



车前子综合化学模式识别研究

罗光明*, 曾金祥, 朱继孝

(江西中医学院药学院, 江西 南昌 330004)

[摘要] **目的:**运用高效液相色谱指纹图谱相似度评价法、系统聚类分析法和主成分分析法建立车前子药材的综合化学模式识别方法。**方法:**采用反相高效液相法,紫外检测器,Diamonsil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),乙腈-0.5%乙酸水溶液为流动相梯度洗脱,建立车前子的HPLC-UV指纹图谱,并以24批药材共有色谱峰峰面积为依据,建立其系统聚类分析方法及主成分分析方法。**结果:**指纹图谱法可以区别不同品种及产地车前子,系统聚类分析法和主成分分析法分析结果基本一致,但稍有差异。**结论:**所建立的综合化学模式识别方法可用于车前子的质量控制及品种评价。

[关键词] 车前子;综合化学模式识别;质量控制与评价

车前子为车前科车前属植物车前 *Plantago asiatica* 和平车前 *P. depressa* 的干燥成熟种子,是一种临床常用的大宗药材^[1]。车前子微寒、味甘,具有清热利尿,渗湿通淋,明目,祛痰的功效。临床上主要用于治疗水肿胀满、热淋涩痛、暑湿泄泻、目赤肿痛、肺热咳嗽等。但车前属植物在我国的分布广泛,包括有17种、2变种、1变型,共23个分类单位^[2]。由于我国车前资源分布广泛,产地的自然环境差异很大,而且其种子外部形态特征差异较小,导致药材混杂的现象较为普遍^[3]。因此,对车前子进行质量控制及品质评价具有重要意义。本研究以不同产地和品系的24批车前子样品为基础,综合运用指纹图谱相似度评价、系统聚类和主成分分析等化学模式识别方法,以期建立车前子质量控制与评价体系。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695 separations module 高效液相色谱仪,Waters 2996 photodiode array detector 检测器,Waters empowder 化学工作站;BP211D 电子天平(Sartorius,1/1万);KQ5200 超声波清洗器(昆山超声仪器厂);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);高速中药粉碎机(瑞安市环球药械厂)。

1.2 试剂

高效液相用甲醇、乙腈、色谱纯,其余试剂为分析纯,水为高纯水。

1.3 样品

车前子药材分别采自江西、湖南、浙江、黑龙江、河南、山东、甘肃、贵州、安徽等地24个不同地区、不同品系车前子,样品并经江西中医学院药学院葛菲教授鉴定,见表1。

表1 车前子药材样品号与产地

Table 1 Origins of 24 batches plantain seed samples

| No. | 样品产地 | 品种 |
|-----|---------|--------------------------|
| 1 | 江西吉水婆婆庙 | <i>Plantago asiatica</i> |
| 2 | 江西吉水水南镇 | <i>P. asiatica</i> |
| 3 | 江西吉水八都镇 | <i>P. asiatica</i> |
| 4 | 江西吉水值夏镇 | <i>P. asiatica</i> |
| 5 | 江西吉水东固镇 | <i>P. asiatica</i> |
| 6 | 江西安义县 | <i>P. asiatica</i> |
| 7 | 江西樟树 | <i>P. asiatica</i> |
| 8 | 江西泰和 | <i>P. asiatica</i> |
| 9 | 江西修水 | <i>P. asiatica</i> |
| 10 | 江西新干 | <i>P. asiatica</i> |
| 11 | 浙江磐安 | <i>P. asiatica</i> |
| 12 | 浙江杭州 | <i>P. asiatica</i> |
| 13 | 湖南泸溪 | <i>P. asiatica</i> |
| 14 | 湖南邵东 | <i>P. asiatica</i> |
| 15 | 湖南岳阳 | <i>P. asiatica</i> |
| 16 | 湖南新化 | <i>P. asiatica</i> |
| 17 | 山东菏泽 | <i>P. depressa</i> |
| 18 | 河南南阳 | <i>P. depressa</i> |
| 19 | 甘肃甘谷 | <i>P. depressa</i> |
| 20 | 甘肃临夏 | <i>P. depressa</i> |
| 21 | 甘肃武都 | <i>P. major</i> |
| 22 | 甘肃永昌 | <i>P. major</i> |
| 23 | 贵州黔南 | <i>P. lessingii</i> |
| 24 | 安徽合肥 | <i>P. lessingii</i> |

[稿件编号] 20111111007

[基金项目] 国家“十一五”科技攻关项目(2006BAI06A11-05);国家“重大新药创制”科技重大专项子课题(2009ZX09308-002);江西省卫生厅基金项目(2008A061)

[通信作者] *罗光明,教授,从事中药资源品质评价与再生研究, Tel: (0791)87118982, E-mail: jzlgm88@163.com



2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称定芦丁对照品 0.62 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,0.22 μm 滤膜过滤,即得。

2.2 供试品制备

取车前子样品 2 g 于 50 mL 锥形瓶中,加 40 mL 甲醇浸泡 30 min,超声 1 h,抽滤,36 °C 下旋干,加 10 mL 双蒸水,5 mL 石油醚萃取 1 次,弃水层,加乙酸乙酯 20 mL 萃取 4 次,45 °C 旋干,用 10 mL 甲醇定容,0.22 μm 滤膜过滤,即得制得乙酸乙酯部位。

2.3 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 为乙腈,B 为 0.5% 的乙酸水溶液 (A + B = 100%),0 ~ 10 min, A 10% ~ 25%; 10 ~ 18 min, A 25% ~ 36%; 18 ~ 21 min, A 36% ~ 100%; 21 ~ 33 min, A 100%。流速 1 g · L⁻¹;柱温 25 °C;检测波长 270 nm;进样量 10 μL。色谱记录时间为 33 min。检测波长为 270 nm。建立车前子乙酸乙酯部位指纹图谱见图 1,其中 S 峰为芦丁。

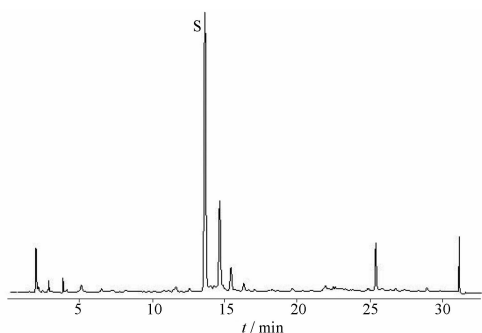


图 1 车前子乙酸乙酯部位指纹图谱 (其中 S 峰为芦丁)
Fig. 1 Fingerprint of the ethyl acetate fraction of the plantain seed extract (Note S is rutin)

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度 取同一批次供试品溶液连续进样 5 次,检测指纹图谱共有峰峰面积及相对保留时间,发现平均相对标准偏差分别小于 2.3%, 2.7%,表明仪器精密密度良好。

2.4.2 重复性 取同一批供试样品 5 份,按 2.2 项下供试品制备方法制备供试品溶液进样分析,检测指纹图谱共有峰峰面积及相对保留时间,发现平均相对标准偏差小于 2.1%, 2.7%,表明结果重复性

良好。

2.4.3 稳定性 取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 24 h 进样。结果表明供试品在 24 h 内稳定。

2.5 综合化学模式的建立

2.5.1 指纹图谱相似性评价 按 2.3 项下色谱条件,对 1 ~ 24 批供试品进样分析,记录色谱图。利用 2004 年中草药指纹图谱相似度评价系统 A 版软件,以江西 1 ~ 10 号样品指纹图谱为基础,采用自动匹配及中位数法生成共有指纹图谱 R,并分析了测试样品共有峰及与共有指纹图谱的相似度,确定共有峰 10 个。各指纹图谱见图 2,与共有指纹图谱 R 相似度分别见表 2。

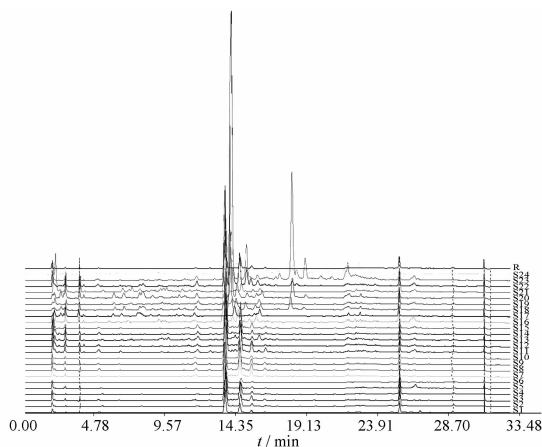


图 2 24 批车前子指纹图谱 (R 为共有指纹图谱)
Fig. 2 Fingerprint of 24 batches plantain seed samples (Note R is the common fingerprint)

表 2 车前子药材各样品与共有指纹图谱 R 相似度
Table 2 The similarity between the common fingerprint R and 24 batches plantain seed samples

| 样品号 | 与 R 相似度 | 样品号 | 与 R 相似度 |
|-----|---------|-----|---------|
| 1 | 0.994 | 13 | 0.928 |
| 2 | 0.969 | 14 | 0.975 |
| 3 | 0.991 | 15 | 0.983 |
| 4 | 0.969 | 16 | 0.931 |
| 5 | 0.942 | 17 | 0.509 |
| 6 | 0.934 | 18 | 0.508 |
| 7 | 0.984 | 19 | 0.621 |
| 8 | 0.984 | 20 | 0.549 |
| 9 | 0.984 | 21 | 0.305 |
| 10 | 0.995 | 22 | 0.311 |
| 11 | 0.98 | 23 | 0.047 |
| 12 | 0.973 | 24 | 0.015 |



2.5.2 系统聚类分析 运用 SPSS 11.5 数据统计分析软件,将 24 批样品的 10 个共有峰峰面积数据,选用组间对比 (between-groups linkage) 进行聚类,用 cosine 法计算样品相似度程度,聚类结果见图 3。由图中结果可将 24 批样品聚为 3 个大类,样品 5, 10, 1, 6, 4, 9, 2, 11, 7, 12, 3, 8, 13, 15, 16, 14 聚为 1 类,样品 17, 19, 18, 20, 21 聚为 1 类, 24, 23, 22 聚为 1 类。

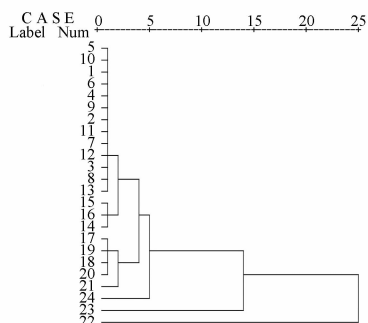


图 3 24 批车前子药材的系统聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of hierarchical cluster analysis for 24 batches plantain seed samples

2.5.3 主成分分析 本实验将 24 批样品的 10 个共有峰峰面积数据导入 SPSS 11.5 数据分析软件,进行主成分分析,分别取第 1、第 2、第 3 主成分作图,见图 4。主成分投影图显示 24 批样品可聚成 4 类,第一类为样品 1 ~ 16 号,第二类为样品 17 ~ 20 号,第三类为样品 21 ~ 23 号,24 号样品独成 1 类。

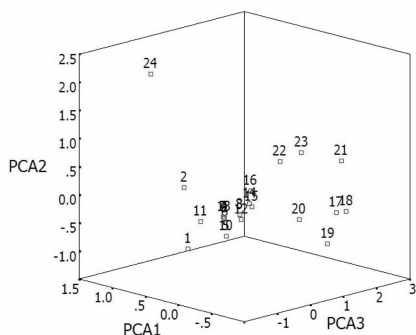


图 4 24 批车前子样品主成分投影图

Fig. 4 The scatter plot obtained by principal comonents analysis of 24 batches plantain seed samples

3 小结与讨论

车前分布广泛,品种较复杂,种子外观形态却非常相似,采用传统方法难以区别,亟需采用现代分析技术建立起有效的质量控制与品质评价方法。药理研究表明,其乙酸乙酯部位为其利尿、止咳、抗炎等作用的有效部位。因此,基于乙酸乙酯部位的化学模式识别研究对于车前子的质量控制与品质评价具有重要意义。

中药材 HPLC 指纹图谱、系统聚类分析与主成分分析法都是基于化学成分的模式识别方法,本实验结果表明,综合运用各种化学模式识别可有效控制与评价其药材质量。

由车前子指纹图谱相似度分析结果可以看出,不同品种不同产地车前子乙酸乙酯部位指纹图谱相似度相差较大。气候及地域与江西接壤的湖南、浙江车前和平车前种子与江西车前种子指纹图谱相似度较高,其他品种车前种子则与平车前和车前种子相似度较低,表明生长环境、气候不同乃至种植方式方法均可导致车前子化学成分上的差异。

系统聚类与主成分分析结果较为接近,但有一定差异。在聚类分析中,22 号样品与其他样品相距最远,而在主成分分析中,24 号样品与其他样品相距较远。另外,21 号样品在聚类分析中更靠近 17 ~ 20 号样品,而在主成分分析中则更靠近 21 ~ 23 号样品。这可能是一方面聚类分析是以相对峰面积分类,而主成分分析是以绝对峰面积分类;另一方面,主成分分析是以样品的少数重要变量特征来进行分类,因此造成了分类差异。

综合考虑样品相似度、共有峰相对峰面积与绝对峰面积,可以将样品 1 ~ 16 归类一类,17 ~ 20 号归类一类,此 2 类为药典品种;21 ~ 24 号归类一类,此类为非药典品种。

因此,采用综合化学模式识别较客观地反映了不同因素对药材品质的影响,可为车前子药材质量控制与评价提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2000: 51.
- [2] 郑太坤,田中俊弘,唐廷国. 中国车前研究[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1993:13.
- [3] 倪福祿,赵艳,霍旺. 车前子人工掺伪品的鉴别[J]. 长春中医药大学学报,2008,24(6): 668.



Comprehensive chemical pattern recognition of *Plantago Semen*

LUO Guangming* , ZENG Jinxiang, ZHU Jixiao

(*School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To establish a method of comprehensive chemical pattern recognition of plantain seed via HPLC fingerprint, principal component analysis (PCA) and cluster analysis. **Method:** The chromatographic separation was performed on a C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m). The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.5% acetic acid aqueous solution in gradient elution. The HPLC fingerprint of ethyl acetate fraction of 24 batches *Plantago Semen* from different habits and varieties was set up and 10 common peaks were obtained. **Result:** The result of the principal component analysis (PCA) and cluster analysis is similar but there is disparity between them. **Conclusion:** The method could be used for the quality control and comprehensive evaluation of *Plantago Semen*.

[**Key words**] *Plantago Semen*; comprehensive chemical pattern recognition; quality control and assessment

doi:10.4268/cjcm20120820

[责任编辑 吕冬梅]