

系统指纹定量法评价牛黄解毒片质量

孙国祥*, 胡玥珊, 毕开顺

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 建立牛黄解毒片 (Niuhuangjiedu tablets, NHJDT) HPLC 指纹图谱, 以系统指纹定量法评价其质量。采用 RP-HPLC 法, 以黄芩苷为参照物峰, 确定 53 个共有指纹峰, 建立了 NHJDT-HPLC 指纹图谱。以宏定性相似度 S_m 和宏定量相似度 P_m 为参量对 15 批 NHJDT 进行聚类分析, 确定用其中 10 批生成对照指纹图谱 (RFP), 以此 RFP 为标准用系统指纹定量法鉴别评价 15 批 NHJDT 质量。鉴别出 9 批质量合格, 1 批均化系数相对偏差明显偏高, 5 批含量明显偏低。系统指纹定量法是对系统化学指纹的整体定性分析和整体定量分析的密切整合, 是评价中药质量的便捷有效方法。

关键词: 系统指纹定量法; 牛黄解毒片; HPLC 指纹图谱; 宏定性相似度; 宏定量相似度; 色谱指纹图分离量指数

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 04-0401-05

Evaluating the quality of Niuhuangjiedu tablets by the systematic quantified fingerprint method

SUN Guo-xiang*, HU Yue-shan, BI Kai-shun

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

Abstract: The HPLC fingerprints of Niuhuangjiedu tablets (NHJDT) were established and assessed by systematic quantified fingerprint method. The chromatographic fingerprints (CFPs) were determined by reversed-phase HPLC, in which the CFPs containing 53 co-possessing peaks were marked by choosing baicalin peak as the referential peak. Fifteen batches of NHJDT were identified with hierarchical clustering analysis by using macro qualitative similarities and macro quantitative similarities as variables. According to the results of classification, the referential fingerprint (RFP) was synthesized from 10 batches of NHJDTs. Taking the RFP for the qualified model, the whole 15 batches of NHJDTs were evaluated by the systematic quantified fingerprint method. Among the 15 batches of NHJDT, 9 batches were completely qualified, the relative variance of leveling coefficient of 1 batch was obviously higher while the contents of other 5 batches were lower. The systematic quantified fingerprint method closely integrates the systematic fingerprints with the macro qualitative similarities and macro quantitative similarities to perform the entire qualification and quantitation analyses, which can briefly and effectively assess the quality of Chinese traditional medicine.

Key words: systematic quantified fingerprint method; Niuhuangjiedu tablets; HPLC fingerprint; macro qualitative similarity; macro quantitative similarity; chromatographic fingerprint resolution index

牛黄解毒片为中医临床重要复方制剂, 原方出自明代王肯堂《证治准绳·幼科》, 原名为牛黄解毒丸,

经加减改制为牛黄解毒片 (NHJDT)。NHJDT 由牛黄、石膏、黄芩、冰片、雄黄、大黄、桔梗、甘草 8 味中药组成, 其功能为清热解毒, 主治火热内盛, 咽喉肿痛, 牙龈肿痛, 口舌生疮, 目赤肿痛等症^[1]。目前文献^[2-6]中有 HPLC 法测定 NHJDT 中大黄素、大黄

收稿日期: 2008-10-29.

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目 (90612002).

*通讯作者 Tel: 86-24-23986286, E-mail: gxswmwys@163.com

酸、黄芩苷含量,气相色谱法测定冰片含量,薄层色谱法测定胆酸含量,原子吸收光谱法测定其痕量组分报道。中药指纹图谱的评价方法多数以定性鉴别评价为主^[7,8],近年出现了定性定量相结合的评价方法^[9-13],但应用不够简便。本文通过检测分析 15 个厂家生产的 NHJDT 建立其色谱指纹图谱,用系统指纹定量法鉴别不同厂家的 NHJDT 的化学成分数量、分布比例和化学成分整体含量差异,为 NHJDT 质量控制和评价提供了便捷有效的新方法。

系统指纹定量法原理^[10-13]

中药是一复杂性科学体系,通过指纹图谱合理评价中药质量应采取宏观定性分析和宏观定量分析相结合。系统指纹定量法是在对指纹系统宏观定性分析合格基础上,直接对系统指纹进行整体定量分析,是对系统的宏观量化评价,具有实用性和可操作性。定性相似度 S_F 能清晰反映样品化学成分与对照指纹图谱反映的化学成分在分布比例上的相似程度,但受大峰影响严重,很难反映小峰丢失。比率定性相似度 S_F' 对所有指纹峰具有等权性,但反映大峰变动不灵敏。综合以上两种定性性质,将双定性相似度 (S_F 与 S_F') 均值 S_m 称为宏定性相似度,见式 (1),用其整体监测化学指纹数量和分布比例。投影含量相似度 C 能清晰反映供试品化学成分与对照指纹图谱反映的化学成分在总体含量上的相似程度,但受大峰影响严重,难以反映小峰丢失而具片面性。定量相似度 P 对所有峰积分值同等对待,能准确地反映小峰对应化学成分的含量变动。综合以上两种定量性质,将双定量相似度 (C 与 P) 均值 P_m 称为宏定量相似度,见式 (2),其能够整体监测化学指纹整体含量。指纹信号均化系数 γ 能清晰反映化学指纹信号分布的均化程度, γ 越接近 1,则各指纹信号大小越趋相等。样品的 γ_x 和对照指纹图谱的 γ_y 越接近,则样品与对照指纹图谱越相似。根据 γ_y 是比较标准,定义样品 γ_x 的相对偏差 α 为指纹均化性变动系数,见式 (3)。用 S_m 、 P_m 和 α 相结合来鉴定中药质量的方法称为系统指纹定量法,据此将中药质量划分为 8 级列于表 1 中。公式

(1~3) 中, n 为指纹峰数, x_i 与 y_i 为各指纹峰积分面积。

$$S_m = \frac{1}{2}(S_F + S_F') = \frac{1}{2} \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2}} + \frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{y_i}}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i}{y_i}\right)^2}} \right) \quad (1)$$

$$P_m = \frac{1}{2}(C + P) = \frac{1}{2} \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sum_{i=1}^n y_i^2} + \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{\sum_{i=1}^n y_i} S_F \right) \times 100\% \quad (2)$$

$$\alpha = \left| 1 - \frac{\gamma_x}{\gamma_y} \right| = \left| 1 - \frac{P}{C} \right| \quad (3)$$

材料与方法

仪器和试剂 Agilent1100 型液相色谱仪 (DAD 检测器、四元低压梯度泵、在线脱气和自动进样装置), ChemStation 工作站 (Agilent 科技有限公司), KDM 型控温电热套 (山东鄄城华鲁仪器公司), RE-52 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。黄芩苷、大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚 (中国药品生物制品检定所)。15 批牛黄解毒片均为市售品,编号 S1~S15。

对照品溶液制备 精密称取黄芩苷对照品 5.0 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。用同法分别配制 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大黄素,150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大黄酚,200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大黄酸,180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大黄素甲醚的对照品溶液。

供试品溶液制备 取去糖衣后 NHJDT 1 g,精密称定,加甲醇 40 mL,回流提取 2 h,过滤,残渣加甲醇 30 mL,继续回流 1.5 h,过滤。合并两次滤液,减压浓缩,用甲醇定容至 10 mL,摇匀,作供试液,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

色谱条件 Century SIL C₁₈ BDS 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm ID, 5 μm); 流动相中 A 为 0.1% 磷酸水, B 为乙腈。梯度洗脱 0~8 min, 3%~5% B; 8~25 min, 5%~22% B; 25~40 min, 22%~22.5% B; 40~65

Table 1 The quality grade divided by systematic quantified fingerprint method

Parameter	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
S_m	≥ 0.95	≥ 0.90	≥ 0.85	≥ 0.80	≥ 0.70	≥ 0.60	≥ 0.50	< 0.50
$P_m/\%$	95~105	90~110	80~120	75~125	70~130	60~140	50~150	0~ ∞
α	≤ 0.05	≤ 0.10	≤ 0.15	≤ 0.20	≤ 0.30	≤ 0.40	≤ 0.50	> 0.50
Quality	Best	Better	Good	Fine	Moderate	Common	Defective	Inferior

min, 25.5%~50% B; 65~80 min, 50%~80% B。柱温 $(30.0 \pm 0.15) ^\circ\text{C}$, 流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 203 nm, 进样量 $10 \mu\text{L}$, 洗脱 85 min。

结果

1 色谱条件优化

本文以色谱指纹图分离量指数 (chromatographic fingerprint resolution index, RF)^[14]作优化目标函数, TZ 是由第一指纹峰 (t_{R1} 与峰宽 W_1) 与末指纹峰 (t_{Rn} 与峰宽 W_n) 计算的指纹峰分离数, 见式 (4), RF 是将相邻指纹峰积分 (A_i 与 A_{i+1}) 取平均值, 以分离度 R_i 为指数构造式 (5)。对 Z 取常用对数并考虑反映峰间等距性的分离度均化系数 τ 后, 得色谱指纹图分离量指数 RF, 见式 (6)。RF 能描述①分离度大小, ②分离所产生的有效指纹信号大小, ③指纹峰信号均化性程度和④指纹峰间等距性等特征。本文以 RF 值越大越好。试验中考察了 2 种梯度洗脱程序, 分别以 203、228、254、280 和 326 nm 检测, 并分别以水、25% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇和甲醇为提取溶剂按“供试品溶液制备”项方法制备牛黄解毒片供试液进样分析, 其中前三者经 80% 乙醇醇沉 12 h。将上述各供试液进样分析, 记录色谱图并计算 RF 值, 比较各种条件下的 RF 值见图 1。依据 RF 值确定以甲醇为提取溶剂, 于 203 nm 检测, 以流动相系统 1 洗脱, 此结果与谱图实际分离情况的直观比较完全一致。

$$\text{TZ} = \frac{2(t_{Rn} - t_{R1})}{W_1 + W_n} \quad (4)$$

$$Z = \left(\frac{A_1 + A_2}{2}\right)^{R_1} \cdot \left(\frac{A_2 + A_3}{2}\right)^{R_2} \cdots \left(\frac{A_{n-1} + A_n}{2}\right)^{R_{n-1}}$$

$$\left(\frac{A_1 + A_n}{2}\right)^{\text{TZ}/(n-1)} \quad (5)$$

$$\text{RF} = \tau \left[\sum_{i=1}^{n-1} R_i \lg\left(\frac{A_i + A_{i+1}}{2}\right)_i + \frac{\text{TZ}}{n-1} \lg\left(\frac{A_1 + A_n}{2}\right) \right] \quad (6)$$

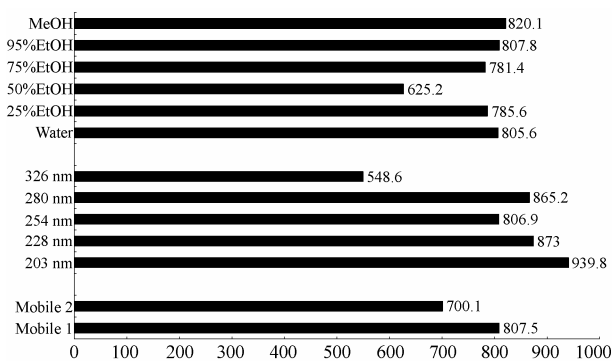


Figure 1 Chromatographic fingerprint resolution index (RF) values under different conditions for Niu Huang Jie Du tablets (NHJDT)

2 系统适用性考察

将 S2 供试品溶液、黄芩苷 (BCL)、大黄素 (EMD)、大黄酚 (CHP)、大黄酸 (RHE)、大黄素甲醚 (PHC) 对照品溶液分别进样 $10 \mu\text{L}$, 记录色谱图见图 2。供试液色谱图中 24 号峰为黄芩苷 (A)、43 号峰为大黄酸 (B)、49 号峰为大黄素 (C)、52 号峰为大黄酚 (D)、53 号峰为大黄素甲醚 (E)。因 24 号黄芩苷峰强度适中且与相邻峰分离较好, 因此选作参照物峰, 在此系统条件下, 黄芩苷理论板数应不低于 210 000。通过测试 2 h 空针和 2 h 样品供试液色谱图确定洗脱时间为 85 min。

3 精密度

精密吸取 S2 号样品供试液 $10 \mu\text{L}$, 连续进样 6

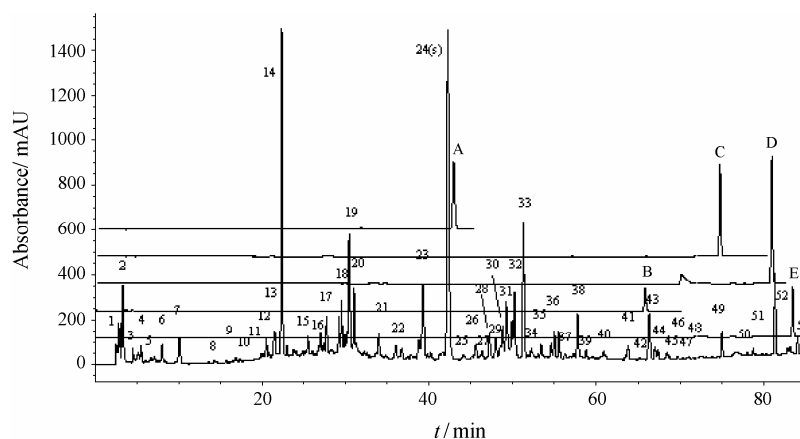


Figure 2 HPLC chromatograms of NHJDT. A: Baicalin (BCL); B: Rhein (RHE); C: Emodin (EMD); D: Chrysophanol (CHP); E: Physcione (PHC)

次,以黄芩苷的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰相对保留时间 RSD 均 $< 1.0\%$,各共有峰峰面积的 RSD 除 19 号峰 (3.84%)、39 号峰 (3.45%)、40 号峰 (3.31%)、50 号峰 (4.16%) 外,其余 $< 3.0\%$ 。表明系统进样精密度良好。

4 稳定性

取 S2 号样品,分别在样品制备后 0、5、10、15、20 和 24 h 进样,以黄芩苷的保留时间和峰面积为参照,计算各峰相对保留时间 RSD $< 1.0\%$,相对峰面积的 RSD 除 2 号峰 (4.0%)、26 号峰 (3.8%)、42 号峰 (3.7%) 外,其余小于 3.0%,表明样品在 24 h 内基本稳定。

5 重复性

取 S2 号样品制备供试液 6 份,进样 $10\ \mu\text{L}$ 测定,以黄芩苷的保留时间和峰面积为参照,计算各峰相对保留时间 RSD $< 1.0\%$,相对峰面积 RSD 除 12 号峰 (3.48%)、26 号峰 (3.77%)、37 号峰 (4.00%)、40 号峰 (3.11%) 外,其余小于 3.0%,表明方法重复性良好。

6 指纹图谱

将 15 个厂家的 NHJDT 供试液分别进样检测,记录色谱图见图 3。以黄芩苷 (24 号峰) 为参照物峰,按峰出现率 100% 计,确定 53 个共有指纹峰。将谱图积分结果的 AIA 文件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”软件按平均值法生成准对照指纹图谱,并计算宏定性相似度 S_m 和宏定量相似度 P_m 。以 S_m 和 P_m 为指标,用 SPSS13.0 软件对 15 批样品进行系统聚类分析,结果 S3、S15、S6、S10、S4、S11、S14、S1、S8、S13 为第一类, S2、S5、S7、S9 和 S12 为第二类。因第一类 10 批样品质量按系统指纹定量法鉴别主要为 II~III 级,仅 S8 为 IV 级而 S6 和 S15 为 V 级,表明其化学成分种类、分布比例和整体成分含量都很相似,故选第一类样品指纹图谱按平均值法生成对照指纹图谱见图 3 (RFP)。以此 RFP 为评价标准计算 15 批样品的 S_m 和 P_m 及 α 值见表 2。

7 NHJDT 质量的整体评价

若规定 $S_m \geq 0.84$ 时样品化学成分数量和分布比例合格,则全部合格。若含量相似度合格标准为 $80\% < P_m < 125\%$ ($\alpha \leq 0.25$),则 S2、S5、S7、S9 和 S12 因含量低而不合格,虽然 S6 宏定性和宏定量相似度都合格,但因均化性变动系数偏高而不合格,其余 9 批完全合格。按照表 1 规定鉴定 15 批 NHJDT 的质量级见表 2。

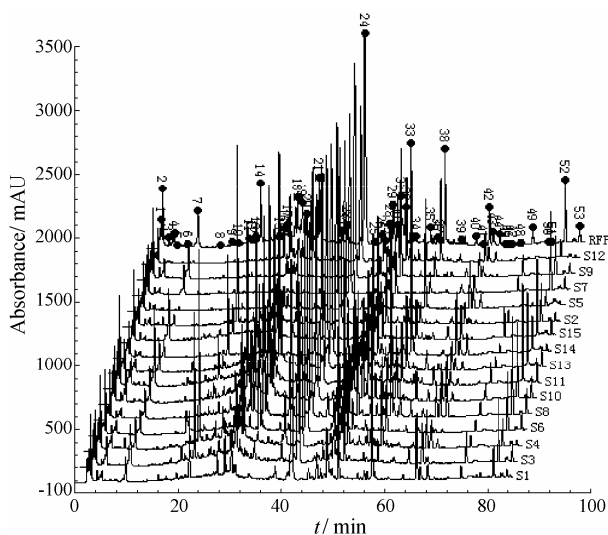


Figure 3 HPLC fingerprints of 15 batches of NHJDTs and their RFP

结论

本文以 RF 为优化的目标函数对指纹图谱试验条件进行优化,选择 BCL 为参照峰,建立了 NHJDT-HPLC 指纹图谱。由于中药是一复杂性科学体系,反映其质量的中药指纹图谱具有系统性、特征性、相对稳定性、模糊性、整体性、复杂性、动态开放性、活性交互性、微观精确性、宏观量化特征、超信息特征和数字化特征^[15]。虽然指纹图谱总量统计矩分析法^[9]具有定量功能,但方法便捷性不适合生产质量控制。遵从系统论和整体论方法学,系统指纹定量法是在对中药指纹系统宏观定性分析合格基础上,直接对中药指纹系统进行整体定量分析,是对中药化学指纹系统

Table 2 The quality grade results of 15 batches of NHJDTs assessed by the systemic quantified fingerprint method

Parameter	S1	S3	S4	S6	S8	S10	S11	S13	S14	S15	S2	S5	S7	S9	S12
S_m	0.90	0.88	0.86	0.90	0.84	0.91	0.94	0.88	0.87	0.90	0.86	0.87	0.86	0.90	0.80
P_m	103.7	83.3	88.5	92.6	113.6	92	99.1	115	96.7	82.3	63.7	65.8	49.5	74.5	67.7
α	0.15	0.03	0.07	0.29	0.01	0.08	0.04	0.02	0.08	0.21	0.00	0.09	0.31	0.23	0.00
Grade	III	III	III	V	IV	II	II	III	III	V	VI	VI	VII	V	VI
Quality	Good	Good	Good	Moderate	Fine	Better	Better	Good	Good	Moderate	Common	Common	Inferior	Moderate	Common

S_m : Macro qualitative similarity; P_m : Macro quantitative similarity; α : Coefficient of variation

的宏观量化评价。 S_m 能整体监测中药化学指纹数量和分布比例以解决模糊性问题; P_m 能整体监测中药化学指纹整体含量(以 α 限定指纹比例变异范围)。由 S_m 和 P_m 及 α 构成的系统指纹定量法运用了研究复杂性科学非常重要的方法学——宏观定性分析和宏观定量分析密切相结合,具有实用性和可操作性,是中药生产质量控制与评价的便捷有效方法。

References

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol I. 2005 ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 387.
- [2] Li TP, Wang XW, Liu DQ. Determination of emodin and rhein in Niu Huang Jie Du tablets by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2003, 25: 293–295.
- [3] Wu LQ. Determination of baicalin in Niu Huang Jie Du tablets by HPLC [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2003, 15: 40–41.
- [4] Liu Q. Determination of borneol in niu Huang Jie Du tablets by GC [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2003, 16: 436–437.
- [5] Wu GH, Kang XL. Determination of cholic acid in niu Huang Jie Du tablets by TLC [J]. Chin J Convalescent Med (中国疗养医学), 2006, 15: 477.
- [6] Liu Y. Determination of ten trace elements in Chinese traditional medicines by atomic absorption spectrometry [J]. Spectrosc Spectral Anal (光谱学与光谱分析), 2000, 20: 373–375.
- [7] Nie L, Cao J, Luo GA, et al. Comparison of different methods for evaluating the similarity of fingerprints of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2005, 27: 249–252.
- [8] Wang LX, Xiao HB, Liang XM, et al. Vectorial angle method for evaluating the similarity between two chromatographic fingerprints of Chinese herb [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 713–717.
- [9] He FY, Zhou HH, Deng KW, et al. A new qualitative and quantitative analytical method of chromatographic fingerprints: total quantum statistical moment [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 195–201.
- [10] Sun GX, Hou ZF, Bi YM, et al. The digital criterion of the potential information characteristics of the traditional Chinese medicine chromatographic fingerprints [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 857–862.
- [11] Sun GX, Hou ZF, Zhang CL, et al. Comparison between the qualitative similarity and the quantitative similarity of chromatographic fingerprints of traditional Chinese medicines [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 75–80.
- [12] Sun GX, Ren PP, Bi YM, et al. Quality assessment on high performance liquid chromatographic fingerprints of *Ginkgo* leaf extract and dipyrindamole injection by double qualitative similarities and double quantitative similarities [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2007, 25: 518–523.
- [13] Sun GX, Shi XF, Zhang JX, et al. Determining the fingerprint attribution ratio and process recovery of medicinal effectiveness components for TCM-compound by quantified fingerprint method [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 1047–1052.
- [14] Sun GX, Xu HS, Wang L. Digitized fingerprint of *Ilex chinensis* by HPLC [J]. Central South Pharm (中南药学), 2008, 6: 105–110.
- [15] Sun GX, Hu YS, Zhi XZ. Exploration on the intrinsic characteristics of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprints by complex science [J]. Central South Pharm (中南药学), 2008, 5: 600–605.