒质量评价提供依据, 本实验主要对其出膏率、提取转移率、TLC、红外指纹图谱和紫外指纹图谱进行研究, 后续还将陆续报道其他指标研究结果。

1 仪器与材料

KQ-100E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵, 成都康宇科技有限公司; P230 II 高效液相色谱仪, 大连依利特分析仪器有限公司; FD-1A-50 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; TU-1810PC 型紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Spectrum Two 红外光谱仪, Perkin Elmer; 卤素水分测定仪; FA2004 分析电子天平, 上海良平仪器仪表有限公司; SQP 电子天平, 赛多利斯科学仪器 (北

京) 有限公司; DZF-6050A 真空烘干箱, 北京中兴伟业仪器有限公司; HH-S6 电热恒温水浴锅, 北京科伟永兴仪器有限公司; 50 μ L 微量进样器, 北京康达顺业科技有限公司。

15 批三颗针药材购于四川、云南、广西、贵州等地 (见表 1), 经成都大学药学与生物工程学院刘涛教授鉴定, 确定为小檗科小檗属植物拟豪猪刺 *Barberis soulieana* Schneid. 的干燥根, 均符合《中国药典》2015 年版一部的要求。根据三颗针饮片的炮制要求, 分别炮制出适用于标准汤剂提取的三颗针饮片。

表 1 15 批次三颗针药材的信息

Table 1 Information of 15 batches of BR

编号	产地	采集时间	编号	产地	采集时间
S1	四川	2017 年 03 月	S9	广西	2018 年 02 月
S2	广西	2017 年 03 月	S10	广西	2017 年 03 月
S3	云南	2017 年 03 月	S11	广西	2017 年 02 月
S4	四川	2017 年 03 月	S12	广西	2017 年 03 月
S5	四川	2017 年 03 月	S13	四川	2017 年 03 月
S6	湖北	2017 年 02 月	S14	河南	2017 年 06 月
S7	广西	2017 年 02 月	S15	广西	2017 年 06 月
S8	河南	2016 年 11 月			

甲醇 (批号 2018011801)、磷酸二氢钾 (批号 2017110101)、冰乙酸 (批号 2017020801), 均购自成都市科隆化学品有限公司; 正丁醇 (批号 201601140131), 天津市致远化学试剂有限公司; 纯净水, 华润怡宝饮料 (中国) 有限公司; 盐酸小檗碱对照品 (批号 633-65-8, 质量分数 > 98%), 三颗针对照药材 (批号 LY8178), 购自中国食品药品检定研究院; 乙腈、甲醇、乙醇, 色谱纯, 成都市科隆化学品有限公司。

2 方法与结果

2.1 三颗针标准汤剂冻干粉的制备

根据技术要求及《医疗机构中药煎药室管理规范》的相关要求, 称取三颗针饮片 100.0 g, 置于圆底烧瓶中, 加 9 倍量水, 浸泡 30 min, 加热煮沸后回流提取 30 min, 趁热纱布滤过; 滤渣再加入 8 倍量水回流提取 20 min, 纱布滤过, 合并滤液, 冰水

冷却,水浴浓缩至密度为 1.1~1.2,将浓缩液于 -40 ℃冷冻至少 12 h,取出,冷冻干燥,即得标准汤剂冻干粉。

2.2 TLC 法鉴别三颗针标准汤剂中指标成分

2.2.1 供试品溶液的制备 称取三颗针标准汤剂干粉 0.05 g,加甲醇 10 mL,超声 10 min,滤过,取续滤液作为三颗针标准汤剂供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 1.0 mg 盐酸小檗碱对照品,用甲醇(色谱纯)稀释至含盐酸小檗碱 100 μg/mL 的溶液,作为对照品溶液。

2.2.3 对照药材溶液的制备 称取三颗针对照药材

的粉末 1.0 g,加入甲醇 20 mL,超声处理 20 min,滤过,取续滤液作为对照药材溶液。

2.2.4 实验条件及结果 取盐酸小檗碱对照品溶液、对照药材溶液、供试品溶液各 30 μL,分别点于同一以 0.4%羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-醋酸-水(2:0.5:1)的上层溶液为展开剂展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果见图 1。在紫外灯(365 nm)检视下,供试品与对照品、对照药材溶液在同一硅胶 G 薄层板相同位置显相同颜色荧光斑点。计算三者的比移值(Rf),均在 0.50~0.58。

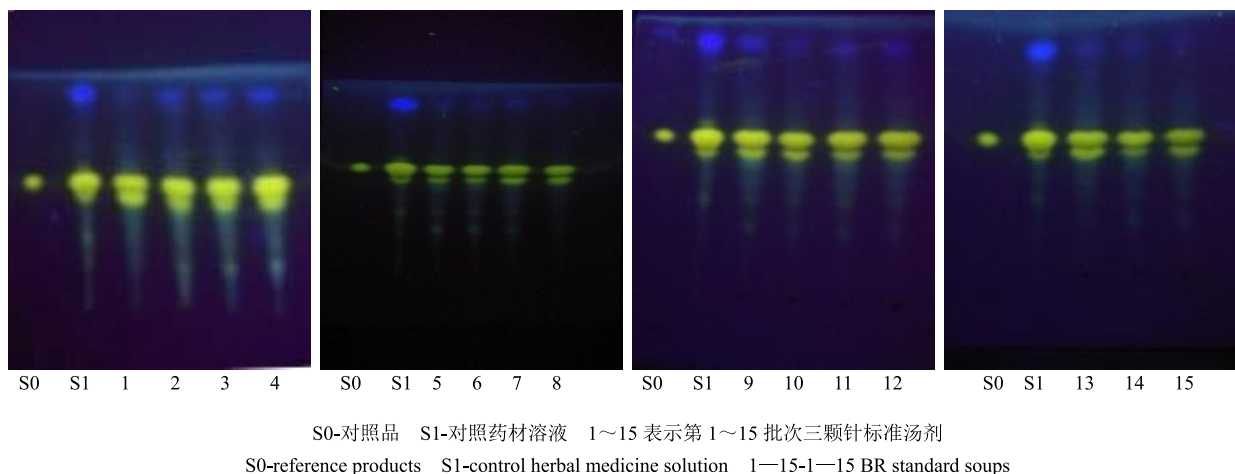


图 1 三颗针对照品、三颗针对照药材溶液、三颗针标准汤剂薄层色谱

Fig. 1 Three TLCs for reference products, control herbal medicine solution, and standard decoction of BR

2.3 指标成分含量测定

2.3.1 溶液的制备 称取三颗针标准汤剂冻干粉适量,加入适量甲醇溶解,超声 10 min,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,得供试品溶液。精密称取盐酸小檗碱对照品适量,置棕色量瓶中,加入甲醇(色谱纯)溶解,定容,配制成质量浓度为 547.6 μg/mL 的对照品储备液,使用时过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.3.2 色谱条件及系统适应性考察 采用依利特 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温 30 ℃;体积流量 1 mL/min;进样量 10 μL;流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾-乙腈(76:24);检测波长 265 nm。此色谱条件下,供试品溶液中待测指标成分盐酸小檗碱分离度良好。色谱图见图 2。

2.3.3 方法学考察

(1) 线性关系考察:取盐酸小檗碱对照品储备液(547.6 μg/mL),用甲醇稀释 0、2、4、8、16 倍,按“2.3.2”项下条件测定,以进样量为横坐标(X),

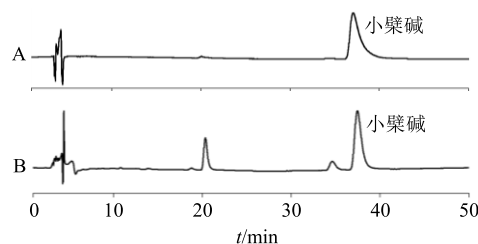


图 2 盐酸小檗碱对照品(A)和三颗针标准汤剂中指标成分(B)的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of berberine hydrochloride reference substance (A) and index components in BR standard decoction (B)

峰面积为纵坐标(Y),得回归方程 $Y=1204.8 X$, $r=0.999 8$,盐酸小檗碱线性范围为 34.2~547.6 μg/mL。

(2) 精密度试验:取盐酸小檗碱对照品溶液(68.45 μg/mL)按“2.3.2”项下色谱条件连续进样 6 次,计算盐酸小檗碱峰面积 RSD 为 1.62%,结果表明精密度良好。

(3) 稳定性试验: 取供试品溶液, 放置 0、2、4、6、8、12 h 时按“2.3.2”项下色谱条件测定, 计算盐酸小檗碱峰面积的 RSD 为 2.43%, 说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

(4) 重复性试验: 取第一批样品 (S1), 按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件测定, 平行 6 次, 计算盐酸小檗碱质量分数平均值为 4.47%, RSD 为 0.86%, 表明该方法重复性良好。

(5) 加样回收率试验: 精密称取已知盐酸小檗碱质量分数为 5.84% 的第 1 批三颗针标准汤剂 (S1) 0.5 g (盐酸小檗碱质量为 3.042 mg), 平行 6 份, 各加入盐酸小檗碱对照品 3.221 mg, 混匀, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件测定, 结果平均加样回收率为 104.33%, RSD 为 1.86%, 加样回收率良好。

2.3.4 指标成分含量测定 分别取 S1~S15 批饮片制备的三颗针标准汤剂冻干粉 0.1 g, 精密称定, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件测定, 结果见表 2。(转移率=标准汤剂中指标成分的质量/饮片中指标成分的质量)。饮片出膏率、饮片中盐酸小檗碱质量分数、冻干粉中盐酸

小檗碱质量分数、指标成分转移率平均值分别为 4.89%、1.26%、10.75%、56.63%, 取平均值的 70%~130% 分别作为 4 者的变异可接受范围, 分别为 3.42%~6.36%、0.88%~1.64%、7.53%~13.98%、39.64%~73.62%。

2.4 三颗针标准汤剂红外指纹图谱建立

2.4.1 测定条件 取三颗针标准汤剂冻干粉 0.2 g, 精密称定, 转移至 10 mL 量瓶, 用纯净水稀释定容, 作为储备液。用 50 μ L 微量进样器吸取适量储备液于玛瑙乳钵中, 吹干。称取 200 mg 干燥的溴化钾, 按同一方向研细、混匀。称取 100 mg 混合物平铺于红外压片模具中, 以 15.0 MPa 压力压制 2 min, 将制备好的样片置于红外光谱仪中, 去除空气的干扰, 测定红外光谱, 波数范围为 450~4 000 cm^{-1} , 确定三颗针标准汤剂冻干粉最佳用量为 0.2 mg。

2.4.2 方法学考察

(1) 精密度试验: 取三颗针标准汤剂 (S1) 冻干粉 0.2 g, 精密称定, 照“2.4.1”项方法制成供试品, 连续 6 次快速扫描, 确定 3 412、2 928、1 605、1 395 cm^{-1} 处为共有峰, 计算扫描结果对共有峰的 RSD 值分别为 0.02%、0、0、0, 该 Spectrum Two 红外色谱仪的精密度良好。

(2) 重复性试验: 照“2.4.1”项方法平行制备 6 份三颗针供试品, 照“2.4.1”法扫描, 计算扫描结果对共有峰 3 412、2 928、1 605、1 395 cm^{-1} 的 RSD 值分别为 0.12%、0.08%、0.06%、0.20%, 表明该方法重复性良好。

(3) 稳定性试验 取三颗针标准汤剂 (S1) 冻干粉 1 份, 按“2.4.1”项方法制备供试品, 按“2.4.1”项方法在 0、1、2、3、4、5 h 时扫描, 计算扫描结果在共有峰 3 412、2 928、1 605、1 395 cm^{-1} 的 RSD 值分别为 0.12%、0、0、0.04 %, 表明三颗针标准汤剂 (S1) 在 5 h 内稳定性良好。

2.4.3 15 批次标准汤剂红外指纹图谱的采集 取 S1~S15 三颗针标准汤剂, 分别按“2.4.1”项下方法进行测定, 其红外指纹图谱叠加图见图 3, 各批次峰值检出见表 3。

2.4.4 15 批次标准汤剂及其与对照图谱双指标序列分析 双指标序列 S1:S2 ($P: P_{va}, P_{vb}$), 其中 S1 为参考标准, S1 与 S2 的共有峰率为 P , S1 的变异峰率为 P_{va} , S2 的变异峰率为 P_{vb} 。共有峰定义为在相互比较的 2 个红外指纹图谱中都出现的一组吸收峰, 且组内吸收峰的最大波数差显著小于其与相邻

表 2 三颗针标准汤剂物理化学特征参数

Table 2 Physical and chemical characteristic parameters of BR standard decoction

编号	出膏率/%	盐酸小檗碱/%		指标成分转移率/%
		饮片	冻干粉	
S1	5.40	0.60	5.84	35.84
S2	3.87	3.39	3.95	13.65
S3	3.60	2.82	4.02	10.72
S4	5.98	3.47	3.94	17.72
S5	6.01	0.74	19.65	83.76
S6	4.14	0.87	12.62	61.47
S7	4.80	0.74	14.04	88.67
S8	4.00	1.18	13.32	24.22
S9	5.04	0.66	11.60	49.97
S10	4.83	0.55	5.28	46.37
S11	5.20	0.51	7.12	72.60
S12	5.11	0.73	19.76	77.08
S13	5.12	0.65	12.80	52.85
S14	4.72	0.54	14.07	79.06
S15	5.51	1.40	13.27	135.40
平均值	4.89	1.26	10.75	56.63

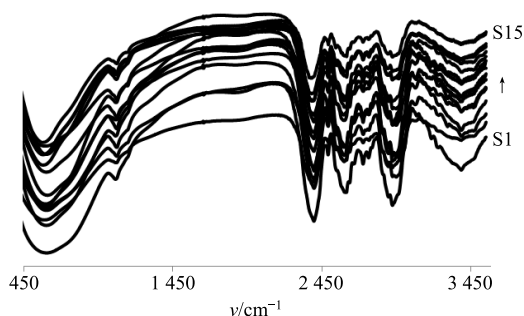


图 3 15 批次三颗针标准汤剂红外指纹图谱叠加图
Fig. 3 IR fingerprint overlay of 15 batches of BR standard decoction

组间的平均波数差, 反之则为变异峰^[12-13]。其计算方法可简化为下述公式。

$$N_a = N_g + n_a$$

$$N_b = N_g + n_b$$

$$P = N_g / N_d$$

$$P_{va} = n_a / N_g$$

$$P_{vb} = n_b / N_g$$

N_a 为指纹图谱 a 的总峰数, N_b 为指纹图谱 b 的总峰数, n_a 为 IR 指纹图谱 a 的变异峰数, n_b 为 IR 指纹图谱 b 的变异峰数, N_g 为共有峰数, P 为共有峰率, N_d 为独立峰数, P_{va} 为指纹图谱 a 的变异峰率, P_{vb} 为指纹图谱 b 的变异峰率

表 3 三颗针标准汤剂红外指纹图谱峰值

Table 3 Peak statistics of IR fingerprints of BR standard decoction

编号	v/cm ⁻¹														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S1	—	3 400.98	2 928.10	1 604.24	1 509.36	1 401.40	—	1 274.27	—	—	—	1 052.27	—	925.24	616.25
S2	—	3 401.05	2 930.41	1 604.23	1 509.16	1 400.50	—	1 275.23	—	1 104.31	—	1 052.81	—	—	616.20
S3	—	3 401.25	2 935.48	1 605.92	1 508.87	1 398.39	—	1 275.73	—	1 104.09	1 077.03	—	—	—	621.77
S4	3 786.63	3 401.45	2 931.23	1 605.60	1 508.29	1 391.92	—	1 274.80	1 238.51	—	1 077.50	—	—	—	615.93
S5	3 771.64	3 400.85	2 936.11	1 605.05	1 509.80	1 392.06	—	1 275.28	1 237.73	1 102.81	1 078.04	—	—	—	615.94
S6	3 786.36	3 412.75	2 931.56	1 607.00	1 508.50	1 400.90	—	1 274.76	—	—	1 078.14	—	—	—	616.11
S7	—	3 429.10	2 927.09	1 618.08	1 508.04	1 385.46	—	1 275.41	—	—	1 077.36	—	—	—	619.25
S8	—	3 391.95	2 928.46	1 603.61	1 508.63	1 390.00	1 364.51	1 275.02	1 235.30	1 102.70	1 077.90	—	1 035.25	916.66	615.78
S9	—	3 422.80	2 927.38	1 619.68	1 508.32	1 385.84	—	1 275.12	—	—	1 077.15	—	—	—	618.32
S10	—	3 419.27	2 928.05	1 613.98	1 508.53	1 401.83	—	1 274.93	—	—	1 077.52	—	—	—	618.07
S11	—	3 421.72	2 929.06	1 620.13	1 508.55	1 385.41	—	1 275.00	—	—	1 078.11	—	—	—	612.01
S12	3 854.90	3 401.07	2 935.23	1 603.45	1 508.04	1 400.24	—	1 275.02	1 235.11	1 103.59	1 077.36	—	—	918.10	616.03
S13	—	3 405.64	2 926.84	1 606.54	1 509.12	1 392.08	—	1 275.37	—	—	1 077.76	—	—	—	615.20
S14	—	3 401.64	2 927.58	1 607.73	1 509.55	1 403.74	—	1 274.45	—	—	—	1 052.32	—	—	616.28
S15	—	3 401.65	2 927.56	1 605.30	1 509.63	1 400.67	—	1 275.18	—	1 107.73	—	1 052.83	—	924.62	615.58

三颗针标准汤剂的共有峰率和变异峰率双指标序列分析结果见表 4。由表 4 可见, 共有峰率范围为 50.0%~100.0%, 变异峰率范围为 0.0%~62.5%。分析可见, 共有峰率的下限可定为 50.0%。

2.4.5 15 批次三颗针标准汤剂的近似组分析

A 组: S1 : S4 (58.3%: 16.7%, 25.0%); S1 : S5 (53.8%: 15.4%, 30.8%); S1 : S13 (70.0%: 28.6%, 14.3%); S4 : S5 (90.0%: 0.0%, 10.0%); S4 : S13 (80.0%: 25.0%, 0.0%); S5 : S13 (72.7%: 37.5%, 0.0%)。

B 组: S2 : S7S9S10S11 (70.0%: 28.6%, 14.3%); S12 : S7S9S10S11 (66.7%: 0.0%, 50%); S7 :

S9S10S11 (100.0%: 0.0%, 0.0%)。

C 组: S6 : S7 (88.9%: 12.5%, 0.0%); S6 : S8 (57.1%: 12.5%, 62.5%)。

A 组产地均为四川, S4 : S5 中共有峰率明显偏大而变异峰率很小。

B 组产地均为广西, S7、S9、S10、S11 的红外图谱相似度极高, 其中 S7 : S9S10S11 的共有峰率为 100.0%, 明显大于 S2 : S7S9S10S11 和 S12 : S7S9S10S11 中的共有峰率, 变异峰率为 0.0%, 低于 S2 : S7S9S10S11 和 S12 : S7S9S10S11 的变异峰率。

C 组中 S6 : S7 的共有峰率为 88.9%, 变异峰率

表 4 不同批次三颗针标准汤剂的共有峰率和变异峰率双指标序列

Table 4 Common peak rates and variation peak rates of BR in different batches

序列	(P : P_{va} , P_{vb})	序列	(P : P_{va} , P_{vb})	序列	(P : P_{va} , P_{vb})
S1 : S2	(80.0%: 12.5%, 12.5%)	S2 : S3	(80.0%: 12.5%, 12.5%)	S3 : S5	(81.0%: 0.0%, 22.2%)
S1 : S3	(63.6%: 28.6%, 28.6%)	S2 : S4	(58.3%: 28.6%, 42.9%)	S3 : S6	(80.0%: 12.5%, 12.5%)
S1 : S4	(58.3%: 16.7%, 25.0%)	S2 : S5	(66.7%: 12.5%, 37.5%)	S3 : S7	(88.9%: 12.5%, 0.0%)
S1 : S5	(53.8%: 15.4%, 30.8%)	S2 : S6	(63.6%: 28.6%, 28.6%)	S3 : S8	(61.5%: 12.5%, 50.0%)
S1 : S6	(63.6%: 18.2%, 18.2%)	S2 : S7	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S3 : S9	(88.9%: 12.5%, 0.0%)
S1 : S7	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S2 : S8	(57.1%: 7.1%, 35.7%)	S3 : S10	(88.9%: 12.5%, 0.0%)
S1 : S8	(57.1%: 12.5%, 62.5%)	S2 : S9	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S3 : S11	(88.9%: 12.5%, 0.0%)
S1 : S9	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S2 : S10	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S3 : S12	(75.0%: 0.0%, 33.3%)
S1 : S10	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S2 : S11	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S3 : S13	(88.9%: 12.5%, 0.0%)
S1 : S11	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S2 : S12	(61.5%: 12.5%, 50.0%)	S3 : S14	(63.6%: 28.6%, 28.6%)
S1 : S12	(61.5%: 12.5%, 50.0%)	S2 : S13	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S3 : S15	(70.0%: 14.3%, 28.6%)
S1 : S13	(70.0%: 28.6%, 14.3%)	S2 : S14	(80.0%: 12.5%, 12.5%)	S4 : S5	(90.0%: 0.0%, 10.0%)
S1 : S14	(80.0%: 12.5%, 12.5%)	S2 : S15	(90.0%: 0.0%, 11.1%)	S4 : S6	(90.0%: 11.1%, 0.0%)
S1 : S15	(90.0%: 0.0%, 11.1%)	S5 : S6	(81.8%: 22.2%, 0.0%)	S4 : S7	(80.0%: 25.0%, 0.0%)
S6 : S7	(88.9%: 12.5%, 0.0%)	S5 : S7	(72.7%: 37.5%, 0.0%)	S4 : S8	(64.3%: 11.1%, 44.4%)
S6 : S8	(57.1%: 12.5%, 62.5%)	S5 : S8	(71.4%: 10.0%, 30.0%)	S4 : S9	(80.0%: 25.0%, 0.0%)
S6 : S9	(88.9%: 12.5%, 0.0%)	S5 : S9	(72.7%: 37.5%, 0.0%)	S4 : S10	(80.0%: 25.0%, 0.0%)
S6 : S10	(88.9%: 12.5%, 0.0%)	S5 : S10	(72.7%: 37.5%, 0.0%)	S4 : S11	(80.0%: 25.0%, 0.0%)
S6 : S11	(88.9%: 12.5%, 0.0%)	S5 : S11	(72.7%: 37.5%, 0.0%)	S4 : S12	(83.3%: 0.0%, 20.0%)
S6 : S12	(75.0%: 0.0%, 33.3%)	S5 : S12	(91.7%: 0.0%, 9.1%)	S4 : S13	(80.0%: 25.0%, 0.0%)
S6 : S13	(88.9%: 12.5%, 0.0%)	S5 : S13	(72.7%: 37.5%, 0.0%)	S4 : S14	(63.6%: 28.6%, 28.6%)
S6 : S14	(70.0%: 14.3%, 28.6%)	S5 : S14	(58.3%: 42.9%, 28.6%)	S4 : S15	(53.8%: 42.9%, 42.9%)
S6 : S15	(58.3%: 28.6%, 42.9%)	S5 : S15	(61.5%: 37.5%, 25.0%)	S9 : S10	(100.0%: 0.0%, 0.0%)
S7 : S8	(61.5%: 0.0%, 62.5%)	S8 : S9	(66.7%: 50.0%, 0.0%)	S9 : S11	(100.0%: 0.0%, 0.0%)
S7 : S9	(100.0%: 0.0%, 0.0%)	S8 : S10	(66.7%: 50.0%, 0.0%)	S9 : S12	(66.7%: 0.0%, 50.0%)
S7 : S10	(100.0%: 0.0%, 0.0%)	S8 : S11	(66.7%: 50.0%, 0.0%)	S9 : S13	(100.0%: 0.0%, 0.0%)
S7 : S11	(100.0%: 0.0%, 0.0%)	S8 : S12	(78.6%: 18.2%, 9.1%)	S9 : S14	(70.0%: 14.3%, 28.6%)
S7 : S12	(66.7%: 0.0%, 50.0%)	S8 : S13	(66.7%: 50.0%, 0.0%)	S9 : S15	(63.6%: 14.3%, 42.9%)
S7 : S13	(100.0%: 0.0%, 0.0%)	S8 : S14	(50.0%: 71.4%, 28.6%)	S10 : S11	(100.0%: 0.0%, 0.0%)
S7 : S14	(70.0%: 14.3%, 28.6%)	S8 : S15	(64.3%: 44.4%, 11.1%)	S10 : S12	(66.7%: 0.0%, 50.0%)
S7 : S15	(63.6%: 14.3%, 42.9%)	S11 : S12	(66.7%: 50.0%, 0.0%)	S10 : S13	(100.0%: 0.0%, 0.0%)
S12 : S13	(66.7%: 50.0%, 0.0%)	S11 : S13	(100.0%: 0.0%, 0.0%)	S10 : S14	(70.0%: 14.3%, 28.6%)
S12 : S14	(50.0%: 71.4%, 28.6%)	S11 : S14	(70.0%: 14.3%, 28.6%)	S10 : S15	(63.6%: 14.3%, 42.9%)
S12 : S15	(69.2%: 33.3%, 11.1%)	S11 : S15	(63.6%: 14.3%, 42.9%)	S7 : S9S10S11	(100.0%: 0.0%, 0.0%)
S13 : S14	(70.0%: 14.3%, 28.6%)	S14 : S15	(72.7%: 12.5%, 25.0%)	S2 : S7S9S10S11	(70.0%: 28.6%, 14.3%)
S13 : S15	(63.6%: 14.3%, 42.9%)	S3 : S4	(72.7%: 12.5%, 25.0%)	S12 : S7S9S10S11	(66.7%: 0.0%, 50%)

分别为 12.5%、0.0%，S6 : S8 的共有峰率为 57.1%，变异峰率分别为 12.5%、62.5%。

由以上分析可见，同一产地同一时间段所产三颗针饮片制得的标准汤剂的红外图谱的相似度高，

而不同产地所得三颗针标准汤剂的红外图谱相似度低。由 B 组 S2 : S7S9S10S11 和 C 组 S6 : S7 比 S6 : S8 的共有峰率大而变异峰低的结果可见，标准汤剂制备时间间隔越大，红外图谱差异性越大。

2.5 三颗针标准汤剂 UV 指纹图谱的建立

2.5.1 光谱扫描条件 以纯净水调整基线并作为参比液进行紫外光谱测定, 光谱带宽 2.00 nm, 扫描范围: 200.00~800.00 nm, 光度模式: Abs, 扫描间隔为 0.5 nm, 快速扫描。

2.5.2 供试品制备 取三颗针标准汤剂干粉 (S1) 0.1 g, 精密称定, 转移到干燥的烧杯中, 加入纯净水 20~30 mL, 超声溶解后转移到 50 mL 量瓶, 稀释至刻度, 作为供试品 1 (稀释 500 倍); 取 1.0 mL 供试品 1 于 10 mL 量瓶中, 用纯净水稀释至刻度, 作为供试品 2 (稀释 5 000 倍); 同法稀释 10 000 倍, 作为供试品 3。照“2.5.1”项下方法分别对上述 3 种供试品进行快速扫描。当稀释倍数为 10 000 倍时, 图谱光滑, 峰值的 Abs 值均在 0.2~2.5, 由此可确定最佳稀释倍数为 10 000 倍, 结果见图 4。

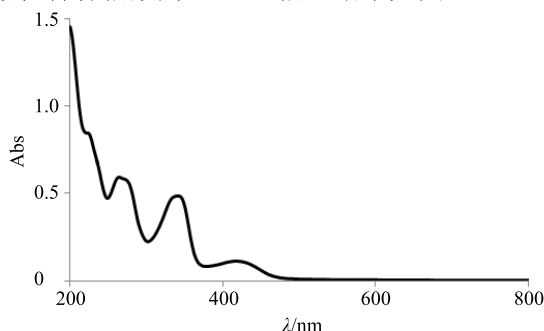


图 4 标准汤剂最适质量浓度时的 UV 图谱

Fig. 4 UV map of BR standard decoction at optimum concentration

2.5.3 方法学考察

(1) 精密度试验: 照“2.5.1”项对供试品 3 连续 6 次扫描, 计算波峰波谷 (415、334、265、205、382、300 nm) 处 Abs 的 RSD 值分别为 0.47%、0.54%、0.51%、2.35%、1.96%、0.72%, 均小于 2.35%, 结果表明该 TU-1810PC 型紫外可见分光光度计精密度良好。

(2) 稳定性试验: 照“2.5.2”项方法制备稀释倍数为 10 000 倍的供试品, 照“2.5.1”项方法在 0、1、2、3、4、5 h 时进行扫描, 计算扫描结果在波峰波谷 (415、334、265、205、382、300 nm) 处 Abs 的 RSD 值分别为 0.47%、0.13%、0.14%、2.38%、0.60%、0.30%, 小于 2.38%, 表明供试品在 5 h 内稳定。

(3) 重复性试验: 照“2.5.2”项方法制备稀释倍数为 10 000 倍的供试品, 照“2.5.1”项方法进行扫描, 平行 6 次, 计算扫描结果在波峰波谷 (415、

334、265、205、382、300 nm) 处 Abs 的 RSD 值分别为 6.52%、3.31%、3.59%、3.11%、7.97%、4.39%, 平均值为 4.82%, 且目标峰 265 nm 处的 RSD 值为 3.59%, 表明该方法重复性良好。

2.5.4 三颗针标准汤剂 UV 指纹图谱的采集 取 15 批次三颗针标准汤剂冻干粉, 分别照“2.5.2”项下方法制样, 按“2.5.1”项下条件快速扫描, 其 UV 叠加图见图 5。

2.5.5 建立对照图谱 计算“2.5.4”中 15 批次紫外图谱各波长下吸光度的平均值, 以此平均值建立对照指纹图谱, 见图 6。

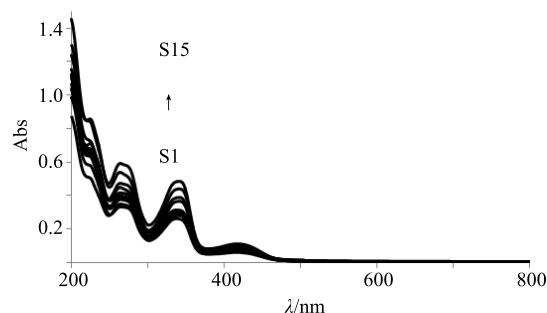


图 5 15 批次三颗针标准汤剂 UV 指纹图谱叠加图

Fig. 5 UV fingerprint overlay of 15 batches of BR standard decoction

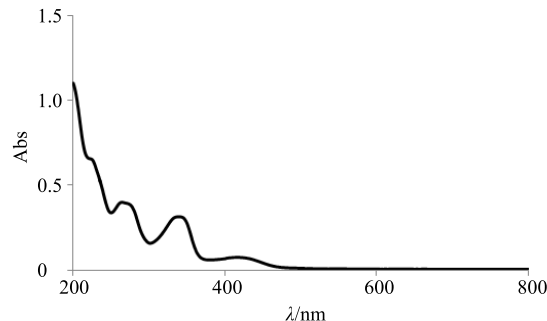


图 6 标准汤剂 UV 对照图谱

Fig. 6 UV reference map of BR standard decoction

2.5.6 样品紫外指纹图谱相似度分析 分别将 S1~S10 号样品的紫外指纹图谱与对照紫外指纹图谱进行相似度分析, 经数据处理软件“IBM SPSS statistics”中双变量相关“Kendall 的 tau-b”分析计算相似度^[14]。相似度范围为 0.991~1.000 (0.995、1.000、0.999、0.998、0.998、1.000、1.000、0.991、0.999、1.000), 相似度平均值 0.998, RSD 为 0.30%。表明 10 批次三颗针标准汤剂紫外指纹图谱与紫外对照指纹图谱的相似度高。将相似度平均值的 70%~130% 作为相似度变异可接受范围, 即 0.768~1.000。

2.5.7 验证性实验 取 S11~S15 号三颗针标准汤

剂测得紫外指纹图谱,分别与对照图谱进行相似度分析,并检验其相似度是否在所规定的范围,结果5批次紫外验证指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在0.987~1.000(0.999、1.000、0.998、0.987、0.998),相似度平均值为0.996,均在变异可接受范围内。

3 讨论

为有效控制中药配方颗粒生产各环节的质量,《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(征求意见稿)提出标准汤剂的概念并将其作为衡量中药配方颗粒是否与临床汤剂基本一致的标准参照物。按照技术要求,标准汤剂系由不少于15批原料分别制得,用出膏率、有效(或指标)成分的含量测定及转移率、指纹或特征图谱3个参数来表征,以平均值规定变异可接受范围,确定限度。采用HPLC或GC指纹图谱,加强专属性鉴别和整体质量控制。近年对标准汤剂的质量控制大多围绕有效成分含量进行,但中药汤剂是以多组分作为一个整体来发挥疗效,仅对几种物质成分进行定性或定量控制并不能完全控制中药质量^[15]。本实验对三颗针标准汤剂的指标成分含量测定、TLC鉴别、出膏率、提取转移率和紫外及红外指纹图谱进行报道,后续还将报道其HPLC及物理指纹图谱的研究结果。

TLC法可用于快速分离和定性分析少量复方制剂、化学药物等^[16]。本研究建立了三颗针标准汤剂的TLC检查项,实现了以对照药材的薄层图谱为指标,对标准汤剂进行整体控制。但近年,不少学者采用高效薄层色谱指纹图谱快速分离鉴别多种物质,并对其中多种成分进行指认^[17],加强了质量控制中的专属性鉴别。故在该项研究的后期也将对标准汤剂进行高效薄层色谱指纹图谱的研究,以加强其专属性研究。

紫外光谱反映了中药中化学组分 $\pi \rightarrow \pi^*$ 、 $n \rightarrow \pi^*$ 及 $n \rightarrow \sigma^*$ 化学键信息,由于不同的化学成分体系紫外吸收曲线具有指纹特征,紫外光谱指纹图谱可用于中药及其制剂质量鉴定^[18]。本研究中,将各批次标准汤剂在各波长处的吸光度平均值作为对照图谱吸光度值,并以此建立对照指纹图谱,通过SPSS软件分析S1~S10与对照图谱的相似度,统计其相似度范围为0.991~1.000,相似度平均值为0.998,规定其下限为0.768。根据此相似度范围可快速鉴别、评价三颗针标准汤剂质量,可用于三颗针标准汤剂的整体性评价。此外,将标准汤剂中盐酸小檗碱含量和各批次紫外指纹图谱与对照图谱的相似度

进行相关性分析,并未发现明显相关性,由此可见,仅仅通过有效成分含量测定进行标准汤剂的质量控制是不够的,还需加强指纹图谱分析。

红外光谱法具有多组分同时测定、样品不须预处理、分析不具破坏性、分析速度快、远距离测定和实时分析、重现性好等优点,目前多采用双指标序列分析法和对照图谱相似度分析法对样品进行定性研究。由于对照图谱分析法需用大量样品以建立对照图谱,而双指标序列分析法能准确反映任意2个样品之间的相似性及差异情况,同时从整体水平上对不同产区、不同时间的三颗针进行分组,更为客观。故此研究收集15批次来源不同的三颗针药材制成标准汤剂,通过双指标序列分析,建立变异可接受范围,从整体水平上鉴别三颗针标准汤剂。通过红外指纹图谱分组分析发现,为提高标准汤剂质量标准,应选择同一产地(道地产区优先)的饮片并在同一时间段制备。

田进国等^[19-20]曾提出,对相近种属配方颗粒,应首选红外指纹图谱法,根据其整体化学成分的差异去区别它们;若要整体进行快速鉴别与质量评价,最好联合选择光谱和色谱法技术。本研究采用薄层色谱法对指标成分进行鉴别,采用HPLC法对指标成分进行含量测定,后采用IR指纹图谱和UV指纹图谱相结合的方式,加强三颗针标准汤剂的多组分质量控制。今后还将从标准汤剂的性状、鉴别、检查、浸出物、HPLC指纹图谱、物理指纹图谱方面进行研究,以期全面建立三颗针标准汤剂质量评价方法,为三颗针配方颗粒质量控制提供支撑依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 王朝碧,魏俊莲,张凤兰,等.贵州三颗针的分布与应用[J].贵阳中医学院学报,2000,22(3):59-61.
- [3] 肖培根,刘国声,陈碧珠,等.三颗针植物资源的综合利用[J].药学通报,1979,14(8):381-382.
- [4] 李远辉,李慧婷,李延年,等.高品质中药配方颗粒与关键制造要素[J].中草药,2017,48(16):3259-3266.
- [5] 乔彬,张琛,张建春.中药配方颗粒的应用现状及前景分析[J].甘肃科技,2017,21(33):127-130.
- [6] 郝云芳,倪艳,李先荣.中药配方颗粒的质量控制方法研究进展[J].药物评价研究,2013,36(4):307-310.
- [7] 殷佳,潘晔,蔡雪朦,等.中药传统汤剂、浸膏剂和配方颗粒剂的比较[J].中草药,2017,48(18):3871-3875.
- [8] 傅凌鸥,吴春暖,孙丽,等.2013—2015年天津市市

- 瘤医院中药配方颗粒的使用情况分析 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(12): 2057-2063.
- [9] 徐亚运, 孔 铭, 李松林. 硫熏白芍配方颗粒检控指标的探讨 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3728-3733.
- [10] 中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求 (征求意见稿) [S]. 2016.
- [11] 沈晓宇, 刘雪松, 毕宇安, 等. 盐补骨脂标准汤剂质量评价体系的建立 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 100-108.
- [12] 杨新周. 臭灵丹红外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析法 [J]. 西南农业学报, 2017, 30(4): 887-893.
- [13] 陈 勇, 魏后超, 韦 韬, 等. 磨盘草药材红外指纹图谱共有峰率和变异峰率双指标序列分析法 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 709-712.
- [14] 伍蕊嗣, 刘 涛, 付春梅, 等. 基于紫外指纹图谱的热毒宁注射液质量研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3), 499-504.
- [15] 杨立伟, 王海南, 耿 莲, 等. 基于标准汤剂的中药整体质量控制模式探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 1-6.
- [16] 尹 丽, 宗兰兰, 蒲晓辉, 等. 薄层色谱法在药物分析中的应用 [J]. 河南大学学报, 2016, 35(2): 77-80.
- [17] 屈敏红, 李 倩, 伍彩红, 等. 豆蔻及其近缘种药用植物的高效薄层色谱指纹图谱研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(4): 258-262.
- [18] 潘春晖, 杨红玉, 张 焯, 等. 基于紫外指纹图谱的公英青蓝合剂质量研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(2): 578-585.
- [19] 田进国, 张 静, 任 健, 等. 同仁大活络丹与同仁牛黄清心丸红外指纹图谱的研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 326-330.
- [20] 田进国, 朱文荣, 任 健, 等. 茯苓、党参、重楼等13种中药配方颗粒红外指纹图谱的研究 [J]. 中成药, 2007, 26(7): 517-521.