

基于茜素红 S-苯硼酸光化学比色传感器的附子配方颗粒强心活性评价方法的建立

陈露梦¹, 刘 惠¹, 贺亚男¹, 罗传红¹, 贾明艳¹, 周永峰¹, 杨景屏², 谭 鹏³, 杨 明^{4*}, 张定堃^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137
2. 四川新盛源药业有限公司, 四川 江油 621700
3. 四川省中医药科学院, 国家中医药管理局中药质量生物评价重点实验室, 四川 成都 610041
4. 江西中医药大学, 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘 要: **目的** 基于附子强心组分去甲乌药碱、去甲猪毛菜碱和棍掌碱共有的肾上腺素类似结构, 构建了以邻二酚羟基基团与茜素红 S-苯硼酸体系置换反应为核心的光化学比色传感器, 用于整体评价附子配方颗粒的强心作用。**方法** 以传感器的响应强度为评价指标, 对超声提取时间、料液比、提取液浓度和乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na) 浓度等供试品的制备条件进行优化; 并对该方法的精密性、重复性和稳定性进行考察; 用平板扫描仪获取 23 批附子配方颗粒的 $|\Delta G|$ 值 (绿色 G , $|\Delta G| = |G_{\text{后}} - G_{\text{前}}|$), 同时采用 LC-MS/MS 测定附子配方颗粒中 3 种生物碱的含量, 将 $|\Delta G|$ 与强心成分总含量进行相关性分析。**结果** 供试品制备方法优选为取附子配方颗粒粉末 0.5 g, 加 10 mL 甲醇, 300 W、60 kHz 超声提取 15 min, 将上清液全部转移至蒸发皿中, 80 ℃ 挥干, 4 mL 0.13 g/mL 的 EDTA-2Na 溶液洗脱蒸发皿上物质, 离心, 取上清液, 调 pH 至 8.0 左右, 缓冲溶液稀释 3 倍。方法学考察表明该方法精密性、重复性和稳定性良好。23 批样品的强心成分总含量的差异较大, 为 127.83~6 928.27 $\mu\text{g/g}$; $|\Delta G|$ 的范围为 0~12.5, 两者的相关系数 (r) 高达 0.96, 表明强心成分总含量与 $|\Delta G|$ 高度相关。**结论** 该方法具有一定的科学性与准确性, 可整体性评价附子配方颗粒强心药效。

关键词: 附子; 强心作用; 配方颗粒; 光化学比色传感器; 质量评价; 茜素红 S; 苯硼酸; 去甲乌药碱; 去甲猪毛菜碱; 棍掌碱; 肾上腺素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1761-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.018

Establishment of cardiotonic activity evaluation method of Fuzi formula granules based on alizarin red S-phenylboronic acid photochemical colorimetric sensor

CHEN Lu-meng¹, LIU Hui¹, HE Ya-nan¹, LUO Chuan-hong¹, JIA Ming-yan¹, ZHOU Yong-feng¹, YANG Jing-ping², TAN Peng³, YANG Ming⁴, ZHANG Ding-kun¹

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. Sichuan Xingshengyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 621700, China
3. State Key Laboratory of Biological Evaluation of TCM Quality, National Administration of TCM, Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China
4. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective Based on the similar structure of adrenaline shared by higenamine, salsolinol and coryneine, a photochemical colorimetric sensor based on the displacement reaction of *o*-diphenol hydroxyl group and alizarin red S-phenylboronic acid system was

收稿日期: 2021-10-26

基金项目: 四川省中医药管理局科学技术研究专项 (2021MS016); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82003907); 四川省中医药管理局中医药重点学科建设项目 (川中医药函[2020]84 号); 四川省重点研发项目 (2022YFS0429)

作者简介: 陈露梦, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制新技术。E-mail: 491145843@qq.com

***通信作者:** 杨 明, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药炮制与制剂。E-mail: yangming16@126.com

张定堃, 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药制药与品质评价新技术。E-mail: zhangdingkun@cdutcm.edu.cn

proposed to evaluate the cardiostimulant effect of Fuzi (*Aconiti Lateralis Radix Praeparata*) formula granules as a whole. **Methods** Taking the response intensity of the sensor as the evaluation index, the preparation conditions of test samples such as ultrasonic extraction time, solid-liquid ratio, extraction solution concentration and EDTA-2Na concentration were optimized; then the precision, repeatability and stability of the method were investigated; The $|\Delta G|$ value (G is green, $|\Delta G| = |G_{\text{after}} - G_{\text{before}}|$) of each sample was obtained by response values determination of 23 batches of Fuzi formula granules; at the same time, the contents of three alkaloids in Fuzi formula granules were determined by LC-MS/MS. The correlation between $|\Delta G|$ and the total content of cardiac components was analyzed. **Results** The preparation method of the test article was preferably as follows: take 0.5 g of Fuzi formula granular powder, add 10 mL of methanol, and ultrasonic at 300 W and 60 kHz for 15 min, put the supernatant in an evaporating dish, volatilize it at 80 °C, elute the substance on the evaporating dish with 4 mL of 0.13 g/mL EDTA-2Na solution, centrifuge, take the supernatant, adjust the pH to 8.0, and dilute the buffer solution three times; The methodological investigation showed that the method had good precision, repeatability and stability. The total content of cardiac components in 23 batches of samples varied greatly, 127.83—6 928.27 $\mu\text{g/g}$; The range of $|\Delta G|$ was 0—12.5, and the correlation coefficient (r) was as high as 0.96, indicating that the total content of cardiac components was highly correlated with $|\Delta G|$. **Conclusion** The method is scientific and accurate, and can evaluate the cardiostimulant effect of Fuzi formula granules as a whole.

Key words: *Aconiti Lateralis Radix Praeparata*; cardiostimulant action; formula granules; photochemical colorimetric sensor; quality evaluation; alizarin red S; phenylboronic acid; higenamine; salsolinol; coryneine; adrenaline

配方颗粒是中药饮片发展的一种新形式。目前,已有 160 个中药配方颗粒的国家标准颁布^[1],但大部分中药配方颗粒仍沿用现有中药饮片的评控体系,主要采用薄层、特征图谱、含量测定、浸出物等理化分析方法。这些检验指标虽具有一定的质控力,但与临床功效和安全性关联不紧密,难以评控中药配方颗粒的内在质量^[2-3]。

附子为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根加工品,因其对于各种急、慢性心衰疗效显著,被誉为“回阳救逆第一品药”,治病保命“药中四维”^[4-5]。但由于含有双酯型生物碱等剧毒成分和不恰当的炮制、应用,时有关于附子中毒事件的报道^[6-7]。附子配方颗粒主要以生附片、黑顺片、淡附片等饮片为原料,经工业化提取、浓缩、干燥、制粒而成。在提取过程中,附子剧毒成分大量降解,确保了用药安全,解决了因先煎带来的不便,且方便携带,调配灵活^[8]。但由于不同厂家的饮片来源、生产制备、颗粒收率等方面的不同,市售附子配方颗粒的化学成分含量差异明显,尚未形成统一的国家质量标准,更缺少关联功效的整体质量评控方法。

课题组前期^[9]建立了基于急性心衰大鼠血液流变学即时测定的附子强心活性评价方法,可真实客观地反映药物的药效强度,但技术难度高,可及性差,需消耗大量实验动物。LC-MS/MS 虽能直接测定强心成分含量,但仪器的购置成本贵,检测速率较慢,且需使用多种对照品。

为寻找快速简便、关联功效的附子整体质量评

控方法,课题组根据附子强心成分去甲乌药碱(higenamine, HI)、去甲猪毛菜碱(salsolinol, SA)、棍掌碱(coryneine, CO),构建了基于茜素红 S(alizarin red S, ARS)-苯硼酸(phenylboronic acid, PA)光化学比色传感器的附子强心活性评价新方法。ARS 与 PA 通过非共价键可逆性结合,含邻二酚羟基的物质与 PA 竞争性结合,指示剂被置换出来,产生指示剂颜色响应(原理如图 1 所示),具有价格低廉、操作简便、响应快速的特点。该方法实现了对不同批次生附片强心强度的区分^[10]。

为进一步扩大该方法的应用范围,本实验以附子配方颗粒为研究对象,根据附子配方颗粒具有的药物浓度高、钙镁离子含量高等特点,优化改进供试品制备方法,对比光化学传感器检测结果与质谱测定结果的异同,并拟定附子配方颗粒的质量分级参考标准。

1 仪器与材料

1.1 仪器

EPSON Perfection V370 Photo 全彩平板扫描仪,爱普生有限公司;KQ-500D E 型超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;Costar 96 孔细胞培养板,美国康宁公司;pHS-3C 型 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;Mili-Q 型超纯水仪,美国 Milipore 公司;BSA 224SA 型 1/1 万分析天平和 BT25S 型 1/10 万分析天平,德国 Sartorius 公司;L550 型台式低速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;Agilent 6460C 三重串联四极杆液质联用仪,美国 Agilent 公司,配有 ESI 离子源。

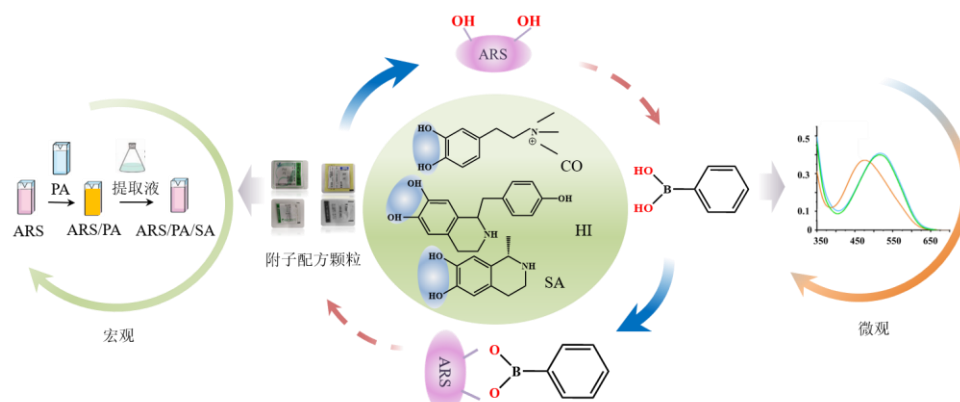


图 1 IDA 置换原理

Fig. 1 IDA displacement principle

1.2 试药

分析甲醇, 批号 2021032902, 成都市科隆化学制品有限公司; 色谱乙腈, 批号 20032512, 西格玛奥德里奇贸易有限公司; PA (批号 C10492112); ARS (批号 1129L031), 阿法埃莎化工有限公司; 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES), 批号 20200918, 北京索莱宝科技有限公司; 对照品 HI (批号 CHB210118, 质量分数 $\geq 98\%$)、SA (批号 CHB190104, 质量分数 $\geq 98\%$)、槲参碱 (批号 CHB180609, 质量分数 $\geq 98\%$) 均购于成都克洛玛生物科技有限公司; 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na, 批号 20190416); 无水亚硫酸钠 (Na_2SO_3 , 批号 015042101), 成都市科龙化工试剂厂。

1.3 样品

23 批附子配方颗粒 (S1~S23) 来源于全国 5 个不同厂家, 样品信息见表 1。

2 方法

2.1 $|\Delta G|$ 值的测定

将缓冲溶液加入 ARS-PA 的反应体系后, 平衡 5 min, 用平板扫描仪扫描反应“前”的图像。不同批次附子配方颗粒的供试品溶液加入反应体系, 平衡 5 min, 反应完全后, 取 200 μL 反应后的溶液于 96 孔板中, 用平板扫描仪扫描, 扫描反应“后”的图像。每个批次做 3 次平行实验, 求取平均值。使用 Adobe Photoshop CS 6.0 软件获得反应前后图像中的绿色 (G) 值, 即为“ $G_{\text{前}}$ ”和“ $G_{\text{后}}$ ”, 并进行差减, 得到反应前后 G 的变化值即 $|\Delta G|$ 值 ($|\Delta G| = |G_{\text{后}} - G_{\text{前}}|$)。

2.2 供试品溶液制备方法的考察

2.2.1 超声时间的优化 准确称取的附子配方颗粒约 0.5 g, 加入 10 mL 甲醇, 300 W、60 kHz 超声提

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	饮片类型	批号	厂家
S1	黑顺片配方颗粒	20095587	江阴天江药业有限公司
S2	黑顺片配方颗粒	20104013	江阴天江药业有限公司
S3	黑顺片配方颗粒	20099411	江阴天江药业有限公司
S4	黑顺片配方颗粒	20088723	江阴天江药业有限公司
S5	黑顺片配方颗粒	20085637	江阴天江药业有限公司
S6	黑顺片配方颗粒	2101034	安徽济人药业有限公司
S7	淡附片配方颗粒	0081579	广东一方制药有限公司
S8	黑顺片配方颗粒	1808018	安徽济人药业有限公司
S9	黑顺片配方颗粒	2007044	安徽济人药业有限公司
S10	黑顺片配方颗粒	18019351	北京康仁堂药业有限公司
S11	黑顺片配方颗粒	17010981	北京康仁堂药业有限公司
S12	黑顺片配方颗粒	17026892	北京康仁堂药业有限公司
S13	黑顺片配方颗粒	20035771	北京康仁堂药业有限公司
S14	黑顺片配方颗粒	20008871	北京康仁堂药业有限公司
S15	黑顺片配方颗粒	20008881	北京康仁堂药业有限公司
S16	淡附片配方颗粒	0092391	广东一方制药有限公司
S17	淡附片配方颗粒	0121871	广东一方制药有限公司
S18	生附片配方颗粒	1905002W	三九医药股份有限公司
S19	生附片配方颗粒	18054151	江阴天江药业有限公司
S20	生附片配方颗粒	18063281	江阴天江药业有限公司
S21	生附片配方颗粒	18072251	江阴天江药业有限公司
S22	生附片配方颗粒	20092293	江阴天江药业有限公司
S23	黑顺片配方颗粒	20035771	北京康仁堂药业有限公司

取 15、30、45、60 min, 对比不同超声时间提取的附子配方颗粒提取液加入前后的 $|\Delta G|$ 值, 优选最佳超声时间。结果 $|\Delta G|$ 分别为 9.50 ± 0.00 、 9.17 ± 0.57 、 9.83 ± 0.57 、 9.83 ± 0.57 ($n=3$), 超声时间对于配方颗粒的响应强度无明显的影响, 因此, 选取提取时

间最短的 15 min 为最佳提取时间。

2.2.2 料液比的优化 分别以 1:5、1:10、1:20、1:30 的料液比提取配方颗粒，超声 15 min，对比不同料液比提取的附子配方颗粒提取液加入前后的 $|\Delta G|$ 值，优选最佳液料比。结果 $|\Delta G|$ 分别为 3.00 ± 0.00 、 5.75 ± 0.50 、 10.17 ± 0.57 、 10.17 ± 0.57 ($n=3$)，当料液比为 1:5 和 1:10 时，附子配方颗粒的响应强度很弱，而当料液增比加至 1:20，响应强度增加，继续增加至 1:30 后，响应强度不再增加，表明当料液比为 1:20 时强心成分已基本溶出，从节省时间、节约溶剂的角度，选取 1:20 为最佳料液比。

2.2.3 附子配方颗粒提取液浓度的优化 pH 调至 8.0 的附子配方颗粒提取液的颜色仍然偏深，为避免提取液颜色对于 $|\Delta G|$ 造成干扰，分别用缓冲溶液将其稀释 3、5、7、10 倍，对比不同浓度的配方颗粒提取液加入前后 $|\Delta G|$ 值，优选最佳的配方颗粒提取液浓度。结果 $|\Delta G|$ 分别为 10.00 ± 0.00 、 6.00 ± 0.00 、 5.60 ± 0.55 、 2.40 ± 0.89 ($n=3$)，附子配方颗粒提取液稀释 3 倍后溶液颜色很淡，将其加入反应体系后，传感器的响应强度很高。稀释至 5、7 倍时，传感器的响应强度急剧降低；继续稀释至 10 倍，传感器的响应强度很弱或几乎无响应，因此优选附子配方颗粒提取液稀释 3 倍后的浓度为最佳浓度。

2.2.4 EDTA-2Na 质量浓度的优化 与生附片不同的是，黑顺片、白附片中含有大量的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ，可竞争性的与茜素红络合，进而形成紫色络合物。为排除 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对实验结果的干扰，选用 EDTA-2Na 进行络合。平行称取 4 份同一批附子配方颗粒约 0.5 g，超声提取后置于 80 °C 的水浴锅上挥干，分别用 4 mL 质量浓度分别为 0.06、0.10、0.13、0.15 g/mL 的 EDTA-2Na 溶液洗脱蒸发皿上的物质，然后再用缓冲溶液稀释 3 倍，即得供试品溶液。对比不同质量浓度 EDTA-2Na 溶液对 $|\Delta G|$ 的影响，优选最佳的 EDTA-2Na 质量浓度。研究结果发现，质量浓度为 0.06、0.10 g/mL 的 EDTA-2Na 溶液无法完全除尽供试品中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ，指示剂仍显紫色。当质量浓度增加至 0.13 g/mL 时，溶液不再显紫色，继续增加至 0.15 g/mL 时，传感器的响应强度也不再增加，说明当 EDTA-2Na 质量浓度为 0.13 g/mL 时， Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 已基本除尽。因此，EDTA-2Na 质量浓度优选为 0.13 g/mL。

2.2.5 供试品溶液的制备 准确称取附子配方颗粒

约 0.5 g，加入 10 mL 甲醇，300 W、60 kHz 超声提取 15 min，8000 r/min 离心（离心半径 81 mm）10 min，将提取液全部转移至蒸发皿中，80 °C 挥干溶剂，4 mL 0.13 g/mL 的 EDTA-2Na 洗脱蒸发皿上的物质，洗脱液 12 000 r/min 离心（离心半径 81 mm）10 min，取上清液，0.3 mol/L NaOH 调 pH 至 8.0 左右，用缓冲溶液稀释 3 倍，即得供试品溶液。所有实验均在 10 mmol/L 的缓冲溶液（pH 8.0）中进行。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度 将 SA (2.5 mmol/L) 对照品溶液，加入 ARS (0.1 mmol/L) 和 PA (0.3 mmol/L) 的反应体系中，0 °C 条件下反应，平衡 5 min，将 200 μL 反应后的溶液加入 96 孔板中，平行移取 6 份，获取反应前后的图像。结果表明 6 次测定的 $|\Delta G|$ 的 RSD 值为 2.43%，表明该方法的精密度很好。

2.3.2 稳定性 将附子配方颗粒 (S4) 制成供试品溶液，室温放置，分别于 0、1、2、4、6、8、10 和 12 h 后进行反应，获取每个时间点的 $|\Delta G|$ ，计算得 $|\Delta G|$ 的 RSD 值。结果表明 $|\Delta G|$ 的 RSD 值为 1.21%，表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.3.3 重复性 平行称取 6 份附子配方颗粒 (S4) 约 0.5 g，制成供试品溶液，分别获取该 6 个平行批次的 $|\Delta G|$ ，计算 $|\Delta G|$ 的 RSD 值。6 份供试品溶液的 $|\Delta G|$ 的 RSD 值为 3.07%，表明该方法的重复性良好。

2.3.4 专属性 配方颗粒中常含有乳糖、糊精等辅料，可能会对 $|\Delta G|$ 产生一定的干扰。前期研究中发现 2.5 mmol/L 的 SA 可将 ARS 完全置换出来。糊精在水中的溶解度很低，将溶解至饱和的糊精和 3 mmol/L 的乳糖加入 ARS-PA 的反应体系中，观察颜色的变化，并获取其 $|\Delta G|$ 值。将 3 mmol/L 的乳糖和部分溶解的糊精加入 ARS-PA 的反应体系后，颜色几乎没有变化， $|\Delta G|$ 均为 0，乳糖和糊精对于 $|\Delta G|$ 几乎没有影响。

2.4 光化学传感器检测结果与质谱检测结果的对比

2.4.1 色谱质谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0~1 min，2%~20% 乙腈；1~5 min，20%~50% 乙腈；5~10 min，50%~75% 乙腈；10~15 min，75%~100% 乙腈；体积流量为 0.45 mL/min；柱温 25 °C；进样量 5 μL [1]。

质谱采用 ESI 源，正离子模式检测；脱溶剂温度 300 °C；脱溶剂气 N₂ 体积流量 11 L/min；雾化器压力 15 psi (1 psi=6.895 kPa)；毛细管电压 4000

V; 扫描方式为多反应检测 (MRM); 3 个待测化合物优化后的离子对、碎裂电压和碰撞能量见表 2。

表 2 附子配方颗粒中 3 种生物碱的质谱数据

Table 2 Mass spectrum data of three alkaloids in Fuzi formula granules

名称	<i>m/z</i>	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
HI	279.1/106.9	100	20
SA	179.9/116.9	105	20
CO	196.1/137	160	20

2.4.2 对照品溶液的配制 分别称取各对照品适量, 精密称定, 用甲醇配制成含 HI、CO、SA 的质量浓度分别为 1.07、1.03、1.07 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.4.3 供试品溶液的配制 精密称取附子配方颗粒粉末约 0.1 g, 分别置于量瓶中, 用甲醇溶解定容至刻度, 超声提取 30 min, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.4.4 测定结果 按上述色谱与质谱条件进样, 进行 LC-MS/MS 分析, 测定样品中 3 种生物碱的含量, 每个样品平行测定 3 份。23 批附子配方颗粒的含量测定结果见表 3。HI 是活性较强的强心成分, 但 23 批附子配方颗粒中 HI 的含量均很低, 含量最高仅为 1.64 $\mu\text{g/g}$, 最低为 0.27 $\mu\text{g/g}$, 相差 6 倍。SA、CO 是强心活性相对较弱的成分, 不同产家、不同原料、不同批次的配方颗粒含量波动较大, CO 含量从 81.62~6 844.412 $\mu\text{g/g}$, 相差 83.85 倍; SA 含量最高为 470.09 $\mu\text{g/g}$, 最低为 2.19 $\mu\text{g/g}$, 相差 214.17 倍。观察发现, 生附片配方颗粒中强心成分的总含量普遍较高, 最高为 6 928.27 $\mu\text{g/g}$ 。这是由于生附片未经过反复的水洗、浸漂、蒸煮处理, 强心的水溶性生物碱保留较为充分。在收集的 23 批附子配方颗粒中, 有 15 批是以黑顺片为原料制成的, 由于黑顺片的原料、加工工艺、加工设备不同, 致使不同厂家、不同批次的黑顺片配方颗粒强心成分的总含量差异巨大, 最高为 5 429.69 $\mu\text{g/g}$, 最低为 201.08 $\mu\text{g/g}$, 相差近 27 倍。3 批淡附片配方颗粒的强心成分的总含量均小于 300 $\mu\text{g/g}$ 。推测这可能是因为淡附片由盐附子漂胆, 与甘草、黑豆煮至透心后, 切片干燥后制成, 水处理环节过多, 导致大量的水溶性生物碱流失, 强心成分总含量总体偏低。23 批附子配方颗粒的光化学传感器检测结果见表 3。23 批样品的 $|\Delta G|$ 差异显著, 最高为 12.5, 最低为 0。生附片配方

表 3 附子配方颗粒中 3 种化合物的含量测定结果 ($n = 3$)

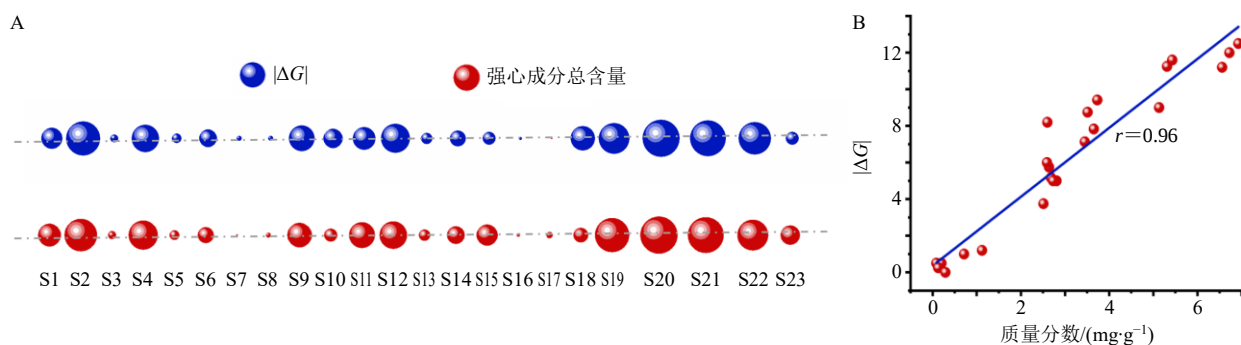
Table 3 Determination results of three compounds in Fuzi formula granules ($n = 3$)

编号	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$				$ \Delta G $
	HI	CO	SA	HI+CO+SA	
1	0.54	3 322.80	125.35	3 448.69	7.13
2	1.64	5 167.38	260.68	5 429.70	11.60
3	0.53	693.53	20.11	714.16	1.00
4	1.20	4 872.01	257.69	5 130.90	9.00
5	0.66	1 093.23	26.50	1 120.39	1.20
6	0.91	2 264.29	371.91	2 637.11	5.75
7	0.44	81.62	2.19	84.26	0.50
8	0.34	164.60	36.14	201.08	0.50
9	0.97	3 041.24	470.09	3 512.30	8.75
10	0.99	2 421.33	169.43	2 591.75	6.00
11	1.18	3 522.49	128.79	3 652.45	7.83
12	1.00	3 538.40	191.20	3 730.61	9.42
13	1.37	2 240.20	268.92	2 510.50	3.75
14	1.35	2 433.56	246.87	2 681.78	5.17
15	1.43	2 535.58	270.08	2 807.09	5.00
16	0.27	125.34	2.22	127.83	0.25
17	0.52	252.60	36.64	289.76	0.00
18	1.04	2 372.09	227.55	2 600.68	8.20
19	1.34	6 484.68	72.40	6 558.42	11.20
20	1.63	6 844.42	82.23	6 928.27	12.50
21	1.53	6 656.63	65.57	6 723.74	12.00
22	1.18	5 260.81	50.35	5 312.34	11.25
23	1.63	2 401.69	327.95	2 731.27	5.00

颗粒的 $|\Delta G|$ 普遍较大, 最高为 12.5; 淡附片的 $|\Delta G|$ 较小, 均接近于 0; 15 批黑顺片配方颗粒的 $|\Delta G|$ 差别很大, 从 0.5~11.6。对比 23 批样品的光化学传感器检测结果与质谱检测结果可发现, 附子配方颗粒的强心成分总含量越高, $|\Delta G|$ 越大。

2.5 一致性和相关性分析

使用 Origin 2019 和 SPSS 26.0 软件分别对传感器阵列的 $|\Delta G|$ 和 3 种强心成分总含量进行一致性和简单的线性相关性分析, 验证该方法的科学性和准确性。为了验证该传感器评价附子配方颗粒强心作用的科学性, 比较 3 种强心成分总含量与 $|\Delta G|$ 值的一致性, 如图 2-A 所示。气泡面积代表强心成分总含量的高低, 气泡越大, 强心成分的总含量越高。从气泡大小的排列顺序来看, 强心成分的总含量排序与 $|\Delta G|$ 总体上基本一致, 除 S10、S15、S18、S19

图 2 强心成分总含量与 $|\Delta G|$ 的一致性评价 (A) 和相关性分析 (B)Fig. 2 Consistency evaluation (A) and correlation analysis (B) of $|\Delta G|$ and total content of cardiotoxic components

稍有偏差。随后, 为了进一步判断该传感器评价附子配方颗粒强心作用的准确性, 本研究对 $|\Delta G|$ 与强心成分的总含量进行了相关性分析。从图 2-B 可以看出, $|\Delta G|$ 与强心成分的总含量呈现显著的线性相关, 其相关系数 (r) 高达 0.96, 相关性方程为 $Y=0.0019X+0.3601$ 。将 $|\Delta G|$ 值代入相关性方程后, 便可预测其强心成分的总含量。本研究建立的 ARS-PA 光化学比色传感器可有效地评价附子配方颗粒的品质, 反映其强心作用的强弱。

2.6 附子配方颗粒的质量评价标准初步研究

强心是附子的主要药理作用, 受药材来源、制剂工艺、产品规格等因素的影响^[12-14], 不同批次、不同产家、不同类型的附子配方颗粒含强心成分的总含量存在着显著的差异。反应后的颜色与强心成分的总含量密切相关, 因此可通过颜色快速评定附子配方颗粒质量优劣。根据 23 批样品反应后的颜色, 构建附子配方颗粒质量评价比色卡及其对应的 $|\Delta G|$ 和强心成分总含量的范围。

本实验依据颜色的差异, 制作附子配方颗粒比色卡, 便于后续的分级评定。如图 3 所示, 强心作用较弱的附子配方颗粒反应后的颜色为橙黄色; 强心作用中等的附子配方颗粒反应后的颜色偏红; 强心作用较强的附子配方颗粒反应后的颜色为紫红色。

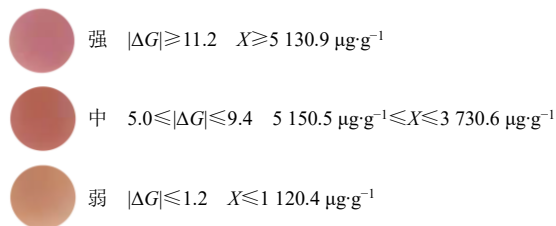


图 3 附子配方颗粒质量评价比色卡

Fig. 3 Color card for quality evaluation of Fuzi formula granules

此外本实验通过制作的附子配方颗粒比色卡对收集的 23 批附子配方颗粒进行初步分级评定, 结果表明这批样品中强心作用较强的有 5 批, 强心作用中等 12 批, 强心作用弱的有 6 批。

3 讨论

含邻二酚羟基结构的化合物不太稳定^[15], 易被氧化, 因此附子配方颗粒提取液若放置过久, 强心活性物质将会被氧化, 溶液颜色加深, 对 $|\Delta G|$ 值产生影响。供试品的稳定性考察结果表明, 样品在 12 h 内是稳定的, 但 12~24 h 溶液的颜色及响应强度均发生一定的变化。考虑到有时样品溶液制备后无法在 12 h 内将其检测完成, 为提高供试品的稳定性, 在 EDTA-2Na 缓冲溶液中加入抗氧化剂 (0.1% 无水 Na_2SO_3), 考察 1、6、12、24 h 稳定性, 结果表明加入抗氧化剂后供试品可在 24 h 内依旧能保持稳定。因此, 有时为提高供试品的稳定性可考虑在其中加入 0.1% 无水 Na_2SO_3 。

附子产鲜季节产量大, 如不及时采挖处理, 1 周时间就会大量腐烂, 因此需通过泡胆工艺防腐^[16-17]。泡胆用的胆巴水由 MgCl_2 、 CaSO_4 、 CaCl_2 、 NaCl 高浓度混合溶液组成^[18-19]。自清朝后期以来, 在四川江油地区, 形成了“泡胆-退胆-煮制-剥皮-切片-蒸制 (火烤)”的主流工艺^[20]。部分商家为谋取个人利益, 故意退胆不净, 致使黑顺片、淡附片中仍然残留着大量的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 其会与 ARS 络合, 进而形成紫色络合物, 严重干扰实验结果。因此, 附子配方颗粒在供试品的制备过程中需加入一定量的 EDTA-2Na, 络合去除金属离子。

LC-MS/MS 是鉴别附子强心活性成分常用的方法, 但其依赖昂贵仪器、分析成本高、需要专业人员、操作复杂、不便于在基层单位使用。相较于 LC-MS/MS 等大型分析设备, 该方法大大缩减了分析成

本：无需专业设备、无需昂贵的对照品、无需专业的操作人员；节省时间，虽然该方法供试品制备时间略长，但 ΔG 值测定时间短，扫描 1 次仅需几秒，整体所需时间较 LC-MS/MS 有所减少，如 1 个样品从制样到显色需大约 1.8 h，而 LC-MS/MS 测定该 3 种成分需要 2.25 h 左右。该方法作为现有方法的重要补充，可整体性的评价附子配方颗粒的强心作用，可为附子配方颗粒质量标准完善提供了重要的技术支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王晨, 时政, 刘钱, 等. 不适宜制备中药配方颗粒的中药材品种探讨 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5775-5781.
- [2] 肖小河, 张定堃, 王伽伯, 等. 中药品质综合量化评控体系: 标准评控力金字塔 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 7-12.
- [3] 肖小河. 走向精准的中药质量评价与控制 [J]. 药科学报, 2019, 54(12): 2139-2140.
- [4] Zhang D K, Han X, Tan P, *et al.* Establishment of one-step approach to detoxification of hypertoxic aconite based on the evaluation of alkaloids contents and quality [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(1): 49-61.
- [5] 贺亚男, 张定堃, 许润春, 等. 附子品质评价方法的研究进展 [J]. 中成药, 2017, 39(12): 2568-2572.
- [6] Chan T Y K. Causes and prevention of herb-induced aconite poisonings in Asia [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2011, 30(12): 2023-2026.
- [7] 陈芙蓉, 邹大江, 闪仁龙, 等. 近 10 年含乌头碱类植物中毒原因及解毒办法文献分析 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3116-3118.
- [8] 唐进法, 张书琦, 王晓艳, 等. HPLC-MS/MS 多组分含量测定研究附子配方颗粒的质量一致性 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1871-1879.
- [9] 张定堃, 赵志浩, 李春雨, 等. 基于生物毒效检测的附子不同炮制品质量评价研究 [J]. 药科学报, 2019, 54(12): 2169-2177.
- [10] 陈露梦, 贺亚男, 刘惠, 等. 一种关联生附片强心作用的质量快速评价方法的建立 [J]. 药科学报, 2022, 57(2): 460-466.
- [11] He Y N, Ou S P, Xiong X, *et al.* Stems and leaves of *Aconitum carmichaelii* Debx. as potential herbal resources for treating rheumatoid arthritis: Chemical analysis, toxicity and activity evaluation [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(9): 644-652.
- [12] 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.
- [13] 钟文, 陈莎, 章军, 等. 重点是原料, 还是工艺?—以葛根芩连汤为例探讨中成药质量一致性控制方法 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6): 1027-1032.
- [14] 黄志芳, 易进海, 陈东安, 等. 附片质量标准研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 49-52.
- [15] 韩文凤, 郭红英, 贾娟, 等. 果蔬多酚及其抗氧化性研究进展 [J]. 保鲜与加工, 2019, 19(4): 191-194.
- [16] 董思含, 孟江, 吴孟华, 等. 附子历史沿革考辨 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5567-5575.
- [17] 刘红梅. 胆巴炮制对附子化学成分及神经毒性影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [18] 黄勤挽, 周子渝, 王瑾, 等. 附子炮制历史沿革研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 269-271.
- [19] 石万银. 无胆附片加工工艺及其质量控制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [20] 刘潺潺, 程铭恩, 段海燕, 等. 古今附子加工方法的沿革与变迁 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1339-1344.

[责任编辑 郑礼胜]