

基于 GC-MS 结合色度值的生、蒸多花黄精对比研究

邹会品^{1,2,3}, 阳睦贤^{1,2,3}, 贾 瑶^{1,2,3}, 肖明珠^{1,2,3}, 胡斯佳^{1,2,3}, 潘 雪^{1,3}, 石继连^{1,2,3*}, 周逸群^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学 药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学 中药炮制技术传承基地, 湖南 长沙 410208

3. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 研究多花黄精不同蒸制品 GC-MS 指纹图谱和色度值的差异。方法 采用 GC-MS 法建立黄精生品及不同蒸制次数蒸制品的指纹图谱, 并用色差仪测定其色度值 (L^* 、 a^* 、 b^*), 结合主成分分析 (PCA)、层次聚类分析 (HCA) 与最小偏二乘-判别分析 (OPLS-DA) 方法分析黄精生品和一蒸~九蒸蒸制品的差异。结果 与多花黄精生品相比较, 二蒸~九蒸饮片粉末的总色差值 $\Delta E^* > 12$, 颜色变化明显, 由第 4 次蒸制开始粉末颜色趋于稳定; 建立的指纹图谱中确定了 17 个共有峰, 五蒸之后新出现 3 个共有峰; 相关性分析 (CA) 表明, 主要色谱峰的峰面积值与色度值有一定的关联, 与 a^* 值的关联较小, 与 L^* 、 b^* 和 E^* 值关联较大; 多元统计分析表明, 多花黄精生品及不同次数蒸制品之间存在明显差异, PCA 与 HCA 可将多花黄精生品及其不同次数蒸制品分为生品、一蒸~四蒸、五蒸~九蒸 3 类, OPLS-DA 筛选出 (+)-柠檬烯、2, 4-二叔丁基苯酚、2-乙基甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、正二十烷、4, 6-二甲基十二烷、联三甲苯、3-乙基甲苯共 9 个差异性成分。结论 建立了 GC-MS 指纹图谱及色度值鉴别方法, 为多花黄精质量控制及评价提供科学参考。

关键词: 多花黄精; 蒸制; GC-MS; 色度值; 差异比较; 相关性分析; 主成分分析; 层次聚类分析; 最小偏二乘-判别分析; (+)-柠檬烯; 2, 4-二叔丁基苯酚; 2-乙基甲苯; 邻二甲苯; 间二甲苯; 正二十烷; 4, 6-二甲基十二烷; 联三甲苯; 3-乙基甲苯

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)04-0936-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.015

Comparative study of raw and steamed *Polygonatum cyrtonema* based on GC-MS combined with chroma value

ZOU Huipin^{1,2,3}, YANG Muxian^{1,2,3}, JIA Yao^{1,2,3}, XIAO Mingzhu^{1,2,3}, HU Sijia^{1,2,3}, PAN Xue^{1,3}, SHI Jilian^{1,2,3}, ZHOU Yiqun^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. State Administration of Traditional Chinese Medicine, Traditional Chinese Medicine Processing Technology Heritage Base of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Hunan Key Laboratory of Drug Ability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: **Objective** To investigate the differences in GC-MS fingerprint and chromaticity values of different steamed products of *Polygonatum cyrtonema*. **Methods** GC-MS was used to establish fingerprints of raw and steamed *P. cyrtonema* samples with 2—9 steaming cycles. Chromaticity values (L^* , a^* , b^*) were measured using a colorimeter. Principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were applied to analyze differences between raw samples and steamed products (1—9 times). **Results** Compared with raw *P. cyrtonema*, total color difference ΔE^* of powder samples from 2—9 steamed batches exceeded 12, indicating significant color changes. Powder color stabilized starting from the fourth steaming. The established fingerprints identified 17 common peaks, with three new peaks emerging after five steamings.

收稿日期: 2024-10-14

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2023JJ50445); 湖南省科技创新计划项目 (2023NK4145); 湖南省教育厅青年项目 (22B0379); 长沙市自然科学基金资助项目 (kq2208192)

作者简介: 邹会品 (2003—), 硕士研究生, 从事中药炮制机制研究。E-mail: 2228213175@qq.com;

*通信作者: 石继连 (1973—), 博士, 教授, 从事中药炮制规范化及机制研究。E-mail: hnsjl@163.com;

周逸群 (1990—), 博士, 副教授, 主要从事中药炮制与制剂新技术及超分子研究。E-mail: zhouyiqun123@sina.com

Correlation analysis (CA) revealed significant correlations between main chromatographic peak areas and chromaticity values, particularly L^* , b^* and E^* , but weaker correlation with a^* . Multivariate statistical analysis showed distinct differences among raw and steamed products. PCA and HCA classified samples into three groups: raw, 1—4 steamings, and 5—9 steamings. OPLS-DA identified nine differential components: (+)-dipentene, 2, 4-di-tert-butylphenol, 2-ethyltoluene, o-xylene, m-xylene, n-eicosane, 4, 6-dimethyl dodecane, 1, 2, 3-trimethylbenzene, and 3-ethyltoluene. **Conclusion** A GC-MS fingerprint combined with chromaticity value analysis was developed, providing a scientific reference for quality control and evaluation of *P. cyrtonema*.

Key words: *Polygonatum cyrtonema*; steaming; GC-MS; chromaticity values; difference comparison; correlation analysis; principal component analysis; hierarchical cluster analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; (+)-dipentene; 2,4-di-tert-butylphenol; 2-ethyltoluene; o-xylene; m-xylene; n-eicosane; 4, 6-dimethyldodecane; 1, 2, 3-trimethylbenzene; 3-ethyltoluene

多花黄精为百合科植物多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua. 的干燥根茎，具有补气养阴、健脾、润肺、益肾的功效^[1]。化学成分研究表明，多花黄精中主要含有黄精多糖、甾体皂苷、黄酮类、氨基酸等^[2-6]。自古以来就有黄精“刺人咽喉”的记载^[7]，生品多花黄精直接服用，有麻舌感，并对咽喉产生刺激，因此临床上多以炮制品入药。目前，多蒸黄精的研究多集中在蒸制后的化学成分变化及药理作用方面^[8-10]，然而对生黄精的刺激性成分及炮制减毒机制研究相对匮乏^[11-12]。开展生黄精刺激性成分研究，不仅有助于判断多花黄精蒸制最佳程度，优化炮制工艺，还能进一步提升其临床用药的安全性，为多花黄精在中医药领域的合理应用提供更为坚实的理论基础。

多花黄精的炮制方法以多次蒸煮方法为主，蒸制后可去除麻味，增强健脾润肺益肾的作用。中药具有多成分、多效应、多靶点的特征，多种活性成分作用于疾病相关的相同或不同靶点，发挥综合疗效^[13]。因此，多花黄精生品与炮制品的功效差异，源于内在药效物质基础不同。在中药领域，利用色差仪测定中药饮片颜色并实现定量已广泛应用^[14-16]。

唐美玲^[12]筛选出多花黄精生品的刺激性成分主要在醋酸乙酯部位，类型为总酚。为探究不同蒸制次数对多花黄精质量的影响，本研究运用 GC-MS 法构建多花黄精及其不同次数蒸制品的指纹图谱，采集生品及不同次数蒸制品粉末的色度值，借助化学计量学识别模式对两者进行动态分析，考察指纹图谱和色度值的动态变化，剖析生多花黄精刺激性成分，为完善多花黄精成分和质量研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

XY-500A 型高速多功能粉碎机，浙江省永康市松青五金厂；SC-10 型色差仪，深圳市三恩时科技有限公司；AR1140 型电子分析天平，奥豪斯国际贸

易（上海）有限公司；KQ3200E 型超声波清洗机，昆山美美超声仪器有限公司；RS-ZF03L 型商用蒸饭柜，合肥荣事达小家电有限公司；101 型电热鼓风干燥箱，北京中兴伟业仪器有限公司；Heraeus Pico 17 型高速离心机，赛默飞世尔科技公司；GCMS-QP2020 型气质联用仪，日本岛津公司。

1.2 药材与试剂

多花黄精药材购买于湖南怀化林泉药业有限公司，经湖南中医药大学龚力民副教授鉴定为百合科植物多花黄精 *P. cyrtonema* Hua. 的根茎。醋酸乙酯（分析级，批号：20190722），湖南汇虹试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 多花黄精不同饮片的制备

根据课题组前期实验结果^[17]及工业化生产实验，取干多花黄精，以根茎直径在 1.5~2.5 cm 为中档，分为大、中、小 3 档，取中档多花黄精 13 批，净制，每批 500 g，第 1 次蒸制时间为 8 h，后切 2~4 mm 厚片，于 70 °C 烘箱中干燥至含水量达到 20% 左右，为一蒸一制多花黄精饮片（标记为 S1），第 2~9 蒸，蒸制时间改为 4 h，重复切片和干燥操作，得二蒸二制~九蒸九制品（标记为 S2~S9）；生品切 2~4 mm 厚片（标记为 S0）。生品及一~九蒸多花黄精饮片炮制品外观图见图 1。

2.2 色度值测定与分析

色差仪 Lab 色彩模式中， L^* 表示亮度明暗， a^* 表示红绿相， b^* 表示黄蓝相， E^* 为总色值。 E^* 值计算公式为 $E^* = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ ，以 S0 样品粉末为标准品进行测定，以该粉末的 L^* 、 a^* 、 b^* 为标准值，测定一~九蒸炮制品与标准值的色差值 ΔL^* （ $\Delta L^*_{\text{样}} = L^*_{\text{样}} - L^*_0$ ）、 Δa^* （ $\Delta a^*_{\text{样}} = a^*_{\text{样}} - a^*_0$ ）、 Δb^* （ $\Delta b^*_{\text{样}} = b^*_{\text{样}} - b^*_0$ ）、 ΔE^* [$\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$]，用于表达生品及不同炮制品在明度、红绿、黄蓝、总体的颜色变化情况。



图 1 生品及一蒸~九蒸多花黄精饮片样品

Fig. 1 Raw and steamed (1 to 9 times) *Polygonatum cyrtonema* slices samples

2.2.1 仪器参数设定与样品前处理 取多花黄精生品及不同蒸制次数的炮制品粉末（过二号筛）适量，均匀填充粉末测试盒，表面均匀平整，上覆盖玻璃载玻片，应用色差仪采用国际照明委员会认可的D65光源，设置标准观察角度 10° ，目标孔径4mm，波长检测范围360~740nm，采用SCI反射光模式、色彩空间CIE (L^* 、 a^* 、 b^*)，对S0~S9粉末进行色度值测定。

2.2.2 精密度试验 取S0粉末适量，放入测试盒中均匀分布，在“2.2.1”项条件下用色差仪连续测定6次，结果显示 L^* 、 a^* 、 b^* 的RSD值分别为0.12%、0.13%、0.14%，说明仪器精密度良好。

2.2.3 重复性试验 取S0粉末6份，分别放入测试盒中均匀分布，在“2.2.1”项条件下用色差仪进行测定，结果显示 L^* 、 a^* 、 b^* 的RSD值分别为0.25%、0.50%、0.43%，表明方法重复性良好。

2.2.4 稳定性试验 取S0粉末适量，放入测试盒中均匀分布，在“2.2.1”项条件下分别于0、1、2、3、4、5、6h后用色差仪进行测定，结果显示 L^* 、 a^* 、 b^* 的RSD值分别为2.06%、1.22%、0.82%，说明样品在6h内稳定性良好。

2.2.5 多花黄精不同饮片颜色比较 当总色差值 ΔE^* 为6~12时，其色差可被肉眼识别，当 $\Delta E^* > 12$ 时，色差显著^[16]。多花黄精不同饮片色度值测定结果见表1。在黄精蒸制过程中， L^* 值从86.06逐步下降到39.53，明度下降54.07%，呈逐渐降低趋势，自三蒸（S3）后， L^* 值下降较缓慢，表明炮制后明度下降，颜色逐渐加深，其中第二蒸到第三蒸明度

降低最为明显，颜色加深明显； a^* 值呈先升后降的趋势，从S0到S3炮制品， a^* 值呈增加的趋势，随后在S4到S9炮制品， a^* 值呈降低趋势； b^* 值呈现先升高后降低的趋势，从最高25.80下降到1.19，黄蓝值下降95.38%。 E^* 代表总色值，在炮制过程中， E^* 从87.54下降到39.59，总色差值下降了54.77%，与明度值 L^* 下降幅度较大有关，说明样品颜色由亮变暗。自S2开始 $\Delta E^* > 12.0$ ，即在蒸制第2次开始，黄精炮制品与生品相比颜色变化明显，可以用肉眼区分；S5~S9 ΔE^* 趋于稳定，表明由第5次开始色差变化并不明显。综合以上结果，多花黄精在蒸制过程中，一蒸~三蒸颜色变化大，四蒸之后颜色趋于稳定。

2.3 多花黄精不同饮片 GC-MS 指纹图谱研究

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取多花黄精粉末

表 1 色度值结果

Table 1 Chromaticvalue results

样品	L^*	a^*	b^*	E^*	ΔE^*
S0	86.06	2.24	15.85	87.54	0.00
S1	83.91	3.59	18.88	86.08	3.95
S2	74.09	8.46	25.80	78.91	16.76
S3	48.36	10.34	14.85	51.63	38.57
S4	43.66	5.60	4.79	44.28	43.95
S5	42.32	4.19	3.26	42.65	45.56
S6	40.20	4.55	4.41	40.70	47.32
S7	40.61	3.01	2.46	40.80	47.39
S8	39.53	1.82	1.19	39.59	48.79
S9	41.33	2.86	2.55	41.51	46.67

(二号筛)0.1 g 置具塞锥形瓶中,加入醋酸乙酯 25 mL, 密塞,称定质量,超声 30 min,放冷,用醋酸乙酯补足减少的质量,上清液以 $12\,000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, $0.22\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3.2 气相色谱条件 采用 HP-5 MS 型石英毛细管柱 ($30\text{ m}\times 0.25\text{ mm}$, $0.25\,\mu\text{m}$); 进样口温度 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$; 载气为高纯氦气; 气体体积流量为 $1.46\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 分流比 5:1; 程序升温起始温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min; 以 $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 3 min; 以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min; 以 $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。

2.3.3 质谱条件 电离方式为电子轰击离子源 (EI); 离子源温度 $220\text{ }^{\circ}\text{C}$; 接口温度 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; 检测器增益: $0.80\text{ kV}+0.00\text{ kV}$; 采集时间: $4.5\sim 53.5\text{ min}$; 采集方式: 全扫描; 扫描范围 $m/z\ 40\sim 450$; 溶剂延迟 4.5 min。应用质谱数据系统检索 (美国 NIST 质谱检索数据库) 和人工图谱解析, 结合相似度和保留时间确定化合物。

2.3.4 精密度考察 取多花黄精 S0 的供试品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件, 连续进样测定 6 次, 以 (+)-柠檬烯为参照峰, 计算得各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.30%, 相对峰面积的 RSD 均小于 1.96%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取多花黄精 S0 的供试品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件, 分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 进样测定, 以 (+)-柠檬烯为参照峰, 计算得各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均 $<0.20\%$, 相对峰面积的 RSD 均 $<3.23\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 重复性试验 取多花黄精 S0 样品 6 份, 按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3.2”项下色谱条件进样测定, 以 (+)-柠檬烯为参照峰, 计算得各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均 $<0.41\%$, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.62%, 表明方法的重复性良好, 符合指纹图谱测定要求。

2.3.7 指纹图谱构建与共有峰识别 分别按照“2.3.1”项下方法制备 S0~S9 供试品溶液, 根据“2.3.2”“2.3.3”项下方法进样分析, 得到色谱图。运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 年版) 建立 GC-MS 指纹图谱。以 S0 为参照图谱, 以“中位数”法作为对照图谱生成方式, 得到对照图谱 (R)。多花黄精不同饮片 GC-MS 指纹图谱见图 2。通过 NIST05 和 NIST14 质谱检索数据库, 以化合物相似度 $\geq 80\%$ 作为判断依据, 对多花黄精不同饮片的共有峰进行定性分析。共鉴定出 29 个化合物, 结果见表 2。

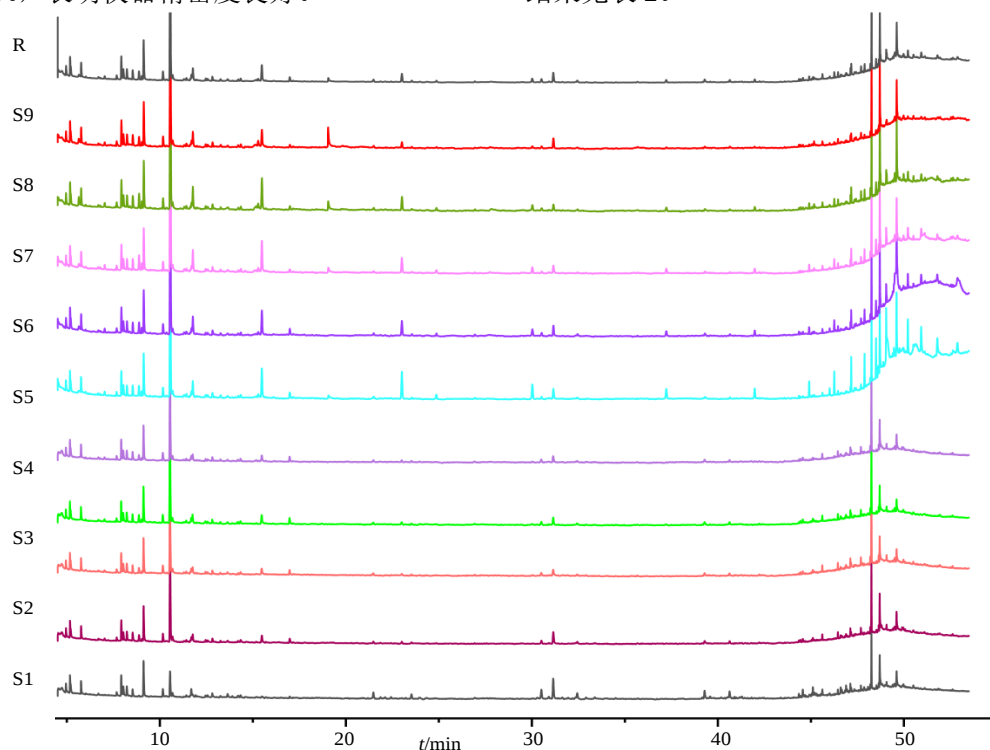


图 2 多花黄精不同饮片 GC-MS 指纹图谱

Fig. 2 GC-MS superimposed fingerprint of *P. cyrtoneura* different slices

表 2 多花黄精不同饮片成分鉴定结果

Table 2 Identification results of *Polygonatum cyrtoneura* different slices

序号	<i>t</i> /min	Cas 号	化合物名称	分子式	测定值 <i>m/z</i>	二级碎片	来源
1	4.955	100-41-4	乙基苯	C ₈ H ₁₀	106.05	51.00、65.05、91.05、106.05	S0~S9
2	5.647	96-26-4	二羟基丙酮	C ₃ H ₆ O ₃	106.05	51.00、77.00、91.05、105.05、106.05	S6~S9
3	5.766	108-38-3	间二甲苯	C ₈ H ₁₀	106.05	51.00、77.00、91.05、105.05、106.05	S0~S4
4	5.771	95-47-6	邻二甲苯	C ₈ H ₁₀	106.05	51.00、77.00、91.00、106.05	S1~S9
5	6.800	99-83-2	水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	136.00	41.00、77.00、93.00、105.10、119.00、 136.00	S5~S9
6	6.966	98-82-8	异丙苯	C ₉ H ₁₂	120.10	43.00、51.00、77.05、79.05、105.05、 120.10	S0~S6、 S8~S9
7	7.021	7785-70-8	蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	136.10	41.00、77.00、93.05、105.00、136.10	S1~S9
8	7.677	103-65-1	正丙苯	C ₉ H ₁₂	120.10	51.00、65.00、78.00、91.05、92.05、 120.10	S0~S9
9	7.926	620-14-4	3-乙基甲苯	C ₉ H ₁₂	120.10	51.00、65.00、77.00、79.05、91.05、 92.05、103.05、105.05、106.05、120.10	S0~S9
10	8.037	611-14-3	2-乙基甲苯	C ₉ H ₁₂	120.10	51.00、79.05、91.05、105.05、120.10	S0~S9
11	8.227	526-73-8	联三甲苯	C ₉ H ₁₂	120.10	51.00、77.00、91.05、105.05、119.10、 120.10	S0~S9
12	9.033	123-35-3	月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	136.10	41.00、69.05、93.05、121.10、136.10	S1~S9
13	10.552	5989-27-5	(+)-柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	136.10	53.05、68.05、93.05、121.10、136.10	S0~S9
14	10.684	496-11-7	蒎满	C ₉ H ₁₀	118.05	57.90、91.05、117.05、118.05	S0~S9
15	11.293	135-01-3	1,2-二乙苯	C ₁₀ H ₁₄	134.10	41.00、77.00、91.05、105.05、119.10、 134.10	S0~S6、S9
16	11.427	1074-43-7	3- <i>N</i> -丙基甲苯	C ₁₀ H ₁₄	134.10	51.00、77.00、91.00、105.05、134.10	S0~S9
17	11.706	934-80-5	4-乙基邻二甲苯	C ₁₀ H ₁₄	134.10	57.05、71.05、85.05、119.05、134.10	S1~S5、 S8~S9
18	11.773	99-85-4	γ-松油烯	C ₁₀ H ₁₆	136.10	41.05、77.00、93.05、121.10、136.10	S0~S9
19	12.466	1758-88-9	2-乙基对二甲苯	C ₁₀ H ₁₄	134.10	41.05、77.00、91.00、119.05、134.10	S0~S9
20	12.564	535-77-3	<i>P</i> -伞花烃	C ₁₀ H ₁₄	134.10	41.00、65.00、91.05、119.05、134.10	S0~S9
21	12.821	934-74-7	5-乙基间二甲苯	C ₁₀ H ₁₄	134.10	51.00、77.00、91.05、119.10、134.10	S0~S9
22	13.269	6004-38-2	四氢二聚环戊二烯	C ₁₀ H ₁₆	136.05	41.00、67.05、95.05、121.10、136.05	S2、S3、S5、 S6、S9
23	14.201	488-23-3	1,2,3,4-四甲基苯	C ₁₀ H ₁₄	134.05	41.05、77.00、91.00、119.05、134.05	S0~S9
24	15.288	28564-83-2	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(<i>H</i>)-吡喃-4-酮	C ₆ H ₈ O ₄	144.00	43.00、72.00、101.00、115.00、 126.00、144.00	S5~S9
25	16.977	15356-70-4	DL-薄荷脑	C ₁₀ H ₂₀ O	156.00	55.00、71.05、81.05、109.10、123.10	S0~S9
26	19.045	67-47-0	5-羟甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₃	126.00	41.05、69.00、97.00、109.00、126.00	S5~S9
27	21.480	61141-72-8	4,6-二甲基十二烷	C ₁₄ H ₃₀	198.10	57.05、71.05、85.05、113.10、127.10、 155.10、169.10	S0~S9
28	30.910	112-95-8	正二十烷	C ₂₀ H ₄₂	261.20	57.05、71.05、85.10、113.10、127.20、 155.10、169.10、205.20、221.20、 240.20、254.10	S0~S9
29	31.147	96-76-4	2,4-二特丁基苯酚	C ₁₄ H ₂₂ O	206.10	57.05、74.05、91.05、107.05、135.05、 163.05、175.05、191.05、207.05	S0~S9

2.4 多花黄精颜色与成分动态关联分析

2.4.1 相关性分析 (CA) 将“2.3.4”项下确定的 S0~S9 峰面积 (缺失的色谱峰面积以 0 计) 与“2.2.1”项下测定的 S0~S9 色度值导入 SPSS 25.0, 采用双变量相关性, 设置皮尔逊相关系数 r 和双尾 t 检验, 以样本数 1 000 进行自助抽样进行相关性分析, 当相关系数 $|r| \geq 0.8$ 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^[18]。由表 3 可知, 间二甲苯 (峰 3)、邻二甲苯 (峰 4)、水芹烯 (峰 5)、正丙苯 (峰 8)、3-乙基甲苯

(峰 9)、2-乙基甲苯 (峰 10)、月桂烯 (峰 12)、(+)-柠檬烯 (峰 13)、3-*N*-丙基甲苯 (峰 16)、 γ -松油烯 (峰 18)、2, 3-二氢-3, 5 二羟基-6-甲基-4(*H*)-吡喃-4-酮 (峰 24) 与 a^* 不相关, 与 L^* 、 b^* 、 E^* 均具有极显著性或显著性相关 ($P < 0.05$ 、 0.01) 其中间二甲苯 (峰 3) 与 3-乙基甲苯 (峰 9) 与 L^* 、 b^* 、 E^* 呈现正相关, 其余均为负相关; 乙基苯 (峰 1) 与 a^* 、 b^* 均具有极显著性负相关 ($P < 0.01$)。表明以上色谱峰的峰面积对色度值均有一定的影响, 对 a^* 的影响较小, 对 L^* 、 b^* 、 E^* 的影响较大。

表 3 多花黄精炮制过程中峰面积与色度值的相关性分析

Table 3 Correlation analysis between the peak area and chromatic value in the processing of <i>Polygonatum cyrtonema</i>											
序号	CAS 号	L^*	a^*	b^*	E^*	序号	CAS 号	L^*	a^*	b^*	E^*
1	100-41-4	-0.487	-0.789**	-0.779**	-0.529	16	1074-43-7	-0.829**	-0.191	-0.778**	-0.833**
2	96-26-4	-0.565	-0.521	-0.639*	-0.582	17	934-80-5	-0.131	0.378	0.103	-0.104
3	108-38-3	0.877**	0.044	0.673*	0.867**	18	99-85-4	-0.772**	-0.389	-0.763*	-0.783**
4	95-47-6	-0.829**	-0.190	-0.723*	-0.831**	19	1758-88-9	0.084	-0.604	-0.270	0.044
5	99-83-2	-0.701*	-0.534	-0.790**	-0.722*	20	535-77-3	0.232	-0.467	-0.083	0.202
6	98-82-8	-0.443	-0.128	-0.445	-0.452	21	934-74-7	-0.603	-0.416	-0.668*	-0.621
7	7785-70-8	-0.653*	-0.096	-0.515	-0.649*	22	6004-38-2	-0.317	0.351	-0.011	-0.288
8	103-65-1	-0.692*	-0.537	-0.811**	-0.717*	23	488-23-3	0.449	-0.293	0.161	0.424
9	620-14-4	0.741*	0.466	0.792**	0.759*	24	28564-83-2	-0.680*	-0.544	-0.777**	-0.702*
10	611-14-3	-0.736*	-0.545	-0.828**	-0.759*	25	15356-70-4	-0.293	0.725*	0.094	-0.254
11	526-73-8	-0.620	-0.608	-0.757*	-0.646*	26	67-47-0	-0.518	-0.472	-0.602	-0.536
12	123-35-3	-0.735*	-0.399	-0.730*	-0.746*	27	61141-72-8	0.576	-0.336	0.259	0.550
13	5989-27-5	-0.757*	-0.363	-0.734*	-0.767**	28	112-95-8	0.664*	-0.141	0.386	0.643*
14	496-11-7	0.462	-0.362	0.080	0.423	29	96-76-4	0.630	-0.416	0.243	0.594
15	135-01-3	-0.257	0.157	-0.153	-0.252						

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

2.4.2 主成分分析 (PCA) 将“2.3.4”项下确定的 S0~S9 峰面积 (缺失的色谱峰面积以 0 计) 与“2.2.1”项下测定的 S0~S9 色度值数据导入 SIMCA 14.1, 选择 Par 计算方法进行 PCA, 以特征值 > 1 为标准, 共提取了 2 个主成分, 累积方差贡献率为 90.1%, 提示模型预测良好, 各主成分贡献率见表 4。以 1、2 主成分建立坐标系, 得到的多花黄精生品及各炮制品的 PCA 得分图见

表 4 主成分特征值及方差贡献率

Table 4 Characteristic values and contribution rates of principal components			
成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	8.120	81.20	81.2
2	0.894	8.94	90.1

图 3。结果显示, 多花黄精不同饮片可明显区分为 3 类, S0 为第 I 类, S1~S4 为第 II 类, S5~S9 为第 III 类。

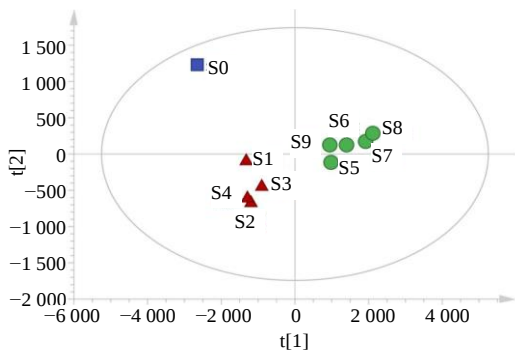


图 3 多花黄精不同饮片 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score chart of *P. cyrtonema* different slices

2.4.3 层次聚类分析 (HCA) 将“2.3.4”项下确定的 S0~S9 峰面积 (缺失的色谱峰面积以 0 计) 与“2.2.1”项下测定的 S0~S9 色度值数据导入 SPSS 25.0, 采用组间连接法, 以平方欧氏距离为分类依据, 以 Z-得分设置标准化进行 HCA, 结果见图 4。当平方欧氏距离为 25 时, 多花黄精生品及蒸制品可明显分为两类; 当平方欧氏距离为 15 时, S0、S1~S4、S5~S9 可明显分为 3 类, S5~S9 无法较好的聚类。多花黄精一蒸~四蒸炮制品相似度较高, 五蒸~九蒸炮制品相似度较高, 与 PCA 结果基本一致。

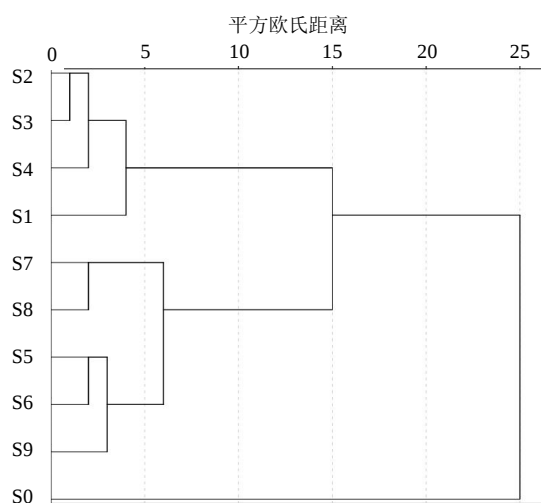


图 4 多花黄精不同饮片的 HCA 图
Fig. 4 HCA chart of *P. cyrtonema* different slices

2.4.4 正交最小偏二乘-判别分析 (OPLA-DA) 进一步筛选多花黄精生品及不同次数蒸制品成分差异的主要标志性成分, 将“2.3.4”项下确定的 S0~S9 峰面积 (缺失的色谱峰面积以 0 计) 与“2.2.1”项下测定的 S0~S9 色度值数据导入 SIMCA 14.1 进行 OPLS-DA, 得分图见图 5。

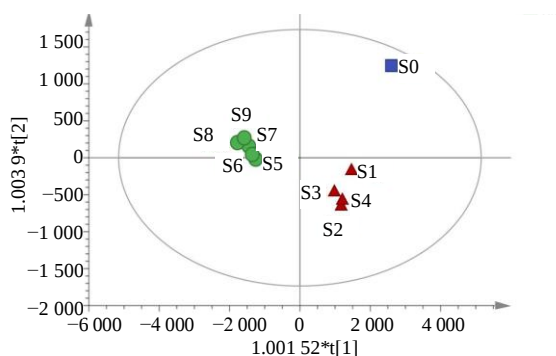


图 5 多花黄精不同饮片的 OPLS-DA 得分图
Fig. 5 OPLS-DA chart of *P. cyrtonema* different slices

S0、S1~S4、S5~S9 分别呈现明显的分类聚集现象, 与 PCA、HCA 结果均一致, 证明多花黄精生品及不同炮制次数的蒸制品间分类差异明显, 分类结果科学可靠。

建立的多花黄精生品及不同次数蒸制品的 OPLS-DA 模型中, 自变量累积解释能力参数 R_x^2 为 0.945, 因变量累积解释能力参数 R_y^2 为 0.962, 预测能力参数 Q^2 为 0.86, 均大于 0.500, 说明所建模型具有较好的数据的解释程度和对模型的预测能力, 能够用于不同蒸制次数多花黄精样品的化学计量学分析。为避免出现过拟合现象, 采用外部模型进行置换检验, 以验证模型的有效性, 回归线的斜率越大, 与纵轴的截距越小, 说明模型的解释能力和预测能力越好^[19]。设置检验次数为 200 次, 得到的置换检验模型验证图如图 6。

结果显示 R^2 和 Q^2 回归线斜率较大, 与纵轴相交截距较小, 下方回归线与纵轴相交点在零点以下, 且右边的原始值均大于左边任何一次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 , 表明原始模型的预测能力大于任何一次随机排列 Y 变量的预测能力, 证明建立的 OPLS-DA 模型是有效可靠的, 并不存在过拟合现象。

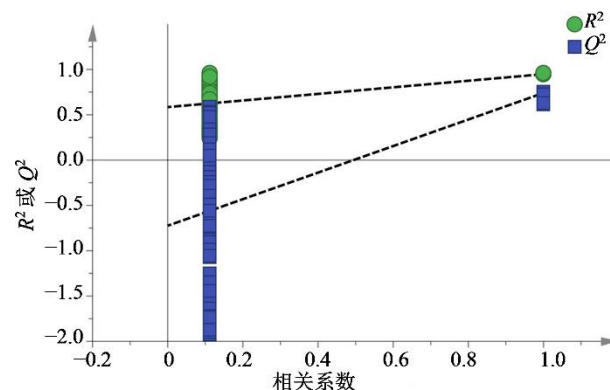


图 6 置换检验模型验证图
Fig. 6 Permutation test

选择变量重要性投影 (VIP) 值 >1 作为筛选差异性成分的指标, 由图 7 可知, 以 VIP 值 >1 为标准共提取 9 种成分, 依次为峰 15[(+)-柠檬烯]、峰 26 (2,4-二叔丁基苯酚)、峰 17 (2-乙基甲苯)、峰 24 (邻二甲苯)、峰 4 (间二甲苯)、峰 5 (正二十烷)、峰 18 (4,6-二甲基十二烷)、峰 13 (联三甲苯)、峰 19 (3-乙基甲苯), 推测以上成分为多花黄精炮制过程中的差异性成分, 具有区分多花黄精炮制程度的潜力。

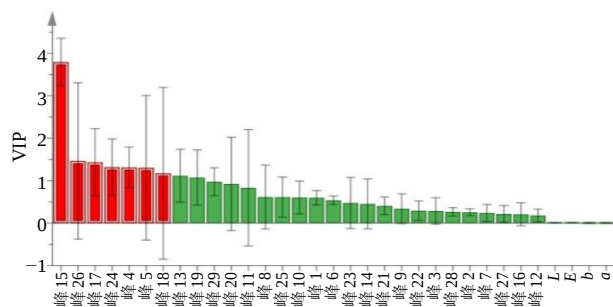


图 7 多花黄精不同饮片差异成分的 VIP 得分图

Fig. 7 VIP score plot of differential components of different *Polytonatum cyrtonema* slices

3 讨论

3.1 成分变化分析

本研究以色度值和色谱峰单位峰面积为评价指标,运用多种分析方法对色谱峰与色度值的相关性进行分析。在多花黄精生品及其不同次数蒸制品的 GC-MS 指纹图谱中共标定了 29 个峰,其中多花黄精生品含 20 个峰,蒸制品涵盖全部 29 个峰。多花黄精生品的主要成分包括联三甲苯、2,4-二叔丁基苯酚、间二甲苯、(+)-柠檬烯、正二十烷,相对含量分别为 20.61%、11.68%、11.56%、10.37%、10.01%,蒸制品的共有主要成分为联三甲苯和(+)-柠檬烯,相对含量分别为 13.03%~16.77%、38.76%~46.40%。随着蒸制次数的增加,除去出现频率在 3 次以下的成分,月桂烯、(+)-柠檬烯、5-羟甲基糠醛、 γ -松油烯 4 个成分的相对含量呈现出逐渐上升的趋势;而乙基苯、正丙苯、间二甲苯、正二十烷、2-乙基对二甲苯、1,2,3,4-四甲基苯、茚满、联三甲苯、P-伞花烃、4,6-二甲基十二烷、3-乙基甲苯、5-乙基间二甲苯、2,4-二叔丁基苯酚这 13 种成分的含量逐渐降低。多花黄精炮制前后色谱峰变化明显,在蒸制品中,新出现了月桂烯、蒎烯和水芹烯 3 个成分的色谱峰。这些色谱峰可以作为多花黄精生品与蒸制品的专属鉴别峰。月桂烯、蒎烯和邻二甲苯在蒸制品中均有出现,说明以上化合物为受热后产生;2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮、5-羟甲基糠醛和水芹烯在五蒸及后续炮制阶段才出现,推测可能为受热程度较高后产生。(+)-柠檬烯在生品和炮制品中均有检出,且相对含量随着蒸制次数的增加显著提高。上述成分可作为多花黄精不同蒸制程度的监测成分。

3.2 生品与蒸制品比较

多花黄精“刺人咽喉”的副作用在蒸制后消失,

推测原因是蒸制过程中刺激性成分受热不稳定或易挥发而散失,因此蒸制品与生品相比明显降低的成分可能是产生麻舌感的刺激性成分。炮制前后多花黄精部分色谱峰变化明显,新增了 7 个色谱峰,包括月桂烯、5-羟甲基糠醛、邻二甲苯等,其中 2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮、5-羟甲基糠醛和水芹烯是在蒸制 5 次后才出现,这些化合物可以作为区分多花黄精生品和蒸制品以及判断蒸制程度的专属性化合物。由 PCA、HCA 结果可知,多花黄精炮制前后成分含量差异较大,采用 OPLS-DA 可将多花黄精生品与炮制品区分开。综合分析结果,多花黄精生品与蒸制品的主要差异性成分为(+)-柠檬烯、间二甲苯、邻二甲苯、正二十烷、2,4-二叔丁基苯酚、4,6-二甲基十二烷、2-乙基甲苯,其中相对含量明显降低的间二甲苯、正二十烷、2,4-二叔丁基苯酚、4,6-二甲基十二烷可能为多花黄精生品中的刺激性成分。

二甲苯可经呼吸道、皮肤及消化道吸收,其蒸气可引起眼、鼻、喉的刺激,高浓度时可致严重的呼吸困难,甚至死亡^[20]。欧洲化学品管理局(ECHA)将 2,4-二叔丁基苯酚(2,4-DTBP)标记为“对水生生物具有严重毒性及长期效应”且具有“潜在的内分泌干扰”特征。刘旺^[21]研究发现,2,4-DTBP 可能通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)通路对斑马鱼产生免疫抑制毒性,破坏仔鱼及成鱼的肠道稳态,导致斑马鱼摄食能力下降,长期暴露下引起斑马鱼死亡。因此,间二甲苯和 2,4-DTBP 可能为多花黄精生品挥发性成分中的刺激性成分,具体机制有待进一步研究。

3.3 色度值与蒸制火候相关性研究

中药来源于自然界,多以动植物药用部位入药,均有食物的天然属性,俗称“药食同源”。由此,自然想到中药炮制过程中所产的不同于生饮片的独特气味、颜色及口感与美拉德反应不无关系^[22]。蒸制次数和辅料可显著性地改变美拉德反应后期形成的一类棕褐色的、结构复杂的大分子化合物的种类与特性,使中药“九蒸九晒”炮制品具有“光黑如漆,味甘如饴”的特点,从而表现出“生凉熟温”“生毒熟减”等生熟异治规律。炮制次数及时间对美拉德反应的影响也较大,随着时间的增加美拉德产物吸光度与加热时间呈一定的线性关系。

本研究通过测定粉末的色度值,量化样品颜色的变化,将色度值与色谱峰进行相关性分析,结合

分析结果可知, L^* 、 b^* 、 E^* 与大部分潜在差异性标志物具有极显著性或显著性相关 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且多花黄精随着九蒸九制颜色变化可分为 2 个阶段, 分别是一蒸~四蒸、五蒸~九蒸, 明确了多花黄精在九蒸九制过程中颜色动态变化规律, 这与九蒸九制槐角^[23]、何首乌^[24]颜色变化基本一致, 为实现多花黄精不同饮片的辨别及九蒸九晒炮制程度的判断提供一定参考依据。

综上, 本研究将多花黄精饮片色度值与 GC-MS 指纹图谱相结合, 研究生、制品颜色与挥发性成分的差异, 初步明确了两者的关联性, 为多花黄精生品的刺激性成分研究及不同次数蒸制品的质量分析提供参考。

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. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 谢冰宗, 李密, 董彩文, 等. 黄精皂苷与多糖超声辅助提取工艺优化及降血糖活性研究 [J]. 食品与机械, 2024, 40(1): 158-166, 196. Xie B Z, Li M, Dong C W, et al. Study on the technology of ultrasonic assisted combined extraction of saponins and polysaccharides from *Polygonatum sibiricum* and its hypoglycemic activity [J]. Food Mach, 2024, 40(1): 158-166, 196.
- [3] Pan M, Wu Y J, Sun C Y, et al. *Polygonati Rhizoma*: A review on the extraction, purification, structural characterization, biosynthesis of the main secondary metabolites and anti-aging effects [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 327: 118002.
- [4] 梁泽华, 潘颖洁, 邱丽媛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析黄精九蒸九晒炮制过程中化学成分的变化 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 4948-4957. Liang Z H, Pan Y J, Qiu L Y, et al. Analysis on chemical components changes of *Polygonati Rhizoma* in processing of nine times steaming and nine times sunning by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(16): 4948-4957.
- [5] Luo M, Hu Z R, Zhong Z X, et al. Chemical structures and pharmacological properties of typical bioflavonoids in *Polygonati rhizoma* (PGR) [J]. J Environ Public Health, 2022, 2022: 4649614.
- [6] 樊淑森. 黄精化学成分及其代谢组学研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- [7] Fan S M. Study on chemical constituents and metabolomics of *Polygonatum sibiricum* [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2023.
- [8] 孟洗. 食疗本草校注 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2015: 二. Meng S. *Annotated and Collated Materia Medica for Dietary Therapy* [M]. zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2015: 2.
- [9] 邓欣雨, 马春花, 王梓萌, 等. 九制多花黄精对雌性大鼠慢性不可预知应激模型的预防效果 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(7): 117-124. Deng X Y, Ma C H, Wang Z M, et al. Effect of processed *Polygonatum cyrtonema* in preventing depression induced by chronic unpredictable mild stress in female rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(7): 117-124.
- [10] 龚欢, 覃宝怡, 施松善, 等. 制黄精多糖的结构表征及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5418-5427. Gong H, Qin B Y, Shi S S, et al. Structural characteristics and antioxidant activity of processed *Polygonatum cyrtonema* polysaccharides [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(16): 5418-5427.
- [11] 任萃姣, 丁杨飞, 李靖季, 等. 多花黄精炮制前后化学成分差异的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(24): 183-189. Ren C J, Ding Y F, Li J J, et al. Differences in chemical composition of *Polygonatum Cyrtonema Rhizome* before and after processing based on UPLC-Q-exactive orbitrap MS analysis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(24): 183-189.
- [12] 仲瑞雪, 沈灵, 刘艳艳, 等. 不同炮制方法对黄精草酸钙针晶形态及含量的影响研究 [J]. 安徽医药, 2024, 28(9): 1732-1736. Zhong R X, Shen L, Liu Y Y, et al. The morphology and content of calcium oxalate needle crystal with different *Polygonati Rhizoma* processing methods [J]. Anhui Med Pharm J, 2024, 28(9): 1732-1736.
- [13] 唐美玲. 生黄精的刺激性成分及其炮制减毒增效作用研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022. Tang M L. Study on the irritant components of raw *Polygonati Rhizoma* and its detoxification and synergistic effect of processed [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2022.
- [14] 施繁莉, 吕慧侠, 张振海. 中药药效物质基础的相对动态性研究进展 [J]. 药学进展, 2021, 45(11): 855-861. Shi F L, Lyu H X, Zhang Z H. Progress of research on relative dynamics of the pharmacodynamic material basis of traditional Chinese medicines [J]. Prog Pharm Sci,

- 2021, 45(11): 855-861.
- [14] 徐东婷, 李美洲, 余欣彤, 等. 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 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(11): 2723-2730.
- Xu D T, Li M Z, Yu X T, et al. Difference of different processing time of carbonized *Imperatae Rhizoma* based on fingerprints and chromatic values [J]. Drugs Clin, 2023, 38(11): 2723-2730.
- [15] 杜伟锋, 赵明方, 汤璐璐, 等. 醋延胡索炮制过程中色度值与生物碱含量相关性研究 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3327-3334.
- Du W F, Zhao M F, Tang L L, et al. Influence of vinegar processing on the correlation between chromatic values and alkaloid content of *Corydalis Rhizoma* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(10): 3327-3334.
- [16] 程钰洁, 邱彩月, 洪婉敏, 等. 车前子及其炮制品色度值、UPLC 指纹图谱及体外抗氧化活性的差异研究 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6657-6670.
- Cheng Y J, Qiu C Y, Hong W M, et al. Comparative study on chromaticity value, UPLC fingerprint and antioxidant activity *in vitro* of *Plantaginis Semen* and its different processed products [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6657-6670.
- [17] 胡斯佳. 黄精炮制过程客体“印迹模板”特征变化规律的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- Hu S J. Study on the characteristics of the object “imprinting template” during the processing of *Polygonatum sibiricum* [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2023.
- [18] 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.
- Yu L Y, Li X, Qiang M Q, et al. HPLC fingerprint and chromatic value of dried ginger and processed ginger [J]. Cent South Pharm, 2022, 20(10): 2305-2311.
- [19] 常相伟, 王博然, 王彤, 等. 基于 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): 3609-3614.
- Chang X W, Wang B R, Wang T, et al. Plant metabolomics approach for age discrimination of mountain cultivated ginseng using UPLC-Q-TOF/MS [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(19): 3609-3614.
- [20] 王秀玲. 二甲苯毒理学研究进展 [J]. 国外医学(卫生学分册), 1997(2): 77-79, 105.
- Wang X L. Research progress of xylene toxicology [J]. Foreign Med Sci Sect Hyg, 1997(2): 77-79, 105.
- [21] 刘旺. 2, 4-二叔丁基苯酚对斑马鱼的免疫毒性效应及其作用机制研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.
- Liu W. Immunotoxic effects of 2,4-ditert-butyl phenol and its mechanism on zebrafish. [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2021.
- [22] 周逸群, 贺福元, 杨岩涛, 等. 美拉德反应研究现状及对中药炮制和制剂工艺研究方法的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 125-130.
- Zhou Y Q, He F Y, Yang Y T, et al. Research situation of Maillard reaction and its influence on research methods for processing and preparation process of Chinese materia Medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2014, 45(1): 125-130.
- [23] 牛晓静, 苏畅, 鲁静, 等. 九蒸九制槐角炮制过程主要成分、物性参数及颜色的相关性分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(8): 1236-1245.
- Niu X J, Su C, Lu J, et al. Correlation analysis on the content of main components, physical parameters and the color of *sophorae fructus* in nine-steam-nine-bask processing [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(8): 1236-1245.
- [24] 于淼. 基于九蒸九晒特色炮制技术的何首乌饮片炮制原理初探 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2024.
- Yu M. Preliminary study on processing principle of *Polygonum multiflorum* decoction pieces based on the characteristic processing technology of nine-time repeating steaming and sun-drying [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2024.

[责任编辑 孙英杰]