

基于 HPLC 指纹图谱与化学模式相结合的益气活血通方便提取工艺优选

李 硕^{1,2}, 杨晓玲¹, 权起元¹, 刘书斌³, 王本欢¹, 杨秀娟¹, 赵林华⁴, 李越峰^{1*}, 仝小林^{4*}

1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050

4. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053

摘要: **目的** 建立基于 HPLC 指纹图谱与化学模式相结合的益气活血通方便(Yiqi Huoxue Tongbian Recipe, YHTR)提取工艺优选方法。**方法** 采用 HPLC 法建立 YHTR 指纹图谱, 并同时测定绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 7 种指标性成分含量, 以干膏率及 7 种成分含量为指标, 利用主成分分析(principal component analysis, PCA)和模糊物元模型(fuzzy matter-element model, FMEM)2 种化学模式识别技术优选 YHTR 最佳提取工艺。**结果** 不同提取工艺的 YHTR HPLC 指纹图谱标定 20 个共有峰, 相似度在 0.782~0.999; 7 个指标性成分质量分数分别为 7.3~57.3、727.6~10 584.7、13.4~79.2、31.7~105.0、100.1~1 115.3、7.4~41.9、2.3~19.0 $\mu\text{g/g}$, 干膏率为 17.8%~24.3%。FMEM 和 PCA 结果一致, YHTR 的指标性成分含量与提取时间、提取次数以及加水倍数具有相关性。从 7 种指标性成分提取率和干膏得率角度考虑, YHTR 最佳提取工艺为加 10 倍量水, 提取 3 次, 每次提取时间 60 min。**结论** 通过指纹图谱结合化学模式识别技术的分析策略可快速有效的筛选 YHTR 最佳提取工艺, 为 YHTR 后续制剂开发提供了参考。

关键词: 益气活血通方便; 指纹图谱; 主成分分析; 模糊物元模型; 质量评价; 绿原酸; 松果菊苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 阿魏酸; 毛蕊花糖苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)18-5692-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.012

Extraction process optimization of Yiqi Huoxue Tongbian Recipe based on the combination of HPLC fingerprint and chemical model

LI Shuo^{1,2}, YANG Xiao-ling¹, QUAN Qi-yuan¹, LIU Shu-bin³, WANG Ben-huan¹, YANG Xiu-juan¹, ZHAO Lin-hua⁴, LI Yue-feng¹, TONG Xiao-lin⁴

1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines of the College of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

3. Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050, China

4. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China

Abstract: Objective Based on the combination of HPLC fingerprint and chemical model, the method for optimizing the extraction process of Yiqi Huoxue Tongbian Recipe (YHTR) was established. **Methods** The fingerprint of YHTR was established by HPLC, and

收稿日期: 2022-08-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81960713); 国家自然科学基金资助项目(82160750); 国家自然科学基金资助项目(82160755); 甘肃省高等学校创新基金项目(2021A-079); 甘肃省中医药科研课题项目(GZKZ-2021-7); 甘肃省自然科学基金项目(18JR3RA201); 甘肃省基础研究创新群体项目(21JR7RA569); 甘肃省青年科技基金项目(20JR10RA331); 甘肃省教育厅项目(2121CYZC-21); 甘肃省教育厅项目(2021B-157); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室项目(zzy-2018-06); 敦煌医学与转化教育部重点实验室 2020 年度开放课题(DHYX20-10)

作者简介: 李 硕(1981—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药品质评价及产品开发研究。

Tel: 13919824303 E-mail: 290608323@qq.com

***通信作者:** 仝小林(1956—), 男, 主任医师, 博士生导师, 中国科学院院士, 研究方向为中医内科学。

Tel: 13910662116 E-mail: tongxiaolin@vip.163.com

李越峰(1974—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药炮制及制剂开发。Tel: 13619349364 E-mail: lyfyxk@126.com

the contents of seven index components including chlorogenic acid, echinacoside, calycosin-7-glucoside, ferulic acid, acteoside, calycosin, formononetin were determined at the same time. Taking the dry paste rate and the content of seven components as indicators, two chemical pattern recognition techniques (PCA and FMEM) were used to optimize the optimal extraction process of YHTR.

Results The HPLC fingerprints of YHTR with different extraction processes were used to calibrate 20 common peaks, and the similarity ranged from 0.782 to 0.999; The mass fractions of 7 index components were 7.3—57.3, 727.6—10 584.7, 13.4—79.2, 31.7—105.0, 100.1—1 115.3, 7.4—41.9, 2.3—19.0 mg/g respectively. The dry extract rate of different extraction processes was 17.8%—24.3%. The results of fuzzy matter-element model and principal component analysis are consistent, and the content of index components of YHTR is related to extraction time, extraction times and water addition times. From the perspective of the extraction rate of seven index components and the yield of dry paste, the best extraction process of YHTR is to add 10 times of water, extract three times, and extract for 60 min each time. **Conclusion** The analysis strategy of fingerprint combined with chemical pattern recognition technology can quickly and effectively screen the best extraction process of YHTR. The established multi index quality evaluation method provides a reference for the quality control and subsequent preparation development of YHTR.

Key words: Yiqi Huoxue Tongbian Recipe; fingerprint; principal component analysis; fuzzy matter-element model; quality evaluation; chlorogenic acid; echinacoside; calycosin-7-glucoside; ferulic acid; acteoside; calycosin; formononetin

便秘是临床上常见的胃肠道功能紊乱性疾病,我国成人慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)占整个便秘患者的 15%~42%^[1-5]。全小林院士基于“态靶同调”辩证理念^[6-9],认为 STC 的主要病因病机是气血津液亏虚、肠燥失运,结合临床实践总结出由黄芪、当归、肉苁蓉、火麻仁组成的益气活血通便方(Yiqi Huoxue Tongbian Recipe, YHTR),针对年老体弱、产后、久病引起的气血亏虚、肠道濡润失司的慢性功能性便秘人群,有明显的补气养血、润肠通便作用,临床治疗效果显著。

目前, YHTR 的药效物质基础、制剂工艺及质量评价方面鲜有研究报道,因此确定 YHTR 的最佳提取工艺、反映组方整体质量的指纹图谱及多指标成分含量的质量评价方法显得尤为重要^[10-15]。本实验以 YHTR 为研究对象,通过 HPLC 指纹图谱对其主要化学成分进行宏观整体表征,并对不同提取工艺的干膏率及 7 种指标性成分绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素进行含量测定,采用主成分分析(principal component analysis, PCA)和模糊物元模型(fuzzy matter-element model, FMEM)确定 YHTR 最佳提取工艺,并进行基于多指标成分的质量综合评价,为 YHTR 质量控制及后续制剂开发提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司; 800 型离心沉淀器,上海手术器械十厂; MH-500 型可调式电热套,北京科伟永兴仪器有限公司; HHS-11S 型电子恒温不锈钢水浴锅,上海宜昌仪器纱筛厂; KQ-250TDB 型高频数控超声波清洗器,

昆山市超声仪器有限公司; DHG-9123A 型电子恒温鼓风干燥箱,上海齐欣科学仪器有限公司。

1.2 药材

黄芪(批号 20220402)、当归(批号 20220203)、肉苁蓉(批号 21080601)、火麻仁(批号 22032802)饮片由甘肃中医药大学附属医院提供,经甘肃中医药大学药学院李成义教授鉴定来源于豆科黄芪属植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,伞形科当归属植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,列当科肉苁蓉属植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 的干燥带鳞叶的肉质茎,桑科大麻属植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实。

1.3 试剂

色谱纯甲醇(批号 20220504)、甲酸(批号 20210301)、乙腈(批号 20220401)购自天津市大茂化学试剂厂;对照品绿原酸(批号 MUST-21030920)、松果菊苷(批号 MUST-21101117)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 MUST-21033005)、阿魏酸(批号 MUST-22011214)、毛蕊花糖苷(批号 MUST-210070910)、毛蕊异黄酮(批号 MUST-21042513)、芒柄花素(批号 MUST-21122712)购自成都曼斯特生物技术有限公司,以上对照品质量分数均≥98%。

2 方法与结果

2.1 样品制备

依据处方配伍,分别精密称取黄芪 15 g、当归 15 g、肉苁蓉 18 g、火麻仁 30 g,加适量蒸馏水浸泡后,热回流装置密闭提取,将提取液趁热用纱布滤过,即得煎煮液;将煎煮液浓缩并定容至 100 mL

即得浓缩液；取浓缩液 10 mL 于已恒定质量的蒸发皿中水浴蒸干，置于烘箱中烘至干燥，取出后，置于干燥器中干燥 30 min，称定质量，即得干浸膏。

根据传统中药汤剂煎煮法及预实验结果，选取对煎煮效果影响较大的关键因素“加水倍数、提取时间、提取次数”作为提取工艺影响因子，结合单因素考察实验，设计 3 因素 3 水平的响应面分析试验，对 YHTR 不同提取工艺进行筛选，响应面分析因素水平见表 1。

表 1 YHTR 的响应面分析试验因素水平

Table 1 Response surface analysis factor level of YHTR

试验号	加水倍数/倍	提取时间/min	提取次数
S1	8	40	2
S2	12	40	2
S3	8	60	2
S4	12	60	2
S5	8	50	1
S6	12	50	1
S7	8	50	3
S8	12	50	3
S9	10	40	1
S10	10	60	1
S11	10	40	3
S12	10	60	3
S13	10	50	2
S14	10	50	2
S15	10	50	2
S16	10	50	2
S17	10	50	2

2.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Aq 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~5 min, 10%~13%乙腈；5~13 min, 13%~17%乙腈；13~20 min, 17%~21%乙腈；20~26 min, 21%~25%乙腈；26~30 min, 25%~38%乙腈；30~34 min, 38%~43%乙腈；34~40 min, 43%~90%乙腈；40~50 min, 90%~10%乙腈；50~60 min, 10%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm；进样量 10 μL；柱温 30 ℃。

2.3 供试品溶液的制备

精密移取“2.1”项下浓缩液 1 mL，置于蒸发皿中，水浴蒸干后加入 70%甲醇溶解，定容于至 10 mL 量瓶中，静置，取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，

取续滤液，即得供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备

分别精密称定绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 7 种对照品适量，加入 70%甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，制成质量浓度分别为 0.01、0.01、0.05、0.06、0.14、0.20、0.20 mg/mL 的混合对照品溶液储备液，备用。

2.5 指纹图谱研究

2.5.1 精密度试验 精密吸取按照“2.1”和“2.3”项下方法制得的同一供试品溶液 (S15)，按照“2.2”项下色谱条件连续重复进样 6 次，每次进样 10 μL，记录 HPLC 色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价 (2012 版)》软件进行评价分析，结果表明，6 个供试品溶液的色谱图相似度为 0.996~1.000，20 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.08%~0.77%，相对峰面积的 RSD 为 0.28%~2.98%，表明该方法精密度较好。

2.5.2 重复性试验 精密吸取按照“2.1”和“2.3”项下方法制得的 6 份供试品溶液 (S15)，按照“2.2”项下色谱条件进样分析，每次进样 10 μL，记录 HPLC 色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价 (2012 版)》软件进行评价分析，结果表明，6 个供试品溶液色谱图的相似度分别为 0.993~1.000，20 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.08%~1.22%，相对峰面积的 RSD 为 0.33%~2.70%，结果表明该方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取按照“2.1”和“2.3”项下方法制得的同一供试品溶液 (S15)，分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.2”项下色谱条件进样分析，每次进样 10 μL，记录 HPLC 色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价 (2012 版)》软件进行评价分析，结果表明，6 个供试品色谱图与其共有模式的相似度分别为 0.994~1.000，20 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.22%~3.17%，相对峰面积的 RSD 为 0.51%~2.94%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 HPLC 指纹图谱的建立及相似度分析 取“2.1”项下 17 份试验样品，分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。将 17 份样品的 HPLC 图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价 (2012 版)》软件，以 S1 号样品的色谱图为参照图谱，时间窗的宽度为

0.5 min、中位数法生成对照指纹图谱 (R)，经多点校正后进行色谱峰匹配，生成 17 份样品的 HPLC 指纹图谱叠加图 (图 1)。

指纹图谱可获得样品的整体信息，通过图谱比较，可反映样品与样品之间的亲疏程度。以对照指纹图谱为参照，进行相似度评价分析，结果见表 2。

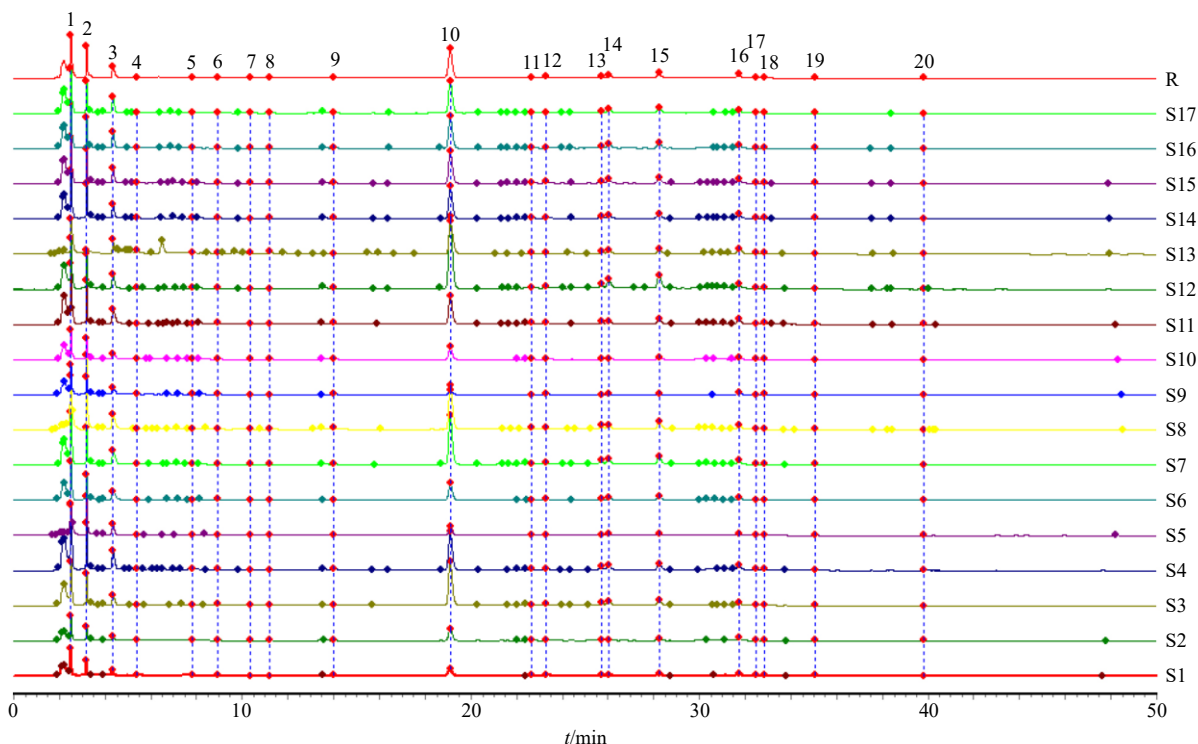


图 1 17 份不同提取工艺 YHTR 样品的 HPLC 指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint overlay and control fingerprint (R) of 17 YHTR samples with different extraction processes

表 2 17 份 YHTR 样品指纹图谱相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation of fingerprints of 17 batches of YHTR

样品	相似度																	R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	
S1	1.000	0.972	0.888	0.922	0.827	0.977	0.878	0.818	0.934	0.968	0.957	0.817	0.686	0.939	0.937	0.928	0.923	0.934
S2	0.972	1.000	0.958	0.978	0.800	0.968	0.963	0.893	0.854	0.956	0.958	0.923	0.801	0.988	0.987	0.982	0.980	0.988
S3	0.888	0.958	1.000	0.965	0.652	0.942	0.980	0.836	0.789	0.936	0.953	0.978	0.792	0.977	0.977	0.976	0.976	0.979
S4	0.922	0.978	0.965	1.000	0.806	0.930	0.989	0.934	0.778	0.912	0.927	0.958	0.829	0.996	0.996	0.997	0.997	0.996
S5	0.827	0.800	0.652	0.806	1.000	0.741	0.729	0.889	0.696	0.715	0.702	0.621	0.620	0.782	0.780	0.775	0.773	0.782
S6	0.977	0.968	0.942	0.930	0.741	1.000	0.904	0.781	0.946	0.998	0.996	0.866	0.669	0.952	0.951	0.943	0.939	0.949
S7	0.878	0.963	0.980	0.989	0.729	0.904	1.000	0.920	0.719	0.887	0.907	0.988	0.855	0.987	0.987	0.989	0.990	0.990
S8	0.818	0.893	0.836	0.934	0.889	0.781	0.920	1.000	0.600	0.751	0.763	0.867	0.850	0.907	0.908	0.908	0.910	0.915
S9	0.934	0.854	0.789	0.778	0.696	0.946	0.719	0.600	1.000	0.954	0.935	0.659	0.444	0.811	0.808	0.794	0.787	0.803
S10	0.968	0.956	0.936	0.912	0.715	0.998	0.887	0.751	0.954	1.000	0.996	0.851	0.642	0.937	0.936	0.927	0.923	0.934
S11	0.957	0.958	0.953	0.927	0.702	0.996	0.907	0.763	0.935	0.996	1.000	0.879	0.655	0.950	0.949	0.941	0.938	0.946
S12	0.817	0.923	0.978	0.958	0.621	0.866	0.988	0.867	0.659	0.851	0.879	1.000	0.849	0.959	0.960	0.963	0.966	0.963
S13	0.686	0.801	0.792	0.829	0.620	0.669	0.855	0.850	0.444	0.642	0.655	0.849	1.000	0.816	0.817	0.820	0.823	0.831
S14	0.939	0.988	0.977	0.996	0.782	0.952	0.987	0.907	0.811	0.937	0.950	0.959	0.816	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999
S15	0.937	0.987	0.977	0.996	0.780	0.951	0.987	0.908	0.808	0.936	0.949	0.960	0.817	1.000	1.000	0.999	0.999	0.999
S16	0.928	0.982	0.976	0.997	0.775	0.943	0.989	0.908	0.794	0.927	0.941	0.963	0.820	0.999	0.999	1.000	1.000	0.997
S17	0.923	0.980	0.976	0.997	0.773	0.939	0.990	0.910	0.787	0.923	0.938	0.966	0.823	0.999	0.999	1.000	1.000	0.997

17 份不同提取工艺 YHTR 样品的指纹图谱相似度为 0.782~0.999, 表明各提取工艺下样品的指纹图谱相对稳定。

2.5.5 共有峰指认及归属研究 精密移取“2.4”项下混合对照品储备液 1 mL, 用 70% 甲醇定容到 10 mL 容量瓶中, 按“2.2”项下色谱条件进行检测, 记录各对照品色谱图。以色谱峰相对保留时间为参照, 对 17 份样品进行色谱峰的指认。确定 20 个共有特征峰。通过与对照品溶液色谱图对比, 确定其中 7 号为绿原酸, 10 号为松果菊苷, 13 号为毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 14 号为阿魏酸, 15 号为毛蕊花糖苷, 19 号为毛蕊异黄酮, 20 号为芒柄花素。具体见图 2-A、2-B。

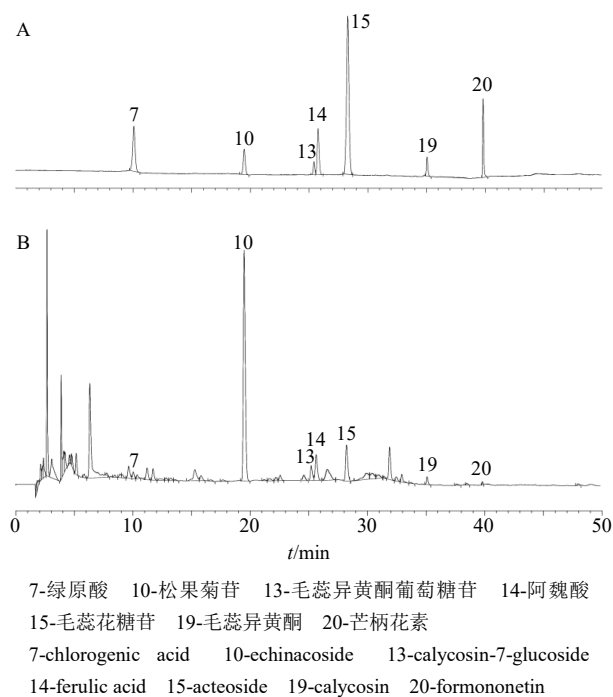


图 2 混合对照品 (A) 和 YHTR 样品 (B) 的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of mixed reference substances (A) and YHTR (B)

2.6 7 个指标成分含量测定

2.6.1 线性关系考察 分别精密吸取“2.4”项下毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、阿魏酸、绿原酸、毛蕊花糖苷对照品储备液 1.2、0.5、1.2、0.8、5.0 mL, 置于 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇定容, 稀释 1、5、10、12.5、20 倍得系列质量浓度梯度的混合对照品溶液。另分别取松果菊苷、芒柄花素对照品储备液, 分别稀释 1、10、20、40、80 倍和 1、5、7、8、10 倍, 即得各系列质量浓度梯度的对照品溶液。精密吸取各对照品溶液与混合对照品溶液 10 μ L, 按

“2.2”项下色谱条件分别进样测定, 以各成分的质量浓度为横坐标 (X), 相应的峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得到各成分的回归方程, 结果分别为绿原酸 $Y=14.117 X-0.060 3$, $R^2=0.999 9$, 线性范围 0.4~8.0 μ g/mL; 松果菊苷 $Y=7.246 8 X-49.184 0$, $R^2=1.000 0$, 线性范围 12.5~1 000.0 μ g/mL; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y=17.056 X-1.776 5$, $R^2=0.999 7$, 线性范围 0.6~12.0 μ g/mL; 阿魏酸 $Y=27.841 X-2.989 5$, $R^2=0.999 7$, 线性范围 0.6~12.0 μ g/mL; 毛蕊花糖苷 $Y=8.729 9 X-6.754 1$, $R^2=1.000 0$, 线性范围 5~100 μ g/mL; 毛蕊异黄酮 $Y=25.909 X-0.469 7$, $R^2=0.999 9$, 线性范围 0.25~5.00 μ g/mL; 芒柄花素 $Y=19.585 X-0.529 8$, $R^2=0.999 8$, 线性范围 0.3~3.0 μ g/mL。

2.6.2 精密度试验 精密吸取“2.4”项下对照品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件连续重复进样 6 次, 每次进样 10 μ L, 测定峰面积, 记录 HPLC 图。测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、阿魏酸、绿原酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 1.68%、0.67%、1.34%、0.76%、0.98%、0.28%、0.98%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 精密吸取按照“2.3”项下方法制得的 6 份供试品溶液 (S15), 按照“2.2”项下色谱条件进样, 每次进样 10 μ L, 记录 HPLC 色谱图。测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、阿魏酸、绿原酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷峰面积, 并计算其含量与 RSD 值。结果显示, 样品中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、阿魏酸、绿原酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷质量分数的 RSD 分别为 1.61%、0.51%、1.41%、1.93%、1.67%、0.54%、0.86%, 表明该方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 精密吸取按照“2.3”项下方法制得的同一供试品溶液 (S15), 分别在制备后 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 每次进样 10 μ L, 记录 HPLC 色谱图。测得毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、阿魏酸、绿原酸、松果菊苷、毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 0.94%、0.35%、1.67%、1.68%、1.47%、0.33%、0.87%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6.5 加样回收率试验 精密移取已测定 7 种指标成分的样品 (S15) 浓缩液 0.5 mL, 共 6 份, 分别加入与样品中含量相同的绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄

酮、芒柄花素的对照品,按照“2.3”项方法制备供试品溶液,依据“2.2”项色谱条件测定,记录峰面积,并计算 7 种成分的加样回收率,结果绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素的平均加样回收率分别为 97.87%、98.18%、99.77%、100.34%、100.38%、99.39%、98.70%,RSD 分别为 3.06%、1.05%、3.49%、1.51%、1.33%、2.13%、3.37%。

2.6.6 含量测定 按“2.3”项下方法制备 17 份供试品溶液(平行 3 份),按“2.2”项下色谱条件对 7 种指标性成分含量进行测定;按“2.1”项下方法制备干浸膏,计算干膏率(干浸膏/复方原药材质量),结果见表 3。

2.7 基于 2 种数学模型筛选最佳提供工艺

2.7.1 基于 PCA 的评价 PCA 采用统计学降维分析原理,将多个变量简化为几个综合变量,使新变

表 3 17 份样品中 7 种指标性成分含量及干膏率

Table 3 Contents of seven index components and dry paste rate of 17 batches of test solution

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							干膏率/%
	绿原酸	松果菊苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	阿魏酸	毛蕊花糖苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	
S1	14.8	1 145.8	37.6	51.5	155.3	28.2	11.8	19.40
S2	14.5	1 810.3	44.1	50.9	141.9	26.8	12.6	20.30
S3	32.7	6 316.8	45.6	53.0	540.5	19.1	5.7	22.80
S4	42.5	5 602.6	65.6	47.4	554.5	36.4	11.1	22.30
S5	11.0	1 331.9	27.9	32.4	209.5	14.7	5.2	19.90
S6	27.7	2 443.0	28.1	45.8	303.3	17.4	5.8	20.90
S7	39.4	7 042.7	64.1	64.0	633.8	31.9	8.7	23.10
S8	29.4	6 667.5	79.2	67.0	492.9	41.9	19.0	22.90
S9	7.3	727.6	13.4	31.7	100.1	7.4	2.3	17.80
S10	9.0	1 777.4	24.4	41.8	169.3	11.9	3.7	20.20
S11	32.7	3 991.5	60.6	58.2	352.1	38.4	13.0	21.50
S12	57.3	10 584.7	60.8	68.9	1 115.3	29.8	12.6	24.30
S13	34.8	4 789.4	66.4	105.0	487.5	36.5	11.0	22.10
S14	40.8	4 695.1	64.3	79.7	511.6	36.6	11.5	21.90
S15	41.8	4 727.8	65.7	78.6	514.2	36.7	11.2	21.90
S16	37.4	4 670.8	51.1	58.2	533.0	31.5	13.9	21.80
S17	39.7	4 769.9	53.8	59.8	537.1	31.9	14.1	22.00

量成为原变量的线性组合,是一种适用于多指标大样本的综合分析方法。通过 SPSS 21.0 软件对绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 7 种指标性成分及干膏率进行 PCA,结果见表 4。由表 4 可知,前 2 个主成分为毛蕊花糖苷和毛蕊异黄酮,其特征值均 >1 ,说明前 2 个主成分在影响 YHTR 水煎液质量评价指标中起主导作用,2 个主成分累积贡献率达 89.66%,能够较客观地反映 YHTR 水煎液内在质量,故选取前 2 个主成分进行分析。

由表 5 可见,处方各因子载荷系数能综合反映各成分对第 1、2 主成分的影响。其中,毛蕊花糖苷的因子载荷量在第 1 主成分中最大,说明其对处方质量评价的影响最大。毛蕊异黄酮载荷系数为

表 4 主成分的特征值及贡献率

Table 4 Eigenvalue of principal components and cumulative contribution rates

主成分	初始特征值			旋转后特征值		
	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	5.951	74.390	74.390	3.831	47.892	47.892
2	1.222	15.271	89.661	3.342	41.770	89.661
3	0.473	5.913	95.574			
4	0.153	1.910	97.484			
5	0.137	1.710	99.194			
6	0.050	0.630	99.824			
7	0.008	0.105	99.928			
8	0.006	0.072	100.000			

表 5 旋转后的因子载荷系数

Table 5 Principal component load matrix and coefficient

成分	因子载荷系数	
	第 1 主成分	第 2 主成分
绿原酸	0.858	0.419
松果菊苷	0.935	0.296
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.513	0.830
阿魏酸	0.383	0.705
毛蕊花糖苷	0.958	0.229
毛蕊异黄酮	0.304	0.936
芒柄花素	0.179	0.894
干膏率	0.877	0.407

0.936, 是影响第 2 主成分的主要因子, 毛蕊花糖苷与毛蕊异黄酮成分呈正相关。

根据各主要因子的权重系数进行累加, 权重系数的计算依据其方差贡献率的大小, 即各主成分的贡献率与 2 个主成分的总贡献率之比, 第 1 主成分的权重 $F_1=47.892\%/89.661\%=0.534$, 则第 2 主成分权重 F_2 为 0.466。根据公式 $F=0.544 F_1+0.466 F_2$, 得出各个 YHTR 水煎液的总因子得分 (F) 并排序, 得分越高, 表明该样品质量越好。具体排序见表 6。

表 6 2 种数学模型评价结果

Table 6 Evaluation results of two mathematical models

排序	PCA		FMEM	
	样品	F	样品	贴近度值
1	S12	7.379	S12	0.639
2	S7	4.925	S8	0.434
3	S8	4.631	S13	0.425
4	S3	4.396	S7	0.423
5	S4	3.998	S15	0.399
6	S13	3.491	S14	0.395
7	S17	3.476	S4	0.376
8	S15	3.457	S17	0.349
9	S14	3.435	S16	0.336
10	S16	3.408	S3	0.320
11	S11	2.894	S11	0.316
12	S6	1.873	S6	0.191
13	S2	1.404	S2	0.190
14	S10	1.364	S1	0.176
15	S5	1.117	S5	0.131
16	S1	0.999	S10	0.131
17	S9	0.653	S9	0.081

2.7.2 基于变异系数的 FMEM 评价 FMEM 以模糊数学为基础, 将用于描述某一事物集合的 3 个要素“事物”“特征”“量值”, 与中药“样品”“成分”“含量”一一对应, 如给定样本名称 M , 使它关于特征 C 有量值 X , 以有序 3 元组 $=(M, C, X)$ 作为描述事物的基本元, 简称为物元 3 要素, 如果其中量值 X 具有模糊性, 则称为模糊物元。已有李喜香等^[16]、刘书斌等^[17]和杨蕊菁等^[18]通过建立 FMEM 对大黄、党参等中药进行质量评价, 取得了较为满意的结果。

本研究 M 为不同提取工艺的 YHTR, C 为所评价的指标性成分种类, X 为 7 种指标性成分含量及干膏率。基于变异系数计算有关评价指标的权重, 步骤如下:

(1) 计算第 i 项评价指标的均值 $\bar{X}_i$, 即:

$$\bar{X}_i = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

(2) 计算第 i 项评价指标的均值 D_i , 即:

$$D_i = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}_i)^2}$$

(3) 计算第 i 项评价指标的变异系数 δ_i , 即:

$$\delta_i = D_i \times \sqrt{\bar{X}_i}$$

(4) 计算第 i 项评价指标的权重 W_i , 即:

$$W_i = \delta_i \times \sum_{i=1}^n \delta_i$$

本研究结合欧氏贴近度概念, 计算 7 种指标成分及干膏率评价指标的变异系数 (δ_i) 分别为 0.076、0.164、0.127、0.135、0.159、0.053、0.013 和 0.007, 权重 (W_i) 分别为 0.103、0.224、0.172、0.184、0.216、0.072、0.018 和 0.010, 建立基于变异系数权重的 FMEM, 得到贴近度复合模糊物元, 对 17 批样品的质量进行排序和综合评价, 见表 6。

从表 6 看出, 2 种评价方法的排序结果基本一致, S12、S8、S7 均靠前 4 名次, S9、S10、S1、S5 均靠后 4 名次, 说明采用 2 种数学模型对基于 7 种指标性成分以及干膏率对 YHTR 17 种不同提取工艺的评价令人满意。

依据 2 种方法评价发现, YHTR 的指标性成分含量与提取时间、提取次数以及加水倍数具有相关性。从 7 种指标性成分提取率和干膏得率角度考虑, YHTR 最佳提取工艺为加 10 倍量水, 提取 3 次, 每次提取时间 60 min。

2.8 最佳提取工艺验证

采用最佳提取工艺提取样品, 按“2.3”项下方

法制备 6 批供试品溶液 (Y1~Y6), 按“2.2”项下色谱条件对 7 种指标性成分含量进行测定; 按“2.1”项下方法制备干浸膏, 计算干膏率, 对优选的最佳提取工艺进行验证, 结果见表 7。测得绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素含量及干膏率的

RSD 分别为 1.53%、1.31%、2.14%、2.08%、1.01%、1.37%、2.25%、0.56%, 表明所优选的提取工艺方法可靠。

3 讨论

本实验首次建立了 YHTR 的指纹图谱, 同时结合化学模式识别筛选出处方的最佳提取工艺, 为质

表 7 6 份工艺验证样品中 7 种指标性成分含量及干膏率

Table 7 Contents of seven index components and dry paste rate of six batches of test solution

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							干膏率/%
	绿原酸	松果菊苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	阿魏酸	毛蕊花糖苷	毛蕊异黄酮	芒柄花素	
Y1	58.1	10 485.9	61.9	67.2	1 117.0	29.1	13.2	24.56
Y2	58.6	10 622.3	62.0	68.2	1 116.0	29.6	12.4	24.22
Y3	58.2	10 644.6	64.5	68.3	1 112.8	28.9	12.6	24.25
Y4	56.3	10 329.1	61.3	66.5	1 113.2	29.9	12.8	24.23
Y5	57.3	10 584.7	60.8	68.9	1 115.3	29.8	12.6	24.30
Y6	56.9	10 721.3	61.2	65.1	1 087.6	29.7	12.5	24.20

量评价提供理论依据。实验过程中, 为了确保所建立的指纹图谱能全面优化提取工艺, 考察了不同紫外吸收波长 (254、270、280、290 nm) 下色谱峰的数目和峰面积差异, 发现 280 nm 下色谱峰信息较丰富, 故选择 280 nm 作为检测波长。此外, 本实验通过对色谱柱的考察, 发现色谱柱 Agilent Zorbax SB-Aq 柱能较好地分离各个被测成分的峰, 且色谱峰的峰型较好。结合上述实验条件, 建立 YHTR HPLC 指纹图谱, 并同时测定绿原酸、松果菊苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素 7 种指标性成分含量, 以干膏率及 7 种成分含量为指标, 利用 PCA 和 FMEM 2 种化学模式识别技术优选 YHTR 最佳提取工艺。本研究确定的 HPLC 指纹图谱条件重现性良好、稳定性可靠、分辨率清晰, 结合化学识别模式建立的数学模型拟合信息丰富、预测能力优良、判别能力精准, 可适用于 YHTR 提取工艺优选及质量评价。

指纹图谱能较全面地反映出中药中所含化学成分的种类和数量, 进而反映药材整体质量和临床疗效^[19-23]。实验数据表明, 17 批不同提取工艺的 YHTR 水煎液的指纹图谱, 出峰时间大体一致, 但相似度计算结果却有明显差异, 说明不同提取工艺对 YHTR 的质量有显著影响。

本实验引入 PCA, 将不同提取工艺的 YHTR 水煎液主成分进行排序, 又借助基于变异系数的 FMEM 对其进行排序, 2 种数学模式所得的结果极

相近, 说明毛蕊花糖苷和毛蕊异黄酮可作为组方水煎液质量评价的标志性成分, 可为评价 YHTR 的质量提供更为全面的参考。

PCA 和 FMEM 属于 2 种不同模式的数学模型, 但对 YHTR 的不同提取工艺评价较为一致, 说明 YHTR 的指标性成分与提取时间、提取次数以及加水倍数具有相关性。PCA 法并未全面考虑这些因素, 只是考虑了不同提取工艺各成分的贡献率和成分之间的相关性, 而 FMEM 利用变异系数考虑了评价指标权重的均衡性, 极大程度上降低人为赋权的主观偏好性因素的影响。因此, 本实验采用 2 种数学模型结合的方式进行实验数据分析, 从而降低了人为原因造成的分析误差, 能更全面、准确地评价 YHTR 的提取工艺及其整体质量。

本实验采用指纹图谱和化学模式识别相结合的方法优化 YHTR 的提取工艺, 并以 7 种指标性成分含量及干膏率对 YHTR 进行质量综合评价, 为 YHTR 的质量控制及临床应用安全有效提供了可靠依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘田田, 周国华, 陈叶青, 等. 生物反馈联合抗焦虑抑郁药物治疗慢性功能性便秘合并焦虑抑郁的临床疗效研究 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(S2): 254-256.
- [2] 刘启鸿, 柯晓, 胡露楠, 等. 基于网络药理学探讨理气通便方治疗慢传输型便秘的作用机制 [J]. 福建中医

- 药, 2022, 53(1): 50-54.
- [3] Sun Y H, Yan C Q, Jin S F, *et al.* Curative effect and mechanism of Guiren Runchang Granules on morphine-induced slow transit constipation in mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5493192.
- [4] Bharucha A E, Lacy B E. Mechanisms, evaluation, and management of chronic constipation [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(5): 1232-1249.
- [5] 姜溪, 陈芙蓉, 只德广, 等. 夏黄颗粒治疗慢传输型便秘的实验研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(9): 1589-1596.
- [6] 张莉莉, 仝小林, 赵林华, 等. 态靶结合辨治多囊卵巢综合征高雄激素血症 [J]. 世界中医药, 2021, 16(22): 3372-3375.
- [7] 李烁, 李敏, 安心怡, 等. 仝小林“态靶结合”辨治糖尿病视网膜病变经验 [J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(11): 24-26.
- [8] 杨映映, 魏秀秀, 王天铭, 等. 仝小林“三期六态”高血压病辨治经验 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2949-2953.
- [9] 何莉莎, 顾成娟, 王涵, 等. 态靶结合辨治代谢性高血压病 [J]. 中医杂志, 2019, 60(16): 1423-1424.
- [10] 黄华靖, 毕晓黎, 江洁怡, 等. 基于超高效液相色谱指纹图谱和多成分含量测定的黄芪益肾颗粒质量评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(3): 248-253.
- [11] 薛起梅, 施海蔚, 钱叶飞, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的黄蛭益肾胶囊质量控制 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(5): 956-963.
- [12] 俱蓉, 杨秀娟, 李响, 等. 当归精准煮散饮片指纹图谱建立及 4 种成分含量测定 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(2): 93-97.
- [13] Yan M Z, Zhang Z L, Liu Y Z. Difference analysis of different parts of chicory based on HPLC fingerprint and multi-component content determination [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(2): 317-323.
- [14] 吴建雄, 秦建平, 刘峰, 等. 坤宁颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(3): 447-449.
- [15] 王继龙, 冯晓莉, 魏舒畅, 等. 敦煌古医方大补肾汤标准煎液 HPLC 指纹图谱及多指标成分测定研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7176-7184.
- [16] 李喜香, 刘书斌, 黄清杰, 等. 基于变异系数的模糊物元模型评价不同产地大黄药材质量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(8): 76-82.
- [17] 刘书斌, 李成义, 张樱山, 等. 基于变异系数权重的模糊物元模型评价甘肃商品纹党的质量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 16-20.
- [18] 杨蕊菁, 顾家琿, 朱顺娟, 等. 基于变异系数权重的模糊物元模型评价大黄不同提取部位降血脂的效果 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(2): 169-172.
- [19] 顾英, 冯怡, 李玉敏. 指纹图谱在中药物质基础研究中的应用 [J]. 中成药, 2007, 29(7): 1048-1051.
- [20] 刘慧, 肖金超, 张庆捷, 等. 金骨莲胶囊 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4185-4192.
- [21] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4833-4843.
- [22] 曹宁宁, 杨文静, 林映仙, 等. 经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2773-2780.
- [23] 裴科, 宁燕, 蔡皓, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的川芎炮制前后对比研究 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1274-1283.

[责任编辑 郑礼胜]