

南药牛大力标准汤剂质量差异性分析

申亚君, 高 晗, 姜国志, 李军山*

神威药业集团有限公司, 河北 石家庄

收稿日期: 2023年3月31日; 录用日期: 2023年4月17日; 发布日期: 2023年5月26日

摘 要

目的: 建立牛大力标准汤剂质量评价方法, 比较不同产地牛大力标准汤剂的差异性。方法: 制备12批不同产地牛大力标准汤剂, 测定出膏率, 建立牛大力标准汤剂HPLC指纹图谱及对指标性成分刺桐碱含量测定, 并结合化学计量学方法对12批牛大力标准汤剂差异性进行分析。结果: 建立了牛大力标准汤剂指纹图谱, 确定了5个共有峰, 指认了一个共有峰。主成分分析(PCA)将样品分为4类, 正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)找出了两个差异性化合物, 分别为峰3、峰5(刺桐碱)。不同产地刺桐碱含量测定平均值分别为: 3.175 mg/g、11.572 mg/g、1.586 mg/g、3.873 mg/g。本文所建立的牛大力标准汤剂质量评价方法科学有效, 可用于牛大力的质量控制和评价。

关键词

牛大力, 标准汤剂, 刺桐碱

Quality Difference Analysis of Standard Decoction of *Millettia speciosa* Champ

Yajun Shen, Han Gao, Guozhi Jiang, Junshan Li*

Shineway Pharmaceutical Group Ltd, Shijiazhuang Hebei

Received: Mar. 31st, 2023; accepted: Apr. 17th, 2023; published: May 26th, 2023

Abstract

Objective: To establish an analysis method of the quality evaluation method and investigate the quality differences of *Millettia speciosa* Champ (MSC) standard decoctions from different habitats. **Methods:** Twelve batches of MSC standard decoction were prepared. The extract rates, the yield of Hypaphorine were determined. Chromatographic fingerprints of MSC standard decoctions were

*通讯作者。

generated from HPLC and the quality differences were analyzed using the method of chemometrics and statistics. Conclusion: The fingerprints of the MSC standard decoctions were established a total of 5 common peaks were determined respectively, and one peak was identified. MSC standard decoctions sample was divided-into four groups by PCA, then two marker compounds were selected and identified by OPLS-DA, including peaks-3, peaks-5 (Hypaphorine). The average content of Hypaphorine from different habitats was 3.175 mg/g, 11.572 mg/g, 1.586 mg/g, 3.873 mg/g. A scientific and effective evaluation method of MSC standard decoction was established, which also provided a reference for the identification and quality control of MSC.

Keywords

Millettia speciosa Champ, Standard Decoction, Hypaphorine

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

牛大力为豆科植物美丽崖豆藤 *Millettia speciosa* Champ. 的干燥块根[1]。首载于 1711 年何克谦《生草药性备要》，具有补虚润肺，强筋活络等功效，是著名的药食两用中药[2] [3] [4]。

牛大力标准汤剂是以牛大力饮片为原料，依据传统中药煎煮方法制备而成，是衡量单味中药配方颗粒与单味中药饮片临床汤剂是否一致的重要物质基准[5] [6]。

侯倩煜等人测定了牛大力中 4 个黄酮类成分的含量[7]，戴蒙等人探究了牛大力膨大根和非膨大根的生药学差异研究[8]，苏志恒等人建立了牛大力的 HPLC 指纹图谱[9]。目前牛大力市售药材饮片规格繁多且常发现混淆品，现存质量标准过于简单无法有效控制牛大力质量。因此本研究通过收集不同产地牛大力药材并制备牛大力标准汤剂，建立牛大力标准汤剂 HPLC 指纹图谱并结合化学计量学分析及指标性成分含量测定，为牛大力配方颗粒质量控制提供参考。

2. 仪器与材料

2.1. 仪器

岛津 LC-2030 高效液相色谱仪(日本岛津公司); CPA225D 电子分析天平(德国赛多利斯股份公司); DHG-9140A 热风循环鼓风干燥箱; KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2.2. 材料

刺桐碱(批号 AFBH0904, 成都埃法生物科技有限公司), 乙腈为色谱级(批号 20221010, 天津科密欧化学试剂有限公司), 磷酸二氢钾(分析纯, 批号 20201208, 天津科密欧化学试剂有限公司)。12 批牛大力饮片分别采购于 3 个不同产地采收加工。

3. 方法与结果

3.1. 牛大力标准汤剂的制备

依据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》指导原则中标准汤剂的制备方法，分别取 12 批

牛大力饮片, 各称取 100 g 至煎药壶中, 加水煎煮两次, 第一煎加饮片量 9 倍量水, 浸泡 30 min, 煮沸后保持微沸煎煮 30 min, 第二煎加饮片量 7 倍量水, 煮沸后保持微沸煎煮 20 min, 合并滤液过 200 目筛网, 测定出膏率, 减压浓缩至适量, 冷冻干燥, 即得牛大力标准汤剂冻干粉, 编号为 NDLBT1-NDLBT12。

3.2. 出膏率测定

理论出膏率以标准汤剂冻干粉量计, 按公式出膏率 = 标准汤剂冻干粉质量/饮片投料量[10]。12 批牛大力标准汤剂出膏率计算结果见表 1。结果表明, 12 批牛大力标准汤剂出膏率范围在 9.6%~14.5%, 均值为 12.5%, 不同产地不同质地牛大力出膏率存在差异。

Table 1. Ointment rate of MSC

表 1. 牛大力标准汤剂出膏率

编号	出膏率/%	编号	出膏率/%	编号	出膏率/%
NDLBT1	14.2	NDLBT5	11.6	NDLBT9	12.4
NDLBT2	14.4	NDLBT6	11.3	NDLBT10	13.0
NDLBT3	14.2	NDLBT7	11.6	NDLBT11	9.8
NDLBT4	14.5	NDLBT8	12.9	NDLBT12	9.6

3.3. 四种牛大力标准汤剂指纹图谱研究

3.3.1. 色谱条件

Agilent 5 TC-C18 (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.04 mol/L 磷酸二氢钾溶液(12:88)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 224 nm, 柱温 25℃, 进样量 10 μL。

3.3.2. 色谱条件

取刺桐碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 ml 含 20 μg 的溶液, 即得。

3.3.3. 供试品溶液的制备

精密称取 12 批牛大力标准汤剂冻干粉 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30%乙醇溶液 25 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 30%乙醇补足减失的重量, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

3.3.4. 方法学考察

1) 精密度考察

取 NDLBT1 样品, 按“3.3.3”项下方法制备供试品溶液, 依据“3.3.1”项下色谱方法重复进样 6 次, 以 5 号峰(刺桐碱)为参照峰, 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.12%, 相对峰面积 RSD 值均小于 0.89%, 表明仪器的精密度良好。

2) 稳定性考察

取 NDLBT1 样品, 按“3.3.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后的 0、4、8、12、18、24 h, 按“3.3.1”项下色谱条件测定, 以 5 号峰(刺桐碱)为参照峰, 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.76%, 相对峰面积 RSD 值均小于 2.2%, 表明供试品溶液在制备后 24 h 内稳定。

3) 重复性考察

取 NDLBT1 样品, 按“3.3.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“3.3.1”项下色谱条件测定, 以 5 号峰(刺桐碱)为参照峰, 计算各共有峰与参照峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.53%, 相对峰面

积 RSD 值均小于 1.7%，表明该方法的重复性良好。

3.4. 指纹图谱的建立

分别取 12 批牛大力标准汤剂冻干粉适量，按“3.3.3”项下方法制备供试品溶液，按“3.3.1”项下色谱条件依次进样测定，记录色谱图信息。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 版)进行评价，设置 NDLBT1 号样品色谱图为参照图谱，采用平均数法，进行多点校正和色谱峰匹配，经全谱峰匹配后得到牛大力标准汤剂指纹图谱(图 1)，共标示出 5 个共有峰，通过对照品比对，指认了峰 5 为刺桐碱。

12 批牛大力标准汤剂(NDLBT1-NDLBT12)相似度计算结果为 0.945、0.967、0.972、0.971、0.940、0.942、0.947、0.893、0.897、0.891、0.966、0.962，结果显示有 9 批标汤相似度大于 0.90，3 批标汤相似度大于 0.8，表明牛大力标准汤剂整体相似性较好。

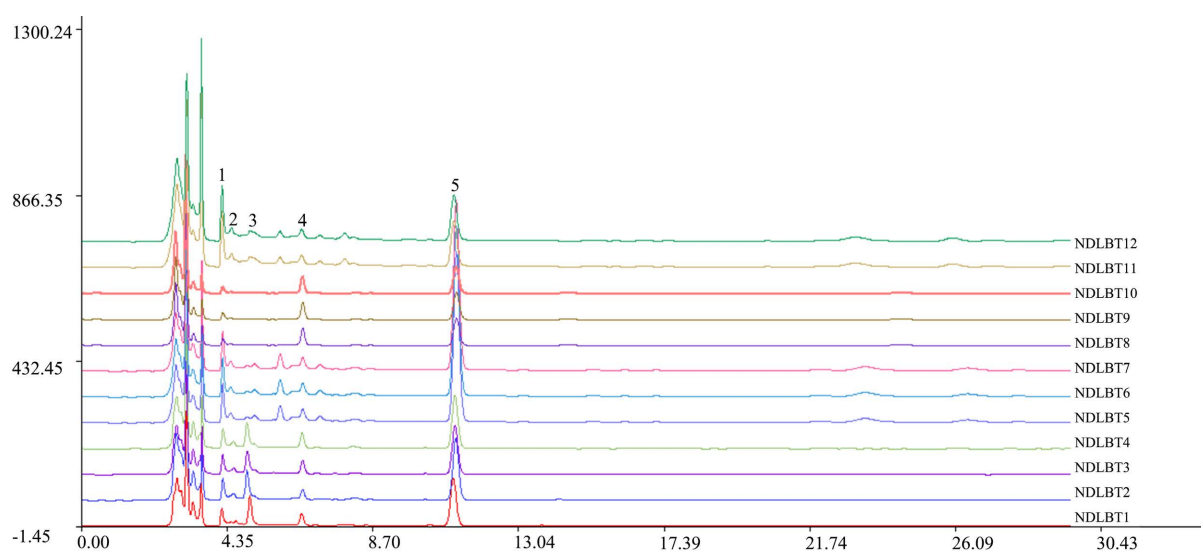


Figure 1. HPLC fingerprint chromatogram of MSC
图 1. 牛大力 HPLC 指纹图谱

3.5. 基于指纹图谱的牛大力标准汤剂差异性分析

3.5.1. PCA

以 12 批牛大力标准汤剂样品中 5 个共有峰的峰面积为变量，借助 SIMICA-P 13.0 软件对 12 批样品采用无监督模式法 PCA 进行分析，前两个主成分的贡献率 80.0%，即可以用 2 个潜在综合指标为解释 80.0%的总方差。12 批牛大力标准汤剂样品被分为 4 组(见图 2)，结果表明不同产地牛大力标准汤剂质量存在一定差异。

3.5.2. OPLS-DA

为进一步提出影响牛大力标准汤剂差异的潜在化学变量，在 PCA 聚类结果基础上，本研究继续建立有监督模式识别分析法的正交偏最小二乘法(OPLS-DA)模型对 12 批样品进行分析。样本得分矩阵见图 3(A)，与 PCA 分析结果一致，样品被分为 4 类，模型对自变量拟合指数 $R^2X=0.997$ ，对因变量拟合指数 $R^2Y=0.970$ ，模型预测指数 $Q^2=0.951$ ，说明该模型有较好的解释能力和预测能力，可用于区分牛大力标准汤剂。

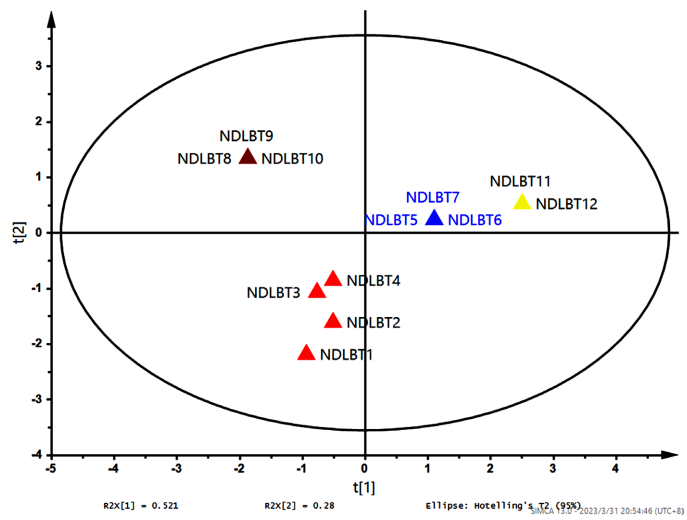
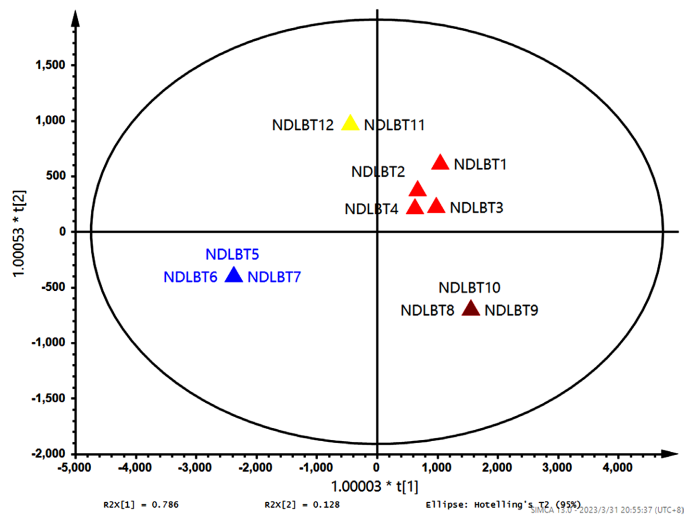
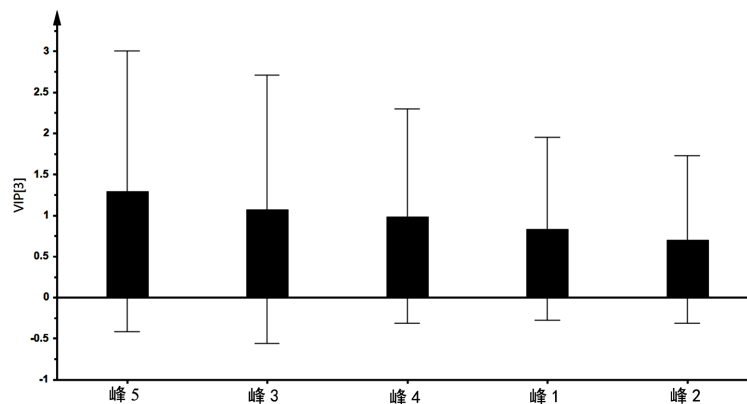


Figure 2. PCA score plot
图 2. PCA 得分图



(A)



(B)

Figure 3. OPLS-DA score plot (A) and VIP (B)
图 3. OPLS-DA 得分图(A)和 VIP 值(B)

3.6. 牛大力标准汤剂含量测定

3.6.1. 方法学考察

1) 精密度考察

取“3.4.2”项下对照品溶液，按“3.4.1”项下色谱方法重复进样6次，计算刺桐碱峰面积RSD值 < 3.0%，表明仪器的精密度良好。

2) 稳定性考察

取NDLBT1样品，按“3.4.3”项下方法制备供试品溶液，分别于制备后的0、4、8、12、18、24 h，按“3.4.1”项下色谱条件测定，计算刺桐碱峰面积RSD值 < 3.0%，表明供试品溶液在制备后24 h内稳定。

3) 重复性考察

取NDLBT1样品，按“3.3.3”项下方法平行制备6份供试品溶液，按“3.3.1”项下色谱条件测定，以5号峰(刺桐碱)为参照峰，计算各共有峰与参照峰的相对保留时间的RSD值均小于0.53%，相对峰面积RSD值均小于1.7%，表明该方法的重复性良好。

4) 加样回收率

精密称定NDLBT1样品0.1 g，平行制备6份，分别加入对照品溶液适量，按“3.4.1”项下色谱条件测定，计算刺桐碱的加样回收率为99.2%，RSD为2.3%，表明方法准确度良好。

3.6.2. 牛大力标准汤剂中刺桐碱含量测定

分别取12批标准汤剂冻干粉，按“3.4.3”项下方法制备供试品溶液，按“3.4.1”项下色谱条件测定并计算刺桐碱的含量，结果见表2。

Table 2. Content of index components in standard decoction of MSC

表 2. 牛大力标准汤剂中指标性成分含量测定

编号	标准汤剂含量(mg/g)
NDLBT1	2.853
NDLBT2	3.655
NDLBT3	2.886
NDLBT4	3.308
NDLBT5	11.810
NDLBT6	11.544
NDLBT7	11.362
NDLBT8	1.621
NDLBT9	1.501
NDLBT10	1.636
NDLBT11	3.921
NDLBT12	3.825

3.6.3. 牛大力标准汤剂中刺桐碱含量测定差异性分析

12批牛大力标准汤剂中的刺桐碱的含量范围为1.501~11.810 mg/g，牛大力四种分类玉林粉质(NDLBT1-4)、王林木质(NDLBT5-7)、广西粉质(NDLBT8-10)、防港城木质(NDLBT11-11)平均含量分别为3.175 mg、11.572 mg/g、1.586 mg/g、3.873 mg/g，结果显示不同产地不同质地间牛大力刺桐碱含量差异较大(见图4)。

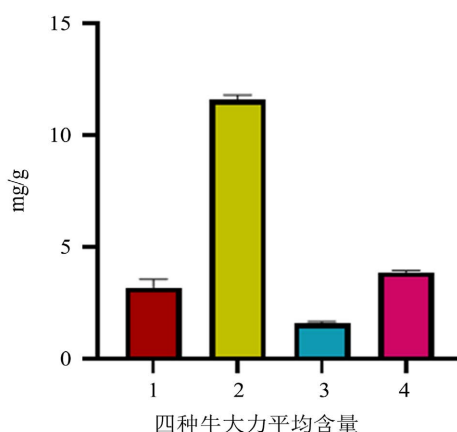


Figure 4. Content of index components in standard decoction of MSC (1. yulin-starchy; 2. yulin-wood-fibrous; 3. guangxi-starchy; 4. fanggangcheng-wood-fibrous)

图 4. 牛大力标准汤剂中指标性成分含量测定(1. 玉林粉质; 2. 玉林木质; 3. 广西粉质; 4. 防城城木质)

4. 讨论和结论

中药标准汤剂，是以中医药理论基础为指导，参考现代提取方法，经标准化工艺制备而成的单味中药饮片水煎剂。“标准汤剂”理念的引入是中药配方颗粒守正创新和提升质量的重要举措。

本研究基于牛大力标准汤剂的出膏率、HPLC 指纹图谱和成分含量测定等方面入手，全面对不同产地不同质地的牛大力质量进行分析，结合化学计量学分析方法对牛大力标准汤剂分成 4 类，结果显示木质牛大力刺桐碱含量远高于粉质牛大力。部分生物碱既是中药的有效成分也是毒性成分[11]，在临床用药中使用不同质地的牛大力饮片，可能会引起有效活性成分的实际剂量不当，从而引起临床不良用药反应。因此确立牛大力质量标准，建立了科学和实用的标准汤剂的质量评价方法，为临床使用牛大力饮片及牛大力配方颗粒质量控制提供参考。

基金项目

云南省重大科技专项计划(202102AA310027); 石家庄市中药配方颗粒产业技术研究院(228790779A); 云南省配方颗粒重点实验室(202105AG070014)。

参考文献

- [1] 河北省食品药品监督管理局. 河北省中药饮片炮制规范(2003年版) [M]. 河北: 学苑出版社, 2004: 26.
- [2] 何克谦. 生草药性备要[M]. 广州: 广东科技出版社, 1717: 26-58.
- [3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第一册) [M]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 40-41.
- [4] 韦玉燕, 巫繁菁, 曾海生, 等. 牛大力研究概况[J]. 广西科学院学报, 2010, 26(3): 380-382.
- [5] 孙福仁, 张睿智, 李菲, 等. 柴胡标准汤剂两种成分测定方法研究[J]. 中医药导报, 2020, 26(12): 24-27.
- [6] 陈士林. 标准汤剂——提升中药配方颗粒质量的重要桥梁[N]. 中医药导报, 2021-03-09(003).
- [7] 侯倩煜, 贾愉波, 王德立, 等. 固相萃取超高效液相色谱测定牛大力中 4 个黄酮的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(11): 1909-1916.
- [8] 戴蒙, 潘超美, 彭泽通, 等. 牛大力两种根的生药学研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 100-102.
- [9] 苏志恒, 郑华, 宋慧, 等. 牛大力 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 现代食品, 2020(17): 205-209.
- [10] 宋驰, 葛威, 邹佳莉, 等. 北柴胡及醋北柴胡标准汤剂质量差异性分析[J]. 中草药, 2022, 53(8): 2331-2340.
- [11] 胡增美, 黄露, 侯佳华, 等. 中药中生物碱类化学成分的毒性作用研究进展[J]. 中南药学, 2022, 20(3): 633-641.