

附子理中丸多波长融合 HPLC 指纹图谱研究*

任培培, 孙国祥**, 孙丽娜

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法对附子理中丸融合指纹图谱进行研究。方法: 采用 CenturySIL C₁₈ BDS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以水 (A) - 乙腈 (B) 为流动相梯度洗脱 (0~10 min 3% → 7% B, 10~20 min 7% → 15% B, 20~60 min 15% → 70% B 并保持 10 min); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 (30.0 ± 0.2) °C; 检测波长为 265, 280, 254, 230 nm。结果: 运用多波长融合指纹图谱技术对色谱图进行处理, 确立 31 个共有峰, 同时建立了附子理中丸的统一化色谱指纹图谱, 并用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0”软件对四波长融合后的指纹图谱进行数字化评价, 结果表明融合后的指纹图谱信息更加丰富。结论: 所建立的多波长融合指纹图谱可用于附子理中丸的质量控制。

关键词: 附子理中丸; 多波长融合指纹图谱; 统一化色谱指纹图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0411-05

Study on multi-wavelength fusion HPLC fingerprint of Fuzilizhong pills*

REN Pei-pe, SUN Guo-xiang**, SUN Li-na

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

Abstract Objective To study and establish the multi-wavelength fusion HPLC fingerprint for Fuzilizhong pills. **Methods** The chromatographic fingerprints were built by using CenturySIL C₁₈ BDS as stationary phase and water (A) - acetonitrile (B) as mobile phase with gradient elution (0-10 min 3% → 7% B, 10-20 min 7% → 15% B, 20-60 min 15% → 70% B, then maintained 10 min) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at (30 ± 0.2) °C and the detection wavelength was set at 265, 280, 254 and 230 nm. **Results** The technique of multi-wavelength fusion fingerprint was applied during processing the fingerprints. There were 31 common peaks in the fingerprint. Meanwhile, the unified chromatographic fingerprint of Fuzilizhong pills was established. The software of “Digitized Evaluation System for Super-Information Characteristics of the Traditional Chinese Medicine Fingerprints 3.0” was employed to estimate the fusion fingerprints. The results show that the information of fusion fingerprint was more abundant. **Conclusions** The multi-wavelength fusion fingerprints analysis is specific and may serve for quality identification and comprehensive evaluation of Fuzilizhong pills.

Key words Fuzilizhong pills; multi-wavelength fusion fingerprint; unified chromatographic fingerprint

附子理中丸由附子(制)、党参、白术(炒)、干姜、甘草(炙)5味药组成, 该方来源于宋代《太平惠民和剂局方》, 温中健脾, 主要用于脾胃虚寒、脘腹冷痛、呕吐泄泻、手足不温^[1]。目前关于附子理中丸质量控制的文献主要为乌头类生物碱的含量测定^[2-3]。高文兰等^[4]利用薄层扫描法对附子理中丸中单味药材进行鉴定, 忻丁烯等^[5]建立了附子理中丸中农药有机氯、重金属、砷及微量元素的测定方法, 张奇凤等^[6]采用火焰原子吸收法和石墨炉原子

吸收法分析了附子理中丸中 21 种无机微量元素的含量, 但现有方法不能够全面地控制该制剂的质量, 且未见附子理中丸指纹图谱的有关报道。

生物学中, 信息融合可以提高鉴别的准确度, 已成为研究的热点。关于指纹图谱信息融合技术, 目前相关报道较少, 且不同研究者所采用的信息融合手段各不相同。聂磊等^[7]采用主成分分析方法进行多维数据的融合, 对不同特征吸收波长下栀子的指纹图谱进行处理, 在保证数据信息损失最小的前提下, 使数

* 国家自然科学基金重大研究计划项目 (No. 90612002)

** 通讯作者 Tel: (024) 23986286, E-mail: gxswmwy@163.com

据处理量大为减少,并与整合法进行了比较。范晓辉等^[8,9]运用串行融合和并行融合2种方式进行色谱指纹图谱的信息融合,同时提出了一种基于信息融合的中药多元色谱指纹图谱相似性的计算方法,计算机仿真和中药产品实际应用结果表明,该方法能够评价多元色谱指纹图谱相似度。指纹图谱融合技术以非分离、快速、简便为优点,以宏观指纹特征为基础,与计算机技术相结合,实现指纹图谱的全面和整体评价。本文采用多波长融合指纹图谱技术对附子理中丸四波长下液相色谱指纹图谱进行融合研究,并对不同批次附子理中丸 HPLC 指纹图谱进行数字化评价,该方法能够准确快速地得到样品指纹图谱中丰富的信息,对附子理中丸质量控制可提供有益参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 型液相色谱仪 (DAD 检测器、四元低压梯度泵、在线脱气装置、自动进样器), ChemStation 工作站 (Agilent 科技有限公司), RE-52 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂), BS 110S 电子天平 (北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 对照品尿苷 (批号: 110887-200202)、5-羟甲基糠醛 (批号: 111626-200503)、京尼平苷 (批号: 110749-200613)、甘草酸铵 (批号: 110731-200614) 购自中国药品生物制品检定所。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, DMA TECHNOLOGY INC.), 水为去离子水。样品为市售附子理中丸 (规格: 9 g 每丸)。

2 溶液配制

2.1 对照品溶液 精密称取 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 对照品适量, 加 50% 甲醇溶液制成每 1 mL 含 200 μg 的溶液, 摇匀, 即得 5-HMF 对照品溶液。同法配制尿苷、京尼平苷、甘草酸铵的对照品溶液, 浓度均为 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 供试品溶液 取样品 1 丸 (约 9 g), 剪碎, 精密称定, 加 10 倍量 95% 乙醇, 回流提取 2 h 滤过, 残渣加 8 倍量相同溶剂继续回流 1.5 h 合并滤液, 减压浓缩至 20 mL, 水沉 24 h, 回收乙醇至 4 mL, 最后用 50% 甲醇定容至 25 mL, 摇匀, 即得。进样前用 0.45 μm 滤膜过滤。

3 色谱条件及系统适用性试验

CenturySIL C₁₈ BDS 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 以流动相水 (A)—乙腈 (B) 梯度洗脱 (0~10 min 3% $\rightarrow$ 7% B; 10~20 min 7% $\rightarrow$ 15% B; 20~60 min 15% $\rightarrow$ 70% B 并保持 10 min); 流速 1.0 mL $\cdot$

min⁻¹; 柱温 (30.0 $\pm$ 0.2) $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 265、280、254、230 nm; 进样量 5 μL 。

取各对照品溶液和附子理中丸供试品溶液分别进样 5 μL , 对比保留时间及紫外光谱图可知, 5 号峰为尿苷, 8 号峰为 5-HMF, 15 号峰为京尼平苷, 25 号峰为甘草酸。5-HMF 的峰强度适中, 且与其他峰分离良好, 因此选作参照物峰, 实验时其理论板数应不低于 42000。正常检测条件下, 记录基线及供试品溶液在 2 h 内变化情况, 二者比较表明流动相系统无干扰, 样品测定时间确定为 70 min。

4 方法学考察

4.1 精密度试验 精密吸取 S6 样品的供试品溶液 5 μL , 连续进样 6 次, 记录色谱图。结果各峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.1%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.3%, 表明检测系统的进样精密度良好。

4.2 溶液稳定性试验 取 S6 样品制备供试品溶液, 分别在制备后的 0.3、6、12、24 h 进样测定, 记录色谱图。结果各峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.3%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.3 重复性试验 取 S6 样品 6 份制备供试品溶液, 精密吸取 5 μL 进样并检测, 记录色谱图。结果各峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.1%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.2%, 表明方法重复性良好。

5 附子理中丸多波长融合指纹图谱研究

5.1 多波长融合指纹图谱的建立 实验中对不同波长下的指纹图谱进行考察, 结合 3D 光谱图, 结果显示 0~7 min 的色谱图在 230 nm 及 265 nm 时指纹信息丰富, 7~32 min 色谱峰在 280 nm 响应值最高, 32~45 min 时在 254 nm 信息相对较多, 45 min 以后 230 nm 的指纹峰最多。另外, 在色谱峰归属时, 尿苷、5-HMF、京尼平苷、甘草酸的色谱峰分别在 265、280、240、250 nm 下信号最强, 而在其他波长下色谱峰信号较弱或无信号。为了得到更加丰富且真实的关于样品的信息, 对以上 4 个波长的信号进行融合是必要的。实验中曾考虑用波长切换采集信号, 但考虑到波长变化造成的基线波动可能对分析结果产生影响, 因此选择了多波长融合指纹图谱技术来进行样品的指纹图谱处理。将 10 批样品的供试品溶液在高效液相色谱仪上进样分析, 记录色谱图并积分处理, 将 4 个波长下的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0”软件^[10], 将 265 nm 的 0~7 min, 280 nm 的 7~32 min, 254 nm 的 32~45 min 和 230 nm 的 45~70 min

色谱图进行融合,通过对 10 批样品的色谱图进行比较,以各峰的共有率 100% 为依据,以 5-HMF 峰为

参照物峰,确定 31 个共有指纹峰。以 S6 样品为例,色谱图见图 1。

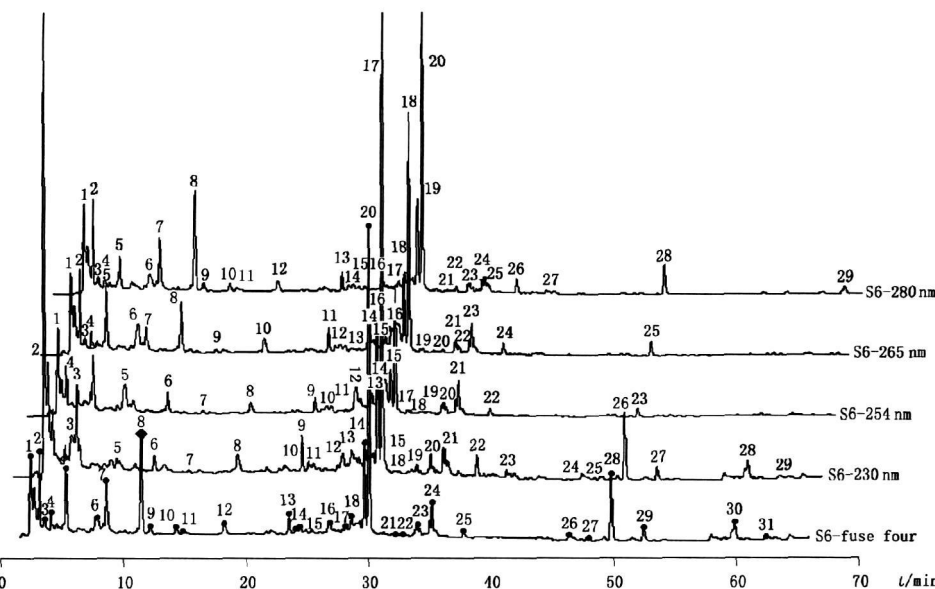


图 1 S6 样品在不同波长下的 HPLC 指纹图谱

Fig 1 The HPLC fingerprints of S6 under different wavelengths

用色谱指纹图谱指数 F 及色谱指纹图谱信息量指数 I 等参数^[11]对融合前后指纹图谱进行评价,以 S6 样品为例,结果见表 1。由表 1 可知在表观进样量 (Q) 相同的前提下,融合指纹图谱的 F 和 I 值均高于各单波长下的值。考虑到分析方法的时间因素 (T 为末指纹峰的保留时间) 出现 254 nm 和 265 nm 时 F_r , $F_{r(q)}$ 和 I_r , $I_{r(q)}$ 对应值略高。 $F_{r(q)}$ 和 $I_{r(q)}$ 是由 1 mg 药材提取物进样后获得的值,用进样量进行校正。 S 是指纹图谱的总熵值,代表信息量的大小。结果表明融合后的指纹图谱信息更加丰富。

表 1 不同波长时 S6 样品指纹图谱指数的比较

Tab 1 The comparison among fingerprints determined under different wavelengths of S6

序号 (No.)	参数 (parameter)	nm				融合谱 (fusion)
		230	254	265	280	
1	T/min	62.49	49.79	49.79	64.63	62.49
2	Q/mg	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
3	F	33.7	32	35	32.6	39.9
4	F_r	27.5	32.8	35.9	25.8	32.6
5	$F_{r(t)}$	27	32.1	35.1	25.2	31.9
6	$F_{r(q)}$	34.4	32.7	35.7	33.3	40.7
7	I	15.6	15.3	15.6	15	16.3
8	I_r	12.7	15.7	16.0	11.8	13.3
9	$I_{r(t)}$	12.5	15.4	15.7	11.6	13.1
10	$I_{r(q)}$	15.9	15.6	15.9	15.3	16.6
11	S	2.6	2.8	2.8	2.7	2.9

5.2 10 批样品统一化色谱指纹图谱的建立 中药

统一化色谱指纹图谱^[12]是将 $RT_i = \frac{t_{R(i)}}{t_{R(E)}}$ 计算所得称为统一化相对时间, $t_{R(E)}$ 为末指纹峰保留时间, 则得 $\overrightarrow{RT} = (RT_1, RT_2, \dots, 1)$ 统一化相对时间向量; 将 $RA_i = \frac{A_i}{A_{\max}}$ 计算所得称为统一化相对峰面积, $A_{\max}$ 为最大指纹峰面积, 可得 $\overrightarrow{RA} = (RA_1, RA_2, \dots, 1, \dots, RA_n)$ 统一化相对峰面积向量, 由 $\overrightarrow{RA}$ 对 $\overrightarrow{RT}$ 作图得统一化色谱指纹图谱。通过统一化变换可实现所有色谱指纹图谱在同一坐标系中作出, 有利于比较指纹图谱特征及化学计量学模糊识别方法的应用^[12]。用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0”软件计算生成 10 批样品融合指纹图谱 (S1~S10) 及对照指纹图谱 (RFP) 的统一化 HPLC 指纹图谱见图 2, 其表明各批样品间存在差异。

5.3 附子理中丸四波长融合指纹图谱的数字化评价 用孙国祥等开发的“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统 3.0”软件对 10 批附子理中丸 HPLC 指纹图谱进行评价, 结果见表 2。除 S10 外, 指纹图谱基线分离程度 $\beta = 0.967 \sim 1$, 说明指纹峰分离良好; 指纹信号均化系数 γ 和峰面积比率 δ 均代表指纹峰积分信号的均化性, γ 及 δ 越接近 1, 信号的均化性越好, 本实验 $\gamma = 0.343 \sim 0.636$, $\delta = 0.352 \sim 0.609$, 表明信号均化性不突出; 代表各成分的总体含量和与积分信号大小的总积分面积和 A_T

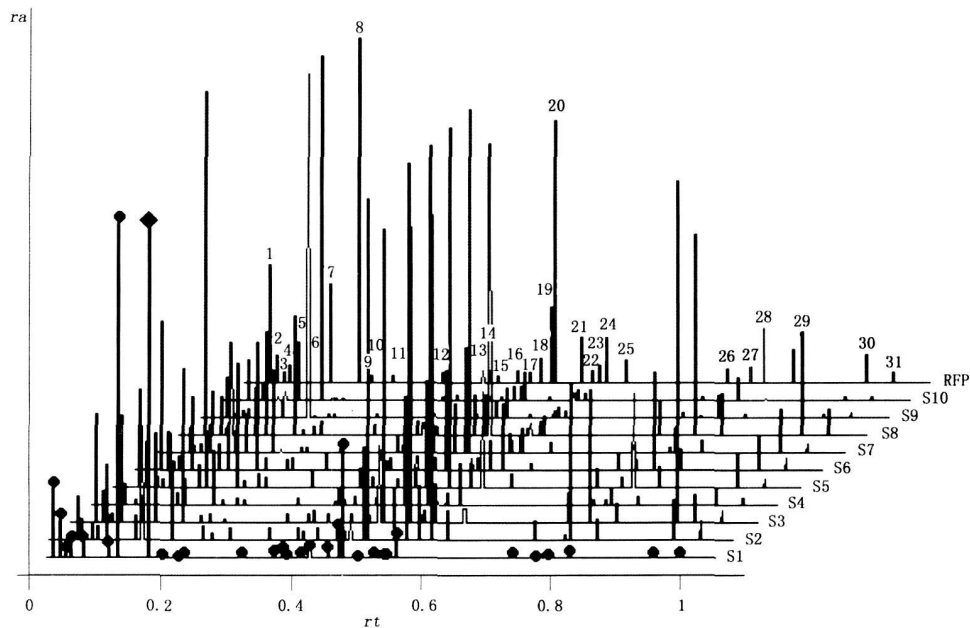


图 2 附子理中丸统一化的 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱 RFP

Fig 2 The nomalization HPLC fingerprints of Fuzilzhong pills and its referential fingerprint

表 2 附子理中丸 HPLC 指纹图谱数字化评价结果

Tab 2 Dig itized evaluation results of HPLC fingerprints of Fuzilzhong pills

序号 (No.)	参数 (parameter)	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	n	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
2	m	30	30	30	30	29	29	29	29	29	28
3	β	1	1	1	1	0.967	0.967	0.967	0.967	0.967	0.933
4	γ	0.624	0.588	0.496	0.635	0.544	0.618	0.636	0.349	0.343	0.45
5	A_{geo}	156.5	133.5	159.9	149.6	150.6	143.0	113.0	155.1	142.0	126.4
6	A_{avg}	266.6	262.4	330.2	258.0	275.4	234.7	197.8	400.1	403.1	350.5
7	δ	0.587	0.509	0.484	0.580	0.547	0.609	0.572	0.388	0.352	0.361
8	η	0.119	0.115	0.122	0.124	0.109	0.133	0.132	0.131	0.125	0.139
9	A_T	8263	8133	10235	7997	8538	7275	6130	12402	12495	10866
10	$\bar{H}$	21.0	20.2	30.8	22.4	25.2	20.3	17.3	37.0	38.0	33.1
11	$\bar{W}$	0.23	0.22	0.24	0.24	0.21	0.26	0.25	0.25	0.24	0.27
12	N	765029	59752	800278	754275	464861	545399	28719	56125	44437	35192
13	R_T	256.3	257.1	251	255.3	294.8	249.2	241.6	229	248.3	225.1
14	$\bar{R}$	8.3	8.3	8.1	8.2	9.5	8	7.8	7.4	8	7.3
15	τ	0.792	0.763	0.705	0.752	0.694	0.740	0.743	0.717	0.672	0.707
16	T/min	62.73	62.48	62.71	62.48	62.39	62.49	62.4	62.26	62.36	62.45
17	Q/mg	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
18	F	42.4	38.8	33.9	42.8	35.5	39.9	39.2	22.9	22.1	27.4
19	F_r	34.5	31.7	27.6	35.0	29.0	32.6	32.1	18.8	18.1	22.4
20	$F_{r(\theta)}$	33.8	31.0	27.0	34.3	28.5	31.9	31.4	18.4	17.7	21.9
21	$F_{t(q)}$	43.3	39.6	34.6	43.7	36.2	40.7	40.1	23.4	22.6	28.0
22	S	2.9	2.8	2.6	2.9	2.8	2.9	2.9	2.2	2.1	2.4
23	I	16.7	16.2	15.9	16.7	16.1	16.3	15.9	13.2	13.0	14.7
24	I_r	13.6	13.2	12.9	13.6	13.1	13.3	13.0	10.8	10.6	12.0
25	$I_{r(\theta)}$	13.3	13	12.7	13.4	12.9	13.1	12.8	10.6	10.4	11.8
26	$I_{t(q)}$	17.0	16.5	16.2	17.0	16.4	16.6	16.2	13.4	13.2	15.0
27	ω	2.54	2.40	2.14	2.56	2.21	2.44	2.46	1.73	1.70	1.86
28	S_F	0.731	0.753	0.790	0.872	0.837	0.885	0.794	0.825	0.821	0.829
29	$C/\%$	61.4	65.9	103.2	69.6	66.1	83.2	48.4	185.9	189.6	126.7

= 6130~12459 平均峰高 $\bar{H} = 17.3 \sim 38.0$ 说明 10 批样品的化学成分含量差异较大; 分离度均化系数 $\tau = 0.672 \sim 0.792$ 表明各峰间距较理想; 指纹图谱指数 F 、指纹图谱相对指数 F_r 、指纹图谱信息量指数 I 、指纹图谱相对信息量指数 I_r 代表指纹信号大小、信号均匀化程度、分离效率高及信息量多少, 均越大越好, 根据实验结果, 考虑到储藏及加工等因素的影响, 对于附子理中丸多波长融合指纹图谱的 F 、 F_r 、 I 和 I_r 应分别不低于 22、18、13、10, S_F 为夹角余弦相似度, 从表中可看到, 10 批样品的多波长融合指纹图谱相似度均较低, 若规定融合指纹图谱的相似度不低于 0.80 则 S1、S2、S3 和 S7 这 4 批样品的相似度不合格, 这可能与药材投料量、生产工艺等因素有关。此 10 批附子理中丸的定量相似度只有 S3 较为理想, S1、S2、S4、S5、S6 和 S7 含量较低, S8、S9 和 S10 含量明显偏高, 反映了不同厂家该制剂质量存在很大差异。

6 讨论

6.1 提取方法考察 取 S6 样品 6 份, 分别以水、25% 乙醇、50% 乙醇、75% 乙醇、95% 乙醇和甲醇为溶剂提取样品, 按样品的供试液制备方法进行溶液制备, 前三者以 80% 乙醇醇沉, 后者水沉。均进样 5 μ L, 记录色谱图, 结果发现 6 种提取溶剂所得色谱图无显著差异。由于样品中蜂蜜含量较高 (约占 50%), 为了防止供试品溶液中含有大量蜂蜜对色谱柱造成损害, 考察了蜂蜜在以上 6 种溶剂中的溶解性, 发现其难溶于 95% 乙醇。因此选择 95% 乙醇提取附子理中丸样品。

6.2 流动相的选择 实验中考察了不同比例的水-甲醇、水-乙腈及水 (1% 冰醋酸)-乙腈 (1% 冰醋酸) 为流动相时的色谱图, 发现以水-甲醇为流动相时分离情况不理想, 而后两者为流动相时色谱图基本一致, 因此选择水-乙腈进行洗脱。

6.3 小结 本文运用多波长融合指纹图谱技术建立了附子理中丸的 HPLC 指纹图谱。该方法可以更加全面地反映样品所含化学信息。将色谱指纹谱变换为统一化色谱指纹图谱, 能够更加直观、真实地展现指纹图谱的特征全貌。应用“中药色谱指纹图谱超信息特征数字化评价系统”对附子理中丸的多波长融合指纹图谱进行数字化评价, 分别从分离度、信号强度、均化程度、时间效率、化学信息量、相似度等多方面反映了样品指纹图谱的信息, 丰富而且详尽, 能够对图谱隐含的定性、定量信息进行多侧面、全方位的数据挖掘。所建立的附子理中丸多波长融合指纹图谱具有较好的精密度和重复性, 为附子理中丸

的质量控制提供了一种新参考方法。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. Vol (一部): 484
- 2 WULAN Na-ri(乌兰娜日), WANG Yu-hua(王玉华), WANG Wei(王伟), *et al* Determination of aconite alkaloid in Fuzilizhong pills by acid dye colorimetry(酸性染料比色法测定附子理中丸中总乌头生物碱的含量). *Chin J Med Appl Pharm* (中国现代应用药学), 1996, 13(4): 30
- 3 ZHU Rui-long(朱瑞龙), JING Ming(景明), CHAI Guo-lin(柴国林), *et al* Determination of di-ester aconitine in Fuzilizhong pills by HPLC(HPLC 测定附子理中丸中双酯型乌头碱含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1996, 18(10): 13
- 4 GAO Wen-lan(高文兰), ZHENG Kun(郑堃). The identification of the pill of Fuzilizhong by scanner(附子理中丸薄层扫描鉴定). *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 1986, 3(1): 58
- 5 XIN Ding-xi(忻丁烯), DENG Qun(邓群), ZHOU Yan-jun(周艳军). Investigation of quality guidelines for Fuzilizhong pill(附子理中丸几种质量指标的考察). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1987, 12(6): 34
- 6 ZHANG Qi-feng(张奇凤), PENG Shan-shan(彭姗姗), NIM in(倪敏), *et al* Determination of ten Chinese traditional medicines made in Jiangxi province by AAS(原子吸收法测定江西十种中成药). *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析), 1999, 19(2): 203
- 7 NE Lei(聂磊), HU Zheng(胡震), LUO Guo-an(罗国安), *et al* The technique of coalesce fingerprint for traditional Chinese medicine(中药指纹图谱的融合技术). *Chin J Analyt Chem* (分析化学), 2005, 33(6): 898
- 8 FAN Xiao-hui(范晓辉), YE Zheng-liang(叶正良), CHENG Yi-yu(程翼宇). A computational method based on information fusion for evaluating the similarity of multiple chromatographic fingerprints of TCM(基于信息融合的中药多元色谱指纹图谱相似性计算方法). *Chem J Chin Univ*(高等学校化学学报), 2006, 27(1): 26
- 9 FAN Xiao-hui, CHENG Yi-yu, YE Zheng-liang *et al* Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines *Analyt Chin Acta*, 2006(555): 217
- 10 XIAO Shi-ying(肖诗鹰), HE Qian(何勤). Symposium on Facilitating Modern Industry of Traditional Chinese Medicine(中药产业现代化推进战略论坛). Hangzhou(杭州): Zhejiang University Press(浙江大学出版社), 2006 127
- 11 SUN Guo-xiang(孙国祥), HOU Zhi-fei(侯志飞), BI Yu-meng(毕雨萌), *et al* The digital criterion of the potential information characteristics of the traditional Chinese medicine chromatographic fingerprints(中药色谱指纹图谱潜信息特征判据研究). *Acta Pharm Sin*(药科学报), 2006 41(9): 857
- 12 SUN Guo-xiang(孙国祥), REN Pei-pei(任培培), LUO Cui-xia(雒翠霞), *et al* Study on the unification chromatographic fingerprint and relative unification characteristic criteria for TCM(中药统一化指纹图谱和相对统一化特征判据研究). *Cent South Pharm* (中南药学), 2007, 5(2): 168

(本文于 2008 年 8 月 23 日修改回)