

淫羊藿药材 HPLC 指纹图谱的勾兑研究

王彬¹, 黄河舟², 朱臻宇², 张海¹, 纪松岗³, 柴逸峰² (1. 东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433 3. 中国人民解放军第 401 医院, 山东 青岛 266071)

摘要 目的: 在中药 HPLC 指纹图谱数据的基础上, 对不同来源的中药淫羊藿原药材进行了勾兑研究, 寻找提高药材指纹图谱相似度, 稳定药材质量的新途径。方法: 以道地药材为勾兑目标, 药材的夹角余弦相似度为评价指标, 使用系统优化的勾兑比例投料进行勾兑实验, 采集勾兑药材的 HPLC 指纹图谱。结果: 勾兑后, 药材与道地药材的相似度评价结果明显提高, 与理论计算的结果一致。结论: 相似度差异较大的不同批次中药材通过基于中药指纹图谱的勾兑, 相似度评价得到提高, 为中药原药材的充分利用提供了新的参考方法。

关键词 勾兑; 中药材; 淫羊藿; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2008)06-0432-04

Blending of crude *Epimedium Brevicornum* according to their HPLC fingerprints

WANG Bin¹, HUANG He-zhou², ZHU Zhen-yu², ZHANG Hai¹, JI Song-gang³, CHAI Yi-feng² (1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China)

ABSTRACT Objective: To find a new way of improving the quality of TCM, blendings of crude *Epimedium Brevicornum* from various sources were studied according to their Fingerprints. **Methods:** Systematic optimization was adopted to determine the mixing ratio of different kinds of non-genuine crude drugs in order to maximize the similarity, which is based on the cosine value between the fingerprints of genuine and non-genuine crude drugs respectively. Fingerprints data were collected after the blending. **Results:** The similarity of drugs was improved evidently, and it was in accordance with the calculation result. **Conclusion:** Quality improvement of TCM can be made by blending. Optimized blending of crude drugs might be an efficient method in making full use of the relatively inadequate TCM resources.

KEY WORDS blending; TCM; *Epimedium Brevicornum*; fingerprinting

中药的勾兑是指将不同批次的药材按照一定比例重新进行组合, 进而调整控制药材中各种成分之间比例的过程。这种组合和调整多数属于物理变化的范畴。目前已有的勾兑研究基本基于酒类生产进行, 通过不同批次原酒的勾兑生产出出色香味合格的成酒。白酒的勾兑调味技术, 是我国劳动人民在长期酿酒实践中积累、总结和发展起来的一项主要生产技术, 在中国白酒色、香、味等典型风格的形成中起着关键作用。

与酒类的生产状况类似, 不同批次的药材药效成分含量亦各有差异。如淫羊藿原药材, 有的药材淫羊藿苷含量较高, 有的则低于药材标准; 其他许多中药材亦存在这种状况。而药材中药效成分的多少及各成分之间的比例关系都影响到药材的质量。若

能对药材进行勾兑则可以取长补短, 使含量高的药材与含量低的药材相互搭配, 有可能成为成分含量或比例合格的药材^[1]。

此外, 有的批次药材中含有较高浓度的非药效成分而不能作为合格药材使用, 如不利用, 会造成较大的经济损失。使用其它批次该成分含量较低的药材进行勾兑以后, 可以将该成分稀释到合格范围以内。

本文在中药材淫羊藿 HPLC 指纹图谱研究的基础上, 尝试通过勾兑实验探索提高药材质量的可能。具体将以一种道地药材为勾兑目标, 通过系统优化确定勾兑比例, 选择合适的药效成分进行指纹图谱相似度计算, 作为勾兑效果的衡量指标。

1 方法原理

按照中药原药材 HPLC 指纹图谱的进行的勾兑主要是基于每种成分 HPLC 峰面积含量的线性加和性, 如下面公式所示:

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BA108B03-07)。

作者简介: 王彬(1979-), 男, 药师。

通讯作者: 柴逸峰. Tel: (021) 25070373, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

$$S = \sum_i b_i \times S_i$$

S 为勾兑后某一成分的峰面积含量, S_i 为勾兑前每批次药材中该成分的峰面积含量, b_i 为每批次药材的勾兑比例。按照一定比例勾兑后的药材, 其每一成分 HPLC 指纹图谱峰面积含量为参与勾兑各药材该成分峰面积含量的比例加和。这里的峰面积含量系指成分 HPLC 色谱峰面积与取样量的比值 (峰面积含量 = $\frac{\text{峰面积}}{\text{样品取样量(g)}}$)。

勾兑后的药材, 其质量以中药 HPLC 指纹图谱相似度指标进行评价。国家药典委员会最新版本的中药指纹图谱相似度计算软件所确定的相似度算法为夹角余弦算法。该算法将中药材样品的 HPLC 指纹图谱各成分色谱峰面积按照保留时间进行匹配后形成一个多维的样本向量, 向量的每一维为一种成分的色谱峰面积。两个样本向量 ρ_q, ρ_d 之间的夹角余弦相似度计算公式为:

$$\text{CosSim}(\rho_q, \rho_d) = \frac{\sum_{i=1}^n q_i \times d_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n q_i^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n d_i^2}}$$

其中 q_i, d_i 为样本向量每一维的值, n 为向量的维数, 对应药材样本中总的成分数。

中药 HPLC 指纹图谱相似度评价指标, 就是测试药材样品与合格的样本药材样品之间的 HPLC 指纹图谱相似度计算结果。勾兑的最终目的就是通过相似度评价不合格的药材的组合, 得到指纹图谱相似度尽可能大, 直至合格的药材。

2 材料与方法

2.1 实验仪器与试剂 Agilent 1100 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器, 美国); SB3200-T 型超声仪(上海必能胜超声有限公司); 80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

淫羊藿去根药材: 第二军医大学药学系生药教研室孙连娜副教授提供。药材来源及编号为: 01, 购自安徽; 02, 购自陕西; 03, 购自甘肃; 04, 采自四川; 05, 购自四川。

乙腈: 色谱纯; 甲酸: 分析纯; 纯化水。

2.2 实验条件 参考《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》, 确定了药材提取条件和 HPLC 检测条件, 并进行了精密性、重复性、重现性等方法学考察。

药材按《中国药典》2005 版一部规定进行了干燥, 粉碎, 过筛等预加工。

2.2.1 淫羊藿药材提取条件 取淫羊藿药材粉末约 0.2 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇(体积比) 20 mL, 密塞称定重量。超声处理 30 min, 放置冷却至室温称定重量, 以 70% 乙醇补足失重。3 000 转离心 10 min 后取上清液, 微孔滤膜过滤, 取续滤液为供试品溶液。

2.2.2 HPLC 色谱条件

色谱柱: 迪马 Diamonsil-C18 柱(填料粒度 5 μm , 4.6 \times 250 mm, Dikma); 流动相: 乙腈和纯化水(甲酸调节 pH 至 3.0), 梯度洗脱(梯度洗脱程序见表 1); 流速: 0.9 mL/min, 采集 60 min 内色谱图; DAD 检测器检测波长: 270 nm; 进样量: 20 μL 。

表 1 中药淫羊藿 HPLC 检测梯度洗脱程序

时间(min)	0	3	20	35	43
乙腈比例(%)	25	25	30	45	73

2.3 样品测定 样品按照 2.2.1 项下方法提取后制成供试品溶液, 按照 2.2.2 项下色谱条件采集 HPLC 色谱图, 每批样品各进样 20 μL , 重复进样 3 次, 记录工作站积分数据, 并计算峰面积含量:

作为初步研究, 勾兑时使用了淫羊藿药材中 4 个主要黄酮成分(表 2)。

表 2 参与勾兑的淫羊藿成分

勾兑组分	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷
保留时间(min)	17.9	19.2	20.3	22.5

在 2.2.2 项下的 HPLC 条件下, 所选择的成分均能基线分离。

2.4 勾兑实验

2.4.1 勾兑比例(质量比)确定 每份样品采集的指纹图谱均与 4 号样品计算相似度。以勾兑后样品与 4 号药材的相似度为响应函数, 使用改良型单纯形法^[3]对 1、2、5 号药材的比例进行了系统优化计算。

2.4.2 勾兑提取实验及结果 根据 2.4.1 项下确定的优化的药材勾兑比例配制药材, 精密称定 2 号药材 0.165 7 g, 5 号药材 0.034 6 g, 合并后以 2.2.1 项下方法进行提取, 得勾兑样品。经 2.2.2 项下 HPLC 检测获取勾兑样品指纹图谱, 记录色谱图中参与勾兑组分的峰面积, 并计算峰面积含量: 峰面积含量 = $\frac{\text{峰面积}}{\text{样品取样量(g)}}$ 。

以指纹图谱工作站与勾兑对象(4 号样品)进行相似度计算(表 3)。

表3 淫羊藿勾兑实验结果

样品号	峰面积				相似度
	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	
1号	2 115	10 420	3 710	11 805	0.830 1
2号	1 112	1 448	844	3 017	0.897 3
3号	1 246	1 943	6 012	7 317	0.999 0
4号	1 627	2 246	7 202	9 546	1.000 0
5号	1 278	1 615	11 876	4 030	0.831 5
勾兑后峰含量计算值	1 141	1 480	2 745	3 194	0.980 2
勾兑后峰含量	1 044	1 507	2 654	3 075	0.978 9

3 结果讨论

3.1 勾兑组分的选取 现代药理研究表明淫羊藿药材有效成分主要为淫羊藿苷、淫羊藿总黄酮及多糖^[2]。由于本研究主要考察淫羊藿药材 70% 乙醇超声提取物勾兑,其主要成分为淫羊藿黄酮,故勾兑组分选择淫羊藿总黄酮中丰度相对较高的组分。五批药材的 HPLC 色谱图经计算后得到朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷的峰面积百分比,见表 4。

表4 样品主要黄酮成分 HPLC 峰面积含量(%)

药材批号	朝藿定 A	朝藿定 B	朝藿定 C	淫羊藿苷	总计
1号	6.4	32.1	11.5	36.4	86.4
2号	9.9	13.3	7.7	27.8	58.7
3号	5.2	8.3	25.8	31.3	70.5
4号	6.0	8.5	27.5	36.1	78.1
5号	5.5	6.9	51.7	17.5	81.6
平均	6.6	13.8	24.8	29.8	75.1

结果表明,四个组分的峰面积丰度在 58% ~ 86% 之间,平均丰度为 75.1%,可以认为包含了主要的黄酮类药效成分,基本可以反映药材的质量。作为中药指纹图谱勾兑的初步研究,本部分仅对勾兑的方法与效果进行考察,更多成分的勾兑与此类似。因此,最终确定表 4 所列四中黄酮成分作为勾兑计算的基础。

3.2 参与勾兑药材对象的选取 4号样品采自四川,经第二军医大学药学院生药教研室鉴定为四川巫山淫羊藿,文献认为可作道地药材使用^[4],故选其为勾兑的对象。从指纹图谱相似度的计算结果来看(表 4),其他四个批次药材中除 3号药材与 4号药材的相似度较高(为 0.999 0)外,其他三个批次的药材相似度不是很理想,均在 0.9 以下。为了使结果更有意义,选择参与勾兑的药材为相似度较低的 1、2、5号药材。

3.3 勾兑效果评价指标的确定 基于中药材指纹图谱的勾兑,其主要目的是通过勾兑使药材中尽可

能多的药效成分之间的相对比例趋于稳定。有效成分之间的相对比例得到保证之后,才可以使药材提取物的质量得到保证。对于有效成分含量相对较低的药材,虽然提取物的得率相对较低,但由于各组分的相对比例稳定,仍然可以作为合格的药材。中药指纹图谱相似度的采用夹角余弦算法进行计算,主要考虑了药材中各种成分的相对比例因素,而对药材中各成分的绝对含量并无要求,符合药材勾兑生产的需求。因此选择药材提取物的 HPLC 指纹图谱相似度对不同批次药材勾兑后的效果进行评价。

3.4 勾兑比例的确定 勾兑比例是指参与勾兑的各批次药材投料的相对比例,该比例的确定是中药指纹图谱勾兑研究的最终目的。基于前面对勾兑方法和勾兑评价指标的确定,最佳的勾兑比例应该可以使指纹图谱中主要成分的相对峰面积比例达到稳定,勾兑后的药材与道地药材 HPLC 指纹图谱相似度才能达到最佳。因此,勾兑比例的确定过程实际上是一个系统优化过程,其考察因素为参与勾兑的各批次药材的投料比例,评价指标为勾兑后药材与道地药材 HPLC 指纹图谱之间的相似度。

本研究使用了改良型单纯形法对该比例的选取进行了优化,经自编软件计算确定的最佳投料比例为药材 1 : 2 : 5 = 0.000 3 : 0.827 4 : 0.172 3。在误差允许范围内,1号药材投料量可以忽略。

3.5 勾兑药材 HPLC 指纹图谱相似度评价结果 理论计算该投料比例下勾兑药材与道地药材 HPLC 指纹图谱的相似度为 0.980 2。经实验获取该投料比例下提取物的 HPLC 指纹图谱并计算相似度,结果为 0.978 9,与理论预测结果吻合。表明该方法可以应用于实际勾兑。

3.6 勾兑中应考虑的其他问题 与酒类的勾兑类似的是,在中药材的勾兑过程中还应注意以下一些问题:

① 药材经勾兑后仅与道地药材的相似度提高,亦即提高了原药材质量控制中的的指纹图谱相似度指标。其他的质量控制指标如杂质限量等指标亦需同时合格方可作为合格的原药材进行使用^[5]。

(下转第 456 页)

$$= V_{\text{供试品}} \times (\rho_{\text{供试品}} - 0.9982)$$

$$V_{\text{供试品}} = \Delta / (\rho_{\text{供试品}} - 0.9982)$$

由于 $\rho_{\text{供试品}} = W_{\text{供试品}} / V_{\text{供试品}}$

$$\text{故 } \rho_{\text{供试品}} = W_{\text{供试品}} / [\Delta / (\rho_{\text{供试品}} - 0.9982)]$$

$$= W_{\text{供试品}} \div \Delta \times (\rho_{\text{供试品}} - 0.9982)$$

$$\rho_{\text{供试品}} \times \Delta = W_{\text{供试品}} \times \rho_{\text{供试品}} - W_{\text{供试品}} \times 0.9982$$

经移项,整理,使得:

$$\rho_{\text{供试品}} \times (W_{\text{供试品}} - \Delta) = W_{\text{供试品}} \times 0.9982$$

于是 $\rho_{\text{供试品}} = W_{\text{供试品}} \times 0.9982 \div (W_{\text{供试品}} - \Delta)$

$$= W_{\text{供试品}} \times 0.9982 \div [W_{\text{供试品}} -$$

$$(W_{\text{瓶+水+供试品}} - W_{\text{瓶+水}})] \text{ 即为(1)式}$$

3 结果与讨论

3.1 精密称取的供试品须全部装入比重瓶中,调整温度和加水时务须装满瓶子,不得留有气泡或空隙。如供试品为片状或块状,不能直接装入瓶中时,可事先研碎或裁剪成适宜大小,称量,全部装入瓶中;如供试品为细粉,则在装入瓶中和加水后须充分振摇以彻底排除所附着的气泡。本法适用于内部致密、且具有固定体积的固体药品,对于很细的粉末,由于气泡不易完全排除,故不宜使用。

3.2 本法适用于不溶于水的固体物质。如供试品溶于水,则应选用不相溶且已知密度的溶剂代替水,同时将(1)式中的0.9982改为该溶剂在20℃时的

密度。

3.3 本法适用于密度大于水的固体药品或药品包装材料如PVC固体药用硬片等。如供试品的密度小于水,则宜选用某些密度大于该供试品、且已知其密度的适宜溶剂。

3.4 PVC固体药用硬片的密度应为1.35~1.45 g/cm³[5]。我们利用本法测定3批硬片供试品并与法定法[4]作比较,结果如下:以法定法测得其密度为:1.3637(批1)、1.3673(批2)、1.3600(批3)(均为二次测定结果的平均值)。

同时按本法分别对上述3批供试品平行测定3次,测得的密度平均值为:1.3640(批1, RSD:0.12%)、1.3669(批2, RSD:0.19%)、1.3606(批3, RSD:0.09%)。

二法测定结果基本相符,且本法测定的RSD<0.2%,表明其准确度和精密度均较良好。

参考文献:

- [1] USP(美国药典)[S], 29(2006), Appendix:699, 841.
- [2] ChP(2005) Vol. II(中国药典2005年版, 二部)[S], 附录VI A:36~37.
- [3] Eur. Ph.(欧洲药典)[S], 5(2005), Vol. I, 2.2.5:27~28.
- [4] 中国国家食品药品监督管理局, 国家药品包装容器(材料)方法标准[S], YBB 00262004 密度测定法.
- [5] 中国国家食品药品监督管理局, 国家药品包装容器(材料)标准[S], YBB 0021-2005 聚氯乙烯固体药用硬片.

收稿日期:2008-05-04

(上接第434页)

② 药材生产中的实际勾兑应尽可能考虑经济效益。参与勾兑的原药材应尽可能节约量少、质高批次的药材,使价值高的药材尽可能得到充分的利用,减少药材的浪费。合理的中药原药材勾兑不但可以保证原药材的质量,而且从企业库存药材的实际量出发,通过合理组合,可以创造出更高的经济效益。因此在优化勾兑比例时可以考虑使参与勾兑的原药材总量(或价值)在勾兑优化的响应函数中得以体现。这方面的内容将在后续的研究中进行。

4 结论

4.1 结合中药材HPLC指纹图谱数据开展了淫羊藿原药材勾兑研究,药材勾兑后,经提取、采集HPLC指纹图谱并进行相似度评价,结果与道地药材的相似度明显提高,表明该方法可以作为提高中药材质量的有效途径。

4.2 使用改良型单纯形法,以勾兑后药材与道地药材的相似度作为响应函数,对淫羊藿药材的勾兑比例进行了优化。预测的最佳勾兑比例下的相似度评价结果与实验分析结果一致。

4.3 研究选取了淫羊藿药材中4个黄酮类主要成分参与淫羊藿原药材相似度计算,进行勾兑方法研究,研究方法具有较强的可扩展性,可以适用于更多成分直至所有成分的勾兑研究。

参考文献:

- [1] 陈靖显. 黄酒勾兑(一)[M]. 酿酒科技, 2004, (121):111.
- [2] 王昌林, 李 昱, 王粤新. 淫羊藿及其有效成分的药理研究概况[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(3):183.
- [3] 相秉仁. 计算药理学[M]. 中国医药科技出版社, 1990:199.
- [4] 郭宝林, 肖培根. 四川产淫羊藿属植物的黄酮类成分分析[J]. 华西药理学杂志, 1996, 11(2):75.
- [5] 于 晓, 王升亮, 胡 军, 等. 白酒勾兑优化模型的研究[J]. 计算机应用研究, 1995, (2):63.

收稿日期:2008-09-08