

• 药剂与工艺 •

指纹图谱段带总量统计矩法对黄连解毒汤提取过程中成分变化的研究

杨岩涛^{1,2,3,5}, 吴春英⁴, 吴德智¹, 唐宇¹, 刘文龙^{1,2,3,5}, 石继连^{1,2,5}, 贺福元^{1,2,3,5*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 湖南 长沙 410208
3. 湖南中医药大学 现代中药制剂制备技术与评价实验室, 湖南 长沙 410208
4. 湖南中医药大学管理与信息工程学院, 湖南 长沙 410208
5. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 建立中药复方提取过程中成分变化信息分析方法——指纹图谱段带总量统计矩法。**方法** 运用指纹图谱段带统计矩法分析黄连解毒汤指纹图谱信息, 阐述中药复方提取过程中成分变化情况。**结果** 黄连解毒汤煎煮 160 min 后成分基本趋于稳定。黄连解毒汤合煎与单味药提取过程相比, 某些成分被抑制, 某些成分被促进, 亦可能有新成分的出现。**结论** 指纹图谱段带统计矩法可用于中药复方提取过程中成分变化信息及中药复方提取时间的研究。

关键词: 指纹图谱; 段带; 总量统计矩; 统计矩原理; 中药复方; 黄连解毒汤

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)15-2157-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.008

Composition change in extraction process of Huanglian Jiedu Decoction by fingerprint division total statistical moment method

YANG Yan-tao^{1,2,3,5}, WU Chun-ying⁴, WU De-zhi¹, TANG Yu¹, LIU Wen-long^{1,2,3,5}, SHI Ji-lian^{1,2,5}, HE Fu-yuan^{1,2,3,5}

1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Key Laboratory of Property and Pharmacodynamics for TCM, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Pharmaceutical Preparation Technology and Evaluation Laboratory of TCM, Hunan University of Tradition Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. College of Management and Information Engineering, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
5. Supermolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To establish a new analytical method of ingredients transformation during the Chinese material medica (CMM) compound extraction: chromatographic fingerprints division total quantum statistical moment (CFDTQSM) method. **Methods** The expression was set up by CFDTQSM method in order to analyze the fingerprint information of Huanglian Jiedu Decoction (HJD), and to explain the ingredients transformation during the CMM compound extraction. **Results** It has been concluded by studying the extracting solution of HJD that the ingredients were stabilized after decocting for 160 min. And compared with the extraction process

收稿日期: 2014-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81173558, 81270055); 高等学校博士学科点基金博导类项目 (20124323110002); 湖南省自然科学基金项目 (13JJ5032, 11JJ2055); 湖南省中医药科研计划项目 (201494); 湖南省“十二五”省级药学重点学科项目 (1007)

作者简介: 杨岩涛 (1981—), 男, 河南太康人, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事中药药剂学、中药制药工程方面的教学与科研工作。

Tel: (0731)88458223 E-mail: xdyt1@163.com

*通信作者 贺福元, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学、中药药剂学、中医药数理特征化及超分子理论研究。研究工作。

Tel: (0731)85381372 E-mail: pharmsharking@tom.com

of single herb, some ingredients are restrained in HJD, some are advanced and some new ingredients are produced. **Conclusion** The CFDTQSM method could be used to the study on the ingredients transformation during the CMM compound extraction, and the study on extraction time.

Key words: fingerprints; division; total quantum statistical moment; statistic moment principle; Chinese material medica compound; Huanglian Jiedu Decoction

中药(复方)为多成分体系,复方化学成分并非各单味药成分的简单加和^[1],配伍过程中会发生量的变化(量变)并可能产生新的化合物(质变)。目前多采用对全方化学成分进行系统提取、分离、纯化和结构鉴定及以药效为标准追踪复方活性部位与有效成分的方法^[2]进行研究。这些方法都能全面分析复方化学成分,与单味药成分的不同以及有无新化合物产生。但却耗能、耗时,不便于对中药复方配伍规律的研究。

本课题组前期研究建立了指纹图谱总量统计矩法^[3-4],亦进一步建立了总量统计矩相似度法,并比较了其与其他指纹图谱相似度分析方法^[5]。本研究进一步将中药复方指纹图谱分为若干段,再用总量统计矩法对每段进行分析,通过比较各段的统计矩参数来分析成分变化,期望给中药复方提取过程中成分变化的分析提供一种新方法——段带统计矩法。

黄连解毒汤(Huanglian Jiedu Decoction, HJD)系中医经典名方,原载于《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏和栀子 4 味中药组成,功效为泄火解毒,主治三焦火毒证^[6],为清热解毒的代表方,现代研究表明该方具有抗菌^[7]、抗炎^[8]、抗肿瘤^[9]、降血糖、调血脂^[10-11]等一系列药理作用。HJD 药味不多,成分相对简单,指纹图谱易于建立,鉴于此,本实验采用 HPLC 方法建立 HJD 全方及各单味药指纹图谱,采用段带统计矩法对其进行分析,以研究其煎煮过程中成分的变化。

1 基本原理

常用的指纹图谱多采用保留时间(λ)和光吸收响应值(R)的 HPLC 谱图表示,一张完整的指纹图谱可看成由 m 个特征峰响应值曲线的迭加而成。按一维随机向量统计原理,可用总量零阶矩、总量响应率、总量一阶矩、总量二阶矩 4 参数来描述 1 张完整的指纹图谱。其运算公式如下:

$$\text{总量零阶矩 } AUC_T = C_T \sum_{j=1}^m K_{r,j} K_{c,j} = \sum_{j=1}^m A_j \quad (1)$$

$$\text{总量响应率 } AUCPW_T = \sum_{j=1}^m K_{r,j} K_{c,j} f_T \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{总量一阶矩 } \bar{\lambda}_{T,i=1} &= \frac{\sum_{j=1}^m K_{r,j} K_{c,j} \lambda_{j,i=1}}{\sum_{j=1}^m K_{r,j} K_{c,j}} = \\ &= \frac{\sum_{j=1}^m A_{j,i=1} \lambda_{j,i=1}}{\sum_{j=1}^m A_{j,i=1}} \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \text{总量二阶矩 } \bar{\sigma}_{T,i=1}^2 &= \frac{\sum_{j=1}^m K_{r,j} K_{c,j} (\sigma_{j,i=1}^2 + \lambda_{j,i=1}^2)}{\sum_{j=1}^m K_{r,j} K_{c,j}} - \bar{\lambda}_{T,i=1}^2 = \\ &= \frac{\sum_{j=1}^m (A_{j,i=1} \sigma_{j,i=1}^2 + A_{j,i=1} \lambda_{j,i=1}^2)}{\sum_{j=1}^m A_{j,i=1}} - \bar{\lambda}_{T,i=1}^2 \end{aligned} \quad (4)$$

式中 C_T 为成分的总量, $K_{r,j}$ 为其响应系数, $K_{c,j}$ 为其构成比, $i=1$ 说明只有 1 个特征变量

由总量统计矩的加和性^[12]可知:若已知包括溶剂的指纹图谱总量统计矩参数的 $\bar{\lambda}_{T,i=1}$ 、 $\bar{\sigma}_{T,i=1}^2$ 及纯溶剂的总量统计矩参数 $\bar{\lambda}_{T,s,i=1}$ 、 $\bar{\sigma}_{T,s,i=1}^2$, 则扣除溶剂后中药复方指纹图谱纯成分的总量参数 $\bar{\lambda}_{T,p,i=1}$ 和 $\bar{\sigma}_{T,p,i=1}^2$ 分别为:

$$\bar{\lambda}_{T,p,i=1} = (\bar{\lambda}_{T,i=1} \sum k_{r,j} k_{c,j} - \bar{\lambda}_{T,s,i=1} \sum k_{r,j,s} k_{c,j,s}) / \sum k_{r,j,p} k_{c,j,p} \quad (5)$$

$$\bar{\sigma}_{T,p,i=1}^2 = [\sum k_{r,j} k_{c,j} (\bar{\sigma}_{T,i=1}^2 + \bar{\lambda}_{T,i=1}^2) - \sum k_{r,j,s} k_{c,j,s} (\sigma_{s,i=1}^2 + \lambda_{s,i=1}^2)] / \sum k_{r,j,p} k_{c,j,p} - \bar{\lambda}_{T,p,i=1}^2 \quad (6)$$

式(5)和(6)可用于中药复方配伍后成分变化的研究。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。

在不同提取时间全方和单味药取样,运用式(5)和(6)对指纹图谱进行分析,差异较大时则此时段全方提取与单味药成分有较大变化,可能有新成分产生。对指纹图谱进行段带分析,可知指纹图谱的哪一段产生新成分,从而初步了解煎煮过程中复方的成分变化,为煎煮过程中是否有新成分产生的研究奠定基础。

段带划分采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版,将甲醇的指纹图谱与全方、各单味药相同时段的指纹图谱进行对照匹配。对甲醇的指纹图谱进行分析,根据色谱原理^[13]可知:由 $\sigma^2 = \lambda^2 / N$ 可得出 σ , 最小峰宽为 4σ , 再根据信噪比为 3 的原则^[13-14]可以得出,信号峰的最小峰宽为 12σ 。当

$\lambda_{i,j} \geq 12\sigma$ 时, 此时对指纹图谱的段带划分有意义。对匹配好的图谱按 $\lambda_{i,j} \geq 12\sigma$ 进行段带, 将指纹图谱分为 n 段, 再对各段进行分析。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters 公司的高效液相色谱仪, Breeze 工作站, Waters 2487 Dual Absorbance Detector; 乙腈、甲醇为进口色谱纯, 蒸馏水为二次重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

盐酸小檗碱(批号 110713-200609)、黄芩苷(批号 110715-200815)、栀子苷(批号 110749-200714)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 黄连、黄芩、黄柏、栀子均购自于湖南中医药大学第一附属医院药剂科, 经本院中药鉴定教研室刘塔斯教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎, 唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。处方: 黄连 9 g、黄芩 6 g、黄柏 6 g、栀子 9 g。

2.2 色谱条件^[15-16]

Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 (A)-水 (B), A、B 均含 0.3% 三乙胺及 0.3% 甲酸, 梯度洗脱: 0 min (0:100) → 10 min (5:95) → 20 min (10:90) → 35 min (20:

80) → 45 min (30:70) → 50 min (45:55) → 55 min (60:40) → 60 min (90:10); 体积流量 1 mL/min, UV 检测波长 340 nm, 柱温 40 °C。

2.3 供试品的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱、黄芩苷、栀子苷对照品, 加甲醇配制成含盐酸小檗碱 0.25 mg/mL、黄芩苷 0.25 mg/mL、栀子苷 0.75 mg/mL 的混合对照品溶液。

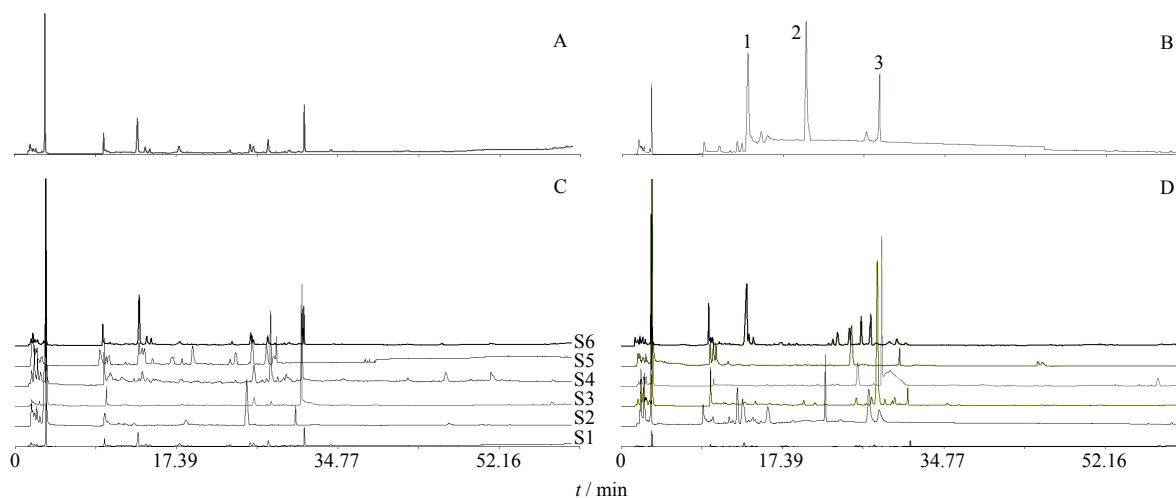
2.3.2 样品溶液的制备 按处方比例, 取 2 倍量全方, 加 8 倍量蒸馏水回流提取, 分别于 10、20、40、80、160 min 及 4、5、6、7、8、9、10、11、12 h 时取样 0.5 mL 记作全方 1~14, 于 60 °C 真空干燥, 挥干溶剂, 加 0.5 mL 甲醇溶解, 过 0.45 μm 微孔滤膜备用。

称取黄连 18 g、黄芩 12 g、黄柏 12 g、栀子 18 g, 分别用 8 倍量蒸馏水回流提取, 于 10、20、40、80、160 min 及 4、5、6、7、8、9、10、11、12 h 时取样 0.5 mL, 分别记作连/芩/柏/栀 1~14, 于 60 °C 真空干燥, 挥干溶剂, 加 0.5 mL 甲醇溶解, 过 0.45 μm 微孔滤膜备用。

3 结果与分析

3.1 HJD 及各单味药指纹图谱建立及其积分条件的确定

精密吸取甲醇液 10 μL, 进样得图 1-A, 以仪器最小的积分阈值积分, 按总量统计矩加合原理求



1-栀子苷 2-黄芩苷 3-盐酸小檗碱 S1-甲醇 S2-栀子 S3-黄柏 S4-黄连 S5-黄芩 S6-全方
1-gardenoside 2-baicalin 3-berberine hydrochloride S1-methanol S2-Gardeniae Fructus S3-Phellodendri Chinensis Cortex
S4-Coptidis Rhizoma S5-Scutellariae Radix S6-HJD

图 1 甲醇 (A)、混合对照品 (B)、HJD 样品在煎煮 20 min (C) 和 6 h (D) 时全方和各单味药的指纹图谱
Fig. 1 Fingerprints of methanol (A), mixture standards (B), and complete prescription and single herb of HJD sample in decoction for 20 min (C) and 6 h (D)

得空白溶剂的总量统计矩参数, 进而求得色谱积分条件: 半峰宽、响应率、面积总量和峰高分别为 36 s、38 $\mu\text{V}/\text{s}$ 、2 400 $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ 和 80 μV 。

分别取混合对照品溶液、1~14 号 HJD 全方及各单味药样品液, 在“2.2”项条件下, 分别进样测定, 混合对照品溶液指纹图谱及煎煮 20 min 和 6 h 时指纹图谱分别列于图 1-B~D, 全方 1~14 号样品指纹图谱见图 2。

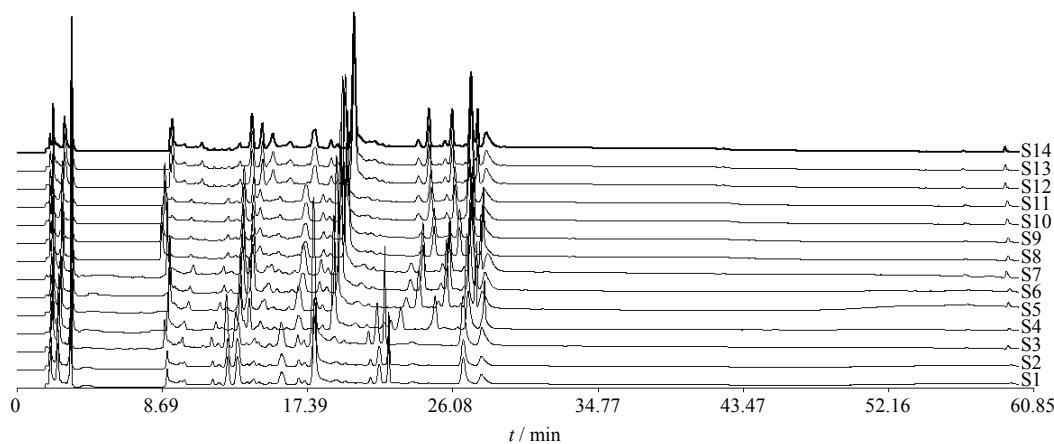
3.2 仪器的精密度测定

分别吸取混合对照品液 10 μL , 进样 3 次, 按

前述积分阈值条件积分, 对积分数据先由理论塔板数与保留时间 ($\lambda_{j,i=1}$) 计算出各峰的方差, 空格峰的理论塔板数以临近的较小保留时间峰计。用 Excel 文件中的数学计算公式, 计算 3 次进样的参数, 并对各参数进行统计分析, 结果见表 1。

3.3 HJD 不同提取时间指纹图谱参数的计算

分别吸取全方及各单味药样品 10 μL , 进样, 对所得指纹图谱按前述积分条件积分, 并对数据进行计算获得不同提取时间各参数, 同时对其进行统计分析, 相关结果见表 2。



S1~S14-全方 1~14 号样品
S1—S14-simiao prescription sample No. 1—14

图 2 HJD 全方煎煮 1~14 号样品指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of simiao prescription decoction samples No. 1—14 of HJD

表 1 混合对照品指纹图谱的参数

Table 1 Parameters of fingerprint of mixture reference substances

进样次数	N (峰数)	$\sum \lambda_j / \text{min}$	$\text{AUC}_T (\sum A_j) /$ ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	$\sum \lambda_j \cdot A_j /$ ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}$)	$\sum \sigma_j^2 \cdot A_j /$ ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^2$)	$\sum \lambda_j^2 \cdot A_j /$ ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^2$)	$\bar{\lambda}_{T,i=1} /$ min	$\bar{\sigma}_{T,i=1}^2 /$ min^2
1	7	138.60	5.463×10^5	1.287×10^7	6.175×10^3	3.772×10^8	23.56	135.2
2	6	96.19	6.855×10^5	1.679×10^7	1.246×10^4	4.896×10^8	24.49	114.5
3	6	89.92	8.802×10^5	2.258×10^7	8.890×10^3	6.513×10^8	25.65	81.9
RSD / %	9.12	24.47	23.82	28.04	34.36	27.23	4.26	24.30

3.4 混合对照品溶液及 HJD 全方和单味药不同提取时间提取物指纹图谱的段带分析

对 HJD 20 min 提取物的全方合煎样品和各单味药单独煎煮的指纹图谱进行分析, 由积分条件信号峰最小峰宽为 36 s, 因此按 1 min 进行段带, 得出扣除甲醇后的各时间段数据, 再分别计算出全方和各单味药单独煎煮后加合的 $\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ 、 $\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$ 及其 RSD, 将有较大差异的时间段数据见表 3。

由表 2 结果, 选择对混合对照品和 HJD 及各单味药煎煮 10、80 min 及 4、5、6、7、8、10 h 的样

品指纹图谱同法进行分析, 结果见表 4、5。

由表 1: 混合对照品 3 次进样峰数 RSD 为 9.116%, $\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$ 的 RSD 为 4.262%, $\bar{\sigma}_{T,i=1}$ 的 RSD 为 4.930%, 说明高效液相仪器的精密度可靠。

由表 2: 从提取时间 10~160 min, 全方和单味药提取的 $\lambda_{T,f,i=1}$ 、 $\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$ 值改变趋势均为逐渐升高, 说明在此阶段成分不断溶出, 而在 160 min 以后, 二值变化较小, 即成分已基本溶出。

由表 3: 对 HJD 20 min 提取物的指纹图谱段带后发现, 在指纹图谱保留时间 4~5、16~17、32~

表2 各提取时间指纹图谱的参数

Table 2 Parameters of fingerprints of samples at each extraction time

时间段	合煎				单味药加合				$\bar{\lambda}_{T,i=1}$			$\bar{\sigma}_{T,i=1}^2$		
	AUC _T / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	$\sum\lambda_j\cdot A_j$ / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}$)	$\sum\lambda_j^2\cdot A_j$ / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^2$)	$\sum\sigma_j^2\cdot A_j$ / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^2$)	AUC _T / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	$\sum\lambda_j\cdot A_j$ / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}$)	$\sum\lambda_j^2\cdot A_j$ / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^2$)	$\sum\sigma_j^2\cdot A_j$ / ($\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{min}^2$)	合煎	单味药 加合	RSD/ %	合煎	单味药 加合	RSD/ %
10 min	1.44×10^6	1.92×10^7	4.19×10^8	7.83×10^3	4.19×10^6	5.89×10^7	1.95×10^9	3.72×10^7	13.35	14.04	3.53	112.16	275.77	59.64
20 min	3.99×10^6	5.73×10^7	1.29×10^9	2.12×10^4	3.00×10^6	6.60×10^7	2.32×10^9	5.66×10^4	14.38	21.98	21.98	116.10	290.49	60.66
40 min	1.30×10^7	2.04×10^8	4.68×10^9	8.55×10^4	7.76×10^6	1.26×10^8	3.25×10^9	8.51×10^4	15.72	16.21	2.15	114.10	155.96	21.92
80 min	1.19×10^7	1.91×10^8	4.30×10^9	1.30×10^5	6.74×10^6	1.15×10^8	3.39×10^9	1.48×10^5	16.10	17.09	4.22	102.28	211.09	49.11
160 min	7.39×10^6	1.27×10^8	3.17×10^9	2.87×10^4	1.19×10^7	1.95×10^8	5.22×10^9	3.16×10^5	17.22	16.42	3.37	132.10	169.26	17.44
4 h	1.36×10^7	2.23×10^8	5.44×10^9	5.70×10^4	1.39×10^7	2.60×10^8	7.21×10^9	1.53×10^5	16.37	18.64	9.17	131.94	170.24	17.92
5 h	1.13×10^7	1.83×10^8	4.55×10^9	5.08×10^4	1.59×10^7	2.94×10^8	8.27×10^9	1.50×10^5	16.24	18.54	9.33	140.32	177.93	16.72
6 h	3.61×10^6	6.11×10^7	1.47×10^9	2.09×10^4	1.25×10^7	2.45×10^8	6.85×10^9	2.32×10^5	16.91	19.60	10.38	122.12	163.07	20.31
7 h	1.22×10^7	1.98×10^8	4.89×10^9	6.39×10^4	9.58×10^6	1.81×10^8	5.03×10^9	1.36×10^5	16.16	18.91	11.12	138.62	167.26	13.24
8 h	1.73×10^7	2.96×10^8	7.44×10^9	1.40×10^5	1.52×10^7	2.92×10^8	8.63×10^9	1.20×10^5	17.13	19.13	7.82	136.68	199.73	26.51
9 h	1.01×10^7	1.76×10^8	4.44×10^9	5.01×10^4	1.55×10^7	2.60×10^8	6.44×10^9	5.84×10^5	17.36	16.76	2.51	137.24	135.19	1.06
10 h	1.09×10^7	1.86×10^8	4.75×10^9	4.40×10^4	1.06×10^7	2.27×10^8	5.79×10^9	1.08×10^6	17.07	21.49	16.21	144.14	86.55	35.30
11 h	1.59×10^7	2.67×10^8	6.75×10^9	6.76×10^4	1.19×10^7	2.02×10^8	5.31×10^9	2.36×10^5	16.80	17.03	0.95	142.10	158.01	7.50
12 h	1.21×10^7	2.09×10^8	5.40×10^9	5.96×10^4	1.72×10^7	2.84×10^8	6.99×10^9	3.00×10^5	17.24	16.50	3.11	147.53	133.93	6.83

表3 HJD 20 min 提取液指纹图谱段带后各参数

Table 3 Parameters of fingerprint of HJD sample in decoction for 20 min after division

时间段 / min	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1} / \text{min}$			$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2 / \text{min}^2$			时间段 / min	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1} / \text{min}$			$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2 / \text{min}^2$		
	全方 合煎	单味药 加合	RSD / %	全方 合煎	单味药 加合	RSD / %		全方 合煎	单味药 加合	RSD / %	全方 合煎	单味药 加合	RSD / %
1~2 [▲]	1.90	2.58	21.52	0.02	-0.62	-150.97	27~28	27.33	27.12	0.56	0.01	-0.21	-151.00
2~3	2.41	2.44	0.79	0.03	0.06	56.86	28~29	28.51	28.55	0.11	0.06	0.04	34.50
3~4	3.35	3.29	1.28	0.00	0.01	69.92	29~30	29.33	29.32	0.02	0.00	0.01	72.16
4~5	—	4.33	—	—	0.00	—	30~31	30.36	30.37	0.02	0.01	0.07	110.99
5~9	—	—	—	—	—	—	31~32	31.45	30.83	1.41	-0.01	-0.39	-131.10
9~10	9.81	9.43	2.81	0.01	0.06	105.61	32~33	—	32.30	—	—	0.12	—
10~11	10.27	10.19	0.55	-0.01	0.07	182.67	33~34	—	33.33	—	—	0.00	—
11~12*	11.72	10.62	6.98	0.05	-1.91	-148.91	34~35	34.03	32.25	3.79	0.01	-5.19	-141.87
12~13	12.53	12.97	2.39	0.08	-0.20	-308.84	35~36	—	35.32	—	—	0.32	—
13~14	13.17	13.04	0.71	0.01	-0.17	-155.34	36~37	—	36.50	—	—	0.64	—
14~15	14.22	14.30	0.40	0.06	0.00	124.45	37~38	—	37.61	—	—	0.04	—
15~16	15.48	15.25	1.04	0.07	0.05	26.09	38~39	—	38.31	—	—	0.04	—
16~17	—	16.82	—	—	0.06	—	39~40	—	39.72	—	—	1.03	—
17~18	17.52	17.81	1.17	0.03	-0.06	-361.75	40~41	—	40.46	—	—	0.11	—
18~19	18.62	18.19	1.64	0.00	0.29	137.60	41~42	—	—	—	—	—	—
19~20	19.19	19.30	0.40	0.05	0.10	44.89	42~43	42.59	42.27	0.53	-0.10	0.00	-153.93
20~21	20.46	20.31	0.53	0.00	0.15	134.12	43~44	—	43.78	—	—	0.11	—
21~22	21.41	21.28	0.44	0.00	0.05	116.89	44~45	—	44.29	—	—	0.18	—
22~23 [▲]	22.81	52.50	55.75	0.03	-910.12	-141.43	45~46	—	45.11	—	—	0.00	—
23~24	23.20	24.23	3.06	0.00	-0.43	-144.01	46~47	46.40	46.45	0.09	0.01	0.01	16.06
24~25	24.60	24.53	0.20	0.00	0.11	129.99	47~48	—	47.16	—	—	0.04	—
25~26	25.45	24.59	2.42	0.00	-0.37	-143.71	48~49	—	48.77	—	—	0.70	—
26~27	26.60	26.85	0.65	0.12	0.03	92.19	49~50	49.17	49.26	0.12	0.12	0.05	55.44

续表 3

时间段 / min	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1} / \text{min}$			$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2 / \text{min}^2$			时间段 / min	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1} / \text{min}$			$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2 / \text{min}^2$		
	全方合煎	单味药加合	RSD / %	全方合煎	单味药加合	RSD / %		全方合煎	单味药加合	RSD / %	全方合煎	单味药加合	RSD / %
50~51	50.07	50.59	0.72	0.01	0.12	115.09	55~56	—	59.96	—	—	0.01	—
51~52	51.42	51.36	0.08	0.00	0.00	37.86	56~57	56.29	56.58	0.36	0.00	0.09	131.79
52~53	—	52.18	—	—	0.05	—	57~58	58.38	59.48	1.32	-0.40	-2.87	-106.49
53~54	53.50	53.89	0.52	0.00	0.05	114.69	58~59	58.19	58.34	0.18	0.00	0.00	40.00
54~55	—	54.01	—	—	0.01	—	59~60	57.92	59.44	1.83	-2.31	-0.05	-135.83

—表示在此时间段指纹图谱没有吸收峰出现, ▲表示全方合煎时此时间段有成分的抑制, *表示全方合煎时此时间段可能有新成分出现
 —No absorption peaks in the period, ▲Some components were suppressed in the period when simiao prescription was decocted, *New component may appear in the period

表 4 混合对照品指纹图谱段带后 $\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ 、 $\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$ 的数据

Table 4 $\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ and $\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$ data of fingerprint of mixture reference substances after division

次数	进样量 / μL	时间段 / min	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1} / \text{min}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2 / \text{min}^2$	次数	进样量 / μL	时间段 / min	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1} / \text{min}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2 / \text{min}^2$
1	10	1~2	1.721 453	0.013 093	3	10	13~14	13.733 520	-0.062 810
		3~4	3.324 090	0.000 778			34~35	34.234 160	0.029 135
		9~10	9.689 519	-0.032 770			1~2	1.730 093	0.011 631
		13~14	13.587 520	-0.032 140			3~4	42.384 820	-185.217 000
		35~36	30.381 580	0.007 063			9~10	9.672 194	-0.016 890
2	10	35~36	32.049 000	0.011 631	13~14	13.942 820	-0.164 230		
		1~2	1.722 789	0.012 425	30~31	35.495 000	0.011 893		
		3~4	3.324 238	0.000 779	32~33	37.640 870	0.024 999		
		9~10	9.680 778	-0.022 810					

表 5 HJD 不同提取时间段指纹图谱段带后全方合煎与各单味药单煎加合后的 RSD

Table 5 RSD of fingerprint of simiao prescription and single herb decoction of HJD in different extraction periods after division

时间段 / min	10 min		80 min		4 h		5 h		6 h		7 h		8 h		10 h	
	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$
1~2	322.26	1.75	-316.73	16.34▲	-142.63	48.91▲	-141.56	-269.60▲	-31.89	5.55▲	-243.37	14.40▲	-167.32	12.05▲	-164.43	24.08▲
2~3	15.52	4.25	63.53	2.30	21.88	3.14	16.75	2.56	13.14	0.59	14.35	0.55	18.76	0.80	125.14	4.50▲
3~4	-142.14	32.35▲	85.07	0.56	20.03	0.46	50.02	0.46	129.11	1.76	75.34	0.47	113.24	0.24	140.14	4.00
4~5	—	—	—	—	—	—	—	—	116.26	3.69	—	—	—	—	—	—
5~6	—	—	###	###	—	—	—	—	137.85	1.44	—	—	###	###	-141.48	53.99▲
6~7	—	—	101.17	1.51	—	—	###	###	—	—	###	###	###	###	###	###
7~8	###	###	###	###	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8~9	—	—	—	—	—	—	###	###	###	###	—	—	—	—	—	—
9~10	306.50	1.63	43.43	0.23	142.72	3.31	135.05	1.08	165.00	4.48*	115.86	1.26	74.68	2.07	-210.89	0.41
10~11	-621.07	4.41▲	72.26	0.02	47.65	1.36	55.48	1.59	122.67	0.31	38.89	1.47	150.12	0.48	-141.53	17.68▲
11~12	-141.92	64.03▲	36.74	1.50	79.18	0.20	43.72	0.31	-141.52	65.01*	541.14	2.88	10.78	0.90	140.46	23.77*
12~13	-142.04	28.77▲	26.25	1.53	124.31	0.90	26.02	0.26	220.93	1.58	45.30	0.52	89.91	2.43	150.73	26.13*
13~14	-117.68	1.35	-185.36	1.90	-145.84	1.60	-135.94	8.87*	-140.04	10.91*	-77.57	0.86	-116.07	11.75**	141.59	8.63*
14~15	12.78	0.23	-141.97	14.50*	159.43	2.00	135.13	2.18	24.62	1.49	10.10	1.17	71.29	0.78	-142.64	2.77
15~16	130.91	0.91	19.08	1.00	38.92	0.18	110.95	0.33	29.32	0.30	109.50	2.25	36.41	0.98	-141.44	16.47▲
16~17	—	—	117.27	0.76	50.98	0.71	78.60	0.60	47.47	1.47	104.33	2.46	123.43	0.64	-141.53	14.77▲
17~18	-1 831.00	0.17	656.06	2.46	-157.10	1.27	-147.17	4.80*	-168.95	3.99	-158.67	4.26	-176.17	0.87	-141.46	12.60▲
18~19	-150.07	3.34	-141.44	78.40▲	31.12	0.80	118.37	1.09	19.16	1.43	123.35	0.80	28.50	0.64	-141.43	27.76

续表 5

时间段 / min	10 min		80 min		4 h		5 h		6 h		7 h		8 h		10 h	
	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$	$\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$	$\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$
19~20	—	—	117.83	1.04	60.06	1.49	99.69	0.39	93.32	0.38	83.36	0.74	100.17	0.86	141.04	12.55*
20~21	—	—	39.08	0.31	46.37	1.12	1.61	0.42	35.62	0.72	21.64	0.21	8.95	1.66	-141.54	1.00
21~22	123.52	0.59	39.23	0.76	107.09	1.38	101.08	1.34	59.53	0.46	92.05	1.44	80.65	0.86	-141.51	6.70▲
22~23	-141.75	7.78*	320.47	1.47	70.15	0.08	11.81	0.71	37.12	0.66	-142.54	13.64▲	132.64	0.39	-141.81	4.34
23~24	117.85	0.67	-141.63	9.20*	41.43	0.58	-172.11	1.00	20.63	0.17	-316.68	1.05	-144.91	6.84*	141.38	66.16▲
24~25	—	—	1.98	0.76	33.34	0.11	112.29	0.96	106.46	1.24	76.61	0.72	58.47	0.89	-144.81	0.19
25~26	115.89	0.12	-163.03	0.28	13.91	0.37	51.65	0.35	114.62	0.60	75.33	1.14	200.85	0.91	141.27	8.22*
26~27	64.42	0.70	44.35	0.40	15.70	0.34	71.89	0.48	30.50	0.19	12.07	0.26	15.44	0.23	-141.51	10.42▲
27~28	141.44	0.71	1.95	0.28	131.17	0.46	108.85	0.74	123.32	0.15	119.69	0.82	80.74	0.31	141.42	83.23*
28~29	29.42	0.52	81.75	0.65	125.60	0.18	9.21	0.73	48.61	0.62	10.93	0.36	35.15	0.49	141.07	8.84*
29~30	-178.56	2.02	119.40	0.54	-149.92	1.48	106.11	0.23	-140.66	1.63	-202.39	0.35	54.54	0.87	141.39	3.30
30~31	166.36	0.59	126.00	0.00	83.83	0.64	52.28	0.33	61.16	0.31	61.43	0.03	85.58	0.57	-141.55	143.64*
31~32	-123.09	0.03	-142.01	0.90	-118.16	0.84	-136.14	0.53	-142.36	0.71	-145.16	0.51	-134.34	0.45	141.42	2.15
32~33	—	—	—	—	###	###	—	—	—	—	—	—	—	—	###	###
33~34	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
34~35	-145.20	2.48	-113.40	1.68	-73.61	0.62	-112.44	0.42	-125.87	2.19	-141.47	13.98▲	-127.13	5.41▲	141.41	14.64▲
35~36	—	—	88.04	0.04	115.85	0.48	81.41	0.33	54.44	0.12	7.61	0.33	96.35	0.03	-141.42	36.93▲
36~37	—	—	—	—	112.24	0.06	94.41	0.10	125.98	0.75	112.82	0.89	132.03	0.32	-141.42	126.58▲
37~38	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	###	###
38~39	—	—	—	—	103.12	0.06	23.57	0.33	128.73	0.83	22.67	0.68	125.89	0.51	—	—
39~40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	###	###
40~41	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	###	###
41~42	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	###	###
42~43	73.38	0.02	75.35	0.10	110.47	0.07	81.56	0.01	54.02	0.04	83.91	0.11	84.87	0.02	-141.42	131.29▲
43~44	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	###	###
44~45	—	—	—	—	123.67	0.27	35.57	0.02	125.74	0.35	131.32	0.90	89.07	0.48	###	###
45~46	139.51	0.84	132.37	0.58	3.53	0.14	120.58	0.26	139.98	0.20	1.07	0.02	62.43	0.18	-141.42	58.40▲
46~47	—	—	34.47	0.26	38.48	0.52	30.17	1.05	44.68	0.75	75.47	0.17	60.02	0.14	141.41	10.37▲
47~48	—	—	—	—	—	—	—	—	60.27	0.34	—	—	64.50	1.19	###	###
48~49	—	—	3.44	1.09	131.38	0.98	###	###	—	—	—	—	—	—	—	—
49~50	—	—	130.49	0.77	131.12	0.54	129.50	0.82	98.36	0.12	28.57	0.18	79.23	0.48	—	—
50~51	—	—	—	—	137.95	0.23	138.59	0.50	—	—	133.73	0.36	132.25	0.16	—	—
51~52	141.09	0.12	118.02	0.09	125.69	0.19	117.63	0.46	104.47	0.29	58.71	0.49	124.51	0.54	141.41	9.36▲
52~53	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
53~54	—	—	127.25	0.09	126.05	0.10	131.08	0.22	128.18	0.16	131.01	0.43	50.82	0.87	-141.42	28.66▲
54~55	###	###	—	—	—	—	—	—	—	—	###	###	—	###	###	—
55~56	—	—	—	—	—	—	103.57	0.29	—	—	—	—	70.31	0.10	—	—
56~57	—	—	117.82	0.47	124.21	0.82	—	—	—	—	131.87	0.77	23.84	0.54	141.40	0.17
57~58	-144.73	1.58	-167.40	1.44	127.56	0.27	126.01	0.25	199.90	0.20	32.16	0.30	107.99	0.51	97.12	0.04
58~59	35.32	0.47	33.11	0.49	87.32	0.64	—	—	—	—	—	—	###	###	###	###
59~60	-140.19	1.37	317.30	0.64	55.75	0.32	-145.85	0.50	-164.64	0.34	-137.86	25.91▲	152.97	0.63	-147.82	0.68

###表示此段指纹图谱无吸收峰；*表示此段全方合煎 $\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$ 大于单味药单煎；—表示全方合煎此段指纹图谱无吸收峰，单味药单煎加合后有吸收峰；▲表示全方合煎在此段有成分被抑制

No absorption peaks in the period, * $\bar{\sigma}_{T,f,i=1}^2$ of simiao prescription decoction was greater than single herb decoction in this period, —No absorption peaks when simiao prescription decoction but there are absorption peaks when single herb was decocted in this period, ▲Some components were suppressed in the period when the simiao prescription was decocted

34、35~41、43~46、47~49、52~53、54~56 min 时, 全方没有色谱峰出现, 而单味药有色谱峰出现, 说明在复方煎煮过程中发生了反应抑制了某些成分的产生。另外, 保留时间在 1~2、11~12、22~23 min 时成分在复方合煎时发生了变化; 保留时间在 1~2、9~15、17~19、20~28、30~32 min 时成分的量发生了变化。

由表 4: 对 3 次混合对照品进行段带分析后发现, 3 张指纹图谱在 13~14 min 时段的 $\sigma_{T,f,i=1}^2$ 分别为 -0.0321 4、-0.062 81、-0.164 23, 计算得出 RSD 为 -80.11%, 故 RSD 大于 -80.11% 作为判断段带中成分变化的依据。

由表 5: 在指纹图谱多数保留时间中全方合煎与单味药单煎的 $\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ 、 $\sigma_{T,f,i=1}^2$ 的 RSD 在合理范围内 ($\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ 的 RSD 为 4.262%, $\sigma_{T,f,i=1}^2$ 的 RSD 为 80.11%), 但在提取 10 min 的样品溶液中, 全方合煎与单煎加合在保留时间 3~4、11~13、22~23 min 时 $\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ 、 $\sigma_{T,f,i=1}^2$ 的 RSD 差异较大, 说明单煎与合煎的成分发生了变化, 保留时间 22~23 min 的全方合煎 $\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ 大于单味药单煎, 说明保留时间在 22~23 min 时成分可能由于全方合煎而产生; 而保留时间 3~4、11~13 min 全方合煎的 $\bar{\lambda}_{T,f,i=1}$ 小于单独煎煮, 说明此处的成分由于合煎而被抑制。

4 结论

中药复方的化学成分是药效作用的物质基础, 复方化学成分的研究对揭示中药配伍规律和作用机制、优化制剂工艺、实现中医药现代化具有重要意义。本研究在总量统计矩法的基础上, 进一步对不同提取时间全方合煎和各单味药单煎加合的指纹图谱进行段带分析, 以探讨中药复方在煎煮过程中成分的变化规律, 分析中药复方配伍后各单味药之间是相互抑制还是相互促进, 亦可用于各单味药合煎后产生的新成分的研究, 进一步可以找出合煎后的新成分。该法具有总量统计矩法加和性、偶联性, 并能够降低对测试方法和操作的要求, 为中药复方煎煮过程成分的变化规律研究提供了一个可行的方法。本方法的成功应用对中药复方配伍规律的研究、中药复方提取时间的选择及中药复方煎煮过程成分变化信息的研究都具有较大的意义。

参考文献

- [1] 鄢丹, 熊吟, 马丽娜, 等. 建立以临床功用为导向的中药质量评控格局与适宜模式的设想 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 1-5.
- [2] 文志明, 徐礼燊. 中药复方化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 1999, 30(6): 468-470.
- [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]. 药学报, 2008, 43(2): 195-201.
- [4] 贺福元, 邓凯文, 黄胜, 等. 总量统计矩标准相似度数学模型的建立及应用研究 [J]. 药学报, 2013, 48(9): 1453-1458.
- [5] 杨岩涛, 吴春英, 刘文龙, 等. 不同相似度法对当归补血汤指纹图谱分析的比较研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1431-1435.
- [6] 邓中甲. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.
- [7] 曾雪花, 周桂保, 杨湘江, 等. 黄连解毒汤体外抗菌活性研究 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(19): 161-162.
- [8] 赵保胜, 刘永刚, 王秀丽. 黄连解毒汤解热、抗炎作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 55-57.
- [9] 刘明霞, 孙付军, 王春芳, 等. 黄连解毒汤 70%醇提物对 MDR 模型小鼠细胞凋亡及相关因子表达的影响 [J]. 中药材, 2009, 32(8): 1270-1272.
- [10] 张扬, 金瑾, 张莲珠, 等. 黄连解毒汤对高脂血症大鼠血脂及氧自由基代谢的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 169-172.
- [11] 邓远雄, 刘晓东, 刘李, 等. 黄连解毒汤对糖尿病大鼠肠道二糖酶活性的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1127-1130.
- [12] 段晓鹏, 贺福元, 周晋, 等. 补阳还五汤指纹图谱总量统计矩加合性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3247-3252.
- [13] 李发美. 医药高效液相色谱技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [14] 孙毓庆. 分析化学 (下册) [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [15] 任玲玲, 薛兴亚, 徐青, 等. 黄连解毒汤高效液相色谱分析方法的建立 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2005, 7(5): 41-44.
- [16] 陈丽静, 孙秀梅, 张兆旺, 等. 3 种方法制备的黄连解毒汤提取液指纹图谱比较 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 487-491.