

基于指纹图谱与主成分分析相结合的复方虎杖方提取工艺研究

汪露露^{1,2}, 何丹丹², 王 满^{1,2}, 刘 胜², 鞠建明^{2*}, 刘克冕^{2*}

1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031

2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

摘要: **目的** 建立指纹图谱与主成分分析 (PCA) 相结合的提取工艺优化方法, 并将其应用于复方虎杖方乙醇提取工艺优化。 **方法** 以复方虎杖方为模型药物, 采用 HPLC 法建立指纹图谱, 对共有峰峰面积进行 PCA, 以总因子得分为评价指标, 采用 $U_9 (9^3 \times 3^1)$ 均匀设计法考察提取次数 (X_1)、乙醇用量 (X_2)、乙醇体积分数 (X_3) 和提取时间 (X_4) 对提取效果的影响, 建立回归模型, 确定最佳工艺参数。 **结果** 建立的数学模型能够较好地描述效应指标与各因素之间的关系 ($r=0.997$), 应用建立的方法优化得到复方虎杖方最适宜醇提工艺为 6 倍量 90% 乙醇提取 3 次, 每次 1 h。 **结论** 所建立的方法简便有效, 适合复方虎杖方提取, 可以为复方中药提取工艺优化提供参考。

关键词: 复方虎杖方; 均匀设计; 指纹图谱; 主成分分析; 提取工艺; HPLC

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)02-0278-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.010

Study on extraction process of Compound Huzhang Prescription based on fingerprint combined with principal component analysis

WANG Lu-lu^{1,2}, HE Dan-dan², WANG Man^{1,2}, LIU Sheng², JU Jian-ming², LIU Ke-mian²

1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

2. Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To establish an extraction process optimization method based on fingerprint combined with principal component analysis, which was finally applied to Compound Huzhang ethanol extraction process optimization. **Methods** Taking Compound Huzhang prescription as model drug, different ethanol extraction condition fingerprint was established by HPLC, harvesting the areas of the common peaks, the total factor scores were calculated by PCA. Arranged experiments with $U_9 (9^3 \times 3^1)$ uniform design method, choosing the total factor scores as index, the influence of extraction times (X_1), alcohol consumption (X_2), alcohol concentration (X_3), and time of extracting (X_4) on the yield of extract was investigated, then the technological parameters of optimum ethanol extraction condition were selected by multi-nonlinear mathematic models. **Results** Multi-nonlinear mathematic models described the relationship between response indexes and factor variables with a regression coefficient of 0.997. The optimized conditions for Compound Huzhang Prescription were extracted in 90% ethanol six times as much as it for three times, 1 h once. **Conclusion** It is proved that the extraction method is suitable and feasible that could provide a reference for compound Chinese medicine extraction process optimization.

Key words: Compound Huzhang Prescription; uniform design; fingerprint; PCA; extraction process; HPLC

中药指纹图谱技术是一种综合的、可量化的定性定量手段, 具有“整体性”的特点, 能全面反映中药提取状况^[1-2], 可用于中药提取工艺的优化。但由于中药化学成分的复杂性和多样性, 中药提取物

收稿日期: 2016-08-11

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”高层次人才培养对象科研资助项目 (2015-YY-011); 江苏省“333 高层次人才培养工程”科研资助项目 (BRA2015494)

作者简介: 汪露露, 女, 在读硕士, 研究方向为中药新剂型、新工艺研究。Tel: 17719492272 E-mail: 17719492272@sina.cn

*通信作者 鞠建明, 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药新剂型、新工艺及中药质量控制。

Tel: (025)85639640 E-mail: jjm405@sina.com

刘克冕, 男, 副主任医师, 主要从事医院药学研究。Tel: (025)85608718 E-mail: 13770826302@163.com

色谱峰较多,各峰权重系数难以确定,给综合评价带来了较大的困难。主成分分析(principal component analysis, PCA)法是一种浓缩数据、简化数据的统计学方法,该法利用降维思想,通过研究指标体系的内在结构关系,在不损失或尽量少损失原有指标信息的情况下把多指标转化成少数几个互相独立而且包含原有指标大部分信息的综合指标,有效地避免了综合评价时主观加权的弊端^[3-4]。因此,指纹图谱技术结合 PCA 既能解决目前普遍存在的工艺提取指标成分选择不全面的问题^[5],又能将多指标数据进行简化,便于综合评价。

复方虎杖方由虎杖、黄柏、金钱草、茵陈、垂盆草、青黛、五味子 7 味中药组成,具有清肝利胆、降酶退黄之功效,临床上用于治疗肝纤维化及病毒性肝炎引起的肝胆湿热证^[6-7]以及复发性生殖器疱疹^[8]等。课题组前期优化了该方的水提工艺^[9],但分析处方组成,该方的主要活性成分为脂溶性成分,如二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类成分^[10];药效学实验进一步表明,醇提效果明显优于水提^[10]。因此本研究拟采用均匀设计方法,应用指纹图谱结合 PCA 技术优选复方虎杖方的醇提工艺,确定最适宜提取参数。

1 仪器与材料

AT201 型 1/10 万电子天平,瑞士梅特勒公司; Waters 高效液相色谱仪, Alliance 2695 四元泵及自动进样系统, 2996 二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站, Milli-Q 型纯水器, 美国 Millipore 公司; BUCHI-200 旋转蒸发仪, 瑞士步琪有限公司; KQ-250E 型超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司; 乙腈, 色谱纯; 超纯水, 自制; 其余试剂均为分析纯。虎杖、黄柏、金钱草、垂盆草、茵陈、青黛、五味子药材均购自安徽丰原铜陵中药饮片股份有限公司, 经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定均符合《中国药典》2015 年版一部相关规定, 其中虎杖为蓼科蓼属植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根, 黄柏为芸香科黄檗属植物黄皮树 *Phyllodendron chinese* Schneid. 的干燥树皮, 金钱草为报春花科马蹄金属植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干燥全草, 垂盆草为景天科景天属多年生草本植物垂盆草 *Sedum sarmentosum* Bunge 的干燥全草, 茵陈为菊科蒿属植物滨蒿 *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. 的干燥地上部分, 青黛为爵床科马蓝属植物马蓝

Baphicacanthus cusia (Nees) Bremek. 的叶或茎叶, 五味子为木兰科五味子属植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 提取液制备

按照处方比例称取复方虎杖方中的各味药材, 共 9 份, 每份含有 1 个处方量的药材 111 g, 分别将药材置圆底烧瓶中, 按照表 1 中条件回流提取, 考察提取次数 (X_1)、乙醇用量 (X_2)、乙醇体积分数 (X_3)、提取时间 (X_4) 对提取效果的影响。合并提取液, 减压回收乙醇至 500 mL, 冷藏备用。

表 1 $U_9(9^3 \times 3^1)$ 均匀设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of $U_9(9^3 \times 3^1)$ uniform design

水平	X_1 /次	X_2 /倍	X_3 /%	X_4 /h
1	1	6	50	0.50
2	1	7	55	0.75
3	1	8	60	1.00
4	2	9	65	1.25
5	2	10	70	1.50
6	2	11	75	1.75
7	3	12	80	2.00
8	3	13	85	2.25
9	3	14	90	2.50

2.2 供试品溶液制备

精密吸取上述不同提取条件下制备的提取液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇至近刻度, 超声 10 min (功率 250 W), 放至室温, 定容至刻度, 高速离心 10 min (12 000 r/min), 取上清液作为供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Alltima C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L; 检测波长 254 nm; 梯度洗脱程序: 0~35 min, 10%~45%乙腈; 35~60 min, 45%~90%乙腈; 60~70 min, 90%乙腈; 70~72 min, 90%~10%乙腈; 72~82 min, 10%乙腈。

2.4 精密度试验

取均匀设计 4 号实验提取条件下的供试品溶液连续进样 6 次, 每次 20 μ L, 计算各共有色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD, 结果表明 22 个共有峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0~0.03%、0~0.53%, 说明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取均匀设计 4 号实验条件下的提取液，制备供试品溶液，重复 6 份，分别进样 20 μL，计算各共有峰的保留时间和峰面积的 RSD，结果表明 22 个共有峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0~0.02%、0.09%~0.67%，说明该实验方法重复性好。

2.6 稳定性试验

取均匀设计 4 号实验提取条件下的供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样 20 μL，计算各共有峰的保留时间和峰面积的 RSD，结果表明 22 个色谱峰的保留时间和峰面积的 RSD 分别为 0~0.03%、0.003%~0.480%，说明供试品溶液在 12

h 内稳定。

2.7 样品分析测定

分别吸取 9 个样品的供试品溶液各 20 μL，在上述色谱条件下分别进样测定，记录色谱图，采用药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (A 版) 对图谱初步分析，确定了 22 个共有色谱峰，见图 1。

2.8 数据处理与结果

2.8.1 主成分提取及贡献率计算^[3-4] 采用 SPSS 17.0 对均匀设计的各组样品的峰面积进行降维处理，获取能代表原始峰面积的主成分及贡献率，解释的总方差见表 2。根据主成分的提取原则，取特

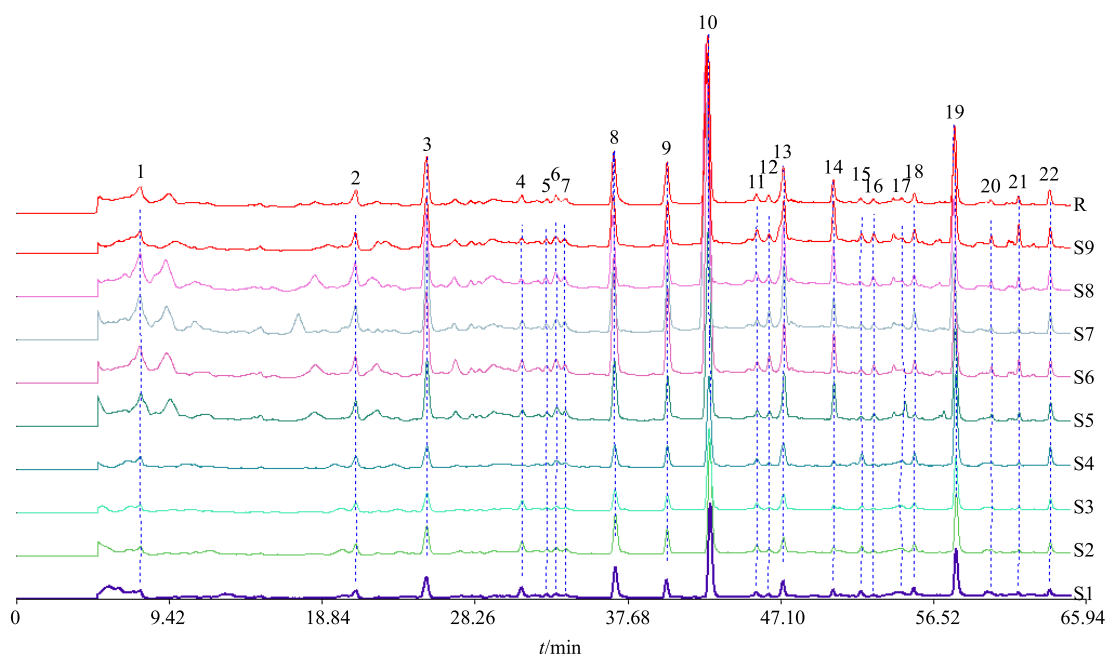


图 1 不同提取条件下 9 个样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of nine samples with different ethanol extraction conditions

表 2 解释的总方差

Table 2 Total variance explained of extracted components

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差/%	累积贡献率/%	合计	方差/%	累积贡献率/%
1	13.031	59.230	59.230	13.031	59.230	59.230
2	4.308	19.581	78.811	4.308	19.581	78.811
3	1.628	7.402	86.213	1.628	7.402	86.213
4	1.337	6.075	92.288	1.337	6.075	92.288
5	0.769	3.496	95.784			
6	0.434	1.972	97.756			
7	0.352	1.600	99.357			
8	0.079	0.357	99.713			
9	0.063	0.287	100.000			

征值 $\lambda > 1$ 的特征根对应的成分作为提取主成分。因此选取的前 4 个成分的初始特征值分别为 13.031、4.308、1.628、1.337，方差贡献率分别为 59.230%、19.581%、7.402%、6.075%，累积方差贡献率为 92.288%，说明提取的 4 个主成分可以代表原始色谱峰峰面积的大部分（92.288%）信息。

2.8.2 综合得分 (F) 计算^[11] 以提取的 4 个主成分的因子得分乘以相应的方差算数平方根得到 4 个主成分的得分，即主成分 1 得分 (F_1) = 主成分 1 因子得分 \times 初始特征值的算数平方根，以此类推得到主成分 2、3、4 得分 (F_2 、 F_3 、 F_4)。按照公式可以分别计算均匀设计 9 个样品的综合得分，结果见表 3。由表 3 可以看出 6 号样品综合得分最高，表明其提取条件为最适宜。

$$F = 0.64180 F_1 + 0.21217 F_2 + 0.08018 F_3 + 0.06585 F_4$$

表 3 $U_9(9^3 \times 3^1)$ 均匀设计方案与结果

Table 3 Test and results of $U_9(9^3 \times 3^1)$ uniform design

试验号	X_1 /次	X_2 /倍	X_3 %	X_4 /h	综合得分
S1	1	7	65	2.00	-5.2
S2	1	9	85	1.50	-3.8
S3	1	11	60	1.00	-5.3
S4	2	13	80	0.50	-3.2
S5	2	6	55	2.25	1.5
S6	2	8	75	1.75	5.8
S7	3	10	50	1.25	3.6
S8	3	12	70	0.75	4.6
S9	3	14	90	2.50	3.0

2.8.3 回归模型的分析及提取工艺条件的优选 为了揭示多个因素对指标的内在关系，采用 SPSS 17.0 统计软件对均匀设计试验结果进行逐步回归分析，建立回归模型，所建模型评价结果见表 4。由概率值 $P < 0.05$ 可知，拟合的回归方程具有统计学意义。

各变量对回归模型的贡献及意义见表 5。由表 5 中数据可得到回归方程为 $Y = -36.749 + 2.101 X_1 - 0.273 X_2^2 + 0.180 X_1 X_3 + 6.121 X_2 - 0.001 X_3^2 - 1.183 X_1 X_2 + 1.252 X_1^2$ ， $r = 0.997$ ，以 Y 为评价指标时，同

表 4 模型回归方差分析

Table 4 Variance analysis of model regression

因素	平方和	自由度	均方差	F 值	P 值
回归	157.834	7	22.548	451.897	0.036
残差	0.050	1	0.050		
总误差	157.884	8			

表 5 各变量的统计检验

Table 5 Statistical test of each variables

模型	未标准化系数		标准化系数	T 检验	P 值
	回归系数	标准误差			
常数项	-36.749	1.856		-19.804	0.032
X_1	2.101	0.900	0.410	2.335	0.058
X_2^2	-0.273	0.025	-3.384	-11.012	0.058
$X_1 X_3$	0.180	0.010	2.803	17.761	0.036
X_2	6.121	0.381	3.773	16.050	0.040
X_3^2	-0.001	0.000	-0.480	-8.169	0.078
$X_1 X_2$	-1.183	0.140	-3.419	-8.477	0.075
X_1^2	1.252	0.385	0.986	3.254	0.190

时考虑各变量之间存在的交互作用，回归方程选入 X_1 、 X_2^2 、 $X_1 X_3$ 、 X_2 、 X_3^2 、 $X_1 X_2$ 、 X_1^2 变量，说明这 7 个变量（即提取次数、溶剂倍量 2 次方交互项、提取次数和乙醇体积分数交互项、溶剂倍量、乙醇体积分数 2 次方交互项、提取次数和溶剂倍量交互项、提取次数 2 次方交互项）对复方虎杖方醇提取工艺效果影响比较显著。由回归模型中各变量的显著性检验可推知单一变量对 Y 的影响大小为溶剂倍量 $>$ 提取次数 $>$ 乙醇体积分数 $>$ 提取时间。

根据最优回归方程用 Excel 2003 进行规划求解，得到各个变量的取值为 $X_1 = 3$ ， $X_2 = 6$ ， $X_3 = 90$ ，组合条件最优，求得 $Y = 26.93$ 。由于 X_4 对复方虎杖方醇提取工艺效果影响不是特别显著，根据实际操作过程中的条件优选 $X_4 = 1$ ，所以确定的最优的醇提工艺条件为用 6 倍量的 90% 乙醇提取 3 次，每次 1 h。

2.8.4 验证试验 按照处方比例，称取同一批药材 3 份，每份 111 g，按照优选的提取工艺进行验证试验，依法制备供试品并测定，综合分析各共有峰面积得到 3 份样品的平均综合得分为 5.6，RSD 为 0.5%，表明优选的提取工艺条件稳定可行。

3 讨论

现代中药提取工艺研究常常会选择出膏率、某 1 个或数个指标成分^[12-15]，亦或出膏率与指标成分综合评分^[16-21]作为考察指标进行工艺优化。一方面，以出膏率作为指标，对水提工艺有一定的参考意义，反映了药材提取的程度，但对醇提指导意义不大，通常醇浓度越高，出膏率越低，因此不能反映药材的提取程度；另一方面，由于复方中药组成药味较多，成分复杂，是由许多活性成分协同发挥作用的，

因此在研究提取工艺时选择一个或几个指标成分远远不够。

中药指纹图谱是一种反映中药中所有化学成分的定性定量技术, 主要以色谱峰的相对保留时间和相对峰面积进行定性, 以峰面积进行半定量, 可以被广泛应用于中药从药材到产品的整个提取分离过程中^[20]。由于指纹图谱涵盖的信息量大, 与目前普遍采用的出膏率、一个或几个指标成分作为考察指标相比, 具有全面性与综合性, 更加能反映提取的效果^[21]。本研究优化了分离条件, 建立了复方虎杖方指纹图谱, 确定了 22 个提取物的共有峰, 用作工艺优化的指标成分, 方法学研究结果表明, 所建立的指纹图谱方法精密度、稳定性、重复性均较好, 可用于指标成分的定量分析。

选择复方虎杖方指纹图谱中 22 个谱峰作为工艺优化的考察指标, 数据繁琐, 各峰权重系数难以确定, 给综合评价带来了较大的困难。采用 PCA 法, 通过线性变换, 将原来的 22 个指标组合成 4 个能充分反映总体信息的指标 (涵盖了原始色谱峰 92.288% 的信息), 从而在不丢掉原来主要信息的前提下, 避开了变量间共线性的问题, 这种浓缩数据、简化数据的统计学方法为进一步进行均匀设计数据回归分析奠定了基础^[22-23]。

本研究首次将指纹图谱技术与 PCA 统计学方法相结合, 用于中药提取工艺优选, 既全面考察了药材提取状况, 又简化了数据处理, 适合中药水提、醇提工艺考察, 具有一定的实用性。

参考文献

- [1] 鞠建明, 段金彪, 钱大玮, 等. 不同树龄邳州银杏叶在不同采收期指纹图谱比较 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1388-1391.
- [2] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [3] 王璐璐, 刘炳周, 王 满, 等. 主成分分析结合均匀设计法用于优选桂芍巴布贴制备工艺的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1682-1689.
- [4] 陆兆光, 闫 明, 杨 晶, 等. 基于主成分分析的金黄凝胶体外透皮吸收研究 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2635-2640.
- [5] 殷明阳, 刘素香, 张铁军, 等. 复方中药提取工艺研究概况 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3279-3283.
- [6] 韩 政. 复方虎杖益肝颗粒治疗慢性乙型肝炎临床观察 [J]. 山西中医, 2014, 30(10): 11-13.
- [7] 刘 丹. 复方虎杖颗粒对非酒精性脂肪性肝病大鼠的治疗作用及机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [8] 肖红梅. 复方虎杖散颗粒治疗复发性生殖器疱疹的临床疗效观察及对相关细胞因子水平的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013.
- [9] 李振华, 华俊磊, 鞠建明, 等. 复方虎杖颗粒提取纯化工艺研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(6): 1390-1392.
- [10] 李振华. 复方虎杖颗粒药理学及抗乙型肝炎病毒作用研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [11] 程翼宇, 瞿海斌. 医药信息学及数据分析处理技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [12] 朱裕林, 陈卫东, 张冬梅, 等. 淫羊藿醇提取与水提取工艺的比较 [J]. 中成药, 2015, 37(2): 435-437.
- [13] 虞 立, 张宇燕, 杨洁红, 等. R 语言多目标优化养阴通脑颗粒组方中 3 种黄酮类指标成分提取工艺 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1156-1160.
- [14] 贺葵邦, 王英姿, 张春泥, 等. 正交试验优选地龙水提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 33-35.
- [15] 朱亚楠, 李 萍, 王 满, 等. 多指标均匀设计法优选痤疮消凝胶提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 24-27.
- [16] 伍振峰, 陈伟良, 王雅琪, 等. 丹参减压提取工艺优化及技术适宜性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(6): 795-800.
- [17] 杨水清. 均匀设计法优选坤安颗粒提取工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 29-31.
- [18] 李文兰, 任晓蕾, 赵 稷, 等. 均匀设计法优选金匱肾气丸中苷类成分的提取工艺 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 199-202.
- [19] 吴 迪. 陈皮总黄酮的提取工艺优化及其抗过敏活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [20] 丰加涛, 金 郁, 王金成, 等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 180-185.
- [21] 杨晓旭, 高家荣, 韩燕全, 等. 正交试验结合指纹图谱优选补骨脂-肉豆蔻药对醇提工艺 [J]. 中草药, 2014, 45(15): 2178-2183.
- [22] 张亚中. 基于超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱的白花蛇舌草注射液主成分分析 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 829-833.
- [23] 刘仁权. SPSS 统计软件 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.