

HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价祖师麻注射液的整体质量

孙 岩, 吴晨光, 韩 群, 黄胜阳*

北京工业大学生命科学与生物工程学院 环境与病毒肿瘤学北京市重点实验室, 北京 100124

摘要:目的 建立祖师麻注射液的 HPLC 指纹图谱和化学模式识别模型, 为祖师麻注射液的质量一致性提供参考。方法 祖师麻注射液的分析采用 Agilent C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 300 nm 和 254 nm; 柱温 30 °C。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 考察 15 批祖师麻注射液的相似度, 结合主成分分析 (principal component analysis, PCA)、聚类分析 (cluster analysis, CA) 以及正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 对祖师麻注射液进行整体质量评价。

结果 祖师麻注射液的 HPLC 指纹图谱中 15 批样品相似度在 0.882~0.998, 通过 PCA、CA、OPLS-DA 分析, 15 批样品聚成 3 类, S1~S8 来自同一厂家, 聚为 2 类; S9~S14 来自同一厂家聚为 1 类, 并从 12 个共有峰中确定 3 个共有峰为祖师麻注射液质量标志物 (Q-marker), 分别为 5、7 (祖师麻甲素)、8 号峰。**结论** 利用化学模式识别与指纹图谱相结合的方法可快速评定不同厂家不同批次祖师麻注射液的稳定性和一致性, 适用于对祖师麻注射液整体质量的评价。

关键词: 祖师麻注射液; HPLC; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量评价; 一致性; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘判别分析; 质量标志物; 祖师麻甲素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)08-2170-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.025

HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition for integral quality of Zushima Injection

SUN Yan, WU Chen-guang, HAN Qun, HUANG Sheng-yang

Beijing Key Laboratory of Environmental and Viral Oncology, College of Life Science and Bioengineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and chemical pattern recognition model of Zushima Injection (ZSMI) and provide reference for evaluating the quality consistency of ZSMI. **Methods** The analysis was performed on Agilent C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% formic acid solution for gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 300 nm and 254 nm, and the column temperature was 30 °C. “Similarity Evaluation System of Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012 edition)” was adopted to investigate the similarity of 15 batches of ZSMI combined with principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to evaluate the overall quality of ZSMI. **Results** The similarity of 15 batches of samples was between 0.882 and 0.998. By PCA, CA, and OPLS-DA analysis, the 15 batches of samples were clustered into three types, of which S1—S8 were clustered into two types from the same manufacturer, S9—S14 were from the same manufacturer and clustered into group I. Three common peaks were identified from 12 common peaks as Q-marker of ZSMI, which were No. 5, 8, and 7 (daphnetin) peaks. **Conclusion** The method of combining chemical pattern recognition with fingerprint is simple with good reproducibility, which can quickly evaluate the stability and consistency of different batches of ZSMI from different manufacturers, and is suitable for the evaluation of the overall quality of ZSMI.

Key words: Zushima Injection; HPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; quality evaluation; consistency; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; quality marker; daphnetin

收稿日期: 2019-11-01

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2015BAK44B00)

作者简介: 孙 岩, 硕士研究生, 研究方向为天然药物与新药开发研究。Tel: 17810299879 E-mail: 592404578@qq.com

*通信作者 黄胜阳, 博士, 副教授, 研究方向为天然药物与新药开发研究。E-mail: hsy@bjut.edu.cn

祖师麻注射液 (Zushima Injection, ZSMI) 是由黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche. 的根皮和茎皮经加工制成的灭菌水溶液, 其主要成分有祖师麻甲素、紫丁香苷等, 临床上主要用于祛风除湿、活血止痛^[1-2]。该方剂在《中国药典》《金匱要略》和《伤寒论》均有记载; 目前该制剂有 3 个生产厂家 (山西康意制药有限公司、甘肃兰药药业有限公司、朗致集团万荣药业有限公司), 质量控制通过高效液相色谱法测定其有效成分祖师麻甲素和紫丁香苷的含量。近 10 年来对 ZSMI 的研究主要集中在临床用药、制备工艺以及指纹图谱和有效成分的含量测定方面, 对其质量控制仅以祖师麻甲素的含量作为标准, 这并不能全面反映样品的整体质量, 尚缺乏全面稳定可行的质量控制方法^[3-6]。

对于中药制剂, 不同厂家产品批次间的质量稳定性是临床等效性和有效性的重要前提^[7-8], 用化学计量学联合构建评价不同厂家不同批次 ZSMI 的质量稳定性研究还未见报道。《中国药典》2015 年版指出, 中药指纹图谱技术可以充分地反映中药材及其制剂的化学成分及其相对比例, 表征中药复杂成分与其内在质量之间的关系^[9-12]。

化学模式识别技术是化学计量学的重要分支, 可以对具有模糊性和整体性的中药指纹图谱实现数据降维、识别和分类等功能, 是筛选质量差异标志物重要的数学方法, 对于中药现代化战略具有重要意义, 已广泛应用于中药及中药制剂的质量控制研究中^[13-16]。本研究建立 15 批不同厂家 ZSMI HPLC 指纹图谱, 对其进行相似度评价并结合主成分分析 (PCA)、聚类分析 (CA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等化学模式识别方法, 评价不同厂家不同批次 ZSMI 的稳定性和一致性, 进而筛选出质量差异标志物, 并在生产过程中对其重点关注, 实现对 ZSMI 的科学、系统的质量控制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 包括二极管阵列检测器 (DAD)、低压四元泵、在线脱气装置、自动进样器、ChemStation 工作站, 美国 Agilent 科技有限公司; Mettlers 电子分析天平, 瑞士 Precisa 公司; 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 超纯水制备仪, 美国 Millipore 公司。

1.2 材料

乙腈、甲醇均为色谱纯, 美国 Fisher Scientific

公司; 甲酸为色谱纯, 天津市光复科技发展有限公司; 水为超纯水; 对照品祖师麻甲素, 批号 N111AS, 质量分数 99.81%, 购自大连美仑生物技术有限公司; 15 批市售 ZSMI, 规格: 2 mL/支, 样品编号为 S1~S8, 批号依次为 17072321、18040121、18120321、18120621、18120921、19010421、19011221、19032021, 购自朗致万荣药业有限公司; 样品编号为 S9~S15, 批号依次为 20180804、20181204、20181210、20181212、2018121、20190101、20190302, 购自甘肃兰州药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 见表 1; 检测波长见表 2; 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C; 进样体积 10 μL。

表 1 梯度洗脱流动相比比例

Table 1 Proportion of mobile phase

<i>t</i> /min	0.1% 甲酸 水溶液/%	乙腈/%	<i>t</i> /min	0.1% 甲酸 水溶液/%	乙腈/%
0	95	5	40	86	14
10	90	10	50	70	30
28	87	13	55	60	40

表 2 检测波长

Table 2 Detection wavelength

<i>t</i> /min	波长/nm	<i>t</i> /min	波长/nm
0	300	35	300
30	254	55	300

2.2 供试品溶液制备

取适量 ZSMI 样品, 经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液制备

精密称取 10.5 mg 祖师麻甲素对照品, 置 10 mL 量瓶中, 加入色谱甲醇溶解并定容, 即得 1.05 mg/mL 祖师麻甲素对照品溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为对照品溶液。

2.4 ZSMI HPLC 指纹图谱研究

2.4.1 共有峰的标定 吸取 S1~S15 供试品溶液和祖师麻甲素对照品各 10 μL, 按“2.1”项色谱条件进样测定。将色谱数据以 AIA 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版) 软件, 得到 15 批样品的 HPLC 指纹图谱, 以 S1 为参照图谱,

时间宽度设定为 0.50 s, 以平均数法建立对照指纹图谱 (R), 共得到稳定性较好的 12 个色谱峰作为共有峰 (图 1), 此 12 个共有峰峰面积占总峰面积的 84.40%。通过与祖师麻甲素对照品的 HPLC 图谱

(图 2) 对比, 确认 7 号峰为祖师麻甲素 (保留时间为 28.56 min)。由于祖师麻甲素对照品色谱峰的峰面积较大、保留时间适中, 且分离度较好, 因此确定 7 号峰为参照峰 (S)。

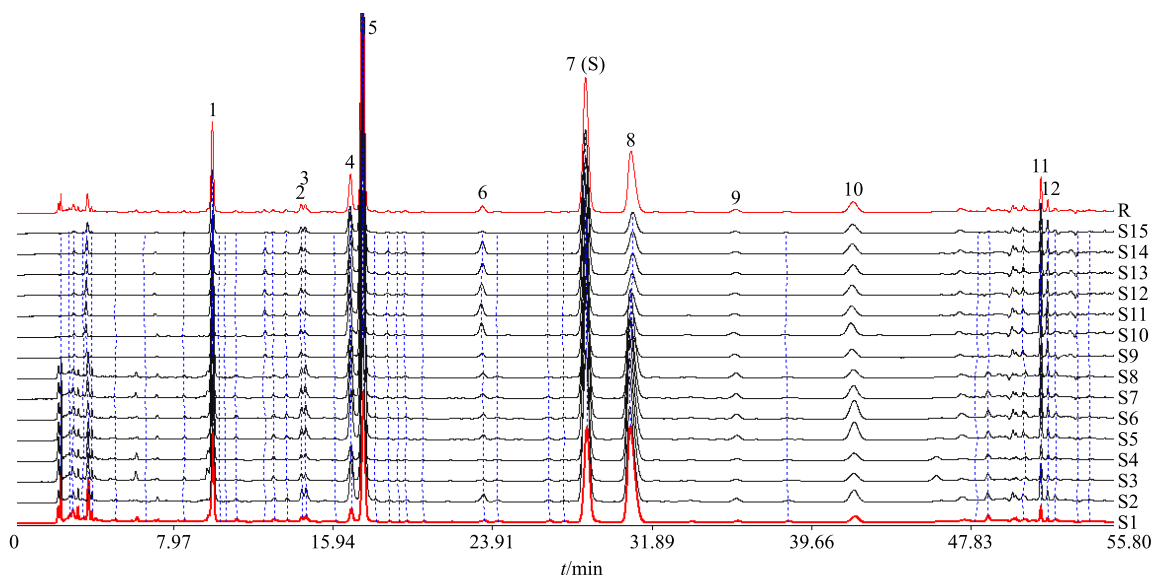


图 1 15 批样品的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of samples and its control fingerprint (R)

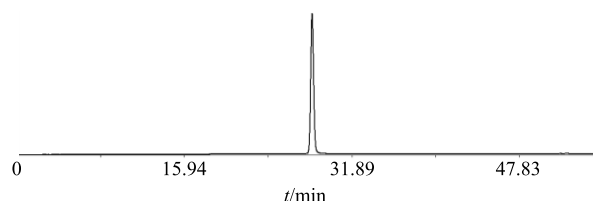


图 2 祖师麻甲素对照品 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC spectrum of daphnetin

2.4.2 精密度试验 取同一批次 (批号 18040121) ZSMI, 按“2.2”项方法制得供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算共有色谱峰的保留时间和峰面积。结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 0.20%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 1.87%, 表明本实验仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批次 (批号 18040121) ZSMI, 按“2.2”项方法平行制得 6 份供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件分别进样, 记录色谱图, 计算共有色谱峰的保留时间和峰面积。结果各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.48%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 1.44%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批次 (批号 18040121) ZSMI, 按“2.2”项方法制得供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件, 于配制后 0、1、2、4、6、8、12 h 时分别进样测定, 记录色谱图, 计算共有色谱峰的保

留时间和峰面积。结果各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 值均小 0.21%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 2.56%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.5 相对保留时间和相对峰面积 根据参照峰 S, 分别计算 15 批 ZSMI 指纹图谱中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 3、4。15 批 ZSMI 中各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.3%, 表明所有批次中 12 个共有峰的出峰时间相对稳定。15 批 ZSMI 中各共有峰相对峰面积的 RSD 值在 15.02%~75.92%, 表明 15 批不同厂家的批 ZSMI 相对峰面积差异较大, 且 6、8、12 号峰的 RSD 值差异最大。

2.4.6 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 对 15 批 ZSMI 指纹图谱进行相似度计算, 结果见表 5。S1~S8 来自同一厂家, S1、S3、S4 的相似度值偏低, 其余均在 0.992 以上; S9~S15 来自同一厂家, 相似度在 0.952~0.981, 相对稳定。表明不同厂家、不同批次之间相似度存在差异, 可能与生产工艺、原料来源或操作人员的关系。

2.5 化学模式识别分析

对指纹图谱数据进行模式识别的整体分析, 结合 ZSMI 15 个批次样本的 CA、PCA 及 OPLS-DA

表 3 15 批样品共有峰的相对保留时间

Table 3 Relative retention time of common peaks of 15 batches of samples

峰号	相对保留时间															RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
1	0.346 9	0.347 6	0.346 4	0.346 3	0.346 9	0.346 9	0.346 4	0.346 7	0.346 5	0.346 8	0.345 7	0.346 2	0.345 9	0.345 9	0.346 1	0.14
2	0.501 9	0.503 0	0.502 0	0.501 6	0.502 3	0.502 4	0.502 1	0.502 0	0.501 9	0.501 7	0.502 1	0.502 3	0.502 3	0.501 9	0.501 9	0.06
3	0.509 4	0.510 3	0.509 3	0.509 1	0.509 8	0.509 4	0.509 1	0.509 3	0.508 9	0.508 7	0.509 1	0.509 1	0.502 7	0.508 9	0.508 9	0.34
4	0.588 8	0.590 1	0.588 2	0.588 2	0.589 1	0.589 2	0.588 3	0.588 3	0.587 4	0.587 5	0.587 5	0.588 4	0.588 4	0.588 1	0.587 8	0.12
5	0.610 2	0.611 1	0.609 6	0.609 6	0.610 4	0.610 2	0.609 6	0.609 3	0.608 8	0.609 0	0.608 7	0.609 7	0.609 9	0.609 6	0.609 1	0.10
6	0.820 3	0.820 6	0.820 1	0.819 7	0.820 6	0.820 5	0.820 2	0.819 7	0.819 0	0.818 6	0.818 1	0.819 3	0.819 5	0.819 5	0.819 3	0.09
7(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
8	1.075 9	1.077 0	1.076 3	1.076 0	1.076 8	1.077 3	1.078 7	1.077 4	1.083 1	1.082 0	1.082 8	1.083 2	1.082 6	1.082 9	1.083 1	0.29
9	1.262 8	1.263 5	1.263 7	1.263 6	1.264 4	1.264 7	1.263 9	1.262 4	1.261 8	1.260 9	1.262 8	1.263 3	1.263 8	1.263 0	1.262 5	0.08
10	1.467 7	1.469 3	1.469 1	1.468 6	1.469 8	1.470 2	1.469 7	1.468 2	1.467 4	1.466 6	1.468 1	1.468 8	1.468 6	1.467 6	1.468 3	0.07
11	1.792 4	1.796 1	1.797 1	1.795 9	1.796 8	1.797 5	1.798 3	1.796 0	1.797 7	1.798 3	1.799 4	1.800 0	1.797 9	1.786 9	1.797 7	0.18
12	1.804 3	1.808 2	1.809 2	1.808 0	1.808 9	1.809 4	1.810 2	1.808 1	1.809 6	1.810 2	1.811 3	1.811 6	1.809 6	1.798 1	1.809 8	0.18

表 4 15 批样品共有峰相对峰面积

Table 4 Relative peak areas of common peaks of 15 batches of samples

峰号	相对峰面积															RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
1	0.425 9	0.277 9	0.450 6	0.469 0	0.296 6	0.326 9	0.331 8	0.711 3	0.151 1	0.203 2	0.142 3	0.104 8	0.132 0	0.128 4	0.261 5	56.84
2	0.025 7	0.026 8	0.024 4	0.023 6	0.026 1	0.022 3	0.024 9	0.038 1	0.024 2	0.033 2	0.027 0	0.026 3	0.025 6	0.025 6	0.024 9	15.02
3	0.036 6	0.034 9	0.027 2	0.031 8	0.031 6	0.029 2	0.034 1	0.061 1	0.019 6	0.028 4	0.025 4	0.020 9	0.021 2	0.020 9	0.030 1	33.58
4	0.095 5	0.169 8	0.091 6	0.088 2	0.162 7	0.169 1	0.173 4	0.312 8	0.125 8	0.315 1	0.224 9	0.206 1	0.209 5	0.207 1	0.167 7	38.22
5	0.832 0	1.459 3	0.755 1	0.691 8	1.108 4	1.139 6	1.216 9	2.139 1	0.995 9	2.195 3	1.734 2	1.603 5	1.638 8	1.617 2	1.345 4	33.99
6	0.019 9	0.032 3	0.011 7	0.012 3	0.021 2	0.018 4	0.025 6	0.037 4	0.040 2	0.122 3	0.089 2	0.081 1	0.082 9	0.082 1	0.019 4	75.92
7(S)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0.00
8	1.332 3	0.594 0	1.060 1	1.287 0	0.684 2	0.562 9	0.582 0	1.114 2	0.258 0	0.330 6	0.242 1	0.223 7	0.225 8	0.223 5	0.252 4	68.56
9	0.020 6	0.022 9	0.017 1	0.025 1	0.027 4	0.027 6	0.032 0	0.060 7	0.047 0	0.037 1	0.028 4	0.027 7	0.027 9	0.028 2	0.023 1	36.40
10	0.105 3	0.088 3	0.095 1	0.112 4	0.143 2	0.128 2	0.118 3	0.132 6	0.128 1	0.214 7	0.135 8	0.134 3	0.129 6	0.127 2	0.133 2	22.23
11	0.049 6	0.052 9	0.038 0	0.045 5	0.057 2	0.057 1	0.062 5	0.099 4	0.131 0	0.261 7	0.126 4	0.123 9	0.126 3	0.127 9	0.092 3	59.49
12	0.011 9	0.013 2	0.013 6	0.014 6	0.014 7	0.014 9	0.016 0	0.032 7	0.065 5	0.103 6	0.050 2	0.043 3	0.040 0	0.041 5	0.041 1	74.00

分析结果, 筛选出批次间差异性较大的质量标志物(Q-marker), 从而得到更与实际情况相符的相似度结果。

2.5.1 CA 采用 SPSS 19.0 软件, 对 15 批 ZSMI 指纹图谱共有峰峰面积进行标准化处理, 采用 Ward 法(Ward's method), 以平方欧氏距离(squared Euclidean distance)作为样品的测度, 进行聚类分析, 结果见图 3。当类间距离范围为 5~15 时, ZSMI 被分为 3 类, 其中 S9~S15 来自同一厂家, 聚为第 I 类; S1~S8 来自同一厂家, 被分成 2 类, 其中 S1、

S3、S4 的相似度分别为 0.882、0.906、0.860, 在 15 批次中偏低, 这与聚类结果一致, 聚为第 II 类。

2.5.2 PCA 采用 SPSS 19.0 软件, 将 15 批 ZSMI 的 12 个共有峰的峰面积进行 Z 标准化, 以特征值大于 1 为提取标准, 得到前 2 个主成分, 累积贡献率为 87.827%, 见表 6。碎石图(scree plot)进一步表明前 2 个成分较陡, 剩余其他成分之间趋于平缓, 说明前 2 个主成分可以代表 ZSMI 的整体特征, 见图 4。以 12 个共有峰峰面积为变量, 使用 SIMCA 14.0 统计软件计算 15 批 ZSMI 的主成分得分图和

表 5 15 批样品相似度

Table 5 Similarity of 15 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000	0.865	0.993	0.997	0.926	0.897	0.894	0.881	0.807	0.713	0.729	0.733	0.733	0.734	0.782	0.882
S2	0.865	1.000	0.889	0.840	0.986	0.991	0.995	0.975	0.968	0.959	0.971	0.971	0.972	0.972	0.982	0.998
S3	0.993	0.889	1.000	0.994	0.947	0.926	0.921	0.892	0.848	0.740	0.762	0.767	0.767	0.768	0.821	0.906
S4	0.997	0.840	0.994	1.000	0.911	0.881	0.876	0.856	0.788	0.676	0.695	0.700	0.700	0.701	0.756	0.860
S5	0.926	0.986	0.947	0.911	1.000	0.997	0.996	0.961	0.963	0.909	0.926	0.930	0.929	0.930	0.957	0.992
S6	0.897	0.991	0.926	0.881	0.997	1.000	0.999	0.962	0.975	0.927	0.946	0.948	0.949	0.949	0.975	0.996
S7	0.894	0.995	0.921	0.876	0.996	0.999	1.000	0.969	0.973	0.936	0.951	0.954	0.954	0.954	0.977	0.998
S8	0.881	0.975	0.892	0.856	0.961	0.962	0.969	1.000	0.900	0.934	0.927	0.921	0.924	0.923	0.936	0.973
S9	0.807	0.968	0.848	0.788	0.963	0.975	0.973	0.900	1.000	0.937	0.963	0.970	0.969	0.970	0.986	0.974
S10	0.713	0.959	0.740	0.676	0.909	0.927	0.936	0.934	0.937	1.000	0.994	0.989	0.991	0.990	0.972	0.952
S11	0.729	0.971	0.762	0.695	0.926	0.946	0.951	0.927	0.963	0.994	1.000	0.999	1.000	0.999	0.988	0.964
S12	0.733	0.971	0.767	0.700	0.930	0.948	0.954	0.921	0.970	0.989	0.999	1.000	0.999	0.999	0.990	0.965
S13	0.733	0.972	0.767	0.700	0.929	0.949	0.954	0.924	0.969	0.991	1.000	0.999	1.000	1.000	0.990	0.966
S14	0.734	0.972	0.768	0.701	0.930	0.949	0.954	0.923	0.970	0.990	0.999	0.999	1.000	1.000	0.991	0.966
S15	0.782	0.982	0.821	0.756	0.957	0.975	0.977	0.936	0.986	0.972	0.988	0.990	0.990	0.991	1.000	0.981
R	0.882	0.998	0.906	0.860	0.992	0.996	0.998	0.973	0.974	0.952	0.964	0.965	0.966	0.966	0.981	1.000

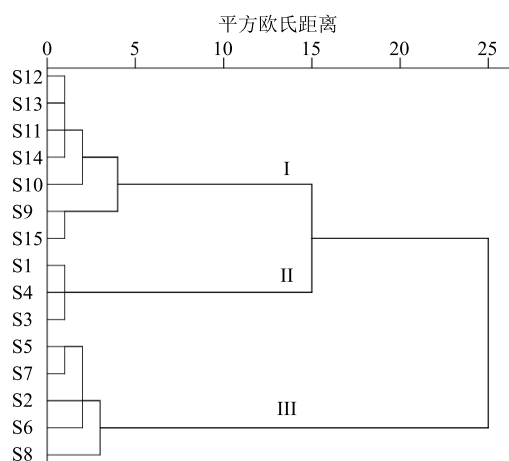


图 3 15 批样品聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of 15 batches of samples

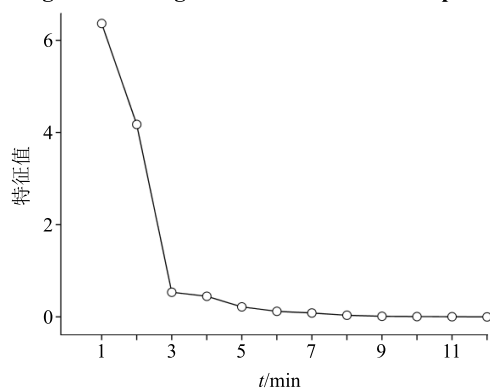


图 4 15 批样品主成分分析碎石图

Fig. 4 PCA scree plot of 15 batches of samples

表 6 主成分的初始特征值和贡献率

Table 6 Initial eigenvalue and contribution rate of principal component

主成分	初始特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
PC1	6.365	53.045	53.045
PC2	4.174	34.782	87.827

12 个共有峰的载荷图, 如图 5、6 所示。由图 5 可见, 15 批样品可以分为 3 类, S1、S3 和 S4 为一类; S2、S5~S8 为一类; S9~S15 为一类, 结果表明 PCA 结果与聚类分析结果一致。表明不同厂家的样品可以被区分开, 同一厂家不同批次样品之间也有一定的差异性。载荷图主要说明样品中 12 个原始变量与主成分 1 和主成分 2 的相关程度, 由图 6 可知,

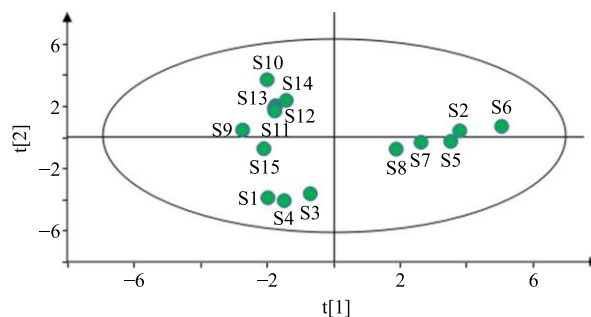


图 5 15 批样品主成分得分图

Fig. 5 Score plot of principal component analysis of 15 batches of samples

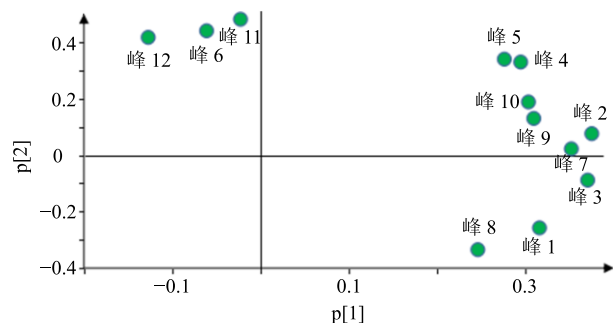


图 6 样品主成分载荷图

Fig. 6 Loading diagram of principal component analysis of samples

2、3、7、9、10、1、4、5 号峰对主成分 1 的影响最大，6、11、12、8 号峰对主成分 2 影响最大。

2.5.3 OPLS-DA 采用统计软件 SIMCA 14.0 对 15 批 ZSMI 进行 OPLS-DA，从而筛选出样品之间的差异标志物。根据 PCA 和 CA 的分类结果，使用监督模式识别方法进行 OPLS-DA 建模分析，筛选出了 2 个预测主成分，得到 3 个关键指标 (R^2_{cum} ，概括 X 矩阵解释率； R^2_{cum} ，反映模型的稳定性； Q^2_{cum} 反映模型的预测性；其中 R^2_{cum} 和 Q^2_{cum} 越接近 1 说明模型的稳定性和预测性越好) [17]，其中 $R^2_{\text{cum}}=0.923$ ，表明该 12 个主成分对 X 变量变异的解释能力为 92.30%； $R^2_{\text{cum}}=0.879$ ，表明模型中 2 个预测主成分对 Y 变量变异的解释能力为 87.90%； $Q^2_{\text{cum}}=0.826>0.5$ ，表明模型中 2 预测主成分对样品的预测能力较强。综合来看，模型拟合较好。

基于 12 个共有峰构建 15 批不同产厂家 ZSMI 的 OPLS-DA 第 1、2 主成分得分图 (图 7)，分为 3 类，不同厂家的样品有明显的聚集趋势，这与 PCA 和 CA 分析结果一致。图 8 为 OPLS-DA 模型第 1、2 主成分载荷图，表示了第 1、2 主成分中的 12 个指标与样品的相关性大小，从图中看出 1、5、7、8 号峰距原点较远。图 9 为 OPLS-DA 模型的 VIP

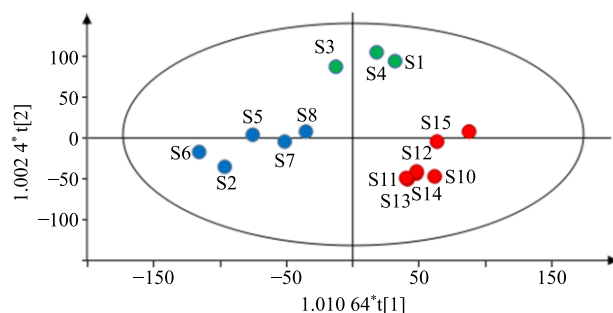


图 7 OPLS-DA 模型第 1、2 主成分得分图

Fig. 7 Score plot of 1st versus 2nd components in OPLS-DA

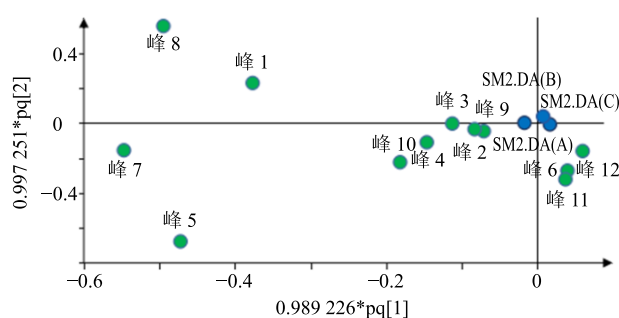


图 8 OPLS-DA 模型第 1、2 主成分载荷图

Fig. 8 Lording scatter plot of 1st versus 2nd components in OPLS-DA

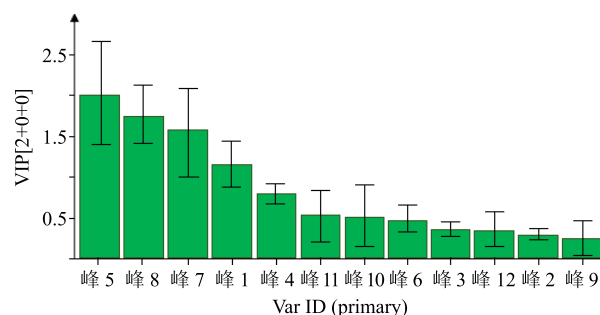


图 9 OPLS-DA 模型的 VIP 图

Fig. 9 VIP plot of OPLS-DA

(variable importance for the projection) 图，VIP 值越大，表示各种化学指标对于解释变量的贡献越大、差异相关性越高，以 $VIP \geq 1.5$ 为标准 [18]，筛选得到 3 个影响较大的峰，从大到小依次为 5、8、7 号峰，表示这 3 个峰对批次间稳定性的影响较大，其中 7 号峰为已知化合物祖师麻甲素，同时有必要进一步明确其他具体化合物。说明在生产中应对这 3 个峰应给予高度重视。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

本实验对甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液等不同比例和种类的洗脱系统进行筛选，同时对 220、254、270、300、320 nm 不同波长进行考察。当波长为 254 nm 和 300 nm，流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液时，色谱峰的分度度较高，峰总数较多，峰纯度较好，更多的成分被分离出来且含量较高。因此最后采用变换波长和梯度洗脱的方法。

3.2 PCA、CA 和 OPLS-DA 分析

采用指纹图谱结合化学模式识别方法，得出 15 批次不同厂家生产的 ZSMI 质量存在显著差异，同

一厂家生产的个别批次的制剂存在较大差异。结合 CA 和 PCA 法可将上述 15 批样品分成 3 类,并结合 OPLS-DA 法筛选得到 3 个差异性物质标志物,分别为 5、8、7(祖师麻甲素)号峰。建议厂家在生产过程中对这 3 个标志物进行重点关注,跟踪这些标志物在各个生产环节中的变化。本实验中 PCA、CA 和 OPLS-DA 的分析结果基本一致,与相似度评价结果互为佐证。指纹图谱结合化学模式识别方法为不同厂家不同批次的 ZSMI 质量一致性提供新思路,能有效弥补现有标准的不足,可供企业在原药材来源、生产工艺、操作人员、运输储存等各个环节进行监控,更科学的,系统的保证药品的质量一致性。

3.3 展望

对于指纹图谱中每一个色谱峰代表何种化合物,还应通过 HPLC-MS 等技术做进一步研究。对于 ZSMI 批间差异与临床安全性、有效性之间的关系,还应通过生物学方法做进一步评价。多层次、多角度、全方位评价和控制其质量的一致性和稳定性,最大限度减少临床不良反应的发生,从而保证临床用药的安全有效。

参考文献

- [1] 白 玮, 张 娇, 叶 潇, 等. 祖师麻的研究进展 [J]. 现代中医药, 2017, 37(5): 113-116.
- [2] 王 鹏, 刘金平, 詹 妮, 等. 祖师麻化学成分和药理活性研究新进展 [J]. 特产研究, 2011, 33(4): 73-76.
- [3] 盛华刚. 祖师麻中香豆素类成分的提取工艺研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(4): 354-356.
- [4] 刘 妍, 王胜利, 毕慧敏, 等. 祖师麻注射液的高效液相指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1109-1110.
- [5] 周 颖, 庞兴寿. 祖师麻注射液中紫丁香苷和祖师麻甲素的含量测定 [J]. 中国药业, 2010, 19(4): 25-26.
- [6] 朱金铸. 祖师麻注射液临证新用举隅 [J]. 中国民间疗法, 2013, 21(4): 17.
- [7] 杨 琳, 李廷利. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的护肝片质量控制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3351-3356.
- [8] 张玉娟, 张晓明, 杜 兴, 等. 天麻素注射液质量评价 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(2): 232-236.
- [9] 祝 明, 陈碧莲, 石上梅. 中药指纹图谱技术在中国药典 2015 年版一部中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(5): 611-614.
- [10] 蒋 爱, 陈 健, 韩加伟, 等. 小儿退热洗剂 HPLC 指纹图谱及指标成分测定 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3077-3083.
- [11] 陈素娟, 聂 静, 张 旗, 等. 熟地黄饮片标准汤剂的质量标准研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2173-2177.
- [12] Gao S M, Liu J S, Wang M, et al. Quantitative and HPLC fingerprint analysis combined with chemometrics for quality evaluation of *Codonopsis Radix* processed with different methods [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(2): 160-168.
- [13] 田清华, 张 亚, 徐 聪, 等. HPLC 指纹图谱结合化学模式识别评价舒筋活血制剂的整体质量 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 4925-4931.
- [14] 付小梅, 孙 菡, 刘 婧, 等. 基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4653-4661.
- [15] 孙立丽, 王 萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [16] 刘昌孝. 发展中药质量标志物(Q-marker)理论方法和策略, 研究提升中药科学技术水平 [J]. 药学报, 2019, 54(2): 185-186.
- [17] 周 欣, 张 琳, 毛 婵, 等. 基于化学计量学方法结合正交偏最小二乘判别分析的陈皮饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2194-2200.
- [18] 王 俊, 许多宽, 肖 勇, 等. 基于化学指标的烟叶产区正交偏最小二乘判别分析 [J]. 中国烟草科学, 2017, 38(1): 91-96.