

熵权法结合星点设计-响应面法优化橘核的盐炙工艺[△]

雷欣荷*,陈 昕,孟 江#,孙 悦,王淑美[广东药科大学中药学院/国家中医药管理局中药数字化质量评价技术重点实验室/广东(省)教育厅高校中药质量工程技术研究中心,广州 510006]

中图分类号 R283.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)02-0165-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.02.07



摘要 目的 优化橘核的盐炙工艺。方法 以柠檬苦素、诺米林、黄柏酮含量,色差值,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基清除率为指标,采用熵权法进行综合评价,以水盐比例、闷润时间、炒制温度、炒制时间为考察因素,采用星点设计-响应面法优化橘核的盐炙工艺。结果 最优橘核盐炙工艺为水盐比例8:1(mL/g)、闷润时间22 min、炒制时间9 min、炒制温度158 ℃。经3次实验验证,优化所得工艺的平均综合评分为92.35分(RSD=2.19%),与预测值(93.25分)的相对误差为1.10%。结论 所得最优盐炙工艺稳定、可行。

关键词 橘核;盐炙工艺;熵权法;星点设计-响应面法;含量测定

Optimization of stir-frying with saltwater technology of *Citrus reticulata* by entropy weight method combined with central composite design-response surface method

LEI Xinhe, CHEN Xin, MENG Jiang, SUN Yue, WANG Shumei[School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University/Key Lab of Digital Quality Evaluation Technology of Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine/Quality Engineering Technology Research Center of Traditional Chinese Medicine in Colleges and Universities of Guangdong (Provincial) Department of Education, Guangzhou 510006, China]

ABSTRACT **OBJECTIVE** To optimize stir-frying with saltwater technology of *Citrus reticulata*. **METHODS** Taking the contents of limonin, nomilin and obacunone, color difference value and free radical scavenging rate of 1,1-diphenyl-2-trinitrophenyl hydrazine (DPPH) as the indexes, the entropy weight method was used for comprehensive evaluation. The stir-frying with saltwater technology of *C. reticulata* was optimized by central composite design-response surface method by using water-salt ratio, stewing time, frying temperature and frying time as factors. **RESULTS** The optimal stir-frying with saltwater technology of *C. reticulata* included water-salt ratio of 8:1 (mL/g), stewing time of 22 min, frying time of 9 min and frying temperature of 158 ℃. After three times of validation tests, the average comprehensive score of the optimized technology was 92.35 (RSD=2.19%), and its relative error with the predicted value (93.25) was 1.10%. **CONCLUSIONS** The optimal stir-frying with saltwater technology is stable and feasible.

KEYWORDS *Citrus reticulata*; stir-frying with saltwater technology; entropy weight method; central composite design-response surface method; content determination

橘核为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟种子,味苦、性平,归肝、肾经,具有理气、散结、止痛的功效^[1]。现代研究表明,橘核主要含有柠檬苦素、诺米林、黄柏酮等柠檬苦素类活性成分^[2],具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-trinitrophenyl hydrazine, DPPH)自由基等活性^[3-4]。盐橘核是橘核通过盐水拌匀,闷透,再经文火炒至微黄而得,炮制后引药下行,可增强疗疝止痛的功效^[5]。历版《中国药典》、《全国中药炮制规范(1988

版)》和全国22个省市炮制规范均收录了橘核的盐炙法,但均以“用盐水拌匀,闷透,用文火加热至微黄并有香气逸出”的主观经验为判断标准,未对炮制时间、炮制温度、饮片颜色等进行明确规定和客观评价^[6];此外,目前关于橘核盐炙工艺的研究仅限于以橙皮苷单个成分或柠檬苦素和诺米林两个成分含量为指标的正交实验,指标和实验设计均较为局限^[7-8]。

色彩色差计是通过模拟人眼视觉系统,结合仪器模拟积分光学系统,根据国际照明委员会Lab颜色空间原理计算得出样品的色差值明度(L^*)、红绿色轴分量(a^*)、黄蓝色轴分量(b^*),再对数据进行分析、统计,得到样品颜色的色彩范围,最终实现对颜色的准确量化^[9-10]。在中药提取工艺研究中,对多指标的综合评价可直接影响提取工艺参数的确定,如何在综合评价中作出合理、科学的评估,确定各因素的权重是影响最优工

[△] 基金项目:国家药典委员会药品标准制修订研究项目(No.2018-Z006)

* 硕士研究生。研究方向:中药炮制原理与饮片质量标准。电话:020-39352175。E-mail:895082870@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药炮制原理与饮片质量控制。电话:020-39352175。E-mail:jiangmeng666@126.com

艺筛选的关键^[11-12]。熵权法是一种从实际数据出发,利用指标值来反映客观信息,从而确定权重的客观赋权法^[13-14]。基于此,本研究采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定了盐橘核中柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的含量;采用色彩色差计对样品的颜色进行客观、数字化处理;采用DPPH自由基清除法测定样品的抗氧化活性;以水盐比例、闷润时间、炒制温度、炒制时间为考察因素,上述各成分含量、色差值、抗氧化活性为指标,采用熵权法进行综合评价,结合星点设计-响应面法优化橘核的盐炙工艺,旨在为橘核炮制工艺探索及盐橘核的质量评价提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-20A型HPLC仪及配套的SPD-20A型检测器、CTO-10ASVP型柱温箱、LC Solution 1.26 色谱工作站(日本Shimadzu公司),R-410型色彩色差计及配套的白色校正板、粉末测试盒(日本Konica Minolta公司),FLUKE-63型非接触红外测温仪(美国Fluke公司),1530型Multiskan SkyHigh全波段微孔板酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],JP-105A型高速多功能粉碎机(永康市久品工贸有限公司),JN18C1型电陶炉(浙江欧奔智能科技有限公司),KQ-300DE型超声波清洗仪(上海凌科实业发展有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

橘核饮片(批号20191103)于2019年11月购自安国市药源商贸有限公司,经广东药科大学中药学院刘基柱副教授鉴定为芸香科植物橘*C. reticulata* Blanco的干燥成熟种子。

柠檬苦素对照品(批号CHB190219)、诺米林对照品(批号CHB180315)、黄柏酮对照品(批号CHB190126)均购自成都克洛玛生物科技有限公司,纯度均大于98%;DPPH试剂(批号D807297)购自上海麦克林生化科技有限公司;食盐购自广东省盐业集团广州有限公司;磷酸、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 盐橘核的炮制

按2020年版《中国药典》(四部)通则“0213盐炙法”炮制:取橘核50g,加食盐1g,拌匀,闷透,置于锅内,用文火加热至微黄并有香气逸出时,取出,放凉^[15]。共炮制得10批盐橘核样品(编号S1~S10)。

2 方法与结果

2.1 柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的含量测定

2.1.1 混合对照品溶液的制备 精密称取柠檬苦素、诺米林、黄柏酮对照品适量,加甲醇溶解并稀释,制成上述成分质量浓度分别为1.500、2.000、1.000 mg/mL的单一对照品贮备液;分别精密量取上述各单一对照品贮备液

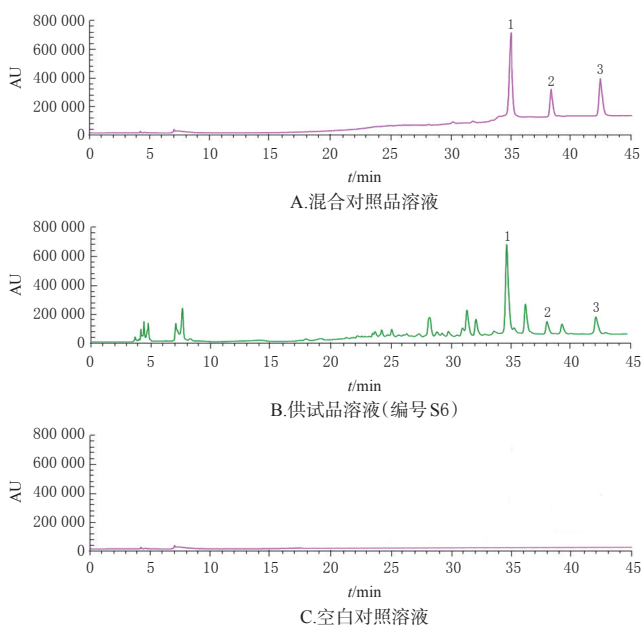
560、75、50 μ L,置于同一1 mL量瓶中,用甲醇定容,混匀,制得上述成分质量浓度分别为840、150、50 μ g/mL的混合对照品溶液。

2.1.2 线性工作溶液的制备 分别精密量取“2.1.1”项下柠檬苦素单一对照品贮备液360、460、560、660、760 μ L,诺米林单一对照品贮备液25、50、75、100、125 μ L,黄柏酮单一对照品贮备液10、30、50、70、90 μ L,置于1 mL量瓶中,用甲醇定容,制得柠檬苦素质量浓度分别为540、690、840、990、1 140 μ g/mL,诺米林质量浓度分别为50、100、150、200、250 μ g/mL,黄柏酮质量浓度分别为10、30、50、70、90 μ g/mL的线性工作溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取盐橘核样品适量,粉碎,过三号筛(下同),取粉末1 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,加甲醇15 mL,称定质量,超声(功率300 W,频率50 kHz)提取40 min,取出,冷却,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 色谱条件 以中谱红RD-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)为色谱柱,以甲醇(A)-0.3%磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~3.5 min,5% A \rightarrow 6% A;3.5~5 min,6% A;5~8 min,6% A \rightarrow 12% A;8~15 min,12% A \rightarrow 45% A;15~30 min,45% A \rightarrow 65% A;30~40 min,65% A \rightarrow 70% A;40~45 min,70% A \rightarrow 95% A);检测波长为210 nm;流速为0.8 mL/min;柱温为30 $^{\circ}$ C;进样量为20 μ L。

2.1.5 系统适用性试验 精密吸取上述混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液(甲醇),按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可见,各成分分离度均大于1.5,理论板数按柠檬苦素峰计均不低于3 000,空白对照溶液对测定无干扰。



1:柠檬苦素;2:诺米林;3:黄柏酮

图1 混合对照品、供试品、空白对照溶液的HPLC图

2.1.6 线性关系考察 取“2.1.2”项下线性工作溶液,按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以各待测成分的质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 柠檬苦素等成分的回归方程与线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g/mL})$
柠檬苦素	$Y=11\ 748\ 544.86X+1\ 556\ 167.90$	0.999 9	540~1 140
诺米林	$Y=13\ 890\ 776.00X-17\ 550.60$	0.999 9	50~250
黄柏酮	$Y=50\ 774\ 550.51X-38\ 989.05$	0.999 2	10~90

2.1.7 精密度试验 取“2.1.1”项下混合对照品溶液,按“2.1.4”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的RSD分别为2.64%、3.47%、2.83% ($n=6$),表示仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号S6),分别于室温下放置0、2、4、8、12、18、24 h时按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,柠檬苦素、诺米林、黄柏酮峰面积的RSD分别为2.91%、4.13%、3.42% ($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.9 重复性试验 取盐橘核样品(编号S6)粉末1 g,共6份,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,柠檬苦素、诺米林、黄柏酮含量的RSD分别为2.82%、3.87%、2.45% ($n=6$),表示方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的盐橘核样品(编号S6)粉末1 g,共6份,分别精密加入柠檬苦素、诺米林、黄柏酮对照品溶液(配制方法同“2.1.1”项)适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表2。

表2 柠檬苦素等成分的加样回收率试验结果($n=6$)

待测成分	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
柠檬苦素	14.868 2	15.000 0	30.728 2	105.73	105.95	2.04
	14.739 2	15.000 0	30.571 0	105.55		
	14.304 3	15.000 0	30.715 5	109.41		
	13.881 2	15.000 0	29.938 1	107.05		
	14.721 3	15.000 0	30.477 5	105.04		
	14.778 5	15.000 0	30.218 4	102.93		
诺米林	1.378 5	1.600 0	3.110 7	108.26	109.56	1.24
	1.489 5	1.600 0	3.250 1	110.04		
	1.480 5	1.600 0	3.213 4	108.31		
	1.464 0	1.600 0	3.251 8	111.74		
	1.474 5	1.600 0	3.215 5	108.81		
	1.479 0	1.600 0	3.242 4	110.22		
黄柏酮	0.843 5	1.000 0	1.906 8	106.34	106.65	1.75
	0.882 6	1.000 0	1.980 7	109.81		
	0.876 5	1.000 0	1.940 4	106.39		
	0.893 6	1.000 0	1.947 5	105.39		
	0.873 6	1.000 0	1.949 1	107.55		
	0.820 2	1.000 0	1.864 6	104.44		

2.1.11 样品含量测定 取盐橘核样品粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。

2.2 盐橘核颜色参数的测定

2.2.1 测定条件 光源为D65,标准观察角度为 2° ,照明口径为50 mm,仪器误差在色差值(ΔE^*ab)0.6以内,重复性标准偏差在 ΔE^*ab 0.07以内。

2.2.2 精密度考察 取盐橘核样品(编号S7)粉末,置于色彩色差计中,按“2.2.1”项下测定条件于同日内连续测定6次。结果显示, L^* 、 a^* 、 b^* 的RSD分别为0.09%、0.49%、0.29% ($n=6$),表明方法精密度良好。

2.2.3 重复性考察 取盐橘核样品(编号S7)粉末,共6份,置于色彩色差计中,按“2.2.1”项下测定条件测定。结果显示, L^* 、 a^* 、 b^* 的RSD分别为0.36%、1.98%、1.86% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.2.4 样品稳定性考察 取盐橘核样品(编号S7)粉末,置于色彩色差计中,按“2.2.1”项下测定条件于同日早上9:00开始,每隔2 h测定1次,连续测定6次。结果显示, L^* 、 a^* 、 b^* 的RSD分别为0.45%、1.99%、2.18% ($n=6$),表明样品日内稳定性良好。取盐橘核样品(编号S7)粉末,置于色彩色差计中,分别于放置0、1、2、3、4、5 d时同一时间点,按“2.2.1”项下测定条件测定。结果显示, L^* 、 a^* 、 b^* 的RSD分别为0.43%、2.06%、1.80% ($n=6$),表明样品日间稳定性良好。

2.2.5 样品色泽测定 取盐橘核样品粉末,置于色彩色差计中,按“2.2.1”项下测定条件测定样品粉末的颜色,每样品平行测定3次,取平均数。 $\Delta E^*ab = [(L_i^* - L_0^*)^2 + (a_i^* - a_0^*)^2 + (b_i^* - b_0^*)^2]^{1/2}$ (式中, L_0^* 、 a_0^* 、 b_0^* 表示10批盐橘核饮片的平均值,即标准饮片的色值, L_i^* 、 a_i^* 、 b_i^* 表示工艺优化条件下样品的色值; ΔE^*ab 值越小,表示炮制工艺越优)^[16]。

2.3 盐橘核抗氧化活性的测定

2.3.1 DPPH工作溶液的配制 称取DPPH粉末0.019 7 g,置于250 mL量瓶中,加75%乙醇溶解并定容,即得DPPH工作溶液。

2.3.2 提取液的制备 精密称取盐橘核样品粉末0.5 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,加甲醇20 mL,称定质量,超声(功率300 W、频率70 kHz)提取50 min,取出,冷却,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.3 DPPH自由基清除率的测定 取“2.3.1”项下DPPH工作溶液140 μL 、“2.3.2”项下盐橘核提取液30 μL ,混合于96孔板中,振荡1 min后再于30 $^\circ\text{C}$ 下避光反应30 min,使用酶标仪于517 nm波长处测定吸光度(A_1)。以水加等体积的DPPH工作溶液作为空白溶液,同法反应后,于517 nm波长处测定吸光度(A_0)。取75%乙醇140 μL ,加入“2.3.2”项下盐橘核提取液30 μL ,同法反应后,

于517 nm波长处测定吸光度(A_2)。每批盐橘核样品均平行测定3次,取平均值。按下式计算DPPH自由基清除率: DPPH自由基清除率= $[A_0-(A_1-A_2)]/A_0 \times 100\%$ ^[17]。

2.4 熵权法分析

熵是系统不确定性和无序程度的度量,可用于确定多指标评价系统中各个指标的权重,将每个评价指标作为1个随机变量,计算该指标的熵权系数,其值变化程度越大,表示越无序且能提供的信息量越大,该指标也就越重要^[13]。对于某评价指标,若综合评分越大,即概率(P_i)的信息熵(H_i)越小,权重系数(W_i)越大,表明该指标处于无序状态,在评价中所起的作用越大;反之,则表示该指标处于有序状态,在综合评价中不起作用^[13]。具体步骤如下:

(1)建立原始评价指标矩阵(X_{ij}): $X_{ij}=(X_{ij})_{mn}$ 。式中, i 表示样品值($i=1, 2, \dots, n$), j 表示指标值($j=1, 2, \dots, m$)。

(2)将原始评价指标矩阵转为概率矩阵(P_{ij}): $P_{ij} = X_{ij} / \sum_{j=1}^m X_{ij}$, ($0 \leq P_{ij} \leq 1$)。

(3)计算各项指标的 H_i : $H_i = -k \sum_{j=1}^m P_{ij} \ln P_{ij}$, $k=1/\ln(m)$ 。

(4)计算各指标的 W_i , $W_i = 1 - H_i / \sum_{i=1}^m (1 - H_i)$ 。

将每个指标的数据标准化处理为0~1的归一值(DI)值,其中柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的含量和DPPH自由基清除率的DI值越大,表示盐炙工艺越优; ΔE^*ab 的DI值越小,表示盐炙工艺越稳定^[13]。

2.5 盐橘核的工艺优化

2.5.1 单因素实验 通过查阅文献得知盐炙法的主要影响因素有水盐比例、闷润时间、炒制温度、炒制时间^[7-8],故本研究选择上述因素进行单因素实验。将各单因素考察所得各个指标数据按“2.4”项下方法对柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的含量, ΔE^*ab ,DPPH自由基清除率进行熵权法分析,计算得各指标的 W_i (表3),同时将上述各指标的数据进行标准化处理得到DI值,按下式计算综合评分(y): $y = (DI_{\text{柠檬苦素}} \times 0.0144 + DI_{\text{诺米林}} \times 0.0198 + DI_{\text{黄柏酮}} \times 0.4173 + DI_{\Delta E^*ab} \times 0.5180 + DI_{\text{DPPH自由基清除率}} \times 0.0306) \times 100$ 。该评分越高,表示盐炙工艺越优^[14]。

表3 柠檬苦素等指标的 H_i 、 W_i 测定结果

指标	H_i	W_i
柠檬苦素含量	0.999 2	0.014 4
诺米林含量	0.998 9	0.019 8
黄柏酮含量	0.976 8	0.417 3
ΔE^*ab	0.971 2	0.518 0
DPPH自由基清除率	0.998 3	0.030 6

(1)水盐比例:取橘核样品50 g,共5份,分别加入不同比例的水盐(5:1、15:2、10:1、25:2、15:1, mL/g)闷润30 min,于120 ℃炒制7 min,考察不同水盐比例对综合评分的影响。结果显示,随着水盐比例的增加,综合评

分呈先升高后降低的趋势;当水盐比例为10:1时,综合评分达到最高,故选择水盐比例为5:1~15:1(mL/g)进行后续实验。结果见图2A。

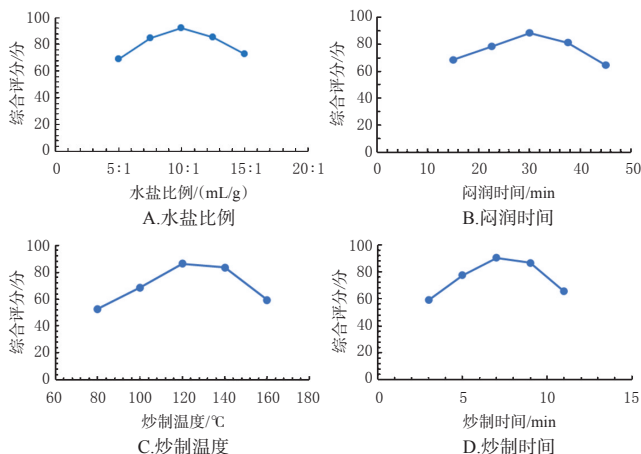


图2 水盐比例等因素对橘核盐炙工艺综合评分的影响

(2)闷润时间:取橘核样品50 g,共5份,按水盐比例10:1(mL/g)加入盐水10 mL,闷润不同时间(15、22.5、30、37.5、45 min)后,于120 ℃炒制7 min,考察不同闷润时间对综合评分的影响。结果显示,随着闷润时间的延长,综合评分呈先升高后降低的趋势;当闷润时间为30 min时,综合评分达到最高,故选择闷润时间为15~45 min进行后续实验。结果见图2B。

(3)炒制温度:取橘核样品50 g,共5份,按水盐比例10:1(mL/g)加入盐水10 mL,闷润30 min,分别于80、100、120、140、160 ℃下炒制7 min,考察不同炒制温度对综合评分的影响。结果显示,随着炒制温度的增加,综合评分呈先升高后降低的趋势;当炒制温度为120 ℃时,综合评分达到最高,故选择炒制温度为80~160 ℃进行后续实验。结果见图2C。

(4)炒制时间:取橘核样品50 g,共5份,按水盐比例10:1(mL/g)加入盐水10 mL,闷润30 min,于120 ℃分别炒制3、5、7、9、11 min,考察不同炒制时间对综合评分的影响。结果显示,随着炒制时间的延长,综合评分呈先升高后降低的趋势;当炒制时间为7 min时,综合评分达到最高,故选择炒制时间为3~11 min进行后续实验。结果见图2D。

2.5.2 星点设计-响应面法优化 以水盐比例(A)、闷润时间(B)、炒制温度(C)、炒制时间(D)为考察因素,以柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的含量, ΔE^*ab ,DPPH自由基清除率为指标,采用星点设计-响应面法优化橘核的盐炙工艺。

(1) W_i 的计算:将工艺优化结果,按“2.4”项下方法对柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的含量, ΔE^*ab ,DPPH自由基清除率进行熵权分析,计算得到各指标的 W_i ,结果见表4。由表4可知, ΔE^*ab 的 W_i 最大、 H_i 最小,表明 ΔE^*ab 的变化最大;其次为黄柏酮含量。结合熵权法得到的 W_i 对

标准化处理后的数据进行加权处理,得到综合评分(y):

$$y = (DI_{\text{柠檬苦素}} \times 0.099\ 0 + DI_{\text{诺米林}} \times 0.141\ 8 + DI_{\text{黄柏酮}} \times 0.381\ 6 + DI_{\Delta E^*ab} \times 0.466\ 7 + DI_{\text{DPPH自由基清除率}} \times 0.033\ 4) \times 100.$$

(2)星点设计:橘核盐炙工艺的因素与水平见表5,其实验设计方案与结果见表6。

表4 工艺优化后柠檬苦素等指标的 H_i 、 W_i 测定结果

指标	H_i	W_i
柠檬苦素含量	0.999 4	0.099 0
诺米林含量	0.999 4	0.141 8
黄柏酮含量	0.975 6	0.381 6
ΔE^*ab	0.970 1	0.466 7
DPPH自由基清除率	0.997 8	0.033 4

表5 橘核盐炙工艺的因素与水平

水平	A/(mL/g)	B/min	C/°C	D/min
-2	5:1	15	80	3
-1	15:2	22.5	100	5
0	10:1	30	120	7
1	25:2	37.5	140	9
2	15:1	45	160	11

表6 橘核盐炙工艺的实验设计方案与结果

试验号	A	B	C	D	柠檬苦素含量/(mg/g)	诺米林含量/(mg/g)	黄柏酮含量/(mg/g)	ΔE^*ab	DPPH自由基清除率	综合评分/分
1	1	1	1	1	11.88	2.32	0.69	1.83	0.52	61.73
2	1	1	1	-1	13.20	2.38	0.77	2.55	0.79	62.47
3	1	1	-1	1	12.64	1.74	0.35	4.99	0.73	23.12
4	1	1	-1	-1	11.89	2.15	0.28	2.43	0.77	43.73
5	1	-1	1	1	12.68	3.25	0.86	2.05	0.77	74.80
6	1	-1	1	-1	12.17	1.36	0.74	2.69	0.81	53.96
7	1	-1	-1	1	12.17	1.67	0.33	4.97	0.75	22.04
8	1	-1	-1	-1	12.62	1.82	0.34	4.61	0.80	26.92
9	-1	1	1	1	11.19	2.90	0.47	0.72	0.82	69.09
10	-1	1	1	-1	12.87	1.11	0.48	1.10	0.84	56.19
11	-1	1	-1	1	10.27	1.97	0.25	2.83	0.79	38.09
12	-1	1	-1	-1	11.84	1.85	0.25	2.88	0.76	36.88
13	-1	-1	1	1	12.18	2.18	0.48	0.47	0.82	67.33
14	-1	-1	1	-1	10.99	0.96	0.36	1.02	0.78	50.45
15	-1	-1	-1	1	11.88	1.86	0.25	2.94	0.77	36.63
16	-1	-1	-1	-1	12.42	1.84	0.24	2.82	0.57	35.02
17	2	0	0	0	11.88	1.49	0.50	4.17	0.76	33.84
18	-2	0	0	0	13.70	2.47	0.66	4.54	0.77	42.91
19	0	2	0	0	12.41	1.60	0.58	3.71	0.75	41.05
20	0	-2	0	0	13.38	1.70	0.66	4.24	0.76	40.78
21	0	0	2	0	13.29	2.45	1.18	1.46	0.63	84.97
22	0	0	-2	0	13.67	2.42	0.17	6.14	0.55	9.96
23	0	0	0	2	11.99	2.20	0.52	3.98	0.70	39.78
24	0	0	0	-2	12.41	1.74	0.53	3.91	0.76	38.37
25	0	0	0	0	13.00	1.67	0.63	3.39	0.78	46.26
26	0	0	0	0	12.83	1.67	0.56	4.20	0.78	37.42
27	0	0	0	0	11.45	2.17	0.36	2.56	0.77	45.52
28	0	0	0	0	13.70	2.49	0.61	4.10	0.76	44.78
29	0	0	0	0	12.38	1.64	0.54	4.01	0.78	37.85
30	0	0	0	0	11.58	2.61	0.58	3.84	0.56	43.72
31	0	0	0	0	11.41	1.64	0.56	4.26	0.57	33.96

(3)模型拟合与方差分析:运用Design Expert 10软件对表6中的数据进行拟合并建立二次多元回归模型,得到综合评分(y)的二次多元回归方程为 $y = 130.028\ 58 - 3.358\ 40A + 1.647\ 14B - 2.050\ 73C - 6.632\ 60D +$

$0.008\ 361AB + 0.050\ 90AC - 0.633\ 56AD - 0.007\ 60BC - 0.231\ 60BD + 0.151\ 16CD - 0.039\ 17A^2 + 0.015\ 66B^2 + 0.006\ 30C^2 + 0.186\ 49D^2$ ($P < 0.001, R^2 = 0.923\ 6$)。二次多元回归模型的 $F = 13.83, P < 0.000\ 1$,表示该模型具有显著性;失拟项中, $F = 1.89, P = 0.224\ 2$,表明失拟项不显著,说明此模型可以用于分析工艺优化的实验结果与预测最优工艺。因素C对综合评分有显著影响($P < 0.01$),因素A、B、D对综合评分无显著影响($P > 0.05$),各因素对橘核盐炙工艺的影响顺序为 $C > A > D > B$ 。二次项中, C^2 为显著项($P < 0.05$), A^2, B^2 和 D^2 为不显著项($P > 0.05$),表明因素C与综合评分并非线性关系。在交互项中,因素CD为显著项($P < 0.01$),表明炒制温度和炒制时间的交互作用明显;因素AB、AC、AD、BC、BE的交互作用不显著($P > 0.05$),表明除了炒制温度和炒制时间外,其他因素的交互作用对橘核盐炙工艺影响不大。结果见表7。

表7 回归模型的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方差	F	P
模型	7103.38	14	507.38	13.83	<0.000 1
A	63.56	1	63.56	1.73	0.206 7
B	25.39	1	25.39	0.69	0.417 7
C	6 131.43	1	6 131.43	167.07	<0.000 1
D	37.55	1	37.55	1.02	0.326 8
AB	0.39	1	0.39	0.011	0.918 8
AC	103.64	1	103.64	2.82	0.112 3
AD	90.31	1	90.31	2.46	0.136 3
BC	20.80	1	20.80	0.57	0.462 5
BD	108.61	1	108.61	2.96	0.104 6
CD	329.02	1	329.02	8.97	0.008 6
A^2	1.71	1	1.71	0.047	0.831 6
B^2	22.19	1	22.19	0.60	0.448 2
C^2	181.31	1	181.31	4.94	0.041 0
D^2	5.03	1	5.03	0.14	0.715 9
残差	587.19	16	36.70		
失拟项	445.94	10	44.59	1.89	0.224 2
纯误差	141.25	6	23.54		

(4)响应面分析及最优盐炙工艺的确定:使用Design Expert 10软件绘制各因素交互作用的响应面图和等高线图(图3)。结果显示,因素C与因素D的交互影响作用最强,曲面陡峭,等高线呈椭圆形且密集;因素C与因素A、因素D的交互影响较强,曲面较为陡峭,等高线较密集;因素A与因素B、因素D的交互影响较弱,曲面较平。根据模型预测得到橘核的盐炙工艺为水盐比例7.8:1(mL/g)、闷润时间21.77 min、炒制时间8.8 min、炒制温度158 °C。结合实际操作,确定橘核的最优盐炙工艺为水盐比例8:1(mL/g)、闷润时间22 min、炒制时间9 min、炒制温度158 °C。

(5)验证实验:取橘核50 g,按上述最优盐炙工艺进行3次实验验证。结果显示,平均综合评分为92.35分(RSD=2.19%),与预测值(93.25分)的相对误差为1.10%,表明优化所得盐炙工艺稳定,可行。结果见表8。

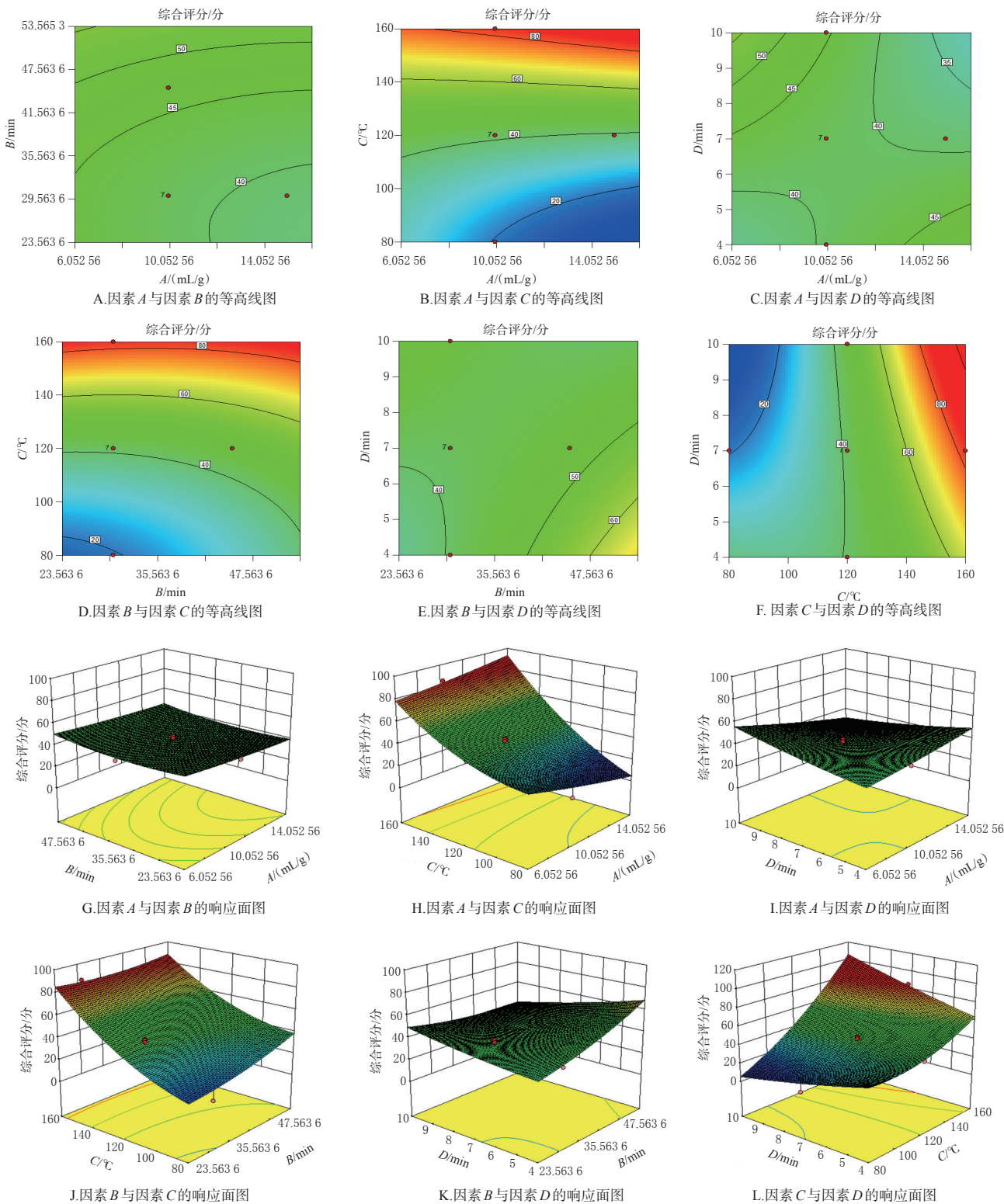


图3 各因素交互作用对综合评分影响的响应面图和等高线图

表8 橘核最优盐炙工艺的验证结果(n=3)

序号	柠檬苦素含量/ (mg/g)	诺米林含量/ (mg/g)	黄柏酮含量/ (mg/g)	ΔE^{*ab}	DPPH自由基 清除率	综合评分/ 分
1	14.97	1.30	1.40	0.92	0.66	92.81
2	15.57	1.38	1.40	1.05	0.67	90.13
3	15.02	1.36	1.42	0.90	0.68	94.09
平均值	15.19	1.35	1.41	0.96	0.67	92.35
RSD/%	2.18	3.08	0.82	8.48	1.49	2.19

3 讨论

本研究采用HPLC法建立了测定盐橘核中柠檬苦素、诺米林、黄柏酮含量的方法,采用色差计将颜色进行客观、数据化处理,并通过测定DPPH自由基清除率得出其抗氧化活性水平,旨在从样品的外观颜色、内在成分含量、药效活性等方面出发,全面客观地优化橘核盐炙工艺。

2020年版《中国药典》(一部)未记载橘核中柠檬苦素类成分的含量测定方法^[1]。目前文献报道的用于测定柠檬苦素、诺米林含量的流动相体系有甲醇-水、乙腈-水、乙腈-四氢呋喃-水、乙腈-水-磷酸缓冲液等^[8,18-20]。本课题组前期预实验结果显示,当流动相为甲醇-磷酸溶液时,各成分分离度较好,基线稳定,峰形较好,同时考虑到峰形的对称性、稳定性以及保留时间,最终选择流动相为甲醇-0.3%磷酸溶液。

有研究表明,柠檬苦素和诺米林的抗氧化活性约为维生素C的2.9~8.3倍^[4],表明两者的抗氧化活性较强。与等量维生素C相比,柠檬苦素具有较强的抗氧化活性,且其抗氧化活性明显强于诺米林^[21]。在本研究中,盐橘核对DPPH自由基的平均清除率为0.73,表明盐橘核对DPPH自由基有较强的清除活性,这种清除效果可能与其含有柠檬苦素和诺米林有关^[4]。也有研究认为,橘核经盐炙和清炒后,其含有的柠檬苦素和诺米林含量较生品显著下降^[2]。因此,盐橘核与生品橘核的抗氧化能力是否有差别,尚有待后续研究进一步证实。本研究结果显示, ΔE^{*ab} 为0.47~6.14,表明采用不同盐炙工艺的盐橘核 ΔE^{*ab} 变化较大,因此笔者认为 ΔE^{*ab} 可作为橘核盐炙工艺重点考察的指标。

熵权法可对实际发生的数据进行整理、计算和分析,得出客观权重系数,精度较高,客观性强,能够很好地解释所得结果^[13]。星点设计-响应面法可通过二次多元方程拟合各因素与响应值之间的函数关系,以回归方程优化工艺参数,具有精密度高、预测准确等优点^[16]。本课题组采用单因素实验考察了水盐比例、闷润时间、炒制时间和炒制温度对橘核盐炙工艺的影响,并对所得结果进行了熵权分析,根据不同炮制方法下各指标的变化程度来确定该指标的客观权重,使得星点设计实验方案更具科学性、客观性。结果得到橘核的最优盐炙工艺为水盐比例8:1(mL/g)、闷润时间22 min、炒制时间9 min、炒制温度158℃。优化所得工艺的平均综合评分为92.35分(RSD=2.19%),与预测值(93.25分)的相对误差为1.10%,表明该盐炙工艺稳定、可行。

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,2020:396.
 [2] 何中燕,裴瑾,莫书蓉,等.不同橘核炮制品中柠檬苦素和诺米林的测定[J].中成药,2011,33(10):1761-1764.
 [3] GENUPUR A, JESU J L R, SRINIVASAN N, et al. Synthesis and cytotoxicity of novel isomeric C-seco limonoids [J]. Eur J Med Chem, 2006, 41(8):997-1002.
 [4] 王菁.柑橘果皮中柠檬苦素类化合物的提取及其抗氧化性研究[D].雅安:四川农业大学,2009.
 [5] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2012:144.

[6] 陈昕,王绿虹,孟江,等.橘核的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(6):226-233.
 [7] 周滢,舒承倩,段恒.橘核盐制工艺的正交设计法优选[J].时珍国医国药,2016,27(2):361-362.
 [8] 王晓清,别甜甜,孙飞,等.多指标正交试验法优选橘核的盐制工艺[J].中成药,2014,36(9):1933-1936.
 [9] APETREIC, APETREI I M, VILLANUEVA S, et al. Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness[J]. Anal Chim Acta, 2010, 17, 663(1):91-97.
 [10] 张慧慧,孙灵根,黄学思,等.“电子眼”在中药炮制中应用构想[C]//中华中医药学会四大怀药与地道药材研究论坛暨中药炮制分会第二届第五次学术会与第三届会员代表大会论文集.焦作:中华中医药学会,2007:35-41.
 [11] 常占瑛,古丽巴哈尔·卡吾力,王梅,等.基于多指标权重分析和正交设计法优选方必清颗粒的提取工艺[J].中国现代应用药学,2019,36(1):64-68.
 [12] 刘小妹,程中琴,施崇精,等.基于AHP-CRITIC法的正交设计优选参膝口服液提取工艺[J].中草药,2018,49(11):2577-2583.
 [13] 曲彤,袁培培,张琳,等.基于AHP-熵权法结合D-最优设计响应面法优化玄参蒸制工艺[J].中草药,2019,50(10):2325-2331.
 [14] 赵重博,王晶,吴建华,等.响应面法优化秦皮产地加工与饮片炮制一体化工艺研究[J].中草药,2018,49(20):4753-4759.
 [15] 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,2020:32.
 [16] 梁清光,王盈,孙萌,等.基于星点设计-效应面法焦槟榔的炮制工艺优选[J].中药材,2017,40(3):580-584.
 [17] 郭雪峰,岳永德,汤锋,等.用清除有机自由基法评价竹叶提取物抗氧化能力[J].光谱学与光谱分析,2009,28(7):1578-1580.
 [18] 彭腾,邱建平,李鸿翔,等.川产柑橘属不同品种成熟果皮中柠檬苦素的含量测定[J].成都中医药大学学报,2010,33(3):69-71.
 [19] ABBASI S, ZANDI P, MIRBAGHERI E. Quantitation of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods[J]. Eur Food Res Technol, 2005, 221(1/2):202-207.
 [20] TIAN Q, MILLER E G, JAYAPRAKASHA G K, et al. An improved HPLC method for the analysis of citrus limonoids in culture media[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 846(1/2):385-390.
 [21] 孙崇德.柑桔柠檬苦素、诺米林、吡啶酮的检测及相关含量与生物活性研究[D].杭州:浙江大学,2006.

(收稿日期:2021-08-13 修回日期:2021-12-12)

(编辑:陈宏)