

中药色谱指纹图谱相似度计算中保留时间校正方法的研究

柴逸峰^{*1,2} 罗国安² 乔善磊¹ 朱臻宇¹ 陆 峰¹ 王建军¹

¹(第二军医大学药学院, 上海 200433) ²(清华大学化学系, 北京 100084)

摘 要 从保留时间校正方法对线性推移、非线性推移和时间延迟的校正效果方面探讨了保留时间校正方法的适用范围。认为一点法校正仅能校正线性推移; 两点法可以校正时间延迟和线性推移, 并能部分校正非线性推移。多点法使用分段线性逼近的方法对非线性推移有良好的校正效果。

关键词 中药, 色谱指纹图谱, 保留时间, 校正方法, 相似度

1 引 言

中药色谱指纹图谱技术是中药质量控制的有效解决方案, 其中相似度计算被认为是能够客观、全面的反映中药色谱指纹图谱之间的相似情况的有效评价手段。依据《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》^[1], 保留时间是色谱峰定性的依据, 即具有相同(或差异未超过阈值)保留时间的色谱峰被认为是同一物质的色谱峰。当色谱峰保留时间发生推移时, 将导致匹配错误, 从而造成相似度计算结果不可靠, 因此需要对保留时间进行校正。

保留时间校正的实质, 是根据各图谱中某些相同成分的色谱峰位置对图谱进行伸缩和平移操作^[2]。曾有文献[3~6]采用基于光谱相关色谱(二维信息)方法对中药色谱指纹图谱的组分相关性进行判断, 得到了较好的处理保留时间推移的效果。本研究以色谱一维信息为对象, 分别采用和提出一点法、两点法和多点法校正方法对造成保留时间推移的 3 种作用: 保留时间的线性推移、时间延迟的存在和保留时间的非线性推移等的影响进行了讨论和比较。

2 原理部分

2.1 保留时间校正方法

2.1.1 一点校正法 在每张指纹图谱上选择一个峰作为保留时间校正峰, 第 i 张图谱的保留时间校正峰的调整保留时间记作 $\bar{t}_m$, 计算其均值 $\bar{t}_m$, 第 i 张指纹图谱上的第 k 个峰的调整保留时间记为 t_{ik} , 第 k 个峰的校正后调整保留时间记为 t'_{ik} , 则:

$$t'_{ik} = \frac{t_{ik}}{\bar{t}_m} \cdot \bar{t}_m \quad (1)$$

2.1.2 两点校正法 在每张指纹图谱上选择两个峰作为保留时间校正峰, 第 i 张图谱上的两个保留时间校正峰分别记作 t_{m1} 、 t_{m2} , 计算所有指纹图谱上的保留时间均值 $\bar{t}_{m1}$ 和 $\bar{t}_{m2}$; 第 i 张指纹图谱上的第 k 个峰, 其校正前的保留时间记作 t_{ik} , 校正后的保留时间记作 t'_{ik} , 则:

$$t'_{ik} = \bar{t}_{m1} + (t_{ik} - t_{m1}) \frac{\bar{t}_{m2} - \bar{t}_{m1}}{t_{m2} - t_{m1}} \quad (2)$$

2.1.3 多点校正法 在每张指纹图谱上选择 n 个保留时间校正峰, 分别计算其保留时间均值。对于第 i 组保留时间校正峰, 其平均保留时间记作 $\bar{t}_i$; 对于一张需要校正的指纹图谱, 其第 i 个保留时间校正峰的保留时间记作 t_i ; 对于一个待校正峰, 其保留时间为 t , 若 $t_i < t \leq t_{i+1}$, 则其校正后的保留时间 t' 为:

$$t' = \bar{t}_i + (t - t_i) \frac{t_{i+1} - \bar{t}_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (3)$$

对于 $t \leq t_i$, 取 $i = 1$; 对于 $t > t_n$, 取 $i = n - 1$ 。

2004-11-12 收稿; 2005-04-28 接受

本文系上海市科委重点科技项目 (No. 03DZ19548)

2.2 3种校正方法对时间延迟的影响

对于两点校正法与多点校正法,如果第 i 张指纹图谱的采样滞后于进样,其滞后时间为 t_d ,该张图谱发生延迟前的第 k 个峰的保留时间为 t_{ik} ,延迟后的保留时间记作 t_{ikd} ,则 $t_{ikd} = t_{ik} - t_d$, $t_{m1d} = t_{m1} - t_d$,时间参照峰的平均保留时间发生了 t_d/n 的延迟 (n 为指纹图谱数目)。若延迟前的校正保留时间为 t'_{ik} ,延迟后的校正保留时间为 t'_{ikd} ,则:

对于发生延迟的图谱 i ,延迟前的校正结果 t'_{ik} 由公式 (2) 计算。

发生延迟后的校正结果为:

$$t'_{ikd} = \left(\bar{t}_{m1} - t_d / n \right) + \left[(t_{ik} - t_d) - (t_{m1} - t_d) \right] \frac{(\bar{t}_{m2} - t_d / n) - (\bar{t}_{m1} - t_d / n)}{(t_{m2} - t_d) - (t_{m1} - t_d)} \quad (4)$$

$$t'_{ikd} = t'_{ik} - t_d / n \quad (5)$$

对于未发生延迟的图谱 l ,延迟前的校正结果为:

$$t'_{lk} = \bar{t}_{m1} + (t_{lk} - t_{m1}) \frac{\bar{t}_{m2} - \bar{t}_{m1}}{(t_{m2} - t_{m1})} \quad (6)$$

发生延迟后的校正结果为:

$$t'_{lkd} = \left(\bar{t}_{m1} - t_d / n \right) + (t_{lk} - t_{m1}) \frac{(\bar{t}_{m2} - t_d / n) - (\bar{t}_{m1} - t_d / n)}{t_{m2} - t_{m1}} \quad (7)$$

$$t'_{lkd} = t'_{lk} - t_d / n \quad (8)$$

发生延迟图谱的某峰与未发生延迟图谱上某峰的距离为:

$$t'_{ikd} - t'_{lkd} = (t'_{ik} - t_d / n) - (t'_{lk} - t_d / n) = t'_{ik} - t'_{lk} \quad (9)$$

可见保留时间发生的延迟只是影响了平均保留时间同方向等距离 (t_d/n) 的移动的变化,对色谱峰的相对位置没有影响,也即对使用保留时间进行峰匹配没有影响。

对于一点校正法,在某图谱发生延迟后,发生延迟图谱上的某峰与未发生延迟图谱上某峰的距离为(推导从略):

$$t'_{ikd} - t'_{lkd} = \frac{t'_{lk} - t_d}{t'_{m1} - t_d} \cdot \left(\bar{t}_m - t_d / n \right) - \frac{t_{lk}}{t_{m1}} \cdot \left(\bar{t}_m - t_d / n \right) \quad (10)$$

可见,保留时间延迟前后的色谱峰的相对位置会发生改变。一点校正法无法校正时间延迟带来的影响。

3 实验部分

3.1 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱仪, 515 泵, 996 二极管阵列检测器, Millennium³² 软件 (美国 Waters 公司)。甲醇 (色谱纯), 石油醚 (分析纯), 二次蒸馏水。丹参酮 A 对照品 (供含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 批号 0766-200011)。样品: 1~8 号丹参 (*S. miltiorrhiza* Bge) 药材分别采自辽宁凌源、河北行塘、山东平邑、河南灵宝、陕西蒲城、四川中江、安徽亳州、上海崇明 (均采于 1999 年, 由本院生药学教研室陈万生副教授鉴定)。图谱保留时间校正和相似度计算使用第二军医大学和清华大学联合开发的“中药指纹图谱工作站”软件进行。

3.2 实验方法

3.2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 大连依利特分析仪器有限公司制造; 流动相: 乙腈-25 mmol/L 磷酸二氢钠 (磷酸调 pH 至 3.2), 梯度洗脱程序为 0~22 min, 乙腈的体积分数由 42% 线性增至 47%; 22~60 min, 乙腈由 47% 线性增至 65%; 60~65 min, 乙腈保持 65%; 65~70 min, 乙腈由 65% 线性减至 42%。流速 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30℃。

3.2.2 溶液的配制 取丹参酮 A 对照品 5 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加少量氯仿溶解, 再加甲醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得每 1 mL 中含丹参酮 A 100 μg 的对照品溶液。取丹参粉末约 1 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加入石油醚 (60~90℃)

150 mL,置水浴上加热回流 6 h,放冷,滤过,滤液置 250 mL 烧瓶中,用石油醚洗涤残渣与滤纸,洗液滤入同一烧瓶中,将滤液减压浓缩至近干,以甲醇溶解转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀即得供试品溶液。

3 2 3 样品测定 分别精密量取对照品溶液及供试品溶液(进样前将溶液过 0.45 μm 微孔滤膜)各 20 μL,注入高效液相色谱仪,使用前述色谱条件分析。

4 结果与讨论

4 1 一点法和二点法对丹参脂溶性指纹图谱的校正结果的比较

对于不同产地的丹参,尽管固定了实验条件(固定色谱柱、固定仪器条件、固定色谱条件、固定操作人员),但色谱峰的保留时间仍出现如图 1 所示的较大推移,使得利用保留时间进行峰匹配的操作无法得到可信结果,从而导致相似度计算结果不可信。

经过一点法校正后(图 2a),各产地丹参的指纹图谱的色谱峰的保留时间得到一定的校正,但结果仍有较大偏差,相似度计算结果仍不可靠。

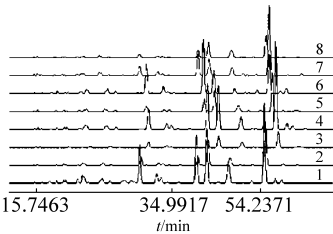


图 1 不同产地丹参脂溶性成分指纹图谱
Fig 1 The lipid soluble component fingerprint of different Radix Salviae miltiorrhizae samples

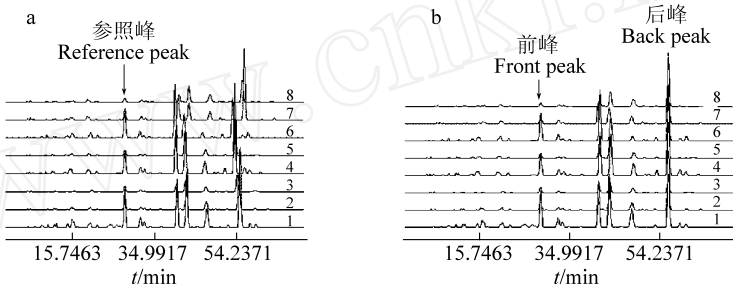


图 2 一点法(a)和二点法(b)校正保留时间后的图谱
Fig 2 The corrected chromatogram by single-point formula (a) and dual-point formula (b)

两点法校正保留时间后(图 2b),可以明显看出,保留时间得到了良好的校正,已经可以达到色谱峰自动匹配的要求,得到了较可靠的相似度计算结果(表 1),能够真实反映样品间的相似情况。当存在保留时间推移时,如果不经保留时间校正,计算结果无法反映样品间的相似情况。因此,对存在保留时间推移的色谱图,必须进行保留时间校正。柱温、流速的改变,都会造成色谱保留时间的线性推移,上述 3 种校正法对保留时间线性推移都有良好的校正效果。

表 1 使用两点法校正后的指纹图谱相似度计算结果
Table 1 The fingerprint similarity after dual-point formula correction

	1	2	3	4	5	6	7	8	特征指数 Characteristic fingerprints
1	1								0.9920
2	0.9562	1							0.9767
3	0.9872	0.9777	1						0.9884
4	0.9823	0.9637	0.9713	1					0.9946
5	0.9667	0.9906	0.9828	0.9811	1				0.9873
6	0.9298	0.8045	0.8697	0.9220	0.8409	1			0.9084
7	0.9114	0.9609	0.9184	0.9577	0.9577	0.8085	1		0.9502
8	0.9560	0.9821	0.9857	0.9496	0.9844	0.7980	0.9226	1	0.9705

两点(多点)校正方法可以消除进样时间和开始采样时间不同步造成的影响;可以消除死时间对匹配的影响,故在使用多点法校正保留时间时没有必要测定死时间。使用两点法校正保留时间时,没有必要再对图谱进行保留时间轴方向的平移操作,但一点法校正无此特点。

两点法一般在同色谱柱情况下能够得到较好的校正结果。但当使用不同的色谱柱时,保留时间非线性的推移情况更加严重,使用更多的保留时间校正峰(多点校正法)能够更有效的对指纹图谱的保留时间进行校正,有利于提高色谱峰自动匹配结果的可靠性,从而提高指纹图谱的相似度计算结果的可靠性。

4.2 指纹图谱校正方法的实用性

一点法、两点法和多点法都可以校正指纹图谱的线性推移。

一点法校正会受到时间延迟的影响,而两点法和多点法不会受到时间延迟的影响。一点法对非线性推移校正结果较差;两点法可以部分校正非线性推移;多点法将色谱图分成了几个区间,假设在每个区间内,保留时间规则、线性推移,对每个区间独立校正,从而对非线性保留时间变化使用分段线性逼近的手段达到校正目的,这是多点法校正的优势所在。

保留时间校正峰数目的增加,将直接增加软件使用者的操作负担,因此,保留时间校正应视图谱的推移情况而定,选择最佳校正峰,使用最少的保留时间校正峰数,达到理想的校正效果。

在两点法的校正峰选择时,应遵循以下原则:(1)选择已知稳定的有效成分作为保留时间校正峰;(2)选择有较大峰面积的共有峰为校正峰;(3)在符合前两个条件的基础上,校正峰的位置对评判结果也有一定影响,应尽可能接近有效信息丰富的色谱区域。以最大限度减少非线性推移的影响。

References

- 1 Guidance of Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint (Trial Version) (中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)). Editorial Committee of the Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典委员会). 20020427
- 2 Welsh W J, Lin W, Tersigni S H, Collantes E, Duta R, Carey M S. *Anal. Chem.*, **1996**, 68: 3473 ~ 3482
- 3 Li Boyan (李博岩), Liang Yizeng (梁逸曾), Hu Yun (胡芸), Xie Peishan (谢培山), Yu Ruqin (俞汝勤), Li Famei (李发美), Sun Yi (孙沂). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2004**, 32(3): 313 ~ 316
- 4 Li Boyan (李博岩), Liang Yizeng (梁逸曾), Xie Peishan (谢培山), Yu Ruqin (俞汝勤). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2003**, 31(7): 799 ~ 803
- 5 Hu Yun (胡芸), Liang Yizeng (梁逸曾), Li Boyan (李博岩), Xu Chengjian (徐承建), Zeng Zhongda (曾仲大). *Acta Chimica Sinica* (化学学报), **2003**, 61(9): 1466 ~ 1470
- 6 Fan G, Liang Y Z, Fung Y S, Chau F T. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1029: 173 ~ 183

Retention Time Correction Method in the Similarity Calculation of the Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine

Chai Yifeng^{*1,2}, Luo Guoan², Qiao Shanlei¹, Zhu Zhenyu¹, Lu Feng¹, Wang Jianjun¹

¹ (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

² (Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract Effects of different retention time correction formulae on linear shift, nonlinear shift and retention time delay are discussed. And the actual samples of *Radix Salviae miltiorrhizae* were used to check the correctness of different correction formulae. Single-point formula deals well only with linear shift. Dual-point formula is suitable for the correction of nonlinear shift and retention time delay. Multi-point formula, depending on the segmented linear approximation, turns out to be effective in correcting the nonlinear shift.

Keywords Chromatographic fingerprints, traditional Chinese medicine, retention time, correction method, similarity calculation

(Received 12 November 2004; accepted 28 April 2005)