

基于代谢组学的天舒胶囊质量评价与控制

陈卫^{1*}, 刘林生¹, 顾炳仁¹, 谢洪平^{2#} (1. 苏州市食品药品检验所, 江苏苏州 215104; 2. 苏州大学医学部药学院, 江苏苏州 215123)

中图分类号 R283.65; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3313-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.17

摘要 目的: 建立基于代谢组学的天舒胶囊高效液相色谱(HPLC)指纹图谱考察方法。方法: 采用代谢组学的主成分分析(PCA)及偏最小二乘法(PLS)模型对54份天舒胶囊内容物提取液的HPLC指纹图谱进行整体观察和评价, 找出并初步确证可能与相似度强相关的标志物, 最后探讨代谢组学用于中药质量评价的可行性和价值。结果: 该方法能从代谢组学的层面上区分各样品的质量情况, 并以超HPLC-串联质谱法找到并确证标志物为洋地黄内酯I, 其可作为天舒胶囊的质量控制重点。结论: 该HPLC中药指纹图谱-代谢组学平台能较好地应用于中药及中药材的质量标准研究。

关键词 天舒胶囊; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 主成分分析; 偏最小二乘法; 质谱

Quality Evaluation and Control of Tianshu Capsules Based on Omics

CHEN Wei¹, LIU Lin-sheng¹, GU Bing-ren¹, XIE Hong-ping² (1. Suzhou Institute for Food and Drug Control, Jiangsu Suzhou 215104, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish an evaluation method for HPLC fingerprints of Tianshu capsules based on Omics. METHODS: HPLC fingerprints of 54 batches of Tianshu capsules were observed and evaluated by PCA model and PLS model. The marker closely related to similarity were found out and confirmed primarily, and the feasibility and value of Omics were investigated in the field of TCM quality evaluation. RESULTS: By this method, the quality of each sample could be distinguished based on Omics. The marker senkyunolide I was found and confirmed by HPLC-MS, which can be the key point of quality control of Tianshu capsules. CONCLUSIONS: HPLC fingerprints-Omics can be well used in the quality standard study of TCM and traditional Chinese medicinal materials.

KEYWORDS Tianshu capsules; HPLC; Fingerprints; PCA; PLS; MS

天舒胶囊源于金·刘完素《宣明论方》卷二的大川穹丸, 由伞形科植物川芎和兰科植物天麻两味药材组成, 经现代技术进行剂型改造而成, 临床上常用于偏头痛的治疗, 并取得了较好的疗效^[1-3]。中药指纹图谱是指中药材或中成药经适当的处理后, 采用现代分析手段, 得到能够标示该中药材或中成药特征的色谱、光谱等, 是一种综合的、量化的技术手段。美国食品药品监督管理局(FDA)允许草药保健品申报资料中提供色谱指纹图谱; 世界卫生组织(WHO)在1996年草药评价指导原则中也规定, 如果草药的活性成分不明确, 可以提供色谱指纹图谱以证明产品质量一致^[4]。2010年版《中国药典》首次在12个中药中使用指纹图谱, 其中就包括天舒胶囊。2010年版《中国药典》目前对指纹图谱评价采用相似度的方法, 不能立体、多维地观察中药材及其制剂的质量。本试验采用代谢组学的手段对天舒胶囊的指纹图谱进行评价, 通过主成分分析(Principal components analysis, PCA)及偏最小二乘法(Partial least squares, PLS)对54批天舒胶囊进行整体和立体的观察、评价与分析, 并探讨代谢组学在中药材质量评价中应用的可能性及其价值。

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药物质量评价与控制。电话: 0512-68222721。E-mail: flone@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药物质量评价与控制。电话: 0512-65882080。E-mail: hpxie@suda.edu.cn

1 材料

1.1 仪器

LC-2010C HT型高效液相色谱(HPLC)仪, 配备四元泵系统、自动进样器(日本岛津公司); XEVO TQ-S型超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)仪(美国Waters公司)。

1.2 药品与试剂

天舒胶囊[规格: 0.34 g, 江苏康缘药业股份有限公司, 35批次共54份(S1~S54)]; 阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110773-201012); 磷酸(分析纯; 纯度≥85.0%, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 120301); 甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取阿魏酸对照品约20 mg, 精密称定, 置200 ml量瓶中, 加50%甲醇使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 再精密吸取5 ml置25 ml量瓶中, 加50%甲醇使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 天舒胶囊提取液的制备

取天舒胶囊内容物适量, 混匀, 研细, 取约1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入50%甲醇25 ml, 称定质量, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 HPLC色谱条件与测定结果

色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 15% A; >5~55 min, 15%→95% A; >55~60 min, 95% A, >60~70 min, 15% A);流速:1 ml/min;柱温:30 ℃,检测波长:276 nm;进样量:10 μl。照以上色谱条件,对54批天舒胶囊的提取液分别进样测定,记录色谱图。结果,共检出数十个色谱峰,且各色谱峰分离度良好,这数十个色谱峰可能代表的化合物共同决定了天舒胶囊的质量。色谱见图1。

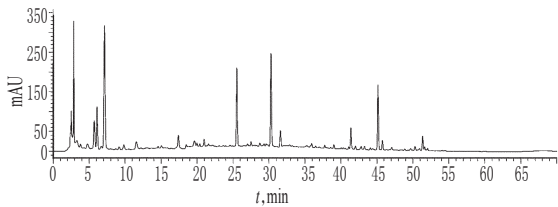


图1 高效液相色谱图
Fig 1 HPLC Chromatograms

2.4 HPLC图的数据化与导入

将所有HPLC图都转换为数据文件,经过基线校正、峰排列、划分窗口等步骤对图谱数据进行处理,最终得到每个色谱图中各色谱峰的保留时间和对应峰面积。每个色谱峰的面积代表了特定化合物在此样品中的相对含量。

在中药色谱指纹图谱相似度评价系统中,所有色谱峰经峰匹配并数据化后导出数据文件,峰面积归一化处理后导入到Simca-P 11.0软件(瑞典Umetrics公司)中,进行多元统计分析。

2.5 基于PCA模型对天舒胶囊质量的整体性评价

通用的分析方法主要有PCA^[7-9]、聚类分析等非监督模式识别方法和内在差别投影-PLS分析(latent structures PLS discriminant analysis, PLS-DA)^[9-10]、PLS^[11-12]等有监督模式识别方法。PCA基本分析方法是:试验样本作为观测变量、峰面积作为响应变量建立数据矩阵,它代表一个K维的空间,其中K表示变量的个数,用交叉验证的方法来确定主成分的个数^[5]。交叉验证方法中, R^2X 、 R^2Y 和 Q^2Y 是评价模型的3个指标,它们分别表示模型能够解释所有HPLC响应变量的程度、模型能够解释观测变量的程度和模型能够预测观测变量的程度。这3个参数的范围是0~1,其越接近1,模型解释或预测的能力越强。

PCA在代谢组学研究中应用最为广泛,它将分散在一组变量上的信息集中到几个主成分上,主成分之间相互垂直、互不相关,表现为正交性。第一个主成分包含了数据集的绝大部分方差,第二个次之,依此类推,这样,根据前两个或三个主成分作图(或其中的几个主成分作图),就可以直观地在二维或三维空间上研究样本与变量的相互关系^[13-15]。

将数据导入Simca-P11.0软件后,获得到3个主成分PCA模型,模型的 R^2X 为31.8%, Q^2Y 为17.9%,解释度不高,即模型的区分度不大,总体差异不大,表明该中药制剂总体趋同,质量相对稳定。

PCA及PLS分析结果的输出形式包括得分图(Scores plot)和载荷图(Loadings plot)两种。得分图上每一个样本在主成分图上的位置由该样本所有色谱峰面积的总体情况决定,相似的样本在得分图中通常处于相似的位置。得分图能够直观地描述不同批次的样本情况。从图2中可以看出,各样品点存在一定的离散情况,样品点可以分为三部分,即左下、

右下和中上部分,据此可将本次测定的54批天舒胶囊分成3组,但各组之间较为接近。具体观察各个样品点的位置,发现标准图谱(R)在得分图的右下角(第四象限),而同在第四象限的样品相似度基本>0.900(S54:0.945;S39:0.916;S42:0.948;S51:0.941;S30:0.928);与之相反,处在第二象限的样本相似度均较低(如S14、S38、S17的相似度均<0.86)。以上结果表明,PCA模型能够较为全面地分析不同相似度的样本。

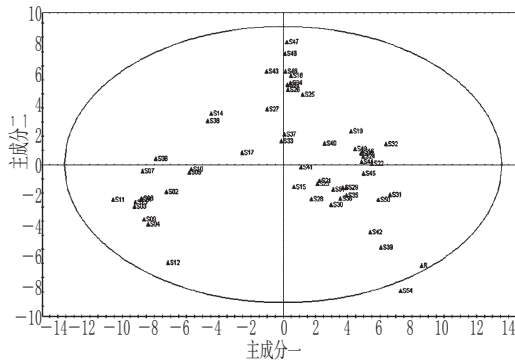


图2 54批次天舒胶囊的PCA结果(得分图)

Fig 2 PCA model of 54 batches of Tianshu capsules (scores plot)

PCA分析的另一个结果为载荷图,载荷图上每一个点代表了样本中检测到的组分的有关信息,载荷点越接近零点,其所代表变量显示的差异越小,对PCA分类模型的贡献越大。从图3可以发现,相似度较高的样品(第四象限)中,保留时间在25.440、66.970、68.260、15.168 min的峰面积较大(提示可能含量较高);而在相似度较低的第二象限中,保留时间在22.36、21.97、12.17 min的化合物峰面积较大。

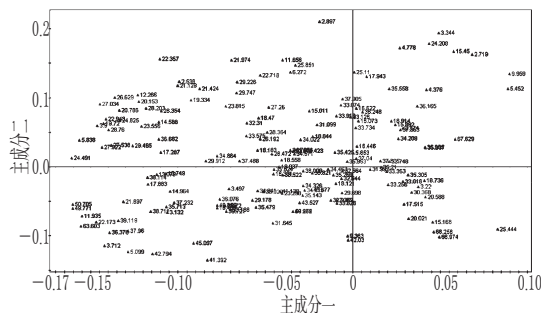


图3 54批次天舒胶囊PCA结果(载荷图)

Fig 3 PCA model of 54 batches of Tianshu capsules (loadings plot)

2.6 基于PLS模型对天舒胶囊相似度的整体性评价

为了寻找到具体的哪几个化合物与相似度之间联系最为密切,将与标准图谱比对得到的相似度作为Y变量,将所得化合物的峰面积作为X矩阵,建立PLS模型。在主成分为5时,所建立模型的 R^2X 为36.7%, R^2Y 为98.8%, Q^2Y 为83.3%。对于能够解释的36.7%的X变量,对Y变量的预测率为83.3%。其中第一个主成分 R^2X 为13.2%, R^2Y 为57.2%, Q^2Y 为40.3%。对于该13.2%的X变量,对Y变量的预测率能够达到40.3%,预示着该制剂的相似度由少数的变量决定,即存在着决定质量的少数主要成分。

PLS模型得分图和载荷图分别见图4和图5,以此来寻找与标准图谱联系密切的化合物。从图4中可见,PLS模型与PCA模型类似,各样品点呈现比较离散的分布形态,说明不同

批次天舒胶囊的HPLC测定结果之间存在差异。此外,从图中还可见,本试验中的天舒胶囊样本可以分为三部分,分别为标准图谱(R)所在的图右半部、左下部和左上部。

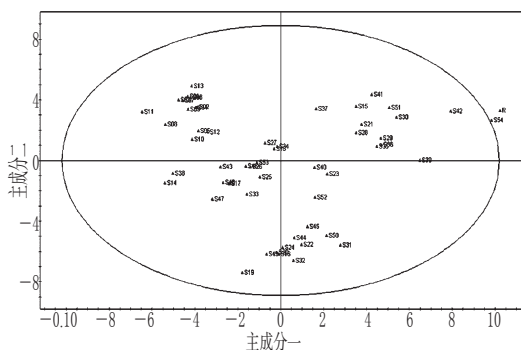


图4 54批次天舒胶囊PLS结果(得分图)

Fig 4 PLS model of batches of Tianshu capsules (scores plot)

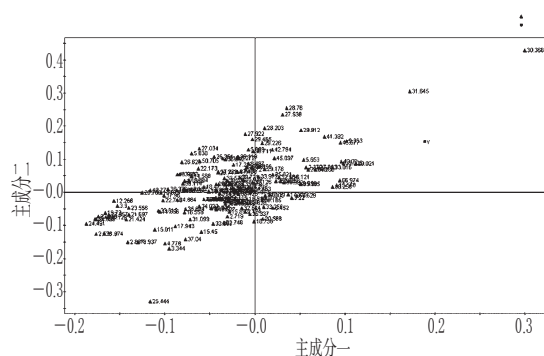


图5 54批次天舒胶囊PLS结果(载荷图)

Fig 5 PLS model of 54 batches of Tianshu capsules (loadings plot)

2.7 标志物的寻找

根据PLS模型的载荷图(图5)寻找对PLS分类模型贡献较大的化合物,即该化合物在PLS建模中具有较大的比重,也对相似度有较大的影响。从载荷图(图5)中可以发现,保留时间为30.4、31.6、2.5、25.4、24.5 min对应的化合物对分类的贡献较大,为相应的标记物。但是,它们与标准图谱的相关性是不一样的。位于载荷图左下角,保留时间为2.5、25.4、24.5 min对应化合物的浓度与标准图谱的相似度 Y 呈负相关。而保留时间为30.4、31.6 min的化合物浓度与 Y 则呈正相关。

为了进一步分析上述5个保留时间处的化合物与相似度之间的潜在关系,采用SPSS 16.0软件的Pearson相关系数法对5个化合物峰与相似度进行相关性分析。结果显示,保留时间30.4 min处的化合物与相似度存在较强的相关性($r=0.778$, $P=0$),提示保留时间30.4 min处的化合物与相似度之间的相关性最密切。

2.8 标记物溶液的制备和初步分析

根据“2.3”项下测定结果,接收保留时间为30.4 min的化合物,氮吹仪吹干,甲醇复溶,按相同色谱条件进样测定,色谱见图6。以HPLC-DAD检测器在250~450 nm波长处行紫外光谱扫描,并进行峰纯度分析,发现保留时间为30.4 min的化

合物为单一化合物。

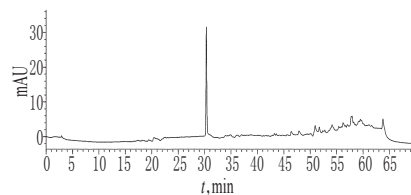


图6 高效液相色谱图

Fig 6 HPLC chromatograms

2.9 UPLC-MS/MS检测条件与结果

2.9.1 UPLC条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈;流速:0.3 ml/min;柱温:30 °C;检测波长:276 nm;进样量:1 μl。

2.9.2 MS/MS条件 离子源:电喷雾离子(ESI)源(+);毛细管电压:0.5 kV;锥孔电压:30 V;脱溶剂气温度:500 °C;脱溶剂气流:1 000 L/h;锥孔气流:150 L/h;雾化气压力:7.0 Bar;二级碰撞能量:35 V。

2.9.3 检测结果 该化合物在正离子模式下的准分子离子峰 m/z 为207(图7),与文献^[6]报道一致,基本可以认定保留时间为30.4 min的化合物为洋川芎内酯I。2010年版《中国药典》仅对天麻素和阿魏酸进行了含量测定,本试验结果提示,保留时间为30.4 min的洋川芎内酯I更需要进行含量测定。

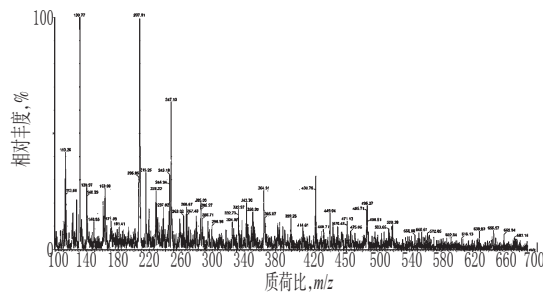


图7 保留时间为30.4 min的纯化产物的MS图

Fig 7 MS spectrum of the purified product with retention time of 30.4 min

3 讨论

PCA是一种无监督的判别模式,在进行分类分析前不需要知道样品的预知信息,就可以对样品进行分类、概括。PLS是一种基于因子分析的多变量校正方法,它不仅利用响应变量矩阵中的信息,还利用自变量矩阵中的信息,并以它们的主因子进行回归,进一步提高了方法的可靠性。在代谢组学研究中,利用PLS对数据进行多变量分析可以有效地分析变量差异,用于解释样本间或组间差异,寻找更能接收与 Y 变量关系最为密切的化合物(标记物)。

本试验运用高效、快速、可靠的HPLC中药指纹图谱分析平台,成功地对天舒胶囊质量进行了初步研究;同时,使用代谢组学的手段,以样本图谱整体多维信息为分析单元得到质量分布情况,即质量总体稳定,但不同批次样本之间还是存在具体差异。

本试验还进一步以不同出峰位置的色谱峰与指纹图谱相似度的关联程度进行分析,找到与相似度强相关的标志物峰,

MS 确证为保留时间 30.4 min 的洋川芎内酯 I, 推荐作为天舒胶囊的质量控制重点, 在质量标准中增加该项目的测定。

本试验结果表明, HPLC 中药指纹图谱-代谢组学平台在中成药及中药材的质量研究方面具有较高的应用价值。

参考文献

- [1] 张勤, 杨天华, 周沐科, 等. 天舒胶囊对偏头痛动物模型血浆一氧化氮、一氧化氮合酶、降钙素基因相关肽含量及血流动力学的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2008, 21(4): 279.
- [2] 丰广魁, 商洪涛, 胡坚, 等. 天舒胶囊对偏头痛患者间歇期血浆、血小板、5-HT 及尿 5-HIAA 含量的影响[J]. 江苏中医药, 2005, 26(2): 18.
- [3] 孙晓江, 赵玉武, 沈洁, 等. 天舒胶囊治疗偏头痛的疗效观察[J]. 临床神经病学杂志, 2009, 22(5): 367.
- [4] Sun Y, Guo T, Sui Y, et al. Fingerprint analysis of flos carthami by capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 792(2): 147.
- [5] Liu L, Aa J, Wang G, et al. Differences in metabolite profile between blood plasma and serum[J]. *Anal Biochem*, 2010, 406(2): 105.
- [6] 陈军辉. 不同模式“液质”联用技术用于陆源及海洋天然药物分析[D]: 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- [7] Yeom J, Shin JH, Yang JY, et al. ¹H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in acinetobacter baumannii 1656-2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57 730.
- [8] 刘惠琳, 万霞, 杨功焕. 应用主成分分析法评价医院控烟强度对无烟医院创建效果的影响[J]. 中国医学科学院学报, 2013, 35(1): 40.
- [9] Fang G, Goh JY, Tay M, et al. Characterization of oils and fats by ¹H NMR and GC/MS fingerprinting: classification, prediction and detection of adulteration[J]. *Food Chem*, 2013, 138(2/3): 1 461.
- [10] Ju HK, Lee JG, Park MK, et al. Metabolomic investigation of the anti-platelet aggregation activity of ginsenoside Rk₁ reveals attenuated 12-HETE production[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(10): 4 939.
- [11] Afanador NL, Tran TN, Buydens LM. Use of the bootstrap and permutation methods for a more robust variable importance in the projection metric for partial least squares regression[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 768: 49.
- [12] Feng J, Wang Z, Li L, et al. A nonlinearized multivariate dominant factor-based partial least squares (PLS) model for coal analysis by using laser-induced breakdown spectroscopy[J]. *Appl Spectrosc*, 2013, 67(3): 291.
- [13] Liu L, Cao B, Aa J, et al. Prediction of the pharmacokinetic parameters of triptolide in rats based on endogenous molecules in pre-dose baseline serum[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43 389.
- [14] Zheng T, Liu L, Aa J, et al. Metabolic phenotype of rats exposed to heroin and potential markers of heroin abuse [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2013, 127(1-3): 177.
- [15] Cao B, Aa J, Wang G, et al. GC-TOF-MS analysis of metabolites in adherent MDCK cells and a novel strategy for identifying intracellular metabolic markers for use as cell amount indicators in data normalization[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(9): 2 983.
- [16] 兰顺, 叶冬梅, 池泮才. 高效液相色谱法测定天舒胶囊的体外溶出度[J]. 中国药房, 2004, 15(5): 304.

(收稿日期: 2014-04-02 修回日期: 2014-06-06)

爱婴医院复核师资培训班在京举办

本刊讯 2014年8月20—21日, 国家卫生计生委妇幼司在京举办爱婴医院复核师资培训班, 旨在推动爱婴医院复核工作科学规范开展, 提高妇幼健康服务管理工作水平。国家卫生计生委妇幼健康服务司司长张世琨出席培训班开班仪式, 并对爱婴医院复核工作作出部署。

张世琨指出, 爱婴医院复核工作是妇幼健康服务年的重要活动之一, 是促进妇幼健康服务监管全覆盖, 提高妇幼健康服务水平的重要手段。爱婴医院复核工作有利于降低孕产妇、儿童死亡率和剖宫产率, 提高母乳喂养率, 有利于全面提升爱婴医院服务质量, 有利于提高母婴健康水平。2014年启动的爱婴医院复核工作在三方面作出了重大创新: 一是扩展内涵, 由单纯的促进母乳喂养扩展到提升产儿科质量; 二是建立长效机制, 由原来的创建为主转变为每3年复核1次; 三是发挥社会监管作用, 向社会公示爱婴医院名单及电话, 主动接受社会监督。

对做好爱婴医院复核工作, 张世琨提出3点要求: (1) 从严评审。一定要突出一个“严”字, 要宁缺毋滥, 确保质量。对于真正达到标准要求的机构给予换牌, 对于不能达到标准要求或通过整改仍然不能达到标准要求的机构必须摘牌, 维护爱婴医院创建工作的严肃性。(2) 科学规范。各地在复核过程中, 要把握科学规范总原则, 细化复核标准, 统一复核尺度, 始终用一把尺子量到底, 层层严格把关, 绝不走过场, 保证爱婴医院复核工作的科学性和规范性。(3) 探索动态管理机制。对于已经荣获爱婴医院称号的医疗机构应当珍惜荣誉, 始终保持先进性; 对于尚未达标的医疗机构要改进和提高, 尽快达到爱婴医院标准, 及时给予爱婴医院称号; 对于疏于管理, 不能保持标准要求的, 要限期整改, 限期整改不到位的应予退出。各地要通过爱婴医院复核, 积极探索动态管理机制, 使爱婴医院真正成为光荣的品牌, 成为医护人员值得骄傲的品牌, 成为人民群众满意、信任的品牌。