

HPLC 指纹图谱结合化学计量学分析不同企业心脑血管胶囊(片)的差异

王赵, 咎珂, 左甜甜, 王莹, 金红宇, 马双成^{*}(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 目的 建立心脑血管胶囊(片)质量评价方法, 比较不同企业心脑血管胶囊(片)的质量差异。方法 将中国药典 2020 年版一部心脑血管胶囊项下特征图谱转化为指纹图谱, 并进行方法学考察。与对照品进行比较, 确定特征峰成分。测定 3 个厂家的 21 批产品, 通过相似度分析其指纹图谱的异同, 进一步使用聚类分析和主成分分析进行模式识别。结果 3 家企业之间心脑血管胶囊(片)指纹图谱存在差异, 聚类分析和主成分分析结果基本一致, 样品按厂家各自聚为一类, 其中峰 10(表没食子儿茶素没食子酸酯), 13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、16(表儿茶素没食子酸酯)等特征峰对指纹图谱影响较大。在企业 H 样品中表没食子儿茶素没食子酸酯含量较低, 仅为企业 N 样品中相应成分含量的 60.08%, 而没食子酸儿茶素没食子酸酯含量较高。在企业 S 样品中没食子酸儿茶素没食子酸酯含量较低, 为企业 N 样品中相应成分含量的 42.47%, 而表儿茶素没食子酸酯含量相对较高。另外, 各企业样品所含主要成分的比例均不相同。结论 化学计量学辅助的 HPLC 指纹图谱具有简便、客观、可数字化的优点, 可直观地区别不同企业心脑血管胶囊(片)成分及其比例的差异。

关键词: 心脑血管胶囊(片); 指纹图谱; 化学计量学; 模式识别; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)12-1614-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.12.016

引用本文: 王赵, 咎珂, 左甜甜, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学分析不同企业心脑血管胶囊(片)的差异[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(12): 1614-1619.

Study on HPLC Fingerprint Combined with Chemometric to Analyze the Quality Differences of Xinnaojian Capsule(Tablet) in Different Enterprises

WANG Zhao, ZAN Ke, ZUO Tiantian, WANG Ying, JIN Hongyu, MA Shuangcheng^{*}(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an approach for quality evaluation of Xinnaojian capsule(tablet) and to compare the quality differences of Xinnaojian capsules(tablets) in different enterprises. **METHODS** Transformed the characteristic chromatogram of Xinnaojian capsule(2020 edition of Chinese Pharmacopoeia) into fingerprint method, and method evaluation was performed. By comparing with control drugs, the characteristic peaks were investigated. Then twenty-one batches of samples from 3 enterprises were determined and their fingerprints were compared by analysis of similarities. Then hierarchical cluster analysis and principal component analysis were applied in pattern recognition. **RESULTS** The fingerprints of Xinnaojian capsule(tablet) from three enterprises differed. The results of hierarchical cluster analysis and principal component analysis were consistent, which indicated that the fingerprints of the samples from the same manufacturer could cluster to their own group. The characteristic peaks of 10(epigallocatechin-3-gallate), 13(gallocatechin gallate), 16(epicatechin-3-gallate) showed the greatest impact on the fingerprints. The content of epigallocatechin-3-gallate in samples of enterprise H was low, which was only 60.08% of that in samples of enterprise N, while the content of gallocatechin gallate was higher in samples of enterprise H. The content of gallocatechin gallate in samples of enterprise S was lower, which was 42.47% of that in samples of enterprise N, while the content of epicatechin-3-gallate was higher in samples of enterprise S. In addition, the proportion of the main components in the samples of different enterprises were not the same. **CONCLUSION** HPLC fingerprinting with aid of chemometric analysis is simple, objective and easy to realize digitalization and can reflect the differences of chemical component and proportion between samples more intuitively.

KEYWORDS: Xinnaojian capsule(tablet); fingerprint; chemometrics; pattern recognition; hierarchical cluster analysis; principal component analysis

心脑血管胶囊(片)具有清利头目、醒神健脑、化浊降脂的功效, 用于头晕目眩、胸闷气短、倦怠

乏力、精神不振、记忆力减退, 亦可用于心血管病伴高纤维蛋白原症及动脉粥样硬化, 肿瘤放疗、

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2018ZX09735-006)

作者简介: 王赵, 女, 硕士, 助理研究员 E-mail: wang_zhao_happy@yeah.net

*通信作者: 马双成, 男, 博士, 研究员, 教授 E-mail:

masc@nifdc.org.cn

化疗所致的白细胞减少症^[1]。心脑血管胶囊(片)以茶叶提取物为原料,茶叶提取物为山茶科植物茶 *Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze 的干燥嫩叶(绿茶)提取制成,主要成分是茶多酚,包括儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿茶素没食子酸酯等,其次还含有少量的茶多糖、茶氨酸及咖啡碱类物质^[2-6]。

心脑血管胶囊(片)始收载于部颁标准^[7-8],原标准采用紫外分光光度法对茶多酚的含量进行测定。后收录于中国药典 2015 年版^[9],现行标准为中国药典 2020 年版^[1]。经检索国家药品监督管理局网站,心脑血管胶囊药品批准文号有 7 个,心脑血管片药品批准文号 1 个,共有 7 家生产企业,但根据调研结果显示,部分企业已停止生产,目前市面上在售的仅有 3 家企业的产品。

中国药典 2020 年版心脑血管胶囊(片)项下特征图谱采用相对保留时间对 7 个特征峰进行评价,并在相同色谱条件下测定了其中表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯和表没食子儿茶素没食子酸酯的含量,但对其余特征峰并没有限量的要求,给样品中较小色谱峰的判断带来了困难。因此本研究提出将药典方法转化为指纹图谱,通过相似度评价及计量学分析等手段,分析不同企业样品的整体差异,为以相似度的形式限定此项检查,完善相关质量标准提供基础。

1 材料

1.1 仪器

LC_30AD 高效液相色谱仪(Shimadzu); AE-240 电子分析天平(Mettler-Toledo); KQ-300DA 型数控超声波清洗仪(昆山山超声仪器有限公司); Milli-Q 纯水仪(Millipore)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher Scientific); 水为纯化水。对照品咖啡因(批号: 171215-202013; 纯度: 99.7%)、表儿茶素(批号: 110878-201703; 纯度: 99.7%)、没食子酸(批号: 110831-201906; 纯度: 91.5%)、表儿茶素没食子酸酯(批号: 111987-201501; 纯度: 98.1%)均购自中国食品药品检定研究院; 表没食子儿茶素没食子酸酯(德斯特生物有限公司, 批号: DSTDB003601; 纯度: 98%)。3 个厂家 21 批次的心脑血管胶囊(片)信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 取咖啡因对照品、表儿茶素对照品、没食子酸对照品、表儿茶素没食子酸对照品和表没食子儿茶素没食子酸酯对照品适量,精密称定,分别加 25%甲醇制成每 1 mL 含咖啡因 14 μg 、表儿茶素 68 μg 、没食子酸 19 μg 、表儿茶素没食子酸酯 140 μg 和表没食子儿茶素没食子酸 850 μg 的溶液,即得。

表 1 心脑血管胶囊(片)样品信息

Tab. 1 Sample information of Xinnaojian capsule(tablet)

编号	企业	批号	剂型
1	N	190702	胶囊
2	N	200602	胶囊
3	N	201201	胶囊
4	N	200705	胶囊
5	N	200701	胶囊
6	N	201005	胶囊
7	N	201002	胶囊
8	S	200302	胶囊
9	S	200802	胶囊
10	S	210101	胶囊
11	S	201101	胶囊
12	S	200701	胶囊
13	S	200702	胶囊
14	S	201202	胶囊
15	H	20200802	胶囊
16	H	20191001	胶囊
17	H	20200701	胶囊
18	H	20200902	胶囊
19	H	20200903	胶囊
20	H-P	20200602	片剂
21	H-P	20200601	片剂

2.1.2 供试品溶液的制备 取本品内容物,混匀,取 0.2 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加 25%甲醇适量,超声处理(功率 160 W, 频率 40 kHz) 30 min。放冷,加 25%甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK C₁₈ MGII 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2%磷酸溶液(10:90)为流动相 A, 乙腈-0.2%磷酸溶液(80:20)为流动相 B, 梯度洗脱程序见表 2; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。检测波长: 280 nm。

表 2 流动相洗脱程序

Tab. 2 Program of gradient elution

t/min	A/%	B/%
0~10	100	0
10~30	100→90	0→10
30~50	90→100	10→0

2.3 测定法

取“2.1”项下溶液,注入液相色谱仪,测定,记录色谱图。比较供试品溶液和混合对照品溶液色谱的保留时间,确认特征峰1,3,4,5,7号。并根据中国药典2020年版^[1]中对相对保留时间的规定,指认2号峰和6号峰成分。结果见图1。

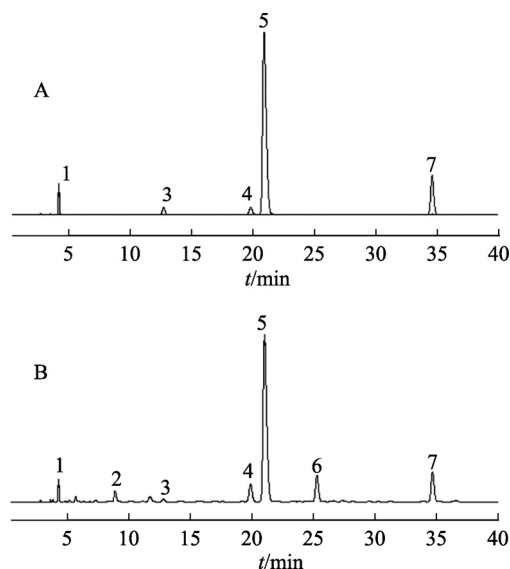


图1 对照品及代表性样品的HPLC色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; 1-没食子酸; 2-表没食子儿茶素; 3-咖啡因; 4-表儿茶素; 5-表没食子儿茶素没食子酸酯; 6-没食子儿茶素没食子酸酯; 7-表儿茶素没食子酸酯。

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference compound and typical sample

A-mix reference solution; B-test solution; 1-gallate; 2-epigallo-catechin; 3-caffeine; 4-epicatechin; 5-epigallocatechin-3-gallate; 6-gallocatechin gallate; 7-epicatechin-3-gallate.

2.4 方法学考察

2.4.1 仪器精密度试验 取表没食子儿茶素没食子酸酯对照品溶液,连续进样测定6次,计算色谱峰峰面积和保留时间的RSD值,结果分别为0.14%和0.08%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h测定其指纹图谱,以表没食子儿茶素没食子酸酯为参照峰,计算色谱图中各特征峰的相对保留时间和峰面积,结果色谱图中各特征峰相对峰面积的RSD为0.08%~3.26%,相对保留时间的RSD为0.12%~0.52%,表明样品溶液在24 h内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批样品(企业N,批号:200701),按“2.1.2”项下供试品溶液的制备方法平行制备6份供试品溶液,分别测定其指纹图谱,以表没食子儿茶素没食子酸酯为参照峰,计算色

谱图中各特征峰的相对保留时间和峰面积,结果色谱图中各特征峰相对峰面积的RSD为0.21%~2.88%,相对保留时间的RSD为0.09%~0.34%,表明方法重复性良好。

2.5 化学计量学分析

将采集得到的21批次样品的色谱数据以通用的ANDI格式导出,再导入ChemPattern化学计量学软件,对相应的色谱峰进行积分,按样品对峰面积进行标准化处理后得到样品叠加图,见图2。以所有变量作为共有峰筛选条件,采用高斯曲线模拟的方法生成共有模式图。见图3。在此基础上,进一步利用ChemPattern软件进行相似度、主成分及聚类分析。

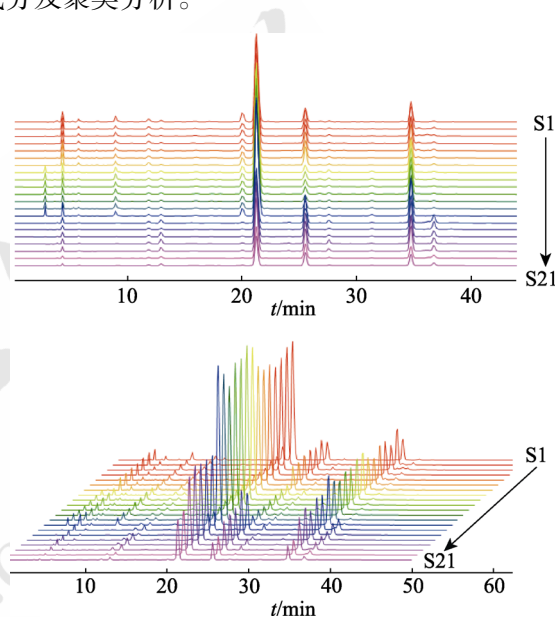


图2 21批心脑健胶囊(片)的HPLC指纹图谱叠加图

Fig. 2 HPLC fingerprint overlay of 21 Xinnaojian capsules(tablets) from different enterprises

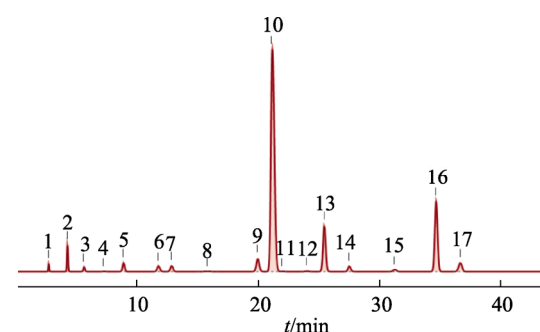


图3 心脑健胶囊(片)的HPLC指纹图谱共有模式

2-没食子酸; 5-表没食子儿茶素; 7-咖啡因; 9-表儿茶素; 10-表没食子儿茶素没食子酸酯; 13-没食子儿茶素没食子酸酯; 16-表儿茶素没食子酸酯。

Fig. 3 HPLC fingerprint common patterns of Xinnaojian capsules(tablets)

2-gallate; 5-epigallo-catechin; 7-caffeine; 9-epicatechin; 10-epigallocatechin-3-gallate; 13-gallocatechin gallate; 16-epicatechin-3-gallate.

2.5.1 相似度分析 相似度评价可以保留较多的共有峰来反映样品的相似性。一般通过计算样品特征之间的距离,如果距离小,那么相似度大;如果距离大,那么相似度小。余弦相似性取值 $[-1,1]$,值越趋于1,表示2个向量的相似程度越高。采用夹角余弦法计算各样品的相似度,结果见图4。所有样品与共有模式的相似度为0.94~1.00,说明各批次间化学成分整体特征相似程度高,一致性良好,未见异常批次。表明不同企业生产的心脑健制剂指纹图谱的差异较小,且同一企业的样品之间相似度差异更小。可以通过限定相似度值控制样品质量。但是通过对指纹图谱叠加图(图2)进行直观分析,可以看出不同企业样品在化学成分以及一些成分的绝对含量和相对比例上有所不同,如1,5,9,10,13,16,17号峰等。需要对样品进一步进行统计分析。

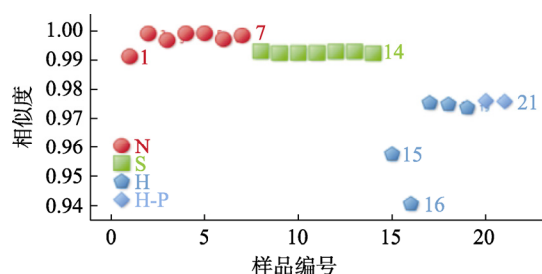


图4 21批心脑健胶囊(片)的相似度

Fig. 4 Similarity results of 21 batches of Xinnaojian capsules(tablets)

2.5.2 主成分分析 主成分分析是将多个变量通过线性变换重新组合成一组新的相互无关的综合变量,根据实际需要从中抽取出几个来尽可能多地反映原来变量信息的一种多元统计分析方法,也是数学上用来降维的一种方法。利用 Chem Pattern 软件将样品测定数据标准化以后进行主成分分析,见图5。第1主成分(PC1)的贡献率为92.11%,第2主成分(PC2)的贡献率为5.62%,累积达到97.73%,说明其能较全面地反映样品间的差异。主成分分析散点图显示,不同企业的样品基本可以各自聚为一类。说明不同企业间样品存在差异,同一企业的不同批次样品差异较小。主成分载荷图给出各色谱峰在主成分中所占的比例,其中离 $X=0$ 纵轴距离越远的点对PC1的贡献越大,如峰10(表没食子儿茶素没食子酸酯)、峰13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、峰16(表儿茶素没食子酸酯)、峰17、峰9(表儿茶素)、峰5(表没

食子儿茶素)等。而离 $Y=0$ 纵轴距离越远的点对PC2的贡献越大,如峰1、峰2(没食子酸)、峰5(表没食子儿茶素)、峰7(咖啡因)、峰9(表儿茶素)、10(表没食子儿茶素没食子酸酯)、峰13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、峰16(表儿茶素没食子酸酯)等。例如,企业H与企业S的样品主要沿PC1得到分离,因此对PC1贡献大的成分是其差异成分。因企业S样品均位于 $PC1>0$ 的位置,所以与PC1正相关的成分如峰13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、峰16(表儿茶素没食子酸酯)在该企业样品中含量较高,从各厂家的样品的叠加图谱中也可以看出其响应值明显高于其他厂家(片剂的取样量减半)。企业N与其余2家企业主要沿PC2分离,且位于 $PC2<0$ 的位置,所以与PC2正相关的成分如峰16(表儿茶素没食子酸酯)、峰17等在该企业样品中含量较低,而与PC2负相关的成分如峰9(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、峰2等在该企业样品中含量较高。同理,企业N与企业H呈对角分离,相关的峰9(表儿茶素)、峰10(表没食子儿茶素没食子酸酯)、峰13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、峰16(表儿茶素没食子酸酯)在2家企业样品中差异较大,这与2家企业的样品叠加图谱比对结果吻合。

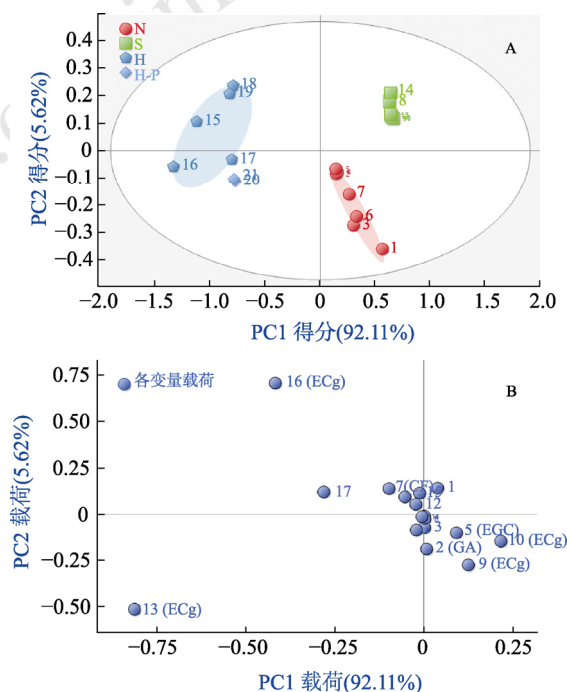


图5 21批心脑健胶囊(片)的主成分分析

A-得分图; B-载荷图。

Fig. 5 Principal component analysis of 21 batches of Xinnaojian capsules(tablets)

A-score plot; B-loading plot.

2.5.3 聚类热图分析 聚类分析是根据研究对象的特征对其进行分类的一种多元统计方法，又称分类分析。将样品图谱针对变量标准化后，以欧氏距离为度量，采用近邻法进行聚类分析，结果见图 6。与主成分分析类似，3 家企业样品各自聚为一类。其中企业 N，S 与 H 区分为 2 类。说明同一企业内部不同批次样品差异较小，但不同企业样品之间确实存在差异，尤其是企业 H 与另外 2 家差异较大。从聚类热图上看颜色较深的峰 10(表没食子儿茶素没食子酸酯)、峰 13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、峰 16(表儿茶素没食子酸酯)等成分对这种差距贡献较大，比较三者在各企业心脑血管胶囊样品中的平均峰面积可知，企业 H 中表没食子儿茶素没食子酸酯的含量较低，仅为企业 N 样品中相应成分的 60.08%；企业 S 中没食子酸儿茶素没食子酸酯的含量较低，仅为企业 N 样品中相应成分的 42.47%；企业 H 中峰 13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)的含量较高，企业 S 中峰 16(表儿茶素没食子酸酯)的含量较高。另外，各主要成分的比例也有所不同。

3 讨论

中药指纹图谱系指中药经适当处理后，采用一定的分析方法得到的能够体现中药整体特性的图谱，分为特征图谱和指纹图谱^[10-12]。特征图谱是选取图谱中某些重要的特征信息，控制中药质量，一般作为鉴别手段使用。本次测定的 21 批次样品按照特征图谱分析，均符合药典标准要求，无法区分不同企业产品的质量差异。而指纹图谱

是基于图谱的整体信息，可用于中药质量的整体评价。本研究通过将原有的特征图谱转化为指纹图谱的分析方法，增加分析的色谱峰数量，采用化学计量学直观分析，可体现样品的整体性，并客观反映样本的差异。

实验证明不同企业产品在含量>60%的主要成分 10(表没食子儿茶素没食子酸酯)、13(没食子酸儿茶素没食子酸酯)、16(表儿茶素没食子酸酯)的含量及其比例上仍存在差异，这一方面可能是与企业所选用的茶叶原料不同有关；另一方面，中国药典 2020 年版心脑血管片项下附有茶叶提取物标准^[1]，明确规定了茶叶提取物的提取工艺。但据课题组调研了解到，现有提取工艺存在一定问题。现有工艺路线为：绿茶原料—沸水煎煮—过滤—加碱沉淀—加酸转溶—过滤—乙酸乙酯萃取—浓缩—干燥—茶叶提取物。但工艺要求不明确，对于茶叶原料产地来源、煎煮时间、酸碱 pH 值的控制、沉淀静置时间以及干燥方式均未说明。其中碱沉淀时多用氯化铝，易造成有毒金属离子残留问题^[13]。另外在沉淀转溶时，会用到硫酸等酸液造成环境污染，污水处理困难^[14-15]。最重要的是，在提取过程中需严格控制酸度，pH 值不仅影响茶多酚络合沉淀物的溶解度，还影响茶多酚的稳定性。pH 值过高使得提取过程中茶多酚氧化严重，不仅影响成品颜色，而且得率极低，浪费茶叶资源。所以不同企业对提取方法不同的优化程度也可能是导致产品差异的原因。

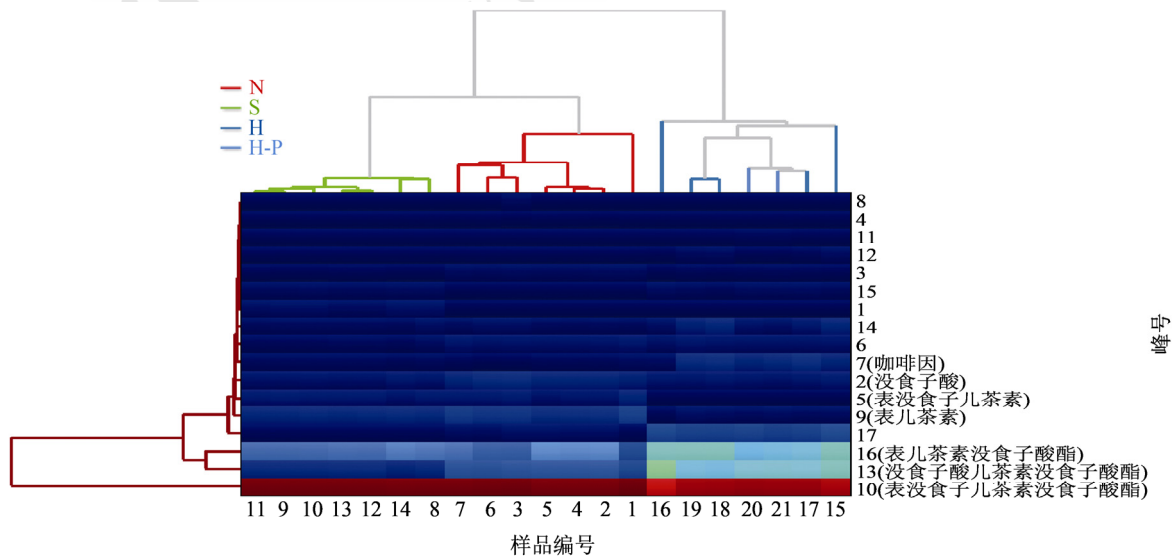


图 6 21 批心脑血管胶囊(片)的聚类分析

Fig. 6 Cluster analysis of 21 batches of Xinnaojian capsules(tablets)

有文献曾报道不同表没食子儿茶素没食子酸酯含量的茶多酚抗氧化能力不同^[16-18], 这是否会成不同企业产品临床疗效的差异, 还需要进一步研究。因此, 为了稳定心脑血管胶囊(片)的质量, 建议控制绿茶提取物原料的质量, 规范生产工艺, 摒弃不合理步骤, 开发安全环保得率高的提取方法。并采用指纹图谱分析产品质量, 保证药品批间质量的稳定性与均一性, 进而确保其疗效。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 761-765.
- [2] WU X R, WANG Y F, ZHANG S K, et al. Research progress on the health functions of tea polyphenols and development of healthy foods[J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2010, 30(S1): 501-505.
- [3] YANG C S, HONG J. Prevention of chronic diseases by tea: Possible mechanisms and human relevance[J]. Annu Rev Nutr, 2013(33): 161-181.
- [4] LU Y, GUO W F, NI J E, et al. The bioactivities and synthesis of theanine[J]. J Tea Sci(茶叶科学), 2003, 23(1): 1-5.
- [5] ZEEB D J, NELSON B C, ALBERT K, et al. Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2000, 72(20): 5020-5026.
- [6] SONG S. Determination of the major factors in EGCG stability for cell culture and the insulin receptor phosphorylation induced by EGCG[D]. Changchun: Jilin University, 2013.
- [7] WS3-B-3151-98, 卫生部药品标准中药成方制剂第十七册[S]. 1998: 32-33.
- [8] WS3-B-3380-98, 卫生部药品标准中药成方制剂第十八册[S]. 1998: 57-58.
- [9] 中国药典. 一部[S]. 2015: 723-727.
- [10] ZHU M, CHEN B L, SHI S M. Application of fingerprint technology on traditional Chinese medicine in Chinese pharmacopoeia(2015 edition) volume I[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 611-614.
- [11] LIU Q H, BAI J J, ZHANG Y, et al. Study on quality evaluation of Jinhua Qinggan granules based on fingerprint, pattern recognition and multi-components determination[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(21): 2701-2707.
- [12] WANG M J, TANG T T, PAN L M, et al. Quality evaluation of Trichosanthis Fructus in different origin based on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(8): 919-924.
- [13] 安娜. 关于食品中铝的测定及食源铝污染的相关分析[J]. 科技创新与应用, 2016(30): 297.
- [14] LANG M Y, FU C H, SHAO Y J, et al. Preparation method of tea leaf extract for heart tonifying and brain tonifying: CN106581308B[P]. 2020-11-17.
- [15] FU C H. Research on the preparation technology of medicinal tea extract[J]. Pract Clin J Integr Tradit Chin West Med(实用中西医结合临床), 2019, 19(9): 173-174.
- [16] WANG Y F, XU P, LEI L L, et al. Research on total antioxidant activity of tea polyphenols and other natural antioxidants[J]. J Tea Sci, 2010, 30(2): 109-114.
- [17] SHEN S R, YANG X Q, ZHAO B L, et al. Radical mechanism of prooxidant effect on tea polyphenols(TP)*in vitro*[J]. J Tea Sci(茶叶科学), 1992, 12(2): 145-150.
- [18] LI D, CAO Y, WANG H, et al. Study on the relationship between the composition of tea extracts and its *in vitro* antioxidant activity[J]. Food and machinery(食品与机械), 2018, 34(6): 109-114.

收稿日期: 2021-09-18
(本文责编: 陈怡心)