

平行五波长高效液相色谱指纹图谱全息整合法 定量鉴定杞菊地黄丸的整体质量

孙国祥* , 吴 波 , 毕开顺

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 :建立了杞菊地黄丸(Qijudihuang Pill , QJDHP)平行五波长(PFW)高效液相色谱(HPLC)指纹图谱 ,并依据系统指纹定量法结合全息整合法定量鉴定了杞菊地黄丸的整体质量。采用反相 HPLC 法 ,以丹皮酚(POL)为参照物峰 ,分别于 203、228、265、280 和 326 nm 下检测 ,分别确定了 51、49、52、49 和 47 个共有指纹峰 ,建立了 QJDHP 的 PFW-HPLC 指纹图谱。分别以权重法、均值法和投影参数法整合 5 个波长下各样品的定性定量全信息 ,结果基于 5 个波长综合信息用系统指纹定量法鉴定 11 批 QJDHP 样品 ,其中有 8 批质量为好 ,1 批为较好 ,质量一般为 2 批。评价时以均值法最为简捷和准确。本实验结果表明 ,平行多波长指纹图谱整合法是基于从全信息角度整体定性和定量鉴定中药质量的有效可信方法 ,是对 HPLC-二极管阵列检测(DAD)三维指纹图谱的简化定量处理 ,其整体综合定量鉴定结果具有可靠性。

关键词 :平行五波长高效液相色谱指纹图谱 ;全息整合法 ;宏定性相似度 ;宏定量相似度 ;系统指纹定量法 ;投影参数法 ;杞菊地黄丸

中图分类号 :O658

文献标识码 :A

文章编号 :1000-8713(2010)09-0877-08

Quantitative identification Qijudihuang Pill by integrating overall information method based on parallel five wavelength high performance liquid chromatographic fingerprints

SUN Guoxiang* , WU Bo , BI Kaishun

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

Abstract : Parallel five wavelength high performance liquid chromatographic (PFW-HPLC) fingerprints of Qijudihuang Pill (QJDHP) were established. The quality of QJDHP was identified based on systematically quantified fingerprint method (SQFM) by the integrating overall information method (IOIM). The chromatographic fingerprints (CFPs) were developed by reversed-phase (RP) HPLC , in which 51 , 49 , 52 , 49 and 47 co-existing peaks were marked at 203 , 228 , 265 , 280 and 326 nm , respectively , by choosing paeonol (POL) peak as the reference peak. The natural weighted method (NWM) , average method (AM) and project parameter method (PPM) were separately used to integrate the different chemical qualitative and quantitative information from different PFW-HPLC fingerprints. By using the IOIM based on SQFM , the qualities of DMS2 , DMS4 , DMS5 and DMS6 (2 grade) were identified as very good ; DMS1 , DMS3 and DMS10 , DMS11 (3 grade) as good ; DMS9 (4 grade) as fine ; DMS7 (6 grade) as common , in which DMS8 was regarded as moderate (5 grade) by the AM and as common (6 grade) by PPM. The qualities of 11 batches of QJDHP were identified , in which 8 batches were above the good level , 1 batch was fine level and two batches were common level. Therefore AM was the most accurate and simple method to integrate all the information. The experimental results indicated that the IOIM based on the PFW-HPLC can be effectively used to

* 通讯联系人 :孙国祥 ,教授 ,博士生导师。E-mail : gxswmwys@163. com.

基金项目 :国家自然科学基金重大研究计划项目(No. 90612002)。

收稿日期 :2010-05-30

identify qualitatively and quantitatively the quality of Chinese traditional medicine from overall information , which is a reliable method and also can quantitatively simplify the bountiful information of HPLC-DAD (diode array detection) fingerprints. In fact , the comprehensive identification ability of IOIM is the most reliable and effective one.

Key words : parallel five wavelength high performance liquid chromatographic (PFW-HPLC) fingerprints ; integrating overall information method (IOIM) ; macro qualitative similarity (S_m) ; macro quantitative similarity (P_m) ; systematically quantified fingerprint method (SQFM) ; project parameter method ; Qijudihuang Pill (QJDHP)

目前 , 色谱指纹图谱研究以紫外单波长检测为主。由于中药材尤其复方中药的各种化学指纹成分的紫外吸收光谱差异很大 , 很难找到一个合适的紫外波长能够兼顾检测所有化学指纹成分。单一波长指纹图谱具有片面性 , 从而导致其反映的中药质量具有随机性和偶然性。事实上 , 用能够全面真实地反映中药复杂系统化学指纹完整信息特征的高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-DAD) 三维空间指纹谱来评价中药是最理想的 , 但其涉及海量数据的复杂运算 , 还有待发展。目前 , 依据主成分原理用多波长指纹图谱代替 HPLC-DAD 三维空间指纹图谱 , 是一种重要的简化处理。多波长指纹图谱适应复杂性的科学要求 , 实质是从多维信息角度揭示指纹图谱代表的整体化学指纹系统的全信息 , 它较单波长指纹图谱更能全面地反映中药的化学物质信息。中药系统各类化学成分在多波长下形成的指纹图谱展示了中药指纹图谱丰富的多维信息特征 , 能排除干扰从而强化指纹峰的可辨别性 , 同时加大了不同样品中相同成分响应值的差异^[1]。多波长指纹图谱模式的本质就是尽可能使每个化学指纹成分在其最大吸收波长的状态下表达在指纹图谱中 , 突出强调信息最大化原则 , 并能显著降低 HPLC-DAD 三维空间指纹系统的信息冗余度。本文对杞菊地黄丸 (QJDHP) 平行五波长 HPLC 指纹图谱进行研究 , 建立了多波长指纹图谱的全息整合法。

杞菊地黄丸出自《麻疹全书》, 是六味地黄丸原方加入枸杞和菊花而成 , 每丸(9 g) 含 1. 269 g 熟地黄、0. 634 g 山药、0. 634 g 山茱萸(制)、0. 476 g 泽泻、0. 476 g 茯苓、0. 476 g 牡丹皮、0. 317 g 枸杞和

0. 317 g 菊花。其功能为滋肾养肝 , 用于治疗肝肾阴虚、眩晕耳鸣、羞明畏光、迎风流泪、视物昏花^[2]。2005 年版中国药典以检测马钱苷和丹皮酚含量作为其质量控制指标。目前文献中有采用 HPLC 法测定杞菊地黄丸中马钱苷、丹皮酚、芍药苷和熊果酸含量 , 采用毛细管气相色谱法测定丹皮酚含量 , 采用离子交换-比色法测定甜菜碱含量等的报道^[3-6]。本文通过建立平行五波长 QJDHP-HPLC 指纹谱 , 分别采用权重法、均值法和投影参数法整合平行五波长下各样品的定性定量全信息 , 用系统指纹定量法^[7]鉴定 11 批 QJDHP 的质量 , 为该制剂的全面质量控制提供综合的客观的评价方法。

1 多波长指纹图谱全息整合法原理

对于 n 个样品 , 在 p 个紫外波长下检测的 $n \times p$ 个指纹图谱 , 按平均值法计算生成各波长下的对照指纹图谱 , 分别计算 p 个波长下每个样品的宏定性相似度 S_m 和宏定量相似度 P_m 及均化性变动系数 α , 则每个样品均获得 p 个 S_m 、 P_m 和 α , 构成 3 个 $n \times p$ 阶矩阵 X 。由于每个化学指纹成分在不同紫外波长下的峰积分有差异 , 使得 p 个 S_m (P_m 或 α) 不等 , 必须对它们进行合理整合。用权向量 W_j 对数据矩阵 X 进行整合得到代表样品整体化学物质综合定性定量信息的质量特征向量 T_j (见式 (1) , 其中 $i = 1, 2, \dots, n ; j = S_m, P_m, \alpha ; p = 1, 2, \dots, m$) , 以系统指纹定量法构成的质量等级隶属矩阵 S (分 8 个质量等级) 判别得到 n 个样品质量等级向量 G (见式 (2))。

$$T = W_{jp} \cdot X_{pi} = (w_{j1}, w_{j2}, \dots, w_{jp})_{j \times p} \begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1n} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ X_{p1} & X_{p2} & \dots & X_{pn} \end{pmatrix}_{p \times n} = (T_{j1}, T_{j2}, \dots, T_{jn})_{j \times n} \quad (1)$$

$$G = S^{-1} T = S^{-1} \begin{pmatrix} S_{m-1} & S_{m-2} & \dots & S_{m-n} \\ P_{m-1} & P_{m-2} & \dots & P_{m-n} \\ \alpha_1 & \alpha_2 & \dots & \alpha_n \end{pmatrix}_{3 \times n} = (G_1, G_2, \dots, G_n) \quad (2)$$

$$S = \begin{pmatrix} S_m \\ P_m \\ \alpha \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \geq 0.95, & \geq 0.90, & \geq 0.85, & \geq 0.80, & \geq 0.70, & \geq 0.60, & \geq 0.50, & < 0.50 \\ 95 - 105, & 90 - 110, & 80 - 120, & 75 - 125, & 70 - 130, & 60 - 140, & 50 - 150, & 0 - \infty \\ \leq 0.05, & \leq 0.10, & \leq 0.15, & \leq 0.20, & \leq 0.30, & \leq 0.40, & \leq 0.50, & > 0.50 \end{pmatrix} =$$

(1 2 3 4 6 6 7 8)

1.1 均值法

均值法是用 p 个紫外波长下的 S_m 、 P_m 和 α 均值分别作为样品的宏定性相似度、宏定量相似度和均化性变动系数。它实质上是进行等权融合,且简单便捷,但会降低极大值和极小值对整合结果的影响。 p 个紫外波长下的 S_m 、 P_m 和 α 的标准偏差不大时使用较为理想。

1.2 权重法

1.2.1 自然权重法

自然权重法是以 p 个波长下检测评价样品后获得 S_m 、 P_m 和 α 大小为基础来计算权重 w_{ij} (见式(3)),其突出的是大值的贡献。

$$X_j = \sum_{i=1}^p w_{ij} X_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^p X_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p X_{ij}}, \quad i = 1, 2, \dots, n; j = S_m, P_m, \alpha \quad (3)$$

1.2.2 独立权重法

独立权重法以样品自身 p 个波长指纹图谱按平均值法计算生成一个拟合谱,以其计算不同波长下的 S_m 、 P_m 和 α 值,以此为基础再计算权重 w_{ij} 。该法注重了样品自身的实际性,不与对照指纹图谱发生联系,属于独立权重。

1.2.3 固定权重法

固定权重法以 p 个波长的 p 个对照指纹图谱按平均值法计算生成一个对照拟合谱,以其计算不同波长的对照指纹图谱的 S_m 、 P_m 和 α ,以此为基础再计算权重 w_{ij} 。对不同样品采取统一的固定权重,该法注重了标准固定分布。

1.3 投影参数法

由 p 个波长指纹图谱可得宏定性相似度向量(MQLSV): $S_m = (S_{m1}, S_{m2}, \dots, S_{mn})$ 和宏定量相似度向量(MQTSV): $P_m = (P_{m1}, P_{m2}, \dots, P_{mn})$,以及均化系数偏差向量(LCSV): $\alpha = (\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n)$,不同波长的对照指纹图谱(RFP)的MQLSV和MQTSV都为 $\alpha = (1, 1, \dots, 1)$ 。上述3个向量 S_m 、 P_m 、 α 与 α 的夹角余弦见式(4),反映不同波长下3种指标的比例分布。计算 S_m 、 P_m 和 α 对 α 的投影含量相似度和定量相似度,并取二者的均值(见式(5))。 X_m 分别代表多波长综合宏定性相似度 S_m 、多波长综合宏定量相似度 P_m 、多波长综合指

纹变异系数 α 、 \bar{X} 分别是 MQLSV、MQTSV 和 LCSV 的各元素的均值。以投影方式整合多波长检测的 p 个指纹系统为一新系统来表征中药质量,因考虑了不同条件下数据量的具体贡献作用,因此其更具有科学性。

$$S = \cos\theta = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n X_i^2}} = \bar{X} \sqrt{\frac{n}{\sum_{i=1}^n X_i^2}} \quad (4)$$

$$X_m = \frac{1}{2}(1 + S)\bar{X} = \frac{1}{2} \left(1 + \bar{X} \sqrt{\frac{n}{\sum_{i=1}^n X_i^2}} \right) \bar{X} \quad (5)$$

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器、四元梯度泵、在线脱气装置和自动进样器)、ChemStation 工作站(Agilent 公司),RE52 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),Sartorius-BS110S 分析天平(北京赛多利斯天平有限公司),KDM 型控温电热套(山东鄞城华鲁仪器公司)。甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂),乙腈(色谱纯,天津市四友生物医学技术有限公司),95%(v/v,下同)乙醇(分析纯,沈阳市富康消毒药剂厂),磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),水为去离子水。对照品马钱苷(loganin, LGN, 批号 11640-200502)和丹皮酚(paeonol, POL, 批号 110708-200505)均购自中国药品生物制品检定所。11 批杞菊地黄丸均为市售品,编号 DMS1 ~ DMS11。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 LGN 和 POL 对照品各 5.0 mg,分别置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取杞菊地黄丸 1 丸,精密称定,加 75% 乙醇 40 mL,回流提取 1 h,过滤,残渣中加 75% 乙醇 40 mL 继续回流提取 1 h,过滤。合并两次滤液,减压浓缩至约 15 mL,用 75% 乙醇定容至 25 mL,摇匀,得到供试品溶液。进样前过 0.45 μ m 滤膜。

2.4 色谱条件

CenturySIL C₁₈ BDS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相中 A 液为 0.2% 磷酸水溶液, B 液为 0.2% 磷酸乙腈溶液。梯度洗脱程序: 0 ~ 10 min, 100% A ~ 12% B; 10 ~ 30 min, 12% B ~ 25% B; 30 ~ 60 min, 25% B ~ 75% B。流速 1.0 mL/min; 紫外检测波长 203、228、265、280 和 326 nm; 柱温(30 ± 0.15) °C; 进样量 10 μL。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的优化

以色谱指纹图谱指数 $F^{[8]}$ 作为优化的目标函数, 考察试验条件的优劣, F 值越大越好。试验中考察分别以水、25% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇和甲醇作为提取溶剂, 取 10 μL 提取液进样至 HPLC 仪中, 记录色谱图。对 265 nm 波长下的色谱图积分并计算其 F 值分别为 41.7、39.5、56.8、69.2、57.5 和 64.3, 因此本文最终确定用 75% 乙醇作为提取溶剂。

3.2 检测波长的选择

QJDHP 的主要化学成分(如甾类、三萜类和三萜酸类等)在 200 ~ 250 nm 处有较强的紫外吸收。枸杞中的甜菜碱的最大吸收波长为 192 nm, 山茱萸里的熊果酸在 215 nm、马钱苷在 240 nm、茯苓中的茯苓酸在 242 nm 有最大吸收; 黄酮类、黄酮苷类、酚类和酚酸类等 在 270 ~ 340 nm 处有较强的紫外吸收, 菊花中的绿原酸和木犀草素在 328 nm、牡丹皮中的丹皮酚在 274 nm 有最大吸收。用任何单一的检测波长表达 QJDHP-HPLC 指纹图谱的信息量均有限, 而且信号强度有很大的差异。Agilent 1100 HPLC 仪配置的 DAD 的波长范围为 190 ~ 950 nm, 有 1 024 个光电二极管, 每个光电二极管对应接收 0.74 nm 的光信号。为了尽可能地表达 QJDHP 的化学指纹的整体定性和整体定量信息, 本文利用 DAD 记录其在 190 ~ 400 nm 波长范围的信号, 依据该制剂的化学成分的紫外吸收光谱特征从中选取 5 个特征波长, 即 203、228、265、280 和 326 nm。通过建立平行五波长 QJDHP-HPLC 指纹图谱, 最大限度地获取该制剂中的化学指纹信息, 以实现最大限度地合理表征其整体化学物质成分质量的定性定量全信息。

3.3 系统适用性试验

将 DMS2 供试品溶液、LGN 和 POL 对照品溶液分别进样 10 μL, 记录 265 nm 波长下的色谱图(见图 1)。通过比较保留时间和在线紫外光谱, 确

定供试液色谱图中 21 号峰为 LGN、47 号峰为 POL。因 POL 峰强度适中且与相邻峰分离较好, 因此选其作为参照物峰。在正常检测条件下, 记录基线在 2 h 内的变化情况和 2 h 供试液色谱图, 结果 60 min 后的色谱峰为溶剂干扰峰, 因此确定洗脱时间为 60 min。在此条件下, 以 POL 峰计柱效应不低于 87 000 理论塔板/m。

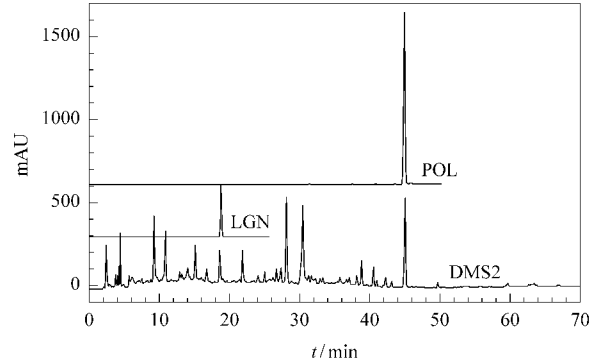


图 1 QJDHP(DMS2)的 HPLC 指纹图谱和马钱苷对照品及丹皮酚对照品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of QJDHP(DMS2) and LGN and POL controls

3.4 进样精密性试验

精密吸取 DMS2 样品供试液 10 μL, 连续进样测定 6 次, 记录色谱图。以 POL 的保留时间和峰面积为参照, 计算得到 5 个波长下各指纹峰相对保留时间的相对标准偏差(RSD)小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.0%, 表明系统进样精密性很好。

3.5 溶液稳定性试验

分别在 DMS2 样品供试液制备后 0、5、10、15、20 和 24 h 精密吸取 10 μL, 进样测定, 记录色谱图。以 POL 的保留时间和峰面积为参照, 计算 5 个波长下各指纹峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.0%, 表明样品在 24 h 内基本稳定。

3.6 方法重复性试验

取 DMS2 号样品按 2.3 节的方法制备供试液 6 份, 精密吸取 10 μL 进样测定, 记录色谱图。以 POL 的保留时间和峰面积为参照, 计算 5 个波长下各指纹峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 小于 3.0%, 表明方法重复性良好。

3.7 QJDHP 平行五波长 HPLC 指纹图谱的建立

将 11 批 QJDHP 的供试液分别进样测定, 记录色谱图(见图 2)。以 POL 为参照物峰, 按峰出现率 100% 计, 确定各检测波长下的共有指纹峰分别是 51 个(203 nm)、49 个(228 nm)、52 个(265 nm)、49 个(280 nm)和 47 个(326 nm)。将谱图积分的

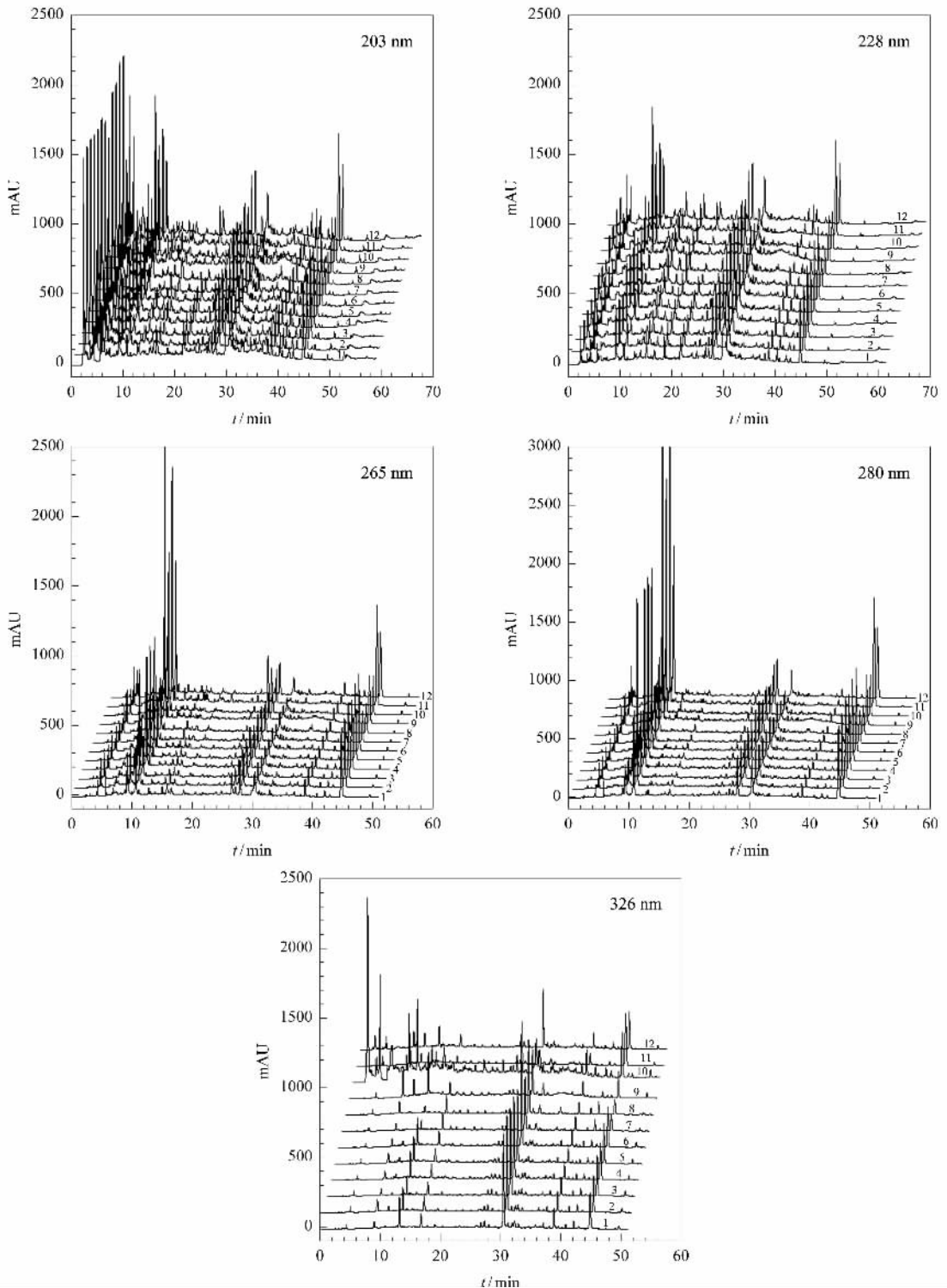


图2 在5个不同波长下11批QJDHP的HPLC指纹图谱和其对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 11 batches of QJDHPs and the reference fingerprint under five different wavelengths
1, 2, 3, ..., 11 represent the samples of DMS1, DMS2, DMS3, ..., DMS11, respectively. 12: reference fingerprint.

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^[9],按平均值法生成各波长下对照指纹图谱(见图2)。以各波长下的对照指纹图谱为标准分别计算11批QJDHP的宏定性相似度和宏定量相似度,并按系统指纹定

量法(SQFM)鉴定各波长下QJDHP的质量等级,结果见表1。

3.7.1 用平行五波长HPLC指纹图谱鉴定QJDHP质量结果的横向比较

在203、228、265、280和326 nm 5个波长下,11

表 1 用系统指纹定量法鉴定 11 批 QJDHP 质量的结果

Table 1 Quality results of 11 batches of QJDHPs assessed by systematically quantified fingerprint method (SQFM)

Type	Para.	DMS1	DMS2	DMS3	DMS4	DMS5	DMS6	DMS7	DMS8	DMS9	DMS10	DMS11	Mean	SD
203 nm	S_m	0.94	0.98	0.97	0.99	0.99	0.98	0.95	0.95	0.94	0.96	0.93	0.96	0.02
	$P_m/\%$	100.3	107.4	97.9	102.8	97.7	103.6	83.2	85.8	90.2	87.7	102.9	96.3	8.2
	α	0.07	0.02	0.05	0.03	0.04	0.03	0.04	0.02	0.01	0.03	0.01	0.03	0.02
	grade	2	2	1	1	1	1	3	3	2	3	2	1.9	0.83
228 nm	S_m	0.93	0.98	0.96	0.98	0.98	0.98	0.93	0.92	0.94	0.96	0.93	0.95	0.03
	$P_m/\%$	103.2	97.3	87.4	95.8	93.0	99.2	74.7	74.1	93.2	80.7	110.7	91.8	11.6
	α	0.20	0.01	0.04	0.01	0.04	0.02	0.01	0.02	0.05	0.04	0.05	0.04	0.05
	grade	4	1	3	1	2	1	5	5	2	3	3	2.7	1.49
265 nm	S_m	0.86	0.97	0.91	0.97	0.98	0.97	0.87	0.90	0.92	0.93	0.92	0.93	0.04
	$P_m/\%$	69.8	88.9	64.6	88.4	88.9	88.9	45.5	49.0	124.0	78.4	139.5	84.2	28.4
	α	0.11	0.03	0.06	0.05	0.01	0.04	0.20	0.21	0.40	0.07	0.10	0.12	0.11
	grade	6	3	6	3	3	3	8	8	6	4	6	5.1	1.97
280 nm	S_m	0.87	0.96	0.92	0.98	0.97	0.98	0.91	0.92	0.92	0.93	0.91	0.93	0.04
	$P_m/\%$	78.2	107.3	73.8	102.9	105.8	105.1	50.8	57.0	139.8	98.8	153.9	97.6	31.6
	α	0.04	0.10	0.01	0.07	0.12	0.05	0.15	0.15	0.42	0.21	0.18	0.14	0.11
	grade	4	2	5	2	3	2	7	7	7	5	8	4.7	2.28
326 nm	S_m	0.94	0.96	0.96	0.96	0.97	0.96	0.92	0.90	0.92	0.74	0.81	0.91	0.07
	$P_m/\%$	113.2	119.7	110.7	108.4	104.2	112	72.2	84.4	86.5	114.8	58.1	98.6	20.1
	α	0.23	0.20	0.21	0.19	0.18	0.20	0.09	0.17	0.08	0.24	0.16	0.18	0.05
	grade	5	4	5	4	4	4	5	4	3	5	7	4.5	1.04
	mean grade	4.2	2.4	4.0	2.2	2.6	2.2	5.6	5.4	4.0	4.0	5.2	3.8	1.29
grade SD	1.5	1.1	2.0	1.3	1.1	1.3	1.9	2.1	2.3	1.0	2.6	1.7	0.54	
NWM	S_m	0.91	0.97	0.94	0.98	0.98	0.98	0.92	0.92	0.93	0.91	0.90	0.94	0.03
	$P_m/\%$	94.7	103.5	87.8	99.5	97.6	101.4	70.2	73.7	112.6	91.7	123.9	96.1	15.5
	α	0.15	0.12	0.11	0.11	0.11	0.11	0.12	0.16	0.31	0.16	0.13	0.14	0.06
	grade	3	3	3	3	3	3	5	5	6	4	4	3.82	1.08
AM	S_m	0.91	0.97	0.94	0.98	0.98	0.97	0.92	0.92	0.93	0.91	0.90	0.94	0.03
	$P_m/\%$	92.9	104.1	86.9	99.7	97.9	101.8	65.3	70.1	106.7	92.1	113.0	93.7	14.8
	α	0.13	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	0.10	0.11	0.19	0.12	0.10	0.10	0.04
	grade	3	2	3	2	2	2	6	5	4	3	3	3.18	1.33
PPM	S_m	0.91	0.97	0.94	0.98	0.98	0.97	0.92	0.92	0.93	0.90	0.90	0.94	0.03
	$P_m/\%$	92.2	103.9	86.1	99.5	97.8	101.6	64.5	69.3	105.7	91.6	110.7	93.0	14.7
	α	0.12	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	0.09	0.10	0.17	0.11	0.09	0.09	0.03
	grade	3	2	3	2	2	2	6	6	4	3	3	3.27	1.49
	mean grade	3.0	2.3	3.0	2.3	2.3	2.3	5.7	5.3	4.7	3.3	3.3	3.42	1.24
grade SD	0.0	0.6	0.0	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	1.2	0.6	0.52	0.31	

NWM : natural weighted method ; AM : average method ; PPM : project parameter method. SD : standard deviation.

批样品的批间 S_m 均值(标准偏差(SD))分别是 0.96(0.02)、0.95(0.03)、0.93(0.04)、0.93(0.04)和 0.91(0.07),其 RSD < 7.7%,表明此 11 批样品在此 5 个波长的任一波长检测到的化学成分数量、分布比例都很相似;批间 P_m (%)均值(SD)分别是 96.3(8.2)、91.8(11.6)、84.2(28.4)、97.6(31.6)和 98.6(20.1);批间 α 均值(SD)分别是 0.03(0.02)、0.04(0.05)、0.12(0.11)、0.14(0.11)和 0.18(0.05),由此可知造成样品质量等级差异的最主要原因是由各化学指纹成分含量有显著差异,另外就是 α 有显著差异。用 203、228、265、280 和 326 nm 的 HPLC 指纹图谱鉴定 11 批 QJDHP 的批间质量等级的均值(SD)分别是 1.9(0.9)、2.7(1.5)、

5.1(2.0)、4.7(2.3)和 4.5(1.1)。这些结果表明,此 11 批样品中具有能在低波长 203 nm 和 228 nm 产生吸收的化学成分的数量、分布比例和含量很相似;能在 265 nm 和 280 nm 产生吸收的化学成分的数量、分布比例虽然相似,但含量差异较大;但在 326 nm 由均化系数的相对偏差高导致 11 批样品的质量等级数都高。

3.7.2 用平行五波长 HPLC 指纹图谱鉴定 QJDHP 质量结果的纵向比较

用平行五波长 HPLC 指纹图谱依据系统指纹定量法鉴定 11 批 QJDHP 的质量等级(见图 3),同一样品在不同波长下的质量等级有显著差别。其中质量等级为 1 者质量最好。在 203 nm 时,11 批样品

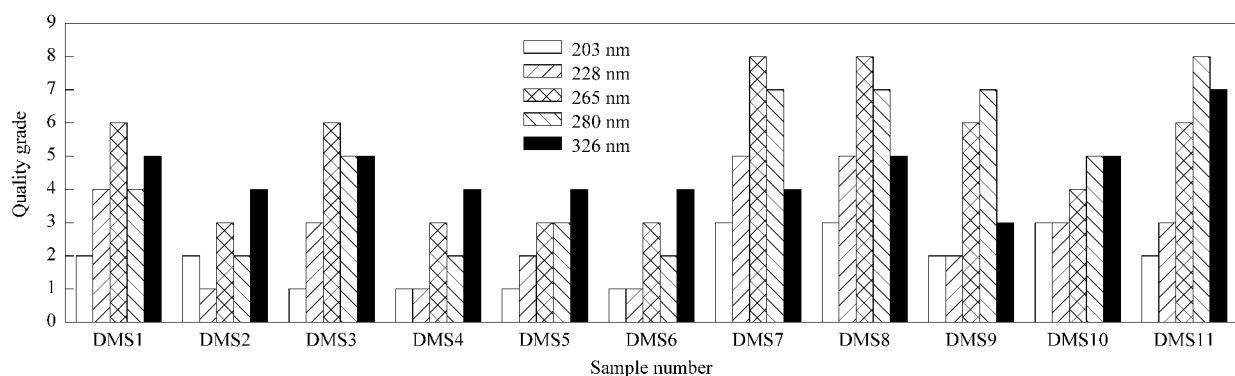


图 3 在 5 个波长下用系统指纹定量法鉴定 11 批 QJDHP 的质量等级图

Fig. 3 Quality grades of 11 batches of QJDHPs identified by SQFM under 5 wavelengths

的质量等级都不高于 3 级。相对于 203 nm 来说,在 228 nm 时,DMS1、DMS3、DMS7 和 DMS8 质量等级均升高 2 个等级,DMS5 和 DMS11 的质量等级均升高 1 个等级,但 DMS2 质量等级下降 1 个等级。在 265 nm 时,DMS3、DMS7 和 DMS8 质量等级均升高 5 个等级,DMS1、DMS9 和 DMS11 质量等级均升高 4 个等级,DMS4、DMS5 和 DMS6 质量等级均升高 2 个等级,DMS2 和 DMS10 质量等级均升高 1 个等级,说明用 265 nm 指纹图谱评价此 11 批样品质量等级都较高。在 280 nm 时,DMS9 和 DMS11 质量等级分别升高 5 和 6 个等级,DMS3、DMS7 和 DMS8 质量等级均升高 4 个等级,DMS1、DMS5 和 DMS10 质量等级均升高 2 个等级,DMS4 和 DMS6 质量等级均升高 1 个等级,说明 280 nm 指纹图谱与 265 nm 指纹图谱的评价结果较为相似。在 326 nm 时,DMS3 和 DMS11 质量等级分别升高 4 和 5 个等级,DMS1、DMS4、DMS5 和 DMS6 质量等级均升高 3 个等级,DMS2、DMS7 和 DMS10 质量等级均升高 2 个等级,DMS8 和 DMS9 质量等级均升高 1 个等级,说明 326 nm 指纹图谱与 280 nm 和 265

nm 指纹图谱的评价结果有一定的相似性。

在 203、228、265、280 和 326 nm 5 个波长下的批内评价结果见表 2,11 批样品的批内 S_m 均值为 0.90 ~ 0.98(除了 DMS10 的 RSD 为 10.3% 外,其他 RSD \leq 5.7%);批内 P_m 均值为 65.3% ~ 113%(RSD 为 7.3% ~ 32.8%),批内 α 均值为 0.07 ~ 0.19(SD 为 0.07 ~ 0.20),结果同样表明不同波长下的质量差异主要是由 P_m 和 α 引起。用平行五波长指纹图谱鉴定 11 批样品的批内质量等级的均值为 2.2 ~ 5.6(批内质量等级数的 SD 为 1 ~ 2.6),11 批样品总平均质量等级为 3.8,质量等级的 SD 的总均值 \approx 2,表明改变检测波长很容易导致鉴定中药质量结果有 2 个质量等级的变化。用 5 个波长下的 HPLC 指纹图谱鉴定 11 批 QJDHP 的批内和批间质量等级均出现了较大的差异,说明用单一波长指纹图谱鉴定的质量结果具有片面性,完全不能代表整体化学指纹的全面定性和定量性质,有必要用全息整合法对 QJDHP 平行五波长指纹图谱的不同质量信息进行全面整合,从而综合客观地鉴定其质量等级。

表 2 5 个波长下鉴定结果的均值与 3 种整合法均值的比较

Table 2 Comparison between the means of five wavelength results and the three integrated methods

Method	Parameter	DMS1	DMS2	DMS3	DMS4	DMS5	DMS6	DMS7	DMS8	DMS9	DMS10	DMS11	Mean	RSD/%
5 λ M	S_m mean	0.91	0.97	0.94	0.98	0.98	0.97	0.92	0.92	0.93	0.90	0.90	0.94	3.4
	RSD/%	4.4	1.0	2.9	1.2	0.9	0.9	3.2	2.2	1.2	10.3	5.7		
	P_m mean	92.9	104.1	86.9	99.7	97.9	101.8	65.3	70.1	106.7	92.1	113.0	93.7	15.8
	RSD/%	19.6	11.2	21.2	7.7	7.3	8.4	24.9	23.5	22.3	16.3	32.8		
3M	S_m mean	0.91	0.97	0.94	0.98	0.98	0.97	0.92	0.92	0.93	0.91	0.90	0.94	3.3
	RSD/%	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.11	
	P_m mean	93.3	103.8	86.9	99.6	97.8	101.6	66.7	71.0	108.3	91.8	115.9	94.2	15.8
	RSD/%	1.4	0.3	1.0	0.1	0.2	0.2	4.6	3.3	3.4	0.3	6.1	1.90	

5 λ M:5 wavelength method;3M:3 integrated method.

纵向比较可以看出,在 203、228、265、280 和 326 nm 波长下检测时,随着检测波长的增大,质量等级普遍升高(质量下降),到底哪个波长的指纹图谱最

能代表中药的质量是评价的难点和重点问题。

3.8 用全信息整合法评估 QJDHP 质量等级

用自然权重法(式(1))计算整合平行五波长

HPLC 指纹图谱计算的 S_m 、 P_m 和 α 结果见表 1, 11 批样品的平均质量等级是 3.82 (SD = 1.08), 除 DMS9 为 6 级, DMS7 和 DMS8 为 5 级外, 其余样品均在 1~4 级。用均值法整合平行五波长 HPLC 指纹图谱计算的 S_m 、 P_m 和 α 结果见表 1, 11 批样品的平均质量等级是 3.18 (SD = 1.33), 结果 DMS2、DMS4、DMS5、DMS6、DMS10 和 DMS11 的质量等级数均降低 1 个等级, DMS9 质量等级数降低 2 个等级, DMS7 质量等级数升高 1 个等级。用投影参数法整合平行五波长 HPLC 指纹图谱并鉴定 QJDHP 质量结果见表 1, 11 批样品的平均质量等级是 3.27 (SD = 1.49), 除 DMS8 质量等级升高 1 个等级外, 其余与均值法鉴定结果完全相同。把 11 批 QJDHP 的 P_m 值看成一个向量, 用 5 个波长和 3 种整合方法获得的评价结果分别构成 8 个向量, 进行欧式距离分析, 结果见表 3。结果显示 265 nm 与

326 nm, 280 nm 与 326 nm 检测的结果差异最大; 均值法与投影法结果间的欧式距离 ($d = 3$) 最小, 其次是均值法与自然权重法间的 $d = 14$, 因此均值法作为一种简单便捷而且准确的数据整合评价方法, 可优先采用。

同时可以看到, 用自然权重法、均值法和投影参数法对平行五波长的化学指纹定性定量信息整合后的结果与 228 nm 的评价结果最为接近, 但不等于就是 228 nm 下的鉴定结果。以均值法和投影参数法为代表的全息整合法鉴定出 DMS2、DMS4、DMS5、DMS6 (为 2 级) 质量很好; DMS1、DMS3、DMS10、DMS11 (为 3 级) 质量好; DMS9 (为 4 级) 质量较好; DMS7 (为 6 级) 质量一般; DMS8 用均值法鉴定 (为 5 级) 质量中等, 而用投影法鉴定 (为 6 级) 质量一般。11 批 QJDHP 有 8 批质量为好, 一批为较好, 2 批质量为一般。

表 3 5 个波长下 P_m 向量与 3 种整合法的 P_m 向量间的欧式距离

Table 3 Eudian distances between the P_m vectors of five wavelength results and those of the three integrated methods

Method	203 nm	228 nm	265 nm	280 nm	326 nm	NWM	AM	PPM
203 nm	0.0	25.3	90.7	90.6	59.2	37.9	34.1	34.2
228 nm		0.0	71.8	79.9	75.4	29.0	24.9	24.7
265 nm			0.0	47.1	132.1	59.1	60.5	60.5
280 nm				0.0	127.7	54.0	60.6	62.2
326 nm					0.0	83.8	75.0	74.1
NWM						0.0	14.0	16.8
AM							0.0	3.0
PPM								0.0

4 结论

本文以 F 作为优化的目标函数, 对 QJDHP-HPLC 指纹图谱实验的提取条件进行了优化, 以 POL 为参照物峰, 建立了 QJDHP 的平行五波长 HPLC 指纹图谱, 分别用权重法、均值法和投影参数法整合 5 个波长 HPLC 指纹谱化学信息, 并以系统指纹定量法鉴定 QJDHP 整体质量, 实现了最大限度的合理表征 QJDHP 中甾类、三萜类、三萜酸类、黄酮类、黄酮苷类、酚类和酚酸类等化学成分的整体质量信息。以均值法鉴定出 11 批 QJDHP 有 8 批质量为好, 1 批为较好, 2 批质量为一般。本文结果表明, 不同波长下的指纹图谱所反映的中药质量等级差异很大, 这是因为不同化学成分在不同波长下产生的紫外吸收信号差异很大所造成的。平行多波长指纹谱全息整合法鉴定结果是对 DAD 三维空间指纹谱所揭示的全紫外吸收化学信息的简化定量处理, 其适应复杂性科学要求从多维信息角度揭示中药整体化学物质的综合质量信息, 因此更能全面地反映中药质量信息。虽然本文仅选择 5 个波长来建立色谱指纹图谱, 但这一方法对中药向全信息质量控制模式的发展将起到推动作用和提供新参考。

参考文献:

- [1] Hu Z, Li D H, Wang Y M, et al. Journal of Guangxi Normal University (胡震, 李德华, 王义明, 等. 广西师范大学学报), 2003, 21(2): 276
- [2] Pharmacopoeia Committee of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part 1. 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: 468
- [3] Pan Y, Guo X L, Chen Y, et al. Journal of China Pharmaceutical University (潘莹, 郭小龙, 陈勇, 等. 中国药科大学学报), 2007, 38(2): 133
- [4] Xu D R, Wang Z T, Luo H Y, et al. Journal of Chinese Medicine Materials (徐德然, 王峥涛, 罗红云, 等. 中药材), 2002, 25(7): 503
- [5] Zhai H Y, Yan X H. Anhui Medical and Pharmaceutical Journal (翟宏焱, 颜晓航. 安徽医药), 2008, 12(11): 1043
- [6] Tian Y S, Jin C M, Jin B Y. Journal of Yanbian Medical College (田玉顺, 金春梅, 金宝渊. 延边医学院学报), 1995, 18(4): 235
- [7] Sun G X, Hu Y S, Bi K S. Acta Pharmaceutica Sinica (孙国祥, 胡玥珊, 毕开顺. 药学报), 2009, 44(4): 401
- [8] Sun G X, Liu X L, Deng X Y, et al. Acta Pharmaceutica Sinica (孙国祥, 刘晓玲, 邓湘昱. 药学报), 2004, 39(11): 921
- [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): 550