

基于液质指纹图谱和化学模式识别的注射用益气复脉（冻干）质量综合评价研究

褚延斌^{1,2}, 苏小琴^{2,3}, 周学谦^{2,3}, 李德坤^{2,3}, 余伯阳¹, 鞠爱春^{2,3*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402

3. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300402

摘要: 目的 采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术建立注射用益气复脉（冻干）（YQFM）的指纹图谱, 为直观、简便、全面地评价其质量提供依据。方法 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸水体系梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 5 μL; 质谱检测采用负离子 ESI 模式, 电压 2.5 kV, 离子源温度 100 ℃, 雾化气温度 400 ℃, 雾化气流量 800 L/h。选择基峰离子流色谱图 (BPC) 进行指纹图谱研究, 并计算相似度。同时将指纹图谱共有峰的数据以预处理后的离子响应强度为变量, 导入 SPSS 19.0 软件, 进行聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA), 并由分析软件 Simca-P 12.0 作图。结果 首次建立了 YQFM 的 UPLC-Q-TOF-MS^E 指纹图谱, 并确定了 18 个共有峰, 其中 15 个来自红参, 3 个来自麦冬; 根据对照品和参考文献定性指认了其中 16 个色谱峰; 28 批 YQFM 的相似度均在 0.970 以上。聚类分析结果为当欧氏距离平方和为 5~10 时, 28 批 YQFM 样品可以聚为 4 类; 主成分降维提取了 7 个主成分, 反映了原变量 84.989% 的信息, 通过拟合归纳第 1 主成分的载荷因子模型, 筛选出对样品质量影响较大的 10 种标记物。结合主成分得分构建了不同批次 YQFM 综合评价函数: $Y=0.420\ 3\ PC_1+0.133\ 8\ PC_2+0.084\ 2\ PC_3+0.064\ 4\ PC_4+0.061\ 1\ PC_5+0.046\ 1\ PC_6+0.040\ 0\ PC_7$, 并对各批次综合得分进行了排序, 28 批供试样品中, S28 综合得分最高, 其次为 S22、S11 和 S9, S14 和 S13 的综合得分最低。结论 UPLC-Q-TOF-MS^E 指纹图谱结合化学模式识别可以对 YQFM 的质量进行客观、有效地评价, 为其质量控制提供科学依据。

关键词: 注射用益气复脉（冻干）; UPLC-Q-TOF-MS^E; 指纹图谱; 化学模式识别; 聚类分析; 主成分分析; 相似度

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)10-2410-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.024

Comprehensive evaluation of Yiqi Fumai Injection quality by UPLC-Q-TOF-MS^E fingerprint and chemical pattern recognition

CHU Yan-bin^{1,2}, SU Xiao-qin^{2,3}, ZHOU Xue-qian^{2,3}, LI De-kun^{2,3}, YU Bo-yang¹, JU Ai-chun^{2,3}

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300402, China

3. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300402, China

Abstract: Objective To establish a UPLC-Q-TOF-MS^E fingerprint of Yiqi Fumai Injection (YQFM) for providing reference for visual, easy and overall control of its quality. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid for gradient elution. The flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was 30 ℃. The capillary voltage was set at 2.5 kV. The nebulization gas was set to 800 L/h at 400 ℃, and the source temperature was 100 ℃. The BPC obtained with negative ion ESI mass spectra were selected for the fingerprint analysis. Similarity evaluation was used to evaluate the quality of YQFM from different batches. Based on the intensities of the ions for common peaks, HCA and PCA were performed using SPSS 19.0 and Simca-P software. **Results** The UPLC-Q-TOF-MS^E fingerprint of YQFM was established by using 28 batches of sample and 18 common peaks were found, of which

收稿日期: 2017-12-14

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2013ZX09402202); 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设项目 (17PTSYJC00090)

作者简介: 褚延斌, 在读硕士, 研究方向为中药质量评价研究。E-mail: chuybin@163.com

*通信作者 鞠爱春, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂的工艺及质量控制。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

15 mutual peaks from *Ginseng Radix et Rhizoma rubra*, three mutual peaks from *Ophiopogonis Radix*. Compared with the reference substances and references, 16 of the common peaks were identified and the similarity of 28 batches samples were over 0.970. 28 batches of YQFM could be divided into four grades when the sum of squared Euclidean distance is 5—10 in the result of HCA; PCA got seven principal components through dimension reduction and accumulative contribution rate reached 84.989%. By fitting the load factor model of the first principal component, ten markers greatly impacting on the quality were found. The comprehensive evaluation function of YQFM in different batches was constructed according to the principal component score. Among 28 batches of YQFM, the comprehensive score of S28 was the best, closely followed by S22, S11 and S9, while S14 and S13 was the worst. **Conclusion** The utilization of UPLC-Q-TOF-MS^E fingerprint coupled with chemical pattern recognition could objectively and effectively assess the quality of YQFM, can provide a more comprehensive reference for the quality control of YQFM.

Key words: Yiqi Fumai Injection ; UPLC-Q-TOF-MS^E; fingerprint; chemical pattern recognition; hierarchical clustering analysis; principle component analysis; similarity

注射用益气复脉(冻干)(YQFM)来源于古方生脉散,由红参、麦冬和五味子3味中药组成,具有益气复脉、养阴生津之功效,临床主要用于治疗冠心病心绞痛^[1]、冠心病慢性心力衰竭^[2-3]等。研究表明,YQFM的化学成分主要为人参皂苷类、木脂素类^[4-5],另外还有糖类、氨基酸及微量元素等^[6],已有文献报道其多成分的质量控制方法^[7-8]。

中药指纹图谱是评价中药及其制剂整体质量的有效手段,已得到广泛应用^[9]。其中HPLC-UV/DAD是最为成熟的指纹图谱分析方法^[10-11]。目前,YQFM指纹图谱的研究也采用此法^[12-13]。但由于中药含有多种类型化合物,其中部分化合物紫外吸收较弱或无紫外吸收,这些化合物在HPLC-UV/DAD指纹图谱上无法得到体现,从而造成指纹图谱信息不完全等问题。近年来随着分析科学的发展,新的分析技术已被广泛应用于指纹图谱的研究^[14-16],这对中药及其制剂的质量控制具有重要的意义。集合了UPLC快速高效色谱分离能力和Q-TOF高分辨率、高灵敏度优点的超高效液相色谱串联四极杆飞行时间全信息质谱(UPLC-Q-TOF-MS^E),已成为中药活性成分研究最有效的分析手段^[17-18],与传统的LC/TOF-MS/MS相比,MS^E采集模式具有更高的灵敏度,同时也能够确保数据的全面性。

中药指纹图谱是一种综合的、可量化的手段,其中潜藏着大量可以反映中药内在化学物质信息的数据和变量,对其进行识别、挖掘和评价具有重大意义。但目前所采用的中药指纹图谱相似度评价系统,不能立体、多维地对其进行整体分析,很难反映中药内在真实质量。化学模式识别(chemical pattern recognition)技术是根据物质所含化学成分信息,用计算机对其进行分类或描述,其能够较好地迎合指纹图谱整体性和模糊性的要求,可对中药

指纹图谱信息进行多维综合分析,实现数据降维、识别、分类等功能,该技术已广泛应用于中药及其制剂的质量控制研究中^[19]。

本实验首次采用UPLC-Q-TOF-MS^E技术,建立YQFM的指纹图谱,结合药材化学成分相关文献及对照品信息,对其共有色谱峰进行鉴定,并对各成分进行药材归属。运用中药指纹图谱相似度评价系统对其进行相似度评价;运用化学模式识别技术对共有峰所包含的离子响应强度进行聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA),最后结合各自结论对YQFM的质量进行综合评价,为其质量的一致性和稳定性评价提供科学依据。

1 仪器与材料

AcquityTM UPLC超高效液相色谱系统, Synapt G2 Q-TOF-MS质谱系统, MassLynx V4.1质谱工作站, Acquity UPLC HSS T3色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),美国Waters公司; KQ-500DE型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; XS105型十万分之一天平,梅特勒-托利多仪器有限公司。

水为超纯水, Milli-Q型超纯水系统,德国Millipore公司; 甲醇、乙腈, 质谱纯, 德国Omni公司; 甲酸, 质谱纯, 美国Sigma公司; 其余试剂均为分析纯。对照品人参皂苷 Rg₁ (Rg₁, 批号110703-201530, 质量分数为91.7%)、人参皂苷 Rg₃ (Rg₃, 批号110804-201504, 质量分数99.5%)、人参皂苷 Re (Re, 批号110754-201525, 质量分数为92.3%)、人参皂苷 Rf (Rf, 批号111719-201505, 供鉴别用)、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁, 批号110704-201424, 质量分数为93.7%)、人参皂苷 Ro (Ro, 批号111903-201604, 供鉴别用)、人参皂苷 Rb₂ (Rb₂, 批号111715-201203, 质量分数为93.8%)、人参皂苷 Rd (Rd, 批号111818-201302, 质量分数

为 94.2%), 均购自中国食品药品检定研究院; 人参皂苷 Rc (Rc), 批号 11021-14-0, 购自成都德思特生物技术有限公司, 经 HPLC 面积归一化法测定, 质量分数 > 98%。

28 批 YQFM, 依次编号为 S1~S28, 红参提取物、麦冬提取物、五味子提取物均由天津天士力之骄药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

称取 Rg₁、Rg₃、Re、Rf、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd、Ro 对照品适量, 精密称定, 分置 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶解, 定容至刻度。再分别吸取各对照品溶液 0.1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇制成质量浓度约为 20 μg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.2 供试品溶液的制备

称取 YQFM 约 100 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入适量超纯水, 超声使其溶解, 放冷至室温后用 70% 甲醇定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。称取红参、麦冬、五味子提取物各 100 mg, 按上述方法制备供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 30 °C, 样品室温度 4 °C。流动相为乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 0~1 min, 2% 乙腈; 1~4 min, 2%~25% 乙腈; 4~8 min, 25%~35% 乙腈; 8~12 min, 35%~45% 乙腈; 12~16 min, 45%~75% 乙腈; 16~18 min, 75% 乙腈; 18~20 min, 75%~90% 乙腈; 进样量 5 μL, 体积流量 0.3 mL/min。

2.4 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式, 数据格式为 Centroided, 毛细管电压 2.5 kV, 锥孔电压 45 V, 提取锥孔电压 4 V, 离子源温度 100 °C, 脱溶剂气体 (N₂) 温度为 400 °C, 脱溶剂气体流量 800 L/h, 锥孔气流量 50 L/h, 采集频率 0.1 s。MS^E 扫描模式检测, 低能量扫描时碰撞能量为 6 eV; 高能量扫描时碰撞能量为 30~50 eV, 质量扫描范围 *m/z* 100~1 800。用亮氨酸脑啡肽作为内标 (Lock SprayTM) 进行质量实时校正, 体积流量为 5 μL/min。

2.5 方法学考察

通过正、负离子模式比较, 结果发现在负离子模式下各成分具有更高的响应强度和更明确的质谱信息, 故选定在负离子模式下基峰离子流色谱图

(BPC) 中占峰总面积百分比在 90% 以上的 18 个共有色谱峰作为主要色谱峰进行方法学考察。

2.5.1 专属性试验 精密吸取空白溶液 (70% 甲醇)、对照品溶液及供试品溶液各 5 μL, 依次进样, 按 “2.3” 和 “2.4” 项下条件测定, 记录色谱图。结果表明, 空白溶液对样品测定无干扰。

2.5.2 精密度考察 精密称取样品约 100 mg, 按 “2.2” 项下方法制备供试品溶液 1 份, 按 “2.3” 和 “2.4” 项下条件, 连续进样 6 针, 测得各共有峰相对保留时间 RSD < 0.09%, 相对峰面积 RSD < 5.0%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.5.3 重复性考察 称取同一批样品约 100 mg, 按 “2.2” 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 “2.3” 和 “2.4” 项下条件依次进样, 结果各共有峰相对保留时间 RSD < 0.08%, 相对峰面积 RSD < 5.0%, 表明方法重复性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.5.4 稳定性考察 精密称取样品约 100 mg, 按 “2.2” 项下方法制备供试品溶液 1 份, 按 “2.3” 和 “2.4” 项下条件, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得各共有峰相对保留时间 RSD < 0.07%, 相对峰面积 RSD < 5.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.6 数据采集与处理

取 28 批 YQFM (S1~S28), 按 “2.2” 项下方法制备供试品溶液, 按 “2.3” 和 “2.4” 项下条件进行测定, 记录色谱图。将色谱图进行统一积分 (积分时间 5~17 min) 后, 以 CDF 格式导出, 用于相似度评价。采用 MarkerLynxTM V4.1 软件对原始质谱数据进行峰提取、峰匹配、峰对齐、峰识别以及归一化等预处理, 导出由样品名称、保留时间-质荷比及对应的离子响应强度组成的数据集, 用于 HCA 和 PCA。参数设置: 保留时间范围 5~17 min, *m/z* 100~1 800, 保留时间允许偏差 0.2 min, 质荷比允许偏差 0.05。噪音消除水平 6.0, 响应强度阈值 500 counts, 去除同位素峰。

2.7 指纹图谱的建立

2.7.1 参照峰的选择 在基峰离子流色谱图 (BPC) 图中, 保留时间在 8.8 min 左右的色谱峰 (5 号峰) 峰面积较大、分离良好且稳定, 经与对照品比较, 鉴定为 Rf, 故选择其作为参照峰。

2.7.2 指纹图谱的建立 将 “2.6” 项下所得 CDF 格式数据同时导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2.0 版) 中进行处理, 运用多点校正法,

以 S1 样品为参照谱进行全峰匹配, 确定了 18 个共有色谱峰, 建立了 28 批 YQFM UPLC-Q-TOF-MS^E 指纹图谱叠加图 (图 1), 得到了共有峰对照指纹图谱 (图 2)。各共有峰相对保留时间 RSD<0.09%, 相对峰面积 RSD<10.00%。

2.8 共有峰药材来源归属及初步鉴定

精密吸取“2.2”项下供试品溶液及单味药材的供试品溶液各 5 μL, 按“2.3”和“2.4”项下条件依次进样测定。通过比较两者间的色谱图, 发现红参对 YQFM 指纹图谱共有峰的贡献最大, 麦冬次之。其中, 1、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、

14、15、17、18 号峰来源于红参; 2、3、16 号峰来源于麦冬; 五味子对共有峰没有贡献。结果见图 3。

对 18 个共有峰的质谱结果分析发现, 负离子模式下主要产生 $[M-H]^-$ 和 $[M+COOH]^-$ 的分子离子峰。根据 Q-TOF 高分辨质谱计算各个主要成分的元素组成、二级质谱信息, 并结合对照品及相关参考文献, 对 YQFM 中 18 个共有峰进行鉴定, 推断了 16 个色谱峰中 20 个化合物的可能结构, 主要为皂苷类成分。结果见表 1。

2.9 不同批次 YQFM 相似度评价

将 28 批 YQFM 样品的 UPLC-Q-TOF-MS^E 图谱

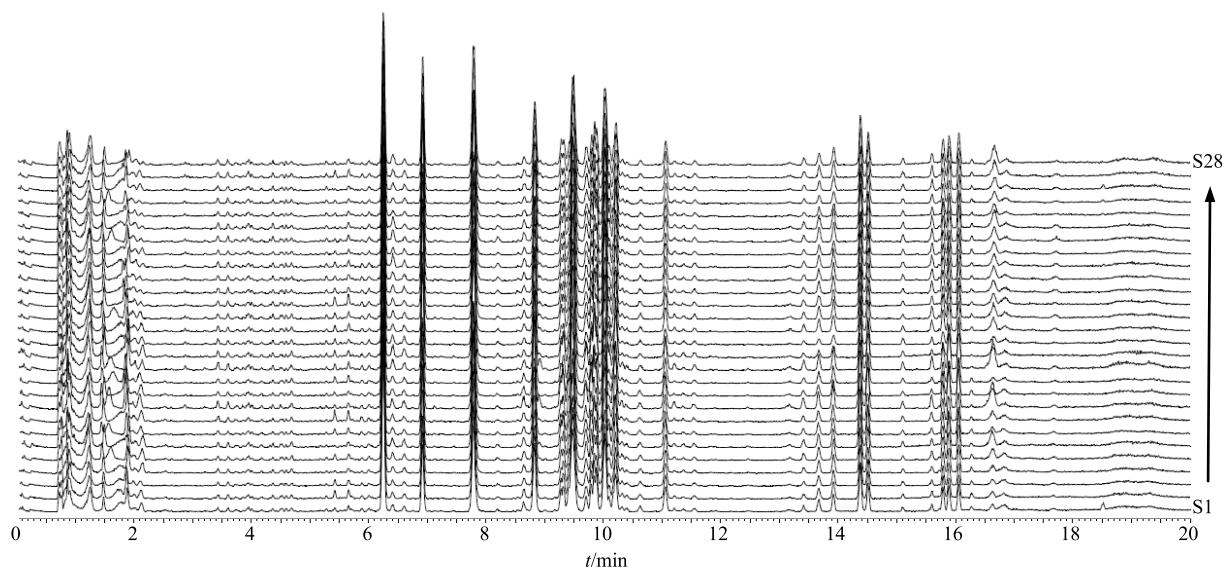


图 1 28 批 YQFM (S1~S28) UPLC-Q-TOF-MS^E 指纹图谱叠加图

Fig. 1 Overlap plot fingerprint for 28 batches (S1—S28) of YQFM

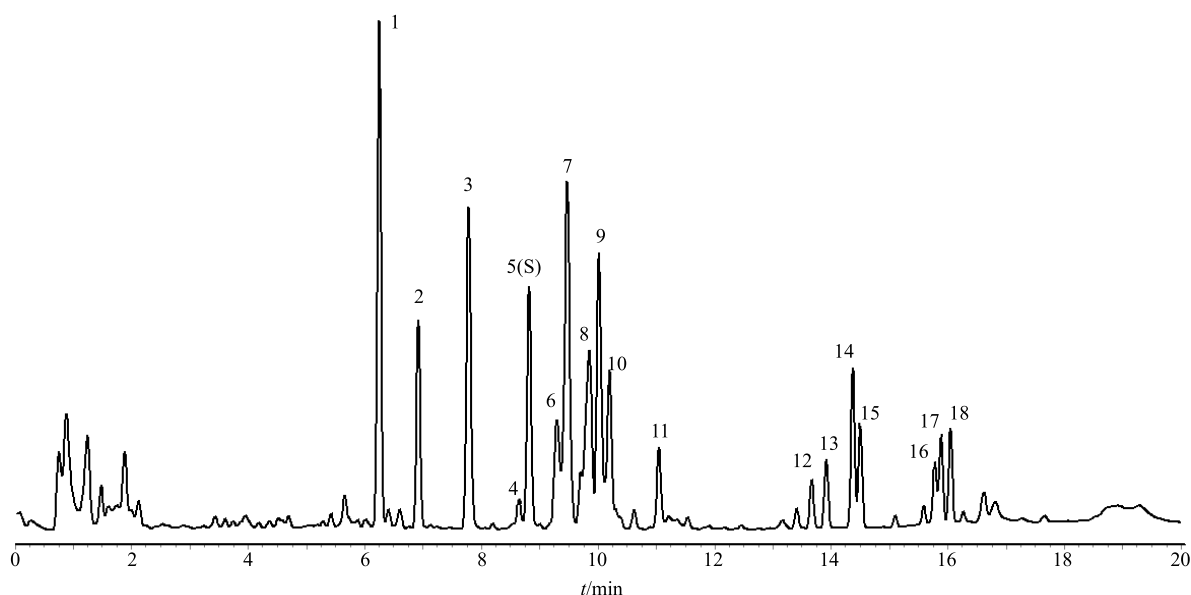


图 2 YQFM UPLC-Q-TOF-MS^E 对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of YQFM

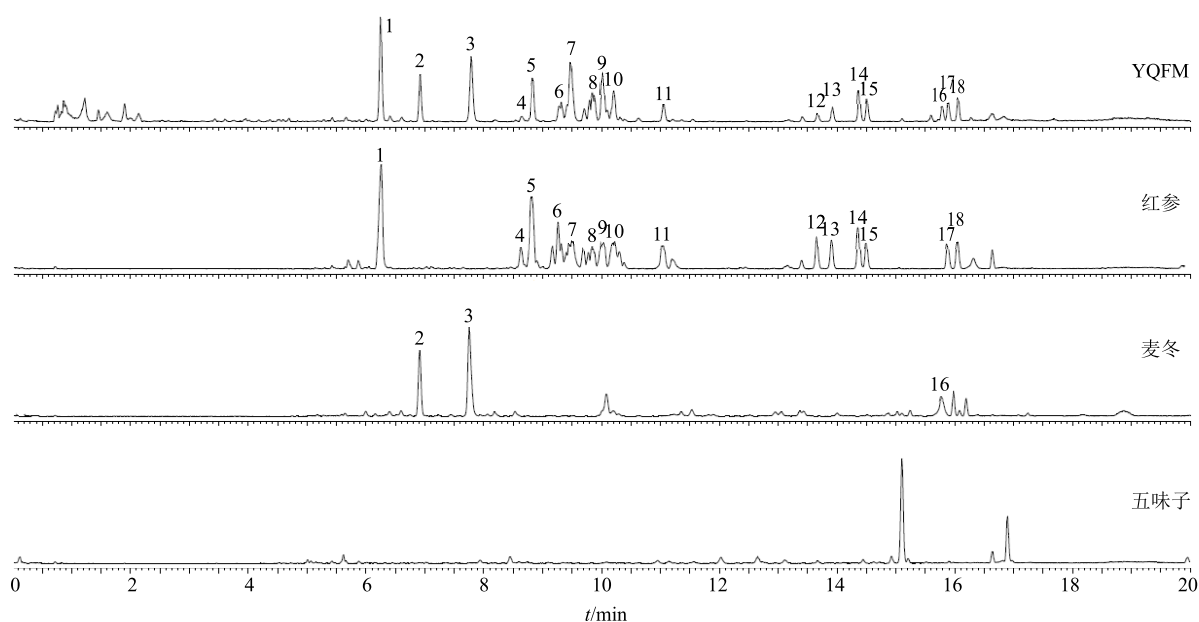


图3 YQFM及各单味药的BPC图

Fig. 3 BPC of YQFM and single herb medicine

表1 共有峰鉴定结果

Table 1 Identification of common peaks in different batches of sample

峰号	t_R/min	选择离子 (m/z)		MS ⁿ 主要峰	分子式	化合物	参考文献
		$[M-H]^-$	$[M+COOH]^-$				
1	6.25	799.476 3	845.482 4	637.428 8, 475.216 3	$C_{42}H_{72}O_{14}$	人参皂苷 Rg_1^*	4-5,20-21
		945.542 3	991.539 1	783.356 6, 637.428 8, 475.216 3	$C_{48}H_{82}O_{18}$	人参皂苷 Re^*	
2	6.92	447.223 4	—	315.182 7	$C_{21}H_{36}O_{10}$	<i>L</i> -borneol-7- <i>O</i> -[β - <i>D</i> -apiofuranosyl 4-5 (1 $\rightarrow$ 6)]- β - <i>D</i> -glucopyranoside	
3	7.79	233.087 9	—	—	—	未知	—
4	8.65	619.312 7	—	—	—	未知	—
		1 239.634 8	—	—	$C_{59}H_{100}O_{27}$	人参皂苷 Ra_3	4
5	8.82	799.488 7	845.495 1	637.417 7, 475.636 3	$C_{42}H_{72}O_{14}$	人参皂苷 Rf^*	4,20-21
6	9.32	604.306 0	—	—	—	未知	—
		769.476 1	815.485 2	637.705 1, 475.159 1	$C_{41}H_{70}O_{13}$	三七皂苷 R_2	4-5,21-22
		1 209.625 9	—	1 077.576 5, 945.536 8, 783.221 9	$C_{58}H_{98}O_{26}$	人参皂苷 Ra_1/Ra_2	4
7	9.47	1 107.599 7	1 153.593 8	945.536 8, 783.491 4, 621.318 8	$C_{54}H_{92}O_{23}$	人参皂苷 Rb_1^*	4-5,20-21
		553.293 9	—	—	—	未知	—
8	9.85	1 077.576 5	1 123.580 2	945.550 2, 915.533 0, 783.491 4, 621.318 8	$C_{53}H_{90}O_{22}$	人参皂苷 Rc^*	4-5,20-21
9	10.02	955.483 2	1 001.530 0	793.435 3, 631.254 8, 613.151 4, 569.734 6	$C_{48}H_{76}O_{19}$	人参皂苷 Ro^*	4-5,21
10	10.20	1 077.576 5	1 123.594 8	945.523 3, 915.533 0, 783.491 4, 621.733 5	$C_{53}H_{90}O_{22}$	人参皂苷 Rb_2^*	4-5,20-21
11	11.06	945.536 8	991.539 1	783.491 4, 621.046 0, 459.141 8, 375.187 5	$C_{48}H_{82}O_{18}$	人参皂苷 Rd^*	4-5,20-21
12	13.67	619.410 8	665.425 7	619.410 8	$C_{36}H_{60}O_8$	人参皂苷 Rh_4/Rk_3	5,20,23
13	13.92	619.421 6	665.425 7	619.421 6	$C_{36}H_{60}O_8$	人参皂苷 Rh_4/Rk_3	5,20,23
		793.435 3	—	631.419 7, 613.259 8	$C_{35}H_{70}O_{19}$	cynarasaponin C/spinasaponin A	20
		—	—	631.419 7	$C_{42}H_{66}O_{14}$	zingibroside R_1	24
14	14.38	783.491 4	829.495 4	621.046 0, 459.198 1	$C_{42}H_{72}O_{13}$	<i>S</i> -人参皂苷 Rg_3^*	5
15	14.51	783.491 4	829.495 4	622.344 8	$C_{42}H_{72}O_{13}$	<i>R</i> -人参皂苷 Rg_3^*	5,20
16	15.79	504.304 8	—	—	—	未知	—
		564.335 1	—	—	—	未知	—
17	15.89	765.474 2	811.489 9	765.477 2	$C_{42}H_{70}O_{12}$	人参皂苷 Rk_1	4-5,21
18	16.06	765.474 2	811.477 4	765.477 2	$C_{42}H_{70}O_{12}$	人参皂苷 Rg_5	5,20,23

*经对照品确认的成分

*Identified by reference ingredient

CDF 格式数据依次导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2.0 版), 多点校正后生成对照指纹图谱, 并计算相似度, 结果 S1~S28 样品的相似度分别为 0.982、0.988、0.990、0.975、0.992、0.995、0.992、0.994、0.980、0.993、0.992、0.989、0.989、0.989、0.985、0.996、0.991、0.997、0.995、0.993、0.993、0.988、0.982、0.989、0.994、0.978、0.996、0.970。结果显示, 28 批样品的相似度均大于 0.970, 说明 YQFM 生产工艺及质量稳定性较好。

2.10 HCA

本研究将 28 批 YQFM 指纹图谱中 18 个共有峰所包含的 25 个化合物的离子响应强度除以称样量进行量化, 形成 25×28 阶数据矩阵, 导入 SPSS 19.0 分析软件, 选择离差平方和法 (ward's method) 进行 Q 型聚类分析, 测量距离采用欧氏距离平方方法 (squared Euclidean distance), 标准化选择“Z 得分”。聚类结果见图 4。从树状聚类图中看到, 当类间距离介于 5~10 时, YQFM 样品可以聚为 4 类, S3~S5、S1、S7、S2、S11、S10 为一类, S9、S12、S6、S8 为一类, S13、S14 为一类, 其他样品为一类。

2.11 PCA

本研究将 28 批 YQFM 指纹图谱中 18 个共有峰所包含的 25 个化合物的离子响应强度除以称样量进行量化, 形成 25×28 阶数据矩阵, 导入 SPSS 19.0

分析软件, 进行 PCA。由表 2 可知, 提取的前 7 个主成分的特征值 (λ) 均大于 1, 累积方差贡献率为 84.989%, 能比较全面地反映样品的信息。为了从 PCA 模型中获取更多样品化学组成差异的信息, 提取了 PCA 模型的载荷因子。载荷的绝对值越大, 表明对主成分的贡献越大。从表 2 主成分载荷矩阵中可以看到, 第 1 主成分 PC1 主要综合了化合物 5

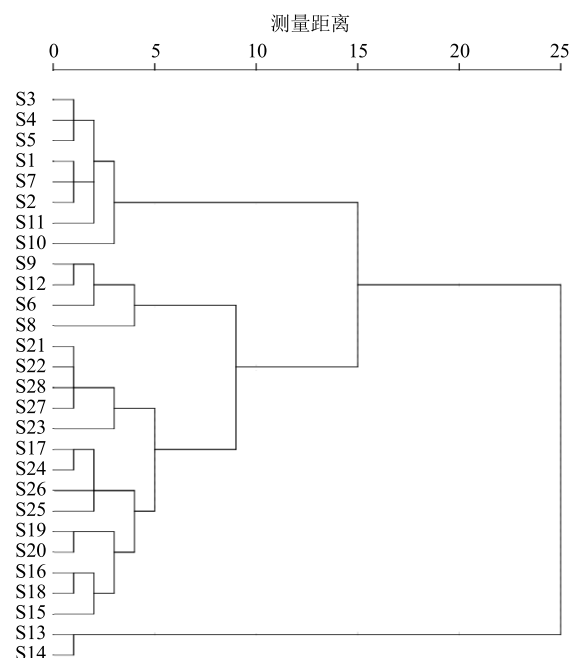


图 4 树状聚类图

Fig. 4 Tree cluster diagram

表 2 7 个主成分的特征值、贡献百分率、累积贡献率及其载荷矩阵

Table 2 Eigen values, contribution, accumulative contribution, and matrix of seven principal components

分量	主成分							分量	主成分						
来源	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	来源	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7
1	0.456	0.279	-0.693	-0.060	0.061	0.083	-0.275	15	0.684	-0.141	0.342	-0.184	-0.019	0.273	0.210
2	0.307	0.003	-0.105	0.797	0.313	0.157	-0.007	16	0.898	-0.164	-0.157	-0.027	0.147	-0.023	-0.128
3	-0.130	0.933	0.064	-0.017	-0.064	0.117	-0.070	17	-0.015	-0.013	-0.295	0.090	0.514	0.579	0.412
4	0.092	0.795	-0.018	0.167	-0.344	0.297	-0.205	18	0.188	0.406	-0.370	0.024	-0.179	-0.321	0.605
5	0.902	-0.289	-0.086	0.062	-0.162	0.015	-0.124	19	0.071	0.421	0.556	0.325	0.321	-0.125	0.073
6	0.431	-0.417	-0.088	0.324	0.275	-0.503	-0.136	20	0.837	0.040	0.457	-0.040	0.013	0.016	0.009
7	0.931	0.004	-0.203	0.049	-0.102	0.027	-0.075	21	0.733	-0.260	0.434	0.075	-0.070	0.046	0.177
8	0.899	-0.357	-0.046	0.076	-0.013	0.024	-0.009	22	0.843	0.374	-0.053	-0.147	-0.097	-0.088	-0.007
9	0.845	0.346	0.100	0.185	0.002	-0.006	-0.064	23	0.876	0.305	-0.132	-0.113	-0.118	-0.126	0.037
10	0.808	-0.213	0.070	0.184	-0.080	0.269	-0.119	24	0.352	0.010	0.352	-0.607	0.405	0.136	-0.248
11	0.594	-0.002	-0.243	-0.415	0.312	-0.148	0.180	25	0.479	-0.215	0.269	0.025	-0.537	0.071	0.268
12	0.922	0.120	-0.072	0.031	-0.091	-0.093	-0.020	特征值 λ	10.508	3.345	2.105	1.609	1.528	1.151	1.000
13	0.708	0.150	-0.237	-0.156	0.215	0.071	0.135	贡献率方差/%	42.032	13.382	8.421	6.436	6.112	4.605	4.001
14	0.229	0.664	0.359	0.027	0.362	-0.277	0.035	累积贡献率/%	42.032	55.414	63.835	70.271	76.383	80.988	84.989

($t_R=8.65$ min, m/z 619.312 6)、7(Rf)、8($t_R=9.32$ min, m/z 604.306 3)、9(三七皂苷 R_2)、10(人参皂苷 R_{a1}/R_{a2})、12($t_R=9.47$ min, m/z 553.293 5)、16(Rd)、20(R_{g3})、22($t_R=15.79$ min, m/z 504.308 7)、23($t_R=15.79$ min, m/z 564.331 1) 的信息, 说明不同

批次的 YQFM 化学成分差异主要体现在这几个成分量的不同, 这些化学成分在不同批次样品之间的差异趋势, 见图 5。可以看到, 同一化学成分在不同批次样品中存在一定的波动, 其中样品 S13、S14 中各成分含量均最低。

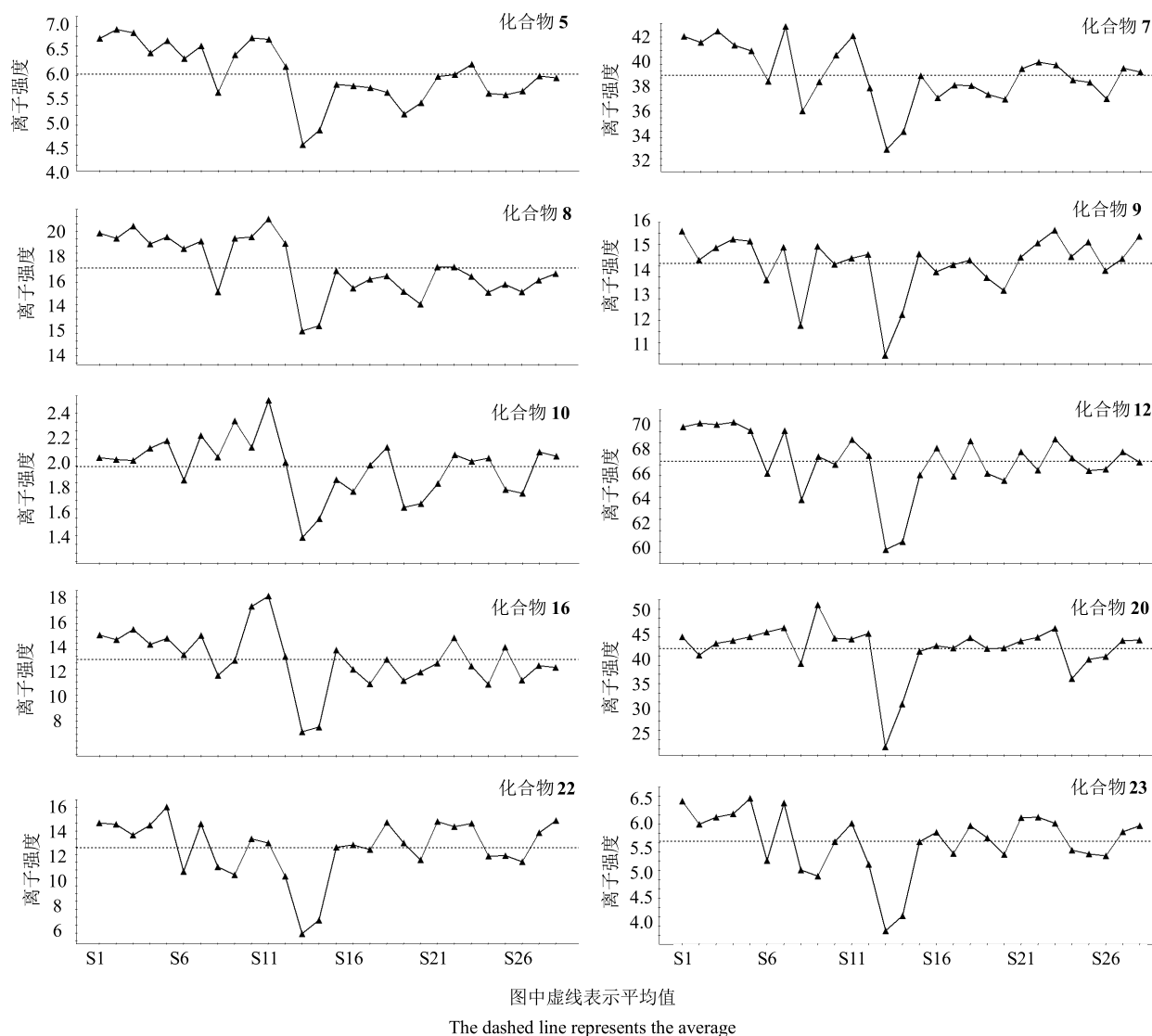


图 5 10 种主要化学成分在不同批次 YQFM 样品之间的差异趋势图

Fig. 5 Trend plots of ten markers in various batches of YQFM

将数据导入 Simca-p12.0 软件作图, 得到 PCA 二维分布散点图, 见图 6。可以看出, 28 批 YQFM 中大部分样品集中在同一区域, 小部分样品存在部分离散, 与聚类分析的结果基本一致。

以各主成分对应的方差贡献率作为权重, 对主成分得分和对应的权重进行线性加权, 构建不同批次 YQFM 综合评价函数: $Y=0.420\ 3\ PC1+0.133\ 8\ PC2+0.084\ 2\ PC3+0.064\ 4\ PC4+0.061\ 1\ PC5+0.046\ 1\ PC6+0.040\ 0\ PC7$, 计算各批次的综合评价

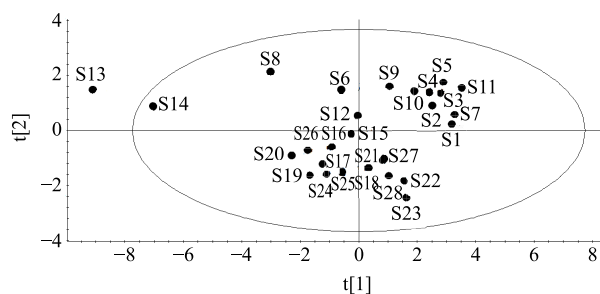


图 6 二维分布散点图

Fig. 6 Two-dimensional distribution scatter plot

分值, 分值越高表示该批次样品质量越好。由表 3 可知, 在所有的供试样品中, S28 综合得分最高 (0.520), 其次为 S22 (0.435)、S11 (0.418) 和 S9 (0.360); 样品 S1、S7、S21、S4、S12、S18、S27、

S2、S23、S3、S5、S15、S10、S24、S25 综合得分均在 0 以上; 样品 S19、S17、S16、S20、S6、S26、S8 综合得分均在 0 以下; 样品 S14 和 S13 的综合得分最低, 分别为-1.521 和-1.156。

表 3 28 批 YQFM 样品的主成分得分、综合得分及优良排序

Table 3 Principal component scores, comprehensive evaluation, and fine sorting of 28 batches of YQFM

样品	主成分							综合得分	排序
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7		
S1	0.899	0.123	-0.570	0.233	-0.239	-0.703	0.434	0.332	5
S2	0.785	-0.421	-1.641	1.240	0.299	-0.570	-0.146	0.201	12
S3	0.990	-0.519	-1.020	-0.775	-1.118	-0.087	0.003	0.139	14
S4	0.826	-0.725	-0.546	-0.079	-0.585	0.263	1.076	0.219	8
S5	1.132	-0.883	-1.001	-1.339	-1.391	-0.680	0.475	0.090	15
S6	-0.136	-1.090	0.815	0.051	-1.111	-0.556	1.012	-0.184	24
S7	0.901	-0.395	-0.266	0.495	-0.376	0.639	-0.644	0.316	6
S8	-1.167	-1.620	0.443	-0.108	-0.790	0.669	-0.817	-0.727	26
S9	0.558	-1.841	2.711	0.837	0.427	1.056	0.368	0.360	4
S10	0.727	-1.139	-0.056	-2.181	1.407	1.024	-2.432	0.044	17
S11	1.364	-0.924	-1.412	0.383	0.569	0.211	0.453	0.418	3
S12	0.116	-0.849	1.184	1.424	1.242	0.450	-0.186	0.216	9
S13	-3.043	-1.030	-0.906	0.051	-0.542	-0.222	0.306	-1.521	28
S14	-2.432	-0.658	-0.564	-0.062	0.010	-0.022	0.163	-1.156	27
S15	-0.019	-0.399	0.625	1.341	1.995	-2.419	-0.085	0.085	16
S16	-0.260	0.336	-0.102	-0.089	0.398	-1.070	0.282	-0.092	22
S17	-0.546	0.857	0.360	0.702	-0.687	0.793	0.016	-0.044	21
S18	0.277	0.867	0.225	-0.580	0.784	-1.484	0.518	0.214	10
S19	-0.490	1.113	0.673	-2.589	1.844	0.245	0.487	-0.023	20
S20	-0.648	0.616	0.692	-1.142	-0.017	-0.242	1.708	-0.149	23
S21	0.418	0.691	0.477	-0.259	-0.020	-0.739	1.028	0.298	7
S22	0.495	1.260	0.163	0.946	-0.509	0.396	-0.087	0.435	2
S23	0.249	1.393	1.978	0.046	-2.149	-1.650	-2.388	0.158	13
S24	-0.477	1.273	-0.773	1.423	-0.176	1.516	-0.720	0.027	18
S25	-0.395	1.222	-1.309	0.936	1.646	0.107	-0.796	0.021	19
S26	-0.661	0.604	-0.782	-0.496	-0.729	-0.400	-1.167	-0.404	25
S27	0.227	0.644	0.156	-0.576	0.233	1.482	-0.744	0.210	11
S28	0.309	1.494	0.445	0.167	-0.413	1.995	1.884	0.520	1

3 讨论

3.1 实验条件优化

本实验考察了水-乙腈、0.05%甲酸水溶液-乙腈、0.10%甲酸水溶液-乙腈、0.20%甲酸水溶液-乙腈等流动相系统, 结果以 0.1%甲酸水溶液-乙腈系统得到的色谱峰峰形较好且稳定; 体积流量考察了 0.25、0.30、0.45、0.50 mL/min, 结果发现体积流量

大于 0.50 mL/min 时压力会超过系统压力上限, 导致仪器无法运行, 因此最终选择 0.30 mL/min; 柱温考察了 25、30、35 ℃, 最终选择 30 ℃; 进样量考察了 1.0、2.0、5.0 μL, 最终选择 5.0 μL; 实验还对 Acquity UPLC BEH C₁₈ 和 Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱进行了考察, 综合比较色谱峰形、分离度、分离时间和分离效率, 发现 Acquity UPLC HSS

T3 C₁₈ 柱的分离效果最为理想, 因此最终采用 Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱。质谱扫描模式分别考察了正、负离子 2 种扫描模式, 结果发现负离子模式下质谱响应更强, 故实验最终选择在负离子模式下进行; 质荷比考察了 m/z 100~1 000 和 m/z 100~1 800 进行比较, 结果 m/z 100~1 800 色谱峰数相对较多, 信息量丰富, 响应值高。

3.2 指纹图谱评价

本实验对总离子流色谱图 (TIC) 和 BPC 进行了比较, 由于 BPC 扣除了基体离子的信号, 各色谱峰的信噪比明显比 TIC 的高。综合比较, 负离子 ESI 模式的 BPC 最适合用于指纹图谱研究。本实验首次建立了 YQFM 的 UPLC-Q-TOF-MS^E 指纹图谱, 在 20 min 内实现了对 YQFM 的快速色谱分离, 与以往文献报道的指纹图谱相比较, 具有高效、专属性强、分离度高、色谱峰纯度高、重现性强、方法简单易行的特点。该指纹图谱可同时对 YQFM 中 18 个共有色谱峰进行检测, 28 批 YQFM 的相似度均在 0.970 以上。鉴于目前实验收集的样本数还相对较少, 后续实验要进一步增加样本量, 不断修正 YQFM 指纹图谱; 对于指纹图谱中共有峰的定性, 还需要借助其他手段进一步确认。

3.3 识别方法比较

HCA 是在不对信息进行删减和重要性划分的前提下, 将关系更接近的研究对象合并为一类, 区分类别之间的组成及界限; PCA 通过剔除不重要的信息, 保留重要信息, 以少量综合指标代表原来多个指标的大部分信息的分析方法。本研究对 YQFM 指纹图谱 18 个共有色谱峰所包含的信息进行 HCA 和 PCA, 客观地反映了 YQFM 内在质量的真实性与一致性, 为制定质量标准与品质评价模式提供新的参考依据。HCA 结果为当欧氏距离平方和为 5~10 时, 28 批 YQFM 样品可以聚为 4 类; PCA 降维提取了 7 个主成分, 反映了原来变量 84.989% 的信息, 通过拟合归纳第 1 主成分的载荷因子模型, 筛选出对样品质量影响较大的 10 种标记物。结合 PCA 得分构建了不同批次 YQFM 综合评价函数, 并对各批次综合得分进行了排序, 28 批供试样品中, S28 综合得分最高, 其次为 S22、S11 和 S9, S14 和 S13 的综合得分最低。比较相似度评价、HCA 和 PCA 方法, 发现其结果不完全相同。分析原因可能是中药本身是个多成分复杂体系, 在进行相似度计算时, 特征峰校正不完全, 进而导致信息缺失, 样品相似

度较高。而 HCA 和 PCA 是在指纹图谱相似度评价的基础上进行的, 虽然 PCA 提取了特征值大于 1 的 7 个主成分, 但被忽略的特征值小于 1 的成分仍然会对结果有贡献, 所以势必会出现 HCA 和 PCA 结果有差异的情况。

由本实验分析结果可知, 在利用 UPLC-Q-TOF-MS^E[25] 指纹图谱相似度对 YQFM 质量进行评价的同时, 联合应用化学模式识别对 YQFM 样本做更准确细致地分类, 可以对指纹图谱相似度进行有效的补充, 为 YQFM 质量综合评价和控制提供科学依据。

参考文献

- [1] 张崇荣, 牛昱光, 李欣, 等. 注射用益气复脉治疗气阴两虚型冠心病心绞痛的临床疗效观察 [J]. 中国医药指南, 2016, 14(8): 211-212.
- [2] 杨丽莉. 注射用益气复脉 (冻干) 粉针对慢性心力衰竭患者心功能及血浆脑钠肽的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(4): 391-393.
- [3] 顾宏韬. 硫酸吗啡缓释片联合注射用益气复脉 (冻干) 治疗中晚期肝癌疼痛的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(1): 52-54.
- [4] Liu C H, Ju A C, Zhou D Z, *et al.* Simultaneous qualitative and quantitative analysis of multiple chemical constituents in YiQiFuMai Injection by ultra-fast liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 640-653.
- [5] Li F, Cheng T F, Dong X, *et al.* Global analysis of chemical constituents in Shengmai injection using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed*, 2016, 117(5): 61-72.
- [6] 周丹丹. 注射用益气复脉 (冻干) 物质基础及质量控制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学中药研究所, 2010.
- [7] 乔晓莉, 肖学风, 周大铮, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定注射用益气复脉 (冻干) 中 13 种成分 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3402-3407.
- [8] 褚延斌, 苏小琴, 李德坤, 等. 基于一测多评法对注射用益气复脉 (冻干) 中 9 种成分的质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3537-3544.
- [9] 伍蕊嗣, 刘涛, 付春梅, 等. 基于紫外指纹图谱的热毒宁注射液质量研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 499-504.
- [10] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.

- [11] 杨晓琴, 吴亿晗, 白俊毅, 等. 五味消毒饮口服液 HPLC 指纹图谱的建立及 6 种指标性成分定量测定 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5151-5157.
- [12] 周丹丹, 王蕴华, 李凡, 等. 注射用益气复脉 (冻干) 的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1900-1904.
- [13] 何珊珊, 岳洪水, 宋丽丽, 等. 注射用益气复脉 (冻干) HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 390-393.
- [14] 卢云芳, 许磊, 曹晖, 等. 参芪扶正注射液的 $^1\text{H-NMR}$ 指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2016, 14(11): 1174-1176.
- [15] 芮雯, 冯毅凡, 石忠峰, 等. 不同产地黄芪药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 607-611.
- [16] 盛萍, 唐代萍, 苗莉娟, 等. 不同产地多伞阿魏挥发油成分 GC-MS 指纹图谱研究 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(1): 30-37.
- [17] 罗艺, 白钢, 罗国安, 等. 治咳川贝枇杷滴丸 UPLC-Q-TOF-MS^E 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 1940-1944.
- [18] 康利平, 赵阳, 余河水, 等. 采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 鉴别芪苈强心胶囊有效部位中的化学成分 [J]. 药学学报, 2011, 46(10): 1231-1236.
- [19] 刘江, 陈兴福, 邹元锋. 基于中药指纹图谱多维信息的化学模式识别研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1081-1088.
- [20] 徐凤莲, 张启云, 姜丽, 等. UHPLC-Q-TOF/MS 法分析红参醇提液中化学成分 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(4): 529-534.
- [21] 赵静, 秦振娴, 彭冰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究 [J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 97-108.
- [22] Zheng C N, Hao H P, Wang X, *et al.* Diagnostic fragment-ion-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in traditional chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI-IT-TOF/MS: Shengmai injection as an example [J]. *J Mass Spectrom*, 2009, 44(2): 230-244.
- [23] Chu C, Xu S J, Li N X, *et al.* Profiling the ginsenosides of three ginseng products by LC-Q-TOF/MS [J]. *J Food Sci*, 2013, 78(5): 653-659.
- [24] Zhang H M, Li S L, Zhang H, *et al.* Holistic quality evaluation of commercial white and red ginseng using a UPLC-QTOF-MS/MS-based metabolomics approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62(1): 258-273.
- [25] 高馥蝶, 赵妍, 邵兵, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查牛奶中的农药和兽药残留 [J]. 色谱, 2012, 30(6): 560-567.