

基于 AHP-CRITIC 结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化奶制手参的炮制工艺及其质量控制研究

刘海翠¹, 先永强², 刘可欣², 范刚², 熊耀祖¹, 万丽^{1*}, 杜蕾蕾^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 优化奶制手参 *Gymnadenia conopsea* 的炮制工艺并采用 HPLC 法建立其指纹图谱及指标成分含量测定方法。方法 基于单因素实验结合 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM), 以料液比、炮制温度和炮制时间为考察因素, 结合层次分析法 (analytic hierarchy process, AHP) 和基于指标相关性的权重分配法 (criteria importance through intercriteria correlation, CRITIC) 综合赋权, 以综合评分作为工艺优化评价标准。采用 HPLC 法建立指纹图谱, 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版本)、IBM SPSS Statistics 27.0、SIMCA 14.1 软件, 结合层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA) 对不同产地的奶制手参质量进行评价。结果 确定最佳炮制工艺参数为料液比 1:2、温度 85 °C、时间 15 min, 经 3 批验证试验综合评分为 83.446 (RSD 为 0.544%)。奶制手参中天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A 和 militarine 的平均质量分数分别为 0.143%、0.300%、0.600%、0.490%、0.870% 和 0.880%。指纹图谱确定了 8 个共有峰, 13 批样品相似度为 0.897~0.996, HCA 将 13 批奶制手参分为 3 类; OPLS-DA 筛选出 militarine 和对羟基苯甲醇为关键差异性成分。结论 建立的炮制工艺稳定可靠, 所构建的 HPLC 指纹图谱结合多成分含量测定的质量控制方法科学合理, 可为奶制手参质量控制提供依据。

关键词: 奶制手参; 炮制工艺; Box-Behnken 设计-响应面法; AHP-CRITIC 赋权法; 指纹图谱; 质量控制; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 天麻素; 对羟基苯甲醇; dactylorhin B; loroglossin; dactylorhin A; militarine
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)17-6148-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.17.006

Study on optimization of processing technology and quality control of milk-processed *Gymnadenia conopsea* based on AHP-CRITIC combined with Box-Behnken design-response surface methodology

LIU Haicui¹, XIAN Yongqiang², LIU Kexin², FAN Gang², XIONG Yaozu¹, WAN Li¹, DU Leilei²

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To optimize the processing technology of milk-processed Shoushen (*Gymnadenia conopsea*, GC) and establish its fingerprint and determination method for index components by HPLC. **Methods** Based on single-factor experiments combined with Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM), the solid-liquid ratio, processing temperature, and processing time were investigated. The comprehensive weighting method combining analytic hierarchy process (AHP) and criteria importance through intercriteria correlation (CRITIC) was used, with the comprehensive score as the evaluation standard for process optimization. The HPLC method was applied to establish the fingerprint, and the traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system (Version 2012.130723), IBM SPSS Statistics 27.0, and SIMCA 14.1 software were used. Quality evaluation of milk-processed GC from different producing areas was conducted by combining hierarchical cluster analysis (HCA) and orthogonal partial

收稿日期: 2025-04-07

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2023YFC3504403)

作者简介: 刘海翠, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药质量控制。E-mail: liuhaicui88@163.com

*通信作者: 杜蕾蕾, 硕士生导师, 从事中药、民族药的药效物质基础与品质评价研究。E-mail: duleilei@cdutcm.edu.cn

万丽, 教授、硕博研究生导师, 研究方向为中药质量控制及评价。E-mail: wanli@cdutcm.edu.cn

least squares-discrimination analysis (OPLS-DA). **Results** The optimal processing parameters were determined as solid-liquid ratio 1:2, temperature 85 °C, and time 15 min. The comprehensive score of three batches of verification tests was 83.446 (RSD is 0.542%). The average contents of gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, dactylorhin B, loroglossin, dactylorhin A, and militarine in milk-processed GC were 0.143%, 0.300%, 0.600%, 0.490%, 0.870%, and 0.880%, respectively. Eight common peaks were identified in the fingerprint, and the similarity of 13 batches of samples was 0.897—0.996. HCA classified the 13 batches of milk-processed GC into three categories; OPLS-DA screened out militarine and *p*-hydroxybenzyl alcohol as key differential components. **Conclusion** The established processing technology is stable and reliable, and the quality control method combining HPLC fingerprint and multi-component content determination is scientific and reasonable, which can provide a basis for the quality control of milk-processed GC. **Key words:** milk-processed *Gymnadenia conopsea*; processing technology; Box-Behnken design-response surface methodology; AHP-CRITIC weighting method; fingerprint; quality control; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discrimination analysis; gastrodin; *p*-hydroxybenzyl alcohol; dactylorhin B; loroglossin; dactylorhin A; militarine

手参为兰科手参属植物手参 *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. 的干燥块茎，又称手掌参、佛手参，藏药名为旺拉，具有生精壮阳、增加体力的功效^[1]。手参多以奶制后入药，以增强其补益功效。“奶制法”是藏医药独具特色的炮制方法之一，具有悠久的历史 and 深厚的理论基础。在藏医药经典著作《四部医典》和《晶珠本草》中，均记载了该方法的理论依据及应用^[2-3]。奶制手参是由藏药手参的干燥块茎经乳汁煎煮、晒干等工艺炮制而成，被《部颁标准·藏药分册》（1979 年版）收载，具有补肾益气、生精润肺等功效，可用于治疗肺病、肺虚咳嗽、肉食中毒、遗精阳痿等^[4]。

目前，奶制手参的炮制工艺缺乏明确的参数控制，导致其质量参差不齐，难以保证临床使用的安全性、有效性和质量可控性。Box-Behnken 设计-响应面法（Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM）是一种在工艺优化领域广泛应用的实验设计手段，通过构建三维立体图形直观地展示各因素间的交互效应，与传统方法如正交试验设计和均匀设计相比，BBD-RSM 在工艺参数的优化选择上展现出更高的准确性^[5-6]。在优选最佳炮制工艺时，选择单一成分作为检测指标不够全面。因此，以多种化学成分为指标，通过 BBD-RSM 优化奶制工艺参数具有重要意义，既能传承传统炮制经验，又能为其质量评价研究提供数据支撑。

奶制手参现行标准仅被《内蒙古蒙药饮片炮制规范》2020 年版收载，含量测定部分仅以多糖作为质控指标。随着中药质量控制要求的提高，单一成分的含量测定并不能全面科学地评价药材质量。指纹图谱和多成分含量测定相结合已成为了常用的质量控制策略，通过建立奶制手参多指标含量测定方法，并结合指纹图谱和化学计量学可以更客观全

面地评价药材质量，为奶制手参质量标准提高提供依据^[7]。基于上述背景，本研究首先采用单因素法考察料液比、炮制时间、炮制温度对奶制手参的影响，再采用 AHP-CRITIC 法结合 BBD-RSM 优选奶制手参的最佳炮制工艺。继而采用 HPLC 技术建立奶制手参中 6 种成分（天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine）的含量测定方法及化学指纹图谱，为奶制手参的质量控制和评价提供科学依据和参考，同时也为其进一步开发与临床应用奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-20A 型高效液相色谱仪，日本岛津公司；UPT-II-10T 型优普超纯水机，成都超纯科技有限公司；SB 4200DTD 型超声波清洗机，宁波新芝生物科技股份有限公司；Sartorius BP121S 型电子天平，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱，上海一恒科技有限公司；KES-W21CS323 型便携式电陶炉，深圳市康家佳品智能电器科技有限公司；D3024 型台式高速微量小型离心机，大龙兴创实验仪器（北京）股份有限公司；TWS-26 型双列六孔电热恒温水浴锅，上海喆图科学仪器有限公司；JP-800C 型高速多功能粉碎机，永康市红太阳机电有限公司；V-1100D 型紫外-可见分光光度计，上海美谱达仪器有限公司。

1.2 材料

对照品天麻素，批号 NO.SG8080，北京索莱宝科技有限公司；对照品 dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A，自制；对照品对羟基苯甲醇（批号 RFS-D05911812016）、militarine（批号 RFS-E04402007029），成都瑞芬思德丹生物科技有限公司；经 HPLC 测定，各对照品质量分数均 >97.0%；

乙腈、磷酸均为色谱纯，成都市科隆化学品有限公司；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。

本研究共收集7批奶制手参(S1~S7)和6批手参药材(D1~D6)，由成都中医药大学杜蕾蕾副教授鉴定，药材基原均为兰科手参属植物手参 *G. conopsea* (L.) R. Br. 的干燥块茎，详细信息见表1。

表1 样品信息

Table 1 Sample information

编号	来源	批号	规格
S1	四川白玉县藏医院	240813	奶制
S2	四川石渠县藏医院	240715	奶制
S3	四川德格县藏医院	240820	奶制
S4	四川得荣县藏医院	240716	奶制
S5	四川宗萨藏医院	240809	奶制
S6	四川甘孜州藏医院	240814	奶制
S7	四川甘露海藏医院	240823	奶制
D8	四川凉山州木里藏族自治县	241214	生品
D9	四川若尔盖县	241125	生品
D10	四川红原县	241207	生品
D11	四川理塘县	241217	生品
D12	青海贵德县贝珠牙药材有限公司	241221	生品
D13	四川色达县	241208	生品

2 方法与结果

2.1 奶制手参炮制方法

取净制手参，加入适量牛奶（以完全浸没为度），文火慢煮至充分煮透。取出，置于通风处晾干，即得奶制手参。

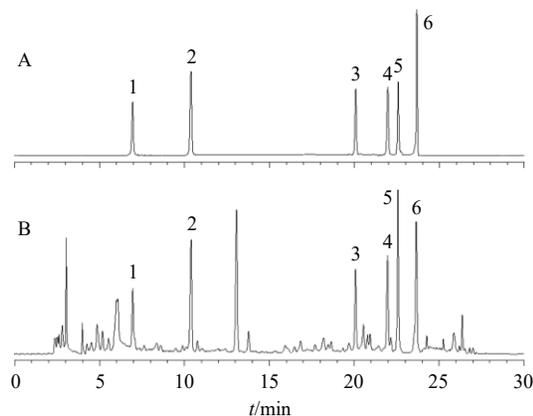
2.2 指标成分的含量测定

2.2.1 供试品溶液的制备 取奶制手参粉末（编号S1）约1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入50%甲醇25mL，密塞，称定质量，超声处理（功率200W、频率40kHz）15min，放冷，再称定质量，用50%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，经0.45μm微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine对照品适量，各自精密称量，置于50mL量瓶内，向其中加入50%甲醇溶解，制成质量浓度分别为209.0、216.4、208.6、212.2、214.8、207.4μg/mL的对照品储备液。

2.2.3 色谱条件 月旭Xtimate系列C₁₈色谱柱（250mm×4.6mm，5μm）；用流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液进行梯度洗脱：0~12.0min，3%~15%乙腈；12.0~20.0min，15%~25%乙腈；20.0~22.5

min，25%~90%乙腈；22.5~30.0min，90%乙腈；体积流量1mL/min；柱温30℃；检测波长220nm；进样量10μL。混合对照品溶液和供试品溶液色谱图见图1。



1-天麻素；2-对羟基苯甲醇；3-dactylorhin B；4-loroglossin；5-dactylorhin A；6-militarine。

1-gastrodin；2-*p*-hydroxybenzyl alcohol；3-dactylorhin B；4-loroglossin；5-dactylorhin A；6-militarine。

图1 混合对照品(A)及奶制手参样品(B)的HPLC图
Fig.1 HPLC of mixed reference substances (A) and milk-processed *G. conopsea* samples (B)

2.2.4 线性关系考察 分别取上述天麻素、对羟基苯甲醇对照品储备液0.1、0.4、0.6、0.8、1.0mL，置于5mL量瓶中，加入50%甲醇定容至刻度，制得系列质量浓度的对照品溶液；分别吸取上述dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A和militarine对照品储备液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL，置于10mL量瓶中，加入50%甲醇定容至刻度，制得系列质量浓度的对照品溶液，在上述色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归，得回归方程分别为天麻素 $Y=20\ 882.0 X-7\ 912.5$ ， $R^2=1.000\ 0$ ，线性范围3.99~39.94μg/mL；对羟基苯甲醇 $Y=40\ 763.0 X-9\ 811.7$ ， $R^2=0.999\ 6$ ，线性范围4.23~40.35μg/mL；dactylorhin B $Y=13\ 065.0 X-9\ 938.6$ ， $R^2=0.999\ 7$ ，线性范围10.32~50.23μg/mL；loroglossin $Y=14\ 229.0 X-6\ 613.2$ ， $R^2=0.999\ 7$ ，线性范围10.29~50.02μg/mL；dactylorhin A $Y=13\ 812.0 X-5\ 815.9$ ， $R^2=0.999\ 9$ ，线性范围10.18~50.07μg/mL；militarine $Y=16\ 947.0 X+62\ 553.0$ ， $R^2=1.000\ 0$ ，线性范围10.02~49.95μg/mL；结果表明各成分在各自质量浓度范围内有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取按照“2.2.1”项下方法制备的供试品溶液，在上述色谱条件下连续进样测定6

次, 结果天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 峰面积的 RSD 分别为 0.83%、1.78%、0.62%、1.56%、0.64%、1.57%, 结果表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取按照“2.2.1”项下方法制备的供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、8、12 h 进样测定, 结果天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 峰面积的 RSD 分别为 1.37%、1.04%、0.82%、1.88%、0.72%、1.46%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取奶制手参(编号 S1) 6 份, 按照“2.2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 在“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 结果天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 质量分数的 RSD 分别为 1.44%、1.90%、1.79%、1.91%、0.87%、0.68%, 结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取已测知含量的 6 份奶制手参(编号 S1), 每份 0.5 g, 精密称定, 每份与“2.2.2”项中相应成分对照品均以含量为 1:1 的比例加入, 制备供试品溶液。按照“2.2.3”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 的平均加样回收率分别为 103.99%、101.90%、98.51%、100.33%、103.20%、99.82%, RSD 分别为 2.21%、1.94%、1.71%、2.01%、0.77%、1.13%, 结果表明该方法准确度良好。

2.3 多糖含量测定

参照多糖试剂盒说明书(苏州格锐思生物科技有限公司), 对样品粉末应用水提醇沉方法进行提取分离, 而后应用苯酚-浓硫酸法进行显色反应, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程为 $Y=4.8205X+0.3918$, $R^2=0.9993$ 。测定各样品中多糖含量, 多糖计算公式如下。

$$\text{多糖含量} = \text{样品质量浓度} \times \text{稀释倍数} / \text{样本质量}$$

2.4 奶制手参综合评分计算方法

2.4.1 AHP 法权重确定 本实验以天麻素 (Y_1)、对羟基苯甲醇 (Y_2)、dactylorhin B (Y_3)、loroglossin (Y_4)、dactylorhin A (Y_5)、militarine (Y_6) 以及总多糖 (Y_7) 的质量分数作为指标, 经过主观分析, 确定各指标的优先顺序, 根据 AHP 理论判断矩阵 $1 \sim 9^{[8-9]}$, 构建两两比较的判断矩阵, 所有指标的重要程度为以下顺序: 即天麻素=对羟基苯甲醇>总多

糖 > dactylorhin B = dactylorhin A > loroglossin > militarine, 结果见表 2。结果显示, 得到的权重系数分别为 0.272、0.272、0.145、0.096、0.096、0.067、0.051, AHP 法经过一致性检验, 一致性指标为 0.017, 一致性比例为 0.013, 均小于 0.1, 表明该矩阵具有一致性, 所确定的权重系数有效。

表 2 AHP 层次分析矩阵

Table 2 AHP hierarchy analysis matrix

权重指标	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	权重
Y_1	1	1	2	3	3	4	5	0.272
Y_2	1	1	2	3	3	4	5	0.272
Y_3	1/2	1/2	1	2	2	2	2	0.145
Y_4	1/3	1/3	1/2	1	1	2	2	0.096
Y_5	1/3	1/3	1/2	1	1	2	2	0.096
Y_6	1/4	1/4	1/2	1/2	1/2	1	2	0.067
Y_7	1/5	1/5	1/2	1/2	1/2	1/2	1	0.051

2.4.2 CRITIC 法权重确定 将得到的各项成分数据进行标准化处理, 本实验所用指标均为正向指标, 各项成分标准化值=(测量值-最小值)/(最大值-最小值)消除量纲, 采用 SPSSAU 在线软件 (<https://spssau.com/>) 对标准化后数据进行相关性分析, 依照 CRITIC 法计算每个因素的权重, 权重系数分别为 0.185、0.166、0.169、0.134、0.120、0.116、0.110。

2.4.3 综合权重的确定 通过 AHP 法和 CRITIC 法计算评价指标天麻素、对羟基苯甲醇、总多糖、dactylorhin B、dactylorhin A、loroglossin、militarine 的相关权重, 得到的相关权重按公式 $\omega_{\text{复合}ij} = \omega_{\text{AHP}ij} \times \omega_{\text{CRITIC}ij} / \sum \omega_{\text{AHP}ij} \times \omega_{\text{CRITIC}i}$ 得到复合权重。权重系数分别为 0.319、0.287、0.155、0.081、0.073、0.049、0.036。

2.4.4 综合评分 以天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 和总多糖的综合评分 (OD) 作为参考指标, 根据公式: $OD = 100 W_1 Y_1 / Y_{1\text{max}} + 100 W_2 Y_2 / Y_{2\text{max}} + 100 W_3 Y_3 / Y_{3\text{max}} + 100 W_4 Y_4 / Y_{4\text{max}} + 100 W_5 Y_5 / Y_{5\text{max}} + 100 W_6 Y_6 / Y_{6\text{max}} + 100 W_7 Y_7 / Y_{7\text{max}}$ 。 $Y_1 \sim Y_7$ 分别为天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 和总多糖的含量, $Y_{1\text{max}} \sim Y_{7\text{max}}$ 分别为 7 个指标值中的最大值。

2.5 单因素考察手参奶制工艺

2.5.1 辅料用量的考察 取手参药材 5 份(编号 D8, 50 g/份), 分别按 1:1.0、1:1.5、1:2.0、1:2.5、1:3.0 的比例加入牛奶, 80 °C 煎煮 15 min 后, 50 °C

干燥 5 h, 即得。计算天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 和总多糖含量测定结果, 结果见表 3, 随着辅料用量的增加, 综合评分先升高后降低, 因此在后续优化实验中, 选择料液比为 1:1.5、1:2.0、1:2.5。

2.5.2 炮制温度的考察 取手参药材 5 份(编号 D8, 50 g/份), 加入 2 倍量牛奶, 分别在 60、70、80、90、

100 °C 下煎煮 15 min, 50 °C 干燥 5 h, 即得。计算天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 和总多糖含量测定结果, 结果见表 4, 随着炮制温度的增加, 综合评分呈先增加后降低的趋势, 因此在后续优化实验中, 选择炮制时间为 70、80、90 °C。

2.5.3 炮制时间的考察 取手参药材 5 份(编号 D8,

表 3 辅料用量考察结果

Table 3 Excipient dosage study results

料液比	质量分数/%							OD
	天麻素	对羟基苯甲醇	dactylorhin B	loroglossin	dactylorhin A	militarine	总多糖	
1:1.0	0.076	0.693	0.460	0.382	0.359	1.120	60.354	93.245
1:1.5	0.077	0.705	0.465	0.458	0.369	1.185	65.430	97.079
1:2.0	0.078	0.715	0.470	0.476	0.395	1.213	77.196	99.170
1:2.5	0.061	0.540	0.394	0.441	0.338	1.019	75.904	80.960
1:3.0	0.052	0.277	0.329	0.338	0.187	0.751	76.690	58.626

表 4 炮制温度考察结果

Table 4 Investigation results on processing temperature

炮制温度/ °C	质量分数/%							OD
	天麻素	对羟基苯甲醇	dactylorhin B	loroglossin	dactylorhin A	militarine	总多糖	
60	0.080	0.522	0.201	0.346	0.158	0.851	65.474	73.079
70	0.101	0.635	0.367	0.370	0.214	0.942	68.158	92.288
80	0.096	0.637	0.495	0.374	0.335	1.039	78.032	97.683
90	0.086	0.617	0.356	0.339	0.321	1.030	77.331	88.941
100	0.079	0.572	0.299	0.333	0.231	0.991	74.036	80.479

50 g/份), 加入 2 倍量牛奶, 80 °C 分别煎煮 12、13、14、15、16 min, 50 °C 干燥 5 h, 即得。计算天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 和总多糖含量测定结果, 结果见表 5, 随着煎煮时间的增加, 综合评分呈先增加后降低的趋势, 因此在后续优化实验中, 选择炮制时间为 14、15、16 min。

2.6 BBD-RSM 优化奶制手参的炮制工艺

2.6.1 BBD 实验设计及结果 取同一批手参药材(编号 D8), 通过单因素实验结果定料液比 (X_1)、

炮制温度 (X_2) 和炮制时间 (X_3) 的范围, 以 7 种化学成分含量的综合评分为响应值, 依据 Design-Expert 13.0 软件, 采用 BBD 实验设计 3 因素 3 水平的响应面分析法对工艺参数进行优化。按照 BBD 实验设计方法炮制奶制手参, BBD 实验设计及结果见表 6。

2.6.2 模型拟合与方差分析 应用 Design-Expert 13.0 软件进行数据拟合分析, 得到二元回归方程 $Y=85.380+0.1075 X_1+0.5375 X_2+1.660 X_3+X_1X_2+1.030 X_1X_3+1.560 X_2X_3-10.820 X_1^2-4.810 X_2^2-2.240$

表 5 炮制时间考察结果

Table 5 Results of processing time investigation

炮制时间/ min	质量分数/%							OD
	天麻素	对羟基苯甲醇	dactylorhin B	loroglossin	dactylorhin A	militarine	总多糖	
12	0.089	0.725	0.249	0.220	0.306	0.917	69.339	70.775
13	0.110	0.739	0.381	0.260	0.353	0.969	72.354	82.856
14	0.140	0.742	0.459	0.329	0.398	1.182	77.085	94.910
15	0.142	0.818	0.471	0.337	0.449	1.167	87.097	98.963
16	0.132	0.765	0.419	0.296	0.301	0.989	84.577	89.388

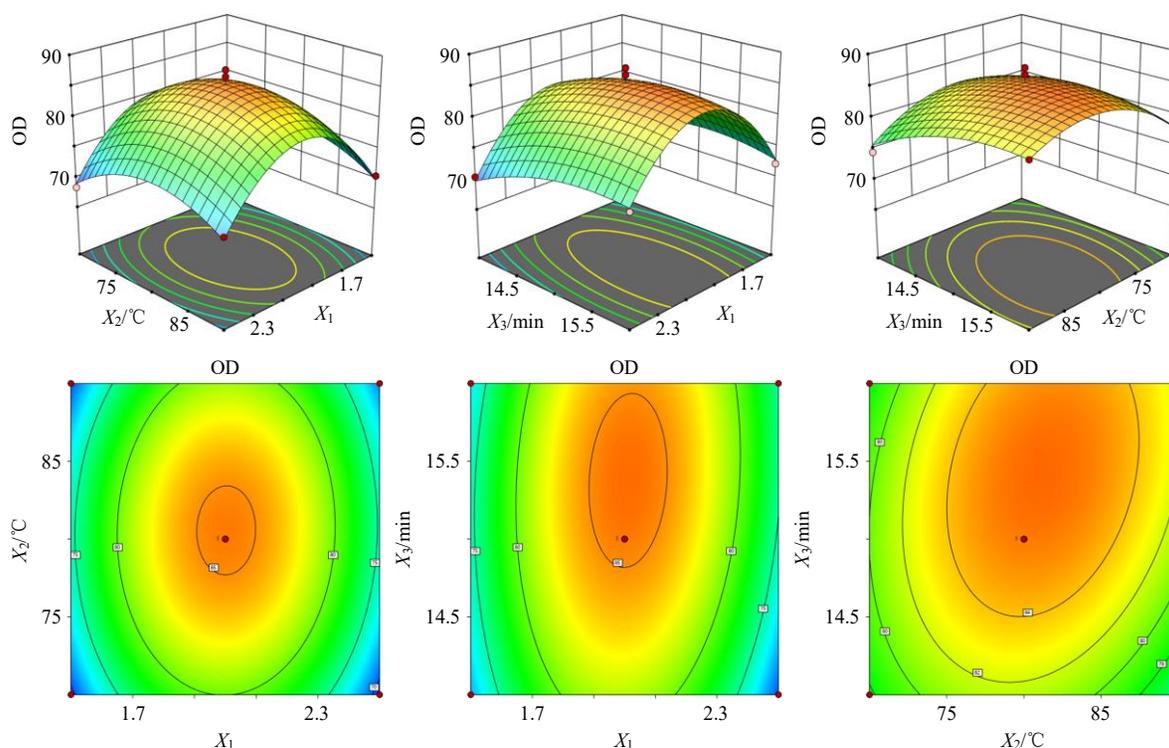


图 2 料液比 (X_1)、炮制温度 (X_2)、炮制时间 (X_3) 交互作用的三维响应面图和等高线图

Fig. 2 Three-dimensional response surface plots and contour plots illustrating interaction effects between solid-liquid ratio (X_1), processing temperature (X_2), and processing time (X_3)

表 8 验证实验结果

Table 8 Results of validation tests

序号	质量分数/%							OD	平均值	RSD/%
	天麻素	对羟基苯甲醇	dactylorhin B	loroglossin	dactylorhin A	militarine	总多糖			
1	0.149	0.673	0.356	0.285	0.333	1.708	62.892	82.955	83.446	0.544
2	0.150	0.649	0.366	0.293	0.357	1.730	65.550	83.531		
3	0.156	0.663	0.370	0.287	0.346	1.682	62.082	83.851		

家藏医院收集的临床在用传统奶制品 (编号 S1~S7) 共同进行含量测定。按“2.2.1”项下方法制备奶制手参供试品溶液,并在上述色谱条件下进样测定,计算含量,结果见表 9。结果表明,13 批奶制手参样品中天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine 质量分数分别为 0.083%~0.278%、0.153%~0.799%、0.282%~1.166%、0.181%~0.858%、0.324%~1.643%、0.549%~2.032%。

2.8 奶制手参 HPLC 指纹图谱的建立

2.8.1 色谱条件 月旭 Xtimate 系列 C_{18} 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m);用流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液进行梯度洗脱:0~12.0 min,3%~15%乙腈;12.0~20.0 min,15%~25%乙腈;20.0~22.5 min,25%~90%乙腈;22.5~30.0 min,90%乙腈;

体积流量 1 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;检测波长 220 nm;进样量 10 μ L。

2.8.2 精密度试验 取奶制手参 (编号 S1),按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.8.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,获得指纹图谱,以 3 号峰 (对羟基苯甲醇) 为参照峰 (S),计算得到各共有峰相对峰面积的 RSD<3%,相对保留时间的 RSD<3%,结果表明该仪器精密度良好。

2.8.3 稳定性试验 取奶制手参 (编号 S1),按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.8.1”项下色谱条件分别在制备后 0、2、4、6、8、12 h 进样测定,获得指纹图谱,以 3 号峰 (对羟基苯甲醇) 为参照峰 (S),计算得到各个共有峰相对峰面积的 RSD<3%,相对保留时间的 RSD<3%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

表 9 13 批奶制手参中 6 种成分的含量测定结果

Table 9 Determination results of six components in 13 batches of milk-processed *G. conopsea*

编号	质量分数/%						编号	质量分数/%					
	天麻素	对羟基苯甲醇	dactylorhin B	loroglossin	dactylorhin A	militarine		天麻素	对羟基苯甲醇	dactylorhin B	loroglossin	dactylorhin A	militarine
S1	0.278	0.348	0.662	0.689	1.179	0.549	S8	0.109	0.188	0.371	0.486	0.871	1.179
S2	0.037	0.222	0.282	0.250	0.386	0.740	S9	0.116	0.284	0.428	0.405	0.623	0.646
S3	0.088	0.365	0.654	0.524	0.978	0.677	S10	0.083	0.284	0.299	0.181	0.324	0.747
S4	0.255	0.197	1.008	0.460	0.970	0.565	S11	0.170	0.273	1.166	0.858	1.633	0.999
S5	0.092	0.222	1.035	0.834	1.643	0.796	S12	0.154	0.799	0.330	0.295	0.398	2.032
S6	0.152	0.324	0.631	0.752	1.071	0.872	S13	0.215	0.153	0.599	0.386	0.809	0.744
S7	0.109	0.237	0.336	0.252	0.422	0.893							

2.8.4 重复性试验 取奶制手参(编号 S1)供试品溶液 6 份,按照“2.8.1”项下色谱条件进行测定,获得指纹图谱,以 3 号峰(对羟基苯甲醇)为参照峰(S),计算得到各共有峰相对峰面积的 RSD<3%,相对保留时间的 RSD<3%,结果表明该方法重复性良好。

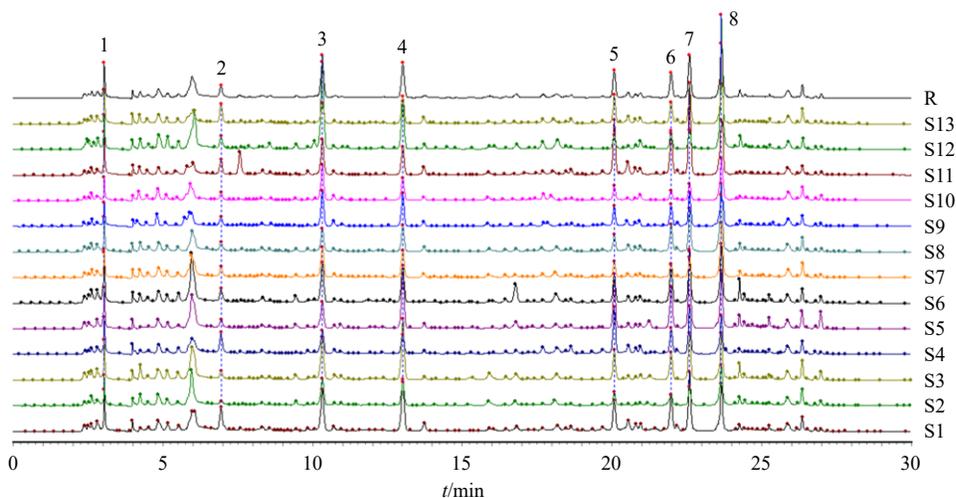
2.8.5 指纹图谱的建立与相似度评价 取 13 批奶制手参样品,按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液。精密吸取各样品溶液 10 μL,依次进样测定,记录 HPLC 色谱图 30 min,将各色谱图在检测波长为 220 nm 处的数据转换成 AIA 格式,导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版),采用中位数法,将编号 S1 样品的图谱设为参照图谱,时间窗宽度设为 0.1 min,进行多点校正和 Mark 峰匹配,得到 13 批样品的 HPLC 叠加指纹图谱及共有

模式的对照指纹图谱(图 3)。结果共确定了 8 个共有峰,通过与对照品比较,确定了 6 个色谱峰的归属,即 2 号峰为天麻素、3 号峰为对羟基苯甲醇、5 号峰为 dactylorhin B、6 号峰为 loroglossin、7 号峰为 dactylorhin A、8 号峰为 militarine。

以共有模式为对照图谱,运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版)对 13 批奶制手参进行相似性分析,得到各批次奶制手参与对照图谱的指纹图谱相似度,结果分别为 0.976、0.981、0.951、0.945、0.960、0.992、0.978、0.972、0.996、0.962、0.961、0.897、0.982,其中 S12(青海产地)相似度最低(0.897),表明不同产地的奶制手参含量存在一定的差异。

2.9 统计分析

2.9.1 层次聚类分析(hierarchical cluster analysis,



2-天麻素; 3-对羟基苯甲醇; 5-dactylorhin B; 6-loroglossin; 7-dactylorhin A; 8-militarine。
2-gastrodin; 3-p-hydroxybenzyl alcohol; 5-dactylorhin B; 6-loroglossin; 7-dactylorhin A; 8-militarine。

图 3 13 批奶制手参 HPLC 叠加指纹图谱(S1~S13)及其对照指纹图谱(R)

Fig. 3 Overlaid HPLC fingerprint chromatograms of 13 batches of milk-processed *G. conopsea* (S1—S13) and their reference fingerprint (R)

HCA) 采用不同批次的奶制手参样品中 8 个共有峰的峰面积作为变量, 运用 SPSS 26.0 软件进行系统聚类分析。分析方法选择组间联接法 (between-groups linkage), 距离度量采用平方欧氏距离^[12]。聚类分析结果 (图 4) 显示, 当欧式距离阈值为 5 时, 13 批奶制手参样品可划分为 3 个聚类群: 第 1 类包含 S5 和 S11 2 个批次; 第 2 类仅包含 S12 批次; 其余 9 个批次 (S1~S4、S6~S10) 聚为第 3 类。这一聚类模式表明, 不同批次的奶制手参在化学成分含量上存在明显差异。

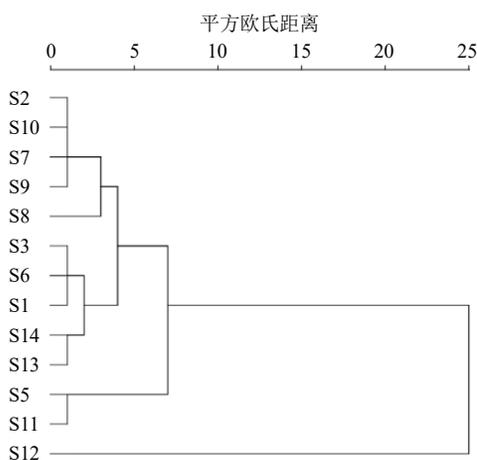


图 4 不同批次奶制手参聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis plot of different batches of dairy ginseng products

2.9.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以 13 批奶制手参中共有峰的峰面积为变量, 采用 SIMCA 14.1 软件进行 PCA, 结果 (图 5) 显示, 样品可分为 3 类: S5 和 S11 聚为一类, S12 单独成类, 其余批次 (S1~S4、S6~S10) 聚为第 3 类。这一分类模式与 HCA 结果高度一致, 该分析不仅佐证了 HCA 的可靠性, 同时为后续关键差异成分的筛选提供了依据^[13]。

2.9.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal

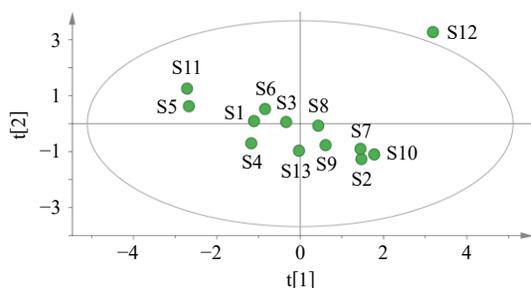


图 5 13 批奶制手参的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot for 13 batches of milk-processed *G. conopsea*

partial least squares-discrimination analysis, OPLS-DA) 为了进一步明确不同批次样品间的差异性成分, 选取 13 批奶制手参的 8 个主要共有峰的峰面积作为变量, 采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA, 结果如图 6-A 所示。OPLS-DA 模型中累积解释能力参数 R^2_{Xcum} 为 0.921, R^2_{Ycum} 为 0.873, 预测能力参数 Q^2_{cum} 为 0.696 > 0.5, 表明所建模型稳定、可靠。

为进一步评估模型的准确性和预测能力, 对模型采取 200 次置换实验, 结果 (图 6-B) 显示, $Q^2 = -1.36 < 0$, 表明模型不存在拟合过的现象, 即置换检验过关, 模型准确、预测力强。根据此模型可得 VIP 值得分图 (图 6-C), 以 $VIP > 1$ 为标准, 确定峰 8 (militarine) 和峰 3 (对羟基苯甲醇) 为关键差异成分, 其 VIP 值依次降低, 表明二者在不同批次间含量差异显著, 可能是影响奶制手参质量特征的主要化学标志物。

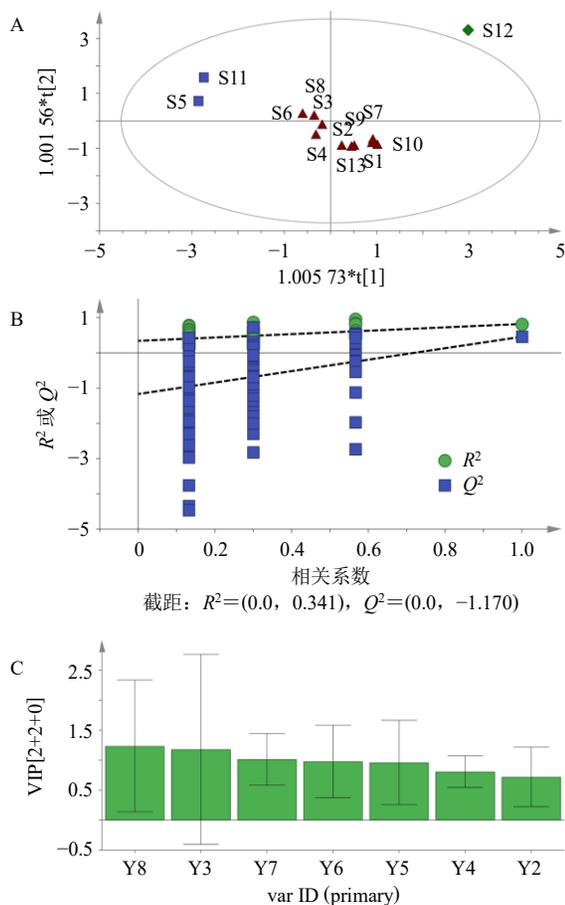


图 6 13 批奶制手参的 OPLS-DA 得分图 (A)、OPLS-DA 置换检验图 (B)、VIP 得分图 (C)

Fig. 6 OPLS-DA score plot (A), OPLS-DA permutation test plot (B), VIP score chart (C) for 13 batches of milk-processed *G. conopsea*

3 讨论

在前期预实验中,系统考察了不同烘干时长(1~6 h,梯度设置6个时间点)对奶制手参感官品质的影响。结果表明,当烘干时间 ≤ 4 h时,产品质地偏软且伴有轻微刺激性气味;延长至6 h则出现微糊现象,故最终确定5 h为最佳烘干时长。单因素考察指标选择的依据主要基于2个方面:其一,有机酸苯酯糖苷类是由天麻素与2-异丁基酒石酸或2-异丁基苹果酸形成的单酯或双酯类化合物,作为手参关键药效成分具有益智、镇静等活性^[14-16],其结构中的天麻素片段可通过酯酶水解释放,具有与天麻素及其苷元相似的活性;其二,经奶制处理后多糖的含量显著提升。因此,本研究选取6种天麻素类衍生物(天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A和militarine)及多糖作为评价指标。采用BBD-RSM进行工艺优化时,同时引入AHP-CRITIC复合熵权法,将主观经验判断与客观数据分析相结合,既规避了纯主观赋权的科学性缺陷,又确保了信息分布的均衡性,从而获得稳定可靠的优化结果^[17-18]。

本研究对HPLC含量测定的供试品溶液制备方法进行了系统优化,考察了不同甲醇体积分数(30%、50%、70%、100%)、提取方式(回流、超声)及提取时间(15、30、45 min)对指标成分溶出的影响。结果表明,天麻素类成分因其亲水性糖苷特性,在高浓度甲醇中溶出较低,而有机溶剂浓度过低则易导致提取液黏稠,影响过滤效率^[19]。对比不同提取方法发现,超声提取效果优于回流,但延长超声时间可能引起目标成分降解。基于上述结果,最终确定50%甲醇溶液25 mL超声提取15 min为最优制备条件。此外,对色谱条件(流动相组成、检测波长、柱温、色谱柱等)进行筛选,发现以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相、220 nm检测波长及30℃柱温时,各色谱峰分离度最佳,基线稳定,符合定量分析要求。

中药指纹图谱可全面反映化学成分信息^[20],本研究首次采用HPLC技术建立奶制手参指纹图谱,指纹图谱标记了8个共有峰,通过与对照品进行对比,指认了其中6个成分(天麻素、对羟基苯甲醇、dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A、militarine)。相似度结果表明,除S12外,其余批次相似度均大于0.94。聚类分析结果呈现出一定的地域与批次差异特征。具体而言,青海产样品(S12)与四川产样

品形成了明显的分离态势。进一步观察四川产样品,发现其中的S5和S11 2个批次独自聚为一类。上述差异可能由多方面因素共同作用。其一,采收时间以及生长环境的影响。采收时间决定了手参所处的生长阶段,其内含成分会有相应变化;生长环境(土壤、气候、光照等)对手参的生长与成分积累有着至关重要的作用。其二,各地区在炮制过程中所采用的加工方法、温度控制、时间把控等环节不尽相同,炮制所用牛奶的品种、产地、营养成分等也会因地域而异,从而使得奶制手参在成分与性质上产生差异。这些因素综合作用于样品,致使结果呈现出上述的差异分布特征。后续将扩大样品的产地范围,以更全面地评估产地和工艺的综合影响。本研究通过分析发现,峰8(militarine)和峰3(对羟基苯甲醇)是奶制手参批次间差异最显著的2个成分。militarine作为手参属植物的特征性成分^[21]其含量变化可能主要与药材基源或生长环境相关;而对羟基苯甲醇作为一种常见酚类化合物,其含量波动可能更多反映加工工艺或储存条件的影响。这2种成分的差异性提示其可作为奶制手参质量控制的潜在标志物。在当前研究中,militarine被发现可明显改善痴呆模型动物的学习记忆障碍^[22],展现出其在神经保护方面的潜力。另一方面,对羟基苯甲醇作为一种临床常用药物,常用于治疗癫痫抽搐、头痛眩晕以及神经衰弱等神经性疾病^[23],其药效已被广泛认可。鉴于两者在中枢神经系统相关疾病治疗中的作用,未来研究可进一步深入探索militarine与对羟基苯甲醇治疗中枢神经系统疾病药效活性的关联,这或许能为开发新型神经治疗药物提供新的思路和方向。

综上所述,本研究确定了奶制手参的最佳炮制工艺和HPLC检测方法,首次建立了其指纹图谱,并通过化学计量学分析发现产地差异影响化学成分,对建立奶制手参科学质量控制标准提供了实验依据和方法学参考,也对促进其临床应用具有重要的意义和科学价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 西藏、青海等六省、自治区卫生局编. 藏药标准(一、二分册合订本)[M]. 青海人民出版社, 1979: 16.
- [2] 宇妥·元丹贡布等著. 马世林译. 四部医典[M]. 上海: 上海科技出版社, 1987: 276.
- [3] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 276.

- 术出版社, 1986: 88.
- [4] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 43-45.
- [5] Wang Y H, Qin W H, Yang Y J, *et al.* A study on the processing technology for *Rhizoma Coptidis* [J]. *BMC Biotechnol*, 2022, 22(1): 3.
- [6] Du L X, Lu H L, Xiao Y F, *et al.* Preparation, characterization and *in vivo* pharmacokinetic study of ginsenoside Rb₁-PLGA nanoparticles [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 18472.
- [7] Wu M Y, Xiong Y Z, Zhu L, *et al.* A comprehensive method for quality evaluation of Tibetan medicine *Synotis solidaginea* by integrating UHPLC-Q-Orbitrap MS chemical profiling and UHPLC-DAD multi-components quantification [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 241: 115983.
- [8] 樊箫雨, 杨凯丽, 李花花, 等. Box-Behnken 响应面结合基准关联度和 AHP-熵权法优化经典名方半夏泻心汤的提取工艺 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6716-6725.
- [9] 赵玥瑛, 王昌海, 张泽康, 等. Box-Behnken 设计-响应面法结合基准关联度和 AHP-熵权法优化经典名方小承气汤的提取工艺 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6472-6480.
- [10] 黄莉, 杨磊, 金凯, 等. AHP-CRITIC 综合加权联用响应面法的蜜百合炮制工艺优选及颜色相关性分析 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6174-6185.
- [11] 陈祥宁, 程世云, 李腾飞, 等. 基于 AHP-CRITIC 综合加权法结合 Box-Behnken 设计-响应面法优选建曲发酵工艺 [J]. 中草药, 2025, 56(3): 785-794.
- [12] 蒋家璐, 康安, 李琴, 等. UHPLC-QTRAP-MS 结合化学计量学分析半枝莲中多指标成分 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 437-443.
- [13] 刘仟禧, 刘梦云, 曹素芹, 等. 基于指纹图谱、化学计量学及熵权 TOPSIS-GRA 融合模型法评价不同产地大青叶的质量 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 2148-2157.
- [14] 李敏, 郭顺星, 王春兰, 等. 手参块茎化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(22): 1696-1698.
- [15] 杨帆, 刘岱琳, 邱峰, 等. 手掌参块茎中水溶性化学成分的研究 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(7): 125-128.
- [16] 岳正刚, 瞿佳辰, 朱承根, 等. 手掌参的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2852-2861.
- [17] 刘小妹, 王姗姗, 施崇精, 等. 基于 AHP-CRITIC 权重分析的 Box-Behnken 响应面法优化参膝口服液提取工艺研究 [J]. 中药材, 2019, 42(1): 150-155.
- [18] 袁诗农, 王少男, 段绪红, 等. 基于 AHP-CRITIC 复合熵权法和响应面法的蛇床子盐炙工艺优选 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2): 345-350.
- [19] 吴燕, 杜蕾蕾, 李彬, 等. UPLC 测定手参中的 6 种天麻素类成分 [J]. 华西药理学杂志, 2017, 32(1): 71-73.
- [20] 杨悦, 刘颖, 冯伟红, 等. 中药山楂核 HPLC 指纹图谱和 3 个主成分含量测定研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(11): 3000-3006.
- [21] Zi J C, Lin S, Zhu C G, *et al.* Minor constituents from the tubers of *Gymnadenia conopsea* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(6): 477-484.
- [22] 王耀, 赵香玉, 李新娅, 等. Militarine 改善慢性脑缺血大鼠认知功能障碍及白质损伤的研究 [J]. 药学报, 2016, 51(5): 738-742.
- [23] 余星霖, 罗苑, 杨丽萍, 等. 对羟基苯甲醇通过 SIRT1/PGC-1 α /TFAM 信号通路抗脑缺血再灌注损伤的作用及机制研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(1): 42-47.

[责任编辑 郑礼胜]