

基于多指标-响应曲面法优选炆地黄炮制工艺 及成分与色泽相关性分析

解杨¹, 钟凌云^{1*}, 薛晓^{1*}, 王卓¹, 宋金菊¹, 李家晴¹, 张青², 王毅彬¹, 曾妍¹

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 建昌帮药业有限公司, 江西 抚州 344700)

[摘要] 研究炆地黄炮制过程中的关键影响因素, 优化炮制方法, 将不同炮制品所含成分与色度值关联, 找寻变化规律, 完善炆地黄炮制过程的量化指标, 以便更好地控制炮制程度。以梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛、还原糖及外观性状为评价指标, 利用层次分析法结合变异系数法计算各指标的权重, 得出综合评分值(OD)。以加水量、闷润时间和蒸制时间为考察因素, 结合 Box-Behnken 响应曲面法确定炆地黄的最佳炮制工艺参数。利用色差分析仪测定生品及响应曲面法 17 个样品色泽度, 通过 SPSS、Prism 等软件分析炆地黄成分与色度之间的相关性。结果显示, 各考察因素对工艺均有影响, 其中蒸制时间影响较大, 加水量次之。得出炆地黄最佳工艺为每 100 g 药材加 7 倍水炆制后, 加入黄酒闷润 5 h, 上锅蒸制 6 h 为佳。表里关联结果为 L^* 与梓醇含量具有极显著正相关, 与 5-羟甲基糠醛和还原糖的含量呈极显著负相关; a^* 与 5-羟甲基糠醛的含量呈显著正相关; b^* 与梓醇含量呈极显著正相关, 与 5-羟甲基糠醛、还原糖的含量呈极显著负相关。该实验采用响应曲面法优化炆地黄, 其炮制工艺是合理可行的, 炆地黄化学成分与色泽度具有显著相关性, 可预测分析色度值与成分含量之间的关系, 为特色饮片炆地黄质量评价体系提供一种新方法。

[关键词] 炆地黄; 工艺优化; 层次分析法; 变异系数法; 响应面法; 色泽度; 相关性

Optimization of processing technology of braised *Rehmanniae Radix* based on multiple indexes and response surface technology and correlation between components and color

XIE Yang¹, ZHONG Ling-yun^{1*}, XUE Xiao^{1*}, WANG Zhuo¹, SONG Jin-ju¹, LI Jia-qing¹, ZHANG Qing²,
WANG Yi-bin¹, ZENG Yan¹

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Jianchangbang Pharmaceutical Co., Ltd., Fuzhou 344700, China)

[Abstract] This study aims to explore the key factors influencing the processing of braised *Rehmanniae Radix*, optimize the processing, and determine the correlation between the components in different processed products and chroma values, which is expected to add quantitative indexes for the processing of braised *Rehmanniae Radix* and better control the processing. The weights of the indexes catalpol, rehmannioside D, verbascoside, isoacteoside, 5-hydroxymethylfurfural, reducing sugar, and appearance were calculated based on analytic hierarchy process (AHP) in combination with coefficient of variation, and the overall desirability (OD) was obtained. Box-Behnken design was used to explore the optimal amount of water added, time for soaking with rice wine, and steaming time in the processing of braised *Rehmanniae Radix*. Colorimeter was employed to determine the chroma of 17 samples and raw samples, and SPSS, Prism, and other software to investigate the correlation between the components in braised *Rehmanniae Radix* and the chroma values. The results showed that each factor influenced the processing, and the influence followed the order of steaming time >

[收稿日期] 2021-09-12

[基金项目] 江西省“双千人才”计划项目(赣才办字[2019]9号);江西省中药标准化计划项目(2020B04)

[通信作者] * 钟凌云, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制研究, E-mail: ly1638163@163.com; * 薛晓, 硕士, 讲师, 主要从事中医药文化研究, E-mail: 642358915@qq.com

[作者简介] 解杨, 硕士研究生, E-mail: 2567711743@qq.com

amount of water added>time for soaking with rice wine. The optimal processing process is as below: A total of 100 g medicinal material was added with 7 times of water, followed by soaking with rice wine for 5 h and steaming in a pot for 6 h. The correlation analysis suggested the extremely significantly positive correlation between L^* and content of catalpol, between a^* and 5-hydroxymethylfurfural content, and between b^* and catalpol content, and the extremely significantly negative correlation between L^* and the content of 5-hydroxymethylfurfural and reducing sugar, and between b^* and the content of 5-hydroxymethylfurfural and reducing sugar. In this experiment, response surface methodology was used to optimize the processing technology of braised Rehmanniae Radix and the optimized process was rational and feasible. The content of chemical components in braised Rehmanniae Radix was significantly correlated with the chroma. This study provided a new method for the quality evaluation of braised Rehmanniae Radix.

[**Key words**] braised Rehmanniae Radix; process optimization; analytic hierarchy process; coefficient of variation; response surface methodology; chroma; correlation

DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20220128.306

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 新鲜或干燥块根。根据不同的炮制方法分为生、鲜、熟 3 种饮片规格,炮制方法有清蒸、酒炖、盐制、砂仁制、陈皮制等特色辅料炮制^[1]。建昌帮特色品种炆地黄采用特定的炆药罐小火慢慢煨制,避免与铁器发生反应,从而使炮制后的地黄更好地发挥滋阴补血,又可降低对脾胃的滋腻之性。但传统的炆制方法操作时间长,工艺参数无量化,缺乏相应的质量标准,并在炮制过程中炆制时间过长或过短都会造成有效成分的损失,影响药效,亟待通过科学的方法,创新发展特色炆制技术。此外,熟地黄传统经验要求“黑如漆、明如镜、甜如饴”,2020 年版《中国药典》(一部)及各地方炮制规范对熟地黄“性状鉴别”项下以“表面乌黑色,有光泽,黏性大”作为区分生、熟地黄的关键因素,现如今多凭主观经验判断,难以保证产品质量,因此将生品及响应曲面法的 17 个样品所含成分与色泽度关联,从而进行量化评价,建立更加客观的评价方法。

拟用响应曲面法优化炆地黄炮制工艺,同时采用层次分析法(AHP)结合变异系数法对评价指标赋予相应权重,求出综合评分值(OD)。利用现代仪器分析方法对炆地黄成分进行测定,引入色差分析技术,对生品及响应曲面法的 17 个样品粉末进行色度值测定,研究其色度与成分的传递规律,为炆地黄饮片在炮制过程中质量监控提供数据支持,更好地有利于炆地黄规范性发展。

1 材料

101-1A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海沪粤明科技仪器有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市子华仪器有限责任公司);GZX-9070 MBE 型数显鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗

设备厂);SQP 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);HH-6 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);SQP 型万分级电子分析天平[赛多利斯科学仪器有限公司(北京)有限公司];RE-52 AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);普析通用新世纪紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司);SR-62 高品质电脑色差仪(深圳市三恩时科技有限公司)。

对照品毛蕊花糖苷(批号 CHB180108,纯度 \geq 98%)、梓醇(批号 CHB181129,纯度 \geq 98%)、地黄苷 D(批号 CHB180129,纯度 \geq 98%)、5-羟甲基糠醛(批号 CHB180118;纯度 \geq 98%)、异毛蕊花糖苷(批号 CHB180927;纯度 \geq 98%)、D-无水葡萄糖(批号 CHB190213,纯度 \geq 98%),均属成都克洛玛生物科技有限公司,DNS 试剂购于北京索莱宝科技有限公司,乙腈、甲醇和磷酸均为色谱纯(美国 ACS 恩科化学公司),水为娃哈哈水。

生地黄(江西继中堂健康科技有限公司,批号 20200701),经江西中医药大学龚千锋教授鉴定为玄参科植物地黄 *R. glutinosa* 的干燥块根。辅料砂仁、陈皮(江西继中堂健康科技有限公司,批号分别为 20200701、20200810);黄酒(浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司,产品符合 GB/T 13662 一级标准,批号 20210608)。

2 方法与结果

2.1 炆地黄炮制方法

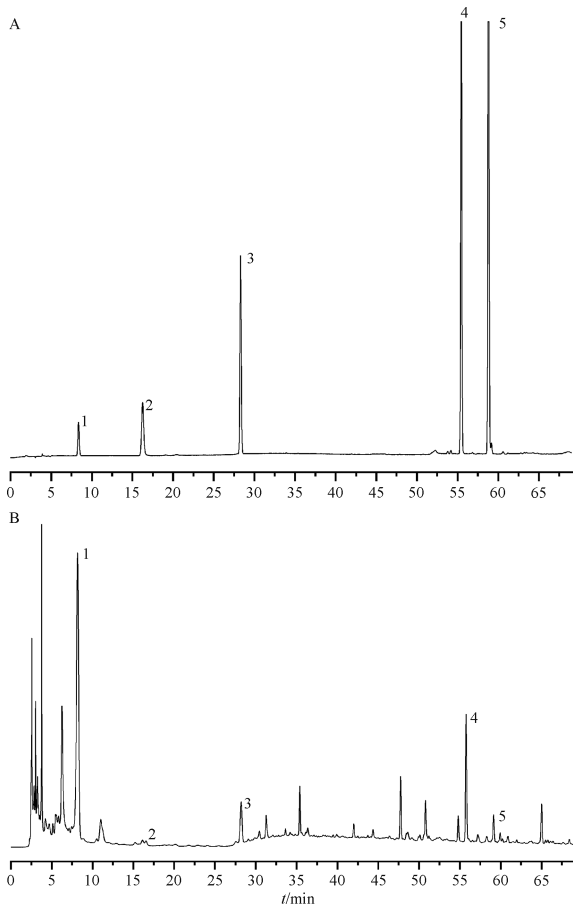
取大小分档的生地黄,用水浸泡后放入炆药坛内炆制 1~2 d,中途加入定量的陈皮、砂仁,待药汁收干取出,晒至半干,加定量的黄酒闷润,蒸制 4~6

h,取出,干燥,即得。每 100 kg 生地黄,用砂仁 1.5 kg,陈皮 4 kg,黄酒 20 kg。

2.2 高效液相色谱法测定有效成分

2.2.1 色谱条件

采用 Symmetry Shield™ RP18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.1%的磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~20 min, 1% A; 20~30 min, 1%~9% A; 30~65 min, 9%~30% A; 65~69 min, 30%~1% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm(梓醇、地黄苷 D), 332 nm(毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷), 284 nm(5-羟甲基糠醛),柱温 30℃,进样量 10 μL,色谱图见图 1。



1. 梓醇; 2. 5-羟甲基糠醛; 3. 地黄苷 D; 4. 毛蕊花糖苷; 5. 异毛蕊花糖苷。

图 1 对照品(A)和供试品(B)高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatograms for the reference (A) and test substances (B)

2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛各对照品适量,置于 10 mL 量

瓶中,加甲醇定容,分别制成质量浓度为 19.485、4.880、1.124、1.400、0.597 mg·mL⁻¹的对照品溶液,超声 5 min,放置于 4℃冰箱中保存备用。

2.2.3 供试品溶液的制备^[2]

精密称取地黄炮制品粉末 2.0 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入 50%甲醇 25 mL,称定质量,超声(功率 500 W,频率 40 000 kHz)处理 1 h,放凉,称定质量并补足减失,静置,取适量上清液,于 6 000 r·min⁻¹离心 15 min 后过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液,放置 4℃冰箱中保存备用。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系 按 2.2.2 项各对照品,用甲醇配成梓醇质量浓度为 0.259 8、0.519 6、0.779 4、1.039 2、1.299 0、1.948 5 mg·mL⁻¹的溶液;地黄苷 D 质量浓度为 0.048 8、0.097 6、0.146 4、0.244 0、0.488 0 mg·mL⁻¹的溶液;毛蕊花糖苷质量浓度为 0.001 4、0.014 1、0.021 5、0.028 1、0.056 2、0.112 4 mg·mL⁻¹的溶液;异毛蕊花糖苷质量浓度为 0.000 5、0.004 1、0.008 8、0.035 0、0.140 0 mg·mL⁻¹的溶液,5-羟甲基糠醛质量浓度为 0.003 0、0.012 9、0.023 9、0.035 8、0.047 8、0.059 7 mg·mL⁻¹的溶液。在 2.2.1 项的色谱条件测定,以各成分的峰面积进行线性回归,结果显示各成分在各自范围内线性关系良好,见表 1。

2.2.4.2 精密度试验 精密吸取各对照品溶液,按 2.2.1 项色谱条件测定,连续进样 6 次,记录梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛峰面积,计算 RSD 分别为 1.3%、1.6%、1.5%、1.1%、0.68%,表明其精密度良好。

2.2.4.3 稳定性试验 取 2.2.3 项下供试品溶液 10 μL,分别在 0、8、16、24、32、48 h 测定,记录梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛峰面积,计算 RSD 分别为 1.3%、0.59%、0.91%、1.2%、0.79%,表明稳定性较好。

2.2.4.4 重复性试验 精密称取同一炆地黄样品粉末 6 份,按 2.2.3 项方法制备,分别测定,记录梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛的 RSD 分别为 2.0%、1.5%、0.80%、0.76%、0.54%,表明重复性良好。

2.2.4.5 加样回收率 分别精密称取同一批炆地黄样品粉末 6 份,分别置于锥形瓶,精密加入梓醇、地黄苷 D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠

表1 线性关系考察

Table 1 Results of linearity relationship

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/mg·mL ⁻¹
梓醇	$y = 7.13 \times 10^6 x + 372136$	0.9995	0.2598~1.9485
地黄苷D	$y = 6.63 \times 10^6 x + 34445$	0.9994	0.0488~0.4880
毛蕊花糖苷	$y = 7.70 \times 10^6 x + 10777$	0.9995	0.0014~0.1124
异毛蕊花糖苷	$y = 8.64 \times 10^6 x + 14274$	0.9996	0.0005~0.1400
5-羟甲基糠醛	$y = 8.80 \times 10^7 x - 60369$	0.9990	0.0030~0.0597

醛对照品适量按2.2.3项方法制备,在色谱条件下,测得平均回收率分别为97.41%、98.65%、99.36%、99.78%、99.38%,RSD分别为1.4%、1.5%、1.3%、1.1%、0.94%。

2.3 还原糖的测定^[3]

2.3.1 对照品溶液的制备

精密称取D-无水葡萄糖对照品适量,加甲醇制成质量浓度为1 mg·mL⁻¹的对照品溶液,即得,放置于4℃冰箱中保存备用。

2.3.2 供试品溶液的制备

取地黄炮制品粉末2.0 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,加入80%甲醇60 mL,80℃水浴回流提取3 h,趁热过滤,洗涤药渣,转移并定容至100 mL量瓶中;精密量取50 mL溶液,挥干甲醇,用水溶解定容至50 mL,取上清液离心5 min后作为供试品溶液。

2.3.3 还原糖测定

精密量取0.08 mL供试品溶液,加水补至2 mL,摇匀后加入2 mL DNS试剂,在沸水浴中显色5 min,冷却后,补水至20 mL。室温下放置20 min,于540 nm处测定吸光度,计算含量。

2.4 外观性状评分

2.4.1 传统性状评分

根据2020年版《中国药典》(一部)熟地黄性状描述及相关文献评分标准^[3-4],对不同炮制样品进行性状评分,由10人分别独立评分,取平均值,评分表见表2。

2.4.2 现代色差仪测定

取样品粉末作为供试品,对仪器进行黑白板校正后,取样品测量,测定条件为D65光源、孔径4 mm、SCE模式,测量各炮制品色度值(L^* 、 a^* 、 b^*),计算总色度值(E_{ab}^*),其中 L^* 为亮度值,值越大亮度越高; a^* 代表红绿轴,“+”表示红色,“-”表示绿色; b^* 为黄蓝色轴,“+”表示黄色,“-”表示蓝色。各样品平行测定3次,取平均值^[5-6]。

表2 外观性状评分

Table 2 Appearance score

评分项目	外观描述	评分/分
外表面干	外表皮微发干略黏,带韧性,不易折断	2
干燥程度	外表皮粘手,略有韧性,易折断	1
	外表皮发干无黏性,无韧性,易折断	0.5
表面颜色	乌黑,有光泽	2
	黑色,无光泽	1
	棕黑色,无光泽	0.5
断面颜色	乌黑色,有光泽,断面多有菊花心或针刺	2
形态	孔状	
	棕黑色,无光泽,断面少菊花心或针刺孔状	1
	黄棕色,无光泽,断面少菊花心或针刺孔状	0.5
断面黏性	黏性足	2
	有黏性	1
	无黏性	0.5
味道	味甜、醇厚	2
	味甜略带酸味	1
	味甜带酸、酸味较重	0.5

按照相关方法进行测定,其 L^* 、 a^* 、 b^* 的精密性、重复性、稳定性RSD均<3%,表明精密性、重复性及稳定性良好。

2.5 指标成分的权重

层次分析法是一种主观赋权法,通过主观价值判断两两指标之间的重要程度,建立判断矩阵,确定权重^[7-8]。为了克服主观性对权重结果的影响,引入客观赋权的变异系数法,在赋权过程中,指标观测值差异越大,表明该指标越重要,相应的指标权重也就越大,但受实验数据的影响,缺乏对实际情况的针对性分析^[9]。因此将层次分析法和变异系数法有机结合,运用归一组合进行赋权,弥补单一方法计算权重的不足。

2.5.1 层次分析法(AHP)确定权重

毛蕊花糖苷、梓醇、地黄苷D分别作为2015年、2020年版《中国药典》一部地黄质量控制的指标性成分,且地黄苷D性质稳定,有效成分不易分

解。异毛蕊花糖苷在加热过程中与毛蕊花糖苷发生转化,两者之间具有相关性,可以一定程度上反映炮制过程中的含量变化^[1]。还原糖可作为指示熟地黄炮制程度的重要指标成分^[10],有研究发现还原糖在滋阴补血中发挥重要作用^[11],熟地黄传统性状判断要求符合“黑如漆,明如镜,甜如饴”的特点,结合传统经验对外观性状进行打分。5-羟甲基糠醛是熟地黄发生美拉德反应的重要产物,有研究提出药材质量越好,5-羟甲基糠醛的含量越高,曾作为2005年版《中国药典》熟地黄定性鉴别指标^[12]。

因此将7个指标分为7个层次,确定各项指标的重要程度:地黄苷D>梓醇>毛蕊花糖苷>还原糖>外观性状>5-羟甲基糠醛>异毛蕊花糖苷,采用1~9

标度法对7项指标进行两两比较评判重要性^[13],评分标准见表3。构建成对比较的判断优先矩阵,见表4。

表3 各层次评分标准

Table 3 Criteria for all levels

评分	重要性定义
9	绝对重要
7	强烈重要
5	比较重要
3	稍微重要
1	同等重要
2,4,6,8	以上两相邻重要程度的中间评分
倒数	若甲相对于乙的重要性为a,则乙相对于甲的重要性为1/a

表4 7项评价指标成对比较优先判断矩阵及权重系数

Table 4 Priority judgment matrix and weight coefficients for pairwise comparison of 7 evaluation indicators

指标	梓醇	地黄苷D	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	5-羟甲基糠醛	还原糖	外观性状	W_A
梓醇	1	1/2	2/1	6/1	3/1	3/1	3/1	0.237 3
地黄苷D	2/1	1	2/1	5/1	4/1	3/1	3/1	0.292 7
毛蕊花糖苷	1/2	1/2	1	4/1	3/1	2/1	2/1	0.161 4
异毛蕊花糖苷	1/6	1/5	1/4	1	2/1	1/4	1/3	0.049 4
5-羟甲基糠醛	1/3	1/4	1/3	1/2	1	1/3	1/2	0.051 0
还原糖	1/3	1/3	1/2	4/1	3/1	1	1	0.111 1
外观性状	1/3	1/3	1/2	3/1	2/1	1	1	0.097 1

根据表4评分结果,参考文献方法^[14]计算得到梓醇、地黄苷D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛、还原糖及外观性状7项指标权重系数分别为0.237 3、0.292 7、0.161 4、0.049 4、0.051 0、0.111 1、0.097 1。一致性比例因子(CR)=0.040 3<0.1,矩阵符合一致性检验,表明权重系数合理有效。

2.5.2 变异系数确定权重^[15]

变异系数法是一种客观赋权的方法,基本理念是在评价体系中指标观测值越大,越能反应被评价对象的差距。

各项指标的变异系数计算公式见公式(1)。

$$V_i = \sigma_i / \bar{x}_i \quad (1)$$

式中: V_i 是第*i*项指标的变异系数; σ_i 是第*i*项指标的标准差; \bar{x}_i 是第*i*项指标的平均数。

各项指标的权重计算公式见公式(2)。

$$W_{\text{变}} = V_i / \sum_{i=1}^n V_i \quad (2)$$

经公式(2)得到炆地黄饮片中六种成分梓醇、

地黄苷D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛、还原糖及外观性状的权重系数分别为0.091 6、0.103 2、0.311 6、0.138 5、0.155 8、0.095 9、0.103 4。

2.5.3 复合权重

为了保证权重方法主客观性,将层次分析法、变异系数法2种方法综合得到复合权重。计算方法见公式(3),计算得到梓醇($W_{\text{复合}1}$)、地黄苷D($W_{\text{复合}2}$)、毛蕊花糖苷($W_{\text{复合}3}$)、异毛蕊花糖苷($W_{\text{复合}4}$)、5-羟甲基糠醛($W_{\text{复合}5}$)、还原糖($W_{\text{复合}6}$)及外观性状($W_{\text{复合}7}$)的复合权重分别为0.157 8、0.219 4、0.365 2、0.049 7、0.057 7、0.077 3、0.072 9。

$$W_{\text{复合}} = \frac{W_{\text{变}} \times W_A}{\sum_{i=1}^m W_{\text{变}} \times W_A} \quad (3)$$

2.5.4 综合评分值(OD)

以梓醇、地黄苷D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛、还原糖、外观形状含量的总评归一值

(OD)作为参考指标。

$$OD = (W_{复合1} Y_1 / Y_{1max} + W_{复合2} Y_2 / Y_{2max} + W_{复合3} Y_3 / Y_{3max} + W_{复合4} Y_4 / Y_{4max} + W_{复合5} Y_5 / Y_{5max} + W_{复合6} Y_6 / Y_{6max} + W_{复合7} Y_7 / Y_{7max}) \times 100 \quad (4)$$

其中, $Y_1 \sim Y_6$ 分别为6种成分的含量, Y_7 为外观性状评分, $Y_{1max} \sim Y_{7max}$ 为各指标测定的最大值。

2.6 Box-Behnken 响应曲面法工艺优化

2.6.1 试验方案

参考课题组前期研究^[16], 以加水倍数(A)、闷润时间(B)、蒸制时间(C)3个为考察因素, 以梓醇、地黄苷D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠

醛、还原糖及外观性状7项指标的综合评分为响应值, 设计3因素3水平 Box-Behnken 试验方案。每组试验因素水平表见表5。数据结果及色差分析仪结果见表6、7。

表5 响应面法工艺优化因素水平

Table 5 Factors and levels of response surface methodology

水平	A	B	C
	加水倍数	闷润时间/h	蒸制时间/h
-1	7	4	4
0	8	5	5
1	9	6	6

表6 Box-Behnken 试验设计方案及结果

Table 6 Box-Behnken design and results

No.	A	B	C	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	OD
		/h	/h	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/mg·g ⁻¹	/分	
1	-1	1	0	15.456	2.453	0.259	0.390	0.083	204.621	8.15	77.416
2	1	-1	0	12.183	2.071	0.152	0.211	0.101	219.258	8.50	60.533
3	0	0	0	15.855	3.166	0.254	0.324	0.100	274.885	8.10	83.938
4	0	1	-1	11.629	2.658	0.004	0.331	0.131	253.522	7.60	52.563
5	1	1	0	12.071	2.287	0.109	0.346	0.117	193.976	7.40	58.359
6	0	0	0	15.675	2.734	0.213	0.350	0.138	266.095	7.95	78.274
7	-1	0	1	15.767	3.235	0.381	0.408	0.076	200.895	8.05	94.487
8	0	0	0	13.386	2.513	0.254	0.368	0.111	270.885	7.40	77.299
9	1	0	-1	12.742	3.157	0.158	0.268	0.121	259.708	6.75	70.113
10	0	0	0	13.456	3.147	0.244	0.383	0.115	266.055	6.65	80.264
11	1	0	1	14.741	2.562	0.176	0.335	0.146	252.523	5.65	70.399
12	-1	0	-1	15.187	2.871	0.147	0.380	0.072	185.460	7.30	67.444
13	0	1	1	11.029	2.173	0.213	0.232	0.153	218.193	7.25	67.042
14	0	0	0	14.442	3.041	0.302	0.302	0.115	274.887	5.10	84.015
15	0	-1	-1	11.432	2.172	0.141	0.241	0.133	222.983	5.70	58.694
16	-1	-1	0	15.911	2.887	0.156	0.376	0.088	226.177	7.65	71.133
17	0	-1	1	12.769	2.619	0.188	0.253	0.136	274.611	5.85	69.397

表7 生品及17组样品的 L^* 、 a^* 、 b^*

Table 7 L^* , a^* and b^* values of the raw sample and 17 samples

No.	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*	No.	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*
生品	38.45	12.30	23.24	46.58	9	17.98	17.45	11.37	27.51
1	29.53	11.30	16.49	35.66	10	19.56	17.95	12.86	29.50
2	31.25	10.93	17.27	37.34	11	15.34	19.81	9.36	26.75
3	29.47	11.73	16.52	35.76	12	22.46	14.81	13.26	29.99
4	25.68	14.13	15.14	32.99	13	20.31	16.57	12.45	29.02
5	24.66	14.26	14.38	31.91	14	14.51	20.62	9.35	26.89
6	26.01	12.94	14.66	32.54	15	16.27	19.51	10.18	27.37
7	29.54	12.49	17.07	36.33	16	23.91	14.57	14.16	31.38
8	21.52	17.39	13.75	30.90	17	17.54	19.05	7.41	26.93

2.6.2 模型建立及显著性检验

运用 Design Expert 11 软件对上述数据进行二次多元回归拟合,创建回归方程 $OD = 80.76 - 6.38A - 0.5471B + 6.56C - 2.11AB - 6.69AC + 0.9440BC - 0.1055A^2 - 13.79B^2 - 5.04C^2$ 。由方差分析可得知模型 $F = 20.83, P = 0.0003 < 0.05$,表明试验模型具有极显著

性;模型决定系数 $R^2 = 0.9640, R^2_{adj} = 0.9177$,表明模型拟合程度较好;失拟项 $F = 0.9851, P = 0.4841 > 0.05$,失拟项不显著,可用于炆地黄炮制工艺的分析。影响炆地黄炮制工艺的3个因素中,由回归模型各项 P 可知,一次项中 A, C 均具有显著性,二次项显著性中 B^2, C^2 具有显著性,在交互项中 AC 具有显著性,见表8。

表8 回归模型方差分析结果

Table 8 Results of analysis of variance of regression models

来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1 820.62	9	202.29	20.83	0.0003	显著
A	326.09	1	326.09	33.57	0.0007	
B	2.39	1	2.39	0.2466	0.6347	
C	344.68	1	344.68	35.49	0.0006	
AB	17.88	1	17.88	1.84	0.2170	
AC	178.98	1	178.98	18.43	0.0036	
BC	3.56	1	3.56	0.3670	0.5638	
A^2	0.0469	1	0.0469	0.0048	0.9466	
B^2	800.95	1	800.95	82.47	<0.0001	
C^2	107.03	1	107.03	11.02	0.0128	
残差	67.99	7	9.71			
失拟项	28.89	3	9.63	0.9851	0.4841	不显著
纯误差	39.10	4	9.77			
总离差	1 888.61	16				

2.6.3 最佳工艺预测

根据试验结果应用 Design Expert 11 软件,绘制各因素交互作用的三维曲面图,见图2。优化得到炆地黄饮片的最佳炮制工艺为每100g加7倍量的水炆制后,加入用黄酒闷润5.091h,上锅蒸6h质量较佳,但因黄酒闷润时间对此工艺影响较小,为了方便炮制采用5h。同时为了降低传统性状打分的主观性,结合色差仪测定色泽,结果发现最佳工艺色泽均具有较好优势。

2.6.4 工艺验证

按照优选出的炆地黄最佳炮制工艺条件平行制备3份样品,分别测定各指标的含量及外观性状,计算OD,结果表明,3批样品验证试验所得OD分别为92.273,91.962,90.691,综合评分较高, $RSD < 3\%$ 。同时,采用色差仪进行验证,平行测量3次, $RSD < 3\%$ 。

2.7 成分与色度值的相关性分析

将2.6.1项的17个样品及生品所含6种指标性成分的含量与色度值 L^*, a^*, b^* 相互关联,用 GraphPad Prism 8 软件对生品及不同炮制品6种成

分含量及色度值作变化趋势图,见图3,相关性分析结果见表9、图4。

结果显示, L^* 与梓醇含量呈极显著正相关,表明 L^* 越大,梓醇含量越高;与还原糖、5-羟甲基糠醛呈显著负相关,表明 L^* 越小,其含量越高。 a^* 与5-羟甲基糠醛含量呈显著正相关,表明 a^* 越大,5-羟甲基糠醛含量越高。 b^* 与梓醇呈极显著正相关,与还原糖、5-羟甲基糠醛呈极显著负相关,表明 b^* 越大,梓醇含量越高,还原糖、5-羟甲基糠醛含量越低。从侧面反映出,梓醇、还原糖和5-羟甲基糠醛与地黄“黑如漆、明如镜”有关。仅仅通过相关性分析还不能根据色度值预测有效成分的含量,需进一步进行线性回归分析。

2.8 回归性分析

炆地黄中的梓醇、地黄苷D、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、5-羟甲基糠醛、还原糖的含量为自变量,以色度值为因变量用 SPSS 26.0 对其进行回归分析,表明化学成分对色度值之间的影响程度。同样以色度值为自变量,以6种成分为因变量进行线性回归,可表明色度值预测化学成分含量的程度,模型

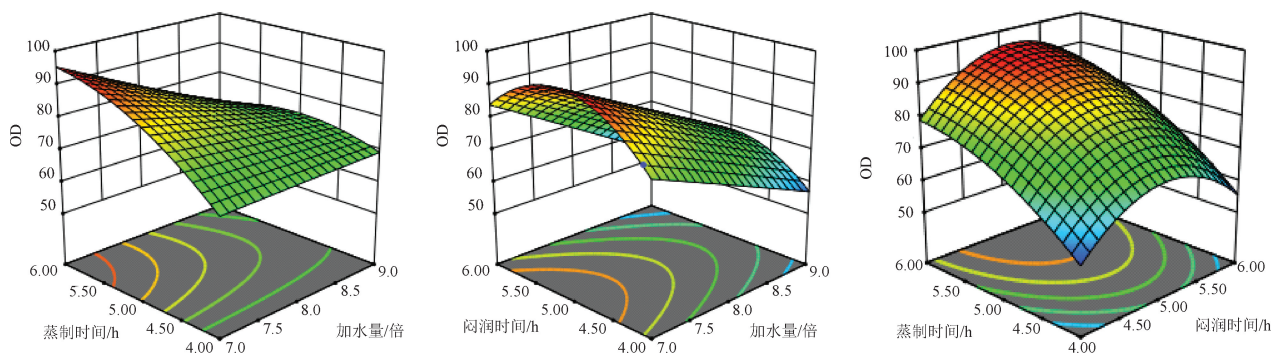


图2 加水量、闷润时间、蒸制时间的交互作用

Fig. 2 Interaction of the amount of water added, time for soaking with rice wine, and steaming time

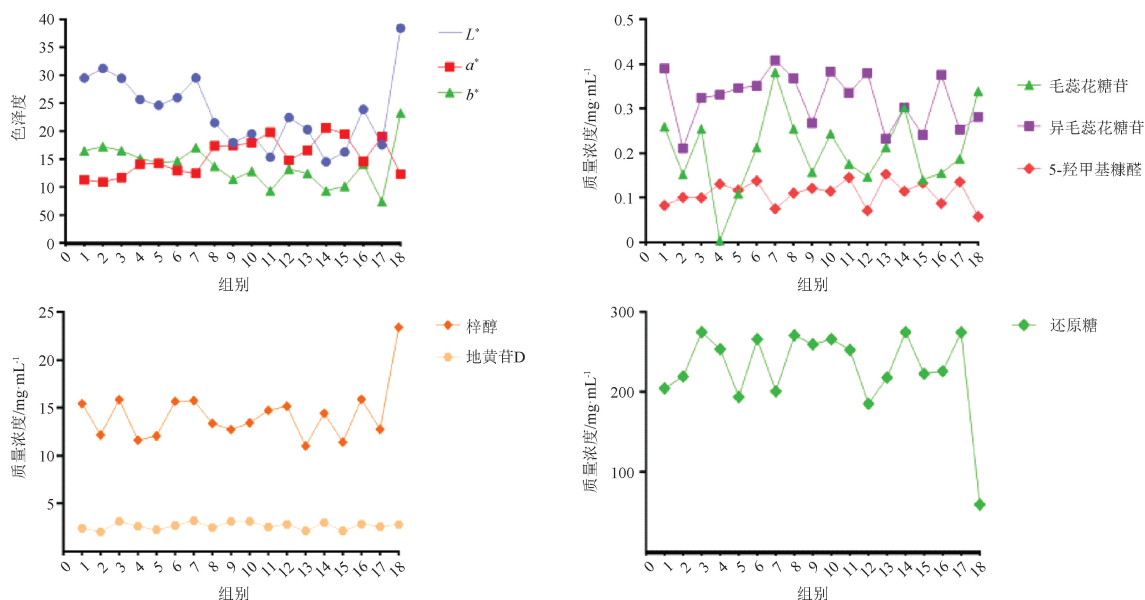


图3 色度值及6种成分含量变化趋势

Fig. 3 Change trend of chroma value and content of 6 components

表9 色度值与6种成分含量相关性分析

Table 9 Correlation analysis between the content of chroma values and 6 components

色度值	参数	梓醇	还原糖	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷	地黄苷D	5-羟甲基糠醛
L^*	Pearson 相关性	0.611 ²⁾	-0.649 ²⁾	0.279	0.132	0.032	-0.676 ²⁾
	Sig. (双尾)	0.007	0.004	0.262	0.602	0.901	0.002
a^*	Pearson 相关性	-0.383	0.440	-0.106	-0.214	0.005	0.579 ¹⁾
	Sig. (双尾)	0.117	0.068	0.674	0.394	0.984	0.012
b^*	Pearson 相关性	0.640 ²⁾	-0.694 ²⁾	0.312	0.182	0.082	-0.697 ²⁾
	Sig. (双尾)	0.004	0.001	0.208	0.469	0.747	0.001

注: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

的回归分析结果见表10、11。

当 L^* 、 a^* 、 b^* 为自变量时,梓醇、地黄苷D等6种成分为因变量,由表10可知,梓醇、5-羟甲基糠

醛、还原糖与色度值的 R^2 分别为 0.584、0.489、0.597,说明3种成分受颜色值的影响程度分别为 58.4%、48.9%、59.7%,表10可看出梓醇、5-羟甲基

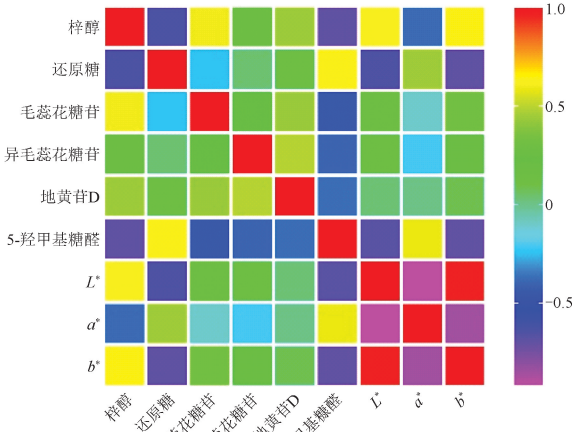


图4 指标成分与色度值相关性热图

Fig. 4 Heat map for correlation between index components and chroma values

表10 6种化学成分回归方差分析

Table 10 Regression analysis of 6 chemical components

模型	R	R ²	调整后 R ²	Sig.
梓醇	0.764	0.584	0.494	0.005
地黄苷 D	0.198	0.039	-0.167	0.901
毛蕊花糖苷	0.475	0.225	0.059	0.297
异毛蕊花糖苷	0.406	0.165	-0.014	0.455
5-羟甲基糠醛	0.700	0.489	0.380	0.021
还原糖	0.773	0.597	0.511	0.004

表11 化学成分与色度值的回归系数

Table 11 Regression coefficient of chemical components and chroma values

模型		非标准化	标准化	t	P
		系数	系数		
梓醇	(常量)	-18.292	-	-1.683	0.115
	L*	0.647	1.469	1.601	0.132
	a*	1.000	1.121	2.411	0.030
	b*	0.138	0.180	0.262	0.797
5-羟甲基糠醛	(常量)	0.216	-	1.871	0.082
	L*	-0.001	-0.277	-0.272	0.789
	a*	-0.001	-0.155	-0.301	0.768
	b*	-0.004	-0.562	-0.737	0.473
还原糖	(常量)	745.016	-	3.772	0.002
	L*	-7.807	-0.959	-1.063	0.306
	a*	-14.755	-0.896	-1.959	0.070
	b*	-7.542	-0.533	-0.786	0.445

糠醛和还原糖验证回归式显著性 P 均小于 0.05, 在统计学中有显著性。其关系可表示为 $Y_{1(\text{梓醇})} = -18.292 + 0.647X_1 + X_2 + 0.138X_3$, $Y_{2(5\text{-羟甲基糠醛})} =$

$0.216 - 0.001X_1 - 0.001X_2 - 0.004X_3$, $Y_{3(\text{还原糖})} = 745.016 - 7.807X_1 - 14.755X_2 - 7.542X_3$, (X_1 、 X_2 、 X_3 分别代表 L^* 、 a^* 、 b^*), 且 L^* 、 b^* 的回归系数均不显著, a^* 在梓醇中回归系数显著, 在 5-羟甲基糠醛和还原糖的回归系数不显著。

以 6 种成分为自变量, 色度值 L^* 、 a^* 、 b^* 分别为因变量结果发现回归式统计学无显著性差异, 因此略去相应回归分析表。

根据色差仪 L^* 、 a^* 、 b^* 在颜色中实际意义, 结合统计学的分析方法可以初步得出, 熟地黄“黑如漆, 明如镜”与梓醇、5-羟甲基糠醛和还原糖密切相关。一般而言, L^* 表示黑白, 其值越大颜色越明亮, 炮制过程中发现 L^* 变小, 梓醇的含量也降低, 5-羟甲基糠醛和还原糖含量升高。 a^* 表示红绿色, 其值越大颜色越红, 炮制过程中发现 a^* 变大, 5-羟甲基糠醛的含量相应增加; b^* 表示黄蓝色, 其值越大颜色越黄, 炮制过程中发现 b^* 变小, 梓醇含量也降低, 5-羟甲基糠醛和还原糖的含量相应上升。

3 讨论

建昌帮传统炆法炮制, 辅料多样, 工序复杂, 现代炮制方法的应用逐渐减少。本研究参考 2008 年版《江西省中药饮片炮制规范》^[17] 和《建昌帮中药传统炮制法》对炆法的介绍, 通过响应曲面法以 7 种指标因素进行工艺优化, 得到最佳炮制工艺为每 100 g 加 7 倍水炆制后, 加黄酒闷润 5 h, 上锅蒸 6 h 干燥即得。优选后的工艺, 在加水量、闷润时间和蒸制时间有了确切参数, 能在一定程度上保证成分的含量, 从而更好的发挥药效。

通过采用色差分析仪测定其 L^* 、 a^* 、 b^* , 科学地判断炮制终点。将其成分与色度值进行相关性及回归性分析, 结果发现, 地黄炮制品性状要求的“黑如漆”与明亮度 L^* 密切相关, L^* 越小颜色越黑, 与之相关的梓醇含量越低, 还原糖和 5-羟甲基糠醛的含量越多, 进一步印证了地黄在加热过程中发生美拉德反应, 从而判定其炆地黄成分与饮片颜色存在一定的相关性, 其颜色的变化一定程度上影响成分的含量。因此该方法可以通过观察饮片外观颜色鉴别饮片的质量, 从而更科学准确地达到“适中”的效果。

3.1 实验条件的考察

本前期分别以 10%、30%、50%、75%、100% 甲醇作为提取溶剂, 在 2020 年版《中国药典》(一部)^[18]

和相关文献^[19]的基础上考察了乙腈-0.1%磷酸、甲醇-0.1%磷酸流动相体系,以全波长扫描结果进行条件优选,以目标成分的出峰时间、峰型和分离度以及基线平稳程度、杂峰的干扰程度为参考依据,分析测定的相关要求。最终确定以50%甲醇作为提取溶剂,以乙腈-0.1%磷酸为流动相,检测波长相较于2020年版《中国药典》有所差异,最终确定的波长为203 nm为梓醇、地黄苷检测波长,284 nm为5-羟甲基糠醛的检测波长,332 nm为毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的检测波长,使得各成分峰形好、吸收强度高。

3.2 响应曲面法及各影响因素交互作用

多因素实验指的是2种以上自变量的实验,在常规工艺优化中大多采用正交试验设计,但正交设计所选的优选值只是设计水平的某种组合,优选结果不会超过所选水平的范围,并且指向性不强^[20]。因此本实验选择响应曲面法,通过多项式拟合各因素与响应值之间的函数关系,以三维立体图更加直观的观察各因素交互作用及通过回归模型预测最佳参数,相比正交更加精确^[21-22]。本实验采用Box-Behnken响应面法优化炮制工艺,结果显示整体模型 $P < 0.05$,失拟项值 $P > 0.05$,表明二次回归方程具有显著性。整体而言,此模型预测炆地黄工艺具有可行性。在影响因素的交互作用比较发现,蒸制时间及加水量之间交互作用比较明显,验证发现其质量稳定,可为后续熟地黄工艺研究提供新思路。

3.3 成分与色泽度相关性及其回归性

色度分析法广泛在中药质量控制中发挥重要的作用,可以对中药饮片及炮制品的颜色实现质量的可控化,使中药质量评价更加客观、精确。相关性分析是对2个或多个变量进行分析,以发现变量之间是否存在线性依存关系,从而反映相关的紧密程度。本实验将成分与色度关联,通过查阅相关文献,最终采用SPSS 26.0及GraphPad Prism 8软件进行相关性分析,得到成分与色度之间的显著正(负)相关性,在此基础上进行多元线性回归,研究某一因变量与几个自变量之间的变动关系,求出关系式^[20]。炆地黄的 L^* 、 a^* 、 b^* 与梓醇、5-羟甲基糠醛和还原糖具有极显著相关性,与地黄苷D、毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷无显著相关性,说明颜色深浅及红绿、黄蓝对梓醇、5-羟甲基糠醛和还原糖的影响较大。这可

能是在炮制过程中,由于温度的升高促使发生美拉德反应,大量的苷类和氨基酸类发生降解,使得地黄由棕褐色变成乌黑色,同时糖类成分增加,并产生新的成分5-羟甲基糠醛^[1]。

3.4 成分-色度关联与药理相关研究

从本实验可以看出来, L^* 、 a^* 、 b^* 与梓醇、5-羟甲基糠醛和还原糖密切相关。通过查阅3种成分的药理研究,可以发现所含成分梓醇在抗抑郁、抗炎等方面作用显著,经过炮制后,由于本身性质不稳定,含量降低,因此临床用于治疗关节炎等疾病大多采用生地黄^[23],而非熟地黄。5-羟甲基糠醛是美拉德反应典型产物,在抗氧化、改善学习记忆能力、抗过敏、抗组织缺氧等发挥作用^[24]。研究发现,炮制后5-羟甲基糠醛含量大幅度升高,且5-羟甲基糠醛性质不稳定,其代谢产物5-磺氧甲基糠醛在一定条件下产生毒性,因此在对5-羟甲基糠醛含量测定是十分必要^[25]。还原糖是指具有还原性的糖类,加热后含量升高,有文献报道还原糖类物质是熟地黄滋阴补血、益精填髓的药效物质基础^[3,11],关于熟地黄成分、色度与药效三者之间的关联还未见报道,后续可将作为一个研究方向,为完善中药质量鉴别提供参考,推动传统炮制学的创新发展。

[参考文献]

- [1] 解杨,钟凌云,王卓,等.地黄炮制历史沿革及现代研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(2):273.
- [2] 朱逸超,任娟,仇雪,等.酒地黄炮制过程中4种活性成分含量变化[J].中国中医药信息杂志,2020,27(2):48.
- [3] 张静,马瑛.多指标综合平衡法-正交试验优化九蒸九晒地黄炮制工艺[J].中国药房,2016,27(7):962.
- [4] 王中华,窦志英,王洋,等.基于毛蕊花糖苷含量分析陈皮和砂仁在熟地黄炮制中的影响性研究[J].天津中医药,2019,36(12):1234.
- [5] 柴冲冲,毛民,袁金凤,等.不同方法软化切制后的黄芩饮片颜色与5种黄酮类成分含量的相关性研究[J].中国中药杂志,2019,44(20):4467.
- [6] 朱兴龙,卢丽洁,吴清华,等.基于成分变化研究厚朴“发汗”过程中颜色与酶促反应的关系[J].中国中药杂志,2022,47(5):1262.
- [7] 冯长根,李杰,李生才.层次分析法在中国安全科学研究中的应用[J].安全与环境学报,2018,18(6):2126.
- [8] 黄显曦,陈艳琰,乐世俊,等.基于层次分析-熵权法的气血和胶囊质量标志物研究[J].中国中药杂志,2021,46(11):2710.
- [9] 冯书顺,武强.基于AHP-变异系数法综合赋权的含水层富水性研究[J].煤炭工程,2016,48(S2):138.
- [10] 王中华,陈涛,王远志,等.还原糖含量对陈皮及砂仁制熟地

- 地黄炮制终点的指示性研究[J]. 中国药师, 2020, 23(11): 2269.
- [11] 马灵珍, 沈嘉慧. 九蒸九制熟地黄内还原糖变化规律研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8):59.
- [12] 周倩. 地黄标准物质及熟地黄质量评价标准的研究[D]. 开封:河南大学, 2014.
- [13] 李慧, 刘其南, 张丽, 等. 基于层次分析法及多指标正交试验优选酒炖女贞子炮制工艺[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2832.
- [14] 张琳, 周欣, 闫丹, 等. 基于 CRITIC-AHP 权重分析法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选陈皮饮片炮制工艺[J]. 中草药, 2018, 49(16):3829.
- [15] 吴建雄, 李苏运, 郭怡敬, 等. 变异系数法-AHP 综合加权结合响应面法优选陈皮醋制工艺[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11):2656.
- [16] 易炳学, 周毅, 颜干明, 等. 正交试验优选建昌帮炆熟地炮制工艺研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(23):14.
- [17] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2009.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2020.
- [19] 余意, 马方励, 胡明华, 等. 多指标综合评分-正交试验法优选清蒸法制熟地黄炮制工艺[J]. 中国药师, 2019, 22(1): 39.
- [20] 陈希孺. 高等数理统计学[M]. 合肥:中国科学技术大学出版社, 2009.
- [21] 王娟, 袁绍莉, 王丹. Box-Behnken 响应面法优化枇杷叶多糖提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 32(6):47.
- [22] 潘鹏超, 陈啸飞, 谌卫, 等. 基于正交试验和响应曲面法优化复方金钱草颗粒提取工艺[J]. 药学实践杂志, 2020, 38(1):27.
- [23] 孙娜, 徐钢, 张丽妍, 等. 中药地黄防治骨质疏松症的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(15):3603.
- [24] 王梅, 王越欣, 武英茹, 等. 5-羟甲基糠醛在中药加工过程中的变化及药理作用研究概况[J]. 药物评价研究, 2020, 43(11):2319.
- [25] 李恩灿, 贺玖明, 靳洪涛, 等. 5-羟甲基糠醛的药理和毒理研究进展[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(4):210.

[责任编辑 孔晶晶]