

## 基于多成分含量和多元统计分析的益艾康胶囊水提取工艺研究

马 开<sup>1</sup>, 张迪文<sup>1</sup>, 屠万倩<sup>1</sup>, 田 萍<sup>1</sup>, 张秀玲<sup>2</sup>

1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450003

2. 河南省中研医药科技有限公司, 河南 郑州 450003

**摘 要:** **目的** 建立基于多成分含量和多元统计分析的提取工艺优化方法, 并优化益艾康胶囊水提取工艺。**方法** 以正交试验法, 选择  $L_9(3^4)$  正交表考察煎煮次数(A)、煎煮时间(B)、加水量(C) 3 个因素的不同水平对益艾康胶囊水提取工艺的影响; 以 HPLC 法测定样品中甘草苷、甘草酸铵、黄芩苷、芍药苷、黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量并进行方法学研究; 通过主成分分析法对实验数据统计分析, 以主成分得分为因变量对正交试验结果进行方差分析, 考察各影响因素对提取效果的影响; 以多重比较法优选各因素水平。**结果** 优选得到的提取工艺为加 8 倍量水, 煎煮 3 次, 每次煎煮 1 h。**结论** 所建立的研究方法既能充分反映样品内在质量, 又能够简化数据结构, 可为中药复方提取工艺研究提供参考。优选得到的工艺简便易行, 可作为益艾康胶囊水提取工艺。

**关键词:** 益艾康胶囊; 提取工艺; 主成分分析; 方差分析; 多重比较分析; HPLC; 甘草苷; 甘草酸铵; 黄芩苷; 芍药苷; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)08-2162-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.024

## Extraction process of Yiaikang Capsules based on multi-component content and multivariate statistical analysis

MA Kai<sup>1</sup>, ZHANG Di-wen<sup>1</sup>, TU Wan-qian<sup>1</sup>, TIAN Ping<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-ling<sup>2</sup>

1. Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

2. Hennan Zhongyan Traditional Chinese Medicine Technology Co., Ltd., Zhengzhou 450003, China

**Abstract: Objective** To establish an extraction process optimization method based on multi-component content determination and multivariate statistical analysis, and optimize the water extraction process factors of Yiaikang Capsules (YAKC). **Methods**  $L_9(3^4)$  orthogonal table was selected to investigate the effects of different levels of extracting times (A), extracting time (B) and water addition (C) on water extraction process of YAKC. The contents of liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, baicalin, paeoniflorin, astragaloside IV, and calycosin-7- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside in the orthogonal samples were determined by HPLC, and related methodological studies were carried out. The experimental data was treated by principal component analysis, principal component score was calculated and chosen as dependent variable, variance was analyzed to evaluate the influence of various factors. The optimum levels of extraction factors were selected by multiple comparison. **Results** The optimized extraction process method was as following: Eight times of water be added, the drug be extracted for three times, each time for 1 h. **Conclusion** The established method can reflect the intrinsic quality of the sample and simplify the data structure, which can provide reference for the further Chinese medicine compound extraction process study. The optimized extraction method of YAKC is simple and reliable.

**Key words:** Yiaikang Capsules; extraction process; principal component analysis; variance analysis; multiple comparative analysis; HPLC; liquiritin; ammonium glycyrrhizinate; baicalin; paeoniflorin; astragaloside IV; calycosin-7- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside

艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起的传染性疾病,

是当今世界最难治疗的疾病之一。国家卫生健康委员会疾病预防控制局和中国疾病预防控制中心最新数据显示,截至2018年底,全国报告HIV/AIDS存

收稿日期: 2019-10-17

基金项目: 国家“十三五”重大传染病防治科技重大专项(2017ZX10205502)

作者简介: 马 开(1968—),男,副研究员,主要从事天然活性成分研究与新药开发研究。Tel: 13613713552 E-mail: zzm1968@126.com

活患者 861 042 例, 其中 2018 年报告显示 AIDS 发病人数 64 170 人, 死亡人数 18 780 人, 占当年因传染病死亡总人数的 80%<sup>[1]</sup>。

艾滋病目前尚无可以治愈的药物, 尽管抗病毒药物比以前有所增加, 但是价格仍过高、毒副作用没有降低、耐药情况依然存在。中医药防治艾滋病的优势在于中医采用辨病与辨证相结合的原则, 综合调整艾滋病患者全身复杂多样的生理病理变化, 有着可喜的前景<sup>[2-4]</sup>。

益艾康胶囊 (Yiaikang Capsules, YAKC) 是河南省中医管理局组织的河南省治疗艾滋病专家组多次到艾滋病高发区巡诊后拟定的中药复方制剂, 并作为在艾滋病高发地区使用药物。YAKC 由黄芪、甘草、白芍、黄芩组成, 具有健脾益气、养血、化湿、清热祛风的功效, 主要用于艾滋病气血两虚证。经过十多年临床应用和验证, 该制剂具有改善艾滋病患者临床症状、减少机会性感染、提高生存质量、稳定和提高艾滋病患者 CD4<sup>+</sup> T 细胞计数、降低病毒载量和年病死率等作用<sup>[5-7]</sup>。

为保证制备工艺及制剂质量的稳定性, 本研究对 YAKC 的提取工艺进行进一步研究, 为进一步开发出具有独立知识产权的治疗艾滋病中药新药打下基础。YAKC 方中黄芪所含有效成分黄芪甲苷具有调节免疫、抗炎、抗病毒和抗肿瘤等作用<sup>[8]</sup>, 黄芪黄酮具有抗炎、抗病毒和免疫调节作用, 可使氢化可的松致免疫功能低下模型鼠的细胞免疫功能恢复至正常水平<sup>[9-10]</sup>, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷是黄芪黄酮中主要成分; 甘草酸及其盐类统称为甘草甜素, 甘草甜素对 HIV 的增殖有抑制作用<sup>[11-12]</sup>, 甘草苷有破坏血管内 HIV 的作用<sup>[13]</sup>; 芍药苷具有抗炎、抗肿瘤、保肝、神经保护、双重免疫调节作用<sup>[14-15]</sup>; 黄芩苷作为非核苷类逆转录酶抑制剂是很好的抗 HIV-1 药物<sup>[16]</sup>。上述成分为 YAKC 提高免疫、减少机会性感染、抗病毒的药效成分, 故作为本工艺研究的指标成分。

本实验通过正交试验考察煎煮时间、次数和加水量 3 个因素对 YAKC 提取工艺的影响, 采用 HPLC 法测定 YAKC 水煎液中的甘草苷、甘草酸铵、黄芩苷、芍药苷、黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量<sup>[17]</sup>, 通过主成分分析法对实验数据统计, 以主成分综合得分为因变量对正交试验结果进行方差分析, 考察各因素对提取效果的影响; 以多重比较法优选各因素水平, 得到最佳水提取方案。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器与试剂

Waters2695 高效液相色谱仪, 配置 2695 溶剂管理系统、2996 二极管阵列检测器和 Empower II 色谱工作站, 美国 Waters 公司; Waters Acquity Arc 高效液相色谱仪配置四元溶剂管理系统、FIN-R 样品管理系统、2998 二极管阵列检测器和 Empower III 色谱工作站, 美国 Waters 公司; ALLtech ELSD 3300HP 蒸发光散射检测器, 瑞士 Büchi 公司; AE240 型十万分之一分析天平, 瑞典 Mettler 公司。色谱纯乙腈、甲醇, 美国 Fisher Scientific 公司; 分析纯磷酸, 国药集团化学试剂有限公司; 超纯水, 自制。对照品黄芪甲苷 (批号 110781-201717, 质量分数 96.9%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、甘草苷 (批号 111610-201607, 质量分数 93.1%)、甘草酸铵 (批号 110731-201720, 质量分数 97.7%)、黄芩苷 (批号 110715-201821, 质量分数 95.4%)、芍药苷 (批号 110736-201842, 质量分数 97.4%) 均购自中国食品药品检定研究院。

### 1.2 药材

白芍 *Paeoniae Radix Alba* (批号 181101)、黄芩 *Scutellariae Radix* (批号 180505)、甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (批号 180101)、黄芪 *Astragali Radix* (批号 180901) 均购自亳州市詹政中药饮片有限公司, 经河南省中医药研究院刘杰研究员分别鉴定为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao, 均符合《中国药典》2015 年版有关规定。

## 2 方法与结果

### 2.1 水提工艺正交试验设计

依据前期实验结果, 选择 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验表设计正交试验, 考察煎煮次数 (A)、煎煮时间 (B)、加水量 (C) 3 个因素的不同水平对 YAKC 煎煮工艺的影响。各因素水平见表 1。

### 2.2 样品溶液的制备

按处方比例, 平行称取黄芪、甘草、黄芩、白芍药材共 9 份 (每份 111.5 g), 分别置于烧杯中, 按照因素水平表及 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验表进行试验, 各实验煎出液滤过, 滤液分别合并, 浓缩并定容至 250 mL, 编号, 得到 1~9 号样品溶液。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

| 水平 | 因素  |     |     |
|----|-----|-----|-----|
|    | A/次 | B/h | C/倍 |
| 1  | 1   | 1   | 4   |
| 2  | 2   | 2   | 6   |
| 3  | 3   | 3   | 8   |

## 2.3 多成分含量测定

### 2.3.1 色谱条件

(1) 甘草苷、甘草酸铵、黄芩苷、芍药苷含量测定的色谱条件: VenusiL ASB C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 16%~19%乙腈; 5~12 min, 19%乙腈; 12~40 min, 19%~50%乙腈; 40~41 min, 50%~100%乙腈; 41~45 min, 100%~16%乙腈; 检测波长: 0~12 min, 233 nm; 12~16 min, 276 nm; 16~26 min, 278 nm; 26~45 min, 252 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。理论塔板数按黄芩苷计算所有组分不低于 3 000。

(2) 黄芪甲苷含量测定色谱条件: Phenomenex Kinetex XB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm); 流动相为乙腈-水 (32:68); 蒸发光散射检测器检测; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。理论塔板数不低于 3 000。

(3) 毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定色谱条件: Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> 100A 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 30%~50%甲醇; 20~22 min, 50%~70%甲醇; 22~25 min, 70%甲醇; 25~28 min, 70%~30%甲醇; 检测波长 260 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。理论塔板数不低于 3 000。

各成分 HPLC 色谱图见图 1~3。

### 2.3.2 对照品溶液的制备

(1) 甘草苷、甘草酸铵、芍药苷、黄芩苷混合对照品溶液的制备: 精密称取甘草苷、甘草酸铵、芍药苷及黄芩苷对照品, 加 70%乙醇制成含甘草苷 29.04 μg/mL、甘草酸铵 58.2 μg/mL、黄芩苷 281.6 μg/mL、芍药苷 44.0 μg/mL 的溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为混合对照品溶液。

(2) 黄芪甲苷对照品溶液的制备: 精密称取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成含黄芪甲苷为 1.004

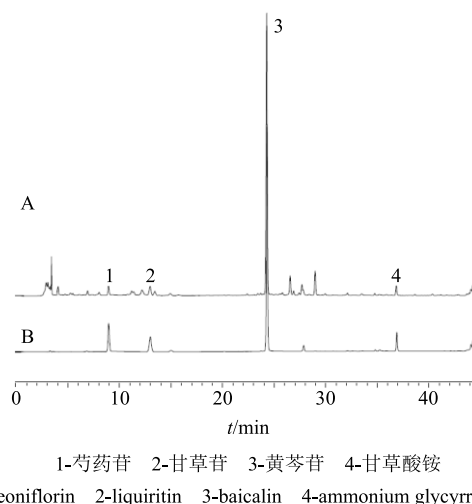


图 1 YAKC 供试品溶液 (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 1 HPLC of YAKC sample solution (A) and mixed reference (B)

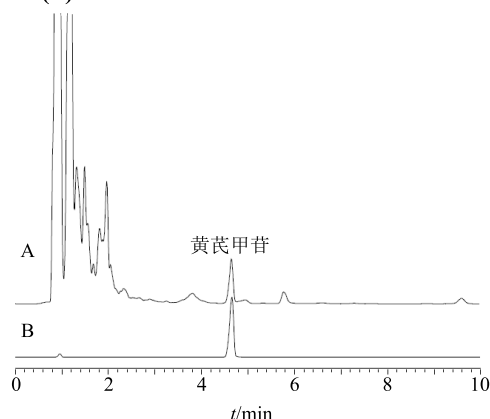


图 2 YAKC 供试品溶液 (A) 和黄芪甲苷对照品 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 2 HPLC of YAKC sample solution (A) and astragaloside IV (B)

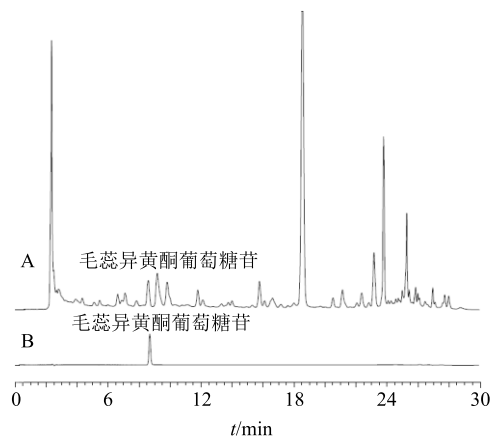


图 3 YAKC 供试品溶液 (A) 和毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 3 HPLC of YAKC sample solution (A) and calycosin-7-O-beta-D-glucopyranoside (B)

mg/mL 的溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为黄芪甲苷对照品溶液。

(3) 毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液的制备: 精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品, 加甲醇制成含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 161.6  $\mu\text{g/mL}$  的溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液。

### 2.3.3 供试品溶液的制备

(1) 甘草苷、甘草酸铵、芍药苷、黄芩苷含量测定供试品溶液的制备: 分别精密量取“2.2”项下样品溶液各 2.5 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加 70%乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为甘草苷、甘草酸铵、芍药苷、黄芩苷含量测定供试品溶液。

(2) 黄芪甲苷含量测定供试品溶液的制备: 分别精密量取“2.2”项下样品溶液各 25 mL, 置于 60 mL 分液漏斗中, 加水饱和正丁醇萃取 5 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇层, 加浓氨试液萃取 2 次, 每次 20 mL, 弃去氨水层, 正丁醇层水浴挥干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为黄芪甲苷含量测定供试品溶液。

(3) 毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定供试品溶液的制备: 分别精密量取“2.2”项下样品溶液各 10 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 mL, 水浴挥干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定供试品溶液。

**2.3.4 线性关系考察** 分别精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液, 逐级稀释为不同质量浓度的系列对照品溶液, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 分别在“2.3.1”项色谱条件下进样分析。黄芪甲苷以进样量的对数为横坐标 ( $X$ ), 以峰面积的对数为纵坐标 ( $Y$ ), 建立线性回归方程; 其余成分以各成分的进样量为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 建立线性回归方程。6 个成分的回归方程、相关系数 ( $r$ ) 和线性范围分别为甘草苷  $Y=2\,070.989 X-5\,266.497$ ,  $r=0.999\,92$ , 线性范围 14.52~290.40 ng; 甘草酸铵  $Y=662.280 X-2\,193.46$ ,  $r=0.999\,97$ , 线性范围 29.10~584.00 ng; 黄芩苷  $Y=3\,494.073 X-18\,304.58$ ,  $r=0.999\,96$ , 线性范围 140.80~2\,816.00 ng; 芍药苷  $Y=1\,717.342 X-6\,544.498$ ,  $r=0.999\,96$ , 线性范围 22.00~440.00

ng; 黄芪甲苷  $Y=1.451 X+5.407$ ,  $r=0.998\,46$ , 线性范围 502.00~10\,040.00 ng; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷  $Y=3\,330.925 X-234\,702.28$ ,  $r=0.999\,96$ , 线性范围 80.80~1\,212.00 ng。

**2.3.5 精密度试验** 取“2.2”项下 5 号样品溶液, 分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在“2.3.1”项条件下连续进样测定 6 次, 测得各待测成分峰面积 RSD 值为 0.1%~2.4%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.6 重复性试验** 取“2.2”项下 5 号样品溶液, 分别按“2.3.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别在“2.3.1”项条件下测定, 测得各待测成分质量分数 RSD 值为 0.3%~2.6%, 表明该方法重复性良好。

**2.3.7 稳定性试验** 取“2.3.5”项下制备的供试品溶液, 分别在“2.3.1”项条件下于 0、2、4、6、8、24 h 进样测定, 测得各待测成分峰面积 RSD 值为 0.1%~2.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.3.8 加样回收率试验

(1) 甘草苷、甘草酸铵、芍药苷、黄芩苷加样回收试验: 精密量取 6 份“2.2”项下已知含量的 5 号样品溶液 2.5 mL, 分别置于 100 mL 量瓶中, 每份精密加入含甘草苷 0.570 mg/mL、甘草酸铵 1.102 mg/mL、黄芩苷 6.480 mg/mL、芍药苷 0.451 mg/mL 的混合对照品溶液 1 mL, 加 70%乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。按“2.3.1”项下条件测定, 计算加样回收率, 结果 4 个成分的平均加样回收率分别为 100.50%、99.75%、101.36%、101.26%, RSD 分别为 1.40%、1.25%、0.88%、1.68%。

(2) 黄芪甲苷加样回收率试验: 精密量取 6 份“2.2”项下已知含量的 5 号样品溶液 15 mL, 分别置于 60 mL 分液漏斗中, 每份精密加入质量浓度为 0.652 mg/mL 的黄芪甲苷水溶液 1 mL, 加水饱和正丁醇萃取 5 次, 每次 20 mL, 合并正丁醇层, 加浓氨试液萃取 2 次, 每次 20 mL, 弃去氨水层, 正丁醇层水浴挥干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。按“2.3.1”项下条件测定, 计算加样回收率, 结果平均加样回收率为 95.45%, RSD 为 2.43%。

(3) 毛蕊异黄酮葡萄糖苷加样回收率试验: 精密量取 6 份“2.2”项下已知含量的 5 号样品溶液 5

mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 每份精密加入质量浓度为 0.285 mg/mL 的毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品溶液 1 mL, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液 10 mL, 水浴挥干, 残渣加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。按“2.3.1”项下条件测定,

计算加样回收率, 结果平均回收率为 98.30%, RSD 为 2.16%。

**2.3.9 样品测定** 取“2.2”项下样品溶液, 分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在“2.3.1”项条件下测定, 计算样品中各指标成分的质量浓度, 结果见表 2。

表 2 正交试验各样品含量测定结果

Table 2 Orthogonal test results of determination of each sample

| 样品 | 质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |         |         |           |       |           |
|----|-------------------------------------------|---------|---------|-----------|-------|-----------|
|    | 甘草酸铵                                      | 甘草苷     | 芍药苷     | 黄芩苷       | 黄芪甲苷  | 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 |
| 1  | 174.188                                   | 86.210  | 93.778  | 1 394.422 | 13.44 | 21.314    |
| 2  | 176.808                                   | 93.234  | 104.570 | 1 564.268 | 18.10 | 22.950    |
| 3  | 189.364                                   | 93.046  | 92.490  | 1 290.544 | 15.54 | 22.224    |
| 4  | 336.244                                   | 175.820 | 170.278 | 2 559.650 | 31.86 | 39.620    |
| 5  | 464.296                                   | 235.404 | 183.456 | 2 606.784 | 42.12 | 58.739    |
| 6  | 226.062                                   | 461.112 | 92.458  | 1 644.820 | 23.50 | 33.595    |
| 7  | 700.734                                   | 350.436 | 213.546 | 3 846.522 | 58.54 | 62.098    |
| 8  | 468.750                                   | 224.028 | 190.476 | 3 253.904 | 46.24 | 54.287    |
| 9  | 461.112                                   | 229.246 | 178.862 | 2 740.704 | 36.76 | 68.394    |

## 2.4 统计分析

**2.4.1 主成分分析** 运用 SPSS 19.0 统计软件对实验样品中上述 6 种指标成分含量进行主成分分析。

(1) KMO 和 Bartlett's 检验: Bartlett's 检验的  $P$  值为 0.000, 小于 0.001, 研究数据适合主成分分析。KMO 检验系数为 0.857, 大于 0.8, 说明本研究数据结构合理, 主成分分析的结果具有较好的实用性。

(2) 特征值、方差贡献率和因子载荷: 因子载荷矩阵见表 3, 特征值和方差贡献率结果见表 4, 碎石图见图 4。由载荷矩阵可知, 第 1 主成分反映实验样品中 6 种指标成分含量信息; 由表 4 可知, 第 1 主成分的特征值为 5.710, 大于 1, 可解释 95.167%

表 3 因子载荷矩阵

Table 3 Factor load matrix

| 成分   | 主因子 1 | 成分        | 主因子 1 |
|------|-------|-----------|-------|
| 甘草酸铵 | 0.990 | 黄芩苷       | 0.983 |
| 黄芪甲苷 | 0.988 | 芍药苷       | 0.973 |
| 甘草苷  | 0.986 | 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 | 0.933 |

的总数据变异, 可代表实验样品中 6 种指标成分含量 95.167% 的信息量; 由碎石图可知, 第 1 主成分的特征值远远高于其他主成分的特征值, 至第 2 主成分后, 特征值变化便趋于平缓。因此第 1 主成分包含了实验样品中 6 种指标成分质量浓度的绝大部分信息。

表 4 特征值和方差贡献率

Table 4 Eigenvalue and variance contribution rate

| 主成分 | 初始特征值 |         |           | 提取载荷平方和 |         |           |
|-----|-------|---------|-----------|---------|---------|-----------|
|     | 合计    | 方差贡献率/% | 积累方差贡献率/% | 合计      | 方差贡献率/% | 积累方差贡献率/% |
| 1   | 5.710 | 95.167  | 95.167    | 5.710   | 95.167  | 95.167    |
| 2   | 0.161 | 2.685   | 97.852    |         |         |           |
| 3   | 0.090 | 1.506   | 99.358    |         |         |           |
| 4   | 0.023 | 0.380   | 99.741    |         |         |           |
| 5   | 0.013 | 0.209   | 99.950    |         |         |           |
| 6   | 0.003 | 0.050   | 100.000   |         |         |           |

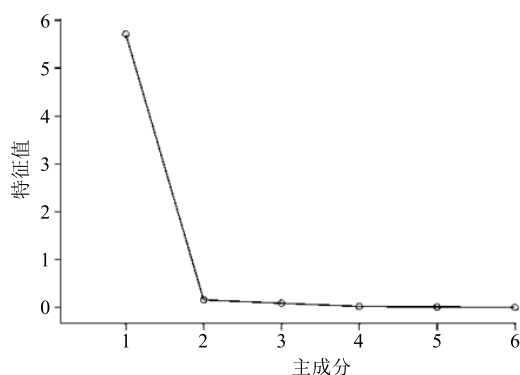


图 4 碎石图  
Fig. 4 Scree plot

(3) 综合得分 ( $Y$ ) 计算: 以提取的主成分的因子得分乘以相应主成分特征值的算术平方根, 计算得到各实验样品主成分得分, 各主成分得分和相应的方差贡献率乘积的和即为综合得分。因本实验第 1 主成分的特征值远远高于其他主成分的特征值, 包含了样品中 6 种指标成分含量的绝大部分信息 (95.167%), 故只需提取第 1 主成分。按照公式  $Y=2.3895 X_1 \times 0.95167$  ( $X$  为因子得分) 计算可得 9 个样品的综合得分。结果见表 5。

**2.4.2 正交试验方差分析** 以各试验样品主成分综合得分为因变量对正交试验结果进行分析, 结果见表 5、6。由方差分析结果可知, 各因素对益艾康水煎液影响的显著性为  $A>C>B$ , 煎煮次数 ( $A$ )  $P$  值为  $0.005<0.01$ , 煎煮时间 ( $B$ ) 与加水量 ( $C$ ) 的  $P$  值分别为 0.046、0.033, 二者均小于 0.05, 说明煎煮次数、煎煮时间、加水量对 YAKC 的水提工艺均有显著影响。由表 5 可知主成分得分平均值 ( $K$ ) 随着煎煮次数和加水量的增加而增加, 随着煎煮时间的增加而降低。

**2.4.3 多重比较分析及各因素水平选择** 对煎煮次数 ( $A$ )、煎煮时间 ( $B$ )、加水量 ( $C$ ) 3 个影响因素的不同水平进行多重比较分析, 根据分析结果选

表 5 正交试验设计及试验结果

Table 5 Orthogonal test design and test results

| 试验号   | 因素     |        |        |        | 综合得分   |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|       | A/次    | B/h    | C/倍    | D (误差) |        |
| 1     | 1      | 1      | 1      | 1      | -2.643 |
| 2     | 1      | 2      | 2      | 2      | -2.280 |
| 3     | 1      | 3      | 3      | 3      | -2.560 |
| 4     | 2      | 1      | 2      | 3      | 0.178  |
| 5     | 2      | 2      | 3      | 1      | 1.552  |
| 6     | 2      | 3      | 1      | 2      | -1.677 |
| 7     | 3      | 1      | 3      | 2      | 3.950  |
| 8     | 3      | 2      | 1      | 3      | 1.880  |
| 9     | 3      | 3      | 2      | 1      | 1.599  |
| $K_1$ | -7.483 | 1.485  | -2.440 | 0.508  |        |
| $K_2$ | 0.053  | 1.152  | -0.503 | -0.007 |        |
| $K_3$ | 7.429  | -2.638 | 2.942  | -0.502 |        |
| $R$   | 14.912 | 4.123  | 5.382  | 1.010  |        |

表 6 方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis

| 来源     | 离均差平方和 | 自由度 | 方差     | $F$ 值   | $P$ 值 |
|--------|--------|-----|--------|---------|-------|
| A      | 37.056 | 2   | 18.528 | 218.488 | 0.005 |
| B      | 3.498  | 2   | 1.749  | 20.627  | 0.046 |
| C      | 4.956  | 2   | 2.478  | 29.221  | 0.033 |
| D (误差) | 0.170  | 2   | 0.085  |         |       |

择因素水平。

(1) 煎煮次数多重比较分析结果及水平选择: 煎煮次数多重比较分析结果见表 7。结果表明, 煎煮 2 次与煎煮 1 次比较,  $P$  值为 0.009; 煎煮 3 次与煎煮 2 次比较,  $P$  值为 0.009, 说明三者差异非常显著, 因  $K_3>K_2>K_1$ , 因此煎煮次数选择 3 次。

(2) 煎煮时间多重比较分析结果及水平选择: 煎煮时间多重比较分析结果见表 8。结果表明煎煮

表 7 煎煮次数多重比较分析结果

Table 7 Results of multiple comparison analysis of extracting times

| (I) 煎煮次数 (次) | (J) 煎煮次数 (次) | 平均差 (I~J) | 标准误差     | $P$ 值 | 95%置信区间  |          |
|--------------|--------------|-----------|----------|-------|----------|----------|
|              |              |           |          |       | 上限值      | 下限值      |
| 1            | 2            | -2.512 0  | 0.237 77 | 0.009 | -3.535 0 | -1.488 9 |
|              | 3            | -4.970 2  | 0.237 77 | 0.002 | -5.993 3 | -3.947 2 |
| 2            | 1            | 2.512 0   | 0.237 77 | 0.009 | 1.488 9  | 3.535 0  |
|              | 3            | -2.458 2  | 0.237 77 | 0.009 | -3.481 3 | -1.435 2 |
| 3            | 1            | 4.970 2   | 0.237 77 | 0.002 | 3.947 2  | 5.993 3  |
|              | 2            | 2.458 2   | 0.237 77 | 0.009 | 1.435 2  | 3.481 3  |

表 8 煎煮时间多重比较分析结果

Table 8 Results of multiple comparison analysis of extracting time

| (I) 煎煮时间 (h) | (J) 煎煮时间 (h) | 平均差 (I~J) | 标准误差     | P 值   | 95%置信区间  |          |
|--------------|--------------|-----------|----------|-------|----------|----------|
|              |              |           |          |       | 上限值      | 下限值      |
| 1            | 2            | 0.111 1   | 0.237 77 | 0.686 | -0.912 0 | 1.134 1  |
|              | 3            | 1.374 6   | 0.237 77 | 0.029 | 0.351 6  | 2.397 6  |
| 2            | 1            | -0.111 1  | 0.237 77 | 0.686 | -1.134 1 | 0.912 0  |
|              | 3            | 1.263 5   | 0.237 77 | 0.034 | 0.240 5  | 2.286 6  |
| 3            | 1            | -1.374 6  | 0.237 77 | 0.029 | -2.397 6 | -0.351 6 |
|              | 2            | -1.263 5  | 0.237 77 | 0.034 | -2.286 6 | -0.240 5 |

1 h 与煎煮 2 h 比较,  $P$  值为 0.686, 大于 0.05, 说明二者差异不显著; 煎煮 2 h 与煎煮 3 h 比较,  $P$  值为 0.034, 说明二者差异性较显著, 因  $K_1 > K_2 > K_3$ , 并且煎煮 1 h 更加节省成本, 因此煎煮时间选择 1 h。

(3) 加水量多重比较分析结果及水平选择: 加水量多重比较分析结果见表 9。结果表明加水量 4

倍与 6 倍之间  $P$  值为 0.113, 二者之间不存在显著性差异; 6 倍与 8 倍之间的  $P$  值为 0.040 小于 0.05, 二者之间存在较显著差异, 因  $K_3 > K_2 > K_1$  因此加水量选择药材量的 8 倍。

优选出的最佳提取工艺条件为  $A_3B_1C_3$ , 即药材加 8 倍量水, 煎煮提取 3 次, 每次 1 h。

表 9 加水量多重比较分析结果

Table 9 Results of multiple comparison analysis of water addition

| (I) 加水量 (倍) | (J) 加水量 (倍) | 平均差 (I-J) | 标准误差     | P 值   | 95%置信区间  |          |
|-------------|-------------|-----------|----------|-------|----------|----------|
|             |             |           |          |       | 下限值      | 上限值      |
| 4           | 6           | -0.646 2  | 0.237 77 | 0.113 | -1.669 2 | 0.376 9  |
|             | 8           | -1.794 4  | 0.237 77 | 0.017 | -2.817 4 | -0.771 4 |
| 6           | 4           | 0.646 2   | 0.237 77 | 0.113 | -0.376 9 | 1.669 2  |
|             | 8           | -1.148 2  | 0.237 77 | 0.040 | -2.171 3 | -0.125 2 |
| 8           | 4           | 1.794 4   | 0.237 77 | 0.017 | 0.771 4  | 2.817 4  |
|             | 6           | 1.148 2   | 0.237 77 | 0.040 | 0.125 2  | 2.171 3  |

## 2.5 工艺验证

按处方比例, 平行称取黄芪、甘草、黄芩、白芍等药材共 3 份 (每份 111.5 g), 根据优选出的最佳提取工艺条件进行验证实验, 结果 5 种成分质量浓度 RSD 值均在 3.0% 之内, 3 份样品主成分综合得分平均值为 4.111, RSD 为 0.44%, 说明该工艺有效成分提取效果好, 结果稳定, 切实可行。

## 3 讨论

YAKC 为中药复方, 其成分复杂, 理化性质各异, 以单一指标成分含量为指标优选工艺, 涵盖面较窄, 难以代表制剂内在质量。黄芪、甘草、黄芩、白芍均为方中主要药物, 故本实验选择此 4 味药物中所含有效成分黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、甘草苷、甘草酸铵、黄芩苷、芍药苷为指标进行研究, 以期更充分代表制剂内在质量, 从而优选出较佳水提工艺。根据待测成分性质, 本实验选用不同

填料色谱柱, 不同检测器, 不同色谱条件测定 6 个成分的含量, 其精密度、重复性、稳定性均达到相应要求, 保证了测量结果的准确性。

分别以 6 个成分质量浓度为因变量进行正交试验方差分析和多重比较分析, 结果分别以甘草苷、甘草酸铵、黄芩苷含量为因变量优选的工艺结果为  $A_3B_1C_3$ ; 以芍药苷含量为因变量优选的工艺结果为  $A_3B_2C_3$ ; 分别以黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量为因变量优选的工艺结果为  $A_3B_2C_2$ 。因结果不尽相同, 为选择提取工艺带来困难。

主成分分析法可将数据的多元变量抽取少量主成分, 从而在能保留原始数据中绝大多数信息的情况下, 使用尽可能少的主成分来表征复杂的原始数据, 既能够简化数据结构, 利于分析, 又避免统计分析中的主观加权<sup>[18-19]</sup>, 分析结果有更高的可信性和说服力。

# 参考文献

- [1] 唐琪, 卢洪洲. 中国消除艾滋病流行面临的挑战 [J]. 微生物与感染, 2019, 14(3): 129-136.
- [2] 李艳萍, 和丽生, 赵远, 等. 治疗艾滋病中药复方制剂研究现状与新思路 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 303-307.
- [3] 钱洁玉, 桑锋, 李杰, 等. 益艾康含药血清对人 NK-92MI 细胞增殖及其效应分子颗粒酶穿孔素基因表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 873-875.
- [4] 刘延泽, 许利嘉, 肖伟, 等. 中医药抗艾滋病优势的科学与前景展望 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1672-1684.
- [5] 宋娜丽, 段呈玉, 李艳萍, 等. 扶正抗毒制剂治疗 HIV 感染者 188 例临床疗效观察 [J]. 云南中医中药杂志, 2011, 32(10): 42-43.
- [6] 邱廷山, 王学芝. 益艾康胶囊治疗艾滋病的临床观察 [J]. 中医学报, 2011, 26(1): 9-10.
- [7] 徐立然, 李发枝, 何英, 等. 益艾康胶囊治疗 HIV/AIDS 病人 60 个月 CD4<sup>+</sup>T 细胞计数和病毒载量临床观察 [J]. 中国艾滋病性病, 2010, 16(3): 231-233.
- [8] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 954-960.
- [9] 全欣. 黄芪主要活性成分的药理作用 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1246-1249.
- [10] 梁连生, 余静. 黄芪中黄酮化合物的药理作用 [J]. 中西医结合脑血管病杂志, 2005, 3(12): 1085-1086.
- [11] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [12] 曲中堂, 项少保. 甘草甜素的药理作用研究动态 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2568-2570.
- [13] 肖明中, 胡爱萍. 甘草的药理作用及其用于艾滋病的研究进展 [J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(12): 48-50.
- [14] 张育贵, 张淑娟, 边甜甜, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3735-3740.
- [15] 陈冉, 王婷婷, 李开铃, 等. 免疫调节抗病毒中药的特性与应用 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1412-1426.
- [16] 王慧, 周红潮, 张旭, 等. 黄芩苷药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(4): 955-958.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [18] 汪露露, 何丹丹, 王满, 等. 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 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 278-282.
- [19] 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.