

基于三波长融合谱的系统指纹定量法 鉴定龙胆泻肝丸的真实质量

孙国祥* , 张静娴

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 :建立了龙胆泻肝丸(Longdanxiegan pill LDXGP)三波长融合高效液相色谱(HPLC)指纹图谱 ,以系统指纹定量法全面鉴定 LDXGP 的质量。采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC) ,运用多波长融合指纹图谱技术对色谱图进行处理 ,以黄芩苷为参照物峰 ,确立了 63 个共有指纹峰 ,以宏定性相似度为参量对 12 个厂家的 12 批 LDXGP 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评价 12 批 LDXGP 的质量。结果鉴别出 9 批质量完全合格 ,1 批含量明显偏高 ,2 批化学成分数量和分布比例不合格。基于多波长融合技术的系统指纹定量法是评价中药真实质量的可靠方法。

关键词 :高效液相色谱法 ;系统指纹定量法 ;三波长融合指纹图谱 ;宏定性相似度 ;宏定量相似度 ;龙胆泻肝丸
中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)03-0318-05 栏目类别 :研究论文

Identification of the authentic quality of Longdanxiegan pill by systematic quantified fingerprint method based on three wavelength fusion chromatogram

SUN Guoxiang* , ZHANG Jingxian

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

Abstract : The three wavelength fusion high performance liquid chromatographic fingerprints (TWFFP) of Longdanxiegan pill (LDXGP) was established to identify the quality of LDXGP by the systematic quantified fingerprint method. The chromatographic fingerprints (CFPs) of the 12 batches of LDXGP were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography. The technique of multi-wavelength fusion fingerprint was applied during processing the fingerprints. The TWFFPs containing 63 co-possessing peaks were obtained when choosing baicalin peak as the referential peak. The 12 batches of LDXGP were identified with hierarchical clustering analysis by using macro qualitative similarity (S_m) as the variable. According to the results of classification , the referential fingerprint (RFP) was synthesized from 10 batches of LDXGP. Taking the RFP for the qualified model , all the 12 batches of LDXGP were evaluated by the systematic quantified fingerprint method. Among the 12 batches of LDXGP , 9 batches were completely qualified , the contents of 1 batch were obviously higher while the chemical constituents quantity and distributed proportion in 2 batches were not qualified. The systematic quantified fingerprint method based on the technique of multi-wavelength fusion fingerprint can effectively identify the authentic quality of traditional Chinese medicine.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC) ; systematic quantified fingerprint method ; three wavelength fusion fingerprint ; macro qualitative similarity ; macro quantitative similarity ; Longdanxiegan pill (LDXGP)

* 通讯联系人:孙国祥,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为中药指纹图谱学体系及其信息学研究。Tel : (024) 23986286 ,
E-mail : gxswmwwys@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 : 2008-11-07

龙胆泻肝丸(LDXGP)由龙胆、柴胡、黄芩、栀子(炒)、泽泻、关木通、车前子(盐炒)、当归(酒炒)、地黄、炙甘草 10 味药组方,是中医治疗肝胆实火、三焦湿热的重要良药,临床上用于治疗肝胆湿热所致的头晕目赤、耳鸣耳聋、耳部疼痛、胁痛口苦、尿赤涩痛、湿热带下等症^[1]。国家药典中有龙胆泻肝丸中龙胆苦苷含量的测定方法^[11],也有采用高效液相色谱法(HPLC)测定黄芩苷^[2]和同时测定龙胆苦苷、栀子苷含量^[3]的报道,但尚未见关于其指纹图谱研究的报道。信息融合技术是协同利用多源信息,以获得对同一事物或目标的更客观、更本质认识的信息综合处理技术^[4]。它比直接从各信息源得到的信息更全面,对事物的评价更客观、更有价值。目前关于指纹图谱的信息融合技术的报道较少。聂磊等^[5]采用主成分分析方法对不同特征吸收波长下栀子的指纹图谱进行融合,并与整合法进行了比较。花汝凤等^[6]对补中益气汤双波长指纹图谱按平均值法融合并进行整体性分析。范晓辉等^[7]运用串行融合和并行融合两种方式进行色谱指纹图谱融合,同时提出了一种评价多元色谱指纹图谱相似度的新方法。本实验采用高效液相色谱-二极管阵列检测器联用(HPLC-DAD)技术,测定 LDXGP 多个特征吸收波长下的色谱图,经筛选,用 254、280 和 326 nm 波长下的色谱图建立了融合指纹图谱,并采用系统指纹定量法^[8]评价了 12 个厂家的 12 批样品的化学成分分布比例、数量和化学成分整体含量差异,为 LDXGP 的质量控制提供了新的参考。

1 系统指纹定量法原理

中药是一个复杂的体系,中药指纹图谱是从 n 维向量空间反映中药质量的模型方法。中药指纹图谱评价是针对样品指纹向量 $X=(x_1, x_2, \dots, x_n)$ 和对照指纹向量 $Y=(y_1, y_2, \dots, y_n)$ 两个系统的定性定量差异比较, x_i 与 y_i 为各指纹峰面积。将双定性相似度(S_F 与 S_F')^[9] 均值 S_m 称为宏定性相似度(见式(1)),其能够整体监测中药化学指纹数量和分布比例;按 S_m 数值大小将中药样品定性划分为 8 个质量级别(见表 1),当样品的 S_m 值满足表 1 中的某值时认为其中药化学成分数量、分布比例满足相应级的要求,因此 S_m 是对中药化学成分数量和分布比例的系统定性评价。将双定量相似度(C 与 P)^[8] 均值 P_m 称为宏定量相似度(见式(2)), P_m 兼顾了大小指纹峰对定量相似度的贡献。按 P_m 值大小将中药样品定量划分为 8 个质量级别(见表 1)。

表 1 系统指纹定量法划分中药的质量级别
Table 1 TCM quality orders divided by the systematic quantified fingerprint method

Grade	S_m	$P_m/\%$	α	Quality
I	≥ 0.95	95 - 105	≤ 0.05	best
II	≥ 0.90	90 - 110	≤ 0.10	better
III	≥ 0.85	80 - 120	≤ 0.15	good
IV	≥ 0.80	75 - 125	≤ 0.20	fine
V	≥ 0.70	70 - 130	≤ 0.30	moderate
VI	≥ 0.60	60 - 140	≤ 0.40	common
VII	≥ 0.50	50 - 150	≤ 0.50	defective
VIII	< 0.50	0 - ∞	> 0.50	inferior

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

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

设 X 和 Y 与 $\alpha=(1, 1, \dots, 1)$ 的夹角余弦分别为 γ_X 和 γ_Y , 分别代表样品和对照指纹图谱的指纹峰信号均化程度。 S_m 和 P_m 具有实际意义的前提是 γ_X 和 γ_Y 的差异性很小,这是因为 γ_X 和 γ_Y 比值与定量相似度(宏观含量相似度 R , 投影含量相似度 W)直接相关(见式(3))。根据 γ_Y 是比较标准,定义 γ_X 的相对

标准偏差的绝对值为 α , 称为指纹均化性变动系数(见式(4))。按 α 大小将中药定性划分为 8 个质量级别(见表 1), α 是一限定参数,主要控制样品指纹谱与对照指纹谱的均化性差异。用 S_m 、 P_m 和 α 相结合来鉴定中药质量级别的方法称为系统指纹定量法,判定样品的质量级别时必须同时满足三者条件。

$$\frac{\gamma_X}{\gamma_Y} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n x_i^2}} \left(\frac{\sum_{i=1}^n y_i}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n y_i^2}} \right)^{-1} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{\sum_{i=1}^n y_i} \times \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2}} = \frac{R}{W} = \frac{P}{C} \quad (3)$$

$$\alpha = \left| 1 - \frac{\gamma_x}{\gamma_y} \right| = \left| 1 - \frac{P}{C} \right| \quad (4)$$

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型液相色谱仪,配有 DAD、四元低压梯度泵、在线脱气装置、自动进样器,Chem Station 工作站(Agilent 公司),RE52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),Sartorius2BS110S 分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);KDM 型控温电热套(山东聊城华鲁仪器公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂),冰醋酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂开发中心),95%(体积分数,下同)乙醇(分析纯,康科德科技有限公司),水为去离子水。龙胆苦苷(gentiopicroside,GPS)、黄芩苷(baicalin,BCL)、甘草酸单铵(glycyrrhizic acid,GHIA)和绿原酸(caffeotannic acid,CGA)对照品(供含量测定用,中国药品生物制品检定所)。12 批 LDXGP(生产厂家,批号):S1(北京同仁堂制药有限公司,8083023);S2(赤峰天奇制药有限公司,20080121);S3(河北药都药业有限公司,20080112);S4(河南百年康鑫药业有限公司,20071001);S5(石家庄海天药业有限公司,20070901);S6(沈阳中药制药有限公司,071001);S7(哈药集团世一堂制药厂,0710146);S8(白城市多邦药业有限公司,20070302);S9(丹东药业有限公司,071001);S10(药都制药集团有限公司,080106);S11(辽宁金丹药业有限公司,20080111);S12(山东仙河药业有限公司,070802);均购于药店,其中 S1~S4 为水丸,S5~S11 为大蜜丸,S12 为浓缩丸。

2.2 溶液的配制

对照品溶液:精密称取龙胆苦苷对照品 5.0 mg,置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀得 200 mg/L 的对照品溶液。同法分别配制 500 mg/L 的黄芩苷、甘草酸单铵和绿原酸对照品溶液。

样品供试液:取 LDXGP(水丸)8.75 g,剪碎,精密称定,加入 60 mL 75% 乙醇回流提取 2 h,过滤,残渣中加入 50 mL 75% 乙醇继续回流 1.5 h。合并两次滤液,减压浓缩至约 20 mL,加水 80 mL 沉淀 24 h,过滤并浓缩;然后用 50% 乙醇定容至 25 mL,摇匀做供试液。同法制备与水丸原生药材量相当的大蜜丸供试液和浓缩丸供试液。

2.3 HPLC 指纹图谱的检测条件

Century SIL C18 BDS 柱(200 mm × 4.6 mm 5

μm)流动相:A 相为 1% HAc 水溶液,B 相为 1% HAc 乙腈溶液,线性梯度洗脱程序 0→3 min,100% A,3→9 min,100% A→5% B;9→22 min,5% B→10% B;22→30 min,10% B→12.5% B;30→45 min,12.5% B→18% B;45→60 min,18% B→30% B;60→80 min,30% B→60% B;80→85 min,60% B→75% B。流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm、280 nm、326 nm;柱温(30.0 ± 0.15)℃;进样量:10 μL。

2.4 LDXGP 融合谱的检测波长的确定

精密吸取供试品溶液 10 μL,用 DAD 采集 200~400 nm 波长范围的光谱图,结果表明,大部分组分在 254 nm 有较强吸收,黄酮类、有机酸类化合物在 270~360 nm 波长范围有较大吸收,因此本实验选取 254 nm、265 nm、280 nm、326 nm、350 nm 5 个波长进行检测。重叠比较 5 个检测波长的色谱图,在不同色谱图上选择指纹峰信号最大且指纹峰数最多的区段,最终确立按表 2 所示时间段对 254 nm、280 nm 和 326 nm 3 个检测波长的谱图进行融合。融合点选择在不光谱峰处,以不损失谱峰为原则,信号按谱图记录的原始信号大小(即不作任何改变)融合(连接)。如果不同谱图基线信号的纵坐标有差异需要将信号整体平移至同一基线信号水平。

表 2 龙胆泻肝丸(LDXGP)融合指纹谱检测波长区段的构成
Table 2 Detection wavelength range composition of the fusion fingerprints for LDXGP

Time range/min	λ/nm
0-15.0	280
15.0-50.5	254
50.5-59.0	326
59.0-72.5	280
72.5-77.5	254
77.5-95.0	280

3 结果

3.1 系统适用性

精密吸取各对照品和供试品溶液分别进样 10 μL,记录 254 nm、280 nm 和 326 nm 波长下的色谱图。按表 2 时间段融合谱图(见图 1),对比保留时间及在线紫外光谱图可知 14,18,39,50 号峰分别是 CGA,GPS,BCL 和 GHIA。因 BCL 峰与相邻峰分离良好且稳定,并在本系统条件下测得其理论板数不低于 160 000,因此选其作为参照物峰。考察 5 个检测波长的空针 2 h 和供试液 2 h 的色谱图,确认 83 min 附近出现的小峰为溶剂干扰峰,应排除其为指纹峰,确定洗脱时间为 95 min。

3.2 精密度

精密吸取 S3 号供试液 10 μL,连续进样 6 次,记录 254 nm、280 nm 和 326 nm 波长下的色谱图。

按表 2 时间段融合指纹谱,以黄芩苷的保留时间和峰面积为参照,计算各指纹峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)均小于 1.0%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明检测系统的进样精密度良好。

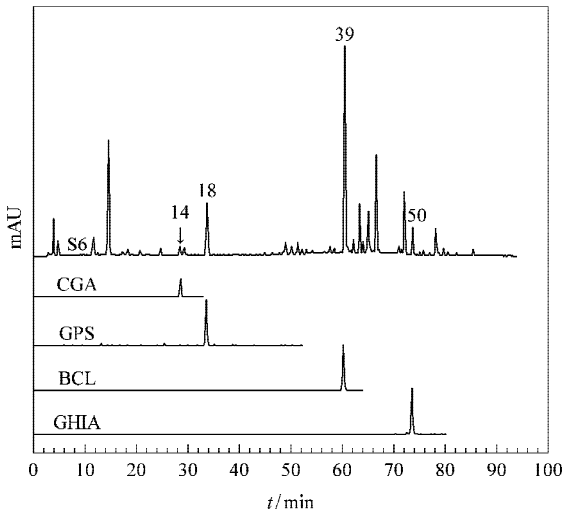


图 1 绿原酸(CGA)、龙胆苦苷(GPS)、黄芩苷(BCL)、甘草酸(GHIA)的 HPLC 谱图和样品 6 的融合 HPLC 谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of CGA, GPS, BCL, GHIA and fusion HPLC chromatogram of sample 6 (S6)

3.3 稳定性

精密吸取 S3 号供试液,分别在制备样品后 0, 4, 7, 11, 14 h 进样 10 μL,记录 254 nm、280 nm 和 326 nm 波长下的色谱图。按表 2 时间段融合指纹谱,以黄芩苷的保留时间和峰面积为参照,计算各指纹峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明样品在 14 h 内稳定。

3.4 重复性

取 S3 号样品制备供试液 5 份。精密吸取供试液 10 μL 进样测定,记录 254 nm、280 nm 和 326 nm 波长下的色谱图。按表 2 时间段融合指纹谱,以黄芩苷的保留时间和峰面积为参照,计算各指纹峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明方法的重复性良好。

3.5 LDXGP 三波长融合指纹图谱的建立和系统指纹定量法鉴定评价

将 12 个厂家的 LDXGP 供试液分别进样检测,记录 254 nm、280 nm 和 326 nm 波长下的色谱图。按表 2 时间段融合指纹谱,以黄芩苷峰(39 号峰)为参照物峰,按峰出现率 100% 计,确定 63 个指纹峰。以平均值法计算生成准对照指纹图谱(PRFP)并计算 12 批样品的双定性相似度。由于宏定性相似度代表不同样品化学指纹数量和分布比例与对照指纹图谱的相似性程度,因此以 S_m 为参量进行系统聚类分析,结果 S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、S10、S11

为第 1 类,S1 和 S12 为第 2 类(见图 2)。选择第 1 类样品,用孙国祥等^[9]研制的“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0”软件按平均值法计算生成 LDXGP 对照指纹图谱(RFP)(见图 3),以此 RFP 为评价标准,计算 12 批样品的 S_m 、 P_m 及 α 值并按表 1 的限度划分 LDXGP 的质量级别(见表 3),仅 S1 和 S12 质量较差,其他批样品的质量均为良好以上。

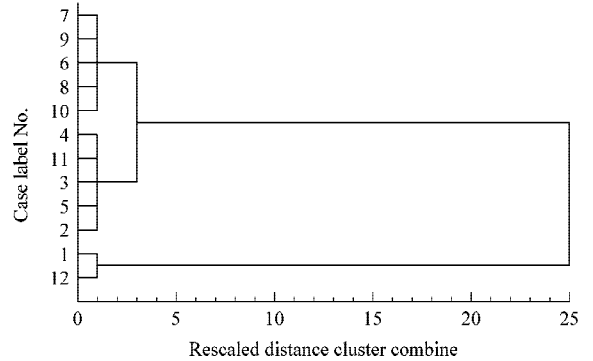


图 2 12 批龙胆泻肝丸宏定性相似度聚类谱系图
Fig. 2 Hierarchical clustering analysis figure of 12 batches of LDXGPs by macro qualitative similarity

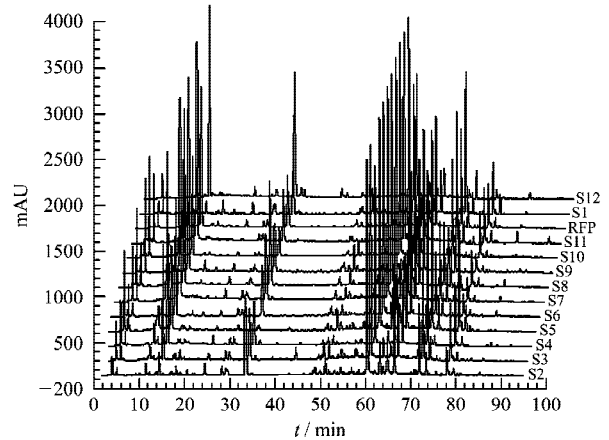


图 3 12 批 LDXGP 融合 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱(RFP)
Fig. 3 Three wavelength fusion HPLC fingerprints of 12 batches of LDXGPs and the RFP

表 3 系统指纹定量法鉴定 12 批 LDXGP 的结果
Table 3 Quality orders of 12 batches of LDXGPs identified by the systematic quantified fingerprint method

Sample	S_m	$P_m/\%$	α	Grade
S2	0.87	77.6	0.08	IV
S3	0.88	83.0	0.04	III
S4	0.90	77.0	0	IV
S5	0.89	88.3	0.05	III
S6	0.93	97.0	0.05	II
S7	0.94	128.6	0.13	V
S8	0.93	111.4	0.01	III
S9	0.94	111.8	0.09	III
S10	0.96	82.4	0.01	III
S11	0.91	118.0	0.13	III
S1	0.78	50.7	0.03	VII
S12	0.75	62.6	0.12	VI

3.6 整体评价 LDXGP 的质量

若规定 $S_m \geq 0.85$ 时样品化学成分数量和分布比例为合格,则仅 S1 和 S12 不合格;若含量相似度的合格标准为 $75\% \leq P_m \leq 125\%$ ($\alpha \leq 0.15$),则 S7 因含量高不合格($\alpha = 0.13$ 也表明其指纹信号均化性与对照指纹图谱差异较大);其余 9 批完全合格。按表 2 的规定鉴定 12 批样品,其质量级别见表 3。

4 讨论

按照“2.2”节样品供试液制备的方法,考察了以水、25%乙醇、50%乙醇、75%乙醇和 95%乙醇为溶剂提取样品,前三者以 80%乙醇沉淀 24 h,后者以水沉淀 24 h,甲醇超声提取 30 min,分别记录色谱图。以色谱指纹图谱相对信息量指数 I_r (其综合了指纹峰信号强度、信号分布均匀性、信息量和分离效率以及制剂取量 Q (mg)等信息)^[10]为优化目标函数, I_r 越大越好。结果显示以 25%乙醇和 75%乙醇为提取溶剂时的 I_r 值相同,但以 25%乙醇提取时的峰数较少,故选择 75%乙醇为提取溶剂。

龙胆泻肝丸药味多,化学成分复杂,单波长色谱图难以完整地反映制剂的化学成分特征,因此采用融合技术对不同波长的色谱图进行融合,可实现指纹图谱最大信息化原则。进一步研究应该对关键组分色谱峰进行 HPLC-MS(质谱)定性研究,同时采用分解定量相似度对其重点控制。基于遵从研究复杂性科学方法论的原理,中药质量控制的特点要求必须采取宏观和综合量化的手段控制中药的真实性、稳定性和一致性。

5 结论

中药是一个复杂的体系,因此应该以复杂性科学理论和方法加以认识和控制^[11]。系统指纹定量法是在对中药系统化学指纹整体定性分析合格基础上,直接对中药系统指纹进行整体定量鉴别,是对中药进行质量整体量化评价的可靠方法。本方法可为

中药的质量控制提供有益的新参考,具有实用性和可操作性。可以预见,一旦建立中药原料和中成药指纹对照品标准即实现对照指纹图谱标准采用随行测时检测方式,系统指纹定量法将进入生产质量控制领域。中药要想真正得到世界认可首要问题是必须解决中药系统整体化学物质组合量的稳定性,我们认为中药系统整体化学物质组含量合格的最低标准是必须控制 P_m 在 70%~130% 范围内,系统指纹定量法为实现这一目标奠定了重要控制方法学的理论核心。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I. Beijing: Chemical Industry Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部. 北京:化学工业出版社), 2005: 461
- [2] Li C Y, Lan H M, Yuan X W. Guangdong Pharmacy (李楚云, 蓝红梅, 袁学文. 广东药学), 2004, 14(6): 21
- [3] Li R X. Chinese Traditional Patent Medicine (李瑞新. 中成药), 2007, 29(8): 1170
- [4] Lan G X, Ai K W. Computer World Report (蓝国兴, 艾克武. 计算机世界报), 1997(18)
- [5] Nie L, Hu Z, Luo G A, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (聂磊, 胡震, 罗国安, 等. 分析化学), 2005, 33(6): 898
- [6] Hua R F, Huang K E, Ke X H, et al. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology (花汝凤, 黄可儿, 柯雪红, 等. 中药新药与临床药理), 2008, 19(1): 42
- [7] Fan X H, Ye Z L, Cheng Y Y. Chemical Journal of Chinese Universities (范晓辉, 叶正良, 程翼宇. 高等学校化学学报), 2006, 27(1): 26
- [8] Sun G X, Ren P P, Bi Y M, et al. Chinese Journal of Chromatography (孙国祥, 任培培, 毕雨萌, 等. 色谱), 2007, 25(4): 518
- [9] Sun G X, Zhi X Z, Zhang C L, et al. Central South Pharmacy (孙国祥, 智雪枝, 张春玲, 等. 中南药学), 2007, 5(6): 945
- [10] Sun G X, Hou Z F, Bi Y M, et al. Acta Pharmaceutica Sinica (孙国祥, 侯志飞, 毕雨萌, 等. 药学学报), 2006, 41(9): 857
- [11] Sun G X, Hu Y S, Zhi X Z. Central South Pharmacy (孙国祥, 胡玥珊, 智雪枝. 中南药学), 2008, 5(5): 600