

指纹图谱总量统计矩法对补阳还五汤分煎与合煎
提取成分变化的影响

周晋¹, 邓凯文², 贺福元^{1*}, 石继连¹
(1. 湖南中医药大学 药学院, 长沙 410208;
2. 湖南中医药大学 第一附属医院, 长沙 410007)

[摘要] 目的:运用总量统计矩法,以 HPLC 指纹图谱方式,研究补阳还五汤分煎与合煎提取物中化学成分的差异。方法:以常规方法制备补阳还五汤分煎与合煎的提取物,并采用总量统计矩法对补阳还五汤的分煎与合煎提取物指纹图谱参数进行计算,比较参数的差异。结果:单个对照品统计矩加合参数与混合对照品统计矩参数比较可知, $\bar{\lambda}_{T,j=1}$ 的加合性为 96.21%, $\bar{\sigma}_{r,i=1}^2$ 的加合性为 129.6%,平均加合性为 97.47%。单味药材统计矩加合参数与药材处方液统计矩参数比较可知 $\bar{\lambda}_{T,j=1}$ 的加合性为 70.50%, $\bar{\sigma}_{r,i=1}^2$ 的加合性为 81.97%,平均加合性为 50.55%。结论:分煎与合煎提取物中化学成分组成存在差异,该法具有对指纹图谱进行加合性分析的功能。

[关键词] 总量统计矩;补阳还五汤;高效液相指纹图谱;分煎;合煎
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)09-0079-04

Composition Change Information of Chromatographic
Fingerprint of Buyanghuanwu Decoction in Extraction Single
and Together with Total Quantum Statistical Moment Method

ZHOU Jin¹, DENG Kai-wen², HE Fu-yuan^{1*}, SHI Ji-lian¹
(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. The First Affinity Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To study the composition change information of chromatographic fingerprint of Buyanghuanwu Decoction in the extraction single and together with total quantum statistical moment method (TQSM). **Method:** The extracts of Buyanghuanwu decoction were prepared by decocting single and together under the same process. The comparison was done between the different parameter of decocting single and together by TQSM. **Result:** Control article's additional parameter $\bar{\lambda}_{T,j=1}$ was 96.21%, $\bar{\sigma}_{r,i=1}^2$ was 129.6%, average additional parameter was 97.47%. Medical material's additional parameter $\bar{\lambda}_{T,j=1}$ was 70.50%, $\bar{\sigma}_{r,i=1}^2$ was 81.97%, average additional parameter was 50.55%. **Conclusion:** Its chemical substances are different between the two extracts. The TQSM was of the characters of additional properties for chromatographic fingerprint.

[Key words] total quantum statistical moment (TQSM); buyanghuanwu decoctio; HPLC fingerprint; decoction single; decoction together

[收稿日期] 20111108(008)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073142);湖南省“十二五”重点学科“药学”项目
[第一作者] 周晋,讲师,硕士,从事中药有效成分分析研究
[通讯作者] * 贺福元,教授,博士,博士生导师,从事中药四谱学、中药药剂学及中医药信息数学分析等研究,
Tel: 0731-85381372, E-mail: pharmsparking@tom.com

中药复方为多成分体系,复方的化学成分不等于各单味药化学成分的简单相加^[1],在配伍过程中会发生量的变化(量变)以及产生新的化合物(质变)。目前对中药复方的研究多采用植化方法对全方化学成分进行系统提取、分离、纯化和结构鉴定的方法,以及以药效为标准追踪复方活性部位与有效

成分的方法^[2]。这些都能全面分析复方化学成分是什么,与单味药成分比较有何区别以及有无新化合物生成。但这些方法对于中药复方这种多成分体系的研究耗时、耗能、耗力,不利于对中药复方配伍规律的研究。本文作者在其导师前期研究基础上^[3-4](总量统计矩法分析指纹图谱),采用总量统计矩法对补阳还五汤的分煎与合煎提取物指纹图谱参数进行计算,通过比较参数的差异来预示成分的变化。如总复方的数学期望和方差与单味药材成分的数学期望和方差加合性差异较大,预示在配伍提取时成分发生了变化,也可能有新成分的产生。这给分析补阳还五汤配伍中成分的变化提供了一种新的分析方法,从而对中药复方在煎煮过程中的成分变化作初步了解,对煎煮过程中是否有新成分的产生研究奠定基础。

1 材料

高效液相色谱仪, Waters 2487 Dual Absorbance Detector, Breeze 工作站(Waters 公司)。苦杏仁苷(批号 110820-200403)、阿魏酸(批号 110773-200611)、芍药苷(批号 110736-201035)、盐酸川芎嗪(批号 110817-200305)对照品均购于国家药品生物制品检定所。黄芪、当归、川芎、赤芍、桃仁、红花、地龙对照药材均购于国家药品生物制品检定所,乙腈、甲醇为色谱纯,蒸馏水为二次重蒸馏水,乙醇等其他试剂均为分析纯。

补阳还五汤处方:黄芪 60 g, 当归 9 g, 川芎 6 g, 赤芍 9 g, 桃仁 9 g, 红花 9 g, 地龙 9 g。

2 方法

2.1 HPLC 指纹图谱的方法建立 色谱柱 Ultimate-xb C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-水(含 1% 乙酸)梯度洗脱[0 min (0:100) ~ 10 min (0:100) ~ 25 min (7:93) ~ 35 min (12.5:87.5) ~ 45 min (18:82) ~ 55 min (25:75) ~ 65 min (30:70) ~ 70 min (32.5:67.5) ~ 71 min (37:63) ~ 80 min (40:60) ~ 100 min (80:20) ~ 115 min (100:0) ~ 120 min (0:100)]; 流速 1 mL·min⁻¹, 波长 264 nm, 温度 40 ℃。

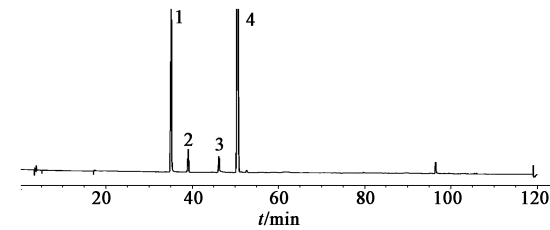
2.2 供试液的制备

2.2.1 补阳还五汤供试品溶液 按处方比例精密称定对照药材组成的全方 11.19 g, 用 8 倍蒸馏水回流提取 1 h, 过滤, 蒸发浓缩水液至 10.0 mL, 加 8 倍量乙醇醇沉, 再滤过, 浓缩, 用甲醇定容至 10.0 mL, 得补阳还五汤供试品溶液。见图 1。

2.2.2 单味药材供试品溶液 按处方比例精密称

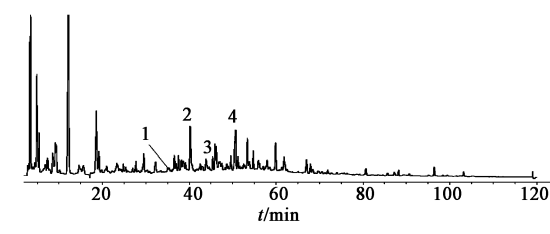
定对照药材黄芪 6.026 g, 川芎 0.657 g, 赤芍 0.955 g, 桃仁 0.961 g, 红花 0.915 g, 地龙 0.916 g, 当归 0.924 g, 分别用 8 倍蒸馏水回流提取 1 h, 过滤, 蒸发浓缩水液至 10.0 mL, 加 8 倍量乙醇醇沉, 再滤过, 浓缩, 用甲醇定量至 10.0 mL, 得单味药材供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液 精密称取苦杏仁苷、芍药苷、盐酸川芎嗪、阿魏酸, 加甲醇配制成每 1 mL 含苦杏仁苷 3.2 mg, 芍药苷 1.3 mg, 川芎嗪 5.5 mg, 阿魏酸 0.56 mg 的混合对照品溶液与单一对照品溶液。见图 2。



1. 盐酸川芎嗪; 2. 苦杏仁苷; 3. 芍药苷; 4. 阿魏酸

图 1 混合对照品溶液 HPLC



1. 盐酸川芎嗪; 2. 苦杏仁苷; 3. 芍药苷; 4. 阿魏酸

图 2 补阳还五汤供试品溶液 HPLC

3 结果

3.1 补阳还五汤指纹图谱积分条件的确定 精密吸取甲醇 20 μL, 进样按指纹图谱测定条件记录图谱, 分别以峰宽、响应率、最小峰面积、最小峰高(分别为 0.01 s, 0 μVs⁻¹, 0 μVs, 0 μV)的仪器最低值积分得空白甲醇的参数。由于在进行梯度洗脱时, 因洗脱剂的比例改变及甲醇的杂质所产生稳定的空白对照峰, 分别再按峰宽、响应率、最小峰面积、最小峰高(分别为 0.01 s, 0 μVs⁻¹, 3 000 μVs, 0 μV)积分, 得空白参数。将空白的峰当作色谱峰处理, 总峰数减去空白色谱峰, 根据噪音峰的平均峰宽、平均响应率、平均最小峰面积、平均最小峰高以及信噪比为 3 倍^[5-6]确定该指纹图谱的积分阈值: 峰宽、响应率、最小峰面积、最小峰高分别为 26 s, 30 μVs⁻¹, 8 600 μVs, 500 μV。

3.2 仪器的精密测定 分别吸取补阳还五汤供试液 20 μL, 进样 5 次(表 1)。

3.3 样品的测定 分别精密吸 20 μL 混合对照品溶液与单一对照品溶液(表 2)、补阳还五汤供试液

(表 1)、单味药材供试液(表 3)进样测定。

3.4 加合处理(表 4)

表 1 补阳还五汤供试液总量统计矩参数

参数	补阳还五汤供试液					RSD /%	20 μL 甲醇	BYHW- 甲醇
	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL			
最大峰面积/ $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$	1.530×10^7	1.657×10^7	8.550×10^6	7.819×10^6	1.013×10^7		4.523×10^5	
最小峰面积/ $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$	9.037×10^3	8.468×10^3	1.081×10^4	1.173×10^4	1.337×10^4		7.544×10^3	
$\sum \lambda_j/\text{min}$	7.185×10^3	6.411×10^3	6.771×10^3	6.481×10^3	6.166×10^3		6.782×10^3	
$\text{AUC}_\text{T}/\sum A_j, \mu\text{v}\cdot\text{sec}$	9.659×10^7	1.321×10^8	6.123×10^7	3.259×10^7	5.075×10^7		4.199×10^6	7.045×10^7
$\text{AUCPW}_\text{T}/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{mg}^{-1}$	1.197×10^6	1.236×10^6	1.123×10^6	9.769×10^5	1.085×10^6		2.658×10^5	8.578×10^5
$\sum \lambda_j\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}$	3.793×10^9	5.040×10^9	2.433×10^9	1.224×10^9	1.780×10^9		2.766×10^8	2.577×10^9
$\sum \sigma_{j^2}\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}^2$	4.920×10^6	5.670×10^6	2.832×10^6	2.417×10^7	1.878×10^6		1.465×10^5	7.748×10^6
$\sum \lambda_{j^2}\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}^2$	2.440×10^{11}	3.134×10^{11}	1.552×10^{11}	8.578×10^{10}	1.179×10^{11}		2.506×10^{10}	1.582×10^{11}
$\overline{\lambda}_{T,i=1}/\text{min}$	39.27	38.17	39.74	37.55	35.07	4.8	65.88	36.58
$\overline{\sigma}_{T,i=1}^2/\text{min}^2$	984.2	916.2	956.2	1223	1093	11.9	1627	907.6

表 2 四个对照品的总量统计矩加合性参数

参数	川芎嗪	芍药苷	阿魏酸	苦杏仁苷	加合单一 对照品	所测混合 对照品
最大峰面积/ $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$	1.794×10^6	1.626×10^6	1.931×10^6	1.727×10^6		1.264×10^6
最小峰面积/ $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$	1.001×10^4	8.015×10^3	8.839×10^3	9.724×10^3		1.302×10^4
$\sum \lambda_j/\text{min}$	3.556×10^3	2.689×10^3	2.101×10^3	1.718×10^3		2.626×10^3
$\text{AUC}_\text{T}(\sum A_j, \mu\text{v}\cdot\text{sec})$	5.133×10^6	4.199×10^6	6.489×10^6	3.992×10^6	5.372×10^6	6.723×10^6
$\sum \lambda_j\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}$	3.388×10^8	2.583×10^8	2.402×10^8	2.212×10^8	2.580×10^8	3.356×10^8
$\sum \sigma_j^2\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}^2$	9.800×10^5	1.839×10^5	7.947×10^5	1.045×10^5	5.918×10^5	4.970×10^5
$\sum \lambda_j^2\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}^2$	2.642×10^{10}	2.031×10^{10}	1.900×10^{10}	1.739×10^{10}	2.029×10^{10}	2.438×10^{10}
$\overline{\lambda}_{T,i=1}/\text{min}$	66.01	61.51	37.01	55.41	48.03	49.92
$\overline{\sigma}_{T,i=1}^2/\text{min}^2$	790.4	1055	1559	1286	1470	1134

表 3 七味药材总量统计矩加合参数

参数	黄芪	川芎	赤芍	桃仁	红花	地龙	当归
最大峰面积/ $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$	7.792×10^6	6.867×10^6	1.480×10^7	1.560×10^6	3.129×10^6	8.618×10^6	1.952×10^7
最小峰面积/ $\mu\text{v}\cdot\text{sec}$	8.959×10^3	7.599×10^3	8.246×10^3	7.506×10^3	7.635×10^3	1.787×10^4	1.147×10^4
$\sum \lambda_j/\text{min}$	4.323×10^3	6.645×10^3	4.572×10^3	3.216×10^3	1.212×10^4	8.337×10^2	1.768×10^4
$\text{AUC}_\text{T}/\sum A_j, \mu\text{v}\cdot\text{sec}$	2.911×10^7	3.264×10^7	2.709×10^7	1.243×10^7	2.154×10^7	1.465×10^7	8.026×10^7
$\text{AUCPW}_\text{T}/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{mg}^{-1}$	9.454×10^5	9.772×10^5	9.246×10^5	6.733×10^5	8.548×10^5	7.288×10^5	1.170×10^6
$\sum \lambda_j\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}$	7.094×10^8	6.976×10^8	3.644×10^8	4.519×10^8	7.507×10^8	1.777×10^8	2.651×10^9
$\sum \sigma_j^2\cdot A_j/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}^2$	1.233×10^6	1.909×10^6	1.769×10^6	1.1097×10^6	1.604×10^6	1.041×10^6	3.372×10^7
$\sum \lambda_j^2\cdot A/\mu\text{v}\cdot\text{sec}\cdot\text{min}^2$	4.090×10^{10}	2.667×10^{10}	8.924×10^9	3.403×10^{10}	3.568×10^{10}	4.102×10^9	1.508×10^{11}
$\overline{\lambda}_{T,i=1}/\text{min}$	24.37	21.37	13.45	36.61	34.85	12.13	33.03
$\overline{\sigma}_{T,i=1}^2/\text{min}^2$	811.2	360.2	148.5	1416	441.8	133.0	788.6

4 分析与讨论

由表 1 可知, $\overline{\lambda}_{T,i=1}$ 的 RSD 为 4.8%, $\sigma_{T,n=1}$ 的 RSD 为 3.4% (由 $\overline{\sigma}_{r,i=1}$ RSD 为 11.9% 算得, 余下同), 说明高效液相仪器的精密度是可靠的。

由表 2 可知, 用总量统计矩法扣除甲醇后, 4 大对照品液指纹图谱 $\overline{\lambda}_{T,i=1}$ 为 49.92 min; $\overline{\sigma}_{T,i=1}$ 为 33.67 min (由 $\overline{\sigma}_{r,i=1}^2$ 为 1134 min^2 算得), 保留时间居指纹图谱近中心, 提示对照品混合物是中等极性的,

这与芍药苷、苦杏仁苷、川芎嗪、阿魏酸对照品的性质是吻合。

表 4 对照品与药材统计矩加合性

参数	对照品加合性			药材加合性		
	加合单个对照品	混合对照品	$\Lambda/\%$	加合单味对照药材	对照药材处方液	$\Lambda/\%$
$AUC_T/\sum A_j, \mu v \cdot sec$	5.372×10^6	6.723×10^6	79.80	3.015×10^7	7.045×10^7	42.80
$\sum \lambda_j \cdot A_j/\mu v \cdot sec \cdot min$	2.580×10^8	3.356×10^8	76.88	7.776×10^8	2.577×10^9	30.17
$\sum \sigma_j^2 \cdot A_j/\mu v \cdot sec \cdot min^2$	5.918×10^5	4.970×10^5	119.1	3.952×10^6	7.748×10^6	51.01
$\sum \lambda_j^2 \cdot A_j/\mu v \cdot sec \cdot min^2$	2.029×10^{10}	2.438×10^{10}	83.22	4.249×10^{10}	1.582×10^{11}	26.86
$\bar{\lambda}_{T,i=1}/min$	48.03	49.92	96.21	25.79	36.58	70.50
$\bar{\sigma}_{T,i=1}^2/min^2$	1470	1134	129.6	744.0	907.6	81.97
平均加合性			97.47			50.55

由表 4 中的单个对照品统计矩加合参数与混合对照品统计矩参数比较可知, $\bar{\lambda}_{T,i=1}$ 的加合性为 96.21%, $\bar{\sigma}_{T,i=1}^2$ 的加合性为 129.6%, 平均加合性为 97.47%, 提示总量统计矩法能用于多成分的加合性分析。单味对照药材统计矩加合参数与对照药材处方液统计矩参数比较可知, $\bar{\lambda}_{T,i=1}$ 的加合性为 70.50%, $\bar{\sigma}_{T,i=1}^2$ 的加合性为 81.97%, 平均加合性为 50.55%, 说明全方合煎的数学期望和方差与单味药材成分的数学期望和方差加合性差异较大, 预示在配伍提取时成分发生了变化, 也可能有新成分的产生。

综上所述, 用总量统计矩法, 在扣除溶剂和仪器噪音干扰后, 可用 $\bar{\lambda}_{T,i=1}, \bar{\sigma}_{T,i=1}^2$ 对中药复方煎煮过程中成分的变化情况作分析, 可用于研究中药复方配伍后各单味药之间的相互作用, 甚至可用于各单味药合煎后产生的新成分研究。本课题后期就打算对复方煎煮后的 $\bar{\lambda}_{T,i=1}, \bar{\sigma}_{T,i=1}^2$ 明显大于各单味药的加合情况作进一步分析, 从而找出合煎后的新成分。因此, 本方法对中药复方的配伍规律的研究具有重

要意义, 对中药复方煎煮过程中产生新成分问题具有指导性的意义。

[参考文献]

[1] 严永清, 朱丹妮, 吴建新, 等. 六味地黄汤化学研究方法的探索[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(5): 310.
[2] 文志明, 徐礼荣. 中药复方化学成分的研究进展[J]. 中草药, 1999, 30(6): 468.
[3] 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.
[4] 贺庆平, 贺福元, 邓凯文, 等. 高效液相色谱法测定补阳还五汤及总苷部位中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7): 3.
[5] 李发美. 医药高效液相色谱技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
[6] 孙毓庆. 分析化学. 下册[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999.

[责任编辑 蔡仲德]