

基于 HPLC 指纹图谱的黄柏配方颗粒汤剂与标准汤剂、传统汤剂对比研究

李学林^{1,2,3,4,5}, 王柯涵¹, 康欢¹, 施钧瀚^{2,3,4,5}, 王青晓⁶, 桂新景^{2,3,4,5}, 张璐^{2,3,4,5}, 张耀¹, 王艳丽¹, 冯文豪¹, 张璞¹, 姚静^{2,3,4,5*}, 刘瑞新^{1,2,3,4,5*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008
2. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450000
3. 国家中医药管理局 中药制剂三级实验室, 河南 郑州 450000
4. 河南省中药饮片临床应用现代化工程研究中心, 河南 郑州 450000
5. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450000
6. 河南省食品药品检验所, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 对比黄柏配方颗粒汤剂(DGD)与标准汤剂(SD)、传统汤剂(TD)的差异, 对市售配方颗粒(DG)的质量进行评价, 并建立 SD、TD 的相关标准及 DG 的评价方法。**方法** 采用 HPLC 建立指纹图谱, 从化学成分种类、代表性指标成分含量、指纹图谱相似度、共有峰峰面积总和、主成分分析(PCA)5个方面对 DGD(A~E 5个厂家各3批)与 SD(10批)、TD(10批)共7类35个供试品进行全面对比研究; 对 DGD 进行临床建议当量校正。**结果** ①SD 和 TD 中的21个共有峰均在 DGD 指纹图谱中得到保留。②DGD 中 A 厂木兰花碱含量比 SD 低 34.3% ($P<0.05$); C 厂木兰花碱含量比 SD 低 35.6% ($P<0.01$), 比 TD 低 37.0% ($P<0.05$); D 厂盐酸黄柏碱含量比 SD 低 22.0% ($P<0.05$), 比 TD 低 27.5% ($P<0.05$); D 厂盐酸小檗碱的含量比 SD 低 20.8% ($P<0.05$), 比 TD 低 23.8% ($P<0.05$); 其他厂家各成分与 SD、TD 无显著性差异 ($P>0.05$)。③各 DGD 与 SD 平均图谱相似度均大于 0.992 6, 与 TD 平均图谱相似度均大于 0.991 2, 成分相似度较高。④采用归一化法以 SD 的 21 个共有峰的总峰面积值为 1 个单位, 7 类供试品比值分别为 0.90、1.03、0.69、0.77、0.73、1.00、1.06。⑤PCA 显示 B 厂与 SD、TD 距离接近, 差异小。以 SD 的 21 个共有峰信息为标准, 采用峰面积加和法对 DG 的临床建议当量进行校正, 建议 A、C、D、E 厂家由 1 g 相当于原饮片 12 g 分别降低至 10.7、8.3、9.2、8.8 g, B 厂家无需校正, 仍为 1 g 相当于原饮片 10 g。**结论** 真实世界中多数黄柏 DGD 与 SD、TD 间存在成分含量上的差异, 并无成分种类和成分种类间比例的明显差异; 这些整体基本一致的差异可通过对临床建议当量进行校正加以调整, 从而促进临床合理用药。

关键词: 黄柏; 配方颗粒; 标准汤剂; 传统汤剂; 指纹图谱; 校正分析; 质量评价; HPLC; 主成分分析; 盐酸黄柏碱; 木兰花碱; 盐酸小檗碱

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)01-0091-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.01.014

Comparative study on composition of dispensing granule decoction, standard decoction, and traditional decoction of *Phellodendri Chinensis Cortex* prescription

LI Xue-lin^{1,2,3,4,5}, WANG Ke-han¹, KANG Huan¹, SHI Jun-han^{2,3,4,5}, WANG Qing-xiao⁶, GUI Xin-jing^{2,3,4,5}, ZHANG Lu^{2,3,4,5}, ZHANG Yao¹, WANG Yan-li¹, FENG Wen-hao¹, ZHANG Pu¹, YAO Jing^{2,3,4,5}, LIU Rui-xin^{1,2,3,4,5}

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

收稿日期: 2019-08-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81773892); 河南省首批自然科学基金面上项目(162300410187); 河南省高等学校重点科研项目(16A360021); 河南省中医药科学研究专项课题(2016ZY2055); 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研专项(2018JDZX039); 河南省中医药拔尖人才培养项目资助(2019ZYBJ07)

作者简介: 李学林(1960—), 男, 教授, 博士生导师, 主任药师, 主要从事中药应用形式研究。

Tel: (0371)66245142 E-mail: xuelinli450000@163.com

***通信作者:** 刘瑞新(1980—), 男, 博士, 硕士研究生导师, 副主任药师, 从事中药饮片临床应用现代化研究。

Tel: (0371)66233562 E-mail: liuruixin7@163.com

姚静(1975—), 女, 硕士, 副主任药师, 从事中药制剂研发和质量分析研究。Tel: (0371)66233639 E-mail: enjing2004@126.com

3. The Level Three Laboratory of Chinese Traditional Medical Preparation of State Administration of TCM, Zhengzhou 450000, China
4. Henan Province Engineering Research Center of Clinical Application Modernization of Traditional Chinese Medicine Pieces, Zhengzhou 450000, China
5. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P. R. China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China
6. Henan Institute for Food and Drug Inspection, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective Comparing the differences between dispensing granule decoction (DGD), standard decoction (SD) and traditional decoction (TD) of *Phellodendri Chinensis Cortex* (PCC) prescription to evaluate the quality of commercially available dispensing granule (DG), and establish the relevant standards for SD, TD and evaluative methods for DG. **Methods** Fingerprint was established by HPLC. A comprehensive comparative study was conducted on 35 samples of DGD (three batches from each of the five A—E manufacturers), SD (10 batches) and TD (10 batches) in seven categories from five aspects of chemical composition type, representative index component content, fingerprint similarity, total peak area sum and principal component analysis (PCA); Clinically recommended equivalent corrections were performed for DGD. **Results** ① Twenty-one common peaks in SD and TD were preserved in the DGD fingerprint. ② The content of magnoflorine in manufacturer A of DGD was 34.3% lower than that of SD ($P < 0.05$); The content of magnoflorine in manufacturer C was 35.6% lower than SD ($P < 0.01$), and 37.0% lower than TD ($P < 0.05$); The content of phellodendrine hydrochloride in D manufacturer was 22.0% lower than SD ($P < 0.05$), and 27.5% lower than TD ($P < 0.05$), The content of berberine hydrochloride in D manufacturer was 20.8% lower than SD ($P < 0.05$), and 23.8% lower than TD ($P < 0.05$). There were no significant differences between the other manufacturers' components. ③ The average similarity of each DGD and SD was greater than 0.992 6, and the average similarity of each DGD and TD was greater than 0.991 2, with high component similarity. ④ Using the normalization method, the total peak area of the 21 common peaks of SD was 1 unit, and the ratios of the seven types of samples were 0.90, 1.03, 0.69, 0.77, 0.73, 1.00, and 1.06. ⑤ PCA showed that the distance between the B manufacturer and SD and TD was close, and the difference was small. Using the 21 common peak information of SD as the standard, the peak area plus method was used to correct the clinical recommended equivalent of DG. It was recommended that manufacturers A, C, D, and E could be reduced from 1 g equivalent to 12 g of the original decoction pieces to 10.7, 8.3, 9.2, and 8.8 g, respectively. B manufacturer was not needed to be corrected, and still 1 g was equivalent to 10 g of the original decoction pieces. **Conclusion** There are differences in the content of components between DGD, SD, and TD in the real world. There is no significant difference in the proportion of components and components. These overall basically consistent differences can be adjusted by correcting the clinical recommended equivalent, thus promoting clinical rational drug use.

Key words: *Phellodendri Chinensis Cortex*; dispensing granule; standard decoction; traditional decoction; fingerprint; correction analysis; quality evaluation; HPLC; principal component analysis; phellodendrine chloride; magnoflorine; berberine hydrochloride

中药传统汤剂是我国应用最早、最广泛的剂型，是中医药辨证施治理论的神韵所在^[1-2]。然而，在当今生活节奏日益加快和中医药现代化的背景之下，因其服用时需煎煮、贮存不易、携带不便等缺点，严重制约了其在临床上的应用和发展，中药汤剂改革已成为大家普遍关注的焦点。中药配方颗粒（dispensing granule of Chinese medicine, DGCM）是应用现代制药技术将传统中药饮片经过提取、浓缩、干燥、制粒、包装而成的颗粒状物质^[3]，临方调配成汤剂后即成中药配方颗粒汤剂（dispensing granule decoction, DGD）^[4]，其在保持传统汤剂（traditional decoction, TD）随证加减优势的前提下，改进了 TD 的绝大多数弊端^[5]，在一定程度上推动了剂型改革创新，促进了中医药发展。然而其自身

也存在一些问题^[6]，如缺乏统一的质量标准和质量监控体系、与 TD 相比是否存在成分或临床疗效方面的差异等。这些问题是当前中医药工作者和很多患者非常关注的问题^[7-8]。近年来关于二者对比的研究取得了很多成绩^[9-13]，但基于“真实世界”下将多类样品、多批样品、多个层次的对比结果综合起来进行系统分析的文献相对较少^[14]。为进一步研究它们之间的差异规律，并能够反映“真实世界”中汤剂与配方颗粒间的差异所在，本实验在参考相关文献的技术标准和工艺参数的前提下，按技术要求特制备 2 种汤剂，即标准汤剂（standard decoction, SD）与 TD。其中 SD 是以中医理论为指导、临床应用为基础，参考现代提取方法，经标准化工艺制备而成的单味饮片水煎剂^[15-16]。

黄柏为芸香科黄檗属植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 习称“川黄柏”, 在临床上极为常用。本实验选择黄柏为研究载体, 从物质基础角度, 由化学成分种类、代表性指标成分含量、指纹图谱相似度、共有峰峰面积总和、主成分分析(PCA)对DGD、SD、TD进行全面分析探讨; 同时基于上述分析结果, 对部分DGD厂家所给出的临床推荐当量(当量: 企业根据工艺参数和相关实验数据确定的每克配方颗粒相当于传统饮片的克数)进行校正并给出相对合理校正建议, 最终为中药配方颗粒的合理应用和标准化提供研究思路。

1 仪器和材料

1.1 仪器

C21-QH2130 电磁炉, 额定功率 2 100 W, 美的集团; JZT-A 家用煤气灶, AQESIMSHI 有限公司; 不锈钢锅, 锅内径为 24 cm, 1 个排气孔, 孔内径为 0.5 cm; CP225D 十万分之一电子天平, 德国 Sartorius 公司; Agilent1260 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Agilent G4212-60008 紫外检测器 ChemstationA.01.04 色谱数据处理系统; TDL-5-A 离心机, 上海安亭科技仪器厂。

1.2 试剂

甲醇, 天津市四友精细化学品有限公司; 乙腈, 德国 Merck 公司; 磷酸, 天津市风船化学试剂科技有限公司; 水为超纯水, 甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯。

1.3 试药

黄柏饮片分别购自于郑州市 3 家中医院, 经河南中医药大学第一附属医院陈天朝主任药师鉴定均为芸香科黄檗属植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮的炮制品, 共 10 批, 产地均为四川, 生产企业: 安徽普仁中药饮片有限公司(5 批)、亳州市泸谯药业有限公司(2 批)、亳州市康博中药饮片有限公司(3 批), 批号分别为 17010123、1801313、1711023、1805253、1807103、1807300172、1806100442、170301、180601、180702。盐酸黄柏碱(批号 Z08A8L33360)、盐酸小檗碱(批号 Y18N8S48598)、木兰花碱(批号 R21M9F61834)均来源于上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均≥98%。黄柏配方颗粒共 15 批, A 厂(浓缩比 1:12, 批号 1709680、18036104、18066104, 编号 DGD1~DGD3)、B 厂(浓缩比 1:10, 批号 17000591、

16016881、17007311, 编号 DGD4~DGD6)、C 厂(浓缩比 1:12, 批号 1706005S、1709001S、1712002S, 编号 DGD7~DGD9)、D 厂(浓缩比 1:12, 批号 7081803、7091563、7110603, 编号 DGD10~DGD12)、E 厂(浓缩比 1:12, 批号 1803043、1705046、1712009, 编号 DGD13~DGD15)。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 DGD 的制备 精密称取 A 厂配方颗粒 DGD1~DGD3 各 1.667 g, B 厂配方颗粒 DGD4~DGD6 各 2.000 g, C 厂配方颗粒 DGD7~DGD9 各 1.667 g, D 厂配方颗粒 DGD10~DGD12 各 1.667 g, E 厂配方颗粒 DGD13~DGD15 各 1.667 g (均相当于川黄柏原药材饮片约 20 g), 加热水(80~100 °C) 60 mL 左右搅拌使全部溶解, 放冷, 加水定容至 100 mL, 备用。

2.1.2 SD 的制备^[17-20] 采用电磁炉为火源、不锈钢锅为煎煮器具的条件下进行 10 批 SD 的制备。取黄柏饮片 200 g, 一煎加水 682 mL, 浸泡 30 min, 武火(2 100 W)煮沸后转为文火(300 W)煎 30 min, 滤过, 滤液备用; 二煎加水 507 mL, 武火煮沸后转为文火煎 20 min, 涤纶滤布(200 目)滤过, 合并滤液, 放冷, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液加水定容至 1 000 mL, 即得。同法制备 10 批, 分别记为 SD1~SD10。

2.1.3 TD 的制备 由 3 个不同的实验人员进行 10 批 TD 的制备, 其中 2 人各制备 3 批, 1 人制备 4 批。按照传统的煎药方法自行制备样品, 参照“2.1.2”项下离心方法, 定容至 1 000 mL。黄柏 TD 的制备工艺参数及所得药液量见表 1。

2.2 对照品溶液的制备

分别称量盐酸小檗碱、盐酸黄柏碱、木兰花碱对照品加甲醇配制成含有盐酸黄柏碱 0.092 g/L、木兰花碱 0.117 g/L、盐酸小檗碱 0.103 g/L 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取“2.1.1”“2.1.2”与“2.1.3”项下制备好的样品溶液, 精密吸取各 5 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇醇沉并定容至刻度, 混匀, 滤过, 滤液过 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 即得。标记为 DGD1~DGD15、SD1~SD10、TD1~TD10。

2.4 色谱条件

Agilent 5 HC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,

表 1 3 个不同实验人员制备黄柏 TD 的工艺参数与得液量结果

Table 1 Technological parameters and liquid yield results of TD of PCC prepared by three experimenters

实验 人员	编号	样品量/ g	加热方式	煎煮器具 (口径 cm)	浸泡时间/ min	一煎/二煎加 水量/mL	一煎/二煎煎煮 时间/min	合并药 液量/mL
A	TD3	200	煤气灶	24	30	600/700	28/25	775
	TD4	200	煤气灶	24	30	1 000/500	20/20	770
	TD5	200	电磁炉	22	30	600/500	25/15	595
B	TD8	200	煤气灶	24	30	1 200/800	25/20	985
	TD9	200	煤气灶	24	30	1 000/800	25/20	970
	TD10	200	煤气灶	24	30	1 000/800	30/20	1 055*
C	TD1	200	电磁炉	24	30	800/650	30/20	800
	TD2	200	电磁炉	24	30	900/600	30/20	935
	TD6	200	电磁炉	24	30	700/500	25/15	550
	TD7	200	电磁炉	24	30	600/750	25/15	720

*TD10 合并药液量为 1 055 mL, 适当浓缩、放冷、定容至 1 000 mL

*The combined volume of TD10 is 1 055 mL, it should be appropriately concentrated, cooled, and fixed to 1 000 mL

5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~25 min, 10%~12%乙腈; 25~35 min, 12%~17%乙腈; 35~45 min, 17%~21%乙腈; 45~55 min, 21%~33%乙腈; 55~65 min, 33%~40%乙腈; 65~70 min, 40%~10%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 230 nm; 进样量 10 μL ; 理论塔板数 $\geq 4\ 000$ 。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性与范围考察 将盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸小檗碱分别配制成 200、100、1 037 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液进行线性回归。其中盐酸黄柏碱分别进样 2、4、5、6、8、10 μL ; 木兰花碱分别进样 2、4、5、6、8、10 μL ; 盐酸小檗碱分别进样 2、6、8、10、12、14 μL 。以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X), 进行线性回归。结果盐酸黄柏碱对照品溶液回归方程为 $Y=1\ 901.3 X-15.496$, $r=1.000\ 0$, 线性范围为 0.40~2.00 ng; 木兰花碱对照品溶液回归方程为 $Y=4\ 607.6 X-20.033$, $r=0.999\ 9$, 线性范围为 0.20~1.00 ng; 盐酸小檗碱对照品溶液回归方程为 $Y=2\ 246.6 X+335.66$, $r=0.999\ 8$, 线性范围为 2.07~14.52 ng。

2.5.2 精密度试验 精密量取 TD8 供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件连续进样 6 次测定, 记录色谱图。结果各主要共有特征峰的相对保留时间无明显变化, RSD 在 0.02%~0.45%; 相对峰面积 RSD 在 0.22%~3.75%; 盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸小檗碱的保留时间的 RSD 值分别为 0.33%、0.32%、

0.03%, 峰面积的 RSD 分别为 0.33%、0.16%、0.23%, 结果表明仪器精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 精密量取 TD8 供试品溶液, 分别于 0、4、6、8、12、24 h 按“2.4”项下色谱条件进样, 结果各主要共有特征峰的相对保留时间无明显变化, RSD 值在 0.02%~0.78%; 相对峰面积 RSD 在 0.05%~1.11%; 盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸小檗碱保留时间的 RSD 值分别为 0.57%、0.44%、0.02%, 峰面积的 RSD 值分别为 0.64%、0.50%、0.06%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.4 重复性试验 取同一批 TD8, 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液。按“2.4”项下色谱条件进样测定, 结果各主要共有特征峰的相对保留时间无明显变化, RSD 在 0.02%~0.68%, 相对峰面积 RSD 在 0.44%~4.55%; 盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸小檗碱保留时间的 RSD 分别为 0.59%、0.43%、0.03%; 峰面积 RSD 分别为 0.99%、0.43%、0.51%, 结果表明该方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 精密量取已知含量的样品 6 份, 每份 2.5 mL, 分别精密加入盐酸黄柏碱 740 $\mu\text{g/mL}$ 、木兰花碱 200 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱 417.6 $\mu\text{g/mL}$ 对照品混合溶液 1 mL, 加甲醇定容至 25 mL, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进行测定, 并计算回收率。盐酸黄柏碱、木兰花碱及盐酸小檗碱的平均加样回收率分别为 104.16%、100.69%、101.80%, RSD 分别为 3.43%、1.73%、1.56%。

2.6 指纹图谱的建立和共有峰的确定

2.6.1 建立黄柏 DGD 标准图谱 按照“2.3”项下方法制备黄柏 DGD 供试品溶液共 15 批,按“2.4”项下色谱条件测定,记录色谱图,构建 HPLC 指纹图谱。标示出黄柏 DGD 中有 22 个共有峰,结果见图 1。

2.6.2 建立黄柏饮片 SD 标准图谱 按照“2.3”项下方法制备黄柏饮片 SD 供试品溶液共 10 批,按“2.4”项下色谱条件测定,构建 HPLC 指纹图谱。结果标示出黄柏 SD 有 21 个共有色谱峰,结果见

图 2。

2.6.3 建立黄柏饮片 TD 标准图谱 按照“2.3”项下方法制备黄柏 TD 供试品溶液共 10 批,按“2.4”项下色谱条件测定,记录色谱图,构建 HPLC 指纹图谱。标示出 21 个共有峰(与 SD 共有峰一致),结果见图 3。

2.7 指纹图谱的比较

2.7.1 色谱峰的归属 SD 和 TD 的 21 个共有峰均在 DGD 指纹图谱中得到保留,相同峰位的色谱峰峰面积一致。通过与对照品色谱图(图 4)比较,

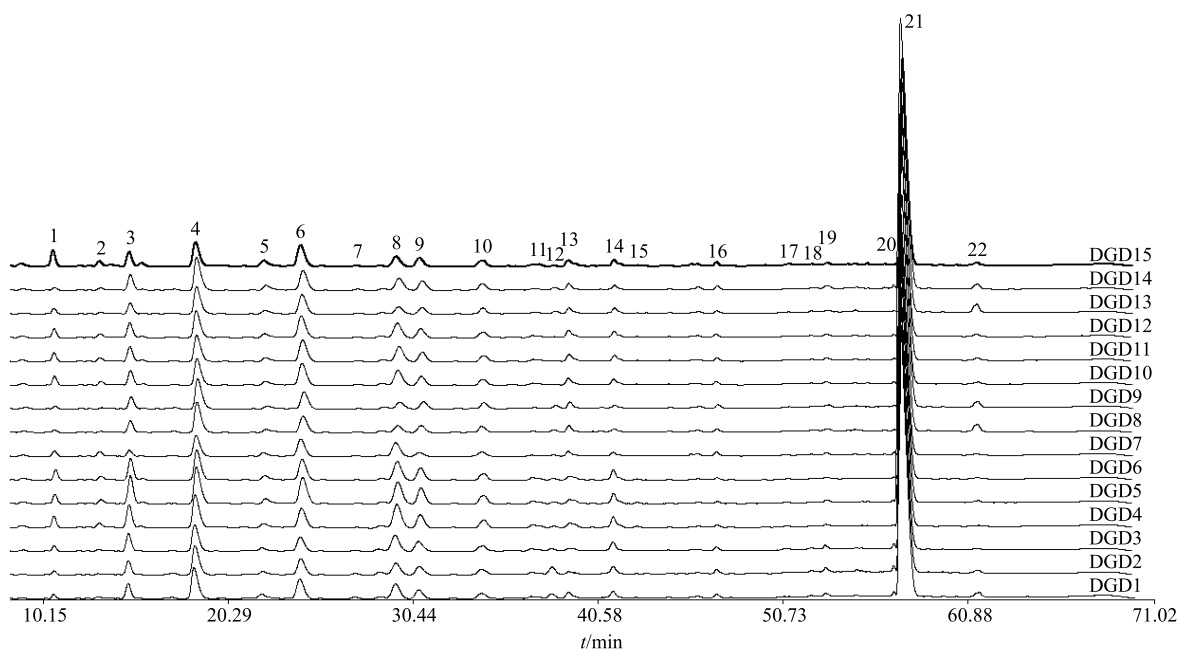


图 1 15 批黄柏 DGD 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 15 batches of PCC DGD

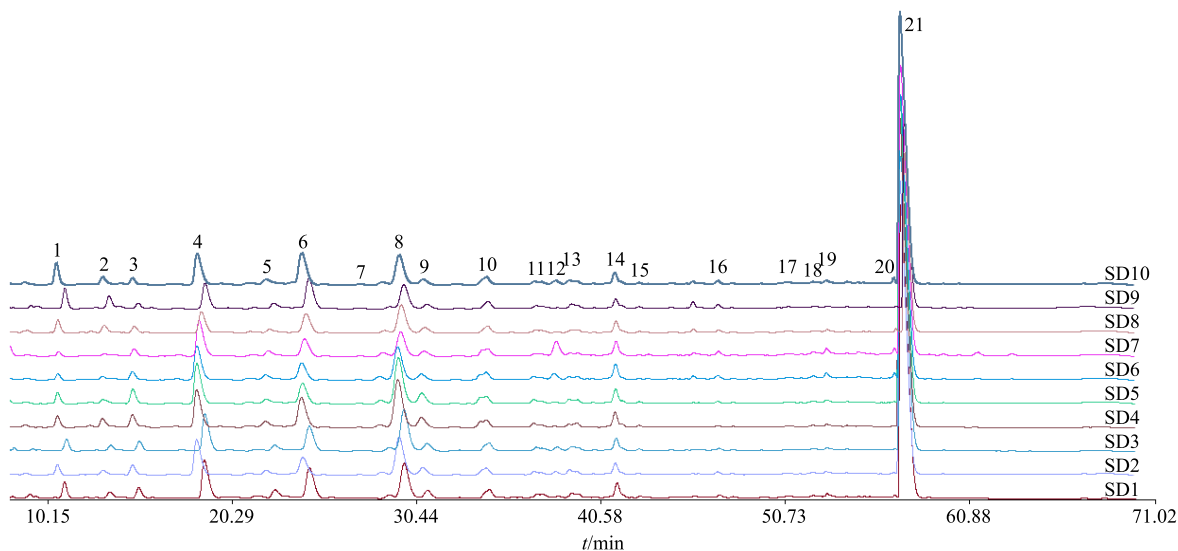


图 2 10 批黄柏 SD 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of 10 batches of PCC SD

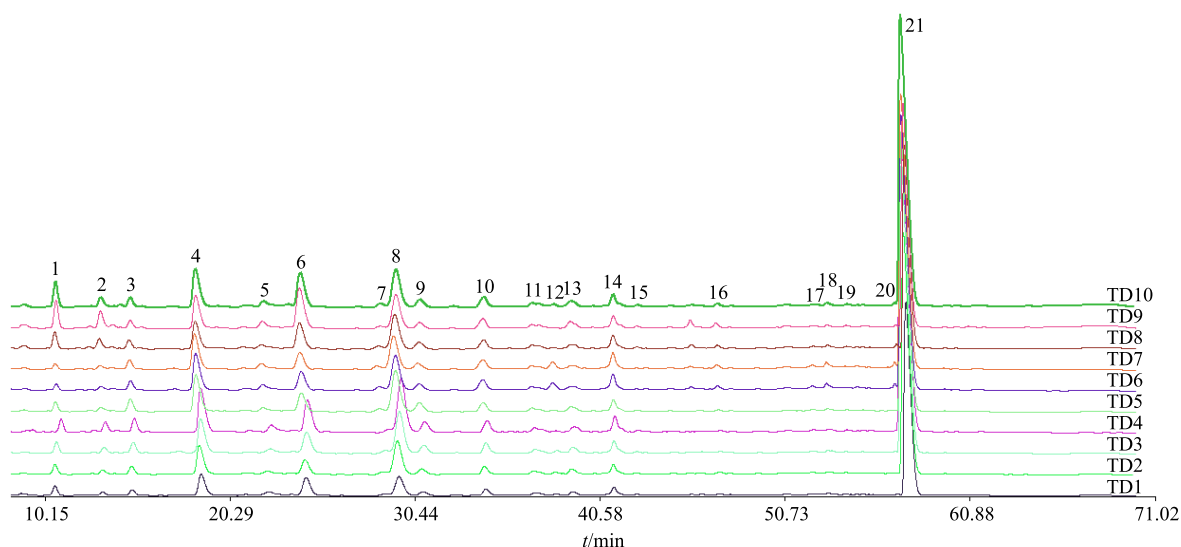


图 3 10 批黄柏 TD 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint of 10 batches of PCC TD

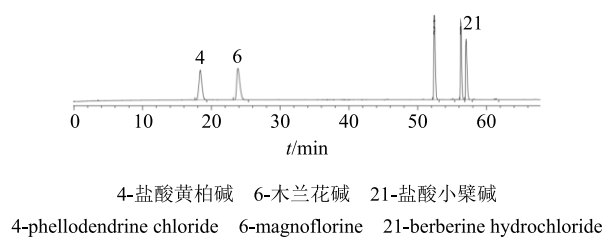


图 4 混合对照品的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of mixed reference

确认 4 号峰为盐酸黄柏碱, 6 号峰为木兰花碱, 21 号峰为盐酸小檗碱。

2.7.2 指纹图谱的相似度比较 采用相关系数法, 基于 Matlab 软件 (2016 b 版本), 在求取黄柏 SD、TD 各自特征图谱的平均谱数据 (每 1 个峰的均值所组成的图谱) 的基础上, 计算各 DGD 分别与 SD、TD 平均谱的相似度。结果见表 2。结果显示, 各 DGD 与 SD 平均图谱相似度均大于 0.992 6, 与 TD 平均图谱相似度均大于 0.991 2, 整体相似度较高。此外, 整体上, B 厂、D 厂与 SD、TD 的相似度更高, 明显高于 A 厂 ($P < 0.05$) 和 E 厂 ($P < 0.01$)。

2.7.3 共有峰总峰面积对比 以 10 批 SD 色谱图中所有共有峰总峰面积的均值定为 1, 采用归一化法求得其他供试品共有峰总峰面积的相对值, 对 7 类 (A~E 厂 DGD、SD、TD) 共 35 个样品的共有峰总峰面积进行对比。归一化比值见表 3。结果显示, 除 B 厂与 SD、TD 的总共有峰峰面积无显著差异外 ($P > 0.05$), 其余各厂家或与 TD、或与 SD 均有显著差异或极显著差异。

表 2 黄柏 DGD、SD、TD 中相似度对比结果 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison results of similarity between PCC DGD, SD and TD ($\bar{x} \pm s$)

样品	n	相似度	
		SD (n=10)	TD (n=10)
DGD-A	3	0.995 2 $\pm$ 0.000 9	0.994 0 $\pm$ 0.001 0
DGD-B	3	0.997 0 $\pm$ 0.000 6	0.996 2 $\pm$ 0.000 8
DGD-C	3	0.994 4 $\pm$ 0.002 9	0.993 3 $\pm$ 0.003 2
DGD-D	3	0.996 9 $\pm$ 0.000 1	0.996 1 $\pm$ 0.000 1
DGD-E	3	0.994 2 $\pm$ 0.000 7	0.993 2 $\pm$ 0.000 7

表 3 黄柏 DGD、SD、TD 共有峰面积对比结果 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison results of common peak area of PCC DGD, SD and TD ($\bar{x} \pm s$)

样品	n	共有峰面积比值
DGD-A	3	1.06 $\pm$ 0.21 [#]
DGD-B	3	1.00 $\pm$ 0.20
DGD-C	3	0.90 $\pm$ 0.03 ^{###}
DGD-D	3	1.03 $\pm$ 0.11 ^{**##}
DGD-E	3	0.69 $\pm$ 0.12 [#]
SD	10	0.77 $\pm$ 0.00
TD	10	0.73 $\pm$ 0.16

与 SD 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 TD 比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs SD; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs TD

2.8 代表性指标成分含量的比较

采用外标一点法计算盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸小檗碱的含量, 由于样本量不等, 在计算 t 检验前需进行 F 检验来确定样本是等方差还是异方

差, 确定后再进行 t 检验来计算 DGD、SD、TD 中 3 者的含量差异。指标性成分含量相对比值结果见表 4。结果显示, DGD 中 A 厂木兰花碱含量比 SD 低 34.3% ($P<0.05$); C 厂木兰花碱含量比 SD 低

表 4 DGD、SD、TD 中指标性成分含量相对比值 ($\bar{x} \pm s$)
Table 4 Relative ratio of index component content in DGD, SD and TD ($\bar{x} \pm s$)

样品	n	指标性成分含量相对比值		
		盐酸黄柏碱	木兰花碱	盐酸小檗碱
DGD-A	3	0.86 ± 0.08	$0.66 \pm 0.19^*$	0.99 ± 0.04
DGD-B	3	0.97 ± 0.11	0.90 ± 0.17	1.08 ± 0.13
DGD-C	3	0.81 ± 0.20	$0.64 \pm 0.03^{**\#}$	0.76 ± 0.16
DGD-D	3	$0.77 \pm 0.01^{*\#}$	0.85 ± 0.02	$0.79 \pm 0.00^{*\#}$
DGD-E	3	0.84 ± 0.16	0.81 ± 0.07	0.75 ± 0.22
SD	10	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.26
TD	10	1.08 ± 0.20	1.02 ± 0.37	1.04 ± 0.25

与 SD 比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$; 与 TD 比较: $^\#P<0.05$

$^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs SD; $^\#P<0.05$ vs TD

35.6% ($P<0.01$), 比 TD 低 37.0% ($P<0.05$); D 厂盐酸黄柏碱含量比 SD 低 22.0% ($P<0.05$), 比 TD 低 27.5% ($P<0.05$); D 厂盐酸小檗碱的含量比 SD 低 20.8% ($P<0.05$), 比 TD 低 23.8% ($P<0.05$); 其他厂家与 SD、TD 均无显著性差异 ($P>0.05$)。结果表明, 除 B 厂和 E 厂外, 其余各厂家配方颗粒的某一种或某 2 种指标成分均显著低于 SD 或 TD。

2.9 PCA

PCA 法是对多变量数据进行统计处理的一种数据线性投影方法, 它在尽可能保留原有数据的基础上将高维空间中的样本映射到低维的主成分空间中, 同时根据实际需要从中可取几个较少的综合指标尽可能多地反映原来指标的信息, 从 35 个供试品的 21 个共有峰面积的主成分分析贡献率及累积贡献率可以得出, 各主成分的贡献率: PC1 为 38.66%, PC2 为 20.92%, 其他贡献率较小。从累积贡献率来看, 前 2 个特征值的累积贡献率为 59.58%, 供试品在二维平面分布图见图 5。

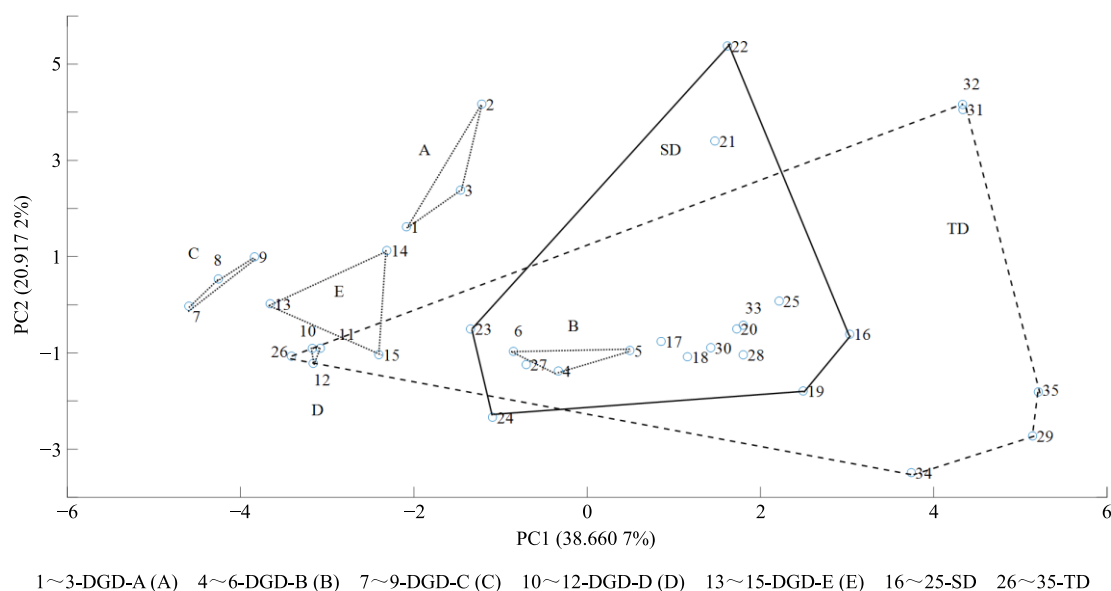


图 5 35 个供试品中 21 个共有峰的 PCA 比较

Fig. 5 Comparison of PCA of 21 common peaks in 35 test specimens

结果显示, SD 和 TD 有较大交叉; B 厂在 SD 和 TD 覆盖之下, 说明其与 SD、TD 的质量一致性较好。D 厂在 TD 区域之内, 但位于边缘; 其 3 批样品较为集中, 说明原料、工艺稳定性相对较好。A、C、E 厂配方颗粒与 SD、TD 在二维空间中距离较大, 表明与 SD、TD 差异相对较大。

2.10 校正分析

以 SD 信息为标准, 采用峰面积加和、峰面积

平均倍数方法计算 5 个厂家配方颗粒临床推荐当量的校正系数 (当量即为使用剂量)。

2.10.1 峰面积加和法 峰面积加和法即将所需共有峰面积加和, 进行当量折算的方法, 在同一谱图中各色谱峰峰面积相差较大的情况下使用。

采用峰面积加和法, 通过算出每个批号的 21 个共有峰 (已知成分和未知成分) 面积之和的平均值, 以 SD 的平均值为标准, 求它与各厂家 DGD 平

均值的比值,以进行校正系数的计算。校正系数计算结果见表 5。

采用峰面积加和法,以 3 个指标成分(盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸小檗碱)进行校正系数的计算。建议在临床推荐当量上需做相应调整,校正系数计算结果见表 6。

表 5 DGD 中 21 个共有峰校正系数 (峰面积加和法)

Table 5 Twenty-one common peak correction coefficients in PCC DGD (peak area summation method)

样品	厂家标示推荐当量	校正系数	本实验计算当量
DGD-A	1 : 12	1.12	1 : 10.7
DGD-B	1 : 10	0.97	1 : 10.3
DGD-C	1 : 12	1.45	1 : 8.3
DGD-D	1 : 12	1.30	1 : 9.2
DGD-E	1 : 12	1.37	1 : 8.8

表 6 DGD 中 3 个指标成分校正系数 (峰面积加和法)

Table 6 Correction coefficient of three indicator components in PCC DGD (peak area summation method)

样品	厂家标示推荐当量	校正系数	本实验计算当量
DGD-A	1 : 12	1.05	1 : 11.4
DGD-B	1 : 10	0.95	1 : 10.5
DGD-C	1 : 12	1.32	1 : 9.1
DGD-D	1 : 12	1.26	1 : 9.6
DGD-E	1 : 12	1.31	1 : 9.2

2.10.2 平均倍数法 平均倍数法即 n 个峰,所有 SD 样品的峰 i 平均峰面积值为 p ,某配方颗粒企业的配方颗粒样品峰 i 峰面积为 q ,则倍数为 $k(p/q)$; $\Sigma k/n$ 就是平均倍数。该方法适用于在同一谱图中各色峰峰面积相差较小,且没有证据表明不同色谱峰的单位峰面积对应的药效当量不同(即效价差异很大)的情况。

采用平均倍数法,以 21 个共有峰(已知成分和未知成分)进行校正系数的计算。校正系数计算结果见表 7。

采用平均倍数法,以 3 个指标成分(盐酸黄柏碱、木兰花碱、盐酸小檗碱)进行校正系数的计算。校正系数计算结果见表 8。

3 讨论

3.1 SD 的制备

为了反映真实世界中汤剂与配方颗粒的差异,选择不同批次的汤剂和配方颗粒进行实验。本实验结合国家药典委员会在 2016 年 8 月颁布《中药配方

表 7 DGD 中 21 个共有峰校正系数 (平均倍数法)

Table 7 Twenty-one common peak correction coefficients in PCC DGD (average multiple method)

样品	厂家标示推荐当量	校正系数	本实验计算当量
DGD-A	1 : 12	1.56	1 : 7.7
DGD-B	1 : 10	1.32	1 : 7.6
DGD-C	1 : 12	2.25	1 : 5.3
DGD-D	1 : 12	1.82	1 : 6.6
DGD-E	1 : 12	1.79	1 : 6.7

表 8 DGD 中 3 个指标成分校正系数 (平均倍数法)

Table 8 Correction coefficient of three indicator components in PCC DGD (average multiple method)

样品	厂家标示推荐当量	校正系数	本实验计算当量
DGD-A	1 : 12	1.25	1 : 9.6
DGD-B	1 : 10	1.04	1 : 9.7
DGD-C	1 : 12	1.39	1 : 8.7
DGD-D	1 : 12	1.24	1 : 9.7
DGD-E	1 : 12	1.28	1 : 9.4

颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿)》和相关参考文献^[17-20]来对黄柏 SD 加水量的具体方法进行制定。以加水量公式确定每副药的加水量,从而进行 10 批 SD 的制备。3 次平行实验结果为一煎平均蒸发系数为 4.72 mL/min,吸水系数为 1.39 mL/g,二煎平均蒸发系数为 8.54 mL/min,吸水系数为 1.49 mL/g,每煎得液量为 300 mL。在以电磁炉为加热方式、不锈钢锅为煎煮器具、公式化的饮片加水量等的条件下进行 SD 的制备。

加水量计算公式: $Q_1 = K_1 W + V_1 T + R_1$; $Q_2 = [K_2 W - K_1 W] + V_2 T + R_2$ 。其中下标 1、2 分别代表一煎、二煎, Q 为加水量(mL), K 为吸水系数(mL/g), W 为饮片原质量(g), V 为单位时间蒸发系数(mL/min), T 为文火煎煮时间(min), R 为预期得液量(mL)。吸水系数=吸水量/饮片质量=(湿药渣总质量-饮片原质量)/饮片质量;单位时间蒸发系数=(药材加水量-药材吸水量-得液量)/文火煎煮时间。在统一加热方式、煎煮器具、浸泡时间(30 min)、煎煮时间(30/20 min)及煎煮次数(2 次)等的条件下,得液量结果较为稳定,均在 556~612 mL。

3.2 色谱条件的选择

实验前期考察了甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液 3 种流动相体系。结果表

明以乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱时,黄柏药材中主要成分的分离效果较好且色谱峰较多,能够满足指纹图谱对色谱峰的要求。分析 230~305 nm 的指纹图谱,结合色谱峰个数和强度综合考察,结果表明在 260 nm 处可较全面地体现 DGD 各样品的图谱特征。

3.3 指标性成分的确定

黄柏中的化学成分较为丰富,其中主要活性部位为生物碱类。现代研究已证实,黄柏治疗疾病的主要物质基础为盐酸小檗碱,且其含量最高^[21]。盐酸小檗碱、木兰花碱和盐酸黄柏碱成为黄柏品质鉴定中的指标成分^[11]。黄柏具有广泛的药理活性,如抗菌、抗病毒、镇咳、降压以及增强免疫等。盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱均为黄柏中抗菌的有效成分,其中黄柏碱、小檗碱对痢疾杆菌、大肠杆菌、肺炎双球菌、金葡菌、链球菌、伤寒杆菌及阿米巴原虫有抑制作用,临床主要用于治疗肠道感染及菌痢等。木兰花碱具有抗炎、杀虫、降压作用。指标成分与黄柏药理作用相一致。

3.4 代表性指标成分含量分析比较

因为 DGD 与 SD、TD 各组样本量不相同 ($n=3$ 或 10),在样品进行 t 检验前先进行 F 检验, F 检验是用于判断两总体方差是否不等的方法^[24]。 F 检验的结果大于 0.05 时,在进行 t 检验时选择双样本等方差; F 检验的结果小于 0.05 时,在进行 t 检验时选择双样本异方差。经 F 检验,A 厂盐酸小檗碱峰面积与 SD、TD 异方差;C 厂木兰花碱峰面积与 SD、TD 异方差;D 厂样品中 3 种指标成分的峰面积均与 SD、TD 异方差;E 厂木兰花碱峰面积与 TD 异方差;其余均为等方差。

通过 t 检验的数据结果对比不难发现,有 3 个厂家配方颗粒的某一种或某两种指标成分均显著低于 SD 或 TD;出现差异的原因,除了原料因素和制剂工艺因素外,推荐当量的不合理确定也是重要的影响因素。

3.5 指纹图谱的相似度和共有峰总峰面积的分析比较

指纹图谱技术能全面反映中药饮片或制剂的内在化学特征,具有整体性和模糊性特点,适用于评价中药配方颗粒的质量^[16,23]。研究表明,指纹图谱技术已成为控制中药质量的最有效手段^[24-25]。本实验中,各厂家配方颗粒与 TD、SD 之间整体相似度较高,说明真实世界中各厂家 DGD 所含成分与 TD、

SD 之间并无成分种类之间比例的差异,仅存在成分整体比例上的差异,而这种整体上统一的差异,可以通过整体缩减或提升当量加以校正。部分厂家的配方颗粒质量相对稳定。

共有峰总峰面积对比分析结果表明,除少数厂家质量接近 SD 和 TD 外,较多厂家需提升各自厂家配方颗粒的质量。

另经对比,无论是 3 种指标成分,还是总峰面积,与 TD 相比,虽然 SD 的指标成分含量均值、总峰面积均值和各自的 RSD 均略微降低,但均无显著性差异 ($P>0.05$);对同一饮片生产企业分组对比的结果也是如此。这说明 SD 对于煎药过程和工艺参数的标准化的意义并不明显,不同批次汤剂的主要差异可能并非煎药过程引起,而更多的可能是中药饮片原料本身的差异所致;这可能也是 SD 难以“标准”的主要原因之一。反过来说,即便不统一煎药过程,只要在真实世界中实施多批次整体比较,也可以得出相对客观和准确的结论。

3.6 PCA

在 PCA 二维图中,B 厂配方颗粒在 SD、TD 区域之内,说明在一定程度上 B 厂家与 SD、TD 的距离接近,成分含量接近,与共有峰面积比较结果相一致。D 厂工艺相对稳定。较多厂家的配方颗粒在二维空间中的距离较大,提示应进一步加强工艺及质量标准的统一。

PCA 分析中前 2 个主成解释释总变异相对较小,一是由于涉及变量较多,降维效率低;二是涉及样品数相对较多,也会导致降维效率降低;三是由于样品之间共线性本身较差,各样品之间的差异相对较大。后续可以探讨用经过归属且具有明确药理活性的成分群(变量)进行 PCA,以提高降维效率和分析准确性。

3.7 校正分析

本实验采用峰面积加和法和平均倍数法对 5 个厂家的 DGD 进行校正系数的计算,通过临床推荐当量和校正系数计算出本文建议当量。两种方法各有利弊,峰面积加和法同时考虑成分种类和成分剂量;平均倍数法将每种成分的应调整的倍数进行平均,具有拉平效应,更适用于各成分倍数本身变化方向一致、变化率接近,且各成分峰面积也较为接近时使用。因此,前者更具有普适性。峰面积加和法中,同时考虑已知成分和未知成分的方法,更为全面。

本实验对 B 厂家的计算当量与 B 厂自行确定临床推荐当量基本一致, 无需进行调整。A、C、D、E 4 个厂家的计算当量与临床推荐当量有一定差异, 需根据计算结果进行临床用药量的相应调整。可以看出, B 厂对推荐当量的确定较为客观、科学、准确(其当量为 1:10, 小于其他 4 个厂家的 1:12)。

本实验对于 DGD 生产过程中可能出现的“以辅料代替浸膏量”, 或无依据的直接增大临床推荐当量的做法, 均有一定的控制作用。

综上所述, 本实验通过全面对比 DGD、SD、TD 的成分差异, 表明三者间的化学成分仅有含量的明显差异, 并无成分种类的明显差异, 根据含量差异对中药配方颗粒的临床建议当量进行校正, 不仅可以促进临床合理应用, 也为国家制定中药配方颗粒统一质量标准提供新思路。课题组后续将进行入血成分及药效层面的深入探讨, 以获取三者更全面的差异规律。

参考文献

- [1] 付敏, 宋雅琳, 孙增涛. 中药汤剂和中药颗粒制剂的现代应用对比研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2017, 15(18): 152-154.
- [2] 陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物和传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4519-4528.
- [3] 刘志勤. 中药配方颗粒利弊浅析 [J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(8): 722.
- [4] 姚静, 施钧瀚, 桂新景, 等. 基于 HPLC 指纹图谱评价的当归补血汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的成分差异分析 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2567-2574.
- [5] 刘瑞新, 施钧瀚, 张璐, 等. 中药汤剂改革和中药配方颗粒研究的新思路 [J]. 中医学报, 2014, 29(2): 239-241.
- [6] 韩振蕴, 蔡舒婷, 张斐姝, 等. 中药配方颗粒临床使用中存在问题的调研与分析 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(7): 2862-2864.
- [7] 连红兵. 中药配方颗粒在临床上的利弊分析 [J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(2): 101-102.
- [8] 阎姝, 夏亚飞, 杨艳, 等. 中红外光谱法评价 6 家企业生产的黄柏、茯苓和熟地黄配方颗粒的质量 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 2005-2010.
- [9] 刘瑞新, 施钧瀚, 张璐, 等. 基于 HPLC、PCA 与相似度评价的芍药甘草汤传统汤剂与配方颗粒汤剂的差异规律分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 1-5.
- [10] 李红, 李妍, 田杰, 等. 葛根芩连汤配方颗粒和传统汤剂的 HPLC 的指纹图谱对比研究 [J]. 世界中医药, 2018, 13(9): 2304-2307.
- [11] 林清, 张建军, 李伟, 等. 五倍子与黄柏外用治疗急性湿疹的配伍合理性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 2126-2129.
- [12] 穆岩, 郝翠, 赵恒强, 等. 基于标准汤剂的丹参配方颗粒质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(12): 2921-2924.
- [13] 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.
- [14] 刘瑞新. 中药剂型选择及制剂等效性研究概况 [J]. 中医杂志, 2007, 48(1): 83-85.
- [15] 李艳, 白明, 宋亚刚, 等. 中药标准汤剂的研究与思考 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 3977-3980.
- [16] 周蔚昕, 刘涛, 刘钱, 等. 川芎饮片标准汤剂的 HPLC 及物理指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5107-5115.
- [17] 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.
- [18] 刘德文, 邓哲, 陈莎, 等. 泽泻饮片标准汤剂的制备及质量评价 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 860-867.
- [19] 袁强华, 呼梅, 谈静. 化扁方标准汤剂制备工艺 [J]. 中成药, 2019, 41(7): 1672-1675.
- [20] 张国瑗, 邓哲, 章军, 等. 车前草饮片标准汤剂的制备及质量控制方法研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1362-1365.
- [21] 杨俐, 叶萌, 高顺. 基于《中华人民共和国药典》修订对黄柏主要有效成分研究的思考 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 3905-3908.
- [22] 孙振球, 徐勇勇, 颜艳, 等. 医学统计学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [23] 徐玉玲, 贾裕杰, 张文文, 等. 基于标准汤剂的三颗针配方颗粒质量评价研究 (I) [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4535-4543.
- [24] Liu J, Zhou J, Zhang Q Q, et al. Monosaccharide analysis and fingerprinting identification of polysaccharides from *Poria cocos* and *Polyporus umbellatus* by HPLC combined with chemometrics methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 406-411.
- [25] Sharifi R, Langari R. Nonlinear sensor fault diagnosis using mixture of probabilistic PCA models [J]. *Mech Syst Signal Pr*, 2017, 85: 638-650.