

化学模式识别评价中药威灵仙质量的研究*

魏敏吉** 周旭 王玺 朱景生

(沈阳药学院, 沈阳110015)

摘要 本文按威灵仙所含化学成分对6个种、16个产地的21个样品进行了气相色谱分析;以抗炎药活性作为评价质量的指标,将样品分为有抗炎作用和无抗炎作用两大类,一部分作训练集,一部分作试验集;用SIMCA选择特征并分类,再用PCA将选择的特征数据在二维平面上显示;根据分类和显示的结果,可以区分威灵仙样品有无抗炎作用即质量的优劣。

关键词 威灵仙; 模式识别; 质量评价; 气相色谱

种属复杂、产地众多、质量不易控制,是影响中药疗效的主要原因。常用的根据形态和个别化学成分含量评价中药质量的方法,难以解释中药诸化学成分所具有的多种药理作用和药效上常有的协同作用。临床试验虽能直接反映中药质量,但不能用作评价中药质量的方法;与临床疗效试验接近的动物药理实验也因费用高、时间长等原因而受到限制。

中国药典⁽¹⁾规定威灵仙为毛茛科植物威灵仙 *Clematis chinensis* Osbeck、东北铁线莲 *Clematis manshurica* Rupr. 和棉团铁线莲 *Clematis hexapetala* Pail. 的干燥根和根茎,生长在我国大部分地区。市场上除以上三种外,还有其它种植物的根和根茎被当作“威灵仙”销售和使用。威灵仙有祛风湿、通经络、止痛的效能,中医主要将威灵仙用于炎症所致风湿病;威灵仙所含化学成分较多,包括皂甙和白头翁素,曾有以具有抗组织胺作用的后者含量多少作为质量指标的报道⁽²⁾。但实验证实,威灵仙的抗炎作用与所含白头翁素的量不相关,而由所含皂甙的种类和含量所决定。本文对威灵仙样品中皂甙所结合的糖进行气相色谱分析,获得样品所含具有抗炎作用的皂甙的信息,用模式识别方法求出该信息与样品抗炎作用的关系,评价了威灵仙的质量,得到比较满意的结果。

理论部分

根据模式识别原理⁽³⁾,一个样品(模式)可用一个 m 维向量 \vec{x} 表示:

$$x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ij}, \dots, x_{im}) \quad i = 1, 2, \dots, n$$

它是 m 维空间中的一个点, n 个样品可用矩阵 X 表示:

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix}$$

上式 x_{ij} 代表第 i 个样品的第 j 个测量值(特征)。本文兼取两个模式识别方法之长;SIMCA (simple classification algorithm)⁽⁴⁻⁵⁾ 为有监督的方法,在特征选择和分类上较其它方法优越⁽⁶⁾;

本文于1991年4月21日收到

* 国家自然科学基金资助课题

** 本院一九八五届研究生, 本文为其硕士学位论文, 曾于一九八八年在第二届全国计算分析化学学术会议上宣读。

PCA (principal component algorithm)^[7] 为无监督的方法, 其优点是可将多维数据压缩到二维平面上以显示各模式之间的关系。

实 验 部 分

一. 样品及材料

(一) 威灵仙样品 如表 1 所示 (所有样品均经植物形态学鉴定)

Tab 1. Sample species identified and classified by pharmacognosy and chemical pattern recognition

| Sample No. | Source | Species identified | Remark | Anti-inflammatory activity (at the 5% level) | Result of classification |
|------------|--|---|--------|--|--------------------------|
| 1* | Tie ling (铁岭, Liaoning Province) | <i>Clematis chinensis</i> Osbeck | A | + | |
| 2* | Kaiyuan (开原, Liaoning Province) | <i>C. hexapetala</i> Pall. | A | - | |
| 3* | Tai bei (太白, Shanxi Province) | <i>Lonicerastrum sibiricum</i> (L.) Pennell | A | + | |
| 4* | Yixing** (宜兴, Jiangsu Province) | <i>C. chinensis</i> Osbeck | A | + | |
| 5 | Shuangyashan (双鸭山, Heilongjiang Province) | <i>C. chinensis</i> Osbeck | B | + | - |
| 6* | Shijiazhuang (石家庄, Hebei Province) | <i>Smilax sieboldii</i> Miq. | B | - | |
| 7* | Harbin (哈尔滨, Heilongjiang Province) | <i>C. chinensis</i> Osbeck | B | - | |
| 8 | Linan (临安, Zhejiang Province) | - | B | - | - |
| 9** | Shexian (歙县, Anhui Province) | <i>S. sieboldii</i> Miq. | B | + | - |
| 10* | Yuexi (岳西, Anhui Province) | <i>S. sieboldii</i> Miq. | B | - | |
| 11 | Yuexi (Anhui Province) | <i>C. chinensis</i> Osbeck | A | + | + |
| 12 | Huoshan (霍山, Anhui Province) | <i>C. florida</i> Thunb. | B | - | - |
| 13* | Huoshan (Anhui Province) | <i>C. paniculata</i> Thunb. | B | - | |
| 14* | Huoshan (Anhui Province) | <i>C. chinensis</i> Osbeck | A | + | |
| 15 | Yixing** (Jiangsu Province) | <i>C. chinensis</i> Osbeck | A | - | - |
| 16* | Dongying (东营, Shandong Province) | <i>S. sieboldii</i> Miq. | B | - | |
| 17 | Anqing (安庆, Anhui Province) | <i>C. chinensis</i> Osbeck | B | + | + |
| 18* | Dandong (丹东, Liaoning province) | <i>C. manshurica</i> Rupr. | B | + | |

| Sample No. | Source | Species identified | Remark | Anti-inflammatory activity (at the 5% level) | Result of classification |
|------------|-----------------------------------|----------------------------|--------|--|--------------------------|
| 19* | Xiuyan (岫岩, Liaoning Province) | <i>C. manshurica</i> Rupr. | A | + | |
| 20* | Yanbian (延边, Jilin Province) | <i>C. manshurica</i> Rupr. | A | + | |
| 21* | Yanbian (Jilin Province) | <i>C. hexapetala</i> Pall. | A | - | |

A. Self-gathered entire roots. B. Slices bought in shops of traditional Chinese medicines. *. Used petal for training of the SIMCA program; **. Wrongly classified by the SIMCA program, ***. Gathered in Yixing county, Jiangsu Province in different seasons. +. Having distinct anti-inflammatory activity; -. Having no distinct anti-inflammatory activity, -. Unidentified.

(二)试剂 致炎剂角叉菜胶由本院中药药理教研室提供;所用其它试剂皆为分析纯。

(三)动物 由本院动物室提供 100 ~ 120 g 的大鼠,雌雄不分。

(四)仪器 Shimadzu GC-9A 气相色谱仪; IBM-PC 计算机;大鼠足肿胀测定仪按文献⁽⁸⁾自制,用前校正。

二. 色谱条件

载气为 N_2 ; 2 m × 3 mm 玻璃柱; 3% SE-30 固定液; 载体为 Chromosorb W (AW-DMCS) 80 ~ 100 目; 气化温度: 240 °C; 柱温: 程序升温, 160 °C 维持 5 min, 以 3 °C/min 的速度升到 180 °C, 保持 18 ~ 20 min; 进样量 1 μl; FID 检测; 内标: 甘露醇。

三. 威灵仙样品的预处理

取 40 ~ 100 目生药 1 g, 精密称定, 移至 10 ml 量瓶中, 加无水甲醇至刻度, 超声振荡 40 ~ 50 min, 室温放置 24 h, 过滤取滤液 0.5 ml 于安瓶中, 水解后制备成硅烷化衍生物⁽⁹⁾。

四. 威灵仙浸膏生理盐水溶液的制备

精密称定 40 ~ 100 目的威灵仙样品 5 g, 置于 25 ml 量瓶中, 加无水甲醇至刻度, 超声振荡 50 min 后室温静置 24 h, 过滤, 滤渣用无水甲醇洗涤, 合并滤液, 减压蒸发除去甲醇, 用生理盐水溶解浸膏至 5 ml, 加两滴吐温-80 助溶即成相当于 1 g/ml 生药的生理盐水溶液。

五. 威灵仙的抗炎药理实验

按文献⁽¹⁰⁾的方法, 以角叉菜胶致炎, 每组 6 只大鼠, 按 5 ml/kg 的剂量皮下注射给药, 同时用水杨酸钠溶液做对照试验, 用生理盐水做空白试验。

对衍生化的威灵仙样品进行气相色谱分析, 得到图 1 中有代表性的三张色谱图。再对色谱图进行如下的数据化, 得到模式识别数据: 以色谱中不同保留时间下色谱峰面积或峰高对内标峰面积或峰高的比值表征样品。将同一产地(来源)样品的不同保留时间下色谱峰与内标峰面积或峰高的比值作为矩阵的一行, 将不同样品色谱图中保留时间相同的色谱峰归为一类称为匹配, 作为矩阵的一列⁽¹⁰⁾, 构成由峰面积或峰高表示所含化学成分相对含量的两个矩阵。对给药组与对照组大鼠足肿胀是否有显著性差异的观察, 是在给药后 3.5 h (致炎后 3 h) 进行的, 按 5% 的显著性水平将 21 个样品分成两类。随机取出有抗炎和无抗炎作用的样品各 7 个, 用 SIMCA 进行特征选择, 根据特征的模化能力 (modelling power) 和判别能力 (discriminatory power) 的大小选择了 4 个特征, 对未知样品的 4 个特征数据分类结果见表 1, 分类的正确率为 86%; 对选择的 4 个特征数据进行 PCA 运算, 所得结果见图 2。

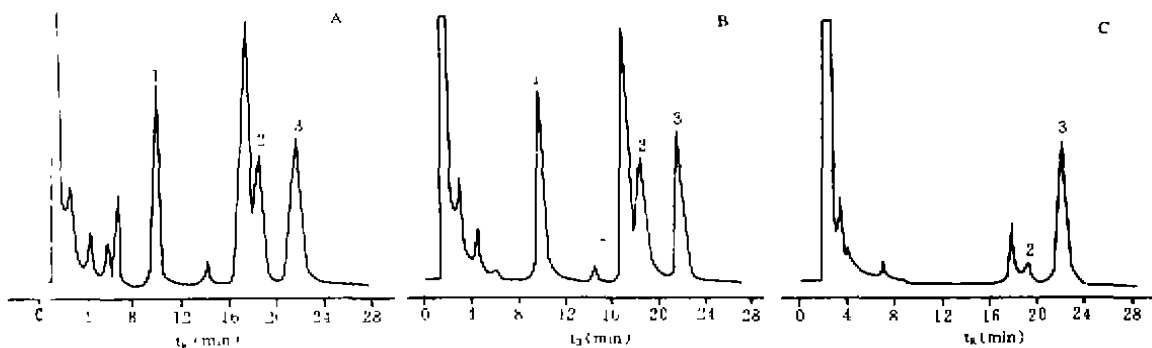


Fig 1. Chromatograms of trimethylsilyl derivatives obtained from methanolic extracts "Wei Ling Xian".
1. D-Ribose; 2. D-Glucose; 3. Mannitol. A. *Clematis chinensis* Osbeck or *Clematis manshurica* Rupr.;
B. *Clematis hexaptala* Pall; C. *Smilax sieboldii* Miq.

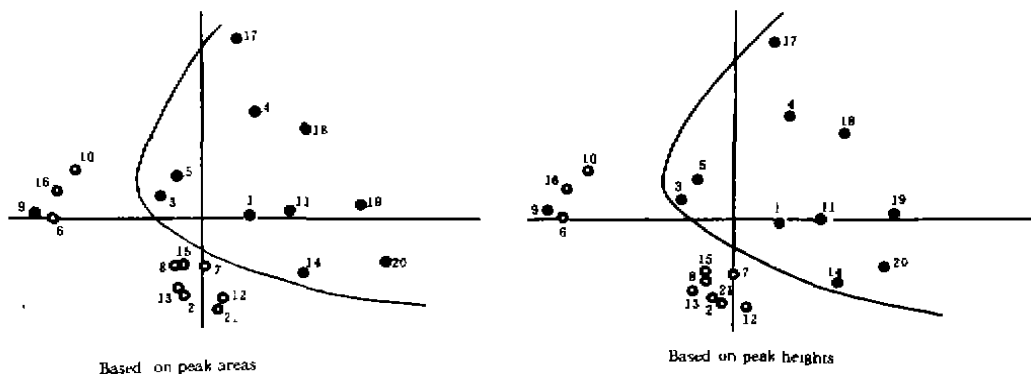


Fig 2. Two-dimensional displays of the "Wei Ling Xian" samples by PCA. ●, Samples having distinct anti-inflammatory activity, ○, Samples having no distinct anti-inflammatory activity.

讨 论

从图 2 可以看出：具抗炎作用的样品在一侧，该侧有威灵仙、东北铁线莲和玄参科轮叶婆婆纳 [*Veronicastrum siebircum* (L.) Pennell, 后者曾当威灵仙使用]；棉团铁线莲抗炎作用弱被分在无抗炎作用的一侧，同侧的还有锥花铁线莲 (*C. paniculata* Thunb.)、铁线莲 (*C. florida* Thunb.) 和百合科菝葜 (*Smilax sieboldii* Miq.)，以上三个种未被中国药典收载。这说明模式识别除评价中药质量外，在区分中药的种属上也有参考价值。

有了经过训练的 SIMCA 法，根据未知威灵仙样品的气相色谱分析结果，不经药理实验即可判定其质量的优劣。因此用模式识别方法更合理地评价活性成分存在协同作用、分子结构尚未完全确定、其含量难测定的中药，是中药质量控制的一条新路。

7 个样品仅一个被错分，可能是由于取样、化学测量等实验误差造成的。

致谢 本院孟宪纾教授、许春泉高级工程师鉴定药材；于庆海副教授提供角叉菜胶；洪福山老师在实验中给予帮助。

参 考 文 献

1. 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 一部, 一九九〇年版, 北京, 人民卫生出版社, 222.
2. 李安民, 等. 中药威灵仙的原植物和药理学研究. 药理学报 1980; 15: 288.
3. 李安民, 等. 计算机模式识别技术, 第一版, 上海交通大学出版社, 1986.
4. Wold S. et al. SIMCA. In: Kowalski B. ed. *Chemometrics: Theory and Application*. Washington DC: American Chemical Society, 1977: 243.
5. Wold S. Cross-validation estimation of the number of components in factor and principal components model. *Computometrics*, 1978, 20: 397.
6. Kryger L. Interpretation of analytical chemical information by pattern recognition method——a survey. *Talanta* 1981; 28: 871.
7. 周冠年. 计算机模式识别统计方法, 第一版. 武汉: 华中工学院出版社, 1986: 190 ~ 195.
8. 朱叔云, 等. 药理学实验法. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 524 ~ 544.
9. 石德成, 等. 脱水化合物的气相色谱分析. 东北师范大学学报自然科学版 1982; (13): 43.
10. 魏敏, 等. 色谱数据的计算机处理方法. 计算机与应用化学 1989; 6: 220.

STUDY OF CHEMICAL PATTERN RECOGNITION AS APPLIED TO QUALITY ASSESSMENT OF THE TRADITIONAL CHINESE MEDICINE "WEI LING XIAN"

MJ Wei, X Luo, X Wang and JS Zhu

(Department of Pharmaceutical Analysis, Shenyang College of Pharmacy, Shenyang 110015)

ABSTRACT Chemical pattern recognition was applied to the quality assessment of the traditional Chinese medicine "Wei Ling Xian". The dried roots and rhizomes of *Clematis chinensis* Osbeck, *Clematis hexapetala* Pall, and *Clematis manshurica* Rupr, 21 samples of "Wei Ling Xian" of six different species, which were collected from different regions of China, were extracted with methanol. The extracts were analyzed by gas chromatography and the GC data of "Wei Ling Xian" samples were correlated with their anti-inflammatory activity in pharmacologic experiments. Positive anti-inflammatory activity is regarded as the quality assurance of medicinal "Wei Ling Xian". According to the results, the samples were classified as two groups, one having and the other not having distinct anti-inflammatory activity at the 5% significance level. Some samples were used as the training set, while some as the test set. The SIMCA program was used for the extraction of features and classification, whereas the PCA program for displaying the data in a two-dimensional space. The quality of unknown samples of "Wei Ling Xian" can be assessed as a result of the classification or the two-dimensional display.

Key words Wei Ling Xian; Pattern recognition; Quality assessment; Gas chromatography