

黄精发酵过程中有效成分含量与色泽的相关性

胡佳莉, 刘林, 李钟*, 李毅, 韩彬*
(广东药科大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**通过测定黄精发酵过程中色度值和主要成分多糖、皂苷和洛伐他汀的含量,探讨有效成分含量与外在颜色的相关性,为红曲发酵黄精的质量控制提供参考。**方法:**将黄精接种红曲菌进行固态发酵,采用比色法测定多糖和皂苷含量, HPLC法测定发酵后新增成分洛伐他汀的含量,利用色差计测量色度值 L^* 、 a^* 、 b^* 。采用SPSS 20.0软件进行成分含量与色度值的相关性和回归分析,通过多维尺度分析和聚类分析研究发酵过程中样品之间的差异性。**结果:**随发酵时间延长,多糖含量逐步升高至第9天达到峰值,此后逐渐下降;皂苷含量整体呈升高趋势,中间略有波动;洛伐他汀含量在第15天到达峰值,此后急剧下降。相关性分析表明,多糖含量与明度值 L^* 和总色值 E^*ab 存在显著正相关关系($P<0.01$),皂苷、洛伐他汀的含量与红绿色值 a^* 存在显著正相关关系($P<0.01$)。回归分析结果显示,明度值 L^* 的变化有52.8%受多糖、皂苷和洛伐他汀含量的共同影响;在54.1%的程度上可以通过 a^* 和 L^* 预测皂苷含量,在61.7%的程度上可以通过 a^* 预测洛伐他汀含量,多糖回归模型的判定系数低于0.4,无法通过色度值预测多糖含量。多维尺度分析和聚类分析将样品按发酵时间分为0~3, 3~7, 7~11, 11~18 d四类。**结论:**红曲菌发酵黄精可导致后者有效成分和外观色泽的改变,这为黄精的发酵炮制提供了依据。此外,在一定程度上发酵黄精的色度值可用于预测样品中皂苷和洛伐他汀的含量,这为黄精发酵过程中有效成分含量的动态监测提供了一个简便快速的检查方法。

[关键词] 发酵黄精;有效成分;颜色;相关性;多元统计分析;含量预测

[中图分类号] R284.1;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0169-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.fj20200221015

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200414.1731.003.html>

[网络出版日期] 2020-4-15 09:19

Correlation Between Effective Constituent Content and Color During Fermentation of Polygonati Rhizoma

HU Jia-li, LIU Lin, LI Zhong*, LI Yi, HAN Bin*

(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University,
Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the correlation between effective constituent content and external color by measuring the chroma value and the content of polysaccharide, saponin and lovastatin during the fermentation of Polygonati Rhizoma samples, in order to provide reference for the quality control of *Monascus* fermented Polygonati Rhizoma. **Method:** Polygonati Rhizoma was inoculated with *Monascus* for solid-state fermentation, and the content of polysaccharide and saponin was determined by colorimetric method, while the content of lovastatin, a new ingredient after fermentation, was determined by HPLC. The chroma values L^* , a^* , b^* of all these samples were measured by a color difference meter. SPSS 20.0 was used to analyze the correlation and regression between component content and chroma value, and the differences between samples in the

[收稿日期] 20200221(015)

[基金项目] 广东省科学技术厅科研项目(2016A020226018)

[第一作者] 胡佳莉,在读硕士,从事中药活性成分及药效物质基础研究,E-mail:hjli961@163.com

[通信作者] *韩彬,硕士,教授,从事中药活性成分及药效物质基础研究,Tel:020-39352182,E-mail:hblz99@21cn.com;

*李钟,博士,副教授,从事中药资源开发及品质鉴定研究,Tel:020-39352176,E-mail:lizhongyxy@126.com

fermentation process was studied through multi-dimensional scale analysis and cluster analysis. **Result:** With the prolongation of fermentation time, the content of polysaccharide gradually increased to the peak value on day 9, and then gradually decreased. The content of saponin showed an rising trend in general, with slight fluctuations in the middle. Lovastatin levels peaked on day 15, and fell sharply since then. The content of polysaccharide was positively related to the lightness value L^* and the total color value E^*ab ($P < 0.01$), and the contents of saponin and lovastatin were significantly related to the red-green value a^* ($P < 0.01$). The results of regression analysis showed that 52.8% of the change in lightness value L^* was affected by the content of polysaccharide, saponin and lovastatin, and the saponin content could be predicted by a^* and L^* to the extent of 54.1%, while the lovastatin content can be predicted by a^* to the extent of 61.7%. The determination coefficient of the polysaccharide regression model was less than 0.4, so the polysaccharide content could not be predicted based on the chroma value. Through the multi-dimensional scale analysis and cluster analysis, the samples were divided into four categories according to fermentation time: 0-3, 3-7, 7-11, 11-18 d. **Conclusion:** The fermentation of *Monascus* and Polygonati Rhizoma can lead to the change of effective constituent and appearance color of the latter, which provides the basis for the fermentation process of Polygonati Rhizoma. In addition, the content of saponin and lovastatin can be predicted by the chroma value of fermented Polygonati Rhizoma to a certain extent, which provides a simple and fast inspection method for the dynamic monitoring of effective constituent content in fermented Polygonati Rhizoma.

[Key words] fermented Polygonati Rhizoma; effective constituent; color; correlation; multivariate statistical analysis; content prediction

黄精是百合科植物滇黄精、黄精或多花黄精的干燥根茎,具有补气养阴、健脾益肾的功效^[1],是一种药食两用的中药。黄精含有多糖、皂苷、黄酮、生物碱等活性成分,其中多糖和皂苷类成分含量较高,为其调节免疫功能、降血糖、调血脂的主要有效成分^[2]。黄精生品有麻舌感,刺人咽喉,因此中医临床多使用其蒸制和酒炖后的炮制品。采用以上方法炮制后,虽可消除刺激性,但其外形呈乌黑的不规则团块状,若直接冲泡饮用,难以让人接受。如何使黄精既保持原有功效,又改善色泽口感,成为一个受众喜欢的即食保健品,是一个亟待解决的问题。

采用发酵法对中药进行处理,使药材表现出比原料药更优越的生理活性,同时能促进菌种的增殖,协同增效^[3],这是近年来中药炮制新的研究方向^[4]。杨婧娟等^[5]采用药(食)用菌凸圆灵芝固态发酵黄精后发现其抗氧化活性增强,刺激性减弱。李洁等^[6]分析了肠膜明串珠菌肠膜亚种发酵黄精前后化学成分的变化,结果发现发酵后的黄精中原生苷种类以及含量减少、次生苷或苷元含量增多。杨婧娟等^[7]还研究了啤酒酵母菌发酵黄精制备黄精酵素的发酵工艺,李慧等^[8]用保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵黄精制备功能饮料,用RX60干酵母发酵黄精饮片生产黄精果酒等。虽然有人采用红曲菌

发酵黄精渣生产 monacolin K 以充分利用黄精深加工废弃物^[9],但是迄今未见采用红曲菌固态发酵黄精的研究报道。

传统中药红曲就是红曲菌与大米固态发酵而来,是天然的红色素,还具有化浊降脂作用,在民间广泛用于黄酒的酿造和肉品、糕点的着色调味等。现代研究表明,红曲菌代谢可产生洛伐他汀,后者是红曲的主要活性成分,具有降血脂作用^[10]。中药作为外源性物质为红曲菌代谢产生洛伐他汀的调控提供了新思路^[11],已有多人采用红曲菌对多味中药如丹参^[12]、葛根^[13]、人参^[14]等进行发酵,考察了发酵对于中药本身药性的改变及中药作为底物诱导红曲菌代谢产物的变化情况。

红曲发酵过程伴随着红曲色素和洛伐他汀的产生^[15],以及糖类物质的变化^[16],直观表现为样品颜色的变化。目前红曲发酵程度的判断多依靠生产者的经验和目标成分的含量,而测定成分含量的方法多复杂繁琐,发酵样品颜色的主观判断又具有模糊性,寻找一种快速准确的检测方法,可加强对发酵生产过程的控制。中药颜色的差异往往与其内在成分含量相关,外在的颜色可以在一定程度上反映内在成分含量^[17]。色差计是一种颜色偏差测试仪器,根据CIE颜色空间的色彩模型(Lab)原理,将光谱度数据的三刺激积分转换成与眼睛视觉一

致的明度 L^* (L^* 越大,表示明度越大,感觉越白)和色度 a^* (正值表示偏红,负值表示偏绿), b^* (正值表示偏黄,负值表示偏绿)^[18],可以对颜色进行客观数字化的描述,在中药领域的应用已取得较好结果^[19-20],实现了中药饮片和粉末颜色的客观量化,对色度值与成分含量进行统计学相关分析,为质量控制与分析提供了新思路和方法^[21-22]。

本文以红曲菌发酵黄精为研究对象,用色差计进行色度值检测,并测定其有效成分多糖、皂苷和洛伐他汀的含量,通过多元统计方法探究黄精发酵过程中内在成分含量的变化与外在颜色的相关性,以及不同发酵时间下样品的差异性,为红曲发酵黄精的质量控制提供参考。

1 材料

CR-410型色差计(日本柯尼卡美能达公司);UV-2600型紫外-可见分光光度计,LC-2030 Plus型高效液相色谱仪,LC-Solution工作站,AUW120D型1/10万电子分析天平(日本岛津公司);MGC-450HP型人工气候箱(上海凯朗仪器设备有限公司);SB-5200-DTA型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

紫色红曲霉菌 *Monascus purpureus* (广东省微生物菌种保藏中心, GDM3. 439); 麦芽汁琼脂培养基(广东环凯微生物科技有限公司); 葡萄糖、洛伐他汀对照品(上海麦克林生化科技有限公司, 批号分别为C10526166, C10105946, 纯度均>98%), 薯蓣皂苷元对照品(上海源叶生物科技有限公司, 批号C10J9Q52616, 纯度>98%); 乙腈色谱纯, 超纯水, 其他试剂均为分析纯。黄精样品购于云南省丽江市星宇生物有限公司, 批号分别为XY20190218, XY20190301, XY20190313, 经广东药科大学中药学院李钟副教授鉴定为百合科植物滇黄精 *Polygonatum kingianum* 的根茎。

2 方法与结果

2.1 样品制备^[23] 取生黄精适量, 粉碎成粗粒, 加入适量水和无机盐离子混匀后, 灭菌, 接种10%的红曲菌种子液, 30℃培养4 d后, 变温至25℃培养。分别取发酵第0, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 18天的样品, 55℃干燥24 h, 粉碎过4号筛, 即得发酵不同天数的黄精样品, 编号分别为d0, d3, d5, d7, d9, d11, d13, d15, d17, d18。

2.2 样品粉末色度值测定 色差计测定条件: 光源D65, 照明口径50 mm, 标准观察角2°。色差计经比色板校准后, 取适量样品进行测定, 记录色度值

数据 L^* (颜色亮度), a^* (红绿色值), b^* (黄蓝色值)。每份样品测3次, 取平均值, 并计算总值 E^*ab , 计算公式为:

$$E^*ab = \sqrt{(L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2}$$

2.3 多糖的含量测定 取发酵黄精样品, 60℃干燥至恒重, 按2015年版《中国药典》的方法进行黄精多糖的含量测定。

2.4 皂苷的含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取薯蓣皂苷元对照品5.00 mg, 置于10 mL量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得0.500 g·L⁻¹的薯蓣皂苷元对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液的制备^[24] 取发酵黄精样品, 60℃干燥至恒重, 精密称取1 g, 加入80%乙醇15 mL, 50℃超声40 min。滤过, 滤纸及滤渣用80%乙醇洗涤。洗液并入滤液, 水浴蒸干, 残渣用1%氢氧化钠溶液溶解20 mL, 用水饱和的正丁醇萃取3次, 合并正丁醇液, 水浴挥干, 残渣用甲醇溶解并定容至5 mL, 摇匀, 即得供试品溶液。

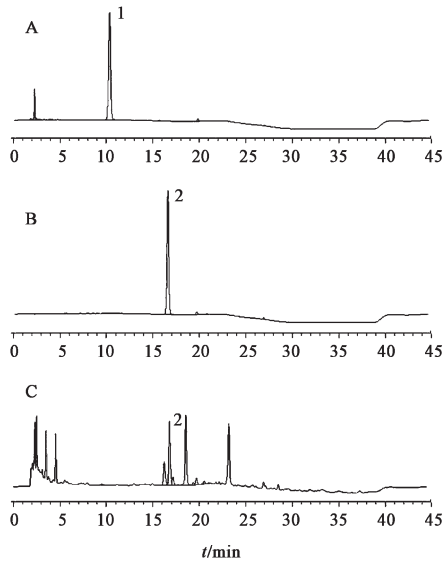
2.4.3 测定方法^[25] 精密吸取供试品溶液0.1 mL于10 mL具塞试管中, 水浴挥干甲醇, 精密加入5%香草醛乙醇溶液0.5 mL, 摇匀, 精密加入72%硫酸溶液5 mL, 混匀后置于60℃水浴加热20 min, 取出, 立即冰水浴冷却10 min。以相应试剂为空白对照, 在400~700 nm波长扫描, 对照品溶液和供试品溶液在510 nm处有最大吸收, 故检测波长最终定为510 nm。

2.4.4 方法学考察 对皂苷的含量测定方法进行方法学考察。薯蓣皂苷元的标准曲线方程为 $Y=0.3055X-0.021$ ($r=0.9993$), 线性范围0.50~2.25 g·L⁻¹, 表明线性关系良好; 取同一供试品溶液连续测定6次, 平均吸光度为0.791, RSD 0%, 说明仪器精密度良好; 取同一样品制备6份供试品溶液, 测得皂苷平均质量分数为7.425 mg·g⁻¹, RSD 2.3%, 说明方法重复性良好; 取同一供试品溶液在60 min内测得的平均吸光度为0.539, RSD 2.2%, 说明供试品溶液在60 min内显色稳定; 薯蓣皂苷元加样回收率在93.75%~98.25%, 平均回收率为95.92%, RSD 1.6%。

2.5 洛伐他汀的含量测定

2.5.1 色谱条件^[26] 采用迪马 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相0.1%三氟乙酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~6 min, 60%B; 6~24 min, 60%~95%B; 24~34 min, 95%B; 34~40 min,

95%~60%B; 40~45 min, 60%B); 柱温 18 °C; 流速 1.1 mL·min⁻¹; 检测波长 236 nm; 进样量 10 μL。液相色谱图见图 1。



1. 酸式洛伐他汀; 2. 内酯式洛伐他汀

图 1 对照品(A,B)及发酵黄精样品(C)HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference(A, B) and fermented Polygonati Rhizoma samples(C)

2.5.2 对照品溶液的制备^[27] 精密称定洛伐他汀对照品 5.04 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 用乙腈溶解并定容至刻度, 得到对照品储备液。精密吸取对照品储备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 得到质量浓度为 100.8 mg·L⁻¹ 的洛伐他汀对照品溶液。精密吸取对照品储备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 5 mL 与乙腈 3 mL, 50 °C 超声 1 h, 取出, 放冷至室温, 用 3 mol·L⁻¹ 磷酸溶液调 pH 至 7~8, 加乙腈定容至 10 mL, 摇匀, 即得质量浓度为 100.8 mg·L⁻¹ 的酸式洛伐他汀对照品溶液。

2.5.3 供试品溶液的制备^[28] 取黄精样品 1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入乙腈 10 mL, 称定质量, 40 °C 超声提取 30 min (功率 200 W, 频率 40 kHz), 放冷后用乙腈补足失重, 摇匀, 离心 15 min (转速 3 000 r·min⁻¹), 取上清液, 浓缩至 1 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

2.5.4 方法学考察 洛伐他汀的标准曲线方程为 $Y=27\ 352X-1\ 268.1$ ($r=1.000\ 0$), 线性范围为 1.000~100.800 mg·L⁻¹, 表明线性关系良好; 取同一供试品溶液, 连续测定 6 次, 平均峰面积为 185 824, RSD 1.8%, 表明仪器精密度良好; 取同一样品制备 6 份供试品溶液, 测得洛伐他汀平均质量分数为

8.38 μg·g⁻¹, RSD 2.1%, 表明方法重复性良好; 取同一供试品溶液在 24 h 内测得的平均峰面积为 181 326, RSD 2.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好; 洛伐他汀加样回收率在 98.02%~104.86%, 平均回收率为 101.54%, RSD 2.2%。

2.6 数据分析方法 采用 SPSS 20.0 软件对发酵黄精的色度值和有效成分含量进行相关性分析、逐步回归分析、多维尺度分析和聚类分析。

2.7 有效成分含量及色度值结果 将发酵黄精样品按 2.2~2.5 项下方法进行测定, 同时观察并记录样品的外观颜色, 结果见表 1。发酵过程中, 样品外观颜色由黄棕色转变为红色。色度值测定结果显示红绿色值 a^* 呈升高趋势, 黄蓝色值 b^* 呈下降趋势, 说明红色逐渐加深, 黄色逐渐减弱, 这与外观颜色的变化趋势一致。

2.7.1 有效成分含量与色度值的相关性分析 双变量相关分析用于描述变量之间关系的密切程度, 相关系数越大, 说明两变量之间关系的密切程度越大^[29]。将各发酵样品的多糖、皂苷、洛伐他汀含量和色度值 L^* , a^* , b^* , E^*ab 导入 SPSS 20.0 软件进行双变量相关分析, 见表 2。结果表明, 多糖含量与明度值 L^* , 总色值 E^*ab 呈显著正相关 ($P<0.01$); 皂苷、洛伐他汀含量与红绿色值 a^* 呈显著正相关 ($P<0.01$); 洛伐他汀含量与黄蓝色值 b^* 呈显著负相关 ($P<0.01$)。说明在一定程度上, 样品颜色变亮, 多糖含量相应升高; 样品颜色变红, 皂苷和洛伐他汀含量相应升高; 样品颜色变黄, 洛伐他汀含量相应降低。然而, 仅通过相关性分析尚不能根据色度值预测发酵样品的有效成分含量, 还需进一步进行线性回归分析。

2.7.2 有效成分含量与色度值的回归分析 多元线性回归是研究多个自变量与一个因变量之间线性关系的一种统计方法^[30]。逐步回归的基本思想是将自变量按其对因变量的显著程度由大到小逐个引入回归方程, 当引入的变量在引入新变量后变得不再显著时, 将其剔除^[31]。以样品多糖、皂苷、洛伐他汀的含量为自变量, 分别以色度值 L^* , a^* , b^* 和 E^*ab 为因变量, 进行逐步回归, 结果见表 3, 4。R 表示模型拟合优度, R^2 是判定系数, 表示拟合方程对因变量的解释程度, 对于预测模型, 要求 $R^2>0.4$ ^[32]。标准化系数绝对值越大, 说明自变量对因变量的影响越大, 正值表示自变量与因变量呈正相关, 负值则表示负相关。经逐步回归分析, L^* 的回归模型调整 R^2 值为 0.528, 说明样品明度的变化有 52.8% 是

表 1 发酵黄精有效成分、色度值及外观颜色测定($n=3$)

Table 1 Effective constituent, chroma value and external color of fermented *Polygonati Rhizoma* ($n=3$)

编号	有效成分			色度值				颜色
	多糖/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	皂苷/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	洛伐他汀/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	L^*	a^*	b^*	E^*ab	
d0	35.92±0.05	4.86±0.04	0	35.88±0.08	6.45±0.02	3.83±0.06	36.65±0.08	棕色
d3	43.36±0.16	6.17±0.20	0	44.57±0.22	5.33±0.15	10.47±0.01	46.09±0.20	棕黄色
d5	50.48±2.62	8.28±0.37	0	47.91±0.64	5.19±0.38	9.37±0.62	49.10±0.70	浅棕黄色
d7	57.86±1.75	7.01±0.39	1.64±0.04	44.47±0.31	7.35±0.68	6.30±0.26	45.52±0.23	黄色
d9	58.81±3.59	7.17±0.42	4.06±0.44	44.18±0.20	7.75±0.53	6.03±0.41	45.26±0.17	浅红色
d11	48.46±3.15	8.52±0.15	5.47±0.50	42.03±0.78	8.65±0.33	5.81±0.39	43.31±0.77	红色
d13	48.15±2.01	9.45±0.22	7.74±1.92	43.10±0.81	8.71±0.32	5.08±0.29	44.26±0.81	红色
d15	46.21±5.40	8.64±0.93	9.39±0.98	43.29±0.80	7.99±0.93	4.14±0.60	44.23±0.66	红色
d17	43.34±1.81	10.43±0.68	5.74±1.10	41.82±1.16	8.37±0.30	4.46±0.71	42.89±1.16	深红色
d18	39.30±6.17	10.00±0.52	4.67±0.22	42.63±1.09	8.31±0.49	4.32±1.36	43.66±1.10	深红色

表 2 发酵黄精有效成分含量与色度值的相关性分析($n=90$)

Table 2 Correlation analysis of effective constituent content and chroma value of fermented *Polygonati Rhizoma* ($n=90$)

有效成分	参数	L^*	a^*	b^*	E^*ab
多糖	Pearson 相关系数	0.601 ¹⁾	0.036	0.289	0.590 ¹⁾
	显著性	0.000	0.848	0.122	0.142
皂苷	Pearson 相关系数	0.281	0.595 ¹⁾	-0.304	0.275
	显著性	0.133	0.001	0.102	0.142
洛伐他汀	Pearson 相关系数	-0.038	0.794 ¹⁾	-0.588 ¹⁾	-0.047
	显著性	0.843	0.000	0.001	0.806

注:¹⁾ $P<0.01$ 。

受多糖、皂苷和洛伐他汀含量的共同影响; a^* 的回归模型调整 R^2 值为 0.617,说明样品红色值的变化有

61.7% 是受洛伐他汀含量的影响; b^* 的回归模型调整 R^2 值为 0.405,说明样品黄色值的变化有 40.5% 是受洛伐他汀和多糖含量的共同影响; E^*ab 的回归模型调整 R^2 值为 0.325,提示用多糖含量预测样品总色值 E^*ab 欠佳。

表 3 色度值回归的模型汇总及方差分析

Table 3 Model summary and analysis of variance for regression of chroma value

因变量	R	R^2	调整 R^2	P
L^*	0.759	0.577	0.528	0
a^*	0.794	0.630	0.617	0
b^*	0.668	0.446	0.405	0
E^*ab	0.590	0.348	0.325	0.001

表 4 色度值的回归分析及方程

Table 4 Regression analysis and equation of chroma value

因变量	模型	非标准化系数	标准化系数	t	P	回归方程
L^*	(常量)	24.088		7.368	0	$L^*=24.088+0.254X_1+1.067X_2-0.432X_3$
	多糖	0.254	0.641	5.003	0	
	皂苷	1.067	0.617	3.602	0.001	
	洛伐他汀	-0.432	-0.478	-2.789	0.010	
a^*	(常量)	6.175		26.418	0	$a^*=6.175+0.319X_3$
	洛伐他汀	0.319	0.794	6.907	0	
b^*	(常量)	3.141		1.542	0	$b^*=3.141+0.093X_1-0.405X_3$
	洛伐他汀	-0.405	-0.603	-4.203	0	
E^*ab	(常量)	32.668		10.914	0	$E^*ab=32.668+0.242X_1$
	多糖	0.242	0.590	3.866	0.001	

注: X_1 多糖含量; X_2 皂苷含量; X_3 洛伐他汀含量。

以色度值 L^* , a^* , b^* , E^*ab 为自变量, 分别以多糖、皂苷、洛伐他汀含量为因变量, 进行逐步回归分析, 结果见表 5, 6。多糖、皂苷、洛伐他汀含量的回归模型调整 R^2 值分别为 0.338, 0.541, 0.617, 说明在 54.1% 的程度上可以通过样品红色值 a^* 和明度值 L^* 预测皂苷含量, 在 61.7% 的程度上可以通过样品红色值 a^* 预测洛伐他汀含量。由于多糖回归模型的调整 $R^2=0.338 < 0.4$, 因此通过色度值对多糖含量的预测不够准确, 有待寻找其他指标进行分析。皂苷含量的回归方程为 皂苷含量 $= -11.130 + 0.282L^* + 0.953a^*$ ($r=0.757, P < 0.01$), 洛伐他汀含量的回归方程为 洛伐他汀含量 $= -10.768 + 1.976a^*$ ($r=0.794, P < 0.01$), 说明发酵黄精皂苷含量与色度值 L^* 和 a^* 呈正相关, 洛伐他汀含量与 a^* 呈正相关。

表 5 有效成分含量回归的模型汇总及方差分析

Table 5 Model summary and analysis of variance for regression of effective constituent content

因变量	r	R^2	调整 R^2
多糖	0.601	0.361	0.338
皂苷	0.757	0.572	0.541
洛伐他汀	0.794	0.630	0.617

注: P 均为 0。

表 6 有效成分含量的回归分析及方程

Table 6 Regression analysis and equation of effective constituent content

因变量	模型	非标准化系数	标准化系数	t	P
多糖	常量	-18.031		-1.097	0.282
	L^*	1.517	0.601	3.976	0.000
皂苷	常量	-11.130		-2.911	0.007
	a^*	0.953	0.732	5.582	0.000
洛伐他汀	常量	-10.768		-5.003	0.000
	a^*	1.976	0.794	6.907	0.000

2.7.3 不同发酵时间样品的差异性分析 多维尺度分析可以将多维空间的数据转换成低维空间构图, 将样品之间的相似度用低维空间中点与点之间的距离直观地表示出来^[33]。以不同发酵时间样品的多糖、皂苷、洛伐他汀含量和色值 L^* , a^* , b^* , E^*ab 为研究对象, 进行多维尺度分析, 见图 2。由图 2 可知, 随发酵时间的不同, 发酵样品的分布呈现一定聚类趋势。发酵 3 d 和 5 d 的样品距离相近, 两者与未发酵的样品距离较远, 说明样品在发酵 3~5 d 时与未发酵时差异较大; 发酵 5, 7, 9, 11 d 的样品排布

较为分散, 说明样品在发酵 5~11 d 的过程中性质变化比较大, 提示此时正是有效成分和颜色大幅变化的动态过程; 发酵 11, 13, 15, 17, 18 d 的样品分布集中, 说明样品发酵 11 d 后趋于稳定, 性质没有大幅变化。

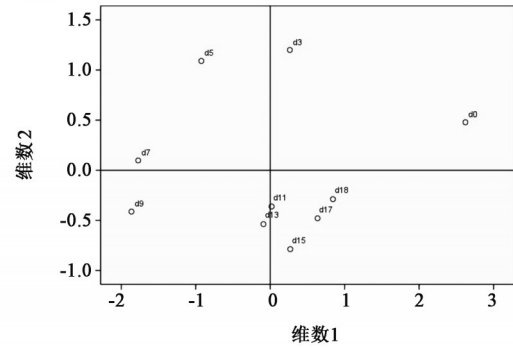


图 2 不同发酵时间样品的多维尺度分析

Fig 2 Multi-dimensional analysis of samples at different fermentation times

采用离差平方和法对不同发酵时间样品的有效成分含量和色度值进行系统聚类分析, 样本间的距离采用欧式距离, 见图 3。当欧式距离取 10 (1_1), 发酵样品被分为 3 类: 未发酵的样品单独作为一类, 发酵 3~5 d 的样品聚为第二类, 发酵 7~18 d 的样品聚为第三类。当欧式距离取 5 (1_2) 时, 发酵 7~18 d 的第三类可进一步分为两小类: 发酵 7~9 d 的样品为一类, 发酵 11~18 d 的样品为另一类。聚类分析的结果进一步验证了多维尺度分析的结果。

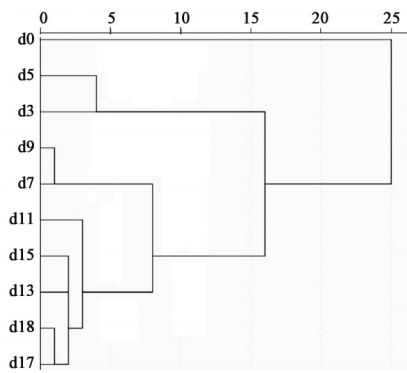


图 3 不同发酵时间样品的聚类分析

Fig 3 Cluster analysis of samples at different fermentation times

3 讨论

本研究用红曲菌对黄精进行固态发酵, 考察了 2015 年版《中国药典》收录的 3 种黄精, 结果发现滇黄精发酵后口感改变最佳, 故选定实验材料为百合科植物滇黄精。红曲发酵过程中会产生两种形式的洛伐他汀, 一种是开环结构的酸式, 一种是闭环

结构的内酯式。酸式洛伐他汀结构不稳定,在高温和强光下易转变为内酯式^[34]。酸式洛伐他汀对照品是由内酯式洛伐他汀经NaOH转化而来,并用磷酸溶液调节pH,其色谱图在2 min时出现的色谱峰为中和反应产生的钠盐。本实验所有发酵样品中均未检测到酸式洛伐他汀,可能是在55℃烘干过程中转变成了内酯式洛伐他汀。

发酵过程中,多糖含量随发酵时间的延长逐步升高,在第9天达到峰值,此后逐步下降;皂苷含量随发酵时间的延长一直在增高,虽然在第7,9,15天的时候有所下降,但整体趋势是随发酵时间的延长而增加;洛伐他汀的含量逐渐升高,在第15天达到峰值,此后急速下降。根据洛伐他汀的积累量,发酵周期应以15 d为宜。然而黄精本身含有多糖和皂苷等有效成分,后期宜结合多种有效成分总量和药效结果作为发酵终点的判断。

将发酵黄精的有效成分含量与色度值进行相关性分析和逐步回归分析,结果表明,有效成分含量与色度值存在显著相关关系。在54.1%的程度上可以通过样品红色值 a^* 和明度值 L^* 预测皂苷含量,在61.7%的程度上可以通过样品红色值 a^* 预测洛伐他汀含量。

综合发酵黄精的有效成分含量和色度值,通过多维尺度分析和聚类分析,可将发酵过程分为0~3,3~7,7~11,11~18 d共4个阶段。发酵前3 d为红曲菌生长停滞期,3~7 d红曲菌迅速生长,第7天开始产生洛伐他汀,3~11 d期间有效成分含量和颜色变化较快,11~18 d样品变化减缓,这与郭壮等^[33]和沈平等^[35]的研究结果基本一致。发酵第3~11天为红曲发酵黄精的关键阶段,需着重控制发酵条件以保证发酵产品的质量。本文初步探讨了红曲菌发酵黄精样品中有效成分的变化规律,为后续黄精样品的发酵炮制提供了依据。同时本文结果也说明了在一定程度上可通过样品粉末色度值结合回归方程推测样品中主要有效成分的含量,这为黄精发酵过程的动态监测提供了一个简便快速的检查方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:306.
[2] 陈辉,冯珊珊,孙彦君,等. 3种药用黄精的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2015,46(15):2329-2338.
[3] AGATA C, ALICJA Z K, AGNIESZKA N, et al. Suitability of the probiotic lactic acid bacteria strains

as the starter cultures in unripe cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fermentation [J]. J Food Sci Technol,2017,54(9):2936-2946.
[4] 李艳凤,翟梦颖,李雨昕,等. 发酵法在中药研究中的应用[J]. 医学综述,2020,26(4):753-757.
[5] 杨婧娟,张希,马雅鸽,等. 发酵对黄精主要活性成分及其抗氧化活性和刺激性的影响[J]. 食品工业科技,2020,doi:11.1759.ts.20190816.0921.014.
[6] 李洁,王喻淇,梅晓丹,等. 固相萃取结合UHPLC-LTQ-Orbitrap MS分析黄精发酵前后的化学成分[J]. 中草药,2019,50(13):3029-3036.
[7] 杨婧娟,张希,谭书宇,等. 黄精发酵工艺的初步研究[J]. 食品研究与开发,2016,37(17):81-88.
[8] 李慧,朱海燕. 黄精食品的开发及发展探讨[J]. 农产品加工,2019(15):86-88.
[9] 陈小林,南海珍,徐志南. 红曲菌发酵黄精渣生产monacolin K的探索性研究[J]. 药学研究,2019,38(1):12-15.
[10] 赵秀举,刘志国. 红曲洛伐他汀发酵条件优化及降脂功能[J]. 中国酿造,2014,33(1):32-35.
[11] 车鑫. 中药对产洛伐他汀红曲菌固态发酵影响的研究[D]. 无锡:江南大学,2016.
[12] 侯衍英,刘文忠,李存能,等. 红曲霉-丹参双向固态发酵工艺条件优化[J]. 化学与生物工程,2018,35(9):55-59.
[13] 宋艳秋,陈有为. 红曲霉转化中药葛根固体发酵条件研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(4):1707-1708,1745.
[14] 丛悦怡,孙佳,于恩,等. 红曲霉发酵转化人参皂苷Rg₃的研究[J]. 中草药,2018,49(6):1298-1303.
[15] 巩健,樊庆鲁. 红曲菌主要代谢产物检测方法研究进展[J]. 中国调味品,2017,42(3):166-171.
[16] 严敏嘉,李小芳,赵甜甜,等. 红曲固态发酵过程中糖类物质的动态变化分析[J]. 食品研究与开发,2018,39(3):79-83.
[17] 徐珍珍,史星星,樊旭蕾,等. 基于色差原理分析木香有效成分含量与颜色值的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13):17-21.
[18] 刘浩学. CIE均匀颜色空间与色差公式的应用[J]. 北京印刷学院学报,2003(3):3-8,12.
[19] 邓桂珠,蓝文煜,窦佩丹,等. 枳壳及其炮制品色差值与化学成分的相关性[J]. 中成药,2017,39(6):1228-1231.
[20] 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.
[21] 刘杰,徐佳,杨瑶珺,等. 基于色度分析原理的防风有效成分含量与颜色值相关性研究[J]. 现代中药研究

- 与实践,2015,29(2):20-25.
- [22] 郭换,刘飞,梅国荣,等. 色度分析花椒黄酮类成分含量与颜色值的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(6):91-97.
- [23] 杨静云,赖永勤,李宇兴,等. 山楂、泽泻、决明子与红曲霉混合发酵制备调血脂中药工艺研究[J]. 中草药,2016,47(12):2100-2107.
- [24] 黄祥元,黄美容. 黄精提取物中总皂苷含量的测定[J]. 食品与机械,2012,28(6):106-108.
- [25] 栾兰,任嘉鹏,王钢力,等. 注射用双黄连(冻干)总糖及总皂苷的含量测定[J]. 中国民族民间医药,2015,24(18):10-11.
- [26] MART T, NAESSENS T, VERONIQUE V, et al. Development and validation of a robust high-performance liquid chromatographic method for the analysis of monacolins in red yeast rice [J]. Food Chem,2017,234:33-37.
- [27] 张秋燕,王家龙,白鸽,等. 红曲药材中活性成分洛伐他汀和毒性成分桔霉素的HPLC-DAD/FLD测定[J]. 时珍国医国药,2016,27(4):816-819.
- [28] 郝盛源,王磊,李红,等. 一测多评法测定红曲及脂必妥片中洛伐他汀和洛伐他汀酸[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(5):74-78.
- [29] 周兆丁,吕锬,沈瑾,等. 统计软件SPSS相关分析及应用[J]. 电脑知识与技术,2019,15(20):301-302.
- [30] 吕邵娃,董书羽,郭玉岩,等. 数据分析技术在中药谱效关系中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,21(15):226-230.
- [31] 李嘉,陈曼译,张颖,等. 统计学建模在中药谱-效关系研究中的应用[J]. 内科,2013,8(6):586-587,595.
- [32] 史周华,张雪飞. 中医药统计学[M]. 北京:科学出版社,2009:181-185.
- [33] 郭壮,蔡宏宇,李建美,等. 不同发酵阶段红曲黄酒滋味品质变化的比较研究[J]. 中国酿造,2015,34(11):56-60.
- [34] 缙三虎,刘杰,何苗,等. 红曲中洛伐他汀的分离鉴定和稳定性评价[J]. 中成药,2016,38(5):1184-1187.
- [35] 沈平,伍军,李浩然,等. 红曲固态发酵生产洛伐他汀的实验条件优化[J]. 北京农学院学报,2005,20(3):47-51.

[责任编辑 顾雪竹]