

星点设计效应面法优化赶山鞭总黄酮提取工艺及提取物指纹图谱研究

井中旭¹, 刘雨薇², 姜海波², 刘焱南², 秦国昭², 冯宇飞^{2*}

1. 黑龙江省中医药管理局, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 优化赶山鞭总黄酮的提取工艺, 建立赶山鞭总黄酮提取物的指纹图谱。**方法** 通过单因素实验研究提取时间、提取次数、乙醇体积分数、料液比对赶山鞭中总黄酮含量及金丝桃苷的转移率的影响; 以此为基础, 采用 Central-Composite 试验设计原理进行 3 因素 5 水平试验设计和响应面分析法优化提取工艺。采用比色法, 于 500 nm 处测定药材中以芦丁计总黄酮的含量, 采用 HPLC 法测定总黄酮中金丝桃苷的含量, 计算金丝桃苷的转移率。采用 HPLC 法建立赶山鞭总黄酮提取物的指纹图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2012 年版)》进行相似度评价, 确定共有峰, 并采用 SPSS 22.0 软件进行聚类分析和主成分分析。**结果** 赶山鞭总黄酮的最佳提取条件为以 65%乙醇, 料液比 1:10, 提取 120 min, 提取 2 次。建立的赶山鞭药材总黄酮提取物的 HPLC 指纹图谱有 15 个共有指纹峰, 指纹图谱的相似度分析结果显示相似度均大于 0.61, 表明 10 批样品的化学成分一致性较好, 但各成分含量存在差异, 对部分色谱峰进行了归属指认分别是金丝桃苷、槲皮素、芦丁、山柰酚。聚类分析可知欧氏距离为 25 时, 10 批样品可聚为 2 类, S1 与 S7 为一类, 其余聚为一类; 欧氏距离为 15 时, 可聚为 5 类, 即 S3、S5、S6、S8~S10 聚为一类, S1、S2、S4、S7 各为一类。经主成分分析, 4 个主成分因子的累积方差贡献率为 88.659%, 以 S5 样品的主成分因子综合得分最高。**结论** 响应面法优化的赶山鞭总黄酮提取纯化条件简单可靠, 建立的 HPLC 指纹图谱能够简便、高效地反映赶山鞭总黄酮提取物中大部分化学成分信息, 为赶山鞭药材的质量评价奠定基础。

关键词: 赶山鞭; 总黄酮; 提取; 工艺优化; 星点设计效应面法; 指纹图谱; 金丝桃苷; 槲皮素; 芦丁; 山柰酚

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)16-5010-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.010

Optimization of extraction process of total flavonoids from *Hypericum attenuatum* by central composite design response surface method and fingerprint research

JING Zhong-xu¹, LIU Yu-wei², JIANG Hai-bo², LIU Yan-nan², QIN Guo-zhao², FENG Yu-fei²

1. Heilongjiang Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To optimize the extraction process of the total flavonoids of Ganshanbian (*Hypericum attenuatum*) and to establish the fingerprint profile of the total flavonoids of *H. attenuatum*. **Methods** Single-factor experiments were conducted to study the effects of solvent extraction time, extraction times, extraction concentration, and material-to-liquid ratio on the extraction rate and transfer rate of hyperoside of total flavonoids in *H. attenuatum*, on this basis, the central-composite design experimental design principle is used to carry out a three-factor five-level experimental design and response surface analysis to optimize the extraction process; on the basis of obtaining the best extraction method, on the basis of the best extraction method, the purification method of the total flavonoids extract of *H. attenuatum* was optimized by using the type of resin, the loading concentration of the extract, the loading volume of the extract, the elution concentration and the elution volume as the investigating indexes. After that, the fingerprints of the total flavonoids extract of *H. attenuatum* were established by HPLC, and SPSS 22.0 software was used for cluster analysis and principal component analysis. **Results** The best extraction conditions were 80% ethanol, 1:10 ratio, 2 h per

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174232); 黑龙江省自然科学基金优秀青年项目 (YQ2019H031); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目 (2018 年); 黑龙江省博士后研究人员落户黑龙江科研启动资助项目 (2020 年)

作者简介: 井中旭 (1983—), 助理研究员, 硕士, 主要从事中药产业化研究。Tel: (0451)87977001 E-mail: xuri_00001@163.com

***通信作者:** 冯宇飞 (1982—), 女, 教授, 从事中药新剂型和新技术研究。Tel: (0451)87266893 E-mail: fuf-002@163.com

extraction, extract 2 times. The HPLC fingerprints of the total flavonoids of *H. attenuatum* were determined to have 15 peaks common to all chromatograms, and the similarity analysis of the fingerprints showed that the similarity was greater than 0.61, the peaks were identified as auriculose, quercetin, rutin and sannaphene, indicating that the chemical composition of the 10 batches of samples was consistent, but there were differences in the content of each component. The clustering analysis showed that when the Euclidean distance was 25, the 10 batches of samples could be clustered into 2 classes, S1 and S7 into one class, and the rest into one class; when the Euclidean distance was 5, they could be clustered into 5 classes, namely S3, S5, S6, S8—S10 into one class, and S1, S2, S4, S7 into one class each. After the principal component analysis, the cumulative variance contribution of the four principal component factors was 88.659%, with the highest overall score of the principal component factors for S5 samples. **Conclusions** The extraction and purification conditions of the total flavonoids of *H. attenuatum* were optimized by response surface analysis. The HPLC fingerprint was able to easily and efficiently reflect most of the chemical information in the extract of *H. attenuatum* Choisy, which could provide reference for the quality evaluation and related study of *H. attenuatum*.

Key words: *Hypericy attenuatum* Choisy; total flavonoids; extraction; process optimization; central composite design response surface method; fingerprinting; hyperoside; quercetin; rutin; kaempferol

赶山鞭 *Hypericy attenuatum* Choisy 收载于《现代中药学大辞典》^[1]、《全国中草药汇编》^[2]、《中国植物志》^[3]，又名乌腺金丝桃，俗称为稳心草，为民间常用中草药，民间常用全草代茶饮，治疗心脏病，在我国植物资源广泛，具有很大的药用开发价值。现代研究表明赶山鞭具有抗心律失常、抗心肌缺血、抗肿瘤、抗抑郁、抑菌等作用^[4]。课题组前期药效学研究结果表明，赶山鞭总黄酮类成分可拮抗 CaCl_2 所致的大鼠心律失常；在离体大鼠心脏功能试验中，总黄酮成分可提高离体心脏心肌收缩力，减慢离体心脏心率，使心律更加稳定规整，该部位是赶山鞭抗心律失常的主要活性部位^[5]。鉴于此，对赶山鞭总黄酮的最佳提取工艺进行优化，建立赶山鞭总黄酮的指纹图谱，对赶山鞭物质基础研究及质量标准的制定，具有十分重要的意义。本研究首先采用星点设计效应面法对不同来源的 10 批赶山鞭药材中的总黄酮进行了提取，对获得的 10 批赶山鞭药材总黄酮提取物建立了 HPLC 指纹图谱，并结合聚类分析、主成分分析对其质量进行评价，为赶山鞭药材的质量评价奠定基础。

1 药材、仪器与试药

赶山鞭全草，经黑龙江中医药大学药学教研室王振月教授鉴定为藤黄科金丝桃属植物赶山鞭 *H. attenuatum* Choisy^[6]。S1~S10 批次的产地及采收时间分别为黑龙江密山市（2015 年 7 月）、黑龙江海林市（2015 年 7 月）、黑龙江省哈尔滨市（2016 年 7 月）、黑龙江海林市（2016 年 7 月）、吉林省吉林市（2014 年 7 月）、吉林省吉林市（2015 年 7 月）、黑龙江密山市（2016 年 7 月）、黑龙江省牡丹江市（2015 年 7 月）、黑龙江省大兴安岭地区（2016 年 7 月）、黑龙江省呼玛县（2016 年 7 月）。

安捷伦 1260 型 HPLC 高效液相色谱仪，DAD 二极管阵列检测器，美国安捷伦公司；Xbrige C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm ），美国 Waters 公司。对照品金丝桃苷（批号 111521-201507）、金丝桃素（批号 10121-201403）、槲皮素（批号 100081-201610）、山柰酚（批号 520-18-3）、芦丁（批号 153-18-4），均购自中国食品药品检定研究院，质量分数均>98.0%；乙腈，色谱纯，美国 Fisher 公司；甲酸，HPLC 级，科密欧化学试剂有限公司；娃哈哈纯净水，杭州娃哈哈集团。

2 方法与结果

2.1 赶山鞭总黄酮含量测定方法的建立

2.1.1 赶山鞭药材的处理及总黄酮提取液供试品溶液的制备 精密称取药材粉末约 2.0 g（过 24 目筛）经 100 mL 醋酸乙酯超声提取后蒸干，甲醇复溶，取上清滤过，并定容至 20 mL 量瓶中，得药材供试品溶液。精密称取赶山鞭药材粉末约 15 g，过 24 目筛，以适宜体积分数的乙醇、料液比、回流时间提取，提取液定容至 50 mL，得到赶山鞭总黄酮提取液供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定一定量芦丁对照品置于 100 mL 量瓶中，用 60%乙醇将其溶解后定容至 100 mL，得到质量浓度为 0.2 mg/mL 的芦丁对照品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密量取芦丁对照品溶液 0.2、0.8、1.0、1.6、1.8 mL，30%乙醇稀释至 2.6 mL，加入 5%亚硝酸钠溶液 0.2 mL，混匀后放置 6 min，再加入 10%亚硝酸铝溶液 0.2 mL，摇匀放置 6 min，加入 4%氢氧化钠溶液 2 mL，放置 15 min。以试剂为空白，500 nm 处测定吸光度（*A*）值^[7]。所得标准曲线的回归方程为 $A=2.293\ 8\ C+0.180\ 8$ ， $r=$

0.999 6, 结果表明芦丁在 0.008~0.072 mg/mL 线性关系良好。

2.1.4 精密度试验 吸取 0.20 mg/mL 芦丁对照品溶液 1.0 mL, 按照“2.1.3”项方法操作, 连续 6 次重复, 测得 *A* 值的 RSD 为 0.9%, 结果表明检测仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 准确称取 6 份赶山鞭药材粉末(S5)各 15 g, 按照“2.1.1”项下方法制备赶山鞭总黄酮提取液, 按“2.1.3”项方法测定 *A* 值的 RSD 为 1.3%, 说明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 准确称取赶山鞭药材粉末(S5) 15 g, 按照“2.1.1”项下方法制备赶山鞭总黄酮提取液, 按“2.1.3”项方法每 20 min 测 1 次 *A* 值, 持续 180 min, 测得 *A* 值的 RSD 为 1.1%, 表明供试品溶液在 180 min 内稳定。

2.1.7 加样回收率试验 准确称取 6 份赶山鞭药材粉末(S5)各 15 g, 按照“2.1.1”项下方法制备赶山鞭总黄酮提取液, 分别准确吸取 1.0 mL 置于加入了 0.20 mg/mL 芦丁对照品溶液 1 mL 的 25 mL 比色管中, 按“2.1.3”项方法测定样品总黄酮含量, 计算芦丁加样回收率, 结果平均加样回收率为 98.08%, RSD 为 1.2%。

2.1.8 样品测定 准确吸取各待测的 1.0 mL 赶山鞭总黄酮提取液置于 25 mL 比色管中, 按“2.1.3”项方法测定样品总黄酮含量。

2.2 金丝桃苷含量测定方法的建立

2.2.1 对照品溶液的制备 金丝桃苷对照 10.57 mg, 甲醇定容, 得质量浓度为 0.1 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 同“2.1.1”项下。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Xbrige C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(68:32); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长 360 nm; 进样量 10 μL。该色谱条件下, 金丝桃苷色谱峰无干扰, 所得色谱图见图 1。

2.2.4 线性关系考察 取金丝桃苷对照品溶液适量, 分别加甲醇稀释, 按“2.2.3”项下色谱条件测定, 以进样量为横坐标(*X*), 峰面积为纵坐标(*Y*), 得金丝桃苷的线性回归方程 $Y=12\ 907\ X+165.2$, $R^2=0.994\ 7$, 线性范围为 0.01~2.0 g/L。

2.2.5 精密度试验 取赶山鞭(S5)总黄酮提取液供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件进样 6 次, 计算金丝桃苷峰面积的 RSD 为 0.4%。

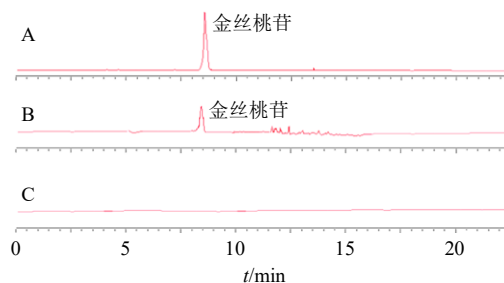


图 1 金丝桃苷对照品 (A) 和赶山鞭总黄酮样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of hyperoside reference substance (A) and total flavonoids of *H. attenuatum* (B)

2.2.6 稳定性试验 取赶山鞭(S5)总黄酮提取液供试品溶液适量, 分别于放置 0、8、10、16、20、24 h 后按“2.2.3”项下色谱条件测定, 计算金丝桃苷峰面积的 RSD 为 0.5%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验 取赶山鞭药材(S5), 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份赶山鞭总黄酮提取液供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件测定, 结果金丝桃苷平均质量分数 0.4%, RSD 为 1.4%, 说明建立的方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定金丝桃苷含量的赶山鞭(S5) 6 份, 精密加入 0.4 mg/mL 金丝桃苷对照品溶液 1 mL, 按“2.1.1”项下方法制备总黄酮供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件测定, 结果平均加样回收率为 97.19%, RSD 为 1.7%。

2.2.9 样品测定 取各待测的赶山鞭药材及提取物供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件测定并计算各赶山鞭总黄酮提取物中金丝桃苷的转移率。

2.3 单因素实验考察赶山鞭总黄酮提取工艺参数

2.3.1 提取温度的影响 准确称取 15 g 赶山鞭药材粉末, 在固定提取时间、提取次数、乙醇体积分数及料液比的前提下, 改变溶剂提取温度(30、40、50、60、70、80 °C)进行单因素实验, 按照“2.1”“2.2”项操作方法测定, 计算提取物中总黄酮的含量(以芦丁计)及金丝桃苷的转移率, 考察提取温度对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响。每个实验重复 3 次。提取温度对总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响见表 1, 随着温度的增加, 提取物中总黄酮含量及金丝桃苷转移率大体呈现上升趋势, 在 70 °C 时达到峰值。

2.3.2 乙醇体积分数的影响 准确称取 15 g 赶山鞭药材粉末, 在固定其他考察因素的条件下, 改变乙

表 1 提取温度对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响
Table 1 Effect of extraction temperature on total flavone content of flavone and transfer rate of hyperoside

提取温度/℃	总黄酮/%	金丝桃苷转移率/%
30	3.45	29.67
40	4.56	35.76
50	5.60	42.48
60	8.99	53.97
70	10.88	62.54
80	9.09	58.67

醇体积分数(30%、50%、60%、80%、90%)进行单因素试验,按照“2.1”“2.2”项操作方法测定,计算提取物中总黄酮的含量(以芦丁计)及金丝桃苷的转移率,考察乙醇体积分数对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响,每个实验重复3次。乙醇体积分数对总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响见表2,因此,选用30%~90%的范围进行乙醇体积分数的优选。随着乙醇体积分数增加,提取物中总黄酮含量及金丝桃苷转移率大体呈现上升趋势,在80%乙醇时达到峰值。

表 2 乙醇体积分数对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响

Table 2 Effect of ethanol concentration on total flavone content of flavone and transfer rate of hyperoside

乙醇/%	总黄酮/%	金丝桃苷转移率/%
30	2.54	30.54
50	4.32	40.67
60	11.02	63.49
80	10.07	58.58
90	9.71	45.34

2.3.3 提取时间的影响 准确称取15 g赶山鞭药材粉末,在固定其他考察因素条件下,改变提取时间(30、60、90、120、180 min)进行单因素实验,按照“2.1”“2.2”项操作方法测定,计算提取物中总黄酮的含量(以芦丁计)及金丝桃苷的转移率,考察提取时间对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响,每个实验重复3次。提取时间对总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响见表3,随着回流提取时间的延长,在120 min时达到峰值。

2.3.4 料液比的影响 准确称取15 g的赶山鞭药材粉末,在固定其他考察因素条件下,改变料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25)进行单因素

表 3 提取时间对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响
Table 3 Effect of extraction time on total flavone content of flavone and transfer rate of hyperoside

提取时间/min	总黄酮/%	金丝桃苷转移率/%
30	1.34	20.49
60	4.45	27.65
90	7.34	40.88
120	11.20	64.78
180	10.02	55.08

实验,按照“2.1”“2.2”项操作方法测定,计算提取物中总黄酮的含量(以芦丁计)及金丝桃苷的转移率,考察料液比对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响,每个实验重复3次。料液比对总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响见表4,随着料液比的增加,总黄酮含量及金丝桃苷转移率呈现先增加后降低的趋势,其中料液比1:10达到峰值。

2.3.5 提取次数的影响 准确称取15 g赶山鞭药材粉末,在固定其他考察因素条件下,改变提取次数(1、2、3次)进行单因素实验,按照“2.1”“2.2”项操作方法测定,计算提取物中总黄酮含量(以芦丁计)及金丝桃苷的转移率,考察提取次数对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响,每个实验重复3次。提取次数对总黄酮含量及金丝桃苷转移率无显著影响,选择提取次数为2次。

综上分析,选择80%乙醇,料液比1:10,回流提取120 min,为中心点进行响应面实验设计。

表 4 料液比对赶山鞭总黄酮含量及金丝桃苷转移率的影响
Table 4 Effect of ratio of material to liquid on total flavone content of flavone and transfer rate of hyperoside

料液比	总黄酮/%	金丝桃苷转移率/%
1:5	6.89	40.57
1:10	11.03	69.65
1:15	9.98	52.58
1:20	8.76	49.79
1:25	8.05	43.32

2.4 响应面法优化赶山鞭总黄酮最佳提取工艺

2.4.1 响应面实验 在单因素考察的基础上,利用Central-Composite 试验设计原理,以提取温度为70℃,总黄酮含量(Y_1)和金丝桃苷的转移率(Y_2)为考察指标,设计甲醇体积分数(X_1)、料液比(X_2)和回流时间(X_3)3因素5水平中心组合试验,上、下区域各取1水平值以(-1.682、-1、0、+1、+1.682)

进行编码, 作为响应曲面试验设计水平, 应用 Design-Expert 11 统计软件设计 3 因素 5 水平的响应

面试验对提取工艺进行寻优, 以确定最优的提取方法, 试验安排及结果见表 5。

表 5 响应面实验设计及结果

Table 5 Central composite design arrangement and result

试验号	$X_1/\%$	X_2	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	试验号	$X_1/\%$	X_2	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	56.08 (-1)	0.09 (-1)	1.41 (-1)	6.03	35.45	11	65 (0)	0.08 (-1.682)	2	3.04	30.65
2	73.92 (+1)	0.09	1.41	6.21	36.78	12	65	0.12 (+1.682)	2	3.08	32.11
3	56.08	0.11 (+1)	1.41	2.89	29.62	13	65	0.10	1 (-1.682)	2.23	19.87
4	56.08	0.11	2.59 (+1)	6.34	35.02	14	65	0.10	3 (+1.682)	2.89	20.61
5	73.92	0.11	2.59	5.88	40.32	15	65	0.10	2	11.20	72.57
6	73.92	0.09	2.59	6.43	41.20	16	65	0.10	2	11.07	72.01
7	56.08	0.09	2.59	5.99	41.21	17	65	0.10	2	11.31	73.89
8	73.92	0.11	1.41	6.09	37.90	18	65	0.10	2	11.19	71.32
9	50 (-1.682)	0.10 (0)	2 (0)	2.95	19.45	19	65	0.10	2	11.32	73.72
10	80 (+1.682)	0.10	2	3.12	33.21	20	65	0.10	2	11.37	73.96

2.4.2 模型拟合及方差分析 采用 Design-Expert 8.0.6 软件, 以 Y_1 、 Y_2 为响应参数对因素 X_1 、 X_2 、 X_3 进行 2 次多项式回归方程拟合, 得拟合方程分别为 $Y_1=11.14+0.27 X_1-0.25 X_2+0.33 X_3+0.27 X_1 X_2+0.38 X_2 X_3-2.19 X_1^2-2.19 X_2^2-2.36 X_3^2$ ($R^2=0.828 2$, $P<0.000 1$), $Y_2=72.46+2.79 X_1-0.68 X_2+1.41 X_3+1.53 X_1 X_2-0.54 X_1 X_3-0.30 X_2 X_3-13.5 X_1^2-11.72 X_2^2-15.66 X_3^2$ ($R^2=0.911 4$, $P<0.000 1$), 从拟合方程的 R^2 与 P 可知, 2 次多项式拟合较好, 可用此模型对总黄酮提取工艺进行预测和分析。 Y_1 、 Y_2 回归方程的方差分析见表 6。结果发现 Y_1 、 Y_2 模型项均 $P<0.000 1$, 说明回归方程的关系是极显著的。对于 Y_1 、 Y_2 模型方程, X_1 、 X_2 、 X_3 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 都是显著项, 是 Y_1 、 Y_2 的显著影响因素, 交互影响因素 3D 效果图与等高线图见图 2。

2.4.3 响应面优化与预测 结合试验要求, 公共区

域中响应面值较高部分为最佳的区域, 并选择最佳范围, 确定最佳范围是 $50 \leq X_1 \leq 80$, $1:8 \leq X_2 \leq 1:12$, $1 \leq X_3 \leq 3$ 。采用 Design-Expert 11.0 软件优化考察因素范围。最终确定赶山鞭总黄酮的最优提取工艺为 $X_1=65\%$, $X_2=1:10$, $X_3=2 h$, 此时 $Y_1=(11.24 \pm 0.11)\%$, $Y_2=(64.23 \pm 6.05)\%$ 。

2.4.4 优化后的处方验证 分别精密吸取 10 批样品的供试品溶液适量, 按“2.2.3”项下色谱条件测定, 结果见表 7。综上所述, 确定赶山鞭总黄酮的最优处方工艺为乙醇浓度为 65%, 料液比为 1:10, 提取时间为 120 min。按该工艺条件提取 3 批赶山鞭总黄酮样品, 将检测结果与拟合方程的预测值进行对比, 按公式 [相对偏差=(预测值-实测值)/预测值] 计算相对偏差, 以评估模型方程的可靠性。各批样品总黄酮含量预测值为 11.14%, 实测值 11.17%、11.21%、11.25%、11.24%、11.38%、11.30%、11.21%、11.19%、11.22%、11.27%, 实测平均值

表 6 回归模型的方差分析

Table 6 Analysis of variance of regression model

方差来源	自由度	总黄酮含量			金丝桃苷转移率			方差来源	自由度	总黄酮含量			金丝桃苷转移率		
		平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值			平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值
模型	9	188.97	5.36	0.007 5	6 983.48	11.42	0.000 4	$X_2 X_3$	1	1.17	0.30	0.596 8	0.696 2	0.01	0.921 4
X_1	1	0.97	0.25	0.629 1	105.97	1.56	0.240 1	X_1^2	1	69.38	17.70	0.001 8	2 628.03	38.69	<0.000 1
X_2	1	0.84	0.21	0.652 8	6.37	0.09	0.765 8	X_2^2	1	68.83	17.56	0.001 9	1 979.04	29.14	0.000 3
X_3	1	1.50	0.38	0.549 7	27.12	0.40	0.541 6	X_3^2	1	80.41	20.51	0.001 1	3 532.89	52.02	<0.000 1
$X_1 X_2$	1	0.56	0.14	0.712 9	18.79	0.28	0.610 4	残差	10	39.20			67.92		
$X_1 X_3$	1	1.45	0.37	0.557 3	2.33	0.03	0.856 7								

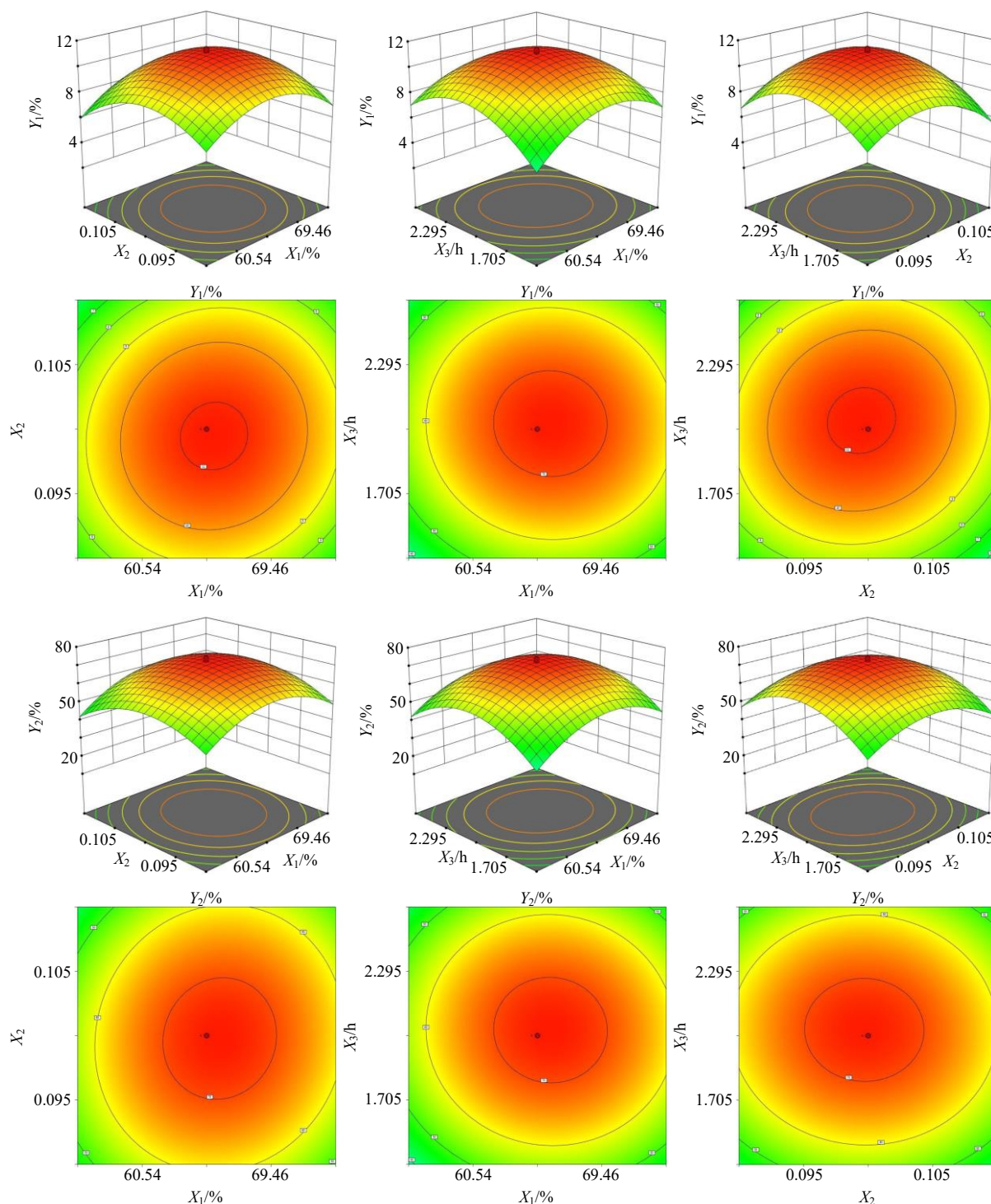


图 2 自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 与应变量 Y_1 、 Y_2 的效应面图

Fig. 2 Response surface diagram of independent variables X_1 , X_2 , X_3 and dependent variables Y_1 , Y_2

11.25%，实测值与预测值之间的相对偏差 $<5\%$ ，各批样品金丝桃苷转移率预测值为 64.80%，实测值 65.85%、65.78%、74.41%、68.18%、55.56%、59.10%、54.76%、67.44%、65.22%、65.96%，实测平均值 64.23%，实测值与预测值之间的相对偏差 $<5\%$ ，与总黄酮的含量结果是一致的。上述结果说明优选的

提取工艺稳定可行。

2.5 赶山鞭总黄酮提取物 HPLC 指纹图谱的建立

2.5.1 色谱条件 色谱柱为 Xbrige C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)；以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱：0~3 min, 15%乙腈；3~38 min, 15%~90%乙腈；38~43 min, 90%乙腈；43~

表 7 赶山鞭总黄酮的理化特征参数

Table 7 Physicochemical parameters of total flavonoids extract of *H. attenuatum*

批次	总黄酮/%	金丝桃苷/%		转移率/%
		总黄酮中	药材中	
S1	11.17	0.27	0.41	65.85
S2	11.21	0.25	0.38	65.78
S3	11.25	0.32	0.43	74.41
S4	11.24	0.30	0.44	68.18
S5	11.38	0.25	0.45	55.56
S6	11.30	0.26	0.44	59.10
S7	11.21	0.23	0.42	54.76
S8	11.19	0.29	0.43	67.44
S9	11.22	0.30	0.46	65.22
S10	11.27	0.31	0.47	65.96

46 min, 90%~15%乙腈; 46~50 min, 15%乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 35 °C; 检测波长 266 nm。

2.5.2 对照品溶液配制 取金丝桃苷、金丝桃素、槲皮素、山柰酚、芦丁对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成分别含 0.23、0.14、0.24、0.18、0.20 mg/mL 的对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备 取不同批次的赶山鞭样品 3 g 粉碎, 过 4 号筛, 65%乙醇 30 mL 回流提取 2 h, 将提取液浓缩至 10 mL 并蒸干, 用甲醇溶解, 作为赶山鞭总黄酮供试品溶液。

2.5.4 精密度试验 取同一赶山鞭总黄酮供试品溶液, 连续进样 6 次, 按“2.5.1”项色谱条件方法测定指纹图谱。应用相似度软件分别对共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果表明, 各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积无明显变化 ($RSD < 3\%$), 精密度合格, 符合指纹图谱的技术要求。

2.5.5 稳定性试验 取同一赶山鞭总黄酮供试品溶液, 按“2.5.1”项色谱条件方法, 分别在 0、4、8、12、16 h 连续进样 6 次, 测定指纹图谱。应用相似度软件分别对共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果表明, 各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积无明显变化 ($RSD < 3\%$), 供试品溶液在 24 h 内基本稳定, 符合指纹图谱的技术要求。

2.5.6 重现性试验 取同一批次赶山鞭药材样品 6 份, 按“2.1.1”项下方法制成 6 份赶山鞭总黄酮供

试品溶液, 再按选择好的色谱条件方法测定各指纹图谱。应用相似度软件分别对共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积进行统计。结果表明, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无明显变化 ($RSD < 3\%$), 方法重复性良好, 符合指纹图谱的技术要求。

2.5.7 指纹图谱的建立^[8]及部分色谱峰的归属 指认取 10 批赶山鞭总黄酮提取物, 按“2.5.1”项色谱条件进样测定, 记录色谱图, 将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 生成叠加图谱及对照图谱, 见图 3。以金丝桃苷、金丝桃素、槲皮素、山柰酚、芦丁作对照, 对指纹图谱中部分共有指纹峰进行了确认, 通过保留时间和在线紫外光谱, 确认各指纹峰见图 4, 选择的对照品金丝桃苷的吸收峰 (7 号峰), 其为赶山鞭的主要代表成分, 且稳定, 因此选其为参照物峰。

2.5.8 指纹图谱相似度计算 通过对 10 批赶山鞭

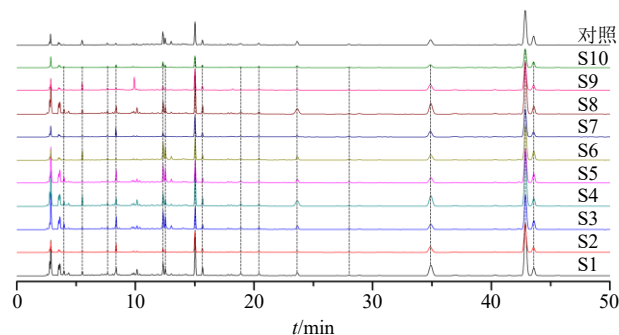
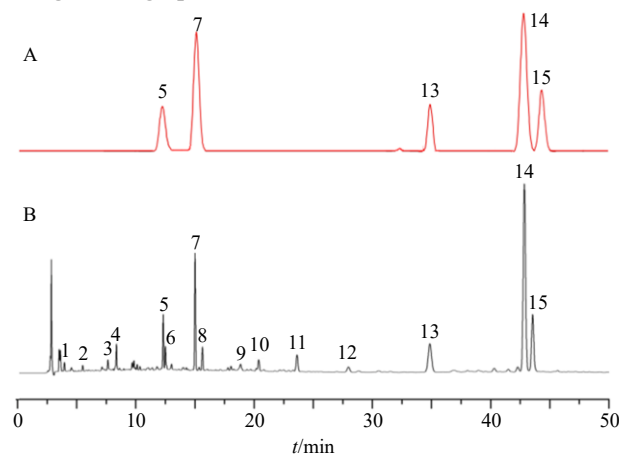


图 3 赶山鞭总黄酮提取物指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of total flavonoids of *H. attenuatum*

5-芦丁 7-金丝桃苷 13-槲皮素 14-山柰酚 15-金丝桃素
5-rutin 7-hyperoside 13-quercetin 14-kaempferol 15-hypericin

图 4 赶山鞭总黄酮典型图谱 (A) 与混合对照品 HPLC 图 (B)

Fig. 4 Typical chromatogram of total flavonoids extract of *H. attenuatum* (A) and HPLC of mixed reference substances (B)

提取物指纹图谱进行了测定, 各指纹图谱中共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积见表 8, 相似度计算结果见表 9, 比较其色谱图, 发现有 15 个指纹峰为各色谱图所共有, 确定为共有指纹峰, 不同批次赶山鞭提取物相似度大于 0.61, 相似度评价结果表明, 各批药材样品间质量存在差异。各共有峰相对峰面积的 RSD 相差较大, 提示不同产地赶山鞭药材的成分虽一致, 但含量存在差异。

2.6 聚类分析

以 10 批样品的 15 个共有峰的相对峰面积为原始数据, 采用 SPSS 21.0 软件, 以系统聚类法结合欧氏距离 (d) 为测度进行分析, 结果见图 5。由图 5 可知, $d=25$ 时, 10 批样品可聚为 2 类, S1, S7 为一类, 其余聚为一类; $d=15$ 时, 可聚为 5 类, 即 S3、S5、S6、S8、S9、S10 聚为一类, S1、S2、S4、S7 各为一类。

表 8 10 批赶山鞭提取物共有指纹峰保留时间及峰面积的 RSD

Table 8 RSD of shared fingerprint peak retention time and peak area of 10 batches of total flavonoids extract in *H. attenuatum*

峰号	t/min	峰面积										RSD/%	
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	保留时间	峰面积
1	3.55	977.20	895.80	713.35	829.09	913.67	885.64	793.74	721.32	889.54	769.54	3.73	8.55
2	5.74	164.47	151.29	155.31	170.22	171.31	164.32	193.80	190.21	173.04	168.77	4.81	8.01
3	8.28	199.01	189.76	206.05	207.37	202.08	207.68	202.76	188.65	197.62	193.89	1.70	2.62
4	8.35	868.08	972.64	860.31	830.98	845.54	889.56	918.81	840.32	887.73	894.43	0.05	4.92
5	12.31	1 046.95	1 141.26	1 230.35	1 194.29	1 198.11	1 259.72	1 152.89	1 098.43	1 108.39	1 178.14	1.23	6.04
6	12.50	815.36	713.48	737.80	840.88	802.73	700.85	763.80	729.40	805.56	781.45	0.05	5.97
7	15.01	2 121.07	2 280.89	2 186.56	2 237.22	1 923.41	1 947.68	2 058.28	1 999.57	2 087.65	2 090.67	0.31	6.09
8	15.63	727.43	848.26	739.78	767.07	803.88	737.82	720.95	726.89	759.67	800.59	0.29	5.59
9	18.86	383.66	380.40	424.69	431.37	449.47	412.82	414.73	397.50	404.67	419.87	1.90	5.07
10	20.39	397.35	362.62	361.65	311.86	327.39	319.26	309.10	323.98	348.78	318.67	0.65	8.26
11	23.62	554.92	550.48	565.97	549.97	589.47	524.15	568.41	525.89	548.98	558.97	0.37	2.95
12	28.90	175.56	177.85	154.72	159.92	163.03	203.56	180.43	168.76	172.59	196.78	1.26	8.43
13	34.92	1 035.36	989.37	1 162.90	1 111.21	1 063.94	1 251.80	1 069.47	1 074.87	1 092.90	1 046.69	0.36	6.81
14	42.91	5 866.76	5 716.16	5 692.01	5 091.11	4 743.34	4 908.56	5 899.10	5 056.47	5 129.67	4 896.59	0.62	8.07
15	43.62	1 617.61	1 621.37	1 895.06	1 862.64	1 771.80	1 856.34	1 938.95	1 699.07	1 832.45	1 730.01	0.17	6.42

表 9 10 批赶山鞭提取物指纹图谱相似度评价结果

Table 9 Evaluation results of similarity of fingerprints of 10 batches of extracts of *H. attenuatum*

样品	相似度										对照
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
S1	1.000	0.724	0.654	0.765	0.670	0.752	0.621	0.687	0.754	0.688	0.872
S2	0.724	1.000	0.612	0.631	0.718	0.827	0.873	0.701	0.778	0.671	0.886
S3	0.654	0.612	1.000	0.787	0.776	0.869	0.634	0.717	0.769	0.701	0.855
S4	0.765	0.631	0.787	1.000	0.674	0.669	0.727	0.689	0.735	0.696	0.793
S5	0.670	0.718	0.776	0.674	1.000	0.883	0.639	0.614	0.689	0.757	0.859
S6	0.752	0.827	0.869	0.669	0.883	1.000	0.629	0.712	0.704	0.682	0.811
S7	0.621	0.873	0.634	0.727	0.639	0.629	1.000	0.698	0.720	0.683	0.837
S8	0.687	0.701	0.717	0.689	0.614	0.712	0.698	1.000	0.698	0.726	0.798
S9	0.754	0.778	0.769	0.735	0.689	0.704	0.720	0.698	1.000	0.649	0.801
S10	0.688	0.671	0.701	0.696	0.757	0.682	0.683	0.726	0.649	1.000	0.845
对照	0.872	0.886	0.855	0.793	0.859	0.811	0.837	0.798	0.801	0.845	1.000

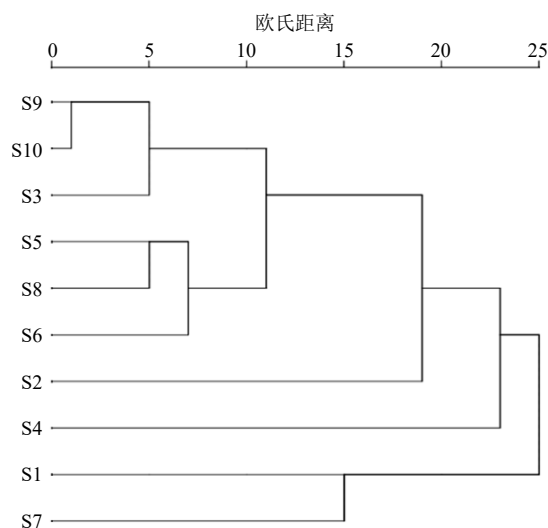


图 5 10 批样品聚类分析树状图

Fig. 5 Cluster analysis dendrogram of 10 batches of samples

2.7 主成分分析

以各共有峰的相对峰面积为指标,将 10 批样本 14 个共有峰(除峰 7 外)的相对峰面积进行标准化处理后,采用 SPSS 21.0 软件进行主成分分析,计算其特征值和方差贡献率,以特征值 >1 ,累积方差贡献率 85%左右为标准,得到 4 个主成分因子的特征值分别为 7.639、1.958、1.473、1.342,作为样本质量评价的主要因子;4 个主成分因子的累积方差贡献率为 88.659%,结果见表 10。

选择提取该 4 个主成分因子对 10 批样品进行评分,以方差贡献率为分配系数,线性组合 4 个主成分因子,计算各批样品的主成分因子得分及综合得分,并对综合得分[综合得分=相应的因子得分 $\times$ (相应主成分的特征值) $^{1/2}$]进行排序,综合得分越高表明对样品中有效成分的统计质量越好^[9-10],结果见表 11。可见,综合得分由高到低依次为 S5、S6、S10、S7、S9、S8、S1、S3、S4、S2。

表 10 赶山鞭总黄酮中 4 个主成分因子的特征值和方差贡献率

Table 10 Eigenvalues and variance contributions of four principal component factors of total flavonoids of *H. attenuatum*

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	7.639	54.561	54.561
2	1.958	13.989	68.550
3	1.473	10.520	79.070
4	1.342	9.589	88.659

表 11 10 批赶山鞭总黄酮主成分因子得分及排序

Table 11 Factor scores and ranking of main components of 10 batches of total flavonoids of *H. attenuatum*

编号	主成分因子得分				综合得分	排序
	因子 1	因子 2	因子 3	因子 4		
S1	-1.62	2.74	-0.72	0.43	-0.54	7
S2	-4.48	0.79	0.45	-2.11	-2.49	10
S3	-2.38	-1.21	0.32	1.03	-1.34	8
S4	-2.89	-2.48	-1.41	0.28	-2.04	9
S5	4.01	-0.18	-1.56	-0.73	1.93	1
S6	3.33	-0.76	1.99	-1.60	1.77	2
S7	0.80	0.12	1.68	1.55	0.78	4
S8	0.58	-0.22	-0.20	-0.13	0.25	6
S9	0.96	1.09	-0.35	0.73	0.71	5
S10	1.70	0.10	-0.21	0.55	0.97	3

3 讨论

响应面法是以 3 水平 2 阶实验设计和数学建模为基础的优化方法,该方法能够克服正交设计无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值的缺陷,弥补均匀设计等线性模型精密度低的不足,能更好地揭示自变量和非自变量之间的关系,故具有较高的科学性和准确性^[11-12],相较于正交实验设计更加简化,与均匀设计相比更全面,可显著减少试验的次数,该方法的精密度高,预测性较好^[13-15]。课题组前期研究表明赶山鞭抗心律失常的主要药效物质基础为总黄酮类成分^[16],本研究以总黄酮总提取率及金丝桃苷的转移率为指标,通过单因素实验和 Central-Composite 响应面设计并利用 3D 响应面和 2D 等高线图分析,确定了回流提取赶山鞭总黄酮 3 个因素的主次关系并得到了提取效果最优的理论工艺条件:乙醇为 65%,料液比为 1:10,回流时间 120 min,提取 2 次。通过验证试验表明赶山鞭总黄酮含量实测值与理论值相近,证明响应面法所构建的模型准确可靠,优化后的总黄酮含量较高。在此基础上,建立了赶山鞭总黄酮含量的 HPLC 指纹图谱。

HPLC 在中药成分研究等方面都是重要的分析手段,它给出的是高分辨的轮廓图谱,具有适用范围广、重现性较好,操作容易,外界影响因素小,所得色谱的稳定性好等优点,HPLC 指纹图谱能够较好地“整体”视角来反映中药材的化学成分,被广泛应用于中药材的质量评价中^[17-20]。因此,本

研究采用 HPLC 技术构建 10 批赶山鞭药材总黄酮提取物的指纹图谱, 指纹图谱的相似度为大于 0.61, 可能因为不同地域的光照、降水、土壤条件不同, 对药材质量差异性影响较大。实验中获得相应的指纹图谱信息数据, 为赶山鞭的质量标准的建立及赶山鞭抗心律失常的“谱效关系”提供实验基础。

本实验中所建立的赶山鞭总黄酮的 HPLC 指纹图谱, 实验方法的精密度、重复性、稳定性良好, 且操作简便可行, 符合指纹图谱研究的技术要求。共识别了 15 个共有峰, 但各成分含量存在差异, 经对照品指认, 对部分色谱峰进行了归属指认分别是金丝桃苷、槲皮素、芦丁、山柰酚。聚类分析可对赶山鞭药材进行较好地分类, 分析结果为当欧式距离为 25 时, 10 批赶山鞭可分为 2 类: 赶山鞭总黄酮含量低的 S1、S7, 即产地为黑龙江密山市聚为一类; 当欧式距离为 15 时, 除黑龙江省海林市和密山市以外产地的 S3、S5、S6、S8~S10 聚为一类, 总黄酮总含量相对较高, 表明基于总黄酮含量差异评价赶山鞭质量的差异与其产地有关。

对赶山鞭总黄酮的特征图谱进行主成分分析, 共选择了 4 个主成分, 累积方差贡献率达到 85% 以上, 得到 4 个主成分因子的特征值分别为 7.639、1.958、1.473、1.342, 选择提取该 4 个主成分因子对 10 批样品进行评分, 对综合得分进行排序, 综合得分由前 3 位依次为 S5、S6、S10。表明主成分分析结果与聚类分析结果部分相近, 2 种分析结果存在一致性和科学性。综上所述, 本研究基于聚类分析和主成分分析研究赶山鞭总黄酮 HPLC 特征图谱可作为赶山鞭药材质量评价的方法和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宋立人. 现代中药学大辞典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 726.
- [2] 谢宗万. 《全国中草药汇编》编写组编. 全国中草药汇编-下册 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1170.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第六十九卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 1824.
- [4] 冯宇飞, 井中旭, 高彦宇, 等. 稳心草的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2780-2786.
- [5] 李冀, 滕林, 高彦宇. 乌腺金丝桃提取物对小鼠心肌缺血的保护作用 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(1): 38-39.
- [6] 刘培亮, 杜诚, 姜在民, 等. 秦岭金丝桃属植物 (藤黄科) 分类学修订 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(6): 1268-1274.
- [7] 孟祥丽, 赵玉佳, 徐艳敏. 不同产地、不同物候期对乌腺金丝桃中总黄酮含量的影响 [J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(3): 14-15.
- [8] 孙国祥, 侯志飞, 李文颖, 等. 中药多元多维指纹图谱特征与构成方式及评价方法研究 [J]. 中南药学, 2014, 12(6): 497-504.
- [9] 林林, 于凤蕊, 徐丽华, 等. 女金丸 HPLC 指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析 [J]. 中国药房, 2019, 30(10): 1339-1343.
- [10] 康念欣, 袁炎炎, 张潇, 等. 酒黄连 HPLC 特征图谱的建立及聚类分析和主成分分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(8): 2790-2798.
- [11] 罗兰, 李欢欢, 汪芳, 等. 响应面法和正交实验法优化天山岩黄芪多酚提取纯化工艺 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3156-3163.
- [12] 李桂华, 赵子晨, 蒋满意, 等. 和厚朴酚自微乳给药系统制备工艺响应面法优化及质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 362-371.
- [13] 谢静静, 杨永寿, 郝芳芳, 等. 星点设计-响应面法优选美洲大蠊抗肝纤维化颗粒的成型工艺 [J]. 医药导报, 2021, 40(12): 1710-1715.
- [14] 张昊昱, 荣易, 李静, 等. 响应面法优化 *N*-氨基甲酰谷氨酸的合成工艺 [J]. 化学试剂, 2021, 43(4): 534-539.
- [15] 杨素琴, 范亚, 黄玉莹, 等. 基于响应面法优选消炎抗菌颗粒的成型工艺 [J]. 武汉工程大学学报, 2021, 43(3): 260-265.
- [16] 滕林. 乌腺金丝桃抗小鼠心律失常及心肌缺血作用的实验研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2008.
- [17] 王梅, 万子玉, 陈辉, 等. 化学模式识别结合 HPLC 指纹图谱的僵蚕质量评价研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(2): 203-212.
- [18] 王静. 三叶青 HPLC 指纹图谱的质量评价及快速繁育研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2016.
- [19] 谢苏梦, 季巧遇, 吕尚, 等. 不同产地野菊花 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7616-7623.
- [20] 冯帅. 基于化学—生物指纹图谱技术的连翘药材质量评价与品质相关研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2014.

[责任编辑 郑礼胜]