

逍遥丸的毛细管电泳指纹图谱的建立

孙国祥*, 丁国瑜

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 采用毛细管区带电泳法建立了逍遥丸(Xiaoyao Pill, XYP)的毛细管电泳指纹图谱(CEFP)。运用正方形优化法,以色谱指纹图谱分离量指数(RF)为优化的目标函数,对建立指纹图谱的实验条件进行了优化,确定了最佳背景电解质(BGE)溶液(50 mmol/L硼砂-50 mmol/L磷酸氢二钠-450 mmol/L磷酸二氢钠-50 mmol/L碳酸氢钠(1:1:1:5, v/v/v/v; pH 7.40)、紫外检测波长228 nm、运行电压12 kV、重力进样25 s(高度14 cm)的分离检测条件。采用未涂层石英毛细管(70 cm×75 μm,有效分离长度57 cm)分离,以咖啡酸色谱峰为参照,确定13批逍遥丸样品的21个共有指纹峰。通过聚类分析确定用其中10批样品生成对照CEFP,以此为标准用系统指纹定量法鉴别13批逍遥丸的质量。结果显示:S3号样品的化学成分数量和分布比例不合格,S10和S12号样品含量明显偏高,其余批次质量均合格。所建立的正方形优化法操作简便,适用于中药的毛细管区带电泳BGE的选择;所建立的逍遥丸CEFP具有较好的精密度和重现性,可以为逍遥丸的质量控制提供新的参考。

关键词: 毛细管电泳指纹图谱;正方形优化法;系统指纹定量法;色谱指纹图谱分离量指数;逍遥丸

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2011)10-1020-07

Establishment of capillary electrophoresis fingerprints of Xiaoyao Pills

SUN Guoxiang*, DING Guoyu

(College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: The capillary electrophoresis fingerprint (CEFP) of Xiaoyao Pills (XYP) was established by capillary zone electrophoresis (CZE). The quadrilateral method was developed for the optimization of the background electrolyte (BGE), and the running voltage, the compositions and pH of BGE, and so on, were evaluated by the chromatographic fingerprint resolution index (RF). An uncoated fused silica capillary column (70 cm×75 μm, the effective length of 57 cm) was employed; 50 mmol/L sodium borate-50 mmol/L Na₂HPO₄-450 mmol/L NaH₂PO₄-50 mmol/L NaHCO₃ (1:1:1:5, v/v/v/v, adjusted to pH 7.40) was used as the ideal BGE. The detection wavelength was set at 228 nm, and a voltage of 12 kV and hydrodynamic pressure injection in 25 s at the height of 14 cm were applied. The CEFPs from 13 batches of XYPs containing 21 common peaks were obtained with good precision and reproducibility, in which caffeic acid was selected as the reference peak. Cluster analysis indicated that 10 out of 13 batches of XYP samples can be deemed as the reference CEFP (RCEFP). The whole 13 batches of XYP were evaluated by the systematic quantified fingerprint method (SQFM) with the RCEFP as the qualified model. The results indicated that the contents of S10 and S12 were obviously higher, the chemical constituents quantity and distributed proportion of S3 were not qualified, while the others were completely qualified. It is concluded that the method can be applied to the optimization of BGE in CZE in traditional Chinese medicine separation; and the established CEFPs of XYP can be served as a novel reference to identify and control the quality of XYP.

Key words: capillary electrophoresis fingerprint (CEFP); quadrilateral optimization method; systematic

* 通讯联系人:孙国祥,博士,教授,博士生导师,研究方向为中药指纹学体系及其信息学研究。Tel: (024) 23986286, E-mail: gxswmwws@163.com.

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划课题(90612002)。

收稿日期:2011-05-03

quantified fingerprint method (SQFM); chromatographic fingerprint resolution index (RF); Xiaoyao Pills (XYP)

逍遥丸(XYP) 每丸含柴胡 0.054 g、当归 0.054 g、白芍 0.054 g、白术(炒) 0.054 g、茯苓 0.054 g、炙甘草 0.043 g、薄荷 0.011 g 和生姜 0.054 g, 共 8 味组方药。功能为疏肝健脾、养血调经。用于中医治疗肝郁脾虚所致的郁闷不舒、胸胁胀痛、头晕目眩、食欲减退、月经不调^[1] 等病症。文献中有对逍遥丸中芍药苷^[1]、阿魏酸^[2] 含量的测定方法, 也有采用气相色谱(GC) 测定其中挥发性成分和指纹图谱的研究^[3], 但尚未见有关其毛细管电泳指纹图谱(CEFP) 的报道。中药作用的特点是通过多成分、多靶点及多途径来调节人体机能。目前, 虽然逍遥丸的具体作用机理尚不明确, 但单一成分的含量测定显然很难完全反映中药所体现的整体疗效的物质基础。指纹图谱能够较为宏观、综合地反映中药的内在质量, 这种观点已被国内外研究者所认可^[4,5], 近年来对中药的 CEFP 研究也有了很大进展, 其具有分析速度快、进样量少、分离效率高、试剂消耗少及抗污染能力强等特点, 可以弥补高效液相色谱(HPLC) 分析中药成分时存在的缺陷, 具有很多潜在的优势^[6], 非常适合中药复杂体系的分离分析。因此, 本文利用毛细管区带电泳法(CZE) 对 13 批逍遥丸进行指纹图谱的研究, 从整体化学角度进行综合定性定量分析, 从而鉴别 XYP 的质量。目前, 有关毛细管电泳实验条件优化选择方法主要有粒子群优化算法^[7]、响应曲面法^[8]、三角形和四面体法优化背景电解质(BGE) 等方法^[9]。正方形优化法方法操作简单、快速, 较三角形和四面体法更适于 BGE 的优化选择, 因此, 本文采用正方形法优化选择最佳的 BGE, 取得了较好的分离效果; 在此基础上, 建立了 XYP-CEFP 的测定方法, 并采用系统指纹定量方法评价了批间的质量差异, 为 XYP 的质量控制提供了新的参考。

1 正方形优化法的基本原理

正方形优化法是通过考察不同组成的 BGE 对难分离组分的分离效果, 来优化电泳分离条件。基本步骤是先选择一正方形 ABCD(见图 1), 以 4 种不同组成的 BGE (A: 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; B: 50 mmol/L Na_2HPO_4 ; C: 150 mmol/L NaH_2PO_4 ; D: 50

mmol/L NaHCO_3) 作为正方形的 4 个顶点。首先选择图 1 中①~④点的 BGE 条件分别进行电泳分离实验, 根据分离效果, 确定样品组分适合在哪种 BGE 中分离。若①点 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 作为 BGE 时分离较好, 说明 XYP 组分适合在碱性条件下分离, 条件选择时 BGE 应偏向于向高 pH 变化, 可用 0.1 mmol/L NaOH 溶液调节 pH 值或添加有机改性剂, 还可以调整 BGE 浓度至最佳, 使难分离物质对得到充分的分离。若②点的 50 mmol/L Na_2HPO_4 作为 BGE 时分离较好, 除了进行上述同法实验外, 还可以考虑采用⑥和⑦点的 BGE 进行实验。如果③点的 150 mmol/L NaH_2PO_4 作为 BGE 时分离效果较好, 除了进行同法实验外, 还可考虑采用⑦和⑧点的 BGE 进行实验。若④点的 50 mmol/L NaHCO_3 作为 BGE 时分离较好, 说明 XYP 组分适合在弱碱性条件下分离, 条件选择时应向该 pH 范围变化。若组分分离情况在上述 4 顶点条件下区别不大或者分离情况不理想, 可在 ABCD、IJKL 等共 10 个正方形框架下分别进行优化, 以获得理想的 BGE; 采用⑤~⑯点的 BGE 进行实验, 并在分离效果好的区域进行进一步的实验。图 1 中 17 个点的 BGE(其组成、配比及各组成成分的浓度见表 1) 中可添加甲醇、乙腈、三乙胺、庚烷磺酸钠和 β -环糊精等有机溶剂来改善分离, 或用稀磷酸或氢氧化钠调节 pH, 以得到更为理想的分析结果。

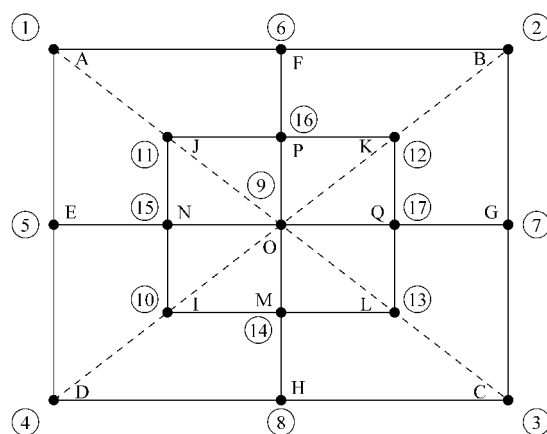


图 1 17 种 BGE 溶液在正方形优化法中的分布图

Fig. 1 Distribution of 17 BGEs in quadrilateral optimization method

For 17 BGEs, see Table 1.

表 1 正方形优化法中 17 点背景电解质溶液的组成、配比及浓度
Table 1 Compositions, proportions and concentrations of 17 BGEs in the quadrilateral method

BGE	Composition and proportion	Concentration/(mmol/L)			
		A	B	C	D
BGE 1	A	50	-	-	-
BGE 2	B	-	50	-	-
BGE 3	C	-	-	150	-
BGE 4	D	-	-	-	50
BGE 5	E = A-D (1:1, v/v)	25	-	-	25
BGE 6	F = A-B (1:1, v/v)	25	25	-	-
BGE 7	G = B-C (1:1, v/v)	-	25	75	-
BGE 8	H = C-D (1:1, v/v)	-	-	75	25
BGE 9	O = A-B-C-D (1:1:1:1, v/v/v/v)	12.5	12.5	37.5	12.5
BGE 10	I = D-O (1:1, v/v)	6.25	6.25	18.75	31.25
BGE 11	J = A-O (1:1, v/v)	31.25	6.25	18.75	6.25
BGE 12	K = B-O (1:1, v/v)	6.25	31.25	18.75	6.25
BGE 13	L = C-O (1:1, v/v)	6.25	6.25	93.75	6.25
BGE 14	M = D-C-O (1:1:1, v/v/v)	6.25	6.25	56.25	18.75
BGE 15	N = A-D-O (1:1:1, v/v/v)	18.75	6.25	18.75	18.75
BGE 16	P = A-B-O (1:1:1, v/v/v)	18.75	18.75	18.75	6.25
BGE 17	Q = B-C-O (1:1:1, v/v/v)	6.25	18.75	56.25	6.25

A. Na₂B₄O₇; B. Na₂HPO₄; C. NaH₂PO₄; D. NaHCO₃.

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

大连江申 HPCE-10 高效毛细管电泳仪,配有江申色谱工作站(大连江申分离科学技术公司);KS-120D 超声波清洗器(宁波科生仪器厂);RE-52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);Sartorius BS 110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);KDM 型控温电热套(山东鄄城华鲁仪器公司);微孔滤膜(0.45 μm,上海兴亚净化材料厂)。硼砂、氢氧化钠(沈阳正信高科技研究所试剂部),NaH₂PO₄、Na₂HPO₄(广东汕头市西陇化工厂),碳酸氢钠(天津市大茂化学试剂厂),以上试剂为分析纯试剂;磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);所用水为去离子水。

对照品咖啡酸(caffeic acid, CFA; 批号为 885-200001)和阿魏酸(ferulic acid, FA; 批号为 773-9910)均购自中国药品生物制品检定所;甘草酸(glycyrrhizic acid, GHIA; 批号为 731-9403)购自甘肃金汉伯药业有限责任公司;异甘草素(isoliquiritigenin, ILG; 批号为 080528)购自上海融禾医药科技有限公司,以上对照品的纯度均大于 98%。

13 批逍遥丸(生产厂家 批号): S1、S2、S6、S10(山东仙河药业有限公司, 090204、091001、091103、100505); S3、S8(河南省宛西制药股份有限公司, 090817、100509); S4、S7、S9、S11(马鞍山神鹿科瑞

药业有限公司, 20091129、20100534、20100708、20100630); S5(兰州大宝制药有限公司, 75100311); S12、S13(漳州片仔癀药业股份有限公司, 0905003、1003004)。以上 13 批逍遥丸均为非处方(OTC)市售品种,购自沈阳药店,其中除 S12、S13 为水丸外,其他均为浓缩丸。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取咖啡酸对照品 5.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制得 500 mg/L 对照品溶液。同法分别配制 500 mg/L 的阿魏酸、甘草酸及 450 mg/L 的异甘草素对照品溶液。

2.2.2 样品供试液的制备

取逍遥丸 16 丸(相当于原药材 6.0 g),精密称定后,加入甲醇 40 mL,加热回流提取 60 min,过滤;残渣中加水 40 mL 后继续回流提取 60 min,过滤,将滤液减压浓缩至约 10 mL,加入 95% (v/v) 的乙醇 40 mL,于 4 °C 下放置 24 h,同法过滤后,合并两次滤液,再减压浓缩至约 20 mL,然后用甲醇定容至 25 mL,摇匀,作为供试液。使用前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.3 毛细管电泳条件

未涂层石英毛细管(70 cm × 75 μm,有效长度 57 cm)(河北永年光导纤维厂);以 50 mmol/L 硼砂-50 mmol/L 磷酸氢二钠-150 mmol/L 磷酸二氢钠-50 mmol/L 碳酸氢钠(1:1:1:5, v/v/v/v; pH 7.40)为 BGE,运行电压 12 kV;电流约 0.035 mA;灵敏度 0.005 AUFS;紫外检测波长为 228 nm;重力进样 25 s(高度 14 cm)。每次实验开始前用 BGE 冲洗毛细管柱 5 min,再运行 5 min 后进样;每两次运行之间用 BGE 冲洗柱 5 min;每天实验结束后依次用 0.1 mol/L NaOH 和水冲洗毛细管柱各 15 min。

3 结果与讨论

3.1 电泳条件的优化

CZE 主要用于分离在水溶液中呈离子态或可离子化的化合物,其分离原理主要是基于化合物在质荷比或形状上存在的差异^[10]。本文分别考察了不同组成的 BGE、进样量、运行电压、pH 和检测波长 5 个因素对 XYP 组分分离的影响,用色谱指纹谱分离量指数(RF)为优化的目标函数对 XYP 实验条件进行优化选择。RF 代表指纹信号强度大小、分布均匀性、分离效率和峰间等距性等信息,以 RF 值越大越好^[11]。

3.1.1 最佳 BGE 的确定

按表 1 所示, 配制正方形上 17 个点的 BGE, 分别在毛细管电泳仪上进行分离实验, 记录色谱图。将谱图积分信号导入孙国祥等开发的“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0”软件^[12], 计算在各 BGE 条件下分离结果的 RF 。从表 2 可见 RF 值最大的体系是 BGE 10 (正方形中第 10 点) ($RF = 144.6$), 该点的优化空间较大, 因此本实验在 BGE 10 的组成和质量浓度不变的条件下, 通过进一步调节背景电解质配比的方法来改善分离。分别考察了上述组分体积比为 1:1:1:2.3、1:1:1:3.7、1:1:1:7、1:1:1:9 的 BGE 对 XYP 组分分离效果的影响。计算各种配比条件下分离谱图的 RF , 得到 RF 值最大时的体积比为 1:1:1:5 (见表 2), 因此认为体积比为 1:1:1:5 的 BGE 10 为最佳的 BGE。

表 2 不同条件(背景电解质、电压、检测波长、进样时间及不同体积比 BGE)下逍遥丸的 RF 值

Table 2 RF of XYP under different conditions (BGE, voltage, detection wavelength, injection time and volume ratio of BGE components)

Parameter		RF
BGE	BGE 1	61.2
	BGE 2	61.2
	BGE 3	7.5
	BGE 4	70.3
	BGE 5	27.7
	BGE 6	29.4
	BGE 7	60.9
	BGE 8	102.5
	BGE 9	85.0
	BGE 10	144.6
	BGE 11	60.3
	BGE 12	98.9
	BGE 13	62.5
	BGE 14	110.9
	BGE 15	61.2
	BGE 16	49.0
	BGE 17	69.6
Voltage/kV	11.0	117.7
	12.0	144.6
	12.2	96.6
	12.5	100.2
	13.0	137.3
Injection time at 14 cm height/s	15	106.6
	20	100.6
	25	144.6
Detection wavelength/nm	203	83.4
	228	144.6
	234	84.4
	246	83.4
Volume ratios of BGE compositions of A, B, C and D	1:1:1:2.3	106.6
	1:1:1:3.7	89.1
	1:1:1:5	144.6
	1:1:1:7	81.7
	1:1:1:9	107.9

3.1.2 检测波长的选择

根据 XYP 中主要成分的紫外吸收波长, 设定了本实验中考察的 4 个检测波长, 分别为 203、228、234 和 246 nm。结果发现: 在 203 nm 波长下末端吸收较强, 各电泳峰均较大, 但由于基线漂移严重且噪声较大, 使分离效果不理想; 在 228 nm 波长下检测时 RF 最大 ($RF = 144.6$) (见表 2), 而当检测波长大于 228 nm 时, 峰形变钝, 色谱峰较小, 因此选择检测波长为 228 nm。

3.1.3 运行电压的选择

运行电压的高低主要影响分离度、分离时间及柱效。本文分别考察了以 11.0、12.0、12.2、12.5 和 13.0 kV 为运行电压时对 XYP 组分分离效果的影响。由 CE 谱图可以看出, 运行电压低时的基线稳定, 分离度大, 分离时间较长; 当运行电压增加时, 分离时间缩短, 但基线漂移严重且分离效果不理想。这主要是因为加大毛细管柱两端的电压虽然可以缩短分离时间, 但电压增加会产生更多的焦耳热, 而其不易散发使缓冲溶液黏度降低, 使电渗流增大、迁移率增加、分离度下降、柱效降低。计算各个运行电压下的 RF , 分别为 117.7、144.6、96.6、100.2 和 137.3 (见表 2), 以 12.0 kV 运行电压下的 RF 值最大。因此确定 12.0 kV 的运行电压为最佳。

3.1.4 进样量的选择

加大进样量可提高信号响应值, 但进样量过大会导致峰展宽和分离效果下降。本文考察了重力 (高度为 14 cm) 下进样时间分别为 15、20 和 25 s 3 个进样量的分离效果, 结果发现, 以重力进样 25 s 时的 RF 较大 (见表 2)。结合实际的 CE 分离谱图, 最终确定重力进样时间为 25 s。

3.1.5 溶液 pH 的选择

BGE 的 pH 能直接影响组分的解离, 使质荷比发生变化, 从而影响组分的迁移时间和分离度。试验时用 0.1 mol/L NaOH 和磷酸调节 BGE 的 pH 分别为 6.60、7.40、7.60、7.80、8.00 和 9.20 进行试验, 结果表明, pH 为 6.60 时的谱峰数量变少且峰形较差; pH 大于 7.40 时的分离不理想。综合考虑选择 pH 7.40, 此恰为 BGE 10 的 pH。

3.2 XYP 正方形优化法的评价

由于中药组分的复杂性及与硼酸盐中硼原子容易配合的特殊性, 因此, 把①点 (50 mmol/L 硼砂水溶液) 作为试验的边界点, 在 BGE 条件优化时应首先考察该试验点的分离效果^[13]。本试验的结果显示, 样品在该条件下无色谱峰出现, 说明样品在该条件下含有的能够与硼原子形成配合物的离子组分较

少,故考虑加入 D 点(50 mmol/L 碳酸氢钠)来调整 BGE 的 pH,加强组分与硼原子形成配合物以达到组分间分离的目的。与正方形优化法相比,三角形和四面体优化法中的 D 点(200 mmol/L 硼酸)电离微弱,其对离子强度变化的影响甚微,故使用正方形优化法中的 D 点来优化分离条件;另外,由于逍遥丸中的组分多数为酚酸类化合物,它们在碱性或弱碱性条件下可以完全解离成离子,而 50 mmol/L 碳酸氢钠较 50 mmol/L 硼酸显弱碱性,有利于组分的解离,在分离中取得了较好的结果,且与文献报道的结果一致。李利军等^[14]以 NaOH 溶液为背景电解质,用胶束毛细管电泳法同时分离测定了加味道遥丸中栀子苷、芍药苷和丹皮酚,也进一步表明逍遥丸在偏碱性的钠盐背景电解质条件下的毛细管电泳分离较好。实验表明用正方形优化法可为逍遥丸的毛细管电泳指纹图谱的 BGE 选择提供一种新的方法。

3.3 系统的适用性

将 S1 号供试品溶液及 CFA、FA、GHIA、ILG 对照品溶液在毛细管电泳仪上分别重力进样 25 s 进行分析,记录电泳谱图(见图 2)。对比迁移时间

(t_M) 推测:9 号峰($t_M \approx 18.50$ min)为 ILG、12 号峰($t_M \approx 19.55$ min)为 FA、14 号峰($t_M \approx 21.32$ min)为 GHIA、20 号峰($t_M \approx 30.05$ min)为 CFA。在样品供试液中加入对照品溶液,进样 25 s,从电泳峰增益图上进一步证明上述推测的正确。CFA、FA、ILG 和 GHIA 都属于有机酸类化合物,在弱碱性 BGE 中带有负电荷。根据 CZE 分离原理,阴离子的表观淌度 $\mu_{app} = \mu_{eo} - \mu_{ep}$,样品电离后质荷比越小的负离子向正极方向电泳越快(μ_{ep} 越大),所以迁移时间较小的 ILG 的质荷比必然大于 CFA、FA 和 GHIA 的质荷比,另外,通过相对分子质量(M_r)与能产生负电荷的氧原子数目(N_o)比值(M_r/N_o)的计算,得到:ILG 的 $M_r/N_o = 256.2/4 = 64.05$,GHIA 的 $M_r/N_o = 822.9/16 = 51.43$,FA 的 $M_r/N_o = 194.2/4 = 48.55$,CFA 的 $M_r/N_o = 180.15/4 = 45.04$,由此也证明了质荷比大小顺序是 ILG > GHIA > FA > CFA。因 20 号咖啡酸峰与相邻组分分离较好且迁移时间适中,故将其选作参照物峰,计算其柱效不低于 79 080 塔板/m。

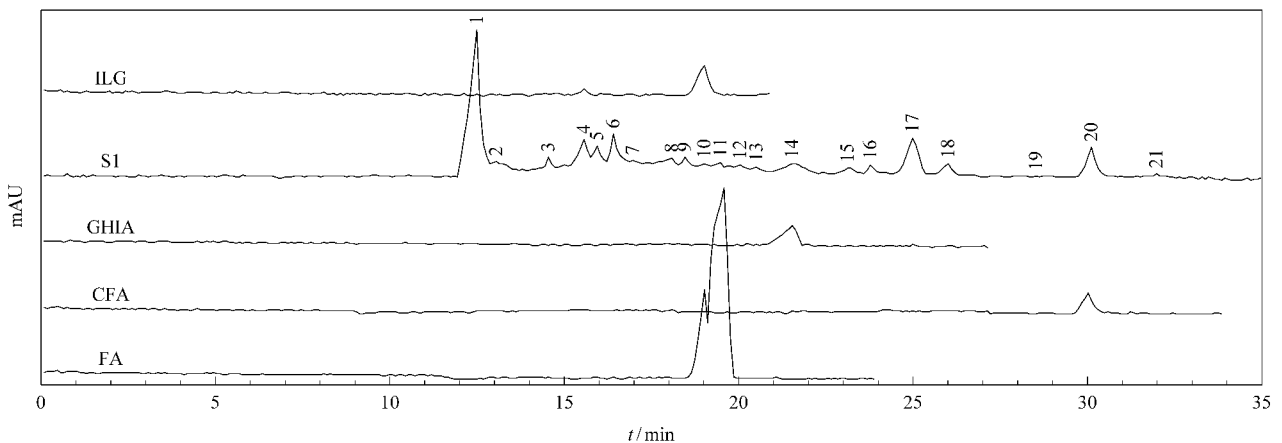


图 2 逍遥丸供试液(S1)及异甘草素、甘草酸、阿魏酸和咖啡酸对照品的 CE 谱图
Fig. 2 Electropherograms of XYP (S1) and ILG, GHIA, FA and CFA standards

3.4 精密度试验

在 2.3 节的条件下对 S1 号供试品溶液连续进样分析 6 次,记录电泳图。以 20 号咖啡酸谱峰的迁移时间和峰面积为参照(下同),计算得到各指纹峰相对迁移时间的相对标准偏差(RSD) < 1.8%,相对峰面积的 RSD < 3.4%,表明仪器的精密度合格。

3.5 稳定性试验

取 S1 号供试品溶液,分别在室温下放置 0、2、4、8、12 h 后,按 2.3 节的条件进样测定,记录电泳图。计算得到各指纹峰的相对迁移时间的 RSD < 1.5%,相对峰面积的 RSD < 4.0%,表明供试品溶液

在 12 h 内基本稳定。

3.6 重复性试验

取 S1 号逍遥丸样品,按 2.2.2 节方法分别平行制备 6 份供试品溶液,按 2.3 节条件进样检测,记录电泳图。计算得到各指纹峰的相对迁移时间的 RSD < 2.0%,相对峰面积的 RSD < 3.5%,表明方法的重复性良好。

3.7 XYP-CEFP 建立^[11]

按 2.3 节的电泳条件测定 13 批 XYP 电泳指纹图谱。4 个代表性样品的 CEFP 见图 3。通过比较各批 XYP 样品的图谱发现,不同样品的图谱迁移时

间差别很大,这主要是由毛细管电泳的性质决定的,因此需要采用相对迁移时间来确定各共有峰的属性,其中以咖啡酸峰(20号峰)为参照物峰。按峰出现率100%计,经比较分析,确定了21个共有指纹峰,将各个指纹峰的积分信号导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统3.0”软件^[12],按平均值法生成准对照指纹图谱。据此计算13批样品的宏定性相似度(S_m)和宏定量相似度(P_m),并以 S_m 和 P_m 为指标,运用SPSS 16.0软件对13批样品进行聚类分析。结果分为4类,其中S2、S5、S6、S8、S9和S11为第I类,S1、S4、S7和S13为第II类,S3和S12为第III类,S10为第IV类。第I类和第II类样品的 $S_m > 0.82$,说明这10批制剂的化学成分、种类和分布比例十分相似,故采用这10批样品的指

纹图谱,按平均值法生成对照CEFP。以对照CEFP为评价标准计算13批样品的 S_m 、 P_m 及 α 值(coefficient of variation),结果见表3。

3.8 系统指纹定量法^[15]评价XYP的质量

若规定 $S_m \geq 0.85$ 为合格,则S3、S8和S10不合格;若规定 $80\% < P_m < 125\%$ ($\alpha \leq 0.25$)为合格,则S10和S12因含量高不合格,其余9批完全合格(见表3)。与HPLC指纹图谱^[16]评价结果相比较,S3、S9、S10、S12和S13的质量等级(grade)稍有差异,其余8批的评价结果与HPLC一致或者相差一个质量等级。这可能是因为检测原理的不同导致部分指纹峰在CE条件下未能出峰,二者反映的质量信息存在差异,致使CEFP鉴定结果与HPLC略有不同。因此可将CEFP控制XYP质量的方法作为HPLC的补充。

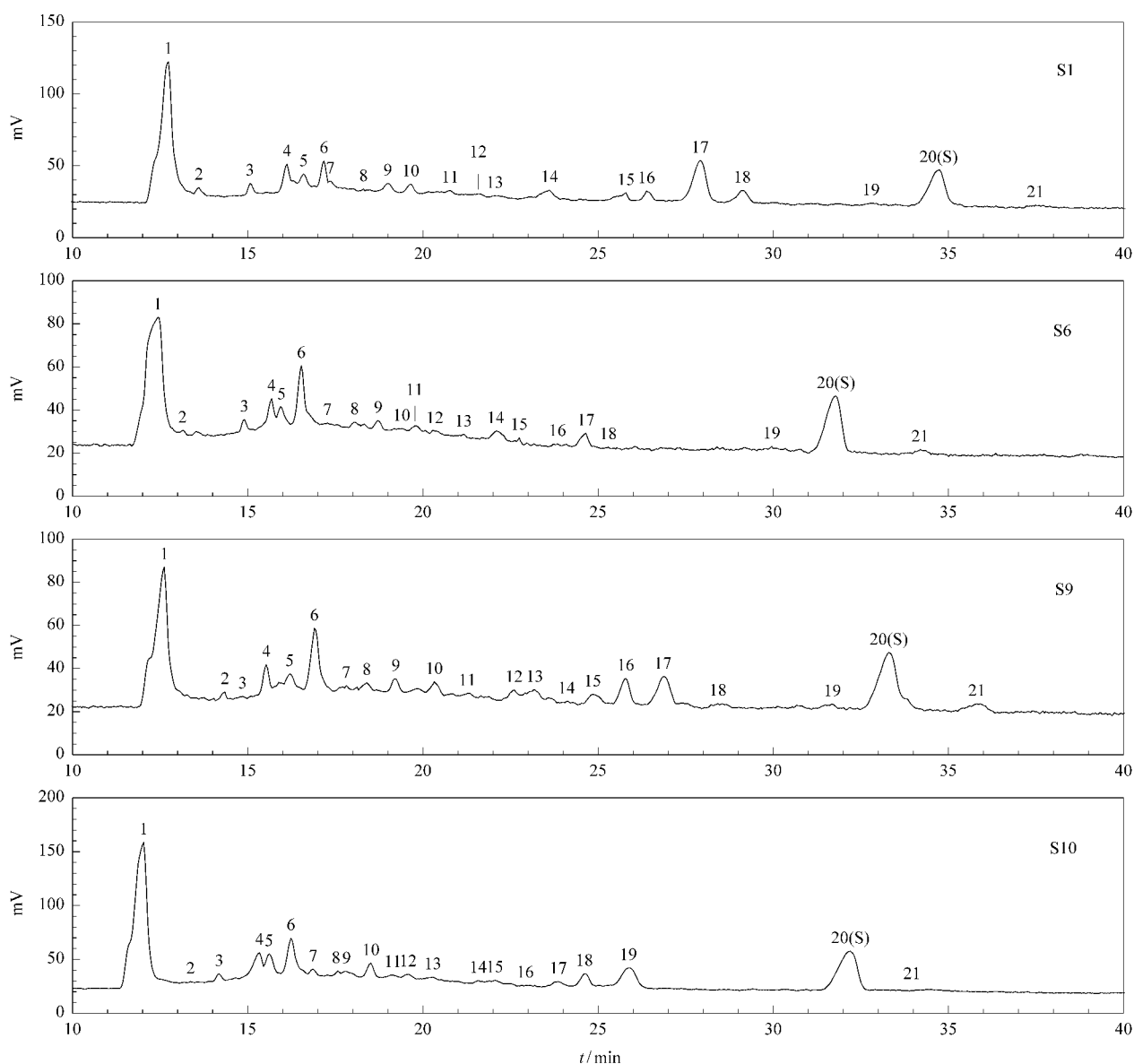


图3 4批逍遥丸样品(S1、S6、S9和S10)的CE指纹图谱

Fig. 3 Capillary electrophoresis fingerprints of XYPs from the four batches of S1, S6, S9 and S10

表 3 13 批逍遥丸的相似性及质量评价结果
Table 3 Similarities and quality evaluation results of XYPs from 13 batches of samples assessed by the systematic quantified fingerprint method

Sample	S_m	$P_m/\%$	α	Grade	Quality
S1	0.90	111.7	0.04	3	good
S2	0.92	87.9	0.06	3	good
S3	0.79	116.8	0.01	5	moderate
S4	0.92	118.3	0.06	3	good
S5	0.85	83.3	0.03	3	good
S6	0.91	83.3	0.13	3	good
S7	0.95	105.1	0.05	2	better
S8	0.82	94.0	0.06	4	fine
S9	0.90	91.3	0.19	4	fine
S10	0.72	167.5	0.03	8	inferior
S11	0.94	97.4	0.02	2	better
S12	0.93	138.9	0.09	6	common
S13	0.88	117.4	0.04	3	good
RFP	1	100	0	1	best

S_m : macro qualitative similarity; P_m : macro quantitative similarity; α : coefficient of variation; RFP: reference fingerprint.

4 结论

建立了一种新的用于毛细管电泳 BGE 选择的正方形优化法。在对逍遥丸指纹图谱的毛细管电泳 BGE 的优化过程中,仅对 17 个点的 BGE 进行了考察,其中 BGE 多为钠盐水溶液,电离较强,更利于逍遥丸组分的毛细管电泳分离,从而获得最佳的 BGE 条件。以色谱指纹谱分离量指数 RF 为优化目标函数,得到了最优的实验条件。该方法与三角形和四面体优化法相比较,考察范围更广,且具有操作简单、省时等优点,同时避免了实验条件选择的盲目性、易于推广、有实用价值。另外,建立了逍遥丸 CE 指纹图谱,选择咖啡酸为参照峰,确定了 21 个共有指纹峰。用系统指纹定量法对 13 批 XYP 进行质量评价。本实验方法简便、快捷、成本低且污染小,适合快速、大量分析复杂的中药成分,并为控制 XYP 质量提供了新的方法。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China: Part I. Beijing: Chemical Industry Press (中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 化学工业出版社), 2005: 564
- [2] Xu Y A, Jin Y. The Journal of Pharmaceutical Practice (许英爱, 金瑛. 药学实践杂志), 2001, 19(3): 166
- [3] Liang Y, Wang L, Ru X, et al. Journal of Instrumental Analysis (梁悦, 王璐, 茹鑫, 等. 分析测试学报), 2009, 28(10): 1170
- [4] Xie P S. China Journal of Chinese Materia Medica (谢培山. 中国中药杂志), 2001, 26(10): 653
- [5] Ni Y, Lai Y, Brandesc S, et al. Anal Chim Acta, 2009, 647: 149
- [6] Sun Y Q, Ruan J H, Ma X. Chinese Journal of Chromatography (孙毓庆, 阮婧华, 马欣. 色谱), 2003, 21(4): 303
- [7] Yu K, Lin Z Y, Cheng Y Y. Chinese Journal of Analytical Chemistry (虞科, 林中营, 程翼宇. 分析化学), 2006, 34(7): 963
- [8] Zhang Y J, Wang M C. Journal of Henan Institute of Science and Technology: Natural Sciences Edition (张毅军, 王敏灿. 河南科技学院学报: 自然科学版), 2006, 34(1): 58
- [9] Sun G X, Song W J, Lin T. Chinese Journal of Chromatography (孙国祥, 宋文璟, 林婷. 色谱), 2008, 26(2): 232
- [10] Liu X, Wu R, Gao J D. Journal of Traditional Chinese Medicine (刘雄, 吴蓉, 高建德. 光明中医), 2009, 24(3): 577
- [11] Sun G X, Yan N N, Ding G Y. Chinese Journal of Chromatography (孙国祥, 闫娜娜, 丁国瑜. 色谱), 2010, 28(11): 1077
- [12] Sun G X, Hou Z F, Zhang C L, et al. Acta Pharmaceutica Sinica (孙国祥, 侯志飞, 张春玲, 等. 药学报), 2007, 42(1): 75
- [13] Sun Y Q, Sun G X, Jin Y. Chinese Journal of Chromatography (孙毓庆, 孙国祥, 金郁. 色谱), 2008, 26(2): 160
- [14] Li L J, Feng J, Huang W Y, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (李利军, 冯军, 黄文艺, 等. 分析实验室), 2007, 26(5): 38
- [15] Sun G X, Zhang J X. Chinese Journal of Chromatography (孙国祥, 张静娴. 色谱), 2009, 27(3): 318
- [16] Ding G Y, Sun G X. Central South Pharmacy (丁国瑜, 孙国祥. 中南药学), 2011, 9(3): 218