

指纹图谱、一测多评与模式识别相结合的忍冬藤配方颗粒质量评价

曹桂云¹, 宁波¹, 余彩娟¹, 庄雪松¹, 刘羽康¹, 王岱杰², 林永强³, 董晓弟¹, 杨纯国⁴, 崔伟亮³, 刘洪超³, 孟兆青^{1*}

1. 山东宏济堂制药集团股份有限公司 山东省中医药治疗呼吸系统疾病技术创新中心, 山东 济南 250103
2. 齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省分析测试中心, 山东 济南 250014
3. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101
4. 山东一方制药有限公司, 山东 临沂 276000

摘要:目的 建立指纹图谱、一测多评与化学模式识别分析相结合的忍冬藤配方颗粒质量评价方法。方法 利用制备的15批忍冬藤标准汤剂和10批忍冬藤配方颗粒建立了HPLC指纹图谱,进行相似度评价、层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)及偏最小二乘-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)。建立一测多评法同时测定忍冬藤标准汤剂与配方颗粒中新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷6种成分的含量,同时测定忍冬藤饮片中相应成分的含量,计算从饮片到标准汤剂及配方颗粒的转移率。结果 15批忍冬藤标准汤剂和10批配方颗粒(S16~S25)HPLC指纹图谱有16个共有峰,相似度评价、HCA、PCA、PLS-DA表明,忍冬藤配方颗粒和标准汤剂成分相似。15批忍冬藤标准汤剂(S1~S15)的出膏率为7.80%~14.57%,新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷质量分数分别为2.09~8.60、6.91~21.84、2.71~6.83、1.94~8.72、1.51~6.81、10.26~33.88 mg/g,6种成分从饮片到标准汤剂的转移率分别为24.14%~41.75%、40.64%~70.83%、26.48%~44.22%、29.58%~51.97%、28.96%~46.59%、45.73%~84.73%。10批忍冬藤配方颗粒(S16~S25)的出膏率为14.4%~14.8%,6种成分从饮片到配方颗粒的转移率分别为46.16%~47.20%、41.87%~42.26%、39.64%~40.17%、58.20%~59.42%、31.14%~31.26%、84.06%~86.26%,与饮片到标准汤剂的转移率基本一致。结论 建立基于标准汤剂的忍冬藤配方颗粒的质量控制标准,以出膏率、指纹图谱的一致性、新绿原酸等6种指标成分的含量及转移率等为指标,衡量忍冬藤配方颗粒与标准汤剂的一致性,结果合理可靠,可为忍冬藤配方颗粒的质量控制及工艺研究提供参考。

关键词:忍冬藤;标准汤剂;配方颗粒;指纹图谱;一测多评法;层次聚类分析;主成分分析;偏最小二乘-判别分析;质量评价;新绿原酸;马钱苷酸;绿原酸;隐绿原酸;当药苷;马钱苷;化学模式识别分析

中图分类号:R283.6 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2024)04-1202-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.04.014

Quality evaluation of *Lonicerae Japonicae Caulis* dispensing granules by combination of fingerprint, quantitative analysis of multi-components by single marker and chemical pattern recognition analysis

CAO Guiyun¹, NING Bo¹, YU Caijuan¹, ZHUANG Xuesong¹, LIU Yukang¹, WANG Daijie², LIN Yongqiang³, DONG Xiaodi¹, YANG Chunguo⁴, CUI Weiliang³, LIU Hongchao³, MENG Zhaoqing¹

1. Shandong Technical Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Treatment of Respiratory Diseases, Shandong Hongjitang Pharmaceutical Group Co., Ltd., Jinan 250103, China
2. Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China
3. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China
4. Shandong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 276000, China

收稿日期: 2023-07-17

基金项目: 山东省重点研发计划重大科技创新工程项目(2021CXGC010511); 泉城产业领军人才计划项目(2020年); 泉城“5150”引才倍增计划项目(2021年)

作者简介: 曹桂云(1984—), 女, 山东菏泽人, 博士, 正高级工程师, 从事中药新药研发及上市后研究工作。E-mail: cgyxfys@163.com

*通信作者: 孟兆青(1979—), 男, 山东青岛人, 博士, 高级工程师, 从事中药新药研发及上市后研究工作。E-mail: cpummm@163.com

Abstract: Objective To establish a method for quality evaluation of Rendongteng (*Lonicerae Japonicae Caulis*, LJC) dispensing granules by combining fingerprint, quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) and chemical pattern recognition analysis. **Methods** The HPLC fingerprint of 15 batches of LJC standard decoctions and 10 batches of dispensing granules were established, and the similarity evaluation, hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were also carried out. A QAMS method was established for content determination of six compositions (neochlorogenic acid, loganic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, sweroside, loganin) from LJC standard decoctions and dispensing granules. The content of the corresponding components in LJC decoction pieces were also detected to calculate the transfer rates from decoction pieces to standard decoctions and dispensing granules. **Results** Sixteen common peaks were calibrated in characteristic chromatography in 15 batches of LJC standard decoctions (S1—S15) and 10 batches of dispensing granules (S16—S25). The results of similarity evaluation, HCA, PCA and PLS-DA indicated the similarity of ingredients in dispensing granules to those in standard decoctions. In standard decoctions, extraction rates were 7.80%—14.57%, the content of neochlorogenic acid, loganic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, sweroside, loganin was 2.09—8.60, 6.91—21.84, 2.71—6.83, 1.94—8.72, 1.51—6.81, 10.26—33.88 mg/g and the transfer rates of six ingredients from decoction pieces to standard decoction were 24.14%—41.75%, 40.64%—70.83%, 26.48%—44.22%, 29.58%—51.97%, 28.96%—46.59%, 45.73%—84.73%, respectively. The extraction rates in LJC dispensing granules were 14.4%—14.8%, the transfer rates of these six components from decoction pieces to dispensing granules were 46.16%—47.20%, 41.87%—42.26%, 39.64%—40.17%, 58.20%—59.42%, 31.14%—31.26%, 84.06%—86.26% respectively, with consistence with those from decoction pieces to standard decoction. **Conclusion** The quality control standards of LJC dispensing granules were established based on standard decoctions. The reasonable and reliable consistency between dispensing granules and standard decoction was further measured by the extraction rates, specific chromatograms, content and transfer rate of six ingredients, which can provide a reference for the quality control and process study of LJC dispensing granules.

Key words: *Lonicerae Japonicae Caulis*; standard decoction; dispensing granules; fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); cluster analysis (HCA); principal component analysis (PCA); partial least squares discriminant (PLS-DA); quality evaluation; neochlorogenic acid; loganic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; sweroside; loganin; chemical pattern recognition analysis

忍冬藤 *Lonicerae Japonicae Caulis* 是忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥茎枝, 有清热解毒、疏风通络之功效。用于温病发热、风湿热痹、痈肿疮疡、关节红肿热痛^[1]。忍冬藤最早记载于汉末的《名医别录》, 其性甘味寒, 尤善清热解毒、疏风通络^[2]。《本草纲目》称其“茎叶及花, 功用皆同, 治一切湿气及诸肿痛”。现代研究发现, 忍冬藤与金银花所含化学成分相似, 主要为有机酸、黄酮类、环烯醚萜苷类等化合物^[3-4], 具有抗菌、抗炎、抗氧化、调节机体免疫力等多种药理作用^[5-7]。

忍冬藤配方颗粒是由忍冬藤饮片经水提取后浓缩干燥而成, 具有免煎易服, 易储存, 携带方便、便于调剂等优点, 满足了随证加减的临床用药特点, 已经成为忍冬藤临床用药的重要形式。因此建立完善的忍冬藤配方颗粒质量评价方法规范忍冬藤配方颗粒质量并明确忍冬藤配方颗粒与临床汤剂一致性对于其临床应用具有十分重要的意义。国家药品监督管理局于 2021 年发布的《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》^[8] (下称《技术要求》) 明确了“标准汤剂”的概念及标准汤剂的制备方法与工

艺, 并对配方颗粒质量标准评价系统的建立提供了思路与依据。目前仅有 4 篇文献报道了忍冬藤标准汤剂及配方颗粒相关研究。胥爱丽等^[9]建立了忍冬藤配方颗粒的 HPLC 指纹图谱。李志娇等^[10]建立了 HPLC 法同时测定忍冬藤配方颗粒中绿原酸、咖啡酸、马钱苷等 3 种成分含量的方法。余德发等^[11]以出膏率和绿原酸、马钱苷的含量及转移率为评价指标对忍冬藤配方颗粒的制备工艺进行了研究。范帅帅等^[12]制备了 15 批忍冬藤标准汤剂, 以绿原酸、咖啡酸、马钱苷作为定量检测指标, 计算出膏率、含量和转移率, 并建立超高液相色谱指纹图谱分析方法。其中前 3 篇报道未基于标准汤剂进行研究, 第 4 篇报道采用购买的饮片进行标准汤剂的制备, 均不符合《技术要求》相关规定, 导致所测定配方颗粒中马钱苷含量数据及出膏率数据与忍冬藤配方颗粒国家标准差距较大, 难以反映现行忍冬藤配方颗粒质量。这些报道还存在研究指标成分过少或单一、未制定配方颗粒指标成分含量限度等问题, 难以用于忍冬藤配方颗粒的全面质量控制。另外, 尚无忍冬藤配方颗粒与其饮片临床用药的一致性相

关研究,不利于忍冬藤配方颗粒的临床配伍使用。

本研究根据《技术要求》相关规定,于山东、河南、河北等地收集代表性药材,炮制成饮片,制备标准汤剂,并建立忍冬藤质量评价标准,并以标准汤剂出膏率、指纹图谱及新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷6个特征成分含量和转移率评价忍冬藤配方颗粒与标准汤剂的一致性,为忍冬藤配方颗粒的质量控制、工艺研究及临床应用提供参考。

1 仪器与材料

Agilent1260型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;BSA224S-CW型1/1万电子天平,赛多利斯科技仪器(北京)有限公司;TS8606型冻干机,菲维科公司;XS105型1/10万电子天平,梅特勒托利多科技(中国)有限公司;YRE2000A型旋转蒸发仪,巩义市予华仪器有限责任公司;KQ-800VSW型双频静音型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;KDM型可调控温电热套,山东鄄城华鲁电热仪器有限公司。

忍冬藤对照药材,批号121069-202107,中国食品药品检定研究院;对照品隐绿原酸(批号250031-202104)、新绿原酸(批号240008-202110)、当药苷(批号260014-202108),质量分数均为98.0%,上海鸿永生物科技有限公司;对照品马钱苷酸,批号ST05430120,质量分数98.0%,上海诗丹德生物技术有限公司;对照品绿原酸,批号110753-202119,质量分数96.3%,中国食品药品检定研究院;对照品马钱苷,批号200359-200604,质量分数99.9%,江苏永健医药科技有限公司。

15批忍冬藤药材来源见表1,经山东省食品药品检验研究院林永强主任药师鉴定,为忍冬科忍冬属植物忍冬*L. japonica* Thunb.的干燥茎枝。水为超

表1 15批忍冬藤药材信息

Table 1 Information of 15 batches of LJC

编号	批号	产地	编号	批号	产地
YC1	YF2103011	山东济宁	YC9	YF2210003	河北邢台
YC2	YF2104002	山东济宁	YC10	YF2204011	山东济宁
YC3	YF2104005	山东临沂	YC11	YF2207004	河南洛阳
YC4	YF2104006	山东临沂	YC12	YF2209001	河南洛阳
YC5	YF2104007	山东临沂	YC13	YF2209002	河南洛阳
YC6	YF2104003	山东济宁	YC14	YF2210004	河北邢台
YC7	YF2210001	河北邢台	YC15	YF2210005	河北邢台
YC8	YF2210002	河北邢台			

纯水,乙腈、磷酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。忍冬藤配方颗粒,山东宏济堂制药集团股份有限公司,批号220501、220502、220503、220504、220505、220506,编号S16~S21;北京康仁堂药业有限公司,批号22015443,编号S22;山东一方制药有限公司,批号G2020732、G2020742、G2020721,编号S23~S25;忍冬藤配方颗粒规格均为每克中药配方颗粒均相当于饮片6.5g。

2 方法与结果

2.1 忍冬藤标准汤剂冻干粉及配方颗粒制备

2.1.1 忍冬藤标准汤剂冻干粉的制备 将15批忍冬藤药材按照《中国药典》2020年版一部忍冬藤饮片【炮制】项下的方法炮制,即除去杂质,洗净,闷润,切段,干燥,得到15批忍冬藤饮片(批号与药材批号对应相同,编号YP1~YP15)。结合现代临床用药习惯,标准汤剂制备工艺确定为称取15批忍冬藤饮片不少于100g,置于砂锅中,加水煎煮2次,第1次加10倍量水浸泡30min,武火煮沸后改为文火煎煮20min,第2次加8倍量水武火煮沸后改为文火煎煮15min,趁热用200目筛滤过,合并滤液,减压浓缩,冷冻干燥,即得15批标准汤剂冻干粉(编号S1~S15)。

2.1.2 忍冬藤配方颗粒制备 取忍冬藤饮片6500g,加水煎煮,滤过,滤液浓缩成清膏,干燥,加入辅料适量,制粒,制成1000g,即得。其中,山东宏济堂制药集团股份有限公司220501、220502、220503(编号S16~S18)批配方颗粒由YF2104005批(编号YC3)药材炮制成饮片,制备成配方颗粒。

2.2 忍冬藤标准汤剂和配方颗粒 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Agilent Zorbax SB-C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);以乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱:0~40min,6%~9%乙腈;40~50min,9%乙腈;50~51min,9%~13%乙腈;51~70min,13%~20%乙腈;70~80min,20%乙腈;检测波长0~60min为236nm,60~80min为327nm;体积流量1.0mL/min;柱温30℃;进样量5μL。理论塔板数按马钱苷峰计算不低于3000。

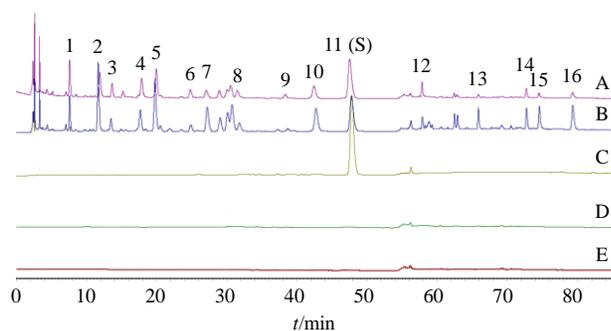
2.2.2 参照物溶液的制备 取忍冬藤对照药材1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入30%甲醇25mL,回流提取30min,放冷,摇匀,滤过,取续滤液,作为对照药材参照物溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 取马钱苷对照品适量,

精密称定，加 50% 甲醇制成含马钱苷 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液，即得。

2.2.4 供试品溶液的制备 预试验采用单因素实验分别对提取方式、提取溶剂、提取时间和取样量等进行考察，确定供试品溶液制备方式为取忍冬藤配方颗粒或标准汤剂冻干粉适量，研细（过五号筛），取约 0.4 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 50 mL，密塞，超声处理（功率 250 W、频率 40 kHz）30 min，放冷，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.5 专属性试验 取忍冬藤配方颗粒所使用的辅料（糊精）适量，按照“2.2.4”项下制备方法制成阴性对照溶液；取忍冬藤配方颗粒供试品溶液、马钱苷对照品溶液、阴性对照溶液按“2.2.1”项下方法获得其色谱图，结果表明（图 1）阴性对照无干扰，表明方法专属性良好。



A-配方颗粒样品；B-对照药材；C-马钱苷对照品；D-阴性样品；E-空白溶剂；3-新绿原酸；5-马钱苷酸；6-8-表马钱酸；7-绿原酸；8-隐绿原酸；10-当药苷；11-马钱苷；12-断氧化马钱子苷；14-异绿原酸 B；15-异绿原酸 A；16-异绿原酸 C。

A-dispensing granules sample; B-reference medicinal materials; C-loganin reference substance; D-negative sample; E-blank solvent; 3-neochlorogenic acid; 5-loganic acid; 6-8-epi loganic acid; 7-chlorogenic acid; 8-cryptochlorogenic acid; 10-chiratin; 11-loganin; 12-secoxyloganin; 14-isochlorogenic acid B; 15-isochlorogenic acid A; 16-isochlorogenic acid C.

图 1 忍冬藤配方颗粒的专属性分析

Fig. 1 Chromatogram of specificity determination of LJC dispensing granules

2.2.6 重复性试验 精密称取同一批号忍冬藤配方颗粒样品 6 份，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定，以马钱苷峰为参照峰，考察各共有峰相对保留时间和相对峰面积的一致性，结果显示，各共有峰的相对保留时间的 $\text{RSD} < 2\%$ ，相对峰面积的 $\text{RSD} < 3\%$ ，供试品指纹图谱相似度 > 0.90 ，表明该方法的重复性较好。

2.2.7 中间精密度试验 由 2 个分析人员在不同日

期分别按“2.2.4”项下方法分别制备 6 份供试品溶液，利用不同仪器按“2.2.1”项下色谱条件检测，以马钱苷峰为参照峰，考察各共有峰相对保留时间和相对峰面积的一致性，结果显示，各共有峰的相对保留时间的 $\text{RSD} < 3\%$ ，相对峰面积的 $\text{RSD} < 5\%$ ，供试品指纹图谱相似度 > 0.90 ，表明该方法的中间精密度较好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.2.1”项下色谱条件测定，以马钱苷峰为参照峰，考察各共有峰相对保留时间和相对峰面积的一致性，结果显示，各共有峰的相对保留时间的 $\text{RSD} < 1\%$ ，相对峰面积的 $\text{RSD} < 3\%$ ，供试品指纹图谱相似度 > 0.90 ，表明供试品溶液稳定性较好。

2.2.9 指纹图谱的建立 取 15 批忍冬藤标准汤剂和 10 批忍冬藤配方颗粒样品，按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定，将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 版），其叠加色谱图见图 2。对 15 批忍冬藤标准汤剂的指纹图谱进行多点校正和 Mark 峰匹配后，生成忍冬藤标准汤剂的对照指纹图谱（R），见图 3。共标定 16 个共有峰，并指认了其中 11 个成分，分别为新绿原酸（峰 3）、马钱苷酸（峰 5）、8-表马钱酸（峰 6）、绿原酸（峰 7）、隐绿原酸（峰 8）、当药苷（峰 10）、马钱苷（峰 11）、断氧化马钱子苷（峰 12）、异绿原酸 B（峰 14）、异绿原酸 A（峰 15）、异绿原酸 C（峰 16）。

2.2.10 忍冬藤配方颗粒与标准汤剂的指纹图谱比较 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2012 版）计算相似度，忍冬藤配方颗粒与标准汤剂对照指纹图谱的相似度均 > 0.9 ，S16~S18 批配方颗粒与相应标准汤剂（S3）图谱相似度 > 0.95 ，表明配方颗粒的生产工艺较为稳定且化学成分与标准汤剂一致性较好。15 批忍冬藤标准汤剂与对照指纹图谱的相似度 > 0.9 ，说明不同批次忍冬藤饮片所制备的标准汤剂具有较高的相似度。

2.2.11 聚类分析 将 15 批忍冬藤标准汤剂指纹图谱中 16 个特征峰的峰面积按制成量折算配方颗粒峰面积，将折算后的峰面积和 10 批配方颗粒的峰面积导入 SPSS 20.0 软件进行聚类分析，结果见图 4。结果发现，当刻度距离为 15 时，可分为 2 类，配方颗粒 S16~S25 与标准汤剂 S1~S13、S15 聚为一类，标准汤剂 S14 单独聚为一类，说明配方颗粒的生产

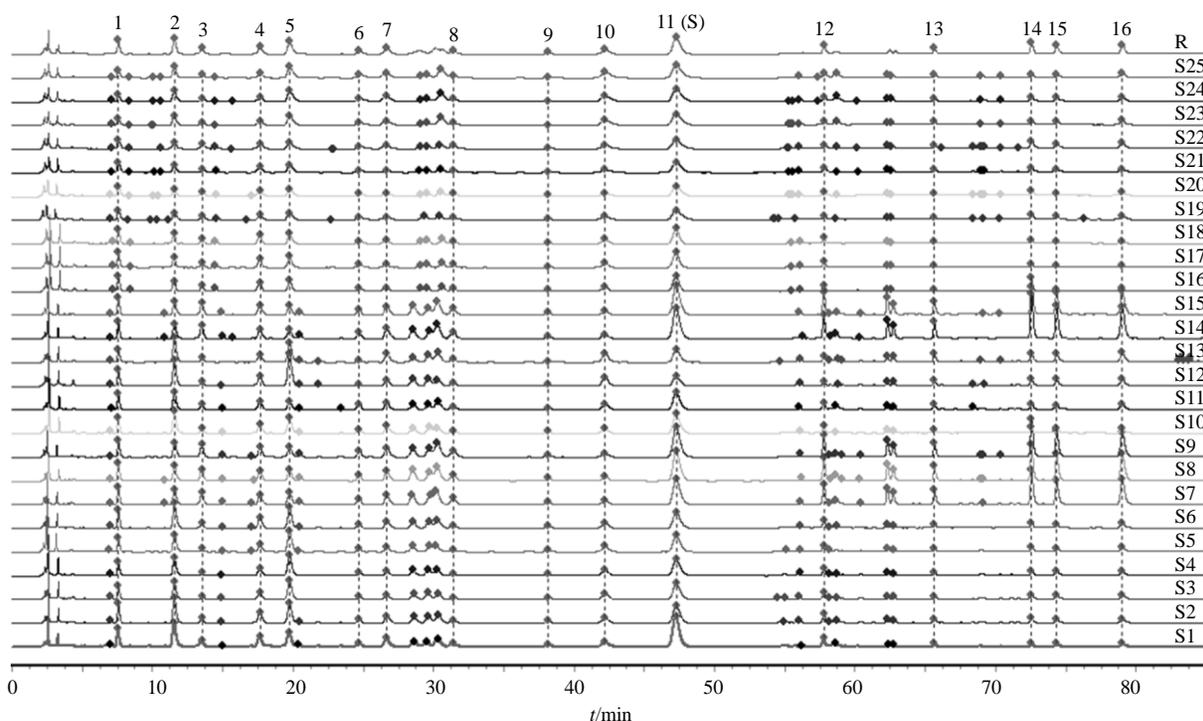
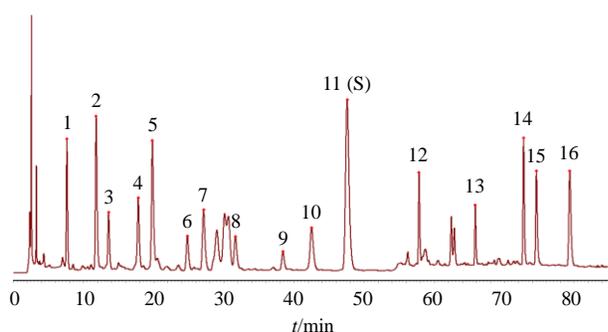


图2 忍冬藤标准汤剂 (S1~S15) 和配方颗粒 (S16~S25) 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of LJC standard decoctions (S1—S15) and dispensing granules (S16—S25)



3-新绿原酸; 5-马钱苷酸; 6-8-表马钱酸; 7-绿原酸; 8-隐绿原酸;
10-当药苷; 11-马钱苷; 12-断氧化马钱子苷; 14-异绿原酸 B; 15-异绿原酸 A; 16-异绿原酸 C。
3-neochlorogenic acid; 5-loganic acid; 6-8-epiloganic acid;
7-chlorogenic acid; 8-cryptochlorogenic acid; 10-sweroside;
11-loganin; 12-secoxyloganin; 14-isochlorogenic acid B;
15-isochlorogenic acid A; 16-isochlorogenic acid C.

图3 忍冬藤标准汤剂对照指纹图谱

Fig. 3 Reference fingerprint of LJC standard decoctions

工艺较稳定, 且化学成分与标准汤剂一致性较好。
2.2.12 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 将 15 批忍冬藤标准汤剂 HPLC 指纹图谱中 16 个特征峰的峰面积按制成量折算配方颗粒峰面积, 将折算后的峰面积和 10 批配方颗粒的峰面积导入 SPSS 20.0 软件进行 PCA, 以特征值 > 1 为提取标准得到 3 个主成分, 其方差贡献率分别为 52.63%、23.89%、10.15%, 累积方差贡献率为 86.67%, 可以

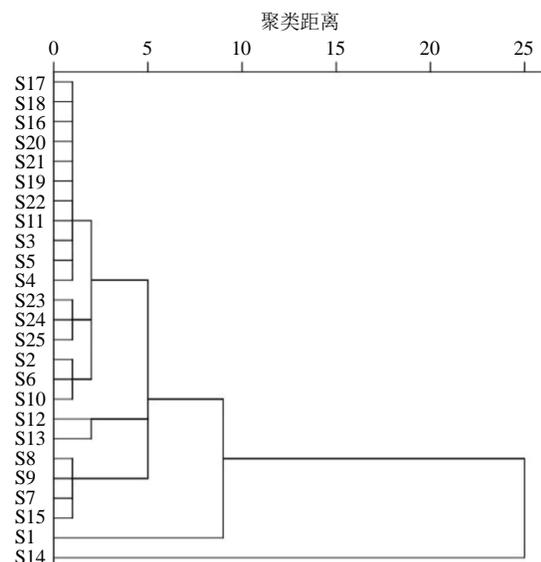


图4 15 批忍冬藤标准汤剂和 10 批配方颗粒指纹图谱聚类分析

Fig. 4 Fingerprint cluster analysis map of 15 batches of LJC standard decoction and 10 batches of dispensing granules

代表 16 个共有成分的大部分信息, 得分图见图 5。结果发现配方颗粒与标准汤剂的成分较为一致, 但存在 3 批配方颗粒 (S23~S25) 与其余配方颗粒及标准汤剂样品分布距离较远, 分析其原因是由于该 3 批配方颗粒峰 10 (当药苷) 峰面积偏高所致。

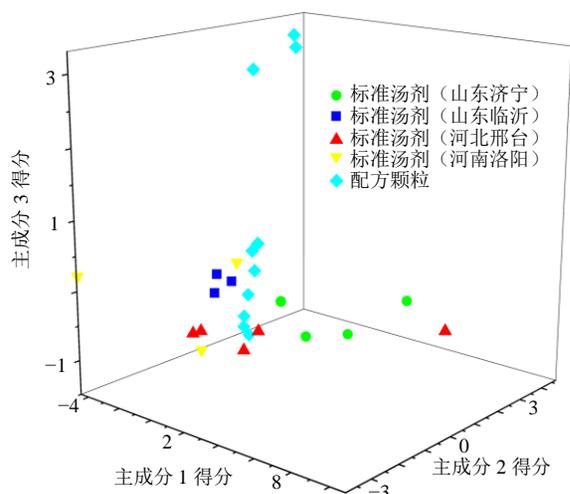


图5 15批忍冬藤标准汤剂和10批配方颗粒PCA得分图
Fig. 5 PCA score chart of 15 batches of LJC standard decoction and 10 batches of dispensing granules

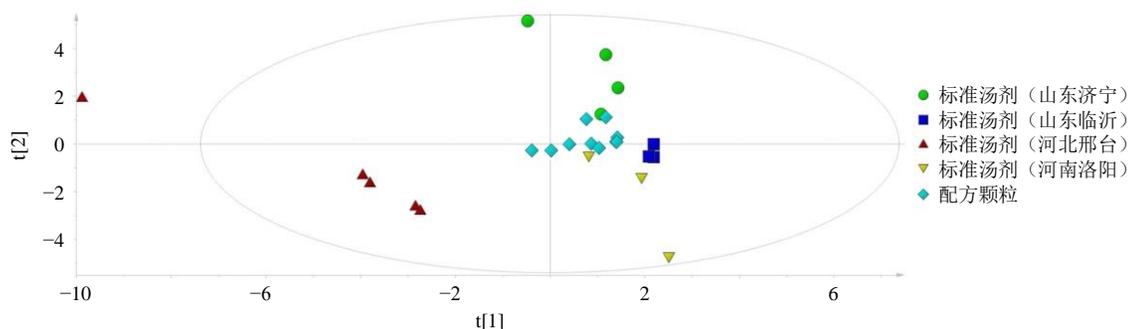


图6 15批忍冬藤标准汤剂和10批配方颗粒PLS-DA得分散点图

Fig. 6 PLS-DA score scatter plots of 15 batches of LJC standard decoction and 10 batches of dispensing granules

柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱: 0~40 min, 6%~9%乙腈; 40~55 min, 9%乙腈; 55~65 min, 9%~75%乙腈; 检测波长 236 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。理论板数按绿原酸峰计算不低于 3 000。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 取新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷对照品适量, 精密称定, 加入 30% 甲醇制成质量浓度分别为 0.975 1、1.301 4、1.508 0、1.146 6、1.173 1、2.081 2 mg/mL 的混合对照品储备液, 即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 采用单因素实验分别对供试品提取方式、提取溶剂、提取时间和取样量等进行考察, 确定供试品溶液制备方式为取忍冬藤配方颗粒或标准汤剂冻干粉适量, 研细 (过五号筛), 取约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 用 30% 甲醇补足减失

的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。
2.2.13 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 将 15 批忍冬藤标准汤剂指纹图谱中 16 个特征峰的峰面积按制成量折算配方颗粒峰面积, 将折算后的峰面积和 10 批配方颗粒的峰面积导入 SIMCA 14.1 软件进行 PLS-DA, 获得相应模型, 模型参数为 R_x^2 为 0.985, R_y^2 为 0.886, Q^2 为 0.695, 均大于 0.5, 表明拟合模型的准确度和预测能力较好, 结果见图 6。结果与相似度分析、PCA 结果相似, 配方颗粒 S16~S18 与其对应标准汤剂 S3 分布集中, 10 批配方颗粒分布集中, 表明配方颗粒生产工艺稳定性较好, 成分与标准汤剂一致性较好, 以上结果与聚类分析及 PCA 相似。

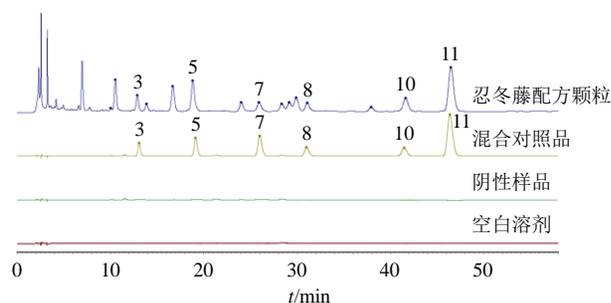
2.3 忍冬藤配方颗粒的 HPLC 定量方法研究

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈

的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3.4 专属性考察 取忍冬藤配方颗粒所使用的辅料 (糊精) 适量, 按照 “2.3.3” 项下方法制备成阴性对照溶液; 取忍冬藤配方颗粒供试品溶液, 新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷混合对照品溶液, 空白溶液, 阴性对照溶液, 按 “2.3.1” 项下方法获得其色谱图, 结果表明 (图 7) 表明阴性对照无干扰, 方法专属性良好。

2.3.5 线性关系考察 采用逐级稀释法, 精密量取适量新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷混合对照品储备液, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 30% 甲醇定容, 稀释得到质量浓度分别为 97.51、130.14、150.80、114.66、117.31、520.30 μg/mL 的对照品溶液, 分别稀释 1、2、4、8、16 倍, 从低到高浓度的混合对照品溶液编号分别为 I~V, 按照 “2.3.1” 项下色谱条件进样分析, 每个质量浓度平行进样 2 次, 以质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰峰面积积分值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得到各指标



3-新绿原酸; 5-马钱苷酸; 7-绿原酸; 8-隐绿原酸; 10-当药苷;
11-马钱苷。
3-neochlorogenic acid; 5-loganic acid; 7-chlorogenic acid;
8-cryptochlorogenic acid; 10-sweroside; 11-loganin.

图7 忍冬藤配方颗粒的专属性分析

Fig. 7 Chromatogram of specificity determination of LJC dispensing granules

成分的回归方程和相关系数, 结果分别为新绿原酸 $Y=11.290 X-11.353$, $r=0.999 9$, 线性范围 $6.09\sim 97.51 \mu\text{g/mL}$; 马钱苷酸 $Y=14.637 X-7.810 6$, $r=1.000 0$, 线性范围 $8.13\sim 130.14 \mu\text{g/mL}$; 绿原酸 $Y=18.175 X-31.221$, $r=0.999 9$, 线性范围 $9.42\sim 150.80 \mu\text{g/mL}$; 隐绿原酸 $Y=10.862 X-22.52$, $r=0.999 8$, 线性范围 $7.17\sim 114.66 \mu\text{g/mL}$; 当药苷 $Y=12.731 X-4.369 5$, $r=1.000 0$, 线性范围 $7.33\sim 117.31 \mu\text{g/mL}$; 马钱苷 $Y=15.108 X-23.868$, $r=1.000 0$, 线性范围 $32.52\sim 520.30 \mu\text{g/mL}$ 。

2.3.6 中间精密度试验 由2个分析人员在不同日期分别按“2.3.3”项下方法制备6份供试品溶液, 利用不同仪器按“2.3.1”项下色谱条件检测, 结果忍冬藤配方颗粒中新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷峰面积的RSD分别为1.96%、1.60%、2.97%、2.26%、2.48%、0.30%, 结果表明方法中间精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取220501批次忍冬藤配方颗粒供试品溶液, 分别于制备后0、2、4、8、12、24 h, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷峰面积的RSD分别为1.66%、0.30%、0.88%、2.64%、0.14%、0.34%, 结果表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 精密称取220501批次忍冬藤配方颗粒样品, 共6份, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷质量分数的RSD分别为1.16%、0.48%、0.67%、0.53%、0.53%、0.71%, 结果表明该方法的

重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 取0.1 g忍冬藤配方颗粒, 分别加入新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷对照品储备液0.4、1.5、0.2、0.3、0.4、0.7 mL, 按“2.3.3”项下方法制备溶液, 平行制备6份, 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率, 结果表明, 新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷的平均加样回收率分别为99.01%、102.18%、99.92%、97.72%、96.99%、97.42%, RSD分别为2.26%、1.65%、1.20%、2.64%、2.33%、2.48%, 符合分析要求。

2.4 忍冬藤配方颗粒的一测多评方法建立研究

2.4.1 相对校正因子 (f_{is}) 计算 精密吸取“2.3.5”项下系列混合对照品溶液I~V各适量, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以绿原酸为内参物(s), 计算新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷的 f_{is} , 计算公式 $f_{is} = A_s C_i / A_i C_s$, A_s 为内标峰面积, C_s 为内标质量浓度, A_i 为待测物峰面积, C_i 为待测物质量浓度。结果见表2。

表2 f_{is} 计算结果

Table 2 f_{is} of each component reference

混合对照品 溶液编号	$f_{\text{新绿原酸/}}$	$f_{\text{马钱苷酸/}}$	$f_{\text{隐绿原酸/}}$	$f_{\text{当药苷/}}$	$f_{\text{马钱苷/}}$
	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸
I	1.59	1.15	1.80	1.32	1.08
II	1.60	1.19	1.74	1.33	1.13
III	1.60	1.18	1.77	1.35	1.14
IV	1.61	1.22	1.70	1.41	1.18
V	1.61	1.23	1.68	1.42	1.19
平均值	1.60	1.19	1.74	1.36	1.15
RSD/%	0.40	2.87	2.65	3.35	3.96

2.4.2 f_{is} 重现性考察 分别考察3台不同Agilent 1260高效液相色谱仪、1台Waters e2695高效液相色谱仪和6根不同色谱柱对 f_{is} 的影响, 结果见表3, 测得的 f_{is} 的RSD值在2.31%~2.72%, 表明各待测组分 f_{is} 在不同仪器和不同色谱柱之间重现性良好。

分别考察不同体积流量及柱温对 f_{is} 的影响, 结果见表4, 测得的 f_{is} 的RSD值分别在0.56%~1.40%, 表明各待测组分 f_{is} 在不同体积流量及柱温之间重现性良好。

2.4.3 待测组分散谱峰定位 分别计算各待测组分与内参物绿原酸的相对保留时间(t_R)与保留时间差

表3 不同仪器和色谱柱对 $f_{i/s}$ 的影响

Table 3 Effects of different instruments and chromatographic columns on $f_{i/s}$

仪器	色谱柱	$f_{\text{新绿原酸/绿原酸}}$	$f_{\text{马钱苷酸/绿原酸}}$	$f_{\text{隐绿原酸/绿原酸}}$	$f_{\text{当药苷/绿原酸}}$	$f_{\text{马钱苷/绿原酸}}$
仪器 1	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	1.54	1.19	1.72	1.39	1.22
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	1.50	1.16	1.72	1.35	1.19
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	1.58	1.21	1.70	1.40	1.16
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	1.52	1.22	1.72	1.43	1.21
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	1.51	1.18	1.69	1.40	1.19
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	1.57	1.23	1.74	1.43	1.25
仪器 2	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	1.59	1.21	1.69	1.40	1.17
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	1.57	1.19	1.63	1.42	1.17
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	1.59	1.20	1.72	1.42	1.19
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	1.55	1.26	1.73	1.45	1.22
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	1.52	1.22	1.73	1.42	1.24
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	1.56	1.26	1.75	1.45	1.22
仪器 3	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	1.61	1.16	1.74	1.36	1.15
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	1.62	1.22	1.65	1.40	1.21
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	1.61	1.22	1.67	1.35	1.20
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	1.53	1.21	1.73	1.42	1.19
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	1.52	1.15	1.65	1.36	1.17
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	1.57	1.22	1.77	1.44	1.24
仪器 4	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	1.51	1.18	1.69	1.33	1.22
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	1.53	1.27	1.60	1.33	1.27
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	1.61	1.20	1.72	1.39	1.20
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	1.57	1.25	1.69	1.36	1.22
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	1.58	1.17	1.77	1.41	1.17
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	1.56	1.25	1.70	1.43	1.18
	平均值	1.56	1.21	1.71	1.40	1.20
	RSD/%	2.31	2.72	2.49	2.56	2.71

表4 不同体积流量及不同柱温对 $f_{i/s}$ 的影响

Table 4 Effects of different volume flow rates and column temperatures on $f_{i/s}$

体积流量/ (mL·min ⁻¹)	柱温/ °C	$f_{\text{新绿原酸/绿原酸}}$	$f_{\text{马钱苷酸/绿原酸}}$	$f_{\text{隐绿原酸/绿原酸}}$	$f_{\text{当药苷/绿原酸}}$	$f_{\text{马钱苷/绿原酸}}$
0.9	30	1.57	1.16	1.70	1.35	1.13
1.0	30	1.60	1.19	1.74	1.36	1.15
1.1	30	1.57	1.16	1.70	1.34	1.13
1.0	29	1.58	1.14	1.72	1.35	1.13
1.0	30	1.60	1.16	1.74	1.36	1.15
1.0	31	1.57	1.17	1.71	1.35	1.14
RSD/%		0.93	1.40	1.07	0.56	0.86

(Δt), 并考察其不同仪器和不同色谱柱之间的重现性, 结果表明 (表 5), 相对保留时间波动较小,

最终选择不同仪器和不同色谱柱中各待测成分的相对保留时间值的平均值作为峰定位依据。

2.4.4 一测多评法与外标法测定结果的比较 分别采用一测多评法和外标法计算待测成分的含量, 结果见表 6。外标法与一测多评法计算的含量经 t 检验比较, P 远大于 0.05, 表明 2 种方法测得的含量无明显差异, 且 2 组含量之间 $RSD < 2\%$, 表明所建立的一测多评法准确性良好, 可用于忍冬藤配方颗粒及标准汤剂的含量测定。

2.5 忍冬藤配方颗粒与标准汤剂出膏率、有效成分含量及转移率比较

对标准汤剂和配方颗粒的出膏率进行测定, 结果见表 7、8。15 批标准汤剂的出膏率在 7.80%~14.57%, 出膏率平均值为 11.80%, 平均值的 70%~

表5 不同仪器和色谱柱中各目标成分的相对保留时间及保留时间差

Table 5 Values of *r* and Δt_R determined by different instruments and columns

仪器	色谱柱	$t_{R\text{新绿原酸}} / \Delta t$	$t_{R\text{新绿原酸}} / \Delta t$	$t_{R\text{马钱苷酸}} / \Delta t$	$t_{R\text{马钱苷酸}} / \Delta t$	$t_{R\text{隐绿原酸}} / \Delta t$	$t_{R\text{隐绿原酸}} / \Delta t$	$t_{R\text{当药苷}} / \Delta t$	$t_{R\text{当药苷}} / \Delta t$	$t_{R\text{马钱苷}} / \Delta t$	$t_{R\text{马钱苷}} / \Delta t$
		绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸	绿原酸
仪器 1	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	0.49	-12.95	0.71	-7.38	1.21	5.34	1.58	14.57	1.76	19.28
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	0.50	-13.85	0.72	-7.89	1.19	5.37	1.53	14.85	1.71	19.63
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	0.50	-14.79	0.71	-8.59	1.18	5.24	1.50	14.76	1.67	19.78
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	0.51	-11.60	0.68	-7.50	1.25	5.85	1.61	14.30	1.86	20.24
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	0.50	-17.08	0.71	-9.91	1.19	6.49	1.53	18.11	1.72	24.60
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	0.51	-8.97	0.75	-4.52	1.26	4.76	1.63	11.53	1.80	14.64
仪器 2	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	0.50	-12.35	0.74	-6.45	1.20	5.04	1.60	14.80	1.80	19.77
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	0.52	-11.70	0.76	-5.73	1.25	6.06	1.62	14.94	1.78	18.84
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	0.51	-13.41	0.73	-7.32	1.18	4.98	1.56	15.18	1.76	20.65
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	0.54	-15.12	0.79	-7.04	1.20	6.71	1.58	19.15	1.69	22.85
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	0.50	-19.82	0.66	-13.46	1.16	6.33	1.52	20.58	1.71	28.10
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	0.53	-10.38	0.73	-5.95	1.24	5.38	1.59	13.00	1.79	17.40
仪器 3	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	0.50	-13.10	0.73	-7.02	1.19	5.11	1.57	15.03	1.74	19.54
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	0.52	-11.49	0.76	-5.75	1.24	5.87	1.59	14.23	1.80	19.20
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	0.51	-14.27	0.73	-7.73	1.17	5.00	1.51	14.91	1.70	20.22
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	0.54	-14.79	0.78	-7.01	1.21	6.54	1.58	18.60	1.74	23.40
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	0.50	-18.94	0.69	-11.76	1.19	7.21	1.52	19.73	1.69	26.19
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	0.53	-9.98	0.75	-5.27	1.24	5.16	1.58	12.23	1.78	16.44
仪器 4	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL122424	0.51	-15.83	0.73	-8.85	1.18	5.71	1.49	15.71	1.67	21.76
	Agilent Zorbax SB-C ₁₈ SN: USCL113883	0.50	-15.35	0.73	-8.36	1.20	6.17	1.53	16.21	1.72	22.05
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈ SN: USUXA35351	0.52	-16.85	0.71	-9.95	1.19	6.46	1.46	15.89	1.73	25.40
	Thermo Acclaim™ 120 C ₁₈ SN: 019501	0.55	-16.02	0.76	-8.46	1.24	8.55	1.56	19.91	1.60	21.27
	Shimadzu Inert Sustain C ₁₈ SN: 6GR98101	0.52	-21.70	0.69	-13.98	1.17	7.67	1.50	22.55	1.75	33.82
	Waters XBridge C ₁₈ SN: 02273117512476	0.53	-11.94	0.75	-6.40	1.22	5.62	1.59	15.10	1.82	21.00
平均值		0.51	-14.26	0.73	-8.01	1.21	5.95	1.56	15.22	1.74	19.34
RSD/%		3.07	-22.00	4.29	-29.85	2.48	15.72	2.94	17.18	3.37	18.71

130%分别为8.26%~15.34%。3批配方颗粒的出膏率为14.40%~14.80%，均在15批标准汤剂出膏率平均值±30%范围内。分别取15批忍冬藤标准汤剂和3批配方颗粒，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.3.1”项下色谱条件测定新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷含量。由表7可知，15批标准汤剂中新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷质量分数分别为2.09~8.60、6.91~21.84、2.71~6.83、1.94~8.72、1.51~6.81、10.26~33.88 mg/g，平均值分别为4.76、11.96、5.14、4.78、3.98、22.73 mg/g。

为计算该6种成分从饮片到配方颗粒和标准汤剂的转移率，需测定其在饮片中的含量。经过考察，

确定其测定方法为分别取15批忍冬藤饮片粉末(过三号筛)约1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入30%甲醇25 mL，称定质量，回流提取30 min，放冷，用30%甲醇补足减失的质量，摇匀，过0.45 μm微孔滤膜，取续滤液，按“2.3.1”项下色谱条件进行测定，并计算饮片中新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷含量。6种指标成分从饮片到标准汤剂的转移率分别为新绿原酸24.14%~41.75%、马钱苷酸40.64%~70.83%、绿原酸26.48%~44.22%、隐绿原酸29.58%~51.97%、当药苷28.96%~46.59%、马钱苷45.73%~84.73%，平均值分别为33.25%、54.53%、35.41%、42.23%、37.10%、65.19%。虽然各指标成分含量差异较大，

表6 外标法与 QAMS 测定忍冬藤中 6 种成分含量的比较

Table 6 Comparison of six effective constituents determined by external standard method and QAMS in LJC

样品	编号	绿原酸/ (mg·g ⁻¹)				新绿原酸/(mg·g ⁻¹)				马钱苷酸/(mg·g ⁻¹)				隐绿原酸/(mg·g ⁻¹)				当药苷/(mg·g ⁻¹)				马钱苷/(mg·g ⁻¹)				
		外标法	QAMS	RSD/%	P 值	外标法	QAMS	RSD/%	P 值	外标法	QAMS	RSD/%	P 值	外标法	QAMS	RSD/%	P 值	外标法	QAMS	RSD/%	P 值	外标法	QAMS	RSD/%	P 值	
标准汤剂	S1	6.63	4.48	4.52	1.32	0.95	12.58	12.34	1.20	0.93	5.67	5.79	1.54	0.87	4.62	4.53	1.65	0.85	33.46	33.88	0.74	0.86				
冻干粉	S2	4.84	3.40	3.43	1.68		14.71	14.44	1.13		4.41	4.51	1.78		3.59	3.52	1.91		18.02	18.24	0.76					
	S3	3.01	2.11	2.13	1.72		13.74	13.48	1.17		1.95	1.99	1.76		5.32	5.22	1.51		17.14	17.36	0.80					
	S4	2.71	2.07	2.09	1.76		13.63	13.38	1.14		1.90	1.94	1.80		1.54	1.51	1.89		17.04	17.26	0.81					
	S5	3.02	2.14	2.16	1.70		13.60	13.34	1.19		2.02	2.07	1.89		1.65	1.62	1.77		17.58	17.80	0.78					
	S6	4.62	3.16	3.19	1.81		14.64	14.37	1.14		3.26	3.33	1.99		2.65	2.60	1.90		17.83	18.05	0.77					
	S7	6.46	7.76	7.83	0.87		10.21	10.02	1.21		6.57	6.71	1.47		5.34	5.24	1.50		28.26	28.62	0.76					
	S8	6.55	7.74	7.81	0.88		9.81	9.62	1.26		6.96	7.11	1.46		5.66	5.56	1.42		31.91	32.31	0.74					
	S9	6.18	8.53	8.60	0.79		8.66	8.50	1.25		6.79	6.94	1.49		5.52	5.42	1.45		31.56	31.96	0.75					
	S10	5.19	3.18	3.21	1.80		11.01	10.81	1.17		3.20	3.27	1.93		2.60	2.55	1.94		20.54	20.80	0.77					
	S11	4.77	3.61	3.64	1.58		7.04	6.91	1.33		4.65	4.76	1.78		3.79	3.72	1.81		18.24	18.47	0.78					
	S12	4.36	2.61	2.63	1.62		22.26	21.84	1.13		2.70	2.75	1.83		2.19	2.15	1.92		10.13	10.26	0.91					
	S13	6.12	3.14	3.17	1.82		14.38	14.11	1.16		3.32	3.39	1.86		2.70	2.65	1.87		13.58	13.75	0.82					
	S14	6.83	8.33	8.40	0.81		7.82	7.67	1.32		8.18	8.36	1.42		6.66	6.53	1.41		30.76	31.14	0.73					
	S15	5.86	8.44	8.51	0.80		8.75	8.58	1.30		8.53	8.72	1.42		6.94	6.81	1.35		30.63	31.02	0.75					
配方颗粒	S16	3.27	3.77	3.81	1.57		7.60	7.46	1.30		3.63	3.71	1.95		3.87	3.80	1.77		16.13	16.33	0.79					
	S17	3.26	3.69	3.72	1.55		7.59	7.45	1.30		3.55	3.63	1.85		3.88	3.81	1.77		16.55	16.76	0.80					
	S18	3.22	3.73	3.76	1.53		7.53	7.39	1.31		3.60	3.67	1.87		3.89	3.81	1.86		16.13	16.33	0.79					
	S19	3.63	4.83	4.88	1.28		6.90	6.98	1.03		5.25	5.32	1.08		4.59	4.63	0.88		16.21	16.28	0.42					
	S20	3.65	4.66	4.71	1.32		6.88	6.94	0.94		5.19	5.27	1.27		4.75	4.81	0.83		16.44	16.53	0.46					
	S21	3.67	3.96	4.00	1.49		6.67	6.80	1.38		5.12	5.21	1.33		4.67	4.75	0.93		16.37	16.45	0.44					
	S22	3.74	5.07	5.09	0.58		6.93	6.91	0.81		5.43	5.48	1.32		4.83	4.78	0.79		16.41	15.98	1.57					
	S23	4.53	4.47	4.53	1.31		12.82	13.04	1.07		4.86	4.92	1.33		8.90	8.59	1.95		17.51	17.47	0.34					
	S24	4.80	4.31	4.36	1.28		12.24	12.31	0.55		4.54	4.62	1.35		9.13	8.81	1.96		17.71	17.63	0.41					
	S25	4.76	4.10	4.15	1.21		12.19	12.26	0.56		4.69	4.76	1.22		8.07	7.78	1.92		17.61	17.57	0.34					

但转移率较稳定，分析可知是由于相应饮片中指标成分含量差异大。根据《技术要求》，配方颗粒药效物质应与标准汤剂保持一致，需根据标准汤剂的含量及含量转移率范围制定合理含量上下限度。

配方颗粒在制备过程中加入了一定量的辅料，按制成量换算 15 批标准汤剂中 6 种成分的含量，新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷在配方颗粒中理论质量分数分别为 1.57~5.14、4.20~19.81、2.04~6.28、1.46~5.49、1.14~4.84、9.31~32.10 mg/g，平均值为 3.34、9.53、3.85、3.42、2.90、16.74 mg/g，分别计算 $\bar{x} \pm s$ 、 $\bar{x} \pm 2s$ 、 $\bar{x} \pm 3s$ 、平均值的 70%~130% 范围，为更好的控制配方颗粒的质量，取指标成分含量下限为平均值的 70%，含量上限为 $\bar{x} + 3s$ ，将该范围作为配方颗粒

可接受的含量限度范围，即新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷质量分数限度范围分别为 2.34~7.09、6.67~22.47、2.70~6.97、2.40~7.24、2.03~6.13、11.72~31.93 mg/g。经测定（表 6），S16~S22 批配方颗粒 6 种指标成分的含量符合所制定配方颗粒含量限度要求，S23~S25 批配方颗粒当药苷含量略高于限度范围，其余指标成分含量符合所制定配方颗粒含量限度要求。S23~S25 批配方颗粒均购自山东一方制药有限公司，推测其生产工艺参数或生产设备可能与其他厂家存在差异导致当药苷含量略高于限度要求。

指标成分从饮片到 3 批配方颗粒（S16~S18）的转移率分别为 46.16%~47.20%、41.87%~42.26%、39.64%~40.17%、58.20%~59.42%、31.14%~31.26%、

表8 忍冬藤配方颗粒的出膏率、指标成分含量及转移率

Table 8 Extraction rate, index ingredients content and transfer rate of LJC dispensing granules

编号	对应药材编号	配方颗粒出膏率/%	质量分数/(mg·g ⁻¹)						转移率/%					
			新绿原酸	马钱苷酸	绿原酸	隐绿原酸	当药苷	马钱苷	新绿原酸	马钱苷酸	绿原酸	隐绿原酸	当药苷	马钱苷
			S16	YC3	14.8	3.81	7.46	3.27	3.71	3.80	16.33	47.20	42.26	40.17
S17		14.7	3.72	7.45	3.26	3.63	3.81	16.76	46.16	42.22	40.05	58.20	31.20	86.26
S18		14.4	3.76	7.39	3.22	3.67	3.81	16.33	46.67	41.87	39.64	58.84	31.26	84.08

84.06%~86.26%，基本符合 15 批标准汤剂转移率平均值±30%范围。以上数据说明配方颗粒制备工艺较为合理。

3 讨论

3.1 标准汤剂的制备

标准汤剂是指以传统中医药理论作为指导，选取主产区药材或道地药材，经加工炮制而成合格饮片后，按照临床应用时传统汤剂的煎煮方法，参照现代中药提取方法制备而成的单味中药饮片水煎剂。本研究购买 15 批次代表性药材炮制成饮片制备标准汤剂。忍冬藤属于清热解毒类中药，药用部位为藤木。《技术要求》标准汤剂制备中规定，清热类药物不宜久煎，煮沸后再煎煮 20 min 为宜，质地较硬的饮片可适当延长煎煮时间。结合现代临床用药习惯，在《医疗机构中药煎药室管理规范》相关规定的基礎上，出膏率和新绿原酸等 6 种指标成分的转移率为主要指标对标准汤剂制备的工艺参数进行优化对标准汤剂制备工艺参数进行考察，确定标准汤剂制备工艺。按照固化的工艺对饮片进行提取，对提取液进行浓缩、冻干，制备成标准汤剂，标准汤剂制备工艺合理，可用于配方颗粒工艺合理性判断及质量标准制定。

3.2 指标性成分的选择

忍冬藤的化学成分较为丰富，其中的主要活性成分为环烯醚萜苷类和有机酸类。对忍冬藤配方颗粒进行成分分析，新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷在忍冬藤中含量较大，生物活性较高^[13-21]，绿原酸和马钱苷也是《中国药典》忍冬藤药材及饮片质量控制所采用的指标成分。因此，将此 6 种成分作为忍冬藤配方颗粒质量评价的指标。

建立一测多评法检测 6 种成分含量的方法，其中，绿原酸化学性质稳定且廉价易得，作为内标物，建立其与新绿原酸、马钱苷酸、隐绿原酸、当药苷、

马钱苷的 f_{is} ，在不同液相色谱系统与色谱柱中 RSD 均小于 5%，符合测定要求。故选择绿原酸为内标物，以降低检测成本。此方法的建立为全面考察忍冬藤质量提供了参考方法，提示在缺少对照品的情况下，通过 f_{is} 及色谱峰的定位计算含量，可以实现忍冬藤中 6 种成分的质量控制。该方法作为忍冬藤质量的一种有效评价方式，可为忍冬藤的质量评价提供参考和依据。

3.3 配方颗粒质量评价标准的建立及与标准汤剂对比分析

本研究收集了 4 个产地的 15 批忍冬藤药材，根据《技术要求》制备标准汤剂，采用高效液相色谱法建立了忍冬藤标准汤剂和配方颗粒的指纹图谱，建立忍冬藤标准汤剂和配方颗粒中新绿原酸、马钱苷酸、绿原酸、隐绿原酸、当药苷、马钱苷的含量测定方法。以出膏率、指纹图谱、6 种指标成分含量及转移率为指标，并结合化学模式识别分析，多维度衡量了忍冬藤配方颗粒与标准汤剂的一致性，为忍冬藤配方颗粒的生产工艺的研究提供依据。

配方颗粒出膏率在标准汤剂出膏率平均值±30%范围内；3 批配方颗粒与其对应标准汤剂的指纹图谱相似度均>0.95，10 批配方颗粒的指纹图谱相似度>0.9；聚类分析显示 3 批配方颗粒可与其对应标准汤剂聚成一类，10 批配方颗粒可与 14 批标准汤剂聚为一类；PCA 与 PLS-DA 显示 3 批配方颗粒对其应标准汤剂 S3 分布集中，10 批配方颗粒分布较为集中；除 S23~S25 批配方颗粒当药苷含量略高，指标成分的含量在标准汤剂按制成量换算后含量平均值的 70%~ $\bar{x} + 3s$ 范围内；6 种指标成分从饮片到配方颗粒中的转移率基本符合从饮片到标准汤剂转移率平均值的 70%~130%；以上结果说明忍冬藤配方颗粒制备工艺合理，与忍冬藤饮片临床汤剂物质基础基本一致。以上研究能够比较全面的反映忍冬藤配方颗粒的内在质量，可忍冬藤配方颗

粒在临床中的应用提供研究基础, 并为其他配方颗粒研究提供思路。

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: 201-202.
- [2] 严宝飞, 段金彪, 张景正, 等. 忍冬藤提取物诱导骨肉瘤细胞凋亡的作用及机制研究 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 3923-3932.
- [3] 王玲娜, 孙希芳, 张芳, 等. 不同发育时期金银花颜色与活性成分的相关性分析 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3182-3188.
- [4] 陈玲, 张海艳, 李晓, 等. 忍冬的化学成分研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(1): 108-114.
- [5] 赵媛媛, 杨倩茹, 郝江波, 等. 金银花与忍冬藤及叶药理作用差异的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(13): 2422-2427.
- [6] Tang Y L, Yin L, Zhang Y D, *et al.* Study on anti-inflammatory efficacy and correlative ingredients with pharmacodynamics detected in acute inflammation rat model serum from *Caulis Lonicerae Japonicae* [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(6): 597-610.
- [7] Su X R, Zhu Z H, Zhang L, *et al.* Anti-inflammatory property and functional substances of *Lonicerae Japonicae Caulis* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113502.
- [8] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于发布《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》的通告 (2021 年第 16 号) [EB/OL]. (2021-02-10) [2023-06-06]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-02/11/content_5586817.html.
- [9] 胥爱丽, 李素梅, 李养学, 等. 忍冬藤配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 江西中医药, 2012, 43(3): 64-66.
- [10] 李志娇, 巩长芹, 李学红, 等. HPLC 法同时测定忍冬藤配方颗粒中的 3 种成分 [J]. 质量与安全检验检测, 2022, 32(3): 46-48.
- [11] 余德发, 于肖辉. 忍冬藤配方颗粒的制备工艺研究 [J]. 实用中西医结合临床, 2018, 18(12): 176-178.
- [12] 范帅帅, 田伟, 王相, 等. 忍冬藤饮片标准煎液质量评价研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(3): 82-87.
- [13] Yu M H, Hung T W, Wang C C, *et al.* Neochlorogenic acid attenuates hepatic lipid accumulation and inflammation via regulating miR-34a *in vitro* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 13163.
- [14] Lu H J, Tian Z M, Cui Y Y, *et al.* Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2020, 19(6): 3130-3158.
- [15] Ma X P, Okyere S K, Hu L W, *et al.* Anti-inflammatory activity and mechanism of cryptochlorogenic acid from *Ageratina adenophora* [J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 439.
- [16] Ma L Q, Yu Y, Chen H, *et al.* Sweroside alleviated aconitine-induced cardiac toxicity in H9c2 cardiomyoblast cell line [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1138.
- [17] Li J, Zhao C T, Zhu Q, *et al.* Sweroside protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and pyroptosis partially via modulation of the Keap1/Nrf2 axis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 650368.
- [18] 葛飞敏, 杨柳, 陈枢青. 马钱苷元对人胰腺癌细胞 BXPC3 的抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(19): 2323-2327.
- [19] 周永静, 王肖辉, 李如意, 等. 马钱苷对裸鼠体内结肠癌的抑制作用及其机制研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2022, 45(2): 75-80.
- [20] Choi N, Yang G, Jang J H, *et al.* Loganin alleviates gout inflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation and mitochondrial damage [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1071.
- [21] Rajabi M, Mohaddes G, Farajdokht F, *et al.* Impact of loganin on proinflammatory cytokines and depression- and anxiety-like behaviors in male diabetic rats [J]. *Physiol Int*, 2018, 105(3): 199.

[责任编辑 郑礼胜]