

## 补中益气丸中氨基酸类成分指纹图谱

柯雪红<sup>1\*</sup>, 花汝凤<sup>2</sup>, 陈锦富<sup>1</sup>, 杨小催<sup>1</sup>, 陈为<sup>1</sup>  
(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;  
2. 广州星群(药业)股份有限公司, 广州 5102882)

**[摘要]** 目的:对 5 个不同药厂生产的 20 批补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱进行比较研究。方法:以柱前衍生化 HPLC,测定不同药厂补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱,提取指纹图谱数字化信息,采用相似度分析、聚类分析等多种统计方法分析不同药厂产品特征。结果:不同药厂补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱中有 9 个共有峰,相似度在 0.8~1.00;A 药厂样品中氨基酸类成分较多,指纹图谱特征与标准汤剂指纹图谱相似度最高。结论:方法稳定、可靠、重复性好,为区分不同药厂补中益气丸提供参考。

**[关键词]** 补中益气丸;氨基酸;指纹图谱;相似度分析;聚类分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0081-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1538.010.html>

**[网络出版时间]** 2012-05-15 15:38

## Fingerprint Chromatogram of Amino Acids Compounds Analysis in Different Brands Buzhongyiqi Pills

KE Xue-hong<sup>1\*</sup>, HUA Ru-feng<sup>2</sup>, CHEN Jin-fu<sup>1</sup>, YANG Xiao-cui<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>

(1. The First Hospital Affiliated to Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;  
2. Xingqun Medicine Co. Ltd of Guangzhou, Guangzhou 510288, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the fingerprint chromatogram of amino acids compounds in different brands Buzhongyiqi pills and offer reference to distinguishing them. **Method:** By 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) according to pre-column derivatization HPLC method to establish the fingerprint chromatogram of amino acids compounds. distilling the digital info of fingerprint chromatogram and analyzing with SPSS. **Result:** nine co-peaks on the HPLC fingerprints of Buzhongyiqi pills were indicated. The results of similarity analysis were 0.8-1.00. **Conclusion:** This method is available for quality evaluation and can control the quality of BuzhongYiqi pills.

**[Key words]** Buzhongyiqi pills; amino acids compounds; fingerprint chromatogram; similarity analysis; cluster analysis

补中益气丸是益气健脾的经典方,具有补中益气、升阳举陷的功效,主要用于脾胃虚弱、中气下陷证引起的体倦乏力及内脏下垂<sup>[1-2]</sup>。氨基酸为补气、抗炎和抗疲劳的主要物质基础,已有实验证明,

氨基酸对免疫器官、淋巴组织、体液免疫、细胞免疫及抗感染能力都有一定作用<sup>[3-4]</sup>。补中益气丸生产厂家多、质量优劣参差不齐,并且补中益气丸含有皂苷、黄酮、有机酸、氨基酸等多类成分,有效成分尚不明确,要识别不同厂家产品的优劣,仅采用性状鉴别及单成分测定不能很好控制。为真实、客观、全面地反映补中益气丸内在质量,本课题组在建立补中益气汤及丸剂氨基酸类成分指纹图谱基础上<sup>[5-6]</sup>,收集了 5 个药厂 20 批补中益气丸,研究不同药厂补中益气丸氨基酸类成分特征,采用色谱指纹图谱相

**[收稿日期]** 20111209(009)

**[基金项目]** 广东省中医药局科研课题(2008215)

**[通讯作者]** \*柯雪红,研究员,硕士,从事新药开发和药物分析研究, Tel: 020-36591740, E-mail: kexuehong@126.com

似度、聚类分析对不同药厂产品进行区分。

### 1 仪器与试药

Waters2695 高效液相色谱仪, Waters2475 荧光检测器, Empower 色谱工作站。AE-200 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

6-氨基酸喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺基-氨基甲酸酯(AQC)衍生剂、氨基酸对照品(Amino Acid standard H,均由 Waters 公司提供),乙腈为色谱纯,二次重蒸水,三水醋酸钠、三乙胺为分析纯,不同药厂补中益气丸见表 1。

表 1 20 批补中益气丸样品药厂及批号

No.	批号	No.	批号
A 药厂	A1 05083514	B 药厂	B1 0609006
	A2 06081468		B2 0409004
	A3 06081467		B3 0408003
	A4 06083118		B4 0608005
C 药厂	C1 0506113	D 药厂	D1 050610
	C2 0601102		D2 060305
	C3 0506110		D3 061109
	C4 0602104	E 药厂	E1 20050205
	C5 0603106		E2 20061203
	C6 0511122		E3 20070101

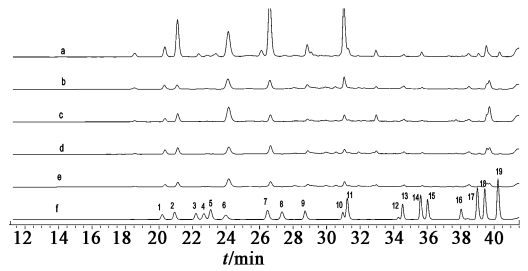
### 2 不同药厂补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱分析

2.1 不同药厂补中益气丸中氨基酸类成分的归属 采用文献<sup>[4]</sup>方法,制备各批次补中益气丸供试品溶液,注入高效液相色谱仪,测定各样品色谱图。提取氨基酸类成分指纹图谱及量化数据,不同药厂补中益气丸及 19 种氨基酸对照氨基酸指纹图谱见图 1,以氨基酸对照图谱中各色谱峰保留时间为指标,识别不同药厂补中益气丸中氨基酸成分。

由图 1、表 2 可知不同药厂补中益气丸中能够检测出的氨基酸数目各不相同,其中 A 药厂中氨基酸类成分共 17 个,且各峰面积比其他药厂大;5 个药厂产品中有 10 个氨基酸共有峰,分别为天门冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、NH<sub>3</sub>、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)。

2.2 参照峰的选定 指纹图谱中精氨酸(Arg)的色谱峰为各药厂补中益气丸共有色谱峰,保留时间约 26.65 min,位于整个色谱图的中心位置,分离度理想,吸收度较高,故选择其作为参照峰。

2.3 共有峰的确定 依据 2.1 项下所得各药厂



a. A 药厂; b. B 药厂; c. C 药厂; d. D 药厂;  
e. E 药厂; f. 19 种氨基酸对照品图谱

1. 天门冬氨酸; 2. 丝氨酸; 3. 谷氨酸; 4. 甘氨酸;
5. 组氨酸; 6. NH<sub>3</sub>; 7. 精氨酸; 8. 苏氨酸; 9. 丙氨酸; 10. 脯氨酸;
11. γ-氨基丁酸; 12. 半胱氨酸; 13. 酪氨酸; 14. 缬氨酸; 15. 蛋氨酸;
16. 赖氨酸; 17. 异亮氨酸; 18. 亮氨酸; 19. 苯丙氨酸

图 1 不同药厂补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱

表 2 不同药厂补中益气丸氨基酸类成分汇总表

No.	名称	A 药厂	B 药厂	C 药厂	D 药厂	E 药厂
1	天门冬氨酸	√	√	√	√	√
2	丝氨酸	√	√	√	√	√
3	谷氨酸	√	-	-	-	-
4	甘氨酸	√	-	-	-	-
5	组氨酸	√	-	-	-	-
6	NH <sub>3</sub>	√	√	√	√	√
7	精氨酸	√	√	√	√	√
8	苏氨酸	√	-	√	√	-
9	丙氨酸	√	√	√	√	√
10	脯氨酸	√	√	√	√	√
11	γ-氨基丁酸	-	-	-	-	-
12	半胱氨酸	√	√	-	-	-
13	酪氨酸	√	√	√	√	√
14	缬氨酸	√	√	√	√	√
15	蛋氨酸	-	-	-	-	-
16	赖氨酸	√	√	√	√	√
17	异亮氨酸	√	-	-	-	-
18	亮氨酸	√	√	√	√	√
19	苯丙氨酸	√	-	-	-	√

补中益气丸 10 个共有氨基酸作为指纹图谱分析的共有峰,其中亮氨酸因分离度较差,不计入共有峰范围,其余 9 个共有峰占总色谱面积的比例均在 83.65% 以上。其保留时间分别为 20.35, 21.11, 24.16, 26.65, 28.88, 31.07, 34.62, 35.71, 38.51 min,这些色谱峰可作为控制补中益气丸质量的标准之一。以精氨酸的色谱峰为参照峰,计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表 3。

2.4 氨基酸类成分指纹图谱相似度评价 将 20 批不同药厂补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱分别用中药指纹图谱相似度评价软件(以 20 批补中益气

表 3 20 批补中益气丸氨基酸类共有峰相对峰面积

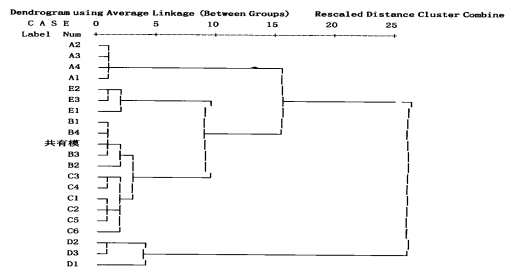
No.	Asp	Ser	NH <sub>3</sub>	Arg	Ala	Pro	Tyr	Val	Lys
A1	0.136 6	0.598 1	0.481 0	1.000 0	0.148 0	0.741 5	0.025 1	0.046 6	0.035 0
A2	0.160 7	0.564 5	0.526 3	1.000 0	0.161 3	0.892 5	0.024 2	0.044 7	0.030 8
A3	0.146 1	0.579 9	0.513 1	1.000 0	0.152 9	0.868 8	0.019 8	0.041 1	0.032 5
A4	0.114 6	0.506 8	0.431 1	1.000 0	0.167 2	0.838 9	0.021 2	0.045 8	0.035 8
B1	0.382 6	0.610 5	1.191 6	1.000 0	0.289 9	0.933 5	0.191 5	0.074 6	0.167 1
B2	0.434 7	0.553 9	1.161 7	1.000 0	0.308 6	1.055 1	0.242 5	0.091 4	0.217 6
B3	0.418 3	0.506 8	1.373 0	1.000 0	0.282 5	0.906 2	0.175 1	0.090 0	0.198 0
B4	0.313 4	0.631 0	1.188 3	1.000 0	0.348 8	0.886 0	0.171 2	0.071 0	0.157 5
C1	0.470 2	0.628 1	1.346 2	1.000 0	0.174 6	0.682 6	0.167 0	0.054 0	0.107 5
C2	0.385 6	0.608 8	1.225 7	1.000 0	0.153 2	0.632 3	0.177 0	0.085 0	0.111 8
C3	0.390 1	0.657 2	1.539 2	1.000 0	0.127 8	0.676 4	0.106 3	0.060 8	0.092 3
C4	0.544 4	0.844 1	1.548 1	1.000 0	0.178 9	0.662 3	0.165 6	0.062 1	0.095 1
C5	0.537 5	0.733 6	1.249 8	1.000 0	0.123 2	0.773 7	0.102 7	0.042 5	0.067 0
C6	0.327 2	0.850 3	1.293 2	1.000 0	0.162 1	0.791 5	0.107 1	0.047 2	0.102 9
D1	0.564 0	0.712 3	2.531 0	1.000 0	0.350 8	0.750 8	0.332 0	0.147 8	0.397 3
D2	0.454 2	0.671 0	2.140 6	1.000 0	0.260 9	0.670 7	0.276 6	0.175 0	0.403 3
D3	0.483 6	0.734 4	2.059 1	1.000 0	0.220 1	0.661 5	0.245 0	0.118 4	0.303 1
E1	0.483 1	0.756 9	1.216 7	1.000 0	0.526 7	0.606 3	0.159 7	0.403 3	0.485 7
E2	0.421 1	0.909 8	1.337 5	1.000 0	0.618 7	0.743 3	0.153 7	0.496 2	0.554 5
E3	0.403 5	0.825 9	1.148 5	1.000 0	0.629 6	0.868 7	0.178 1	0.418 8	0.590 4
均值	0.378 6	0.674 2	1.275 1	1.000 0	0.269 3	0.782 1	0.152 1	0.130 8	0.209 3

丸生成的对照图谱作参照)、相关系数法及夹角余弦法(以 20 批补中益气丸各氨基酸成分均值作参照)的方法计算相似度。结果见表 4。

**2.5 氨基酸类成分指纹图谱聚类分析** 聚类分析是利用相似系数或欧氏距离等量值大小,将系列样品按近似程度由远及近聚集一起,本实验以欧氏距离为聚类统计量(Squard Eudideun distance),运用 SPSS 软件进行数据处理,采用 ward's method 聚类法进行分析,将 20 批补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱进行图谱解析,获得其量化数据信息。对量化数据进行聚类分析<sup>[7]</sup>,结果 5 个药厂 20 批样品根据特征相近程度若分为 3 类,则 A 药厂为第一类,B,C,E 药厂归为第二类,D 药厂为第三类;若分为 5 类,每个药厂的产品自成一类,因此以 9 个氨基酸类成相对峰面积可区分不同药厂产品,见图 2。

**3 讨论**

在文献<sup>[5-6]</sup>基础上,本实验进一步研究不同药厂补中益气丸氨基类成分特征,因补中益气丸厂家较多,质量优劣参差不齐,以所有产品的均值作为共有模式评价药厂的差异,具有一定的可行性,可全面体现产品的成分特征,但成分之间的比例关系,不能代表产品质量的优劣,为反映产品的有效性,本研究



A1 ~ A4. A 药厂 4 批样品; B1 ~ B4. B 药厂 4 批样品;  
C1 ~ C6. C 药厂 6 批样品; D1 ~ D3. D 药厂 3 批样品;  
E1 ~ E3. E 药厂 3 批样品;  
共模为 20 批样品通过软件生成的对照

图 2 20 批补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱聚类谱系

以补中益气标准汤剂氨基酸类成分指纹图谱作为对照图谱,分析不同药厂补中益气丸氨基酸类成分差异,其中 A 药厂中有 17 个氨基酸类成分,且各峰面积比其他药厂大,B,C,D,E 药厂分别有 11 个氨基酸类成分;5 个药厂产品中有 9 个氨基酸共有峰,分别为天门冬氨酸(Asp)、丝氨酸(Ser)、精氨酸(Arg)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、赖氨酸(Lys)、亮氨酸(Leu)。

不同药厂产品相似度研究,①本实验收集了 5 个药厂产品,相同药厂产品相似度均在 0.98 以上,

表 4 不同药厂间补中益气丸氨基酸类成分指纹图谱相似度

不同厂家	No.	不同家相似度			药厂内部相似度		与标准汤剂相似度	
		相似度评价软件	相关系数	夹角余弦	相关系数	夹角余弦	夹角余弦	相关系数
A 药厂	A1	0.834	0.815	0.916	0.996	0.998	0.958	0.952
	A2	0.858	0.819	0.918	0.999	0.999	0.969	0.958
	A3	0.853	0.817	0.916	1.000	1.000	0.975	0.962
	A4	0.842	0.778	0.897	0.998	0.999	0.961	0.953
B 药厂	B1	0.969	0.985	0.995	0.999	1.000	0.933	0.858
	B2	0.955	0.958	0.986	0.993	0.997	0.932	0.861
	B3	0.916	0.983	0.994	0.992	0.997	0.900	0.777
	B4	0.925	0.987	0.995	0.995	0.998	0.933	0.858
C 药厂	C1	0.911	0.988	0.994	0.997	0.999	0.888	0.752
	C2	0.963	0.990	0.995	0.995	0.998	0.902	0.783
	C3	0.918	0.986	0.987	0.994	0.996	0.865	0.713
	C4	0.946	0.970	0.986	0.993	0.997	0.862	0.694
	C5	0.983	0.979	0.990	0.991	0.996	0.911	0.804
	C6	0.979	0.988	0.992	0.987	0.995	0.919	0.823
D 药厂	D1	0.802	0.884	0.949	0.998	0.999	0.744	0.447
	D2	0.865	0.910	0.963	0.999	1.000	0.775	0.502
	D3	0.892	0.931	0.969	0.997	0.999	0.790	0.542
E 药厂	E1	0.948	0.935	0.969	0.987	0.997	0.857	0.690
	E2	0.912	0.913	0.963	0.995	0.999	0.855	0.681
	E3	0.914	0.917	0.959	0.983	0.997	0.881	0.791

表明每家药厂产品质量相对稳定;②采用 20 批样品的均值作为共有模式,分析不同药厂补中益气丸特征差异,结果 A 药厂、D 药厂的相似度在 0.8~0.9 之间;B、C、E 药厂氨基酸类成分特征相近,且样本数量较多,对共有模式生成贡献较大,因此 B 药厂、C 药厂、E 药厂的相似度均在 0.9 以上;③为正确反映产品的有效性,分析产品质量优劣,本实验以标准汤剂指纹图谱为对照图谱<sup>[5]</sup>,分别计算各厂产品的相似度,不同药厂的相似度大小顺序为 A 药厂>B 药厂>C 药厂>E 药厂>D 药厂,表明 A 药厂的产品与标准汤剂氨基酸成分特征最相似。从图谱特征分析,各药厂能够检测出的氨基酸数目不尽相同,其中药厂 A 与标准汤剂指纹图谱在峰个数及峰比例方面最接近,表明图谱特征与相似度计算结果相符。

本实验采用聚类分析对 20 批不同药厂补中益气丸进行分类研究,结果显示,各药厂补中益气丸均可准确归类,分类结果与实际药厂归属基本相符,聚类分析图表征不同药厂产品氨基酸类成分的相近程度,其中药厂 B、C、E 图谱特征较相近。

[参考文献]

- [1] 翟佳,周晓红,张雪静.补中益气汤的研究概况[J].中华实用中西医杂志,2004,17(4):2935.
- [2] 花汝凤,黄可儿,柯雪红,等.补中益气汤双波长融合指纹图谱的整体性分析[J].中药新药与临床药理,2008,19(1):42.
- [3] 徐琪寿.氨基酸药理学研究进展[J].氨基酸和生物资源,1996,18(1):30.
- [4] 陈为,柯雪红,杨小催.AQC 柱前衍生 RP-HPLC 荧光法测定颅脑损伤患者脑脊液中氨基酸类神经递质[J].神经损伤与功能重建,2010,18(2):20.
- [5] 柯雪红,花汝凤,黄可儿等.补中益气丸中氨基酸类成分 HPLC 指纹图谱研究[J].中药新药与临床药理,2007,18(4):306.
- [6] 柯雪红,花汝凤,陈锦富,等.配伍对补中益气汤中氨基酸类成分影响的研究[J].中成药,2009,31(5):117.
- [7] 王燕,鲍家科,金杨等.西南鬼灯檠的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,23(1):64.

[责任编辑 顾雪竹]