

基于指纹图谱结合色度值的不同炮制时间茅根炭差异研究

徐东婷, 李美洲, 余欣彤, 黄森, 林荣楷, 段佳佳, 张正*

广东一方制药有限公司 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244

摘要: **目的** 考察炮制过程中茅根炭饮片 UPLC 指纹图谱和色度值的差异。 **方法** 采用 UPLC 法建立白茅根、茅根炭的指纹图谱, 并采用分光测色仪测定其色度值 (L^* 、 a^* 、 b^*), 以各类分析方法分析茅根炭炮制过程中饮片指纹图谱与色度值的相关性。 **结果** 随着炮制时间的延长, 茅根炭较白茅根指纹图谱的相似度逐渐降低; 峰 1、5-羟甲基糠醛、峰 11、4-香豆酸单位峰面积先增大后减小, 其余共有峰单位峰面积均呈减小趋势; L^* 、 b^* 值整体上逐渐减小, 而 ΔE^* 逐渐增大。5-羟甲基糠醛、峰 3、峰 9 峰面积与色度值间具有极显著性或显著性。主成分分析共提取 2 个主成分, 累积方差贡献率为 88.870%。聚类分析结果显示, 炮制时间 2~6 min 聚为第 1 类, 炮制时间 8~16 min 聚为第 2 类, 炮制时间 18~30 min 聚为第 3 类。正交偏最小二乘法判别分析结果显示, 峰 1、 a^* 、 b^* 、峰 3、 L^* 、峰 12、 E^* 、5-羟甲基糠醛是茅根炭饮片炮制过程中发生质量变化的主要指标。 **结论** 不同炮制时间茅根炭饮片的色度值与 UPLC 指纹图谱密切相关, 可为茅根炭炮制过程中监测饮片质量提供参考。

关键词: 茅根炭; 色度值; 指纹图谱; 相关性; 主成分分析; 聚类分析; 正交偏最小二乘法判别分析; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R284

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)11-2723-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.010

Difference of different processing time of carbonized *Imperatae Rhizoma* based on fingerprints and chromatic values

XU Dong-ting, LI Mei-zhou, YU Xin-tong, HUANG Sen, LIN Rong-kai, DUAN Jia-jia, ZHANG Zheng

Guangdong Yi Fang Pharmaceutical Co., Ltd, Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, China

Abstract: Objective To investigate the difference between UPLC fingerprint and chromaticity value of carbonized *Imperatae Rhizoma* of different processing time. **Methods** UPLC method was used to establish fingerprint, and spectrophotometric colorimeter was used to determine the chromaticity value (L^* , a^* , b^*). And the correlation difference between UPLC fingerprint and chromaticity value of carbonized *Imperatae Rhizoma* during processing was analyzed using various analytical methods. **Results** With the prolonging of processing time, the similarity of carbonized *Imperatae Rhizoma* and *Imperatae Rhizoma* gradually decreased. The unit areas of peak 1, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), peak 11, and *p*-coumaric acid first increased and then decreased, while the other common peaks showed a decreasing trend. The values of L^* and b^* gradually decreased, while ΔE^* gradually increased. 5-HMF, peak 3, and peak 9 had extremely significant or significant correlation between peak area and chromaticity value. Two principal components were extracted by principal component analysis, and the cumulative variance contribution rate was 88.870%. The results of cluster analysis showed that the samples processed for 2 — 6, 8 — 16, and 18 — 30 min were clustered into three classes. The results of orthogonal partial least squares discriminant analysis showed that peak 1, a^* , b^* , peak 3, L^* , peak twelve, E^* , and 5-HMF were the main indexes of quality change of carbonized *Imperatae Rhizoma* during processing. **Conclusion** The chromaticity values of carbonized *Imperatae Rhizoma* at different processing times is closely related to UPLC fingerprint, which can provide reference for monitoring the quality of carbonized *Imperatae Rhizoma*.

Key words: carbonized *Imperatae Rhizoma*; chromatic value; fingerprint; correlation; principal component analysis; cluster analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; 5-hydroxymethylfurfural

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 工业和信息化部 2022 年产业技术基础公共服务平台 (2022-230-221)

作者简介: 徐东婷, 女, 执业药师, 从事中药制剂工艺与质量控制研究。E-mail: 2359452561@qq.com

*通信作者: 张正, 男, 主管中药师, 从事中药制剂工艺与质量控制研究。E-mail: 524928277@qq.com

白茅根为禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. 的干燥根茎^[1], 性寒、味甘, 具有劳伤虚羸、补中益气、除瘀血的功效, 临床常用于血闭寒热、利小便等症^[2]。白茅根中化学成分主要为绿原酸、棕榈酸等有机酸类成分^[3-5]和多糖、葡萄糖、果糖和木糖等糖类成分^[6]。现代药理研究表明白茅根具有止血、利尿降压、抗炎镇痛、抗肿瘤、降血糖、调血脂等作用^[7-11]。茅根炭收载于《中国药典》2020 年版一部白茅根项下炮制品, 白茅根经炒制后在外观性状和功效方面均有明显差异, 但《中国药典》2020 年版一部中对茅根炭饮片鉴别项下仅作了简单的外观形状描述, 并没有明确规定茅根炭的炮制终点, 也没有规定指标成分的测定, 易导致产品质量参差不齐, 疗效难以保障, 因此急需解决该饮片的炮制工艺主观化、缺乏量化标准的问题。

中药炮制是一个动态的变化过程。在炮制过程中, 饮片外观颜色和化学成分均会随着炮制时间的不同而变化^[12]。利用分光测色仪进行色度值分析, 将样品颜色转化为多参数 (L^* 、 a^* 、 b^*) 进行定量分析, 使颜色的定性、定量描述更准确^[13]。随着相关分析仪器的的发展, 色差分析技术已被应用于红芪、大黄、牛膝等中药色度程度的判别^[14-15]。中药指纹图谱是对中药整体性化学成分表达和反映^[16]。目前中药指纹图谱结合色度值测定已在中药鉴别、质量评价和炮制过程控制等方面应用广泛^[17-18]。基于此, 本研究建立茅根炭炮制过程中的指纹图谱, 同时测定茅根炭饮片粉末的色度值, 考察不同炒制时间茅根炭饮片指纹图谱和色度值的动态变化, 为茅根炭炮制工艺的优选提供参考。

1 材料

Waters H-Class 型高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); XP26 型百万分之一天平、ME204E 型万分之一天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); Milli-Q Direct 型超纯水系统 (德国默克股份有限公司); TS7600 型分光测色仪 (深圳市三恩时科技有限公司); ARB52B+型红外测温仪 (东莞万创电子制品有限公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 111B 型二两装高速中药粉碎机 (浙江瑞安市永历制药机械有限公司)。

10 批白茅根饮片产地见表 1, 经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. 的干

燥根, 符合《中国药典》2020 年版一部白茅根项下规定。新绿原酸 (批号 DSTDX001503, 质量分数 99.58%)、隐绿原酸 (批号 DST220104-035, 质量分数 99.3%) 对照品均购自德思特生物技术有限公司, 绿原酸 (批号 110753-202119, 质量分数 96.3%)、咖啡酸 (批号 110885-201703, 质量分数 99.7%)、4-香豆酸 (批号 112037-202102, 质量分数 99.7%)、5-羟甲基糠醛 (批号 19060403, 质量分数 99.0%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。

表 1 白茅根饮片产地信息

Table 1 Origin information of *Imperatae Rhizoma*

编号	产地	编号	产地
B1	安徽省亳州市	B6	河南省南阳市
B2	安徽省亳州市	B7	河南省南阳市
B3	安徽省亳州市	B8	河北省邢台市
B4	安徽省亳州市	B9	安徽省亳州市
B5	河北省邢台市	B10	安徽省亳州市

2 方法与结果

2.1 茅根炭饮片样品的制备

取白茅根段 (编号 B5), 设置电陶炉加热功率为 1 000 W, 锅温达到 260~270 °C, 将其置热锅内, 从炮制 0 min 起, 每隔 2 min 取样 1 次, 放凉, 即得不同炮制时间的茅根炭饮片, 对应的饮片编号依次为 M1~M15。

2.2 UPLC 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Waters HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 0.2% 醋酸 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 5%→8% A; 20~50 min, 8%→25% A; 50~52 min, 25%→100% A; 52~54 min, 100%→5% A); 检测波长: 325 nm; 体积流量: 0.3 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 1 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 5-羟甲基糠醛、新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸、4-香豆酸对照品适量, 置于量瓶中, 加甲醇制成质量浓度分别为 12.55、38.98、21.14、39.91、21.36、51.74 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 分别取白茅根饮片、茅根炭饮片粉末 (过二号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10% 甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 (300 W、40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用 10% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 精密度试验 精密吸取供试品溶液（编号 M3），连续进样 6 次，以 7 号峰绿原酸为参照峰，计算得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.29%~1.01%、1.55%~2.88%。

2.2.5 重复性试验 精密称取供试品（编号 M3）适量，平行制备 6 份供试品溶液，进样测定，以 7 号峰绿原酸为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.03%~0.06%、0.12%~2.71%。

2.2.6 稳定性试验 精密称取供试品（编号 M3）适量，制备供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，以 7 号峰绿原酸为参照峰，计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.08%~0.15%、0.15%~2.95%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 UPLC 指纹图谱的建立和色谱峰的指认 取白茅根饮片（编号 B1~B10）和不同炮制时间的茅根炭饮片（编号 M1~M15），制备供试品溶液，进样测定，记录色谱图。将色谱图分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）》，以编号 B1、M1 样品色谱图为参照图谱，将时间窗宽度设为 0.1 min，采用多点校正法进行峰匹配，建立 UPLC 叠加指纹图谱，见图 1、2。10 批白茅根饮片共标定 11 个共有峰，与对照品溶液色谱图比对，共指认 5 个色谱峰，分别为新绿原酸（4 号峰）、咖啡酸（6 号峰）、绿原酸（7 号峰）、隐绿原酸（9 号峰）、4-香豆酸（10 号峰）。不同炮制时间的茅根炭饮片共标定 12 个共有峰，其中 5-羟甲基糠醛（2 号峰）为经炮制后被检测到的，说明其可能为茅根炭炒炭后的新增成分，可作为区分白茅根饮片与茅根炭饮片的关键指标。当茅根炭饮片炮制 8 min 时，咖啡酸已无法检出。

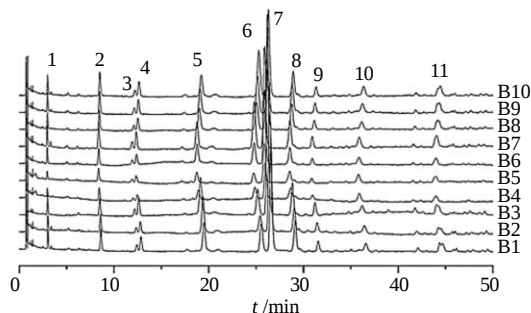


图 1 白茅根饮片 UPLC 叠加指纹图谱
Fig. 1 Superimposed UPLC fingerprint of *Imperatae Rhizoma*

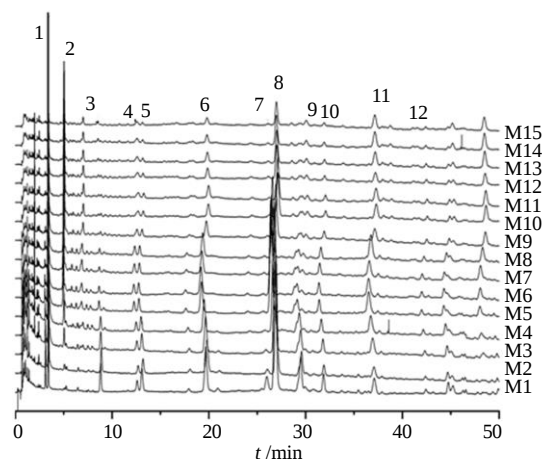


图 2 茅根炭饮片 UPLC 叠加指纹图谱
Fig. 2 Superimposed UPLC fingerprint of carbonized *Imperatae Rhizoma*

2.2.8 茅根炭制过程中图谱动态变化分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）》对不同批次白茅根饮片（编号 B1~B10）和不同炮制时间茅根炭饮片（编号 M1~M15）进行相似度评价，以编号 B1、M1 样品图谱为参照图谱，设定时间窗宽度为 0.1 min，采用多点校正法进行色谱峰匹配，中位数法生成白茅根、茅根炭饮片的对照图谱，相似度结果见表 2。10 批白茅根样品的相似度均大于 0.900，表明不同批次饮片中化学成分具有较好的一致性，批间差异较小。随着炮制时间的延长，茅根炭饮片与编号 M1 样品图谱的相似度逐渐降低。当炮制时间超过 6 min，两者相似度低于 0.800，表明茅根炭经炮制后化学成分发生了明显变化。

表 2 相似度评价结果
Tab 2 Results of similarity evaluation

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
B1	1.000	B10	0.957	M9	0.499
B2	0.987	M1	1.000	M10	0.549
B3	0.995	M2	0.941	M11	0.545
B4	0.975	M3	0.808	M12	0.546
B5	0.975	M4	0.627	M13	0.534
B6	0.996	M5	0.606	M14	0.530
B7	0.974	M6	0.633	M15	0.580
B8	0.992	M7	0.613		
B9	0.987	M8	0.590		

分别以各色谱峰单位峰面积为纵坐标，以炮制时间为横坐标进行回归分析，结果见表 3。随着炮制时间的延长，峰 1、5-HMF、峰 11、4-香豆酸的

单位峰面积呈先升后降，其余共有峰单位峰面积呈下降趋势。

表 3 单位峰面积随炮制时间变化结果

Table 3 Variation of unit peak area with processing time			
峰号	回归方程	<i>r</i>	
峰 1	$Y=-2\,736.8 X^2+73\,460 X+219\,072$	0.644 1	
5-羟甲基糠醛	$Y=-656.57 X^2+25\,851 X-69\,887$	0.912 7	
峰 3	$Y=182.44 X^2-8\,221.7 X+95\,085$	0.978 5	
峰 4	$Y=-11.937 X^2-711.22 X+33\,599$	0.835 1	
新绿原酸	$Y=-5.1924 X^2-2\,435.8 X+74\,268$	0.874 1	
峰 6	$Y=70.865 X^2-8\,611.2 X+209\,473$	0.933 9	
咖啡酸	$Y=112.65 X^2-4\,524.5 X+40\,480$	0.770 1	
绿原酸 (S)	$Y=153.65 X^2-26\,835 X+729\,881$	0.921 2	
峰 9	$Y=464.13 X^2-20\,054 X+210\,606$	0.905 6	
隐绿原酸	$Y=-40.062 X^2-764.8 X+62\,205$	0.816 6	
4-香豆酸	$Y=-158.9 X^2+4250.9 X+11\,621$	0.451 3	
峰 12	$Y=-181.45 X^2+5742.4 X+54\,605$	0.365 2	

2.3 茅根炭饮片粉末色度值测定

采用分光测色仪测量粉末颜色，选择色彩空间 CIE (L^* 、 a^* 、 b^*)，测量光源为 D65，观察角度 10° ，经白板校正后，测得各样品的 L^* 、 a^* 、 b^* ；其中 L^* 代表明亮度， L^* 越大，亮度越大； a^* 代表红绿值，负值代表绿色，正值代表红色； b^* 代表黄蓝值，负值代表蓝色，正值代表黄色^[19]。每份样品平行测定 3 次，取平均值。以白茅根生品 (B1) 样品粉末为标准品进行测定，以该粉末的 L^* 、 a^* 、 b^* 为标准值，测定 15 批炮制品样品与标准值的色差值 (ΔL^* 、 Δa^* 、 Δb^* 、 ΔE^*)，见图 3，粉末色度值见表 4。

$$\Delta L^*=L_{\text{样}}-L_0^*$$

$$\Delta a^*=a_{\text{样}}-a_0^*$$

$$\Delta b^*=b_{\text{样}}-b_0^*$$

$$\Delta E^*=[(\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^2+(\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

在茅根炭炮制过程中， L^* 值从 73.85 逐步下降到 33.53，明度下降 56.67%，呈逐渐降低趋势，自炮制 20 min (M10) 后， L^* 下降较缓慢； a^* 值呈先升后降的趋势，从 B1 到 M7 炮制品， a^* 值呈增加的趋势，随后在 M8 到 M15 炮制品， a^* 值呈降低趋势； b^* 从 24.92 逐步下降到 16.59，黄蓝值下降 33.43%，呈降低趋势。 E^* 代表总色值，在炮制过程中， E^* 从 78.00 下降到 38.42，总色差值下降了 50.75%，与明度值 L^* 下降幅度较大有关，说明样品颜色由亮变暗。粉末总色差值 ΔE^* 不断升高，表明

样品的色差逐渐增大。当 ΔE^* 大于 12.0 时，可明显区别白茅根药材生品与茅根炭炮制品^[20]。



图 3 不同炮制时间茅根炭的色彩图像

Fig. 3 Color images of carbonized *Imperatae Rhizoma* at different processing times

表 4 不同炮制时间对茅根炭饮片色度值的影响

Table 4 Effects on different processing time on chromaticity values of carbonized <i>Imperatae Rhizoma</i>						
编号	<i>t</i> /min	L^*	a^*	b^*	E^*	ΔE^*
B1	0	73.85	3.00	24.92	78.00	0.00
M1	2	73.78	4.09	26.12	78.37	1.62
M2	4	72.51	5.35	26.09	77.25	2.95
M3	6	60.59	9.27	27.2	67.06	14.84
M4	8	55.99	10.99	28.41	63.74	19.87
M5	10	50.17	10.75	26.38	57.69	24.96
M6	12	46.40	10.43	24.75	53.61	28.44
M7	14	46.70	11.22	25.85	54.54	28.38
M8	16	42.36	10.35	23.47	49.52	32.37
M9	18	37.59	9.77	20.31	43.83	37.17
M10	20	36.18	9.39	18.78	41.83	38.70
M11	22	34.61	9.80	19.30	40.82	40.22
M12	24	34.92	9.59	18.72	40.77	39.97
M13	26	35.14	9.74	19.10	41.16	39.72
M14	28	32.00	9.11	16.80	37.27	43.07
M15	30	33.53	8.74	16.59	38.42	41.57
均值		47.90	8.85	22.67	53.99	27.12
最小值		32.00	3.00	16.59	37.27	0.00
最大值		73.85	11.22	28.41	78.37	43.07

2.4 炮制过程中茅根炭颜色与成分动态关联分析

2.4.1 相关性分析 利用 SPSS 20.0 对峰面积与色度值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 E^* 进行相关分析 (表 5)。一般认为, 相关系数 $|r| \geq 0.8$ 时, 高度相关; $0.5 \leq |r| < 0.8$ 时, 中度相关; $0.3 \leq |r| < 0.5$ 时, 低度相关; $|r| < 0.3$ 时, 基本不相关^[21]。其中峰 1、峰 12 与 L^* 、 E^* 不相关; 峰 4、新绿原酸、峰 6、绿原酸、隐绿原酸与 a^* 不相关, 与 L^* 、 b^* 、 E^* 具有极显著性 ($P < 0.01$); 5-羟甲基糠醛、峰 3、峰 9 与色度值间具有极显著性或显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01); 咖啡酸与色度值 L^* 、 a^* 、 E^* 具有极显著性 ($P < 0.01$); 4-香豆酸峰面积的变化与色度值的变化无相关性, 表明随着炮制程度加深, 茅根炭中大部分成分都发生了变化。

2.4.2 主成分分析 将不同炮制时间茅根炭饮片的单位色谱峰峰面积和色度值数据导入 SPSS 20.0 软件进行因子分析, 结果见表 6。以指纹值大于 1 为提取标准, 得到前 2 个主成分的累积方差贡献率为 88.870%, 基本上可以用于表征茅根炭饮片色度值和指纹图谱的大部分信息。第 1 主成分主要反映峰 3~峰 6、绿原酸、峰 9、隐绿原酸的信息; 第 2 主成分主要反映峰 1、4-香豆酸、峰 12 的信息。

表 5 茅根炭炮制过程中共有峰峰面积与色度值的相关性分析

Table 5 Correlation analysis of mean peak area and chromatic value of carbonized *Imperatae Rhizoma*

编号	L^*	a^*	b^*	E^*
峰 1	0.156	0.639*	0.645**	0.226
5-羟甲基糠醛	0.833**	0.666**	-0.548*	-0.809**
峰 3	0.971**	0.749**	0.692**	0.952**
峰 4	0.811**	-0.181	0.895**	0.839**
新绿原酸	0.857**	-0.230	0.933**	0.885**
峰 6	0.908**	-0.325	0.914**	0.927**
咖啡酸	0.814**	-0.916**	0.403	0.775**
绿原酸	0.891**	-0.293	0.915**	0.912**
峰 9	0.921**	-0.768**	0.607*	0.896**
隐绿原酸	0.763**	-0.130	0.867**	0.792**
4-香豆酸	-0.196	0.411	0.037	-0.167
峰 12	0.127	0.532**	0.555*	0.189

*在 0.05 级别 (双侧), 相关性显著; **在 0.01 级别 (双侧), 相关性显著

*at the 0.05 level (bilateral), the correlation is significant; **at the 0.01 level (bilateral), the correlation is significant

表 6 指纹值和方差贡献率

Table 6 Characteristic value and variance contribution rate

成分	初始指纹值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	7.461	62.176	62.176	7.461	62.176	62.176
2	3.203	26.694	88.870	3.203	26.694	88.870
3	0.711	5.926	94.796			
4	0.255	2.124	96.920			
5	0.211	1.756	98.676			
6	0.089	0.746	99.422			
7	0.038	0.321	99.742			
8	0.021	0.176	99.919			
9	0.005	0.039	99.957			
10	0.003	0.025	99.982			
11	0.002	0.017	99.999			
12	0.000	0.001	100.000			

2.4.3 聚类分析 采用 SPSS 20.0 软件对色谱峰单位峰面积和色度值进行聚类分析, 采用组间连接法, 以欧式平方距离为测度, 结果见图 5。当欧式距离取 5 时, 15 批样品可分为 3 类, 炮制时间 2~

6 min 聚为第 1 类, 炮制时间 8~16 min 聚为第 2 类, 炮制时间 18~30 min 聚为第 3 类。

2.4.4 正交偏最小二乘法判别分析 为了进一步区分不同炮制程度茅根炭样品之间的差异, 采用

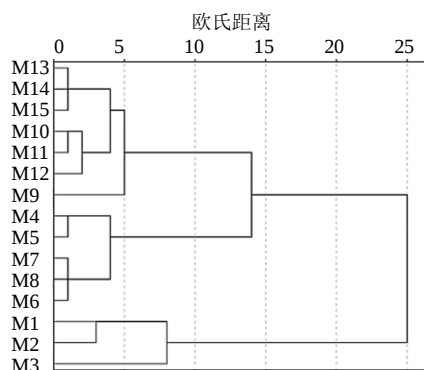


图 5 不同炮制时间茅根炭样品聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of carbonized *Imperatae Rhizoma* at different processing times

SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 分析, 得到 OPLS-DA 得分图、变量重要性投影 (VIP) 值图和 Permutation 图, 以区分不同组间样品的差异成分, 为茅根炭炮制过程控制提供参考依据。建立的 OPLS-DA 模型参数 $R^2_X=0.946$, $R^2_Y=0.899$, $Q^2=0.772$, 均大于 0.500, 证明建立的模型具有较好的数据解析能力和预测能力, 能够用于 15 批样品的化学计量学分析^[22-23]。为进一步验证所建立模型的合理性, 采用外部模型进行置换检验, 以验证模型的有限性^[24]。设置检验次数为 200 次, 得到的置换检验模型验证图如图 6。图中的 R^2 、 Q^2 均高于左边所有的点, 且大于 0.5, 并且 R^2 、 Q^2 的回归线斜率均大于 1, 证明所建立的模型合理有效, 无过拟合现象。

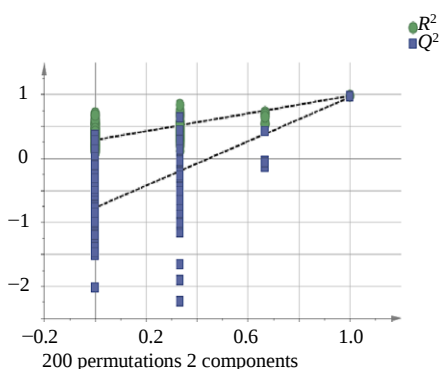


图 6 置换检验模型验证图

Fig. 6 Permutation test

以上述模型为基础, 建立 OPLS-DA 得分图, 结果见图 7。可以看出, 15 批样品依然被分为 3 类, 结果与聚类分析一致, 证明 3 组样品的差异明显, 分类结果科学可靠。VIP 图见图 8。在 95% 的置信区间内, 一般选择 VIP 值 > 1 作为筛选差异性成分

的指标, 提取了 8 个 VIP (VIP 均大于 1), 分别是峰 1 (1.240 7)、 α^* (1.236 1)、 b^* (1.051 1)、峰 3 (1.048 3)、 L^* (1.039 9)、峰 12 (1.038 4)、 E^* (1.027 1)、5-羟甲基糠醛 (1.005 6), 推测上述成分为茅根炭炮制过程中的差异成分, 具有区分茅根炭炮制终点的潜力。

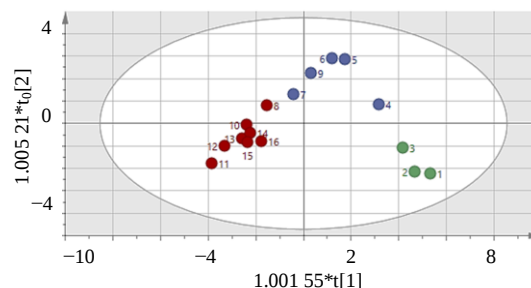
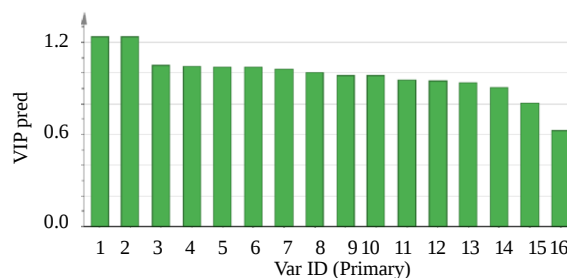


图 7 不同炮制时间茅根炭饮片的 OPLS-DA 得分散点图

Fig. 7 Score scatter plot of OPLS-DA of carbonized *Imperatae Rhizoma* at different processing times

1-峰 1 2- α^* 3- b^* 4-峰 3 5- L^* 6-峰 12 7- E^* 8-5-羟甲基糠醛
9-峰 9 10-新绿原酸 11-峰 6 12-咖啡酸 13-绿原酸 (S)
14-峰 4 15-隐绿原酸 16-4-香豆酸
1-peak 1 2- α^* 3- b^* 4-peak 3 5- L^* 6-peak 12 7- E^* 8-5-hydroxymethyl
furfuraldehyde 9-peak 9 10-neochlorogenic acid 11-peak 6 12-caffeic
acid 13- chlorogenic acid (S) 14-peak 4 15-cryptochlorogenic acid
16-4-coumaric acid

图 8 各色谱峰峰面积和色度值的 VIP 得分图

Fig. 8 VIP score plot for peak area and chromaticity value

3 讨论

本研究基于色度值和色谱峰单位峰面积为评价指标, 分别采用各类分析方法对指纹图谱与色度值的相关性结果进行分析。通过相关分析可以看出各色谱峰单位峰面积与色度值的相关程度及其显著程度, 结果表明 5-羟甲基糠醛、峰 3、峰 9 均与色度值间具有极显著或显著 ($P < 0.01$ 、0.05)。结合主成分分析、聚类分析和 OPLS-DA, 不同炮制时间的茅根炭饮片可以区分开来, 同时进一步补充说明茅根炭饮片质量的差异标志物。上述相关分析方法在一定程度上相互印证、相互补充, 较好地建立了

茅根炭饮片外观与内在质量的关系。

茅根炭在炮制过程中产生了5-羟甲基糠醛,是炮制后峰面积明显增大的成分,可作为生品和炮制品的区分。5-羟甲基糠醛作为糖的脱水产物,广泛存在于含糖类物质的植物和食品中,炮制或加热过程中,往往伴随含量的变化^[25]。文献报道,茅根炭的止血作用主要通过缩短止血凝血时间、缩短血浆复钙时间从而达到增强止血作用^[26-27]。白茅根炒炭后,5-羟甲基糠醛虽有显著增加,但目前尚无研究报道5-羟甲基糠醛与其止血作用具有一定联系。但因5-羟甲基糠醛具有双向药理作用,既有抗氧、保肝、改善血液微循环等药理作用^[28],又具有一定的遗传毒性、生殖毒性和致癌性^[29],因此在炮制过程中不宜加热过久,以免5-羟甲基糠醛毒性的积累。随着炮制时间的延长,酚酸类成分(新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸、4-香豆酸)的峰面积都出现了不同程度的下降,这与加热时间过长、成分出现降解有关。

白茅根中化学成分众多,主要含有三萜类、糖类、内酯类、有机酸和香豆素类等成分,但有效成分含量均较低,从指纹图谱可看出,色谱峰峰型较高、响应较好的均为酚酸类成分。虽然亦可采用紫外检测器测定其多糖含量,但该方法测定结果专属性较差、重复性一般。因此,白茅根、茅根炭中指标成分的选择上,可对酚酸类成分进行优先测定。酚酸类成分具有一定的不稳定性,在一定程度上存在相互转化^[30],故在对白茅根或茅根炭进行定量分析时,不能仅仅测定某一个成分,应以酚酸类成分的总量进行对比研究为佳。茅根炭中的5-羟甲基糠醛作为生品和炮制品的区分,亦应当对其进行测定,严格控制5-羟甲基糠醛的含量,保证临床用药安全性和有效性。本研究在指纹图谱建立过程中,分别对提取溶剂(10%甲醇、50%甲醇、甲醇、10%乙醇、50%乙醇、乙醇)、提取方式(回流、超声)、提取时间(15、30、45min)进行考察,并以色谱峰峰型、分离度为评价指标,确定了供试品溶液的制备方法。

颜色是中药质量评价的指标之一,经过长期的发展应用,辨色论有丰富的理论,但主观性强,缺乏客观标准。本研究通过测定粉末的色度值,量化样品颜色的变化,将色度值与指纹图谱相结合,考察茅根炭在炮制过程中颜色与成分动态关联分析,其中5-羟甲基糠醛、峰3、峰9峰面积与色度值间

具有极显著性或显著性,主成分分析提取出2个主成分,聚类分析聚为3类,与OPLS-DA的分析结果一致。因此本研究建立的茅根炭UPLC指纹图谱结合色度值、化学模式识别分析,将外观颜色与内在质量进行联系,明确茅根炭的质量差异指标,可为茅根炭的在线炮制生产提供参考。

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.2020:111.
- [2] 清 孙星衍.神农本草经.卷二:中经[M].太原:山西科学技术出版社,2017:43.
- [3] 王明雷,王素贤,孙启时,等.白茅根化学成分的研究[J].中国药物化学杂志,1996,6(3):39-41.
- [4] 冯丽华,江丰,汪玢.HPLC法测定白茅根中绿原酸的含量[J].江西化工,2005(4):104-105.
- [5] 付丽娜,陈兰英,刘荣华,等.白茅根的化学成分及其抗补体活性[J].中药材,2010,33(12):1871-1874.
- [6] 徐丹洋,马长振,陈佩东,等.茅根炭止血机理的实验研究[J].中成药,2010,32(12):2114-2117.
- [7] 时银英,白玉昊,兰志琼.白茅根降压茶治疗原发性高血压的实验研究[J].陕西中医学院学报,2008,31(6):57-58.
- [8] 岳兴如,侯宗霞,刘萍,等.白茅根抗炎的药理作用[J].中国临床康复,2006,10(43):85-87.
- [9] 于庆海,杨丽君,孙启时,等.白茅根药理研究[J].中药材,1995,18(2):88-90.
- [10] 崔珏,李超,尤健,等.白茅根多糖改善糖尿病小鼠糖脂代谢作用的研究[J].食品科学,2012,33(19):302-305.
- [11] 蓝贤俊,邓彩霞,陈永兰,等.白茅根对酒精中毒小鼠肝及脑损伤的保护作用研究[J].医学理论与实践,2012,25(2):125-128.
- [12] 杨丽,龚姝婷,许铭珊,等.基于“表里关联”的大黄炭炮制过程颜色和成分变化关系研究[J].中草药,2020,51(22):5705-5713.
- [13] 何晓凤,王露露,张晶.基于色度学原理的颜色分析方法在药物研究领域的应用概况[J].药物分析杂志,2018,38(9):1471-1475.
- [14] 陈仕妍,卢文彪,王凤梅.基于颜色匹配模板的中药饮片图像识别[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(6):158-162.
- [15] 李倩,何芳,艾青青,等.模拟加速实验研究大黄贮藏过程中颜色变化与药效成分的相关性[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):139-144.
- [16] 姚令文,刘燕,郑笑为,等.指纹图谱、指纹图谱技术在中药材和中成药中的应用[J].中国新药杂志,2018,

- 27(8): 934-939.
- [17] 高原, 方妍, 单梦瑶, 等. 基于色差原理分析不同产地桑白皮有效成分含量与颜色的相关性 [J]. 中国药房, 2021, 32(2): 213-219.
- [18] 于梦婷, 童黄锦, 毛春芹, 等. 基于色泽量化与主要成分含量的不同基原莪术饮片质量识别研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1393-1400.
- [19] 徐斌, 张强, 刘亮镜. 丹参酒炙过程中炮制时间、颜色与化学成分含量的相关性 [J]. 中国药房, 2021, 32(14): 1715-1720.
- [20] 张雪, 李晓庆, 王云, 等. 焦栀子炒制过程中 HPLC 图谱变化与外观颜色的动态关联研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (17): 4029-4037.
- [21] 余凌英, 李星, 强梦琴, 等. 干姜和炮姜高效液相色谱指纹图谱与色度值对比研究 [J]. 中南药学, 2022, 20(10): 2305-2311.
- [22] 毛莹莹, 粟焕焕, 郑富香, 等. 不同产地板蓝根 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别研究 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3147.
- [23] 黄梦婷, 潘玲, 邓李红, 等. 基于 UPLC 指纹图谱与色度值的桑白皮生品和炮制品的鉴别及炮制终点研究 [J]. 中国药房, 2021, 32(1): 56.
- [24] 常相伟, 王博然, 王彤, 等. 基 UPLC-Q-TOF/MS 的植物代谢组学技术鉴别林下山参的生长年限 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(19): 3609.
- [25] 晏朝操. 炮制前山莼肉和炮制后酒莼肉的化学成分鉴别与分析 [J]. 现代医学与健康研究, 2018, 2(6): 177.
- [26] 徐丹洋, 马长振, 陈佩东, 等. 茅根炭止血机理的实验研究 [J]. 中成药, 2010, 32(12): 2114-2117.
- [27] 和颖颖. 白茅根炭品的止血机理及质量标准研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [28] 魏梅, 邓淙友, 梁志毅, 等. 生脉散传统饮片汤剂与配方颗粒汤剂 5-羟甲基糠醛(5-HMF)含量比较 [J]. 世界中医药, 2015, 10(1): 100-103.
- [29] 纪玉华, 洪婉敏, 干丽, 等. 基于指纹图谱结合色彩图像技术的白芍与炒白芍差异研究 [J]. 中国现代中药, 2022, 24(7): 1358-1364.
- [30] 朱鹏, 苗潇磊, 陈勇. 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性 pH 条件下的降解动力学 [J]. 药学学报, 2016, 51(1): 122-126.

【责任编辑 解学星】