

金樱子盐炙工艺及其盐炙前后 HPLC 指纹图谱与色度值研究

张洪涛*, 张 静, 孟灵旭, 朱正华, 孟相俊, 张啸环[#](长春中医药大学药学院, 长春 132000)

中图分类号 R917;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)07-0861-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.07.16



摘要 目的 优选金樱子的盐炙工艺,并对其盐炙前后的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱与色度值进行研究。方法 采用综合评价法,以外观性状、水分与多糖含量为指标优选金樱子盐炙工艺。采用 HPLC 法建立金樱子盐炙前后的指纹图谱,并对金樱子盐炙前后粉末色度值(L^* 、 a^* 、 b^*)进行测定,以其共有峰峰面积与色度值为指标对金樱子生品与盐炙品进行多元统计分析。结果 确定金樱子的最佳盐炙工艺为:将其与适量食盐水拌匀后置于 140 °C 预热炒锅内,炒制 25 min,炒锅转数为 20 次/min。在金樱子盐炙前后 HPLC 指纹图谱中共标定 10 个共有峰,并指认了没食子酸、儿茶素、鞣花酸 3 个成分;盐炙后色度值 L^* 、 b^* 、 E^* 有显著变化。多元统计分析方法可将生品与盐炙品区分为 2 类,其中 1、5、6、10 号峰及色度值 b^* 、 E^* 为重要特征因素。结论 本实验优选的金樱子盐炙工艺稳定、可靠,建立的指纹图谱方法重复性、稳定性良好。指纹图谱与色度值结合多元统计分析可为金樱子盐炙前后的鉴别及质量分析提供参考。

关键词 金樱子;盐炙;工艺优化;指纹图谱;色度值;多元统计分析

Study on the salt-processing technology of *Rosa laevigata* and its HPLC fingerprints and chromaticity values before and after salt-processing

ZHANG Hongtao, ZHANG Jing, MENG Lingxu, ZHU Zhenghua, MENG Xiangjun, ZHANG Xiaohuan (College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 132000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize the salt-processing technology of *Rosa laevigata*, and to study high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and chromaticity values of *R. laevigata* before and after salt-processing. **METHODS** The comprehensive scoring method was adopted to optimize the salt-processing technology of *R. laevigata* using appearance character, moisture and polysaccharide content as index. Fingerprints were established by HPLC method before and after salt-processing, and chromaticity values (L^* , a^* , b^*) of the powder before and after salt-processing were determined. The multivariate statistical analysis was carried out for raw product and salt-processing product of *R. laevigata* by using common peak areas and chromaticity values as index. **RESULTS** The optimal salt-processing technology of *R. laevigata* was to mix it with appropriate amount of salt water, place them in the preheated frying wok at 140 °C, fry them for 25 min, and rotate frying wok 20 times/min. Ten common peaks were calibrated by HPLC fingerprints before and after salt-processing, and 3 components were identified, such as gallic acid, catechin and ellagic acid. The chromaticity values L^* , b^* and E^* changed significantly after salt-processing. The multivariate statistical analysis method could distinguish raw products and salt-processing products into two categories, in which peaks 1, 5, 6 and 10 and chromaticity values b^* and E^* were important characteristic factors. **CONCLUSIONS** The optimized salt-processing technology is stable and reliable, and the established fingerprint has good repeatability and stability. Fingerprint and chromaticity values combined with multivariate statistical analysis can provide reference for the identification and quality analysis of *R. laevigata* before and after salt-processing.

KEYWORDS *Rosa laevigata*; salt-processing; technology optimization; fingerprint; chromaticity value; multivariate statistical analysis

金樱子为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* Michx. 的干燥成熟果实,具有固精缩尿、固崩止带、涩肠止泻的作用,可用于遗精滑精、遗尿尿频、崩漏带下、久泻久痢等症^[1]。金樱子主要通过所含的多糖、酚酸、三萜、甾体和苯丙素类化合物,发挥抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降糖、降脂、免疫调节、保护肾脏等多种药理作用^[2]。传统炮制理

论认为“入盐走肾”^[3],即盐炙后能增强金樱子固精缩尿的作用。观察金樱子盐炙前后性状变化判断炮制终点的方法与“辨状论质”理论通过观察药材的形状、大小、颜色、气味等分析评判出药材的内在品质相契合^[4]。中药指纹图谱技术是评价中药质量的有效方法,现已取得国内外广泛的认可^[5]。将指纹图谱、色度值与多元统计分析方法结合可有效地评价中药炮制前后的质量,并筛选出质量差异性因素^[6]。因此,本研究基于“辨状论质”理论,采用综合评价法优选金樱子盐炙工艺,建立金樱子盐炙前后的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并测定

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制技术及科学内涵。E-mail: 627898294@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:中药炮制技术及科学内涵。E-mail:619787310@qq.com

金樱子盐炙前后粉末色度值,再结合主成分分析(principal component analysis, PCA)、聚类分析(cluster analysis, CA)、正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)方法对金樱子盐炙前后的指纹图谱和色度值进行研究,为金樱子生品和盐炙品的鉴别及质量分析提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-2030型HPLC仪(日本Shimadzu公司)、UV-2450紫外分光光度仪(上海谱元仪器有限公司)、FA1204B型万分之一电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)、Q-250型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、3NH高品质电脑色差仪(深圳市三恩时科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

没食子酸对照品(批号C17D10C105977)、鞣花酸对照品(批号S24D11G135548)、儿茶素对照品(批号P02A9F57645)均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均大于98%;D-无水葡萄糖(批号110833-201908)购自中国食品药品检定研究院,纯度为99.8%;磷酸、甲醇均购自成都市科隆化学品有限公司,乙腈购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,均为色谱纯;水为超纯水。10批金樱子经长春中医药大学药学院翁丽丽教授鉴定为蔷薇科植物金樱子*R. laevigata* Michx.的干燥成熟果实,样品信息见表1。

表1 金樱子样品信息

编号	产地	批号	厂家
S1	广东	20200108	吉林省北药药材加工有限公司
S2	广东	20180630	吉林省北药药材加工有限公司
S3	广东	20190106	吉林省北药药材加工有限公司
S4	湖北	190801	安国市安兴中药饮片有限公司
S5	湖北	191015	安国市安兴中药饮片有限公司
S6	江西	190418001	河北美康药业有限公司
S7	江西	190409010	河北美康药业有限公司
S8	江西	181001194	河北美康药业有限公司
S9	湖南	C430181108	安国市荣华本草中药材有限公司
S10	湖南	C430181102	安国市荣华本草中药材有限公司

2 方法与结果

2.1 金樱子盐炙工艺优选

本研究以金樱子的外观性状、水分与多糖含量为指标,综合评价优选其盐炙工艺。综合指标采用加权归一化法^[7]:外观性状评分、多糖含量为最大化指标,公式为 $d_{max} = (Y_i - Y_{min}) / (Y_{max} - Y_{min})$;水分最小化指标,公式为 $d_{min} = (Y_{max} - Y_i) / (Y_{max} - Y_{min})$,其中 Y_{min} 为指标中最小值, Y_{max} 为指标中最大值。将优选指标按重要性比较,分别赋予外观性状50分、多糖含量30分、水分20分的权重,公式为 $Y = (d_{外观性状} \times 50 + d_{多糖含量} \times 30 + d_{水分} \times 20)$ 。

2.1.1 外观性状评分 通过参考金樱子在2020年版《中国药典》中的性状描述与2009年版《甘肃省中药炮制规范》、1986年版《吉林省中药炮制标准》中盐炙品的性状

描述,制定评分依据(见表2)。由10位从事饮片生产和炮制研究的人员对样品外观进行评分。采用3NH高品质电脑色差仪(D65光源)测定样品色度值,赋予外观评分与色度值各25分权重。色度值包括 L^* 值、 a^* 值与 b^* 值: L^* 值表示亮度; a^* 值表示红绿色,负值为绿,正值为红; b^* 值表示蓝黄色,负值为蓝,正值为黄。金樱子为红黄色或红色,故色度值均为正值; L^* 、 a^* 、 b^* 值同等重要,各赋予1/3的权重。故外观性状评分=(外观评分/外观评分最大值) $\times 25 + (L^*/L^*_{max} \times 1/3 + a^*/a^*_{max} \times 1/3 + b^*/b^*_{max} \times 1/3) \times 25$ ^[8]。

表2 盐金樱子外观评分表

项目	分值	判断依据	得分
是否炒干	2	粘手	0
		稍粘手	1
		基本不粘手	2
内表面颜色	2	无颜色加深	0
		颜色稍加深	1
		颜色加深	2
		颜色加深、灰暗	1
外表面颜色	2	无颜色加深	0
		颜色稍加深	1
		颜色加深	2
		颜色加深、灰暗	1
有无光泽	2	无光泽	0
		稍有光泽	1
		有光泽	2
		有光泽但灰暗	1
是否炒制均匀	2	炒制均匀、无焦斑	1
		炒制均匀、稍有焦斑	2
		有焦斑	1
		炒制不均、多焦斑	0

2.1.2 水分的测定 依据2020年版《中国药典》(四部)通则0832水分测定烘干法^[9]测定并计算金樱子水分(%)。

2.1.3 多糖含量的测定 金樱子多糖的含量测定参照枸杞子^[10]与黄精^[11]的测定方法。

(1)对照品溶液的制备:精密称取D-无水葡萄糖适量,加水配制成浓度为0.6 mg/mL的对照品溶液。

(2)供试品溶液的制备:取金樱子粗粉约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加80%乙醇150 mL,加热回流1 h,趁热滤过,残渣用热的80%乙醇洗涤3次,每次10 mL;将残渣及滤纸置于具塞锥形瓶中,精密加水50 mL,称定质量,加热回流1 h,放冷,再称定质量,用水补足缺失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液10 mL,置于100 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。

(3)检测波长的选择:取对照品溶液与供试品溶液(编号S1)各2 mL,分别置于具塞试管中,精密加4%苯酚溶液1 mL,混匀,迅速精密加入硫酸7 mL,摇匀,置沸水浴中保温5 min,取出;置冰水浴中放置5 min,取出。以蒸馏水为空白溶液,照上述步骤反应显色。使用紫外-可见分光光度计于400~600 nm波长范围内进行扫描。结果显示,在485 nm波长处对照品溶液与供试品溶液均有最大吸收,故确定485 nm为测定波长。

(4)线性关系考察:精密量取对照品溶液1、2、3、4、

5、6 mL,分别置于50 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀。分别取上述溶液2 mL,按“2.1.3(3)”项下方法显色,于485 nm波长处测定吸光度。以葡萄糖质量浓度为横坐标(X)、吸光度为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y=5.6041X-0.0066$ ($r^2=0.9996$),表明葡萄糖质量浓度在0.0024~0.0144 mg/mL范围内线性关系良好。

(5)精密度的试验:取供试品溶液(编号S1),按“2.1.3(3)”项下方法显色,显色后重复测定6次吸光度,结果吸光度的RSD为0.05%($n=6$),表明仪器精密度良好。

(6)稳定性试验:取供试品溶液(编号S1),按“2.1.3(3)”项下方法显色,显色后分别在0、20、40、60、80、100、120 min时测定吸光度,结果吸光度的RSD为0.87%($n=7$),表明供试品溶液在120 min内稳定。

(7)重复性试验:取样品(编号S1)0.5 g,共6份,按“2.1.3(2)”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3(3)”项下方法显色,显色后测定吸光度并按标准曲线法计算含量,结果多糖含量的RSD为0.58%($n=6$),表明方法有较好的重复性。

(8)加样回收率试验:取已知含量的样品(编号S1),共6份,每份0.25 g,分别精密加入D-无水葡萄糖6 mg,按“2.1.3(2)”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3(3)”项下方法显色,显色后测定吸光度并计算加样回收率,结果多糖的平均加样回收率为99.32%,RSD为2.35%($n=6$),表明方法准确度良好。

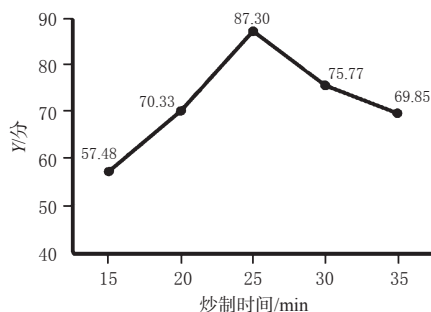
2.1.4 单因素实验 根据实际情况炒锅转数有10、15、20次/min共3种条件,固定炒锅转数为15次/min,对炒制时间与温度进行单因素实验。取10份S1样品,每份100 g,分别加入食盐水[水盐比例8:1(mL/g)],拌匀闷润120 min,按“2.1”项下方法计算综合得分(Y),实验结果如图1。根据实验结果可知,炒制时间25 min、炒制温度140 °C时综合评分最高。

2.1.5 正交试验设计 依据单因素实验结果,采用正交试验的3因素3水平设计,以炒制温度(A)、炒制时间(B)、炒锅转数(C)为自变量,综合评分(Y)为因变量,优化金樱子的盐炙工艺。试验设计因素与水平见表3,正交试验设计与结果见表4。利用SPSS 26.0软件进行方差分析,结果见表5。根据极值(r)大小与方差分析可知,炒制温度(A)对试验工艺影响最大,其次是炒制时间(B)、炒锅转数(C),其中炒制温度与炒制时间的影响有统计学意义,炒锅转数的影响无统计学意义。根据分析结果确定最佳炮制的工艺条件是 $A_2B_2C_3$,即将金樱子与适量食盐水拌匀,置于140 °C预热炒锅内,炒制25 min,炒锅转数为20次/min。

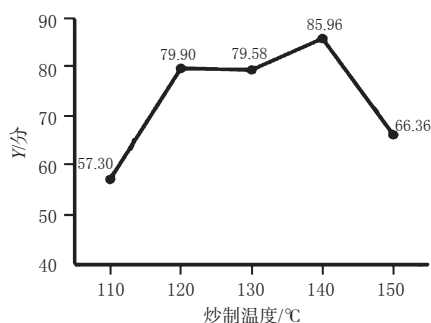
2.2 金樱子盐炙前后HPLC指纹图谱与色度值研究

2.2.1 盐金樱子的制备 取10批金樱子样品各100 g,按“2.1.5”项下优化工艺制备盐金樱子,编号为Y1~Y10。

2.2.2 色谱条件 以Hypersil ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)为流动相,



A.随炒制时间变化综合得分图(固定炒制温度140 °C)



B.随炒制温度变化综合得分图(固定炒制时间25 min)

图1 单因素实验结果

表3 金樱子盐炙工艺正交试验的因素与水平

水平	A/°C	B/min	C/(次/min)
1	130	20	10
2	140	25	15
3	150	30	20

表4 金樱子盐炙工艺正交试验的设计与结果

试验号	因素				外观性状 评分/分	多糖含 量/%	水分/ %	Y/分
	A/°C	B/min	C/(次/min)	空列				
1	1	1	1	1	34.87	3.05	16.45	62.67
2	1	2	2	2	40.00	2.97	14.08	66.64
3	1	3	3	3	39.96	2.91	13.50	63.36
4	2	1	2	3	41.19	3.03	10.40	79.50
5	2	2	3	1	49.54	3.08	9.58	93.13
6	2	3	1	2	43.96	2.93	8.14	79.42
7	3	1	3	2	41.67	2.81	8.66	67.32
8	3	2	1	3	45.36	2.73	7.12	68.20
9	3	3	2	1	40.24	2.67	6.34	60.24
K ₁	192.67	209.49	210.30	216.03				
K ₂	252.04	227.97	206.37	213.39				
K ₃	195.76	203.01	223.81	211.06				
R	19.79	8.32	5.81	1.66				

表5 金樱子盐炙工艺正交试验方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F*	P
A	744.900	2	179.935	0.006
B	111.764	2	26.997	0.033
C	55.765	2	13.470	0.069
误差	4.140	2		

a: $F_{0.05}(2, 2) = 19.0$

梯度洗脱(0~48 min, 4% A→9% A; 48~70 min, 9% A→13% A; 70~110 min, 13% A→21% A);流速为1.0 mL/min;检测波长为280 nm;进样量为10 μL;柱温为30 °C。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 精密称定没食子酸、儿茶素、鞣花酸对照品适量,置于同一25 mL量瓶中,加甲

醇稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度分别为没食子酸 120 μg/mL、儿茶素 160 μg/mL、鞣花酸 160 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液的制备 精密称取金樱子或盐金樱子粉末(过50目筛)0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加80%甲醇25 mL,称定质量,超声(150 W, 40 kHz)提取30 min;放冷,再次称定质量,用80%甲醇补足质量,摇匀,滤过,取续滤液过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.2.5 方法学考察 对方法的精密度、重复性、稳定性考察如下。

(1)精密度试验:取金樱子样品(编号S1),按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件连续进样6次。以没食子酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果各峰相对保留时间与相对峰面积RSD均小于3%,表明仪器精密度良好。

(2)重复性试验:取金樱子样品(编号S1),共6份,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定。以没食子酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果各峰相对保留时间与相对峰面积RSD均小于3%,表明方法的重复性良好。

(3)稳定性试验:取金樱子样品(编号S1),按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24 h时按“2.2.2”项下色谱条件进样测定。以没食子酸为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。结果各峰相对保留时间与相对峰面积RSD均小于3%,表明金樱子供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.6 指纹图谱的建立、相似度评价及色谱峰指认 分别取10批金樱子和盐金樱子,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件依次进样测定,记录色谱图。将色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》中,分别以S1、Y1样品图谱为参照图谱,选择中位数法,时间窗宽度为0.1 min,多点校正后,以Mark峰进行峰匹配,生成对照图谱并计算相似度。结果共标定10个共有峰(见图2、图3),其中金樱子生品相似度为0.980、0.972、0.986、0.983、0.986、0.988、0.996、0.991、0.988、0.995,盐炙品相似度为0.990、0.988、0.997、0.994、0.987、0.980、0.986、0.991、0.997、0.979,表明各批次之间差异较小、质量较稳定。盐炙品与生品相比,5、6、10号峰峰面积升高而8号峰峰面积下降;与混合对照品图谱(图4)比较,确定1号峰为没食子酸、3号峰为儿茶素、8号峰为鞣花酸。

2.2.7 色度值的测定 取金樱子与盐金樱子粉末约2.0 g,以D65光源白色板作为背景校正色差仪后,对粉末色度值(L^* 、 a^* 、 b^*)进行采集,平行3次,取平均值,记录结果见表6。样品总色度值(E^*)的计算公式为 $E^* = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ 。 $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$,其中 ΔL^* 、 Δa^* 、 Δb^* 表示盐炙前后相应色度值的变化, ΔE^* 表示样品炮制前后的颜色变化;当 $\Delta E^* > 3.5$ 时,其色差可被肉眼识别^[12]。根据

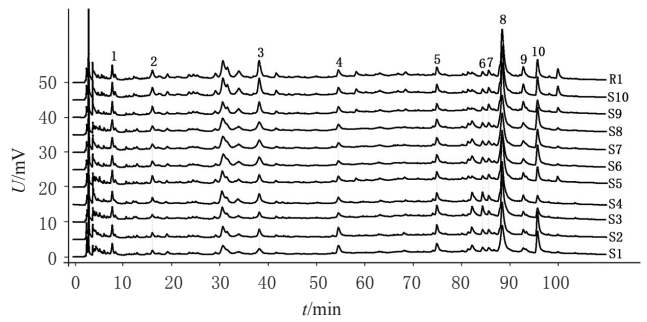


图2 金樱子HPLC指纹图谱

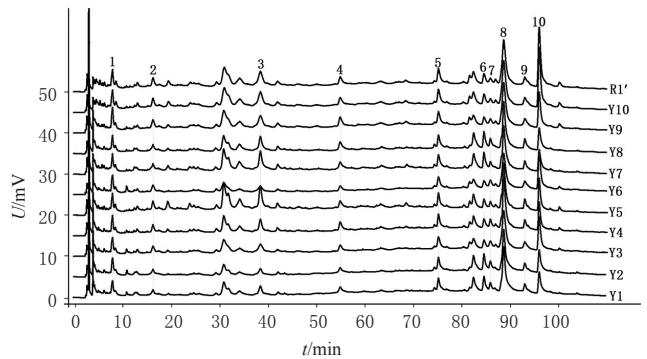
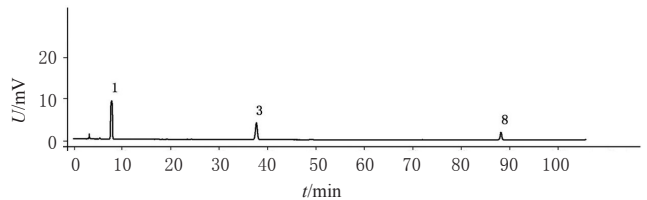


图3 盐金樱子HPLC指纹图谱



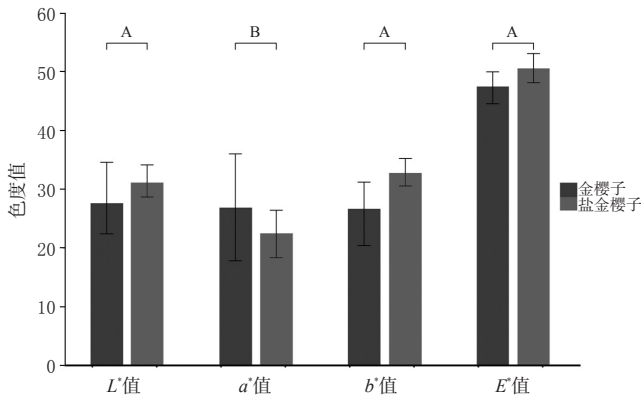
1:没食子酸;3:儿茶素;8:鞣花酸

图4 混合对照品溶液HPLC图

测定结果可知,金樱子盐炙前后的 ΔE^* 值在4.06~18.59之间,即通过肉眼可以区分判断同批次药材的生品与盐炙品。利用R语言的ggsignif与ggplot2数据包,将金樱子生品与盐炙品的色度值绘制成柱状图,同时作 t 检验,结果见图5。 t 检验结果表明金樱子盐炙前后的色度值 L^* 、 b^* 、 E^* 有显著性差异。因此,在金樱子盐炙过程中观察色度值 L^* 与色度值 b^* 的变化对于区分生品与盐炙品有一定意义。

表6 金樱子与盐金樱子色度值测定结果

编号	生品				盐炙品				ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*	
	L^*	a^*	b^*	E^*	编号	L^*	a^*	b^*					E^*
S1	29.46	17.83	28.25	44.54	Y1	34.14	20.43	31.76	50.91	4.68	2.60	3.51	6.40
S2	27.69	26.40	29.45	48.28	Y2	31.47	21.42	32.63	50.14	3.78	-4.98	3.18	7.01
S3	28.92	22.33	29.11	46.72	Y3	30.05	23.34	32.88	50.29	1.13	1.01	3.77	4.06
S4	32.76	20.18	31.20	49.54	Y4	28.67	25.84	32.48	50.44	-4.09	5.66	1.28	7.10
S5	34.57	19.71	28.46	48.92	Y5	31.42	18.35	33.95	49.76	-3.15	-1.36	5.49	6.47
S6	24.21	31.43	20.42	44.62	Y6	32.15	23.25	35.10	52.97	7.94	-8.18	14.68	18.59
S7	22.41	36.01	23.12	48.31	Y7	30.54	22.34	31.96	49.53	8.13	-13.67	8.84	18.20
S8	25.20	29.78	23.78	45.69	Y8	31.88	23.66	35.23	53.08	6.68	-6.12	11.45	14.60
S9	25.36	32.00	25.40	48.09	Y9	31.42	19.87	30.55	48.12	6.06	-12.13	5.15	14.50
S10	25.64	32.96	27.44	49.97	Y10	29.39	26.42	30.96	50.20	3.75	-6.54	3.52	8.32



A: 与生品比较, $P < 0.05$; B: 与生品比较, $P > 0.05$

图5 金樱子与盐金樱子色度值差异分析柱状图

2.2.8 多元统计分析 采用CA、PCA、OPLS-DA对大批金樱子和盐金樱子的测定结果进行分析。

(1)CA:以金樱子和盐金樱子共有峰的相对峰面积为变量,导入SPSS 26.0统计软件进行系统CA。将数据标准化后采用瓦尔德法,以欧氏距离作为距离公式计算,结果见图6。当欧氏距离为20时,金樱子样品分为2类,即生品与盐炙品各聚为一类。

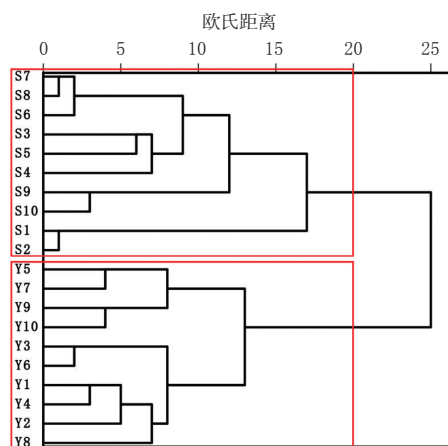


图6 金樱子与盐金樱子CA树状图

(2)PCA:利用R语言软件中princomp函数,以金樱子、盐金樱子共有峰峰面积与色度值为变量进行无监督模式的PCA,分析结果见表7。利用R语言中的ggplot2数据包包制作二维散点图,结果见图7。根据分析结果,选择标准差大于1的前5个主成分(PC1~PC5),可反映金樱子与盐金樱子的指纹图谱和色度值87.00%的信息。其中PC1的方差贡献率为33.54%,色度值 b^* (0.410)、5号峰(0.358)与总色度值 E^* (0.355)的载荷较大;PC2的方差贡献率为23.57%,2号峰(0.480)与9号峰(0.494)的载荷较大;PC3的方差贡献率为12.57%,5号峰(0.422)和10号峰(0.497)有较大载荷;PC4的方差贡献率为9.02%,3号峰(0.499)和4号峰(0.578)有较大载荷;PC5的方差贡献率为8.30%,6号峰(-0.380)与7号峰(-0.396)有较大载荷。由图7可知,金樱子与盐金樱子沿PC1轴各自聚为一类,说明金樱子盐炙后发生了多种化学成分

的变化,从而影响其质量,且色度值对区分金樱子生品与盐炙品有一定影响。

表7 金樱子与盐金樱子的PCA载荷

指标	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
1号峰	0.321	0.174	0.316	0	0.318
2号峰	0	0.480	-0.175	0.240	0.132
3号峰	0	0.331	0	0.499	-0.260
4号峰	0.136	-0.113	-0.137	0.578	-0.366
5号峰	0.358	0	0.422	0	0
6号峰	0.338	-0.107	0	0	-0.380
7号峰	0.289	0	-0.233	-0.401	-0.396
8号峰	0	0.361	-0.409	0	0.333
9号峰	0.100	0.494	0	-0.170	0
10号峰	0.246	0.147	0.497	0	0.141
色度值 L^*	0.320	-0.234	-0.287	0	0.340
色度值 a^*	-0.254	0.345	0.114	-0.256	-0.340
色度值 b^*	0.410	0.126	-0.161	0	0
总色度值 E^*	0.355	0.115	-0.274	-0.286	0
标准差	2.167	1.816	1.327	1.124	1.078
方差贡献率/%	33.54	23.57	12.57	9.02	8.30
累计方差贡献率/%	33.54	57.11	69.68	78.70	87.00

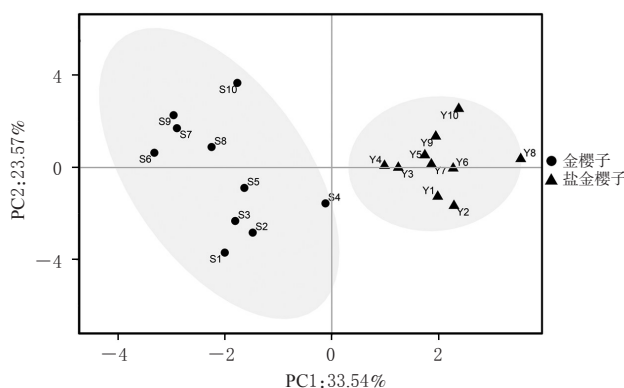


图7 金樱子与盐金樱子PCA得分图

(3)OPLS-DA:利用R语言中的ropls数据包对金樱子、盐金樱子的共有峰峰面积和色度值进行有监督模式的OPLS-DA,结果见图8A。模型中累积解释能力参数(R^2Y)为0.931,表明拟合度好,预测能力参数(Q^2Y)为0.864,说明预测能力较好^[12],可用于区别金樱子与盐金樱子。同时以各样本在投影平面内以及正交投影面的距离作图,结果见图8B。由图8B可知,没有样品超过观测距离,说明样品间无较大差异的个例。对建立的模型进行随机置换检验,结果见图8C,可知实际模型的 Q^2Y 值与验证模型的 Q^2Y 值(图上散点)均小于真实值(图上横线),表明所构建的OPLS-DA模型未出现过拟合。提取OPLS-DA模型中变量重要性投影(variable importance in the projection, VIP),结果见表8。筛选VIP值 > 1 的成分作为区分金樱子生品、盐炙品的重要因素,分别为5号峰(VIP值为1.537)、1号峰(VIP值为1.445)、色度值 b^* (VIP值为1.376)、总色度值 E^* (VIP值为1.251)、10号峰(VIP值为1.195)、6号峰(VIP值为1.161),这些因素可显著影响金樱子生品和盐炙品的分类。

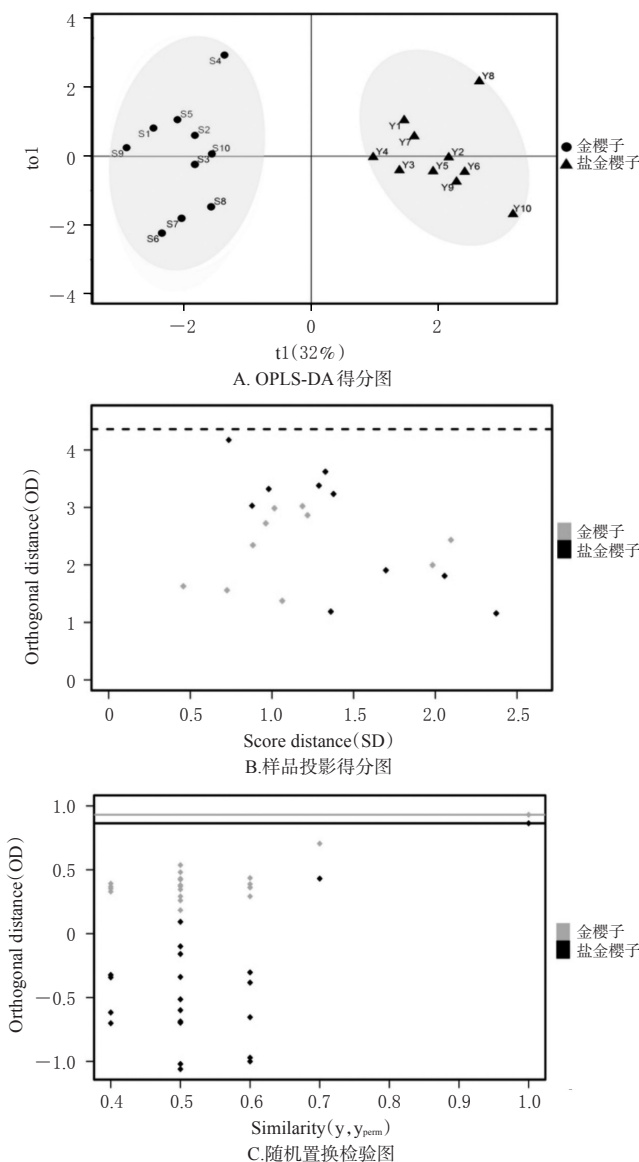


图8 金樱子与盐金樱子的OPLS-DA图

表8 金樱子与盐金樱子在OPLS-DA模型中的VIP值

ID	VIP值	ID	VIP值
5号峰	1.537	色度值 L^*	0.955
1号峰	1.445	色度值 a^*	0.724
色度值 b^*	1.376	9号峰	0.584
总色度值 E^*	1.251	3号峰	0.491
10号峰	1.195	2号峰	0.454
6号峰	1.161	4号峰	0.284
7号峰	0.981	8号峰	0.209

3 讨论

盐金樱子未被收载于《中国药典》，各地方对盐金樱子工艺与质量标准也没有具体规定，不能有效控制盐金樱子质量。金樱子的炮制工艺多以多糖、总黄酮、总皂苷、总酚酸、水溶性浸出物为质量考察指标^[13-14]，而没有考察炮制过程中外观性状的变化。本研究基于“辨状论质”理论，以外观评分与色度值结合的方法对盐金樱子进行性状评价，同时测定水分及多糖含量，采用综合评分法优选了金樱子盐炙工艺。

外观观察结果显示，色度值 L^* 的变化(ΔL^*)多数为正值、少数为负值，与金樱子盐炙后光泽度增加相一致；色度值 b^* 的变化(Δb^*)都为正值，说明金樱子盐炙后颜色变成以深棕色为主，与传统经验认为的炒后颜色加深相符合。盐炙品指纹图谱中8号峰(鞣花酸)峰面积较生品减小，5、6、10号峰峰面积较生品增大，提示这些色谱峰可能为鉴别金樱子与盐金樱子的质量标志性成分。经CA、PCA和OPLS-DA发现，金樱子与盐金樱子可各自聚为一类。根据OPLS-DA结果，筛选VIP值大于1的6个特征因素作为鉴别金樱子生品与盐炙品的指标。

综上，本研究优化了金樱子的盐炙工艺，建立了金樱子盐炙前后的HPLC指纹图谱，并测定了金樱子生品与盐炙品色度值，通过多元统计分析，发现1、5、6、10号峰及色度值 b^* 、 E^* 为区别金樱子生品及盐炙品的重要指标，可为金樱子盐炙前后的鉴别及质量分析提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:232.
- [2] 陈倩,李娜,张雨林,等.金樱子的研究进展[J].中医药导报,2018,24(19):106-110.
- [3] 李凯,周宁,张振凌.“入盐走肾”理论的现代研究[J].中草药,2017,48(24):5281-5285.
- [4] 李佳园,魏晓嘉,万国慧,等.“辨状论质”的历史沿革与现代研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(6):189-196.
- [5] 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.
- [6] 裴科,宁燕,蔡皓,等.基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别的川芎炮制前后对比研究[J].中草药,2021,52(5):1274-1283.
- [7] 王可可,易丽昕,姜明燕.星点设计效应面法优化盐酸文拉法辛油包水乳剂处方[J].医药导报,2015,34(5):644-648.
- [8] 闫梦真,王瑞生,王金森,等.星点设计-响应面法优选菝葜叶干燥方法和炮制工艺[J].中草药,2021,52(7):1957-1964.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:114-115.
- [10] 崔治家,刘峰林,张启立,等.不同产地枸杞子中枸杞多糖含量的比较分析[J].华西药学杂志,2020,35(1):59-61.
- [11] 蓝松.苯酚-硫酸法测定黄精多糖含量研究[J].广东化工,2013,40(18):132-133.
- [12] 洪婉敏,陈丹燕,纪玉华,等.北苍术麸炒前后指纹图谱与色度值的差异研究[J/OL].中药材,2021(2):329-334 [2021-09-23]. <https://doi.org/10.13863/j.issn1001-4454.2021.02.013>.
- [13] 江迎春,邓翀,李景丽.Box-Behnken响应面法优选蜜制金樱子炮制工艺[J].中南药学,2015,13(9):938-942.
- [14] 张凌,黄媛媛,曹兰兰,等.正交实验优选金樱子盐制品最佳炮制工艺条件[J].时珍国医国药,2012,23(1):186-187.

(收稿日期:2021-10-08 修回日期:2022-01-24)

(编辑:曾海蓉)