

焦栀子炒制过程中 HPLC 图谱变化与外观颜色的动态关联研究

张雪¹, 李晓庆^{1,2}, 王云¹, 李玲云^{1,2}, 戴业佳^{1,3}, 王清浩^{1,2}, 麻印莲¹, 宋 嫻⁴, 张玉莲⁴, 吕婷婷⁴, 张 村^{1,2,3*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450008

3. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230000

4. 上海上药华宇药业有限公司, 上海 200002

摘要: **目的** 分析与焦栀子炒制过程中颜色变化密切相关的化学成分。**方法** 利用色彩分析仪对焦栀子炒制过程中的样品进行色度值测定, 并利用 HPLC 整体图谱分析对焦栀子过程样品中共有成分进行指认和相对峰面积计算, 同时利用多元统计学方法对焦栀子过程样品进行颜色与成分关联与判别分析。**结果** 本实验共筛选出与焦栀子炒制过程中与总色值 (E_{ab}^*) 高度相关的 8 个成分, 即羟异栀子苷、6"-香豆酰京尼平龙胆二糖苷、西红花苷-I、西红花苷-II 及峰 I6、I12、C1、C2, 此 8 种成分含量随焦栀子炒制颜色加深呈下降趋势。且实验结果显示焦栀子炒制过程中鸡屎藤次苷甲酯、去乙酰车叶草苷酸甲酯、羟异栀子苷、西红花苷-II、西红花苷-I 及峰 C1、C2、C4、C6、C7 为含量变化较显著的 10 个成分。**结论** 羟异栀子苷、西红花苷-I 和西红花苷-II 是焦栀子炒制过程中与外观颜色变化高度相关且含量变化显著的成分, 可作为焦栀子质量控制的潜在质量标志物。

关键词: 焦栀子; 炒制; HPLC; 质量标志物; 颜色; 色度值; 多元统计分析; 色彩分析仪; 动态关联; 羟异栀子苷; 6"-香豆酰京尼平龙胆二糖苷; 西红花苷-I; 西红花苷-II; 鸡屎藤次苷甲酯; 去乙酰车叶草苷酸甲酯

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)17-4029-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.17.010

Dynamic correlation between constituents detected by HPLC and colors of samples in stir-frying process of *Gardeniae Fructus Praeparatus*

ZHANG Xue¹, LI Xiao-qing^{1,2}, WANG Yun¹, LI Ling-yun^{1,2}, DAI Ye-jia^{2,3}, WANG Qing-hao^{1,2}, MA Yin-lian¹, SONG Yan⁴, ZHANG Yu-lian⁴, LV Ting-ting⁴, ZHANG Cun^{1,2,3}

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

3. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China

4. SPH Huayu Chinese Herbs Co., Ltd., Shanghai 200002, China

Abstract: Objective To find the constituents that is closely related to the color change during the stir-frying process of *Gardeniae Fructus Praeparatus* (Jiaozhizi in Chinese herbal name, JZZ). **Methods** The colorimetric method was used to measure the chromatic value of the samples during the stir-frying process of JZZ. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the common constituents of samples in the processing of JZZ, and the multivariate statistical methods of correlation and discriminant analysis was used to investigate the color and constituents of JZZ. **Results** The E_{ab}^* of eight constituents in processed JZZ samples showed a highly linear positive correlation, they were gardoside, crocin-I, crocin-II, *p*-coumaroylgenipin gentiobioside, I6, I12, C1 and C2. The contents of these eight components decreased with the increase of color in the stir-frying process. Ten key components of JZZ samples, scandoside methyl ester, deacetyl asperulosidic acid methyl ester, gardoside, crocin II, crocin I, peaks C1, C2, C4, C6, and C7,

收稿日期: 2018-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81473356, 81873010, 81173553); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2014ZX09304307001); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-SH-38); 中国中医科学院自主选题 (ZXKT16001, ZZ2014053)

作者简介: 张雪 (1992—), 博士研究生, 研究方向为中药炮制学。Tel: (010)64087690 E-mail: 15600162107@163.com

*通信作者 张村 (1969—), 研究员, 博士生导师, 主要从事中药炮制、中药化学研究。Tel: (010)64087690 E-mail: zhc95@163.com

had significant changes in contents. **Conclusion** Gardoside, crocin I and crocin II are the most important components in the stir-frying process of JZZ, which are highly correlated with the change of color and can be used as chemical markers for the quality control of JZZ.

Key words: *Gardeniae Fructus Praeparatus*; stir-frying processing; HPLC; quality marker; color; chromatic value; multivariate statistical methods; color analyzer; dynamic correlation; gardoside; p-coumaroylgenipin gentiobioside; crocin-I; crocin-II; scandoside methyl ester; deacetyl asperulosidic acid methyl ester

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 性味苦寒, 多用于治疗热病心烦、火毒疮疡等症。临床上为减弱栀子的苦寒之性, 常使用栀子的炮制加工品, 如姜栀子、炒栀子、焦栀子与栀子炭。其中焦栀子具有凉血止血的功效, 常用于治疗血热吐血、衄血、尿血等症^[1]。焦栀子在生产过程中, 通常以颜色的变化作为焦栀子炮制终点判断的依据, 如《中国药典》2015 年版规定焦栀子炒至表面焦黑色, 而江西、河南等地方炮制规范中焦栀子的炮制终点为炒至焦黄色、焦褐色等^[2]。目前不同厂家之间焦栀子饮片质量差异较大, 其原因除与药材质量本身相关外, 还与焦栀子炮制终点的颜色缺少量化标准紧密相关。

近年来, 色彩分析仪广泛应用于饮片的外观描述, 其优势在于可将饮片的传统外观辨别经验转化为标准化数据, 如利用色彩分析仪考察槟榔、藕节、栀子、山楂炮制过程中火候对颜色的影响^[3-5], 鉴别不同炮制程度的制何首乌粉末的颜色等^[6]; 或结合饮片内在成分含量变化, 分析饮片外观与成分含量的相关性, 如研究发现鸡冠花成分中木犀草素、槲皮素、山柰酚与色值中的 a^* 呈显著正相关^[7], 黄连粉末 a^* 值与小檗碱呈极显著正相关且黄连粉末色度与总生物碱显著相关等^[8]。

而在栀子炮制过程中, 不仅颜色发生变化, 同时伴随着化学成分组成与含量的变化。已有研究表明京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、西红花苷-I (藏红花素)、多糖等成分含量随炮制程度加深而降低, 而鞣质、西红花酸 (藏红花酸) 含量随炮制程度加深而增加^[9-12]。本实验室前期利用色彩分析与可见-紫外分光光度法, 仅发现焦栀子炒制过程饮片的外观颜色与色素总量与总环烯醚萜类成分呈正相关关系, 虽然为后续的研究提供了一定的研究线索, 但未能明确到具体的化学成分。本实验在前期工作的基础上, 将 HPLC 指纹图谱的整体分析与栀子炒制过程的外观颜色变化相结合, 以多元统计学方法对焦栀子的外观颜色变化与内在成分含量变化进行关联性研究, 揭示焦栀子颜色变化密切相关的化

学成分, 为焦栀子饮片生产工艺标准的制定提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

CGY900B 滚筒式燃气炒药机, 江阴市香山中药机械有限公司; VA400 色彩分析仪, 含 CMOS 镜头、颜色校准板与 Alpha soft 14.3 数据分析软件, 法国 ALPHA M.O.S 公司; ST20 红外测温仪, 美国 RAYTEK 公司; LC-20A 高效液相色谱仪, DAD 检测器, 日本岛津公司; KQ-300B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; XS105DU 分析天平, 梅特勒-托利多公司; FA2204B 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 药材与试剂

栀子 *Gardeniae Fructus*, 购自河北安国市, 产地为江西丰城, 经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定为茜草科栀子属植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实。焦栀子 *Gardeniae Fructus Praeparatus*, 栀子的炮制品, 炮制方法以《中国药典》2015 年版为依据, 由河北百草康神药业有限公司依法进行中试生产。

西红花苷-I (批号 15111212, 质量分数 99.11%), 购自成都曼斯特生物科技有限公司; 山栀子苷、栀子苷酸、去乙酰车叶草苷酸甲酯、羟异栀子苷、鸡屎藤次苷甲酯、京尼平-1-*O*- β -龙胆二糖苷、栀子苷、6"-香豆酰京尼平龙胆二糖苷、西红花苷-II、绿原酸对照品为本实验室自制, 经 HPLC 面积归一化法测定质量分数达 98% 以上。色谱分析用甲醇、乙腈为色谱纯, 甲酸为分析纯, 实验用水为纯净水, 使用前均经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过; 提取分离用甲醇等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 焦栀子中试样品制备

将炒药机加热至 168 $^{\circ}\text{C}$ 时, 投入净制后的生栀子 10 kg, 炒至栀子饮片表面呈焦褐色, 内部种子团棕褐色时, 取出, 每隔 1 min 取样 1 次。焦栀子炒制时间约 14 min, 样品编号为 JZZ1~JZZ14, 第 14

分钟样品经饮片厂老药工鉴别为合格焦栀子样品，且炒制终点样品符合《中国药典》2015 年版下各项规定。其中焦栀子 0 min 样品标记为 JZZ0（即生栀子）。

2.2 焦栀子炒制过程 HPLC 图谱动态变化规律

2.2.1 供试品溶液的制备 取焦栀子 0 min 饮片粉末（40 目筛）0.5 g 于锥形瓶中，精密称定，精密加入 50%甲醇溶液 25 mL，称定质量后，超声提取 30 min，待样品冷却至室温，以 50%甲醇溶液补足减失的质量，滤过，取上清液，过 0.45 μm 有机微孔滤膜，供 HPLC 检测。

2.2.2 对照品溶液的制备 取山栀子苷、栀子苷酸、去乙酰车叶草苷酸甲酯、羟异栀子苷、鸡屎藤次苷甲酯、绿原酸、京尼平-1-*O*-β-龙胆二糖苷、栀子苷、6"-香豆酰京尼平龙胆二糖苷适量，50%甲醇溶解，配成混合对照品溶液，分别取西红花苷-I 与西红花苷-II 50%甲醇制备成相应的对照品溶液，供 HPLC 图谱化学成分指认研究用。

2.2.3 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈（2）100A 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；检测波长 254、440 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 10 μL；流动相为乙腈-0.5%甲酸水溶液，梯度洗脱：0~10 min，6%乙腈；10~18 min，6%~12%乙腈；18~25 min，12%~17%乙腈；25~35 min，17%~20%乙腈；35~45 min，20%~27%乙腈；45~65 min，27%~32%乙腈；65~70 min，32%~36%乙腈；70~72 min，36%~55%乙腈；72~77 min，55%~100%乙腈。在此色谱条件下，254 nm 下检出 14 个共有色谱峰（I1~I14），440 nm 下检出 7 个共有色谱峰（C1~C7），可反映焦栀子炒制过程不同样品的 HPLC 特征图谱的变化情况。

2.2.4 精密度考察 取同一焦栀子（JZZ0）0 min 供试品溶液，重复进样 6 次，依法检测，结果（表 1）显示各色谱峰峰面积 RSD 值均小于 3%，表明该方法精密度良好。

2.2.5 重复性考察 取焦栀子（JZZ0）0 min 供试

表 1 方法学考察

Table 1 Method validation by separated program

峰号	<i>t_R</i> /min	RSD/%			峰号	<i>t_R</i> /min	RSD/%			峰号	<i>t_R</i> /min	RSD/%		
		精密度	重复性	稳定性			精密度	重复性	稳定性			精密度	重复性	稳定性
I1 ^a	9.069	0.82	1.58	0.94	I8 ^a	25.791	0.91	2.62	0.81	C1 ^b	43.546	1.87	1.88	1.40
I2 ^a	10.585	2.04	0.64	1.69	I9 ^a	28.371	0.16	1.49	0.11	C2 ^b	45.543	0.33	2.16	2.62
I3 ^a	12.194	1.18	2.82	2.02	I10 ^a	30.661	0.79	1.84	0.28	C3 ^b	48.069	0.32	1.96	0.29
I4 ^a	14.664	0.73	2.02	0.62	I11 ^a	31.100	1.24	2.59	0.92	C4 ^b	48.981	2.68	2.89	1.18
I5 ^a	18.605	0.41	2.39	0.63	I12 ^a	37.797	2.13	1.56	2.24	C5 ^b	51.777	0.30	2.40	0.28
I6 ^a	21.576	0.38	2.12	0.84	I13 ^a	46.541	0.91	2.38	0.24	C6 ^b	66.483	0.79	1.95	0.64
I7 ^a	25.273	0.11	2.80	0.12	I14 ^a	49.223	0.76	2.50	1.51	C7 ^b	71.479	0.31	2.08	0.72

a-254 nm 下检测 b-440 nm 下检测，表 2 同

a-peaks recorded at 254 nm b-peaks recorded at 440 nm, same as table 2

品粉末 6 份，分别按“2.2.1”项下方法制备成供试品溶液，依法进样分析，结果（表 1）各色谱峰峰面积的 RSD 值均小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性考察 取同一焦栀子（JZZ0）0 min 供试品溶液，分别于进样后 0、2、4、8、12、16、24 h 进样，依法检测，结果（表 1）共有峰峰面积 RSD 值均小于 3%，表明共有峰成分在 24 h 内稳定性较好。

以上结果均显示，该色谱分析方法稳定可靠，可用于栀子饮片的鉴别分析。

2.2.7 对照图谱 由于焦栀子炒制过程中成分呈动态变化，为找到能表征焦栀子整个炮制过程的动态

变化成分，本实验利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对焦栀子炒制过程样品进行共有峰识别，并生成对照图谱。同时利用相对峰面积定量法，以对照图谱各共有峰峰面积为基准，观测共有峰成分在焦栀子炒制过程样品中的动态变化。本实验共在 254 nm 下识别出 14 个共有峰，440 nm 下识别出 7 个共有峰。

2.2.8 色谱峰指认 基于前期实验室栀子的化学成分分离基础^[13]，利用实验室自制对照品，在 254 nm 与 440 nm 下共指认出 11 个成分。其中 254 nm 下，峰 I1 为山栀子苷，峰 I2 为栀子苷酸，峰 I3 为去乙酰车叶草苷酸甲酯，峰 I4 为羟异栀子苷，峰 I5 为

鸡屎藤次苷甲酯, 峰 I7 为京尼平龙胆二糖苷, 峰 I8 为绿原酸, 峰 I9 为栀子苷, 峰 I14 为 6"-香豆酰京

尼平龙胆二糖苷; 440 nm 下峰 C3 为西红花苷-I, 峰 C5 为西红花苷-II (图 1)。

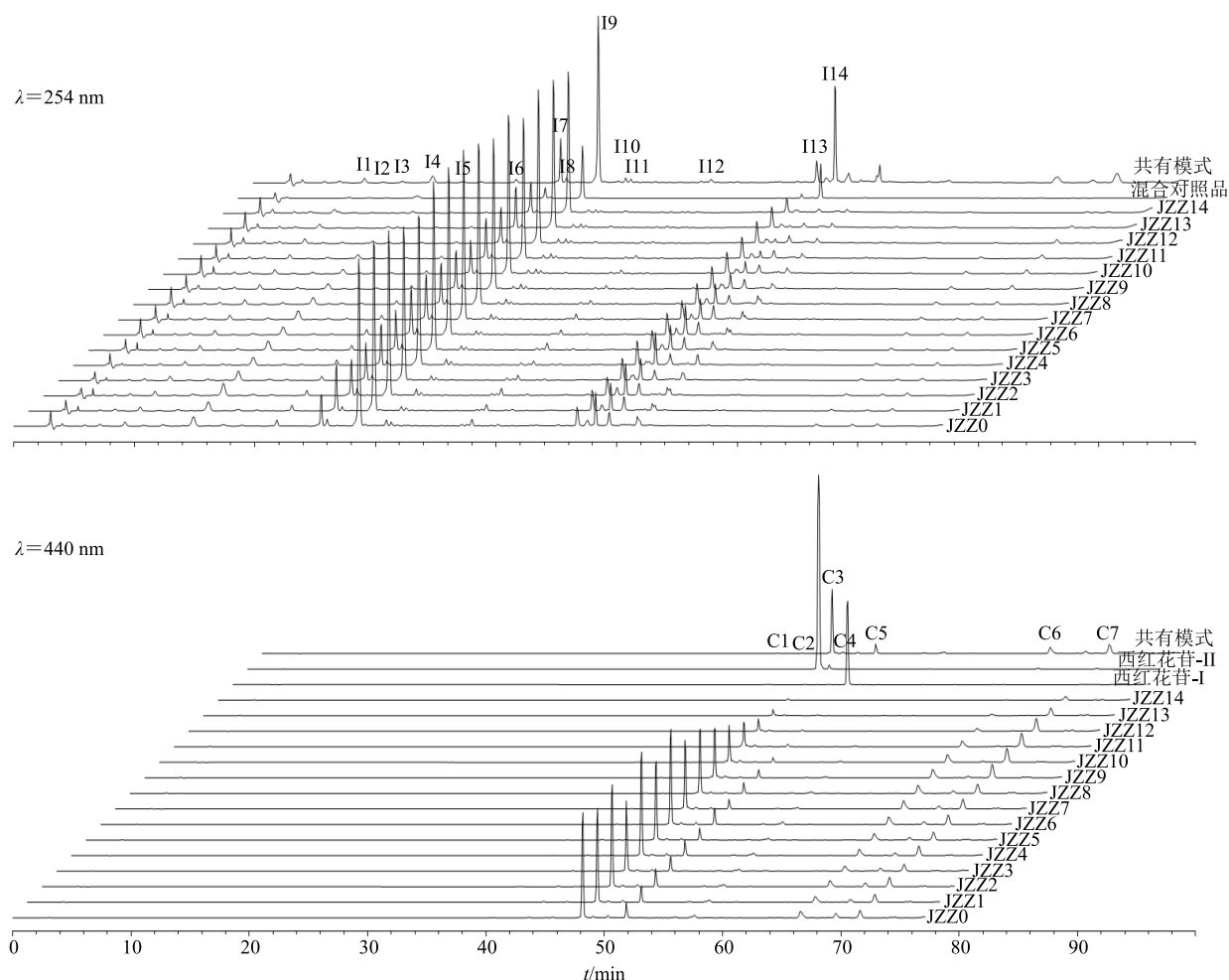


图 1 焦栀子炒制过程中图谱的变化

Fig. 1 Chromatograms change in stir-frying process of JZZ samples

2.2.9 不同炒制样品相对峰面积 根据建立的 HPLC 图谱分析方法, 依法对焦栀子不同炒制样品进样分析, 根据各样品峰面积测定结果, 以“2.2.7”项下生成对照图谱的峰面积为基准值, 进行相对峰面积计算, 计算结果见表 2。

2.2.10 焦栀子炒制过程中图谱动态变化分析 以生栀子 (JZZ0) 图谱作为对照, 利用相似度评价软件, 计算焦栀子炒制过程样品与 0 min 样品的图谱相似性, 计算结果见表 3。相似度结果显示, 254 nm 下图谱变化较小, 而 440 nm 下图谱变化较为明显, 炒制 7 min 后与初始样品图谱发生明显改变, 至炮制终点时相似度仅为 0.332。根据相似度评价结果, 选取 0 min 样品与 440 nm 下相似度变化较大的时间点 7、11、14 min 样品相对峰面积, 观察炒制过程中共有成分的变化规律 (图 2)。从图 2 可以看出,

焦栀子炮制过程中大多数成分相对峰面积呈下降趋势, 其中 440 nm 下各成分与峰 I4、I6、I11、I12、I14 下降较明显; 少数成分呈现先上升后下降的变化趋势, 如峰 I5、I7 与 C4 相对峰面积在炮制 1~7 min 呈上升趋势, 7~14 min 呈下降趋势, 峰 I13 与 C7 相对峰面积在炮制 1~11 min 呈上升趋势, 其中 11 min 时 C7 相对峰面积较初始相对峰面积增加了近 1.7 倍, 但至炮制终点时其相对峰面积下降至初始相对峰面积的 1/2。

通过焦栀子炒制过程各时间图谱发现, 440 nm 下 t_R 为 50.1、69.4 min 与 254 nm 下 t_R 为 36.5 min 的成分随炮制程度的加深, 其成分结构被破坏, 至炮制终点时已无法检出。且通过观察图谱发现, JZZ8 样品 254 nm 下 t_R 为 30.12 min 的成分为焦栀子炒制过程中产生的新成分, 且一直存在于该炮制

表 2 焦栀子炒制样品中共有峰相对峰面积
Table 2 Relative peak areas of processed samples of JZZ

峰号	t _R /min	对照图谱 峰面积	相对峰面积														
			JZZ0	JZZ1	JZZ2	JZZ3	JZZ4	JZZ5	JZZ6	JZZ7	JZZ8	JZZ9	JZZ10	JZZ11	JZZ12	JZZ13	JZZ14
I1 ^a	9.069	240 780	0.890	0.863	0.994	0.972	0.865	1.070	1.006	1.044	1.048	1.008	0.942	0.883	1.074	1.021	0.955
I2 ^a	10.585	56 792	1.212	0.950	1.002	1.081	0.890	0.933	1.060	0.869	1.331	1.095	0.998	0.882	1.298	1.099	0.772
I3 ^a	12.194	72 006	1.088	0.978	0.922	1.105	1.042	1.076	0.801	1.078	1.243	1.238	1.278	0.958	0.929	0.621	0.538
I4 ^a	14.664	365 109	1.731	1.674	2.163	1.757	1.508	1.755	1.479	1.691	1.144	0.856	0.698	0.666	0.343	0.321	0.103
I5 ^a	18.605	62 163	0.944	0.888	0.982	0.957	0.866	1.018	0.806	1.207	1.357	1.426	1.401	1.192	1.270	0.937	0.777
I6 ^a	21.576	134 089	1.564	1.478	1.406	1.048	1.337	1.237	1.396	1.121	1.021	0.979	0.900	0.725	0.551	0.437	0.283
I7 ^a	25.273	1 266 565	0.808	1.152	0.860	1.007	1.088	1.058	1.140	1.066	1.035	0.993	0.918	0.993	0.925	1.042	0.770
I8 ^a	25.791	145 210	1.506	0.921	1.578	1.182	1.052	1.402	1.310	0.964	1.024	1.076	0.872	0.976	0.926	0.847	0.649
I9 ^a	28.371	5 271 516	1.105	1.146	1.068	0.997	1.003	1.090	1.100	1.096	1.083	0.958	1.053	0.896	0.990	0.937	0.882
I10 ^a	30.661	123 405	1.368	0.979	1.415	0.969	1.255	0.922	0.845	1.127	1.202	1.098	1.031	1.080	0.954	0.850	0.598
I11 ^a	31.100	88 997	1.386	1.120	1.082	0.960	1.385	1.072	1.204	1.131	0.914	1.008	1.066	0.992	0.905	0.948	0.419
I12 ^a	37.797	134 934	1.626	1.502	1.795	1.199	0.985	1.708	1.267	1.430	1.072	0.948	1.015	0.774	0.495	0.493	0.254
I13 ^a	46.541	707 722	0.897	0.995	0.898	1.039	1.087	0.949	1.087	0.974	0.995	1.039	1.005	1.047	1.010	0.975	0.649
I14 ^a	49.223	375 860	1.371	1.341	1.196	1.126	1.402	1.197	1.196	1.279	0.898	1.052	0.948	0.870	0.802	0.501	0.376
C1 ^b	43.546	38 381	1.532	2.185	1.987	1.394	1.801	1.850	1.758	1.272	0.960	1.040	0.736	0.617	0.296	0.131	0.048
C2 ^b	45.543	29 993	1.883	1.956	1.437	1.600	2.113	1.601	2.190	1.158	1.106	0.894	0.722	0.462	0.227	0.126	0.032
C3 ^b	48.069	4 525 146	1.659	1.556	1.733	1.248	1.772	1.352	1.606	1.126	1.126	0.874	0.672	0.430	0.222	0.111	0.028
C4 ^b	48.981	141 377	0.890	1.021	1.007	0.865	0.993	1.210	1.326	1.309	0.961	1.224	1.231	1.149	0.859	0.460	0.174
C5 ^b	51.777	720 534	1.643	1.693	2.078	1.543	1.771	1.418	1.797	1.142	1.308	0.858	0.545	0.354	0.178	0.091	0.017
C6 ^b	66.483	987 222	1.084	0.962	0.947	0.831	1.047	1.073	1.274	1.307	1.375	1.449	1.300	0.953	0.482	0.255	0.056
C7 ^b	71.479	1 290 967	0.707	0.823	0.953	0.726	1.014	0.835	0.991	1.027	1.009	1.484	1.526	1.491	1.395	0.859	0.460

表 3 焦栀子过程样品与 0 min 样品相似度
Table 3 Similarity analysis between processed samples and 0 min samples of JZZ

样品	相似度		样品	相似度	
	254 nm	440 nm		254 nm	440 nm
JZZ0	1.000	1.000	JZZ8	0.997	0.985
JZZ1	0.998	1.000	JZZ9	0.996	0.932
JZZ2	0.999	0.999	JZZ10	0.997	0.882
JZZ3	0.997	0.999	JZZ11	0.993	0.782
JZZ4	0.996	0.999	JZZ12	0.994	0.597
JZZ5	0.998	0.998	JZZ13	0.991	0.531
JZZ6	0.997	0.998	JZZ14	0.992	0.332
JZZ7	0.998	0.985			

时间点之后的样品中。以上结果表明，焦栀子炒制过程中其内在化学成分呈现动态变化。

2.3 颜色测定

2.3.1 色彩分析仪 色彩分析仪是基于国际照明委

员会（CIE）于 1976 年提出 CIELAB 均匀色空间系统理论，用于客观描述样品颜色空间数值的分析仪器。该色彩系统中 L^* 代表明度指数， a^* （红-绿轴）、 b^* （黄-蓝轴）代表色品指数，样品颜色可用总色值（ E_{ab}^* ）表达，公式为 $E_{ab}^* = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ 。明度差 $\Delta L^* = L_m^* - L_{t0}^*$ 与色差 $\Delta E_{ab}^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ （ $\Delta a^* = a_m^* - a_{t0}^*$ ， $\Delta b^* = b_m^* - b_{t0}^*$ ， t_n 为炒制时间点）用于表达样品的颜色变化，当 ΔL^* 为负值代表样品颜色明度低、颜色深，为正值则相反； ΔE_{ab}^* 值越大，代表与对照样品色值相差越大，其值为 6~12 个色差单位（NBS）时，其色差可被人眼识别。

2.3.2 样品色值测定 测定样品之前，利用标准比色板对 IRIS 视觉分析仪进行校正，校正后将各样品粉末（过 40 目筛）分别压制于载玻片上，压制厚度约为 1 mm，重复拍照 3 次。利用 Alpha soft14.3 软件对所有样品得到的色号进行聚类分析，聚类分析共筛选出 3 个色号 1 603、2 147、2 656，此 3 种色号所占比例大于 90%（图 3），根据样品色号的比例

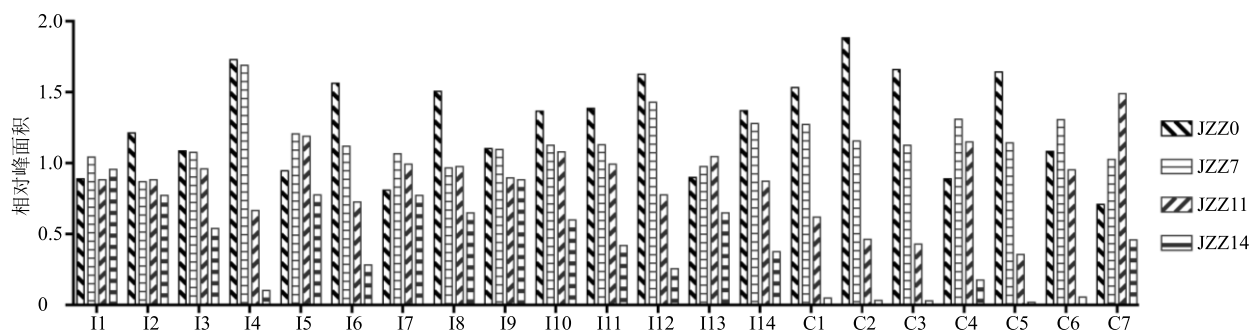


图2 焦栀子炒制过程相对峰面积变化

Fig. 2 Changes of relative peak areas of JZZ samples in stir-frying process

与对应的 L^* 、 a^* 、 b^* 值计算样品 E_{ab}^* 值, 结果见表 4。从图 3 可以看出, 焦栀子炒制 1~8 min, 其颜色主要由 2 656 色号与 2 147 色号贡献, 其中 2 656 色号的比例随炒制时间的延长降低, 当焦栀子炒制至第 10 分钟, 2 656 色号贡献率不足 1%, 颜色主要由 2 147 色号贡献, 而 10 min 过后, 焦栀子粉末中 1 603 色号贡献率逐渐提升, 至炒制终点 14 min 时, 1 603 色号贡献率近 100%。

表 4 结果显示, 焦栀子炒制过程中, E_{ab}^* 值随炒制程度加深逐渐下降, 而其中变化较明显为 L^* 与 b^* 值。炒制终点相对炒制初始的 ΔL^* 值与 Δa^* 、 Δb^* 最低, 为负值, 表明样品颜色亮度由明至暗, 颜色由红黄偏向蓝绿转变。且炒制过程中焦栀子样品的色差值逐渐增大, 10~12 min 色差值 20, 表明此过程中样品颜色的变化可被肉眼显著识别, 而炒制终点较初始样品 ΔE_{ab}^* 进一步增大, 且色差值较 12 min 样

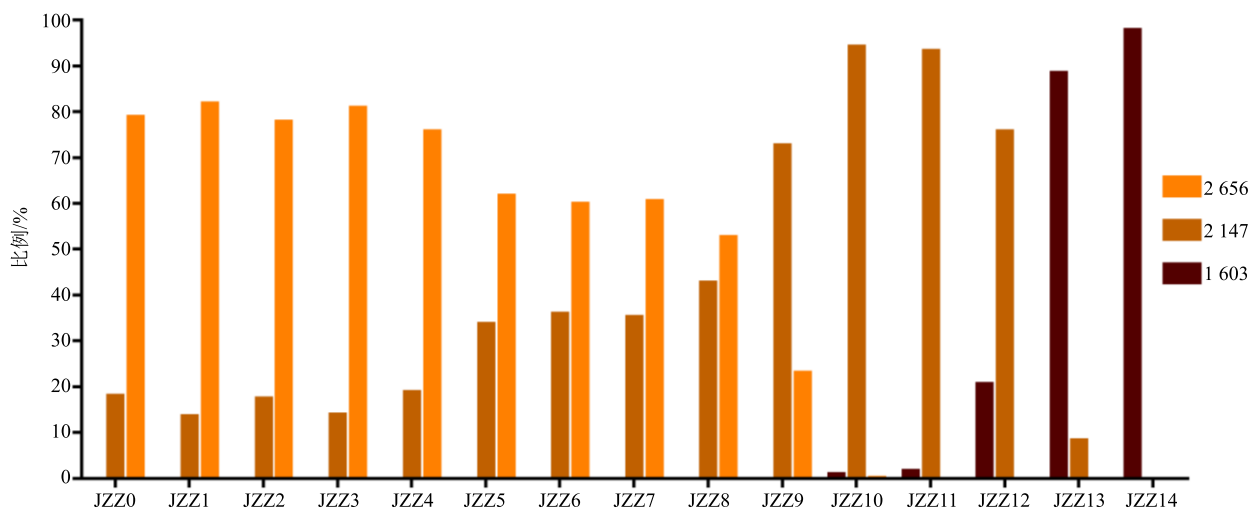


图3 焦栀子炒制过程中主要色号比例

Fig. 3 Ratio of main color of JZZ samples in stir-frying process

表4 焦栀子炒制过程中色度值变化

Table 4 Chromatic values of JZZ processed samples[illegible]

品升高约为 7 个 NBS, 表明炒制终点的颜色较炒制过程中样品可被显著识别。

2.4 焦栀子颜色与成分动态关联分析

2.4.1 成分与色值之间相关性分析 将 254 nm 与 440 nm 下共有峰校正后的相对峰面积与焦栀子炒制过程中的相关色值参数 E_{ab}^* 、 L^* 、 a^* 、 b^* 数据, 依次输入至 SPSS 22.0 软件进行皮尔逊 (Pearson) 相关性分析, 结果显示与焦栀子总色值 E_{ab}^* 呈高度线性正相关的为焦栀子中 I4、I6、I12、I14、C1、C2、C3、C5, 显著正相关的成分为 I8、I9、I11、C4、C6, 呈一般正相关的成分为 I3、I7、I10。其中与明度 L^* 变化呈高度线性正相关的成分为 I4、I6、I12、I14、C1、C2、C3、C4、C5、C6, 显著正相关的成

分为 I3、I9、I11, 一般正相关的成分为 I8、I10、I13 (表 5)。

2.4.2 焦栀子炒制过程中化学成分与颜色动态关联分析 为进一步对焦栀子炒制样品进行判别分析, 得到与颜色变化相关的显著成分变量, 首先将焦栀子炒制过程中各个时间点样品的颜色参数输入至 SIMCA-P13.0 进行聚类分析 (图 4), 根据聚类分析的分组结果, 对焦栀子炒制过程中样品的成分进行偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA), 从而得到 VIP 值大于 1 的重要成分变量。

聚类分析将焦栀子炒制过程中的样品分成了 3 类, 其中炒制时间 1~8 min 归为第 1 类, 9~12 min 归为第 2 类, 13~14 min 归为第 3 类。利用此归类

表 5 色值与成分相关性分析

Table 5 Pearson correlation analysis between chromatic values and compounds

峰号	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*	峰号	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*
I1	-0.079	-0.098	-0.108	-0.112	I12	0.803***	0.696***	0.864**	0.863***
I2	0.118	-0.137	0.023	0.029	I13	0.623*	0.076	0.476	0.495
I3	0.731**	0.059	0.542*	0.568*	I14	0.915***	0.668***	0.934**	0.939***
I4	0.812***	0.859***	0.943***	0.935***	C1	0.814***	0.819***	0.927***	0.921***
I5	0.217	-0.544	-0.086	-0.052	C2	0.784***	0.816***	0.907***	0.899***
I6	0.874***	0.752**	0.940***	0.939***	C3	0.829***	0.836***	0.947***	0.939***
I7	0.509	0.435	0.547*	0.543*	C4	0.844***	0.131	0.646*	0.674**
I8	0.644*	0.538*	0.685**	0.684**	C5	0.801***	0.874***	0.943***	0.933***
I9	0.696**	0.600*	0.745**	0.744**	C6	0.822***	0.208	0.666**	0.687**
I10	0.657*	0.296	0.596*	0.607*	C7	0.271	-0.629*	-0.083	-0.040
I11	0.723**	0.407	0.691**	0.698**					

* $P < 0.05$ 相关; ** $P < 0.01$ 显著性相关; *** $P < 0.001$ 极显著性相关

* $P < 0.05$ relevant; ** $P < 0.01$ significantly relevant; *** $P < 0.001$ highly significantly relevant

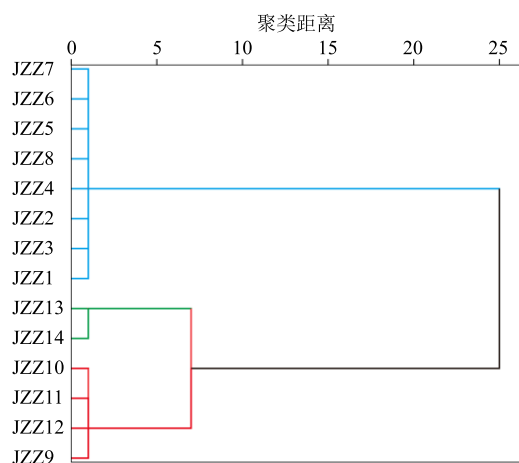


图 4 焦栀子炒制过程样品颜色聚类分析

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis of chromatic values of JZZ processed samples

结果, 对焦栀子炒制过程样品的共有成分建立 PLS-DA 模型。模型参数累积贡献率 (R^2) 为 0.727, 与预测优度系数 (Q^2) 为 0.69, 均大于 0.5, 表明该模型为优质模型, 可以用于变量的预测。通过此模型预测的焦栀子炒制过程中成分的重要变量值 (VIP 值, 图 5), 得到 10 个 VIP > 1 的成分变量, 分别为峰 C7 (1.705 2)、鸡屎藤次苷甲酯 (1.345 2)、峰 C4 (1.169 8)、去乙酰车叶草苷酸甲酯 (1.131 3)、西红花苷-II (1.106 5)、羟异栀子苷 (1.099 1)、西红花苷-I (1.063 8)、峰 C2 (1.041 7)、峰 C1 (1.008 9) 与峰 C6 (1.006)。此 10 种成分为焦栀子炒制过程中与颜色相关, 动态变化较明显的成分。

2.5 小结

本实验共筛选出与焦栀子炒制过程中总色值高

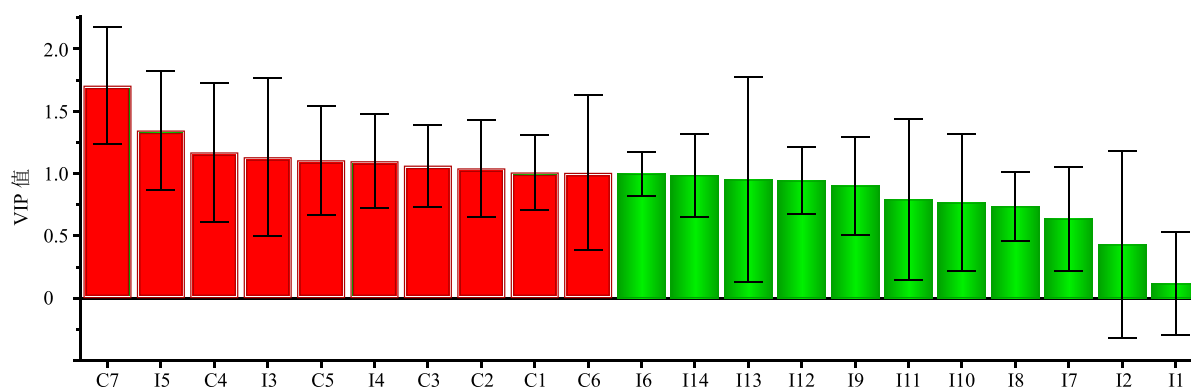


图 5 焦栀子炒制过程中成分 VIP 值 (PLS-DA)

Fig. 5 VIP (Variable importance for projection) plot of JZZ processed samples of *Gardeniae Fructus Praeparatus* (PLS-DA)

度相关的 8 个成分, 即羟异栀子苷、6"-香豆酰京尼平龙胆二糖苷、西红花苷-I、西红花苷-II 及峰 I6、I12、C1、C2, 此 8 种成分含量随焦栀子外观颜色加深而降低, 其中羟异栀子苷、西红花苷-I、西红花苷-II 及峰 C1、C2 是焦栀子炒制过程中相对峰面积变化较明显的成分。综上, 羟异栀子苷、西红花苷-I、西红花苷-II 及峰 C1、C2 是焦栀子炒制过程中与颜色变化高度正相关且含量变化较显著的 5 个成分。而峰 C1、C2 在焦栀子中含量较少, 较难进行定量研究, 建议将羟异栀子苷、西红花苷-I 与西红花苷-II 作为焦栀子饮片质量控制标准的候选标志物。

3 讨论

3.1 实验数据处理方法的选择

传统的中药鉴别方法中有眼看、鼻闻、口尝、手捻等, 而在炮制饮片过程中, 多由饮片的外观颜色变化判断炮制是否得当, 此过程受人为主观影响, 普适性不高。1976 年由 CIE 组织提出的 LAB 色度空间理论, 可以准确对颜色进行描述, 使样品颜色具有量化值, 广泛应用于彩色印刷中。近年来, 该理论被引入中药领域, 用于对传统中药鉴别中颜色相关的经验量化, 从而为中药饮片的质量标准提供参考。

本实验基于 CIELAB 色彩空间理论, 利用色彩分析仪对焦栀子炒制过程中颜色变化进行量化。通过对过程样品各色度值的主成分分析, 拟合出 2 个主成分, 在此基础上建立聚类分析, 聚类分析结果成功将样品分成了 3 类。而在焦栀子炒制过程中, 焦栀子颜色随着炒制程度的加深, 逐渐从初始的橙红色过渡至棕黄色, 最后至炮制终点的焦黑色, 与聚类分析的结果相吻合, 说明聚类分析可以准确地

区别不同炒制过程的焦栀子样品。

利用聚类分析的结果, 对焦栀子炒制过程样品中共有化学成分进行 PLS-DA 分析, 从而筛选出焦栀子炮制过程中含量变化明显的成分。在 PLS-DA 模型中, 模型的好坏通常由 R^2 与 Q^2 共同评价, 当二者均大于 0.5 时, 该模型被认为是好模型, 本实验中 R^2 与 Q^2 均大于 0.5, 表明该模型可以解释焦栀子炮制过程中成分含量的变化, SIMCA-P13.0 模型说明中, VIP 值用于解释 X 与 Y 值之间相关的重要性, VIP 大于 1 被认为是重要变量, 低于 0.5 被认为是不重要变量, 而 0.5~1.0 被认为是灰色地带, 其值的意义取决于数据集的大小。本实验通过主成分分析、聚类分析、PLS-DA 分析 3 种多元数据分析方法, 共筛选出 10 个焦栀子炮制过程中重要成分变量, 即鸡屎藤次苷甲酯、去乙酰车叶草苷酸甲酯、羟异栀子苷、西红花苷-II、西红花苷-I、峰 C1、C2、C4、C6、C7。

文献表明环烯醚萜类成分与色素类成分分别在 238、440 nm 下有较强吸收, 但 238 nm 下基线不稳, 而 254 nm 下基线较平稳, 且检出峰数目与 238 nm 下一致, 故本实验选择 254、440 nm 作为检测波长。

3.2 成分与颜色相关性分析

在 Pearson 相关性分析中, 与焦栀子炒制过程中总色值呈高度线性正相关的变量为羟异栀子苷、6"-香豆酰京尼平龙胆二糖苷、西红花苷-I、西红花苷-II 及峰 I6、I12、C1、C2, 此 8 种成分含量随焦栀子外观颜色加深而降低。其中西红花苷-I 与西红花苷-II 是类胡萝卜素类成分, 其结构骨架中的共轭二重键是构成其颜色的基础, 此类成分多不稳定。化学动力学研究发现, 在 60 °C 条件下, 西红花苷-I

的降解速率常数较大,且半衰期仅为76 h,在80℃条件下,降解速度进一步加快,在单一成分模拟炮制过程中,西红花苷-I在160℃时,降解速度急剧加快,且部分转化其苷元西红花酸,至180℃时,含量极低,高于200℃时,西红花苷-I与西红花苷-II几乎检测不到^[14-16]。而本实验近炒制终点时,物料温度高达180℃以上,虽持续时间较短,但西红花苷-I与西红花苷-II相对含量较初始含量显著降低,结合440 nm下图谱发现色素类成分整体含量在炮制终点下降均较明显,这可能与共轭二重键在高于180℃受到破坏有关。而色素类成分除C7外,均与栀子炒制过程中颜色变化高度正相关,故推断此类成分含量的降低是其外观颜色发生显著变化的主要原因。

且本实验室前期研究发现,栀子炒制过程中其鞣质含量与吸附率随炒制程度的加深而升高,这可能为焦栀子炒制后止血作用增强的原因之一^[9]。西红花苷类成分在焦栀子炒制过程中含量呈下降趋势,同时还伴随着成分组成的变化,此与炮制后栀子饮片的药性改变密切相关。通过市场调研发现,各企业生产的焦栀子外观颜色与炒制程度存在一定的差异,而焦栀子目前仅将栀子苷含量作为质量标准不足以反映其质量内涵。本实验通过化学计量学结合色彩分析仪发现色素类成分与焦栀子炒制过程中颜色高度相关,且为焦栀子炒制过程中含量变化较明显的成分,建议在完善焦栀子质量标准中,可将此类成分纳入其质量评价体系,为构建栀子不同饮片专属的质量评价标准提供依据,也为焦栀子炮制工艺技术标准制定奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
[2] 于江泳, 张村. 全国中药饮片炮制规范辑要 (2016年版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.

- [3] 黄学思, 李文敏, 张小琳, 等. 基于色彩色差计和电子鼻的槟榔炒制火候判别及其指标量化研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1786-1791.
[4] 刘粤疆, 张继良, 吴纯洁, 等. 中药藕节现代炮制过程数据量化控制研究 [J]. 中国医药导报, 2009, 6(36): 9-11.
[5] 殷放宙, 吴晓燕, 李林, 等. 炮制火候对饮片颜色的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2252-2256.
[6] 张语凡, 相乐康, 王鑫, 等. 结合传统性状客观化分析何首乌不同炮制方式与炮制程度的色彩色差 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20): 1-7.
[7] 郭爽, 李庆, 何婉婉, 等. 鸡冠花有效成分与药材粉末颜色的相关性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 64-69.
[8] 吉光见稚代, 瞿显友, 罗维早, 等. 基于色度对中药材品质评价研究 (I). 黄连粉末色度与化学成分含量之间的相关性 [J]. 中药材, 2014, 37(5): 785-789.
[9] 姚蓝, 孟江, 张村, 等. 炒制对栀子饮片中鞣质含量及吸附性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 45-48.
[10] 姚蓝, 张村, 刘慧, 等. 栀子炒炭前后3个环烯醚萜苷类成分的比较研究 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(4): 279-282.
[11] 盛萍, 王新铃, 王青, 等. 栀子炒炭前后多糖含量分析 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 392-393.
[12] 陈红, 肖永庆. 炒制对栀子中藏红花素含量的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(6): 222-223.
[13] 刘慧. 基于“黄芩清肺汤”的黄芩栀子饮片炮制配伍物质基础研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
[14] 姚蓝. 基于栀子炒炭存性的物质基础内涵研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
[15] 付小梅, 吴志瑰, 裴建国, 等. 栀子药材中西红花苷-I的化学稳定性研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 525-527.
[16] 黄弦, 罗光明, 罗扬婧, 等. 焦栀子的炮制工艺优化及西红花苷类成分含量变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 10-13.