

基于化学计量学研究莪术-三棱药对水煎液物理参数与化学成分的相关性

单东杰¹, 罗秀明², 常艳丽¹, 吕芳¹, 姚鉴玲¹, 魏静¹, 于啊香¹, 董英¹, 张燕³, 折改梅^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

2. 东阿阿胶股份有限公司 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252200

3. 北京四环制药有限公司, 北京 101113

摘要: 目的 基于化学计量学对莪术-三棱药对水煎液物理参数与化学成分的相关性进行分析, 探索利用直观物理参数表征化学成分含量的可行性。方法 测定莪术-三棱药对水煎液的物理参数 (电导率、黏度、pH 值和色度); 采用苯酚-硫酸法测定水煎液的多糖含量、考马斯亮蓝法测定水煎液的总蛋白含量, 建立水煎液 HPLC 指纹图谱, 并采用 HPLC-MS/MS 技术表征水煎液中化学成分组成; 利用 Pearson 相关系数、灰色关联度、前向逐步回归法等化学计量学方法, 探索物理参数与化学成分的相关性, 并尝试建立以物理参数预测化学成分含量的数学模型。结果 pH 值与莪术-三棱药对水煎液总蛋白、二芳基庚烷类化合物含量相关性较强, 均为正相关; 电导率与总蛋白、多糖含量相关性较强, 均为正相关; 溶液亮度与总蛋白、二芳基庚烷类化合物含量关系密切, 与前者呈负相关、与后者呈正相关; 总蛋白、倍半萜类和二芳基庚烷类化合物含量对溶液的红绿、黄蓝色影响较大; 溶液黏度与总蛋白含量呈正相关。有机酸类成分、多糖和总蛋白的含量与物理参数的数学方程拟合度较高, 可以作为快速分析莪术-三棱药对水煎液化学成分含量的依据。结论 通过化学计量学分析, 莪术-三棱药对水煎液的物理参数与其化学成分呈现良好的相关性, 建立的数学模型初步表明可以通过简单的物理参数表征水煎液的化学成分含量。

关键词: 莪术-三棱药对; 物理参数; 总蛋白; 多糖; 化学计量学; 相关性

中图分类号: R283

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)17-5363-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.013

Correlation of physical parameters and chemical components of *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction based on chemometrics

SHAN Dong-jie¹, LUO Xiu-ming², CHANG Yan-li¹, LYU Fang¹, YAO Jian-ling¹, WEI Jing¹, YU A-xiang¹, DONG Ying¹, ZHANG Yan³, SHE Gai-mei¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. National Engineering Technology Research Center for Gelatin-based Traditional Chinese Medicine, Dong'e Ejiao Co., Ltd., Liaocheng 252200, China

3. Beijing Sihuan Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 101113, China

Abstract: Objective Based on chemometrics, the correlation analysis between physical parameters and chemical components of Ezhu (*Curcumae Rhizoma*)-Sanleng (*Sparganii Rhizoma*) decoction was conducted to explore the feasibility of using visual physical parameters to characterize chemical composition content. **Methods** The physical parameters (conductivity, viscosity, pH value and chromaticity) of the *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction were determined. The phenol-sulfuric acid method was used to determine the polysaccharide content of the decoction and coomassie bright blue method was used to determine the total protein content of the decoction. HPLC fingerprint was established and the chemical composition of the decoction was characterized by HPLC-MS/MS. The correlation between physical parameters and chemical composition was established by Pearson correlation coefficient, grey correlation degree and forward stepwise regression method. A mathematical model was established to predict chemical

收稿日期: 2022-04-16

基金项目: 北京市科技计划课题 (Z201100005420005)

作者简介: 单东杰 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。E-mail: bucmshandongjie@163.com

*通信作者: 折改梅 (1976—), 博士生导师, 研究员, 研究方向为中 (民族) 药药效成分和新药创制研究。

Tel: (010)53912129 E-mail: shegaimei@126.com

composition content by physical parameters. **Results** pH value was positively correlated with the contents of total protein and diarylheptanoids compounds of *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction. The electrical conductivity was positively correlated with the contents of total protein and polysaccharide contents. The brightness of solution was closely related to the contents of total protein and diarylheptanoids compounds, with negative correlation with the former and positive correlation with the latter. The contents of total protein, sesquiterpenoids and diarylheptanoids compounds had great effect on the red-green and yellow-blue of the solution. Solution viscosity was positively correlated with the contents of total protein content. The content of organic acids, polysaccharides and total protein was well fitted to the mathematical equations of physical parameters, which could be used as a basis for the rapid analysis of the content of chemical components in *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction. **Conclusion** Through the chemometric analysis, the physical parameters of *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction showed a good correlation with its chemical constituents, and the established mathematical model initially indicated that the chemical components content of decoction could be characterized by simple physical parameters.

Key words: *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* medicine pair; physical parameters; total protein; polysaccharide; chemometrics; correlation

汤剂作为中医传统用药的主要形式和药物剂型之一,其外在质量往往体现在其物理参数,如黏度、浊度、pH 值、电导率、表面张力、折光率等;内在质量往往体现在其化学成分,如在水煎煮过程中溶入水中的各药味所含的小分子成分(黄酮、蒽醌、生物碱、皂苷、萜类等)和生物大分子成分(蛋白质、多糖等),以及部分无机元素等。作为共同表征汤剂质量的物理和化学属性具有相关性,即化学成分组成、含量、存在形式等都会影响和改变其物理参数。例如,单萜、倍半萜等挥发性成分在水煎过程中形成饱和芳香水可使中药中的其他亲脂性成分溶解度显著增大;具有表面活性的皂苷类物质在汤剂中形成胶体溶液,可有效起到助溶和增溶的作用;生物碱类、有机酸等成分会改变汤剂 pH 值并影响体系内的酸碱平衡;黄酮类、儿茶素等成分与水煎液色度有关联性^[1];多糖、蛋白质等大分子成分会影响水煎液的密度、亮度以及黏度等^[2-3]。在中药领域已有将物理和化学属性进行相关性分析的研究报道^[4-7]。陈婷等^[4]采用 UPLC-MS/MS 技术分析乳香-没药药对水煎液中的化学成分,并将其与水煎液的物理参数(电导率、盐度、浊度、黏度、pH 值)进行相关性分析,结果表明化学成分的组成和含量都会影响水煎液的物理性质。其中,五环三萜酸酯与浊度呈显著正相关,倍半萜与黏度呈显著负相关。

化学计量学在中药研究中的应用已经成为国内外专家共同关注的研究热点,课题组围绕该热点开展了系列研究,尤其是在建模、预测和验证方面做了大量工作^[8-10]。目前中药领域常用的化学计量学分析方法主要有相关性分析、回归分析、主成分分

析、灰色关联度分析等^[11-12]。在中药物理和化学属性相关性分析方面,大部分只采用回归模型。本研究拟采用 Pearson 相关系数、灰色关联度以及前向逐步回归法等多种化学计量学方法分析中药物理和化学属性的相关性,并尝试利用前向逐步回归法建立以物理参数预测化学成分含量的数学模型。前向逐步回归算法过程为:(1)模型中只有一个单独解释因变量变异最大的自变量;(2)尝试将加入另一自变量;(3)根据自变量加入后模型对因变量的解释度是否增加为标准,重复步骤(2),直到建立对因变量解释度最高的模型。步骤(2)判断对模型解释程度的指标为赤池信息准则,该准则不仅能提高模型拟合度(极大似然),而且引入了惩罚项,使模型参数尽可能少,有助于降低过拟合的可能性。此外,前向逐步回归算法在数据导入分组时自动划分为训练集和测试集,这样建立的模型不仅拟合程度高,且经历过算法内部验证,更适用于建立预测模型。

莪术-三棱药对出自于清代《经验良方》中的三棱丸,是临床常用的经典药对,可活血化瘀,主要用于治疗血滞经闭腹痛之癥证^[13]。莪术-三棱药对临床常以 1:1 的比例与其他药味组合给药。莪术-三棱药对的主要化学成分为挥发油(单萜、倍半萜和芳香族衍生物等)、二芳基庚烷类、有机酸等^[13-14]。本研究以莪术-三棱药对为研究对象,测定药对水煎液的物理参数和化学成分,研究 2 类属性的相关性,探索利用直观物理参数表征化学成分含量的可行性。样品的含量测定过程复杂繁琐,建立预测模型后,则可以通过测量提取液的物理参数,快速计算各时刻的化学成分含量,降低中药中化学成分含量测定难度,为中药提取过程中的快速质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); KQ-100DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DDS-307A 电导率仪(上海佑科仪器仪表有限公司); 品式黏度计(上海宝山启航玻璃仪器厂); pH 计(Mettler Toledo 公司); CM-S 色度计(Konica Minolta 公司); 1901PC 紫外分光光度计(上海棱光有限公司); BT25S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); CP224C 万分之一天平[奥豪斯仪器(常州)有限公司]; DZKW4 电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司); 1100 型高效液相色谱仪(Agilent 科技有限公司); S6000 型高效液

相色谱仪[华谱科仪(北京)科技有限公司]; Agilent Q-TOF 6520 质谱仪(ESI 离子源, Agilent 科技有限公司)。

1.2 药材

莪术饮片由北京中医药大学王晶娟教授鉴定为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥根茎; 三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* Buch. -Ham. 的干燥块茎。所有样本均保存于北京中医药大学中药学院 B 座 417 实验室。26 批莪术和三棱饮片信息见表 1。

1.3 对照品与试剂

葡萄糖对照品(批号 S08J6G1, 上海源叶生物科技有限公司); 考马斯亮蓝(批号 EZ2811F373, 赛国生物科技有限公司); 牛血清白蛋白(批号

表 1 莪术和三棱饮片信息

Table 1 Information of *Curcuma* Rhizoma and *Sparganii* Rhizoma decoction pieces

编号	药材名称	产地	批号	编号	药材名称	产地	批号
1	莪术	广西	171001	14	莪术	广西	20180227
	三棱	四川	17090101		三棱	河南	20170701
2	莪术	广西	1601215	15	莪术	广西	1609001
	三棱	广西	170201001		三棱	江苏	17030305
3	莪术	广西	20180401	16	莪术	云南	161221
	三棱	江西	201803176		三棱	浙江	16032101
4	莪术	广西	160524	17	莪术	广西	170801
	三棱	河南	170301		三棱	河南	160902
5	莪术	广西	180301	18	莪术	广西	G00317J01
	三棱	浙江	180101		三棱	安徽	G08616F01
6	莪术	广西	20180327	19	莪术	广西	1611073
	三棱	河南	20160806		三棱	浙江	1611082
7	莪术	广西	160101	20	莪术	广东	601154140
	三棱	河南	17110101		三棱	河南	161025004
8	莪术	广西	20180327	21	莪术	广西	17042001
	三棱	河南	20180104		三棱	河南	161025004
9	莪术	广西	1601102	22	莪术	浙江	180160701
	三棱	江苏	1605195		三棱	浙江	160219
10	莪术	浙江	20170501	23	莪术	广西	18032212
	三棱	四川	20170305		三棱	江西	17111414
11	莪术	广西	170101	24	莪术	广西	815090101
	三棱	江苏	161001		三棱	浙江	816041891
12	莪术	广西	1606004	25	莪术	四川	20180607
	三棱	江苏	1606216		三棱	四川	20180617
13	莪术	广西	201801583	26	莪术	浙江	20120014
	三棱	江西	171201		三棱	河南	20160153

EZ2811E172, 赛国生物科技有限公司); 氯仿、正丁醇、乙醇、苯酚、磷酸、浓硫酸(北京化工厂)均为分析纯; 乙腈、甲酸(美国 Fisher 公司)均有色谱纯和质谱纯; 实验用水为去离子水(实验室自制)和娃哈哈纯净水(中国杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 24.0 进行统计分析, 组间差异性采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。Origin 2018 64 Bit 用于 Pearson 相关系数分析, R 语言 3.4.1 用于前向逐步回归分析, Microsoft Excel 用于灰色关联度分析。《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》用于指纹图谱的建立。

2 方法与结果

2.1 样品制备

称取不同批次莪术、三棱饮片各 100 g, 加入 2000 mL 去离子水, 浸泡 30 min, 煎煮 1 h, 滤过, 滤渣加水 1600 mL, 煎煮 1 h, 合并滤液, 减压浓缩至 1 g/mL (按生药量计), 得莪术-三棱药对水煎液样品, 记为 S1~S26。

2.2 物理参数测定

2.2.1 不同浓度稀释液样品制备 取“2.1”项下各批次药对样品, 加水稀释得 1/2、1/5、1/10、1/20 稀释液。

2.2.2 电导率 取“2.2.1”项下各批次不同稀释液样品适量, 室温下, 以电导率仪测定样品的电导率, 结果见表 2。

电导率是衡量溶液体系离子浓度的指标。结果表明不同批次样品电导率差异明显, 1/2 稀释液的电导率为 3.53~10.77 S/m, 1/5 稀释液的电导率为 1.61~6.70 S/m, 1/10 稀释液的电导率为 0.85~4.22 S/m, 1/20 稀释液的电导率为 0.43~2.23 S/m。说明不同批次样品中金属离子、蛋白、有机酸类带电胶体粒子浓度存在差异。此外, 由表 2 直观分析发现, 溶液按比例稀释, 其电导率值也随之降低, 不同浓度下样品的电导率具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2.3 pH 值 取“2.2.1”项下各批次不同稀释液样品适量, 室温下, 以 pH 计测定样品的 pH 值, 见表 2。

各稀释液的 pH 值在 3.49~5.81, 显弱酸性, 呈现显著性差异 ($P < 0.05$)。当溶液不断被稀释时, 溶液的 pH 值没有发生显著变化。推测煎煮过程中, 三棱自身所含的有机酸在溶出的过程中与其盐形成了缓冲体系, 因此溶液的酸碱度不易随着浓度的改变而改变。研究表明, 姜黄素类化合物在 $\text{pH} < 5$ 时较为稳定, 三棱中的有机酸构建了稳定的弱酸环境

使该类化合物不易被分解, 可能是二者相须配伍的原因之一^[15]。

2.2.4 黏度 取“2.2.1”项下各批次不同稀释液样品适量, 室温下, 以品式黏度计测定样品的黏度, 结果见表 2。

黏度是度量流体黏性程度的物理量。中药汤液中, 淀粉、黏液质、果胶等高分子物质的含量与药液的黏度密切相关。结果显示不同批次样品的相对黏度在 1.558~2.298 mm²/s, 随溶液浓度降低, 黏度会随着降低, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2.5 色度测定 取“2.2.1”项下各批次不同稀释液样品适量, 室温下, 以色度计测定样品的色度值, 数据用 L^* 、 a^* 、 b^* 色空间法表示。其中 L^* 为亮度值, L^* 值越大亮度越高; a^* 为红-绿色轴, a^* 值越大越红, a^* 值越小则越绿; b^* 为黄-蓝色轴, b^* 值越大越黄, b^* 值越小则越蓝, 结果见表 3。

由表 3 可知, 药对水煎液 L^* 值较大, 表明样品溶液的亮度较大, 且随着溶液的浓度降低, 亮度逐渐增大。与 a^* 值相比, 药对水煎液 b^* 值较大, 说明样品偏黄色, 与实际相符。 a^* 值较小且有负值出现, 表明样品中几乎没有绿色。各样品不同稀释液之间的色度值有显著性差异 ($P < 0.05$)。 dE_{ab}^* 是指在色空间中 2 个颜色点之间的距离, 表示 2 个颜色在视觉上的颜色差异, 可以分析同一浓度下样品的色度差异。根据行业的不同, dE_{ab}^* 的标准各不相同。但通常认为 dE_{ab}^* 小于 1 时, 人眼将无法分辨两种颜色的差别^[16]。

$$dE_{ab}^* = [(dL^*)^2 + (da^*)^2 + (db^*)^2]^{1/2}$$

依据上述公式对 26 批药对水煎液每 2 组间的 dE_{ab}^* 进行比较, 1/2 提取液颜色较深, 各样品之间的差异明显 ($dE_{ab}^* > 1$), 随着溶液浓度不断降低, 亮度越来越大, 样品颜色越来越浅, 样品间的差异越来越小, dE_{ab}^* 逐渐减小, 1/5、1/10、1/20 稀释液分别出现 1、5、16 个 $dE_{ab}^* < 1$ 的数值。

2.3 化学成分含量测定

2.3.1 多糖、蛋白质含量测定

(1) 供试品溶液制备: 取“2.1”项下的样品, 采用 Sevag 法除蛋白。取氯仿-正丁醇(4:1)适量加入样品液中, 充分振摇, 静置 30 min, 重复 3 次。采用倾析法取出上清液加入无水乙醇使醇含量达到 80%, 静置 1 h, 离心 30 min (4000 r/min) 后滤过, 弃滤液, 干燥后得到粗多糖。精密称取粗多糖 10 mg, 加水定容至 10 mL, 配制成 1 mg/mL 的粗

表 2 莪术-三棱药对水煎液电导率、pH 和黏度值测定结果

Table 2 Results of conductivity, pH and viscosity of *Curcuma Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction

编号	电导率/(S·m ⁻¹)				pH 值				黏度/(mm ² ·s ⁻¹)			
	1/2	1/5	1/10	1/20	1/2	1/5	1/10	1/20	1/2	1/5	1/10	1/20
S1	7.59	3.60	1.95	1.04	5.10	5.11	4.85	5.14	1.710	1.641	1.663	1.601
S2	8.05	4.01	2.11	1.22	5.01	5.04	5.06	4.92	1.755	1.614	1.640	1.586
S3	3.86	1.70	0.89	0.47	5.05	4.82	4.73	4.70	1.624	1.593	1.627	1.579
S4	5.42	1.81	1.27	0.70	5.12	5.01	4.98	5.32	1.657	1.569	1.614	1.569
S5	3.67	1.67	0.87	0.49	5.24	5.17	4.94	5.02	1.633	1.578	1.612	1.580
S6	8.18	4.03	2.27	1.22	4.22	4.28	4.43	4.43	1.742	1.621	1.642	1.600
S7	5.66	2.72	1.51	0.80	4.71	4.74	4.74	4.70	1.690	1.591	1.597	1.587
S8	8.43	4.29	2.40	1.26	4.93	4.94	4.84	4.84	1.780	1.632	1.608	1.601
S9	8.32	4.01	2.18	1.15	4.89	4.92	4.91	4.93	1.710	1.640	1.664	1.746
S10	6.83	3.21	1.77	0.90	5.21	5.26	5.01	5.08	1.715	1.625	1.559	1.591
S11	7.96	3.76	2.08	1.11	5.07	5.01	5.10	5.07	1.750	1.630	1.570	1.561
S12	3.53	1.61	0.85	0.43	5.26	5.09	4.89	4.85	1.631	1.604	1.572	1.708
S13	—	6.70	4.22	2.23	4.71	4.70	4.74	4.73	2.136	1.822	1.657	1.652
S14	9.01	3.88	2.10	1.19	5.27	5.25	5.23	5.23	1.746	1.632	1.627	1.607
S15	8.23	3.97	2.11	1.17	5.20	5.18	5.16	4.80	1.722	1.634	1.585	1.630
S16	—	6.65	3.91	2.01	4.63	4.75	4.74	4.78	2.298	1.709	1.666	1.607
S17	7.72	3.70	1.93	1.06	5.81	5.75	5.66	5.79	1.676	1.643	1.599	1.619
S18	7.83	3.98	2.24	1.20	3.49	3.63	3.71	3.91	1.643	1.593	1.568	1.600
S19	8.78	4.19	2.21	1.04	5.13	5.18	5.12	5.21	1.742	1.591	1.581	1.635
S20	7.23	3.51	1.90	1.20	4.30	4.38	4.41	4.23	1.706	1.615	1.607	1.622
S21	7.35	3.57	1.89	1.00	4.16	4.22	4.31	4.23	1.640	1.604	1.558	1.592
S22	10.77	5.47	3.19	1.70	5.25	5.38	5.23	5.20	2.196	1.793	1.649	1.679
S23	7.24	3.29	1.81	0.95	5.34	5.43	5.24	5.04	1.691	1.599	1.597	1.624
S24	4.53	2.01	1.10	0.58	5.20	5.13	5.03	5.22	1.612	1.627	1.577	1.608
S25	7.23	3.26	1.77	0.80	5.44	5.15	5.28	5.06	1.695	1.652	1.574	1.649
S26	7.50	3.46	1.87	1.00	4.98	4.98	5.01	5.01	1.661	1.601	1.572	1.604

多糖母液。再取 1~2 mL 母液定容至 10 mL 量瓶，即得多糖供试品溶液。

取“2.1”项下的样品，加水稀释 5 倍，即得蛋白质供试品溶液。

(2) 对照品溶液制备：精密称取 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖对照品 2 mg，加水定容于 10 mL 量瓶中，配制成 0.2 mg/mL 的母液。

精密称取牛血清白蛋白 2 mg，加水定容至 2 mL，得对照品母液。用去离子水梯度稀释母液，质量浓度分别为 20、40、80、120、160、200 µg/mL。

(3) 含量测定：采用优化后的苯酚-硫酸法测定 26 批莪术-三棱药对水煎液的多糖含量，平行测定 2

次求平均值，结果见表 4。

采用考马斯亮蓝法^[17]测定 26 批莪术-三棱药对水煎液的总蛋白含量，平行测定 2 次求平均值，结果见表 4。

2.3.2 HPLC-MS/MS 分析

(1) 供试品溶液制备：取“2.1”项下各批次样品，水浴蒸干，蒸干后的粉末用无水乙醇溶解，超声处理 15 min，过 0.22 µm 微孔滤膜即得供试品溶液。

(2) 混合对照品溶液制备：为了精确鉴定三棱、莪术共煎后的化学成分，分别称取适量各对照品（前期实验室分离纯化得到）用无水乙醇定容于 5 mL 量瓶中，得对照品储备液。分别吸取各对照品储备

表 3 莪术-三棱药对水煎液色度值测定结果

Table 3 Results of chromaticity value of *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction

编号	<i>L</i> *值				<i>a</i> *值				<i>b</i> *值			
	1/2	1/5	1/10	1/20	1/2	1/5	1/10	1/20	1/2	1/5	1/10	1/20
S1	66.18	83.13	89.24	94.75	16.40	4.48	0.70	-0.32	41.10	38.76	28.17	14.67
S2	62.08	77.79	86.86	92.64	20.71	9.37	2.46	-0.26	34.61	46.47	36.89	24.07
S3	82.65	93.52	96.14	98.22	4.34	-0.11	-0.56	-0.46	44.68	16.76	11.68	6.77
S4	81.66	93.02	94.40	97.37	5.29	-0.29	-0.53	-0.47	37.43	16.77	14.25	7.75
S5	81.84	91.50	95.12	97.52	4.84	0.54	0.07	-0.10	40.78	20.39	10.16	6.29
S6	76.54	86.01	92.75	96.76	11.10	2.40	-0.58	-0.99	35.42	41.33	24.59	13.15
S7	80.34	91.56	95.83	98.11	6.39	0.18	-0.54	-0.52	51.01	26.51	13.66	7.67
S8	62.07	78.69	87.97	93.84	21.07	5.46	1.12	-0.20	46.71	49.00	30.50	19.51
S9	62.64	81.37	90.24	95.38	22.66	6.21	1.06	-0.52	71.76	49.04	27.78	17.13
S10	75.85	87.04	92.30	96.06	11.55	2.90	0.79	0.04	43.25	33.04	18.76	9.76
S11	62.59	80.45	92.40	89.43	21.51	7.39	0.28	2.87	52.81	45.69	20.73	37.60
S12	86.08	93.96	96.65	98.27	3.65	0.08	-0.16	-0.18	29.17	18.41	8.91	5.34
S13	64.09	64.16	80.61	88.40	32.87	17.77	6.02	0.84	59.22	67.59	36.42	30.73
S14	72.67	87.12	91.60	95.23	13.78	3.18	0.56	0.02	34.17	26.48	25.62	10.78
S15	77.30	89.41	94.23	97.29	8.47	1.50	-0.01	-0.28	49.95	24.53	15.58	8.39
S16	48.56	83.70	84.03	91.37	31.03	6.21	3.63	0.24	72.26	17.28	42.33	22.21
S17	72.13	89.19	93.56	96.47	11.53	2.13	0.17	-0.19	44.34	21.77	18.85	10.28
S18	81.58	90.76	94.86	96.97	6.91	-0.33	-1.30	-0.89	51.24	32.87	18.67	9.92
S19	58.46	79.03	88.77	94.57	20.34	5.47	0.44	-0.89	60.09	50.64	28.92	17.71
S20	72.42	86.51	92.75	96.26	13.52	2.40	-0.04	-0.46	59.28	37.93	19.30	10.74
S21	49.44	61.64	77.43	87.47	23.12	25.42	10.27	2.13	20.30	78.41	57.65	38.87
S22	49.17	72.04	82.96	90.95	26.20	11.65	3.54	0.01	51.20	60.32	41.54	24.63
S23	65.83	82.46	91.77	95.95	15.81	3.79	-0.05	-0.79	39.88	45.58	24.35	14.50
S24	78.86	91.34	95.33	97.76	4.87	-0.02	-0.63	-0.51	37.20	24.28	13.61	8.02
S25	74.93	89.41	94.65	97.93	11.19	1.95	0.13	-0.35	50.66	30.92	16.53	8.84
S26	61.12	84.03	88.57	94.25	19.82	4.89	1.73	0.13	49.14	24.98	26.59	15.10

表 4 莪术-三棱药对水煎液多糖、蛋白质含量

Table 4 Contents of polysaccharide and protein in *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction

编号	多糖/(mg·g ⁻¹)	总蛋白/(mg·g ⁻¹)	编号	多糖/(mg·g ⁻¹)	总蛋白/(mg·g ⁻¹)
S1	1.786	0.420	S14	1.861	0.146
S2	3.104	0.378	S15	2.359	0.163
S3	1.468	0.211	S16	1.777	0.429
S4	0.536	0.145	S17	0.217	0.572
S5	0.932	0.151	S18	0.473	0.085
S6	1.474	0.142	S19	0.916	0.307
S7	1.170	0.205	S20	2.964	0.136
S8	3.063	0.346	S21	1.661	0.274
S9	3.022	0.226	S22	0.490	0.543
S10	0.986	0.260	S23	0.532	0.316
S11	1.057	0.291	S24	0.807	0.311
S12	0.683	0.249	S25	0.651	0.563
S13	1.361	0.553	S26	2.857	0.290

液适量，混匀即得混合对照品溶液。

(3) 液相条件：SilGreen C₁₈ HPLC 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；柱温 35 ℃；体积流量 1 mL/min；检测波长 280 nm；进样量为 10 μL；流动相为乙腈 (A) -0.05% 甲酸水溶液 (B)，梯度洗脱 (0~4 min, 10%~15% A；4~10 min, 15%~25% A；10~13 min, 25%~35% A；13~30 min, 35%~40% A；30~50 min, 40%~45% A；50~65 min, 45%~50% A)。

(4) 质谱条件：电喷雾离子源 (Dual ESI)，分别在正、负离子模式下检测，一级、多级模式分别扫描，分辨率为 30 000；离子源电压为 3.5 kV；毛细管加热温度为 320 ℃，体积流量为 12 L/min；雾化器压力为 207 kPa，Skimmer 为 65 V，碎裂电压 80 V，用质心模式采集，速率为 1 spectra/s, m/z 50~1000，碰撞能量为 25 eV。

(5) 精密度试验：取供试品溶液，按上述液相条件连续进样 6 次，各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD<3%，表明仪器精密度良好。

(6) 稳定性试验：取供试品溶液，按上述液相条件分别于 0、2、4、8、10、12 h 进样，各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD<2%，表明样品在 12 h 内稳定。

(7) 重复性试验：取莪术-三棱饮片，按供试品制备方法平行制备 6 份供试品溶液，按上述液相条件进样，各共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD<2%，表明方法的重复性良好。

(8) 指纹图谱的建立：记录 26 批药对样品色谱图，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》对所得莪术-三棱的色谱图进行分析生成对照

指纹图谱，见图 1。结果显示 26 批药对样品色谱的共有峰的数量较少，且各样品的相似度较低。为了尽可能全面地阐释药对中的化学成分，本实验最终选择了与对照指纹图谱及其他批次样品色谱图相似度较高、色谱峰数量较多、峰面积较高的 2 批样品 S10 和 S26，全面分析其色谱峰，最终得到 31 个色谱峰，包含 9 个共有峰。

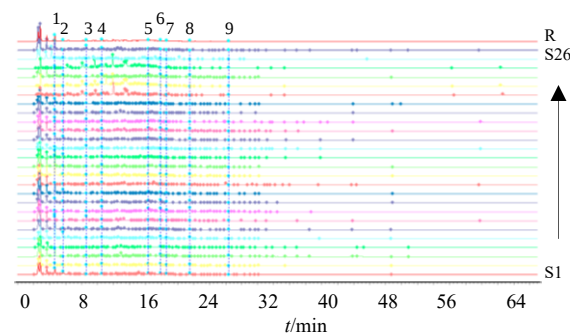


图 1 莪术-三棱药对水煎液 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint analysis of *Curcuma Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction

(9) 化学成分的鉴定：在收集多种化合物对照品的基础上，通过国内外数据库 (Scifinder、CNKI 等) 检索莪术、三棱 (科、属、种) 相关化学成分信息，建立莪术、三棱中各类化学成分数据库。并计算相关化合物的 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 、 $[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$ 准分子离子的精确质荷比，为化合物分析鉴定提供参考。通过药对的化学成分数据库、对照品的对比以及相关文献报道的数据^[18-22]，在 S10 和 S26 样品的水煎液中，实现了对 31 个色谱峰的定性，正、负离子模式下 S10 和 S26 样品水煎液的总离子流图见图 2。已鉴定出的化合物见表 5 和

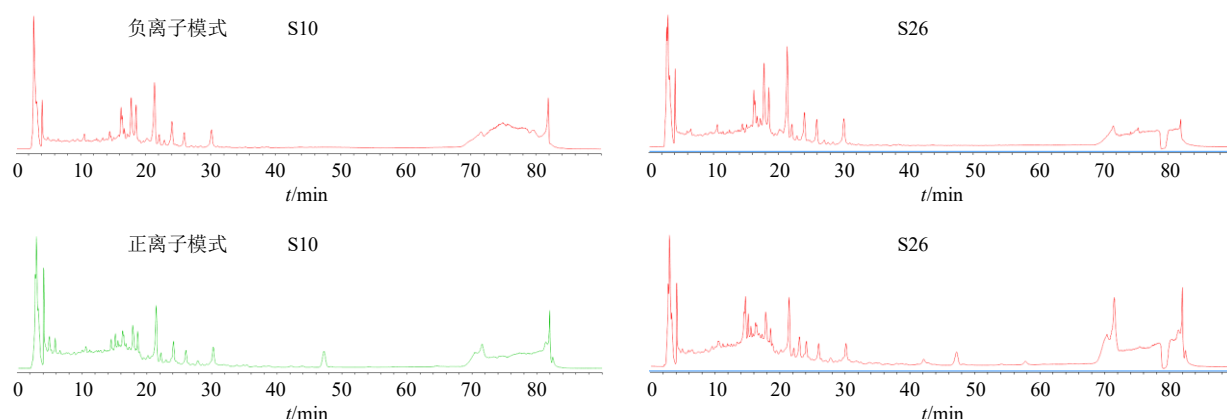


图 2 莪术-三棱水煎液总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of *Curcuma Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction

表 5 基于 HPLC-MS/MS 正、负离子模式下莪术-三棱药对水煎液中化合物信息

Table 5 Compounds information of *Curcuma Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction based on positive and negative ion mode of HPLC-MS/MS technology

序号	t_R/min	分子式	质量数 (m/z)		MS ² 碎片	化合物名称	类型
			$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$			
1	2.861	C ₂₁ H ₂₈ O ₆	375.177 6		339, 298, 251, 203, 179, 161, 131, 119, 89	3,5-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-heptane	二芳基庚烷
2	4.152	未知	230.102 2		215, 200, 187, 162, 145, 136, 109, 98	未知	有机酸
3	4.662	未知	441.197 8		423, 405, 383, 317, 279, 256, 237, 219, 192, 178, 159, 132, 113	未知	二芳基庚烷
4	5.292	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	253.129 5		236, 220, 204, 191, 166, 150, 122, 108, 96	isozedoarondiol 或其他同分异构体	倍半萜
5	6.348	未知	163.059 8	161.045 5	148, 133, 119, 109, 93, 79	未知	有机酸
6	6.719	C ₁₅ H ₂₄	205.060 9		180, 166, 146, 135, 120, 108, 98, 70	榄香烯	倍半萜
7	8.605	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	197.127 9		171, 141, 128, 112, 99, 84, 70, 54	环-(<i>L</i> -脯- <i>L</i> -缬)二肽	环二肽
8	9.274	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	265.142 8		247, 229, 214, 173, 159, 143, 121, 105	curcolonol	倍半萜
9	10.553	C ₁₀ H ₂₀ O ₆	237.132 6		244, 227, 201, 175, 163, 147, 125, 107, 95, 57	正丁基-β- <i>D</i> -吡喃果糖苷	糖苷
10	12.472	C ₇ H ₆ O ₂	123.043 5		109, 95, 77, 67	对羟基苯甲醛	有机酸
11	12.860	C ₁₅ H ₁₄ O	211.142 2		194, 180, 167, 154, 138, 120, 114, 98, 86, 79	linderazulene	倍半萜
12	13.447	C ₉ H ₈ O ₃	165.054 1		147, 119, 91, 77	对羟基桂皮酸	有机酸
13	14.394	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.108 5		181, 167, 153, 149, 135, 113, 107, 91, 69	阿魏酸	有机酸
14	16.109	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	297.147 2		266, 251, 237, 203, 187, 149, 133	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-6-hepten-3-one	二芳基庚烷
15	16.537	C ₁₉ H ₂₄ O ₅	333.166 5		313, 295, 209, 193, 179	3,5-dihydroxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-heptane	二芳基庚烷
16	16.728	C ₂₀ H ₂₃ O ₄	327.159 3		294, 277, 248, 217, 177, 163, 149, 137, 123, 107	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-3-one	二芳基庚烷
17	16.889	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	233.153 0		218, 209, 200, 187, 175,	furanogermacrene/curcumafuranol	倍半萜
18	17.248	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	359.151 7		315, 261, 236, 191, 165, 150, 136, 119	5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-3-heptanone	二芳基庚烷
19	17.750	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	315.161 7		297, 279, 209, 191, 173, 163, 149, 131, 121, 106	1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-heptane	二芳基庚烷
20	17.927	C ₁₉ H ₂₀ O ₂	281.144 1		267, 220, 187, 147, 133, 121, 107, 91	1-bis(4-hydroxyphenyl)-7-phenyl-6-hepten-3-one	二芳基庚烷
21	18.476/ 23.393	C ₂₁ H ₂₅ O ₆	373.163 9		356, 339, 315, 277, 247, 203, 185, 163, 149, 123, 103	3-acetoxy-5-hydroxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-heptane	二芳基庚烷
22	19.489	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	265.143 2		229, 201, 161, 139, 123, 107	zedoalactone H	倍半萜
23	21.384	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	373.167 3		331, 313, 295, 207, 163, 122, 93	3-acetoxy-5-hydroxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-heptane	二芳基庚烷
24	21.509/ 28.025	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	357.169 0		297, 203, 187, 163, 149, 133, 123, 107, 91	3-acetoxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-6-heptene	二芳基庚烷
25	21.927	C ₂₂ H ₂₈ O ₇	403.177 9		361, 343, 328, 221, 192, 161, 135, 108	1,5-epoxy-3-hydroxy-1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-3-methoxyphenyl-heptane	二芳基庚烷
26	22.238	未知	387.180 3		360, 327, 295, 226, 203, 177, 163, 149, 137, 123, 103	未知	二芳基庚烷
27	22.978	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	277.128 3		248, 201, 185, 167, 157, 149, 139, 115, 101	邻苯二甲酸二丁酯	有机酸
28	24.162	C ₂₃ H ₂₈ O ₈	431.172 4		389, 371, 329, 311, 293, 249, 207, 189, 163, 122	3,5-diacetoxy-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-heptane	二芳基庚烷
29	26.023	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	357.171 1		315, 297, 209, 191, 163, 149, 133, 106	3-acetoxy-5-hydroxy-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-heptane	二芳基庚烷
30	26.470	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	235.168 9		217, 199, 189, 177, 169, 147, 133, 105, 93	curcumenol 或其同分异构体	倍半萜
31	27.851	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	247.132 8		229, 211, 196, 181, 159, 149, 143, 133, 123, 107	zedoalactone F	倍半萜

图 3, 其中包括 15 个链状二芳基庚烷类化合物, 7 个倍半萜类化合物, 6 个有机酸类化合物以及 3 个其他成分 (1 个环二肽类、1 个挥发油和 1 个糖苷类)。

(10) 各类型成分的相对含量: 同一结构类型化学成分的物理性质以及对物理参数的影响相似, 且发挥的药效类似, 可以作为整体进行分析。因此, 将 31 个化合物按照结构类型分为 4 类: 二芳基庚

烷类、倍半萜类、有机酸类、其他类。将“指纹图谱的建立”项下生成的对照指纹图谱的色谱峰面积计为 1, 获得 4 类化合物在不同批次药对中的相对峰面积 (表 6), 以相对峰面积粗略地代表相对含量。

2.4 物理参数与化学成分相关性分析

2.4.1 参数编号 为了方便分析, 对物理参数 (1/5 稀释液) 和化学成分相对含量进行编号: C1-二芳基

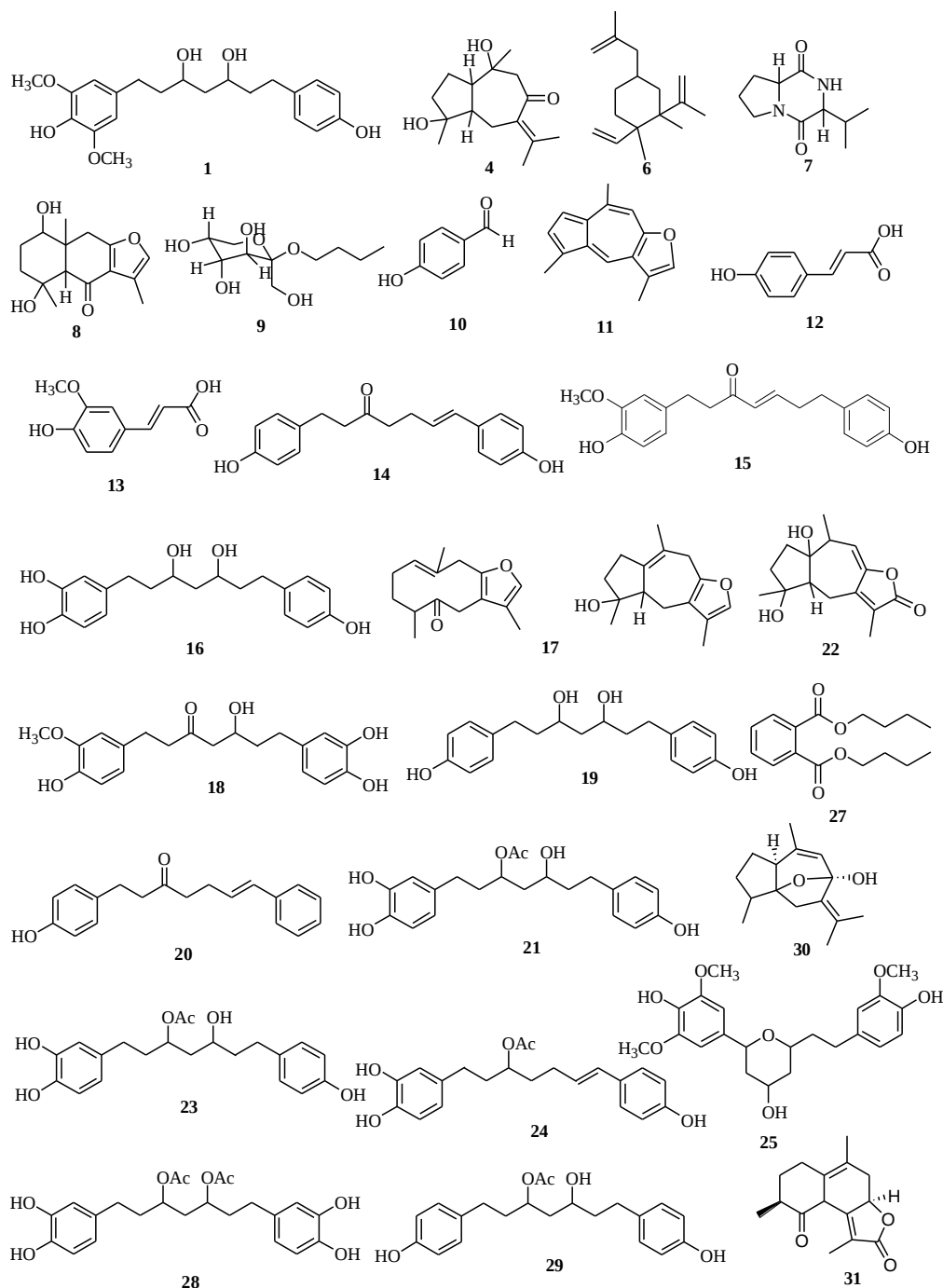


图 3 莪术-三棱药对水煎液中已鉴定的化学成分结构

Fig. 3 Structure formulation on chemical components of *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction

表 6 莪术-三棱药对水煎液各类型化合物的相对峰面积

Table 6 Relative peak area of each type of compound in *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* decoction

编号	相对峰面积			
	二芳基庚烷类化合物	倍半萜类化合物	有机酸类化合物	其他类
S1	231.83	20.76	24.63	14.66
S2	318.56	35.61	15.68	15.02
S3	18.83	26.73	72.12	28.46
S4	216.40	75.68	32.30	14.95
S5	235.67	18.69	21.12	13.09
S6	205.29	12.25	11.27	7.29
S7	269.80	19.73	20.17	15.40
S8	33.94	32.67	82.75	45.44
S9	18.89	27.20	12.46	39.10
S10	353.87	16.82	27.23	17.97
S11	172.84	43.70	8.11	10.07
S12	226.31	23.84	26.15	6.04
S13	145.43	74.10	32.37	23.23
S14	236.60	20.61	17.54	11.75
S15	271.58	14.53	8.68	9.53
S16	188.14	22.82	22.63	7.52
S17	88.67	57.69	14.32	4.11
S18	174.71	37.62	14.52	8.11
S19	298.34	32.17	24.64	14.97
S20	217.11	21.09	12.90	7.27
S21	142.00	19.73	16.21	10.30
S22	104.87	30.70	22.87	11.79
S23	315.97	40.38	13.58	11.64
S24	276.92	17.81	12.09	11.51
S25	219.13	113.22	29.12	9.52
S26	153.37	21.89	15.16	12.68

庚烷类化合物、C2-倍半萜、C3-有机酸、C4-其他、C5-多糖、C6-总蛋白；P1-pH、P2-电导率、P3- L^* 、P4- a^* 、P5- b^* 、P6-黏度。

2.4.2 Pearson 相关系数 利用 Origin 2018 软件计算物理参数和化学成分含量的 Pearson 相关系数，建立二者的相关性，结果见表 7。

结果表明，总蛋白含量与溶液的物理参数 pH 值、电导率、色度 L^* 和 a^* 以及黏度显著相关，且与亮度 L^* 呈负相关。但是其他数据显示，二芳基庚烷类化合物与有机酸和其他类成分显著相关；倍半萜类成分与总蛋白的含量显著相关；有机酸类成分与其他类成分相关性高；电导率受溶液色度和黏度的

影响；色度与黏度之间具有显著相关性。

2.4.3 灰色关联度 依据文献方法^[23]，分别以药对水煎液中物理参数 P1~P6 为参考序列，化学成分 C1~C6 为比较序列，分辨系数 ρ 取 0.5。根据相对关联度的大小，确定各化学成分对物理性质贡献的大小，结果见表 8。

结果表明二芳基庚烷类化合物和总蛋白对溶液的 pH 值影响较大，而有机酸类成分对 pH 值的影响不大，推测是因为有机酸与其盐形成了缓冲体系，导致 pH 值变化并不明显。但是形成的缓冲体系的 pH 值影响了二芳基庚烷类成分的溶出，因此二者相关性明显；结合 Pearson 相关系数可知，总蛋白、多

表 7 物理参数和化学成分含量的 Pearson 相关系数

Table 7 Pearson correlation coefficient between physical parameters and chemical composition content

相关系数	C1	C2	C3	C4	C5	C6	P1	P2	P3	P4	P5	P6
C1	1.000											
C2	-0.114	1.000										
C3	-0.464*	0.148	1.000									
C4	-0.514*	-0.006	0.683*	1.000								
C5	-0.203	-0.352	0.121	0.464*	1.000							
C6	-0.180	0.515*	0.118	0.005	-0.181	1.000						
P1	0.161	0.155	0.028	0.017	-0.187	0.457*	1.000					
P2	-0.182	0.097	-0.083	0.067	0.226	0.490*	-0.133	1.000				
P3	0.209	-0.057	0.013	-0.205	-0.232	-0.439*	0.134	-0.653*	1.000			
P4	-0.220	0.052	-0.054	0.109	0.194	0.396*	-0.176	0.546*	-0.962*	1.000		
P5	-0.162	0.055	-0.043	0.247	0.170	0.298	-0.220	0.507*	-0.924*	0.853*	1.000	
P6	-0.267	0.244	0.030	0.075	-0.036	0.679*	0.112	0.776*	-0.562*	0.493*	0.422*	1.000

*在 0.05 水平下显著相关 (相关系数 0.8~1.0 表示极强相关, 0.6~0.8 为强相关, 0.4~0.6 表示中等程度相关, 0.2~0.4 则为弱相关, 0~0.2 为极弱相关或无相关)

*Significant correlation at 0.05 level (correlation coefficient 0.8 to 1.0 indicates very strong correlation, 0.6 to 0.8 indicates strong correlation, 0.4 to 0.6 indicates moderate correlation, 0.2 to 0.4 indicates weak correlation, 0 to 0.2 indicates very weak correlation or no correlation)

表 8 物理参数与化学成分灰色关联度

Table 8 Grey correlation degree between physical parameters and chemical components

参考序列	化学成分	关联度	参考序列	化学成分	关联度
P1	C1	0.895 8	P4	C6	0.813 6
	C6	0.864 4		C5	0.801 1
	C4	0.863 3		C4	0.782 0
	C3	0.862 4		C3	0.770 2
	C5	0.837 5		C2	0.765 6
	C2	0.809 4		C1	0.763 5
P2	C6	0.862 8	P5	C6	0.860 9
	C5	0.843 1		C4	0.850 2
	C1	0.841 6		C1	0.847 6
	C4	0.834 6		C5	0.833 9
	C3	0.816 2		C3	0.827 2
	C2	0.801 5		C2	0.796 1
P3	C1	0.887 0	P6	C1	0.884 1
	C3	0.849 6		C6	0.861 6
	C4	0.849 3		C4	0.858 1
	C6	0.845 7		C3	0.855 1
	C5	0.826 4		C5	0.834 4
	C2	0.805 2		C2	0.817 5

糖和二芳基庚烷类化合物对电导率的影响较大, 且二芳基庚烷类成分含量越高、电导率越低; 二芳基庚烷类、有机酸类、其他类和总蛋白对亮度影响较

大, 结合 Pearson 相关系数可知, 总蛋白的含量与亮度为负相关, 而溶液的颜色与总蛋白含量均为正相关, 此结果有待进一步分析原因; 溶液中总蛋白

含量越高，黏度越大，而二芳基庚烷类化合物越多，则溶液的黏度越小。

2.4.4 前向逐步回归法 利用 R 语言软件，采用前向逐步回归法，分别以物理参数 P1~P6 为因变量，化学成分 C1~C6 为自变量做相关性拟合，分析物理参数与化学成分的相关性。6 个自变量会形成 63

种组合（C1、C1C2、C1C2C3 等），并从中筛选与因变量相关性最高的组合进行拟合。方程中参数的斜率越大，表明相关性越强，调整决定系数（ R_{adj}^2 ）值越高说明方程的拟合效果越好，图中颜色越深表示相关度越高。最终得到 6 个对 P1~P6 解释度最高的方程，结果见图 4 和表 9。

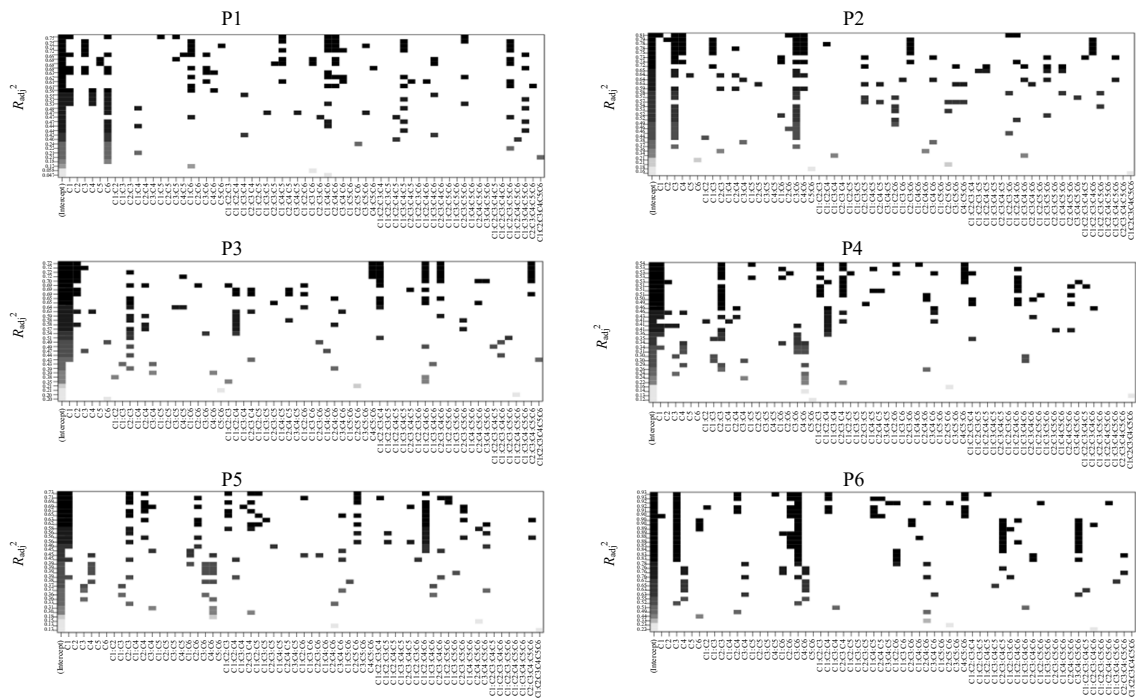


图 4 C1~C6 对 P1~P6 的相关性分析

Fig. 4 Correlation analysis of C1—C6 to P1—P6

表 9 C1~C6 对 P1~P6 相关性拟合方程

Table 9 Correlation fitting equation of C1—C6 to P1—P6

序号	方程	R_{adj}^2
1	$P1 = 1.206 + 0.012\ 4\ C1 + 5.758\ C6 - 0.002\ 9\ C1C5 + 0.032\ 6\ C5C3 + 0.000\ 25\ C1C5C4 - 0.002\ C1C6C4 + 0.007\ 16\ C6C4C2 - 0.003\ 66\ C6C5C2C3$	0.754
2	$P2 = 7.722 - 0.016\ 2\ C1 - 0.524\ C3 + 0.749\ C4 - 0.244\ C2C6 + 2.204\ C3C6 - 3.560\ C4C6 - 0.000\ 004\ 8\ C1C3C2C6 + 0.001\ 91\ C1C4C2C6$	0.807
3	$P3 = 27.476 + 0.3\ C1 + 0.085\ 1\ C2C3 - 0.024\ 2\ C1C5 - 0.000\ 2\ C1C2C3 - 0.002\ C2C3C4 - 0.003\ C1C2C6 - 0.016\ 5\ C1C4C6 + 1.912\ C4C5C6$	0.724
4	$P4 = 46.89 - 0.161\ C1 - 0.555\ C2 - 1.039\ C4C5C6 + 0.000\ 003\ C1C2C3C4 + 0.000\ 688\ C1C2C4C6 - 0.004\ 03\ C3C2C4C6 + 0.001\ 37\ C3C2C4C6C5$	0.542
5	$P5 = 168.833 - 0.578\ C1 - 0.144\ C2C3 - 0.058\ C4C2 + 0.000\ 374\ C1C2C3 + 0.003\ 34\ C3C2C4 + 0.002\ 56\ C1C2C5 - 3.150\ C6C2C5 + 0.001\ 8\ C1C2C4C6$	0.732
6	$P6 = 16.784 - 0.018\ 2\ C3 + 0.001\ 08\ C2C4 - 0.2\ C4C5 + 0.002\ 42\ C2C6 - 0.241\ C6C4 - 0.000\ 008\ C1C2C4 - 0.021\ 6\ C6C4C5 + 0.000\ 02\ C1C2C4C5$	0.662

由图 4 和表 9 可知，总蛋白和二芳基庚烷类化合物的含量对 pH 值影响较大，与灰色关联度结果一致。同时，多糖和有机酸类成分的组合与 pH 值的相关性也十分明显，意味着多成分的共同作用展现出

了各样品 pH 值的差异；有机酸和其他类成分与电导率相关性高，意味着此类化合物的含量受溶液电导率的影响，提示在提取这些化合物时注意控制电导率；二芳基庚烷类化合物与溶液的亮度关系密切。同

时,其他类成分、多糖和总蛋白组合对溶液亮度影响最大,呈正相关,即这几类成分含量高时,溶液的亮度较大;倍半萜类化合物和二芳基庚烷类化合物对溶液的红绿、黄蓝色影响较大,可能与这 2 类成分自身的颜色有关;黏度受有机酸类成分的影响,推测酸性环境会改变蛋白的性质,借此影响溶液的黏度。

综合 Pearson 相关系数、灰色关联度和前向逐步回归法 3 种相关性分析结果可知, pH 值与总蛋白、二芳基庚烷类化合物含量相关性较强,均为正相关;电导率与总蛋白、多糖含量的相关性较强,均为正相关;溶液亮度与总蛋白、二芳基庚烷类化合物含量关系密切,与总蛋白含量呈负相关、与二芳基庚烷类化合物含量呈正相关;总蛋白、倍半萜类和二芳基庚烷类化合物含量对溶液的红绿、黄蓝色影响较大;溶液黏度与总蛋白含量呈正相关。另外,二芳基庚烷类化合物几乎出现在了前向逐步回归拟合的每一个方程中,说明这类化合物与物理性质的关系最为密切。

2.4.5 物理参数与化学成分含量的数学关系
“2.4.2”~“2.4.4”项的实验结果表明,物理参数和化学成分之间具有一定的相关性,但是具体的数学关系尚不明确。采用“2.4.4”项下前向逐步回归法,建立以

物理参数为自变量、化学成分为因变量的数学模型。

数据集包含 26 组数据,每组包含 6 个自变量和 1 个因变量。训练集与测试集划分:将数据划分为 70% 的训练集和 30% 的测试集,分开存放。模型架构:筛选自变量(6 个自变量会形成 63 种组合(P1、P1P2、P1P2P3 等)中与因变量(C1~C6)相关性最高的组合进行拟合,构建物理参数预测化学成分含量的数学模型。利用训练集建立模型,测试集验证模型。图中颜色越深表示相关度越高, R_{adj}^2 值越高说明方程的拟合效果越好。最终得到 6 个相关方程,结果见图 5 和表 10。

结果表明 P1~P6 对 C3、C5、C6 的拟合程度较好,即有机酸类、多糖和总蛋白的含量与其他 6 个物理参数的数学方程拟合度较高。P1~P6 对 C3 (有机酸类)的相关性分析结果显示,溶液的电导率和溶液的黄蓝色 b^* 值的乘积对有机酸类成分含量影响最大,其次是溶液的红绿色 a^* 值。提示当溶液的电导率和黄蓝色 b^* 的乘积较大时,溶液中具有较多的有机酸成分,而红绿色 a^* 的大小正好相反; P1~P6 对 C5 (多糖)的相关性分析可知, pH 值和溶液红绿色 a^* 的乘积对多糖含量影响较大; P1~P6 对 C6 (总蛋白)的相关性分析表明,总蛋白含量受电

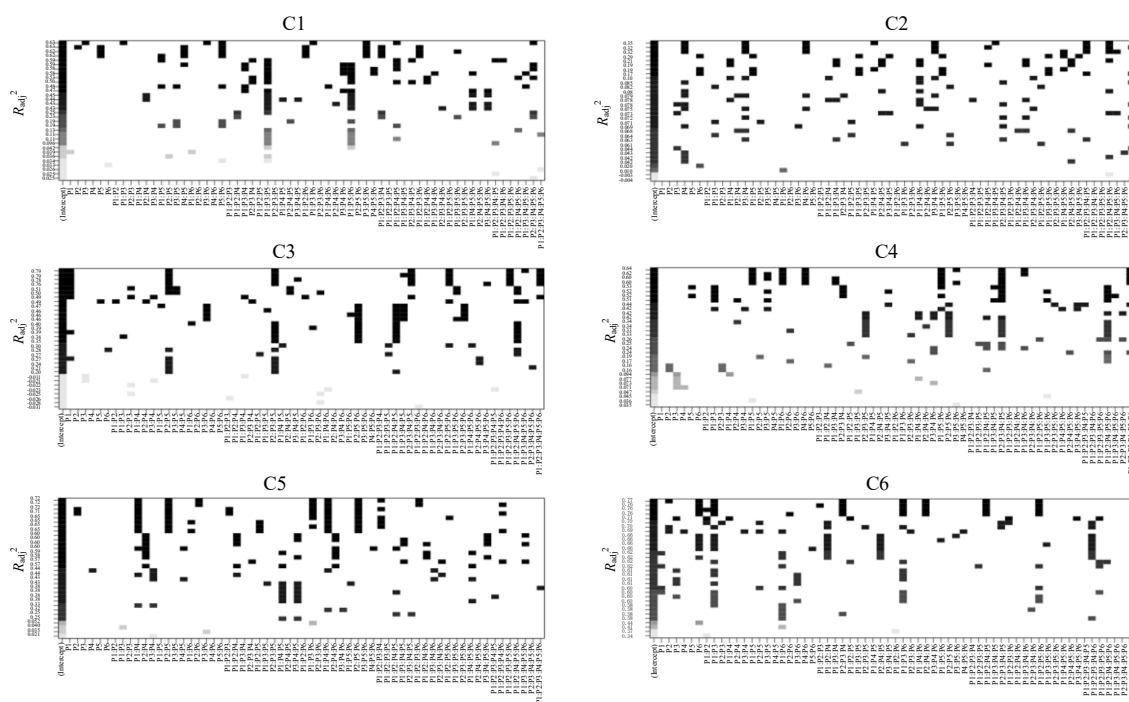


图 5 P1~P6 对 C1~C6 的相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of P1—P6 to C1—C6

表 10 P1~P6 对 C1~C6 相关性拟合方程
Table 10 Correlation fitting equation of P1—P6 to C1—C6

序号	方程	R_{adj}^2
1	$C1 = 3\ 127.380 - 778.218\ P3 + 146.632\ P1P3 + 44.893\ P3P6 - 8.531\ P5P6 - 8.853\ P1P6P3 + 0.102\ P3P5P6 + 0.601\ P1P2P4P5 - 0.002\ 21\ P1P2P3P4P5$	0.634
2	$C2 = 30.374 + 16\ 319.583\ P4 - 190.460\ P4P3 - 968.406\ P4P6 - 5.086\ P1P4P5 + 11.296\ P3P4P6 + 0.063\ 2\ P3P4P5 - 0.014\ 4\ P1P2P3P4P5 + 0.069\ 4\ P1P2P6P4P5$	0.353
3	$C3 = 1\ 006.017 - 187.777\ P4 + 155.983\ P5P2 - 0.065\ 3\ P4P6 - 1.806\ P2P3P5 - 0.032\ 2\ P2P3P4P5 - 1.771\ P1P2P5P6 + 0.020\ 5\ P1P6P3P2P5 + 0.000\ 531\ P1P6P3P4P5 + 0.000\ 357\ P1P2P6P4P5P3$	0.776
4	$C4 = 455.059 - 5.804\ P1P5 - 4.807\ P1P6 - 3.908\ P4P6 + 0.477\ P1P5P6 - 0.008\ 18\ P3P6P5 + 0.005\ 71\ P2P3P4P5 + 0.007\ 90\ P1P3P6P4 - 0.000\ 06\ P1P2P6P4P5P3$	0.638
5	$C5 = 35.469 + 6.352\ P1P4 - 1.236\ P2P5 - 0.411\ P2P6 - 0.004\ 45\ P1P3P6 - 0.397\ P1P4P6 + 0.073\ 8\ P2P5P6 + 0.000\ 89\ P1P2P3P4 + 0.000\ 902\ P1P2P3P6$	0.722
6	$C6 = 76.791 - 0.305\ P2 - 4.627\ P6 - 0.178\ P1P3 - 0.001\ 6\ P2P3P4 + 0.108\ P1P3P6 + 0.011\ P2P4P6 - 0.002\ 73\ P1P2P4P5 + 0.000\ 079\ 4\ P1P2P6P5$	0.770

导率和黏度单独影响较大,也受 pH 值和溶液亮度 L^* 乘积的影响,且均呈负相关。方程结果提示,通过测量上述物理参数,可以快速计算有机酸类成分、多糖、总蛋白含量,准确度较高。

但是 P1~P6 对 C1、C2、C4 的拟合程度效果欠佳,即二芳基庚烷类化合物、倍半萜和其他类成分与物理参数的拟合程度低。但也可以通过物理参数的大小,对几类化学成分的含量进行简单的预测。P1~P6 对 C1 (二芳基庚烷类化合物) 的相关性分析表明该方程用来拟合实验数据有一定的差距,但是从方程中可以发现, L^* 作为单独因素影响 C1,且斜率最大,表明其与 C1 的相关性强,即溶液的亮度与二芳基庚烷类呈现极高的负相关,提示当溶液的亮度比较高时,样品中的二芳基庚烷类化合物含量偏低; P1~P6 对 C2 (倍半萜) 的相关性分析发现, P4 出现在 C2 方程中的每一项中,且其斜率最大,表明溶液的红绿色对倍半萜类成分的影响极大,二者呈正相关。提示当样品溶液红绿色 a^* 增大时,其倍半萜类成分偏多,且随着成分含量的增加,溶液更靠近红色,但是由于方程的 R_{adj}^2 值偏小,说明该方程拟合的效果不好,因此不能作为评价标准。P1~P6 对 C4 (其他类成分) 的相关性分析可知, P1、P5 和 P6 3 者的相互组合受其他类成分的影响,且呈负相关。即 pH 值、黄蓝色 b^* 和黏度越小,其他类成分的含量越高。

3 讨论

本研究采用的苯酚-硫酸法测定多糖含量及建

立药对水煎液 HPLC 指纹图谱的色谱条件均为实验优化得到。苯酚-硫酸法考察了显色温度、时间,苯酚和浓硫酸用量等,方法学考察结果表明,该方法精密度高、重现性好、稳定可靠。HPLC 指纹图谱的色谱条件考察了流动相、流动相洗脱梯度、柱温和体积流量等。

实验测定了莪术-三棱药对水煎液不同浓度稀释液的物理参数 (电导率、黏度、pH 值和色度),结果发现电导率随着浓度的下降而降低;三棱中的有机酸及其盐形成缓冲体系,溶液的 pH 值随溶液浓度变化较小;由于水煎液在煎煮过程产生沉淀,对黏度的影响比较大,结果表现为黏度和溶液的浓度没有明显关系,提示黏度的测定需要在提取后尽快完成。由于受到药材中二芳基庚烷类和倍半萜等成分的影响提取液呈现棕褐色,不同批次之间的样品颜色差异明显,肉眼可见。

莪术-三棱药对水煎液多糖含量较高,质量分数为 0.217~3.104 mg/g。莪术多糖是莪术的活性成分之一,具有抗氧化、降血糖、抗肿瘤等活性^[24-25],目前,虽然对三棱中的多糖成分研究较少,但是其苷类成分多具有减少血小板聚集、延缓血栓形成的作用^[26]。提示今后的研究中应对该药对的多糖予以更多的关注。实验选择考马斯亮蓝法作为蛋白质含量测定方法,方法学考察结果表明该方法精密度高、重现性好、稳定性强,可以作为测定莪术-三棱药对水煎液中总蛋白含量的测定方法。实验室前期针对莪术开展的系列研究中发现不同批次莪术化学成分

存在差异^[9,27-28],且差异明显,其他文献也有相关报道。莪术与不同产地的三棱共煎后,增大了化学成分多样性和复杂性,并且加剧了成分之间的差异性,可能是各样品相似度较低的主要原因。

本研究首次利用化学计量学方法对莪术-三棱药对水煎液物理参数和多种化学成分含量进行相关性分析。利用 R 语言前向逐步回归方法,首次建立莪术-三棱药对水煎液的物理参数和化学成分含量的数学模型。结果表明有机酸类成分、多糖和总蛋白的含量与 6 个物理参数的数学方程拟合度较高($R_{adj}^2 > 0.72$),可以作为快速分析该药对化学成分含量的依据。样品的含量测定过程复杂繁琐,在对这几类成分进行提取富集时,则可以通过测量提取液的物理参数,快速计算各时刻的化学成分含量,为中药提取过程中的快速质量控制提供参考。

Pearson 相关系数结果发现各因素间的相互影响较大,自变量之间的相互作用效应会影响结果。逐步回归是在 R 语言的基础上进行的,不断剔除自变量,筛选最佳组合方式,但是部分方程的拟合度依旧不高。为了提高预测效果,后续研究会通过测定更多批次的相关数据,增大样本量、减小误差;测定更多的物理参数,扩大自变量范围,包括表面张力、浊度、Zeta 电位等,最终将化学成分和更多的特别是单独变化的物理参数关联起来;尝试更多的化学计量学方法,探索更好、更合适的建模方法以得到更好的预测效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 潘顺顺,李家贤,孙世利,等. 特色品种绿茶成分与茶汤色泽的相关性研究 [J]. 华南农业大学学报, 2012, 33(3): 307-310.
- [2] 田军军,刘莹,冯广义. 中药汤剂煎煮法和有效成分溶出率关系探讨 [J]. 吉林中医药, 2008, 28(5): 373-374.
- [3] 姚薇薇,朱华旭,郭立玮. 1 万 PS 膜对黄连解毒汤不同药物组合物理化学参数影响的初步研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(6): 359-361.
- [4] 陈婷,宿树兰,钱叶飞,等. 乳香-没药配伍前后汤液理化参数变化与化学成分的关联分析 [J]. 中成药, 2012, 34(8): 1529-1536.
- [5] Lan Z W, Zhang Y, Sun Y, et al. A mid-level data fusion approach for evaluating the internal and external changes determined by FT-NIR, electronic nose and colorimeter in *Curcumae Rhizoma* processing [J]. *J Pharm Biomed Anal*,

- 2020, 188: 113387.
- [6] Ren K, Fei Z P, Wang Y N, et al. Quality assessment of *Typhae Pollen Carbonisata* based on chromaticity analysis combined with UPLC fingerprinting and thrombin activity [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(6): 809-817.
- [7] Méndez J, González M, Lobo M G, et al. Color quality of pigments in cochineals (*Dactylopius coccus* Costa). Geographical origin characterization using multivariate statistical analysis [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(5): 1331-1337.
- [8] Wang L, Wang X H, Liu X Y, et al. Fast discrimination and quantification analysis of *Curcumae Radix* from four botanical origins using NIR spectroscopy coupled with chemometrics tools [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, 254: 119626.
- [9] Wang L, Ren X Y, Wang Y, et al. HPLC fingerprint and UV-Vis spectroscopy coupled with chemometrics for *Curcumae Radix* species discrimination and three bioactive compounds prediction [J]. *Microchem J*, 2021, 166: 106254.
- [10] Wang L, Li X, Wang Y, et al. Rapid discrimination and screening of volatile markers for varietal recognition of *Curcumae Radix* using ATR-FTIR and HS-GC-MS combined with chemometrics [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114422.
- [11] 吕邵娃,董书羽,郭玉岩,等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 226-230.
- [12] 冯鑫,房德敏,周永梅. 谱效关系分析在中药组方研究中的应用进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(3): 422-427.
- [13] 黄礼闯,赵梦亭,桑夏楠,等. 三棱-莪术药对化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6612-6616.
- [14] Zhou Y, Xie M, Song Y, et al. Two traditional Chinese medicines *Curcumae Radix* and *Curcumae Rhizoma*: An ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 4973128.
- [15] 齐莉莉,王进波. 单体姜黄素稳定性的研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28(1): 181-182.
- [16] 尉广飞,李佳,刘谦,等. 丹参根部颜色及其与活性成分含量的相关性研究 [J]. 山东农业科学, 2015, 47(8): 59-62.
- [17] 董洁,郭立玮,文红梅,等. 中药水提液中蛋白质含量测定方法研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2009, 23(6): 40-43.
- [18] Chang Y L, Xu G L, Wang X P, et al. Anti-tumor activity

- and linear-diarylheptanoids of herbal couple *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* and the single herbs [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112465.
- [19] Liu X Y, Chang Y L, Wang X H, *et al.* An integrated approach to uncover anti-tumor active materials of *Curcumae Rhizoma-Sparganii Rhizoma* based on spectrum-effect relationship, molecular docking, and ADME evaluation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114439.
- [20] 丁中涛, 周俊, 谭宁华. 金铁锁中的四个环二肽 [J]. 中草药, 2000, 31(11): 803-805.
- [21] 蒋建兰, 靳晓丽, 乔斌, 等. HPLC-ESI-MS/MS 分析姜黄中姜黄素类化合物 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1582-1588.
- [22] 丛浦珠, 李筍玉. 天然有机化合物质谱图集 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- [23] 于萍, 李克. 使用 Microsoft Excel 进行数据的灰关联分析 [J]. 微型电脑应用, 2011, 27(3): 29-30.
- [24] 姚远. 黄芪-莪术抗肝癌活性组分筛选及其机制研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2017.
- [25] 段晋宁, 肖旺, 曾建红, 等. 莪术多糖对糖尿病大鼠血糖、抗脂质过氧化作用的影响与单糖组分分析 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(3): 569-572.
- [26] 贺潇潇, 吴启南, 王新胜, 等. 基于多指标质量评价技术研究不同干燥方法对三棱品质的影响 [J]. 中药材, 2014, 37(1): 29-34.
- [27] Ren X Y, He T, Wang J J, *et al.* UV spectroscopy and HPLC combined with chemometrics for rapid discrimination and quantification of *Curcumae Rhizoma* from three botanical origins [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 202: 114145.
- [28] Yu Wang, Ting He, Jingjuan Wang, *et al.* High performance liquid chromatography fingerprint and headspace gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometrics for the species authentication of *Curcumae Rhizoma* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 202: 114144.

[责任编辑 潘明佳]