

基于超高效液相色谱指纹图谱轮廓的 香丹注射液相似度快速评价

刘卉¹, 姚卫峰^{1*}, 张丽¹, 丁安伟^{1,2}, 姚鑫¹, 李靖¹, 刘丹¹

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 建立采用超高效液相色谱指纹图谱轮廓快速评价香丹注射液相似度的方法。方法: 采用超高效液相色谱 (UPLC) 法, 以 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱为色谱柱, 0.4% 甲酸水和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 紫外检测波长为 288 nm, 测定了 9 个不同厂家的样品和其中 1 个厂家的 10 批香丹注射液 UPLC-UV 指纹图谱, 再用基线校正、色谱峰匹配等数据预处理方法对指纹图谱进行处理, 校正干扰后比较各批次香丹注射液样品的色谱图轮廓考察指纹图谱的相似度。结果: 采用色谱指纹图谱轮廓能够在一定程度上反映出注射液的质量变化信息, 与采用峰面积的分析方法差异不大, 结果相似。结论: 本方法可用于测定并比较不同来源的香丹注射液色谱指纹图谱相似度, 并为快速中药质量评价和生产工艺监控提供可靠依据。

[关键词] 超高效液相色谱; 香丹注射液; 色谱图轮廓; 相似度评价

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)12-0048-03

Fast Assessment on Similarity of Xiangdan Injection Based on Ultra High-performance Liquid Chromatography Fingerprint Profile

LIU Hui¹, YAO Wei-feng^{1*}, ZHANG Li¹, DING An-wei^{1,2}, YAO Xin¹, LI Jing¹, LIU Dan¹

(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] Objective: To establish UPLC fingerprint profile for the fast assessment on the similarity of Xiangdan injection. **Method:** Xiangdan injection was separated on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column. The mobile phase consisted of formic acid-water and acetonitrile was used for separation by gradient elution. The detection wavelength was set at 288 nm. The fingerprint profile was then established for analysis of Xiangdan injection from 9 corporations and 10 batches of one corporation on the base of the above chromatography condition. It was pretreated by the methods such as baseline correction and peak matching and then the similarity of fingerprint profile was studied by the comparison of Xiangdan injection from different batches. **Result:** The fingerprint profile was able to reflect the message of quality change to some extent and it has little differences from the method of peak area. **Conclusion:** UPLC fingerprint profile can be used for the rapid assessment on the similarity of Xiangdan injection and it provided a good approach to evaluate rapidly the quality of traditional Chinese medicine and control the production process.

[Key words] UPLC; Xiangdan injection; fingerprint profile; assessment on the similarity

[收稿日期] 20100407(001)

[基金项目] 2009年度江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(381)

[第一作者] 刘卉, 南京中医药大学药学院 2006 级本科生

[通讯作者] * 姚卫峰, 博士, 讲师, 主要从事中药分析和代谢研究, Tel: 025-85811053, Fax: 025-85811524, E-mail: weifengyao@sohu.com

超高效液相色谱法 (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) 是近几年出现的一种新的液相色谱技术, 能显著改善色谱峰的分离度和检测灵敏度。

中药指纹图谱能全面反映化学成分的种类与数量, 进而反映中药的质量^[1]。利用色谱图全谱轮廓作为中药指纹图谱分析的对象, 可以避免采用峰面积作为信号变量引入的分析者主观因素以及部分色谱信息有可能丢失的局限性, 使化学信息获取客观准确^[2-4], 且可体现中药指纹图谱“整体性”和“模糊性”的特点。

本研究在色谱图基线校正和色谱峰匹配的基础上, 采用超高效液相色谱快速分析得到的指纹图谱整体轮廓, 即数据点, 评价中药香丹注射液的相似度, 结果令人满意。本法与采用色谱峰面积为分析对象的相似度计算结果比较, 可证实采用消除干扰后的全谱轮廓保留了样本的全部信息, 有利于实现数据分析的客观准确, 整个过程不涉及复杂的色谱图主要成分色谱峰的选取和积分, 为中药质量的快速评价提供借鉴与基础。

1 材料

仪器为 Waters 公司 Acquity 超高效液相系统, 带有二元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、PDA 全波长检测器以及 Waters Masslynx4.1 数据处理工作站。乙腈(色谱纯, Merck 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 水为超纯水。其他试剂均为分析纯。0.22 μm 微孔滤膜购自上海新亚净化器厂。香丹注射液购自南京各大药店, 厂家和批号见表 1。

表 1 香丹注射液样品的生产厂家和批号

No.	厂家	批号	No.	厂家	批号
1	四川三精升和	080601	10	四川三精升和	081004
2	四川三精升和	081017	11	山西亚宝	081004-1
3	四川三精升和	081014	12	福建三爱	090502
4	四川三精升和	081018	13	山西双鹤	200806165
5	四川三精升和	080633	14	吉林益盛	0904119
6	四川三精升和	080843	15	湖北清大	20081202
7	四川三精升和	081208	16	上海中西	0811034
8	四川三精升和	081211	17	正大青春宝	0809193
9	四川三精升和	080701	18	浙江康恩贝	20080612

2 方法

2.1 样品的处理与分析 精密量取香丹注射液样品 1.0 mL, 精密加入超纯水 3.0 mL, 混合均匀, 过

0.22 μm 微孔滤膜, 即得。色谱柱为 Acquity UPLC BEH-C₁₈ 柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 柱温 30 °C; 流动相 A 液为 0.4% 甲酸水溶液, B 液为乙腈; 梯度洗脱条件 0 ~ 8 min, A 液由初始 98% 线性变化至 40%, 8 ~ 12 min, A 液由线性变化至 2.0%。流速 0.2 mL · min⁻¹; 检测波长优化选择 288 nm; 进样量 1 μL。

2.2 色谱指纹图谱轮廓图的建立及预处理 在上述色谱条件下, 本文对来自 9 个不同厂家的样品和其中一个厂家的 10 批香丹注射液, 共 18 批样品测定超高效液相色谱指纹图谱, 每张色谱图由 8 500 个数据点组成。由于仪器噪声和流动性不稳等因素的存在, 需要对色谱指纹图谱进行数据预处理, 消除干扰。

在色谱图匹配之前, 采用基于 Whittaker 平滑的不对称最小二乘平滑用于训练集和测试集中色谱图基线漂移的校正 ($p = 0.001, \lambda = 1e6$)^[5-6]。此法用于基线校正具有准确快速的特点, 且对于同一色谱条件产生的类似的色谱图基线漂移, 基本不需要对单个色谱图进行参数优化, 自动化程度较高。色谱峰的匹配采用本课题组建立的 Auto-PABS 方法^[4], 选择训练集中的第一张色谱图作为参考色谱图, 其余色谱峰均与之匹配, 确定片段数的优化范围为 [10, 60], 计算快速傅立叶变换互相关的最大平移值为 60。当参考色谱图与待匹配色谱图被分割的片段数在 10 与 60 之间以步长 10 变化时, 分别与第一张色谱图进行匹配, 相关系数最大的分割作为最终的匹配。测试集的色谱图也是与训练集的第一张色谱图匹配, 得到保留时间校正后的色谱图, 基线校正和峰匹配前后的训练集和测试集色谱图叠加图见图 1, 处理前 (图 1A) 由于存在基线漂移和峰漂移, 基线水平不一致, 叠加色谱峰较宽, 处理后 (图 1B) 基线基本处于同一水平, 叠加色谱峰变得较尖锐。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择 为确定适宜的检测波长, 分别在 220, 254, 288, 320 nm 波长下对 10 种香丹注射液样品进行了分析。结果发现, 在 288 nm 检测波长下, 大多数香丹注射液样品样品的色谱峰数目较多, 峰形较好, 考虑在中药质量控制的普遍适应问题, 故选择检测波长 288 nm。

3.2 重复性 同一样品连续进样 6 次, 各个色谱峰面积和保留时间的平均相对标准偏差 (RSD) 均小

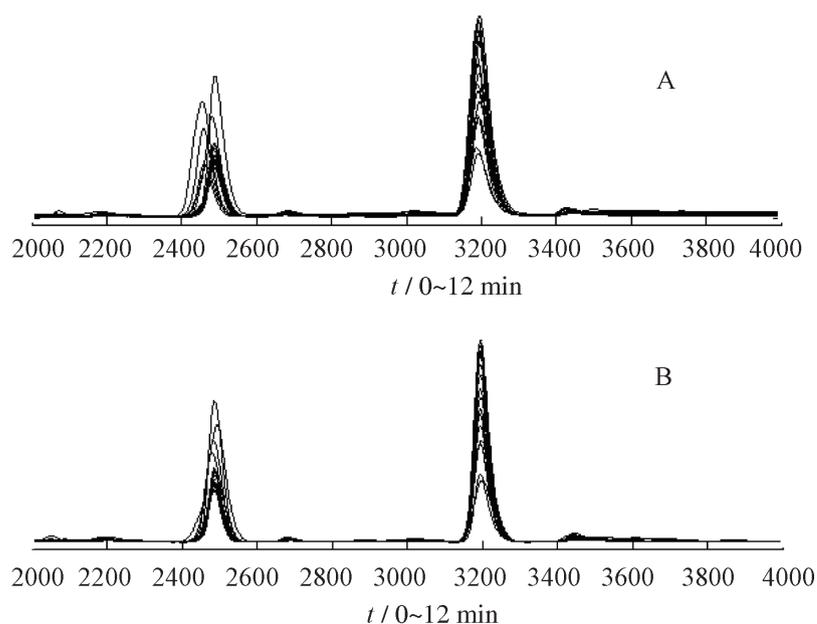


图 1 基线校正与色谱峰匹配前后的香丹注射液样品 UPLC 指纹图谱叠加图
A. 处理前; B. 处理后

于 3%。每天一次,连续 6 d 对同一样品进行分析,各个色谱峰峰面积和保留时间的平均相对标准偏差 (RSD) 均小于 3%,说明本方法具有较好的重复性。

3.3 色谱指纹图谱的相似度评价 色谱指纹图谱的相似度是指图谱的整体相关性,本试验采用指纹图谱轮廓对 18 批次样品稀释品的 UPLC 色谱指纹图谱进行了不同测度(皮尔逊相关系数、夹角余弦和欧氏距离)的相似度计算(表 2),并将结果与采用色谱峰面积的计算方法进行了对比,发现两者结果相近,但是采用色谱图轮廓(即数据点,本文选取了 8 500 个)为分析对象,避免了色谱图积分参数选择和部分色谱信息丢失等缺点。

4 结论

采用图谱轮廓法建立的香丹注射液 UPLC 指纹图谱,经数据预处理后,能够在一定程度上反映出注射液的质量变化信息,而图谱轮廓的差异不大,其结果与采用色谱峰面积为分析对象的评价方法相似,且考虑到了小量浓度组分的存在,保持了中药多成分信息的完整性。因此,可以采用超高效液相色谱快速分析得到的指纹图谱,结合消除干扰后的样品色谱轮廓图进行中药质量控制。整个数据处理过程可以完全依靠计算机完成,保证了质量评价过程的客观准确。

表 2 不同测度的相似度计算

No.	皮尔逊相关系数		夹角余弦		欧氏距离	
	数据点	峰面积	数据点	峰面积	数据点	峰面积
1	1	1	0	0	0	0
2	0.997 8	0.994 2	0.997 8	0.995 2	1.03e + 6	0.81e + 4
3	0.996 7	0.993 7	0.996 6	0.994 1	0.88e + 6	0.79e + 4
4	0.998 1	0.993 7	0.998 1	0.994 6	0.66e + 6	0.84e + 4
5	0.993 9	0.990 3	0.994 2	0.993 2	1.58e + 6	1.09e + 4
6	0.998 2	0.995 2	0.998 2	0.995 3	0.55e + 6	1.21e + 4
7	0.977 4	0.951 4	0.977 9	0.965 6	2.33e + 6	1.71e + 4
8	0.998 1	0.998 8	0.998 1	0.999 2	1.30e + 6	0.27e + 4
9	0.993 1	0.992 7	0.993 4	0.992 6	1.20e + 6	1.64e + 4
10	0.986 0	0.868 1	0.986 3	0.908 7	1.37e + 6	3.00e + 4
11	0.968 4	0.959 6	0.969 6	0.969 9	2.83e + 6	1.87e + 4
12	0.910 6	0.846 2	0.914 8	0.893 7	4.16e + 6	3.12e + 4
13	0.904 3	0.845 4	0.909 0	0.893 5	4.17e + 6	3.10e + 4
14	0.731 3	0.679 7	0.744 9	0.789 6	5.62e + 6	3.97e + 4
15	0.924 8	0.898 3	0.928 4	0.930 1	3.07e + 6	2.30e + 4
16	0.869 3	0.828 6	0.875 1	0.883 9	4.95e + 6	3.54e + 4
17	0.829 8	0.729 9	0.838 2	0.812 3	4.54e + 6	3.70e + 4
18	0.945 5	0.917 9	0.948 0	0.942 5	3.87e + 6	3.13e + 4

[参考文献]

- [1] 王学勇,崔光红,黄璐琦,等.建立高效液相指纹图谱分析无机离子对丹参不定根有效成分影响[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(1):1.
- [2] G Malmquist. Multivariate evaluation of peptide mapping using the entire chromatographic profile[J]. J Chromatogr A, 1994, 687(1): 89.
- [3] A M van Nederkassel, M Daszykowski, D L Massart, et al. Prediction of total green tea antioxidant capacity from chromatograms by multivariate modeling [J]. J Chromatogr A, 2005, 1096(1-2): 177.
- [4] Weifeng Yao, Xiaoying Yin, Yuzhu Hu. A new algorithm of piecewise automated beam search for peak alignment of chromatographic fingerprints [J]. J Chromatogr A, 2007, 1160(1-2): 254.
- [5] Paul Eilers. Parametric time warping [J]. Anal Chem, 2004, 76(2): 404.
- [6] Paul Eilers. A perfect smoother [J]. Anal Chem, 2003, 75(14): 3631.

[责任编辑 顾雪竹]