

高分辨气相色谱—模糊聚类分析法在术类药材分类中的应用

陈彦 叶崇义* 刘舞霞* 荣有富* 朱蓉贞*

(江苏省中医药研究所,南京 210028; *江苏省药品检验所,南京 210009)

摘要 本文用高分辨气相色谱—一阶程序升温的方法对术类12种药材进行色谱分析,所得相应色谱保留指数的样品组分百分含量用模糊聚类分析的数学方法通过计算机进行处理,正确划分了术类药材的种类,取得初步成果,所提出的方法学对中药材鉴定和分类具有一定的指导意义。

关键词 高分辨气相色谱;模糊聚类分析;术类药材

苍术和白术同来源于菊科(Compositae)术属(*Atractylodes*)植物,收载于中国药典一部(1990年版),是常用中药,有补中益气、燥湿健脾之功效。长期以来,对于术类种及种以下等级的划分存在着分歧^[1]。药材的分类鉴定,大多采用植物形态和某些化学成分为主,近年来已有文献报道^[2~4]用近代仪器分析和化学模式识别的方法进行分类鉴别,但尚未见应用于术类药材。

本文通过高分辨气相色谱—一阶程序升温的方法测定了12个样品的 Kovats 保留指数及相应组分的相对百分含量,从其组分相对百分含量的总体相关性出发,按照模糊聚类分析的数学方法进行分类,为研究中药材的鉴别分类开辟了新的途径。

实验部分

样品来源

12个术类药材样品见表1。所有样品均经江苏省药检所中药室刘舞霞副主任药师鉴定。

Tab 1 Sample species identified and classified by pharmacognosy

| Sample No. | Source | Species identified |
|------------|--|---|
| 1 | Jurong(句容, Jiangsu Province)1990年采集,野生 | <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC. |
| 2 | Jurong(句容, Jiangsu Province)1991年采集,野生 | <i>A. lancea</i> (Thunb.) DC. |
| 3 | Jintan(金坛, Jiangsu Province)栽培 | <i>A. lancea</i> (Thunb.) DC. |
| 4 | Jintan(金坛, Jiangsu Province)野生 | <i>A. lancea</i> (Thunb.) DC. |
| 5 | Nanjing(南京, Jiangsu Province)野生 | <i>A. lancea</i> (Thunb.) DC. |
| 6 | Nanjing(南京, Jiangsu Province)栽培 | <i>A. lancea</i> (Thunb.) DC. |
| 7 | Hubei(湖北, Hubei Province)野生 | <i>A. lancea</i> (Thunb.) DC. |
| 8 | Shijiazhuang(石家庄, Hebei Province)野生 | <i>A. chinensis</i> (DC.) Koidz |
| 9 | Yangqu(阳曲, Shanxi Province)野生 | <i>A. chinensis</i> (DC.) Koidz |
| 10 | Haerbin(哈尔滨, Heilongjiang Province)野生 | <i>A. japonica</i> Koidz. ex Kitam |
| 11 | Kuandian(宽甸, Liaoning Province)野生 | <i>A. japonica</i> Koidz. ex Kitam |
| 12 | Yuhang(余杭, Zhejiang Province)栽培 | <i>A. macrocephala</i> Koidz |

高分辨气相色谱

1 仪器及色谱条件 Shimadzu GC-9A 气相色谱仪, 附 FID 氢火焰检测器; CLH-702型毛细管支架; C-R3A 色谱数据处理机; 弹性石英毛细管色谱柱 PEG-20M(25 m×0.3 mm)(HP 公司); 柱温: $60\text{ }^{\circ}\text{C} \xrightarrow{3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}} 210\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30') 进样口温度 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$; 载气(N_2); $50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; H_2 : AIR = 0.7 : 0.5 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$; 尾吹: $60\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; 载气线速度: $17\text{ cm}\cdot\text{sec}^{-1}$, Range = 10'; Atten = 2^5 ; 纸速 $5\text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$; 分流比: 70:1。

2 样品溶液的制备 称取样品粗粉适量(过3号筛)置挥发油提取器中提取, 所得挥发油用乙醚萃取, 醚层脱水, 挥去溶剂即得挥发油。实验证明, 术属药材特征峰的保留时间都在正烷烃 nC_9 到 C_{23} 之间, 所以精密称取 $\text{nC}_9\sim\text{C}_{23}$ 正烷烃适量, 配成 0.15% 的乙醚溶液作为内标溶液。用挥发油 1 份, 加 5 份体积 0.15% 的正烷烃($\text{nC}_9\sim\text{C}_{23}$)乙醚液, 混匀, 吸取 $1.0\text{ }\mu\text{l}$ 进样, 得色谱图 1。(注: 图中 C_{21} , C_{22} 与特征峰重合)。

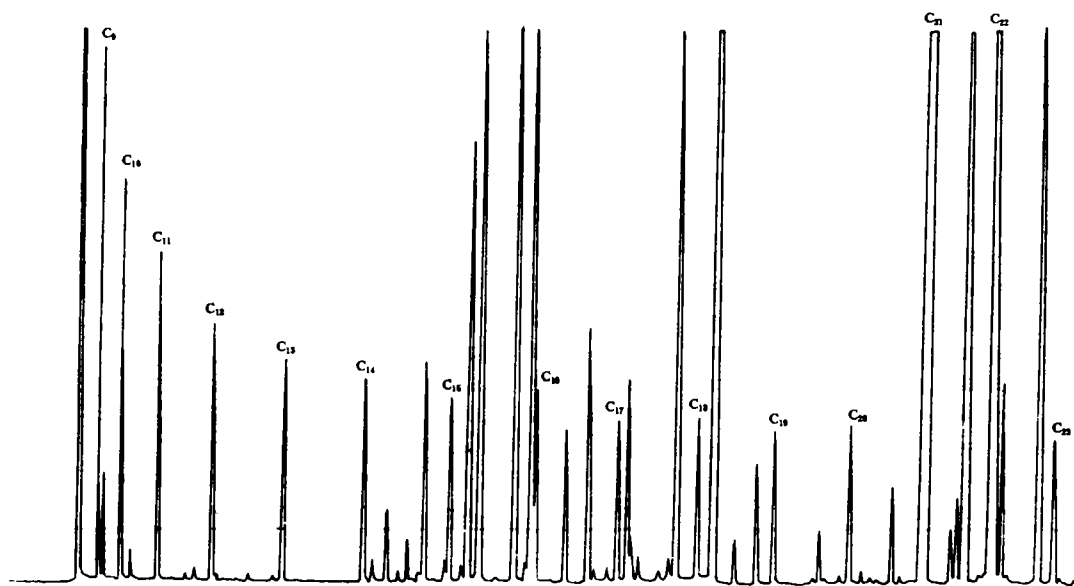


Fig 1 The chromatogram of Rhizoma Atractylodis sample.

数据分析

输入给 C-R3A 数据处理机一个简单程序, 数据处理机可根据色谱图上各组分的保留时间自动打印出 Kovats 保留指数, 同时还可根据色谱峰的峰面积打印出各组分的相对百分含量, 这二值既是组分定性的依据, 又是组分定量的依据, 因此把每一样品的这两组数据作为特征值输入计算机进行处理, 首先把所有样品的 Kovats 保留指数按顺序由小到大排列起来, 并记录下其组分的浓度, 若在此保留指数处无色谱峰出现, 其组分的浓度定为 0, 这样就得到十二个术属药材组分浓度表, 并以此进行模糊聚类分析:

首先把数据标准化并压缩到 $[0, 1]$ 闭区间, 用极值标准化公式:

$$x = \frac{x' - x'_{\min}}{x'_{\max} - x'_{\min}} \quad x' \text{ 为原始数据}$$

其次计算样品间的相似系数 r_{ij}

$$r_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^m |x_{ik} - \bar{x}_i| \cdot |x_{jk} - \bar{x}_j|}{\sqrt{\sum_{k=1}^m (x_{ik} - \bar{x}_i)^2} \cdot \sqrt{\sum_{k=1}^m (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}}$$

$$\text{式中 } \bar{x}_i = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m x_{ik} \quad \bar{x}_j = \frac{1}{m} \sum_{k=1}^m x_{jk}$$

r_{ij} 表示第*i*号分类对象与第*j*号分类对象之间的相似系数; x_{ik}, x_{jk} 分别表示第*i*号和第*j*号对象的第*k*个因素; m 是描述每个对象因素的个数。

用各样品间的相似系数构成相似关系矩阵R(表2),将R改造成等价关系矩阵,为此需做下列合成运算: $R \cdot R = R^2, R^2 \cdot R^2 = R^4, \dots$ 当某一步出现 $R^{2^k} = R^t$ 时, R^t 便是等价关系矩阵,结果见表3。取定一个阈值 $\lambda \in [0, 1]$,作等价矩阵的 λ 截矩阵,然后由 λ 截矩阵分类,根据不同 λ 值画出动态聚类图(见图2)。

Tab 2 Similar matrix of 12 samples

| r_{ij} | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.984 | 1.000 | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.978 | 0.996 | 1.000 | | | | | | | | | |
| 4 | 0.993 | 0.995 | 0.994 | 1.000 | | | | | | | | |
| 5 | 0.991 | 0.960 | 0.951 | 0.972 | 1.000 | | | | | | | |
| 6 | 0.922 | 0.956 | 0.957 | 0.948 | 0.880 | 1.000 | | | | | | |
| 7 | 0.725 | 0.824 | 0.834 | 0.792 | 0.648 | 0.909 | 1.000 | | | | | |
| 8 | 0.566 | 0.660 | 0.682 | 0.638 | 0.469 | 0.808 | 0.923 | 1.000 | | | | |
| 9 | 0.538 | 0.616 | 0.642 | 0.604 | 0.434 | 0.740 | 0.845 | 0.964 | 1.000 | | | |
| 10 | 0.755 | 0.741 | 0.729 | 0.742 | 0.787 | 0.538 | 0.385 | 0.094 | 0.055 | 1.000 | | |
| 11 | 0.743 | 0.729 | 0.724 | 0.734 | 0.777 | 0.530 | 0.377 | 0.098 | 0.057 | 0.994 | 1.000 | |
| 12 | 0.729 | 0.715 | 0.719 | 0.723 | 0.767 | 0.524 | 0.370 | 0.097 | 0.053 | 0.970 | 0.983 | 1.000 |

Tab 3 Equivalent matrix of 12 samples

| r_{ij} | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 1.000 | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.993 | 1.000 | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.993 | 0.996 | 1.000 | | | | | | | | | |
| 4 | 0.993 | 0.995 | 0.995 | 1.000 | | | | | | | | |
| 5 | 0.991 | 0.991 | 0.991 | 0.991 | 1.000 | | | | | | | |
| 6 | 0.957 | 0.957 | 0.957 | 0.957 | 0.957 | 1.000 | | | | | | |
| 7 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 1.000 | | | | | |
| 8 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.923 | 1.000 | | | | |
| 9 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.909 | 0.923 | 0.964 | 1.000 | | | |
| 10 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 1.000 | | |
| 11 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.994 | 1.000 | |
| 12 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.787 | 0.983 | 0.983 | 1.000 |

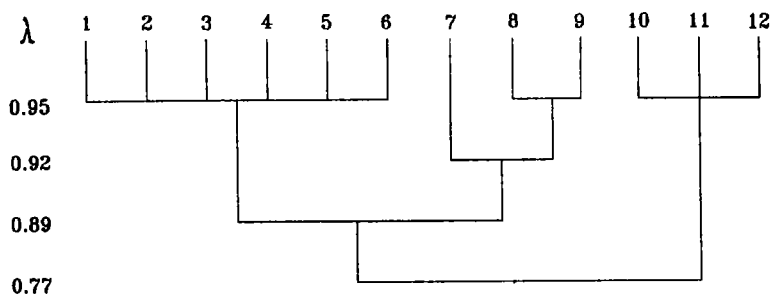


Fig 2 Diagram of dynamic cluster.

结果与讨论

从不同 λ 值动态聚类图可看出,当 $\lambda=0.95$ 时样品被分为四类,I:江苏地区1~6号样品,II:7号样品湖北茅苍术,III:8~9号样品北苍术,IV:10~12号样品关苍术与白术。当 $\lambda=0.92$ 时,样品被分为三类,I:1~6号样品,II:7~9号样品,III:10~12号样品;当 $\lambda=0.89$ 时,样品分为两类;即 I:1~9号样品,II:10~12号样品;当 $\lambda=0.77$ 时,全部样品归为一类。

从上述分类结果可以看出,本法首先将茅苍术、北苍术、白术划分开来,符合客观实际,并与传统分类基本一致。其次可以看出,江苏南京、句容、金坛三地区的茅苍术相似程度大,栽培品与野生品差异也很小(相似系数为0.95),可作为野生茅苍术的代用品,但同是茅苍术,由于地域不同,有明显差异,如湖北地区的茅苍术与江苏地区的茅苍术比较有明显差异,显示出较强的特异性。

对关苍术和白术的异同,曾有人进行研究,认为关苍术与白术化学成分最接近,因而其亲缘关系也最接近,从聚类结果看,关苍术与白术相似系数为0.95时即归为一类,进一步证明了上述观点。

本实验除了用 PEG-20M 柱对术类药材进行色谱分析外,还使用了 SE-54 柱进行测定,对用不同极性色谱柱测定所得数据分别聚类的结果看,两者分类大致相同,但还存在一些差别,PEG-20M 柱的聚类结果更符合客观分类。

总之,本文用高分辨气相色谱对术属12种药材进行了测定,并对所测数据进行模糊聚类分析,由于数据复杂庞大,借助于计算机,能快速准确地地区分术属药材以下的不同种,取得了初步满意的结果,为今后中药材的植物分类鉴定和质量评定开辟了一条新的途径。

参 考 文 献

- 1 付舜漠. 苍术属药用植物的研究. 植物分类学报, 1981, 19:196
- 2 王玺, 周密, 洪福山. 气相色谱数据的聚类分析法评价中药厚朴的质量. 沈阳药学院学报, 1990, 7:5
- 3 苏薇薇. 聚类分析法在黄芩鉴别分类中的应用. 中国中药杂志, 1991, 16:579
- 4 齐美玲, 罗旭, 王玺. 黄芩品种及代用品的模糊聚类分析. 沈阳药学院学报, 1992, 9:127

APPLICATION OF CLUSTERING ANALYSIS OF HRGC DATA IN CLASSIFICATION OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE *ATRACTYLODES*

Y Chen, CY Ye* , WX Liu* , YF Rong* and RZ Zhu*

(*Jiangsu Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Nanjing 210028,*

** Jiangsu Provincial Institute for Drug Control, Nanjing 210009)*

ABSTRACT In this paper, extracts of 12 plant species belonging to the section *Atractylodes* were analyzed by high resolution gas chromatography, Classification of *Atractylodes* was accomplished by the method of clustering analysis of multivariate data obtained from the above analysis. The result was satisfactory and the technique might be a new method for the identification of traditional Chinese medicine.

Key words High resolution gas chromatography; Clustering analysis; *Atractylodes*