

直接进样-质谱检测指纹图谱技术结合化学模式识别法研究杜仲的质量

赵 杨^{1,2}, 周 欣^{1,2*}, 龚小见^{1,2}, 栾庆祥^{1,2}

1. 贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001

2. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵州 贵阳 550001

摘 要: **目的** 利用直接进样-质谱检测指纹图谱技术结合化学模式识别法研究不同产地杜仲药材的质量。**方法** 样品经简单提取后, 不经色谱分离, 直接进入质谱仪进行分析, 产生的 m/z 100~1 000 的离子响应强度信息经预处理后由分析软件 Simca-P 进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)。**结果** 经 PCA 和 PLS-DA 分析得到的分布图将来源于不同产地的杜仲聚为 4 类, 反应了其化学成分的差异性; 通过载荷图则可发现在分类过程中起决定作用的化学标记物。**结论** 该方法作为一种极具特点的指纹图谱分析技术, 可以被广泛用于药材的真伪鉴别、基源鉴定及不同产地药材的快速判别研究。

关键词: 直接进样-质谱检测指纹图谱技术; 化学模式识别法; 杜仲; 主成分分析; 偏最小二乘法判别分析

中图分类号: R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)19-2844-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.022

Study on quality of *Eucommiae Cortex* using flow injection-mass spectrometric fingerprinting method combined with chemical pattern recognition approaches

ZHAO Yang^{1,2}, ZHOU Xin^{1,2}, GONG Xiao-jian^{1,2}, LUAN Qing-xiang^{1,2}

1. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guiyang 550001, China

2. The Research Center for Quality Control of Nature Medicines, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To study the quality of *Eucommiae Cortex* from different resources using flow injection mass spectrometric fingerprinting (FIMS) method combined with chemical pattern recognition approaches. **Methods** Different *Eucommiae Cortex* samples were extracted in a simple way and were directly injected into the mass spectrometer for the analyses with no column used. Based on the intensities of the ions at m/z 100—1 000, principal components analysis and partial least square discrimination analysis were performed using Simca-P software. **Results** *Eucommiae Cortex* samples from different resources were classified into four clusters in scores plot, and the biomarkers which played the most important roles in classification were screened out. **Conclusion** As a novel and characteristic fingerprinting method, FIMS can be widely and efficiently used in true or false identification, identification of origins, and rapid discrimination of herbs from different regions.

Key words: flow injection-mass spectrometric fingerprinting method; chemical pattern recognition approaches; *Eucommiae Cortex*; principal components analysis; partial least square discrimination analysis

杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮。4~6 月剥取, 刮去粗皮, 堆置“发汗”至内皮呈紫褐色, 晒干。杜仲具有补肝肾, 强筋骨、安胎之功效, 用于肝肾不足、腰膝酸痛、筋骨无力、头晕目眩、妊娠漏血、胎动不安^[1]。杜仲主产于四川、陕西、湖北、湖南、云南、河南等

地。关于其道地性, 文献中有不同的记载, 其被认为是贵州^[2]、河南^[3]及陕西^[4]的道地药材。众所周知, 道地药材是指在特定自然条件、生态环境的地域内所产的药材, 因生产较为集中, 栽培技术、采收加工也都有一定的讲究, 以致较在其他地区所产者同种药材品质佳、疗效好。

收稿日期: 2014-03-16

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目 (黔科合 ZY 字 [2012] 3003 号); 贵阳市科技计划项目 (筑科合同 [2012204] 22 号); 贵州省药物分析研究科技创新人才团队项目 [黔科合人才团队 (2011) 4008]

作者简介: 赵 杨 (1982—), 男, 副研究员, 博士, 主要从事中药及功能食品质量控制及体内外代谢研究。

Tel: (0851)6700494 E-mail: bestyangzhao@gmail.com

***通信作者** 周 欣 (1962—), 女, 教授, 博士。Tel: (0851)6700494 E-mail: alice9800@sina.com

指纹图谱已经被广泛用于中药材的质量控制研究当中,在中药现代化进程中起到了至关重要的作用^[5]。用不同的色谱分离手段及检测器,可以得到不同的指纹特征。直接进样-质谱检测指纹图谱技术是一种新颖、快速、极为方便及高效的指纹图谱技术^[6-9],它不需要进行样品的色谱分离,样品进行提取、滤过以后,由液相色谱直接导入质谱仪进行分析,在1~2 min即可得到样品的总离子流图和质谱信息。由质谱得到的原始数据经预处理以后,导入Simca-P软件进行主成分分析(PCA)和偏小二乘法判别分析(PLS-DA),可以直观、深入地分析药材质量,通过化学判别式的建立以及化学标记物的选择预判未知样品的分类信息。

本研究采用直接进样-质谱检测指纹图谱技术结合化学模式识别法快速分析、检测不同产地杜仲药材,以其质量稳定性为出发点,判断贵州产杜仲药材的道地性。

1 材料

1.1 仪器与药材

Thermo Fisher TSQ Quantum 液相色谱-质谱联用仪(美国赛默飞世尔科技有限公司)。液相色谱部分为Accela 1250超高效液相色谱仪,包括Accela

1250 PDA检测器,Accela HTC PAL自动进样器,Accela 1250输液泵。质谱部分包括:三重四级杆质量分析器,ESI离子源,Xcalibur工作站。

AL 204型十万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);KQ 5200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TGL-16M台式高速冷冻离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司);微量移液器(德国Eppendorf公司)。

本实验收集了贵州省内不同产地的杜仲药材22批,经贵阳中医学院孙庆文副教授鉴定为杜仲*Eucommia ulmoides* Oliv.的干燥树皮,药材详细信息见表1。乙腈(美国TEDIA公司)、甲醇(美国TEDIA公司)及甲酸(美国Roe Scientific Inc.公司)均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈保护柱;流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液(50:50)等度洗脱,体积流量0.2 mL/min;进样量为5 μL,每个样品平行进样5次,每次分析时间为2 min。

2.2.2 质谱条件 采用ESI离子源,在正离子模式与负离子模式下分别采集数据。数据采集范围 m/z

表1 22批不同来源杜仲药材详细信息

Table 1 Detailed information of 22 different *Eucommiae Cortex* samples

编号	来源	纬度(N)	经度(E)	海拔 / m
1	贵阳市花溪区党武乡龙井村	26°22'18.60"	106°34'16.60"	1 218
2	毕节市黔西县中坪镇	27°17'23.04"	106°30'32.53"	1 284
3	毕节市威宁县二屯镇艾家坪村	26°73'67.20"	104°58'46.17"	2 381
4	毕节市威宁县金钟镇	26°45'23.00"	104°26'24.00"	2 350
5	毕节市七星关区朱昌镇	27°17'59.32"	105°31'51.60"	1 654
6	毕节市威宁县小海镇松山村	27°03'24.38"	105°13'32.72"	2 176
7	贵阳市小河区药用植物园	未知	未知	未知
8	贵阳市花溪区高坡乡	未知	未知	未知
9	四川杜仲(1)	未知	未知	未知
10	毕节市	未知	未知	未知
11	四川杜仲(2)	未知	未知	未知
12	六盘水市水城	未知	未知	未知
13	毕节市大方县	未知	未知	未知
14	黔西南州	未知	未知	未知
15	贵州野生杜仲	未知	未知	未知
16	安顺市关岭(1)	未知	未知	未知
17	毕节市金沙县	未知	未知	未知
18	安顺市关岭(2)	未知	未知	未知
19	遵义市	未知	未知	未知
20	实验室自留	未知	未知	未知
21	黔西南州普安县江西坡镇	25°80'68.59"	105°04'09.17"	1 524
22	黔西南州普安县盘水镇文笔村	25°47'01.80"	104°58'07.41"	1 599

100~1 000。质谱参数：喷雾电压 3 kV；喷雾电流 5 μ A；鞘气压力 414 kPa；辅助气体流量 20 L/min；毛细管温度 300 $^{\circ}$ C；毛细管电压 35 V/-35 V；套管透镜补偿电压 176 V/-176 V。

2.2 样品处理方法

22 批药材经过干燥后，粉碎，收集于样品袋中密封干燥保存。取杜仲药材粉末样品 0.100 0 g，精密称定，置于 15 mL 离心管中，加入 5.0 mL 甲醇-水溶液（50：50），室温下超声提取 60 min，提取液于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液过 0.22 μ m 微孔滤过，即得。

2.3 直接进样-质谱检测指纹图谱的数据采集

样品经高效液相色谱仪自动进样系统吸取，通过 C_{18} 预柱滤除杂质（以减少对质谱检测器的污

染），不经色谱柱分离直接进入质谱检测器检测。在样品的检测过程中，采用全扫描模式，扫描范围为 m/z 100~1 000，每个样品平行进样 5 次。

2.4 数据处理

由质谱响应离子强度与化合物质荷比组成的数据经 Xcalibur 软件处理后导入 Excel 办公软件，经多元数据分析软件 Simca-P 11.5（瑞典 Umetrics 公司）进行 UV 标度化预处理后，进行 PCA 和 PLS-DA 分析，对杜仲药材进行质量评价和判别。

3 结果与分析

3.1 杜仲直接进样-质谱检测指纹图谱直观分析

实验对 22 批不同来源杜仲药材进行了直接进样-质谱检测指纹图谱分析，药材在正、负模式下的总离子流图及质谱图见图 1。

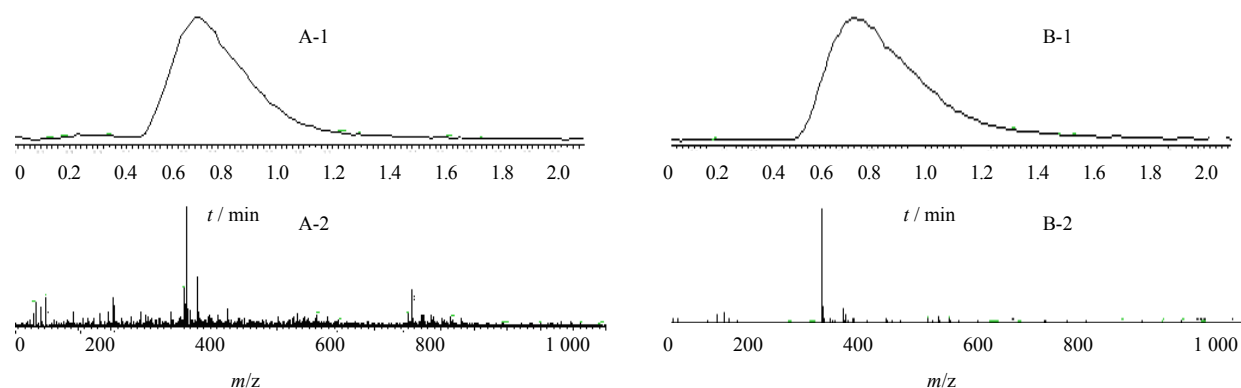


图 1 正 (A) 和负 (B) 模式下杜仲药材的总离子流图 (1) 及质谱图 (2)

Fig. 1 TIC (1) and MS (2) of *Eucommiae Cortex* sample in positive (A) and negative (B) modes

本研究中，样品不通过色谱柱进行分离，经保护柱滤除杂质以后直接进行质谱分析，每次分析只需 1.5~2.0 min。正、负离子模式下，药材质谱图给出不同离子信息。负离子模式下，质谱图离子信息相对简单，响应强度较高的主要为 m/z 341.02、372.99、518.93、502.91、191.14 等离子；正离子模式下，质谱离子信息较丰富，响应强度较高的离子主要集中在 m/z 100~750，除了 m/z 365.05 和 381.04 这 2 个强度最高的离子以外， m/z 104.16、150.16、252.73、360.11、705.03 及 720.96 等离子也出现较高的响应强度。

与其他指纹图谱技术相比，直接进样-质谱检测指纹图谱技术最大、最具优势的特点就是可实现对大量样品的快速分析。本实验对 22 批杜仲药材的一次分析仅需 44 min，即在 1 h 内即可完成 22 批杜仲药材的质谱分析。通过质谱数据的直观分析，可以快速发现不同产地杜仲药材在正、负离子模式下给

出的共有信息及不同药材所含有的差异较大的离子信息。当然，分析时间仅为 2 min 的总离子流图中含有大量的离子信息，仅仅靠直观分析不能科学、完整地揭示药材之间的异同点，进一步的深入分析需要借助专业软件。为了增加分析数据的可靠性，本实验的样本平行分析 5 次。

3.2 PCA

以 m/z 100~1 000 的 901 个离子（取整数）的离子强度为变量，对 110 (22 $\times$ 5) 个样本进行 PCA。分别以前 2 个和前 3 个主成分建立坐标系进行投影，即可得到所有样本的在二维平面，结果见图 2。

图 2 是正模式下杜仲药材在二维平面上的得分投影图，为了便于描述，将得分图分为 4 个象限。1 象限位于 PC1 的负半轴，PC2 的正半轴，分布在这个象限的样品在 PC1 上的得分值小于 0，在 PC2 上的得分值大于 0；2 象限位于 PC1 和 PC2 的正半轴，分布在这个区的样品在 PC1 和 PC2 上的得分值都大

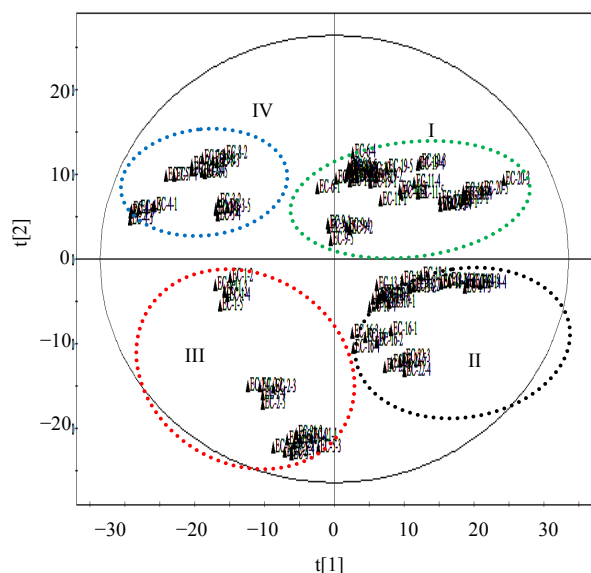


图2 正离子模式下杜仲药材 PCA 在二维平面中的得分投影图

Fig. 2 PCA 2D scores plot of *Eucommiae Cortex* samples base on data in positive mode

于0; 3象限位于PC1和PC2的负半轴,分布在这个象限的样品在PC1和PC2上的得分值都小于0; 4象限位于PC1的正半轴,PC2的负半轴,分布在这个象限的样品在PC1上的得分值大于0,在PC2上的得分值小于0。由图2可以看出,来源于不同产地的22批杜仲药材分别位于I、II、III、IV 4个不同的区域,其中编号为10、13、14、16、18、22 6个产地药材集中于II号区域,分布于得分图的第4象限;编号为1、2、5、21的4个产地杜仲药材集中于III号区域,分布于得分图的第3象限;3、4、7、8的4个产地杜仲集中于IV号区域,分布于得分图的第1象限;其余来源的杜仲药材集中于I号

区域,分布于得分图的第2象限。

从药材在PC1和PC2的得分上来看,区域I中的杜仲药材在2个主成分上的得分值都大于0,分布于这个区域的所有杜仲药材中,20和9号药材分别得到最高和最低的PC1值,6和9号药材分别得到最高和最低的PC2值;分布于区域II中的所有杜仲药材在PC1上的得分值都大于0,在PC2上的得分值都小于0,14和16号药材分别得到最高和最低的PC1得分值,18和22号药材分别得到最高和最低的PC2得分值;同理,分布于区域III中的所有杜仲药材在PC1和PC2上的得分值都小于0,5号和21号药材在PC2上的得分值最低,在PC1上的得分值最高,1号药材得到最高的PC2值和最低的PC1值;区域IV中的所有杜仲药材在PC2上的得分值都大于0,在PC1上的得分值都小于0,该区域中,4号药材得到最低的PC1和PC2值,3和8号药材分别得到最高的PC1和PC2值。由于药材在得分图上4个象限的PC1和PC2的得分差异,使得集中于I、II、III、IV 4个不同区域的药材在得分图上的得分不同,导致22批杜仲药材的分布情况及各批次药材之间存在相似性或差异性。

3.3 PLS-DA

在正离子模式下PCA分类信息的基础上,以 m/z 100~1 000的901个离子(取整数)的离子强度为变量,对110(22×5)个样本进行PLS-DA,使组内差异最小化,组间差异最大化。结果见图3。

图3是正离子模式下杜仲药材PLS-DA在二维平面上的得分图,其象限划分与PCA时的划分一致。由图3可以看出,来源于不同产地的22批杜仲药材分别位于I、II、III、IV 4个不同的区域,其中

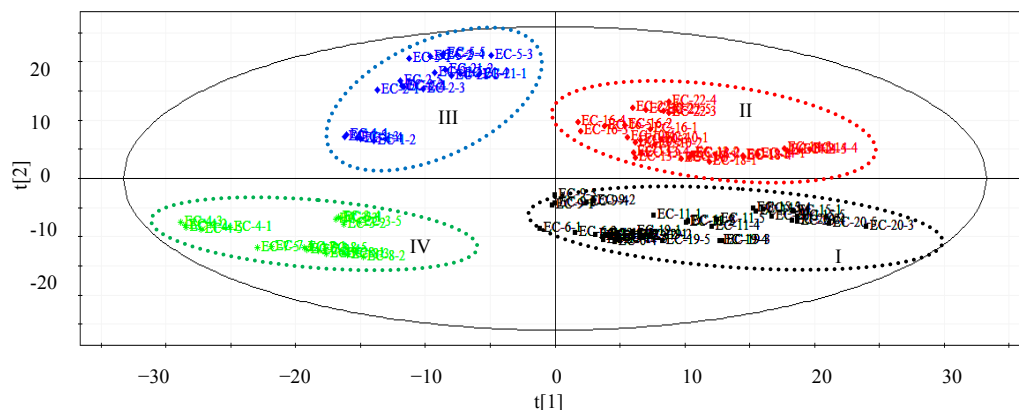


图3 正离子模式下杜仲药材 PLS-DA 在二维平面中的得分投影图

Fig. 3 PLS-DA 2D scores plot and 3D scores plot of *Eucommiae Cortex* samples based on data in positive mode

编号为 10、13、14、16、18、22 的 6 个产地的杜仲药材集中于 II 号区域，分布于第 2 象限；编号为 1、2、5、21 的 4 个产地的杜仲药材集中于 III 号区域，分布于第 1 象限；编号为 3、4、7、8 的 4 个产地的杜仲药材集中于 IV 号区域，分布于第 3 象限；其余产地的药材集中于 I 号区域，分布于第 4 象限。

从正离子模式下杜仲药材 PLS-DA 的结果可以看出，与 PCA 分析相比，虽然药材分布在不同象限，但药材的分布更为集中，通过组间数据的差异最大化以及组内数据的差异最小化，来源于不同产地的杜仲药材由于化学成分的差异，得到了更好地分类（组间）与聚集（组内）。通过该分类，可以轻松、客观地分析未知杜仲药材的化学成分及其组别。

3.4 化学标记物筛选及分析

通过 PLS-DA 可以看出，含有相同化学成分或化学成分量相近的杜仲药材被聚为一类，各组内样本点聚集较好，而含有不同化学成分或化学成分量相差较大的杜仲药材在得分图上离得较远。为了发现这些在分类中起决定性作用的化学标记物，通过载荷图对数据进行了进一步分析，见图 4 和表 2。

表 2 在杜仲分类过程中起决定作用的特征离子

Table 2 Characteristic ions in loadings plot which play important roles in classification of <i>Eucommiae Cortex</i> samples					
序号	特征离子 (<i>m/z</i>)	VIP 值	序号	特征离子 (<i>m/z</i>)	VIP 值
1	153	2.11	9	354	1.53
2	356	1.82	10	252	1.40
3	237	1.75	11	255	1.35
4	360	1.68	12	157	1.30
5	253	1.66	13	296	1.26
6	366	1.60	14	256	1.23
7	365	1.60	15	589	1.21
8	362	1.56	16	160	1.16

得到的离子，它们对样品分类的贡献可以通过在因子载荷图上的位置来判断。那些在因子载荷图上比较分散的离子对药材分类的贡献比较大，在药材分类中起主要作用，称之为特征离子。表 2 列出变量重要性投影（VIP）值大于 1.0 的特征离子，共有 16 个，这些离子可以作为化学标记物帮助用于杜仲药材的质量控制（图 4）。

4 讨论

本实验首次运用直接进样质谱检测指纹图谱技术对来源于不同产地的杜仲药材进行了分析。其原理是基于药材提取物在质谱中 *m/z* 100~1 000 的离

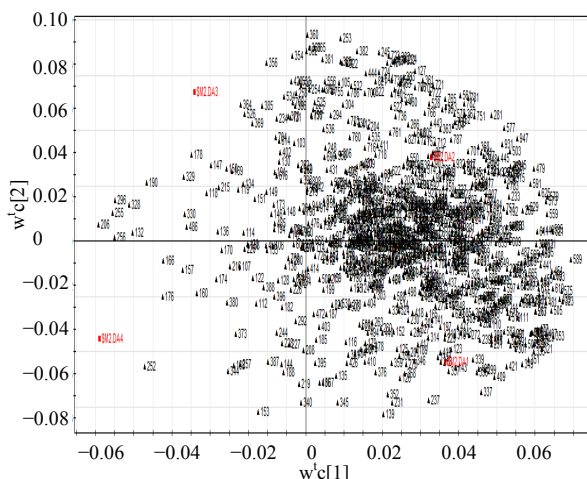


图 4 杜仲药材 PLS-DA 因子载荷图

Fig. 4 PLS-DA loadings plot of *Eucommiae Cortex* samples

图 4 是正离子模式下杜仲药材 PLS-DA 得到的二维载荷图，该图反映了各变量对不同产地杜仲药材在得分图上分布的影响。在因子载荷图上，每一个变量都体现出了其对杜仲药材在得分图上得分的贡献，分布越密集的区域对药材分类的影响越小。反之，离密集区越远的变量对药材分类的影响越大。在本研究中，变量就是杜仲药材提取物直接进样而

子响应强度为变量进行分析，该方法的最大特点是样品经简单提取处理后，不经色谱柱分离直接进入质谱仪器进行检测，可以在短时间内对大量样本进行分析，在药材的真伪鉴别、基源鉴定及不同产地药材的快速判别方面具有其他指纹图谱技术不可取代的优点，为中药质量评价提供了新的思路与方法。

通过质谱检测，得到的离子信息数据经过预处理后，采用 Simca-P 等软件进行 PCA 和 PLS-DA。得到的 2D 得分图直观地提供不同产地杜仲药材的分类信息，快速实现不同产地杜仲药材化学信息的可视化。而因子载荷图则直观分析那些在药材分类

过程中起决定作用的变量,将这些变量视为化学标记物,化学标记物的发现可以用于杜仲药材的质量控制。

结合药材来源信息及PCA和PLS-DA的结果可以看出,杜仲的分类不仅跟产地有一定的相关性,还可能与它的生长年限、光照、海拔、温度、湿度、气候等因素有一定的相关性。贵州产杜仲药材的质量均一,仅个别产地(毕节市黔西县中坪镇、毕节市七星关区朱昌镇、黔西南州普安县江西坡镇)的药材与省内其他产地药材有差异性,然而这3个产地的药材与其他省内产地的药材在生长环境和地理环境没有很大差异,很有可能是药材的生长年限不同,使其化学成分的积累不同,导致分类的不同。

道地药材,即地道药材,也就是其功效地道实在,确切可靠。作为中药工作者,是否考虑过在除了以“疗效好”作为道地性验证的标准以外,采用其他方法证明药材的道地性。本研究采用直接进样-质谱检测指纹图谱技术结合化学模式识别法快速分析、检测不同产地杜仲药材,以其质量稳定性为出发点,判断贵州产杜仲药材的道地性。

本实验所收集的杜仲药材在产地、数量等方面的信息量还不够全面,以至于在模式识别应用中数据量不够丰富,还不能达到完全预期的效果,在将来的进一步研究中还要加以改进和完善。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 王世清, 刘绍欢, 徐茂茂, 等. 《中药鉴定学》创新性实验方法探讨研究—贵州省道地药材天麻、杜仲、吴茱萸的真伪鉴别与质量评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(10): 9-11.
- [3] 吴立明, 陈洪群, 程晓卫. 南阳“八大宛药”四性的文献研究 [J]. 国医论坛, 2012, 27(5): 36-38.
- [4] 刘永福. 陕西道地药材杜仲本草考证及资源 [J]. 陕西中医, 1995, 16(11): 518-519.
- [5] 黄 洋, 邵慧凯, 路 丽, 等. 不同采收期小叶榕叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 271-275.
- [6] Chen P, Harnly J M, Peter de B, *et al.* Flow injection mass spectroscopic fingerprinting and multivariate analysis for differentiation of three *Panax* Species [J]. *J AOAC Int*, 2011, 94(1): 90-100.
- [7] Chen P, Lin L Z, Harnly J M. Mass spectroscopic fingerprinting method for differentiation between *Scutellaria lateriflora* and the Germander (*Teucrium canadense* and *T. chamaedrys*) Species [J]. *J AOAC Int*, 2010, 93(4): 1148-1155.
- [8] Zhao Y, Sun J, Yu L L, *et al.* Chromatographic and mass spectrometric fingerprinting analyses of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels-derived dietary supplements [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(13): 4477-4485.
- [9] Zhao Y, Niu Y G, Xie Z H, *et al.* Differentiating leaf and whole-plant samples of di- and tetraploid *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino using flow-injection mass spectrometric fingerprinting method [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5: 1288-1297.