

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)19-0091-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.19.019



肠胃散高效液相色谱指纹图谱及化学模式识别研究*

陈 锋

(广西壮族自治区中医药研究院化学所·广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: 目的 为肠胃散的质量评价提供参考。方法 建立高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB - C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.2% 磷酸溶液 (梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 226 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)建立 10 批样品的 HPLC 叠加指纹图谱, 并进行相似度评价。考察整体相似度和改良程度相似度方法的适用性, 结合聚类分析法和主成分分析法综合评价其质量。结果 HPLC 指纹图谱共识别出 18 个共有峰, 确定峰 1、峰 7、峰 9、峰 11、峰 14、峰 16 分别为橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱和吴茱萸次碱。指纹图谱评价系统相似度、整体相似度和改良程度相似度分别为 0.996~1.000, 0.886~0.955, 0.878~0.951; 按整体相似度和改良程度相似度分类, 编号为 S3-S4, S6-S7, S9 的样品聚为一类, 其余编号的样品聚为另一类。聚类分析法将 10 批样品聚为 3 类, 编号为 S3-S4, S6-S7, S9 的样品, 编号为 S8, S10 的样品, 编号为 S1-S2, S5 的样品分别聚为一类。经主成分分析, 4 个主成分累积方差贡献率为 90.662%, 主成分综合得分排序按样品编号从大至小为 S8 > S9 > S6 > S3 > S7 > S10 > S4 > S5 > S1 > S2。结论 所建立的方法简单快速、可行性高, 可用于全面评价肠胃散的质量。

关键词: 肠胃散; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 整体相似度; 改良程度相似度; 聚类分析法; 主成分分析法

HPLC Fingerprints and Chemical Pattern Recognition of Changwei Powder

CHEN Feng

(Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science · Guangxi Key Laboratory of the Quality Standard of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530022)

Abstract: Objective To provide a reference for the quality evaluation of Changwei Powder. **Methods** The high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint was established, the chromatographic column was Agilent Eclipse XDB - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.2% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 226 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 10 μL. The Similarity Evaluation System for Fingerprint Chromatographic of Traditional Chinese Medicine (Version 2012) was used to establish HPLC overlay fingerprints of 10 batches of samples and conduct similarity evaluation. The applicability of methods for overall similarity and improved extent similarity was investigated, and the quality was comprehensively evaluated by combining clustering analysis and principal component analysis. **Results** A total of 18 common peaks were identified in the HPLC fingerprints, and peaks 1, 7, 9, 11, 14, and 16 were determined to be hesperidin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, eugenol, evodiamine, and rutaecarpine, respectively. The similarity of fingerprints, overall similarity, and improved extent similarity were 0.996 - 1.000, 0.886 - 0.955, and 0.878 - 0.951, respectively. According to the overall similarity and improved extent similarity, samples numbered S3 - S4, S6 - S7, and S9 were grouped into one category, while samples with other numbers were grouped into another category. Cluster analysis was used to group 10 batches of samples into three categories: samples numbered S3 - S4, S6 - S7 and S9, samples numbered S8 and S10, and samples numbered S1 - S2 and S5. According to principal component analysis, the cumulative variance contribution rate of the four principal components was 90.662%. The comprehensive scores of the principal components were ranked in descending order of sample number as S8 > S9 > S6 > S3 > S7 > S10 > S4 > S5 > S1 > S2. **Conclusion** The established method is simple, fast, and highly feasible, which can be used to comprehensively evaluate the quality of Changwei Powder.

Key words: Changwei Powder; HPLC; fingerprint; overall similarity; improved extent similarity; cluster analysis; principal component analysis

肠胃散是由肉桂叶、吴茱萸、丁香、陈皮、岗松、大叶桉等多味中药组方的外用贴剂, 用于治疗寒湿蕴结所致泄泻、腹痛肠鸣^[1]。肠胃散化学成分复杂, 仅测定其中的几个成分含量不能全面反映制剂的质量^[2]。多成分、多靶点是中药化学和药理学的显著特点, 但由于技术手段与研究工作的局限性, 一般仅对部分成分进行定

性和定量分析, 无法达到综合评价质量的目的。高效液相色谱(HPLC)指纹图谱技术可用于多组分特别是含未定性化合物制剂的质量综合评价, 一致性和稳定性较好^[3]。指纹图谱的评价指标也在逐步完善, 强化了评价方法的科学性, 提高了中药质量控制水平^[4]。相似度评价是 HPLC 指纹图谱的主要评价方法, 多用于中药材

*基金项目: 广西科技重大专项项目[桂科 AA23023002]; 广西中医药适宜技术开发与推广项目[GZSY22-10]。

第一作者: 陈锋, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为植物化学和药物分析, (电子信箱)120765361@qq.com。

品种的比较,但较难反映差异不大和工艺稳定的样品间的差异性^[5]。本研究建立了肠胃散的HPLC指纹图谱,并进行相似度评价,以此对整体相似度和改良程度相似度的适用性进行考察,并采用聚类分析法和主成分分析法综合评价肠胃散的质量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司);XS205型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);KS-500DE型超声波清洗器(昆山洁力美超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

橙皮苷对照品(批号为110721-201818,含量为96.20%),肉桂酸对照品(批号为110786-201604,含量为98.80%),桂皮醛对照品(批号为110710-201720,含量为98.70%),均购自中国食品药品检定研究院;丁香酚对照品(批号为MUST-16040204,含量为99.00%),吴茱萸碱对照品(批号为MUST-16040313,含量为99.99%),吴茱萸次碱对照品(批号为MUST-16040314,含量为99.97%),均购自成都曼思特生物科技有限公司;肠胃散(批号分别为201812051,201812052,201812061,201812062,201812063,201812071,201812072,201812073,201812081,201812082,编号为S1-S10),不含陈皮、肉桂、丁香和艾叶、吴茱萸的阴性样品均购自广西源安堂药业有限公司;乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min时22%A,10~60 min时22%A→45%A,60~70 min时45%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:226 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

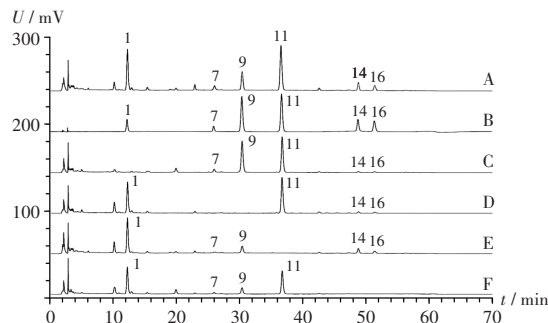
2.2 溶液制备

分别取橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品各适量,精密称定,用甲醇溶解,经微孔滤膜滤过,即得混合对照品溶液。取样品粉末0.5 g,精密称定,置具塞三角瓶中,加甲醇25 mL,称定质量,超声30 min,放冷至室温,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。分别取不含陈皮、肉桂、丁香和艾叶、吴茱萸的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,经微孔滤膜滤过,即得阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品

溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。



1. 橙皮苷 7. 肉桂酸 9. 桂皮醛 11. 丁香酚 14. 吴茱萸碱
16. 吴茱萸次碱

A. 供试品溶液 B. 混合对照品溶液 C - F. 阴性对照品溶液
(分别缺陈皮、肉桂、丁香和艾叶、吴茱萸)

图1 高效液相色谱图

1. Hesperidin 7. Cinnamic acid 9. Cinnamaldehyde 11. Eugenol
14. Evodiamine 16. Rutaecarpine

A. Test solution B. Mixed reference solution C - F. Negative reference solution (lacking Citri Reticulatae Pericarpium, Cinnamomi Cortex, Caryophylli Flos, Artemisiae Argyi Folium, and Euodiae Fructus)

Fig. 1 HPLC chromatograms

精密度试验:精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的RSD分别为1.85%,1.98%,1.36%,0.74%,2.39%,1.92%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(编号为S1)适量,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量的RSD分别为1.02%,2.68%,1.67%,0.98%,2.51%,1.94%(n=6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于4,8,12,16,20,24 h时按2.1项下色谱条件进样,记录峰面积。结果橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积的RSD分别为2.20%,2.77%,1.88%,2.23%,2.95%,2.54%(n=6),表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.4 HPLC 指纹图谱建立与相似度评价

指纹图谱建立与共有峰指认:取10批样品(编号为S1-S10)各适量,精密称定,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)对色谱图进行分析,以编号为S1的样品的色谱图参照图谱,时间窗为0.1 min,采用中位数法,经多点校正和全谱峰匹配,生成叠加指纹图谱(图2),共标识18个

共有峰。通过与混合对照品溶液色谱图(图 1)进行对比,共指出 6 个共有峰,其中峰 1、峰 7、峰 9、峰 11、峰 14、峰 16 分别为橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱和吴茱萸次碱。11 号峰保留时间适中,面积较大,故设为参照峰(S)。

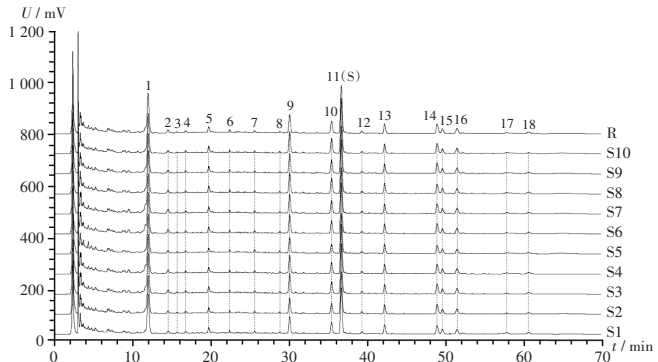


图 2 10 批样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 2 HPLC overlay fingerprints of 10 batches of samples

相似度评价:分别采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)、整体相似度(Q)公式(1)和改良程度相似度(Q')公式(2)计算 10 批样品的 HPLC 与对照图谱的相似度。其中,整体相似度可定量反映样品相对差异的大小;当峰面积的差异不超过 100.00% 时,改良程度相似度可精确反映样品与参照的相对差异^[6]。由表 1 可知,评价系统的相似度结果均不低于 0.996,表明肠胃散各批次间的化学成分基本一致;整体相似度和改良程度相似度结果基本一致,分别介于 0.886~0.955 和 0.878~0.951,其中编号为 S3-S4, S6-S7, S9 的样品(相似度在 0.95 左右)聚为一类,编号为 S1-S2, S5, S8, S10 的样品(相似度不超过 0.922)聚为一类,表明这 2 种评价方法对肠胃散均适用。

$$Q = \frac{1}{n} \sum \frac{\min(a_i, b_j)}{\max(a_i, b_j)} \quad (1)$$

$$Q' = 1 - \frac{\sum |1 - (a_i/b_j)|}{n} \quad (2)$$

式中, a_i, b_j 为色谱图 A 和 B 中相同色谱峰的峰面积, n 为色谱峰的数量。

表 1 10 批样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Tab. 1 The similarity of HPLC fingerprints of 10 batches samples

相似度	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
评价系统相似度	0.999	0.998	1.000	0.999	0.996	0.998	0.999	0.999	1.000	1.000
整体相似度	0.911	0.922	0.955	0.955	0.889	0.942	0.948	0.920	0.946	0.886
改良程度相似度	0.912	0.922	0.950	0.951	0.878	0.933	0.937	0.911	0.944	0.881

2.5 聚类分析

采用 SPSS 25.0 统计学软件处理 18 个共有峰的相对峰面积,以组间联接法测量平方欧式距离,对 10 批样品进行聚类分析。由图 3 可知,当平方欧式距离为 5 时,10 批样品可聚为 3 类,编号为 S3-S4, S6-S7, S9 的样

品,编号为 S8, S10 的样品,编号为 S1-S2, S5 的样品分别聚为一类,结果与整体相似度和改良程度相似度评价结果整体一致。

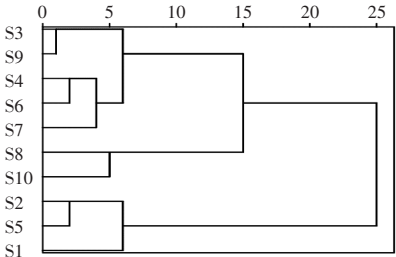


图 3 10 批样品聚类分析树状图

Fig. 3 Dendrogram of the cluster analysis of 10 batches of samples

2.6 主成分分析

采用 SPSS 25.0 统计学软件分析,对 18 个共有峰进行主成分分析,其特征值(λ)及方差贡献率见表 2。可见,前 4 个成分 $\lambda > 1$,其累积方差贡献率达 90.662%,故取前 4 个为主成分。由主成分载荷矩阵(表 3)可知,主成分 1 主要反映了橙皮苷、桂皮醛、丁香酚及峰 5、峰 6、峰 10 的信息,主成分 2 主要反映了肉桂酸及峰 2、峰 3、峰 4、峰 12 的信息,主成分 3 主要反映了吴茱萸碱、吴茱萸次碱及峰 8、峰 13、峰 15、峰 17 的信息,主成分 4 主要反映了峰 18 的信息。根据 4 个主成分的得分矩阵计算出主成分得分和综合得分^[7],并进行排名,得分的高低对应不同批次肠胃散的整体质量。由表 4 可知,10 批肠胃散质量按编号由高到低依次为 $S8 > S9 > S6 > S3 > S7 > S10 > S4 > S5 > S1 > S2$ 。这与相似度评价结果和聚类分批结果表现出较高的一致性,但个别批次的样品可能因中成药成分复杂而存在一定差异性。

表 2 样品主成分分析特征值与方差贡献率

Tab. 2 Eigenvalues and variance contribution rate of principal component analysis of samples

主成分	特征值	方差贡献率(%)	累积方差贡献率(%)
1	7.037	39.094	39.094
2	4.371	24.285	63.379
3	3.566	19.810	83.189
4	1.345	7.473	90.662

3 讨论

3.1 指纹图谱评价

肠胃散化学成分复杂,所建立的 HPLC 指纹图谱在 70 min 内共标识了 18 个共有峰,且响应值较好,分离度达标。定性得到的橙皮苷、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、肉桂酸 6 种成分在 226 nm 波长下仍有明显吸收,表明该方法较全面、便捷地反映了肠胃散的色谱信息。

3.2 相似度结果评价

国家药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统原理是夹角余弦法,本研究中采用该法得到的相似度介于 0.996~1.000,表明各色谱峰在比例上

表 3 主成分因子载荷矩阵

Tab. 3 Loading matrix of principal component factors

峰号	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	峰号	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4
1	0.578	-0.229	0.422	0.306	10	0.981	0.065	-0.035	-0.094
2	0.103	0.833	-0.444	0.037	11	0.874	0.028	-0.188	-0.130
3	-0.377	0.841	-0.237	-0.055	12	-0.287	0.819	0.115	0.458
4	0.280	0.913	0.129	-0.095	13	0.626	0.278	0.702	-0.014
5	0.929	0.006	-0.269	0.173	14	0.542	0.357	-0.677	-0.026
6	0.881	0.086	0.308	0.038	15	0.614	0.299	0.715	-0.023
7	-0.519	0.558	0.436	-0.420	16	0.510	0.466	-0.594	-0.021
8	-0.412	0.443	0.558	-0.538	17	0.608	-0.165	0.661	0.078
9	0.887	0.164	-0.176	-0.295	18	-0.327	0.572	0.340	0.641

表 4 10 批样品主成分得分和综合得分及排名

Tab. 4 Principal component scores, comprehensive scores, and rankings of 10 batches of samples

编号	主成分得分				综合得分	排名
	1	2	3	4		
S1	-0.697	-1.529	0.515	0.732	-0.537	9
S2	-0.971	-0.850	-0.731	1.351	-0.695	10
S3	0.077	0.824	-0.371	0.336	0.201	4
S4	-0.495	0.330	-0.843	-0.026	-0.311	7
S5	-1.610	0.199	1.579	-1.492	-0.419	8
S6	0.040	1.380	-0.622	-0.189	0.235	3
S7	0.005	-0.001	-0.410	-0.160	-0.101	5
S8	1.590	0.214	1.871	0.704	1.210	1
S9	0.853	-0.149	-0.100	0.586	0.354	2
S10	1.207	-1.445	-0.888	-1.842	-0.213	6

相似度较高,但未检测到峰面积的线性波动。鉴于生产工艺,每批制剂成分的种类和含量基本稳定,该方法对制剂的评价稍有不足,更适合药材的品种评价^[8]。故引入整体相似度和改良程度相似度进行比较,整体相似度介于 0.886~0.955,改良程度相似度介于 0.878~0.951,且将样品聚为两类,这与聚类分析结果一致。在相互证明的同时,相似度评价还将聚类结果分出了等级,表明这 2 种方法均适用于肠胃散指纹图谱研究,在其他中成药的评价中,也可考虑采用上述 2 种相似度评价方法替代夹角余弦法。但针对药材,批间同一成分的含量可能存在几倍甚至数十倍的差距,用改良程度相似度计算会出现负值,故不宜采用此方法评价药材质量。

3.3 主成分分析

在方差贡献率最大的主成分 1 中,经定性确认的橙皮苷、桂皮醛、丁香酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、肉桂酸等成分均有和肠胃散相关的功效,均能通过经皮给药发挥作用,该方法用于评价肠胃散的质量是合理的^[9-13]。以往的研究仅对肠胃散的部分成分进行了定性和定量分析,未能体现出质量评价的整体性和批间关联性,本研究中通过引入 HPLC 指纹图谱和主成分分

析法,既能降低原始数据处理的量级,又能保留大部分主要信息,结合聚类分析法还可对不同批次药品进行分类^[14]。主成分分析法广泛用于化学成分群与药理的综合评价,有助于基础研究、新药和药食同源产品的开发^[15-16]。本研究中的 10 批样品的质量评价结果与相似度和聚类分析结果一致性较高,但中成药成分复杂,个别批次样品还存在一定差异性。

参考文献

[1] 赵永超,张西洁,周云飞. 痛泻安脾汤联合肠胃散贴敷治疗腹泻型肠易激综合征临床研究[J]. 新中医,2020,52(15): 102-105.

[2] 陈 锋,杨海船,何春欢,等. HPLC 法同时测定肠胃散中 5 种成分[J]. 中成药,2020,42(2):309-313.

[3] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药,2016,47(22):4085-4094.

[4] 鄢海燕,邹纯才.《中国药典》(2010 年版~2020 年版)中药指纹(特征)图谱应用进展与展望[J]. 南方医科大学学报,2022,42(1):150-155.

[5] 邹纯才,鄢海燕. 我国中药色谱指纹图谱相似度评价方法 30 年(1988—2017 年)研究进展与展望[J]. 中国中药杂志,2018,43(10):1969-1977.

[6] 刘永锁,曹 敏,王义明,等. 相似系统理论定量评价中药材色谱指纹图谱的相似度[J]. 分析化学,2006,34(3):333-337.

[7] 马永辉,田宇柔,田 伟. 基于 HPLC 指纹图谱及化学计量学筛选石楠叶质量标志物及其含量测定研究[J]. 中国新药杂志,2023,32(9):961-968.

[8] 刘亮亮,孙 红,武林芝,等. 某市 29 批市售党参药材饮片高效液相色谱指纹图谱建立及化学计量学研究[J]. 中国药业,2023,32(16):84-89.

[9] 杨 季,王思博,鹿茗源,等. 橙皮苷的药理活性及在家禽生产应用的研究进展[J]. 中国饲料,2020(17):5-9.

[10] 沈梦婷,白丹妮,王庆伟,等. 肉桂及其活性成分抗炎作用机制的研究进展[J]. 中草药,2022,53(10):3218-3225.

[11] 孔奕丹,齐 英,崔 娜,等. 吴茱萸化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2023,40(5):79-83.

[12] 林 慧,梅全喜. 化学治疗所致胃肠道反应肿瘤患者中医药外治法的应用进展[J]. 中国药业,2022,31(15):125-128.

[13] 周建新,沈 硕,杜茂波,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术和整合药理学方法探索吴茱萸经皮成分及其治疗腹泻的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(7):112-120.

[14] 陈 锋,张 颖,李 嘉,等. 基于聚类分析和主成分分析的广西小叶金花草高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学,2021,19(9):1883-1886.

[15] LIU M, XIAO WZ, ZHANG H, et al. Quality control strategies of medicine food homology materials based on fingerprint profiling and chemometrics: Citri Reticulata Pericarpium as an example[J]. Spectrochim Act A, 2023, 286: 121968.

[16] 陈锦霞,高永坚,林碧珊,等. 当归补血汤基准样品质量控制方法研究[J]. 药物评价研究,2022,45(11):2247-2256.

(收稿日期:2023-09-13;修回日期:2024-04-25)