

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.04.001

光谱指纹定量法评价木香顺气丸质量*

王玲娇¹, 孙国祥², 戴娜³, 杨继章¹, 于静^{1△}

(1. 河北医科大学第一医院, 河北 石家庄 050031; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016;

3. 河北省直属机关第二门诊部, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 建立木香顺气丸红外-紫外光谱(IR-UV)指纹图谱,并以光谱指纹定量法评价其质量。方法 以中药IR-UV为基础,将IR和UV光谱各数据点按平均值法分别生成对照指纹图谱,以光谱点为单位计算两类光谱的宏观定性定量信息,并以等权融合。结果 光谱指纹定量法鉴定出15批木香顺气丸质量好,1批质量为中等。结论 基于IR-UV的光谱指纹定量法可便捷地评价木香顺气丸质量。

关键词:光谱指纹定量法;木香顺气丸;红外指纹图谱;紫外指纹图谱;质量评价

中图分类号:R932;R284.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)04-0001-05

Quality Evaluation of Muxiangshunqi Pills by Spectrum Quantified Fingerprint Method

WANG Lingjiao¹, SUN Guoxiang², DAI Na³, YANG Jizhang¹, YU Jing¹

(1. The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050031; 2. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning, China 110016; 3. The Second Department of Outpatient, Hebei Province Direct Agency, Shijiazhuang, Hebei, China 050000)

Abstract: Objective To establish the IR-UV spectrum fingerprints of Muxiangshunqi Pills and evaluation its quality by spectrum quantified fingerprint method(SQFM). **Methods** Based on the IR-UV of traditional Chinese medicine, the referential UV fingerprint(RUVFP) and the referential IR fingerprint(RIRFP) were respectively synthesized by the point to point data of IR and UV spectra. The macroscopic qualitative and quantitative information of the two kinds of spectra was calculated in terms of spectral points and fused with equal weights. **Results** Fifteen batches of Muxiangshunqi Pills were identified to be of good quality and one batch was of medium quality by SQFM. **Conclusion** The SQFM based on the spectra of IR-UV can briefly and quickly identify the quality of Muxiangshunqi Pills.

Key words: spectrum quantified fingerprint method; Muxiangshunqi Pills; IR fingerprint; UV fingerprint; quality evaluation

木香顺气丸由木香、砂仁、香附(醋制)、槟榔、甘草、陈皮、厚朴(制)、枳壳(炒)、苍术(炒)和青皮(炒)10味中药组方,传统剂型为水丸,收载于2015年版《中国药典(一部)》^[1]。其具有行气导滞、燥湿健脾等功效,常用于治疗食积、腹痛、气郁等症^[2]。药典收载的质量标准为用高效液相色谱(HPLC)法测定厚朴酚含量,现有文献报道了厚朴酚的HPLC指纹图谱^[3]和甲醇提取物的指纹图谱^[4],也有文献报道橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、木香羟内酯等单个或多个成分的含量^[5-8]。紫外指纹图谱可反映中药中具有不饱和化学键及其共轭体系基本物质的吸收情况,并以此控制中药质量^[9-10]。红外指纹图谱不仅可反映中药中多种化合物成分饱和键的吸收,且样品预处理简单,无须行样品损坏检测^[11]。可通过适当校正样本建立数学模型,应用优化后的数学模型和未知样品的近红外光谱^[12-13],进行中药质量控制。本研究利用中药红外-紫外光谱(IR-UV)联用技术^[14-15]建

立木香顺气丸的光谱指纹图谱,结合光谱指纹定量法宏观定性定量评价木香顺气丸的质量,进而实现其质量控制。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100型高效液相色谱仪(含DAD检测器、四元低压梯度泵、在线脱气和自动进样装置及Chem-Station工作站,美国Agilent公司);KDM型控温电热套(山东鄄城华鲁仪器公司);BS110S型分析天平(北京赛多利斯天平有限公司);RE-52型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Bruker IFS55型红外分光光度计(瑞士布鲁克公司)。

1.2 试剂

16批木香顺气丸样品来源见表1。甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂),其他试剂均为分析纯,水为去离子水。

*基金项目:国家自然科学基金[81573586];河北省中医药管理局2013年度中医药类科研计划课题[2013007]。

第一作者:王玲娇,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药质量控制,(电子信箱)327239256@qq.com。

△通信作者:于静,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药质量控制,(电话)0311-85917354。

表1 木香顺气丸厂家、批号及剂型

编号	厂家	批号	剂型	编号	厂家	批号	剂型
S1	哈药集团世一堂制药厂	808704	水丸	S9	广州中一制药有限公司	K00072	水丸
S2	哈药集团世一堂制药厂	811712	水丸	S10	哈药集团世一堂制药厂	0808718	水丸
S3	哈药集团世一堂制药厂	0903703	水丸	S11	哈药集团世一堂制药厂	0809709	水丸
S4	哈药集团世一堂制药厂	0904709	水丸	S12	山东三九药业有限公司	0902024	水丸
S5	山东三九药业有限公司	0810102	水丸	S13	石家庄海天药业有限公司	20080401	水丸
S6	山东三九药业有限公司	811064	水丸	S14	石家庄海天药业有限公司	20080601	水丸
S7	河南百年康鑫药业	20080507	水丸	S15	承德颈复康药业有限公司	080914	水丸
S8	广州中一制药有限公司	K00081	水丸	S16	广州中一制药有限公司	M00001	水丸

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 UV 光谱条件

光谱管: Agilent 聚四氟乙烯(PTFE)管(600 mm × 0.17 mm); 柱温: (30.0 ± 0.15)℃; 流动相: 甲醇-水(50:50, V/V); 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 0.1 μL; 检测波长: 220 ~ 450 nm(DAD), 数据采集间隔 0.5 nm, 狭缝宽度 1 nm。

2.1.2 IR 光谱条件

波段: 4 000 ~ 400 cm⁻¹; 分辨率: 8 cm⁻¹; 扫描速率: 20 次/s; 升温速率: 2℃/min。

2.2 供试品制备

UV 光谱: 取样品约 6 g, 精密称定, 加入 75% 乙醇 50 mL 回流提取 1.5 h, 滤过, 残渣重复滤过 1 次, 残渣中再加入 95% 乙醇 40 mL 回流 1 h。合并 3 次滤液, 减压浓缩至约 10 mL, 然后用 95% 乙醇定容至 25 mL, 摇匀, 作为供试品溶液。

IR 光谱: 取样品 2 丸, 研磨成粉末, 取 1 ~ 2 mg, 精密称定, 精密称取 150 mg 干燥的 KBr 粉末, 研磨、混匀, 转移至模具中, 在低真空下用约 10 GPa 的压力, 经约 2 min 即可将样品压成透明供试品薄片, 精密称定质量, 于 10 min 内测试。

2.3 IR-UV 光谱定量法原理

选择一固定对照模式(至少平均生成 10 批样品, 也可选用指纹对照品)作评价标准, 分别以 IR 和 UV 光谱各数据点为基础, 分别按公式(1)(2)(3)计算样品的 IR 和 UV 光谱与标准光谱间的宏观定性相似度(S_m)、宏定量相似度(P_m)、均化系数相对偏差(α); 对 IR 和 UV 指纹图谱反映的两类宏观定性定量信息进行等权融合, 计算公

式见(4)(5)(6), 据此建立中药 IR-UV 联用指纹系统等权融合模型。中药 IR 光谱和 UV 光谱突出反映了两类宏观定性定量信息, IR 光谱能检测单键信息, 可补偿 UV 光谱仅能检测不饱和键的不足。这一方法构成了基于中药整体系统化学键振动和价电子跃迁的光谱指纹定量法, 反映的整体定性定量信息明显好于任何单一色谱指纹图谱和单一光谱指纹图谱, 称为中药 IR-UV 联用光谱指纹定量法。据此将中药质量划分为 8 个等级(见表 2)。

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

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

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

$$S_{m-IRUV} = \frac{1}{2}(S_{m-IR} + S_{m-UV}) \quad (4)$$

$$P_{m-IRUV} = \frac{1}{2}(P_{m-IR} + P_{m-UV}) \quad (5)$$

$$\alpha_{IRUV} = \frac{1}{2}(\alpha_{IR} + \alpha_{UV}) \quad (6)$$

2.4 指纹图谱的建立和评价

2.4.1 UV 光谱指纹图谱

1) 方法学考察

精密度试验: 取编号为 S1 的样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液 1 份, 按 2.1.1 项下检测条件连续进样

表2 中药 IR-UV 联用系统指纹定量法划分中药质量等级

参数	I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级	VI 级	VII 级	VIII 级
S_{m-IRUV}	0.95	0.90	0.85	0.80	0.70	0.60	0.50	$S_m < 0.5$
$P_{m-IRUV}(\%)$	95 ~ 105	90 ~ 110	80 ~ 120	75 ~ 125	70 ~ 130	60 ~ 140	50 ~ 150	0 ~ ∞
α_{m-IRUV}	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	0.50	> 0.50
质量	极好	很好	好	良好	中	一般	次	劣

6次,以265 nm波长处木香顺气丸非分离色谱图考察进样精密度。结果其保留时间和峰面积的 RSD 均小于0.3% ($n=6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取编号为S1的样品,按2.2项下方法制备供试品溶液1份,分别于0,2,4,8,12,24 h时按2.1.1项下检测条件进样测定,以265 nm波长处木香顺气丸非分离色谱图考察稳定性。结果保留时间和峰面积的 RSD 分别小于1.0%和3.0% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取编号为S1的样品,按2.2项下方法制备供试品溶液6份,按2.1.1项下检测条件进样测定,以265 nm波长处木香顺气丸分离色谱图考察重复性,结果保留时间和峰面积的 RSD 分别小于1.0%和3.0% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2) 图谱建立

将16批木香顺气丸分别进样检测,记录220~450 nm波长处的在线UV光谱,详见图1。考虑到流动相中甲醇和提取溶剂中乙醇的末端吸收,又由于波长在450 nm后制剂成分基本无吸收,因此确定220~450 nm波长用于鉴定其不饱和成分的含量情况。将样品信号导入自主研发的中药光谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统3.0软件,以各数据点为计量单元按均值法生成对照指纹图谱,并根据系统指纹定量法计算各样品 S_{m-UV} , P_{m-UV} , α_{UV} 值。结果见表3。

3) 图谱整体质量评价(系统指纹定量法)

由表3可知,质量等级从I级到V级分布,来自6个厂家的16批样品的质量出现明显差异,S3,S5,S10

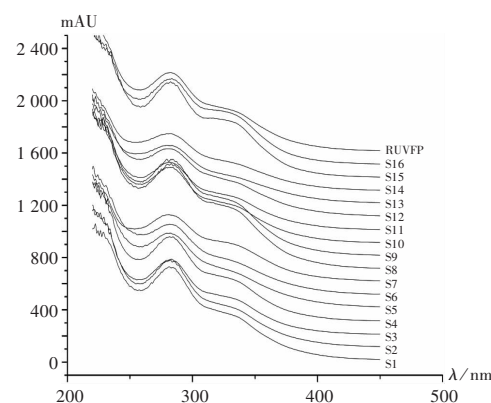


图1 16批木香顺气丸的紫外指纹图谱

为I级,质量极好;S8和S14为V级,质量为中等。所有样品 $S_{m-UV} \geq 0.993$, $73.1\% \leq P_{m-UV} \leq 127.8\%$, $0.001 \leq \alpha_{UV} \leq 0.057$,说明16批样品UV指纹数量和分布比例较相似,但整体含量仍有差异,大部分样品质量等级介于I~III级,仅S8和S14质量等级为V级,究其原因,主要为 P_{m-UV} 值的显著差异,S8 P_{m-UV} 值过高(127.8%),S14 P_{m-UV} 值过低(73.1%),导致这2批次的质量等级为V级。除此之外,来自同一生产厂家的药品质量一致性略有差异,个别厂家甚至差异很大,如S5,S6,S12(山东三九药业有限公司)质量等级相同或相似,分布在I级和II级;S8,S9,S16(广州中一制药有限公司)样品质量等级分别为V级、III级和II级。

2.4.2 IR 指纹图谱

1) 方法学考察

精密度试验:取编号为S1的样品,按2.2项下方法制备供试品1份,按2.1.2项下检测条件连续进样6次,

表3 UV、IR及UV-IR鉴定16批木香顺气丸药材质量等级

样品编号	UV				IR				UV+IR			
	S_{m-UV}	$P_{m-UV}(\%)$	α_{UV}	等级	S_{m-IR}	$P_{m-IR}(\%)$	α_{IR}	等级	S_{m-IRUV}	$P_{m-IRUV}(\%)$	α_{IRUV}	等级
S1	1.000	118.0	0.002	III	0.994	98.9	0.048	I	0.997	108.4	0.023	II
S2	0.999	106.9	0.017	II	0.984	71.6	0.057	V	0.991	89.2	0.020	III
S3	0.999	95.0	0.024	I	0.999	100.7	0.010	I	0.999	97.8	0.017	I
S4	0.998	107.0	0.017	II	0.999	124.9	0.001	IV	0.999	115.9	0.008	III
S5	0.997	95.6	0.004	I	1.000	96.7	0.002	I	0.998	96.2	0.003	I
S6	0.998	94.8	0.007	II	0.996	96.0	0.030	I	0.997	95.4	0.011	I
S7	0.996	87.7	0.033	III	0.986	127.1	0.008	V	0.991	107.4	0.012	II
S8	0.995	127.8	0.014	V	0.992	77.3	0.039	IV	0.994	102.6	0.026	I
S9	0.998	117.0	0.048	III	0.999	88.1	0.017	III	0.999	102.6	0.003	I
S10	1.000	98.5	0.057	I	0.998	105.5	0.006	II	0.999	102.0	0.011	I
S11	0.999	88.4	0.010	III	0.999	76.8	0.008	IV	0.999	82.6	0.008	III
S12	0.998	93.5	0.001	II	0.983	164.6	0.074	VIII	0.991	129.0	0.035	V
S13	0.994	80.9	0.002	III	0.999	92.6	0.016	II	0.996	86.8	0.005	III
S14	0.998	73.1	0.030	V	0.996	88.2	0.036	III	0.997	80.7	0.020	III
S15	0.993	107.2	0.008	II	0.999	84.8	0.018	III	0.996	96.0	0.009	I
S16	0.997	105.6	0.039	II	0.999	101.7	0.011	I	0.998	103.6	0.009	I

记录光谱图,导入中药光谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0 软件。结果 $S_{IR} \geq 0.990$ 且 $RSD = 0.23\%$ ($n = 6$),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取编号为 S1 的样品,按 2.2 项下方法制备供试品 1 份,分别于 0,1,2,3,4,6 h 时按 2.1.2 项下检测条件进样测定,记录光谱图,导入同一软件。结果 $S_{IR} \geq 0.990$ 且 $RSD = 0.15\%$ ($n = 6$),表明供试品溶液在 6 h 内稳定性良好。

重复性试验:取编号为 S1 的样品,按 2.2 项下方法平行制备供试品 6 份,按 2.1.2 项下检测条件进样测定,记录光谱图,导入同一软件,结果 $S_{IR} \geq 0.990$ 且 $RSD = 0.36\%$ ($n = 6$),表明方法重复性良好。

2) 图谱建立

将 16 批样品分别进行 IR 光谱检测,记录 400 ~ 4 000 nm 波长处的中药 IR 光谱,详见图 2。将样品信号导入同一软件,以各数据点为计量单元按均值法生成对照指纹图谱,并根据系统指纹定量法计算各样品 S_{m-IR} , P_{m-IR} 和 α_{IR} 值。结果见表 3。

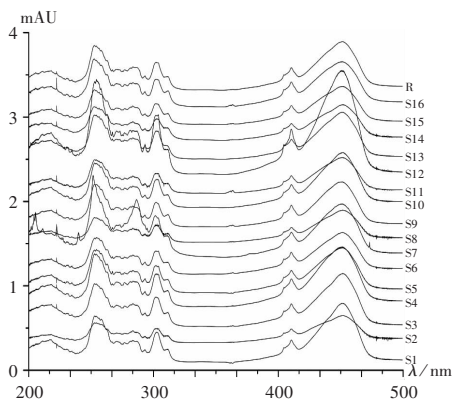


图 2 16 批木香顺气丸红外光谱图

3) 图谱整体质量评价(系统指纹定量法)

由表 3 可知,各个样品之间质量差异很大,质量等级最好为 I 级,最差的达Ⅷ级,S1,S3,S5,S6,S16 为 I 级;S10 和 S13 为 II 级;S9,S14,S15 为 III 级;S4,S8,S11 为 IV 级;S2 和 S7 为 V 级;S12 为Ⅷ级。所有样品 $S_{m-IR} \geq 0.983$, $71.6\% \leq P_{m-IR} \leq 164.6\%$, $0.001 \leq \alpha_{IR} \leq 0.074$,说明 16 批样品 IR 指纹数量和分布比例相似,但指纹整体含量存在显著差异。S12 因 P_{m-IR} 值过高(164.6%),未达到合格要求;而 S2 因 P_{m-IR} 值过低(71.6%),质量评价为中等。

2.4.3 IR-UV 联用评价木香顺气丸质量

根据公式(4)(5)(6)对 UV 指纹图谱和 IR 指纹图谱分析结果进行整合,用光谱指纹定量法鉴定 16 批木香顺气丸质量。结果见表 3。16 批样品 $S_{m-IRUV} \geq 0.991$,表明 16 批木香顺气丸的化学成分的种类和分布比例十分相似。S3,S5,S6,S8,S9,S10,S15,S16 质量为极好

(I 级),S1 和 S7 质量为很好(II 级),S2,S4,S11,S13,S14 质量为好(III 级),S12 质量为中等(V 级)。

2.4.4 不同分析方法评价结果比较

由图 3 可知,16 批样品在不同分析方法下的质量等级评定结果不同。如 S12 在 UV 光谱指纹图谱、IR 光谱指纹图谱和整合法时质量等级分别为 II 级、Ⅷ级和 V 级。采用 IR 和 UV 指纹图谱分别计算 16 批木香顺气丸的 S_m 均不低于 0.99,2 种方法均证明,各批样品化学成分种类和分布比例都十分相似,由于 IR 和 UV 光谱检测原理的显著不同,导致宏定量相似度 P_m 差异很大。上述不同分析方法的定量相似度见图 4。

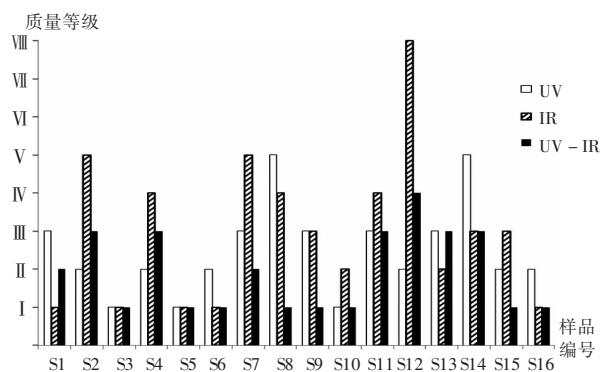


图 3 不同评价方法得到的样品质量等级

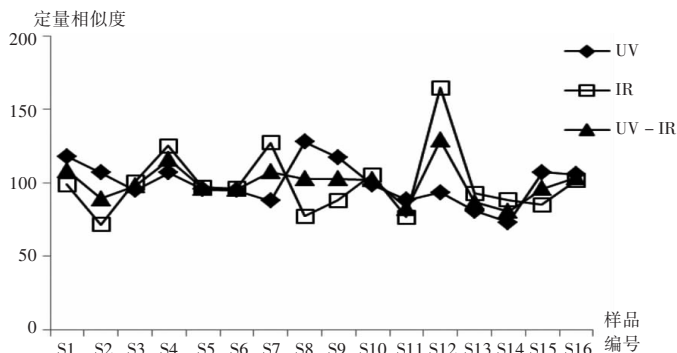


图 4 不同评价方法得到的样品定量相似性结果

3 讨论

中成药化学成分非常复杂,单一地采用 UV 或近 IR 分析技术分析时,并不能真实全面地反映中药的质量。本研究中以 IR 检测单键信息,以弥补 UV 仅能检测不饱和键的不足,实现了 IR-UV 联用对木香顺气丸进行整体定性和整体定量的快速鉴定,基于光谱学的简单、快捷并在多组分未分离的情况下得到整体的数据来区别中成药的质量等级,试图全方位、多角度揭示中药复杂的特征,为其质量控制提供新思路。由于中药信息的量大及不确定性可能会使制剂的质量等级在不同分析方法中发生较大差异,多种分析方法的联合或许能进一步缩小误差,从而使试验结果更接近中药的真实质量。但光谱指纹图谱不能揭示药物确定的有效成分,也不能解释生物活性成分和质量等级的相关性,因此结合中药