

基于特征图谱的小儿消积止咳口服液量质传递相关性研究

雷璇¹, 汪芸兰¹, 魏玄¹, 张颖¹, 屈琼¹, 赵小梅¹, 赵佩媛¹, 张新博¹, 邱金清¹, 段玺², 宋逍^{1,3*}

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000

3. 中药制药与新药开发教育部工程研究中心, 北京 100029

摘要:目的 建立 HPLC 特征图谱检测方法, 将物性参数及化学成分结合进行相关性分析研究小儿消积止咳口服液(Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid, XXZOL)的提取、醇沉、浓缩过程中的量质传递规律, 为 XXZOL 在生产过程中的质量控制提供帮助。方法 分别建立 15 批 XXZOL 制备过程中的提取液、醇沉液、浓缩液的特征图谱, 并测定 15 批提取液、醇沉液、浓缩液的物性参数(pH 值、电导率、相对密度), 结合化学成分含量进行相关性分析, 得到在 XXZOL 制备过程中提取液、醇沉液、浓缩液之间的量质传递规律。结果 建立了 15 批 XXZOL 中提取液、醇沉液、浓缩液的特征图谱, 标定出 13 个共有峰, 根据对照品指认出 6 个色谱峰, 确定为 5-羟甲基糠醛(峰 2)、绿原酸(峰 4)、连翘酯苷 A(峰 8)、芸香柚皮苷(峰 9)、橙皮苷(峰 10)、新橙皮苷(峰 11); 经主成分分析(principal component analysis, PCA), 提取出 5 个主成分, 累积方差贡献率为 91.3%; 量质传递规律研究发现 6 个成分在提取液-醇沉液中的转移率较低, 在醇沉液-浓缩液中的转移率较高。根据正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)筛选得到 5 个差异指标; 根据测定的物性参数与化学成分相关性分析, 醇沉液与浓缩液中相对密度与芸香柚皮苷的含量都呈显著正相关, 并且连翘酯苷 A 的含量与 pH 值呈显著负相关, 提取液与浓缩液中新橙皮苷含量与连翘酯苷 A 含量都呈显著负相关。5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、新橙皮苷在提取液、醇沉液、浓缩液之间都呈显著正相关, 橙皮苷含量在醇沉液和浓缩液之间呈显著正相关。结论 得到的 XXZOL 的提取、醇沉、浓缩过程的量质传递规律, 可为 XXZOL 在生产过程中的质量控制提供帮助。**关键词:** 小儿消积止咳口服液; 特征图谱; 量质传递; 质量控制; 质量标志物; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 电导率; 相对密度; 5-羟甲基糠醛; 绿原酸; 连翘酯苷 A; 芸香柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)16-5182-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.16.007

Correlation between quantity and quality transfer of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid for children based on characteristic chromatogram

LEI Xuan¹, WANG Yun-lan¹, WEI Xuan¹, ZHANG Ying¹, QU Qiong¹, ZHAO Xiao-mei¹, ZHAO Pei-yuan¹, ZHANG Xin-bo¹, QIU Jin-qing¹, DUAN Xi², SONG Xiao^{1,3}

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

3. Engineering Research Center for Pharmaceutics of Chinese Materia Medica and New Drug Development, Ministry of Education, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To establish a HPLC characteristic chromatogram detection method, the physical parameters and chemical composition were combined for correlation analysis to study the mass transfer law of the extraction, alcohol precipitation and concentration process of Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid (小儿消积止咳口服液, XXZOL), so as to provide help for the quality control of XXZOL in the production process. **Methods** The characteristic chromatograms of extract, alcohol precipitate solution and

收稿日期: 2023-03-17

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1711204); 陕西省教育厅项目(21JC011); 陕西省中医药管理局(2021-04-ZZ-007)

作者简介: 雷璇(1999—), 女, 汉, 陕西省西安市, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂工艺与新产品开发。

Tel: 18209187521 E-mail: 2216539744@qq.com

*通信作者: 宋逍(1979—), 男, 汉, 陕西省乾县人, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中药制剂工艺与新产品开发。

Tel: 15319015083 E-mail: song-xiaoyao@163.com

concentrated liquid in the preparation process of 15 batches of XXZOL were established, and the physical parameters (pH value, conductivity, relative density) of 15 batches of extract, alcohol precipitate solution and concentrated liquid were determined. The correlation analysis was carried out by combining the content of chemical components, and the mass transfer law between extract, alcohol precipitate solution and concentrated liquid in the preparation process of XXZOL was obtained. **Results** The characteristic chromatograms of the extract, alcohol precipitation solution and concentrated solution of 15 batches of XXZOL were established, and 13 common peaks were identified. According to the reference substance, six chromatographic peaks were identified as 5-hydroxymethylfurfural, chlorogenic acid, forsythoside A, narirutin, hesperidin and neohesperidin. Five principal components were extracted by principal component analysis (PCA), and the cumulative variance contribution rate was 91.3%. The study of mass transfer law found that the transfer rate of six components in water extract-alcohol precipitate was low, and the transfer rate in alcohol precipitate-concentrated solution was high. Five differential indexes were screened according to orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). According to the correlation analysis between the measured physical parameters and the chemical composition, the relative density in the alcohol precipitation solution and the concentrated solution was significantly positively correlated with the content of narirutin, and the content of forsythoside A was significantly negatively correlated with pH value. The content of neohesperidin in the extract and concentrated solution was significantly negatively correlated with the content of forsythoside A. There was a significant positive correlation between 5-hydroxymethylfurfural, chlorogenic acid, forsythoside A, narirutin and neohesperidin in the extract, alcohol precipitation and concentrated liquid. The content of hesperidin was significantly positively correlated between alcohol precipitation and concentrated liquid. **Conclusion** The quality transfer law of the extraction, alcohol precipitation and concentration process of XXZOL obtained in this study can provide help for the quality control of XXZOL in the production process.

Key words: Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid; characteristic chromatogram; quantitative transfer; quality control; quality markers; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; electric conductivity; relative density; 5-hydroxymethylfurfural; chlorogenic acid; forsythoside A; narirutin; hesperidin; neohesperidin

小儿消积止咳口服液 (Xiaoer Xiaoji Zhike Oral Liquid, XXZOL) 是依据“食积咳嗽”治疗理论研发的儿科用的中药制剂, 不仅是鲁南制药集团股份有限公司重点产品之一, 也是国家中药保护品种之一。XXZOL 由炒山楂、槟榔、枳实、蜜枇杷叶、瓜蒌、炒莱菔子、炒葶苈子、桔梗、连翘、蝉蜕 10 种中药组成, 具有清热肃肺、消积止咳的功能^[1], 临床用于小儿饮食积滞及痰热蕴肺导致的咳嗽、咳痰、腹胀、口臭等症^[2-4]。炒山楂及槟榔为处方中的君药, 具有消食导滞之功效, 消食化积, 则郁热痰浊无依, 生热生痰无源^[5]; 蜜枇杷叶、瓜蒌、桔梗、连翘为处方中的臣药, 具有清肺化痰同时还具有宣散肺气的作用^[6]; 葶苈子、莱菔子、蝉蜕、枳实为处方中的佐药, 葶苈子泄肺平喘的作用较强, 莱菔子主降气化痰, 蝉蜕可宣散肺热、消食化积、枳实行气消痰; 桔梗是处方中的使药, 除了具有宣肺利气和祛痰止咳的作用之外, 还能载药上行直达病所^[7]。10 味药共同发挥消积化痰、宣肺止咳的功效。消去胃内食积, 脾的运化功能恢复, 绝生痰之源、肺气宣通、咳嗽停止, 从而恢复正常^[8-9]。XXZOL 是目前临床常用于治疗小儿咳嗽的有效药物, 该方针对小儿体质和咳嗽常见病机特点选药配伍^[10], 其处方配伍严密, 药性平和, 君臣佐使分明, 不仅用于治疗小儿

食积咳嗽, 还可用于治疗小儿支原体肺炎^[11]、支气管哮喘^[12]、慢性咳嗽^[13]、变异性哮喘等^[14], 具有较好疗效。《中国药典》2020 年版中规定的标准是与槟榔、连翘、桔梗对照药材及辛弗林对照品进行薄层鉴别, 用 HPLC 测定辛弗林的含量, 并没有对 XXZOL 整体的质量控制进行研究, 难以有效反映该制剂的整体质量^[15]。

从中医的整体观出发, 中成药从提取、醇沉、浓缩过程中, 各参数间会具有一定的传递性, 在化学成分含量测定的基础之上可以考虑增加物性参数的测定, 单个指标成分与多个物性参数之间相互对应, 为中药生产工艺规范化研究提供更加综合的数据参数^[16]。刘昌孝院士^[17]首次提出质量标志物 (Q-Marker) 的概念, 指出中药 Q-Marker 是指中药材以及中药产品 (如中药饮片、中药汤剂、中药提取物、中成药制剂) 中本来存在的或者在中药生产过程中形成的和中药功效密切相关的化学成分^[18], 可以反映出中药安全性及有效性的标示性物质。根据中药 Q-Marker 的定义, 基于质量传递与溯源、成分特有性、成分有效性、复方配伍环境、成分可测性 5 个方面对 XXZOL 进行预测分析^[19-20]。现有文献研究发现, 橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷、绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 与 XXZOL 的有效性密切相关, 且

可测性较高,可以作为 XXZOL 的质量标志物^[21-25]。

基于此,本研究通过 HPLC 指纹图谱结合多指标成分含量测定,建立 XXZOL 的特征图谱及质量控制方法。运用 SPSS 25.0 进行主要成分与物性参数(pH 值、电导率、相对密度)间的相关性分析,表示 XXZOL 从提取、醇沉、浓缩的物性参数与主要成分间的动态变化过程,可为中药生产智能化、产业化奠定一定的实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-250DE 型数控超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司;D101 型电热鼓风干燥箱,北京科伟永鑫实验仪器设备厂;安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;高速多功能粉碎机,永康市铂欧五金制品有限公司;New CLassic MS-S 型十万分之一分析天平,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;PHS-3E 型雷磁 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;DDS-307A 型电导率仪,杭州齐威仪器有限公司。

1.2 试药

实验所用中药材均经陕西中医药大学中药鉴定教研室颜永刚教授鉴定,炒山楂为蔷薇科山楂属植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实的炮制品;槟榔为棕榈科槟榔属植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子;枳实为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥

幼果;蜜枇杷叶为蔷薇科枇杷属植物枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 的干燥叶的炮制品;瓜蒌为葫芦科栝楼属植物栝楼 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 的干燥成熟果实;炒莱菔子为十字花科萝卜属植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子的炮制品;炒葶苈子为十字花科播娘蒿属植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 的干燥成熟种子的炮制品;桔梗为桔梗科桔梗属植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 的干燥根;连翘为木犀科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实;蝉蜕为蝉科昆虫黑蚱蝉 *Cryptotympana pustulata* Fabricius 的若虫羽化时脱落的皮壳。

乙腈、甲醇,色谱纯,美国 Fisher 公司;水为纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司;磷酸,色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯;对照品 5-羟甲基糠醛,批号 B21832,质量分数≥98%,上海源叶生物技术有限公司;对照品绿原酸(批号 B20780)、连翘酯苷 A(批号 PS011810)、芸香柚皮苷(批号 PS011543)、柚皮苷(批号 PS001113)、橙皮苷(批号 PS011588)、新橙皮苷(批号 PS010413),质量分数≥98%,均购自成都普思生物科技股份有限公司。

15 批 XXZOL 提取液、醇沉液、浓缩液均为实验室自制,各批提取液、醇沉液、浓缩液所对应的饮片信息见表 1。

表 1 15 批中药饮片来源信息

Table 1 Information of 15 batches of Chinese herbal decoction pieces

XXZOL 编号	炒山楂	槟榔	枳实	蜜枇杷叶	瓜蒌	炒莱菔子	炒葶苈子	桔梗	连翘	蝉蜕
S1	山东	广东	湖南	四川	浙江	广东	河北	安徽	山西	河南
S2	山东	海南	江西	广东	山东	河南	河南	安徽	陕西	河南
S3	山东	四川	陕西	广东	河北	四川	陕西	陕西	陕西	陕西
S4	山东	广西	重庆	广东	河北	甘肃	河北	河南	晋城	陕西
S5	山东	广西	四川	四川	江苏	河北	河北	陕西	陕西	陕西
S6	山东	广东	陕西	四川	山西	河北	江苏	陕西	安徽	安徽
S7	山东	云南	四川	湖北	山西	河北	山东	陕西	陕西	安徽
S8	山东	广西	江西	浙江	河北	陕西	陕西	陕西	山西	陕西
S9	山东	广东	江西	广东	河北	河北	江苏	陕西	山西	河北
S10	山东	河南	福建	江苏	陕西	陕西	河北	吉林	山西	陕西
S11	陕西	河南	陕西	河南	河北	陕西	河北	陕西	陕西	陕西
S12	山东	广东	福建	福建	河南	甘肃	山东	安徽	陕西	山东
S13	河北	广东	湖北	广东	安徽	河南	河北	安徽	安徽	安徽
S14	山东	海南	江西	广东	河北	河北	河北	山西	安徽	湖北
S15	河北	海南	江西	广西	河北	河北	陕西	陕西	陕西	山东

2 方法与结果

2.1 XXZOL 浓缩液的制备过程

分别称取炒山楂 20.0 g、槟榔 20.0 g、枳实 20.0 g、蜜枇杷叶 20.0 g、瓜蒌 26.8 g、炒莱菔子 20.0 g、炒葶苈子 20.0 g、桔梗 20.0 g、连翘 20.0 g、蝉蜕 13.2 g。采用 10 倍量水提取 2 次, 每次 1.5 h, 合并滤过, 即得提取液; 药液浓缩至 167 mL, 加入乙醇至含醇量为 60%, 4 ℃ 静置 20 h 滤过, 即得醇沉液; 继续回收乙醇并浓缩至 100 mL, 即得浓缩液。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷适量, 加甲醇配制成分别含 5-羟甲基糠醛 191.68 μg/mL、绿原酸 314.00 μg/mL、连翘酯苷 A 828.00 μg/mL、芸香柚皮苷 1 198.00 μg/mL、橙皮苷 198.72 μg/mL、新橙皮苷 1 532.00 μg/mL 的混合对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 各单味药供试品溶液 按照“2.1”项下 XXZOL 制备方法, 分别称取炒山楂 20.0 g、槟榔 20.0 g、枳实 20.0 g、蜜枇杷叶 20.0 g、瓜蒌 26.8 g、炒莱菔子 20.0 g、炒葶苈子 20.0 g、桔梗 20.0 g、连翘 20.0 g、蝉蜕 13.2 g, 制备得到各单味药样品溶液, 精密量取 2 mL 各单味药样品溶液至 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.2 阴性对照溶液的制备 分别称取除去炒山楂、槟榔、枳实、蜜枇杷叶、瓜蒌、炒莱菔子、炒葶苈子、桔梗、连翘、蝉蜕的其余饮片, 按照“2.1”项下的制备方法操作, 精密量取 2 mL 放置 10 mL 量瓶内, 甲醇定容, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得阴性对照溶液。

2.3.3 提取液供试品溶液 按照“2.1”项下所制备的 XXZOL 提取液, 精密量取 2 mL 放置 10 mL 量瓶内, 甲醇定容, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得提取液样品供试品溶液 (AS1~AS15)。

2.3.4 醇沉液供试品溶液 按照“2.1”项下 XXZOL 口服液制备方法, 精密量取 1 mL 放置 10 mL 量瓶内, 甲醇定容, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得醇沉液样品供试品溶液 (BS1~BS15)。

2.3.5 浓缩液供试品溶液 按照“2.1”项下所得到的 XXZOL 浓缩液, 精密量取 0.5 mL 放置 10 mL 量瓶内, 甲醇定容, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得浓缩液样品供试品溶液 (CS1~CS15)。

2.4 特征图谱分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Acclaim TM 120A C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.2% 磷酸水溶液-乙腈, 洗脱梯度: 0~10 min, 5% 乙腈; 10~15 min, 5%~10% 乙腈; 15~20 min, 10% 乙腈; 20~25 min, 10%~15% 乙腈; 25~65 min, 15%~17% 乙腈; 65~90 min, 17%~30% 乙腈; 90~100 min, 30%~40% 乙腈; 100~101 min, 40%~5% 乙腈; 101~110 min, 5% 乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 275 nm; 柱温为 30 ℃; 进样量为 10 μL。

2.4.2 精密度试验 取 S1 提取液 1 份, 过 0.22 μm 滤膜, 按“2.4.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以芸香柚皮苷为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD。结果各共有峰相对保留时间 RSD<1.00%, 相对峰面积 RSD<3%, 以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》2012 版评价, 6 次进样的相似度均为 1.00, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.4.3 重复性试验 按照“2.3.3”项下的方法平行制备 6 份 S1 提取液供试品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。以芸香柚皮苷为参照峰, 计算其他各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值。结果计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 均<1.00%, 相对峰面积的 RSD 均<3%, 表明该方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取 S1 提取液 1 份, 过 0.22 μm 滤膜, 按“2.4.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进行测定, 记录色谱图。以芸香柚皮苷为参照峰, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD。结果计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 均<1.00%, 相对峰面积的 RSD 均<3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 XXZOL 化学特征图谱建立及相似度分析 精密吸取对照品溶液、各单味药供试品溶液、阴性对照溶液、提取液、醇沉液、浓缩液 10 μL, 过 0.22 μm 滤膜, 按“2.4.1”项下色谱条件进样, 对记录的色谱图进行分析。以 S1 号样品图谱为参照图谱, 时间窗为 0.1 min, 用平均数法生成对照图谱 (R), 进行全谱峰匹配, 计算相似度。通过与对照品色谱峰位置比较, 指认共有峰。结果得到 15 批提取液 (AS1~AS15)、醇沉液 (BS1~BS15)、浓缩液 (CS1~CS15) 的 HPLC 特征图谱及其对照指纹图谱 (AR、BR、CR), 结果见图 1。相似度评价结果见表 2。共标定

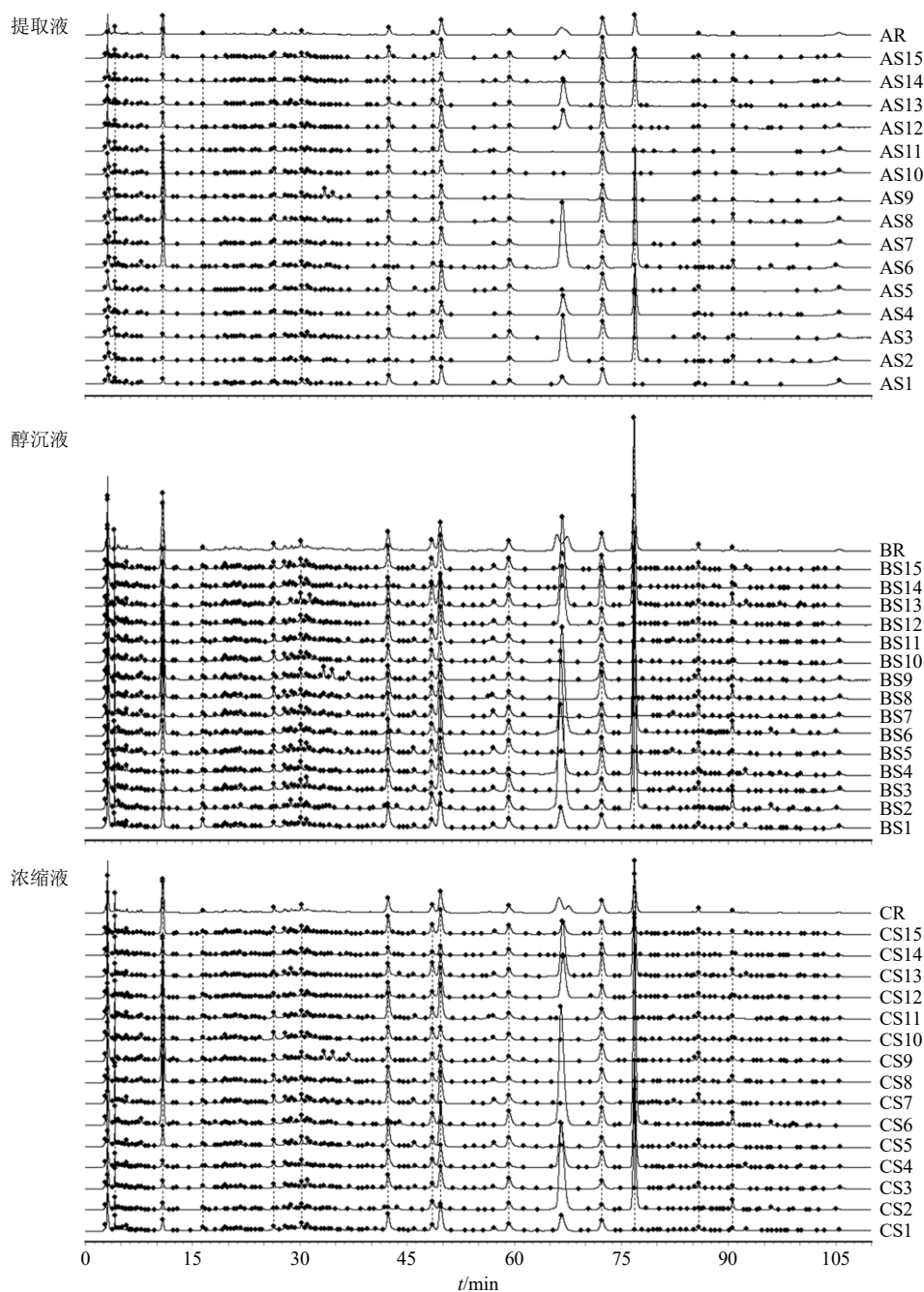


图 1 15 批提取液 (AS1~AS15)、醇沉液 (BS1~BS15)、浓缩液 (CS1~CS15) 的 HPLC 特征图谱及其对照指纹图谱 (AR、BR、CR)

Fig. 1 HPLC fingerprints of 15 batches of extract (AS1—AS15), alcohol precipitate solution (BS1—BS15), and concentrated solution (CS1—CS15), and their control fingerprints (AR, BR, CR)

了 13 个共有峰, 通过与对照品图谱进行比对指认出了其中的 6 个色谱峰, 结果见图 2, 即峰 2 为 5-羟甲基糠醛, 峰 4 为绿原酸, 峰 8 为连翘酯苷 A, 峰 9 为芸香柚皮苷, 峰 10 为橙皮苷, 峰 11 为新橙皮苷。

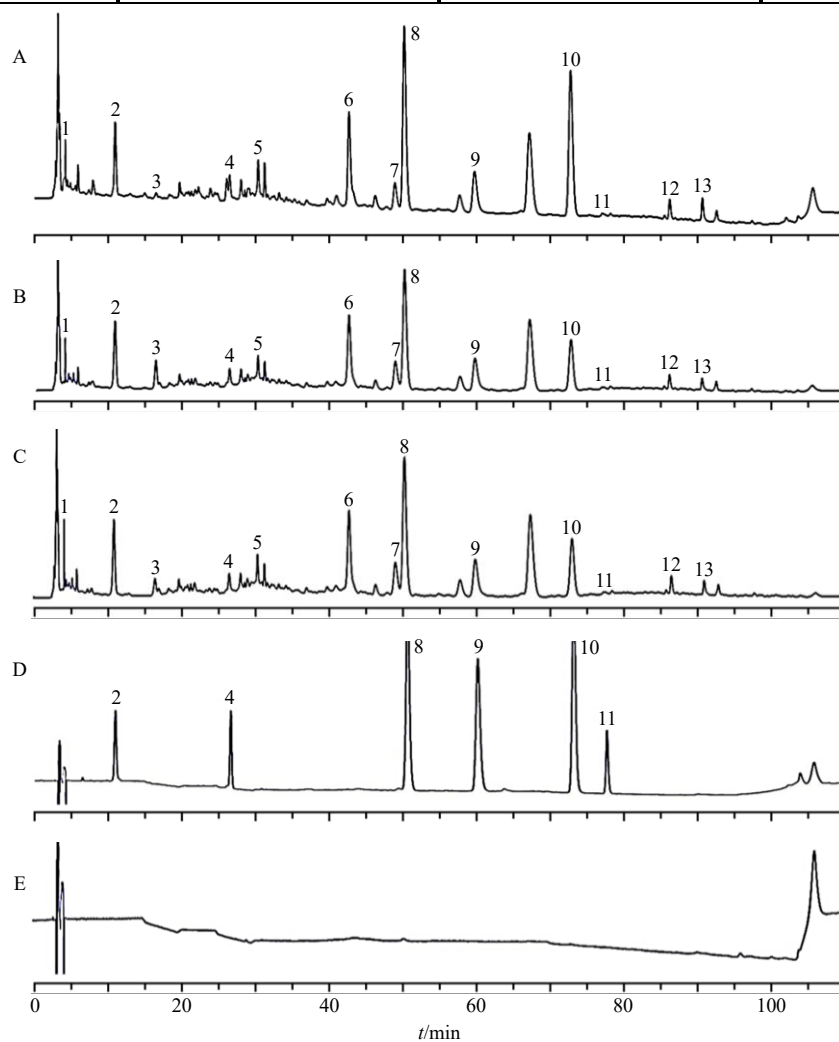
将各单味药材、缺单味药阴性样品的 HPLC 图 (图 3) 与样品色谱图比对分析得: 峰 2~5 来源于炒山楂, 峰 4 来源于槟榔, 峰 1、5、9~11、13 来

源于枳实, 峰 3、4 来源于蜜枇杷叶, 峰 1、2 来源于瓜蒌, 峰 13 来源于炒莱菔子, 峰 5、8、13 来源于炒葶苈子, 峰 1 来源于桔梗, 峰 6~8、12 来源于连翘, 峰 1 来源于蝉蜕。其中 9 号峰 (芸香柚皮苷) 分离度良好, 峰面积较大, 且相对保留时间在 0.98~1.02, 因此, 选芸香柚皮苷作为参考色谱峰, 计算出其他共有峰的相对保留时间以及相对峰面积, 各共

表 2 15 批提取液、醇沉液、浓缩液与各自对照特征图谱的相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation results of 15 batches of extract, alcohol precipitation solution, concentrated solution and their respective control fingerprints

编号	相似度			编号	相似度			编号	相似度			编号	相似度		
	提取液	醇沉液	浓缩液		提取液	醇沉液	浓缩液		提取液	醇沉液	浓缩液		提取液	醇沉液	浓缩液
S1	0.828	0.723	0.714	S5	0.792	0.727	0.711	S9	0.712	0.647	0.607	S13	0.888	0.876	0.875
S2	0.605	0.727	0.729	S6	0.691	0.828	0.800	S10	0.831	0.751	0.755	S14	0.802	0.814	0.778
S3	0.820	0.717	0.704	S7	0.833	0.734	0.708	S11	0.825	0.747	0.727	S15	0.926	0.878	0.889
S4	0.840	0.832	0.842	S8	0.796	0.702	0.701	S12	0.871	0.800	0.790				



2-5-羟甲基糠醛 4-绿原酸 8-连翘酯苷 A 9-芸香柚皮苷 10-橙皮苷 11-新橙皮苷
2-5-hydroxymethylfurfural 4-chlorogenic acid 8-forsythoside A 9-narirutin 10-hesperidin 11-neohesperidin

图 2 XXZOL 提取液供试品溶液 (A)、醇沉液供试品溶液 (B)、浓缩液供试品溶液 (C) 及混合对照品溶液 (D)、空白溶剂 (E) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of XXZOL extract sample solution (A), alcohol precipitation test solution (B), concentrated test solution (C), mixed reference substances solution (D) and blank solvent (E)

有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 1%，表明这 15 批提取液、醇沉液、浓缩液样品中 13 个共有峰之间的保留时间比较接近，但共有峰相对峰面积的 RSD 值相差比较大，表明不同产地批次制备的 15 批提

取液、醇沉液、浓缩液 13 个共有峰所代表化合物的含量存在较大差异。除了 S2、S6 的提取液及 S9 的醇沉液和浓缩液外，其他各批次样品与对照图谱的相似度均大于 0.700。

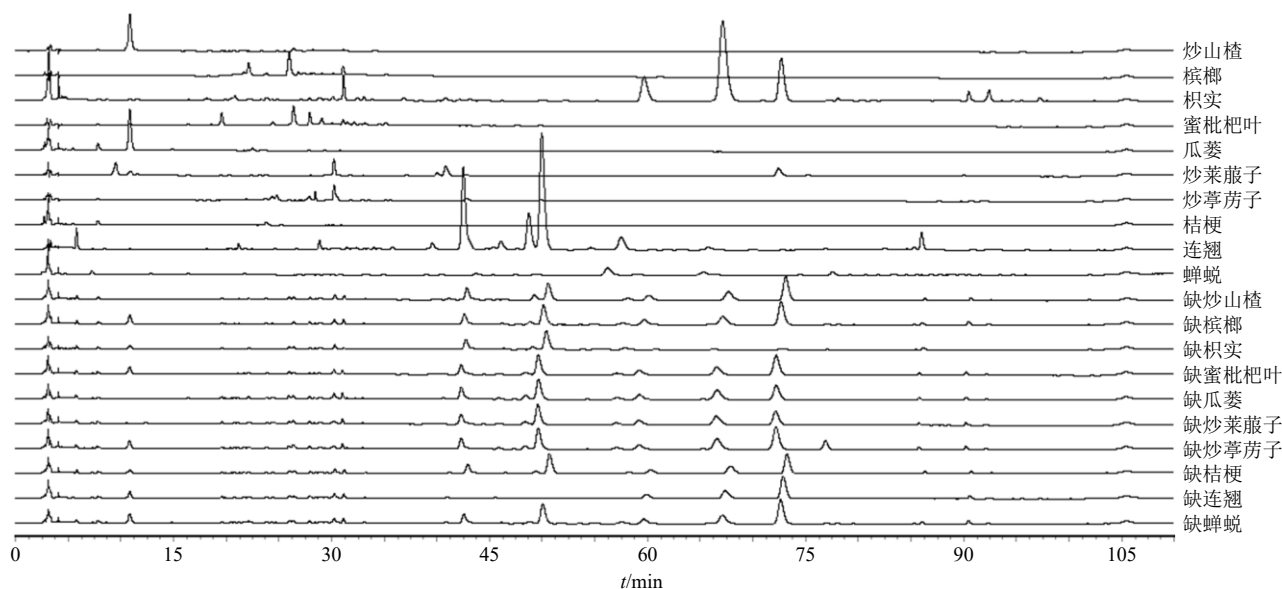


图 3 各单味药供试品、缺单味药阴性样品的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of test samples of each single herb and negative samples without single herb

2.5 XXZOL 制备过程中有效成分的含量测定

2.5.1 色谱条件 同“2.4.1”项下的色谱条件。

2.5.2 专属性试验 分别精密吸取混合对照品溶液、各单味药、提取液、醇沉液、浓缩液供试品溶液以及甲醇空白溶剂各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 按照色谱条件测定。结果供试品色谱中, 在与 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷混合对照品色谱对应位置上有色谱峰, 而甲醇溶剂的空白样品不存在对应的色谱峰, 实验结果显示, 样品溶液中各组分之间分离度程度和理论塔板数都很高, 而且阴性样品没有干扰, 见图 2。

2.5.3 线性关系考察 将“2.2”项下的对照品溶液用甲醇稀释共制得 6 个样品, 注入液相色谱仪, 按照色谱条件测定, 以各成分对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 回归方程分别为 5-羟甲基糠醛 $Y=54.991 X+19.588 0$, $r=0.999 9$, 线性范围 0.32~191.68 μ g/mL; 绿原酸 $Y=8.370 4 X-76.349 0$, $r=0.999 2$, 线性范围 3.22~314.00 μ g/mL; 连翘酯苷 A $Y=7.922 3 X-2.802 0$, $r=0.999 9$, 线性范围 3.39~828.00 μ g/mL; 芸香柚皮苷 $Y=13.741 X-12.372 0$, $r=1.000 0$, 线性范围 4.91~1 198.00 μ g/mL; 橙皮苷 $Y=14.547 X+10.485 0$, $r=0.999 8$, 线性范围 2.04~198.72 μ g/mL; 新橙皮苷 $Y=16.435 X+1.042 7$, $r=1.000 0$, 线性范围 0.25~1 532.00 μ g/mL; 结果表明, 这 6 个成分在相应的质量浓度

范围内线性关系较良好。

2.5.4 精密度试验 取 S1 提取液供试品溶液 1 份, 按照色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算各成分色谱峰面积的 RSD。结果显示 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.74%、1.64%、0.49%、1.48%、0.62%、0.46%, 表明该仪器精密度良好。

2.5.5 重复性试验 取 6 份 S1 提取液供试品溶液, 按照“2.4.1”项下色谱条件测定, 依次进样分析, 记录峰面积, 计算各成分质量分数的 RSD。结果 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷质量浓度的 RSD 分别为 1.94%、0.37%、0.60%、1.42%、2.73%、2.50%, 表明该方法重复性良好。

2.5.6 稳定性试验 取 S1 提取液供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进行测定, 按“2.4.1”项下色谱条件, 记录峰面积, 计算各成分色谱峰面积的 RSD。结果 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 2.35%、1.27%、0.62%、1.83%、0.67%、2.82%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.7 加样回收率试验 精密量取 S1 提取液 1 mL 分别精密加入对照品溶液适量, 加入甲醇定容至 10 mL, 平行配制 9 份, 摇匀, 过 0.22 μ m 滤膜, 进样量 10 μ L 注入液相色谱仪, 按色谱条件测定, 记录峰面积, 分别计算 6 个指标成分的平均加样回收率。结果 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚

皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的平均加样回收率分别为 99.80%、101.54%、99.63%、100.49%、99.67%、100.82%，RSD 分别为 1.53%、0.94%、1.72%、1.46%、1.87%、1.95%，结果表明该方法准确可靠。

2.5.8 含量测定 将 15 批的中药饮片，按照供试品溶液制备方法，根据色谱条件对供试品溶液进行指标成分含量测定。以 XXZOL 制备过程稳定性成分为评价指标，分别计算 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的得率。15 批提取液、醇沉液、浓缩液中 5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量见表 3~5。

2.6 物性参数测定

2.6.1 相对密度测定 参照《中国药典》2020 年版四部通则 0601 项下比重瓶法测定法，分别测定 15 批提取液、醇沉液、浓缩液的相对密度，结果见表 6。

2.6.2 电导率测定 对电导仪先进行校正，然后进行温度补偿，将铂黑电极浸入待测溶液中，等待示

数稳定后读取数值，乘以相应的电极常数，即得到浸膏的电导率^[26]，分别测定 15 批提取液、醇沉液、浓缩液的电导率值，结果见表 6。

2.6.3 pH 值测定 实验使用 pH 计进行测定，测定前采用标准缓冲液校正仪器，测定 15 批提取液、醇沉液、浓缩液的 pH 值，结果见表 6。

2.6.4 各指标成分含量在提取液-醇沉液-浓缩液之间的传递规律 6 个指标成分在提取液-醇沉液-浓缩液之间的转移率结果见表 7。结果显示，5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷 6 个成分在提取液-醇沉液的转移率分别在 16.14%~67.66%、6.74%~12.64%、12.60%~24.79%、15.98%~24.87%、5.66%~27.14%、10.97%~62.95%，平均转移率分别为 37.84%、9.77%、17.03%、19.48%、10.26%、28.56%。醇沉液-浓缩液的转移率分别在 33.34%~80.27%、39.49%~79.71%、49.85%~86.10%、47.73%~96.40%、39.58%~79.07%、22.88%~94.79%，平均转移率分别为 53.99%、55.74%、63.33%、63.74%、

表 3 15 批提取液中有效成分含量

Table 3 Content of effective components in 15 batches of extract solution

样品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						样品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷		5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
AS1	5	64	295	58	172	2	AS9	82	78	206	44	168	2
AS2	2	69	44	49	33	463	AS10	7	93	211	54	218	5
AS3	3	74	44	89	184	2	AS11	8	77	359	48	202	1
AS4	1	83	221	25	160	343	AS12	18	72	339	43	202	13
AS5	4	91	489	75	186	6	AS13	7	69	244	51	208	349
AS6	91	81	48	105	116	825	AS14	6	68	131	58	210	5
AS7	6	87	281	54	157	3	AS15	36	80	299	68	196	46
AS8	79	88	317	46	246	2							

表 4 15 批醇沉液中有效成分含量

Table 4 Content of effective components in 15 batches of alcohol precipitation solution

样品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						样品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷		5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
BS1	78	231	1607	351	420	15	BS9	544	220	909	227	542	4
BS2	70	149	291	411	283	4029	BS10	95	360	878	301	561	23
BS3	68	215	1474	561	425	7	BS11	125	282	1665	246	398	16
BS4	44	239	1563	197	769	3191	BS12	172	205	1952	260	407	120
BS5	134	282	2566	530	447	44	BS13	109	237	1451	403	960	3008
BS6	467	198	192	431	511	3594	BS14	98	163	664	322	450	81
BS7	83	321	1604	377	392	25	BS15	308	244	1537	389	355	348
BS8	566	355	1479	259	824	7							

表 5 15 批浓缩液中有效成分含量

Table 5 Content of effective components in 15 batches of concentrated solution

样品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)						样品	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷		5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
CS1	198	580	5376	1146	1391	24	CS9	2163	878	2954	805	2142	14
CS2	117	293	726	980	677	4760	CS10	381	1005	2545	913	1664	34
CS3	123	640	4221	1607	1165	47	CS11	408	851	6784	955	1387	29
CS4	108	625	4370	531	2127	4402	CS12	454	510	5949	769	1238	165
CS5	333	836	8591	1659	1320	81	CS13	231	586	3955	1068	2374	3999
CS6	1359	646	826	2075	2377	8516	CS14	272	378	1926	961	1254	58
CS7	222	993	6212	1390	1216	46	CS15	881	698	4828	1304	1314	581
CS8	1293	875	3980	657	1631	12							

表 6 15 批提取液、醇沉液、浓缩液物性参数测定结果

Table 6 Determination results of physical parameters of 15 batches of extract, alcohol precipitate and concentrated solutions

样品	相对密度/($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			电导率/($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$)			pH 值		
	提取液	醇沉液	浓缩液	提取液	醇沉液	浓缩液	提取液	醇沉液	浓缩液
S1	1.010 3	0.940 1	1.146 1	1.79	1.00	5.65	4.61	5.19	4.12
S2	1.007 3	0.948 6	1.103 1	1.38	1.16	6.09	4.45	5.19	4.19
S3	1.008 4	0.940 5	1.140 4	1.65	1.09	6.45	4.57	5.17	4.15
S4	1.007 3	0.941 2	1.114 3	1.48	1.20	7.65	4.69	5.20	4.24
S5	1.009 6	0.952 3	1.165 1	1.63	1.15	5.55	4.68	5.05	4.00
S6	1.009 8	0.946 4	1.178 8	1.85	1.16	4.48	4.48	5.11	4.15
S7	1.003 8	0.938 0	1.120 3	1.69	1.22	5.96	4.50	5.21	4.20
S8	1.008 0	0.939 1	1.133 7	1.64	1.08	5.51	4.55	5.22	4.12
S9	1.008 2	0.936 8	1.105 2	1.65	1.22	3.71	4.42	5.03	4.28
S10	1.007 1	0.937 5	1.131 0	1.65	1.14	5.93	4.73	5.32	4.26
S11	1.008 4	0.938 4	1.134 5	1.62	1.10	6.18	4.51	5.15	4.04
S12	1.007 8	0.942 1	1.136 0	1.59	1.22	5.72	4.61	5.05	4.00
S13	1.009 6	0.950 5	1.149 4	1.32	1.10	3.13	4.74	5.12	4.30
S14	1.007 9	0.940 5	1.109 3	1.49	1.28	5.30	4.89	5.23	4.49
S15	1.003 4	0.941 9	1.156 4	1.46	1.27	6.09	4.89	5.22	4.18

61.73%、61.05%。

2.6.5 各物性参数在提取液-醇沉液-浓缩液之间的传递规律 由表 6 可知, 15 批提取液、醇沉液、浓缩液的相对密度、电导率、pH 值均较稳定。其传递规律在提取液-醇沉液-浓缩液均呈现先递减后递增的趋势。

2.6.6 相关性分析 运用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析, 采用相关性双变量考察 15 批提取液、醇沉液、浓缩液物性参数与主要成分含量间的相关性。物性参数与成分间相关性分析结果见表 8~13, 结果显示提取液中橙皮苷含量与连翘酯苷 A 含量存在显著正相关关系, 橙皮苷含量与新橙皮苷含量存在显

著负相关关系, 新橙皮苷含量与连翘酯苷 A 含量存在显著负相关关系。醇沉液中相对密度与芸香柚皮苷以及新橙皮苷的含量存在显著正相关的关系。浓缩液中连翘酯苷 A 含量与 pH 值、新橙皮苷含量均存在显著负相关关系, 相对密度与芸香柚皮苷的含量存在显著正相关关系。5-羟甲基糠醛、绿原酸、连翘酯苷 A、芸香柚皮苷、新橙皮苷含量在提取液、醇沉液、浓缩液之间都存在显著正相关关系, 橙皮苷含量在醇沉液和浓缩液之间存在显著正相关关系。

2.7 主成分分析(principal component analysis, PCA)

将 15 批提取液、醇沉液、浓缩液的共有峰峰面积及测定的物性参数值导入 SIMCA 14.1 软件中, 进

表 7 提取液-醇沉液 6 个成分的传递转移率

Table 7 Transfer rate of six components in extract-alcohol precipitation solution

样品	提取液-醇沉液传递转移率/%						样品	醇沉液-浓缩液传递转移率/%					
	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷		5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
S1	47.38	11.27	17.04	18.82	7.61	22.14	S1	50.93	50.32	66.91	65.38	66.26	62.72
S2	54.73	6.74	20.47	26.37	27.14	27.19	S2	33.34	39.49	49.85	47.73	47.78	47.26
S3	67.66	9.00	24.79	19.80	7.22	31.78	S3	36.04	59.65	52.27	57.31	54.79	78.35
S4	32.48	8.97	22.12	24.87	15.01	29.11	S4	48.97	52.38	55.93	53.79	55.34	55.18
S5	18.20	9.64	16.38	22.02	7.52	23.11	S5	49.71	59.29	66.97	62.57	59.07	72.96
S6	16.14	7.63	12.60	12.83	13.75	13.61	S6	58.13	65.17	86.10	96.40	93.06	94.79
S7	41.60	11.58	17.86	21.70	7.79	28.35	S7	53.78	61.83	77.46	73.66	62.09	73.08
S8	22.42	12.64	14.58	17.72	10.46	10.97	S8	45.69	49.38	53.82	50.77	39.58	71.91
S9	20.64	8.85	13.79	16.20	10.10	37.03	S9	79.60	79.71	65.01	71.02	79.07	22.88
S10	42.99	12.10	12.99	17.44	8.05	15.55	S10	80.27	55.86	57.97	60.66	59.33	59.33
S11	50.18	11.40	14.47	15.98	6.16	62.95	S11	65.33	60.33	81.50	77.72	69.68	73.39
S12	29.46	8.91	17.99	18.75	6.29	28.25	S12	52.68	49.83	60.94	59.20	60.78	54.97
S13	47.04	10.76	18.55	24.59	14.40	26.96	S13	42.50	49.42	54.51	53.05	49.45	53.17
S14	50.02	7.56	15.81	17.23	6.70	47.66	S14	55.68	46.20	57.98	59.74	55.71	28.94
S15	26.67	9.48	16.08	17.88	5.66	23.77	S15	57.20	57.19	62.80	67.06	74.00	66.82

表 8 15 批提取液间物性参数与成分间相关性

Table 8 Correlation between physical parameters and components of 15 batches of extract solution

变量	相关性系数								
	pH 值	电导率	相对密度	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
pH 值	1.000	-0.438	-0.217	-0.362	-0.034	0.188	-0.027	0.489	-0.231
电导率	-0.438	1.000	0.246	0.405	0.279	0.049	0.465	0.059	-0.051
相对密度	-0.217	0.246	1.000	0.094	-0.313	-0.041	0.207	0.013	0.249
5-羟甲基糠醛	-0.362	0.405	0.094	1.000	0.225	-0.137	0.253	0.032	0.287
绿原酸	-0.034	0.279	-0.313	0.225	1.000	0.346	0.049	0.248	-0.115
连翘酯苷 A	0.188	0.049	-0.041	-0.137	0.346	1.000	-0.314	0.529*	-0.544*
芸香柚皮苷	-0.027	0.465	0.207	0.253	0.049	-0.314	1.000	-0.149	0.316
橙皮苷	0.489	0.059	0.013	0.032	0.248	0.529*	-0.149	1.000	-0.637*
新橙皮苷	-0.231	-0.051	0.249	0.287	-0.115	-0.544*	0.316	-0.637*	1.000

提取环节物性参数与成分相关性比较: * $P < 0.05$ comparison of correlation between physical parameters and components in extraction process: * $P < 0.05$

行 PCA。结果在 16 个变量中选取 5 个变量, 累积方差贡献率为 91.3%, 结果见表 14, 说明模型具有良好的预测能力。进行 Hotelling T^2 检验发现 CS6、CS9 样品超出 99% 控制限, 剔除这 2 个样品后, 提取前 2 个主成分作 PCA 得分图, 详见图 4、5。结果表明 15 批提取液、醇沉液、浓缩液可各聚为一类。

2.8 正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)

采用 SIMAC 14.1 软件对 15 批提取液、醇沉液、浓缩液的共有峰峰面积及测定的物性参数值进行

OPLS-DA, 建立 OPLS-DA 模型。分析结果显示, OPLS-DA 自变量拟合指数 (R_X^2) 为 0.689, 因变量拟合指数 (R_Y^2) 为 0.906, 模型预测指数 (Q^2) 为 0.885, 说明该模型稳定性及预测能力较好。为进一步验证该模型的有效性, 利用 SIMCA 14.1 软件对其进行置换检验, 所有 Q^2 均在 R^2 之下, 说明该模型有效。由 OPLS-DA 得分图可以看出, 15 批提取液、醇沉液、浓缩液可以很好地区分, 详见图 6。以 VIP > 1 为标准, 筛选得到 pH 值、相对密度、电导率和色谱峰 5、6 可作为区分 15 批提取液、醇沉液、

表 9 15 批醇沉液与提取液间物性参数与成分间相关性

Table 9 Correlation between physical parameters and components of 15 batches of alcohol precipitation and extract solution

变量	相关性系数								
	pH 值	电导率	相对密度	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
pH 值	0.385	-0.101	-0.429	-0.287	0.178	-0.242	-0.118	0.126	-0.124
电导率	0.329	-0.312	-0.619*	0.083	0.134	-0.084	-0.116	-0.080	0.000
相对密度	0.112	-0.365	0.363	-0.155	-0.124	0.039	0.310	-0.363	0.524*
5-羟甲基糠醛	-0.307	0.324	0.046	0.977**	0.259	0.000	0.163	0.138	0.134
绿原酸	0.001	0.281	-0.230	0.063	0.772**	0.541*	-0.167	0.563*	-0.421
连翘酯苷 A	0.197	0.008	-0.020	-0.357	0.226	0.845**	-0.190	0.509	-0.581*
芸香柚皮苷	0.053	0.061	0.128	-0.204	-0.035	-0.193	0.782**	-0.253	0.163
橙皮苷	0.149	-0.251	0.292	0.211	0.164	0.083	-0.306	0.425	0.182
新橙皮苷	-0.158	-0.366	0.176	0.046	-0.205	-0.507	0.026	-0.677**	0.921**

各变量（物性参数、成分）在醇沉与提取环节的相关性比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ correlation comparison of variables (physical parameters, components) in alcohol precipitation and extraction process: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 10 15 批浓缩液与提取液间物性参数与成分间相关性

Table 10 Correlation between physical parameters and components of 15 batches of concentrated solution and extract solution

变量	相关性系数								
	pH 值	电导率	相对密度	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
pH 值	0.398	-0.374	-0.153	-0.030	-0.217	-0.517*	-0.151	0.018	0.087
电导率	0.105	0.013	-0.386	-0.468	0.218	0.049	-0.197	-0.096	-0.197
相对密度	0.159	0.369	0.291	0.218	0.176	0.249	0.704**	0.183	0.267
5-羟甲基糠醛	-0.342	0.335	0.037	0.937**	0.225	-0.032	0.112	0.083	0.085
绿原酸	-0.187	0.452	-0.237	0.247	0.793**	0.462	-0.014	0.446	-0.389
连翘酯苷 A	0.086	0.124	-0.059	-0.355	0.241	0.865**	-0.136	0.427	-0.577*
芸香柚皮苷	-0.094	0.442	0.124	0.130	0.100	-0.186	0.939**	-0.269	0.350
橙皮苷	-0.015	0.117	0.342	0.502	0.171	-0.055	0.012	0.208	0.434
新橙皮苷	-0.200	-0.089	0.240	0.256	-0.110	-0.526*	0.267	-0.617*	0.996**

各变量（物性参数、成分）在浓缩与提取环节的相关性比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ correlation comparison of variables (physical parameters, components) in concentration and extraction process: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 11 15 批醇沉液间物性参数与成分间相关性

Table 11 Correlation between physical parameters and components of 15 batches of alcohol precipitation solution

变量	相关性系数								
	pH 值	电导率	相对密度	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
pH 值	1.000	-0.048	-0.389	-0.294	0.356	-0.280	-0.107	0.021	-0.055
电导率	-0.048	1.000	-0.082	0.089	-0.270	-0.171	-0.187	-0.246	0.005
相对密度	-0.389	-0.082	1.000	-0.167	-0.345	0.082	0.584*	0.109	0.574*
5-羟甲基糠醛	-0.294	0.089	-0.167	1.000	0.139	-0.236	-0.232	0.227	-0.070
绿原酸	0.356	-0.270	-0.345	0.139	1.000	0.409	-0.184	0.320	-0.455
连翘酯苷 A	-0.280	-0.171	0.082	-0.236	0.409	1.000	0.076	0.071	-0.500
芸香柚皮苷	-0.107	-0.187	0.584*	-0.232	-0.184	0.076	1.000	-0.282	0.085
橙皮苷	0.021	-0.246	0.109	0.227	0.320	0.071	-0.282	1.000	0.263
新橙皮苷	-0.055	0.005	0.574*	-0.070	-0.455	-0.500	0.085	0.263	1.000

醇沉环节物性参数与成分相关性比较：* $P < 0.05$ comparison of correlation between physical parameters and components in alcohol precipitation process: * $P < 0.05$

表 12 15 批浓缩液与醇沉液间物性参数与成分间相关性

Table 12 Correlation between physical parameters and components of 15 batches of concentrated solution and alcohol precipitation solution

变量	相关性系数								
	pH 值	电导率	相对密度	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
pH 值	0.405	0.394	-0.180	-0.064	-0.248	-0.573*	-0.166	0.261	0.165
电导率	0.464	0.052	-0.273	-0.463	0.133	0.239	-0.087	-0.345	-0.090
相对密度	-0.230	-0.304	0.447	0.178	0.147	0.274	0.517*	0.058	0.029
5-羟甲基糠醛	-0.371	0.181	-0.251	0.951**	0.069	-0.280	-0.293	0.143	-0.109
绿原酸	0.088	-0.111	-0.425	0.296	0.877**	0.332	-0.146	0.166	-0.503
连翘酯苷 A	-0.294	-0.155	0.024	-0.250	0.422	0.960**	0.073	-0.090	-0.538*
芸香柚皮苷	-0.200	-0.079	0.409	0.035	-0.131	-0.065	0.819**	-0.344	0.092
橙皮苷	-0.236	-0.066	0.043	0.429	0.121	-0.152	-0.275	0.739**	0.329
新橙皮苷	-0.116	0.009	0.521*	0.105	-0.414	-0.548*	0.132	0.229	0.938**

各变量（物性参数、成分）在浓缩与醇沉环节的相关性比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ correlation comparison of variables (physical parameters, components) in concentration and alcohol precipitation process: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 13 15 批浓缩液间物性参数与成分间相关性

Table 13 Correlation between physical parameters and components of 15 batches of concentrated solution

变量	相关性系数								
	pH 值	电导率	相对密度	5-羟甲基糠醛	绿原酸	连翘酯苷 A	芸香柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
pH 值	1.000	-0.256	-0.483	0.205	-0.227	-0.615*	-0.220	0.235	0.103
电导率	-0.256	1.000	-0.208	-0.514	-0.020	0.240	-0.180	-0.510	-0.168
相对密度	-0.483	-0.208	1.000	0.063	0.150	0.275	0.705**	0.275	0.249
5-羟甲基糠醛	0.025	-0.514	0.063	1.000	0.338	-0.263	0.009	0.474	0.058
绿原酸	-0.227	-0.020	0.150	0.338	1.000	0.411	0.055	0.253	-0.391
连翘酯苷 A	-0.615*	0.240	0.275	-0.263	0.411	1.000	0.031	-0.205	-0.555*
芸香柚皮苷	-0.220	-0.180	0.705**	0.009	0.055	0.031	1.000	0.006	0.308
橙皮苷	0.235	-0.510	0.275	0.474	0.253	-0.205	0.006	1.000	0.463
新橙皮苷	0.103	-0.168	0.249	0.058	-0.391	-0.555*	0.308	0.463	1.000

浓缩环节物性参数与成分相关性比较：* $P < 0.05$ comparison of correlation between physical parameters and components in concentration process: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表 14 5 个主成分分子的特征值和方差贡献率

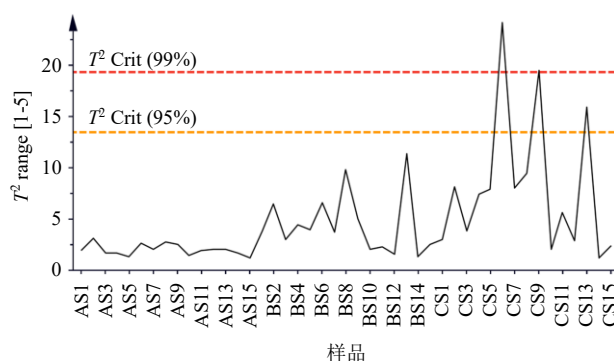
Table 14 Eigenvalue and variance contribution rate of five principal component factors

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.110	57.00	57.0
2	1.980	12.40	69.3
3	1.650	10.30	79.6
4	1.110	6.96	86.6
5	0.761	4.75	91.3

浓缩液质量差异指标，详见图 7 和表 15。

3 讨论

本实验采集的 15 批中药饮片样品，基本上能代表市场上流通的饮片，保证了其来源的可溯性。XXZOL 处方药味较多，成分复杂。pH 值、相对密

图 4 Hotelling T^2 检验图Fig. 4 Hotelling T^2 test chart

度、电导率等物性参数能够反映出中药饮片本身的性质。本实验建立了 15 批 XXZOL 中提取液、醇沉液、浓缩液的指纹图谱，根据对照品指认出 6 个色

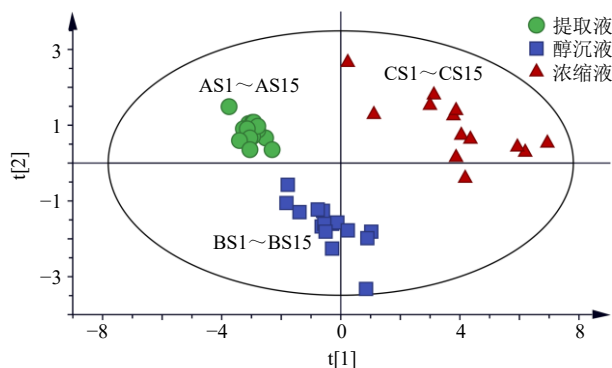


图5 15批提取液、醇沉液、浓缩液的PCA得分图

Fig. 5 PCA scores of 15 batches of extract, alcohol precipitation solution and concentrated solution

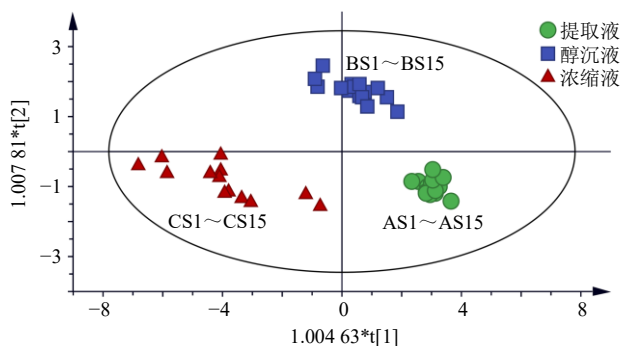


图6 15批提取液、醇沉液、浓缩液的OPLS-DA得分图

Fig. 6 15 OPLS-DA scores of extract, alcohol precipitation solution and concentrated solution

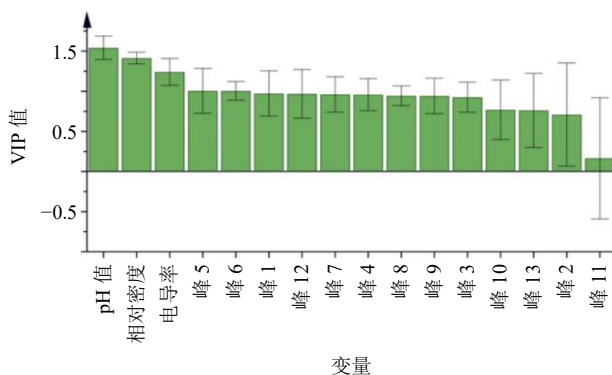


图7 15批提取液、醇沉液、浓缩液的OPLS-DA VIP值

Fig. 7 OPLS-DA VIP values of 15 batches of extract, alcohol precipitation solution and concentrated solution

表15 VIP>1的5个差异指标的VIP值

Table 15 VIP values of five differential indexes with VIP > 1

变量	VIP 值	变量	VIP 值
pH 值	1.541 45	色谱峰 5	1.005 38
相对密度	1.414 09	色谱峰 6	1.004 47
电导率	1.240 70		

谱峰,经PCA,提取出5个主成分,根据OPLS-DA筛选得到了5个差异指标。在供试品制备过程中,

“2.3.4”“2.3.5”项反映了醇沉过程、浓缩过程样品的制备,得到的醇沉、浓缩供试品溶液,是为了在实验中体现小儿消积止咳口服液醇沉、浓缩过程的量质传递关系。指纹图谱结果表明,不同产地批次制备的15批提取液、醇沉液、浓缩液13个共有峰所代表化合物的含量存在较大差异,分析造成此含量差异的原因可能是15批中药饮片的药材产地、采收时间、贮存时间、炮制方法及炮制时间等有所差异。根据各指标成分含量在提取液-醇沉液-浓缩液之间的传递规律,发现6个成分在水提液-醇沉液中的转移率较低,在醇沉液-浓缩液中的转移率较高,分析原因可能为这几种指标成分的相对分子质量相对较小,容易被醇沉的沉淀物(多糖类、蛋白类等)吸附,后期课题组将尝试采用膜分离方法以解决提取-醇沉环节转移率低的缺点。

物性参数与化学成分相关性分析表明,醇沉液与浓缩液中相对密度与芸香柚皮苷的含量都呈显著正相关,且连翘酯苷A的含量与pH值呈显著负相关,提取液与浓缩液中新橙皮苷含量与连翘酯苷A含量都呈显著负相关。pH值、电导率、相对密度反映了溶液的物理性质,从pH值、电导率、相对密度相关性分析来看,pH值减小,电导率和相对密度增大,由pH值可知溶液呈酸性,同时分析绿原酸、连翘酯苷A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷化学结构及测定其溶液pH值,结果显示均为酸性,可以认为电导率和pH值在一定层面上反映绿原酸、连翘酯苷A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷成分的溶解性,同时相对密度值也侧面印证绿原酸、连翘酯苷A、芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷成分的溶解性增加,即电导率、相对密度与化学成分呈正相关,pH值与化学成分呈负相关。因此,可以用pH值、电导率、相对密度预测XXZOL整体质量。造成提取液、醇沉液、浓缩液中物性参数与化学成分之间存在不同相关性的原因可能是在醇沉过程中,加乙醇速度、搅拌速度、醇沉温度等对成分转移率有较大影响。PCA分析结果表明,15批样品被分成了3类,A为提取液,B为醇沉液,C为浓缩液,累积方差贡献率为91.3%,说明模型具有良好的预测能力。此外,通过OPLS-DA分析,pH值、相对密度、电导率、色谱峰5、色谱峰6的VIP>1,可将其作为XXZOL的质控指标,本课题组后续将对色谱峰5、色谱峰6进行指认。

综上所述,本研究创新性的将物性参数和化学

成分结合进行相关性分析, 研究 XXZOL 制备过程中提取、醇沉、浓缩过程中量质传递变化规律。结合特征图谱分析并对关键成分进行含量测定与量质传递评价, 相较于药典规定的质量评价方法, 本实验从物理属性、化学属性方面对 XXZOL 进行了较为全面的质量控制方法研究, 为实际生产过程中质量控制提升提供依据, 对控制 XXZOL 的质量、提升 XXZOL 质量标准具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 袁斌. 小儿消积止咳口服液治疗小儿急性支气管炎 118 例疗效观察 [J]. 江苏中医, 2001, 33(12): 16.
- [2] 高辉, 林永强, 徐丽华. 小儿消积止咳口服液质量标准研究 [J]. 齐鲁药事, 2011, 30(11): 650-652.
- [3] 王树亮. 小儿消积止咳口服液治疗小儿咳嗽的疗效研究 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(8): 134-135.
- [4] 刘冬岩, 孙方舟, 姚国华. 小儿消积止咳口服液联合丙卡特罗治疗小儿咳嗽变异性哮喘的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(7): 2064-2068.
- [5] 杨永朝. 小儿消积止咳颗粒联合保和丸治疗小儿痰热咳嗽兼食积证的疗效及对血清 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平影响 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34(20): 3598-3600.
- [6] 肖伟, 李俊. 小儿消积止咳口服液治疗小儿咳嗽的疗效及对患儿症状的影响分析 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(S1): 103-105.
- [7] 王凯, 张伯礼, 崔远武, 等. 桔梗“载药上行”探寻与评议 [J]. 中医杂志, 2018, 59(4): 271-275.
- [8] 张雪荣, 向希雄. 小儿消积止咳口服液/颗粒治疗痰热咳嗽兼食积证疗效观察 [J]. 中国中西医结合儿科学, 2010, 2(6): 521-523.
- [9] 龚向英, 刘小妹, 斯建中. 小儿消积止咳口服液佐治下呼吸道感染 93 例分析 [J]. 儿科药学杂志, 2005, 11(5): 52-53.
- [10] 管华全, 谭峰, 樊巧玲. 小儿消积止咳口服液治疗咳嗽组方机制探析 [J]. 世界中医药, 2021, 16(22): 3383-3386.
- [11] 王艳茹, 章樱, 周琴, 等. 小儿消积止咳口服液联合阿奇霉素治疗支原体肺炎及对患儿体液免疫功能的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(5): 1168-1171.
- [12] 周璇, 葛灿侠, 陈羽, 等. 小儿消积止咳口服液联合西药治疗儿童支气管哮喘临床效果的远期观察 [J]. 世界中医药, 2020, 15(11): 1611-1614.
- [13] 梁刚, 陈立, 周彦池, 等. 小儿消积止咳口服液对慢性咳嗽患儿症状改善及体液免疫功能的影响 [J]. 世界中医药, 2018, 13(12): 3043-3045.
- [14] 孟战备. 小儿消积止咳口服液在小儿咳嗽变异性哮喘中的疗效观察及对 T 淋巴细胞百分比的影响 [J]. 中国合理用药探索, 2021, 18(4): 39-43.
- [15] 范建伟, 刘武占, 李艳芳, 等. 小儿消积止咳口服液的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(6): 858-862.
- [16] 陈天朝, 李沁, 姚超, 等. 赤芍不同炮制品及标准汤剂的物性参数及主要成分、指标成分含量的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(2): 113-117.
- [17] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.
- [18] 陈士林, 刘昌孝, 张铁军, 等. 基于中药质量标志物和传统用法的中药饮片标准汤剂传承发展研究思路与建议 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4519-4528.
- [19] Zhang Y T, Xiao M F, Deng K W, *et al.* Novel mathematic models for quantitative transitivity of quality-markers in extraction process of the Buyanghuanwu Decoction [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45: 68-75.
- [20] Liang G, Yang J Y, Liu T T, *et al.* A multi-strategy platform for quality control and Q-markers screen of Chaiqin Chengqi Decoction [J]. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153525.
- [21] 王喜军, 陈曦, 杨舸, 等. 枳术丸口服给药后血中移行成分分析及其定量研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(2): 54-57.
- [22] 李文兵, 许玲, 卢君蓉, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的枇杷叶蜜炙前后标准汤剂质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(13): 3444-3450.
- [23] 孔维洁, 翟莹, 袁发许, 等. 连翘、黄芩、大青叶三味中药药理作用及主要活性成分含量检测方法研究 [J]. 广东化工, 2021, 48(10): 199-201.
- [24] 葛俊德, 李晓骄阳, 刘闰平, 等. 基于“肺与大肠相表里”的小儿消积止咳口服液功效网络分析与作用机制探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 3978-3986.
- [25] 梁琰, 张贵民, 苏瑞强, 等. 小儿消积止咳口服液多指标成分分析及其 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4440-4447.
- [26] 梁悦, 刘涛, 蒋天宇, 等. 生脉注射液物理指纹图谱的建立及其质量评价 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2571-2576.

[责任编辑 郑礼胜]