

基于¹H-NMR和主成分分析法分类鉴别秦艽药材

杨凤仙, 陈炼红, 李荣娇, Brian D. McGarvey, 王晓玲*
(西南民族大学化学与环境保护工程学院, 成都 610041)

[摘要] 目的:以多基原药材秦艽为研究对象,应用核磁共振氢谱(¹H-NMR)和主成分分析方法(PCA)鉴别不同来源秦艽药材。方法:将5种不同秦艽药材在相同条件下进行溶剂提取,采用核磁共振波谱仪进行检测,图谱进行数据处理、聚类分析和PCA。结果:通过聚类分析可很好地区分5种秦艽药材;在PCA中提取了6个主成分,累计贡献率达98.9%,前2个主成分累积贡献率达76.9%,能解释原变量信息的76.9%,在以主成分1和主成分2为横纵坐标的得分散点图上实现了不同基原秦艽药材的区分。结论:¹H-NMR结合PCA是一种有效的药材资源鉴别研究方法,能全面反映不同基原药材的全成分且前处理方便,可作为分类鉴别不同来源药材的手段之一。

[关键词] 秦艽;核磁共振氢谱;聚类分析;主成分分析

[中图分类号] R282.5;R284.1;R931.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0036-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160036

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150702.1011.005.html>

[网络出版时间] 2015-07-02 10:11

Metabolomic Classification for Species of Gentianae Macrophyllae Radix by ¹H-NMR and Principal Component Analysis YANG Feng-xian, CHEN Lian-hong, LI Rong-jiao, Brian D. McGarvey, WANG Xiao-ling* (College of Chemistry and Environment Protection Engineering, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To develop methodology for significant discrimination of different groups of Gentianae Macrophyllae Radix based on ¹H-NMR analysis combined with principal component analysis (PCA). **Method:** Five groups of Gentianae Macrophyllae Radix were extracted by the same method, ¹H-NMR spectra were obtained using a 400 MHz NMR spectrometer. Then data were analyzed by hierarchical cluster analysis and PCA. **Result:** Different groups of Gentianae Macrophyllae Radix could be discriminated by hierarchical cluster analysis. Furthermore, 6 principal components were extracted in PCA, their cumulative contribution rate was 98.9%, and loading plot of PC1 and PC2 explained 76.9% of the original variance. **Conclusion:** ¹H-NMR combined with PCA is an effective method for discrimination of Chinese medicines, its pre-treatment is convenient, therefore it can be used as a valuable means for discrimination of different groups of herbal medicines.

[Key words] Gentianae Macrophyllae Radix; ¹H-NMR; cluster analysis; principal component analysis

秦艽具有祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热的功效,用于治疗风湿痹痛、中风半身不遂、筋脉拘挛等证,其主要化学成分有龙胆苦苷、獐牙菜苦苷等。文献报道在秦艽脂溶性部位可分得三萜及甾体类化合物^[1]。秦艽花是我国传统藏族药材,具有悠久的用药历史,藏族药名为解吉嘎保,载于《中国药品部颁

标准》藏药分册^[2],归胃、肝、胆经,可祛风湿、舒经络、清虚热、利湿退黄。以解吉嘎保入药的秦艽花种类较多,比如麻花秦艽和川西秦艽等10余种^[3]。秦艽花的主要化学成分为环烯醚萜苷类,如龙胆苦苷、獐牙菜苦苷^[4]。秦艽类药材来源多,伪品也多,有的还有毒^[5]。据2010年版《中国药典》记载,秦艽

[收稿日期] 20141125(008)

[基金项目] 四川省科技厅重点科技自筹项目(2013SZZ028);西南民族大学2014年研究生创新型科研项目(CX2014SZ55)

[第一作者] 杨凤仙,在读硕士,从事天然药物化学研究,Tel:18081128090,E-mail:2091085534@qq.com

[通讯作者] *王晓玲,博士,教授,从事天然药物化学研究,Tel:13258159190,E-mail:wxl3232@sina.com

的鉴别采用薄层色谱法(TLC)对龙胆苦苷及枳椇酸进行定性检测^[6],但单一成分的检测不能全面反映药材的真伪和分类情况。核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)具有无损性等特点^[7],很适合研究代谢产物中的成分。最有效的模式识别方法为主成分分析法(principal component analysis, PCA)。PCA能对¹H-NMR谱获得的大量数据进行分类降维。故本实验采用¹H-NMR-PCA对不同来源的秦艽药材进行归类鉴别,为该药材的不同基原鉴别提供参考。

1 材料

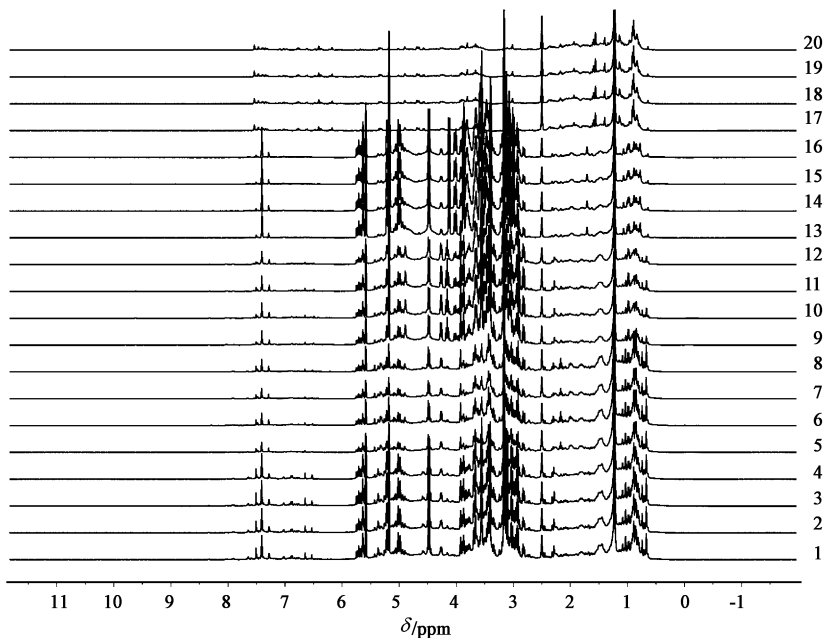
400 MHz型核磁共振仪(美国瓦里安公司), GL-88B型旋涡混合器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司)。氘代二甲基亚砜(DMSO)和四甲基硅烷(TMS)均购自美国Sigma-Aldrich公司,试剂均为分析纯。5种秦艽药材由西藏自治区药检所达瓦卓玛副主任药师鉴定分别为小秦艽 *Gentiana dahurica* (2012年8月采于青海门源), 麻花秦艽 *G. straminea* (2012年8月采于青海门源), 西藏秦艽花 I *G. tibetica* (2012年9月采于西藏墨竹工卡), 西藏秦艽花 II *G. tibetica* (2012年6月采于西藏林芝) 和川西秦艽花 *G. dendrologi* (2012年9月采于四川阿坝), 每个样品4份, 依次标记为小1~4, 麻1~4, 西1~4, 秦1~4, 川1~4, 标本存放在西南民族大学少数民族药物研究所标本室。

2 方法与结果

2.1 样品的预处理 称取20份样品, 每份约4.0 g, 各加入甲醇80 mL^[6], 于65℃水浴回流提取2次, 每次2 h, 提取溶液合并后回收溶剂, 得湿浸膏^[8]。将湿浸膏用甲醇定容至100 mL, 分别量取2.5 mL至核磁管中, 抽干溶剂, 冷冻干燥, 加入DMSO 0.5 mL, 震荡混匀。

2.2 核磁共振图谱检测 检测温度25℃, 扫描数64次, 谱宽6 410.3 Hz, 脉冲宽度0 μs, 采样时间2.555 9 s, 采用标准的预饱和脉冲序列(Presat)压制水峰信号^[9]。将准备好的样品溶液分别在核磁共振仪上测定, 见图1。

2.3 图谱处理及数据采集 将所得各样品的自由感应衰减信号(free induction decay, FID)导入MestReNova软件进行傅里叶转换, 并手动调整相位和基线, 化学位移以DMSO五重峰定标。每张谱图积分区间为δ 0.5~10, 按0.05积分间隔为一个binning^[10-12]进行分段积分, 得到1个数据矩阵。矩阵中每行代表1个样本的所有变量, 每列代表所有样本的同一变量。为了消除溶剂峰的影响, 将积分区间δ 2.45~2.55的积分值设为0。为了消除样本间因质量浓度不同带来的分析误差, 在进行聚类分析与主成分分析之前对数据矩阵中各分段积分值进行归一化处理^[13]。归一化后的数值将导入SPSS 19.0和Excel中进行聚类分析和主成分分析。



1~20号分别为西1~4, 秦1~4, 川1~4, 小1~4和麻1~4

图1 不同秦艽样品¹H-NMR

Fig.1 ¹H-NMR of different groups of Gentianae Macrophyllae Radix

2.4 数据分析

2.4.1 不同来源秦艽药材的分类 聚类分析是研究“物以类聚”的一种多元统计分析方法。系统聚类法的基本思想是认为研究的样本或变量间存在着不同程度的相似性。依据 1 批样本的多个观测指标,找出一些能够度量样本或变量之间相似性程度的统计量,以这些统计量为划分类型的依据。将 5 种秦艽药材前 3 次提取数据用于分类。在 SPSS 19.0 中对矩阵中数据标准化后进行系统聚类,见图 2。结果显示 5 种秦艽药材得到了很好的区分,其中麻花秦艽与其余几种秦艽药材差异明显,小秦艽其次。

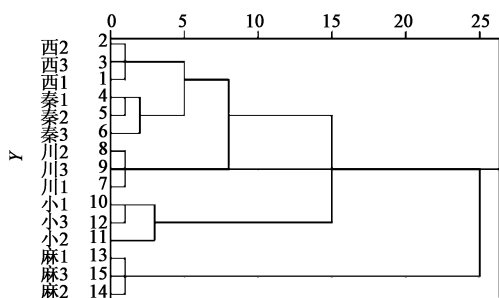


图 2 前 3 次提取的秦艽药材聚类分析
Fig.2 Cluster analysis of the first three extraction of *Gentiana Macrophyllae Radix*

采用模式识别方法中的主成分分析法 (PCA)^[14]。基于多变量的 PCA,是通过对矩阵中多变量进行降维,提取主成分 (principal component, PC) 后对所有样本进行分析,能给出不同样本间的代谢差异。将数据矩阵中的数据导入 SPSS 19.0,提取了 6 个主成分,6 个主成分累计贡献率达 0.989,表示这 6 个主成分可解释原变量信息的 98.9%,其中 PC1 和 PC2 可解释原变量信息的 76.9%。以 PC1 的得分值和 PC2 的得分值分别为横、纵坐标,绘制得分散点图,见图 3。结果显示 5 种不同来源的秦艽药材在 PC1 上可很好的区分。川西秦艽、小秦艽和麻花秦艽在 PC2 上也得到了良好的区分。由于西藏秦艽花 I 与西藏秦艽花 II 产地很接近,所以在得分散点图上比较接近。此结果与聚类分析结果一致。

2.4.2 秦艽药材的鉴别 以第 4 次提取的 5 种秦艽药材为鉴别对象,将第 4 次所得数据加入前 3 次所得数据矩阵中,导入 SPSS 19.0 和 Excel 进行分析。PCA 共提取了 6 个主成分,累计贡献率 0.988。表明这 6 个主成分可解释原变量信息的 98.8%,其

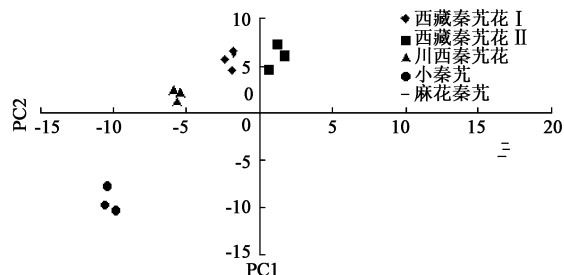


图 3 前 3 次提取的秦艽 PCA 主成分 1 对主成分 2 的得分散点
Fig.3 Score scatter plot of PC1/PC2 in the first three extraction of *Gentiana Macrophyllae Radix* through PCA

中前 2 个主成分可解释原变量信息的 77.1%,以 PC1 和 PC2 的得分为横纵坐标,绘制得分散点图,见图 4。结果显示第 4 次提取的 5 种不同基原秦艽药材都得到了很好的归类,结合图 3 可以实现 5 种药材的鉴别。

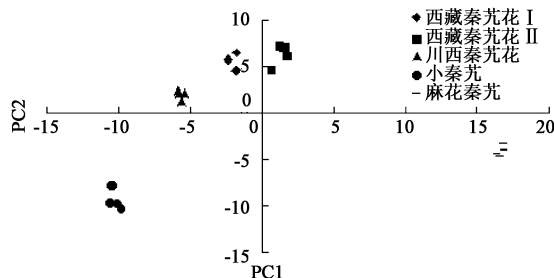


图 4 第 4 次提取的秦艽 PCA 主成分 1 对主成分 2 的得分散点
Fig.4 Score scatter plot of PC1/PC2 in the fourth extraction of *Gentiana Macrophyllae Radix* through PCA

3 讨论

在相同的实验条件和操作过程中,个体样本间的差异会对植物次生代谢产物分析结果产生一定影响,而不同实验环境、人为因素对结果的影响不显著^[15]。从聚类分析与 PCA 结果可知,不同来源是导致代谢物所含成分差异的主要因素,且 5 种不同来源的秦艽药材无论是在聚类分析图还是在 PCA 图上都得到了良好的区分,麻花秦艽与其他 4 种来源的秦艽类药材差异最为显著,小秦艽其次,真实的反映了药材之间的本质区别。但由于本实验中采样时间有限,而且采集地方皆为高寒地带,交通不便,所以只做了 1 批样本的鉴定。

传统质量控制方法是对药材的有效成分进行定性和定量,而本文基于¹H-NMR-PCA 对中药的全部代谢物进行分析,比单独检测 1 种或 1 类成分更能全面反映药材的整体情况,并且该方法前处理容易、操作简便、快速,可为其他中药材的鉴定提供参考。

中药材品种的多基原自古有之,多基原药材因内部遗传信息的明显差异和外部生长环境、栽培及采收加工等因素的影响,导致不同品种药材有效成分的种类或含量存在差异,化学多样性更加突出,比单基原药材的质量控制更加困难。并且由于“同名异物”现象、地区用药习惯差异、野生资源量匮乏和经济利益等因素,药材在实际流通和应用过程中常出现地区习用品、替代品和伪品,这使得中药材基原更加复杂,来源更加混乱,严重影响了药材的质量。利用现代科学技术加强复杂多基原中药材的品种鉴别、质量控制与评价研究,促进药材质量标准的完善与提高,是提升中药材的科技水平,推动其现代化、产业化的重要手段之一。

[参考文献]

[1] 陈千良,石张燕,涂光忠,等. 陕西产秦艽的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(19):1519-1522.
[2] 国家卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准. 藏药分册[S]. 2000;222.
[3] Zhao Z L, Dorje G, Wang Z T. Identification of medicinal plants used as Tibetan traditional medicine Jie-Ji[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(1): 122-126.
[4] 胡一晨,廖晴,万丽,等. 秦艽花液质联用的指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):67-70.
[5] 戴善光. 秦艽与常见伪品的鉴别[J]. 广西中医学院学报,2005,8(3):97-98.
[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2010:253-254.

[7] 赵剑宇,颜贤忠. 基于核磁共振的代谢组学研究进展[J]. 国外医学:药学分册,2004,31(5):308-312.
[8] 赵瑞芝,梁伟杰,邱小惠. 龙胆药材中龙胆苦苷的提取工艺研究[J]. 中国药房,2005,16(12):956-957.
[9] 罗乔奇,田祥琴,张琦,等. 基于氢核磁共振-主成分分析建立洁尔阴洗液质量控制的研究[J]. 中草药,2009,40(12):1907-1911.
[10] De Meyer T, Sinnave D, Van Gasse B, et al. NMR-based characterization of metabolic alterations in hypertension using an adaptive, intelligent binning algorithm[J]. Anal Chem, 2008, 80(10): 3783-3790.
[11] Eads C D, Furnish C M, Noda I, et al. Molecular factor analysis applied to collections of NMR spectra[J]. Anal Chem, 2004, 76(7): 1982-1990.
[12] Slupsky C M, Rankin K N, Wagner J, et al. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles[J]. Anal Chem, 2007, 79(18): 6995-7004.
[13] 杨永霞,陈书峰,陈阿丽,等. 重症乙型肝炎患者血清代谢组研究[J]. 中国抗生素杂志,2011,36(3):220-222.
[14] 张小确,高技荣,夏云贵. 主成分分析方法及其在个仪器分析中的运用[J]. 河北工业科技,2007,24(6):345-354.
[15] 李怡,周金琳,李伟. 初探各实验条件对基于核磁共振的代谢组学研究结果的影响[J]. 生物医学工程学杂志,2010,27(2):241-244.

[责任编辑 刘德文]