

肺纤方提取工艺的优化

刘 艺^{1,2}, 朱启勇^{1,2}, 湛晓莉^{1,2}, 肖庆龄^{1,2*}, 鞠建明^{1,2*}
(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028)

摘要: **目的** 优化肺纤方提取工艺。**方法** 建立 HPLC 指纹图谱, 对共有峰峰面积进行主成分分析。以主成分综合评分为评价指标, 料液比、提取时间、提取次数为影响因素, 正交试验优化提取工艺。**结果** 9 批样品指纹图谱中有 33 个共有峰, 6 个主成分累积方差贡献率达 97.725%。最优条件为 12 倍量水提取 2 次, 每次 1 h, 主成分综合评分 3.33。**结论** 该方法稳定可行, 可用于提取肺纤方。
关键词: 肺纤方; 提取; 正交试验; HPLC 指纹图谱
中图分类号: R284.2 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2020)06-1581-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.036

中药复方具有多成分、多靶点、协同发挥疗效的特点, 在研究其提取工艺的过程中倾向于采用能反映整体提取效果的指标, 而不是某一种或一些指标成分^[1-2]。指纹图谱作为一种综合、整体、可量化的定性定量分析手段, 能较好地体现复方制剂中各类成分与疗效的相关性, 国内外主要将其用于成分分析和质量控制研究^[3-10]。由于中药复方提取物成分复杂、各成分权重系数难以确定, 故需要结合统计学方法进行综合评价。主成分分析常被应用于综合评价^[11-12], 基于其方差最大原则, 把数据中的自变量进行归一化处理, 减少相互重叠信息, 即降维思想, 同时将多指标转化为少数相互独立的综合指标, 用于反映大部分信息。

肺纤方为江苏省中西医结合医院全国名老中医朱启勇主任的临床验方, 由丹参、赤芍、桃仁、水蛭、麦冬、木蝴蝶等药材组成, 具有补肺肾阴、化肺络瘀之功效, 临床上用于治疗阴虚血瘀引起的肺间质纤维化, 在常规治疗基础上联合其治疗时可使动脉血气、肺功能、症状积分明显改善, 疗效显著。但该方剂型为汤剂, 患者使用不便, 故拟按照医院制剂备案技术要求, 在物质基础不发生改变的前提下将其开发为颗粒剂。本实验遵循中医传统采用水提取方法, 依据中药复方制剂整体性的特点, 将指纹图谱技术与主成分分析相结合优化肺纤方提取工艺, 以期将该方开发成医院制剂、服务广大患者奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪, 配置 Alliance 2695 四元泵、自动进样系统、2996 二极管阵列检测器 (美国 Waters 公司); Milli-Q 型纯水器 (美国 Millipore 公司);

AT201 型电子天平 (十万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Buchi-200 旋转蒸发仪 (瑞士 Buchi 公司)。
1.2 试剂与药物 丹参 (批号 20180401-04) 购自贵州同德药业有限公司; 水蛭 (批号 170824) 购自南京松龄中药饮片有限公司; 桃仁 (批号 1708010)、赤芍 (批号 1802003)、麦冬 (批号 1804011) 购自亳州市万珍中药饮片厂; 木蝴蝶 (批号 20170724) 购自南京松龄中药饮片有限公司, 均由江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定为正品, 符合 2015 版《中国药典》一部相关规定。乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 提取液制备 称取方中各味药材共 9 份, 每份含药量为 114 g, 置于圆底烧瓶中, 按照表 1 因素水平回流提取后, 考察料液比 (A)、煎煮时间 (B)、煎煮次数 (C) 对提取效果的影响, 合并后浓缩至 500 mL, 冷藏备用。

表 1 因素水平

水平	A 料液比	B 煎煮时间/min	C 煎煮次数/次
1	1:8	30	1
2	1:10	60	2
3	1:12	90	3

2.2 供试品溶液制备 精密吸取“2.1”项下提取液 5 mL, 蒸干, 残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 超声 (功率 250 W) 处理 30 min, 放冷, 定容后摇匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 即得。

2.3 色谱条件 奥泰 Alltima™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm ×

收稿日期: 2019-08-30
基金项目: 朱启勇全国名老中医药专家传承工作室建设项目 (国中医药人教发 [2016] 42); 江苏省中西医结合医院医院制剂开发专项 (Y201901); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX19_0376); 第六批全国名老中医专家学术经验继承项目 (国中医药人教发 [2017] 29)
作者简介: 刘 艺 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为中药制剂与质量控制。Tel: (025) 85639640, E-mail: 18500951610@163.com
* 通信作者: 鞠建明 (1975—), 男, 研究员, 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

4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱 (0~20 min, 2%~3% 乙腈; 20~21 min, 3%~6% 乙腈; 21~41 min, 6%~14% 乙腈; 41~71 min, 14%~27% 乙腈; 71~86 min, 27%~45% 乙腈); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 283 nm; 进样量 10 μL 。

2.4 精密度试验 按照 2015 年版《中国药典》方法进行考察, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 测得 33 个共有峰保留时间 RSD 为 0.04%~1.48%, 峰面积 RSD 为 0.32%~1.95%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 按照 2015 年版《中国药典》方法进行考察, 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 测得 33 个共有

峰保留时间 RSD 为 0.63%~2.66%, 峰面积 RSD 为 0.02%~1.22%, 表明该方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 按照 2015 年版《中国药典》方法进行考察 (24 h 内), 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 测得 33 个共有峰保留时间 RSD 为 0.15%~1.36%、峰面积 RSD 为 0.54%~2.98%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 HPLC 指纹图谱建立 精密吸取 9 份“2.2”项下供试品溶液, 每份 10 μL , 在“2.3”项色谱条件下进样测定, 通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 对所得结果进行分析, 采用中位数法生成对照指纹图谱 (R), 共标定 33 个共有峰, 见图 1。

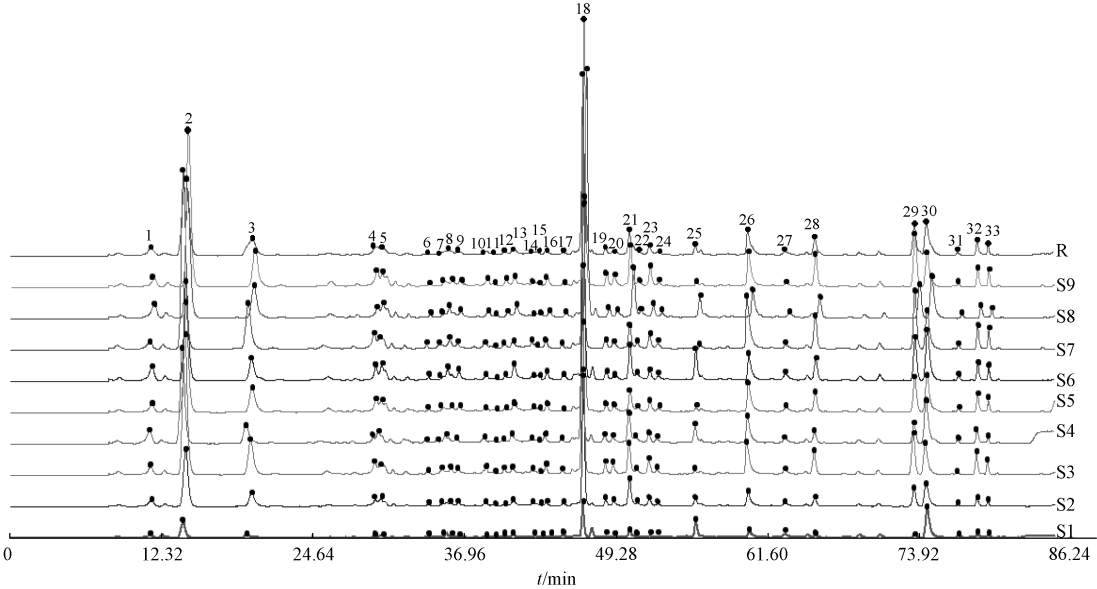


图 1 9 批样品 HPLC 指纹图谱

2.8 共有色谱峰的标识及归属分析 精密称取方中处方药材 (水蛭主要包含蛋白质和氨基酸, 故未对其进行检测), 置于圆底烧瓶中, 加 12 倍量水回流提取 2 次, 每次 60 min, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”项色谱条件下进样 10 μL 测定, 记录色谱图, 确认共有峰

药材归属, 结果见图 2。确认了 28 个共有峰的来源, 分别来自丹参 (10、16、17、25、30、32 号峰)、麦冬 (7、18、19、20 号峰)、赤芍 (1、2、3、5、24、26 号峰)、桃仁 (9、14、15 号峰)、木蝴蝶 (11、13、14、21、27、28、29、31、33 号峰)。

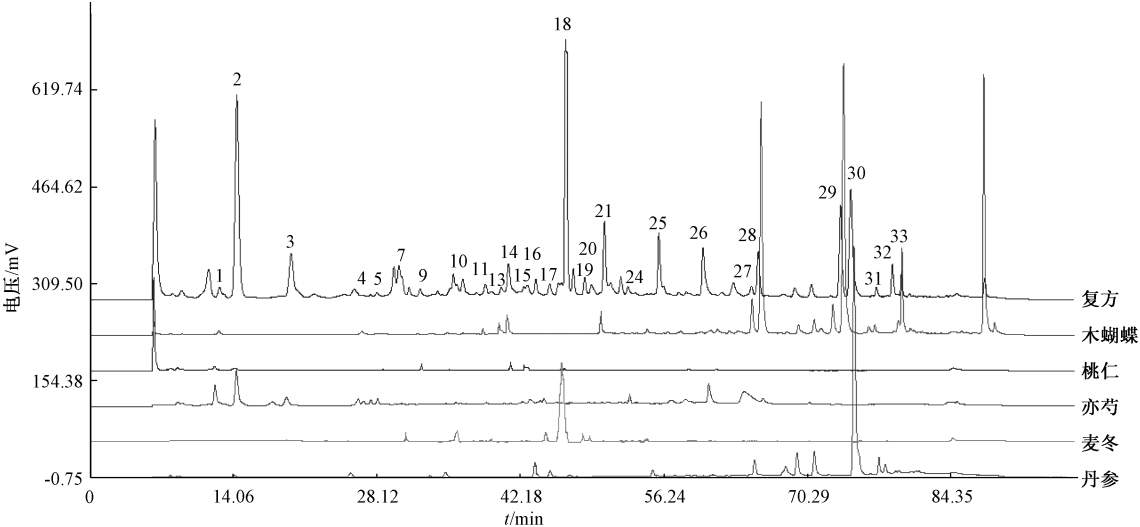


图 2 肺纤方及组成药材的 HPLC 色谱图

2.9 数据处理

2.9.1 主成分分析 将表1数据录入SPSS 22.0软件进行因子分析,得到可以代表原始峰面积的主成分、贡献率及解释的总方差,见表2。主成分个数的提取原则为筛选特征值大于1者^[13],故前6种成分的初始特征值分别为17.678、5.876、3.606、2.539、1.477、1.073,方差贡献率分别为53.569%、17.807%、10.927%、7.694%、4.477%、3.251%,累积方差贡献率为97.725%,包含了大部分相关信息。

将第1~3主成分作为变量,建立三维投影图载荷图(图3),在投影图中距离原点较远的点为权重较大的成分。在第1、第2主成分中,峰1~6、8~18、20、22、25~26、30~31、33的系数较大,可反映上述色谱峰的相关信息;同理,第3主成分主要反映了峰7、23的相关信息。

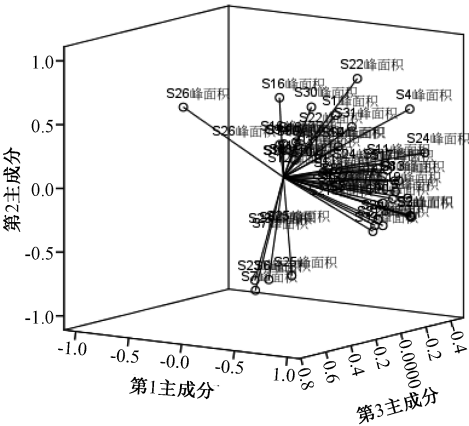


图3 各主成分载荷图

表2 各主成分总方差

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	17.678	53.569	53.569	17.678	53.569	53.569
2	5.876	17.807	71.377	5.876	17.807	71.377
3	3.606	10.927	82.303	3.606	10.927	82.303
4	2.539	7.694	89.997	2.539	7.694	89.997
5	1.477	4.477	94.474	1.477	4.477	94.474
6	1.073	3.251	97.725	1.073	3.251	97.725
7	0.493	1.494	99.218			
8	0.258	0.782	100.000			

2.9.2 正交试验分析 以提取指纹图谱共有峰主成分所得综合评分(F)为评价指标,主成分得分=主成分因子得分×相应方差算数平方根^[14],即 $F = 0.535\,69F_1 + 0.178\,07F_2 + 0.109\,27F_3 + 0.076\,94F_4 + 0.044\,77F_5 +$

$0.032\,51F_6$;料液比(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为影响因素,正交试验优化提取工艺,结果见表3,方差分析见表4。

表3 试验设计与结果

试验号	A 料液比/倍	B 提取时间/min	C 提取次数/次	D(空白)	F 综合评分
1	1:8(1)	30(1)	1(1)	(1)	-4.713
2	1:8(1)	60(2)	2(2)	(2)	-2.644
3	1:8(1)	90(3)	3(3)	(3)	0.042
4	1:10(2)	30(1)	2(2)	(3)	0.142
5	1:10(2)	60(2)	3(3)	(1)	-0.012
6	1:10(2)	90(3)	1(1)	(2)	2.119
7	1:12(3)	30(1)	3(3)	(2)	2.018
8	1:12(3)	60(2)	1(1)	(3)	1.786
9	1:12(3)	90(3)	2(2)	(1)	1.260
K ₁	-2.438	-0.851	-0.269	-1.155	—
K ₂	0.750	-0.290	-0.414	0.498	—
K ₃	1.688	1.140	0.683	0.657	—
R	4.126	1.991	1.097	1.812	—

表4 方差分析

来源	离均差平方和	自由度	F值	P值
A	28.066	2	4.647	>0.05
B	6.328	2	1.048	>0.05
C	2.131	2	0.353	>0.05
D(误差)	6.04	2	—	—

由表3可知,各因素影响程度依次为A>B>C,理论最优工艺为A₃B₃C₃;由表4可知,各因素均无显著影响(P>0.05)。综合考虑时间、成本等各方面因素,最终确定最优工艺为A₃B₂C₂,即加12倍量水提取2次,每次60 min。

2.9.3 验证试验 根据处方比例称取3份药材,按

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$ 。

“2.8.2”项下优化工艺提取，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项色谱条件下进样测定，计算各共有峰面积主成分综合评分，结果见表5。由此可知，工艺稳定可行，可用于工业化生产。

表 5 验证试验结果 (n=3)

编号	综合评分
1	3.380
2	3.290
3	3.320
平均值	3.330
RSD/%	1.380

3 讨论

中药复方发挥药效的关键，在于其多成分、多靶点的协同作用。因此，在选择中药复方最优提取工艺的过程中，如果只选用某一或某几种成分的含有量作为评价指标，则无法反映全方整体提取水平。

指纹图谱是一种评价中药复杂成分体系质量标准的有效手段，能较好地反映其整体上的相近程度，包括以峰面积、相对保留时间、相对峰面积为指标进行定性和半定量分析，在中药复方提取工艺优化中具有一定优势^[15]。本实验比较了不同梯度甲醇-水、乙腈-水的分离效果，确定文中色谱条件；通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统（A版）对9批样品HPLC指纹图谱进行分析，得到对照指纹图谱（R）及33个共有峰，并将其作为提取工艺优化指标。方法学研究结果显示，本实验所建立的方法具有良好的精密度、稳定性、重复性，可用于指标成分定量分析。

考虑到各组分权重系数难以确定，本实验采用主成分分析，将高维数据降低维，把33个共有峰组合成6个涵盖了原始色谱峰97.725%信息的综合指标，从而较好地浓缩、简化数据，为进一步正交试验极差分析和方差分析奠定基础。

综上所述，本实验建立了肺纤方HPLC指纹图谱，并与主成分分析等化学计量学方法相结合，用未知结构成分的模糊数据（特征色谱峰的总因子得分）进行多指标的综合评定，从而优化该方提取工艺。该方法既全面反映了药材整体提取水平，又在数据处理方面简单易行，具有较好的实用性和借鉴意义。

参考文献：

[1] 刘芳, 周小江, 袁志鹰, 等. 基于指纹图谱结合多指标测

定的玄参药材等级质量研究[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1238-1243.

[2] 王瑞, 闫玺镁, 顾超, 等. 多成分指标定量结合指纹图谱分析评价不同产地柴胡的质量[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2522-2525.

[3] 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.

[4] 谢凡, 施崇精, 杨秀清, 等. 基于信息熵理论的正交设计结合指纹图谱优选加味四妙颗粒的提取工艺[J]. 中草药, 2018, 49(6): 1331-1337.

[5] 杜平, 刘文, 卿勇军, 等. 不同评价指标对芍药甘草汤提取工艺优化的影响[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2188-2193.

[6] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.

[7] Jing J, Parekh H S, Wei M, et al. Advances in analytical technologies to evaluate the quality of traditional Chinese medicines[J]. Trends Anal Chem, 2013, 44: 39-45.

[8] 施崇精, 李雨珂, 刘小妹, 等. HPLC-DAD 多波长切换指纹图谱结合化学计量学评价不同产地川牛膝的药材质量[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2431-2436.

[9] 涂奇军, 徐玲, 聂晶, 等. 蛇胆陈皮制剂中陈皮 UPLC 指纹图谱[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2233-2237.

[10] 李海英, 贺鹏, 樊启猛, 等. 桃红四物汤的 HPLC 指纹图谱的总量统计矩及一次稳态投料量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 37-43.

[11] 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.

[12] 李卫飞, 许金凯, 支美汝, 等. 基于正交设计和主成分分析、层次分析相结合的知母盐炙工艺优化[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 4167-4170.

[13] 刘仁权. SPSS 统计软件[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.

[14] 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.

[15] 周梦楠, 王亚静, 张怡, 等. 基于 HPLC 指纹图谱和主成分分析考察醒脑静注射液的配伍稳定性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19): 80-86.