

气相指纹图谱结合化学计量学分析在中药鉴别中的应用—以 3 种乳香为例

于新兰¹, 李革¹, 孙磊^{1,2*} (1. 新疆维吾尔自治区食品药品检验所, 乌鲁木齐 830004; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立乳香的气相色谱指纹图谱结合化学计量学分析的方法用于 3 种乳香的鉴别。方法: 样品经甲醇超声提取, 用 HP-5MS 毛细管柱采用程序升温的模式进行分离, 以 FID 检测器检测, 记录色谱图, 并使用 ChemPattern 软件进行二维聚类分析、主成分分析、相似度分析和模式识别研究。结果: 索马里乳香、埃塞俄比亚乳香和印度乳香分别有 12、18 和 25 个共有峰。指纹图谱采用二维聚类分析和主成分分析, 可区分 3 种乳香。以 23 批埃塞俄比亚乳香作为共有模式, 3 种乳香的相似度均大于 0.80, 其中所有埃塞俄比亚乳香的相似度均大于 0.97。并进一步选择了 kNN 算法用于模式识别。结论: 本方法准确、专属性强、重现性好, 可用于乳香的鉴别。

关键词: 指纹图谱; 化学计量学; 气相色谱; 乳香

中图分类号: R917; R931.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)04-0460-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.04.016

Application of Gas Chromatographic Fingerprint Combined with Chemometrics Analysis in Identification of Traditional Chinese Medicine Taking Three Kinds of Frankincense as Chemometrics

Yu Xinlan¹, Li Ge¹, Sun Lei^{1,2*} (1. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute for Food and Drug Control, Urumqi 830004, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish a gas chromatographic fingerprint combined with chemometrics analysis for the identification of three kinds of frankincense. **Methods:** The samples were ultrasonically extracted by methanol, separated on the HP-5MS capillary column by a pattern of programmed temperature, and detected by a FID detector. The chromatograms were recorded and 2D cluster analysis, principal component analysis, similarity analysis and pattern recognition study were carried out by using ChemPattern software. **Results:** There were 12, 18 and 25 common peaks in the chromatograms of Somalis frankincense, Ethiopian frankincense and Indian frankincense respectively. The three kinds of frankincense could be distinguished by 2D cluster analysis and principal component analysis. The similarities of three different kinds of frankincense were greater than 0.80 with the use of 23 batches of Ethiopian frankincense as the common pattern, and the similarities of all Ethiopian frankincense were greater than 0.97. Furthermore, k-nearest neighbor (KNN) algorithm was used for pattern

基金项目: 国家食药总局进口药材标准增修订专项 (编号 JKYC2012-14)

作者简介: 于新兰; 研究方向: 中药、民族药质量控制及有害残留物分析; Tel: (0991) 2816490; E-mail: xjyxl-nv@163.com

通信作者: 孙磊, 硕士; 研究方向: 主要从事中药、天然药质量控制及有害残留物分析; Tel: (0991) 2815067; E-mail: dasunlei@sina.cn

recognition. **Conclusion:** The method is accurate and shows good specificity and reproducibility, so it can be used for identification of frankincense.

Keywords: fingerprint; chemometrics; gas chromatography; frankincense

对中药进行准确地鉴别是中药检验和科研中一项重要的工作,常用的方法有性状和显微鉴别法、薄层鉴别法、气相色谱和高效液相色谱法等;近年来,又逐步将化学计量学分析法引入了中药鉴别,极大地提高了鉴别的准确性和客观性。

乳香为树脂类药材,用于活血、定痛、消肿生肌^[1],我国常用品为埃塞俄比亚乳香[*Boswellia papyrifera* (Del.) Hochst.]和索马里乳香(原植物 *B. sacra* Flück.)^[1-2],欧洲、美国和印度等国家常用品为印度乳香(原植物 *B. serrata* Roxb.)^[3-5]。它的鉴别方法有传统的性状、显微法,但由于3种乳香外观等较接近,专属性不强^[6]。采用气相色谱法以蒎烯及己酸辛酯作为指标鉴别索马里乳香和埃塞俄比亚乳香^[1,7]存在一定的误判率。此外,还有薄层色谱^[6,8]及高效液相色谱^[6]鉴别法,有较准确的鉴别结果,但判定存在一定的主观性。采用液相色谱指纹图谱、化学计量学的方法具有检测指标多、判定客观和结果准确的优点^[9-10]。但目前尚无关注挥发性成分的气相色谱结合化学计量学鉴别法的报道。本研究在收集了3种乳香34批样品的基础上,建立了可区分不同种乳香的气相色谱指纹图谱化学计量学方法,并进一步进行了模式识别研究^[11],为乳香的基原鉴别提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent7890A气相色谱仪(FID检测器,美国Agilent公司);HP-5MS毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm, Agilent);ChemPattern先进化学计量学系统解决方案软件[科迈恩(北京)科技有限公司]。

乳香药材经新疆食品药品检验所孙磊副研究员鉴定,为乳香树 *B. sacra* Flück.、纸乳香树 *B. papyrifera* (Del.) Hochst.和齿叶乳香树 *B. serrata* Roxb.的树脂,详见表1;甲醇(分析纯,北京化工厂);水由Milli-Q系统(美国Millipore公司)制备。

表1 乳香样品信息

样品序号	原植物	产地
1 ~ 8	<i>B. sacra</i>	索马里
9 ~ 31	<i>B. papyrifera</i>	埃塞俄比亚
32 ~ 34	<i>B. serrata</i>	印度

1.2 色谱条件

程序升温:80℃保持3 min,以10℃·min⁻¹速率升至220℃,保持5 min,再以10℃·min⁻¹速率升至250℃,保持5 min,再以10℃·min⁻¹速率升至300℃,保持1 min;进样口温度250℃;检测器温度250℃;载气流速为1.0 mL·min⁻¹(恒流模式);分流比10:1。进样量1 μL。

1.3 供试品溶液^[9]

乳香粉碎,取粉末约0.1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加25 mL甲醇,超声(功率200 W,频率50 kHz)30 min,滤过,取续滤液,即得。

1.4 化学计量学分析

将仪器采集的数据用ANDI格式导出,再导入ChemPattern,对色谱峰进行积分,对峰面积数据进行标准化预处理,再进行夹角余弦相似度、二维聚类和主成分分析。

2 结果与讨论

2.1 方法学验证

1) 精密度:取样品1份,制备供试品溶液,连续进样6次,所有共有峰保留时间的RSD小于3%,百分峰面积大于2%的共有峰相对峰面积的RSD小于3%。

2) 稳定性:取精密度项下供试品溶液,分别在0、3、6、9、12、24 h进样,所有共有峰的保留时间的RSD小于3%,百分峰面积大于2%的共有峰相对峰面积的RSD小于3%。

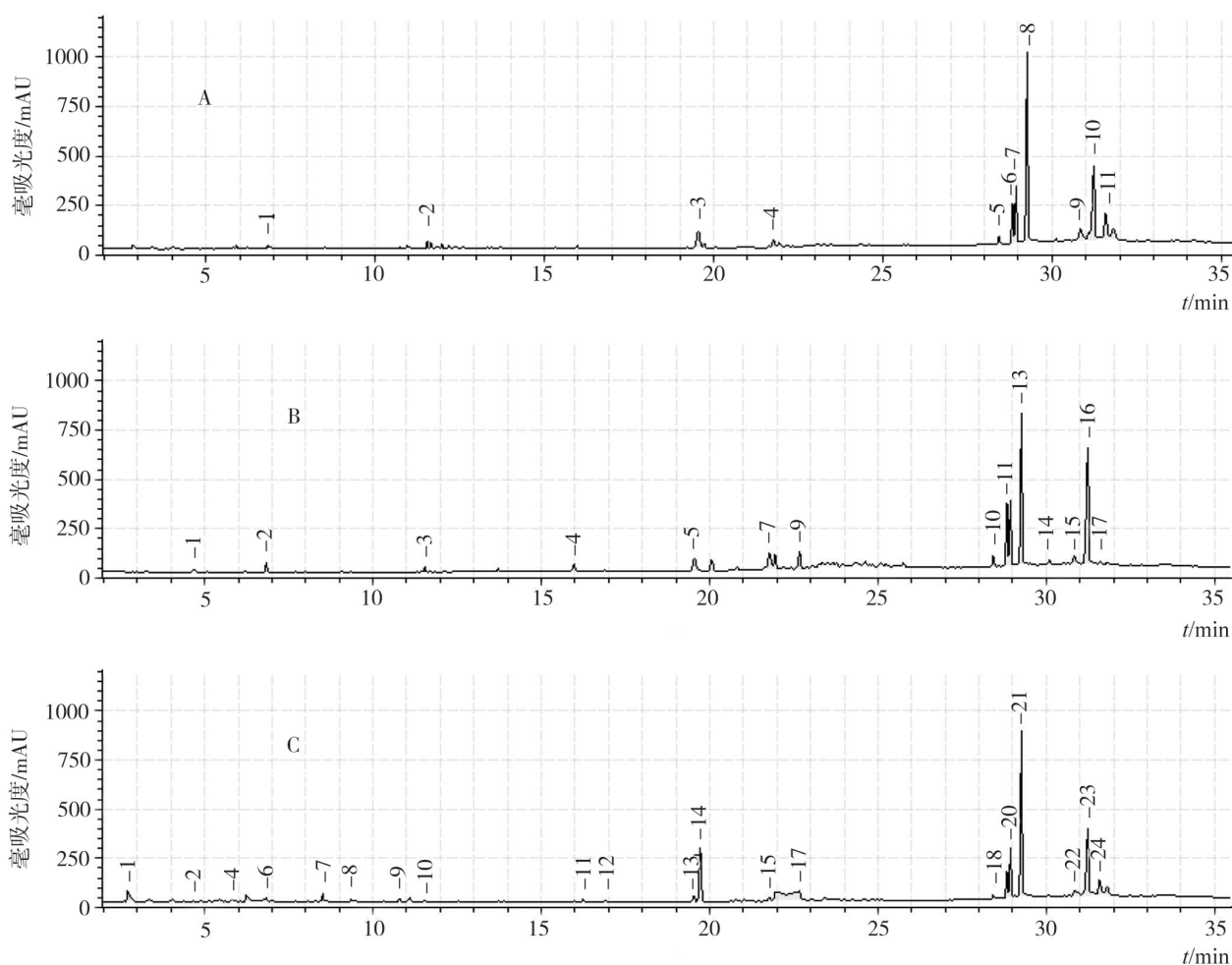
3) 重复性:取样品6份,制备供试品溶液,进样,各共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD均小于3%。

2.2 化学计量学鉴别

2.2.1 共有模式

图1为索马里乳香、埃塞俄比亚乳香和印度乳香的指纹图谱共有模式。该共有模式以该种乳香的所有样品作为代表性样品,以各样品图谱中出现频率为100%的色谱峰作为特征峰,以各样品相应色谱峰峰面积的平均值作为特征峰峰面积。由图可见,3种乳香的共有模式存在一定的差异。其中,索马里乳香有12个特征峰,较大的峰有6#、7#、8#、10#和11#;埃塞俄比亚乳香有18个特征峰,较

大的峰有11#(对应索马里乳香的6#)、12#(索马里乳香7#)、13#(索马里乳香8#)和16#(索马里乳香10#);印度乳香有25个特征峰,较大的峰有14#、19#(对应索马里乳香的6#)、20#(索马里乳香7#)、21#(索马里乳香8#)和23#(索马里乳香10#)。3种乳香的共有模式的特征峰数目不一致,但较大的色谱峰的保留时间、峰面积以及图谱的整体轮廓有些类似,仅凭图谱的直观比较进行判断存在一定的困难和错误率,因此,采用化学计量学分析法进行鉴别。



A. 索马里乳香; B. 埃塞俄比亚乳香; C. 印度乳香。

图1 3种乳香共有模式色谱图

2.2.2 二维聚类分析

首先采用二维聚类分析(以街区距离计算距离,连接方法为远邻法)进行3种乳香的鉴别,结果见图2。其中,参与计算的变量对应埃塞俄比亚乳香共有模式的特征峰,横向对样品进行聚类,纵

向对特征峰进行聚类,热图颜色代表归一化百分比峰面积。由图可见所有埃塞俄比亚乳香聚为一类,相互距离也较小;所有索马里乳香聚为一类,相互间的距离稍大;印度乳香基本聚为一类,但32号样品与索马里有些接近;索马里乳香和印度乳香聚为

一类，表明两者的气相色谱成分较为相近。色谱峰聚类表明，1~10、14和15号峰聚为一类，因为它们在3种乳香中的峰面积都较小且区别不甚明显。而其余色谱峰在不同种乳香中存在一定差异，是对3种乳香进行鉴别的强特征峰。由热图可见埃塞俄

比亚乳香与另两种乳香的主要区别在于17、18号峰很小而16号峰较大。上述结果表明，采用二维聚类分析可以准确地区分3种乳香，并有助于识别强特征峰并归纳出这些特征峰的模式差异。

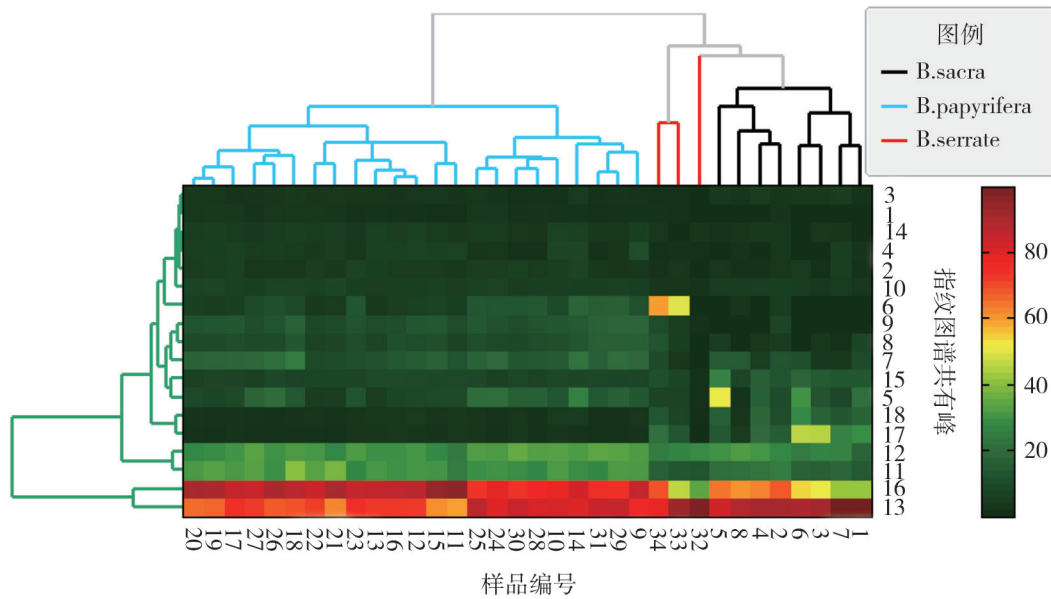


图2 二维聚类分析结果图

2.2.3 主成分分析

进一步采用了主成分分析法对上述数据进行分析，参与计算的变量与二维聚类分析一致，结果见图3。图3左为三维结果，右图为二维显示结果，

两图表明，3种乳香分布在不同的主成分空间位置，可以较好地进行了区分。其中，埃塞俄比亚乳香更为集中，索马里乳香和印度乳香较为分散，以上结论与二维聚类分析结果基本一致。

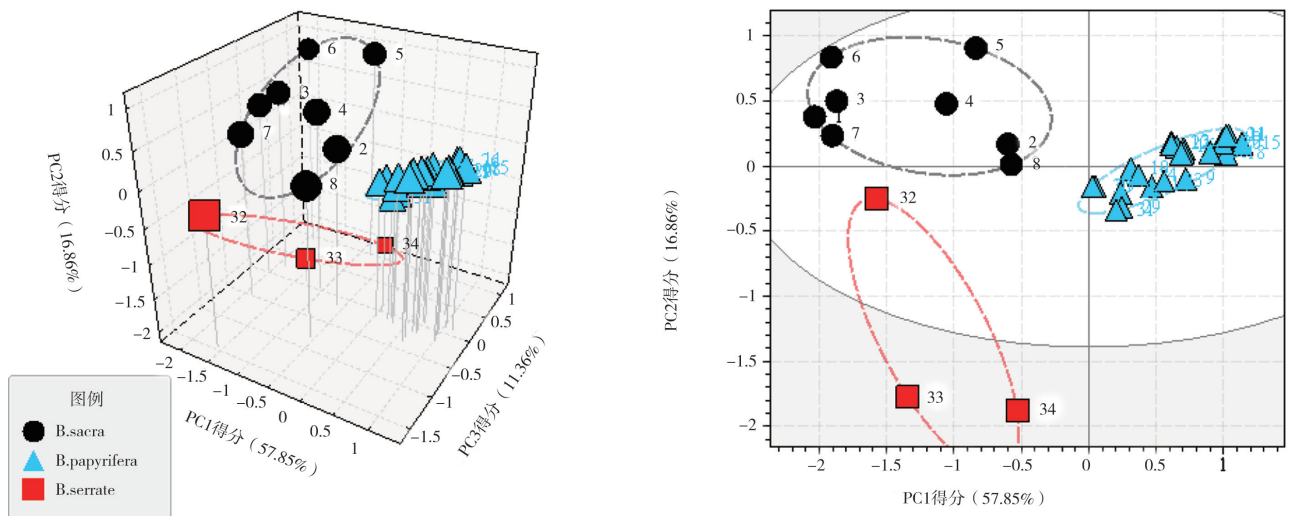


图3 主成分分析结果图

2.2.4 相似度分析

二维聚类分析和主成分分析可以找出3种乳香的差异并加以区分。而夹角余弦相似度主要用来评价样品间的相似程度,并给出量化结果。此处以埃塞俄比亚乳香的共有模式作为参照,计算所有乳香样品的相似度,结果见图4。由图可见,埃塞俄比亚乳香的相似度均大于0.97,表明这些样品高度相似,这与上述两种分析结果基本一致;印度乳

香的相似度为0.84~0.88;索马里乳香的相似度为0.84~0.97,种内样品间的差异较大,这也跟上述两种分析结果基本一致。上述结果表明3种乳香虽然存在一定的差异,但整体上也较为类似,这或许是3种乳香均作药用的一个可能的佐证。此外,可以发现索马里乳香似为另两种乳香的过渡种,这一结论与文献^[9]基本一致。

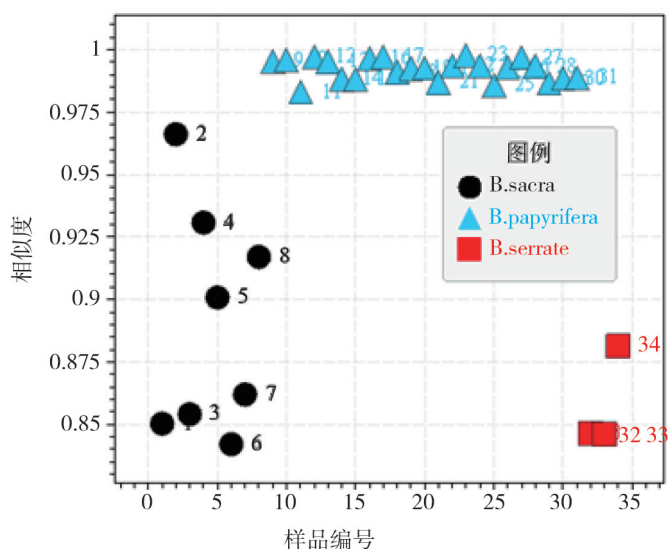


图4 相似度分析结果图

2.2.5 模式识别

聚类分析和主成分分析并不能直接给出确切的样品鉴别结果,为此笔者进一步进行了模式识别研究。将所有样品作为测试集,并分为埃塞俄比亚、索马里和印度3组,分别采用k重法和留一法

进行交叉验证,对k近邻法(kNN)和偏最小二乘判别(PLS-DA)的识别效果进行比较,见表2。结果表明以现有的样品作为模型集,kNN法最佳,识别率达到97%,并且误识率为3%。未来将收集更多的乳香样品,以丰富数据集,进一步提高预测精度。

表2 模式识别分类器的比较

模式识别算法	模型参数	交叉验证	拒识率 /%	误识率 /%	识别率 /%
K 最近邻法 (kNN)	k=2	k 重, k=7	2.94	2.94	97.06
		留 1	2.94	2.94	97.06
偏最小二乘判别 (PLS-DA)	LV=8	k 重, k=7	5.88	5.88	94.12
		留 1	2.94	2.94	97.06

3 结论

药材的基原鉴别是中药检验的首要工作。对乳香来说,目前的《中国药典》《美国药典》《欧洲药典》以及《印度药典》的鉴别方法均不能对3种乳香进行准确的鉴别。本研究收集了3种乳

香样品,通过数据统计分析建立了一种使用化学计量学分析和模式识别的气相色谱鉴别法。该法准确、专属、重现性好,可用于3种药用乳香的鉴别,为挥发性中药的鉴别提供了一种新的思路。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社. 2015：223.
- [2] 孙磊，徐纪民，金红宇，等. 乳香基原的本草学、植物学和成分分析研究[J]. 中国中药杂志，2011，36（2）：112-116.
- [3] EP8. 0[S]. 2013:1276.
- [4] USP36[S]. 2013:2015.
- [5] IP2010[S]. 2010:2515-2516.
- [6] 王赵，孙磊，康帅，等. 乳香基原研究（II）：性状、显微、TLC和HPLC鉴别技术分析三种乳香[J]. 中药材，2014，37（6）：981-984.
- [7] 石上梅，田金改，王宝琴. 进口乳香药材的检测方法研究[J]. 中国中药杂志，2002，27（3）：170-173.
- [8] Paul M, Br ü ning G, Bergmann J, et al. A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera*, and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*) [J]. *Phytochemical Analysis*, 2012, 23（2）：184-189.
- [9] 孙磊，张超，田润涛，等. 色谱指纹图谱结合化学计量学用于3种乳香的鉴别和质量评价[J]. 中国药学杂志，2015，50（2）：140-146.
- [10] Chao Z, Lei S, Tian R, et al. Combination of Quantitative Analysis and Chemometric Analysis for the Quality Evaluation of Three Different Frankincenses by Ultra High Performance Liquid Chromatography and Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2015, 38（19）：48181-48186.
- [11] 张玲，李朋玲，华永丽，等. 黄芩和红芩的红外光谱法结合化学计量学方法鉴别[J]. 时珍国医国药，2015（7）：1657-1659.

（修回日期 2018年9月17日 编辑 范玉明）