

基于物性表征-内在指标结合化学模式识别比较不同醋淬方法对醋鳖甲质量的影响

陈高源^{1,2}, 曹皇亮^{1,2}, 涂济源^{1,2}, 伍红菊^{3*}, 刘艳菊^{1,2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430060

3. 国药集团中联药业有限公司, 湖北 武汉 430023

摘要: 目的 比较浸淬与淋淬 2 种醋淬工艺对醋鳖甲 *vinegar Trionycis Carapax* 质量的影响, 为砂烫醋淬制备醋鳖甲工艺中醋淬的操作方法提供依据。方法 分别采用质构仪、色差仪测定醋鳖甲的酥脆度和颜色值, 按照《中国药典》2020 年版方法测定浸出物; 采用 HPLC 技术建立醋鳖甲指纹图谱, 通过方差分析法、配对样本 *t* 检验、聚类热图分析和主成分分析 (principal components analysis, PCA), 综合评价 2 种淬法对醋鳖甲质量的影响。结果 单因素方差分析显示, 2 种醋鳖甲的酥脆度、色度值和浸出物没有显著性差异 ($P > 0.05$); 建立了醋鳖甲 HPLC 指纹图谱, 指认了 15 个共有峰中的 12 个; 配对样本 *t* 检验结果表明, 两者共有成分均无显著性差异 ($P > 0.05$); 聚类热图分析结果表明, 两者相互交混区分不开; PCA 分析结果表明, 两者主成分得分的三维散点融为一体, 不能分开; 进一步证明 2 种淬法所得醋鳖甲的内在质量具有一致性。结论 采用浸淬和淋淬所制醋鳖甲的品质基本一致, 2 种操作均可用于砂烫醋淬法。拓展了淬法操作的含义, 为补充完善国家标准中砂烫醋淬法的淬制工艺提供实验依据。

关键词: 醋鳖甲; 醋淬; 质构仪; 色差仪; 氨基酸; 浸出物; 指纹图谱

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)22-7653-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.009

Comparison of effects of different vinegar quenching methods on quality of vinegar *Trionycis Carapax* based on physical property characterization-intrinsic index combined with chemical pattern recognition

CHEN Gaoyuan^{1,2}, CAO Huangliang^{1,2}, TU Jiyuan^{1,2}, WU Hongju³, LIU Yanju^{1,2}

1. School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430060, China

3. Sinopharm Zhonglian Pharmaceutical Co., Ltd., Wuhan 430023, China

Abstract: Objective To compare the effects of soaking quenching and sprinkling quenching on the quality of Biejia (*Trionycis Carapax*) processed with vinegar, providing a basis for the “vinegar quenching” operation method in the preparation process of soft-shelled turtle shells processed with vinegar by sand-frying and vinegar quenching. **Methods** Utilize a texture analyzer and a colorimeter to respectively assess the crispness and color values of the *Trionycis Carapax* processed with vinegar-steeped. The leachables were determined according to the method of the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. Employ HPLC to construct a fingerprint profile for the *Trionycis Carapax* processed with vinegar-steeped. Through the application of analysis of variance (ANOVA), paired *t*-test, hierarchical clustering heatmap analysis, and principal component analysis (PCA), comprehensively evaluate the effects of two quenching methods on the quality of the *Trionycis Carapax* processed with vinegar-steeped. **Results** One-way ANOVA showed that there were no significant differences in the crispness, color value, and extractable matter of the two types of *Trionycis Carapax* processed with vinegar ($P > 0.05$); an HPLC fingerprint profile was established for the soft-shelled turtle shells,

收稿日期: 2024-06-27

基金项目: 湖北省中央引导地方发展项目 (2020ZYDD030)

作者简介: 陈高源, 硕士研究生, 研究方向为中药饮片炮制工艺、质量控制及原理研究。E-mail: 1157643618@qq.com

*通信作者: 刘艳菊, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药饮片炮制工艺、质量控制及原理研究。E-mail: lyj1965954@sohu.com

伍红菊, 工程师, 研究方向为中药质量控制研究。E-mail: whj552001@163.com

identifying 12 out of 15 common peaks; the results of the paired sample *t*-test indicated no significant differences in the common components between the two ($P > 0.05$); cluster heat map analysis indicated that the two were interwoven and could not be distinguished; PCA results showed that the three-dimensional scatter plots of the principal component scores of the two were integrated and could not be separated; further proving that the intrinsic quality of *Trionycis Carapax* processed with vinegar obtained by the two quenching methods is consistent. **Conclusion** The quality of *Trionycis Carapax* processed with vinegar produced by immersion quenching and spray quenching is essentially consistent, and both methods can be applied to the sand-heating and vinegar-quenching technique. This expands the connotation of quenching operations and provides an experimental basis for supplementing and perfecting the quenching process in the national standard for sand-heating and vinegar-quenching methods.

Key words: vinegar *Trionycis Carapax*; vinegar quenching; texture analyzer; color difference meter; amino acids; extracts; fingerprints

鳖甲为鳖科鳖属动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲, 鳖甲醋制后, 质变酥脆, 易于粉碎及煎出有效成分, 并能矫臭除味, 故临床上多用醋鳖甲。醋鳖甲为鳖甲的砂烫醋淬品, 与生鳖甲相比, 其入肝消积、软坚散结作用增强。《中国药典》2020 年版收载醋鳖甲的炮制方法为“取净鳖甲, 照烫法(通则 0213)用砂烫至表面淡黄色, 取出, 醋淬, 干燥。用时捣碎”^[1]。

砂烫醋淬法为常用炮制方法, 是将砂烫与淬法 2 个环节无缝对接、连续操作的方法。目前对该方法的研究较多, 但研究重点大多聚焦在砂烫过程, 关于砂烫温度和时间对药物的影响研究较为深入^[2-4], 多数饮片企业对砂烫工艺均有明确参数规定。然而对于醋淬这一关键环节有所忽略, 目前对其研究甚少。《中国药典》2020 年版“炮制通则”中对砂烫醋淬法表述为砂烫后“需醋淬时, 筛去辅料, 趁热投入醋液中淬酥”(该法文中称之为浸淬), 一般 100 kg 鳖甲用 20 kg 醋液。由于淬液醋的用量较少, 难以达到浸泡要求, 为适应醋淬需求, 企业进行了工艺方法的优化。

调研发现, 有些企业砂烫后采用规定量的醋液喷淋并翻动鳖甲, 使饮片与醋液充分接触(该法文中称之为淋淬)。淋淬与现代工业加工中喷淋淬火^[5]较为类似, 均为物品经高温处理后趁热喷淋液体, 使物料酥脆。据此, 笔者认为淬的含义包括“趁热浸入液体”和“趁热喷淋液体”2 种。但是淋淬法与《中国药典》2020 年版规定的浸淬表述不符。淋淬法是否合理可行, 淋淬与浸淬处理后的醋鳖甲质量是否一致, 目前尚无相关研究。根据醋鳖甲的质量要求, 需质地酥脆, 酥脆度是其关键表征。传统方法常用手掰判断, 以手掰易折为宜, 该法方便但难以准确分辨样品间酥脆度的差异。质构仪是一种质地性质检测仪器, 可通过多种测试模式表征脆度、硬度等物性特征参数, 结果客观、灵敏、准确^[6], 因

此本实验选择用质构仪表征醋鳖甲的酥脆程度。

基于此, 为明确醋淋是否可以作为醋淬的适宜方法, 本实验以酥脆度、颜色值、浸出物及氨基酸类成分指纹图谱等为考察指标, 从物性表征和内在指标 2 方面较系统地考察淋淬与浸淬对醋鳖甲质量的影响, 明确醋淬的科学操作和含义, 为明确醋鳖甲的醋淬炮制工艺提供实验依据, 为国家标准中砂烫醋淬定义的完善提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Brookfield CT3 型质构仪, 上海宝圣实业发展有限公司; HH-2 型数显恒温水浴锅, 上海虞龙仪器设备有限公司; FA1004 型十万分之一电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; CR-410 型色差仪, 日本柯尼卡美能达有限公司; DFY-800C 型摇摆式高速粉碎机, 温岭市林大机械有限公司。

1.2 药材与试剂

采集 10 批鳖甲样品, 经湖北中医药大学杨红兵教授鉴定, 为鳖科鳖属动物鳖 *T. sinensis* Wiegmann 的背甲, 均符合《中国药典》2020 年版相关要求, 鳖甲药材来源信息见表 1。米醋(执行标准: GB18187-2000 酿造), 批号 20230901, 涡阳恒太调味品有限公司; 20 种天然氨基酸标准品套装, 包含天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸、精氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、组氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺, 批号 B29409, 购于上海源叶生物科技有限公司, 套装中 20 种氨基酸的质量分数均大于 98%; 乙腈(色谱纯)、无水乙酸钠(分析纯), 均购于国药集团化学试剂有限公司; 水为娃哈哈纯净水; 三乙胺、异硫氰酸苯酯(PITC)、正己烷, 色谱纯, 均购于上海麦克林生化科技股份有限公司。

表 1 鳖甲药材来源信息

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	安徽阜阳	F1078-2323	S6	湖北荆门	F1078-2337
S2	安徽淮北	F1078-2331	S7	湖北荆州	F1078-2320
S3	安徽宿州	F1078-2332	S8	湖北荆州	F1078-2321
S4	安徽淮北	F1078-2330	S9	湖北武汉	F1078-2325
S5	湖北京山	F1078-2319	S10	江苏南通	F1078-2333

2 方法与结果

2.1 醋鳖甲样品的制备

2.1.1 鳖甲的制备 参照《中国药典》2020 年版一部鳖甲【炮制】项下方法进行操作。取鳖甲药材，置蒸锅内，沸水蒸 45 min，取出，放入热水中，立即用硬刷除去皮肉，洗净，在 80 ℃ 下干燥 5 h 左右。

2.1.2 醋鳖甲的制备 取洁净河砂置炒制容器内，用武火加热至滑利状态时（温度 200~220 ℃），投

入大小分档的净鳖甲 200 g，砂烫至表面淡黄色，取出，快速将样品等分 2 份。趁热将其中 1 份（相当于 100 g 鳖甲）投入 20 mL 米醋中，翻动，进行醋淬，待听不到吡声后取出，得浸淬醋鳖甲样品；同时，将另 1 份放入瓷盘中，立即用喷淋器喷淋 20 mL 米醋，边喷边翻动，待米醋喷完为止，得淋淬醋鳖甲样品。然后将样品放入烘箱中 70 ℃ 烘干，2 h 后取出，备用。

2.2 不同醋淬方式醋鳖甲性状观察

10 批鳖甲经砂烫后，分别采用浸淬和淋淬方式处理，所得样品性状见图 1。直观观察认为，不同方法处理饮片的颜色无明显差异，手掰法感觉二者酥脆度相近。

2.3 醋鳖甲酥脆度的数据化表征研究

醋鳖甲酥脆程度评价方法常用手掰法，以手掰易折为宜。而质构仪可通过多种测试模式表征脆度、

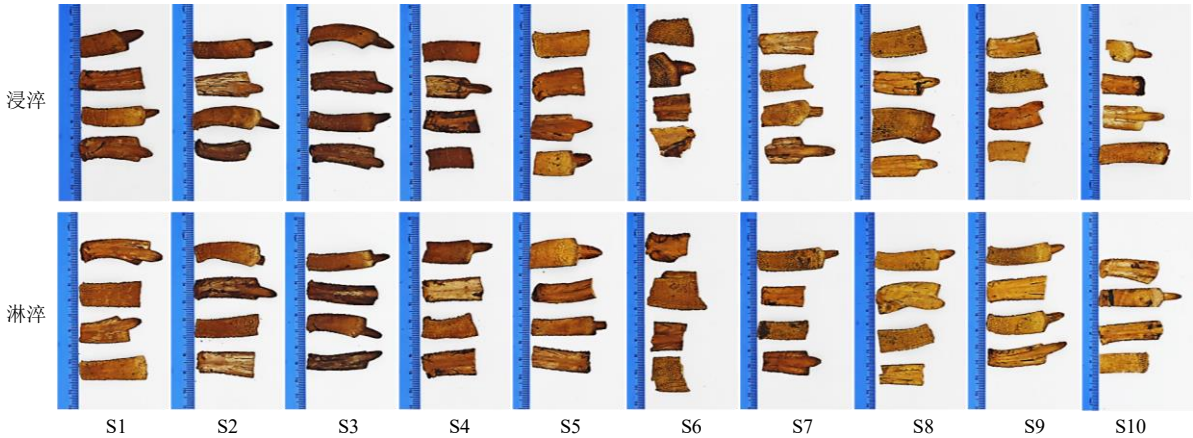


图 1 浸淬、淋淬醋鳖甲性状

Fig. 1 Characteristics of *Trionycis Carapax* processed with soaking and sprinkling vinegar

弹性、内聚性等物性特征参数，结果客观、灵敏、准确^[7]，故本实验选择质构仪表征醋鳖甲的酥脆程度。质构仪具有压缩、穿刺、剪切及拉伸等多种模式，并可根据所测物体的直径大小来选择不同类型的探头。根据本研究的目的，结合预实验结果，选择压缩模式与柱形挤压探头对醋鳖甲酥脆程度进行研究。预实验中发现触发力、测试速度和压缩度为主要影响因素，故以各因素条件下测试的脆度值的 RSD 值为指标，分别进行单因素实验考察。

将样品随机取 10 条，为准确表征每 1 块样品的质量全貌，测定时将每条醋鳖甲剪切为 3 段，如图 2 所示。分别测试后求出均数作为 1 个样本数据。根据 RSD 值的大小选择最佳触发力、测试速度和压缩度参数。



图 2 鳖甲切为 3 段

Fig. 2 Cut *Trionycis Carapax* into three sections

2.3.1 触发力选择 触发力是判定探头是否与样品接触的控制参数，当质构仪探头所受阻力达到设定触发力时，仪器开始记录测量数据。设定测试前速度与测试后速度均为 2 mm/s，测试速度为 2 mm/s，压缩度为 20.0%，触发力水平选择 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 gf，各水平重复测定 3 次，测试结果见表 2。触发力在 5.0~25.0 gf 条件下，对醋鳖甲脆度值

表 2 单因素优选参数实验结果 ($n=3$)Table 2 Experimental results of single variate preferred parameters ($n=3$)

触发力/gf	脆度值/N	RSD/%	测试速度/(mm·s ⁻¹)	脆度值/N	RSD/%	压缩度/%	脆度值/N	RSD/%
5.0	40.56	41.27	0.5	31.58	17.09	5.0	11.90	22.17
10.0	38.62	41.43	1.0	23.74	33.62	10.0	34.33	24.98
15.0	41.76	57.28	1.5	26.52	46.73	15.0	41.51	28.42
20.0	40.97	29.67	2.0	43.82	10.31	20.0	61.51	11.60
25.0	66.66	26.02	2.5	61.53	59.97	25.0	61.53	59.97

测定影响较小。醋鳖甲脆度值随触发力的增加略有波动,当出现较大波动前的那个临界参数较好。其中触发力为 20.0 gf 和 25.0 gf 时,醋鳖甲脆度值的 RSD 值较小,样品脆度值的测定较稳定。综合考虑,触发力选择 20.0 gf。

2.3.2 测试速度选择 测试速度是探头从接触测试样品到探头运行距离达到设定值时的运行速度。设定测试前速度与测试后速度均为 2 mm/s、触发力为 20.0 gf、压缩度为 20.0%,考察测试速度水平 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mm/s,各水平重复测定 3 次,测试结果见表 2。随着测试速度的增大脆度值呈现升高的趋势,说明测试速度对脆度值有一定的影响。且 RSD 值呈现先增大后减小再增大的趋势,当测试速度为 2.0 mm/s 时,样品脆度值的 RSD 值最小,说明在此情况下测定,脆度值最稳定,故测试速度选择 2.0 mm/s。

2.3.3 压缩度选择 压缩度为探头接触样品后下压距离的控制参数。厚度不一的醋鳖甲高度差距明显,以固定压缩距离作为压缩终点不够合理,故选择压缩度为下压参数。设定测试前速度和测试后速度均为 2 mm/s、触发力为 20.0 gf、测试速度为 2 mm/s,压缩度水平选择 5.0%、10.0%、15.0%、20.0%、25.0% 进行考察,各水平重复测定 3 次,测试结果见表 2。随着压缩度的增大,脆度值的 RSD 值呈先增大后减小再增大的趋势,当压缩度为 20.0% 时,样品脆度值的 RSD 值最小,说明在此情况下测定,脆度值最稳定,故压缩度选择 20.0%。

综合以上结果,测定醋鳖甲脆度时,质构仪的最佳参数:测试前速度、测试速度、测试后速度均为 2.0 mm/s,触发力为 20.0 gf,压缩度为 20.0%。

2.3.4 醋鳖甲酥脆度数据的采集 采用确定的最佳参数条件,测定 10 批次醋鳖甲的酥脆度,结果以脆度值表示。每批随机测定 10 条醋鳖甲,测定时将每条醋鳖甲剪切为 3 段,分别测试后求出均值作 1 个样本数据。测定结果见表 3。浸淬与淋淬方式处理

表 3 2 种淬法醋鳖甲脆度测定 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Brittleness determination of *Trionycis Carapax* processed with vinegar by two quenching methods ($\bar{x} \pm s, n=10$)

编号	脆度值/N	
	浸淬法	淋淬法
S1	55.18±10.72	68.81±11.01
S2	44.27±12.62	43.51±10.54
S3	38.79±10.37	45.76±5.97
S4	49.34±9.27	54.22±5.44
S5	36.02±7.07	58.58±18.05
S6	81.29±22.22	81.33±17.47
S7	73.34±16.64	76.45±16.10
S8	50.39±20.06	40.11±11.02
S9	59.11±13.68	45.66±10.72
S10	50.20±7.96	56.38±5.83
$\bar{x} \pm s$	52.79±13.58	57.08±13.57

的醋鳖甲脆度值相近。经单因素方差分析,2 种方法所得醋鳖甲的脆度统计值没有显著性差异 ($P<0.05$)。

2.4 醋鳖甲色度值的测定

2.4.1 样品粉末制备 将醋鳖甲样品粉碎,使通过 2 号筛达到 95% 以上,未能过 2 号筛的粉末合并,密封备用。

2.4.2 颜色测定条件 光源 D65,标准观察角度 2°,照明口径 50 mm。

2.4.3 颜色测定方法 将标准白板放入测量仪中进行色度扫描,进行基线校正,测得色度值 $L^*=87.50$, $a^*=0.3182$, $b^*=0.3361$ 。然后再取样品进行测定,记录样品颜色各指标值。 L^* 代表颜色的亮度, $L^*=0$ 指示为黑色, $L^*=100$ 指示为白色, $\Delta L^*=L^*(\text{浸淬})-L^*(\text{淋淬})$; a^* 代表红绿色轴, a^* 负值指示为绿色, a^* 正值指示为红色, $\Delta a^*=a^*(\text{浸淬})-a^*(\text{淋淬})$; b^* 代表黄蓝色轴, b^* 负值指示为蓝色, b^* 正值指示为黄色, $\Delta b^*=b^*(\text{浸淬})-b^*(\text{淋淬})$; ΔE^* 代表颜色总色差,计算公式为 $\Delta E^*=(\Delta L^{*2}+\Delta a^{*2}+\Delta b^{*2})^{1/2}$, $\Delta E^*>3$, 说

明存在色差, ΔE^* 数值越大, 说明色差越大^[8]。

2.4.4 样品颜色测定 取各批样品 (S1~S10) 粉末, 置中号培养皿中。使用 CR-410 色差仪按照“2.4.3”项下方法测量各批次醋鳖甲粉末的颜色, 记录其 L^* 、 a^* 、 b^* 值, 并计算样品总色差值 ΔE^* , 各批样品重复测定 3 次, 取平均值。

2.4.5 精密度考察 以醋鳖甲 (S1) 为样品, 按照“2.4.3”项下色度测定法进行样品颜色测定, 连续测定 6 次, 记录其 L^* 、 a^* 、 b^* 值。经计算其 L^* 、 a^* 、 b^* 的 RSD 值均 < 0.5%, 表明该仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性考察 以醋鳖甲 (S1) 为样品, 按照“2.4.3”项下色度测定法进行样品颜色测定, 分别于第 0、2、4、8、12、24 小时测定同一样品, 记录其 L^* 、 a^* 、 b^* 值。经计算其 L^* 、 a^* 、 b^* 的 RSD 值均 <

0.5%, 表明该仪器稳定性良好。

2.4.7 重复性考察 取醋鳖甲 (S1) 样品适量, 共 6 份, 按照“2.3.3”项下色度测定法进行样品颜色测定, 记录其 L^* 、 a^* 、 b^* 值。经计算其 L^* 、 a^* 、 b^* 的 RSD 值均 < 0.5%, 表明该方法重复性良好。

2.4.8 醋鳖甲色度测定结果 各批醋鳖甲色度值测定结果见表 4。由表 4 可知, 浸淬醋鳖甲的 L^* 值为 54.82~66.94、 a^* 值为 8.93~12.56、 b^* 值为 20.89~23.48; 淋淬醋鳖甲的 L^* 值为 55.16~67.29、 a^* 值为 8.79~12.25、 b^* 值为 20.64~23.79。除 S6 和 S9 样品中浸淬和淋淬所得醋鳖甲 $\Delta E^* > 3$ 存在色差外, 其余各批样品 2 种方式所得醋鳖甲均不存在色差。提示从颜色值分析, 2 种醋鳖甲基本没有差异 ($P < 0.05$)。

表 4 醋鳖甲色度值测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Determination results of chromaticity value of *Trionycis Carapax* processed with vinegar ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	浸淬组			淋淬组			ΔE^*
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*	
S1	58.20±0.23	12.56±0.13	22.55±0.13	58.66±0.15	11.98±0.04	21.19±0.12	1.60±0.18
S2	56.67±0.13	11.89±0.06	20.89±0.07	57.97±0.14	12.24±0.03	22.46±0.04	2.08±0.16
S3	54.82±0.06	11.91±0.02	21.02±0.12	55.16±0.05	12.25±0.02	21.65±0.06	0.80±0.20
S4	57.31±0.26	11.84±0.15	21.42±0.16	58.90±0.05	11.56±0.05	21.66±0.02	1.64±0.24
S5	64.29±0.24	11.21±0.09	23.48±0.06	61.76±0.17	11.71±0.05	23.79±0.01	2.60±0.10
S6	64.25±0.15	10.01±0.04	22.48±0.17	60.28±0.04	10.56±0.02	22.39±0.11	4.02±0.13
S7	66.94±0.12	9.49±0.07	22.42±0.03	66.15±0.03	9.27±0.02	21.53±0.03	1.21±0.09
S8	66.52±0.10	8.93±0.07	21.33±0.14	67.29±0.34	8.79±0.06	21.07±0.16	0.88±0.36
S9	63.34±0.30	9.45±0.12	21.58±0.16	66.75±0.02	9.42±0.04	22.36±0.03	3.50±0.26
S10	65.55±0.25	9.73±0.11	21.95±0.12	63.78±0.11	9.84±0.04	20.64±0.15	2.21±0.30

2.5 醋鳖甲浸出物的测定

现行《中国药典》2020 年版收载的醋鳖甲标准中暂没有浸出物测定指标, 但鳖甲药材项下有醇溶性浸出物测定, 结合临床用药形式多为汤剂, 故本实验对醋鳖甲的醇溶性浸出物和水溶性浸出物进行测定。

2.5.1 供试品制备 将浸淬和淋淬所得的醋鳖甲样品分别粉碎, 过 2 号筛, 备用。

2.5.2 水分测定 按照《中国药典》2020 年版四部通则 0832 水分测定法中烘干法进行测定。10 批醋鳖甲水分测定结果见表 5。由结果可知, 浸淬所得醋鳖甲的水分为 3.10%~3.84%, 淋淬所得醋鳖甲的水分为 2.93%~3.56%。浸淬法所得醋鳖甲的水分统计值显著高于淋淬法所得醋鳖甲。

2.5.3 醇溶性浸出物测定 醇溶性浸出物测定参照《中国药典》2020 年版四部通则 2201 (醇溶性浸出

物热浸法) 进行测定。测定结果见表 5。由结果可知, 浸淬所得醋鳖甲的醇溶性浸出物为 7.91%~10.85%, 均值为 9.15%; 淋淬所得醋鳖甲的醇溶性浸出物为 7.96%~10.02%, 均值为 9.13%。经单因素方差分析, 二者结果显示无显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5.4 水溶性浸出物测定 水溶性浸出物测定参照《中国药典》2020 年版四部通则 2201 (水溶性浸出物热浸法) 进行测定。测定结果见表 5。由结果可知, 浸淬所得醋鳖甲的水溶性浸出物为 11.62%~12.60%, 均值为 11.83%; 淋淬所得醋鳖甲的水溶性浸出物为 10.87%~12.80%, 均值为 11.83%。经单因素方差分析结果显示, 二者无显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.6 醋鳖甲氨基酸指纹图谱研究

2.6.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅

表 5 醋鳖甲水分及浸出物测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Determination results of moisture and extract of *Trionycis Carapax* processed with vinegar ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	水分/%		醇溶性浸出物/%		水溶性浸出物/%	
	浸淬组	喷淋组	浸淬组	淋淬组	浸淬组	淋淬组
S1	3.48±0.00	3.04±0.04	8.33±0.01	7.96±0.01	11.16±0.15	11.16±0.03
S2	3.74±0.04	3.32±0.01	8.70±0.02	8.31±0.10	11.59±0.03	10.87±0.14
S3	3.10±0.03	3.37±0.01	7.91±0.06	8.71±0.13	11.61±0.18	12.29±0.10
S4	3.50±0.01	3.01±0.02	8.91±0.12	9.08±0.09	11.36±0.24	12.01±0.05
S5	3.26±0.05	2.93±0.04	9.75±0.14	8.91±0.24	12.60±0.10	11.62±0.30
S6	3.58±0.04	3.33±0.06	8.96±0.17	9.87±0.25	12.08±0.05	12.80±0.10
S7	3.46±0.03	3.18±0.07	9.86±0.04	10.02±0.26	12.19±0.21	10.95±0.26
S8	3.84±0.06	3.28±0.03	10.85±0.14	9.87±0.29	12.15±0.15	12.18±0.14
S9	3.73±0.02	3.56±0.06	8.51±0.04	9.46±0.15	12.14±0.05	12.12±0.07
S10	3.84±0.03	3.29±0.01	9.65±0.02	9.19±0.10	11.96±0.14	12.27±0.19
$\bar{x} \pm s$	3.55±0.23	3.23±0.18*	9.15±0.83	9.13±0.66	11.83±0.42	11.83±0.61

与浸淬组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs immersion quenching group.

烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-0.1 mol/L 醋酸钠水溶液(用醋酸调节 pH 值至 6.5)(7:93)的混合溶液为流动相 A,以乙腈-水(4:1)的混合溶液为流动相 B;按表 6 中的规定进行梯度洗脱;柱温 30 ℃;检测波长 254 nm^[9-10]。理论塔板数按脯氨酸峰计算不低于 4 000。

表 6 梯度洗脱

Table 6 Gradient elution

t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%
0~9	100~97	0~3	32~38	82~70	18~30
9~22	97	3	38~45	70~66	30~34
22~23	97~83	3~17	45~47	66~0	34~100
23~32	83~82	17~18	47~50	0	100

2.6.2 供试品溶液的制备 取醋鳖甲 0.1 g,精密称定,置于具塞水解管中,加入 9 mol/L 盐酸溶液 10 mL,密塞,150 ℃水解 3 h 放冷,摇匀,滤过,量取滤液 5 mL,置蒸发皿中,蒸干,残渣用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解,并转移至 25 mL 量瓶中,加 0.1 mol/L 盐酸溶液至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.6.3 对照品溶液的制备 取天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、赖氨酸对照品适量,精密称定,加 0.1 mol/L 盐酸溶液制成混合溶液,作为对照品溶液。

2.6.4 衍生化处理 取上述供试品溶液与对照品溶液各 5 mL,分别置 25 mL 量瓶中,各加 0.1 mol/L PITC 的乙腈溶液 2.5 mL 和 1 mol/L 三乙胺的乙腈

溶液 2.5 mL,摇匀,室温放置 1 h 后,加 50%乙腈稀释至刻度,摇匀。取 10 mL,加正己烷 10 mL,振摇,放置 10 min,取下层溶液,滤过,取续滤液,即得衍生化后的对照品溶液与供试品溶液。

分别精密吸取衍生化后的对照品溶液与供试品溶液各 5 μL,注入液相色谱仪,测定,即得。

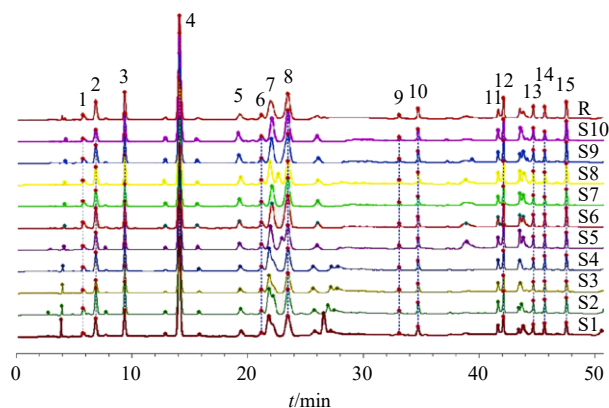
2.6.5 精密度试验 取醋鳖甲粉末(S1)适量,精密称定,按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.6.4”项下方法衍生化后,按“2.6.1”项色谱条件下进样测定,连续进样 6 次,记录色谱图。以甘氨酸(4 号峰)为参照峰,计算 15 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD,结果均<2%,表明该仪器精密度良好。

2.6.6 稳定性试验 取醋鳖甲粉末(S1)适量,精密称定,按“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.6.4”项下方法衍生化后,按“2.6.1”项色谱条件下进样测定,分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样,记录色谱图。以甘氨酸(4 号峰)为参照峰,计算得 15 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积的 RSD,结果均<2%,表明该方法稳定性良好。

2.6.7 重复性试验 取同一醋鳖甲粉末(S1)适量,精密称定,按“2.6.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.6.4”项下方法衍生化后,按“2.6.1”项色谱条件下进样测定,记录色谱图。以甘氨酸(4 号峰)为参照峰,计算得 15 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积 RSD,结果均<2%,表明该方法重复性良好。

2.6.8 指纹图谱的建立和相似度评价 分别按“2.6.2”“2.6.4”项下方法所制备 10 批浸淬和 10 批淋淬醋鳖甲柱前衍生化样品溶液,按“2.6.3”“2.6.4”项下方法所制备对照品衍生化溶液,在“2.6.1”项色谱条件下进样测定,记录色谱图,将醋鳖甲图谱数据分别或一起导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”,以 S6 号样品色谱图为参照图谱,采用多点校正后进行 Mark 峰匹配,生成浸淬、淋淬醋鳖甲 HPLC 叠加图谱,平均数法生成特征对照图谱,均标定 15 个共有峰,结果见图 3、4。

通过与对照品图谱(图 5)比对,指认出 12 个



1-天冬氨酸; 2-谷氨酸; 4-甘氨酸; 7-脯氨酸; 8-丙氨酸; 9-酪氨酸; 10-缬氨酸; 11-异亮氨酸; 12-亮氨酸; 13-苯丙氨酸; 14-色氨酸; 15-赖氨酸; 图 4、5 同。

1-aspartic acid; 2-glutamic acid; 4-glycine; 7-proline; 8-alanine; 9-tyrosine; 10-valine; 11-isoleucine; 12-leucine; 13-phenylalanine; 14-tryptophan; 15-lysine; same as figures 4, 5.

图 3 浸淬醋鳖甲 HPLC 叠加图谱及其对照图谱 (R)

Fig. 3 HPLC superposition and control pattern (R) of soaking quenching *Trionycis Carapax* processed with vinegar

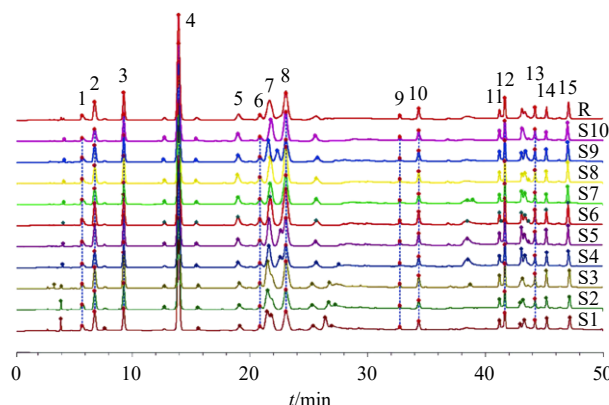


图 4 淋淬醋鳖甲 HPLC 叠加图谱及其对照图谱 (R)

Fig. 4 HPLC superposition and control pattern (R) of sprinkling quenching *Trionycis Carapax* processed with vinegar

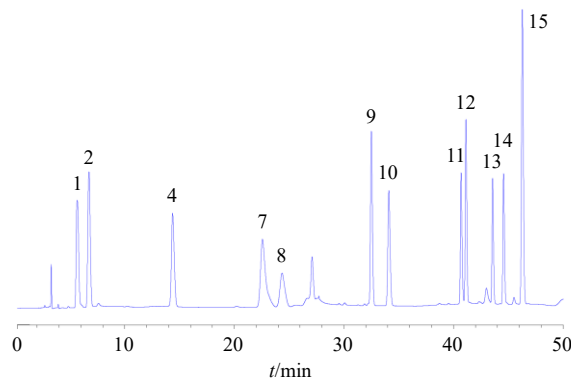


图 5 混合对照品溶液的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC diagram of mixed reference solution

成分,分别为 1 号峰天冬氨酸、2 号峰谷氨酸、4 号峰甘氨酸、7 号峰脯氨酸、8 号峰丙氨酸、9 号峰酪氨酸、10 号峰缬氨酸、11 号峰异亮氨酸、12 号峰亮氨酸、13 号峰苯丙氨酸、14 号峰色氨酸、15 号峰赖氨酸。相似度评价结果见表 7。10 批浸淬或淋淬醋鳖甲样品与各自对照图谱的相似度均 >0.990 ,相似度较高,说明不同淬法所得醋鳖甲样品质量较为稳定。

2.6.9 浸淬与淋淬醋鳖甲 HPLC 特征对照图谱比较 比较浸淬、淋淬所得醋鳖甲的特征对照图谱镜像图,结果见图 6。共确定 15 个共有峰,由镜像对比图可知,通过浸淬或淋淬所得醋鳖甲的特征化学成分基本一致。

表 7 指纹图谱相似度评价结果

Table 7 Fingerprint similarity evaluation results

组别	相似度		组别	相似度	
	浸淬	淋淬		浸淬	淋淬
S1	0.998	0.998	S6	0.995	0.996
S2	0.997	0.998	S7	0.996	0.996
S3	0.998	0.999	S8	0.998	0.997
S4	0.998	0.999	S9	0.996	0.999
S5	0.999	0.999	S10	0.998	0.999

2.7 化学模式识别分析

采用 SPSS 26.0 软件进行配对样本 t 检验和主成分分析 (principal component analysis, PCA)、采用 Origin 2022 软件进行聚类热图分析。

2.7.1 配对样本 t 检验 将所得的 20 批醋鳖甲样品的 15 个共有色谱峰的峰面积数据,导入 SPSS 26.0 软件进行配对样本 t 检验,结果见表 8,所有共有峰的双侧 P 值差均高于 0.05,表明浸淬或淋淬所得醋鳖甲的 15 个共有色谱峰的差异值无统计学意义 ($P<0.05$),即该 2 种淬法对所得醋鳖甲的质量影响

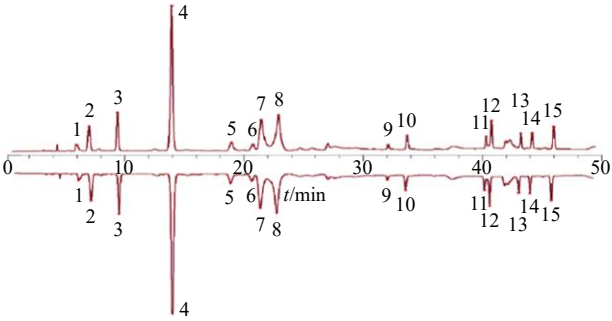


图 6 浸淬 (上)、淋淬 (下) 醋鳖甲 HPLC 特征对照图谱
镜像对比图

Fig. 6 Image comparison of HPLC characteristic control chromatogram of soaking quenching (top) and sprinkling quenching (bottom) *Trionycis Carapax* processed with vinegar

基本一致。

2.7.2 聚类热图分析 将所得的 20 批醋鳖甲样品的 15 个共有色谱峰的峰面积数据, 导入 Origin 2022 软件进行聚类热图分析。其中样品间距采用 Euclidean 距离法进行计算, 处理后的聚类热图见图 7。结果显示, 浸淬或淋淬所得醋鳖甲质量基本一致, 且不能根据淬法不同区分开来。

2.7.3 PCA 利用 SPSS 26.0 软件对 10 批浸淬、淋淬醋鳖甲的指纹图谱进行 PCA, 对共有峰峰面积标准化处理后, 计算主成分特征值、累积方差贡献率, 绘制主成分得分散点图。以特征值 >1 为标准, 得到前 5 个主成分的累积方差贡献率为 87.585%, 可代表样品 87.585% 的信息, 结果见表 9。第 1 主成分

表 8 浸淬、淋淬醋鳖甲共有峰配对 t 检验结果

Table 8 Paired t -test results of common peaks in soaking and sprinkling quenching *Trionycis Carapax* processed with vinegar

共有峰	配对差值			双测 P 值	共有峰	配对差值			双测 P 值	共有峰	配对差值			双测 P 值
	平均值	标准误差 平均值	t 值			平均值	标准误差 平均值	t 值			平均值	标准误差 平均值	t 值	
1	-11.25	8.11	-1.39	0.20	6	47.64	54.14	0.88	0.40	11	-11.87	7.39	-1.61	0.14
2	7.82	26.80	0.29	0.78	7	32.84	55.62	0.59	0.57	12	-10.69	9.58	-1.12	0.29
3	-4.28	16.18	-0.26	0.80	8	-83.39	107.69	-0.77	0.46	13	-2.84	5.43	-0.52	0.61
4	-37.63	74.55	-0.50	0.63	9	-0.38	3.29	-0.12	0.91	14	-5.71	5.78	-0.99	0.35
5	-1.34	6.73	-0.20	0.85	10	8.06	10.71	0.75	0.47	15	-7.44	8.65	-0.86	0.41

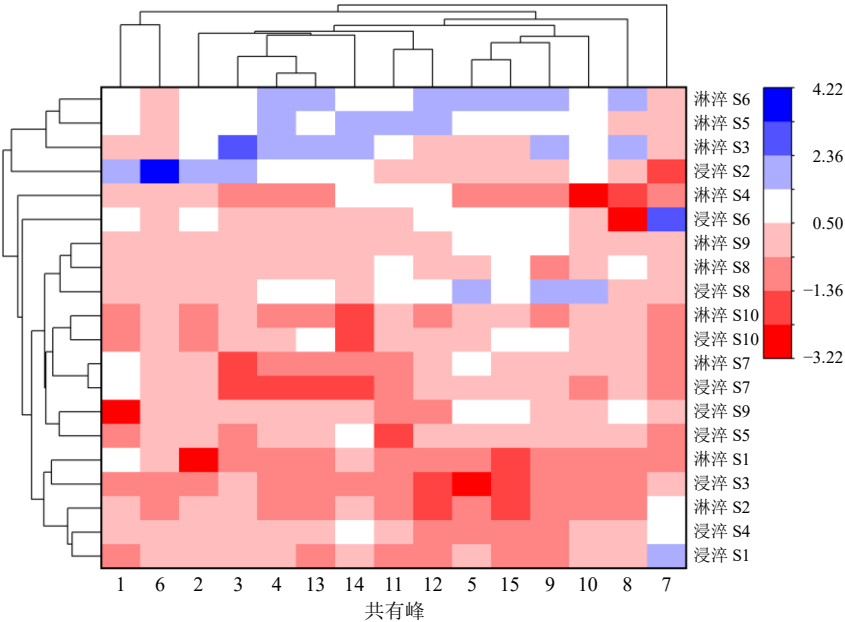


图 7 10 批浸淬、淋淬醋鳖甲聚类热图分析

Fig. 7 Cluster heat map analysis of ten batches of soaking and sprinkling quenching *Trionycis Carapax* processed with vinegar

的信息主要来自于色谱峰 5、8~10、15, 第 2 主成分的信息主要来自于色谱峰 2~4、13、14, 第 3 主成分的信息主要来自于色谱峰 11、12, 第 4 主成分

的信息主要来自于色谱峰 1、6, 第 5 主成分的信息主要来自于色谱峰 7, 结果见表 10。由表 10 可知, 主成分 1、2、3 的累积方差贡献率为 71.248%, 基

表 9 浸淬、淋淬醋鳖甲 PCA 特征值和方差贡献率
 Table 9 PCA eigenvalues and variance contribution rate of
 dip quenching and drenching quenched acetat shells

峰号	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	7.043	46.950	46.950
2	2.167	14.445	61.395
3	1.478	9.853	71.248
4	1.422	9.482	80.731
5	1.028	6.855	87.585

表 10 浸淬、淋淬醋鳖甲主成分因子荷载矩阵
 Table 10 Factor load matrix of principal components of
 soaking and sprinkling quenching *Trionycis Carapax*
 processed with vinegar

峰号	主成分因子荷载矩阵				
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
1	0.081	0.013	0.227	0.857	0.152
2	0.318	0.526	0.315	0.368	0.112
3	0.225	0.940	0.087	0.074	-0.014
4	0.460	0.791	0.354	0.099	0.033
5	0.867	-0.069	0.372	0.092	-0.058
6	-0.004	0.388	-0.088	0.753	-0.423
7	0.049	0.194	-0.057	-0.030	0.955
8	0.593	0.399	-0.144	-0.260	-0.460
9	0.769	0.218	0.377	0.063	0.162
10	0.853	0.325	-0.143	0.162	0.076
11	0.133	0.382	0.815	0.106	-0.008
12	0.383	0.272	0.820	0.212	-0.005
13	0.551	0.731	0.362	0.000	-0.030
14	-0.208	0.782	0.310	0.182	0.242
15	0.768	0.126	0.539	-0.063	-0.115

本可以显示出醋鳖甲氨基酸类成分之间的相似关系。因此，醋鳖甲中复杂的化学信息可以降维为 3 个主成分进行分析。主成分得分见表 11。根据主成分得分绘制三维散点图，结果见图 8，可知浸淬和淋淬醋鳖甲根据主成分得分不能够区分开，说明该 2 种醋淬方法对醋鳖甲的质量影响一致。

3 讨论

鳖甲砂烫醋淬的目的是酥脆药物、增强软坚散结作用，并矫味去腥。砂烫醋淬法是将砂烫和醋淬 2 个工艺连续操作，砂烫可使药物质地酥脆，再经醋淬，进一步酥脆药物，并可引药入肝，增强药效。砂烫醋淬法自古就有，一直沿用至今。如《世医得效方》中记载鳖甲炮制方法为“炙黄，醋淬五七次，去腥”。当时的醋淬应是浸淬，但没有明确醋的用量。《中国药典》2020 年版“炮制通则”中规定：砂烫后

表 11 浸淬、淋淬醋鳖甲主成分得分
 Table 11 Score of the main components of soaking and
 sprinkling quenching *Trionycis Carapax* processed with
 vinegar

编号	浸淬醋鳖甲主成分得分			淋淬醋鳖甲主成分得分		
	因子 1	因子 2	因子 3	因子 1	因子 2	因子 3
S1	-0.651	-0.139	0.415	-1.258	-0.728	-0.365
S2	-0.745	2.977	-0.893	-1.359	-0.005	0.482
S3	-1.769	-0.156	-0.555	0.652	1.798	-0.385
S4	-0.811	0.425	0.723	-1.228	0.039	1.715
S5	-0.327	-0.069	-0.521	1.029	0.965	1.157
S6	0.507	-0.680	2.615	1.924	0.571	0.318
S7	-0.044	-1.230	-0.500	0.167	-1.108	-0.472
S8	1.509	-0.429	0.135	0.592	-0.021	-0.486
S9	0.539	-0.312	-1.592	0.615	-0.276	0.161
S10	0.646	-0.742	-0.968	0.010	-0.881	-0.986

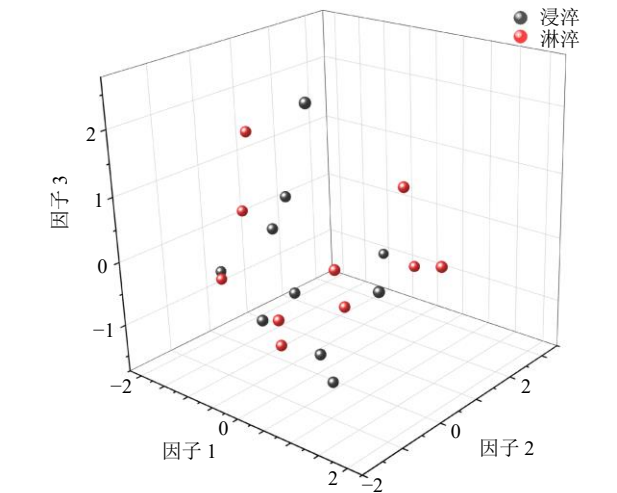


图 8 10 批浸淬、淋淬醋鳖甲主成分得分三维散点图
 Fig. 8 Three-dimensional scatter plot of the principal
 component score of ten batches of soaking and sprinkling
 quenching *Trionycis Carapax* processed with vinegar

“需醋淬时，筛去辅料，趁热投入醋液中淬酥”，一般每 100 kg 鳖甲用醋 20 kg。由于规定所用淬液醋量较少，难以达到浸淬的要求，因此现在有些饮片企业采用喷淋淬的方法，将浸淬调整为淋淬，可以将有限的醋液较均匀地喷于鳖甲上，达到酥脆的目的。除此之外，还有些企业在醋淬过程中用超规定量的醋满足浸淬法，即一次取出大量的醋反复多次用于砂烫品，目前较多企业按照此法处理，但存在以下问题：一次取大量醋多次使用过程中，醋的质量也在变化。由于鳖甲趁热浸淬，醋中的成分一部分被鳖甲吸附；同时，在较高温度下，会使醋液中一部分成分挥发（浸后醋液温度高达 70 ℃左右），

所剩醋液与原醋相比质量差异明显, 后续浸淬品质直接受到影响。针对这一问题本课题组也进行了相关研究。本研究为考察淋淬法是否可行? 淋淬与浸淬炮制品质量是否一致或更优。根据砂烫醋淬目的, 选择了质地与颜色作为物性关键指标。若按传统方法判别, 因人的敏感性差异, 会导致判断误差较大。因此本研究选择质构仪^[7,11-13]和色差仪^[14-17]等现代仪器对指标进行表征, 这些技术在中药领域应用广泛, 指标可量化, 准确度高、重复性好。本研究经对不同醋淬方式所得醋鳖甲进行质地和颜色的量化评价, 结果表明 2 种淬法所得醋鳖甲的性状指标具有一致性。在外在性状表征比较的基础上, 进一步对于醋鳖甲的内在指标进行检测。浸出物高低与酥脆度关系密切, 与药效直接相关^[18-19]。根据《中国药典》2020 年版对鳖甲药材质量控制要求, 选择了醇溶性浸出物为指标; 并结合临床用药形式多为汤剂, 本研究检测了水溶性浸出物, 实验结果显示, 2 种淬法无显著性差异 ($P < 0.05$)。鳖甲主要成分为蛋白类物质, 经炮制后为多肽和氨基酸等, 有研究表明富含药用氨基酸是醋鳖甲具备药用价值的重要物质基础^[20]。为考察醋淬后醋鳖甲中氨基酸类成分的整体差异, 建立了指纹图谱, 通过指纹图谱分析, 相似度高; 通过配对样本 t 检验、聚类热图分析和 PCA, 进一步证明了 2 种淬法所得醋鳖甲的内在质量具有一致性。本研究结果为明确醋鳖甲炮制方法中醋淬的操作提供了参考。

综上, 本研究根据颜色、质地等性状表征以及浸出物、氨基酸类成分等内在指标, 对不同醋淬方式所得的醋鳖甲质量进行了客观评价, 结合化学模式识别分析。明确了浸淬法与淋淬法对醋鳖甲饮片的影响具有一致性, 提示淋淬法作为淬法的一种操作方法具有合理性, 本研究为拓展醋鳖甲的醋淬工艺提供了实验依据。

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: 402.
- [2] 牛菲, 孙善德. 老药工中药鉴别及炮制经验要诀 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(3): 268-270.
- [3] 向文, 陈敏, 张佳东, 等. 鳖甲加工方法的改进研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(1): 82-85.
- [4] 韩秋俊, 毕葳, 王伟, 等. 鳖甲炮制前后肽类含量比较

[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 86-88.

- [5] 赵小莲, 张珂星, 刘东, 等. 7050 铝合金超厚板喷淋淬火的数值模拟分析 [J]. 热加工工艺, 2021, 50(14): 135-138.
- [6] 胡亚云. 质构仪在食品研究中的应用现状 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(11): 101-104.
- [7] 张新瑞, 杨婧, 张尧, 等. 延胡索樟帮传统软化法的科学表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 108-116.
- [8] 陈奕帆, 张琳, 刘长虹, 等. 高明度 ND1 代型材料表面 4 种全瓷冠光学特性比较 [J]. 实用口腔医学杂志, 2015, 31(4): 464-468.
- [9] 高伟城, 王小平, 陈荣珠, 等. 不同产地枇杷叶氨基酸组成及营养价值评价 [J]. 中药材, 2023, 46(9): 2245-2253.
- [10] 广东省中药配方颗粒质量标准 (醋鳖甲配方颗粒) [S]. 2021: 3-4.
- [11] 吴梦孜, 张英, 吴孟华, 等. 干燥动力学结合低场核磁共振和物性分析技术的地黄饮片干燥过程表征 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4645-4652.
- [12] 彭杰, 吴孟华, 马志国, 等. 吸水动力学结合现代技术的当归润制过程研究 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 96-99.
- [13] 彭杰, 马志国, 吴孟华, 等. 低场核磁共振结合物性分析研究黄芪软化机理 [J]. 中成药, 2023, 45(1): 135-141.
- [14] 宋成程, 王燕, 詹鑫, 等. 色差值结合化学计量学对谷芽炮制品的分类鉴别及水分预测研究 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 611-613.
- [15] 杨欣欣, 黄梓骏, 洪禹昕, 等. 基于《雷公炮炙论》的白矾蜂巢制炮制工艺研究 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4008-4019.
- [16] 肖扬鑫, 董妍, 涂济源, 等. 基于性状与化学成分变化规律分析桔萼最佳采收年限 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(5): 1219-1223.
- [17] 张前亮, 甘均龙, 邓雯, 等. 当归破壁饮片沸腾干燥动力学研究及理化性质评价 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3300-3309.
- [18] 高建蓉, 胡祖良, 施静妮, 等. 鳖甲炮制前后抗肝纤维化活性部位的 SDS-PAGE 凝胶电泳比较研究 [J]. 中国药师, 2017, 20(9): 1543-1544.
- [19] 施婧妮. 鳖甲炮制前后抗肝纤维化药效物质及其质量分析比较研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2011.
- [20] 廖彭莹, 刘华宇, 孙雪芹, 等. 不同来源市售醋鳖甲水提取物的氨基酸含量分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(1): 287-295.

[责任编辑 郑礼胜]