

基于超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱的白花蛇舌草注射液主成分分析

张亚中

安徽省食品药品检验所, 安徽 合肥 230051

摘要: 目的 探讨全国范围内白花蛇舌草注射液物质基础的差异性。方法 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-QTOF-MS)对16批样品进行测定,对采集的数据以保留时间和质荷比作为变量,进行主成分分析(PCA)。结果 通过PCA发现不同企业生产的样品自身差异较小,相互之间差异较大;通过载荷图分析筛选出对分组影响比较大的7种标记物。结论 全国范围内不同厂家生产的白花蛇舌草注射液不仅颜色差异较大,其内在的物质基础也存在明显的差异,这种差异主要体现在黄酮类和有机酸类成分的量上。

关键词: 白花蛇舌草注射液;超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱;主成分分析;物质基础;黄酮类;有机酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)07-0829-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.011

Principal component analysis of Baihuasheshecao Injection by UPLC-QTOF-MS

ZHANG Ya-zhong

Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China

Abstract: Objective To study the difference of substantial base of Baihuasheshecao (*Hedyotis Diffusae Herba*) Injection (BSCI) within the nationwide. **Methods** To determine 16 batches of samples by UPLC-QTOF-MS and analyze the data according to a variety of retention time and m/z by principal component analysis (PCA). **Results** The results showed that the difference itself was smaller but between each other was bigger among the different enterprises. Seven markers greatly impacted on the components through loading plot analysis were found. **Conclusion** BSCIs from different enterprises within nationwide are not only obviously different in color but also different in substantial base, which especially indicates the content of flavonoids and organic acids.

Key words: Baihuasheshecao (*Hedyotis Diffusae Herba*) Injection; UPLC-QTOF-MS; principal component analysis; substantial base; flavonoids; organic acids

白花蛇舌草注射液为白花蛇舌草经提取制成的单味药灭菌水溶液,用于湿热蕴毒所致的各种感染,亦可用于癌症辅助治疗。国家食品药品监督管理局(SFDA)共批准了8个文号,2011年SFDA对全国范围内的白花蛇舌草注射液生产企业和流通领域进行了抽检,发现在市场流通的有吉林省通化振国药业有限公司、安徽凤阳科苑有限公司和江西天施康中药股份有限公司的产品。本次抽样批数为16批,均经过生产企业的确认。检验中发现不同厂家生产的白花蛇舌草注射液颜色差异较大。为了探讨其内在物质基础的差异性,本实验采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-QTOF-MS)法^[1-2]

对16批样品进行了测定,对采集到的数据以保留时间和质荷比作为变量,进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。

1 仪器与材料

Acquity UPLC™超高效液相色谱仪(Waters公司); Xevo G2 QTOF质谱仪和Marker Lynx XS数据处理工作站(Waters公司);色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。

乙腈(Merck, 色谱级);冰醋酸(Tedia, 色谱级);纯净水为Millie-Q纯水。

白花蛇舌草注射液:安徽凤阳科苑有限公司(批号101129-1、101129-2、110326、110325-1、110325-2);

收稿日期: 2012-09-22

基金项目: 国家食品药品监督管理局项目(中2011003046001)

作者简介: 张亚中,男,副主任中药师,研究方向为中药质量控制。Tel: (0551)3358053 E-mail: yazhongzhang@hotmail.com

网络出版时间: 2013-03-07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130307.1737.002.html>

吉林省通化振国药业有限公司(批号 110106、100907、110705、110704);江西天施康中药股份有限公司(批号 10110301、10010812、11010101、11031401-1、11031401-2、11020402、11051403)。

芦丁对照品(批号 100080-200707),中国食品药品检定研究院提供,质量分数为 90.5%;对香豆酸对照品(批号 11052132),上海同田生化有限公司提供,质量分数为 98.0%。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密量取白花蛇舌草注射液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,摇匀。

2.2 UPLC 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以 0.3%醋酸水溶液(A)-甲醇(B)为流动相,进行梯度洗脱:0~4 min, 95%~80% A; 4~8 min, 80%~70% A; 8~12 min, 70%~50% A;柱温 20 °C,体积流量 0.4 mL/min。

2.3 QTOF 条件

离子源为电喷雾电离源正离子模式(ESI⁺),毛细管电压为 3 kV,锥孔电压为 40 V,离子源温度为 120 °C,脱溶剂气温度为 350 °C,脱溶剂气流量为 600 L/h,碰撞能量低能量为 4 V,梯度高能量为 20~30 V,碰撞气体为氦气,扫描时间为 0.2 s,质量扫描范围 *m/z* 50~800,采集过程中采用亮氨酸脑啡肽进行实时质量数校准。

2.4 数据采集和分析

将全国范围内收集到的 16 批白花蛇舌草注射液样品制成供试品溶液,平行 3 份,每份进样 2 μL,以 Marker Lynx XS 应用软件对质谱数据进行分析。分析参数设定为保留时间 1~12 min,质量数范围为 *m/z* 50~800,质量数误差窗口设为 0.05,保留时间误差窗口设为 0.1 min,以保留时间和质荷比作为 1 个离子标识,离子强度大于 5 000 的峰作为研究对象进行峰提取,将所有提取离子进行 PCA 分析,结果见图 1。从上述 PCA 得分图可以看出,来自 3 个厂家的样品自然分成 3 组,其中安徽凤阳科苑有限公司(ky)产品聚类在一起,吉林省通化振国药业有限公司(zg)产品聚类在一起,江西天施康中药股份有限公司(tsk)产品聚类在一起。3 组能够明显区分开,表明 3 个厂家生产的样品自身差异较小,但相互之间差异较大。

为寻找到 3 个厂家生产的样品的主要差别,继

续对其载荷图进行分析,在 PCA 载荷图中,每一个点代表 1 个保留时间-精确质量数数据对,其中离原点越远的点,表明其对组间差异贡献越明显。结果见图 2。

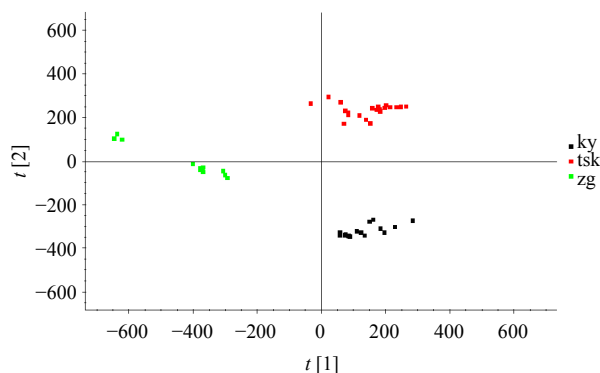


图 1 16 批样品的 PCA 得分图

Fig. 1 PCA scores of 16 bathes of samples

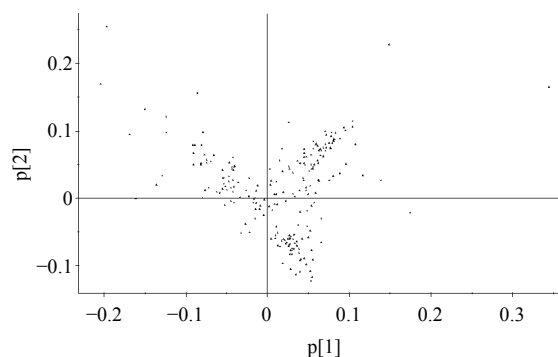


图 2 16 批样品的 PCA 载荷图

Fig. 2 PCA loading plot of 16 bathes of samples

利用 Waters 四级杆高分辨串联质谱的 MS^E(串联全信息数据扫描)功能,既可以得到母离子的精确质量数,同时也可以获得碎片离子的精确质量数。在此基础上,采用 Marker Lynx XS 应用软件中生成元素组成的功能,可对载荷图中不同保留时间的精确质量数自动批量进行元素组成分析。载荷图中各不同保留时间的相对分子质量以及可能的分子式均可以推测出来,筛选出远离原点的对分组影响比较大的标记物,结果见表 1。

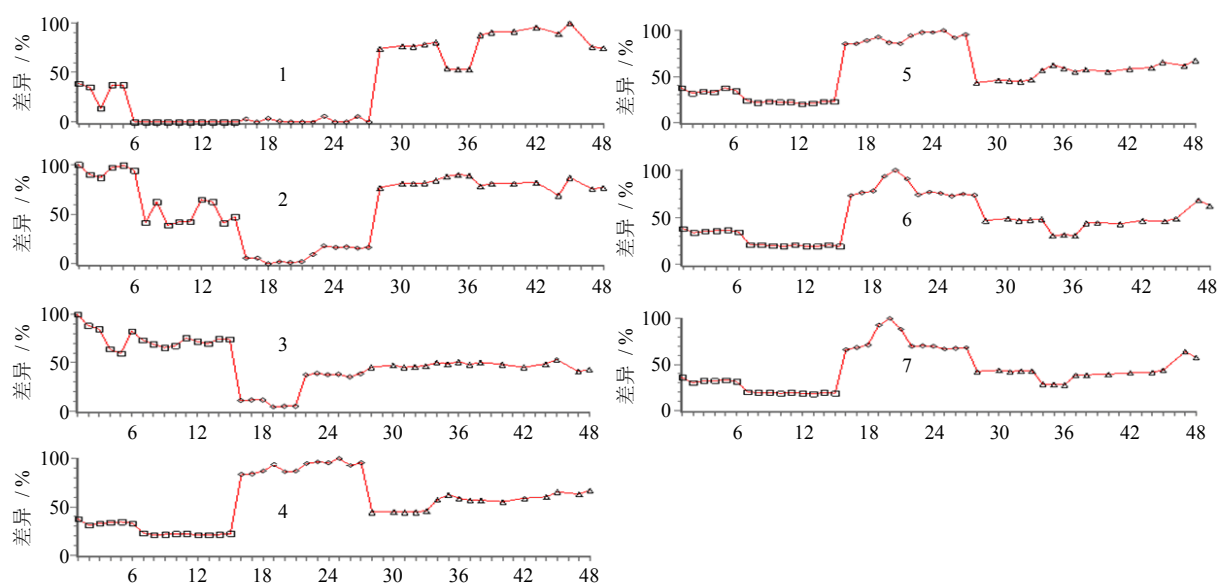
以不同批次的样品($n=3$)为横坐标,以样品中标记物的最高量为纵坐标,比较筛选出的差异化合物在 3 个厂家不同批次之间的差异,结果见图 3。标记物 1~3 的量吉林省通化振国药业有限公司产品明显低于安徽凤阳科苑有限公司和江西天施康中药股份有限公司产品,标记物 1~3 的 *m/z* 分别为 303.050 4、303.048 5、287.055 0,经推测并与槲皮素

表1 载荷图中对组间差异贡献较大的标记物

Table 1 Markers greatly impacted variations of loading plot

| 标记物 | <i>t</i> / min | <i>m/z</i> | 分子式 |
|-----|----------------|------------|--|
| 1 | 7.431 7 | 303.050 4 | C ₁₅ H ₁₁ O ₇ |
| 2 | 5.581 7 | 303.048 5 | C ₁₅ H ₁₁ O ₇ |
| 3 | 6.426 2 | 287.055 0 | C ₁₅ H ₁₁ O ₆ |
| 4 | 4.233 4 | 147.042 8 | C ₉ H ₇ O ₂ |
| 5 | 4.236 0 | 119.048 0 | C ₈ H ₇ O |
| 6 | 1.293 3 | 193.048 9 | C ₁₀ H ₉ O ₄ |
| 7 | 1.289 6 | 175.035 3 | C ₁₀ H ₇ O ₃ |

和山柰酚对照品的质谱图比较,发现 *m/z* 303.050 4 和 287.055 0 分别为槲皮素和山柰酚的 [M+H]⁺ 峰,而槲皮素和山柰酚为白花蛇舌草注射液中黄酮类成分的苷元,提示吉林省通化振国药业有限公司生产的白花蛇舌草注射液中黄酮类成分较少^[3-4]。标记物 4~7 的量吉林省通化振国药业有限公司产品明显高于安徽凤阳科苑有限公司和江西天施康中药股份有限公司产品,标记物 4 和 5 的 *m/z* 147.042 8 和 119.048 0,经推测并与对香豆酸对照品的质谱图比较,发现均为对香豆酸的主要碎片峰,提示吉林省通化振国药业有限公司生产的白花蛇舌草注射液



1~15-安徽科苑 16~27-吉林振国 28~48-江西天施康
1—15-Anhui Keyuan 16—27-Jilin Zhenguo 28—48-Jiangxi Tianshikang

图3 7种差异化合物在不同企业不同批次之间的差异趋势图

Fig. 3 Trend plots of seven markers in various batches from different enterprises

中有机酸类成分量较高。标记物 6~7 的 *m/z* 相差 18 (标记物 7 可能为标记物 6 的脱水化合物),具体成分还有待于进一步分析^[4]。

2.5 标记物的定量分析

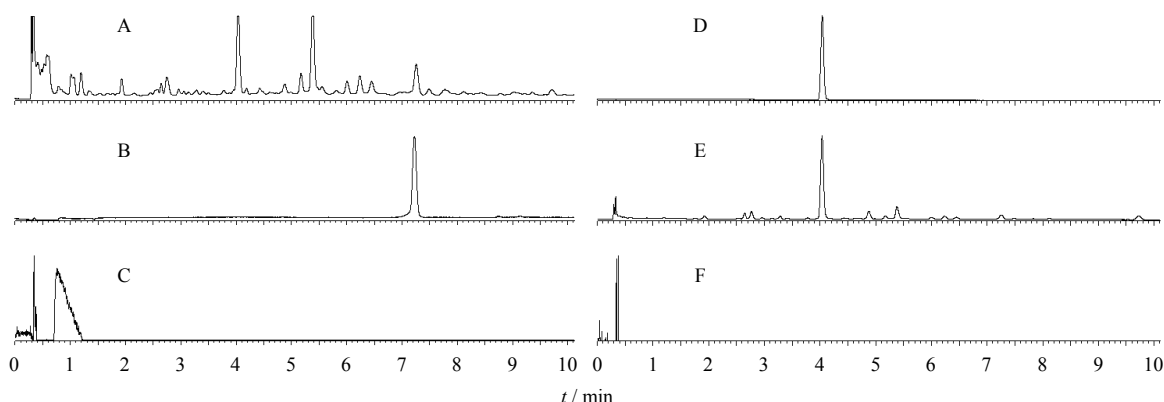
以芦丁(标记物 1 为芦丁的子离子)和对香豆酸(标记物 4 为对香豆酸的子离子)为对照,对 16 批样品进行测定。

2.5.1 色谱条件 见“2.2”项下,芦丁和对香豆酸的检测波长分别为 265、308 nm。

2.5.2 溶液制备 取芦丁和对香豆酸对照品适量,精密称定,用 50% 甲醇分别制成含芦丁 5.25 μg/mL、对香豆酸 16.78 μg/mL 的对照品溶液。供试品溶液的制备同“2.1”项下。

2.5.3 专属性试验 按处方组成,取除白花蛇舌草药材的辅料,按供试品溶液制备项下的方法制备阴性对照溶液。在上述色谱条件下,阴性对照溶液无干扰,见图 4。

2.5.4 线性关系考察 取芦丁对照品溶液 0.2、0.4、0.8、1.2、2.0、4.0、8.0 μL 或对香豆酸对照品溶液 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、4.0 μL,按“2.5.1”项色谱条件进样检测,以峰面积积分为纵坐标 (*Y*),芦丁或对香豆酸进样量 (ng) 为横坐标 (*X*) 进行线性回归,得回归方程:芦丁 $Y=78.715 X-36.931$ ($r=0.999 8$),对香豆酸 $Y=293.39 X+10.956$ ($r=0.999 996$),结果表明芦丁在 1.05~42.00 ng,对香豆酸在 1.68~67.12 ng 线性关系良好。



A-样品 (265 nm) B-芦丁对照品 C-缺白花蛇舌草的阴性对照品 (265 nm) D-对香豆酸对照品
E-样品 (308 nm) F-缺白花蛇舌草的阴性对照品 (308 nm)
A-sample (265 nm) B-rutin reference substance C-negative sample without *Hedyotis Diffusae Herba* (265 nm) D-*p*-coumaric acid reference substance E-sample (308 nm) F-negative sample without *Hedyotis Diffusae Herba* (308 nm)

图4 UPLC 色谱图

Fig. 4 UPLC chromatograms

2.5.5 精密度试验 精密量取芦丁和对香豆酸对照品溶液，注入液相色谱仪，连续进样5次，测定峰面积，结果芦丁和对香豆酸峰面积的RSD分别为0.8%、0.4%。

2.5.6 稳定性试验 取供试品溶液，在室温下放置，每隔一定时间后进样1次，进行测定，在24 h芦丁和对香豆酸峰面积的RSD分别为1.4%、0.3%。

2.5.7 重复性试验 取江西天施康中药股份有限公司的样品（批号10010812）6份，分别依法制成供试品溶液，测定芦丁和对香豆酸的量，芦丁的量为0.082 mg/mL，RSD为1.4%，对香豆酸的量为0.17 mg/mL，RSD为0.3%。

2.5.8 加样回收率试验 取江西天施康中药股份有限公司的样品（批号10010812）6份，每份0.5 mL，分别精密加入108.7 μg/mL芦丁对照品溶液0.3 mL、0.805 mg/mL对香豆酸对照品溶液0.1 mL，依法制成供试品溶液，测定芦丁和对香豆酸的量，计算回收率。结果芦丁的平均加样回收率为99.4%，RSD为2.6%，对香豆酸的平均加样回收率为99.8%，RSD为0.7%。

2.5.9 样品测定 取各批样品，依法制备供试品溶液，按上述色谱条件进样测定。16批样品中芦丁和对香豆酸的测定结果见表2。

由测定结果可知，全国范围内不同厂家生产的白花蛇舌草注射液不仅颜色差异较大，其内在的物质基础也存在明显的差异，这种差异主要体现在黄酮类和有机酸类成分的种类和量上。由此可见各生

表2 16批样品中芦丁和对香豆酸的测定结果

Table 2 Determination of rutin and *p*-coumaric acid in 16 batches of sample

| 批号 | 芦丁 / (mg·mL ⁻¹) | 对香豆酸 / (mg·mL ⁻¹) |
|------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 101129-1 | 0.025 | 0.076 |
| 101129-2 | 0.025 | 0.076 |
| 110326 | 0 | 0.032 |
| 110325-1 | 0 | 0.034 |
| 110325-2 | 0 | 0.033 |
| 110106 | 0 | 0.262 |
| 100907 | 0 | 0.469 |
| 110705 | 0 | 0.339 |
| 110704 | 0 | 0.341 |
| 10110301 | 0.072 | 0.164 |
| 10010812 | 0.082 | 0.171 |
| 11010101 | 0.057 | 0.273 |
| 11031401-1 | 0.089 | 0.232 |
| 11031401-2 | 0.094 | 0.233 |
| 11020402 | 0.090 | 0.243 |
| 11051403 | 0.068 | 0.282 |

产企业应尽快统一生产工艺，消除这种差异，为制订质量标准和安全用药提供保障。

3 讨论

本实验对UPLC色谱条件中的流动相组成进行了优化，考察了0.3%醋酸(A)-甲醇(B)、醋酸水溶液(pH 3.2)-甲醇(95:5)(A)-乙腈(B)和0.1%甲酸(A)-甲醇(B)3个流动相体系，体

系1和2峰型类似,考虑到体系2流动相A配制较复杂,体系3出峰时间较长,峰型无改善,故选择体系1的色谱条件。

供试品溶液的制备中分别考察了水、50%甲醇和甲醇作为供试品溶液制备的溶剂,结果表明50%甲醇和甲醇为溶剂的色谱峰峰形优于水,鉴于50%甲醇和甲醇作为溶剂时色谱峰峰形区别不大,50%甲醇和流动相的比例较为接近,故选择50%甲醇作为溶剂。

PCA是一种基本的处理复杂数据集的数值分类技术。目前这种统计技术已愈来愈多地应用于生物学、医学研究中,从多元数据集中提炼出有价值的信息,成为生物学、医学重要的分析工具。从分类过程来看,PCA能从多指标的数据中提取特征指标,简化数据,用较少的综合指标来解释初始较多指标所反映的事物特征,使分析得以简化^[5-8]。

参考文献

- [1] 杨亮,王宇光,梁乾德,等. 藜芦与人参配比毒性与生物碱类成分变化的相关性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1574-1579.
- [2] 马丽娜,张岩,陶遵威. 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 58-62.
- [3] 张海娟,陈业高,黄荣. 白花蛇舌草黄酮成分的研究 [J]. 中药材, 2005, 28(5): 385-387.
- [4] 陈伟成,顾大伟,张海,等. HPLC-TOFMS法对白花蛇舌草药材及其注射剂中化学成分的快速分离与鉴别 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(3): 292-296.
- [5] 张瑞杰,郭政,李霞,等. 主成分分析与聚类分析在民族分化研究中的应用比较 [J]. 中国卫生统计, 2002, 19(4): 201-203.
- [6] 王启帅,杨云,肖功胜,等. 北柴胡 HPLC-ELSD 指纹图谱的建立及色谱数据的分析 [J]. 中成药, 2011, 33(3): 373-378.
- [7] Ma S G, Dai Y. Principal component analysis based methods in bioinformatics studies [J]. *Brief Bioinform*, 2011, 12(6): 714-722.
- [8] Bober L, Koba M, Judycka-Proma U, et al. Pharmacological classification of drugs by principal component analysis applying molecular modeling descriptors and HPLC retention data [J]. *J Chromatogr Sci*, 2011, 49(10): 758-763.