

基于多元统计方法和成分差异分析辨识半夏白术天麻汤的质量标志物(Q-marker)

徐 男¹, 孙 蓉^{2*}, 朱晓明¹, 黄 欣³, 李明臣³, 时海燕^{3*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

3. 山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院), 山东 济南 250014

摘 要: **目的** 基于多元统计方法分析不同批次半夏白术天麻汤差异的标志性成分, 辨识质量标志物(Q-marker)。**方法** 建立 18 批半夏白术天麻汤活性部位的 HPLC 指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A 版)对指纹图谱数据进行处理, 使用 SPSS 20.0 进行系统聚类分析和主成分分析(PCA), 根据 PCA 结果再进行聚类分析, 筛选出可能影响半夏白术天麻汤质量差异的标志性成分, 并测定样品中其含量。**结果** 选取了 12 个色谱峰作为指纹图谱共有峰, 18 批样品的相似度计算结果均大于 0.900, 说明各批次有较好的一致性; 通过聚类分析可将 18 批样品聚为 3 类, 由 PCA 结果筛选出 5 个标志性色谱峰, 其中 2 个色谱峰鉴定为天麻素、柚皮苷, 将这 5 个标志性色谱峰再进行聚类分析与之前结果基本一致, 18 批样品主成分综合得分与天麻素、柚皮苷的含量测定结果存在相关性。**结论** 通过多元统计方法能够较好地辨识影响半夏白术天麻汤差异的标志性成分, 为进一步半夏白术天麻汤差异成分与药效关联研究提供参考, 为半夏白术天麻汤的 Q-marker 及全面质量控制奠定基础。

关键词: 半夏白术天麻汤; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 质量标志物

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)19-4595-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.19.011

Identification of quality markers (Q-marker) of Banxia Baizhu Tianma Decoction based on component difference analysis and multivariate statistical method

XU Nan¹, SUN Rong², ZHU Xiao-ming¹, HUANG Xin³, LI Ming-chen³, SHI Hai-yan³

1. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine Research, Ji'nan 250014, China

2. Institute of Advanced Medical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China

3. Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, the First Hospital Affiliated Shandong First Medical University, Ji'nan 250014, China

Abstract: **Objective** To identify the quality markers (Q-marker) for Baizhu Tianma Decoction from different batches based on multivariate statistical analysis. **Methods** The fingerprint data of 18 batches of Banxia Baizhu Tianma Decoction were processed by the Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine (2012A Edition). SPSS 20.0 was used for cluster analysis and principal component analysis (PCA). According to PCA results, cluster analysis was carried out to screen out the markers that might affect the quality difference of Banxia Baizhu Tianma Decoction and determine its content in the samples. **Results** A total of 12 chromatographic peaks were selected as common peaks of fingerprint, and the similarity of 18 batches of samples was greater than 0.900, which indicated that each batch had good consistency. Eighteen batches of samples were clustered into three groups by cluster analysis. Five marker peaks were screened out from PCA results. Two of them were identified as gastrodin and naringin. The five marker peaks were further clustered and the results were basically the same as before. There was a certain correlation between the comprehensive score of principal components and the determination results of gastrodin and

收稿日期: 2019-09-10

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2017-136); 山东省重点研发计划项目(2017CXGC1308); 山东省泰山学者工程专项(ts201511107)

作者简介: 徐 男(1982—), 男, 中药学博士, 主要从事中药新药开发与药效物质研究。E-mail: 93679706@qq.com

*通信作者 时海燕, 生药学博士, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: shihaiyan123@163.com

孙 蓉, 药理学博士, 主要从事中药药理与毒理研究。E-mail: sunrong107@163.com

naringin in 18 batches of samples. **Conclusion** Through multivariate statistical analysis, the Q-markers that may affect the difference of Banxia Baizhu Tianma Decoction were better identified, which can lay the foundation for the comprehensive quality control of Banxia Baizhu Tianma Decoction and its compound preparations, and provide reference for the further study of the correlation between the different components and pharmacodynamics of Banxia Baizhu Tianma Decoction.

Key words: Banxia Baizhu Tianma Decoction; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; Q-marker

2016 年刘昌孝院士^[1-2]根据中药生物属性、制造过程及配伍理论等自身医药体系的特点, 提出中药质量标志物(Q-marker)的新概念。中药 Q-marker 是存在于中药材和中药产品(如中药饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂)中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质, 是质量标准能否控制中药材、饮片、提取物及制剂内在质量的关键, 是中药质量标准中的核心要素^[3]。近年来, 众多学者对如何发现和确认中药 Q-marker 进行了大量的探索性研究。

2018 年 5 月 29 日, 国家药品监督管理局发布了《古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理规定》的公告, 明确了经典名方复方制剂开发免临床研究政策, 这无形中也对经典名方复方制剂的质量标准提出了更高的要求^[4]。色谱或光谱指纹图谱能够较好地反映经方整体的化学信息, 已取得中医药工作者的普遍认可。但由于经方的药效物质及其作用机制研究尚不充分, 在指纹图谱共有峰指认时, 如果只是一些极普通且没有生物活性的化学成分, 缺乏专属性, 也无生物活性, 就不能真正反映经方的质量^[5-6], 无法有效保证经方临床应用的有效性和安全性, 那么制定的质量标准的价值将大打折扣。因此, Q-marker 研究在经典名方研究中同样意义非凡。

2018 年 4 月 17 日, 国家中医药管理局公布的《古代经典名方目录(第一批)》共收录方剂 100 首, 其中药味数小于 5 味的处方仅占 37%, 药味数 6~10 的中等处方占 50%, 其他为 10 味以上处方^[7]。可以看出, 经典名方普遍药味组成较多、成分复杂、模糊因素较多, 这决定了经典名方 Q-marker 的研究难度较大。为了全面、系统地分析经方全部化学信息, 对经方指纹图谱进行综合评价, 常常需要考虑衡量多个变量。由于变量之间可能存在着相关性, 需要采用多元统计分析方法对指纹图谱所有变量的观测数据进行分析, 研究多个随机变量之间相互依赖关系以及内在统计规律性。目前已有学者尝试利用多元统计分析, 包括聚类分析、主成分分析(PCA)和因子分析等, 从复杂的中药 HPLC 指纹图谱检测

数据中提取有效的化学信息, 用于杜仲、人参、人工牛黄等药材的 Q-marker 及质量评价研究^[8-10]。

半夏白术天麻汤(《医学心悟》清·程国彭撰)作为首批发布的 100 首经典名方之一, 具有燥湿化痰、平肝息风的功效, 主治风痰上扰所致眩晕头痛、胸闷呕恶、舌苔白腻、脉弦滑等证, 是中医临床治疗痰湿壅盛型高血压的代表方剂^[11]。其由半夏、天麻、茯苓、橘红、白术、甘草 6 味中药组成, 主要化学成分包括酚酸、黄酮、皂苷、生物碱以及多糖、蛋白质等大分子^[12-14]。鉴于该方化学成分的复杂性和多样性, 本实验在前期研究已经筛选出了半夏白术天麻汤的活性部位的基础上^[15], 从组分中药思路出发, 建立半夏白术天麻汤活性部位的指纹图谱, 并对指纹图谱信息进行多元统计分析, 筛选出可能影响不同批次半夏白术天麻汤差异的标志性成分, 为进一步半夏白术天麻汤差异成分与药效关联研究提供参考, 为半夏白术天麻汤 Q-marker 的辨识及全面质量控制奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-250E 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FA1100 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司); LXJ-II 型离心沉淀机(上海医疗器械三厂); Mettler AE 240 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司); DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); 高效液相色谱仪、工作站及紫外检测器(美国赛默飞公司)。

1.2 材料

对照品天麻素(批号 wkq18011604)、甘草苷(批号 wkq16071504)、柚皮苷(批号 wkq17052406)、异甘草苷(批号 wkq18042008), 购于四川省维克奇生物科技有限公司, 所有对照品经 HPLC 峰面积归一化法检测质量分数均在 98%以上; 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司, 水为广州屈臣氏纯净水。

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎; 天麻为兰科植物天麻

Gascrodia elata Bl. 的干燥块茎;白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎;橘红为芸香科植物柑橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥外层果皮;茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核;甘草为豆科多年生草本植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.

的干燥根及根茎。以上药材饮片均购自安徽亳州药材市场,药材饮片产地及批号见表 1,经山东大学孙蓉教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版标准。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

InertSustain C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5

表 1 半夏白术天麻汤药材饮片产地及批号

Table 1 Origin and batch number of Banxia Baizhu Tianma Decoction pieces

序号	半夏		天麻		白术		橘红		茯苓		甘草	
	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号
1	山西绛县	181101	四川	180101	安徽亳州	181001	广东化州	180701	安徽金寨	181101	鄂尔多斯	180501
2	甘肃西和	181102	安徽安庆	181101	安徽涡阳	180801	广东新会	180501	安徽安庆	181201	内蒙赤峰	181001
3	甘肃陇南	180702	安徽六安	181201	河北	180401	广西	181201	湖南邵阳	181101	内蒙包头	180801

μm);流动相:乙腈(A)-水(B);梯度洗脱:0~45 min, 3%~45% A; 45~60 min, 45%~100% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取天麻素对照品 5.67 mg、甘草苷对照品 4.68 mg、柚皮苷对照品 3.60 mg、异甘草苷对照品 3.22 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液^[15] 称取半夏 9 g、天麻 6 g、茯苓 6 g、橘红 6 g、白术 15 g、甘草 4 g, 置于圆底烧瓶中, 提取 2 次, 每次 60 min, 加水量依次为 8、4 倍, 提取液依次粗滤, 合并滤液。抽滤, 减压浓缩 (70 °C) 至浸膏。取适量浸膏以聚酰胺树脂吸附, 浸膏与聚酰胺树脂质量比为 1:3, 加于 DM301 型大孔吸附树脂顶部, 浸膏与树脂质量比为 1:3, 依次用水和 80%乙醇洗脱, 洗脱量均为 3 倍柱体积 (BV), 洗脱体积流量控制为 1 mL/min, 收集 80%乙醇洗脱液, 减压浓缩 (60 °C), 定容至 10 mL, 摇匀, 经 0.45 μm 滤膜滤过, 即得。

2.3 半夏白术天麻汤活性部位指纹图谱的研究

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S1), 连续进样 6 次, 记录指纹图谱, 选择出峰稳定、响应值最高、峰面积较大的柚皮苷为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.96%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.55%, 表明本方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S1), 分别于 0、4、8、12、16、24 h 进行检测, 记录指纹图谱, 以柚皮苷为参照峰, 各共有峰相对保留时间

的 RSD 均小于 2.05%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.20%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 分别取 S1 6 份, 按照“2.2.2”项方法制备供试品溶液及“2.1”项色谱条件进行检测, 记录指纹图谱, 以柚皮苷为参照峰, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.72%, 相对峰面积 RSD 均小于 2.61%, 表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立 将表 1 中药材饮片按 L₁₈ (3⁷) 正交表排列组合, 按“2.2.2”项下方法制备 18 批样品的供试品溶液, 在“2.1”项条件下分别进样测定, 记录色谱图。将得到的 HPLC 图谱数据导入中药指纹图谱相似度评价系统 (2014A 版), 以夹角余弦为测度对上述指纹图谱进行相似度分析。选择色谱峰进行多点校正、色谱峰自动匹配, 以中位数法生成 HPLC 指纹图谱共有模式, 见图 1。指纹图谱相似度计算结果以对照图谱为参照, 各批样品与对照图谱进行比较, 计算 18 批样品的相似度分别为 0.997、0.998、0.987、0.992、0.989、0.988、0.995、0.967、0.999、0.975、0.985、0.963、0.964、0.988、0.994、0.958、0.991、0.969。选择特征明显、重复性好、稳定性好的色谱峰为共有峰, 根据评价系统生成的指纹图谱和对照指纹图谱进行比对, 共标定 12 个共有峰, 共有峰面积占总峰面积 80%以上, 符合指纹图谱共有峰的要求。经对照品比对色谱峰 2 为天麻素, 6 为甘草苷, 7 为柚皮苷, 10 为异甘草苷, 见图 2。

2.3.5 聚类分析 将指纹图谱的 12 个共有峰的峰面积为特征, 处理成量化特征峰数据, 见表 2。运用 SPSS 20.0 分析软件对其进行聚类分析, 采用组间连接法, 以欧式平方距离为测度, Z 标准化, 对

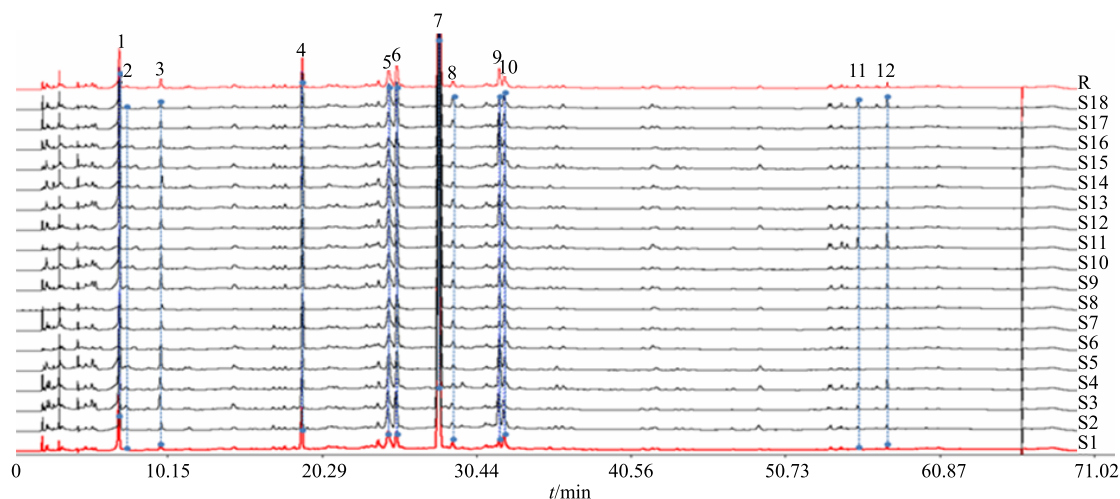
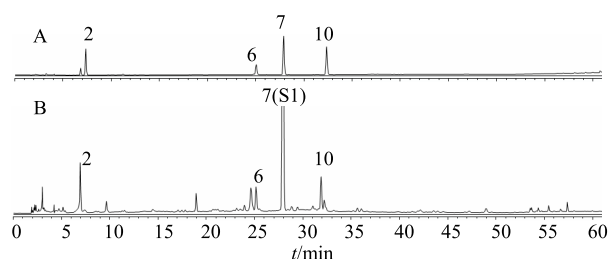


图 1 18 批样品指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprints of 18 batches of samples and control fingerprints (R)



2-天麻素 6-甘草苷 7-柚皮苷 10-异甘草苷
2-gastrodin 6-glycyrrhizin 7-naringin 10-isoliquiritoside

图 2 混合对照品 (A) 和供试品溶液 (S1, B) HPLC 图

Fig. 2 HPLC diagram of mixed reference substance (A) and sample solution (S1, B)

样品进行聚类分析, 结果见图 3。从中可以看出, 18 批样品总共可以聚为 3 类, 其中, S1~S7、S9、S10、S12~S15、S17 聚为第 1 类; S8、S16 单独聚为第 2 类; S11、S18 单独聚为第 3 类。从聚类分析结果表明, 18 批样品的质量基本稳定, 成分差异的重要因素之一可能为处方组成药味的产地、采收、贮藏、炮制等中药固有因素不同, 导致批次之间质量会有所差异。

2.3.6 PCA 将 12 个共有峰峰面积导入 SPSS 20.0 软件, 进行 PCA。对共有峰峰面积 Z 标准化处理后, 计算主成分特征值、累积贡献率及因子荷载矩阵等。

表 2 18 批样品共有峰的量化特征峰面积

Table 2 Quantitative characteristic peak area of common peaks in effective parts of 18 batches

样品	峰面积											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	6.012 8	0.263 4	0.985 9	4.701 6	4.035 0	2.443 6	82.349 4	1.005 8	1.361 6	2.835 3	0.183 9	1.278 2
S2	4.007 0	0.345 5	0.785 9	2.088 4	4.418 7	4.923 8	72.180 9	0.901 3	5.347 2	2.966 6	0.181 5	0.703 9
S3	6.263 2	0.401 5	1.817 6	3.346 1	3.710 9	2.551 5	69.113 7	0.951 8	2.766 4	1.850 0	0.130 0	1.404 4
S4	6.091 0	0.881 5	1.474 4	2.146 4	5.082 9	4.230 0	70.771 3	0.796 2	4.990 2	1.993 5	0.345 0	0.702 1
S5	7.692 6	0.142 8	2.390 7	2.236 3	3.512 7	2.519 3	55.808 8	0.715 2	4.984 3	1.963 1	0.112 6	0.831 6
S6	2.073 9	0.292 2	0.930 5	4.589 8	2.935 1	4.680 7	65.370 4	1.082 0	0.867 3	1.989 7	0.181 7	0.220 8
S7	4.151 3	0.403 7	1.076 2	4.023 3	3.817 5	5.054 0	91.955 1	1.195 0	1.456 1	2.760 4	0.088 5	0.649 3
S8	1.251 2	0.446 0	0.774 1	1.209 0	2.564 5	1.742 3	33.397 7	0.419 2	2.526 6	1.152 2	0.162 2	0.819 0
S9	7.262 8	0.465 5	1.869 8	4.247 4	3.471 7	2.928 8	101.397 7	1.317 0	2.028 9	2.311 8	0.269 7	0.895 0
S10	5.569 8	0.442 7	1.733 2	3.346 5	3.722 5	4.134 0	83.460 3	1.027 4	1.932 6	2.287 0	0.217 1	0.489 6
S11	1.598 5	1.397 9	0.361 3	4.291 3	4.176 4	3.609 0	87.809 6	1.224 3	0.867 6	1.795 5	0.858 5	0.705 6
S12	5.460 3	0.470 2	1.254 4	2.053 4	3.888 5	2.594 5	50.455 6	0.792 9	4.388 2	2.129 1	0.316 0	0.150 0
S13	5.470 8	0.594 0	1.459 0	4.067 8	4.197 9	3.526 5	110.738 7	1.315 5	1.763 1	2.186 7	0.177 5	0.920 8
S14	4.412 8	0.167 9	1.501 2	4.502 8	3.463 2	3.256 7	87.010 7	0.852 0	0.856 1	2.182 1	0.112 4	0.309 7
S15	4.377 3	0.388 6	1.333 9	2.466 2	3.441 9	4.985 0	68.769 9	0.942 9	4.927 8	2.091 1	0.209 9	0.745 8
S16	3.747 3	0.135 0	1.458 9	1.971 9	1.820 2	1.885 7	52.421 3	0.585 3	4.277 3	1.146 7	0.109 4	0.774 0
S17	5.700 1	0.273 0	0.984 2	3.580 2	3.203 1	4.211 8	106.281 8	0.550 1	1.924 9	2.104 1	0.279 1	0.695 2
S18	5.523 1	1.041 6	0.979 3	4.390 9	5.011 4	3.773 5	99.186 0	1.506 5	0.937 0	1.790 2	0.440 3	0.182 6

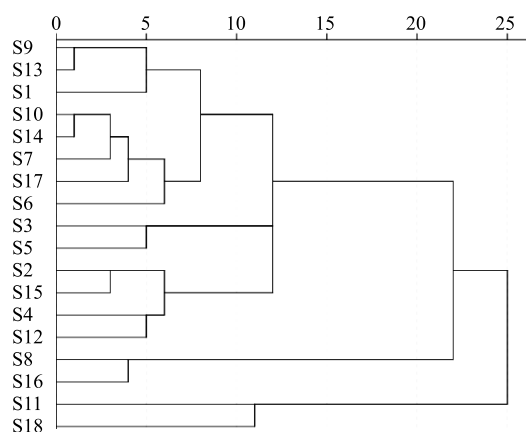


图 3 18 批样品聚类树状图

Fig. 3 Cluster tree of substance groups of effective parts in 18 batches

主成分特征值、累积方差贡献率见表 3 和图 4。以特征值 >1 为提取标准, 得到前 4 个主成分的累积方差贡献率为 82.271%, 故选取前 4 个主成分即可进行评价, 它代表了 12 个成分量的 82.271% 的信息量, 具有很好的代表性, 可用这 4 个主成分新变量代替原有的 12 个变量; 在 4 个主成分中, 特征值较大的是主成分 1, 其累积方差贡献率达到 35.361%, 是信息量较全面的指标。

根据因子载荷矩阵, 推测影响 18 批样品差异的并不是单一成分, 而是多成分(群)的协同作用的结果。从表 4 和图 5 中可以看出, 色谱峰 2、4、5、7、8 是主成分 1 中权重较大的成分。

2.3.7 差异特征峰分析 采用 SPSS 20.0 统计分析软件对色谱峰 2、4、5、7、8 的峰面积为特征, 处

表 3 特征值和方差贡献率

Table 3 Characteristic value and variance contribution rate

峰号	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.243	35.361	35.361	4.243	35.361	35.361
2	2.588	21.567	56.927	2.588	21.567	56.927
3	1.628	13.564	70.491	1.628	13.564	70.491
4	1.414	11.780	82.271	1.414	11.780	82.271
5	0.877	7.310	89.581			
6	0.411	3.425	93.006			
7	0.364	3.032	96.038			
8	0.212	1.769	97.806			
9	0.147	1.225	99.031			
10	0.071	0.594	99.626			
11	0.039	0.325	99.951			
12	0.006	0.049	100.000			

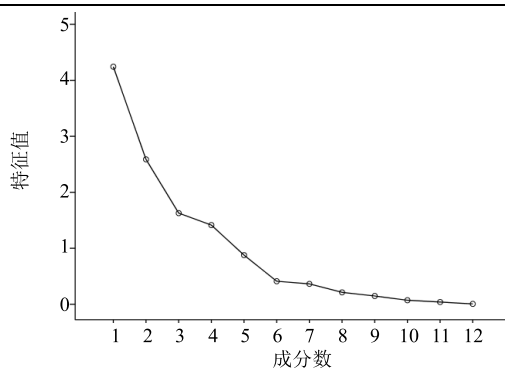


图 4 公共因子碎石图

Fig. 4 Macadam figure of common factors

理成量化特征峰数据再次进行系统聚类分析, 采用组间联结法, 利用欧式距离作为样品的测度, PCA 后的聚类分析图, 见图 6。结果显示, S1~S7、S9、S10、S12~S15、S17 聚为第 1 类; S8、S16 单独聚

表 4 初始因子载荷矩阵

Table 4 Component matrix

主成分	1	2	3	4
1	-0.004	0.330	0.160	0.229
2	0.155	-0.190	0.245	0.270
3	-0.095	0.276	0.042	0.218
4	0.183	0.090	-0.329	0.052
5	0.158	0.079	0.379	0.053
6	0.127	0.036	0.154	-0.488
7	0.186	0.151	-0.111	0.043
8	0.198	0.079	-0.020	0.097
9	-0.146	0.050	0.442	-0.092
10	0.105	0.230	0.081	-0.329
11	0.139	-0.217	0.189	0.246
12	-0.052	0.136	-0.039	0.321

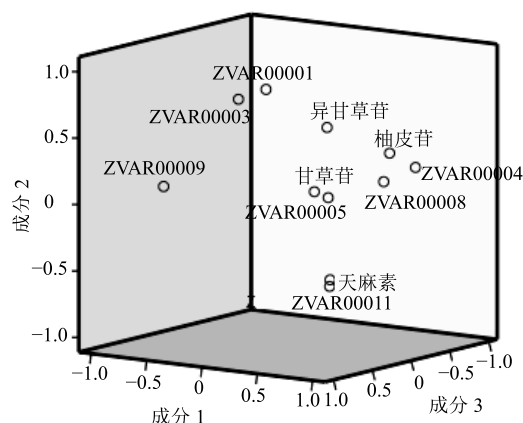


图 5 旋转后主成分空间图

Fig. 5 Spatial map of rotating principal component

为第 2 类; S11、S18 单独聚为第 3 类, 结果显示, 经 PCA 结果筛选出数据进行聚类分析和之前聚类分析结果一致。因此可以得出结论, 通过多元统计分析筛选出峰 2 (天麻素)、4、5、7 (柚皮苷)、8 是不同批次半夏白术天麻汤差异的标志性色谱峰。

2.3.8 综合评价 用 4 个主成分对 18 批样品进行综合评价, 将得到的特征向量与标准化后的数据相乘, 得到主成分表达式, 再以每个主成分所对应的特征

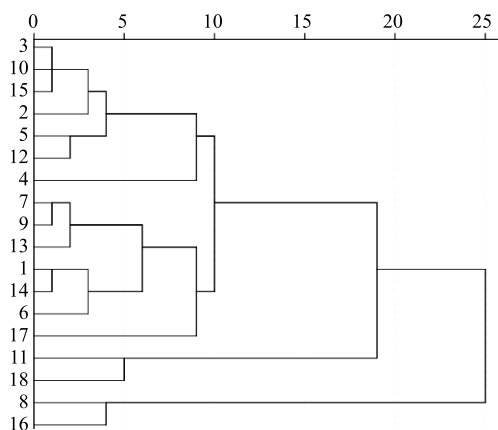


图 6 18 批样品进行主成分分析后的聚类树状图

Fig. 6 Cluster dendrogram of 18 batches after principal component analysis

值占提取主成分总的特征值之和的比例作为权重得到了主成分综合模型, 根据主成分综合模型计算 18 批样品的主成分得分及综合得分值, 见表 5。综合得分结果显示, S18、S13、S11 在所有样品中的综合得分位于前 3 名, 表明该 3 批的药材质量较好。对应指纹图谱中标志性色谱峰 2、4、5、7、8 的峰面积值均较大; S8、S16、S5 在所有样品中的综合

表 5 主成分得分、综合得分排序

Table 5 Rank of principal component scores and comprehensive scores

序号	主成分 1 得分	主成分 2 得分	主成分 3 得分	主成分 4 得分	综合得分	排名
S1	0.723 3	1.541 8	-1.099 3	0.562 3	1.155 2	6
S2	-0.034 0	0.319 6	1.930 2	-2.308 4	0.117 8	9
S3	-1.175 7	1.345 9	-0.255 1	1.731 5	-0.232 2	12
S4	0.041 6	-0.008 1	2.917 0	0.364 8	0.709 2	7
S5	-2.895 3	1.956 6	0.958 4	0.905 3	-1.382 5	16
S6	0.689 6	-1.281 8	-1.833 2	-1.824 5	-0.626 3	13
S7	1.590 6	0.885 6	-0.669 5	-1.713 5	1.349 3	5
S8	-3.502 8	-3.260 9	-0.763 7	0.371 5	-4.574 2	18
S9	0.982 6	1.977 1	-0.623 6	1.348 2	1.802 3	4
S10	0.436 5	0.849 2	-0.046 4	-0.359 2	0.673 8	8
S11	3.593 5	-3.696 8	0.407 5	1.460 4	1.956 8	3
S12	-1.262 4	-0.766 3	1.440 5	-0.252 6	-1.181 0	15
S13	1.668 7	1.274 6	-0.437 5	0.727 9	2.047 0	2
S14	0.188 5	0.528 7	-1.723 6	-0.686 4	-0.089 5	11
S15	-0.761 8	0.039 3	1.068 3	-1.166 6	-0.631 7	14
S16	-3.917 9	-1.180 0	-1.026 2	0.579 6	-4.083 9	17
S17	0.150 8	0.237 3	-0.764 9	-0.628 9	-0.034 4	10
S18	3.484 2	-0.761 7	0.521 1	0.888 6	3.024 6	1

得分位于后 3 名,表明该 3 批的药材质量稍差,对应指纹图谱中标志性色谱峰 2、4、5、7、8 的峰面积值较小。

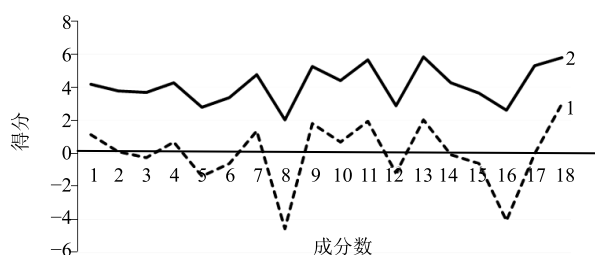
以 S1~S18 中天麻素、柚皮苷 2 个成分总量角度对样品进行打分,见表 6。结果发现各样品含量得分与主成分综合得分明显相关,见图 7,两者的相关系数为 0.899,提示天麻素、柚皮苷 2 种成分可作为质量标志物对半夏白术天麻汤的质量优劣进行评价,含量越高质量越好。

表 6 半夏白术天麻汤样品含量测定结果 ($n=3$)
Table 6 Determination of Banxia Baizhu Tianma Decoction ($n=3$)

序号	天麻素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	柚皮苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	总质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
S1	2.84	38.81	41.66
S2	3.73	34.02	37.75
S3	4.33	32.58	36.91
S4	9.51	33.36	42.86
S5	1.54	26.31	27.84
S6	3.15	30.81	33.96
S7	4.35	43.34	47.70
S8	4.81	15.74	20.55
S9	5.02	47.79	52.81
S10	4.77	39.34	44.11
S11	15.07	41.39	56.46
S12	5.07	23.78	28.85
S13	6.41	52.20	58.60
S14	1.81	41.01	42.82
S15	4.19	32.41	36.60
S16	1.46	24.71	26.16
S17	2.94	50.10	53.04
S18	11.23	46.75	57.98

3 讨论

现代数理统计和计算机技术的发展,开辟了用数学方法研究中药复方成分变化规律的新领域,也为研究经典名方 Q-marker 提供了有力的工具。本实验从经典名方半夏白术天麻汤活性部位出发,综合利用 PCA、聚类分析、因子分子等多元统计分析方法初步辨识经方半夏白术天麻汤的 Q-marker。首先,通过分析不同批次半夏白术天麻汤差异性化学信息,初步筛选出峰 2 (天麻素)、4、5、7 (柚皮苷)、8 的量是影响质量差异的标志性成分。然后,通



1-主成分综合得分 2-2 种成分总含量 $\times 0.1$
1-main component comprehensive score 2-total content of two ingredients $\times 0.1$

图 7 S1~18 主成分得分及 2 种成分总量测定结果比较
Fig. 7 Comparison of main component comprehensive scores and determination results of two components

过双变量相关分析主成分综合得分值与指纹图谱中色谱峰 2、7 的含量之和,发现二者之间存在较强的关联性,说明天麻素、柚皮苷 2 种成分可作为 Q-marker,用于评价半夏白术天麻汤的质量优劣。旨在抛砖引玉,希望通过本研究不但能为进一步半夏白术天麻汤差异成分与药效关联研究提供参考,对其复方制剂的提取、浓缩、干燥、成型等制药过程的工艺优化及质量标准等研究提供借鉴作用,还可以为复杂中药复方的 Q-marker 研究提供可供借鉴的研究思路与方法

本研究辨识半夏白术天麻汤 Q-marker 色谱峰 2 (天麻素)、7 (柚皮苷),符合 Q-marker 核心内容的要求,即有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍“五要素”^[16]。天麻素、柚皮苷分别为君药天麻和佐药橘红中的代表性成分。现代研究发现,天麻素能舒张血管^[17]、改善胰岛素抵抗和调节炎症因子的产生及抑制炎症反应过程^[18]等药理作用,柚皮苷具有抗氧化和保护高糖诱导的人内皮细胞损伤作用^[19]。色谱峰 4、5、8 为未知黄酮类成分,还需进一步结合 HPLC-MS-MS^[20]、UPLC-Q-TOF/MS^[21]及 UPLC-QTOF-MS/MS^[22]等现代分析技术对各成分的结构确定进行深入研究。

参考文献

- [1] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1456.
- [2] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149-3154.
- [3] 刘昌孝. 发展中药质量标志物 (Q-marker) 理论方法和策略, 研究提升中药科学技术水平 [J]. 药学报, 2019, 54(2): 185-186.

- [4] 梁爱华, 韩佳寅, 陈士林, 等. 中药经典名方的质量与安全性考量 [J]. 中国食品药品监管, 2018, 6: 4-10.
- [5] 熊亮, 彭成. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的基本条件研究益母草和赶黄草的 Q-Marker [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2212-2220.
- [6] 杨立伟, 王海南, 耿莲, 等. 基于标准汤剂的中药整体质量控制模式探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 1-6.
- [7] 王奕博, 黄平情, 杜媛媛, 等. 基于第一批经典名方的分析与思考 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2191-2196.
- [8] 资文, 刘韶, 彭应枝. 基于指纹图谱和化学计量学技术筛选张家界产杜仲的标志性成分 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1831-1834.
- [9] 石岩, 孙冬梅, 熊婧, 等. 人工牛黄多组分测定及其质量差异标志物的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 659-664.
- [10] 赵幻希, 王秋颖, 孙秀丽, 等. HPLC-MS 结合多元统计分析区分人参产地及筛选皂苷类标志物 [J]. 高等学校化学学报, 2019, 40(2): 246-253.
- [11] 徐男, 王亮, 时海燕, 等. 基于整合药理学平台探究半夏白术天麻汤治疗高血压的分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 109-117.
- [12] Hu P Y, Yue P F, Zheng Q, *et al.* Pharmacokinetic comparative study of gastrodin after oral administration of *Gastrodia elata* Bl extract and its compatibility with the different indigents of *Ligusticum chuanxiong* Hort to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 191: 82-86.
- [13] Yang Y, Wang X, Zhao C, *et al.* Chemical mapping of essential oils, flavonoids and carotenoids in citrus peels by Raman microscopy [J]. *J Food Sci*, 2017, 82(12): 2840-2846.
- [14] Luo M, Luo H, Hu P, *et al.* Evaluation of chemical components in *Citri Reticulatae Pericarpium* of different cultivars collected from different regions by GC-MS and HPLC [J]. *Food Sci Nutrition*, 2018, 6(2): 400-416.
- [15] 徐男, 时海燕, 王淑玲, 等. 基于正交试验配合多药效指标综合评价半夏白术天麻汤治疗痰湿壅盛型高血压的有效组分配伍 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 7-13.
- [16] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196.
- [17] 张映桥, 余涛, 许激扬, 等. 天麻素对离体大鼠胸主动脉环的舒张作用及其机制 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2135-2138.
- [18] Ye T, Meng X, Wang R, *et al.* Gastrodin alleviates cognitive dysfunction and depressive-like behaviors by inhibiting ER stress and NLRP3 inflammasome activation in db/db mice [J]. *Inter J Molecular Sci*, 2018, 19(12): 1-15.
- [19] Li G, Xu Y, Sheng X, *et al.* Naringin protects against high glucose-induced human endothelial cell injury via antioxidation and CX3CL1 downregulation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2540-2551.
- [20] 薛刚强, 曹宝帅, 高淑丽, 等. LC-MS/MS 法同时测定回春育子颗粒中 9 种成分的含量 [J]. 中国药房, 2018, 29(9): 1213-1217.
- [21] 韩旭阳, 张璐, 彭冰, 等. UPLC-Q-TOF-MS 辨析清热除湿汤药效物质基础 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 150-155.
- [22] Zhu M, Wei P, Peng Q, *et al.* Simultaneous qualitative and quantitative evaluation of *Toddalia asiatica* root by using HPLC-DAD and UPLC-QTOF-MS/MS [J]. *Phytochem Anal: PCA*, 2019, 30(2): 164-181.