

片仔癯 HPLC 指纹图谱的总量统计矩及其相似度法分析

胡超^{1,2}, 贺红^{1,2}, 杨岩涛^{1,2,3}, 唐宇², 周逸群^{1,2,3}, 贺福元^{1,2,3,4*}

- (1. 湖南中医药大学 药学院, 长沙 410208;
2. 中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 长沙 410208;
3. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 长沙 410208
4. 湖南中医药大学 现代中药制剂制备技术与评价实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 对片仔癯 HPLC 指纹图谱总量统计矩及其相似度进行研究, 进一步验证前期所创方法的关联性, 并为片仔癯制剂质量控制提供依据。方法: 以三七皂苷 R₁, 人参皂苷 R_{g₁} 与 R_{b₁}, 牛磺胆酸钠为对照, 采用 RP-HPLC 建立片仔癯指纹图谱, 并对指纹图谱总量统计矩及其相似度法的关联性进行分析。结果: 10 批样品共有特征峰为 14 个, 采用总量统计矩法计算其 AUC_T, 相对 AUC_T, $\bar{\lambda}_T$, 相对 $\bar{\lambda}_T$, $\bar{\sigma}_T$, 相对 $\bar{\sigma}_T$ 的平均值分别为 $7.430 \times 10^6 \mu\text{V} \cdot \text{s}$, 1.002, 22.540 min, 0.972, 5.391 min, 1.065, RSD 分别为 5.0%, 4.3%, 1.0%, 1.0%, 2.9%, 2.9%; 以生成的对照图谱为参考, 采用总量统计矩相似度法分析得相似度平均值为 0.943, RSD 为 1.9%; 相关性分析得相对 $\bar{\lambda}_T$ 与相似度的相关系数为 0.980, $P < 0.01$, 相对 $\bar{\sigma}_T$ 与相似度的相关系数为 -0.683, $P < 0.05$, 均具有统计学意义。结论: 总量统计矩及其相似度法存在关联性, 该法具有加合、偶联与统计性; 所建立的片仔癯 HPLC 指纹图谱重复性好, 准确度高, 可用于质量控制。

[关键词] 总量统计矩法; 总量统计矩相似度; 片仔癯; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0053-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080053

HPLC Fingerprint of Pien Tze Huang by Total Statistical Moment and Similarity Method

HU Chao^{1,2}, HE Hong^{1,2}, YANG Yan-tao^{1,2,3}, TANG Yu², ZHOU Yi-qun^{1,2,3}, HE Fu-yuan^{1,2,3,4*}

- (1. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Key Laboratory of Property and Pharmacodynamics, State Administration of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
3. Pharmaceutical Preparation Technology and Evaluation Laboratory of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
4. Supramolecular Mechanism and Mathematics-Physics Characterization Laboratory for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To study the fingerprints of Pien Tze Huang by total quantum statistical moment (TQSM) and total quantum statistical moment similarity (TQSMS) method, further verify the relevance between the previously established methods, and provide basis for the quality control of Pien Tze Huang. **Method:** With Notoginsenoside R₁, ginsenoside R_{g₁}, ginsenoside R_{b₁} and sodium taurocholic acid as the control products, RP-HPLC was used to establish the chromatographic fingerprints of Pien Tze Huang, and the correlation between TQSM

[收稿日期] 20150624(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173558); 国家博士点基金项目(20124323110002); 湖南省自然科学基金项目(2015JJ2111); 湖南省教育厅重点资助项目(14A108)

[第一作者] 胡超, 在读硕士, 从事中药制剂及其质量控制的研究, Tel: 15874180023, E-mail: 348009051@qq.com

[通讯作者] * 贺福元, 博士, 教授, 从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化的研究工作, Tel: 0731-5381372, 13787213681, E-mail: pharmsharking@tom.com

and TQSMS of the fingerprints was analyzed. **Result:** There were 14 common characteristic peaks for 10 batches of Pien Tze Huang samples. By using TQSM method, the average values of AUC_T , relative AUC_T , $\bar{\lambda}_T$, relative $\bar{\lambda}_T$, $\bar{\sigma}_T$, relative $\bar{\sigma}_T$ were calculated as $7.430 \times 10^6 \mu V \cdot sec$, 1.002, 22.540 min, 0.972, 5.391 min, 1.065 and their RSD were 5.0%, 4.3%, 1.0%, 1.0%, 2.9%, 2.9% respectively. The average similarity was 0.943 and RSD was 1.9% compared with reference fingerprint by TQSMS. The correlation coefficient of relative $\bar{\lambda}_T$ and similarity was 0.980, $P < 0.01$, and the correlation coefficient of relative $\bar{\sigma}_T$ and similarity was -0.683 , $P < 0.05$, with statistically significant difference. **Conclusion:** There was correlation between TQSM and TQSMS and this method was additive, couplable and statistical. Besides, the established chromatographic fingerprint was highly precise and reproducible, thus can be applied in the quality control of Pien Tze Huang.

[**Key words**] total quantum statistical moment; total quantum statistical moment similarity; Pien Tze Huang; chromatographic fingerprint

片仔癀由漳州片仔癀药业有限公司独家生产,属国家绝密中药品种,有“中国特效抗生素”的美称,享誉国内外。本品由麝香、牛黄、蛇胆、三七等组成,具有清热解毒、散瘀止血、消肿止痛之功效,常用于各种炎症及跌打损伤的治疗。近年来由于其在治疗急性病毒性肝炎、癌症方面的卓越疗效受到医药界的广泛关注。目前,其质量评价仍以含量测定为主,未能全面反映所含成分的信息,为此可采用中药指纹图谱进行测定,一方面可表征中药成分的整体组成及特性,另一方面也可表征未知成分,兼具整体性和模糊性 2 种属性。中药指纹图谱的分析方法有夹角余弦法、模式识别法、相关系数法、距离系数法、人工神经网络、总量统计矩法等^[1-5]。其中总量统计矩法是较为理想的中药指纹图谱评价方法^[6],该法特点在于综合了所有指纹图谱峰的信息,用统计学的方法对指纹图谱进行定性定量分析。将指纹图谱曲线函数整合为正态分布函数,创立的总量统计矩相似度分析法,可用于指纹图谱相似度分析,两指纹图谱的正态分布函数重叠面积之和即为相似度^[7]。前期本室人员对总量统计矩法与其相似度法分别进行了证明,本试验先采用高效液相色谱法建立片仔癀的指纹图谱,采用总量统计矩与其相似度法一并对指纹图谱进行研究,一方面验证两者的关联性,二则对片仔癀批间质量的一致性进行考察,为其质量监测提供基础和可靠依据。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪 (Breeze 色谱工作站, 2487 检测器, 美国 Waters 公司), KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), CP114 型电子天平 (奥豪斯仪器有限公司)。

片仔癀 (漳州片仔癀药业有限公司, 批号 1310050, 1311054, 1401004, 1402027, 1403011,

1403012, 1405029, 1406021, 1407016, 1407042); 对照品三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 购自北京赛百草科技有限公司, 纯度均 $\geq 98\%$ (批号分别为 SH0838, SH0762, SH0759); 对照品牛磺胆酸钠 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 YS0802YA14, 纯度 $\geq 98\%$); 乙腈为色谱纯; 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试验溶液的制备

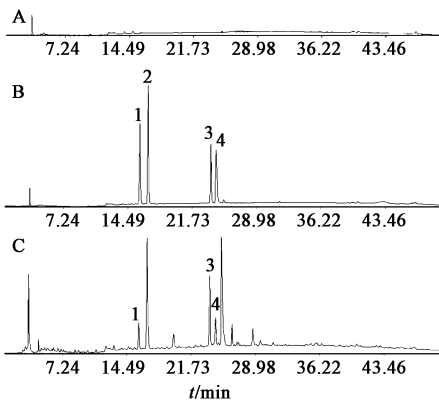
2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品三七皂苷 R_1 0.004 8 g, 人参皂苷 R_{g_1} 0.007 4 g, 人参皂苷 R_{b_1} 0.005 0 g 及牛磺胆酸钠 0.005 2 g 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声 (200 W, 40 kHz) 溶解, 定容至刻度, 混匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取片仔癀细粉 0.3 g, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量超声处理 (200 W, 40 kHz) 15 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2 色谱条件及系统适应性 Ultimate AQ-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A) - 0.5% 磷酸溶液 (B)^[8], 梯度洗脱程序^[9-10] (0 ~ 5 min, 5% ~ 20% A; 5 ~ 20 min, 20% ~ 36% A; 20 ~ 45 min, 36% ~ 80% A; 45 ~ 50 min, 80% ~ 100% A), 检测波长 203 nm, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}C$, 进样体积 10 μL , 记录时间 50 min。理论塔板数按各对照品峰计均不低于 30 000; 各峰与相邻杂质峰之间的分离度均 > 1.5 。见图 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 吸取不同体积的混合对照品溶液, 分别进样测定, 以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行线性回归, 得各对照品的回归方程。其中三七皂苷 R_1 回归方程为 $Y = 1.4 \times 10^5 X + 27\ 308$ ($r = 0.999\ 9$), 在 0.48 ~ 9.60 μg 呈良好的线性关系; 人



A. 甲醇空白; B. 对照品; C. 样品; 1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g_1} ; 3. 人参皂苷 R_{b_1} ; 4. 牛磺胆酸钠

图 1 片仔癀 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Pien Tze Huang

参皂苷 R_{g_1} 回归方程为 $Y = 2.1 \times 10^5 X + 46\ 346$ ($r = 0.999\ 9$), 在 $0.74 \sim 14.80\ \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系; 人参皂苷 R_{b_1} 回归方程为 $Y = 1.1 \times 10^5 X + 17\ 547$ ($r = 0.999\ 9$), 在 $0.50 \sim 10.00\ \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系; 牛磺胆酸钠回归方程为 $Y = 1.2 \times 10^5 X + 51\ 925$ ($r = 0.999\ 6$), 在 $0.52 \sim 10.40\ \mu\text{g}$ 呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 取片仔癀供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录其指纹图谱, 其峰面积、总量一阶矩、总量二阶矩的 RSD 分别为 2.3%, 2.0%, 1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批号片仔癀 6 份, 按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 记录其指纹图谱, 计算得峰面积、总量一阶矩、总量二阶矩的 RSD 分别为 2.1%, 1.7%, 2.4%, 表明制备方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取片仔癀供试品溶液于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 分别进样分析, 记录其指纹图谱, 计算得峰面积、总量一阶矩、总量二阶矩的 RSD 分别为 1.9%, 2.5%, 2.9%, 表明片仔癀供试品液在 24 h 内稳定。

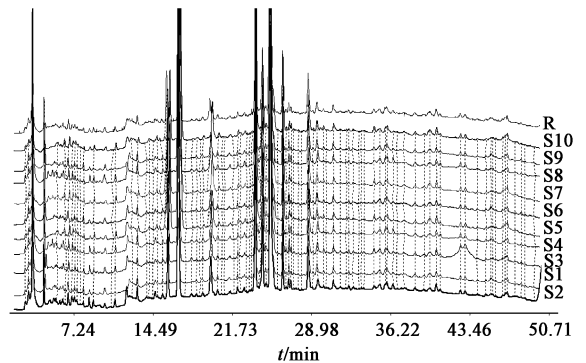
2.3.5 准确度试验 精密称定已知含量的片仔癀细粉 6 份 (每份约 0.15 g), 精密加入一定量的混合对照品溶液, 同法制备供试品溶液进样测定, 按总量统计矩法计算回收率, 三七皂苷 R_1 , 人参皂苷 R_{g_1} 与 R_{b_1} , 牛磺胆酸钠的平均回收率分别为 100.96%, 101.08%, 101.24%, 99.70%, RSD 分别为 0.6%, 0.8%, 0.5%, 1.3%。

2.4 片仔癀指纹图谱的测定

2.4.1 指纹图谱积分条件的确定 精密吸取空白

溶剂 (甲醇) $10\ \mu\text{L}$, 进样测定其指纹图谱, 以仪器最小积分门槛值积分得空白溶剂的全峰数为 132 个, 根据总量统计矩加合原理^[5]用 Excel 软件分别计算各噪音峰的平均峰宽、平均峰面积及平均峰高, 斜率灵敏度为峰高与峰宽的比值, 以信噪比 3 倍确定样品积分门槛值: 半峰宽、峰面积、峰高分别为 35 s, $40\ 000\ \mu\text{V}\cdot\text{s}$, $4\ 000\ \mu\text{V}$, 斜率灵敏度为 $150\ \mu\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

2.4.2 样品测定 精密吸取不同批次片仔癀供试品溶液各 $10\ \mu\text{L}$, 分别进样, 在 2.2 项色谱条件下测定, 记录色谱图。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版), 以 5 号样品的图谱为参照图, 时间窗宽度设为 0.20, 采用平均数及多点校正, 生成对照图谱 (R), 各图谱见图 2。



S1 ~ S10. 10 批样品; R. 对照图谱

图 2 样品及对照图谱重叠

Fig. 2 HPLC chromatograms of samples and generated reference

2.4.3 各批片仔癀指纹图谱总量统计矩参数^[5]及总量统计矩相似度^[11]计算 对 2.4.2 所得指纹图谱按前述积分条件积分, 共标出 14 个共有特征峰。对所得数据进行计算得各指纹图谱总量统计矩参数, 见表 1。以对照图谱 (R) 为参照, 计算各图谱对 R 的相对 AUC_T , 相对 $\bar{\lambda}_T$ 及相对 $\bar{\sigma}_T$, 同时利用总量统计矩相似度法计算各图谱与 R 的相似度, 结果见表 2。

2.4.4 总量统计矩参数与总量统计矩相似度相关性评价 将表 2 中 10 批样品的相对 AUC_T , 相对 $\bar{\lambda}_T$, 相对 $\bar{\sigma}_T$ 及与 R 相似度数据输入 SPSS 17.0 进行相关性分析, 得相对 $\bar{\lambda}_T$ 与相似度的相关系数为 0.980, $P < 0.01$; 相对 $\bar{\sigma}_T$ 与相似度的相关系数为 0.683, $P < 0.05$, 均具有统计学意义。其余两两之间相关系数无统计学意义。说明仅相对 $\bar{\lambda}_T$, 相对 $\bar{\sigma}_T$ 与相似度之间存在直接相关性。

3 讨论

片仔癀中三七、蛇胆两组分占 90% 以上, 其主要成分较易溶于水和醇, 由于三七中淀粉较多, 不宜

表 1 各批片仔癯指纹图谱总量统计矩参数

Table 1 Total quantum statistical moment parameters of different batches of Pien Tze Huang

No.	$AUC_T \times 10^6 / \mu V \cdot s$	$\bar{\lambda}_T / \text{min}$	$\bar{\sigma}_T / \text{min}$
1	7.475	22.304	5.549
2	6.727	22.639	5.450
3	7.480	22.734	5.302
4	7.910	22.591	5.282
5	7.208	22.647	5.359
6	7.356	22.459	5.124
7	7.683	22.390	5.347
8	7.864	22.235	5.630
9	7.572	22.412	5.575
10	7.024	22.985	5.293
R	7.482	23.202	5.063

表 2 相对 AUC_T , 相对 $\bar{\lambda}_T$, 相对 $\bar{\sigma}_T$ 及相似度分析

Table 2 Relative AUC_T , $\bar{\lambda}_T$, $\bar{\sigma}_T$ and similarity

No.	相对 AUC_T	相对 $\bar{\lambda}_T$	相对 $\bar{\sigma}_T$	与 R 相似度
1	0.999	0.961	1.096	0.923
2	0.899	0.976	1.076	0.947
3	1.000	0.98	1.047	0.960
4	1.057	0.974	1.043	0.950
5	0.963	0.976	1.058	0.952
6	0.983	0.968	1.012	0.942
7	1.027	0.965	1.056	0.934
8	1.051	0.958	1.112	0.916
9	1.012	0.966	1.101	0.928
10	0.939	0.991	1.045	0.974
R	1.000	1.000	1.000	1.000

用水提,故试验考察了甲醇、乙醇、正丁醇对片仔癯中成分提取的影响,结果以甲醇提取最为理想,同时,考察了甲醇超声提取和回流提取对提取效率的影响,发现超声提取效率高于回流提取且操作更为方便,故试验采用甲醇超声的方法提取样品。另外,试验还对检测波长进行了考察,样品溶液经紫外全波长扫描(200~400 nm),发现最大吸收波长在 215 nm 及 279 nm 处,实验分别以 203^[8], 215, 279 nm 为检测波长进行测定,结果表明检测波长设为 203 nm 时,特征峰峰面积最大,且不受杂质峰干扰。故选定检测波长为 203 nm。

前期实验组成员将统计矩原理用于色谱学分析,创立了中药指纹图谱总量统计矩分析法^[5],包括 4 个主要参数,即①总量零阶矩(AUC_T);②总响

应率($AUCPW_T$);③总量一阶矩($MCRT_T$):总量平均保留时间,用 λ_T 表示;④总量二阶矩($VCRT_T$):平均保留时间方差,用 σ_T^2 表示。前者用于定量分析,后三者用于定性分析。将两指纹图谱的总量统计矩参数转变为两正态分布曲线,又可用两指纹图谱的正态分布曲线下重叠面积之和表示相似度,即总量统计矩相似度法^[7]。将两正态分布曲线转换为标准正态分布曲线后,可建立起总离均度、总变异度、总把握度、总相似度四参数,除了能对曲线是否来源于总体进行判断外还能对判断的不确定性进行概率计算,因而较其他相似度评价方法更具客观性。此外,总量统计矩及其相似度法在扣除噪音干扰的前提下考虑了小峰作用,为其他指纹图谱评价方法所不及。该法具有加合性,利用这一特性可确定指纹图谱积分条件,扣除溶剂总量统计矩参数,最终求得纯中药或复方提取物的总量统计矩参数,以总量统计矩参数表征标准中药或复方提取物指纹图谱;具有偶联性,可与药动学、药效学等偶联成谱动学、谱效学及谱效动力学等,用于多变量的中心和离散程度的分析。

本试验对不同批次片仔癯的 HPLC 图谱进行了测定,通过各批次样品总量统计矩参数的计算得 $\bar{\lambda}_T$, $\bar{\sigma}_T$ 的 RSD 分别为 1.0%, 2.9%, 表明 10 批样品指纹图谱的中心与离散程度波动较小。以生成的对照图谱为参照,通过总量统计矩相似度计算可知各批次样品间差异较小,生产工艺相对稳定。但总量统计矩参数与总量统计矩相似度之间是否存在关联性,仍未可知,至此考虑对两者的相关性进行探讨,结果显示仅相对 $\bar{\lambda}_T$ 与相似度之间及相对 $\bar{\sigma}_T$ 与相似度之间存在相关性,总量平均保留时间偏移越小,平均保留时间方差偏移越小,指纹图谱相似性越大。总量统计矩法与总量统计矩相似度法相互印证,表明两者用于中药指纹图谱分析的科学性。

试验所建立的片仔癯指纹图谱重复性好、准确度高、特征性强,无疑为片仔癯的质量控制提供了新的方法,同时,由于总量统计矩法固有的加合特征,使得其在片仔癯的拆方、合方以及重新组方研究中展现出独有的优势,与其衍生而来的总量统计矩相似度法配套使用,破解片仔癯“中华神药”之谜指日可待。

[参考文献]

[1] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):

- 282-287.
- [2] 唐琍萍, 魏娟, 曾金祥, 等. 吴茱萸脂溶性成分指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中药材, 2013, 36 (10):1588-1594.
- [3] 刘江, 陈兴福, 邹元锋. 基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8):1081-1088.
- [4] 汤丹, 李薇, 许毅, 等. 广藿香指纹图谱解析的人工神经网络方法研究 [J]. 中药材, 2004, 27 (7): 534-536.
- [5] 贺福元, 周宏灏, 邓凯文, 等. 指纹图谱的一种定性、定量研究新方法: 总量统计矩分析法 [J]. 药学学报, 2008, 43(2):195-201.
- [6] 杨岩涛, 吴春英, 刘文龙, 等. 不同相似度法对当归补血汤指纹图谱分析的比较研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (5):1431-1435.
- [7] 贺福元, 邓凯文, 黄胜, 等. 总量统计矩标准相似度数学模型的建立及应用研究 [J]. 药学学报, 2013, 48(9):1453-1458.
- [8] 赖延锦, 陈纪鹏, 游勇基. HPLC 测定片仔癀中 4 种成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43 (24): 1906-1908.
- [9] 李静, 王璇, 马付勇, 等. 影响中药三七 HPLC 指纹谱的若干因素 [J]. 中国天然药物, 2004, 2 (1): 33-41.
- [10] 孙国祥, 刘晓丽, 姜玢, 等. 三七高效液相色谱数字化指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2007, 5 (4): 362-366.
- [11] 黄胜, 贺福元, 刘文龙, 等. 总量统计矩相似度法对左金缓释片多成分释放相似度的评价研究 [J]. 中成药, 2009, 31(1):35-39.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD (E)

经过中国科学院“中国科学引文数据库 (Chinese Science Citation Database, 简称 CSCD)”定量遴选、专家定性评估,《中国实验方剂学杂志》入选 2015—2016 年度 CSCD (E)。

2015—2016 年度 CSCD 收录来源期刊 1200 种, 其中中国出版的英文期刊 194 种, 中文期刊 1006 种。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 872 种 (以备注栏中 C 为标记); 扩展库 328 种 (以备注栏中 E 为标记)。

CSCD 具有建库历史最为悠久、专业性强、数据准确规范、检索方式多样、完整、方便等特点, 自提供使用以来, 深受用户好评, 被誉为“中国的 SCI”。CSCD 是我国第一个引文数据库, 曾获中国科学院科技进步二等奖。该数据库已在我国科研院所、高等学校的课题查新、基金资助、项目评估、成果申报、人才选拔以及文献计量与评价研究等多方面作为权威文献检索工具获得广泛应用。