

基于色度-化学成分关联的蜜糠炒白芍质量控制研究

郑郁清¹, 郭静英¹, 康爱圆¹, 张涛¹, 商杰¹, 白婷婷¹, 杨明^{1,2}, 谌瑞林^{1,3}, 何浪³, 张金莲^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学药学院现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 江西江中中药饮片有限公司, 江西 九江 332300

摘要: 目的 建立 30 批白芍和蜜糠炒白芍的指纹图谱, 研究白芍经蜜糠炒制后颜色的变化与内在成分的关联性, 并构建相关的人工神经网络 (artificial neural network, ANN) 模型。方法 利用色差仪对白芍及蜜糠炒白芍色度进行测定, 通过 HPLC 建立白芍及蜜糠炒白芍的 HPLC 指纹图谱, 结合多元统计学方法对白芍及蜜糠炒白芍样品色度值与共有成分进行关联分析。以色度和相关成分建立 ANN 模型。结果 白芍经蜜糠炒制后, 饮片粉末的 L^* 、 a^* 、 b^* 值呈上升趋势; 相关分析结果表明没食子酸 (峰 1)、芍药苷 (峰 6)、没食子酰芍药苷 (峰 7)、五没食子酰葡萄糖 (峰 8)、苯甲酸 (峰 9)、苯甲酰芍药苷 (峰 10) 与色度值存在显著相关; 当隐含层神经元个数为 8 时, ANN 模型的均方根误差最低 (RMSE=0.124 0), R^2 最高 ($R^2=0.983 5$), 模型整体拟合程度最好。因此选择 4 个输入层、8 个隐含层和 6 个输出层组成 ANN 模型为最佳拓扑结构。

结论 色度与成分结合能更加全面科学地评价蜜糠炒白芍整体质量, 可将色度指标纳入蜜糠炒白芍饮片质量评价体系中, 为蜜糠炒白芍饮片在线质量控制提供参考。

关键词: 白芍; 蜜糠炒白芍; 色度; 化学成分; 人工神经网络; 相关性; 质量控制; 指纹图谱; HPLC; 没食子酸; 芍药苷; 没食子酰芍药苷; 五没食子酰葡萄糖; 苯甲酸; 苯甲酰芍药苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0534-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.020

Quality control of honey bran-fried *Paeoniae Radix Alba* based on color-chemical composition association

ZHENG Yu-qing¹, GUO Jing-ying¹, KANG Ai-yuan¹, ZHANG Tao¹, SHANG Jie¹, BAI Ting-ting¹, YANG Ming^{1,2}, CHEN Rui-lin^{1,3}, HE Lang³, ZHANG Jin-lian¹

1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine College of Pharmacy, Nanchang 330004, China

3. Jiangxi Jiangzhong Traditional Chinese Medicine Pieces Co., Ltd., Jiujiang 332300, China

Abstract: Objective To establish the fingerprints of 30 batches of Baishao (*Paeoniae Radix Alba*, PRA) and honey bran-fried PRA (hb-fPRA), study the correlation between the color change and the internal components of PRA after being fried with honey bran was studied, and construct the relevant artificial neural network (ANN) model. **Methods** The chroma of PRA and hb-fPRA was determined by colorimeter. The HPLC fingerprints of PRA and hb-fPRA were established by HPLC, and the correlation analysis between the chromaticity value of PRA and hb-fPRA and the common components was analyzed by multivariate statistical method. ANN model was established by chromaticity and correlation components. **Results** After the PRA is fried with honey bran, the L^* , a^* and b^* value of the decoction piece powder showed an upward trend. The correlation analysis results showed that gallic acid (peak 1), paeoniflorin (peak 6), galloylpaeoniflorin (peak 7), pentagalloylglucose (peak 8), benzoic acid (peak 9) and benzoylpaeoniflorin

收稿日期: 2022-06-22

基金项目: 国家重点研发计划专项课题 (2018YFC1707206); 江西省重点研发计划 (20192BBG70073); 国家自然科学基金资助项目 (82060724); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202110412015); 校级创新团队项目 (CXTD22003)

作者简介: 郑郁清 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制。E-mail: 1137105612@qq.com

*通信作者: 张金莲 (1969—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药学及中药炮制学教学研究。

Tel: (0791)87118995 E-mail: jxjzjl@163.com

(peak 10) are significantly correlated with the chromaticity values. When the number of neurons in the implicit layer is eight, the root mean square error of the ANN model is the lowest (RMSE = 0.124 0) and the highest R^2 ($R^2 = 0.983 5$), and the overall fit of the model is the best. Therefore, the ANN model is selected as the best topology for four input layers, eight hidden layers, and six output layers. **Conclusion** The combination of color and ingredients can more comprehensively and scientifically evaluate the overall quality of hb-fPRA, and the color index can be included in the quality evaluation system of hb-fPRA decoction pieces, providing a reference for the online quality control of hb-fPRA.

Key words: *Paeoniae Radix Alba*; honey bran-fried *Paeoniae Radix Alba*; chroma value; chemical constituents; artificial neural networks; correlation; quality control; fingerprinting; HPLC; gallic acid; paeoniflorin; galloylpaeoniflorin; pentagalloylglucose; benzoic acid; benzoylpaeoniflorin

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 性苦、酸, 味微寒, 具有养血调经、敛阴平肝、柔肝止痛的功效^[1]。蜜糠炒白芍为江西省建昌帮特色炮制品种, 《建昌帮中药炮制全书》记载“生白芍性较寒凉, 酒润蜜糠炒制能降低酸收寒凉之性, 入肝补血”^[2], 其特色在于白芍经酒润, 加蜜糠进行炒制后, 所得到的饮片具有蜜糠香气, 色泽偏黄且光亮^[3]。生白芍性较寒凉, 酒润蜜糠炒制能降低酸收寒凉之性, 入肝补血, 并借酒性活血通经, 冬月产后尤宜, 在功效上较白芍有一定的优势^[2]。

人工神经网络 (artificial neural network, ANN) 是一种基于生物神经网络结构和功能的计算模型^[4], 其具有区分模式和从数据中提取规律的能力, 这使得 ANN 能成功拟合成分复杂的模型^[5]。赵芳等^[6]用 ANN 模型优化丹参川芎嗪注射液水提工艺, 李昱等^[7]用气相电子鼻检测结果建立的 ANN 模型可快速准确判别 3 种五味子饮片, 马磊等^[8]建立的 ANN 模型可用性状指标预测黄芩提取物的体外抑菌率。中药成分的复杂性和中药作用的整体性, 用单一指标成分不能全面整体的评价中药饮片的质量, 因此选用 ANN 模型可以较好将中药饮片中的多个化学成分和外外在指标进行拟合。

中药炮制程度及炮制终点的判断主要以经验为主, 根据饮片的颜色、气味等, 如蜜糠炒白芍炒至淡黄色, 这说明颜色的变化是判断蜜糠炒白芍的关键特征。中药饮片在炮制过程中, 不仅饮片的外在评价指标颜色发生改变, 而且内在的化学成分组成和含量也发生改变^[9-11], 这提示中药饮片在炮制过程中颜色的变化和成分含量之间存在相关性。基于此, 本研究以颜色的亮度 (L^*)、色调 (a^*)、彩度 (b^*) 和总色差值 (E_{ab}^*) 作为输入值, 色度相关峰的峰面积作为输出值建立 ANN 模型, 通过色度值预测炮制后成分的含量, 为蜜糠炒白芍饮片在线质量控制提供参考, 为蜜糠炒白芍进一步科学研究提

供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 药材

白芍药材均来源于江西江中中药饮片有限公司, 经江西中医药大学中药资源教研室刘勇教授鉴定均为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 的干燥根, 经检测均符合《中国药典》2020 年版白芍项下的标准。蜜糠炒白芍按照《建昌帮中药炮制全书》^[2]相应规定炮制, 样品信息见表 1 和图 1。

1.2 试剂

对照品五没食子酰葡萄糖 (批号 wkq19011402, 质量分数 $\geq 98\%$)、芍药苷 (批号 wkq20041008, 质量分数 $\geq 98\%$)、苯甲酰芍药苷 (批号 wkq21050606, 质量分数 $\geq 98\%$)、没食子酸 (批号 wkq18032304,

表 1 白芍和蜜糠炒白芍样品信息

Table 1 Sample information of *Paeoniae Radix Alba* (PRA) and honey bran-fried *Paeoniae Radix Alba* (hb-fPRA)

产地	白芍		蜜糠炒白芍	
	编号	批号	编号	批号
安徽亳州	S1	20211001	M1	2022012301
安徽亳州	S2	20211002	M2	2022012302
安徽亳州	S3	20211003	M3	2022012303
浙江磐安	S4	20211101	M4	2022012304
浙江磐安	S5	20211102	M5	2022012305
浙江磐安	S6	20211103	M6	2022012306
浙江磐安	S7	20211104	M7	2022012307
浙江磐安	S8	20211105	M8	2022012308
浙江磐安	S9	20211106	M9	2022012309
浙江缙云	S10	20211107	M10	2022012310
浙江缙云	S11	20211108	M11	2022012311
浙江缙云	S12	20211109	M12	2022012312
浙江东阳	S13	20211110	M13	2022012313
浙江东阳	S14	20211111	M14	2022012314
浙江东阳	S15	20211112	M15	2022012315



图 1 白芍 (S1) 和蜜糠炒白芍 (M1) 饮片 (I) 和粉末 (II) 样品

Fig. 1 Pieces (I) and powder (II) samples of PRA (S1) and hb-fPRA (M1)

质量分数 $\geq 98\%$)、没食子酰芍药苷 (批号 wkq22013003, 质量分数 $\geq 95\%$), 均购于四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品苯甲酸 (批号 100419-201703, 质量分数为 99.9%), 购于中国食品药品检定研究院。色谱分析用甲醇、乙腈均为色谱纯, 购于美国 ACS 公司, 水为屈臣氏蒸馏水, 其余常规试剂为分析纯。

1.3 仪器

Agilent 1260 Infinity II 型液相色谱系统, 美国安捷伦科技有限公司; OHAUS 型万分之一分析天平, 奥豪斯国际贸易 (上海) 有限公司; TGL-16B 型超速离心机, 上海安亭科学仪器厂; KQ-500E 型超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; NH300 型精密电脑色差仪, 深圳三恩驰科技有限公司; CYJ-900 型电磁炒药机, 杭州金竺机械有限公司。

2 方法与结果

2.1 蜜糠炒白芍

2.1.1 蜜糠的制备 用糠筛筛去杂质, 即得净糠。然后将定量的炼蜜和沸水倒入容器内, 搅拌溶化, 制成蜜水溶液。加热拌有蜜水的糠, 炼至糠表皮光亮, 色泽加深, 微粘手, 握之不成团为度, 取出摊凉, 即得蜜糠^[2]。每 100 千克净糠, 用蜜 20 kg, 沸水 4 kg。

2.1.2 蜜糠炒白芍的制备 取白芍饮片加定量的黄酒, 喷淋拌匀, 待黄酒吸尽后, 取出摊晾 4~6 h。将蜜糠入热锅, 炒至冒烟时, 立即倒入白芍片, 300 °C 炒 2 min 至淡黄色时, 出锅, 筛去糠及灰屑^[3]。

每 100 千克白芍, 用蜜糠 18 kg, 黄酒 10 kg。

2.2 白芍及蜜糠炒白芍样品色度的测定

2.2.1 测定条件 可选光源 D65, 视场选择 8 度视角, 测定孔径 4 mm, 光源 LED 蓝光激发, 仪器误差 $\Delta E_{ab}^* \leq 0.4$ 。对仪器进行黑白板校正以后, 进行样品测定。

2.2.2 精密度考察 取 M10 蜜糠炒白芍 (过三号筛) 样品, 均匀平铺于测试盒底部, 按“2.2.1”项条件测定对粉末连续测定 6 次, 记录 L^* 、 a^* 、 b^* 值, 计算得出 RSD 值分别为 0.05%、0.07%、0.17%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性考察 取 6 份 M10 蜜糠炒白芍 (过三号筛) 样品, 均匀平铺于测试盒底部, 按“2.2.1”项条件测定依次对 6 份样品进行测定, 计算得出 L^* 、 a^* 、 b^* 的 RSD 值分别为 0.88%、1.68%、0.86%, 表明仪器重复性良好。

2.2.4 稳定性考察 取 M10 蜜糠炒白芍 (过三号筛) 样品, 均匀平铺于测试盒底部, 按“2.2.1”项条件测定分别于 0、1、2、3、4、5、6 h 对粉末进行测定, 计算得出 L^* 、 a^* 、 b^* 的 RSD 值分别为 0.64%、0.43%、1.45%, 表明仪器稳定性良好。

2.2.5 样品色度的测定 取白芍生品及蜜糠炒白芍 (过三号筛) 样品, 均匀平铺于测试盒底部, 按“2.2.1”项下测定条件对粉末进行测定, 每个样品重复测定 3 次, 记录样品的颜色 L^* 、 a^* 、 b^* , 并计算 E_{ab}^* [$E_{ab}^* = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$], 色度值见表 2。

L^* 、 a^* 和 b^* 是由国际照明委员会 (CIE) 开发的颜色模型, 其中 L^* 代表明亮度 (0~100 表示颜色由黑到白), a^* 代表色调 (+a 为红、-a 为绿), b^* 代表彩度 (+b 为黄、-b 为蓝)。由表 2 可知, 白芍经过蜜糠炒制后, 大部分饮片粉末的 L^* 值增加, 表明白芍经蜜糠炒制后颜色变亮, 而产地安徽的白芍可能由于本身颜色偏亮, 炒制后 L^* 下降; a^* 值经蜜糠炒制后有所增加, 说明蜜糠炒制后白芍饮片的偏红; 白芍经过蜜糠炒制后, 粉末的 b^* 值均呈上升趋势, 表明白芍蜜糠炒后颜色变黄。以上色度测定的结果和《建昌帮中药炮制全书》对蜜糠炒白芍的描述一致, 说明白芍经蜜糠炒制后饮片色泽偏黄且光亮。

2.2.6 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (partial least square method-discriminant analysis, OPLS-DA) 将白芍和蜜糠炒白芍的各颜色参数导入 SIMCA 14.1 软件, 进行无监督的 PCA 处理, 其模型解释率参数

表2 白芍样品 (S1~S15) 及其炮制品蜜糖炒白芍样品 (M1~M15) 的色度值测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Color measurement results of PRA samples (S1—S15) and its processed products hb-fPRA samples (M1—M15) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

样品	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*	样品	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*
S1	53.372±0.108	11.752±0.011	26.264±0.017	60.634±0.101	M1	51.598±0.124	12.540±0.040	28.830±0.013	60.443±0.132
S2	52.469±0.085	11.926±0.017	26.690±0.012	60.063±0.077	M2	51.776±0.029	12.812±0.014	29.606±0.039	61.003±0.017
S3	52.441±0.113	12.079±0.027	26.526±0.023	59.997±0.113	M3	51.539±0.112	12.644±0.031	29.301±0.031	60.619±0.102
S4	47.609±0.003	12.081±0.017	28.923±0.020	57.001±0.007	M4	51.694±0.067	12.169±0.038	29.210±0.022	60.610±0.062
S5	47.539±0.003	12.040±0.012	28.822±0.012	56.883±0.008	M5	52.670±0.006	11.529±0.013	28.720±0.042	61.089±0.020
S6	47.720±0.006	12.020±0.031	28.402±0.011	56.819±0.011	M6	50.520±0.049	12.205±0.028	29.746±0.038	59.884±0.040
S7	47.792±0.005	11.388±0.018	27.150±0.064	56.138±0.035	M7	48.474±0.012	12.506±0.008	30.179±0.055	58.454±0.031
S8	47.823±0.012	11.577±0.022	27.918±0.013	56.571±0.020	M8	49.664±0.012	12.211±0.011	29.981±0.030	59.283±0.016
S9	47.533±0.006	11.583±0.013	27.712±0.039	56.236±0.011	M9	49.773±0.052	12.516±0.027	29.981±0.087	59.438±0.080
S10	47.530±0.004	11.582±0.010	27.714±0.023	56.226±0.011	M10	48.772±0.025	12.032±0.006	29.309±0.019	58.159±0.027
S11	47.821±0.003	11.569±0.016	27.913±0.024	56.567±0.010	M11	48.315±0.062	12.380±0.011	30.310±0.020	58.364±0.044
S12	47.791±0.005	11.377±0.010	27.148±0.016	56.129±0.008	M12	48.802±0.027	12.351±0.012	30.102±0.045	58.654±0.013
S13	44.276±0.028	13.875±0.031	29.756±0.022	55.121±0.021	M13	44.942±0.059	15.984±0.148	31.648±0.035	57.244±0.041
S14	44.898±0.018	13.900±0.018	30.364±0.015	55.956±0.010	M14	45.639±0.027	15.442±0.039	32.230±0.014	57.967±0.017
S15	44.048±0.103	13.014±0.117	30.186±0.066	55.470±0.087	M15	44.904±0.028	15.777±0.046	31.599±0.019	57.129±0.021

R^2_X (模型中隐变量反映自变量 X 的变异百分比) 为 0.938; 预测能力参数 Q^2 (模型的可预测能力) 为 76.5%。由图 2 可知, 通过色度值可明显将白芍和蜜糖炒白芍区分开, 不同产地的白芍颜色存在一定差异。通过色度值可将不同产地白芍分为 3 类, 浙江东阳为一类, 安徽亳州为一类, 浙江磐安和浙江缙云为一类。

在 PCA 基础上进行有监督的 OPLS-DA, 结果见图 3。结果与 PCA 结果基本一致, 进一步验证了分析结果的可靠性。其模型解释率参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 1.000 和 0.871, 预测能力参数 Q^2 为 84%, 均大于 0.8, 说明该模型稳定可靠^[12], 根据色度值

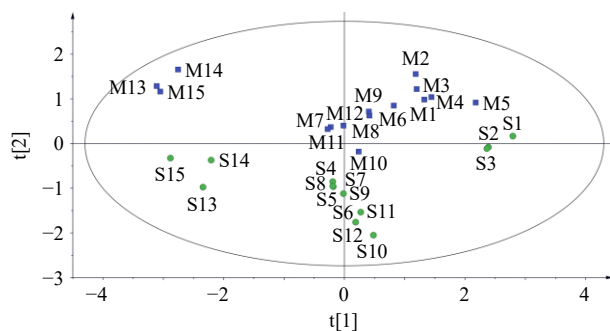


图2 白芍 (S1~S15) 及其炮制品蜜糖炒白芍 (M1~M15) 饮片粉末色度的 PCA 得分图

Fig. 2 PCA score graph of powder color of PRA (S1—S15) and its processed products hb-fPRA (M1—M15)

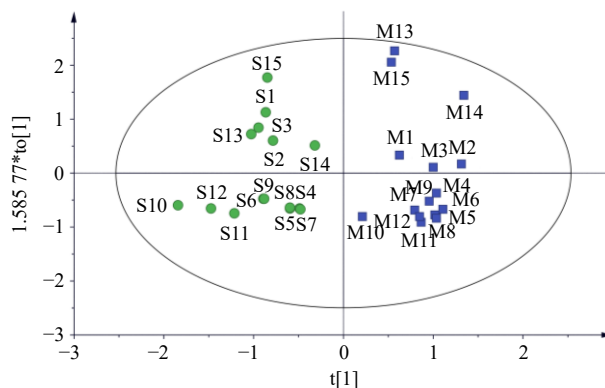


图3 白芍 (S1~S15) 及其炮制品蜜糖炒白芍 (M1~M15) 饮片粉末色度的 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score graph of powder color of PRA (S1—S15) and its processed products hb-fPRA (M1—M15)

能准确将白芍和蜜糖炒白芍区分开。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为菲罗门 Titank C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~12 min, 10%~15%乙腈; 12~48 min, 15%~25%乙腈; 48~58 min, 25%~46%乙腈; 58~61 min, 46%~95%乙腈; 柱温 35 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10.0 μL; 检测波长 240 nm; 理论塔板数以芍药苷峰计不低于 2000。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取白芍生品及蜜

糠炒白芍饮片粉末(过3号筛)0.50 g,加50%乙醇25.0 mL,静置30 min,称定质量,超声(功率500 W、频率40 kHz)提取30 min,用50%乙醇补足减失质量,10 000 r/min离心(离心半径3 cm)10 min,取上清液,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3.3 混合对照品溶液的制备 分别精密称定没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷、五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷对照品,加入甲醇溶解并定容,制成质量浓度分别为64.2、604、18.6、90、23.5、21.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液,备用。

2.3.4 精密度考察 取M1蜜糠炒白芍饮片粉末,按“2.3.2”项方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件重复进样6次,记录指纹图谱,以芍药苷为参比峰,计算图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的RSD为0.02%~0.38%,相对峰面积RSD为0.19%~3.67%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性考察 取M1蜜糠炒白芍饮片粉末6份,按“2.3.2”项方法平行制备供试品溶液6份,按“2.3.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,以芍药苷为参比峰,计算各主要色谱峰相对峰面积和相对保留时间。结果各特征峰相对保留时间的RSD为0.03%~0.59%,相对峰面积RSD为0.72%~4.70%,表明方法重复性良好。

2.3.6 稳定性考察 取M1蜜糠炒白芍饮片粉末,按“2.3.2”项方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件分别于0、2、4、8、12、24 h进行测定,记录色谱图,以芍药苷为参照峰,计算各主要色谱峰相对峰面积和相对保留时间。结果在0~24 h内,各特征峰相对保留时间的RSD为0.02%~0.48%,相对峰面积RSD为0.29%~3.63%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3.7 HPLC指纹图谱的建立及相似度评价 将15批白芍及15批蜜糠炒白芍饮片,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3.1”项色谱条件下检测,各采集15批色谱图。将HPLC采集到的白芍样品色谱图结果依次导入国家药典委员会研制的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》软件进行分析。以S1(或M1)作为参照图谱,采用“中位数法”,时间宽度设定为0.1 min,对各指纹图谱色谱峰多点校正后进行峰匹配,生成对照图谱(R),通过对比筛选确认生白芍有10个共有峰,蜜

糠炒白芍有11个共有峰。得到HPLC叠加特征图谱,结果见图4。

将白芍和蜜糠炒白芍的特征图谱与各自相对应特征图谱进行比较,15批白芍药材(S1~S15)的相似度分别为0.998、0.998、0.999、0.998、0.998、0.999、1.000、0.998、1.000、0.991、0.997、0.989、0.983、0.987、0.981,均在0.981~1.000;15批蜜糠炒白芍药材(M1~M15)的相似度分别为0.995、0.997、0.993、0.999、0.999、0.999、1.000、0.998、0.999、0.999、0.999、1.000、0.987、0.989、0.979,均在0.979~1.000;相似度均良好,表明不同产地、不同批次的白芍药材化学组成成分基本相同,白芍炒制前后的化学成分种类相似,且整体质量较稳定。

2.3.8 共有峰的指认 取“2.3.3”项下混合对照品溶液,按“2.3.1”项色谱条件下检测,经过色谱图比对,指认出6个峰,分别为没食子酸(峰1)、芍药苷(峰6)、没食子酰芍药苷(峰7)、五没食子酰葡萄糖(峰8)、苯甲酸(峰9)、苯甲酰芍药苷(峰10)。由于芍药苷(峰6)的峰面积较大、出峰时间居中、峰形好,故选择芍药苷为参照峰。白芍、蜜糠炒白芍及混合对照品图谱见图5。

2.4 化学计量学分析

2.4.1 PCA 将15批白芍饮片和蜜糠炒白芍饮片的共有峰峰面积数据导入SIMCA 14.1软件进行PCA,其 R^2_X 为0.941, Q^2 为0.795,说明该模型稳定性良好。由图6可知,不同产地的白芍经蜜糠炒制后,其化学成分含量变化不同。浙江磐安和浙江缙云的白芍经蜜糠炒制后能明显和生品区分开。

2.4.2 OPLS-DA 为进一步区分生品和炮制品,也为寻找白芍和蜜糠炒白芍间产生差异的标志物,在PCA基础上进行有监督的OPLS-DA,结果见图7。结果发现白芍和蜜糠炒白芍分别位于Y轴的两侧,说明白芍经过蜜糠炒制后化学成分含量有明显差异。变量重要性投影(variable importance projection, VIP)值是筛选差异性化合物的重要指标, VIP值越高,影响越大。以VIP>1为筛选指标,得出峰9、10、5、11、7是区分白芍和蜜糠炒白芍的关键化合物,结果见图8。

2.5 成分与色度值的相关性分析

运用SPSS 20.0软件,将两者10个共有峰的峰面积和色度值参数进行相关分析,再用Origin Pro 2021软件进行Pearson相关分析并绘制可视化热图,结果见表3和图9。结果表明, L^* 值和峰1、8呈显

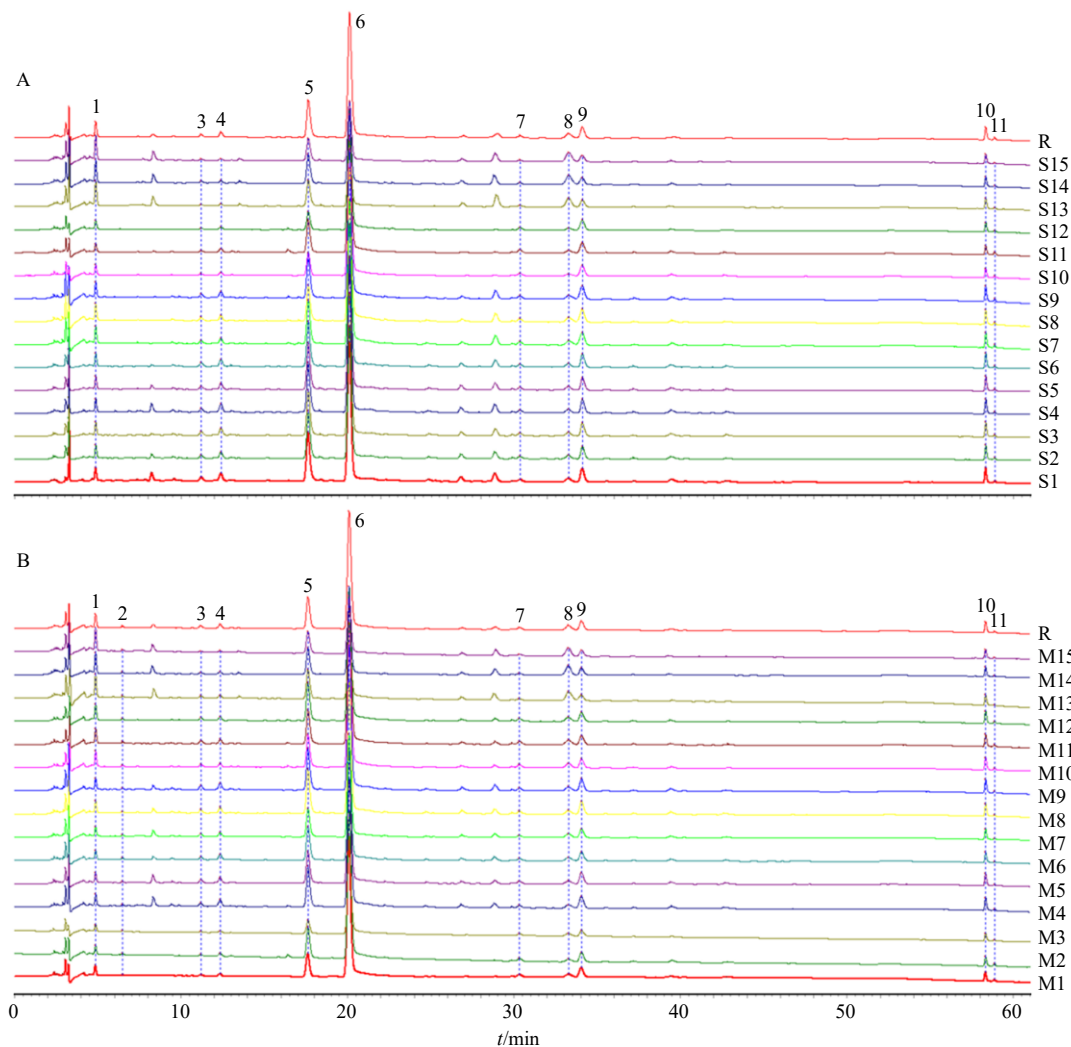


图4 15批白芍样品 (S1~S15, A) 及其炮制品 15批蜜糠炒白芍样品 (M1~M15, B) 的指纹图谱

Fig. 4 Fingerprints of 15 batches of PRA samples (S1—S15, A) and its processed products of 15 batches of hb-fPRA samples (M1—M15, B)

著的正相关, 峰6、7呈负相关; a^* 值和所有的峰都存在极显著的相关, 除了峰1、8呈正相关外, 其他都呈负相关; b^* 值和峰1、8呈正相关, 峰6、7、9、11呈极显著负相关; E_{ab}^* 值和峰6呈正相关, 和峰1、5、8、10呈不同程度负相关。

2.6 ANN模型

2.6.1 ANN模型的构建 本实验主要建立蜜糠炒白芍炮制前后色度值和相关峰峰面积的ANN模型。由于和色度值相关峰的数量较多, 既不利于饮片的在线质量控制, 模型也不容易拟合, 故分别选取和 L^* 、 a^* 、 b^* 、 E_{ab}^* 值相关系数最高的前3位的峰面积作为输出层, 共有峰1、6~10这6个峰, 经对照品确定为没食子酸、芍药苷、没食子酰芍药苷、五没食子酰葡萄糖、苯甲酸、苯甲酰芍药苷。采用MATLAB R2016a建立ANN模型, 模型的输入层为

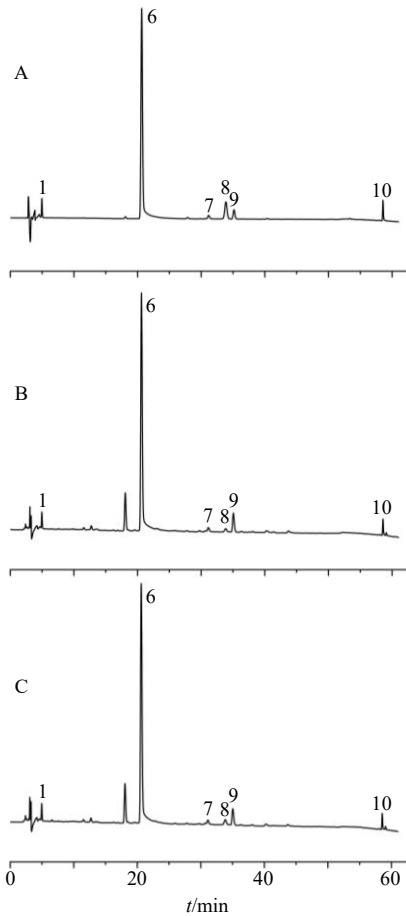
L^* 、 a^* 、 b^* 、 E_{ab}^* 值, 输出层为6个与色度相关性较高的峰的峰面积, 使用列文伯格-马夸尔特(Levenberg-Marquardt)算法对网络进行训练。以公式(1)中的确定系数(R^2)和公式(2)中的均方根误差(root meansquare error, RMSE)来评价模型的性能^[13-14]。 R^2 值越高同时RMSE值越低, 说明ANN模型的性能越好。

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (P_{ANN,i} - P_{exp,i})^2}{\sum_{i=1}^N (\bar{P}_{ANN,i} - P_{exp,i})^2} \quad (1)$$

$$RMSE = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (P_{ANN,i} - P_{exp,i})^2}{N} \right]^{1/2} \quad (2)$$

$P_{exp,i}$ 和 $P_{ANN,i}$ 分别为第*i*次试验的实际测量值和ANN预测值, \bar{P}_{ANN} 为ANN预测值的平均值, N 为试验共进行的组数

2.6.2 数据预处理 为消除不同数据数量级之间的差别, 同时提高运算速度和模型精度, 需要对数据



1-没食子酸 6-芍药苷 7-没食子酰芍药苷 8-五没食子酰葡萄糖 9-苯甲酸 10-苯甲酰芍药苷
1-gallic acid 6-paeoniflorin 7-galloylpaeoniflorin 8-pentagalloylglucose 9-benzoic acid 10-benzoylpaeoniflorin

图5 混合对照品 (A)、白芍样品 (B) 和炮制品蜜糖炒白芍样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of mixed reference substances (A), PRA sample (B) and hb-fPRA sample (C)

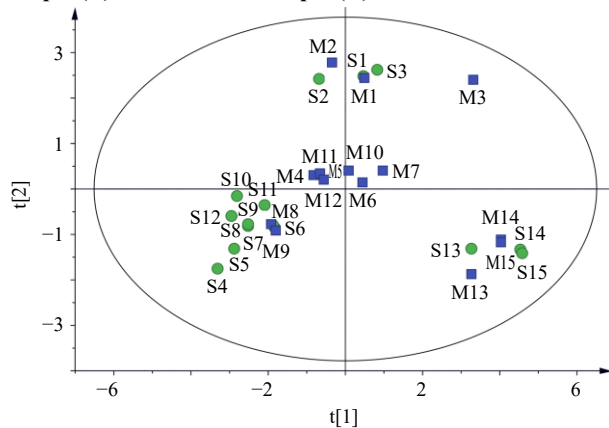


图6 白芍饮片样品 (S1~S15) 及其炮制品蜜糖炒白芍饮片样品 (M1~M15) 峰面积的 PCA 得分图

Fig. 6 PCA score graph of peak area of PRA samples (S1—S15) and its processed products hb-fPRA samples (M1—M15)

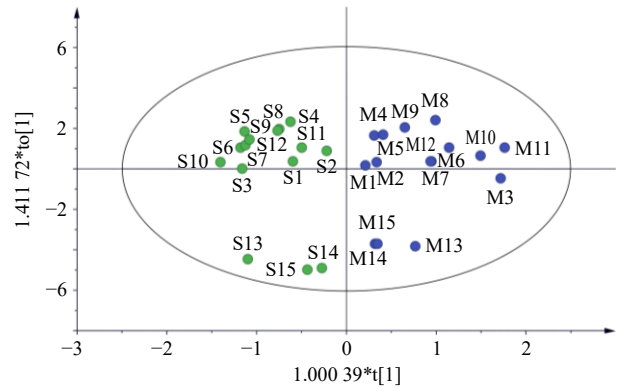


图7 白芍饮片样品 (S1~S15) 及其炮制品蜜糖炒白芍饮片样品 (M1~M15) 峰面积的 OPLS-DA 得分图

Fig. 7 OPLS-DA score graph of peak area of PRA samples (S1—S15) and its processed products hb-fPRA samples (M1—M15)

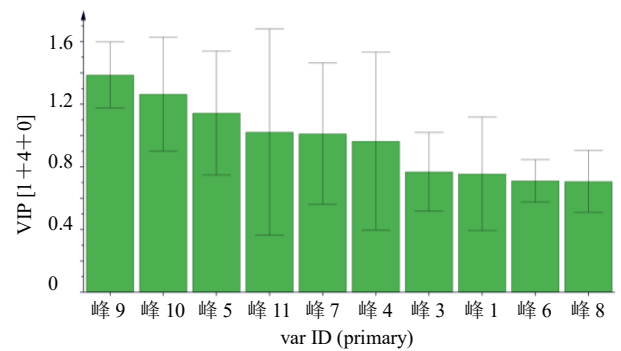


图8 白芍与其炮制品蜜糖炒白芍共有峰 VIP 值

Fig. 8 VIP value of PRA and its processed products hb-fPRA common peak

表3 色度和共有峰峰面积相关性分析

Table 3 Correlation analysis of chromaticity and common peak-peak area

共有峰	L^*		a^*		b^*		E_{ab}^*	
	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P
1	-0.780**	0.000	0.774**	0.000	0.525**	0.003	-0.609**	0.000
3	-0.056	0.770	-0.553**	0.002	-0.127	0.504	-0.234	0.213
4	0.081	0.671	-0.581**	0.001	-0.249	0.184	-0.118	0.535
5	-0.154	0.417	-0.499**	0.005	-0.183	0.332	-0.367*	0.046
6	0.631**	0.000	-0.852**	0.000	-0.641**	0.000	0.366*	0.047
7	0.458*	0.011	-0.786**	0.000	-0.684**	0.000	0.148	0.435
8	-0.858**	0.000	0.844**	0.000	0.693**	0.000	-0.629**	0.000
9	0.306	0.100	-0.786**	0.000	-0.622**	0.000	-0.016	0.933
10	-0.246	0.191	-0.493**	0.006	-0.261	0.164	-0.507**	0.004
11	0.279	0.135	-0.475**	0.008	-0.556**	0.001	0.037	0.844

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

进行归一化处理后进行建模。将输入数据和输出数据进行一般权值的归一化处理,使数据全部在[0, 1]。

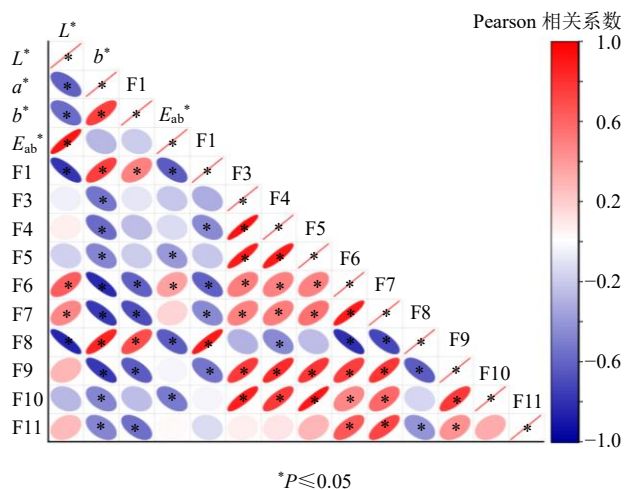


图 9 白芍样品 (S1~S15) 及其炮制品蜜糠炒白芍样品 (M1~M15) 色度值与化学成分的 Person 相关系数热分析
Fig. 9 Heat map of Person correlation coefficient between the chromaticity value of PRA samples (S1—S15) and its processed products hb-fPRA samples (M1—M15) and chemical compositions

2.6.3 隐含层神经元数确定 在设计 ANN 时, 寻找隐含层神经元最佳数量是最重要的, 因为输入和输出的数量是固定的。隐含层神经元的数目取决于所研究模型的难度。一般来说, 隐含层神经元数量多, 需要更多的计算训练时间, 可能会导致模型过拟合, 而隐含层神经元数量少则会导致模型欠拟合。通常情况下, 具有少量神经元的隐藏层是首选的, 因为它可以减少网络的大小, 提高网络的学习能力。根据公式 (3) 计算隐含层神经元个数, 确定隐含层神经元数在 [3, 13], 通过试凑法, 测试了隐藏层中不同神经元的数量, 以选择最优的拓扑结构。

$$L=(m+n)^{1/2}+\alpha \quad (3)$$

L 为隐含层神经元数, m 为输入层节点数, n 为输出层节点数, α 为 [0, 10] 的自然数

根据表 4 比较结果可知, RMSE 先减少再增加, 当神经元数量为 8 时, RMSE 到达最小值 0.124 0。R²_{train} (训练集的 R²) 和 R² (所有数据的 R²) 变化趋势相似, 都先增加再减少, 其中 R² 最大为 0.983 5 时, 神经元为 8。因此, 建立模型时, 结合上述参数, 选用隐含层神经元数为 8 的模型作为最优模型。

2.6.4 色度-成分 ANN 模型 在该模型中, 共进行 30 组试验。随机选取 20 组 (70%) 为模型训练数据, 5 组 (15%) 为模型检验数据, 其余 5 组 (15%) 为模型验证数据。整个网络结构采用 4-8-6 模型, 其中 4 为输入层节点数, 8 为隐含层神经元数, 6 为输出层节点数。该模型在训练、验证和测试过程中的

表 4 试验各隐含层神经元数量的结果

Table 4 Results of experiment on number of neurons in each implicit layer

隐含层数	RMSE	R ²	R ² _{train}	R ² _{test}	R ² _{validation}
3	0.175	0.960	0.957	0.812	0.895
4	0.153	0.976	0.971	0.879	0.866
5	0.145	0.977	0.972	0.900	0.918
6	0.131	0.985	0.978	0.925	0.934
7	0.138	0.977	0.971	0.942	0.912
8	0.124	0.983	0.985	0.889	0.916
9	0.135	0.981	0.976	0.946	0.875
10	0.137	0.981	0.976	0.886	0.901
11	0.162	0.942	0.942	0.898	0.910
12	0.160	0.976	0.970	0.936	0.907
13	0.186	0.950	0.929	0.868	0.815

试验值与预测值的比较见图 10。由图可知所有试验的相关系数 R 都在 0.85 以上, 说明白芍经过蜜糠炒制后, 其色度和相关成分的含量可以通过 ANN 模型进行很好的拟合, 模型预测的能力也较好。

2.6.5 色度-成分 ANN 模型验证 取 3 批未经训练的蜜糠炒白芍色度值, 利用“2.6.4”项下构建的 ANN 模型对其峰面积进行预测, 计算实际试验值与预测值的相对误差, 结果见表 5。结果显示, 试验值与预测值的平均相对误差值在 4.77%~14.24%, 表明模型整体预测能力良好。

3 讨论

历版《中国药典》和各省中药饮片炮制规范中对中药饮片外观颜色都进行了规定, 在实际生产中老药工常根据饮片在炮制过程中颜色的变化来判断炮制程度, 但因颜色属于一种主观评价, 缺少客观依据, 对于颜色的判断、理解往往会因人而异^[15], 故亟需将主观经验判定的外观颜色描述转化为量化的具体数值。本实验运用色差仪将外观颜色量化, 结果表明白芍经蜜糠炒制后其饮片偏黄且具光亮色泽, 与《建昌帮中药炮制全书》的描述一致, 说明色度值可作为参考指标用于评价饮片质量, 后续可在制定其饮片质量标准中性状项加入色度值, 进一步对饮片的颜色进行补充。同时通过分析色度值, 发现蜜糠炒白芍饮片较白芍饮片, a* 值有着显著的升高, 而 a* 值越大表明颜色越红, 表明白芍经蜜糠炒制后饮片颜色偏红, 建议对蜜糠炒白芍饮片描述时可增加该项, 将其纳入蜜糠炒白芍饮片的评价体系中。

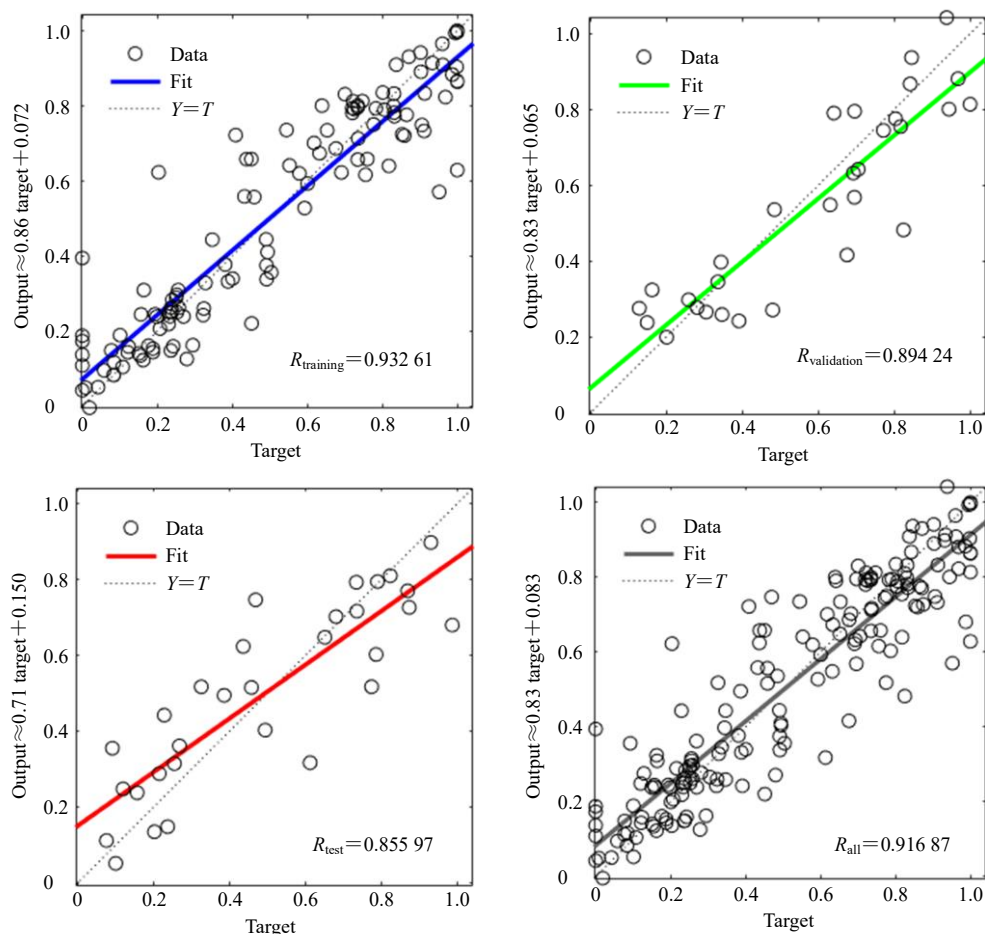


图 10 4-8-6 模型在训练、验证和测试过程中的试验值与预测值的比较

Fig. 10 Comparison between experimental and predicted values during training, validation, and testing of the 4-8-6 model

表 5 3 批蜜糠炒白芍相关成分峰面积的预测结果

Table 5 Prediction results of peak area of three batches of hb-fPRA related ingredients

批次	L^* 值	a^* 值	b^* 值	E_{ab} 值	没食子酸		芍药苷峰面积		没食子酰芍		五没食子酰葡		苯甲酸峰面积		苯甲酰芍药苷	
					峰面积		峰面积		药苷峰面积		萄糖峰面积		峰面积		峰面积	
					真实值	预测值	真实值	预测值	真实值	预测值	真实值	预测值	真实值	预测值	真实值	预测值
1	51.048	12.239	29.298	60.117	244.230	225.918	5 092.732	4 999.087	101.713	114.354	155.510	176.941	449.118	396.215	218.339	199.443
2	50.953	12.229	29.372	60.071	205.104	225.822	4 890.953	5 013.641	108.601	114.413	173.484	177.609	452.938	395.309	234.622	199.800
3	51.523	13.016	31.448	61.750	221.274	227.313	4 714.427	5 183.443	113.952	108.279	220.259	189.225	500.438	422.387	224.336	181.181
平均相对 误差/%							6.78	4.77			7.59	10.08		13.37		14.24

通过白芍、蜜糠炒白芍 OPLS-DA 模型中 VIP 值分析 10 个共有色谱峰的分类贡献度, 结果表明, 5、7 (没食子酰芍药苷)、9 (苯甲酸)、10 (苯甲酰芍药苷)、11 号色谱峰的 VIP > 1.0, 说明这 5 个成分是区分白芍和蜜糠炒白芍的关键成分。由 10 个共有峰的峰面积和色度值相关分析可知, 峰 1 (没食子酸)、5、6 (芍药苷)、7 (没食子酰芍药苷)、8 (五没食子酰葡萄糖)、9 (苯甲酸)、10 (苯甲酰芍

药苷) 的峰面积变化与色度值关系紧密。结合 VIP 值 > 1.0 和相关性结果, 筛选出峰 5、9 (苯甲酸)、10 (苯甲酰芍药苷), 后续可进行含量测定和全面的方法学考察, 将其作为蜜糠炒白芍炮制过程关键质控参数, 结合药典指标芍药苷, 建立蜜糠炒白芍饮片质量标准项下的含量测定。

本研究所用的蜜糠炒白芍饮片为电磁炒药机炒制, 与传统人工炒制相比有着炒制均匀、批间质量稳

定的优点,提高了炮制效率,利于大规模生产^[16-17]。炒药机炒药时仍需经验丰富的老药工判断其炒制程度是否合适,故可将炒药机与智能感官技术及在线监测技术相结合,实现炮制经验客观化。而 ANN 作为人工智能的经典基础技术,目前已被多家药企成功运用在生产中。如天力士建立了过程监控模型,其滴制工艺过程丸剂/丸形的工业成像与图像识别,可实时判断制剂工艺的终点^[18];康仁堂药业将浊度值与目视法结合,运用传感器技术对中药制剂的关键质量属性进行客观化表征^[19]。说明中药产业智能化是可行且必须的,结合数学建模等方法,可将中药传统生产过程中的经验描述与其质量控制成分结合在一起。本研究将色度值和共有成分进行相关性分析,成功建立色度-成分 ANN 模型。经过验证,模型表现出较好的网络预测精度,能够较准确的对峰面积进行预测。后续可结合工业成像技术^[17]、NIRS 技术^[20]等现代过程分析仪器,构建“外在性状-质控成分”在线监控模型,建立一条智能化炮制生产线,实现饮片生产的在线质控,更加全面科学的评价饮片质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 108.
- [2] 上官贤. 建昌帮中药炮制全书 [M]. 南昌: 江西教育出版社, 2013: 139.
- [3] 张金莲, 曾昭君, 潘旭兰, 等. 砗糠在建昌帮中药炮制中的应用 [J]. 中草毒, 2013, 44(21): 3092-3094.
- [4] Yang J, Huang Y, Xu H Y, *et al.* Optimization of fungi co-fermentation for improving anthraquinone contents and antioxidant activity using artificial neural networks [J]. *Food Chem*, 2020, 313: 126138.
- [5] Nasiri A, Taheri-Garavand A, Fanourakis D, *et al.* Automated grapevine cultivar identification via leaf imaging and deep convolutional neural networks: A proof-of-concept study employing primary Iranian varieties [J]. *Plants*, 2021, 10(8): 1628.
- [6] 赵芳, 陈泽麒, 李文竹, 等. 基于裂区的 D-最优实验设计法优化丹参川芎嗪注射液水提工艺 [J]. 中草毒, 2021, 52(1): 45-54.
- [7] 李昱, 宫静雯, 费程浩, 等. 快速气相电子鼻结合人工神经网络对 3 种五味子饮片快速识别及气味差异标志物研究 [J]. 中草毒, 2022, 53(5): 1303-1312.
- [8] 马磊, 王佳辉, 郝宣润, 等. 基于神经网络模型的黄芩提取物性状-成分与药效相关性研究 [J]. 中草毒, 2020, 51(8): 2151-2161.
- [9] 张涛, 邓亚玲, 陈西勇, 等. 基于 HS-GC-MS 考察建昌帮炒法对何首乌气味形成的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14): 134-141.
- [10] 鲁云, 洪婉敏, 姚晓璇, 等. 麸炒北苍术饮片粉末的色度值与质量指标的相关性分析及其炮制时间研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(21): 2605-2612.
- [11] 甄臻, 王杨, 魏海峰, 等. 基于颜色变化的麸炒山药质量标准及炮制工艺探究 [J]. 中成药, 2021, 43(3): 816-819.
- [12] 董天娇, 张兰, 刘佳, 等. 软坚消癭颗粒对肝郁脾虚型桥本甲状腺炎大鼠作用机制的代谢组学分析 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5): 1104-1108.
- [13] Taheri-Garavand A, Mumivand H, Fanourakis D, *et al.* An artificial neural network approach for non-invasive estimation of essential oil content and composition through considering drying processing factors: A case study in *Mentha aquatica* [J]. *Ind Crops Prod*, 2021, 171: 113985.
- [14] Shi C F, Yang H T, Chen T T, *et al.* Artificial neural network-genetic algorithm-based optimization of aerobic composting process parameters of *Ganoderma lucidum* residue [J]. *Bioresour Technol*, 2022, 357: 127248.
- [15] 吕思霖. 基于性状、化学成分的地黄九蒸九晒炮制科学性研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [16] 薛黎明, 秦雪梅, 张丽增. 酒黄芩炮制工艺及饮片标准研究 [J]. 中成药, 2007, 29(4): 545-547.
- [17] 蒋伟, 谢斌, 吕洪善, 等. 中药炮制机械智能炒药机温控系统设计 [J]. 湖南理工学院学报: 自然科学版, 2014, 27(4): 58-62.
- [18] 熊皓舒, 章顺楠, 朱永宏, 等. 中药智能制造质量数字化研究及复方丹参滴丸实践 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1698-1706.
- [19] 杨立诚, 封亮, 贾晓斌. 协同融合信息技术的智能制药设备在中药产业升级中应用现状与展望 [J]. 世界中医药, 2020, 15(15): 2199-2204.
- [20] 李文龙, 瞿海斌. 基于近红外光谱技术的“过程轨迹”用于中药制药过程监控的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(19): 3506-3510.

[责任编辑 郑礼胜]