

# HPLC 定量特征图谱在补阳还五汤质量评价中的应用

周琴妹<sup>\*</sup>, 张源, 陈武  
(江苏省中医院, 南京 210029)

**[摘要]** 目的:采用定量特征图谱对补阳还五汤进行质量评价,以此来定量控制其煎煮液的质量。方法:采用 HPLC 法建立补阳还五汤特征图谱,并进行方法学考察,以芍药苷为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,考察精密性、稳定性、重复性;建立 10 批补阳还五汤的特征图谱,并比较特征图谱的技术参数,通过计算其相关系数、夹角余弦和程度相似度,并结合数量相似度,综合评定了其质量。结果:精密性、稳定性、重复性考察中共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 <3.0%;样品的相关系数和夹角余弦计算结果都在 0.95 以上,无法反映样品间的差异;而程度相似度的结果差异较大,能反映样品间的差异。用程度相似度结合数量相似度的方法比通过相关系数、夹角余弦等计算相似度的方法可更好的反映出不同批次样品间的差异,达到控制产品质量的目的。结论:该方法准确、可行,对中药质量评价是一种合理、有效的技术手段。

**[关键词]** 补阳还五汤;特征图谱;程度相似度;数量相似度

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0075-04

## Application of Quantitative Characteristic Spectrum to Quality Evaluation of Buyanghuanwutang

ZHOU Qin-mei<sup>\*</sup>, ZHANG Yuan, CHEN Wu

(Jiangsu Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210029, China)

**[收稿日期]** 20110610(004)

**[基金项目]** 中医药行业科研专项项目(201007010)

**[通讯作者]** \*周琴妹,本科,主任中药师,从事中药制剂质量控制和新药开发研究, Tel:025-86529291, E-mail:joy\_zhouqinmei@yahoo.com.cn

- [10] 吴瑾瑾,朱雨晴,葛卫红,等. 猕猴桃根多糖脂质体包封率测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):21.
- [11] 陈彤,侯世祥,张文生,等. 复方硫酸长春新碱脂质体包封率的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(12):841.
- [12] 赵妍,于彬,邓意辉,等. 主动载药法制备硫酸长春新碱脂质体及其包封率的测定[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(20):1559.
- [13] NANCY L B. Optimization of liposomal retention properties of vincristine [D]. British: Univ. of British Columbia, 1994;33.
- [14] Waterhouse D N, Santos N D, Mayer L D, et al. Drug-drug interaction from the use of liposomal vincristine in combination with other anticancer drugs[J]. Pharm Res, 2001, 18(9):1331.
- [15] Zhigaltsev I V, Maurer N, Akhong Q F, et al. Liposome encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine. A comparative study of drug loading and retention [J]. J Control Release, 2005, 104(1):103.
- [16] Johnston M J, Semple S C, Klimuk S K, et al. Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin [J]. Biochim et Biophys Acta, 2007(768): 1121.
- [17] Masahiro Y, Kyoko T, Masayuki A, et al. Release of drugs from liposomes varies with particle size [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(5): 963.
- [18] 张灵芝. 脂质体的制备及其在生物医学中的应用 [M]. 北京:北京医科大学、协和医科大学联合出版社, 1998:5.

[责任编辑 顾雪竹]

**[ Abstract ] Objective:** To evaluate the quantitative characteristic spectrum to control the quality of buyanghuanwutang the product by extent. **Method:** The Characteristic spectrum of buyanghuanwutang was established. In methodological study, peoniflorin as the reference peak to calculate the RSD of the relative retention time and relative peak area of each common peaks, precision, stability and reproducibility were investigated as well. The characteristic spectrums of 10 batches of buyanghuanwutang were established. The quality of buyanghuanwutang was evaluated by the correlation, cosine of the angle and extent similarity of ten batches, combined with the numericalsimilarity. **Result:** RSD of the relative retention time and relative peak area of common peaks of precision, accuracy, repeatability was less than 3%. The calculation results of Samples' correlation coefficient and angle cosine are above 0.95, it cannot reflect the differences among samples, but there is a great difference in extent similarity, so it can reflect the differences among samples. The combination of the extent similarity and numerical similarity was better than the correlation, cosine of the angle. The combination reflected the differences of different batches, and was used to control the quality of products. **Conclusion:** This method is accurate and reliable, for quality evaluation of Traditional Chinese Medicine.

**[ Key words ]** Buyanghuanwutang; characteristic spectrum; extent similarity; numerical similarity

补阳还五汤出自清代名医王清任所著《医林改错》，该方由黄芪、当归、芍药、川芎、桃仁、红花、地龙共 7 味药组成，具有补气、活血、通络功效，为益气活血法之代表方剂，倍受医家推崇。其在抗血栓、抗衰老、抗血脂及免疫功能方面都有广泛的作用<sup>[1]</sup>。一般认为仅凭一个或几个化学成分难以全面反映中药复方的质量。中药特征图谱是近年来国际公认的用来控制中药或天然药物质量的有效方法<sup>[2-4]</sup>，其优点在于可比较全面反映中药复杂的化学成分及其相对比例。中药特征图谱是指中药材、饮片、中间体以及制剂等经过适当处理后，采用一定的分析手段得到的能够标示其特征的共有峰图谱。特征图谱是用相对保留时间及相对峰面积的比值进行评价，而指纹图谱采用相似度软件进行评价。定量特征图谱是一种综合的、量化的鉴定手段，用来鉴别真伪，评价中药材、饮片、中间体以及制剂等的质量。其基本特征是整体性和模糊性<sup>[5-6]</sup>。而色谱特征图谱的相似度计算又是其质量评价的重要环节，现已有多种相似度计算方法在特征图谱研究中<sup>[7]</sup>，其中最广泛的为相关系数、夹角余弦两种算法。为了更充分利用中药特征图谱包含的定性和定量信息，控制评价样品的质量，我们采用了定量特征图谱程度相似度方法，对补阳还五汤进行质量控制。

### 1 仪器与试剂

Waters e2695-2998 型高效液相色谱仪，包括 2998 二极管阵列检测器和自动进样器（美国 Waters 公司）；BP-211D 型电子分析天平（德国赛多利斯公司）；10 批补阳还五汤由江苏省中医院制剂部药检室提供，见表 1。

表 1 10 批补阳还五汤来源及批号

No.	批号	来源
1	20110117	江苏省中医院制剂部药检室
2	20110118	江苏省中医院制剂部药检室
3	20110119	江苏省中医院制剂部药检室
4	20110120	江苏省中医院制剂部药检室
5	20110121	江苏省中医院制剂部药检室
6	20110122	江苏省中医院制剂部药检室
7	20110123	江苏省中医院制剂部药检室
8	20110125	江苏省中医院制剂部药检室
9	20110126	江苏省中医院制剂部药检室
10	20110128	江苏省中医院制剂部药检室

乙腈、甲醇为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件与系统适应性试验<sup>[7]</sup>** C<sub>18</sub> 色谱柱（4.6 mm × 250 mm, 5 μm），流动相以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相，流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>，按表 2 进行梯度洗脱，柱温 30 ℃，检测波长 220 nm。

表 2 流动相梯度洗脱程序

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸水溶液/%
0	5	95
5	5	95
50	35	65
70	60	40
100	80	20
120	80	20

**2.2 供试品溶液的制备** 按处方比例称取饮片适量，加 10 倍量的水煎煮提取 2 次，每次提取 1 h，滤过，合并滤液，浓缩，定容至 100 mL。精密吸取滤液 2 mL 于 10 mL 量瓶中，用甲醇定容，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

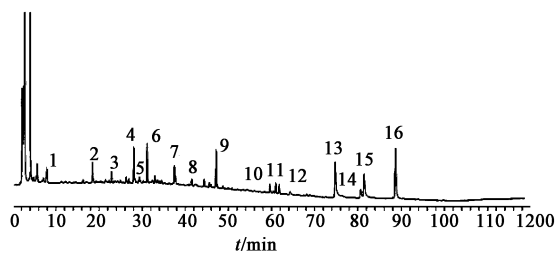
## 2.3 方法学考察

**2.3.1 精密度试验** 取批号为 20110128 的样品,按 2.2 项下方法制备,吸取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪中,按上述色谱条件测定。重复进样 6 次,以芍药苷(4 号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3.0%。表明仪器精密度良好。

**2.3.2 稳定性试验** 取批号为 20110128 的样品,按 2.2 项下方法制备,取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$ ,分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样,按上述色谱条件测定。以芍药苷(4 号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3.0%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.3.3 重复性试验** 取批号为 20110128 的样品,按 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,取供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ ,注入高效液相色谱仪中,按上述色谱条件测定。以芍药苷(4 号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3.0%。表明方法重复性良好。

**2.4 特征图谱及各项技术参数** 按上述色谱条件对 10 批补阳还五汤进行检测,然后将色谱图输入国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”进行时间窗的设置、谱峰匹配,最后确定补阳还五汤中含有 16 个共有色谱峰,见图 1。选择芍药苷(4 号峰)作为参照峰,各峰相对保留时间和相对峰面积见表 3。



3. 苦杏仁苷;4. 芍药苷

图 1 补阳还五汤 HPLC

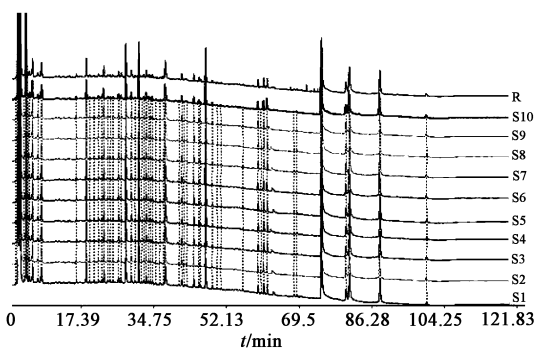
## 3 定量特征图谱对补阳还五汤的质量评价

**3.1 中国药典指纹图谱相似度评价系统的评价** 将 10 批补阳还五汤 HPLC 图的 AIA 数据文件导入国家药典委员会开发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”,见图 2。计算各样品特征图谱与生成的对照图谱 R 的相似度,结果分别为 0.962, 0.983, 0.957, 0.955, 0.953, 0.961, 0.958, 0.966, 0.973, 0.959。

**3.2 程度相似度的评价**<sup>[8]</sup> 中药色谱特征图谱包

表 3 10 批补阳还五汤共有峰相对保留时间及相对峰面积

峰号	保留时间	相对峰面积	峰号	保留时间	相对峰面积
1	0.281	0.685	9	1.684	1.184
2	0.662	0.537	10	2.131	0.250
3	0.814	0.280	11	2.181	0.301
4(S)	1.000	1.000	12	2.210	0.266
5	1.047	0.258	13	2.674	2.983
6	1.111	0.873	14	2.885	0.551
7	1.337	0.882	15	2.914	1.408
8	1.481	0.163	16	3.175	1.170



R. 参考图谱;S<sub>1</sub> ~ S<sub>10</sub>. 10 批补阳还五汤样品

图 2 10 批补阳还五汤 HPLC 叠加

含信息的复杂性决定了其评价指标多样性,相似度是众多评价指标中应用较多的一类。**3.1** 采用的相似度计算是采用相似系数  $r$  和夹角余弦  $\cos\alpha$  评价指标,无法完全反应出不同药材或成品间的差异,因此我们采用了程度相似度( $Q_u$ )进行计算,程度相似度公式为:

$$Q_u = 1/n \sum_{i=1}^n u_{ij}(X_i)$$

其中  $U_{ij}(xi)$  表示第  $i$  个相同色谱峰的峰面积,  $n$  为色谱峰的数目。选取 10 批样品的 16 个共有色谱峰峰面积的平均值作为参照,计算各样品和参照图谱的相似度,见表 4。

从表 4 中可看出,样品的相关系数和夹角余弦计算结果均 > 0.95,无法反映出不同批次间的差异。而程度相似度的计算结果可明显看出样品差异,其中,1 号样品差异最大,2 号和 9 号样品差异最小。而表 4 的结果又证明了这点,平均差异较大的 1 号和 4 号样品,其程度相似度分别只有 0.75 和 0.76,2 号和 9 号样品的平均差异最小,为 11%,其对应的程度相似度则是 0.89,是程度相似度中最大的两个样品,这从另一方面说明了程度相似度可以较好的反映出不同批次补阳还五汤间的差异。

表 4 以相关系数、夹角余弦和程度相似度  $Q$  计算 10 批样品与参照图谱的相似度

No.	相关系数	夹角余弦	程度相似度
1	0.962	0.965	0.756
2	0.983	0.984	0.896
3	0.957	0.958	0.798
4	0.955	0.954	0.781
5	0.953	0.955	0.769
6	0.961	0.967	0.788
7	0.958	0.959	0.786
8	0.966	0.959	0.785
9	0.973	0.974	0.893
10	0.959	0.960	0.789

**3.3 数量相似度的评价** 运用相关系数、夹角余弦或程度相似度等算法计算时,只是针对不同特征图谱的共有峰进行计算,无法反应出非共有峰的差异,因此无法完全反映出不同样品间的差异,我们采用了数量相似度 ( $Q_n$ ) 进行计算,数量相似度公式为:  $Q_n = n/K + L - n$  其中  $K, L$  分别代表两个色谱图中各自的色谱峰数目,  $n$  为共有色谱峰的数目<sup>[8]</sup>。以相同积分条件积分计算峰数,并根据公式计算其数量相似度,结果见表 5。

表 5 10 批补阳还五汤特征图谱与参照图谱的数量相似度

样品	峰数量	相似度
1	18	0.889
2	16	1
3	17	0.941
4	17	0.941
5	20	0.800
6	18	0.889
7	17	0.941
8	18	0.889
9	16	1
10	20	0

## 4 结论与讨论

**4.1 色谱条件的选择** 考察了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1% 磷酸水溶液 3 种流动相梯度洗脱效果,结果表明以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱效果最好,基线较平稳,色谱峰分离度良好;同时采用二极管阵列检测器对检测波长进行了选择,见图 3,发现 220 nm 检测波长下色谱图峰信息最多,成分含量较高,且基线平稳,分离度较好;实验过程中采集了 150 min 的色谱图,发现 120 min 后未出现色谱峰,所以选择检测时间为 120 min。

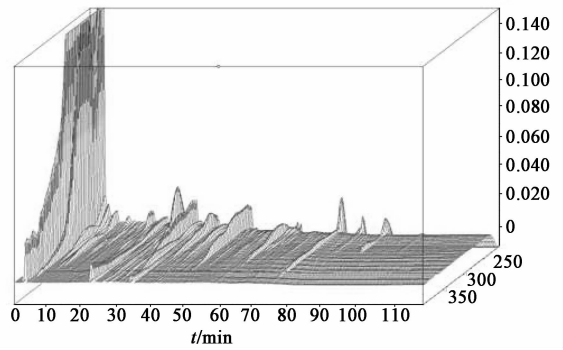


图 3 补阳还五汤 HPLC (3D)

**4.2 定量特征图谱的评价** 计算样品的程度相似度和数量相似度后,可以明显看出不同批次样品间的差异,并可通过整体相似度来控制样品质量。从表 4,5 中可见,在生产中,当 2 号与 9 号样品的程度相似度控制在 0.89 以上时,即可将预控制成分的含量差异控制在 11% 以下,而当其数量相似度控制的越接近于 1,说明不同批次间的成分差异越小,这是相关系数和夹角余弦都无法做到的。因此,我们可以定量的评价不同批次补阳还五汤样品间的差异,该方法可用来评价控制中药的质量。

## [参考文献]

- [1] 王敏,邓常青,贺福元. 补阳还五汤抗脑缺血作用的研究概况与展望[J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(4): 71.
- [2] 国家食品药品监督管理局. 关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671.
- [3] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 141.
- [4] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与应用[J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 135.
- [5] 李卓明,黄雯,李明. 安神补脑液高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 18.
- [6] 尹雪,黄国存,魏刚. 黄芪,白术,防风单煎、合煎对玉屏风煎剂 HPLC 指纹图谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 1.
- [7] 邹亮,彭镰心,罗杰英,等. 中药补阳还五汤的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2009, 31(4): 48.
- [8] LIU Y S, MENG Q H, JIANG S M, et al. Similarity system theory to evaluate similarity of chromatographic fingerprints of traditional chinese medicine [J]. Chin J Chromatogr, 2005, 23(2): 158.

[责任编辑 顾雪竹]