

熊胆粉冷冻干燥工艺优化及其颜色与化学成分相关性分析

梁新颖¹, 吴琪¹, 樊毓清¹, 杜佳乐¹, 傅金荣², 付金洪², 祝婧^{1*}

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 江西天元药业有限公司, 江西 宜春 331200)

摘要: 目的 优化熊胆粉冷冻干燥工艺, 并分析其颜色与化学成分的相关性。方法 在单因素试验基础上, 以预冻时间、干燥时间、干燥温度为影响因素, 牛磺熊去氧胆酸含量、胆红素含量、冻干率、色度值的综合评分为评价指标, AHP-CRITIC 法结合正交试验优化冷冻干燥工艺。考察色度值与牛磺熊去氧胆酸、胆红素含量的相关性。结果 最佳工艺为预冻时间 3 h, 干燥时间 9 h, 干燥温度 20 ℃, 综合评分为 94.47 分。胆红素含量与色度值呈正相关 ($P < 0.05$), 牛磺熊去氧胆酸含量与后者无明显相关 ($P > 0.05$)。结论 该方法稳定可靠, 可为熊胆粉冷冻干燥工艺后续中试放大实验及药材工业化生产奠定基础。

关键词: 熊胆粉; 冷冻干燥工艺; 颜色; 化学成分; AHP-CRITIC 法; 正交试验; 相关性

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)08-2716-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.08.038

熊胆粉为熊科动物黑熊 *Selenarctos thibetanus* Cuvier 经胆囊手术的引流胆汁的干燥品^[1], 主要含有胆汁酸类、胆色素类等活性成分。现代药理研究证实, 熊胆粉具有抗炎^[2]、保肝^[3]、解热镇痛^[4]、抑菌^[5]等药理作用, 临床主要用于肝胆、心血管等疾病。

熊胆粉传统干燥方式以阴干^[6]为主, 通过自然晾干达到去除水分的目的, 但阴干周期较长, 而且干燥过程中易受环境影响, 导致其色泽和品质下降。现代干燥方式(如常压干燥、真空冷冻干燥^[7])可为熊胆粉干燥提供新选择, 其中常压干燥操作简便, 但因温度较高, 易导致有效成分损失, 进而影响其药效; 真空冷冻干燥在低温下通过真空升华的方式去除水分, 不仅能有效保留熊胆粉中有效成分含量, 还可抑制其颜色褐变^[8]。

目前, 熊胆粉缺乏明确的冷冻干燥工艺及生产规范。因此, 本实验采用 AHP-CRITIC 法结合正交试验优化熊胆粉冷冻干燥工艺, 并考察其颜色与化学成分的相关性, 以期在规范该工艺的基础上通过多维评价方法优化该药材质量评价方法, 为后续其质量标准制定提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LGJ-10E 型冷冻干燥机, 购自四环福瑞科仪科技发展(北京)有限公司; CP214 型电子天平(万分之一), 购自奥豪斯仪器(上海)有限公司; 高速台式冷冻离心机, 购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Waters 2695 型高效液相色谱仪, 购自美国 Waters 公司; GZX-

9076MBE 型电热鼓风干燥箱; 购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂; UV-B000S 型紫外可见分光光度计, 购自上海元析仪器有限公司; 减压真空干燥器, 购自科路得实验器材科技有限公司; KQ-500E 型超声波清洗器, 购自昆山市超声仪器有限公司; 3nhMH300 型电脑色差仪, 购自深圳三恩时科技有限公司。

1.2 试剂与药材 胆红素对照品(批号 B104211, 纯度 $\geq 98\%$), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 牛磺熊去氧胆酸对照品(批号 ST8580, 纯度 $\geq 98\%$), 购自北京索莱宝科技有限公司。庚烷磺酸钠(批号 S30093), 购自上海源叶有限公司; 磷酸二氢钠(批号 2310161), 购自西陇科学股份有限公司。引流熊胆汁(批号 20240216), 购自江西天元药业有限公司, 经江西中医药大学中药炮制教研室龚千锋教授鉴定为正品。甲醇、三氯甲烷均为色谱纯, 购自西陇科学股份有限公司; 水为纯净水, 购自杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品前处理 将药材过滤, 备用。

2.2 牛磺熊去氧胆酸含量测定 采用 HPLC 法。

2.2.1 色谱条件 Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(25 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相 A 为将 4.68 g 磷酸二氢钠和 2.0 g 庚烷磺酸钠溶于 400 mL 水中, 再加入 600 mL 甲醇, 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱(0~10 min, 3%~6% B; 10~16 min, 6%~10% B; 16~23 min, 10% B); 柱温 40 ℃; 检测波长

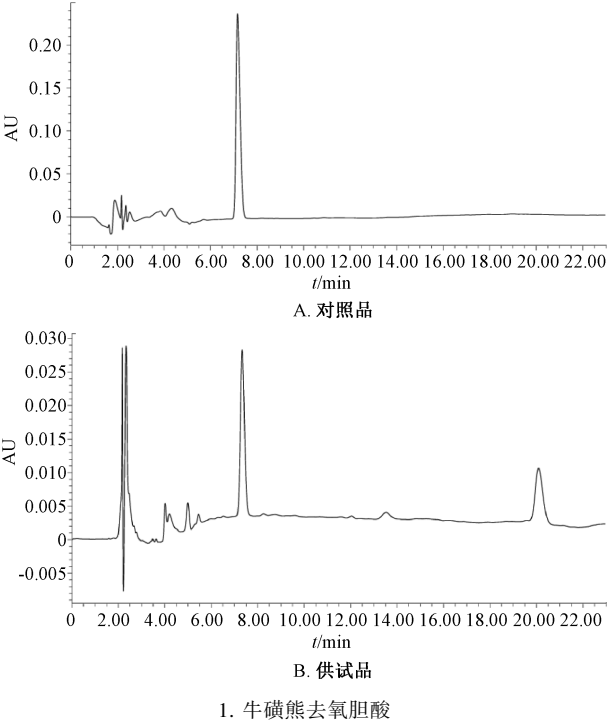
收稿日期: 2024-12-26

基金项目: 江西省重点研发计划-产业链科技创新联合体揭榜挂帅项目(20224BBG71022); 江西省“双千人才”科技创新青年类高端人才项目(S2021GDQN2519); 宜春市重点研发计划项目(宜科字[2022]62号); 江西中医药大学中药炮制技术传承创新团队项目(CXTD22003)

作者简介: 梁新颖(2000—), 女, 硕士生, 从事中药炮制研究。E-mail: 1428837592@qq.com

* **通信作者:** 祝婧(1985—), 女, 博士, 副教授, 从事中药饮片质量标准及其炮制机理研究。Tel: (0791) 87118995, E-mail: 277836041@qq.com

210 nm；进样量 10 μL。色谱图见图 1。



1. 牛磺熊去氧胆酸
图 1 牛磺熊去氧胆酸 HPLC 色谱图

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取牛磺熊去氧胆酸对照品适量，甲醇制成 1 mg/mL 的溶液，0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.3 供试品溶液制备 取药材冻干粉（过 3 号筛）约 10 mg，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇适量，超声（功率 250 W，频率 40 kHz）溶解，取出，放冷，甲醇稀释至刻度，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2.4 方法学考察

2.2.4.1 线性关系考察 精密称取对照品 10 mg，置于 10 mL 量瓶中，甲醇逐级稀释 0.2、0.3、0.6、0.8、1 倍，分别取 10 μL，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品峰面积（Y）对其质量浓度（X）进行回归，得方程为 $Y=641\,979X+19\,823$ ($r=0.996\,4$)，在 140~700 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.2.3”项下供试品溶液适量，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得牛磺熊去氧胆酸峰面积 RSD 为 2.18%，表明仪器精密度良好。

2.2.4.3 稳定性试验 精密吸取“2.2.3”项下供试品溶液适量，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得牛磺熊去氧胆酸峰面积 RSD 为 1.94%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4.4 重复性试验 精密称取 6 批药材冻干粉，每批 10 mg，在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，测得牛磺熊去氧胆酸峰面积 RSD 为 2.16%，表明该方法重复性良好。

2.2.4.5 加样回收率试验 精密称取 6 批药材冻干粉，加入等量对照品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，

在“2.2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，牛磺熊去氧胆酸平均加样回收率为 85.97%，RSD 为 2.17%。

2.3 胆红素含量测定 参照 2020 年版《中国药典》0401 通则，采用紫外分光-可见分光光度法。

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取胆红素对照品约 2 mg，置于 100 mL 棕色量瓶中，加入 80 mL 三氯甲烷，超声提取 20 min，三氯甲烷定容至刻度，摇匀，制成 20 μg/mL 溶液，即得。

2.3.2 供试品溶液制备 精密称取药材冻干粉 2 mg，置于 10 mL 棕色量瓶中，加入 8 mL 三氯甲烷，超声提取 20 min，三氯甲烷定容至刻度，摇匀，4 000 r/min 离心 10 min，取三氯甲烷层，即得。

2.3.3 吸光度测定 在 453 nm 波长处进行。

2.3.4 方法学考察 分别精密量取对照品溶液 1、2、3、4、5、6 mL，置于 10 mL 量瓶中，按“2.3.3”项下方法测定吸光度，以对照品质量浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（A）进行回归，得方程为 $A=0.076\,4X+0.004\,3$ ($r=0.999\,0$)，在 20~120 μg/mL 范围内线性关系良好。精密量取对照品溶液适量，按“2.3.3”项下方法测定吸光度 6 次，测得其 RSD 为 2.80%，表明仪器精密度良好。精密称取药材冻干粉适量，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.3.3”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 2.92%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。精密称取药材冻干粉 6 份，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.3.3”项下方法测定吸光度，测得其 RSD 为 2.31%，并且胆红素平均加样回收率为 106.2%，RSD 为 3.30%。

2.4 冻干率测定 冻干率是指物料冻干脱水后的质量与物料水分总量的比值^[9]，参照 2020 年版《中国药典》通则 0832 第三法（减压干燥法）测定含水率，计算冻干率，公式为冻干率=1-含水率。

2.5 色度分析 精密称取药材冻干粉适量，采用色差仪测量色度值 ΔL、Δa、Δb，计算平均总色差值 E_{ab}^* ，公式^[10]为 $E_{ab}^*=(L^{*2}+a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ ，平行测定 3 次，取平均值。

2.6 单因素试验 以胆红素含量、冻干率、色度值的综合评分为评价指标，计算公式^[11]为综合评分=〔（冻干率/冻干率最大值）×71.94%+（胆红素含量/胆红素含量最大值）×21.55%+（色度/色度最大值）×6.51%〕×100%。

2.6.1 预冻时间 取药材 20 g，固定干燥时间 9 h，干燥温度 40 ℃，分别考察预冻时间 1、2、3、4 h 对综合评分的影响，结果见表 1。由此可知，随着预冻时间延长，综合评分升高，超过 2 h 后降低，故选择 2、3、4 h。

2.6.2 干燥时间 取药材 20 g，固定预冻时间 2 h，干燥温度 40 ℃，分别考察干燥时间 7、9、11、13 h 对综合评分的影响，结果见表 2。由此可知，随着干燥时间延长，综合评分先升后降，为 13 h 时最低，故选择 7、9、11 h。

表 1 预冻时间对综合评分的影响

预冻时间/h	胆红素含量/%	冻干率/%	色度值	综合评分/分
1	0.1747	98.80	56.76	71.95
2	0.2205	95.82	58.66	83.99
3	0.2075	95.65	54.18	79.01
4	0.1878	98.22	55.92	74.89

表 2 干燥时间对综合评分的影响

干燥时间/h	胆红素含量/%	冻干率/%	色度值	综合评分/分
7	0.214 0	93.98	60.36	82.88
9	0.286 0	96.01	56.55	99.68
11	0.240 1	94.65	57.27	96.72
13	0.200 9	95.81	55.32	77.80

2.6.3 干燥温度 取药材 20 g，固定预冻时间 2 h，干燥时间 9 h，分别考察干燥温度 20、30、40、50 ℃对综合评分的影响，结果见表 3。由此可知，随着干燥温度增加，综合评分先升后降，可能是由于高温会破坏胆色素类成分的生物活性，故选择 20、30、40 ℃。

表 3 干燥温度对综合评分的影响

干燥温度/℃	胆红素含量/%	冻干率/%	色度值	综合评分/分
20	0.207 5	93.12	56.91	79.88
30	0.214 0	95.43	54.03	80.58
40	0.214 0	97.38	54.78	80.99
50	0.181 2	96.22	56.77	73.41

2.7 权重系数确定

2.7.1 层次分析法（AHP） 根据有效成分活性结合文献[12]报道，确定各指标优先顺序为牛磺熊去氧胆酸含量>胆红素含量>色度值>冻干率。先构建优先判断矩阵（表

4），再按公式 $W_i = \frac{(\prod_{j=1}^n a_{ij})^{\frac{1}{n}}}{\sum_{i=1}^n (\prod_{j=1}^n a_{ij})^{\frac{1}{n}}}$ ($i = 1, 2, \dots,$

n)^[13] 计算权重系数，其中 i 为列， j 为行， n 为指标数，测得牛磺熊去氧胆酸含量、胆红素含量、色度值、冻干率权重系数分别为 48.01%、25.81%、16.72%、9.47%，一致性指标因子（CR）= 0.087<0.1，符合一致性检验，表明该方法用于赋权时具有科学性。

表 4 各指标优先判断矩阵

指标	牛磺熊去氧胆酸含量	胆红素含量	色度值	冻干率
牛磺熊去氧胆酸含量	1	3	2	5
胆红素含量	0.333	1	3	2
色度值	0.5	0.333	1	2
冻干率	0.2	0.5	0.5	1

2.7.2 客观赋权法（CRITIC） 参照文献[14]报道，将各指标原始数据导入 SPSS PRO 软件并进行归一化处理，得到指标变异性、指标冲突性、信息量、权重，见表 5。

2.7.3 AHP-CRITIC 法 AHP 法依据专家评分利用方根法形成判断矩阵，主观性较强，而 CRITIC 法是一种客观赋权法，故将两者结合，有效避免主客观因素的影响，使结果

表 5 CRITIC 法各指标成分相关数据

指标	指标变异性	指标冲突性	信息量	权重/%
冻干率	0.001	2.275	0.001	2.165
色度值	0.004	1.475	0.005	8.488
胆红素含量	0.015	1.564	0.024	38.009
牛磺去氧胆酸含量	0.013	2.568	0.033	51.337

更合理^[15-16]。再计算各指标复合权重 $W_{\text{复合}}$ ，公式为 $W_{\text{复合}} = W_{\text{AHP}} W_{\text{CRITIC}} / \sum W_{\text{AHP}} W_{\text{CRITIC}}^{\text{[17]}}$ ，其中 W_{CRITIC} 为 CRITIC 法所得权重系数， W_{AHP} 为 AHP 法所得权重系数，结果牛磺熊去氧胆酸含量、胆红素含量、色度值、冻干率分别为 68.30%、27.18%、3.93%、0.58%。

2.7.4 方法比较 采用 SPSS 27.0 软件对 3 种权重系数评价方法进行相关性分析，发现 AHP 法与 AHP-CRITIC 法、CRITIC 法与 AHP-CRITIC 法的相关系数分别为 0.991、0.943，而 AHP 法与 CRITIC 法的相关性不显著（ $P > 0.05$ ），表明两者所反映的信息不重叠。为了减少主观影响，选择 AHP-CRITIC 法计算综合评分，公式为综合评分 =（冻干率/冻干率最大值）×0.58% +（胆红素含量/胆红素含量最大值）×27.18% +（牛磺熊去氧胆酸含量/牛磺熊去氧胆酸含量最大值）×68.30% +（色度/色度最大值）×3.93%，结果见表 6。

表 6 AHP-CRITIC 法计算综合评分结果

试验号	A 预冻时间/h	B 干燥时间/h	C 干燥温度/℃	综合评分/分
1	2	7	20	78.62
2	2	9	30	84.17
3	2	11	40	75.25
4	3	7	30	69.98
5	3	9	40	81.27
6	3	11	20	82.00
7	4	7	40	78.60
8	4	11	30	97.81
9	4	9	20	78.41

2.8 正交试验 在单因素试验基础上，以预冻时间（A）、干燥时间（B）、干燥温度（C）为影响因素，牛磺熊去氧胆酸含量、胆红素含量、冻干率、色度值的综合评分（Y）为评价指标，每个因素 3 个水平，进行 L_9 （ 3^4 ）设计，因素水平见表 7，结果见表 8，方差分析见表 9。

表 7 正交试验因素水平

水平	因素		
	A 预冻时间/h	B 干燥时间/h	C 干燥温度/℃
1	2	7	20
2	3	9	30
3	4	11	40

由此可知，各因素影响程度依次为 $B > C > A$ ，并且均无显著影响（ $P > 0.05$ ）；最优工艺为 $A_3 B_2 C_1$ ，即预冻时间 3 h，干燥时间 9 h，干燥温度 20 ℃。

平行取 3 批药材，每批 30 g，按上述优化工艺进行验证试验，结果见表 10。由此可知，该工艺稳定可行，重复性良好。

越亮。

综上所述，本实验筛选出熊胆粉最优冷冻干燥工艺为预冻时间 3 h，干燥时间 9 h，干燥温度 20 ℃。验证试验结果表明，上述优化工艺稳定可靠，可为后续考察传统干燥方法、真空冷冻干燥所得熊胆粉的量-效关系奠定基础。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准（新药转正标准 第 11 册）[S]. 北京：中国医药科技出版社，1997.

[2] Wang L P, Bai Y Y, Tao Y L, *et al.* Bear bile powder alleviates Parkinson’s disease-like behavior in mice by inhibiting astrocyte-mediated neuroinflammation[J]. *Chin J Nat Med*, 2023, 21(9): 710-720.

[3] Wu J S, Fang S, Li W K, *et al.* Metabolomics research on the hepatoprotective effect of cultured bear bile powder in α -naphthylisothiocyanate-induced cholestatic mice[J]. *J Chromato B*, 2020, 1153: 122269.

[4] 李新月, 苏芳芳, 蒋超, 等. 中药熊胆功效演进及成分研究概述[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(18): 4846-4853.

[5] 薛峰, 李耘, 刘健, 等. 比拜克浸膏/熊胆粉与抗炎颗粒浸膏体外抗菌作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(11): 1132-1134.

[6] 苏颂. 本草图经[M]. 合肥：安徽科学技术出版社，1994：438.

[7] 杨俊莉, 杨放, 谭瑶琳, 等. 干燥方式对熊胆粉物理特性、紫外及抑菌作用的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(2): 186-193.

[8] 邱勋荣, 李玉姗, 万琴, 等. 真空冷冻干燥对中药材质量的影响与调控技术研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(4): 1377-1388.

[9] 石召华, 陈立军, 黄文芳, 等. 七叶皂苷钠冻干粉针的工艺优化研究[J]. 中药材, 2014, 37(7): 1265-1269.

[10] 罗慧, 祝婧, 刘璐, 等. 变异系数法-AHP 综合加权联用星点设计—效应面法优选樟帮特色炮制辅料蜜麸制备工艺[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(2): 341-344.

[11] 郭丽, 赵变, 吴作敏, 等. AHP-CRITIC 法结合正交设计优选丹参心脑通胶囊提取工艺[J]. 辽宁中医杂志, 2023, 50(1): 130-134.

[12] 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.

[13] 邓雪, 李家铭, 曾浩健, 等. 层次分析法权重计算方法分析及其应用研究[J]. 数学的实践与认识, 2012, 42(7): 93-100.

[14] 刘丽珊, 张习习, 许长沙, 等. 应用 TOPSIS 和 WRSR 结合 CRITIC 方法评估中国部分地区接种单位预防接种服务能力[J]. 中国疫苗和免疫, 2023, 29(5): 493-497.

[15] 贾成友, 李微, 张传辉, 等. 基于多指标权重分析和正交设计法优选白黄泄热止痢片复方提取工艺[J]. 中草药, 2016, 47(6): 917-922.

[16] Li Y, Huang Y L, Zhang X Y, *et al.* Ecosystem health assessment: a PSR analysis combining AHP and EW methods for Sansha Bay, China[J]. *Front Mar Sci*, 2024, 11: 1396026.

[17] 俞越童, 邹慧琴, 姚月保, 等. 基于 AHP-CRITIC 法结合正交设计优选复方血竭跌打膏中四味中药提取工艺[J]. 世界科学技术（中医药现代化）, 2020, 22(8): 2807-2816.

[18] 刘松雨, 黄勤挽, 吴纯洁, 等. 冷冻干燥技术在中药领域的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(3): 930-936.

[19] 孟灵旭, 张静, 张洪涛, 等. 基于信息熵理论和反向传播人工神经网络优选人参真空冷冻干燥工艺[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(1): 91-95.

[20] 何慧楠, 唐晓雷, 刘雨霏, 等. 不同加工方法梅花鹿鹿茸中尿嘧啶等五种核苷成分的含量分析[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2395-2397.

[21] 王文祎, 杨瑶琨, 赵卫涛. 水蛭冻干粉与微粉的研究进展[J]. 中国医药科学, 2024, 14(1): 56-58; 124.

[22] 樊毓清, 祝婧, 陈泣, 等. 羊胎盘冻干饮片炮制工艺的优化[J]. 中国药房, 2024, 35(22): 2739-2743.

[23] 杨冰, 祝丹丹, 于欣茗, 等. 新世纪 20 年：守正创新背景下创新炮制技术探索与实践[J]. 中草药, 2024, 55(2): 357-365.

[24] 刘倩倩, 王升菊, 任超翔, 等. 中药辨色论质理论与方法的传承创新[J]. 中草药, 2021, 52(10): 3121-3132.