

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.03.015

高效液相色谱指纹图谱法结合化学模式识别评价 脑安胶囊整体质量

魏培¹, 曹春泉², 朱瑞娟¹, 钱淼¹, 孙新堂^{1△}

(1. 山东畜牧兽医职业学院食品与药品科技系, 山东 潍坊 261061; 2. 菏泽学院药学院, 山东 菏泽 274000)

摘要:目的 评价脑安胶囊的整体质量。方法 建立测定制剂中阿魏酸、川芎嗪、藁本内酯、羟基红花黄色素 A、山柰素、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re 和人参皂苷 R_{b1} 8 个化合物含量的高效液相色谱法, 建立 19 批脑安胶囊的指纹图谱, 运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版软件进行相似度评价, 并通过聚类分析(CA)和偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)法进行化学模式分析。结果 共标定 21 个共有峰。指认 8 个化合物, 分别为羟基红花黄色素 A、川芎嗪、阿魏酸、藁本内酯、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{b1}、山柰素; 19 批样品相似度为 0.911~0.996; CA 和 PLS-DA 结果显示, 可将 19 批样品按生产厂家的不同聚成两类, 并确定 7 个差异标志物。结论 高效液相色谱指纹图谱结合化学模式识别可客观评价脑安胶囊的质量。

关键词: 脑安胶囊; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学模式识别; 聚类分析; 偏最小二乘-判别分析法; 质量评价

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)03-0067-06

Evaluation of Overall Quality of Naoan Capsules by HPLC Fingerprint Combined with Chemical Pattern Recognition

WEI Pei¹, CAO Chunquan², ZHU Ruijuan¹, QIAN Miao¹, SUN Xintang¹

(1. Department of Food and Drug Technology, Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang, Shandong, China 261061;

2. School of Pharmacy, Heze University, Heze, Shandong, China 274000)

Abstract: Objective To evaluate the overall quality of Naoan Capsules. **Methods** The high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for the determination of eight compounds including ferulic acid, tetramethylpyrazine, ligustilide, hydroxysafflor yellow A, kaempferol, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside Re and ginsenoside R_{b1} in the preparation. The fingerprint of 19 batches of Naoan Capsules was established, the similarity was evaluated by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012A), and the chemical pattern recognition was performed by the cluster analysis (CA) and partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA). **Results** A total of 21 common peaks were obtained, and eight compounds were identified, including hydroxysafflor yellow A, tetramethylpyrazine, ferulic acid, ligustilide, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside Re, ginsenoside R_{b1} and kaempferol. The similarity of 19 batches of samples was in the range of 0.911 - 0.996. The results of CA and PLS-DA showed that 19 batches of samples could be classified into two groups according to different manufacturers, and seven different markers was identified. **Conclusion** HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition can objectively evaluate the quality of Naoan Capsules.

Key words: Naoan Capsules; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; cluster analysis; partial least squares - discriminant analysis; quality evaluation

脑安胶囊是由川芎、当归、红花、人参、冰片 5 味中药组方的复方制剂, 具有活血化瘀、益气通络功效, 用于治疗脑血栓急性期、恢复期的气虚血瘀证候, 症见急性起病, 半身不遂, 口舌歪斜, 舌强语塞, 偏身麻木, 气短乏力, 口角流涎, 手足肿胀舌黯或有瘀斑, 苔薄白等^[1-2]。临床用于治疗偏头痛^[3]、缺血性中风气虚血瘀症^[4]、高血压脑血管功能异常^[5]、老年性脑梗死^[6]等。脑安胶囊收载于 2020 年版《中国药典(一部)》, 以阿魏酸

和人参皂苷 Re 含量作为定量分析指标。但单一指标成分的定量分析无法完整、准确地反映中药制剂的复杂性和质量一致性。指纹图谱是采用色谱法、光谱法等分析方法得到的能体现中药整体特征的图谱, 将图谱某些重要特征信息或整体信息用于中药材或中药制剂真伪鉴别或中药质量整体控制和评价的方法^[7], 可科学、系统地体现中药材或中药制剂的整体性和复杂性, 能较全面地反映中药材及制剂所含化学成分的相对关

第一作者: 魏培, 女, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为中药物质基础及质量评价, (电子信箱) 108584969@qq.com。

△通信作者: 孙新堂, 男, 大学本科, 副教授, 研究方向为药物分析与检验, (电子信箱) sdmysxt@163.com。

系,体现中药材和中药制剂的复杂性和相关性^[8],具有稳定性好、专属性强、重复性好等优点^[9],广泛应用于中药材及中药制剂的质量控制及评价^[10-11]。但中药的复杂性使获取的色谱、光谱数据信息存在量大、多维的特点,具有宏观性和模糊性,增加了人工识别的难度,故需借助化学模式识别技术对指纹图谱进行数据信息的挖掘和解析。化学模式识别是一种将数理统计学、计算机信息技术与化学图谱解析整合起来,将海量、多维的原始数据通过数学算法进行压缩、降维和归类分析,找到样品集的内部规律,从而实现中药及中药制剂的分类、快速鉴别和质量控制^[12]。目前,中药分析主要有监督模式识别分析和无监督模式识别分析,有监督模式识别分析常用偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)法、Fisher判别等,无监督模式识别分析常用聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)等。本研究中建立了2个生产厂家的脑安胶囊的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并结合CA和PLS-DA化学模式识别方法,对脑安胶囊的HPLC指纹图谱进行统计学分析,为其质量评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695型高效液相色谱仪(美国沃特世公司);XPR105DR/AC型电子天平(梅特勒-托利多国际有限公司,精度为十万分之一);JP-100S型数控超声波清洗器(深圳市洁盟清洗设备有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

川芎(批号为220513,产地四川彭州市),当归(批号为220907,产地甘肃岷县),红花(批号为220402,产地新疆塔城),人参(批号为221027,产地吉林长白山),均为饮片,购自亳州市滕王药业有限责任公司;藁本内酯对照品(批号为111737-201507,含量以99.3%计),阿魏酸对照品(批号为110773-201614,含量以99.0%计),羟基红花黄色素A对照品(批号为111637-201609,含量以91.9%计),人参皂苷Re对照品(批号为110754-201827,含量以93.4%计),人参皂苷Rg₁对照品(批号为110703-201731,含量以99.7%计),人参皂苷Rb₁对照品(批号为110704-201726,含量以91.1%计),山柰素对照品(批号为110861-201812,含量以93.8%计),均购自中国食品药品检定研究院;川芎嗪对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号为A0188,含量不低于98%);甲醇、乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);磷酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水为娃哈哈纯净水;脑安胶囊(安徽誉隆亚乐药业有限公司,批号分别为20190414,20190529,

20190913,20191107,20191122,20191205,20200311,20200427,20200608,20200630,20200904,20201016,编号为S1-S12;上海祥鹤药业有限公司,批号分别为180714,180721,180904,181013,190714,190921,190929,编号为S13-S19)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~6 min时7%A,6~25 min时7%A→40%A,25~45 min时40%A→60%A,45~60 min时60%A,60~70 min时60%A→90%A,70~75 min时90%A→7%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:316 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取对照品藁本内酯、阿魏酸、川芎嗪、羟基红花黄色素A、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re和山柰素各适量,精密称定,加70%甲醇溶解,制成藁本内酯、阿魏酸、川芎嗪、羟基红花黄色素A、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁、人参皂苷Re和山柰素质量浓度分别为26.31,33.05,17.41,22.96,24.37,28.20,30.19,24.75 μg/mL的混合对照品溶液。

取样品内容物1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇30 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为500 W,频率为40 kHz)40 min,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

分别取川芎、当归、红花、人参4味中药饮片细粉适量,精密称定,按供试品溶液制备方法制备单味对照药材溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取同一批(批号为20190414)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果各色谱峰相对保留时间的RSD低于1.17%(n=6),相对峰面积的RSD低于2.34%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为20190414)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件连续进样测定,记录色谱图。结果各色谱峰相对保留时间的RSD低于0.75%(n=6),相对峰面积的RSD低于2.61%(n=6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为20190414)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,4,8,16,24,48 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果各色谱峰相对保留时间的RSD低于1.03%

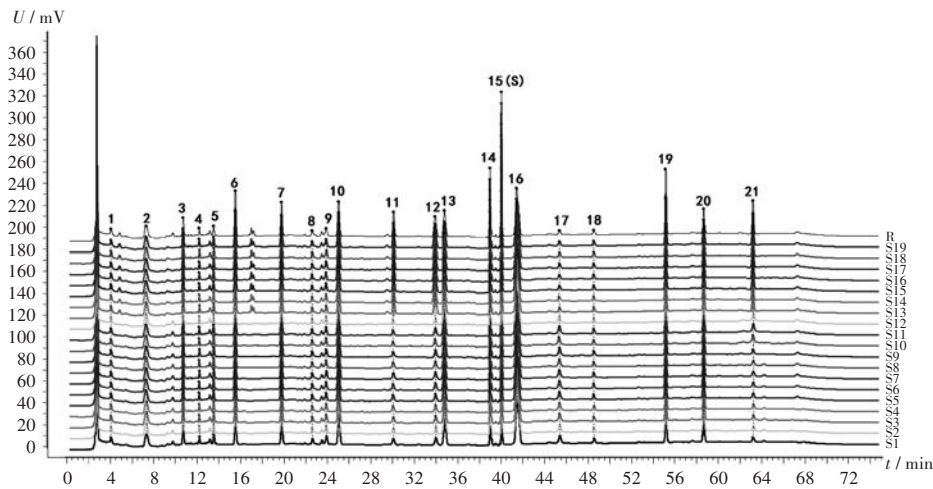


图1 19批脑安胶囊高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig.1 HPLC superimposed fingerprint of 19 batches of Naoan Capsules

($n = 6$), 相对峰面积的 RSD 低于 $3.42\%(n = 6)$, 表明供试品溶液在室温下放置 48 h 内稳定性良好。

2.4 指纹图谱分析

2.4.1 指纹图谱建立

将 19 批(编号为 S1 – S19)样品的 HPLC 图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版软件, 以 S1 号色谱图为参考图谱, 设定时间窗宽度 0.5, 采用中位数法生成 HPLC 指纹图谱和对照指纹图谱(R), 详见图 1。根据指纹图谱匹配结果, 提取的 21 个色谱峰的峰面积之和占总峰面积和的 93% 以上, 故确定这 21 个色谱峰为脑安胶囊指纹图谱的共有峰。

2.4.2 共有峰归属及指认

由图 2 可知, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 19 号峰归属于川芎, 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 19 号峰归属于当归, 1, 2, 3, 7, 8, 11, 12, 13, 21 号峰归属于红花, 1, 3, 7, 16, 17, 18, 20 号峰归属于人参。结合混合对照品溶液 HPLC 图, 比对指认出 8 个特征峰, 分别为 2 号峰羟基红花黄色素 A、4 号峰川芎嗪、7 号峰阿魏酸、15 号峰藁本内酯、16 号峰人参皂苷 R_{g_1} 、18 号峰人参皂苷 Re、

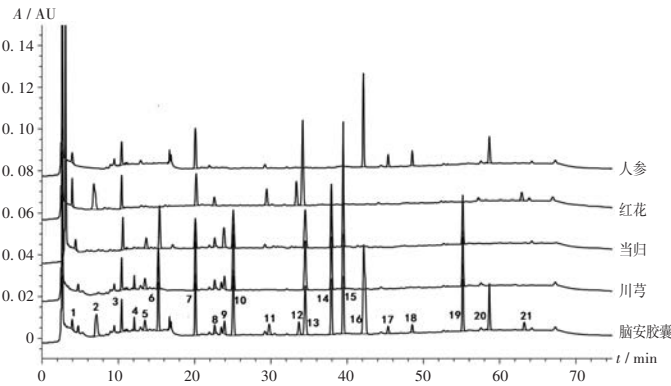
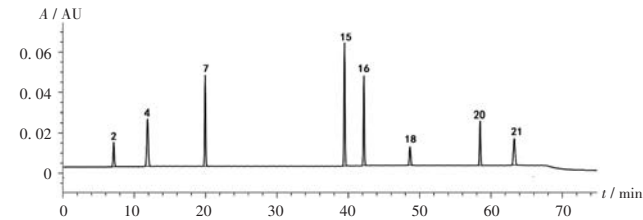


图2 脑安胶囊及各单味对照药材溶液高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of Naoan Capsules solution and reference solution of single herb medicine



2. 羟基红花黄色素 A 4. 川芎嗪 7. 阿魏酸 15. 藁本内酯
16. 人参皂苷 R_{g_1} 18. 人参皂苷 Re 20. 人参皂苷 R_{b_1} 21. 山柰素

图3 混合对照品溶液高效液相色谱图

2. Hydroxysafflor yellow A 4. Tetramethylpyrazine 7. Ferulic acid
15. Ligustilide 16. Ginsenoside R_{g_1} 18. Ginsenoside Re
20. Ginsenoside R_{b_1} 21. Kaempferol

Fig.3 HPLC chromatograms of mixed reference solution

20 号峰人参皂苷 R_{b_1} 、21 号峰山柰素。详见图 3。

2.4.3 相似度评价

由图 1 可知, 15 号峰(藁本内酯)峰面积响应值和保留时间均符合指纹图谱参照峰要求, 与相邻色谱峰分离度符合规定, 故选择藁本内酯色谱峰为参照峰。相似度计算结果见表 1。19 批(编号为 S1 – S19)样品与对照指纹图谱的相似度均不低于 0.911, 说明 2 个生产厂家的脑安胶囊指纹图谱一致性较好。

表1 19批脑安胶囊相似度评价结果

Tab.1 Results of similarity evaluation of 19 batches of Naoan Capsules

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.993	S8	0.991	S15	0.911
S2	0.982	S9	0.986	S16	0.915
S3	0.989	S10	0.963	S17	0.927
S4	0.996	S11	0.989	S18	0.919
S5	0.975	S12	0.994	S19	0.934
S6	0.996	S13	0.921		
S7	0.972	S14	0.937		

表2 19批脑安胶囊高效液相色谱指纹图谱共有峰相对保留时间
Tab.2 Relative retention time of common peaks in HPLC fingerprint of 19 batches of Naoan Capsules

色谱峰 编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	RSD (%)
1	0.099	0.096	0.099	0.098	0.098	0.097	0.100	0.098	0.099	0.099	0.099	0.099	0.098	0.098	0.099	0.099	0.098	0.098	0.099	0.92
2	0.186	0.183	0.187	0.186	0.183	0.182	0.187	0.189	0.187	0.181	0.186	0.185	0.189	0.187	0.189	0.179	0.186	0.182	0.188	1.57
3	0.265	0.265	0.269	0.265	0.263	0.264	0.259	0.257	0.263	0.263	0.266	0.270	0.266	0.268	0.268	0.263	0.264	0.264	0.267	1.20
4	0.306	0.305	0.310	0.314	0.301	0.309	0.312	0.314	0.309	0.313	0.306	0.305	0.302	0.314	0.314	0.305	0.307	0.313	0.303	1.44
5	0.337	0.335	0.343	0.331	0.333	0.330	0.336	0.339	0.333	0.338	0.338	0.325	0.329	0.331	0.335	0.338	0.336	0.338	0.328	1.35
6	0.387	0.385	0.389	0.385	0.384	0.384	0.391	0.387	0.387	0.385	0.387	0.386	0.384	0.386	0.389	0.375	0.384	0.389	0.389	0.87
7	0.490	0.489	0.495	0.489	0.487	0.488	0.494	0.493	0.491	0.483	0.488	0.491	0.490	0.492	0.488	0.491	0.489	0.491	0.491	0.55
8	0.564	0.564	0.569	0.563	0.557	0.561	0.569	0.567	0.567	0.563	0.560	0.564	0.557	0.563	0.558	0.566	0.565	0.566	0.564	0.64
9	0.595	0.590	0.595	0.595	0.590	0.592	0.593	0.597	0.597	0.595	0.595	0.593	0.594	0.596	0.600	0.595	0.596	0.596	0.595	0.40
10	0.626	0.624	0.633	0.630	0.635	0.633	0.635	0.637	0.637	0.635	0.634	0.639	0.631	0.629	0.646	0.634	0.636	0.637	0.629	0.78
11	0.750	0.751	0.762	0.750	0.748	0.757	0.764	0.758	0.754	0.753	0.756	0.753	0.759	0.761	0.756	0.751	0.754	0.754	0.754	0.58
12	0.845	0.843	0.851	0.846	0.829	0.836	0.849	0.849	0.839	0.849	0.848	0.844	0.839	0.844	0.850	0.843	0.845	0.838	0.841	0.66
13	0.867	0.867	0.872	0.863	0.856	0.854	0.864	0.859	0.855	0.865	0.860	0.863	0.859	0.866	0.872	0.865	0.867	0.866	0.867	0.60
14	0.979	0.988	0.994	0.981	0.980	0.986	0.996	0.992	0.992	0.990	0.991	0.990	0.986	0.987	0.995	0.993	0.989	0.993	0.989	0.50
15	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
16	1.040	1.031	1.046	1.042	1.030	1.031	1.048	1.042	1.044	1.041	1.032	1.023	1.033	1.037	1.047	1.035	1.040	1.040	1.039	0.64
17	1.135	1.131	1.152	1.142	1.120	1.131	1.145	1.150	1.130	1.126	1.134	1.140	1.133	1.132	1.142	1.132	1.133	1.133	1.129	0.71
18	1.211	1.221	1.223	1.198	1.180	1.209	1.227	1.207	1.203	1.217	1.220	1.211	1.203	1.214	1.223	1.206	1.226	1.210	1.203	0.95
19	1.379	1.395	1.404	1.383	1.367	1.380	1.407	1.383	1.399	1.380	1.380	1.378	1.368	1.399	1.390	1.386	1.382	1.390	1.384	0.79
20	1.468	1.462	1.461	1.462	1.449	1.457	1.483	1.461	1.468	1.460	1.461	1.457	1.456	1.466	1.478	1.459	1.468	1.458	1.450	0.57
21	1.580	1.570	1.593	1.576	1.579	1.594	1.612	1.584	1.596	1.581	1.589	1.594	1.581	1.589	1.606	1.582	1.591	1.588	1.576	0.66

2.4.4 相对峰面积及相对保留时间计算

设置参照峰藁本内酯的峰面积和保留时间为1,计算相对其他色谱峰的峰面积及相对保留时间,结果见表2和表3。21个共有峰相对保留时间的RSD为0.41%~1.57%(n=19),表明各共有峰的保留时间较稳定;相对峰面积的RSD为6.60%~40.70%(n=19),表明各批次间共有峰峰面积差异较大,且12号峰和17号峰差异最大。

2.5 化学模式分析

2.5.1 数据标准化处理

以共有峰峰面积为变量,导入SPSS 22.0统计学软件分析,选择描述统计项下的描述对原始变量进行标准化处理,得到19×21新的标准化变量矩阵。

2.5.2 CA

将标准化变量矩阵导入SPSS 22.0统计学软件进行CA,结果19批脑安胶囊依生产厂家的不同聚为两类,即S1-S12归为一类,S13-S19归为一类。详见图4。

2.5.3 PLS-DA模型建立及分析

将标准化变量矩阵导入Simca-P 14.1版软件,建

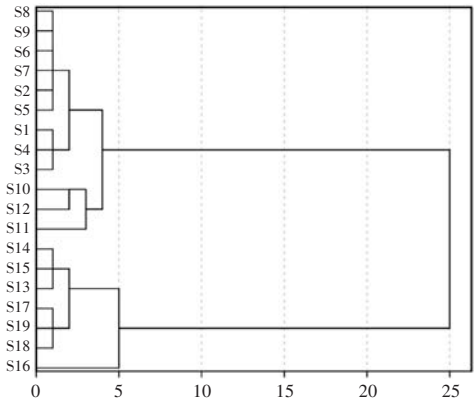


图4 19批脑安胶囊聚类分析
Fig.4 CA of 19 batches of Naoan Capsules

立PLS-DA模型。共提取2个主成分,PLS-DA模型的3个关键参数解释率(R^2)X为0.938>0.5, R^2 Y为1.000>0.5,预测力(Q^2)为0.996>0.5,且 R^2 X和 R^2 Y与 Q^2 的差距均小于0.2,表明所建模型的解释能力和预测能力均较强,可有效监督、分析19批脑安胶囊的指纹图谱信息。设置分类Y矩阵变量随机排列20次做置换检验, R^2 和 Q^2 回归线的斜率均大于1,表明所建模型可靠,不存在过度拟合现象。经PLS-DA模型拟合分析生

表3 19批脑安胶囊高效液相色谱指纹图谱相对峰面积
Tab. 3 Relative peak area of HPLC fingerprint of 19 batches of Naoan Capsules

色谱峰 编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	RSD (%)
1	0.135	0.134	0.135	0.140	0.133	0.133	0.134	0.137	0.134	0.099	0.136	0.136	0.097	0.096	0.096	0.100	0.100	0.100	0.100	15.62
2	0.240	0.237	0.243	0.244	0.242	0.237	0.244	0.241	0.237	0.175	0.239	0.250	0.237	0.232	0.224	0.237	0.238	0.237	0.236	6.60
3	0.214	0.221	0.195	0.209	0.240	0.237	0.232	0.241	0.238	0.151	0.208	0.207	0.283	0.286	0.288	0.293	0.289	0.297	0.293	17.79
4	0.152	0.139	0.153	0.154	0.144	0.138	0.143	0.141	0.137	0.114	0.155	0.156	0.265	0.265	0.265	0.256	0.257	0.257	0.255	31.27
5	0.158	0.157	0.158	0.162	0.153	0.153	0.155	0.154	0.152	0.114	0.158	0.159	0.114	0.115	0.113	0.116	0.116	0.114	0.115	15.33
6	0.509	0.507	0.504	0.521	0.512	0.510	0.487	0.509	0.495	0.379	0.521	0.526	0.368	0.377	0.369	0.373	0.372	0.372	0.374	15.41
7	0.291	0.286	0.283	0.283	0.279	0.296	0.305	0.283	0.294	0.222	0.288	0.282	0.456	0.459	0.448	0.458	0.458	0.454	0.460	25.24
8	0.173	0.170	0.173	0.180	0.173	0.167	0.168	0.171	0.168	0.130	0.172	0.175	0.087	0.086	0.087	0.088	0.089	0.088	0.087	29.81
9	0.162	0.160	0.158	0.167	0.155	0.155	0.156	0.156	0.153	0.124	0.163	0.172	0.094	0.096	0.097	0.099	0.099	0.099	0.099	22.78
10	0.371	0.376	0.386	0.385	0.370	0.361	0.364	0.363	0.358	0.279	0.379	0.384	0.434	0.444	0.442	0.446	0.449	0.450	0.445	11.54
11	0.179	0.177	0.183	0.186	0.174	0.174	0.175	0.175	0.171	0.133	0.181	0.183	0.143	0.130	0.135	0.129	0.143	0.143	0.143	13.22
12	0.387	0.379	0.387	0.395	0.376	0.373	0.377	0.377	0.368	0.273	0.373	0.374	0.156	0.157	0.156	0.165	0.163	0.165	0.164	36.36
13	0.345	0.344	0.341	0.352	0.324	0.323	0.324	0.343	0.320	0.243	0.354	0.353	0.230	0.237	0.227	0.235	0.236	0.242	0.230	18.15
14	0.585	0.585	0.602	0.605	0.583	0.620	0.623	0.607	0.595	0.452	0.588	0.599	0.420	0.422	0.424	0.434	0.449	0.448	0.431	15.91
15	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
16	1.220	1.195	1.211	1.253	1.140	1.136	1.317	1.146	1.114	0.873	1.197	1.199	0.816	0.820	0.814	0.836	0.832	0.832	0.828	18.17
17	0.164	0.162	0.166	0.168	0.159	0.158	0.161	0.161	0.156	0.121	0.168	0.168	0.062	0.061	0.060	0.060	0.059	0.061	0.060	40.70
18	0.174	0.171	0.171	0.177	0.167	0.167	0.168	0.167	0.164	0.129	0.176	0.175	0.071	0.071	0.070	0.084	0.084	0.084	0.084	33.73
19	0.587	0.585	0.584	0.606	0.574	0.572	0.577	0.576	0.571	0.434	0.594	0.598	0.782	0.777	0.782	0.791	0.785	0.786	0.781	17.04
20	0.480	0.473	0.479	0.493	0.480	0.471	0.471	0.469	0.458	0.354	0.504	0.485	0.362	0.357	0.353	0.364	0.358	0.370	0.356	14.31
21	0.168	0.164	0.166	0.172	0.163	0.163	0.164	0.163	0.161	0.127	0.175	0.168	0.138	0.138	0.125	0.116	0.120	0.120	0.115	13.72

成散点得分图和变量投影重要性(VIP)图,详见图5和图6。

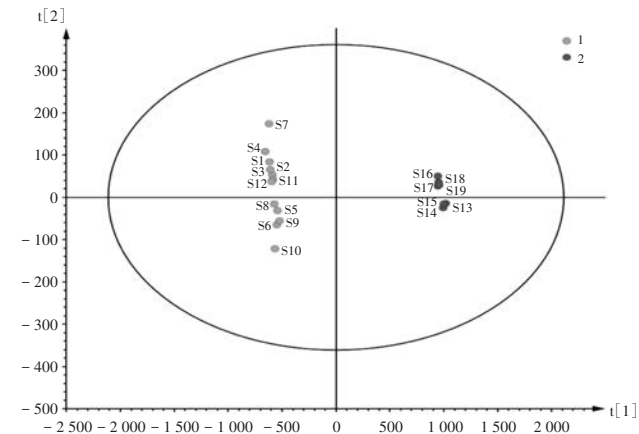


图5 PLS-DA模型散点得分图
Fig. 5 Scoring plot of PLS-DA

由图5可知,19批脑安胶囊均匀分布在95%置信区间内,S1-S12聚为一类,S13-S15聚为一类,聚类良好,区分明显,说明2个生产厂家的脑安胶囊指纹图谱存在明显差异。 $VIP > 1$ 的成分对分类有显著影响,即为差异标志物。由图6可知,脑安胶囊的差异标志物按权重大小依次为19号峰、7号峰(阿魏酸)、15号峰(藁本

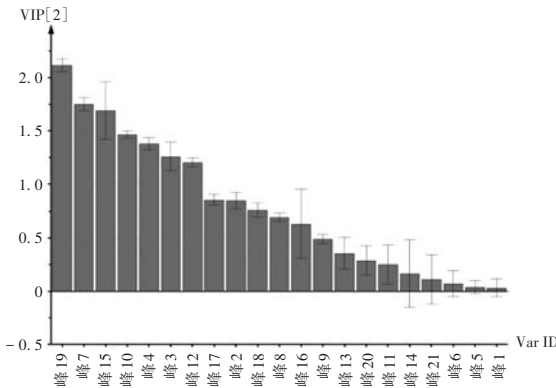


图6 PLS-DA模型的VIP图
Fig. 6 VIP plot of PLS-DA

内酯)、10号峰、4号峰(川芎嗪)、3号峰、12号峰,表明这7个化合物对脑安胶囊指纹图谱的差异影响较大,生产时应高度重视这7个化合物,同时有必要进一步借助质谱分析等手段鉴定19号峰、10号峰、3号峰和12号峰。

3 讨论

3.1 指标成分选择

方中,川芎为君药,标志性成分为阿魏酸,同时含有酰胺类生物碱川芎嗪、苯酐类化合物藁本内酯等。研究发现,川芎嗪是一种新型钙离子拮抗剂,具有抑制自

由基产生、清除自由基^[13],抑制脑缺血再灌注(I/R)损伤^[14],改善微循环、抗血小板凝集、抗炎、抗腹膜间皮细胞损伤和防治腹膜纤维化^[15],影响肿瘤细胞增殖与凋亡、侵袭与转移^[16-17]等作用;藁本内酯为苯酞类化合物的主要活性物质,具有抗动脉粥样硬化、保护神经、抗癌、抑制心肌肥大、抗炎、镇痛等药理活性^[18],阿魏酸和藁本内酯是当归的主要活性成分;羟基红花黄色素A和山柰素是《中国药典(一部)》红花的定性指标;人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re、人参皂苷Rb₁是《中国药典(一部)》人参的定性指标,故确定本研究中的定性指标分别为阿魏酸、川芎嗪、藁本内酯、羟基红花黄色素A、山柰素、人参皂苷R_{g1}、人参皂苷Re和人参皂苷Rb₁ 8个化合物。

3.2 色谱条件选择

本研究中采用二极管阵列检测器(DAD)于200~400 nm波长范围内进行全波段扫描,发现HPLC图于316 nm波长处基线平稳,色谱峰信息丰富,峰面积响应值适中,与相邻色谱峰分离度较好,故确定检测波长为316 nm。同时,考察由甲醇、乙腈水溶液、磷酸水溶液、醋酸水溶液组成的11种不同流动相梯度洗脱体系对HPLC图的影响,结果以乙腈-0.1%磷酸水为流动相进行梯度洗脱时,色谱峰信息更全面,峰形较好,基线平稳,故确定以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相。

3.3 供试品提取方法选择

本研究中考察了加热回流、浸提和超声提取3种提取方法、不同体积比甲醇水溶液、不同超声提取时间对脑安胶囊HPLC指纹图谱的影响,综合指标成分提取率、指纹图谱色谱峰信息等,最终选择2.2项下处理方法。

3.4 结果分析

由相似度结果可知,脑安胶囊化学成分一致性较好。共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.40%~1.57%和6.60%~40.70%,表明方法稳定性良好,但不同批次脑安胶囊中部分化合物含量差异较大。CA和PLS-DA将19批脑安胶囊依生产厂家的不同聚为两类,同时PLS-DA筛选出影响分组的7个差异标志物,分别为19号峰、3号峰、10号峰、12号峰、阿魏酸、川芎嗪、藁本内酯。建议评价脑安胶囊稳定性时应着重关注这7个化合物的含量。

3.5 方法评价

本研究中首次采用指纹图谱结合化学模式识别技

术,较系统、整体、全面地分析及评价了中药复杂指纹图谱,可快速筛选脑安胶囊质量控制过程中需重点关注的指标成分。该方法科学、快速、有效,可较全面地反映脑安胶囊所含化学成分,结合相似度评价及CA和PLS-DA化学模式识别技术,补充了脑安胶囊现有质量评价方法的不足,为脑安胶囊HPLC指纹图谱的分析提供了有效手段,为完善脑安胶囊的药品标准提供了试验依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科学出版社, 2020: 1493.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科学出版社, 2015: 824-825.
- [3] 薛金志, 马新风. 脑安胶囊对外感风寒型偏头痛的疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(85): 172-173.
- [4] 王维, 田玉梅, 胡秀娟. 脑安颗粒治疗缺血性中风气虚血瘀证的效果观察[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(12): 46-47.
- [5] 赵立娟. 脑安胶囊治疗高血压脑血管功能异常临床观察[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(1): 45-46.
- [6] 张炳南, 曹茜. 脑安片治疗脑梗死合并胃溃疡临床观察[J]. 海峡药学, 2019, 31(12): 186-187.
- [7] 祝明, 陈碧莲, 石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典2015年版一部中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614.
- [8] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [9] 周思敏, 刘斌. 中药指纹图谱相似度软件在“药物分析”教学中的应用[J]. 林区教学, 2020(1): 23-26.
- [10] 王计瑞, 谭均, 李隆云, 等. 独活的HPLC指纹图谱及4个香豆素类成分的测定[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 955-963.
- [11] 唐佩琴. 双黄连片高效液相色谱指纹图谱的建立及聚类分析和主成分分析[J]. 中国药业, 2020, 29(9): 102-105.
- [12] 顾志荣, 师富贵, 金岩. 化学模式识别在中药分析中的应用研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2014, 31(3): 108-111.
- [13] 马晓麒, 冯伟科, 辛丹, 等. 川芎嗪对心脑血管疾病的作用机制研究进展[J]. 山东中医杂志, 2020, 39(5): 530-533.
- [14] 蒲忠慧, 代敏, 彭成, 等. 川芎生物碱的物质基础及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2020, 31(8): 1020-1024.
- [15] 张康, 张琪, 周军. 川芎嗪在普通外科应用的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(10): 1132-1136.
- [16] 李华, 卞尧尧, 杨丽丽, 等. 川芎嗪抗消化系统肿瘤机制的研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 424-427.
- [17] 韩炜. 川芎的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2017, 19(9): 1341-1349.
- [18] 陈振鹤, 吴国泰, 孙敏, 等. 当归中藁本内酯研究概况[J]. 甘肃中医药大学学报, 2018, 35(2): 102-105.

(收稿日期: 2022-04-02; 修回日期: 2022-09-29)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办

术对脑安胶囊不同生产厂家、不同生产批次的质量进行深入