

## • 药剂与工艺 •

## 基于粉末和显微特征颜色数字化的生地黄与熟地黄判别

甄臻<sup>1</sup>, 李慧芬<sup>1</sup>, 刘静<sup>1</sup>, 王杨<sup>1</sup>, 孔庆悦<sup>1</sup>, 张学兰<sup>1,2\*</sup>

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心, 山东 济南 250355

**摘要:**目的 采用色差法和显微成像技术获取生地黄与熟地黄粉末和显微特征颜色信息, 通过统计分析探究基于色度学原理对生地黄与熟地黄进行快速鉴别的可行性。方法 利用色差仪测定地黄生、熟品粉末颜色, 使用显微镜摄取生地黄与熟地黄木栓细胞、导管的显微特征图像, 使用“显微特征颜色提取”软件测定显微特征颜色, 以生地黄与熟地黄粉末和显微特征颜色值( $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ )及总值( $E^*_{ab}$ )为基础, 利用 Kruska-Wallis  $H$  秩和检验、聚类分析和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)研究生地黄与熟地黄的差异, 利用 Fisher 判别分析建立二者粉末与显微特征颜色的非标准化典则判别函数。结果  $a^*$ 为生地黄与熟地黄主要差异性颜色值, 木栓细胞为生地黄与熟地黄主要差异性显微特征。生地黄与熟地黄粉末颜色的非标准化典则判别函数为  $y=0.629 L^*+0.379 a^*-2.754 b^*+1.494 E^*_{ab}-40.662$ , 显微特征颜色的非标准化典则判别函数为  $y=0.497 L^*-0.659 b^*+0.267 E^*_{ab}-5.428$ ; 上述 2 个函数判别规则为  $y>0$  判为生地黄,  $y<0$  判为熟地黄。结论 利用色差法和显微成像技术实现了生地黄与熟地黄粉末和显微特征颜色的数字化表达, Fisher 判别分析利用饮片粉末和显微特征颜色信息可有效判别生地黄与熟地黄, 为中药生、制饮片的判别提供了一种新方法, 为中药饮片的质量评价提供了借鉴。

**关键词:** 生地黄; 熟地黄; 粉末颜色; 显微特征颜色; 数字化; 色差法; 显微成像技术; Kruska-Wallis  $H$  秩和检验; 聚类分析; 正交偏最小二乘-判别分析; Fisher 判别分析

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)24-7438-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.005

Identification of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* based on color digitization of powder and microscopic characteristicsZHEN Zhen<sup>1</sup>, LI Hui-fen<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>, KONG Qing-yue<sup>1</sup>, ZHANG Xue-lan<sup>1,2</sup>

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Province University Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Quality Control and Construction of Whole Industry Chain, Jinan 250355, China

**Abstract: Objective** To study the color information of powder and microscopic characteristics of Dihuang (*Rehmanniae Radix*, RR) and Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*, RRP) by the color difference method and the microscopic imaging technology, and explore the feasibility of rapid identification of RR and RRP based on colorimetric principle through statistical analysis.

**Methods** The precision colorimeter was used to measure the powder color of RR and RRP, the microscope was used to obtain the

收稿日期: 2021-07-08

**基金项目:** 国家重点研发计划课题(2018YFC1707002); 国家重点研发计划课题(2018YFC1707204); 山东省高校中药质量控制与全产业链建设协同创新中心资助课题(CYLXTCX2021-12); 《山东省中药饮片炮制规范》(2022年版)饮片标准研究课题(2020-272); 《山东省中药饮片炮制规范》(2022年版)饮片标准研究课题(2020-273); 《山东省中药饮片炮制规范》(2022年版)饮片标准研究课题(2020-274)

**作者简介:** 甄臻(1996—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药饮片制备技术与质量控制研究。

Tel: 13280011703 E-mail: zz961018@126.com

**\*通信作者:** 张学兰(1963—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药饮片制备技术与质量控制研究。

Tel: 13406062766 E-mail: zhang8832440@sina.com

microscopic images of cork cells and conduits of RR and RRP, the “microscopic characteristics color extraction” software was used to measure the microscopic characteristics color, based on the values of  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  and  $E^*_{ab}$  of powder and microscopic characteristics of RR and RRP, Kruska-Wallis  $H$  test, hierarchical cluster analysis and OPLS-DA was used to compare the differences between RR and RRP, Fisher discriminant analysis was used to establish the non-standardized criterion discriminant function of powder color and microscopic characteristics color of RR and RRP. **Results**  $a^*$  was the main difference color value and the cork cells was the main difference in microscopic characteristics of RR and RRP. The non-standardized criterion discriminant function of powder color:  $y = 0.629 L^* + 0.379 a^* - 2.754 b^* + 1.494 E^*_{ab} - 40.662$  and the non-standardized criterion discriminant function of microscopic characteristics color:  $y = 0.497 L^* - 0.659 b^* + 0.267 E^*_{ab} - 5.428$ , the discriminant rules of the two functions were as follows:  $y > 0$  corresponding to RR,  $y < 0$  corresponding to RRP. **Conclusion** The digital expression of powder color and microscopic characteristics color of RR and RRP is realized by the color difference method and the microscopic imaging technology, Fisher discriminant analysis are feasible to distinguish the RR and RRP using the color information of powder and microscopic characteristics, which provides a new method for the identification of raw and processed Chinese medicine, with view to providing reference for quality evaluation of Chinese medicine.

**Key words:** *Rehmanniae Radix*; *Rehmanniae Radix Praeparata*; color of powder; color of microscopic characteristics; digitization; color difference method; microscopic imaging technology; Kruska-Wallis  $H$  test; hierarchical cluster analysis; OPLS-DA; fisher discriminant analysis

地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的新鲜或干燥块根, 生地黄 *Rehmanniae Radix* (RR) 炮制成熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata* (RRP) 后药性由寒性转变为温性, 作用由清转化为补, 味由苦转甜。生地黄具有清热凉血、养阴生津的作用, 熟地黄则具有滋阴补血、益精填髓的作用<sup>[1]</sup>。《中国药典》2020 年版一部收录了生地黄与熟地黄饮片, 规定了生地黄的显微鉴别内容, 对其粉末颜色及显微特征颜色仅进行了主观描述, 无客观的颜色量化评价指标, 熟地黄则无显微鉴别内容, 不能体现炮制对其显微特征的影响。徐曼菲等<sup>[2]</sup>提出“辨色论质”的思想, 认为颜色作为最直观的指标与药材内在质量具有直接关系, 但是, 传统的经验鉴别法对于中药饮片颜色的评价依赖于主观判断, 存在主观性强、个体差异大的缺点。现在, 已有研究利用色差仪实现了一些中药饮片外观和粉末颜色的客观化评价, 如大黄、党参、穿心莲<sup>[3-5]</sup>。有学者还将颜色与成分含量、生物活性等质量评价指标进行了相关性研究, 结果表明, 饮片颜色与成分含量、生物活性密切相关<sup>[6-9]</sup>, 同时也证明了颜色作为质量评价指标之一的科学性。

显微鉴定技术利用光学系统或电子光学系统设备, 观察肉眼所不能分辨的微小物体形态结构及其特征<sup>[10]</sup>, 具有快捷、简单、准确的特点<sup>[11]</sup>。目前, 该技术在中药饮片质量研究中已广泛应用, 主要用于中药材(饮片)的定性鉴别<sup>[12-15]</sup>, 及通过显微特征定量、显微组织测定实现显微特征数量的定量分析<sup>[16-19]</sup>。目前研究已建立了生地黄与熟地黄的含量

测定方法、HPLC 指纹图谱、炮制工艺<sup>[20-23]</sup>, 但未见生地黄与熟地黄粉末与显微特征颜色数字化评价相关研究报道。本研究采用色差法和显微成像技术量化生地黄与熟地黄饮片粉末和显微特征的颜色, 并通过多种数理统计方法分析生地黄与熟地黄粉末、显微特征颜色的差异性, 建立生地黄与熟地黄饮片的判别函数, 为进一步完善生地黄与熟地黄饮片的质量标准提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

WF30 精密色差仪, 深圳市威福光电科技有限公司; Olympus BX 53 显微镜, 广州市明美光电技术有限公司, 配套成像软件, Mshot Image Analysis System; New Classic MF 型电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; 101-IES 电热鼓风干燥箱, 北京市永光明医疗仪器有限公司; 粘附载玻片, 1.0~1.2 mm, 25 mm×75 mm, Wuhan Goodbio Technology Co., Ltd.; SAIL BRAND 盖玻片, 0.13~0.17 mm, 22 mm×22 mm, 天津市奥淇洛谱商贸有限公司。

### 1.2 药品与试剂

水合氯醛(质量分数为 99.5%, 批号 J09S10H97118)、甘油(质量分数为 99%, 批号 Z20A10Y95672), 上海源叶生物科技有限公司。

水合氯醛试液的配制<sup>[1]</sup>: 取水合氯醛 50 g, 加水 15 mL 与甘油 10 mL 使溶解, 即得。

### 1.3 生地黄与熟地黄饮片样品收集信息

共收集生地黄、熟地黄饮片各 10 批样品, 具体样品信息见表 1、2, 经山东中医药大学李峰教授鉴

表 1 10 批生地黄饮片样品信息

Table 1 Ten batches of samples information of RR

编号	批号	生产企业
SD1	2020070261	安徽家佑中药饮片有限公司
SD2	20200401	山东建联盛嘉中药有限公司
SD3	191216	上海康桥中药饮片有限公司
SD4	20250622	上海万仕诚药业有限公司
SD5	180304	山东百味堂中药饮片有限公司
SD6	20040102	郑州瑞龙制药股份有限公司
SD7	20200301	山东建联盛嘉中药有限公司
SD8	2001589111	安国市祁澳中药饮片有限公司
SD9	18070165	山东蓝泽中药饮片有限公司
SD10	2005002	河北润华药业有限公司

表 2 10 批熟地黄饮片样品信息

Table 2 Ten batches of samples information of RRP

编号	批号	生产企业
JD1	191101	安徽家佑中药饮片有限公司
JD2	20191101	山东建联盛嘉中药有限公司
JD3	190801	上海康桥中药饮片有限公司
JD4	20240707	上海上药华宇药业有限公司
JD5	18071001	郑州瑞龙制药股份有限公司
JD6	180304	山东百味堂中药饮片有限公司
JD7	20200401	山东建联盛嘉中药有限公司
JD8	200429166	山东蓝泽中药饮片有限公司
JD9	1191001086	安国市惠泰嘉生中药材有限公司
JD10	2001589111	安国市祁澳中药饮片有限公司

定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根的炮制加工品。所有样品均粉碎过 4 号筛, 备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 生地黄与熟地黄饮片外观颜色比较

取生地黄与熟地黄饮片各 10 批, 室内自然光下观察其外观颜色, 结果 10 批生地黄饮片外表皮棕黑色或棕灰色, 切面棕黄色至黑色或乌黑色, 10 批熟地黄饮片外表皮和断面均呈乌黑色, 生地黄与熟地黄饮片的外观颜色均符合《中国药典》2020 年版要求。饮片性状见图 1。

### 2.2 生地黄与熟地黄饮片粉末和显微特征颜色比较

《中国药典》2020 年版一部地黄饮片“鉴别”项下规定, 生地黄粉末深棕色, 其显微特征包括木栓细胞、薄壁细胞、分泌细胞、导管<sup>[1]</sup>。

取生地黄与熟地黄饮片粉末各 10 批, 按照《中



图 1 生地黄 (A) 与熟地黄 (B) 饮片实物图

Fig. 1 Practicality picture of decoction pieces of RR (A) and RRP (B)

国药典》2020 年版四部 2001 显微鉴别法(粉末制片法)制备生地黄、熟地黄粉末制片<sup>[1]</sup>, 置于显微镜下观察。结果 10 批生地黄饮片粉末均呈深棕色, 10 批熟地黄粉末均呈棕褐色或棕黑色; 10 批生地黄与熟地黄饮片均检出木栓细胞、薄壁细胞、分泌细胞、导管。与生地黄饮片比较, 熟地黄饮片粉末和显微特征的颜色均呈不同程度加深。显微特征见图 2。

### 2.3 生地黄与熟地黄饮片粉末颜色测定

**2.3.1 色差法原理** 色差法是利用 CIE  $L^* a^* b^*$  均匀色空间及色差公式进行颜色测定, 为国际通用的测色标准。该法采用  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  3 个指标表征被测物质的颜色:  $L^*$  为亮度值, 值越大亮度越高;  $a^*$  为红-绿色轴,  $+a^*$  表示红色,  $-a^*$  表示绿色, 值越大颜色偏红, 反之偏绿;  $b^*$  为黄-蓝色轴,  $+b^*$  表示黄色,  $-b^*$  表示蓝色, 值越大颜色偏黄, 反之偏蓝<sup>[24]</sup>;  $E^*_{ab}$  为总色值, 表示待测物质的总体颜色情况, 计算公式为  $E^*_{ab}=[L^{*2}+a^{*2}+b^{*2}]^{1/2}$ <sup>[25]</sup>。

**2.3.2 测定条件** 可选光源: D65; 色系: LAB; 口径 8 mm; 照明 8/d; 含光: SCI。

**2.3.3 精密度试验** 取生地黄饮片粉末(过 4 号筛), 均匀平铺于测试盒中, 连续测定 6 次, 记录  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值, 结果 RSD 分别为 0.08%、0.35%、0.95%, 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.4 样品饮片粉末颜色测定** 生地黄与熟地黄饮片粉末(过 4 号筛), 利用精密色差仪进行颜色测定, 记录样品的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值, 并计算  $E^*_{ab}$  值, 每份样品粉末平均测定 3 次, 取平均值。结果见表 3。

### 2.4 生地黄与熟地黄饮片显微特征颜色测定

**2.4.1 粉末装片制备** 精密称取生地黄与熟地黄饮片样品粉末(过 4 号筛) 1.00 mg 置于载玻片上, 滴加水合氯醛试液 60  $\mu$ L, 盖上盖玻片, 置于烘箱内 90  $^{\circ}$ C 加热 10 min。

**2.4.2 显微特征摄取条件** 对 Mshot Image Analysis

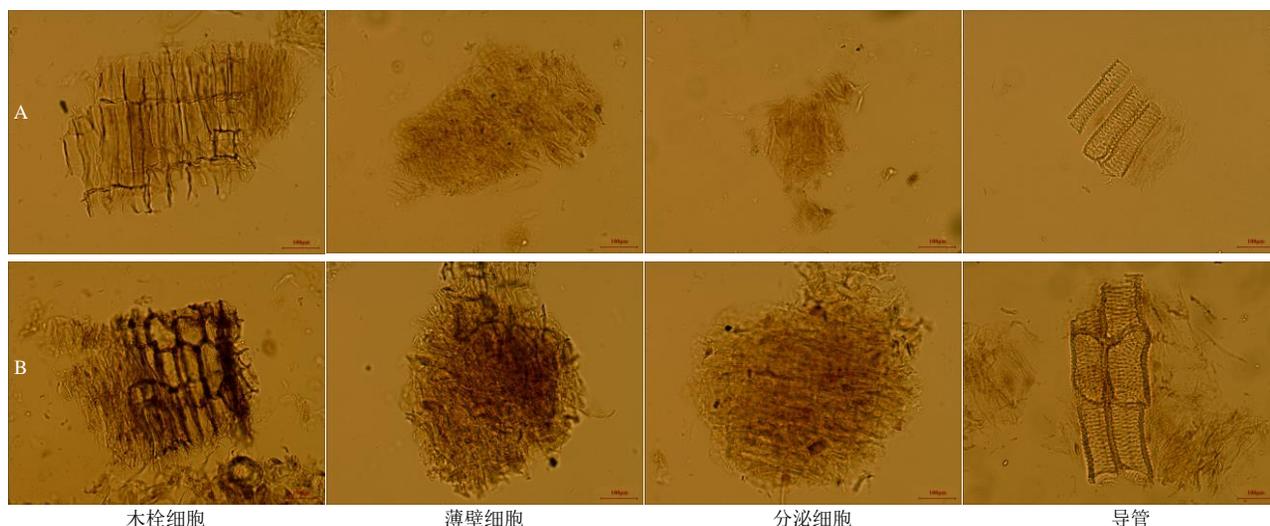


图2 生地黄 (A) 与熟地黄 (B) 饮片显微特征图 (×200)

Fig. 2 Microscopic characteristics of RR (A) and RRP (B) (× 200)

表3 生地黄与熟地黄饮片粉末颜色测定结果 (n = 3)

Table 3 Determination results of powder color of RR and RRP (n = 3)

样品 编号	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*_{ab}$	样品 编号	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*_{ab}$
SD1	35.30	8.37	14.21	38.96	JD1	32.46	7.07	13.39	35.82
SD2	34.66	8.51	14.16	38.40	JD2	30.90	7.21	12.75	34.20
SD3	33.54	8.55	14.48	37.52	JD3	29.81	6.94	12.88	33.21
SD4	35.30	8.99	15.61	39.63	JD4	30.33	6.70	12.46	33.47
SD5	34.26	8.25	14.35	38.05	JD5	31.58	7.60	13.17	35.05
SD6	34.08	8.30	13.85	37.71	JD6	31.82	7.97	12.91	35.25
SD7	34.59	8.71	14.64	38.56	JD7	30.99	6.91	12.20	34.01
SD8	36.64	9.36	16.74	41.36	JD8	32.24	7.30	13.25	35.61
SD9	34.48	8.62	15.24	38.67	JD9	32.44	7.83	13.32	35.93
SD10	39.55	10.27	18.62	44.90	JD10	31.91	7.49	13.28	35.37

表4 Mshot Image Analysis System 软件参数

Table 4 Software parameters of Mshot Image Analysis System

项目	参数
分辨率	预览分辨率设定为 2560×1944, 捕获分辨率为 2560×1944
曝光控制	非自动曝光 (目标 120, 增益 1; 曝光时间 500.0 ms), 帧速为 NORMAL SP, 电源频率为直流
颜色控制	增益控制 (红色增益 75, 绿色增益 68, 蓝色增益 165), 无颜色增强 (饱和度默认 100), 无单色, 无自动白平衡, 颜色校正 OFF
图像调整	亮度控制 (亮度 115, 对比度 23, 伽马值 0.730, 锐度 0), 无降噪与 3D 降噪
荧光控制	自动黑平衡 (最小值 24, 最大值 255), 无曝光检测, 无过曝检测, BINNING: 1×1, 染色 OFF

片制备方法制备粉末装片 1 份, 在室温 (25 °C) 条件下自然放置 24 h, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 置显微镜下观察并摄取同一木栓细胞显微图像, 采

System 成像软件的分辨率、曝光控制、颜色控制、图像调整、荧光控制模块进行设置, 具体参数见表 4。调整显微镜光圈数值 3, 设置光圈大小 3, 光源强度 3, 放大倍数 200 倍 (目镜×10, 物镜×20), 木栓细胞、导管 2 种显微特征各摄取 3 张不同的显微图像。

**2.4.3 精密度试验** 取同一批生地黄粉末 (过 4 号筛), 约 1 mg, 精密称定, 按“2.4.1”项下粉末装片制备方法制备粉末装片 1 份, 置显微镜下观察并摄取木栓细胞显微图像, 采用“显微特征颜色提取”软件对同一木栓细胞连续测定 6 次, 记录木栓细胞的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值, 结果  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值的 RSD 分别为 0.04%、0.01%、0.02%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.4 稳定性试验** 取同一批生地黄粉末 (过 4 号筛), 约 1 mg, 精密称定, 按“2.4.1”项下粉末装

用“显微特征颜色提取”软件测定并记录木栓细胞的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值, 结果  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值的 RSD 分别为 0.03%、0.06%、0.03%, 表明样品在 24 h 内颜色值

稳定性良好。

**2.4.5 重复性试验** 取同一批生地黄粉末(过4号筛)平行6份,各约1 mg,精密称定,按“2.4.1”项下粉末装片制备方法制备,置于显微镜下观察并摄取木栓细胞显微图像,测定并记录木栓细胞的 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 值,结果 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 值的RSD分别为0.02%、0.04%、0.02%,表明该方法重复性良好。

**2.4.6 显微特征颜色测定** 取生地黄与熟地黄饮片粉末(过4号筛),按“2.4.1”项下方法制备粉末装片,置于显微镜下观察木栓细胞、导管,按“2.4.2”项下显微特征摄取条件摄取木栓细胞与导管显微图像,将显微图像导入“显微特征颜色提取”软件,测定并记录 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 值,取3张图像 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 值的平均值,并计算 $E^*_{ab}$ 值。结果见表5。

**2.5 生地黄与熟地黄饮片粉末颜色差异性分析**

**2.5.1 Kruska-Wallis H 秩和检验** 由于本实验数据不满足正态性,故采用Kruska-Wallis H 秩和检验对生地黄与熟地黄饮片粉末颜色 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$ 值

**表5 生地黄与熟地黄饮片显微特征颜色测定结果 (n = 3)**  
**Table 5 Determination results of microscopic characteristics color of RR and RRP (n = 3)**

编号	木栓细胞颜色值				导管颜色值			
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*_{ab}$	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*_{ab}$
SD1	41.05	19.13	45.16	63.96	40.29	21.10	44.95	63.95
SD2	45.61	21.34	47.78	69.42	48.80	20.24	48.18	71.50
SD3	42.46	25.06	46.67	67.88	45.84	21.15	47.60	69.38
SD4	41.94	22.38	45.29	65.66	44.29	20.19	46.97	67.65
SD5	42.51	19.72	45.58	65.37	41.03	20.44	45.68	64.72
SD6	40.08	22.26	45.68	64.72	44.22	22.57	48.03	69.08
SD7	39.87	21.64	45.57	64.31	44.65	22.82	48.29	69.61
SD8	41.53	21.07	46.93	66.12	42.96	23.32	47.91	68.44
SD9	41.02	22.03	46.06	65.49	39.44	21.55	45.96	64.28
SD10	35.43	23.38	42.62	60.15	45.95	20.22	46.83	68.65
JD1	33.27	22.58	41.66	57.90	34.03	22.70	42.87	59.26
JD2	23.46	20.44	31.34	44.16	36.53	21.24	44.65	61.47
JD3	37.48	22.37	44.56	50.99	39.16	21.10	46.30	60.35
JD4	29.67	22.16	37.26	52.54	31.83	25.12	41.39	57.94
JD5	23.10	21.55	31.89	44.89	36.00	22.20	44.41	61.32
JD6	27.76	21.12	36.88	50.77	39.19	21.58	46.29	64.38
JD7	22.23	20.54	31.01	43.33	29.95	22.38	39.02	54.04
JD8	30.59	25.34	39.94	56.33	37.36	22.03	45.30	62.72
JD9	28.11	21.87	36.65	51.10	35.34	23.17	44.28	61.21
JD10	19.02	22.04	27.31	39.92	35.56	22.98	43.76	60.89

进行差异性比较,结果熟地黄粉末的 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$ 值均较生地黄显著降低( $P < 0.01$ )。结果见表6。

**2.5.2 聚类分析** 运用SPSS 21.0软件进行聚类分析,采用系统聚类法,以生地黄与熟地黄各10批饮片的粉末颜色值 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$ 值为变量,结合平方欧式距离为度量标准,对20批样品进行聚类分析,见图3。结果显示,当距离为5~10时,SD1~SD10为生地黄聚为一类,JD1~JD10为熟地黄聚为一类,表明生地黄与熟地黄饮片粉末颜色具有差异。

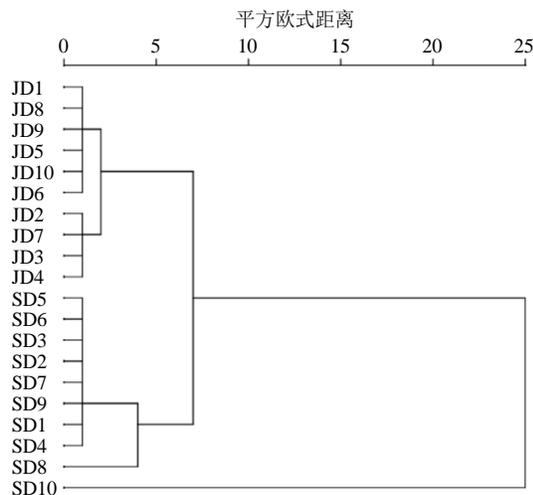
**表6 生地黄与熟地黄饮片粉末颜色 Kruska-Wallis H 秩和检验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )**

**Table 6 Results of Kruska-Wallis H test of powder color of RR and RRP ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )**

饮片	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*_{ab}$
生地黄	35.24±1.73	8.79±0.62	15.19±1.48	39.38±2.23
熟地黄	31.45±0.91**	7.30±0.42**	12.96±0.40**	34.79±0.99**

与生地黄组比较: \*\* $P < 0.01$ , 下表同

\*\* $P < 0.01$  vs RR group, same as below tables



**图3 生地黄与熟地黄饮片粉末颜色值聚类分析**

**Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of powder color value of RR and RRP**

**2.5.3 正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)** 将生地黄与熟地黄各10批饮片的粉末颜色值 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 导入SIMCA14.1软件中,启动PLS-DA分析程序。模型解释率参数 $R^2_X = 1.000$ ,  $R^2_Y = 0.824$ , 预测能力参数 $Q^2 = 0.769$ , 说明所建模型具有较高的稳定性和预测率。分别生成得分散点图与变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)值图,见图4。由图4-A可见,生地黄与熟地黄饮片样品被分为2类,10批生地黄(SD1~SD10)聚为一类,10

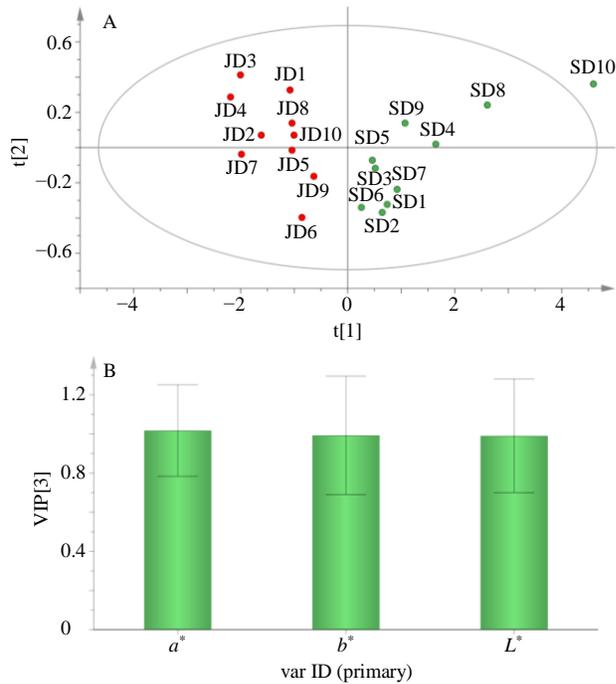


图4 生地黄与熟地黄饮片粉末颜色值 PLS-DA 得分图 (A) 及 VIP 图 (B)

Fig. 4 PLS-DA score graph (A) and VIP graph (B) of powder color value of RR and RRP

批熟地黄 (JD1~JD10) 聚为一类。VIP 值图 (图 4-B) 可直观的表现出各颜色值影响生、熟地黄分类的权重大小, 3 个颜色参数根据 VIP 值大小排序依次为  $a^* > b^* > L^*$ 。VIP > 1 的为  $a^*$ , 认为  $a^*$  值是生地黄与熟地黄饮片粉末主要差异性颜色参数。

**2.5.4 Fisher 判别分析** 将样本分为生地黄、熟地黄两组, 利用 SPSS 21.0 软件, 以组别为因变量, 以饮片粉末颜色值  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  为自变量进行 Fisher 判别分析, 建立判别函数, 并用训练样本对判别式作回代考核, 对判别函数进行可靠性检验。

组均值的均等性检验表明  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值的  $\lambda$  值分别为 0.324、0.310、0.459、0.338,  $P$  值均为 0.00, 认为在生地黄与熟地黄的判别函数中,  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值均具有统计学意义。建立非标准化典则判别函数  $y = 0.629 L^* + 0.379 a^* - 2.754 b^* + 1.494 E^*_{ab} - 40.662$ , 该函数判别规则为  $y > 0$  判为生地黄,  $y < 0$  判为熟地黄。回代验证结果见表 7, 认为该函

表 7 回代检验结果

Table 7 Retrospective test results

实际分类	预测组成员		合计	正判率/ %	平均 正判率/%
	生地黄	熟地黄			
生地黄	10	0	10	100	100
熟地黄	0	10	10	100	

数能通过粉末颜色有效判别生地黄、熟地黄饮片。

**2.6 生地黄与熟地黄饮片显微特征颜色差异性分析**

**2.6.1 Kruska-Wallis  $H$  秩和检验** 由于数据不满足正态性, 故采用 Kruska-Wallis  $H$  秩和检验对生地黄与熟地黄饮片木栓细胞与导管颜色的  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值进行差异性比较。结果熟地黄木栓细胞和导管的  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值均较生地黄显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而二者木栓细胞和导管的  $a^*$  值均无显著性差异。结果见表 8、9。

**2.6.2 聚类分析** 运用 SPSS 21.0 软件进行聚类分析, 采用系统聚类法, 以生地黄与熟地黄各 10 批饮片的木栓细胞、导管的  $E^*_{ab}$  值为变量, 结合平方欧式距离为度量标准, 对 20 批样品进行聚类分析, 见图 5。结果显示, SD1~SD10 为生地黄聚为一类,

表 8 生地黄与熟地黄饮片木栓细胞颜色 Kruska-Wallis  $H$  秩和检验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 8 Results of Kruska-Wallis  $H$  test of color of cork cells of RR and RRP ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

饮片	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*_{ab}$
生地黄	41.15 ± 2.58	21.80 ± 1.70	45.73 ± 1.37	65.31 ± 2.45
熟地黄	27.47 ± 5.61**	22.00 ± 1.38	35.85 ± 5.40**	49.19 ± 5.88**

表 9 生地黄与熟地黄饮片导管颜色 Kruska-Wallis  $H$  秩和检验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 9 Results of Kruska-Wallis  $H$  test of color of conduits of RR and RRP ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

饮片	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$E^*_{ab}$
生地黄	43.75 ± 2.88	21.36 ± 1.17	47.04 ± 1.17	67.73 ± 2.56
熟地黄	35.50 ± 2.95**	22.45 ± 1.17	43.83 ± 2.25**	60.36 ± 2.83**

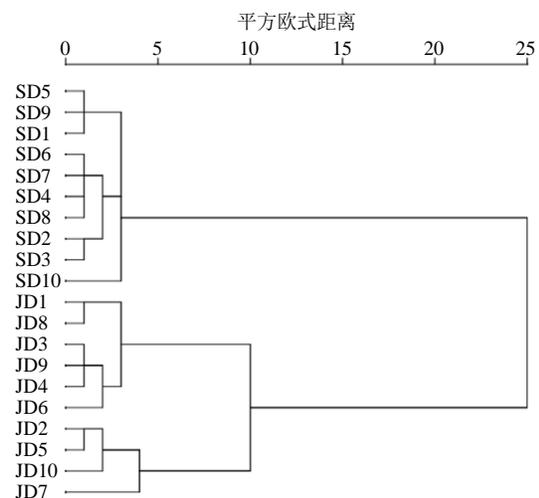


图 5 生地黄与熟地黄饮片显微特征  $E^*_{ab}$  值聚类分析

Fig. 5 Hierarchical cluster analysis of  $E^*_{ab}$  value of microscopic characteristics of RR and RRP

JD1~JD10 为熟地黄聚为一类, 表明生地黄与熟地黄饮片显微特征颜色具有差异。

**2.6.3 OPLS-DA** 将生地黄与熟地黄各 10 批饮片的木栓细胞、导管的  $E^*_{ab}$  值导入 SIMCA14.1 软件中, 启动 PLS-DA 分析程序。模型解释率参数  $R^2_x=1.000$ ,  $R^2_y=0.824$ , 预测能力参数  $Q^2=0.769$ , 说明所建模型具有较高的稳定性和预测率。分别生成得分散点图与 VIP 值图, 见图 6。由图 6-A 可见, 生地黄与熟地黄饮片样品被分为 2 类, 10 批生地黄 (SD1~SD10) 聚为一类, 10 批熟地黄 (JD1~JD10) 聚为一类。如图 6-B 所示, 2 种显微特征根据 VIP 值大小排序依次为木栓细胞>导管。VIP>1 的为木栓细胞, 认为该显微特征是生地黄与熟地黄饮片的主要差异性显微特征。

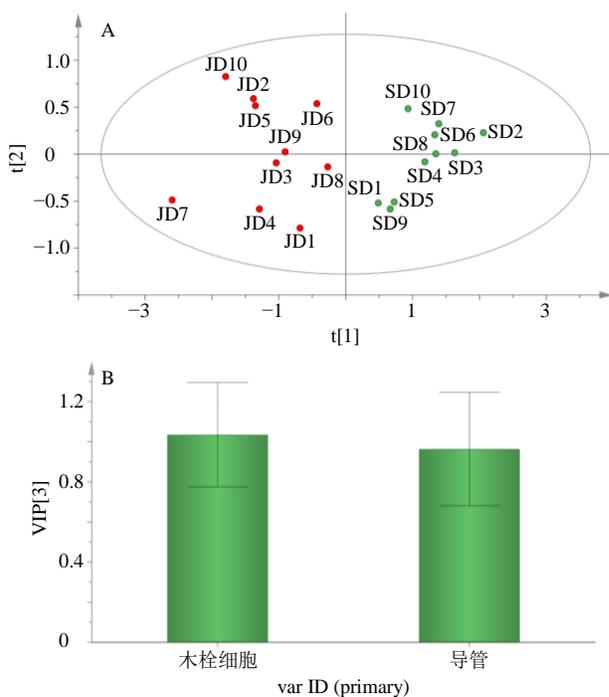


图 6 生地黄与熟地黄显微特征 PLS-DA 得分图 (A) 及 VIP 图 (B)

Fig. 6 PLS-DA score graph (A) and VIP graph (B) of microscopic characteristics of RR and RRP

**2.6.4 Fisher 判别分析** 由“2.6.1”项 Kruska-Wallis  $H$  秩和检验表明, 生地黄与熟地黄木栓细胞和导管颜色的  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值存在显著差异。由“2.6.3”项研究结果可知, 木栓细胞为生地黄与熟地黄饮片的主要差异性显微特征。故将样本分为生地黄、熟地黄 2 组, 利用 SPSS 21.0 软件, 以组别为因变量, 以生、熟地黄饮片的木栓细胞  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值为自变量进行 Fisher 判别分析, 建立判别函数, 并用训

练样本对判别式作回代考核, 对判别函数进行可靠性检验。

组均值的均等性检验表明  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值的  $\lambda$  值分别为 0.268、0.364、0.220,  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值的  $P$  值均为 0.000, 认为生、熟地黄的判别函数中,  $L^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$  值均具有统计学意义。建立非标准化典则判别函数  $y=0.497 L^*-0.659 b^*+0.267 E^*_{ab}-5.428$ , 该函数判别规则为  $y>0$  判为生地黄,  $y<0$  判为熟地黄。回代验证结果见表 10, 认为该函数能通过木栓细胞颜色有效判别生地黄、熟地黄饮片。

表 10 回代检验结果

Table 10 Retrospective test results

实际分类	预测组成员		合计	正判率/ %	平均 正判率/%
	生地黄	熟地黄			
生地黄	10	0	10	100	100
熟地黄	0	10	10	100	

### 3 小结

本研究运用色差法与显微成像技术量化生地黄与熟地黄饮片粉末与显微特征的颜色; 通过 OPLS-DA 分析确定  $a^*$  为二者粉末颜色的主要差异性参数, 木栓细胞为二者主要差异性显微特征; 利用 Fisher 判别分析建立了生地黄与熟地黄饮片粉末、显微特征颜色的非标准化典则判别函数, 规定函数判别规则为  $y>0$  判为生地黄,  $y<0$  判为熟地黄。本研究实现了生地黄与熟地黄粉末与显微鉴别特征颜色的数字化评价, 提供了一种通过粉末与显微特征颜色测定快速判别生地黄与熟地黄饮片的方法。

### 4 讨论

#### 4.1 显微特征颜色测定时粉末装片工艺的优选

目前多采用冷法装片和酒精灯加热透化后装片后进行显微特征观察, 本研究前期对冷法装片、酒精灯加热透化装片、烘箱加热透化装片的透化效果进行比较, 结果发现, 酒精灯和烘箱加热透化的粉末装片中显微特征透化程度完全, 内部结构清晰, 但酒精灯加热透化程度不稳定, 导致显微特征颜色差异较大, 测定结果误差大, 而烘箱加热透化程度稳定, 且便于控制, 因此, 确定采用烘箱加热透化装片。对不同烘制工艺进行比较, 结果以 90 °C 烘制 10 min 装片中显微特征结构清晰, 透化程度统一, 颜色均匀, 因此确定透化工艺为 90 °C 烘 10 min。

因本研究需要待测定显微特征在成像范围内单独存在, 以减少其他显微特征或物质对待测特征的

干扰,保证测定结果的准确度,因此,本研究还对粉末装样量进行优选,以显微镜视野下的特征分布密度是否适合特征单独拍摄的需要以及特征细胞数量是否可以满足拍摄数量的需要为评价标准,确定粉末装样量为1.00~2.00 mg。在上述上对水合氯醛试液用量同样进行了优选,以制备好的装片边缘平整,试液充满整个盖玻片范围,稍有溢出可擦拭干净,内部无气泡为评价标准,选取最佳水合氯醛试液用量为60~70  $\mu\text{L}$ 。

#### 4.2 外界光线对显微特征颜色测定的影响

本研究曾对外界光线是否会影响显微特征颜色测定结果进行了考察,选择早、午、晚3个不同光照强度的时间段,分别在不避光(开灯+不拉帘)和避光(关灯+拉帘)的环境中获取显微特征图像,测定显微特征颜色,结果显示,不同时间段、不同光照环境下各显微特征颜色 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 、 $E^*_{ab}$ 值的RSD均小于3%,说明外界光线的强弱对显微特征颜色测定无明显影响。

#### 4.3 显微特征颜色提取

本研究基于图像分割技术与Lab颜色空间原理,以“显微特征颜色提取”软件,实现显微特征的分割与颜色数字化测定。该软件基于无监督聚类和数学形态学的方法对拍摄的显微特征图像进行分割,进一步采用深度学习模型的图像分割方案,以大量的显微特征分割的标注图像为基础,区分待测显微特征与显微图像背景,实现待测显微特征的圈定<sup>[26]</sup>,然后测定显微特征颜色,结果以 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ 表示。

#### 4.4 显微特征的选择

本研究曾对《中国药典》2020年版地黄与熟地黄显微鉴别项下收录的4种显微特征木栓细胞、薄壁细胞、分泌细胞、导管颜色均进行了测定。实验中发现,薄壁细胞与分泌细胞的边缘结构不清晰,该两种显微特征与显微图像背景的分割效果不好,特征圈定范围或大或小,导致颜色测定结果存在较大误差,因此本实验未对这两种显微特征颜色进行数字化分析。

#### 4.5 生地黄与熟地黄差异性显微特征的筛选

由于每个显微特征的颜色指标有3个参数,分别为 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ ,即1个变量下有3个分变量,不能实现生地黄与熟地黄差异性显微特征的筛选。本研究利用国际公认的色差公式计算每种显微特征的总色值 $E^*_{ab}$ ,将 $E^*_{ab}$ 值作为变量进行PLS-DA分析,

可实现生地黄与熟地黄饮片的差异性显微特征的快速筛选。

**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.2020:129-130,230,418.
- [2] 徐曼菲,吴志生,刘晓娜,等.从辨色论质谈中药质量评价方法[J].中国中药杂志,2016,41(2):177-181.
- [3] 肖井雷,刘玉翠,刘媛媛,等.熟地黄炮制工艺优选及判定标准量化研究[J].中草药,2017,48(8):1571-1576.
- [4] 王清浩,王云,张雪,等.基于“表里关联”的米炒党参炮制过程质量传递规律研究[J].中草药,2019,50(12):2848-2855.
- [5] 张晓,吴宏伟,于现阔,等.基于电子眼技术的穿心莲质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):189-195.
- [6] 宿莹,侯晓琳,刘战,等.基于色差原理分析黄柏有效成分含量与颜色的相关性[J].中药材,2019,42(8):1766-1770.
- [7] 刘伟,周冰谦,王晓,等.丹参药材粉末色泽与有效成分含量的相关性[J].中华中医药杂志,2019,34(4):1466-1470.
- [8] 晏宇杭,卢丽洁,周永峰,等.川白芷产地趁鲜切制与传统切制方法对其质量的影响[J].中草药,2021,52(14):4176-4184.
- [9] 奚亚亚,郑文华,曲丛丛,等.基于形性与生物活性结合的酒炙丹参炮制程度研究[J].中药材,2019,42(11):2538-2541.
- [10] 康廷国.中药鉴定学[M].北京:中国中医药出版社,2003:24-29.
- [11] 魏晓楠,郝铁成,刘庆华,等.中药鉴别方法与技术探究[J].中国野生植物资源,2018,37(4):65-69.
- [12] 石佳,康帅,张南平,等.菟藟子的性状和显微鉴定研究与数字化表征[J].药物分析杂志,2021,41(8):1306-1315.
- [13] 刘家水,鲁轮,张丹雁,等.中药菟丝子与其混伪品的鉴定[J].安徽农业科学,2017,45(3):145-149.
- [14] 王丽,刘铭,杨钊,等.显微定量法鉴别林下山参和园参[J].世界科学技术—中医药现代化,2020,22(2):318-322.
- [15] 杨军.中药材鉴定中应用显微鉴定技术的研究进展[J].光明中医,2021,36(16):2828-2830.
- [16] 陈妍月,龚恒佩,汪红,等.不同地区海芋与混淆品尖尾芋的生药鉴定与显微定量分析研究[J].浙江中医药大学学报,2020,44(1):89-98.
- [17] 刘旭颖,王纹岚,葛朝晖,等.基于优化显微定量法的吴茱萸质量评价[J].中国现代中药,2018,20(5):

- 561-564.
- [18] 那红宇, 张振秋, 许亮. 中药锦灯笼果实显微特征指数的定量研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(6): 249-252.
- [19] 刘子薇, 谢林辰, 靳羽含, 等. 七厘散中红花的显微定量研究 [J]. 药学研究, 2020, 39(7): 385-387.
- [20] 夏梦莹, 曹杰楠, 王媛媛, 等. 基于含量测定及指纹图谱评价酒地黄的质量 [J]. 中药材, 2021, 44(5): 1108-1112.
- [21] 黄春跃, 欧阳丹薇, 牛莉鑫, 等. 基于 HPLC 二维指纹图谱结合化学计量分析对生地黄质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(8): 1667-1674.
- [22] 闫妍, 侯晓琳, 宿莹, 等. 基于指纹图谱和化学计量法的生地黄药材质量评价研究 [J]. 中药材, 2020, 43(10): 2482-2486.
- [23] 张振凌, 吴若男, 于文娜, 等. 生地黄产地加工炮制一体化工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4767-4772.
- [24] 赵于前, 陈真诚, 李凌云, 等. 基于对比度信息的彩色图像分割 [J]. 计算机工程与应用, 2005(34): 19-20.
- [25] 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.
- [26] Liu J, Qiu D W, Zhang X L, *et al.* An efficient cell segmentation algorithm based on unsupervised clustering and morphology [J] // 2019 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM) [C]. San Diego: IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, 2019: 2455-2460.

[责任编辑 郑礼胜]