

不同等级厚朴饮片质量评价指标的系统聚类分析

翁德会¹, 刘先琼², 许腊英^{2*}, 沈雨², 胡慧芬²

(1. 武汉华夏理工学院 生物与制药学院, 武汉 430223; 2. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065)

[摘要] 目的:建立厚朴饮片质量评价指标的聚类分析,规范该饮片的质量规格。方法:测定不同产地及同一产地不同树龄厚朴饮片的水溶性浸出物、醇溶性浸出物、挥发油、厚朴酚与和厚朴酚的含量,并对其进行不同类间距离聚类分析。结果:厚朴饮片的水溶性浸出物、醇溶性浸出物、挥发油及总酚的含量与厚朴的级别呈正相关。厚朴饮片可分为三个等级,一级饮片:规格为厚度4~6 mm,挥发油质量分数>0.7%,水溶性浸出物质量分数>10%,醇溶性浸出物质量分数>20%,厚朴酚与和厚朴酚总质量分数>15%。二级饮片:规格为厚度2~4 mm,挥发油质量分数>0.35%,水溶性浸出物质量分数>5%,醇溶性浸出物质量分数>8%,厚朴酚与和厚朴酚总质量分数>7%。三级饮片:低于以上各指标值的均归为此类。结论:利用质量指标评价厚朴饮片与传统分级存在一定的相关性,为综合评价厚朴饮片质量规格提供了新思路。

[关键词] 饮片等级;厚朴;浸出物;挥发油;有效成分;聚类分析;厚朴酚

[中图分类号] R282.4;R284.1;R943.1;R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0006-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230006

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0906.002.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:06

Hierarchical Cluster Analysis of Quality Evaluation Index of Magnoliae Officinalis Cortex with Different Grades

WENG De-hui¹, LIU Xian-qiong², XU La-ying^{2*}, SHEN Yu², HU Hui-fen²

(1. College of Biology and Pharmaceutical, Wuhan Huaxia University of Technology, Wuhan 430223, China;
2. Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To set up the hierarchical cluster analysis of quality evaluation index of Magnoliae Officinalis Cortex with different grades, and standardize its quality standard. **Method:** Contents of water soluble extract, alcohol soluble extract, volatile oil, magnolol and honokiol in Magnoliae Officinalis Cortex from different origin and different ages with the same origin were determined, then they were investigated by cluster analysis. **Result:** Contents of water soluble extract, alcohol soluble extract, volatile oil and total phenol were positively correlated with the level of Magnoliae Officinalis Cortex. By the analysis of hierarchical cluster, the three hierarchies were proposed, such as premium grade with thickness of 4-6 mm, volatile oil content > 0.7%, water soluble extract > 10%, alcohol soluble extract > 20%, total content of magnolol and honokiol > 15%; the second grade with thickness of 2-4 mm, volatile oil content > 0.35%, water soluble extract > 5%, alcohol soluble extract > 8%, total content of magnolol and honokiol > 7%; the third grade with every index was less than the above. **Conclusion:** There is a certain correlation with traditional grading and quality index evaluation for Magnoliae Officinalis Cortex.

[Key words] grade of decoction pieces; Magnoliae Officinalis Cortex; extract; volatile oil; active ingredient; cluster analysis; magnolol

[收稿日期] 20160118(021)

[基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201007012-2);武汉华夏理工学院校级科研基金项目(16001)

[第一作者] 翁德会,副教授,从事中药饮片的有效成分的提取及质量标准化研究,Tel:13986249486,E-mail:450208495@qq.com

[通讯作者] *许腊英,教授,从事中药饮片标准化研究,Tel:18971211681,E-mail:xulaying@163.com

厚朴始载于《神农本草经》,列为中品,是一味传统的芳香化湿药^[1-3],具有抗菌、消炎、抗胃溃疡、抗氧化等作用,以树皮入药。厚朴的生长周期较长,一般要到种植后的 15~20 年才可采剥,甚至有研究认为其采收期应在种植 27 年后^[4]。由于厚朴资源的不断减少,大批生产年限不足 15 年的厚朴被提前砍伐,造成厚朴药材质量下降^[5-6],严重影响了临床疗效。

厚朴药材的优劣评价多以厚朴酚、和厚朴酚含量为指标,由于厚朴的种源存在着个体差异,研究者为了判别几种不同种源的厚朴加工成厚朴药材的质量优劣,分别取 7 个省 13 个种源的厚朴,以及同一种源不同个体的厚朴,比较其厚朴酚含量、和厚朴酚含量、厚朴酚与和厚朴酚总量、厚朴酚与和厚朴酚的含量比^[5,7],另还有厚朴同功酶和 DNA 指纹图谱研究^[8-10],发现湖北五峰、鹤峰和恩施 3 个种源的厚朴质量明显优于别的种源^[11-13];但对同一种源中不同树龄的厚朴药材的优劣及厚朴饮片质量评价指标尚未见报道。本实验通过对不同产地及同一产地不同树龄的厚朴饮片的浸出物、挥发油、厚朴酚与和厚朴酚的含量进行研究,发现厚朴饮片的水溶性浸出物、醇溶性浸出物、挥发油及总酚的含量均与厚朴的级

别呈正相关,即树龄越长,其含量越高,且湖北恩施的样品中各指标均最高,重庆南川的样品其次,陕西商洛的样品第三,其他样品均较低。对各指标进行聚类分析,制定了厚朴饮片的综合评分方法,为该饮片质量规格分级的综合评价提供新思路。

1 材料

P680 型高效液相色谱仪(美国戴安公司), AB104-N 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), HN101-3A5 型电热恒温鼓风干燥箱(上海科韶仪器有限公司)。厚朴酚、和厚朴酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110729-200412, 110730-201011),水为自制重蒸馏水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

厚朴的采收期为 4~6 月,需经过产地加工,于 2011 年 7 月—2012 年 1 月采集当年的厚朴药材及各企业生产的饮片,共收集厚朴药材 10 批和厚朴饮片 9 批,厚朴药材的分级标准参考《现代中药材商品手册》^[14],样品来源见表 1。样品均经湖北中医药大学吴和珍教授鉴定为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* 或凹叶厚朴 *M. officinalis* var. *bilota* 的干燥根皮、干皮及枝皮。

表 1 厚朴样品的采收情况

Table 1 Harvesting conditions of *Magnoliae Officinalis* Cortex

时间	地点	样品来源	采样量	编号
2011-07	湖北恩施	腾云农业发展科技有限公司	药材干皮(一级、二级、三级、统货各 5 kg)	A1, A2, A3, A4
2012-01	重庆南川	南川中药材有限公司	药材干皮(一级、二级、三级各 5 kg)	B1, B2, B3
2012-01	陕西商洛	香菊药业有限责任公司	药材干皮(一级、二级、三级各 5 kg)	C1, C2, C3
2011-04	湖北武汉	刘天保药业有限责任公司	饮片 5 kg	D
2011-07	湖北恩施	圣峰药业有限公司	饮片 5 kg	E
2011-10	湖北十堰	云浩药业有限公司	饮片 5 kg	F
2011-10	江西宜春	樟树天齐堂药业有限公司	饮片 5 kg	G
2011-11	四川成都	新荷花中药饮片股份有限公司	饮片 5 kg	H
2011-11	湖南怀化	龙源药业有限责任公司	饮片 5 kg	I
2011-11	湖南怀化	芷江侗族自治县药材公司	饮片 5 kg	J
2011-11	湖北武汉	天济中药饮片有限公司	饮片 5 kg	K
2012-01	陕西商洛	香菊药业有限责任公司	饮片 5 kg	L

按当地分级方法即树龄的高低(树龄信息从当地药农口中得知)将其分级。恩施的紫油厚朴药材分为 4 个等级。一级药材:生长年限 40~45 年的干皮(记为 A1);二级药材:生长年限 25~35 年的干皮(记为 A2);三级药材:生长年限 15~25 年的干皮(记为 A3);统货:枝皮、根皮混合(记为 A4)。重庆

南川的厚朴药材为干皮,分为 3 个等级。一级药材:生长年限 25~35 年的干皮(记为 B1);二级药材:生长年限 15~25 年的干皮(记为 B2);三级药材:生长年限 10~15 年的干皮(记为 B3)。陕西商洛的厚朴药材为干皮,分为 3 个等级。一级药材:生长年限 20~30 年的干皮(记为 C1);二级药材:生长年限

15~20 年的干皮(记为 C2);三级药材:生长年限 10~15 年的干皮(记为 C3)。

2 方法与结果

2.1 饮片的加工 取样品 A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, C1, C2, C3 各 4.0 kg,按 2015 年版《中国药典》中厚朴饮片的炮制方法炮制。在饮片制备的过程中,控制挑选、淋洗、浸润、切丝、干燥及包装等各个工序的操作,保证得到产量高、质量优的饮片,结果得质量分别为 3.0,3.2,3.4,3.4,3.3,3.3,3.5,3.2,3.3,3.5 kg 的饮片。饮片的编号沿用药材的编号。

2.2 浸出物的测定 按 2015 年版《中国药典》四部通则 2201 浸出物测定法测定,取各样品粉末 4.0 g,以干燥品计算样品中水溶性和醇溶性浸出物含量,见表 2。结果发现 19 批样品的醇溶性浸出物含量均高于水溶性浸出物含量。对于样品 A1~A4, B1~B3, C1~C3 的水溶性和醇溶性浸出物含量,基本呈现等级越高浸出物含量越高的趋势,说明厚朴的分级与浸出物的含量有关,且为正相关。

表 2 不同厚朴样品的 5 种质量评价指标值

Table 2 Five kinds of quality evaluation index value of Magnoliae Officinalis Cortex samples

No.	饮片厚度 /mm	挥发油 /%	水溶性浸出物 /%	醇溶性浸出物 /%	总酚 /%
A1(1)	4~6	0.85	11.19	26.36	19.22
A2(2)	3~4	0.67	8.78	20.01	11.60
A3(3)	2~3	0.34	7.45	13.29	8.84
A4(4)	1~2	0.28	2.47	5.44	2.66
B1(5)	3~4	0.56	8.37	18.61	12.18
B2(6)	1~2	0.35	5.19	8.56	7.57
B3(7)	1~2	0.33	4.61	8.76	6.18
C1(8)	3~4	0.45	7.67	15.51	10.33
C2(9)	1~2	0.35	5.88	8.72	7.73
C3(10)	1~2	0.27	3.99	7.34	4.04
D(11)	1~2	0.33	4.29	7.64	6.52
E(12)	1~2	0.36	3.44	6.79	5.51
F(13)	1~2	0.37	4.37	8.52	5.87
G(14)	1~2	0.11	3.15	6.38	2.82
H(15)	1~2	0.35	4.30	7.57	4.67
I(16)	1~2	0.13	2.22	4.65	3.07
J(17)	1~2	0.11	2.35	5.11	2.58
K(18)	1~2	0.37	3.55	6.60	5.80
L(19)	1~2	0.27	4.19	7.33	3.88

注:总酚质量分数计为厚朴酚与和厚朴酚质量分数的总和。

2.3 挥发油的测定 将各厚朴饮片样品粉碎,精密称取 50 g,按 2015 年版《中国药典》四部通则 2204 挥发油测定法测定,见表 2。结果说明厚朴的分级与挥发油含量有关,且为正相关。

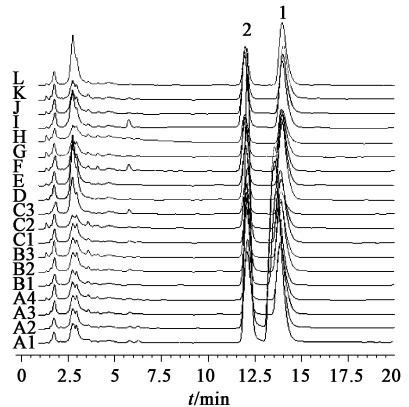
2.4 厚朴有效成分的含量测定

2.4.1 色谱条件 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(73:27),检测波长 294 nm。理论板数按厚朴酚峰计 >3 800。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取厚朴酚、和厚朴酚对照品 7.64,3.88 mg,分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得储备液。精密吸取各对照品储备液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL 分别置 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列对照品溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称取厚朴饮片粉末(过三号筛)0.2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,摇匀,密塞,超声提取 1 h,加甲醇补足失重,滤过,精密量取续滤液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.4 样品测定 取供试品溶液 10 μL,按 2.4.1 项下色谱条件测定,结果见表 2 和图 1。结果不论是厚朴酚还是和厚朴酚的含量,等级越高者含量越高,总酚含量也是最高的,说明厚朴的分级与厚朴酚、和厚朴酚的含量有关,且为正相关。



1. 厚朴酚;2. 和厚朴酚

图 1 厚朴样品 HPLC

Fig. 1 HPLC of Magnoliae Officinalis Cortex

2.5 系统聚类分析 利用 SPSS 17.0 软件,按 5 个质量评价指标将 19 组样品进行聚类分析^[15],见图 2~8。结果发现不同类间距离定义得到的树状图,19 个样本逐个合并成的一些小子集略有差异,但从总体趋势观察,可分为三大类。湖北恩施产一级厚朴样品 A1 为一类;湖北恩施产二级和三级厚朴样品 A2 和 A3,南川产一级厚朴样品 B1,陕西商洛产一级厚朴 C1 为一类;其余的样品统归为第三类。

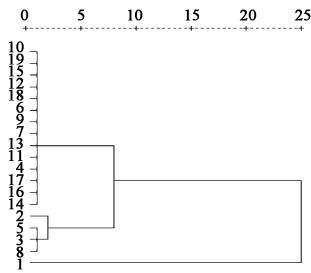


图 2 组间距离法聚类分析厚朴样品

Fig. 2 Magnoliae Officinalis Cortex samples analyzed by between-group linkage

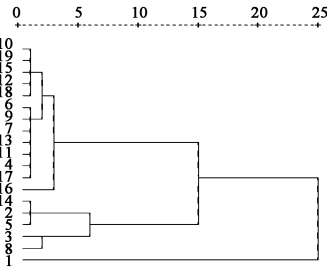


图 3 组内距离法聚类分析厚朴样品

Fig. 3 Magnoliae Officinalis Cortex samples analyzed by within-group linkage

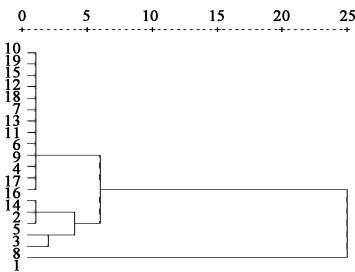


图 4 最短距离法聚类分析厚朴样品

Fig. 4 Magnoliae Officinalis Cortex samples analyzed by nearest neighbor

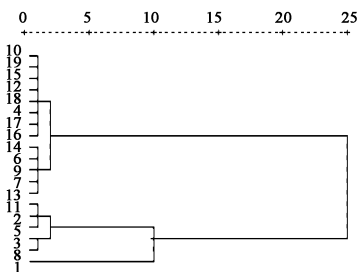


图 5 最长距离法聚类分析厚朴样品

Fig. 5 Magnoliae Officinalis Cortex samples analyzed by furthest neighbor

3 讨论

将评价厚朴质量优劣的传统方法与现代方法结合分析,发现厚朴饮片的厚度、水(醇)溶性浸出物含量、挥发油含量、有效成分含量与通过传统方法分级得到的不同级别饮片间呈正相关。确定将饮片厚

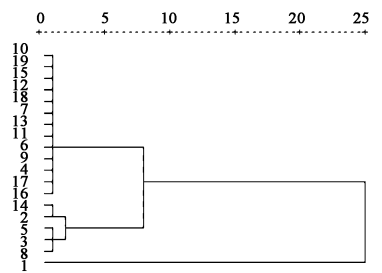


图 6 重心法聚类分析厚朴样品

Fig. 6 Magnoliae Officinalis Cortex samples analyzed by centroid clustering

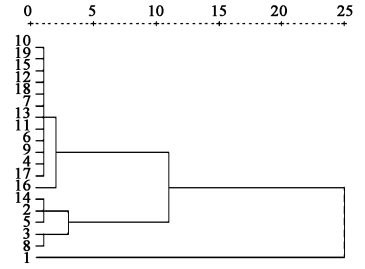


图 7 中位数距离法聚类分析厚朴样品

Fig. 7 Magnoliae Officinalis Cortex samples analyzed by median clustering

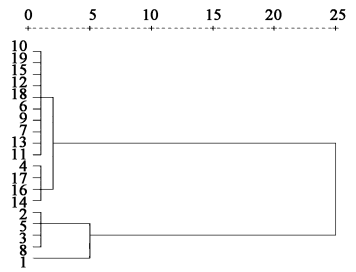


图 8 离差平方和法聚类分析厚朴样品

Fig. 8 Magnoliae Officinalis Cortex samples analyzed by ward's method

度、浸出物含量、挥发油含量、有效成分含量作为其质量评价的指标,弥补了前人仅以有效成分含量作为评价指标的单一性。通过系统聚类统计方法,以 5 个质量评价指标作为变量,分析各样本,将所有样本初步聚类为三大类,将分级与各项指标值挂钩,可初步归纳为①一级饮片:规格为厚度 4~6 mm,挥发油质量分数 > 0.7%,水溶性浸出物质量分数 > 10%,醇溶性浸出物质量分数 > 20%,厚朴酚与和厚朴酚总质量分数 > 15%。②二级饮片:规格为厚度 2~4 mm,挥发油质量分数 > 0.35%,水溶性浸出物质量分数 > 5%,醇溶性浸出物质量分数 > 8%,厚朴酚与和厚朴酚总质量分数 > 7%。③三级饮片:低于以上各指标值均归为此类。在厚朴饮片规格分级的研究中,引用了系统聚类分析手段,结果准确,虽方法稍显复杂,使用中可能会有一定的限制,但可采用

综合评分方法将聚类方法简便化,得到更简单的分类方法,后期研究中会进一步探索。

[参考文献]

[1] 宋立人. 现代中药学大辞典. 下册[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:1519.

[2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:1629.

[3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第二册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:886.

[4] 初敏,丁立文,刘红,等. 厚朴商品资源概述[J]. 中草药,2003,34(6):附 14-附 15.

[5] 斯金平,潘心平. 厚朴资源的现状及其发展和保护意见[J]. 中药材,1994,17(8):11-14.

[6] 斯金平,潘心平,潘明炎,等. 人工栽培凹叶厚朴中厚朴酚与和厚朴酚含量的研究[J]. 浙江林业科技,1994,14(5):21-22.

[7] 斯金平,潘心平,童再康,等. 产地与树叶类型与厚朴质量关系的研究[J]. 中药材,1998,21(11):541.

[8] 朱玉球,曾燕如,潘心平,等. 厚朴外观性状与内在品

质的关系[J]. 浙江林学院学报,1999,16(4):387-391.

[9] 朱玉球,童再康,斯金平. 厚朴种源同功酶初步研究[J]. 浙江林学院学报,2000,17(1):32-36.

[10] 王艇,苏应娟,朱建明,等. 中药材厚朴的 DNA 扩增产物指纹分析研究[J]. 中药材,2001,24(10):710-715.

[11] 刘文生,朱建明,何斌,等. 中药材厚朴的随机扩增多态性 NDA 指纹图谱研究[J]. 中药材,2004,27(3):164-169.

[12] 童再康,斯金平. 厚朴遗传改良策略的研究[J]. 经济林研究,2000,18(1):13-15.

[13] 斯金平. 厚朴药材道地性的研究[J]. 中药材,2000,23(7):373-375.

[14] 张万福. 现代中药材商品手册[M]. 北京:中国中医药出版社,1998:352.

[15] 杨妮,戴昱,王建. 不同种质广西莪术植物形态、药材性状及挥发油产量的聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(2):12-15.

[责任编辑 刘德文]

《中国实验方剂学杂志》知网新用采编系统启动说明

本刊为了便于审稿专家、作者、读者更加通畅、便捷、有效的登录并使用该采编系统,拥有更加强大的数据平台共享、实时发布最新稿件处理信息,杜绝网络上假冒网站的猖獗,《中国实验方剂学杂志》社决定于 2016 年 9 月 14 日启用知网新采编系统(www.zgsyfxzz.com)。

新的采编系统前台功能模块区分清晰,一目了然,界面友好,页面操作都十分简易方便。在文前给出辅助审稿工具检测报告,包括学术不端检测、创新性检测、作者学术情况统计等信息,更便于各位审稿专家及编辑有效、快速处理各位作者的稿件。此网站目前已正式启用,开始接受投稿及稿件的正常处理。可以通过知网链接或 www.zgsyfxzz.com 两种方式登录网站。

原采编系统(www.syfxzz.com)目前还在使用中,除投稿功能外,其他的运作功能均能正常运行,如果您还有未处理完的稿件,请您通过在线查询模块登入原系统进行后续处理工作。

在此过程中给各位审稿专家、作者、读者带来的不便和不适应处,我们深感抱歉,还望谅解! 希望各位能尽快了解、使用、喜爱新的采编系统! 如有需要请与我们联系。

编辑	电话	手机	E-mail	QQ
张丰丰	(010)84076882	13611306192	511135923@qq.com	511135923
刘德文	(010)64553854	15210025459	dqliu@icmm.ac.cn	3095569501
周冰冰	(010)64553764	18811528020	zhouh89@163.com	875140439
邹晓翠	(010)64553784	18610670128	zou-ak48@163.com	65029229
顾雪竹	(010)64553814	13601383260	14182115@qq.com	14182115
郑镁香(编务)	(010)84076882	-	syfx_2010@188.com	810566472