

文章编号: 1674-8085(2018)03-0093-05

基于主成分分析和聚类分析评价安徽省地产及全国主产区药材半夏质量

*刘 宏, 戴 胜, 秦亚东

(安徽省中医药高等专科学校, 安徽, 芜湖 241000)

摘 要: **目的** 综合分析、比较、评价皖产半夏和全国主产区半夏质量。**方法** 比色法、电位滴定法测定安徽及全国主产区半夏氨基酸、有机酸、多糖、蛋白质及生物碱含量, 并通过聚类分析和主成分分析对半夏质量进行评价。**结果** 不同产地半夏药材 5 类成分含量差异较大。**结论** 主成分分析和聚类分析适用于半夏药材内在质量特征评价。

关键词: 半夏; 质量; 安徽省; 聚类分析

中图分类号: R284

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2018.03.019

EVALUATION OF THE QUALITY OF *PINELLIA TERNATA* IN ANHUI PROVINCE AND OTHER PROVINCES BASED ON PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS AND CLUSTER ANALYSIS

*LIU Hong, DAI Sheng, QIN Ya-dong

(Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu, Anhui 241000, China)

Abstract Objective: To evaluate the quality of *Pinellia ternata* in Anhui Province and the other main production area of China by using comprehensive analysis, comparison and evaluation. **Methods:** The contents of amino acids, organic acids, polysaccharides, proteins and alkaloids in *P. ternata* in Anhui and the other main producing areas of China were determined by colorimetry and potentiometric titration, and the quality of *P. ternata* was evaluated by cluster analysis and principal component analysis. **Results:** There are significant differences among the contents of 5 kinds of compounds in different areas. **Conclusions:** The principal component analysis and cluster analysis are suitable for the evaluation of the internal quality characteristics of *P. ternata*.

Key words: *Pinellia ternata*; quality; Anhui province; cluster analysis

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Berit. 的块茎, 为 2015 年版《中国药典(一部)》收录的唯一正品半夏药材。其性温, 味辛, 有小毒, 归脾、胃、肺经。具有降逆止呕、燥湿化痰、和胃安神、宽中消痞、排脓消痈作用^[1]。现代中药药理研究表明, 半夏具有镇咳、催吐和镇吐、抗癌、调节胃肠功能及利胆等作用。半夏

块茎含 75% 左右的淀粉, β -谷甾醇及其葡萄糖苷, L-麻黄碱、胆碱、胡芦巴碱、多糖、多种氨基酸及无机元素。其药理作用主要表现在抗肿瘤、抗炎、祛痰镇咳、抗溃疡作用, 另外对循环系统也有抑制作用^[2]。

野生半夏主产于山东、安徽、湖南、江苏、浙江等省。我省的半夏历来质量上乘, 如阜南、

收稿日期: 2018-01-17; 修改日期: 2018-03-22

基金项目: 安徽省教育厅 2017 年自然科学计划项目(KJ2017A684); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目(gxyq2017209)

作者简介: *刘 宏(1975-), 男, 安徽芜湖人, 讲师, 硕士, 主要从事中药化学研究(E-mail:717079649@qq.com);

戴 胜(1989-), 男, 安徽芜湖人, 讲师, 硕士, 主要从事药物分析化学研究(E-mail:510348545@qq.com);

秦亚东(1979-), 男, 安徽宿州人, 副教授, 硕士, 主要从事中药质量研究(E-mail:393581594@qq.com).

颖上所产的半夏, 誉称之“颖半夏”, 贵池殷汇所产半夏, 誉称之“汇半夏”, 舒城所产半夏, 誉称之“舒半夏”, 均著名于世。特别是阜南焦坡集的半夏, 誉称之“焦半夏”, 历史上曾为朝廷进贡珍品, 其个大色白, 粉足重实, 一面凹入, 白色, 棕眼明显, 另一面半球形, 美称之为“圆珠半夏”^[3]。现今安徽市场上销售半夏基本为外省所产, 故为了解安徽地产半夏质量优劣, 寻找优质半夏种质资源, 为我省大范围发展半夏人工种植提供科学的依据。

《中国药典(一部)》2015 版中规定半夏药材总酸含量不低于 0.25%, 仅以总酸含量难以客观全面反映半夏药材的内在质量差异。为更全面反映半夏药材内在质量特征, 本研究采集了安徽具有代表性的三个产地及五个外省半夏主产区标本, 每个产地采样两批标本进行研究, 以不同来源半夏药材氨基酸等五类成分含量为变量, 利用主成分分析的数据降维思维和聚类分析将变量根据相似性而分类的方法来概括五类成分含量信息, 在整体上区分或分类不同产地、不同来源半夏药材, 更全面评价安徽产半夏药材内在质量。

1 仪器与材料

1.1 仪器

XMTD-4000数显恒温水浴锅(北京光明医疗仪器有限公司); 85-2数字恒温磁力搅拌器(北京光明医疗仪器有限公司); XC-XY-320型超声波提取器(河北星联晨科技有限公司); RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); Discovery十万分之一电子天平(美国OHAUS); 3-18k离心机(德国SIGMA有限公司); Cary-60紫外分光光度计(Agilent Technologies); PHS-3C酸度计(上海精密科学仪器有限公司); 超纯水处理系统(北京莱特莱德纯水设备技术股份有限公司)。

1.2 材料

半夏药材由安徽省中医药高等专科学校赵宝林教授鉴定为天南星科植物三叶半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。本省药材均由作者自行采集, 外省药材由浙江省医药公司和亳州药材市场提供。D(+)-无水葡萄糖(北京北纳创联生物技术研究, 批号: 170224); 牛血清蛋白(山

西西亚化学有限公司, 批号: N02038); 缬氨酸(北京北纳创联生物技术研究, 批号: 170530); 盐酸麻黄碱(中国食品药品检定研究院, 批号: 171241-201508); 其余所用试剂均为分析纯, 水为纯化水。

2 各类成分测定方法

2.1 多糖

2.1.1 对照溶液制备

精密称量干燥至恒重的D(+)-无水葡萄糖 10.59 mg, 纯化水溶解并定容至100 mL。

2.1.2 标准曲线制备

分别取对照溶液0.1、0.25、0.4、0.55、0.7、0.85、1.0 mL至具塞试管中, 加水补足至1.0 mL, 加5%苯酚溶液1.0 mL, 摇匀, 迅速加入浓硫酸5 mL, 100℃水浴15 min, 取出后迅速冰水浴15 min, 放冷至室温, 另取水1.0 mL同法制备参比溶液^[4]。

取上述待测溶液1份, 在400~800 nm波长下扫描, 确定 $\lambda_{\max} = 490$ nm, 此波长下测定上述溶液得标准曲线方程 $y = 0.0088x + 0.0034$ ($R^2 = 0.9995$, 浓度单位: $\mu\text{g/mL}$)。

2.1.3 样品溶液制备

半夏粉碎, 过80目筛, 80℃干燥2 h, 精密称定1.0 g, 50 mL水80℃浸提2 h, 共3次, 合并滤液, 浓缩并定容至50 mL。取2 mL至15 mL离心管中, 加无水乙醇10 mL, 冷藏24 h, 4000 r/min离心20 min, 弃去上清液, 沉淀用80%乙醇洗涤两次, 每次8 mL, 离心弃去, 沉淀再用80℃水溶解, 定容于100 mL容量瓶^[5], 即得。

2.1.4 测定方法

取上述样品溶液1份, 按照单因素实验确定加样量为0.5 mL, 取各产地待测液0.5 mL, 照2.1.1项下的方法测定吸光度, 计算多糖含量。

2.2 有机酸

2.2.1 测定方法

取2.1.3项下处理的半夏粉末约5 g, 精密称重, 加95%乙醇50 mL, 回流提取1 h, 同法再提取2次, 滤液合并, 回收乙醇。残渣精密加入NaOH滴定液(0.1 mol/L) 10 mL, 超声(功率500W, 频率40KHz) 30 min, 转移至50 mL容量瓶, 用新沸过的冷水定容, 精密量取25 mL, 照2015版《中国药典》附录

VIIIA法测定,用HCl滴定液(0.1 mol/L)滴定,水为空白试剂做校正^[6],记录数据,计算滴定液体积,每1 mL NaOH相当于琥珀酸5.904 mg。滴定液体积计算公式如下:

$$V_e = \frac{10^{\Delta E/S} - 1}{V_1 \times 10^{\Delta E/S} - V_2} \times V_1 V_2 \quad (1)$$

V_e : 电位滴定计量点体积; V_1, V_2 : 所选两点消耗滴定液体积;
 ΔE : 两点电位差; S : 电极响应斜率

2.2.2 稳定性测定

取同一产地半夏生品,依上述方法,间隔2 h测定一次,共6次。结果表明,供试液在10 h内,总有机酸含量稳定(RSD = 2.02%)。

2.2.3 重复性测定

取两个产地半夏生品,分别制取6份样品溶液,依上述方法测定,RSD分别为2.96%和2.35%,表明方法重复性好。

2.3 蛋白质

2.3.1 对照溶液制备

精密称取牛血清蛋白10.1 mg,纯化水定容至100 mL,4℃保存待用。

2.3.2 考马斯亮蓝G250溶液配制

精密称取60 mg考马斯亮蓝G250,用95%乙醇50 mL溶解,加入85% H_3PO_4 于1 L棕色容量瓶中定容,即得^[7]。

2.3.3 标准曲线制备

取上述对照溶液0.1、0.25、0.4、0.55、0.7、0.85、1.0 mL至具塞试管中,加水补足至1.0 mL,加入考马斯亮蓝G250溶液4.0 mL,混匀,5 min后进行波长扫描,确定 λ_{max} = 595 nm,在此波长条件下测定各对照溶液吸光度,建立标准曲线方程为: $y = 0.003x + 0.0389$ ($R^2 = 0.9931$, 浓度单位: $\mu g/mL$)。

2.3.4 样品溶液制备

精密称取2.1.3项下半夏粉末0.75 g,研钵中加1%NaOH溶液10 mL,研磨成匀浆,用1%NaOH溶液定容至50 mL,超声30 min,加水补足至50 mL。取10 mL在5000 r/min条件下离心20 min,上清液即为供试溶液^[8]。

2.3.5 测定方法

取样品溶液各0.1 mL,加纯化水补足至1.0 mL,依2.3.3项下方法测定吸光度,计算,即得。

2.4 氨基酸

2.4.1 对照溶液制备

精密称取缬氨酸12.9 mg,纯化水定容至100 mL。

2.4.2 缓冲溶液制备

取0.2 mol/L磷酸二氢钾溶液250 mL及0.2 mol/L氢氧化钠溶液,用水定容至1.0 L,即得。

2.4.3 标准曲线制备

取上述对照溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL至25 mL容量瓶,加0.2%茚三酮溶液及上述缓冲溶液各1.0 mL,沸水浴加热15 min,后室温下冷却15 min,加水至刻度。进行波长扫描,确定 λ_{max} = 569 nm,在此波长条件下测定各对照溶液吸光度,建立标准曲线方程为: $y = 0.0083x + 0.0014$ ($R^2 = 0.9984$, 浓度单位: $\mu g/mL$)。

2.4.4 样品溶液制备

精密称取2.1.3项下半夏粉末1.0 g,加50%乙醇50 mL,超声30 min,过滤,重复2次,提取液合并,回收乙醇,于50 mL容量瓶中加水定容^[10]。

2.4.5 测定方法

取样品溶液各1.5 mL,依2.4.3项下方法测定吸光度,计算,即得。

2.5 生物碱

2.5.1 麝香草酚蓝标准液的制备

精密称取麝香草酚蓝0.1 g,加0.05 mol/L氢氧化钠3.2 mL溶解,加水稀释至200 mL。

2.5.2 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的制备

量取0.1 mol/L柠檬酸38 mL及0.1 mol/L柠檬酸钠162 mL,混合后定容至1.0 L。

2.5.3 对照溶液制备

精密称取盐酸麻黄碱5.1 mg,纯化水定容至50 mL。取1.0、2.5、4.0、5.5、7.0、8.5、10.0 mL于分液漏斗中,加水至10 mL,加20 mL柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH = 6.0),20 mL三氯甲烷,2.5 mL麝香草酚蓝标准液,振摇萃取,静止30 min,分取三氯甲烷层,同法三氯甲烷再萃取2次,合并三氯甲烷液,浓缩并定容至25 mL^[11]。

2.5.4 标准曲线制备

取上述对照溶液,在300~500 nm进行波长扫描,确定 λ_{max} = 417 nm,此波长下测定上述溶液得标准曲线方程 $y = 0.0081x - 0.012$ ($R^2 = 0.9974$, 浓度单位: $\mu g/mL$)。

2.5.5 样品溶液制备

精密称取2.1.3项下半夏粉末1.0 g,加入1.0 mL

浓氨水浸润药材，加入三氯甲烷20 mL，浸渍过夜后超声提取30 min，过滤，药渣用20 mL三氯甲烷分3次洗涤，合并，蒸干溶剂，残渣再加20 mL三氯甲烷使其溶解并转移至分液漏斗，依据2.4.3项下的方法制备样品溶液^[12]。

2.5.6 测定方法

对上述样品溶液在波长417 nm下测定吸光度，

计算生物碱含量。

3 结果与分析

3.1 半夏中五类有效成分的测定结果

安徽及全国主产区半夏每个产地两批，共16批，测定各类成分含量，列表如下。

表1 安徽及全国主产区半夏各类成分含量

Table 1 Contents of various components of Pinellia ternata in Anhui and China's main production areas						
编号	产地	多糖 (%)	有机酸 (%)	氨基酸 (%)	蛋白质 (%)	生物碱 (%)
S1	安徽贵池 (野生)	17.76	0.584	1.51	5.00	0.0589
S2	安徽贵池 (野生)	18.52	0.568	1.47	6.20	0.0612
S3	安徽舒城 (栽培)	28.28	0.462	0.80	4.49	0.0398
S4	安徽舒城 (栽培)	27.21	0.452	0.57	4.84	0.0408
S5	安徽阜阳 (栽培)	20.06	0.478	0.78	4.02	0.0402
S6	安徽阜阳 (栽培)	26.01	0.484	0.67	4.38	0.0415
S7	甘肃天水 (野生)	25.60	0.510	0.58	4.84	0.0249
S8	甘肃天水 (野生)	26.01	0.501	0.56	4.91	0.0261
S9	甘肃西和 (栽培)	45.38	0.369	0.43	4.86	0.0148
S10	甘肃西和 (栽培)	43.28	0.351	0.42	5.18	0.0160
S11	河北安国 (栽培)	28.93	0.509	1.42	5.80	0.0267
S12	河北安国 (栽培)	28.69	0.520	1.50	5.94	0.0273
S13	贵州盘县 (野生)	28.02	0.479	1.14	4.82	0.0443
S14	贵州盘县 (野生)	27.78	0.492	1.16	5.02	0.0459
S15	湖北荆门 (野生)	30.86	0.489	1.03	3.67	0.0415
S16	湖北荆门 (野生)	30.35	0.506	1.04	3.91	0.0430

3.2 半夏药材质量分析

3.2.1 主成分分析

将16批半夏药材多糖、有机酸、氨基酸、蛋白质、生物碱含量数据录入EXCEL，导入SIMCA-P (11.5版)软件，以半夏5种成分的含量为变量进行二维主成分分析，结果见图1所示。

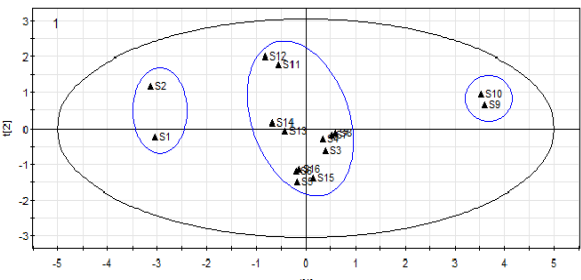


图1 半夏5种成分PCA分析1.M1(PCA-X) t[Comp.1]/t[Comp.2]

Fig.1 PCA Analysis used for five kinds of ingredients of Pinellia ternata 1.M1(PCA-X) t[Comp.1]/t[Comp.2]

由图1可见，16批半夏样品区分明显，样品S1、S2位于第一主成分负值象限，S9、S10位于第一主成分和第二主成分正值象限区域，其余样品则分布在第一主成分和第二主成分正负值区域。由表1可

以看出，样品S9、S10偏离其他样品较远，与多糖含量明显偏高、氨基酸和生物碱含量明显偏低有关；样品S1、S2偏离其他样品，与多糖含量明显偏低、蛋白质和氨基酸含量明显偏高有关。

继续深入分析，发现缩小象限范围S11、S12位于第一主成分[-1~0]与第二主成分[-1.5~2]象限区域，偏离S3、S4、S5、S6、S7、S8、S13、S14、S15、S16所处的第一主成分[-1~1]与第二主成分[1.5~2]象限区域，尤其是在第二主成分象限范围区分明显，与其蛋白质含量偏高有关系。若按产地分析，不同产地半夏药材未能有效区分，因此若以5类成分总含量为数据源，半夏药材内在质量与产地可能关联度不强，其原因可能是在样品采集时间、处理方式等方面因素未能考虑。

3.2.2 聚类分析

为进一步分析16批不同产地半夏药材内在质量彼此疏远关系、进一步验证主成分分析结果，以16批半夏样品5类成分含量为变量，EXCEL数据导入Origin (8.0版)软件，进行数据标准化处理、选择欧式距离进行系统聚类分析，结果见图2所示。

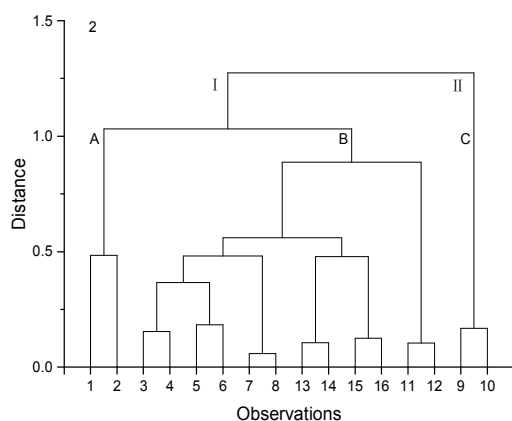


图2 半夏5种成分聚类分析

Fig.2 Cluster analysis used for five kinds of ingredients of *Pinellia ternata*

由图2聚类分析结果可见：16批不同产地半夏样品在欧式距离约1.25附近时被分为 I、II 大类，S9、S10被单独聚为 II 大类，其余样品聚为 I 大类，反映出S9、S10号样品明显偏离其他样品，与图1主成分分析结果保持一致；继续缩小欧式距离在1附近时，16批半夏药材被聚为A、B、C三类，I 大类又被分为A、B两大类，A类包含S1、S2号半夏样品，B类包括S3、S4、S5、S6、S7、S8、S13、S14、S15、S16号样品，C类包括S9、S10，结果与主成分分析保持一致；若继续缩小欧式距离B类中S11、S12号半夏药材被聚集在一起，其结果与主成分分析保持了高度一致，因此主成分分析结果与聚类分析结果互相验证，得到很好的解释，反应了不同产地半夏药材内在质量的疏远关系。

4 讨论

从表中可以看出各产地半夏总有机酸和总蛋白含量差异不明显，作为药典检测的指标性成分总有机酸，均符合2015版《中国药典》“半夏药材”中所规定的不低于0.25%。但多糖、氨基酸、生物碱差异较大，特别是作为常见生物活性成分的氨基酸和生物碱的差异较大，显示各产地半夏质量存在显著差别，特别是生物碱的含量，最低和最高含量差异达到4倍，故有必要对各产地半夏中所含生物碱的组成及各具体成分含量做进一步考察。而皖产半夏中贵池所产野生半夏的总有机酸、氨基酸及生物碱含量均高于其他产地，蛋白质含量也位于前列，作为优质种质资源有着极大的开发前景。

传统中药由于所含成分类型多、化学成分复

杂，且受采收期、炮制加工方法等方面^[13]的影响而增加了其质量控制难度。随着分析技术的日益发展，从传统中药中测定到更多成分的含量信息变得越来越容易，但对于复杂含量数据信息如何进行有效分析处理得到药物研究人员所需信息显得尤为重要。主成分分析和聚类分析作为化学识别模式的主要方法，在传统中药真假鉴别、种属产地分类、质量控制等领域得到较广的应用。

本研究采用不同分析方法测定半夏药材中五种类别成分含量，得到不同来源半夏药材的多变量数据，利用主成分分析和聚类分析将不同来源半夏药材明显区分，且两种分析方法所得结果互相验证，很好地解释了安徽产半夏与其他产地半夏药材质量差异和疏远关系。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005: 119-120.
- [2] 刘亚平,邢素芳. 半夏的药理作用研究[J].基层医学论坛,2014,18(32):4446-4447.
- [3] 石青,赵宝林. 半夏的本草考证[J].陕西中医学院学报,2013,36(2):90-92.
- [4] 廖永丽,陈景斯,郭华敏,等. 不同产地油茶果壳多糖含量的研究[J].广州药科大学学报,2017,33(5): 269-272.
- [5] 黄丽,文凤娟,李佳琼,等. 铁皮石斛多糖提取工艺及优化研究[J].云南农业大学学报,2017,32(5): 884-888.
- [6] 陈韵,朱国胜,郭巧生,等. 光质对半夏生长及药材品质的影响[J].中国中药杂志,2013,38(24):4257-4262.
- [7] 杨静,白冰,王宁,等. 考马斯亮蓝法对烟草薄片涂布液中蛋白质含量的测定[J].湖北农业科学,2017,56(3): 946-950.
- [8] 杨红兵,石磊. 半夏蛋白质提取方法研究[J].中药材,2010,33(10):1647-1649.
- [9] 于双慧,朱梦露,甄绮雯,等. 西黄丸中氨基酸含量测定方法研究[J].亚太传统医药,2016,12(14):46-48.
- [10] 曹玮娟,杨竹雅,梁晓原. 紫外可见分光光度法测定山珠半夏中总有机氨基酸含量[J].云南中医学院学报,2010,33(1):41-45.
- [11] 陈洪群,吴立明. 唐半夏栽培品总生物碱含量测定[J].国医论坛,2013,28(4):52-53.
- [12] 张浩波,陈晖,麻文霞,等. 浅析对半夏使用硫磺进行熏制的时间对半夏总生物碱含量的影响[J].当代医药论丛,2015,4(13):126-127.
- [13] 宋玉鹏,陈海芳,谭舒舒,等. 不同采收期江枳壳中柚皮素和橙皮素 HPLC 含量测定[J].井冈山大学学报:自然科学版,2017,38(1):83-87.