

基于中药指纹图谱结合模式识别的清开灵软胶囊批次间稳定性控制研究

滕会会 杜守颖 李鹏跃 陆洋 白洁 武慧超 孙如煜 张晴 杜秋

【摘要】 目的 基于中药指纹图谱结合化学模式识别方法寻找影响清开灵软胶囊批次间稳定性的重点化学成分。**方法** 采用聚类分析、主成分分析及偏最小二乘法模型对不同批次清开灵软胶囊的高效液相色谱法指纹图谱进行整体观察和评价,找出可能与相似度强相关的标志物。**结果** 通过系统聚类分析及主成分分析表明剔除黄芩苷色谱峰后的相似度计算结果更符合实际情况;经偏最小二乘法分析得到3个化学成分与相似度密切相关,该3个化合物可作为控制清开灵软胶囊批次间稳定性的重点化学成分。**结论** 该中药指纹图谱-化学模式识别方法用于中药不同批次间稳定性控制研究是可行的。

【关键词】 指纹图谱; 化学模式识别; 清开灵软胶囊

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.11.010

Based on fingerprint combined with chemical pattern recognition for stability control study between different batches of Qingkailing soft capsules TENG Hui-hui, DU Shou-ying, LI Peng-yue, et al.

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of TCM, Beijing 100102, China

Corresponding author: DU Shou-ying, E-mail: dushouying@263.net

【Abstract】 Objective Based on fingerprint combined with chemical pattern recognition method for Qingkailing soft capsule on the stability of key chemical composition between different batches. **Methods** Cluster analysis, PCA and PLS model were used for observation and evaluation of different batches of soft capsules on the HPLC fingerprint, markers associated with similarity were identified. **Results** The system clustering analysis and principal component analysis showed that after eliminating chromatographic peak of baicalin similarity calculation the results was more in line with the actual situation. The PLS analysis was got 3 chemical component that was closely related to the similarity. The three compounds can be used as a

基金项目:北京市科技新星计划(xx2015A048)

作者单位:100102 北京中医药大学中药学院[滕会会(硕士研究生)、杜守颖、李鹏跃、白洁、陆洋、武慧超、孙如煜(硕士研究生)、张晴(硕士研究生)、杜秋(硕士研究生)]

作者简介:滕会会(1988-),女,2013级在读硕士研究生。研究方向:中药中药新剂型与新技术研究。
E-mail:h15810377850@163.com

通讯作者:杜守颖(1960-),女,博士,教授,博士生导师。研究方向:中药新剂型与制剂关键技术。E-mail:dushouying@263.net

key of chemical composition which influenced the stability of soft capsule between different batches.

Conclusion The TCM fingerprint and chemical pattern recognition method is feasible for traditional Chinese medicine (TCM) between different batches stability control research.

【Key words】 Fingerprint; Chemical pattern recognition; Qingkailing soft capsules

清开灵组方源于中医治疗急性热病传统处方“温病三宝”中的安宫牛黄丸,具有清热解毒、化痰通络、醒神开窍之功效,临床疗效显著^[1-2]。现行的清开灵软胶囊质量评价和控制还停留在几个有效成分的定性和定量测定^[3],由于中药材或中药制剂是通过内部各种化学成分间协同作用发挥药效作用的,仅以其中个别或几个“有效成分”作为质量评价标准,很难准确对中药质量进行整体评价^[4]。中药指纹图谱是一种综合的、可量化的手段^[5],但目前采用相似度评价,不能立体、多维地对中药材及其制剂的质量进行整体分析,而化学模式识别能实现中药多维信息的综合分析,已广泛应用于中药材及中成药的质量控制研究^[6-10]。因此,本研究采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)建立清开灵软胶囊指纹图谱,并用聚类分析、主成分分析(principal component analysis, PCA)及偏最小二乘法(partial least square, PLS)等化学模式识别对所得图谱进行分析、解析,为全面控制清开灵软胶囊的批次间的稳定性提供了方法。

1 仪器与试剂

日本岛津高效液相色谱仪(LC-20AD 泵, SIL-20A 自动进样器, SPD-M20A 检测器);分析天平(赛多利斯仪器系统有限公司);G20 型医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司);KQ5200DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110715-201318);甲醇、乙腈(Fisher 公司,色谱纯);磷酸(TED 公司,色谱纯);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);清开灵软胶囊(批号:14072411、15052042、15051641、15051941、15051841、15051942、15052041、15052241、15051741、15052111、15052141,每粒 0.4 g,含黄芩苷 20 mg)。

2 实验方法与结果

2.1 清开灵软胶囊指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 Phenomenex Luna RP C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相(A)0.4% 磷酸的水溶液-(B)甲醇-乙腈(体积比为 4:1),梯度洗脱;流

速 1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长 254 nm;进样量为 5 μL。梯度洗脱程序:0~15 分钟,5%~30% B;15~22 分钟,30%~35% B;22~40 分钟,35%~60% B;40~43 分钟,60% B;43~55 分钟,60%~81% B;55~60 分钟,81%~90% B;60~65 分钟 90% B。

2.1.2 溶液的配制 黄芩苷对照品溶液的配制:称量黄芩苷对照品适量,加 70% 甲醇超声溶解,配制含黄芩苷 100 μg/mL 的对照品溶液。软胶囊供试品的制备:取 1.2 g 硅藻土置于蒸发皿中,精密称定,再取软胶囊内容物 0.4 g,精密称定于上述蒸发皿中,研匀后,将其全部转入锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声 70 分钟(功率 200 W,频率 40 KHz),再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,吸取 5 mL 以 10000 rpm 离心 10 分钟,上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.1.3 指纹图谱分析及数据处理方法 中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)进行指纹图谱分析,多元数据分析和建模由 SIMCA-P 11.5 软件及 SPSS 16.0 来完成。

2.1.4 清开灵软胶囊指纹图谱方法学考察 (1)精密度考察:取同一批号供试品溶液,连续进样 6 次,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均<1.3%,相对峰面积的 RSD 均<2.8%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。(2)稳定性考察:取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、12、24 小时进样检测,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均<0.12%,相对峰面积的 RSD 均<3%,其相似度均大于 99%,表明供试品溶液在 24 小时内稳定性良好,符合指纹图谱研究技术的要求。(3)重现性考察:取同一批号供试品 6 份,按 2.1.2 项下对应的方法制备各供试品,分别进样检测,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均<0.12%,相对峰面积的 RSD 均<2.7%,其相似度均大于 99%,表明方法具有较好的重复性,符合指纹图谱的要求。(4)样品测定:取 11 批清开灵软胶囊,分别按 2.1.2 项下制备各供试液并按 2.1.1 项下色谱条件进样检测,并用中药指纹图谱相似度计算软件进行分析,以黄芩苷色谱峰作为参照峰,其保留时间为 38.395 分钟,标示出了清开灵软胶囊

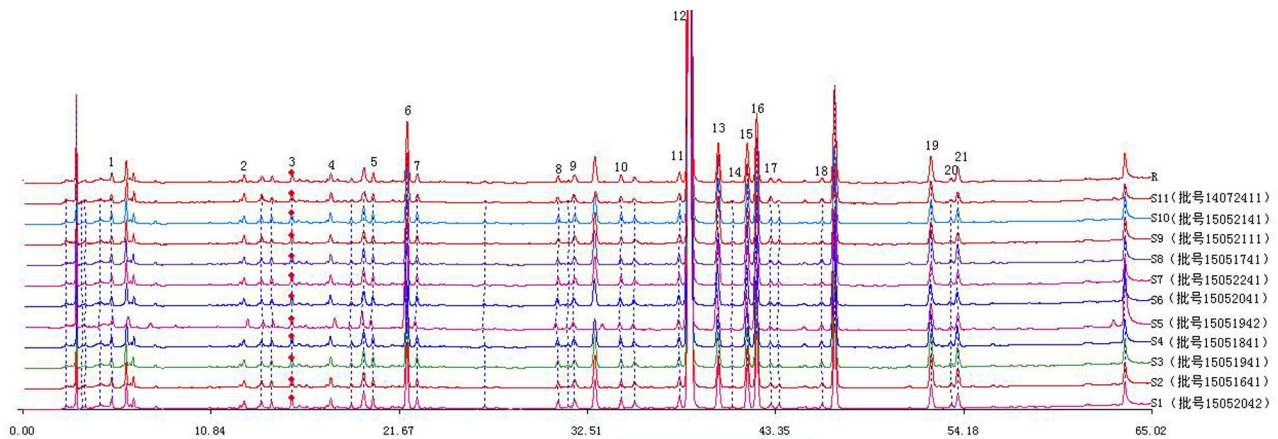


图 1 11 批清开灵软胶囊指纹图谱

21 个共有峰(如图 1),共有峰面积所占总面积比例为 87.42%,相似度均为 1。(5)相似度评价:由于清开灵软胶囊经 HPLC 检测所得色谱图中,黄芩苷色谱峰面积过大,峰高与其他峰高差异太大,因此考虑将其剔除后再计算相似度,保证相似度的准确性。结果所得 11 批次清开灵软胶囊的相似度为 0.994、0.993、0.995、0.992、0.92、0.998、0.992、0.994、0.989、0.992、0.976。

2.2 基于化学模式识别方法对不同批次清开灵软胶囊进行整体性评价

前期实验得到清开灵软各自批次间的相似度均较高,但剔除黄芩苷与不剔除黄芩苷后所得两者的相似度差异明显,为了所得相似度的准确性,在接下来实验中进行模式识别分析,结合清开灵软胶囊 11 个样本批次的整体聚集,分散情况得到更符合实际情况的相似度,并通过 PLS 模型分析相似度与变量之间的关系找到与相似度有密切联系的化学成分。

2.2.1 系统聚类分析 将清开灵软胶囊指纹图谱数据经归一化处理后进行聚类分析,采用 Ward 法(Ward's Method),利用平方 Euclidean 距离(Squared Euclidean distance)作为样品的测度进行分析。结果见图 2,聚类分析将 11 批样品分为 4 类。样本中 S1、S7、S10、S6、S9 为第 I 类,S3、S8、S2、S4 为第 II 类,S11 为第 III 类,S5 在第 IV 类,这四大类又继续分成更小的类别,其中 I 类分为 A 类和 B 类,说明在同一类别里 S9 与 S1、S7、S10、S6 相差较远,II 类分为 C 类和 D 类,说明 S4 与 S3、S8、S2 在同一类别里相差较远,结果表明,在剂型一致的前提下,不同批号的清开灵制剂样品存在差异。由剔除黄芩苷后相似度结果,S5 相似度为 0.92,S11

为 0.976,在 11 批样品中相似度最低,S1、S7、S10、S6、S9 相似度分别 0.994、0.992、0.992、0.998、0.989,S9 相似度最低,S3、S8、S2、S4 的相似度为 0.995、0.994、0.993、0.992,S4 的相似度最低,这与聚类分析分类结果一致。

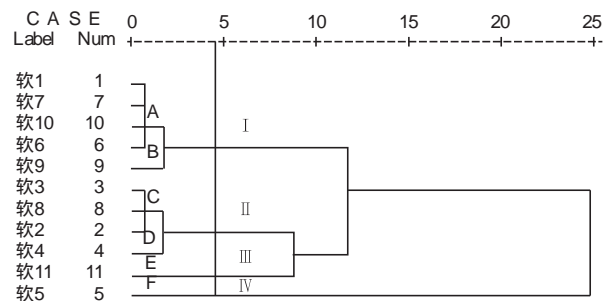


图 2 聚类分析

2.2.2 PCA 分析 通过将清开灵软胶囊指纹图谱数据经归一化处理后导入 SIMCA-P 中,得 4 个主成分 PCA 模型,如图 3 所示,模型的 R^2X 为 89.8%, Q^2Y 为 67.9%,解释度很高,符合实验要求。分别绘制出得分图及其 3D 图(图 4)、PCA 得分与载荷汇总图(图 5)。

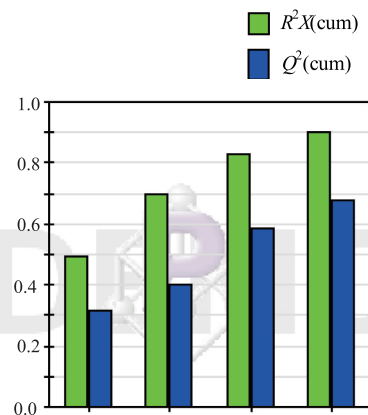


图 3 PCA 主成分参数

由图 4 可看出,样品点在四个象限存在离散的情况,即不同批次样品在处理后经 HPLC 测定的结果之间还是存在一定的差异,进一步分析样本分布情况,S1、S6、S7、S10 在右下第四象限高度聚集在一起,S2、S3、S4、S8 在第三象限分布较近,S5、S9、S11 分布在中上部分,距离较远。这与剔除黄芩苷后所得相似度大小规律相一致,所得结果与聚类分析一致,说明黄芩苷由于峰过高过大,会对相似度计算的准确性有一定的影响,将其剔除后相似度结果比较符合实际情况。

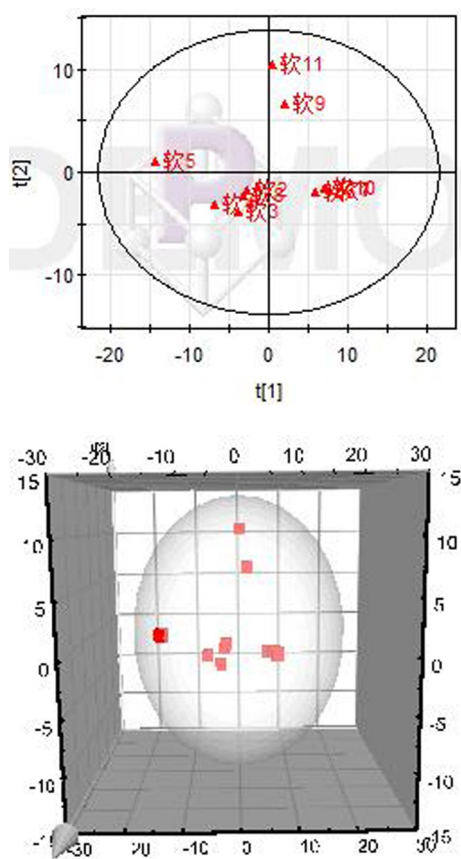


图4 PCA得分图(上)及其3D图(下)

由图 5 可见,样本可分为右下,左下及中上三部分。中上部分的 S5、S9、S11 相似度为 0.92、0.989、0.976,而右下及左下部分的 S1、S2、S3、S4、S6、S7、S8、S10 相似度均大于 0.99,且样本 S1、S6、S7、S10 在右下部分高度聚集在一起,即样品的相似度从右下至左上存在递减的趋势。而通过载荷分析,每个象限的变量分布不一样,为了寻找对批次间相似度影响较大的化合物,拟以相似度作为 Y 变量,进行 PLS 分析。

2.2.3 基于 PLS 的重点化学成分筛选 通过将清开灵软胶囊指纹图谱数据导入 SIMCA-P 中,峰面积

为 X 矩阵,相似度为 Y 变量,进行 PLS 分析。得 3 个主成分,如图 6 所示。PLS 模型的 R^2X 为 0.826, R^2Y 为 0.997, Q^2 为 0.953,能够解释 82.6% 的 X 变量,解释 99.7% 的 Y 变量,交叉有效性为 95.3%;解释指标及预测指标均较高,模型拟合较好。分别绘制出预测值与观测值拟合曲线图(图 7)、载荷图(图 8)、各化合物系数图(图 9)、和各化合物 VIP 值图(图 10),考察与相似度(Y)联系密切的样品或化学成分。

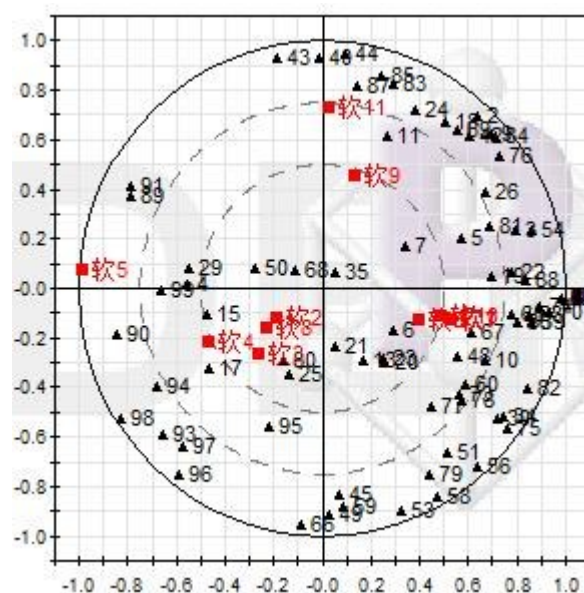


图5 PCA得分与载荷汇总图

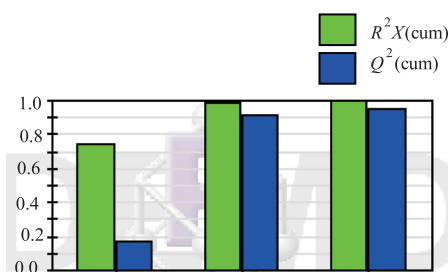


图 6 PLS 模型主成分参数

由图7可见 PLS 模型的预测值与观测值基本一致, $R^2=0.9969$, $RMSEE=0.0015$, 模型拟合较好, 能够很好的通过模型预测 Y 。

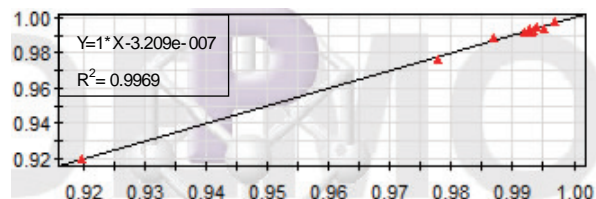


图7 PLS模型中预测值与观测值拟合曲线

图 8 可得,峰号 77、5、82、19、3、74、56、51、79、88、34、63、39 共 13 个化学成分与 Y 分布最近,呈正相关;峰号 99、4、29、50、15、17、18、35 与 Y 距离最远,呈负相关。由图 9、10 可得,13 个化学成分的系数及 VIP 值均大于 1,较其他成分高,说明这 13 个峰对应的化学成分对软胶囊相似度贡献较大。通过将这 13 个成分的第一主成分 loading 值、系数分布及 vip 值(阈值>1)相关参数总值 $|r|$ 对比,再结合

色谱峰比对、与相似度进行相关性分析(SPSS 16.0, Pearson Correlation Coefficients),筛选出 3 个化合物,结果见表 1。由表可知,峰号 82、19、77 总值 $|r|$ 均大于 1.6,色谱峰比对得到相应保留时间,相关性分析参数 R 值均大于 0.8, P 值均小于 0.05,说明该 3 个化合物与相似度存在较强的相关性,最终确定峰号 82、19、77 共 3 个化学成分为与相似度密切相关的潜在标志物,其中 82 号峰对应的化学成分为黄芩苷。



图 8 PLS 载荷图

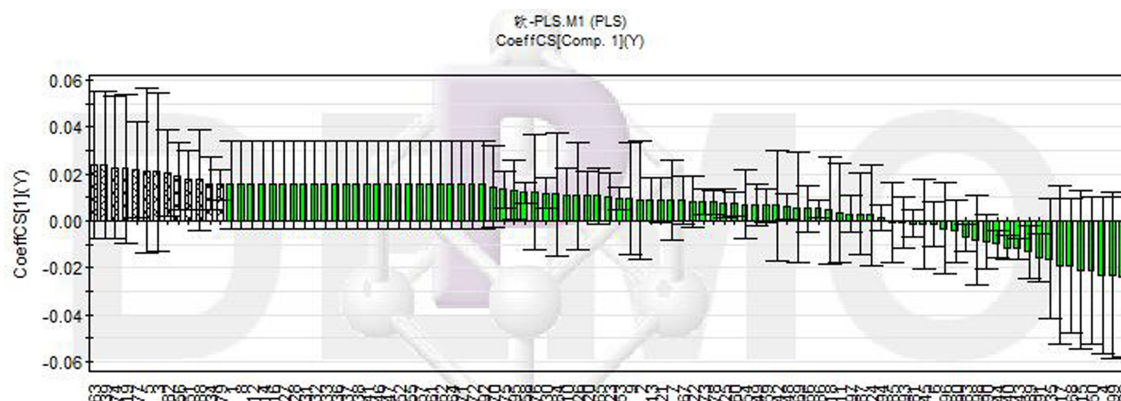


图 9 PLS 中各化学成分的系数结果

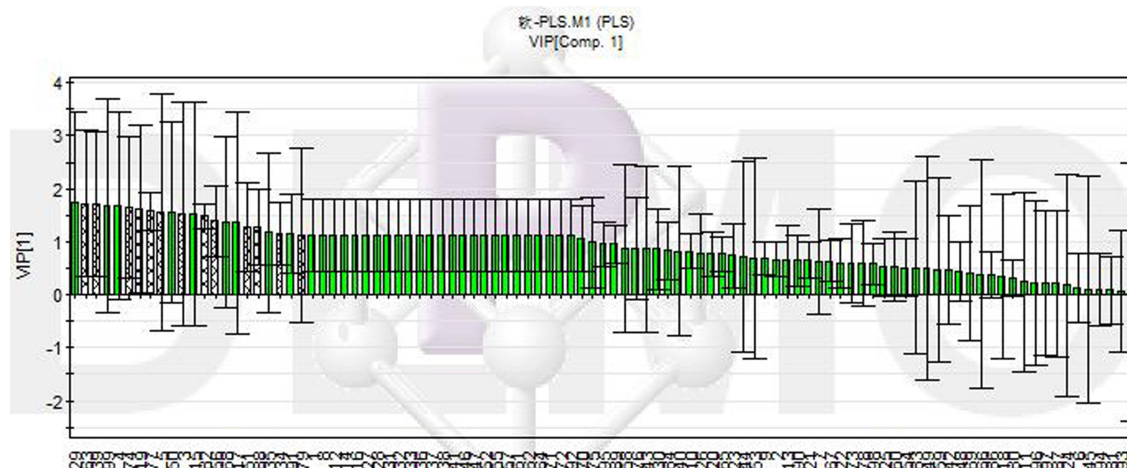


图 10 PLS 中各化合物的 VIP 值

表 1 软胶囊相似度潜在标志物相关参数表

峰号	保留时间(min)	相关参数 r	R	P
82	38.396	1.6515	0.812	0.002
19	5.967	1.7983	0.885	0.000
77	32.978	1.7547	0.863	0.001

3 讨论

本实验中应用了系统聚类分析和主成分分析法两种化学计量学方法分别对清开灵软胶囊指纹图谱色谱数据进行了模式识别的初探,经过分析与比较得到如下结论:两种分析方法均将样品分为四类,从整体分类效果上来看,主成分投影法更为直观,能一目了然地看出各个分类样本之间的聚类关系,聚类分析法则能体现出分类样本间内在的相互联系,两种分析结果基本一致,可见,聚类分析与主成分分析方法可以互相佐证,为可信的数据分析方法。

目前指纹图谱的评价以相似度作为门槛,而多数学者认为指纹图谱中峰面积大及峰高较高的峰会对相似度的准确性有一定的影响,但该方面的研究报道却很少。本实验通过系统聚类分析和主成分分析两种方法分析样本的聚集、分布情况,得到清开灵软胶囊 11 个批次样本分布存在离散情况,说明各个批次之间存在一定的差异,其相似度不可能均在 1 左右;进一步分析样本聚集情况,发现其与剔除黄芩苷后相似度的大小规律相接近,因此得出剔除黄芩苷后所得相似度更符合实际情况。

实验中,由 PCA 分析得到样品的相似度从右下至左上存在递减的趋势。通过载荷分析,发现每个象限的变量并不是均匀分布,说明变量与相似度之间也可能存在某种联系,因此进一步通过 PLS 模型分析,建立相似度与变量之间的关系,找出与相似度密切相关的标志物,最终得到 3 个标志物。其中一个标志物为黄芩苷,已列入药典质量限定范围,提示有必要将其它未列入质量限定范围标志物列

入质控标准。

本实验采用化学模式识别技术成功地对清开灵软胶囊 HPLC 指纹图谱进行了初步研究,该分析及数据处理方法能实现清开灵软胶囊指纹图谱的整体分析,不仅建立了清开灵软胶囊指纹图谱,验证了峰面积大及峰高较高的峰确实会对相似度的准确性有一定的影响,同时找出了与相似度强相关的标志物,说明该方法能运用于中药及中药材的批次间稳定性的控制研究。由于时间原因,未对其他标志物进行结构鉴定,笔者团队后续将会进行深入研究。

参 考 文 献

[1] 唐卡毅. 清开灵软胶囊临床应用与研究新进展[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(12):1444-1447.

[2] 陈荣,李云委. 清开灵临床应用概况[J]. 江西中医学院学报,1995,7(1):42-44.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1526-1528.

[4] 梁逸曾,易伦朝,黄熙,等. 中药分析新思路及其质量控制[J]. 分析测试学报,2014,33(2):119-126.

[5] 孙磊,乔善义,赵毅民. 中药指纹图谱应用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2009,36(3):194-197,203.

[6] 徐小娜. 中药色谱指纹图谱研究及化学计量学方法的应用[D]. 长沙:中南大学,2010.

[7] 黎阳,刘素香,张铁军,等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,40(9):1469-1474.

[8] 刘潇潇,周颖仪,杨立伟,等. 清开灵系列制剂的氨基酸色谱指纹图谱[J]. 中成药,2014,36(12):2537-2542.

[9] Liu Z H, Ting xiang Y E, Zhao H Z, et al. Fingerprint and chemical pattern recognition method for quality control of Huoxiang Zhengqi liquid[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis,2012,32(11):2064-2067.

[10] Song X M, Yang X J, Wang W, et al. HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition of Rhizoma Panacis Majoris[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011,17(11):59-62.

(收稿日期: 2015-06-23)
(本文编辑: 董历华)

· 启 事 ·

本刊核心影响因子为 0.569

2016 年 10 月 12 日,中国科学技术信息研究所在北京发布了最新中国科技论文统计结果。

据《2016 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》显示:《环球中医药》的核心影响因子为 0.569,在 27 种中医学类中国科技核心期刊中,排名第 11 位,比去年有所提升,综合评价总分在 1985 种中国科技核心期刊中排名第 773 位。

同期,本刊扩展影响因子 1.553,扩展 H 指数 8(至少有 8 篇文章被引不低于 8 次)。