

本文引用:粟倩,唐洁,张鹏,廖颖妍,谢菁琛,龚云,林丽美. 妇科千金胶囊与妇科千金片指纹图谱的建立及其比较分析[J].湖南中医药大学学报,2021,41(8):1197-1203.

妇科千金胶囊与妇科千金片指纹图谱的建立及其比较分析

粟倩^{1,2},唐洁^{1,2},张鹏^{2,3},廖颖妍^{1,2},谢菁琛^{1,2},龚云^{2,3*},林丽美^{1,2*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湘产大宗药材品质评价湖南省重点实验室,湖南长沙410208;

3.株洲千金药业股份有限公司,湖南株洲412007)

〔摘要〕目的 建立妇科千金胶囊与妇科千金片的指纹图谱,为两者鉴别与质量评价提供实验依据。方法 采用高效液相色谱法对40批妇科千金胶囊与40批妇科千金片进行测定,结合聚类分析、模式识别分析、相似度评价等对其进行比较。结果 首次建立了妇科千金胶囊与妇科千金片的指纹图谱,共确定了23个共有峰,指出了穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯两个成分。聚类分析以及模式识别分析均可以明显地将其分为两类,并确定了穿心莲内酯为千金胶囊与妇科千金片的差异性成分。结论 该方法重复性好、准确率高,结合各类分析方法可以明确地区分妇科千金胶囊与妇科千金片,可用于对妇科千金胶囊与妇科千金片进行质量控制与评价。

〔关键词〕 妇科千金胶囊;妇科千金片;指纹图谱;聚类分析;模式判别

〔中图分类号〕R284.1

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.08.010

Establishment and Comparative Analysis of Fingerprint Chromatogram of Fuke Qianjin Capsule and Tablet

SU Qian^{1,2}, TANG Jie^{1,2}, ZHANG Peng^{2,3}, LIAO Yingyan^{1,2}, XIE Jingchen^{1,2}, GONG Yun^{2,3*}, LIN Limei^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory for Quality Evaluation of Bulk Herbs of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd, Zhuzhou, Hunan 412007, China)

〔Abstract〕 Objective To establish the fingerprints of Fuke Qianjin Capsule and Fuke Qianjin Tablet, so as to provide experimental evidence for their identification and quality evaluation. **Methods** High performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint of 40 batches Fuke Qianjin Capsule and 40 batches Fuke Qianjin Tablet and the quality assessment was achieved by cluster analysis, pattern recognition analysis and similarity evaluation. **Results** It was the first time to establish the HPLC characteristic fingerprints of Fuke Qianjin Capsule and Fuke Qianjin Tablet. There were 23 common peaks in the fingerprints. Two components were identified as andrographolide and dehydrated andrographolide by comparing with reference standards. 80 batches of different capsules and tablets were obviously divided into two groups by cluster analysis and pattern recognition analysis and the results of classification were consistent, and andrographolide were determined as the main different chemical components of Fuke Qianjin Capsule and Fuke Qianjin Tablet. **Conclusion** This method can distinguish the Fuke Qianjin Capsule and Fuke Qianjin Tablet combined with various analysis methods with good repeatability and high accuracy. It can be used to control and evaluate the quality of Fuke Qianjin Capsule and Fuke Qianjin Tablet.

〔Keywords〕 Fuke Qianjin Capsule; Fuke Qianjin Tablet; fingerprint; cluster analysis; mode identification

〔收稿日期〕2021-04-12

〔基金项目〕国家中药标准化项目(ZYBZH-C-HUN-21);湖南省重大科技专项(2015SK1001)。

〔作者简介〕粟倩,女,硕士,研究方向:药物分析。

〔通信作者〕*林丽美,女,博士,教授,E-mail:lizasmile@163.com;龚云,男,高级工程师,E-mail:gongyun2002@126.com。

妇科千金胶囊/片是妇科常用中成药,由千金拔、金樱根、功劳木、穿心莲、当归、单面针、鸡血藤以及党参 8 味中药材组成,是最早一批收载入国家基本药物管理的中成药^[1]。妇科千金片于 1979 研制成功,妇科千金胶囊在 2002 年获新药证书,妇科千金片的研制成功为后来妇科千金胶囊的发展奠定了基础,起到了关键性的作用。该方具有清热除湿、活血解毒、益气补血等功效,临床常用于治疗湿热瘀滞之带下、腹痛、慢性盆腔炎、慢性前列腺炎、子宫内膜炎、慢性宫颈炎等^[2-3]。目前,多数研究^[4-6]着重于妇科千金片/胶囊药效验证,两者的指纹图谱比较鲜有学者研究。妇科千金片/胶囊虽由相同药材组成,但两者制备工艺迥异,二者在成分方面的异同尚未可知。因此,本文在建立两者指纹图谱的基础上并进行比较,寻找其共同点和差异性,为二者建立既具有一致性又兼顾差异性的质量控制标准提供参考。

模式识别是一个综合、交叉的科学领域,广泛运用于多个学科的分析工作,在中药指纹图谱数据分析中十分常见。模式识别通过对识别对象的原始数据进行提取,优选出能够反映对象某一方面的特征参数,根据相似度评价将具有相似性的数据归为一类^[7]。目前,最常用的方法是主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA),具有准确、简便、除繁为简等优点。因此,本文采用 PCA 与 OPLS-DA 结合聚类分析等计量学手段对妇科千金片/胶囊指纹图谱数据进行对比分析,寻求差异,以期为两者的质量标准及鉴别提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 主要仪器

Waters2695 高效液相色谱系统(包括 Empower 工作站、四元梯度泵、紫外检测器,美国 Waters 公司);QUINTIX224-1cm 分析电子天平(奥多利斯科学仪器公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Microfuge20R 高速离心机(德国 eppendorf 公司);Direct-Q 5 UV 超纯水机(苏州赛恩斯仪器公司);Epic C₁₈(250 mm×4.6 mm 5 μm)色谱柱(北京东方银锐科技有限公司);0.22 μm 微孔滤膜(上海兴亚净化股份有限公司)。

1.2 主要试剂

80 批样品均由株洲妇科千金药业提供,具体见

表 1(S1~S40 为妇科千金胶囊,S41~S80 为妇科千金片);穿心莲内酯(YJ-110797,中国食品药品检定研究院);脱水穿心莲内酯(YJ-110854,中国食品药品检定研究院);甲醇(德国 Merck 公司色谱纯);乙腈(美国 Fisher 公司色谱纯);甲酸(天津化工研究所分析纯);水为超纯水。

表 1 样品信息

序号	批次	序号	批次
S1	20170116	S41	201706026
S2	20170817	S42	201704007
S3	20170213	S43	201711034
S4	20171001	S44	201710008
S5	20171031	S45	201703030
S6	20170601	S46	201704016
S7	20171110	S47	201706010
S8	20170902	S48	201704002
S9	20171038	S49	201706018
S10	20170711	S50	201711010
S11	20171011	S51	201703048
S12	20170727	S52	201703002
S13	20171102	S53	201702042
S14	20170616	S54	201702032
S15	20170203	S55	201706002
S16	20171220	S56	201701021
S17	20170329	S57	201702002
S18	20170209	S58	201703038
S19	20170801	S59	201706032
S20	20170321	S60	201702018
S21	20171219	S61	201702010
S22	20170810	S62	201609042
S23	20170703	S63	201701031
S24	20171141	S64	201712026
S25	20170106	S65	201801015
S26	20171211	S66	201801008
S27	20170943	S67	201710026
S28	20170304	S68	201801027
S29	20170932	S69	201712034
S30	20170425	S70	201801041
S31	20170539	S71	201712017
S32	20180102	S72	201801021
S33	20170922	S73	201711023
S34	20170503	S74	201712010
S35	20171133	S75	201710036
S36	20170609	S76	201710018
S37	20170912	S77	201801033
S38	20170314	S78	201712003
S39	20171121	S79	201801003
S40	20170719	S80	201711003

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Epic C₁₈ 色谱柱(250 mm×406 mm, 5 μm); 流动相 0.1%甲酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~10 min, 5% B; 10~50 min, 5%~30% B; 50~70 min, 30%~90% B; 70~80 min, 90% B); 柱温 30 ℃; 进样体积 10 μL; 流速 1 mL/min。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯, 加甲醇溶解制成质量浓度分别为 0.408、0.163 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液制备

精密称定妇科千金胶囊及妇科千金片 0.5 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 60 min, 取出冷却至室温, 用 70% 甲醇补足失重。离心取上层清液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得^[2,8]。

2.4 条件优化

2.4.1 最佳波长的确定 通过对 254、268、280、316、

320、326、360 nm 波长进行筛选, 发现在 254 nm 波长下, 色谱峰数量最多, 峰面积较大, 峰分离效果较好。具体见图 1。因此, 实验选择在这个波长下对药材的指纹图谱进行分析。

2.4.2 提取溶剂的优化 通过对比不同浓度甲醇(50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇溶液) 提取对指纹图谱的影响, 结果如图 2, 可以看出在不同浓度下的指纹图谱相似度很高, 并没有较大的区别, 通过对每个峰的峰型以及峰高、分离度方面考虑, 其中又以甲醇浓度 70% 效果最好, 因此, 本实验考虑提取溶剂为 70% 甲醇。

2.4.3 提取时间的优化 不同提取时间(20、30、40、50、60 min) 对药材的指纹图谱的影响没有明显的差别, 在 30~60 min 间图谱各个峰面积相差较小, 说明超声提取 30 min 时药材中的有效成分已基本提取完全。因此, 为了提高实验效率, 考虑将提取时间 30 min 作为后续实验条件。见图 3。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度实验 取同一份样本 S1, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 结果显示各色谱峰的峰面积与保留时间

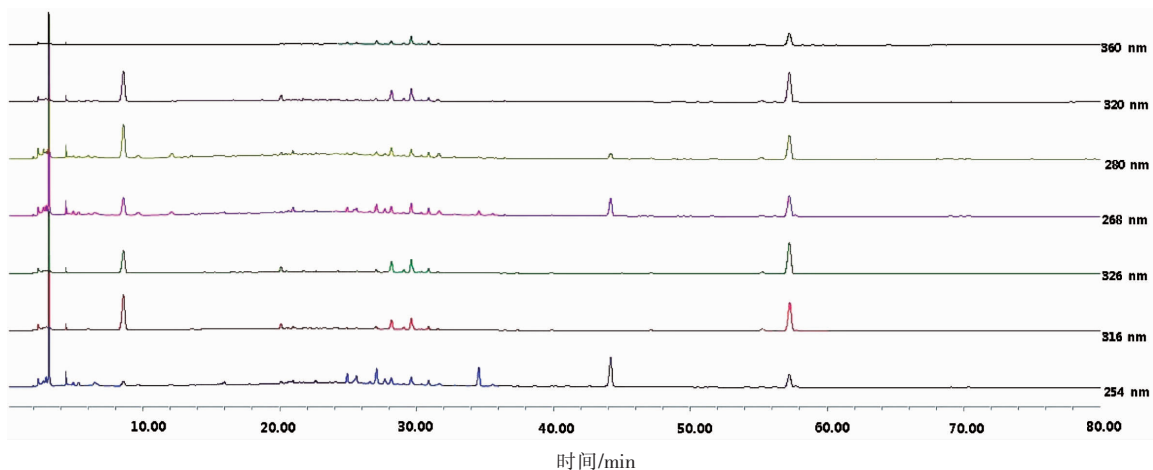


图 1 不同波长 HPLC 色谱图

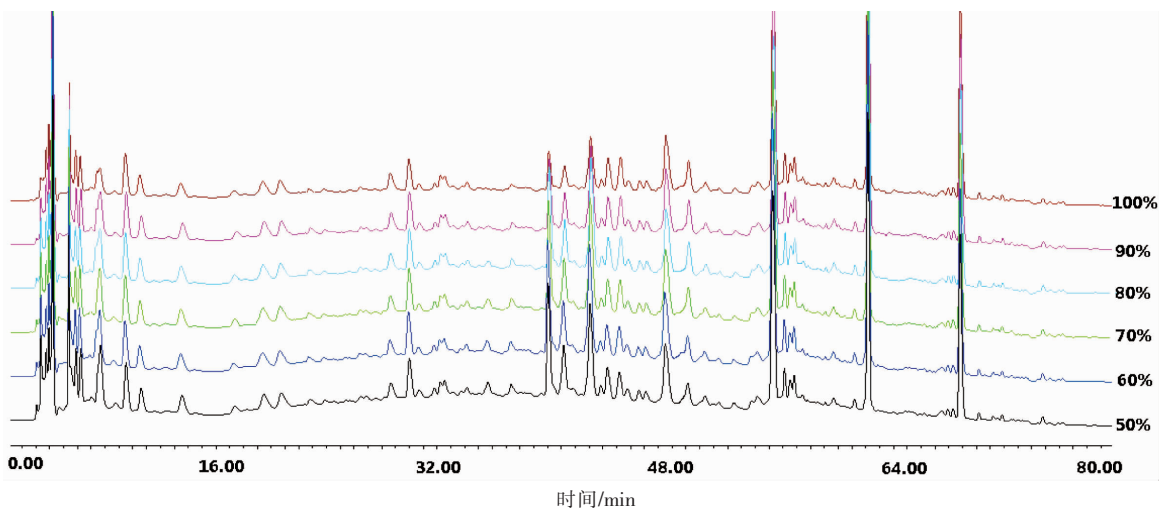


图 2 不同提取溶剂 HPLC 色谱图

RSD<3%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性实验 取同一份样本 S1,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项条件下测定,测得各对照品共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均<3%,表明该方法重复性良好。

2.5.3 稳定性实验 取同一份样本 S1,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,“2.1”项条件下,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样分析,计算各色谱峰峰面积与保留时间的 RSD 值,结果显示 RSD<3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 指纹图谱建立

80 批样本按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样,将 80 批样本色谱图数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行分析,确定共有峰、计算指纹图谱相似度以及生成对照指纹图谱。采用 SIMCA-P 13.0 软件与 SPSS 22.0

软件进行聚类、主成分等分析。共确定了 23 个共有峰,得到妇科千金胶囊与妇科千金片叠加图如图 4,对照指纹图谱和混合对照品色谱图对比如图 5,通过对照品比对得知 19、22 号峰分别为穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯。

2.7 相似度评价

将 80 批成品(S1~S40 批为妇科千金胶囊,S41~S80 批为妇科千金片)数据进行分析,计算所有批次成品的相似度,结果如表 2 所示,除了 S20 样品相似度为 0.896 以外,其余 79 批药材指纹图谱相似度均大于 0.9。表明妇科千金胶囊与妇科千金片指纹图谱总体上相似,其产生的差异部分可能与不同制备方式、药材的不同产地等有关。

2.8 聚类分析

聚类分析是对具有一定相似性的数据进行分析分类的统计分析技术。将一组研究对象分为不同的

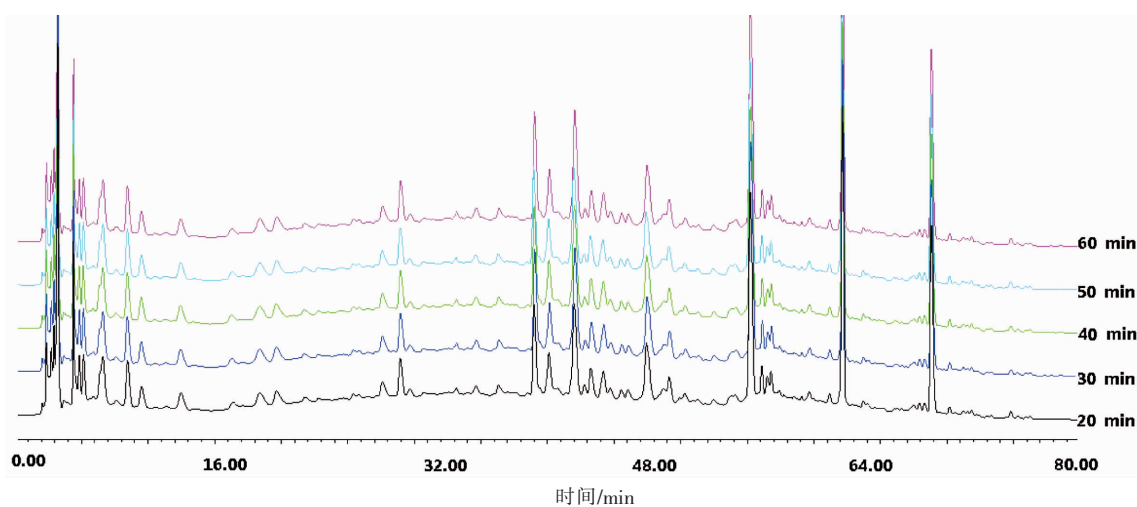


图 3 不同提取时间 HPLC 色谱图

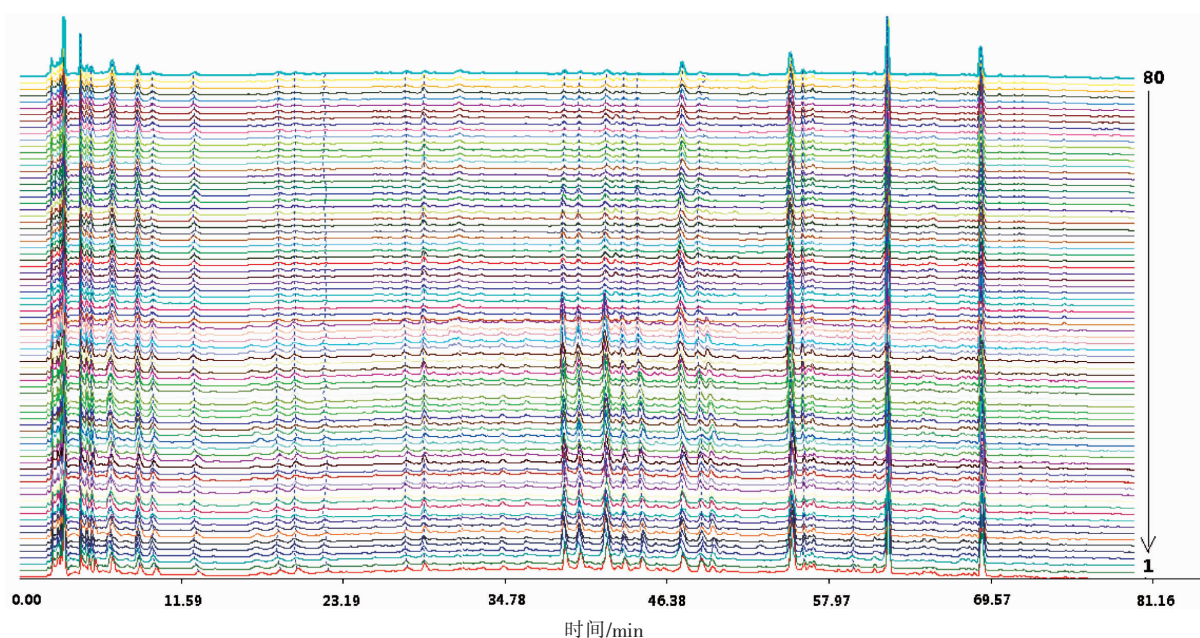
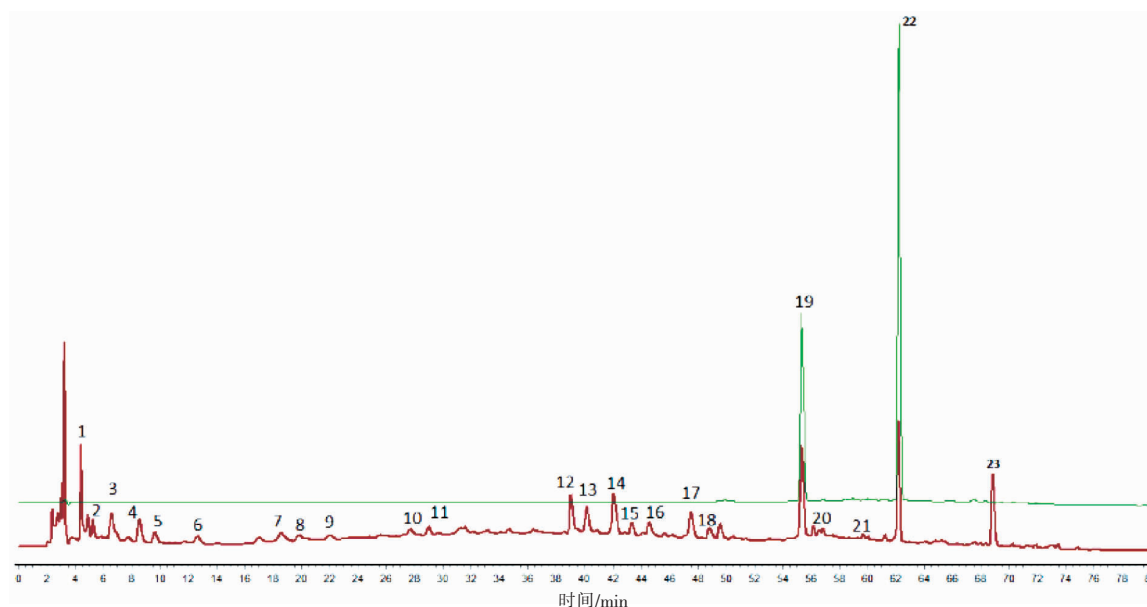


图 4 80 批样品 HPLC 指纹图谱



注:19.穿心莲内酯;22.脱水穿心莲内酯

图5 样品与对照品 HPLC 对照色谱图

表2 80批样品相似度结果

序号	相似度	序号	相似度	序号	相似度	序号	相似度
S1	0.987	S21	0.982	S41	0.953	S61	0.980
S2	0.962	S22	0.949	S42	0.962	S62	0.938
S3	0.994	S23	0.983	S43	0.977	S63	0.976
S4	0.963	S24	0.989	S44	0.984	S64	0.976
S5	0.986	S25	0.992	S45	0.955	S65	0.967
S6	0.991	S26	0.990	S46	0.968	S66	0.960
S7	0.957	S27	0.957	S47	0.968	S67	0.977
S8	0.941	S28	0.931	S48	0.955	S68	0.967
S9	0.968	S29	0.947	S49	0.946	S69	0.969
S10	0.934	S30	0.934	S50	0.956	S70	0.963
S11	0.975	S31	0.992	S51	0.956	S71	0.971
S12	0.938	S32	0.966	S52	0.979	S72	0.970
S13	0.980	S33	0.969	S53	0.991	S73	0.947
S14	0.970	S34	0.913	S54	0.986	S74	0.968
S15	0.990	S35	0.992	S55	0.970	S75	0.971
S16	0.987	S36	0.976	S56	0.940	S76	0.980
S17	0.957	S37	0.962	S57	0.954	S77	0.953
S18	0.985	S38	0.943	S58	0.950	S78	0.973
S19	0.926	S39	0.988	S59	0.947	S79	0.963
S20	0.896	S40	0.920	S60	0.987	S80	0.979

类,同类间的数据具有较大的相似性,不同类之间具有明显的差异^[9]。以妇科千金胶囊与妇科千金片共有峰峰面积为变量,采用 SPSS 22.0 统计软件进行聚类分析,当欧式距离平方和为 20 时,80 批数据可以分为两类,一类为妇科千金胶囊,另一类为妇科千金片,能够有效区分两种不同的剂型。结果见图 6。

2.9 PCA

PCA 是对众多变量数据进行处理,删除重复的变量,优选出尽可能少的能反映原来指标信息的变量的一种多元统计分析方法。这些变量之间具有明显差异,通过这些变量分析找到各样本之间的相似与疏远关系^[10]。为综合评价妇科千金胶囊与妇科千金片的差异,将 80 批样品共有峰数据导入 SIMCA

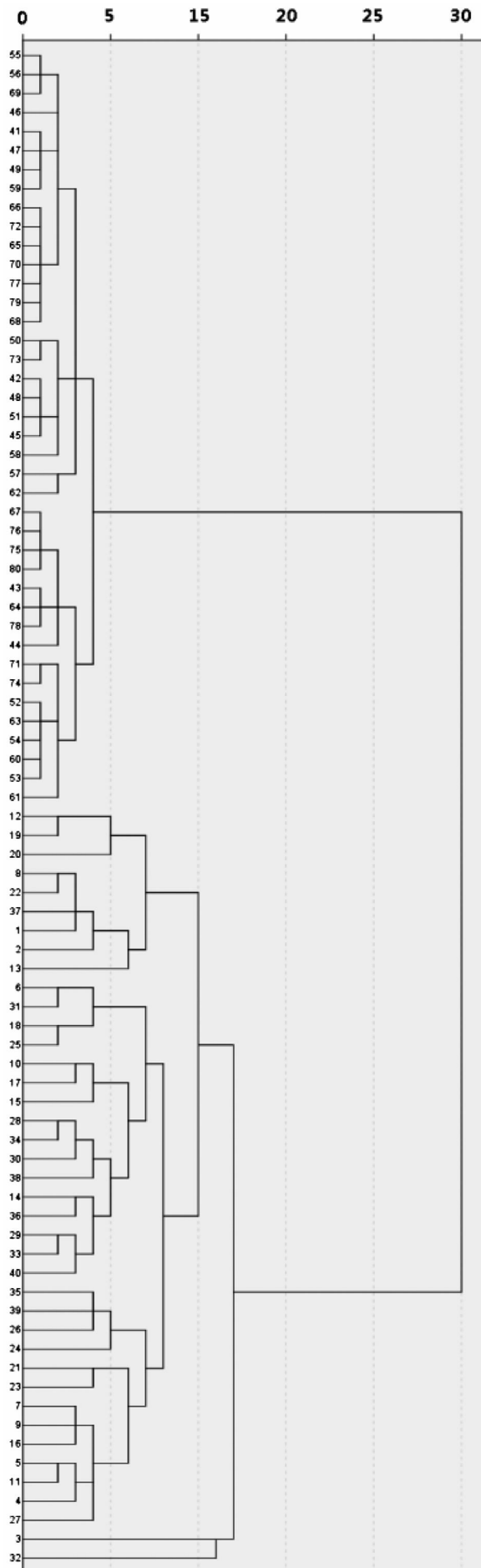


图 6 80 批样品聚类树状图

13.0 软件进行 PCA, 结果见图 7, 可以看出妇科千金胶囊(S1~S40)与妇科千金片(S41~S80)之间具有明显的界限, 能够进一步进行两种不同剂型的区分。

2.10 OPLS-DA

OPLS-DA 是一种用于判别分析的多变量统计分析方法, 通过分解 X、Y 矩阵提取主成分, 建立样本变量与分类变量之间的回归模型, 从而来判断研究对象的分类^[11-12]。为了考察两者间的相似性与差异性, 对共有峰数据进一步分析, 由模型验证的参数图可知, $R_2Y=0.96, Q_2Y=0.954$, 说明该模型区别及预测程度良好, 从 OPLS-DA 得分图(图 8)同样可以看出两者具有明显的区分。

2.11 差异标记物的筛选以及鉴定

根据 OPLS-DA 模型的 VIP 值来筛选导致差异性的主要成分, 提取模型中 23 个变量的 VIP 值, 一般认为 $VIP>1$ 的变量对分类起着关键作用。如图 9 所示: 14 号峰、5 号峰、15 号峰、8 号峰、1 号峰、12 号峰、9 号峰、7 号峰、13 号峰、4 号峰、23 号峰、16 号峰、10 号峰、2 号峰、19 号峰共 15 个峰的 VIP 均大于 1。说明这些成分是引起妇科千金胶囊与妇科千金片成分差异的主要标志性成分, 其中 19 号峰为穿心莲内酯。

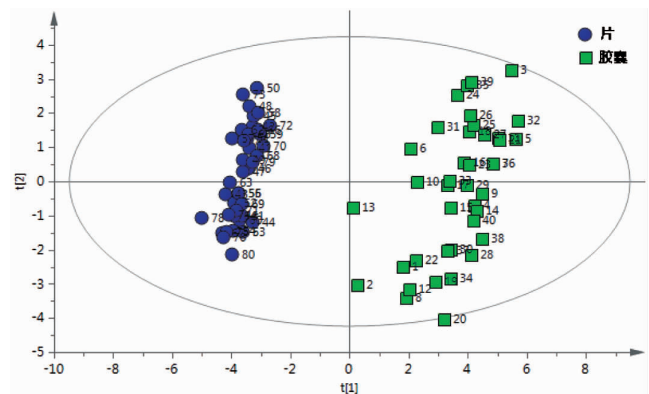


图 7 PCA 得分图

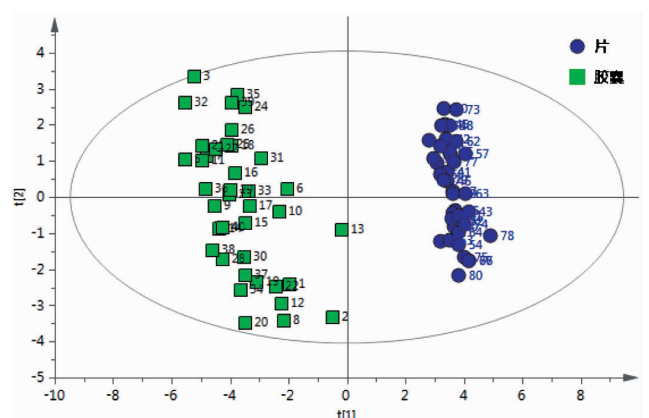


图 8 OPLS-DA 得分图

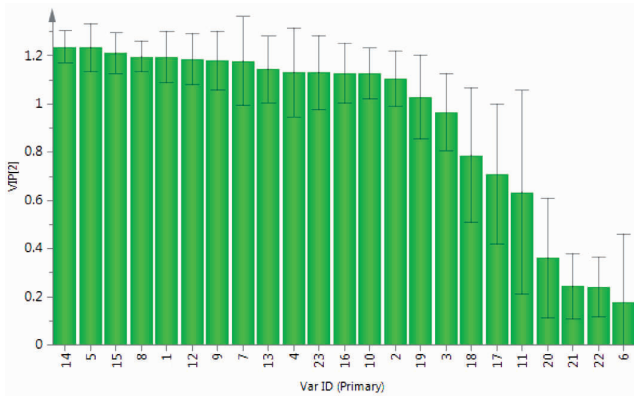


图9 差异性标志物的VIP

3 讨论

本实验对检测波长 210、254、268、280、320、360 nm,提取浓度 50%、60%、70%、80%、90%、100% 甲醇以及超声提取时间 30、40、50、60 min 进行了优选。最终确定采用色谱柱为 Epic C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸,检测波长为 254 nm,70%甲醇提取,超声提取 30 min,得到的 HPLC 特征指纹图谱色谱峰较多,峰型美观,基线较平稳,分离效果较好,此方法简单易行、稳定可靠、重复性好。

本文对 40 批妇科千金胶囊与 40 批妇科千金片建立了特征指纹图谱。经过软件比对确定了 23 个共有峰。通过标准品指认得到其中 2 个峰对应的化合物分别为穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯,同时两者也是《中华人民共和国药典》中妇科千金片及妇科千金胶囊的质控指标,而其中穿心莲内酯为妇科千金片和妇科千金胶囊的差异性成分。片剂与胶囊大体上相似度较高,但各个峰的峰面积差异较大,胶囊组各个峰响应值均明显大于片剂组。聚类分析以及模式识别分析结果均显示两者具有明显的区分,推断两者差异可能是由于妇科千金胶囊采取醇提加水提的制备方式,而片剂采用水提加药材粉末的制备方式,造成了胶囊组各成分含量均高于片剂组。这也说明不同剂型中成药不仅在服用简便程度上有区别,药效物质基础也会有所差异。

本文首次建立了妇科千金胶囊与妇科千金片的比较指纹图谱,并结合模式识别对妇科千金胶囊与妇科千金片进行评价。与前期报道的妇科千金片的指纹图谱^[13]相比,本文将株洲千金药业股份有限公司的另一市场占有剂型妇科千金胶囊也作为研

究对象,在相同条件下同时建立处方一致的妇科千金胶囊与妇科千金片指纹图谱,通过相似性评价和模式识别等比较二者的相似性和差异性,不仅为该品种的质量控制提供参考,增加市场对于药品的选择依据,也为后期市场需求推出其他剂型提供理论基础。

参考文献

- [1] 江雪欣,梁伟娜.HPLC 法同时测定妇科千金片中 6 种活性成分[J]. 中国药师,2016,19(11):2174-2176.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 师振予,郭建生,袁建菱,等.妇科千金片对急性盆腔炎模型大鼠外周血细胞及盆腔组织病理改变的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):199-202.
- [4] 王莉,徐锐,张少华,等.妇科千金片(胶囊)联合抗生素治疗子宫内膜炎疗效的 Meta 分析[J].中国中药杂志,2016,41(16):3090-3095.
- [5] 李珍珠,高光玲,蒲媛媛,等.妇科千金片联合左氧氟沙星治疗慢性宫颈炎的临床研究[J].现代药物与临床,2017,32(8):1504-1507.
- [6] 李维,邹亮,龚云,等.妇科千金片对阿奇霉素在慢性盆腔炎大鼠体内药物动力学的影响[J].中国中药杂志,2016,41(12):2339-2343.
- [7] 夏伯候,严东,曹艺,等.不同剂型夏桑菊颗粒 HPLC 指纹图谱及其模式识别分析[J].中国中药杂志,2016,41(3):416-420.
- [8] 徐容.妇科千金片 HPLC 特征指纹图谱及多成分含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):84-89.
- [9] MARKLAND A D, VAUGHAN C P, OKOSUN I S, et al. Cluster analysis of multiple chronic conditions associated with urinary incontinence among women in the USA[J]. BJU International, 2018, 122(6): 1041-1048.
- [10] NIKOLAI K, RAKESH J, PINKIE Eravuchira, et al. Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF-MS data: the analysis of the fraction in green coffee beans as a case study[J]. Analytical Methods, 2011, 3(1): 144-155.
- [11] WANG Z, XU J F, HU R. Explore medicine using compression and partial least square discriminate analysis method[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012, 220-223: 2694-2697.
- [12] GU H W, PAN Z Z, XI B W, et al. Principal component directed partial least squares analysis for combining NMR and MS Data in metabolomics: Application to the detection of breast cancer[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 686(1/2): 57-63.
- [13] 徐容.妇科千金片 HPLC 特征指纹图谱及多成分含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(11):84-89.