

远志质量的多元统计评价方法研究

房敏峰, 张文娟, 付志玲, 岳明, 郑晓晖, 赵桂仿*

(西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘要 目的: 建立远志药材主成分质量评价指标和方法。方法: 以远志对照药材为对照, 反相高效液相色谱法分析山西平遥产远志 7 个不同商品药材等级和部位, 并进行聚类分析和主成分分析 (PCA); 依据传统远志质量等级标准, 采用多元逐步回归法筛选与药材质量相关的主要影响因子。结果: 远志的 7 个等级聚为二类; 主成分分析的 3 个排序轴解释了数据矩阵 88.16% 变异; 远志药材的质量等级与 5 个色谱峰关系密切, 拟合评价公式为: $Y = -8.662 \times 10^{-6} C_{12} + 4.635 \times 10^{-5} C_{19} - 5.022 \times 10^{-6} C_{23} + 2.061 \times 10^{-5} C_{13} + 7.466 \times 10^{-6} C_1 + 6.742$ 。结论: 该方法能体现远志多成分联合起效的特点, 可用于远志及有效成分不明确药材的质量评价及新资源开发。

关键词: 远志; 质量; 多元统计; 评价方法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1828-04

Research on multiple statistic evaluating method of quality for *Polygala tenuifolia* quality

FANG Min-feng ZHANG Wen-juan FU Zhi-ling YUE Ming

ZHENG Xiao-hui ZHAO Gui-fang*

(Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China (NWU), Ministry of Education

The College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069 China)

Abstract Objective To establish the evaluating index and method of principal component for quality control in *Polygala tenuifolia* Wild. **Methods** *Polygala tenuifolia* standard material was chosen as the reference; seven different parts and commercial grades of *Polygala tenuifolia* samples from Pingyao of Shanxi were analyzed by HPLC with gradient elution. Clustering method and principal component analysis (PCA) were processed according to the peak area. The major impact factors related to the quality of the herb was screened and the quality rank evaluating equation was made by multiple regression method according to the traditional quality rank standard of *Polygala tenuifolia*. **Results** The seven ranks of *Polygala tenuifolia* are classified two kinds; three sequences of PCA indicate that the data matrix change 88.16% were proving a satisfied result. The quality rank of *Polygala tenuifolia* is closely related to the five chromatographic peaks; the evaluating equation is $Y = -8.662 \times 10^{-6} C_{12} + 4.635 \times 10^{-5} C_{19} - 5.022 \times 10^{-6} C_{23} + 2.061 \times 10^{-5} C_{13} + 7.466 \times 10^{-6} C_1 + 6.742$. **Conclusion** This method confirms the conclusion that *Polygala tenuifolia* has many effective components, demonstrating that it can be used for the quality evaluation and development of new resource of *Polygala tenuifolia*.

Key word: *Polygala tenuifolia*; quality; multiple statistic; evaluating method

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd 或卵叶远志 *P. sibirica* L 的干燥根, 用于心肾不交引起的失眠多梦、健忘惊悸、神志恍惚、咳痰不爽、疮疡肿毒、乳房肿痛^[1], 主要有效成分为皂苷、甾酮、寡糖酯和生物碱等^[2]。远志为大宗常用药材,

近年来市场需求连年增长, 货源短缺, 其质量控制方法及新资源研究已成为热点问题之一。前人建立了远志中总皂苷或皂苷元的含量测定方法^[3~5]。本文以远志对照药材为对照, 采用高效液相色谱法分析了山西平遥产远志 7 种不同商品药材等级和部位,

* 陕西省重大科技专项 (2006ZK10-G3); 陕西省教育厅产业化培育项目 (07JC17)

第一作者 Tel: (029) 88302686 E-mail: fmf885@126.com

建立了远志质量的多元统计评价方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器 岛津 LC-10AT vp 高效液相色谱仪, 包括 LC-10AT vp 泵, SPD-10A vp 紫外检测器和 SHIMADZU CBM-102 色谱工作站, 日本岛津公司; KQ5200DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; FA2004 万分之一电子天平, 上海良平仪器仪表有限公司。

1.2 试药 远志对照药材, 购自中国药品生物制品检定所 (批号: 111572-200301); 远志一级筒、二级筒、三级筒、远志根、芦头、地上、木心均购自山西省平遥县朱坑乡北汪湛村, 经西安市药品监督检验所谢志民研究员鉴定为正品, 远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根。乙腈为色谱纯 (Fisher 公司), 水为二重蒸馏水。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱: SHIMADZU VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A) - 0.05% 甲酸溶液 (B), 梯度洗脱, B 相 0~10 min 85%, 10~20 min 80%, 20~52 min 77%, 52~57 min 73%, 57~65 min 68%, 65~85 min 65%, 85~100 min 60%; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 310 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。此条件下, 远志对照药材 50% 甲醇溶液的液相色谱图见图 1, 其中* 作为本文研究的参比峰。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取远志对照药材粉末 0.4000 g 加 50% 甲醇 10 mL, 超声 30 min, 过滤, 滤液用 50% 甲醇定容至 25 mL 量瓶中。

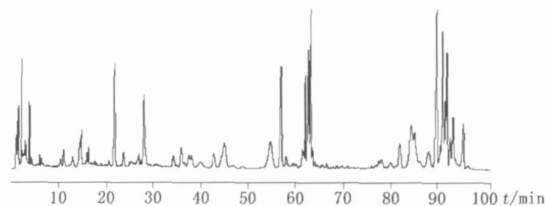


图 1 远志对照药材色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of reference substance of *Polygala tenuifolia*
* 参比峰 (reference chromatographic peak)

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的远志粉末 (20 目) 1.0000 g 加 50% 甲醇 25 mL, 超声 30 min, 过滤, 滤液用 50% 甲醇定容至 25 mL 量瓶中。

2.1.4 精密度试验 取远志二级筒供试品溶液, 连续进样 5 次, 进样分析, 测得参比峰峰面积的 RSD 为 0.86% (n=5)。

2.1.5 稳定性试验 取远志二级筒供试品溶液, 室温放置, 在拟定色谱条件下于 1, 2, 4, 6, 8 h 分别进样。测得参比峰峰面积的 RSD 为 1.4% (n=5)。

2.1.6 重复性试验 取远志二级筒样品共 5 份, 按供试品溶液的制备方法制备平行溶液, 进样分析。测得参比峰峰面积的 RSD 为 1.6% (n=5)。

2.1.7 数据处理 聚类分析、主成分分析及多元逐步回归的全部运算在 STATISTICA 4.0 for Windows 软件下完成。

2.2 结果

2.2.1 样品测定结果 将净远志木心、地上茎叶、芦头、远志根、三级筒、二级筒和一级筒分别粉碎, 过 20 目筛, 置干燥器中室温干燥至恒重。按供试品溶液的制备方法制备样品, 拟定色谱条件下, 分别进样对照药材溶液和供试品溶液。结果见图 2。

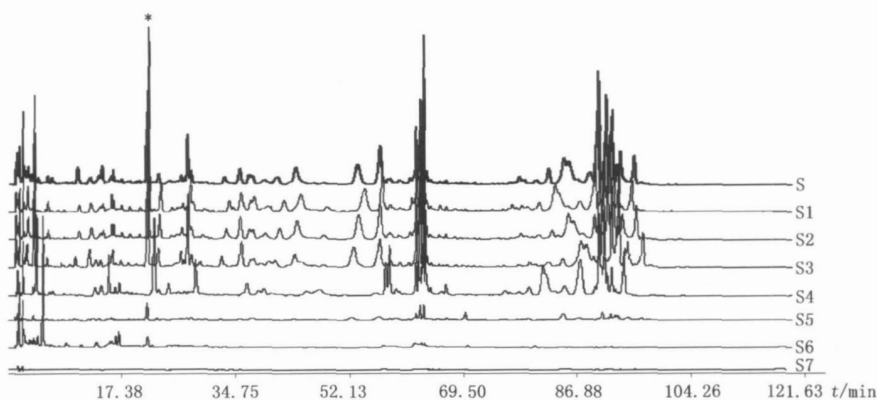


图 2 远志 7 个不同商品药材等级和部位的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of seven different parts and commercial grades of *Polygala tenuifolia* samples

S 远志对照药材 (reference substance of *Polygala tenuifolia*) S₁ 一级筒 (the 1st rank cortex) S₂ 二级筒 (the 2nd rank cortex) S₃ 三级筒 (the 3rd rank cortex) S₄ 远志根 (root) S₅ 芦头 (basic stem) S₆ 地上 (stem and leaf) S₇ 木心 (xylem of the root)

2.2.2 聚类分析结果 采用加权成对组平均法(欧氏距离)对远志 7 个不同商品药材等级和部位进行聚类,结果见图 3。远志的 7 种等级被聚为二类,一类为远志筒和远志根,另一类为芦头、地上部分和木心,该结果与传统用药习惯一致。

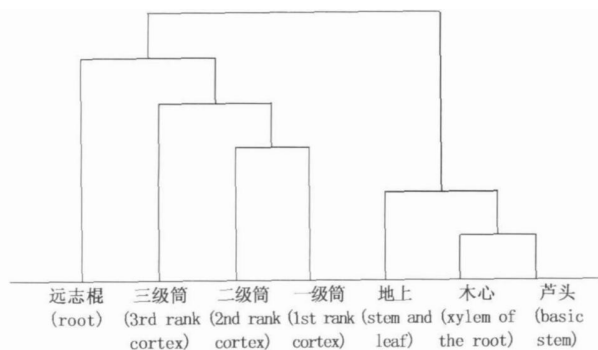


图 3 远志 7 个不同商品药材等级和部位的聚类分析图

Fig 3 Clustering analysis figure of seven different parts and commercial grades of *Polygala tenuifolia*

2.2.3 主成分分析结果 以远志对照药材为标准,对远志一级筒的色谱峰进行编号,其他等级与此相对应。记录各个峰的保留时间和面积,统一均值标准化为参比峰的相对保留时间和相对色谱峰面积,对相对色谱峰面积进行主成分分析,建立三维排序图,3 个排序轴解释了数据矩阵 88.16% 变异,排序结果非常满意。在图 4 中,远志 7 个规格形成了 3 组,木心和地上部分各自独立,芦头受 12 号峰和 34 号峰的影响与远志筒和远志根成为一组。分析表明 X 轴 (factor 1)、Y 轴 (factor 2) 和 Z 轴 (factor 3) 分别与 12 号峰 ($t_R = 21.473$)、34 号峰 ($t_R = 89.596$) 和 5 号峰 ($t_R = 4.086$) 关系最为密切。

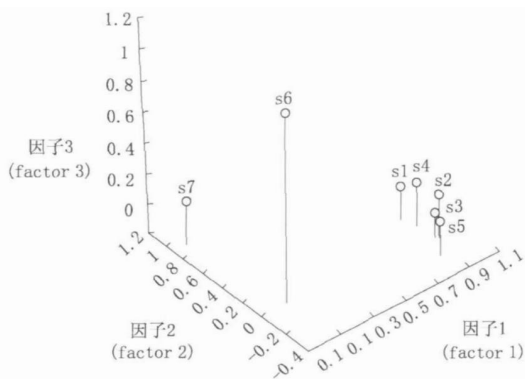


图 4 远志 7 个不同商品药材等级和部位的主成分分析三维排序图

Fig 4 Tridimensional ordination by PCA of seven different parts and commercial grades of *Polygala tenuifolia*

s₁, 一级筒 (the 1st rank cortex) s₂, 二级筒 (the 2nd rank cortex)
s₃, 三级筒 (the 3rd rank cortex) s₄, 远志根 (root) s₅, 芦头 (basic stem)
s₆, 地上 (stem and leaf) s₇, 木心 (xylem of the root)

2.2.4

多元逐步回归结果 将一级筒、二级筒、三级筒、远志根、芦头、地上、木心按质量优劣人为定义为 1 ~ 7 级,通过对色谱峰的多元逐步回归分析,远志药材质量等级 (Y) 与峰 12 ($t_R = 21.473$)、峰 19 ($t_R = 37.07$)、峰 23 ($t_R = 44.687$)、峰 13 ($t_R = 23.361$) 和峰 1 ($t_R = 1.278$) 的面积 (C) 呈显著线性关系,计算公式为:

$$Y = -8.662 \times 10^{-6} C_{12} + 4.635 \times 10^{-5} C_{19} - 5.022 \times 10^{-6} C_{23} + 2.061 \times 10^{-5} C_{13} + 7.466 \times 10^{-6} C_1 + 6.742 \quad (r = 0.9999, F(5, 22) = 154800, p < 0.0000)$$

将远志色谱峰划分为 5 个特征指纹区,即 A: 0 ~ 20 m in B: 20 ~ 30 m in C: 30 ~ 50 m in D: 50 ~ 80 m in E: 80 ~ 100 m in 对指纹区进行多元逐步回归分析,远志药材质量等级 (Y) 与 50 ~ 80 m in (D) 和 80 ~ 100 m in (E) 的峰群总面积呈良好的线性关系,增加 30 ~ 50 m in (C) 峰群能提高计算精度,且计算结果不受 0 ~ 50 m in 分段位置影响。计算公式为:

$$Y = -1.939 \times 10^{-6} D + 3.819 \times 10^{-7} E + 6.991 \times 10^{-7} C + 6.505 \quad (r = 0.9554, F(3, 24) = 83.66, p < 0.0000)$$

3 讨论

3.1 本文以山西平遥产远志不同商品药材等级和部位为研究对象,采用多元统计方法研究远志的质量等级与主成分的关系,发现在梯度洗脱的 38 个色谱峰中,5 个色谱峰与远志质量密切相关,其中 12 号色谱峰 ($t_R = 21.473$ m in) 为远志各规格的共有峰,分离度好,对主成分排序影响大,故选用 12 号峰作为参比峰进行方法学考察。

3.2 聚类分析结果显示,远志药材不同等级和部位首先被聚为二类,即远志筒和远志根为一类,另一类为地上部分、芦头和木心,该结果与传统用药习惯一致。在两大类中,远志根因含木心而与一级筒、二级筒和三级筒距离较远;地上部分因功效与传统远志药材不同^[6]而与芦头和木心距离较远。文献研究表明,远志木心与筒具有相似的化学成分,但有效成分含量普遍较低^[7],故现行版中国药典规定不抽心,另一方面,远志芦头在市场上已被作为低档远志使用。这与本文的研究结果相一致。

3.3 多元统计分析结果显示,12 号色谱峰 ($t_R = 21.473$ m in) 与远志质量关系极为密切,该色谱峰为 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯^[8],具有明显的抗忧郁作用^[9]。远志色谱图中,50 ~ 100 m in 为皂苷类成分,

是远志的主要活性成分, 0~ 50 min为寡糖酯和吡酮类成分, 也是远志不可忽视的两类重要成分分类群^[10-21]。因此, 本文建立的多元统计评价方法不仅可用于评价远志质量, 而且可以为筛选有效成分和有效部位提供线索。

3.4 本文以山西平遥样品为对象所得到的多元逐步回归方程是否适应于其他产区有待进一步验证。但研究思路和方法则完全适用于解决类似问题。

参考文献

- 1 CHP(中国药典). 2005 Vol I(一部): 107
- 2 LIPing(李萍), YAN Ming(闫明), LIPing-ya(李平亚). Advance in study on chemical Ingredient and pharmaceutical activities of Polygala(远志属植物化学成分及生物活性研究进展). *Special Wild Economic Animal Plant Res*(特产研究), 2004 (3): 56
- 3 LIU You-ping(刘友平), WAN De-guang(万得光), LIU Tao(刘涛), et al. Studies on quantitative determination of total saponins in Radix Polygalae by ultraviolet spectrometry(分光光度法测定不同产地远志总皂甙的含量). *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*(成都中医药大学学报), 2000 23(2): 46
- 4 SUN Wen-ji(孙文基), SHI Zhen-fang(沙振方), XIANG Hong-hong(向红红). Studies on quantitative determination of senegenin in Radix Polygalae and the preparation by TLCS(远志及其制剂中远志皂苷元的薄层扫描法测定). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 1990 12(5): 15
- 5 YANG Guo-hong(杨国红), SUN Xiao-fei(孙晓飞). Studies on quantitative determination of senegenin in Radix Polygalae by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定远志中远志皂苷元的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2001, 21(4): 260
- 6 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). *The Chinese Medicine Dictionary*(中药大词典). Vol 1(上册). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 1985. 1028
- 7 GONG Qian-feng Editor-in-chief(龚千峰主编). *science of Chinese Medicinal Herbs Preparation*(中药炮制学). Beijing(北京): China Traditional Chinese Medicine Publishing House(中国中医药出版社), 2003. 315
- 8 FANG Min-feng(房敏峰), ZHANG Wen-juan(张文娟), TENG hong-mei(滕红梅), et al. Research on control and evaluating method of *Polygala tenuifolia* quality and resources(远志质量控制及资源评价研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2009, 40(4): 644
- 9 LIU Ping(刘屏), WANG Dong-xiao(王东晓), GUO Dai-hong(郭代红), et al. Antidepressant effect of 3', 6'-disinapoyl sucrose from *Polygala tenuifolia* Willd in pharmacological depression model(远志 3', 6'-二芥子酰基蔗糖在药物诱发抑郁模型上的药效评价). *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2008 43(18): 1391
- 10 JIANG Yong(姜勇), ZHANG Na(张娜), CUI Zhen(崔振), et al. Fingerprint of *Polygala tenuifolia* by high performance liquid chromatography(远志药材的 HPLC 指纹图谱). *Acta Pharm Sin*(药学报), 2006, 41(2): 179

(本文于 2008 年 5 月 5 日收到)