

## 丹膝颗粒组成药味 UPLC 指纹图谱的 1 次稳态投料量研究

王敏存<sup>1,2</sup>, 贺琪璐<sup>4,5</sup>, 周燕子<sup>1,2</sup>, 陈定芳<sup>1,2</sup>, 杨学斌<sup>1,2</sup>, 李萍<sup>1,2</sup>, 李海英<sup>1,2</sup>, 黄胜<sup>3</sup>, 邓凯文<sup>4,5</sup>, 潘雪<sup>1,2\*</sup>, 贺福元<sup>1,2,4,6\*</sup>

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208
3. 九芝堂股份有限公司, 湖南 长沙 410008
4. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 湖南 长沙 410208
5. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007
6. 中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 湖南 长沙 410208

**摘要:** 目的 建立丹膝颗粒组成药味的 UPLC 指纹图谱, 并运用总量统计矩、信息熵和信息量及 1 次投料量数学模型, 计算出稳态 1 次投料量, 建立动态中药成分群的稳态性质量提取方法。方法 采用 UPLC 法, 色谱柱为 Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量为 0.4 mL/min; 240 nm UV 检测; 柱温为 30 °C; 进样量为 3 μL。建立丹参、牛膝、川芎等 12 味丹膝颗粒组成药味的 UPLC 指纹图谱, 采用总量统计矩、信息熵和信息量分析方法获得指纹图谱的动态性参数, 并根据遗传统计学原理获得单味药材及全方的 1 次投料量, 指导工业化大生产, 获得成分稳态的丹膝颗粒。结果 丹膝颗粒 12 味组成药味的平均总量统计矩零、一、二阶矩、信息熵、信息量分别为  $6.56 \times 10^4$ 、13.36、50.71、5.75、 $3.59 \times 10^5$ ; 其中以桑寄生药材信息量的 RSD 最大, 以川芎药材的 RSD 最小, 平均为 24.51%; 按单味药材投料, 据全方累积信息量的 RSD 计算出 1 次投料量为 2.13 kg, 按全方的比例投料, 全方 1 次稳态投料量为 335.35 kg, 远远大于《中国药典》2020 年版规定。结论 丹膝颗粒组成药味的指纹图谱动态性可用总量统计矩、信息熵、信息量进行分析, 据此可获得稳态的一次投料量, 据此投料生产可保证丹膝颗粒质量的稳定。

**关键词:** 丹膝颗粒; 指纹图谱; 总量统计矩; 超分子“气析”理论; 1 次稳态投料量

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)03-0704-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.008

## Study on one-time steady-state feeding quantity of UPLC fingerprint of composition of function ingredients of Danxi Granules

WANG Min-cun<sup>1, 2</sup>, HE Qi-jun<sup>4, 5</sup>, ZHOU Yan-zi<sup>1, 2</sup>, CHEN Ding-fang<sup>1, 2</sup>, YANG Xue-bin<sup>1, 2</sup>, LI Ping<sup>1, 2</sup>, LI Hai-ying<sup>1, 2</sup>, HUANG Sheng<sup>3</sup>, DENG Kai-wen<sup>4, 5</sup>, PAN Xue<sup>1, 2</sup>, HE Fu-yuan<sup>1, 2, 4, 6</sup>

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine of Hunan Province, Changsha 410208, China
3. Jiuzhitang Co., Ltd., Changsha 410008, China
4. Laboratory of Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
5. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 国家自然科学基金(81874507); 国家自然科学基金(81803729); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ80058); 湖南省中医药科研基金项目(2021078); 长沙市科技计划项目(kq1907137); 湖南省研究生科研创新项目(CX20210689); 湖南中医药大学校级科研基金(2019XJJ024)

作者简介: 王敏存, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药复方的生物有效性及其新制剂、新技术与新工艺的研究。

Tel: (0731)88458225 E-mail: 13312587641@163.com

\*通信作者: 贺福元, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化的研究。

Tel: (0731)85381372 E-mail: pharmsharking@tom.com

潘雪, 讲师, 从事中药药理学、中药复方物质基础及超分子化学研究。E-mail: 405465029@qq.com

6. Key Laboratory of Medicinal Properties and Efficacy of Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To establish a UPLC fingerprint of composition of function ingredients of Danxi Granules (丹膝颗粒), and use total statistical moments, information entropy, information amount and one-time steady-state feeding quantity mathematical model, to calculate the one-time steady-state feeding quantity, and establish a steady-state quality extraction method for dynamic Chinese medicine component groups. **Method** UPLC method was adopted. The sample was separated on a chromatographic column of Acquity UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as mobile phase, gradient elution at a volume flow rate of 0.4 mL/min, 240 nm UV detection; The column temperature was 30 °C; The injection volume was 3 μL. UPLC fingerprint of 12 Chinese medicine herbs of composition of function ingredients of Danxi Granules was established. The dynamic parameters of the fingerprints were obtained by total statistical moment, information entropy and information amount. The one-time steady-state feeding quantity of single-medicinal herb and complex preparation were obtained according to the principles of genetic statistics, which guided industrial production and obtained Danxi Granules with stable ingredients. **Results** The average total statistical zero, first and second moments, information entropy, and information amount of the 12 composition of function ingredients of Danxi Granules were  $6.56 \times 10^4$ , 13.36, 50.71, 5.75,  $3.59 \times 10^5$  respectively; Among them, the RSD of information amount of Chinese medicine herbs *Taxillus chinensis* was the largest one, and the RSD of *Chuanxiong Rhizoma* was the smallest one, with an average of 24.51%. According to single medicinal herb, the one-time steady-state feeding quantity calculated according to the RSD change of the accumulated information amount of the whole prescription was 2.13 kg. When one-time steady-state feeding quantity was 335.35 kg according to ratio of the whole prescription, which was far greater than that stipulated in Chinese Pharmacopoeia. **Conclusion** The dynamics of the fingerprint of composition of function ingredients Danxi Granule can be analyzed by total statistical moment, information entropy, and information amount. According to this, one-time steady-state feeding quantity can be obtained, and stability of the quality of Danxi Granules can be guaranteed.

**Key words:** Danxi Granules; fingerprint; total statistical moment; supramolecular *qi* chromatography theory; one-time steady-state feeding quantity

丹膝颗粒由丹参、牛膝、天麻、牡丹皮、赤芍、川芎、地黄、淫羊藿、桑寄生、栀子、决明子、火麻仁共 12 味药材组成，具有养阴平肝、熄风通络、清热除烦功效；用于中风病中经络恢复期瘀血阻络兼肾虚证，症见半身不遂、口舌歪斜、舌强语蹇、偏身麻木、头晕目眩、腰膝酸软等，脑梗死恢复期见上述诸症状者<sup>[1]</sup>。该方临床疗效确切，但基础研究薄弱，为了提升该产品的科技含量，进行二次开发和有效组分中药的研制，在进行药效学研究前需摸清该方的成分动态变化规律；为了生产出质量稳定均一颗粒剂，需对药材饮片的指纹图谱和稳态性提取工艺中的 1 次投料量进行研究，以便控制该颗粒剂的质量稳定均一性。

中药为生物巨复超分子体，在自然界的生物进化过程中，生命体通过自组织、自组装、自识别与自复制，在众多小分子模板基础上进行超分子主体结构合成，组成超分子，最终构成整个生物世界，生物体为各种形式的超分子体，中药为其一员<sup>[2]</sup>。人体同样是自然界生物体系统的巨复超分子体，拥有各种层次“印迹模板”空间孔穴通道结构，亦超分子主体，与外界发生联系；中药对人体作用而产

生效应就是基于生物界这种超分子“印迹模板”主客体选择性作用的结果<sup>[3]</sup>。中药成分簇是这种超分子“印迹模板”作用的客体聚集体，受生长环境和生物遗传多样性影响，随域随种随株变化而变化，其质量处于动态的遗传统计学变化之中。与中药材及其制剂质量相关的一切关系总和为其质量属性，受药材基原、道地性、采收季节、入药部位、产地加工、炮制技术等环境固有因素影响<sup>[4]</sup>，最终在指纹图谱上体现为提取物成分的种类和含量的变化上；受生物遗传多态性影响，可按 Hardy-Weinberg 平衡的群体质量的生物统计学原理控制<sup>[5]</sup>。环境固有和遗传多样性影响都会反映到中药成分的指纹图谱特征属性的变化上；可采用客体成分簇的总量统计矩参数、信息熵和信息量进行动态性评价，并根据其 RSD 获得稳态 1 次投料量进行质量统计遗传学控制，实现中药质量的稳定均一<sup>[6]</sup>。

本实验采用中药指纹图谱的总量统计矩、信息熵和信息量进行成分印迹性的动态评价，获得多批次样本间的 RSD，再采用 Hardy-Weinberg 平衡的 1 次投料量公式计算出稳态性投料量，以指导实际工业化生产，获得质量稳态性丹膝颗粒制剂。

## 1 实验原理

### 1.1 总量统计矩分析法和信息熵理论的基本原理

总量统计矩分析法是运用统计矩原理定性定量表征中药指纹图谱的分析方法<sup>[7-9]</sup>。该法将中药指纹图谱色谱峰的响应曲线转化成正态分布概率密度函数曲线,先获得单个色谱峰的统计矩参数,再利用统计矩的加合性获得总量零阶矩(AUC<sub>T</sub>)、总量一阶矩(MCRT<sub>T</sub>)、总量二阶矩(VCRT<sub>T</sub>)3个参数来反映整张指纹图谱的特征。总量零阶矩为曲线下的  $n$  个色谱峰面积总和,按公式(1)计算;总量一阶矩 MCRT<sub>T</sub>,为  $n$  个色谱峰的平均保留时间,按公式(2)计算;总量二阶矩 VCRT<sub>T</sub>为  $n$  个色谱峰的平均保留时间方差,按公式(3)计算;其中 AUC<sub>T</sub>可用于对来自于中药的成分组成进行定量分析,表征整体成分的含量变化;MCRT<sub>T</sub>、VCRT<sub>T</sub>2个参数可用于中药指纹图谱的定性分析,表征成分组成(构成比)发生的变化,3个参数就能定性定量地分析1张指纹图谱的特征,反映出成分的动态变化规律。

$$AUC_T = \sum_{i=1}^n A_i \quad (1)$$

$$\bar{\lambda}_T = \sum_{i=1}^n A_i \lambda_i / \sum_{i=1}^n A_i \quad (2)$$

$$\bar{\sigma}_T^2 = \sum_{i=1}^n A_i (\sigma_i^2 + \lambda_i^2) / \sum_{i=1}^n A_i - \bar{\lambda}_T^2 \quad (3)$$

$A_i$ 表示第  $i$  峰的峰面积,  $\lambda_i$ 表示第  $i$  峰的保留时间,  $\sigma_i$ 表示第  $i$  峰的保留时间标准差,共有  $n$  个色谱峰

信息熵是离散值的概率性表达,中药材指纹图谱上每个峰对应1个化学成分,中药成分复杂多样,每个化学成分可看作1个离散信息元,峰的强度即表明其化学信息显现的概率,且此概率受色谱条件、成分相互作用等的综合影响,因此中药指纹图谱色谱峰的出峰状态可用信息熵和信息量进行表征<sup>[10-12]</sup>,信息熵表征指纹图谱所携带成分的信息单元多少,信息量表示指纹图谱的信息量大小。

中药指纹图谱的色谱峰的“出现”与“不出现”可用信息熵( $\Delta S_{ie}$ )表示,反映1个体系的混杂程度,按公式(4)计算;而信息量( $\Delta S_{iq}$ )要在特征峰信息熵的基础上乘以这一色谱条件下的总面积  $A_T$ ,其中信息量按公式(5)计算。

$$\Delta S_{ie} = -(1/\ln 2) \sum_{i=1}^m w_i \ln w_i \quad (4)$$

$$\Delta S_{iq} = -(A_T/W_0 \ln 2) \sum_{i=1}^m w_i \ln w_i \quad (5)$$

$w_i$ 为第  $i$  峰的峰面积百分比,  $m$  为色谱峰的总峰数,  $W_0$ 为总含量或单位投料量,  $A_T$ 为总响应面积

因此可用中药指纹图谱的总量统计矩参数及信息熵、信息量来表征指纹图谱的动态特征,分析各批次样本的差异性。

### 1.2 稳态性1次投料的基本原理

中药材多以动植物入药,来源于自然界,具生物多样性,在环境(没有选择、突变、迁移和遗传漂变)稳定的情况下其成分呈多态性,但宏观上应遵循 Hardy-Weinberg 群体平衡定律<sup>[13-14]</sup>,即当中药的生长环境稳定后,经过相当长的时间,其遗传基因变异频率与基因型频率每代保持不变,中药材的群体整体质量处于稳定。由于基因的变异频率可通过中药有效成分群指纹图谱质量属性的变化得以反映,因此测定中药有效成分群指纹图谱质量属性信息,按生物统计学求算获得1次投料单元样本数目,乘上单元重量就可以得到1次总投药量<sup>[15]</sup>。对于某一产地中药材的加工饮片,当大于一定量的样本投料量投料进行生产时,其成分处于 Hardy-Weinberg 平衡的稳态性质量之中,其指纹图谱的总量统计矩和信息参数就处于稳定,若以大于此量进行勾兑,则中药成分指纹图谱的特征信息量所体现的差异被勾兑消失,质量处于稳定均一之中,若以小于此量进行勾兑,则中药成分指纹图谱特征信息量差异处于波动之中,其批间成分质量在一定的上下限进行波动,因此中药成分的波动上下限与投料量相关<sup>[16]</sup>。以信息量为横坐标,各信息出现的频率为纵坐标,得到1张信息量—频率近似正态分布曲线,运用统计学原理,则其稳态时的投料样本数按公式(6)计算。

$$|\Delta S_{iq,i} - \overline{\Delta S_{iq}}| / (s/n^{1/2}) \geq t_{\alpha,n-1} \quad (6)$$

同时考虑到 II 型假阴性错误概率,则式(6)可转化为式(7)。

$$n^{1/2} \geq (t_{\alpha,n-1} + \mu\beta) \cdot \sigma_{iq} / |\Delta S_{iq,i} - \overline{\Delta S_{iq}}| \quad (7)$$

$n$  为投料样本数,也可测试“单位”,  $t_{\alpha,n-1}$  为界值  $\alpha$  ( $\nu = n - 1$ ) 时的  $t$  检验界值,  $\mu\beta$  为犯 II 型假阴性错误概率  $\beta$  对应的可信限,  $\Delta S_{iq}$  为信息量均数,  $\sigma_{iq}$  为信息量方差,也可平均分子连接性指数、总量统计矩参数及各种物理参数等

按当  $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.05$  ( $t_{\alpha,n-1} + \mu\beta = 10.8$ ),  $|\Delta S_{iq,i} - \overline{\Delta S_{iq}}| \leq \overline{\Delta S_{iq}} \cdot 10\%$  时,也就是置信系数为 0.05,质量控制在有效期含量规定内(制剂生产过程中一般认为药物变化的差值不得低于原值的 10% 时,其质量是稳定的),因此可变为公式(8)。

$$n \geq (108\sigma_{iq}/\overline{\Delta S_{iq}})^2 = (108 \text{RSD}_{iq})^2 \quad (8)$$

故一次稳态投料量为公式 (9)。

$$W \geq nW_0 = (108 \text{RSD}_{iq})^2 W_0 \quad (9)$$

因此, 只要测出同一产地或多个产地中药指纹图谱总量统计矩、信息熵和信息量的变异系数 RSD, 可确定单味药味的稳态投料量, 根据处方的比例计算整个复方的总稳态投料量 (Y)。

$$Y \geq B_1 A_i / B_i + B_2 A_i / B_i + \dots + B_m A_i / B_i \quad (10)$$

$m$  为处方中药味的个数, 处方质量为  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $B_3$ 、 $\dots$ 、 $B_m$ ; 首先通过各饮片指纹图谱信息量的变异系数计算出各饮片的稳态投料量为  $A_1$ 、 $A_2$ 、 $A_3$ 、 $\dots$ 、 $A_m$ 。 $A_i$  为各药味的稳态投料量最大者, 该药味的处方用量为  $B_i$ 。以  $A_i$  为基准, 按处方比例依次放大其他药味的 1 次稳态投料量, 同时与按单一药味计算出的 1 次稳态投料量比对, 若按处方比例的 1 次稳态投料量小于单一药味的 1 次稳态投料量, 应以单一药味计算出的 1 次稳态投料量按比例放大到全方后, 再得到全方的稳态投料量  $Y$ , 按 1 次稳态投料量公式就能获得整体质量稳定的总样本大小, 亦统计遗传学上特征参数稳定 1 次勾兑投料量, 当可实现中药质量的稳定。

## 2 仪器与材料

### 2.1 仪器

Acquity UPLC H-Class 型超高效液相色谱仪, 美国沃特世公司; RE-2000A 旋转蒸发器, 巩义市中天仪器科技有限公司; ZDHW 调温电热套, 北京中兴伟业仪器有限公司; YHC-A6 英衡精密电子秤, 哈尔滨众汇衡器有限公司; MS205DU 电子天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; H1850R 型台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; EKup-II-20T 超纯水机, 长沙市科临电子科技有限公司。

### 2.2 试剂与药材

对照品购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%, 包括芍药苷 (批号 X12A8C33672)、丹参酮 II<sub>A</sub> (批号 Y16M10C88487)、丹酚酸 B (批号 P20J10F93457)、天麻素 (批号 T10M9F55562)、阿魏酸 (批号 L03A9D57744)、蜕皮激素 (批号 TO2A9F57640)、丹皮酚 (批号 L15D9D77791)、橙黄决明素 (批号 P07S11F122784)、川芎嗪 (批号 KJ0622CA14)、大黄酚 (批号 T29D10F107203)、淫羊藿苷 (批号 T05D9B76755)、槲皮素 (批号 S14J10Y79596)、梔

子苷 (批号 C01J10Y91727)、梓醇 (批号 Y26F11Y17148)。甲醇 (批号 20055094)、乙腈 (批号 20055009) 为色谱纯, 美国 Tedia 试剂公司; 其他试剂为分析纯; 水为超纯水。

丹膝颗粒处方: 丹参 15 g, 牛膝 12 g, 天麻 3 g, 牡丹皮 10 g, 赤芍 12 g, 川芎 5 g, 地黄 12 g, 淫羊藿 9 g, 桑寄生 12 g, 栀子 6 g, 决明子 6 g, 火麻仁 6 g。丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎; 牛膝为苋科牛膝属植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根; 天麻为兰科天麻属植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎; 牡丹皮为毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮; 赤芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根; 川芎为伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根; 地黄为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根; 淫羊藿为小檗科淫羊藿属植物淫羊藿 *Epimedium brevicornum* Maxim. 的干燥叶; 桑寄生为桑寄生科钝果寄生属植物桑寄生 *Taxillus chinensis* (DC.) Danser 的干燥带叶茎枝; 栀子为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实; 决明子为豆科决明属植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 干燥成熟种子; 火麻仁为桑科大麻属植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟种仁。上述药材每产地各 5 批, 购于湖南中医药大学含浦校区周边药店及由本课题组成员于原产地购买, 均由湖南中医药大学药学院中药炮制教研室石继连教授按《中国药典》2020 年版一部有关项下要求进行鉴别, 均符合规定, 具体信息见表 1。

## 3 方法与结果

### 3.1 溶液的制备

3.1.1 丹膝颗粒全方供试品溶液 取 1/3 处方量药材, 即丹参 5 g, 牛膝 3 g, 天麻 1 g, 牡丹皮 3.3 g, 赤芍 4 g, 川芎 1.67 g, 地黄 4 g, 淫羊藿 3 g, 桑寄生 4 g, 栀子 2 g, 决明子 2 g, 火麻仁 2 g, 丹参、牛膝、牡丹皮、川芎、火麻仁粉碎成粗粉, 加 10 倍量的 70% 乙醇回流提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 滤液合并, 回收乙醇并浓缩至生药质量浓度为 1 g/mL (60 °C) 的清膏, 备用; 上述各药渣及其余生地黄酒等 7 味饮片加 10 倍量水煎煮 2 次, 第 1 次 1.5 h, 第 2 次 1 h, 合并滤液, 滤过, 滤液浓缩至生药质量浓度为 1 g/mL (60 °C) 的清膏, 与上述各清膏合并, 浓缩至生药质量浓度为 1.5 g/mL (60 °C)

表1 丹膝颗粒组成药味的产地信息

Table 1 Origin information of composition of function ingredients Danxi Granules

药材	产地		
	1~5批	6~10批	11~15批
丹参	山西运城市	河北保定市	山东临沂市
牛膝	河南武陟县	河南温县	内蒙古赤峰市
天麻	云南昭通市	贵州雷山县	四川青川县
牡丹皮	安徽亳州市	河南洛阳市	安徽铜陵市
赤芍	河北赤城县	河北迁西县	内蒙古呼伦贝尔市
川芎	四川崇州市	四川都江堰	四川彭州市
地黄	河南温县	陕西咸阳市	河南武陟县
淫羊藿	陕西宁强县	甘肃徽县	甘肃渭源县
桑寄生	广西钦州市	广西玉林市	广西南宁市
栀子	浙江台州市	湖南浏阳市	江西樟树市
决明子	安徽合肥市	四川省广元市	安徽蚌埠市
火麻仁	山东泰安市	广西巴马县	山西阳曲县

的清膏；取2 mL，挥干溶剂，加入50%甲醇复溶，定容至5 mL，超声10 min，12 000 r/min、4 ℃离心15 min，取上清液过0.22 μm微孔滤膜，取续滤液，得全方供试品溶液。

**3.1.2 单味饮片供试品溶液** 取单味饮片各10 g<sup>[6,15]</sup>，丹参、牛膝、牡丹皮、川芎、火麻仁粉碎成粗粉，加10倍量的70%乙醇后同法提取；上述5味饮片药渣与其余生地黄等各7味饮片加10倍量水后同法提取；各饮片滤液及滤液合并液同法浓缩至生药质量浓度为1.5 g/mL（60 ℃）的清膏，取2 mL，挥干溶剂，加入50%甲醇复溶，定容至5 mL，超声10 min，12 000 r/min、4 ℃离心15 min，取上清液过0.22 μm微孔滤膜，取续滤液，得各单味饮片供试品溶液。

**3.1.3 混合对照品溶液** 取芍药苷、丹参酮II<sub>A</sub>、丹酚酸B、天麻素、阿魏酸、蜕皮激素、丹皮酚、橙黄决明素、川芎嗪、大黄酚、淫羊藿苷、栀子苷、槲皮素、梓醇适量，精密称定置于5 mL量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，制成各对照品储备液。分别精密吸取上述对照品储备液适量，充分混合后加甲醇定容，制成上述对照品质量浓度分别为0.081、0.115、0.123、0.547、0.043、0.108、0.263、0.255、0.448、0.408、0.255、0.333、0.127、0.553 mg/mL的混合对照品溶液，过0.22 μm微孔滤膜，即得混合对照品溶液。

## 3.2 色谱条件

Acquity UPLC HSS T3 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相为0.1%磷酸水溶液-乙腈；梯度洗脱：0~4 min，0~4.5%乙腈；4~8 min，4.5%~9.0%乙腈；8~10 min，9%~11%乙腈；10~12 min，11%~14%乙腈；12~16 min，14%~18%乙腈；16~19 min，18%~22%乙腈；19~24 min，22%~27%乙腈；24~29 min，27%~32%乙腈；29~40 min，32%~45%乙腈；40~45 min，45%~63%乙腈；45~50 min，63%~81%乙腈；50~53 min，81%~90%乙腈；53~55 min，90%~0乙腈；柱温30 ℃；体积流量0.4 mL/min；全波长扫描（190~400 nm），240 nm下峰面积较大，峰数最多，故选择检测波长为240 nm；进样量3 μL。

## 3.3 方法学考察

**3.3.1 精密度试验** 取表1中每味药材第1个产地中第1批次饮片组成的复方，按“3.1.1”项下方法制备供试品溶液，按“3.2”项色谱条件，连续进样6次，根据所得指纹图谱计算总量统计矩、信息熵、信息量参数，其峰数的RSD为0.47%，总量零阶矩的RSD为0.35%，总量一阶矩的RSD为0.16%，总量二阶矩的RSD为0.46%，信息熵的RSD为0.09%，信息量的RSD为0.39%，结果表明仪器精密度良好，符合指纹图谱的检测要求。

**3.3.2 重复性考察** 取表1中每味药材第1个产地中第1批次饮片组成的复方6份，按“3.1.1”项下方法平行制备供试品溶液6份，按“3.2”项色谱条件测定指纹图谱，计算总量统计矩、信息熵、信息量参数，其峰数的RSD为2.92%，总量零阶矩的RSD为1.47%，总量一阶矩的RSD为1.28%，总量二阶矩的RSD为1.12%，信息熵的RSD为0.66%，信息量的RSD为1.25%，表明该试验重复性良好。

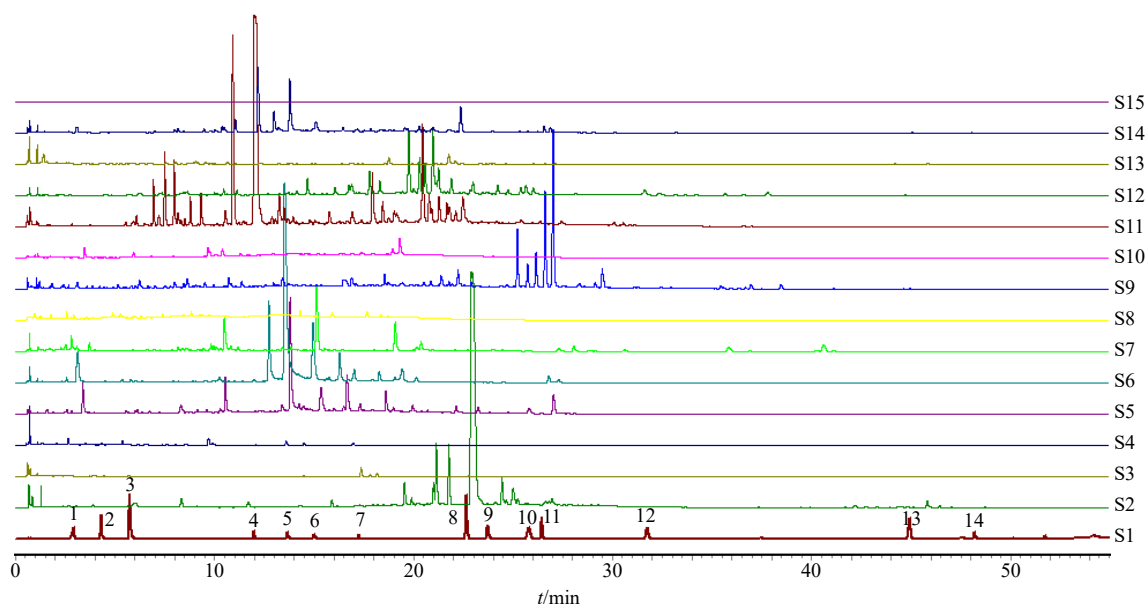
**3.3.3 稳定性试验** 取表1中每味药材第1个产地中第1批次饮片组成的复方，按“3.1.1”项下方法制备供试品溶液，按“3.2”项色谱条件分别在制备后0、2、4、6、8、12、24 h进样，记录色谱图，计算总量统计矩、信息熵、信息量参数，其峰数的RSD为1.49%，总量零阶矩的RSD为0.24%，总量一阶矩的RSD为0.16%，总量二阶矩的RSD为0.94%，信息熵的RSD为0.28%，信息量的RSD为0.36%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 3.4 12味药材及丹膝颗粒全方指纹图谱的建立

取“3.1”项下各供试品溶液，按“3.2”项下色

谱条件进样测定, 采用国家药典委员会《中药指纹图谱相似度评价系统 2012.130723 版本》软件进行图谱处理, 每味饮片和全方选取 1 个批次的图谱进行展示, 分别标记为 S2~S14。根据《中国药典》2020 年版确定丹参 (丹参酮 II<sub>A</sub>、丹酚酸 B)、牛膝

(蜕皮激素)、天麻 (天麻素)、牡丹皮 (丹皮酚)、赤芍 (芍药苷)、川芎 (阿魏酸、川芎嗪)、地黄 (梓醇)、淫羊藿 (淫羊藿苷)、桑寄生 (槲皮素)、栀子 (栀子苷)、决明子 (橙黄决明素、大黄酚) 药材中的对照品, 结果见图 1。



S1-混合对照品 S2-丹参 S3-牛膝 S4-天麻 S5-牡丹皮 S6-赤芍 S7-川芎 S8-地黄 S9-淫羊藿 S10-桑寄生 S11-栀子 S12-决明子 S13-火麻仁 S14-丹膝颗粒全方 S15-50%甲醇 1-梓醇 2-天麻素 3-川芎嗪 4-栀子苷 5-芍药苷 6-阿魏酸 7-蜕皮激素 8-丹酚酸 B 9-槲皮素 10-丹皮酚 11-淫羊藿苷 12-橙黄决明素 13-大黄酚 14-丹参酮 II<sub>A</sub>  
 S1-mixed reference substances S2-Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma S3-Achyranthis Bidentatae Radix S4-Gastrodiae Rhizoma S5-Moutan Cortex S6-Paeoniae Radix Rubra S7-Chuanxiong Rhizoma S8-Rehmanniae Radix S9-Epimedii Folium S10-Taxilli Herba S11-Gardeniae Fructus S12-Cassiae Semen S13-Cannabis Fructus S14-whole prescription of Danxi Granules S15-50% methanol 1-catalpol 2-gastrodin 3-ligustrazine 4-geniposide 5-paeoniflorin 6-ferulic acid 7-ecdysone 8-salvianolic acid B 9-quercetin 10-paeonol 11-icariin 12-aurantio-obtusin 13-chrysophanol 14-tanshinone II<sub>A</sub>

图 1 1 个批次的丹膝颗粒单味药材饮片及全方的 UPLC 指纹图谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of one batch of medical herb in pieces and whole prescription of Danxi Granules

### 3.5 15 批丹膝颗粒的饮片及制剂的 UPLC 指纹图谱的总量统计矩参数及信息熵分析

按总量统计矩法分析获得其总量统计零、一、二阶矩参数和信息熵、信息量, 其均值及 RSD 列于表 2。可知, 零阶矩、信息量的平均值 RSD > 10%, 说明这 2 个参数能作为中药指纹图谱的定量分析指标, 反映整体成分的含量变化; 而一阶矩、二阶矩和信息熵的平均值 RSD < 10%, 说明这 3 个参数可用于中药指纹图谱的定性分析, 中药整体受控于超分子“印迹模板”作用机制, 来源于不同产地的同一药材成分构成比的变化符合要求, 即在宏观上表现出整体性质的稳定。

根据各单味饮片信息量的 RSD 大小、操作单位及处方用量, 按稳态性 1 次投料公式计算得各 12 味饮片及全方特征参数的 1 次稳态投料量, 结果列

于表 3。对比各特征参数的 1 次稳态投料量, 按累积信息量的 RSD 变化, 全方需投 2.13 kg, 川芎的 1 次稳态投料量最小 (1.03 kg), 而桑寄生 1 次稳态投料量为最大 (30.58 kg), 也就是只要按桑寄生信息量的 1 次稳态投料量投料, 其它参数会更稳定。以桑寄生信息量的 1 次稳态投料量作为基准, 再按处方比例依次放大其他药味及全方的 1 次稳态投料量, 结果发现天麻的 1 次稳态投料量最小 (9.32 kg), 而丹参最大 (46.58 kg), 全方需投 335.35 kg, 虽远远大于累积的全方 1 次投料量 (2.13 kg), 但能保证药物成分的均一性与稳定性。

### 4 讨论

本研究采用 UPLC 法建立了丹膝颗粒各单味饮片及全方的指纹图谱, 在色谱条件探索过程中, 流动相研究了水-甲醇、水-乙腈、0.05% 甲酸水溶液-

表2 15批丹膝颗粒单味饮片及全方UPLC指纹图谱的总量统计矩参数及信息熵、信息量及其RSD ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
Table 2 Total statistical moment parameters and information entropy, information quantity and their RSD of UPLC fingerprint of 15 batches of medical herb in pieces and whole prescription of Danxi Granules ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

样品	AUC <sub>T</sub> /( $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) (RSD/%)	MCRT <sub>T</sub> /min (RSD/%)	VCRT <sub>T</sub> /min <sup>2</sup> (RSD/%)	$\Delta S_{ie}/(\mu\text{V}\cdot\text{s})$	$\Delta S_{iq}/(\mu\text{V}\cdot\text{s})$
丹参	$(9.52 \pm 1.88) \times 10^4$ (33.85)	$21.33 \pm 0.48$ (14.33)	$50.24 \pm 12.65$ (11.41)	$4.77 \pm 0.95$	$(4.44 \pm 0.76) \times 10^5$
牛膝	$(9.52 \pm 3.43) \times 10^3$ (36.05)	$10.82 \pm 0.63$ (5.86)	$106.69 \pm 15.65$ (14.67)	$5.27 \pm 0.36$	$(5.11 \pm 2.05) \times 10^4$
天麻	$(9.39 \pm 2.29) \times 10^3$ (24.37)	$5.93 \pm 0.29$ (4.92)	$31.10 \pm 3.14$ (10.10)	$5.33 \pm 0.25$	$(5.05 \pm 1.43) \times 10^4$
牡丹皮	$(7.99 \pm 1.73) \times 10^4$ (21.71)	$15.04 \pm 0.79$ (5.26)	$31.98 \pm 1.47$ (4.60)	$5.65 \pm 0.09$	$(4.52 \pm 1.05) \times 10^5$
赤芍	$(8.49 \pm 1.16) \times 10^4$ (13.65)	$13.50 \pm 0.20$ (1.51)	$22.62 \pm 1.32$ (5.84)	$4.23 \pm 0.14$	$(3.60 \pm 5.93) \times 10^4$
川芎	$(5.06 \pm 0.39) \times 10^4$ (7.63)	$16.24 \pm 1.91$ (11.78)	$105.10 \pm 27.02$ (25.71)	$5.86 \pm 0.20$	$(2.97 \pm 0.28) \times 10^5$
地黄	$(3.88 \pm 1.31) \times 10^4$ (33.85)	$8.80 \pm 1.26$ (14.33)	$26.74 \pm 3.05$ (11.41)	$6.08 \pm 0.13$	$(2.36 \pm 0.81) \times 10^5$
淫羊藿	$(1.04 \pm 0.11) \times 10^5$ (10.99)	$18.94 \pm 1.54$ (8.12)	$73.61 \pm 4.86$ (6.60)	$6.54 \pm 0.12$	$(6.80 \pm 0.68) \times 10^5$
桑寄生	$(4.27 \pm 2.12) \times 10^4$ (49.78)	$14.39 \pm 2.23$ (15.48)	$30.88 \pm 4.51$ (14.61)	$5.75 \pm 0.24$	$(2.49 \pm 1.27) \times 10^5$
栀子	$(1.83 \pm 0.20) \times 10^5$ (11.05)	$15.28 \pm 0.78$ (5.15)	$38.23 \pm 5.02$ (13.14)	$5.30 \pm 0.28$	$(9.74 \pm 1.55) \times 10^5$
决明子	$(7.41 \pm 1.15) \times 10^5$ (15.52)	$19.81 \pm 0.34$ (1.73)	$40.70 \pm 1.62$ (3.97)	$5.80 \pm 0.14$	$(4.30 \pm 0.69) \times 10^5$
火麻仁	$(1.32 \pm 0.46) \times 10^4$ (35.01)	$13.57 \pm 3.13$ (23.10)	$101.40 \pm 26.15$ (25.79)	$6.08 \pm 0.18$	$(8.00 \pm 2.71) \times 10^4$
全方	$(6.71 \pm 0.87) \times 10^4$ (13.00)	$15.45 \pm 0.34$ (2.20)	$51.58 \pm 3.71$ (7.19)	$6.22 \pm 0.07$	$(4.18 \pm 0.56) \times 10^5$
均值(单味药材)	$(6.56 \pm 5.10) \times 10^4$ (22.57)	$13.36 \pm 5.87$ (5.99)	$50.71 \pm 32.64$ (8.78)	$5.75 \pm 0.58$	$(3.59 \pm 2.70) \times 10^5$

表3 丹膝颗粒单味饮片及全方的1次稳态投料量  
Table 3 One-time steady-state feeding quantity of medical herb in pieces and whole prescription of Danxi Granules

名称	操作 单位/g	1次稳态 投料量/kg	处方 用量/g	1次稳态处方 投料量/kg
丹参	10	3.45	5.00	46.58
牛膝	10	18.79	4.00	37.26
天麻	10	9.32	1.00	9.32
牡丹皮	10	6.25	3.33	31.02
赤芍	10	3.16	4.00	37.26
川芎	10	1.03	1.67	15.53
地黄	10	13.79	4.00	37.26
淫羊藿	10	1.18	3.00	27.95
桑寄生	10	30.58	4.00	37.26
栀子	10	2.97	2.00	18.63
决明子	10	3.02	2.00	18.63
火麻仁	10	13.39	2.00	18.63
全方	36	2.13	36.00	335.35

乙腈、0.05%醋酸水溶液-乙腈、0.1%磷酸水溶液-乙腈,发现0.1%磷酸水溶液-乙腈条件下,色谱图基线平稳,各色谱峰分离较好,出峰较多,峰形较好,故流动相选用0.1%磷酸水溶液-乙腈;进样量考察了1、2、3、4、5  $\mu\text{L}$ ,发现进样量为3  $\mu\text{L}$ 时,峰数较多,峰面积较大,故选择了进样量为3  $\mu\text{L}$ ;柱温考察了25、30、35  $^{\circ}\text{C}$ ,发现柱温为30  $^{\circ}\text{C}$ 时,

色谱峰分离度较好,出峰时间适中,故柱温选择了30  $^{\circ}\text{C}$ 。体积流量考察了0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL/min,发现体积流量为0.4 mL/min时,出峰时间适中,洗脱效果较好,故体积流量选择了0.4 mL/min。

据信息量的变异系数RSD变化,计算出全方需投2.13 kg,川芎的1次稳态投料量最小(1.03 kg),而桑寄生最大(30.58 kg),也就是只要按桑寄生的1次稳态投料量投料,其它参数会更稳定。以桑寄生信息量的1次稳态投料量作为基准,再据处方比例依次放大其他药味及全方的1次稳态投料量,并与以单一药味计算出的1次稳态投料量对比,发现天麻按处方用的1次稳态投料量小于单独使用天麻计算出的1次稳态投料量,故以单独使用天麻的1次稳态投料量按比例放大到全方后,再得到全方的稳态投料量,这也是处方用天麻的1次稳态投料量最小的原因,最终得到全方1次稳态投料量为335.35 kg,各药味的投料量依次为丹参46.58 kg,牛膝37.26 kg,天麻9.32 kg,牡丹皮31.02 kg,赤芍37.26 kg,川芎15.53 kg,地黄37.26 kg,淫羊藿27.95 kg,桑寄生37.26 kg,栀子18.63 kg,决明子18.63 kg,火麻仁18.63 kg,该投料量为保证制剂生产的最小投料量,虽远远大于《中国药典》规定,若能以大于等于该最小投料量进行投料和工业化生产,则能保证药物成分的均一性与稳定性。

中药客体成分受环境和遗传双重影响,成分具多样性,从源头上影响中药提取物的质量稳定均一,中药提取工艺长期缺乏对中药材遗传基因多态性的认识<sup>[16-19]</sup>,没有明确中药材及复方的最小投料量是造成中药有效成分群制剂质量不稳的关键因素,也是以多少量实现匀兑必须解决的首要问题。测定中药有效成分群指纹图谱信息量的变异概率曲线,按统计学原理求得有效投料单元数量,乘上单元重量就可以得到总投料量,在大于总投料量的前提下投料进行中药有效成分群的炮制、提取、匀兑,就能获得中药制剂群体 Hardy-Weinberg 平衡质量,以实现中药质量的均一与稳定。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 719.
- [2] 贺福元, 周逸群, 邓凯文, 等. 超分子化学对中医药理论的特殊影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1534-1543.
- [3] 贺玉婷, 樊启猛, 周逸群, 等. 中药毒性的研究现状及其超分子“印迹模板”调控机制的探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5638-5644.
- [4] 贺福元, 周宏灏, 罗杰英, 等. 生物遗传多态性规律揭示中药材质量稳定性规律的探讨 [J]. 中草药, 2008, 39(1): 2-6, 12.
- [5] 贺福元, 邓凯文, 黄胜, 等. 中药群体指纹图谱信息量和一次投料量数学模型的建立及对大黄和鱼腥草实验研究 [J]. 中成药, 2011, 33(8): 1292-1298.
- [6] 李海英, 贺鹏, 樊启猛, 等. 桃红四物汤 HPLC 指纹图谱的总量统计矩及一次稳态投料量分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 37-43.
- [7] 周晋. 指纹图谱总量统计矩分析法的建立及对补阳还五汤的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2006.
- [8] 贺福元, 周宏灏, 邓凯文, 等. 指纹图谱的一种定性定量研究新方法: 总量统计矩分析法 [J]. 药学学报, 2008, 43(2): 195-201.
- [9] 李海英, 樊启猛, 贺玉婷, 等. 金银花、山银花动态挥发性成分的质量控制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 148-155.
- [10] 朱志飞, 樊启猛, 刘有志, 等. 基于信息熵最大化原则优化经典名方身痛逐瘀汤 UPLC 指纹图谱 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3173-3179.
- [11] 唐宇, 贺福元, 邓凯文, 等. 中药燃烧焓、信息熵及生物熵的稳定性揭示其成分间的“虹势性” [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 867-873.
- [12] 朱志飞, 刘金玲, 樊启猛, 等. 基于指纹图谱段带总量统计矩法和信息熵的桑源药材成分比较分析研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(10): 2547-2555.
- [13] 张宏礼, 张鸿雁. 关于最大信息熵原理与群体遗传平衡一致性的探讨 [J]. 遗传, 2006, 28(3): 324-328.
- [14] 汪小龙, 袁志发, 郭满才, 等. 最大信息熵原理与群体遗传平衡 [J]. 遗传学报, 2002, 29(6): 562-564.
- [15] 樊启猛, 刘润南, 贺鹏, 等. 经典名方单味药材群体指纹图谱信息熵及一次投料量研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4): 975-979.
- [16] 刘文龙. 中药材鱼腥草株间的遗传多样性及其质量稳定性控制研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2014.
- [17] 刘红宇, 贺福元, 罗杰英. 中药(复方)成分提取动力学数学模型建立及粒径对六味地黄汤中梓醇浓度的影响 [J]. 中国药房, 2009, 20(36): 2804-2807.
- [18] 王海琴, 刘文龙, 贺福元, 等. 基于鱼腥草 ISSR 扩增条带信息熵的一次投料量研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 288-292.
- [19] 任德权. 抓住机遇, 迎接挑战——在中药指纹图谱和中药工程会议上的报告 [J]. 中成药, 2002, 24(1): 1-2.

[责任编辑 郑礼胜]