

补骨脂炮制前后纳入复方二神丸的提取物 HPLC 指纹图谱的建立及多种模式识别分析

熊 瑞¹, 李艺丹¹, 张婷婷¹, 郑凯旋¹, 连雨玫¹, 李文兵², 胡昌江^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 四川 成都 610081

摘要: 目的 建立补骨脂炮制前后分别纳入复方二神丸的石油醚提取物的 HPLC 指纹图谱, 初步建立炮制前后二神丸提取物的化学模式识别方法, 为其内在质量的控制提供参考。方法 采用 HPLC 法, 以思普乐 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 0.01% 甲酸水溶液和甲醇-乙腈 (1:1) 为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL, 分别建立炮制前后二神丸的提取物指纹图谱, 并且采用指纹图谱相似度评价, 结合聚类分析和主成分分析 (PCA) 进行化学模式识别研究。结果 分别建立了炮制前后二神丸提取物的 HPLC 指纹图谱, 各色谱峰分离较好, 标定了 20 批次提取物的 28 个共有峰, 明确了其中 6 个成分 (补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚、去氢二异丁香酚); 10 批炮制前、后提取物分别与对照图谱比较, 相似度均大于 0.9; PCA 和聚类分析可将 20 批提取物很好地分为炮制前和炮制后 2 类, 且分类结果一致, 同时 PCA 结果提示了一些可区别炮制前后二神丸的指纹图谱特征性的色谱峰。结论 该方法稳定、可靠, 为炮制前后二神丸提取物的质量控制提供了方法依据, 同时结合化学模式识别研究可有助于炮制前后二神丸提取物整体质量控制及质量评价。

关键词: 补骨脂; 二神丸; 炮制; 指纹图谱; 化学模式识别; 补骨脂素; 异补骨脂素; 补骨脂酚; 甲基丁香酚; 甲基异丁香酚; 去氢二异丁香酚

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)19-3977-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.012

HPLC fingerprint and analysis of Ershen Pills extract containing *Psoraleae Fructus* before and after processing based on variety of chemical pattern recognition

XIONG Rui¹, LI Yi-dan¹, ZHANG Ting-ting¹, ZHENG Kai-xuan¹, LIAN Yu-mei¹, LI Wen-bing², HU Chang-jiang^{1,2}

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Sichuan Neo-Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Chengdu 610081, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Ershen Pills extracted with petroleum ether, which contains *Psoraleae Fructus* (PF) before and after processing, and initially set up the pattern recognition technique of the extract, so as to provide reference for quality control. **Methods** HPLC was used, and the separation was performed at 30 °C on an Spolar Hplc Packed C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Gradient elution was performed with the mobile phases of methanol-acetonitrile (1:1) and water containing 0.1% formic acid. The flow rate was 1 mL/min, and sample size was 10 μL. The UV detection wavelength was set at 210 nm. Furthermore, the fingerprint was analyzed by similarity analysis, as well as pattern recognition technique, including hierarchical clustering analysis and principal component analysis. **Results** The fingerprints were established respectively consisting of 28 common peaks well separated. There into, six compounds were identified (psoralen, isopsoralen, methyleugenol, methylisoeugenol,

收稿日期: 2017-04-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81274035); 国家基础科学人才培养基金项目 (J13100340-17)

作者简介: 熊 瑞 (1991—), 女, 重庆人, 在读博士研究生, 主要从事中药学和中药炮制原理的研究。

Tel: 15281090514 E-mail: 342296918@qq.com

*通信作者 胡昌江 (1952—), 男, 四川成都人, 教授, 博士研究生导师, 学士学位, 主要从事中药炮制学的教学和科研工作。

E-mail: hhccjj@hotmail.com

dehydrodiisoeugenol, and backuchiol). Compared with the reference spectrum, the similarity degrees were greater than 0.9. When dealing with principal component analysis, the samples were well divided into two categories, which was consistent with the principal component analysis. Meanwhile, the results of principal component analysis prompted some chromatographic peaks which could be used to distinguish between two species. **Conclusion** The method is stable and reliable, which can be used for quality control of Ershen Pills extracted with petroleum ether. Meanwhile, it is contributing to the entire quality control and quality evaluation when combined with chemical pattern recognition.

Key words: *Psoraleae Fructus*; Ershen Pills; processing; fingerprint; chemical pattern recognition; psoralen; isopsoralen; backuchiol; methyleugenol; methylisoeugenol; dehydrodiisoeugenol

二神丸,出自宋·许叔微的《普济本事方》,是临床治疗脾肾阳虚而致五更泄泻的基础方,具有温肾暖脾、涩肠止泻的功效^[1],由补骨脂和肉豆蔻组成。补骨脂的传统炮制理论,最早见于《雷公炮炙论》^[2],目前在临床上最为常用的为盐炙品,按照传统的中药炮制理论,补骨脂盐炙可以引药入肾,增强温补脾肾作用,缓和辛窜温燥之性^[3]。但目前关于补骨脂的炮制理论研究仅局限于单味药材,已报道的化学成分研究认为单味药材补骨脂盐炙前、后变化的成分主要是香豆素类和黄酮类成分^[4-7],认为这些成分的改变可能是造成生、熟饮片临床功效产生差异的主要原因。但中医临床功效的发挥是以复方为载体,将生、熟饮片纳入复方进行研究更符合中医临床用药的特点。目前,补骨脂盐炙前、后在复方中的化学成分变化、药效变化机制研究并不多见,因此有必要将补骨脂纳入复方中进行炮制机制研究,以求更全面、更系统地揭示其炮制机制。课题组前期筛选出了二神丸的止泻的有效部位是石油醚部位^[8],并通过药理实验证明了方中药物补骨脂和肉豆蔻分别经过盐炙和煨炙后的有效部位的止泻作用均有所增强^[9-11],这提示了二神丸中药物炮制前后的化学成分的组成或量上发生了一定的改变。为了更加科学地控制二神丸提取物的质量,建立二神丸提取物评价体系是非常必要的。指纹图谱是目前评价中药、中成药及提取物这类含有复杂成分群质量控制的重要手段^[12-15],且随着化学计量学的飞速发展,为评价不同的复杂系统提供了很多有效方法,因此将指纹图谱结合化学模式识别技术应用于中药、中成药及提取物的质量控制的研究中也愈来愈得到关注^[16]。因此,为深入考察补骨脂炮制前、后对二神丸石油醚提取物质量的影响,本实验将炮制前、后的补骨脂分别与煨肉豆蔻组成复方二神丸,采用 HPLC 分别建立炮制前、后二神丸石油醚部位的指纹图谱,并对该部位指纹图谱进行相似度分析、主成分分析(PCA)和聚类分析,对其进行

质量评价和质量控制,也为后期进一步的药理及作用机制研究提供基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括 G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1315B 二极管阵列检测器,安捷伦科技有限公司;AG 285 分析天平,德国梅特勒公司;KQ-300E 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;优普超纯水制造系统,四川优普超纯科技有限公司;真空干燥箱 DZF-6051,上海将任实验设备有限公司。

1.2 试药

甲醇、乙腈,色谱纯, Sigma 公司;甲酸(批号 2015102301)、乙腈(批号 201509250),分析纯,成都市科龙化工试剂厂;对照品补骨脂素、异补骨脂素、甲基丁香酚、去氢二异丁香酚,批号依次为 201416、201313、201403、200301,均由中国食品药品检定研究院提供;对照品甲基异丁香酚,由 Sigma 公司提供,批号 D1369050;对照品补骨脂酚,批号 E-0647,由上海同田生物技术股份有限公司提供;所有对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。流动相用水为超纯水。

1.3 药材来源

补骨脂 *Psoraleae Fructus* 和肉豆蔻 *Myristicae Semen* 均购于成都市荷花池药材市场和各饮片厂,详细信息见表 1,经成都中医药大学药学院炮制教研室胡昌江教授鉴定,分别为豆科补骨脂属植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,肉豆蔻科肉豆蔻属植物肉豆蔻 *Myristica fragrans* Houtt. 的干燥种仁,均符合《中国药典》2015 年版^[17]入药要求。

2 方法与结果

2.1 药材炮制及二神丸提取物的制备

2.1.1 补骨脂盐炙品 取补骨脂药材,加入药材量一半的含盐 2%的食盐水溶液,室温闷润 24 h,于

表 1 10 批补骨脂药材来源

Table 1 Sources of *Psoraleae Fructus*

生品编号	样品来源	炮制品编号
S1	四川禾一天然药业有限公司	P1
S2	成都真龙百信堂药业有限公司	P2
S3	四川省龙发药业有限公司	P3
S4	四川利民中药饮片有限责任公司	P4
S5	成都吉安康药业有限公司	P5
S6	四川固康中药饮片有限责任公司	P6
S7	四川皓博药业有限公司	P7
S8	四川新荷花中药饮片股份有限公司	P8
S9	湖北金贵中药饮片有限公司	P9
S10	四川中庸药业有限公司	P10

150 ℃炒制 10 min 后置于托盘中, 于 30 ℃鼓风烘箱中烘干^[8,10-11]。

2.1.2 肉豆蔻煨炙品 取肉豆蔻生品与麦麸(100:40) 适量同置锅内, 文火加热, 温度控制在 130~150 ℃, 翻炒 20 min, 至麦麸呈焦黄色, 肉豆蔻呈棕褐色^[8,10-11]。

2.1.3 炮制前后二神丸石油醚提取物浸膏制备 分别取 10 个批次补骨脂(或相对应 10 个批次的盐补骨脂)和煨肉豆蔻, 按 2:1(质量比)组方。用 8 倍量 75%乙醇提取 2 次, 第 1 次 1.5 h, 第 2 次 1 h, 滤渣再用水提取 2 次, 第 1 次 1 h, 第 2 次 0.5 h, 合并滤液, 减压回收, 得浸膏。浸膏用硅藻土拌匀后, 用石油醚(60~90 ℃)索氏提取至虹吸管内的有机溶剂呈无色, 将所得的石油醚提取液经减压回收后通过水浴(60 ℃以下)挥发至无醚味, 即得浸膏, 称得浸膏总质量^[9-10]。

各浸膏编号与相应药材生品或炮制品对应, 分别为 S1~S10, P1~P10。

2.2 色谱条件

色谱柱为思普乐 C₁₈ 液相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.01%甲酸水溶液, B 为甲醇-乙腈(1:1), 进行梯度洗脱: 0~40 min, 45%~65% B; 40~70 min, 65%~100% B; 70~80 min, 100% B; 检测波长 210 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL, 分析时间 80 min。

2.3 供试品溶液的制备

分别精密称取“2.1.3”项下制备的浸膏总质量的 2.0%, 溶解于乙腈中, 超声 5 min, 再定容至 10 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取补骨脂素、异补骨脂素、甲基丁香酚、异甲基丁香酚、去氢二异丁香酚、补骨脂酚对照品适量, 并定容至 10 mL 制成储备液。然后分别精密移取适量该 6 种对照品储备液, 配制成混合对照品溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取二神丸提取物浸膏(S1), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下, 连续进样 6 次, 记录色谱图。并以 25 号峰(峰面积最大, 分离较好)为参照, 计算各共有峰中百分含量在 1%以上的色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取二神丸提取物浸膏(S1), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL, 记录色谱图, 以 25 号峰为参照, 计算各共有峰中百分含量在 1%以上的色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 稳定。

2.5.3 重复性试验 取二神丸提取物浸膏(S1)共 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 并在“2.2”项色谱条件下测定, 记录色谱图, 以 25 号峰为参照计算各共有峰中百分含量在 1%以上的色谱峰的相对保留时间和相对峰面积, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2%, 相对峰面积的 RSD 均小于 3%, 重复性良好, 符合指纹图谱分析要求。

2.6 指纹图谱的建立和相似度的评价

中药指纹图谱相似度计算^[18]是将 1 张指纹图谱(所有峰或所有信号点)当作 1 个 n 维向量, 2 张指纹图谱之间的相似度系数指将 2 张指纹图谱所对应的向量进行一定的运算, 以反映指纹图谱之间的共性和个性差异, 主要应用于判定指纹图谱的相似情况。

取 20 批炮制前、后二神丸提取物浸膏, 按“2.3”项下方法制备, 按“2.2”项下色谱条件分别进样 10 μL, 记录色谱图, 将色谱图自动积分后导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”软件进行处理, 分别以 S1 和 P1 为参照图谱, 选择中位数法, 时间窗宽度为 0.2 min, 采用多点校正方法对色谱峰进行谱峰匹配, 匹配结果见图 1、2, 并生成共有模

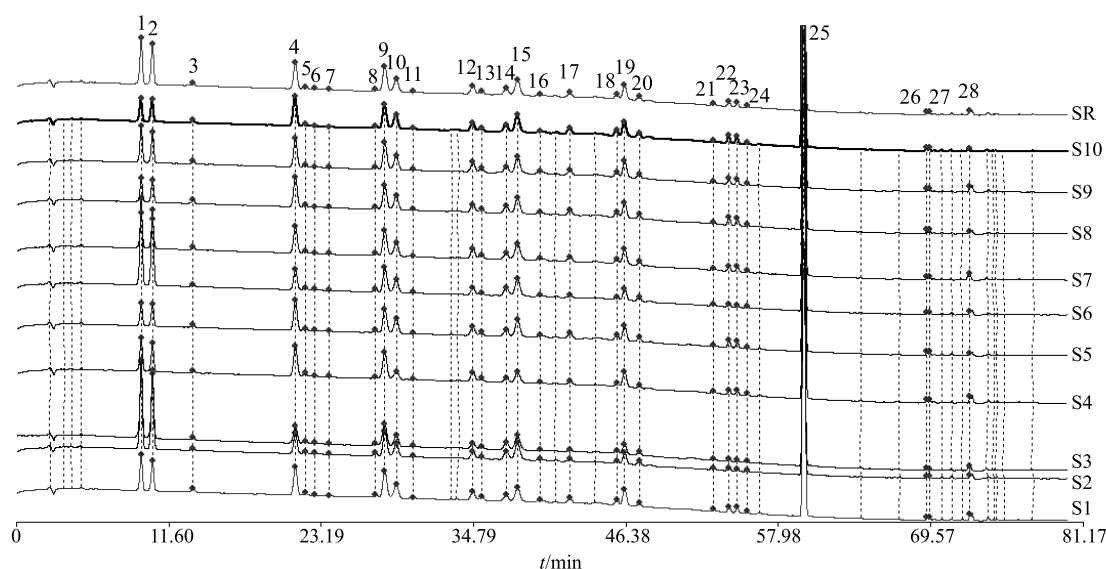


图1 补骨脂炮制前纳入二神丸的10个批次 (S1~S10) 指纹图谱

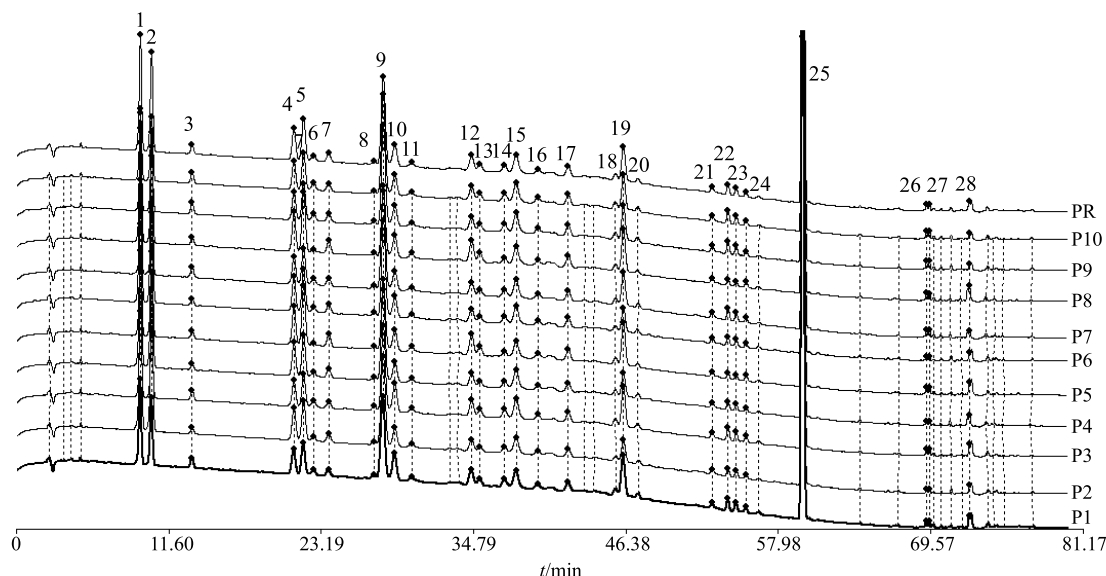
Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of Ershen Pills extract containing crude *Psoraleae Fructus* (S1—S10)

图2 补骨脂炮制后纳入二神丸的10个批次 (P11~P20) 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of Ershen Pills extract containing processing *Psoraleae Fructus* (P11—P20)

式指纹图谱 (R), 共标定了 28 个特征峰 (占总峰面积的 1% 以上), 10 批炮制前、后二神丸石油醚部位的相似度结果见表 2、3, 相似度均大于 0.9, 表明 10 个批次的炮制前、后的石油醚提取物品质均较为一致, 相对稳定。并由混合对照品进行比对, 见图 3, 可知第 1、2、5、7、18、25 号峰分别为补骨脂素、异补骨脂素、甲基丁香酚、甲基异丁香酚、去氢二异丁香酚和补骨脂酚。

另外, 将炮制前提取物和炮制后的提取物生成的共有模式图谱分别导入相似度评价软件中, 计算得相似度达到 97.7%, 显然单独从相似度计算结果

来看, 样品并未体现出炮制前、后提取物的区分及质量差异, 尽管图谱中主要峰群的整体面貌相似, 但各成分含有量的相对比值不同, 因此需要进一步研究。

2.7 化学模式识别分析

2.7.1 PCA PCA 是将多个变量通过线性变换重新组合成一组新的互相无关的几个综合变量, 同时根据实际需要从中取出几个较少的综合变量, 尽可能多地反映原来变量的多元统计分析方法, 是数学上一种降维处理的技术^[19-20]。现主要用于数据预览和样本诊断, 其在中药材的鉴别与质量分析中的应用

表 2 补骨脂炮制前纳入二神丸的 10 个批次指纹图谱相似度结果

Table 2 Similarity evaluation results of HPLC fingerprints of Ershen Pills extract containing crude *Psoraleae Fructus*

样品	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	SR
S1	1.000	0.984	0.962	0.941	0.976	0.975	0.975	0.972	0.986	0.976	0.983
S2	0.984	1.000	0.956	0.944	0.978	0.977	0.977	0.987	0.985	0.976	0.984
S3	0.962	0.956	1.000	0.971	0.949	0.948	0.946	0.941	0.944	0.944	0.955
S4	0.941	0.944	0.971	1.000	0.953	0.954	0.952	0.943	0.926	0.945	0.956
S5	0.976	0.978	0.949	0.953	1.000	0.993	0.996	0.983	0.977	0.978	0.994
S6	0.975	0.977	0.948	0.954	0.993	1.000	0.994	0.983	0.972	0.978	0.992
S7	0.975	0.977	0.946	0.952	0.996	0.994	1.000	0.982	0.980	0.979	0.996
S8	0.972	0.987	0.941	0.943	0.983	0.983	0.982	1.000	0.976	0.968	0.988
S9	0.986	0.985	0.944	0.926	0.977	0.972	0.980	0.976	1.000	0.979	0.985
S10	0.976	0.976	0.944	0.945	0.978	0.978	0.979	0.968	0.979	1.000	0.981
SR	0.983	0.984	0.955	0.956	0.994	0.992	0.996	0.988	0.985	0.981	1.000

表 3 补骨脂炮制后纳入二神丸的 10 个批次指纹图谱相似度结果

Table 3 Similarity evaluation results of HPLC fingerprints of Ershen Pills extract containing processing *Psoraleae Fructus*

样品	相似度										
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	PS
P1	1.000	0.985	0.962	0.933	0.935	0.978	0.979	0.964	0.974	0.971	0.980
P2	0.985	1.000	0.972	0.955	0.953	0.987	0.990	0.975	0.979	0.977	0.990
P3	0.962	0.972	1.000	0.980	0.977	0.973	0.977	0.955	0.944	0.945	0.977
P4	0.933	0.955	0.980	1.000	0.990	0.956	0.956	0.947	0.926	0.923	0.961
P5	0.935	0.953	0.977	0.990	1.000	0.956	0.955	0.950	0.937	0.933	0.966
P6	0.978	0.987	0.973	0.956	0.956	1.000	0.993	0.976	0.976	0.976	0.992
P7	0.979	0.990	0.977	0.956	0.955	0.993	1.000	0.974	0.972	0.971	0.991
P8	0.964	0.975	0.955	0.947	0.950	0.976	0.974	1.000	0.981	0.978	0.985
P9	0.974	0.979	0.944	0.926	0.937	0.976	0.972	0.981	1.000	0.993	0.989
P10	0.971	0.977	0.945	0.923	0.933	0.976	0.971	0.978	0.993	1.000	0.986
PS	0.980	0.990	0.977	0.961	0.966	0.992	0.991	0.985	0.989	0.986	1.000

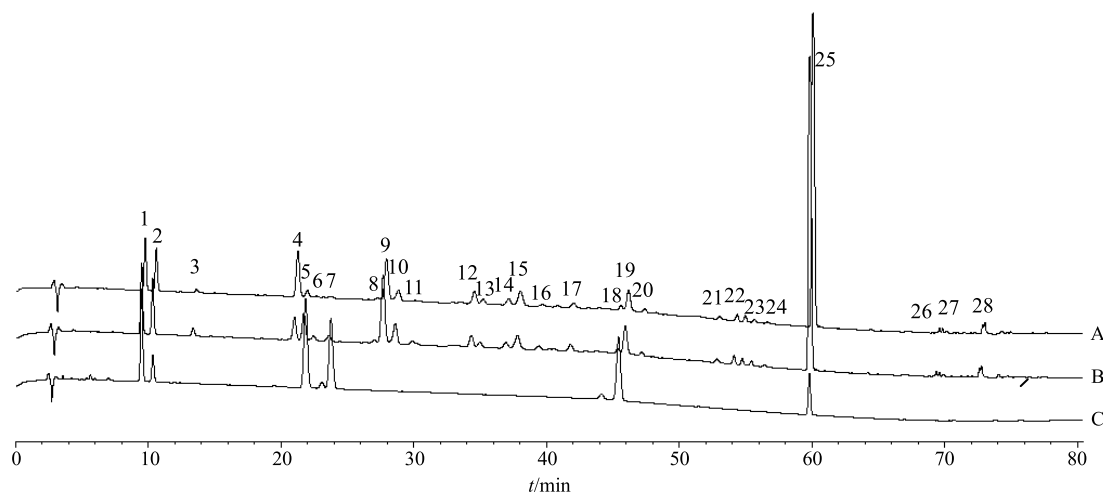
是较为广泛的^[21]。

采用 SIMCA-P 11.5 统计分析软件 PCA 方法对 2 组样本: 10 个批次的炮制前提取物和 10 个批次的炮制后提取物 (共计 20 批) 以 PCA on X-block 模型进行分析, 以观察炮制前后补骨脂纳入二神丸的石油醚提取物的差异。

以 20 批炮制前、后提取物为观察对象, 以 28 个色谱峰的峰面积相对于称样量量化后为变量, 建立 20×28 的原始矩阵, 经标准化处理后进行统计分析。主成分个数提取原则为: ① 主成分对应的特征值大于 1 的前 m 个主成分; ② 累积贡献率 ≥ 85%。本实验相关系数的特征根与方差贡献率见表 4, 表

中显示前 3 个主成分的累积贡献率达到了 86.1%, 且前 3 个主成分的特征值均大于 1, 故表明前 3 个主成分能够体现二神丸石油醚提取物的基本特征。分别取第 1、2 主成分建立二维坐标系, 并以第 1、2、3 主成分建立三维坐标系, 将多维多息的样本信息在损失少部分信息的前提下, 将潜变量投影, 以观察其样本分布。20 批样本的 PCA 得分图和载荷图分别用来观察样本的分布状况和分析变量对样本分类所起的作用。

如图 4、5 所示, 图中每 1 个点代表 1 个样本, 从图中可以看出炮制前、后的样本在二维得分图上和三维得分图上均能够得到很好地区分, 20 批二神



1-补骨脂素 2-异补骨脂素 5-甲基丁香酚 7-甲基异丁香酚 18-去氢二异丁香酚 25-补骨脂酚
1-psoralen 2-isopsoralen 5-methyleugenol 7-methylisoeugenol 18-dehydrodiisoeugenol 25-backuchiol

图 3 炮制前 (A)、后 (B) 二神丸提取物和混合对照品 (C) 叠加色谱图

Fig. 3 Superposition chromatographic fingerprints of extract of crude (A), extract of processed (B), and mixed reference substance (C)

表 4 相关系数的特征根与方差贡献率

Table 4 Eigenvalues and contribution rates of correlation coefficients

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	11.50	57.30	57.30
2	3.99	20.00	77.20
3	1.76	8.82	86.10
4	0.87	4.34	90.40
5	0.61	3.03	93.40

丸石油醚提取物可明显分为 S(S1~S10)和 P(P1~P10) 2 类。

PCA 不仅能对样品进行分类, 还能解释和评价指纹图谱中所蕴含的化学成分信息, 获取这些数据背后潜在有用的信息来合理评价指纹图谱的整体特征。如载荷图 6、7 所示, 图中每 1 个点代表 1 个色谱峰。各色谱峰对第 1、2、3 个主成分综合作用的贡献, 距离载荷图 (0, 0) 点越远的变量, 贡献程度越高, 代表该峰对样本数据分布所起的作用越大。

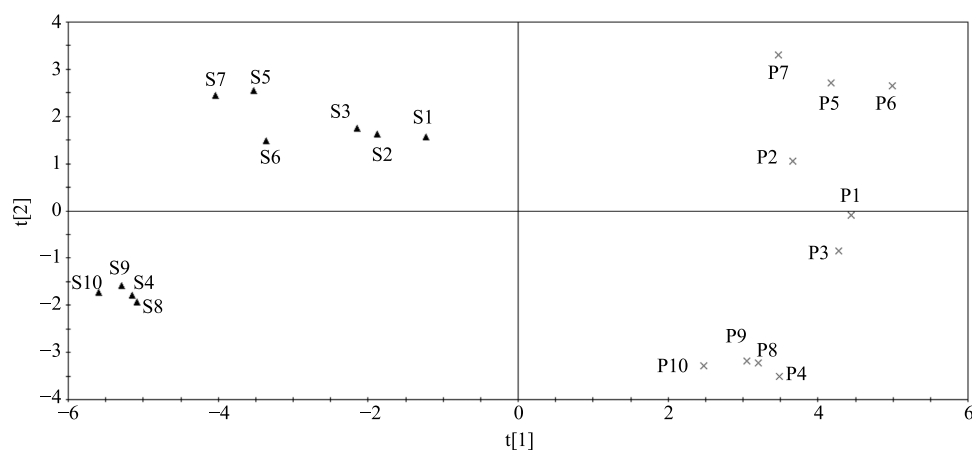


图 4 二维得分图

Fig. 4 2D scatter plot of PCA

从表 4 中可以看出前 3 个主成分中, 信息最多的指标为第 1 主成分。结合图 4 的二维得分图分析, 第 4、10、25、14、15、20、23、18、8、12、13、17、

26、27、22 号峰在第 1 个主成分上载荷为负, 且与炮制前提取物所处象限一致, 第 5、11、9、6、7、3、28、2、1、19、24、21、16、24、19、13 号峰

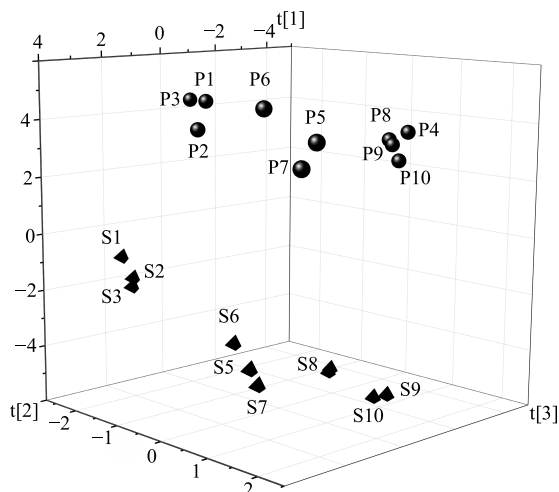


图 5 三维得分图

Fig. 5 3D scatter plot of PCA

在第 1 个主成分上载荷为正, 与炮制后的提取物所处象限一致, 以上色谱峰均可以作为区分是炮制前、后差异性的色谱峰, 其中 4 号峰的载荷最大 ($P[1]=-0.230\ 092$, $P[2]=0.108\ 666$), 结合载荷相对较小的第 10、25、14、15、20、18、23、8、12、5、11、9、6、7、3 号色谱峰一起, 基本能较好地区分炮制前、后的提取物。

2.7.2 聚类分析 通常, 采用一种化学计量学方法进行分析, 同时需要采用另外一种计量学方法对同样的数据进行验证, 其中, 在指纹图谱的分析中, 系统聚类法运用的频率较高。聚类分析是按“物以类聚”的原则, 将特征相近的观测单位或变量进行分类处理的基本方法^[22]。

本研究以 20 批炮制前、后二神丸石油醚提取物

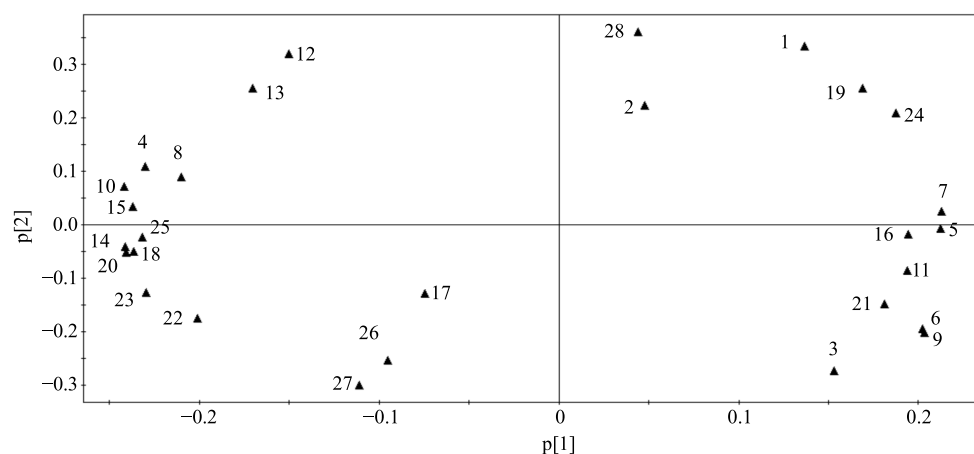


图 6 二维主成分载荷图

Fig. 6 2D Loading diagram of PCA

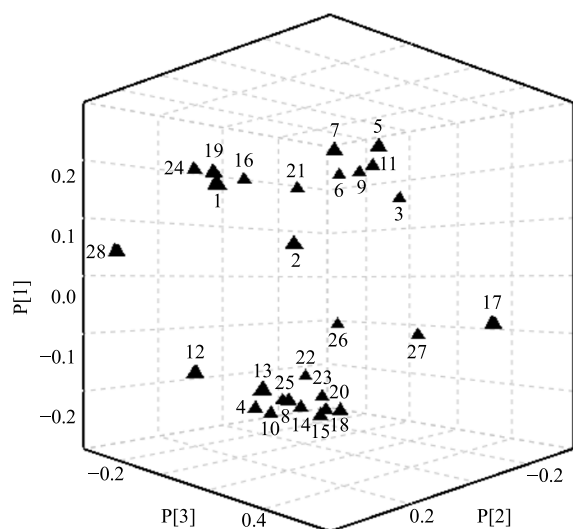


图 7 三维主成分载荷图

Fig. 7 3D Loading diagram of PCA

的 28 个共有色谱峰的峰面积相对于称样量量化后作为变量, 运用 SPSS 22.0 统计分析软件系统聚类方法, 选用组间联接聚类方法, 利用余弦距离作为样品的测度, 对 20 批样品进行聚类分析, 聚类结果见图 8。结果显示, 当阈值为 20 时, 20 批样品被分为 2 类, 炮制前提取物 S1~S10 样品为一组, 炮制后提取物 P1~P10 为另一组。结果表明, 聚类分析可以对炮制前、后的二神丸提取物进行分类评价, 其结果与 PCA 评价结果一致。

3 讨论

实验研究考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈 (1:1 混合)-水、甲醇-乙腈 (1:1 混合)-0.1% 甲酸水溶液及不同比例的流动相系统, 最终选择甲醇-乙腈 (1:1 混合)-0.1% 甲酸水溶液, 指纹图谱基本达到基线分离且重复性好; 考察了 25、30、35 ℃,

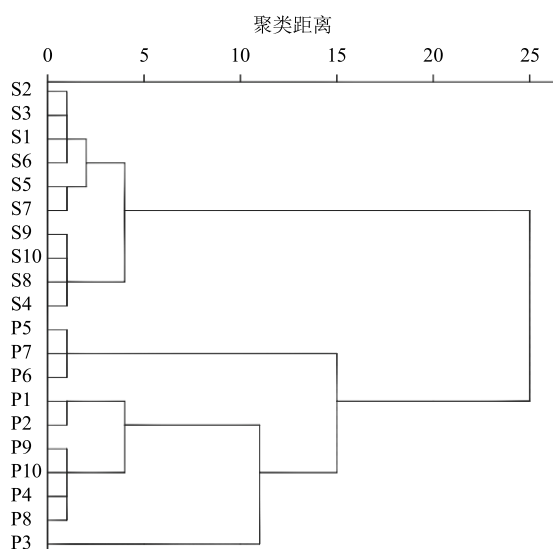


图8 20批炮制前、后二神丸提取物聚类分析树状图

Fig. 8 HCA of different batches of Ershen Pills extract containing *Psoraleae Fructus* before and after processing

最后选择分离度最优 30 ℃作为检测温度；考察了 0.8、1.0、1.2 mL/min 3 个体积流量，最终选择了分离度最好的 1 mL/min 作为检测的体积流量；考察了 206、210、230 nm 3 个不同波长，最终选择基线平稳和响应值较好的 210 nm 作为检测波长。

实验研究建立了炮制前、后二神丸石油醚部位 HPLC 指纹图谱的分析方法，分析方法稳定、可靠，同时采用相似度进行评价，并进一步利用聚类分析和 PCA 的化学模式识别方法对炮制前后共 20 批提取物的质量稳定性和一致性进行了评价。相似度的结果表明，炮制前、后二神丸提取物的质量相对稳定，与其他化学模式识别方法相互补充。

PCA 载荷图提示了一些特征性的成分在区别炮制前、后二神丸的指纹图谱中的重要作用，后期实验将会进一步进行各色谱峰的鉴定，以及在质量的进一步定量控制上重点考察这些色谱峰对提取物质量的影响。PCA 直观地观测到各样品的分布情况，同时 PCA 和聚类分析都可将炮制前、后样品很好地进行分类，说明炮制前、后的补骨脂的内在质量存在一定的差异，从而导致纳入复方二神丸后的提取物其内在质量存在一定的差异，进而在药效上表现出差异。

目前化学计量学方法在中药领域中的产地分类和品质评价运用较多^[23-26]，在中药生品和炮制品的分类及质量差异评价上运用较少，本实验所建立的指纹图谱技术与化学模式识别方法能够根据成分的

差别对炮制前、后的二神丸提取物进行评价，提示指纹图谱技术与化学模式识别方法相结合的方法用于区分中药生品与炮制品种类以及差异性评价具有一定的参考意义。

参考文献

- [1] 彭怀仁. 中医方剂大辞典 (第1册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [2] (南北朝) 雷敫撰, (清) 张骥补辑, 施仲安校注. 雷公炮炙论 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1985.
- [3] 叶定江, 原思通. 中药炮制学辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [4] 陶 益, 蒋妍慧, 李伟东, 等. 炮制对补骨脂中 12 种化学成分含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 6-9.
- [5] 王增绘, 付 娟, 武拉斌, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的补骨脂盐炙前后化学成分变化研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 51-55.
- [6] 施大文, 黄德杰. 补骨脂的炮制研究——盐炙前后化学成分的比较 [J]. 中成药, 1989, 11(2): 18-19.
- [7] 吴 疆, 魏 巍, 袁永兵. 补骨脂的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 217-219.
- [8] 耿媛媛, 胡昌江, 潘 新, 等. 二神丸不同提取部位温脾止泻的谱效关系研究 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2658-2663.
- [9] 潘 新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. 补骨脂、肉豆蔻炮制前后在“二神丸”中对脾肾阳虚泄泻小鼠的止泻研究 [J]. 中成药, 2014, 36(5): 1059-1062.
- [10] 潘 新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. “二神丸”中药物炮制前后对脾肾阳虚泄泻大鼠血清中一氧化氮和胃动素、胃泌素的影响 [J]. 中药与临床, 2014, 5(5): 26-28.
- [11] 潘 新, 胡昌江, 耿媛媛, 等. 复方二神丸中的药物炮制后对 T 淋巴细胞亚群及 cAMP/cGMP 的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 138-141.
- [12] 李明月, 周立红, 章顺楠, 等. 加味逍遥提取物超高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 230-236.
- [13] 孙 绪, 付思红, 熊丹丹, 等. 艾纳香及其提取物的 GC-MS 指纹图谱和相关性研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 693-699.
- [14] 秦建平, 吴建雄, 郎 悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 427-430.
- [15] Xie R F, Zhao Q H, Li Z C, et al. Comparison on HPLC fingerprints between *Fraxini Cortex* and its Eye Drop [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 301-306.
- [16] 张 婷, 郑 夺, 王文彤, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在参苓养心颗粒质量评价中的应用研究 [J]. 中草

- 药, 2015, 46(13): 1920-1925.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [18] 乔善磊. 中药色谱指纹图谱相似度评价研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2004.
- [19] 于鹤丹. 多元统计分析方法在中药质量评价中的应用 [J]. 数理医药学杂志, 2006, 19(1): 885-887.
- [20] Jung S, Sen A, Marron J S. Boundary behavior in high dimension, low sample size asymptotics of PCA [J]. *J Multivariate Anal*, 2012, 109: 190-203.
- [21] 吴燕. 中药质量控制中的中药全息指纹图谱模式识别方法的研究及应用 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2013.
- [22] 刘颖, 王青, 王放, 等. 苦碟子注射液 HPLC 指纹图谱与化学模式识别分析 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(24): 2097-2101.
- [23] 丁晓彦, 刘青, 李岩, 等. 丹参脂溶性成分的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2254-2256.
- [24] 张慧, 杨孟妮, 刘娟, 等. 基于多种分析模式对藏茵陈水部位的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 114-118.
- [25] 朱晓红, 李强, 王强, 等. 枣仁安神胶囊 HPLC 指纹图谱与化学模式识别分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(2): 234-238.
- [26] 苗琦, 罗光明, 罗扬婧, 等. 栀子多波长 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3159-3164.