

不同指标评价布渣叶药材质量的聚类分析[△]

李泽华^{1*},徐文杰^{2#},董玉娟³,汪梦霞³,许灿新³(1.广东省人民医院/广东省医学科学院,广州 510080;2.广东省中医药工程技术研究院,广州 510095;3.广州中医药大学附属第二中医院,广州 510405)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4081-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.17

摘要 目的:为布渣叶药材的质量评价提供依据。方法:分别以牡荆苷和总黄酮的质量分数为指标,采用聚类分析法对广东省9个地区的20份布渣叶样品进行聚类分析。结果:聚类分析结果显示,同一产区的布渣叶并没有全部归为一类;分别以牡荆苷和总黄酮的质量分数为指标所得的聚类分析结果不同,且二者没有相关性。结论:布渣叶药材的质量受到诸多因素的影响,应当采用多指标进行综合评价。

关键词 布渣叶;聚类分析;牡荆苷;总黄酮;含量

Quality Evaluation of *Microcos paniculata* by Cluster Analysis Based on Different Indicators

LI Ze-hua¹, XU Wen-jie², DONG Yu-juan³, WANG Meng-xia³, XU Can-xin³ (1. Guangdong Academy of Medical Sciences/Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China; 3. The Second Affiliated TCM Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the quality evaluation of *Microcos paniculata*. METHODS: Using the content of vitexin and total flavonoids as indicators, 20 samples of *M. paniculata* from 9 districts of Guangdong province were analyzed by using cluster analysis. RESULTS: Results of cluster analysis showed *M. paniculata* from same production were not classified as a class. The results of cluster analysis were not the same using the contents of vitexin and total flavonoids as indicators, respectively; there was no clear correlation. CONCLUSIONS: The quality of *M. paniculata* is affected by many factors, so it should be evaluated comprehensively based on multiple indicators.

KEYWORDS *Microcos paniculata*; Cluster analysis; Vitexin; Total flavonoids; Content

剂的混合液作为有机相,以乙腈-甲醇(90:10, V/V, B)-50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH3.0, A)为流动相进行梯度洗脱,该方法不仅可以使芦丁与金丝桃苷中间的杂质峰完全分离,而且还能将金丝桃苷与其后的同类化合物异槲皮苷分开。

国内现有检测金丝桃苷和芦丁含量的文献方法和2010年版《中国药典》方法均存在分析时间长^[4-7]、分离度达不到要求^[5-6,9]、目标峰中可见杂峰存在^[3,5-6,8]、基线波动大及背景干扰严重^[5-6,9]等问题。为此,本试验建立了同时测定舒肝解郁胶囊中金丝桃苷及芦丁的HPLC分析方法,并对提取方式及方法进行了考察。结果表明,本方法能快速、准确地检测舒肝解郁胶囊金丝桃苷和芦丁的质量分数,且分析时间短、专属性强、耐用性高,可用于舒肝解郁胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 孙新宇,陈爱琴,许秀峰,等.舒肝解郁胶囊治疗轻中度抑郁症的随机双盲安慰剂对照研究[J].中国新药杂志,2009,18(5):413.
- [2] 范之枫,张瑞欣,黄毅.新疆贯叶金丝桃不同部位中金丝

桃苷、芦丁和金丝桃素的含量及提取工艺对它们的影响[J].新疆中医药,2005,23(4):4.

- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:215.
- [4] 丁姗姗,吕凌,张毅,等.HPLC法同时测定宣木瓜中绿原酸、芦丁、金丝桃苷、槲皮素的含量[J].安徽医药,2012,16(4):450.
- [5] 张薇,常军民,沈美英,等.RP-HPLC法测定天山花楸果实中苦杏仁苷、芦丁、金丝桃苷和橙皮苷的含量[J].药物分析杂志,2011,31(5):935.
- [6] 李玉兰,李军,王乃利,等.RP-HPLC法测定小花鬼针草中原儿茶酸、芦丁、金丝桃苷和槲皮苷的含量[J].沈阳药科大学学报,2009,26(8):639.
- [7] 汪光林,王坚,吕晔.RP-HPLC法测定宁心红杞胶囊中金丝桃苷和绿原酸的含量[J].中国药房,2008,19(9):694.
- [8] 王光函,张振秋,张颖,等.HPLC法测定刺玫果中芦丁和金丝桃苷的含量[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(6):248.
- [9] 王福成,豆文太,朱文学.HPLC测定山楂精中牡荆苷、牡荆苷-2''-O-鼠李糖苷、金丝桃苷、芦丁的含量[J].中成药,2002,24(2):122.

△基金项目:广东省中医药强省科研课题(No.20132080)

*主管药师。研究方向:医院药学。电话:020-83827812-60237。

E-mail: lizehuasy@126.com

#通信作者:主管中药师,博士。研究方向:中药学。电话:020-83501292。E-mail: xwjnv@qq.com

(收稿日期:2013-09-04 修回日期:2014-05-08)

布渣叶为椴树科植物破布叶 *Microcos paniculata* L. 的干燥叶,主产于我国岭南地区,属于广东道地药材。其味微酸、性平,具有消食化滞、清热利湿的功效,临床多用于饮食积滞、感冒发热、湿热黄疸等症,已收载于2010年版《中国药典》(一部)和《广东省中药材标准》(第一册)^[1-2]。布渣叶含有黄酮类、生物碱、三萜类、挥发油类成分^[3],其中黄酮类是其活性成分^[4]。关于不同产地的布渣叶中总黄酮及牡荆苷质量分数的分析已有相关报道^[5-10],但未见应用聚类分析法从总黄酮及牡荆苷质量分数两个指标来对不同产地布渣叶进行质量评价的研究报道。笔者选择不同产地的布渣叶,分别以总黄酮与牡荆苷的含量为指标,并应用聚类分析法对布渣叶进行产区分类,以为完善布渣叶的药材质量评价标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UV-2550型紫外分光光度计(日本岛津公司);2695-2998型高效液相色谱(HPLC)仪,配备PAD检测器、四元梯度泵、Empower 2数据处理系统(美国沃特斯公司);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Mettler XS205DU型电子天平(瑞士梅特勒托利多公司);MilliPore Advantage A10自动纯水机(美国默克密理博公司)。

1.2 试剂

芦丁对照品(批号:100080-200707)、牡荆苷对照品(批号:111687-200602)均购于中国食品药品检定研究院;D101型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司);甲醇为色谱纯,水为纯化水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

布渣叶经广东省中医药工程技术研究院刘法锦教授鉴定为椴树科植物破布叶 *M. paniculata* L. 的干燥叶,药材来源见表1。

表1 布渣叶药材来源
Tab 1 Source of *M. paniculata*

编号	产地	编号	产地
S1	广东化州	S11	广东阳西
S2	广东化州	S12	广东阳西
S3	广东化州	S13	广东肇庆
S4	广东湛江	S14	广东肇庆
S5	广东湛江	S15	广东惠州
S6	广东湛江	S16	广东惠州
S7	广东广州	S17	广东清远
S8	广东广州	S18	广东清远
S9	广东高州	S19	广东江门
S10	广东高州	S20	广东江门

2 方法与结果

2.1 牡荆苷的含量测定^[11]

2.1.1 色谱条件 色谱柱:AKKZONOBEL Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.4%甲酸溶液(30:70, V/V);检测波长:339 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:25 °C。色谱见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备 取牡荆苷对照品适量,精密称定,加70%甲醇制成每1 ml含牡荆苷106.70 μg的对照品溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取布渣叶药材粉末(过3号筛)约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理1 h,放

冷,再次精密称定,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

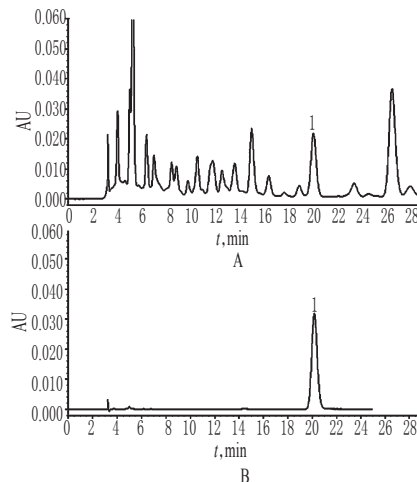


图1 高效液相色谱图

A.样品;B.对照品;1.牡荆苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. sample; B. control substance; 1. vitexin

2.1.4 线性关系考察 精密量取“2.1.2”项下的对照品溶液1、2、6、9、12、15 ml,分别置25 ml量瓶中,加入70%甲醇稀释至刻度,制成每1 ml含牡荆苷4.27、8.54、25.62、38.43、51.24、64.05 μg的对照品溶液。精密吸取上述溶液各10 μl,注入液相色谱仪,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以峰面积积分值(y)为纵坐标,进样量(x, ng)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y = 2\,338.3x + 8\,595$ ($r = 0.999\,9$)。结果表明,牡荆苷的进样量在42.70~640.50 ng范围内与其峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.5 精密度试验 精密吸取牡荆苷对照品溶液(质量浓度为106.70 μg/ml)10 μl,按上述色谱条件进样测定,重复5次,记录色谱图。结果, $RSD = 1.02\%$ ($n = 5$),表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取同一供试品(S1)溶液,分别于0、1、2、4、6、8、10 h按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果, $RSD = 1.35\%$ ($n = 7$),表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批样品(S1)6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算样品含量。结果,牡荆苷的平均质量分数为0.11%, $RSD = 1.16\%$ ($n = 6$),表明本方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 取已知质量分数的样品(S1)约1.0 g,共9份,精密称定,分别精密加入适量的牡荆苷对照品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,计算加样回收率,结果见表2。

2.1.9 样品中牡荆苷的含量测定 取布渣叶药材适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算样品中牡荆苷的质量分数,结果见表3。

2.2 总黄酮的含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取芦丁对照品适量,精密称定,加70%乙醇超声(功率:250 W,频率:100 kHz)使溶解,制成每1 ml含0.46 mg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取各批次布渣叶药材粉末(过3号筛)约2.0 g,精密称定,置100 ml具塞锥形瓶中,精密加入70%

表2 牡荆苷加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

编号	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	1.0023	0.94	0.77	1.71	99.56		
2	1.0015	0.94	0.77	1.71	99.23		
3	1.0034	0.95	0.77	1.71	99.56		
4	1.0008	0.94	0.94	1.87	98.14		
5	1.0017	0.94	0.94	1.88	99.78	99.16	0.70
6	1.0009	0.94	0.94	1.87	98.23		
7	1.0016	0.94	1.07	2.01	100.01		
8	1.0025	0.94	1.07	2.01	99.46		
9	1.0031	0.95	1.07	2.00	98.49		

表3 样品中牡荆苷的含量测定结果(n=2)

Tab 3 Content determination of vitexin in samples(n=2)

编号	牡荆苷质量分数,%	编号	牡荆苷质量分数,%
S1	0.105	S11	0.104
S2	0.059	S12	0.095
S3	0.087	S13	0.082
S4	0.061	S14	0.077
S5	0.073	S15	0.051
S6	0.057	S16	0.084
S7	0.070	S17	0.067
S8	0.043	S18	0.068
S9	0.057	S19	0.080
S10	0.065	S20	0.055

乙醇50 ml,称定质量,超声(功率:250 W,频率:100 kHz)处理30 min,放冷,再次精密称定,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 ml,95℃水浴加热,蒸干,加水5 ml使溶解,过D101型大孔吸附树脂柱,以水100 ml洗脱,弃去水液,再用70%乙醇洗脱,收集洗脱液,置50 ml量瓶中,加70%乙醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 线性关系考察 精密量取对照品溶液1、2、3、4、5、6 ml,分别置25 ml量瓶中,加70%乙醇至6 ml,依次精密加入5%亚硝酸钠溶液1 ml(摇匀,放置6 min)、10%硝酸铝溶液1 ml(摇匀,放置6 min)、氢氧化钠试液10 ml,加水至刻度(摇匀,放置15 min),以相应试剂为空白,在500 nm波长处测定吸光度(A)。以A(y)为纵坐标,质量浓度(x, μg/ml)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=0.0088x+0.0642$ ($r=0.9995$)。结果表明,芦丁的质量浓度在18.28~109.68 μg/ml范围内与其吸光度呈良好线性关系。

2.2.4 样品中总黄酮的含量测定 取上述布渣叶药材,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,测定吸光度,结果见表4。

表4 样品中总黄酮的含量测定结果(n=2)

Tab 4 Content determination of total flavonoids in samples(n=2)

编号	总黄酮,%	编号	总黄酮,%
S1	11.01	S11	12.46
S2	8.12	S12	7.01
S3	6.45	S13	6.98
S4	7.56	S14	7.14
S5	10.98	S15	9.80
S6	9.04	S16	11.14
S7	6.75	S17	10.45
S8	7.14	S18	8.76
S9	8.14	S19	7.42
S10	9.06	S20	9.78

2.3 聚类分析

应用SAS JMP Statistical Discovery V9.0.2.0统计分析大师软件,采用离差平方和法,选取欧氏距离平方和作为样品的测度,对20份布渣叶样品的牡荆苷和总黄酮的质量分数分别进行聚类分析。样品中牡荆苷、总黄酮含量的聚类分析树状图见图2;样品中牡荆苷、总黄酮含量的聚类历史记录见表5、表6。

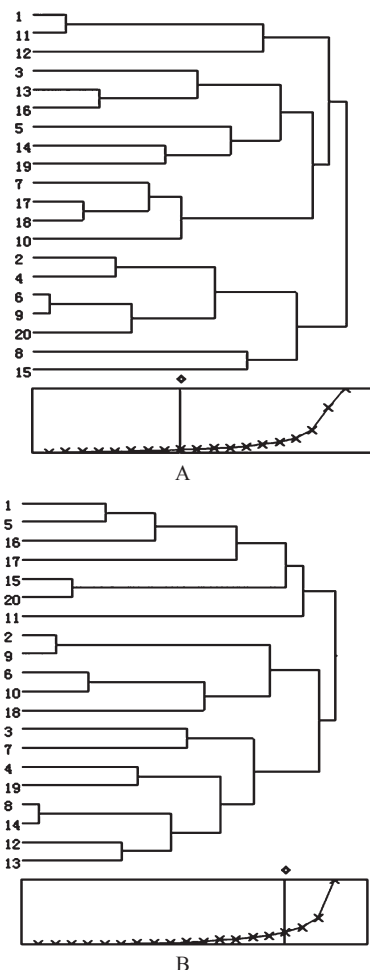


图2 样品中牡荆苷、总黄酮含量的聚类分析树状图

A.牡荆苷含量;B.总黄酮含量

Fig 2 Cluster analysis of the content of vitexin and total flavonoids in samples

A.vitexin;B.total flavonoids

以牡荆苷的质量分数为指标,当欧氏距离为0.75时,所有样品分为四大类,其中1、11、12聚为一类,3、5、13、14、16、19聚为一类,7、10、17、18聚为一类,2、4、6、8、9、15、20聚为一类。以总黄酮的质量分数为指标,当欧氏距离为0.72时,所有样品分为四大类,其中1、5、15、16、17、20聚为一类,2、6、9、10、18聚为一类,11为一类,3、4、7、8、12、13、14、19聚为一类。结果表明,同一产区的布渣叶并没有全部归为一类,这可能与布渣叶药材具体的采收地点、采收时间、干燥方法、贮藏方法不同等有关,也说明布渣叶对地理环境、采收时间和加工贮藏方法等因素比较敏感。

采用SPSS Statistic 17.0统计软件对布渣叶中牡荆苷与总黄酮质量分数的相关性进行分析。结果表明,二者没有显著性关系,相关性数据见表7。

表5 样品中牡荆苷含量的聚类历史记录

Tab 5 Cluster record of the content of vitexin in samples

聚类数	距离	领先者	结合者
19	0.000	6	9
18	0.041	1	11
17	0.041	17	18
16	0.082	13	16
15	0.082	2	4
14	0.095	6	20
13	0.118	7	17
12	0.123	14	19
11	0.168	7	10
10	0.190	3	13
9	0.233	2	6
8	0.261	5	14
7	0.329	8	15
6	0.451	1	12
5	0.546	3	5
4	0.751	2	8
3	1.172	3	7
2	2.302	1	3
1	3.302	1	2

表6 样品中总黄酮含量的聚类历史记录

Tab 6 Cluster record of the content of total flavonoids in samples

聚类数	距离	领先者	结合者
19	0.000	8	14
18	0.008	2	9
17	0.008	15	20
16	0.008	6	10
15	0.012	1	5
14	0.012	12	13
13	0.056	4	19
12	0.067	1	16
11	0.082	8	12
10	0.120	3	7
9	0.134	6	18
8	0.276	4	8
7	0.291	1	17
6	0.421	3	4
5	0.510	2	6
4	0.722	1	15
3	1.013	1	11
2	1.556	2	3
1	3.793	1	2

3 讨论

在总黄酮质量分数测定中,笔者分别以供试品、对照品及空白对照在200~800 nm波长范围内进行扫描。结果显示,对照品溶液及供试品溶液的最大吸收波长一致,两者在(500±2) nm处有最大吸收,故选择500 nm为测定波长。

本研究分别以牡荆苷和总黄酮的质量分数为指标进行聚

表7 样品中牡荆苷与总黄酮含量的相关性分析

Tab 7 Relative data of the contents of vitexin and total flavonoids in samples

成分	指标	牡荆苷	总黄酮
牡荆苷	Pearson 相关性	1	0.242
	显著性(双侧)		0.303
	N	20	20
总黄酮	Pearson 相关性	0.242	1
	显著性(双侧)	0.303	
	N	20	20

类分析,二者结果不相同,进一步对样品中牡荆苷和总黄酮质量分数的相关性进行研究,二者仍无相关性,即牡荆苷质量分数的高低并不能代表样品中总黄酮的高低,这同时也表明,以单一活性成分判断药材质量的优劣是有缺陷的。本研究结果表明布渣叶药材的质量受到诸多因素的影响,且评价布渣叶药材质量时应进行多指标的综合评价。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 88-89.
- [2] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准: 第一册[S]. 广州: 广东科学技术出版社, 2004: 66-68.
- [3] 曾聪彦, 吴惠妃, 郭展荣. 布渣叶化学成分定性鉴别的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(3): 175.
- [4] 陈雪婷. 布渣叶总黄酮微丸的药学研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [5] 潘天玲, 李坤平, 林赞菲, 等. 不同产地布渣叶总黄酮含量及其清除自由基活性研究[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(5): 452.
- [6] 罗文汇, 谭志灿, 李养学, 等. HPLC测定布渣叶中牡荆苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 110.
- [7] 冯燕燕, 梁秋嫻, 李小青, 等. 布渣叶中总黄酮与牡荆苷质量分数的季节动态变化[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(1): 35.
- [8] 李坤平, 高崇凯, 李卫民. 布渣叶药材中黄酮的高效液相色谱指纹图谱分析[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 47(2): 194.
- [9] 孙冬梅, 谭志灿, 毕晓黎, 等. RP-HPLC法同时测定布渣叶牡荆苷和异牡荆苷的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(7): 630.
- [10] 孙冬梅, 陈雪婷, 谭志灿. HPLC同时测定布渣叶提取物中3种黄酮苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 102.

(收稿日期: 2014-07-21 修回日期: 2014-09-16)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA) 收录期刊, 欢迎投稿、订阅