

## 基于物质基础与颜色变化相关性分析的制何首乌古今炮制方法探讨

于淼, 代悦, 刘涛涛, 肖永庆, 李丽\*

中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

**摘要:**目的 比较古代经典炮制方法与《中国药典》2020 年版收载炮制方法对制何首乌 *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* 饮片主要化学成分及颜色的影响, 探讨古今炮制方法的差异性。方法 采用 HPLC 法测定制何首乌不同饮片中没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚共 7 种成分含量; 采用电子眼技术对制何首乌不同饮片颜色进行客观表征; 利用偏最小二乘回归法 (partial least squares regression method, PLS) 对主要成分含量与颜色进行相关性分析。结果 古今方法炮制的制何首乌饮片在化学成分组成及含量方面具有显著差异, 药典法制何首乌中没食子酸含量约为九蒸九晒何首乌的 1.3 倍, 与九蒸九晒何首乌相比, 二苯乙烯苷减少了约 43%, 蒽醌苷类成分减少了约 74%, 5-羟甲基糠醛仅在药典法制何首乌中检出。电子眼分析结果显示, 何首乌经炮制后颜色变深变红变蓝, 药典法较九蒸九晒制何首乌饮片颜色变化程度更深。7 种主要成分含量和颜色的系统聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 结果均显示, 不同方法炮制的制何首乌饮片可以分别聚类, 且与生首乌相比, 古、今方法炮制的何首乌可聚为一类, 体现了古今炮制方法的个性特征和共性规律。何首乌不同饮片中没食子酸、二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚与其颜色指标显著相关。结论 古代经典九蒸九晒法与药典法制何首乌饮片的主要成分含量及颜色的总体变化趋势较为相似, 但有程度上的差异, 且二者成分组成也有明显的区别, 极有可能导致其药效及毒性的差异。

**关键词:** 制何首乌; 九蒸九晒; 药典法; 多成分含量; 色度值; 多元统计分析; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 二苯乙烯苷; 大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 大黄素; 大黄素甲醚

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)11-3480-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.11.010

## Discussion on ancient and modern processing methods of *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* based on correlation analysis of material basis and color changes

YU Miao, DAI Yue, LIU Tao-tao, XIAO Yong-qing, LI Li

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**Abstract: Objective** To compare the effect of ancient classical processing method and those contained in the *Chinese Pharmacopoeia* (2020 edition) on the main chemical components and colors of Zhiheshouw ( *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*, PMRP) decoction pieces, and to explore the differences between the ancient and modern processing methods. **Methods** HPLC was used to determine the contents of gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, stilbene glycoside, emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside, physcion-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside, emodin, physcion in different decoction pieces of PMRP; Electronic eye technology was used to objectively characterize the color of different decoction pieces of PMRP; Partial least square regression method (PLS) was used to analyze the correlation between the content of main components and color characteristics. **Results** The content determination results showed that the content of gallic acid in PMRP prepared by pharmacopoeia method was about 1.3 times that of the *Polygoni Multiflori Radix* (PMR) prepared by nine times of steaming and drying. Compared with PMR prepared by nine times of steaming and drying, the content of stilbene glycosides and anthraquinone glycosides decreased by about 43% and 74%. 5-Hydroxymethylfurfural was detected only in PMRP prepared by pharmacopoeia method. The results of electronic eye analysis showed that the color of PMR became dark, red and

收稿日期: 2022-12-28

基金项目: 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04205); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZXKT23007)

作者简介: 于淼 (1995—), 女, 硕士研究生, 从事中药炮制与中药质量评价研究。E-mail: yumiao\_zdnx@163.com

\*通信作者: 李丽, 研究员, 硕士生导师, 从事中药炮制与中药质量评价研究。Tel: (010)64032658 E-mail: lili7755@163.com

blue after processing, and the change of color in PMRP prepared by pharmacopoeia method was deeper than that in PMR prepared by nine times of steaming and drying. The results of hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) of the content of seven main components and the colors showed that PMRP decoction pieces processed by different methods could be clustered separately, and compared with raw PMR, PMR processed by ancient and modern methods could be clustered together, which reflected the individual characteristics and common rules of ancient and modern processing methods. Gallic acid, stilbene glycoside, emodin-8-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside and physcion in different decoction pieces of PMR were significantly correlated with their color indexes.

**Conclusion** The overall trend of changes of the contents of the main components and the color of PMRP decoction pieces are similar between the ancient classic method of nine times of steaming and drying and the pharmacopoeia method, but there are differences in degree, and there are also differences in composition, which may lead to the differences in their efficacy and toxicity.

**Key words:** *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*; nine times of steaming and drying; pharmacopoeia method; multi-component content; chromatic value; multivariate statistical analysis; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; stilbene glycoside; emodin-8-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside; physcion-8-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside; emodin; physcion

何首乌为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 味苦、甘、涩, 性微温。生品具有解毒、消痈、截疟、润肠通便等功效, 炮制后味转甘厚而性转温, 增强了补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨、化浊降脂等功效<sup>[1]</sup>, 故临床多以制品应用<sup>[2]</sup>。近年来有关何首乌不良反应事件频发<sup>[2-4]</sup>, 其中以肝毒性为主, 由此引发了对何首乌临床安全用药的广泛关注。《中国药典》2020 年版收载的制何首乌炮制方法中对于炮制终点的规定仍采用性状描述, 即“炖至汁液吸尽; 或蒸至内外均呈棕褐色”, 缺少客观化的评判标准, 易造成饮片炮制程度不一, 品质参差不齐等问题, 可能成为影响临床疗效并引发临床不良反应的重要因素之一<sup>[5]</sup>。本课题组对何首乌古今炮制方法进行了梳理, 发现九蒸九晒是古代何首乌的经典炮制方法, 始载于宋代《太平圣惠方》<sup>[6]</sup>, 并作为主流炮制方法沿用至清代, 其中《本草纲目》记载的“用何首乌赤白各一斤, 竹刀刮去粗皮, 米泔浸一夜, 切片, 用黑豆三斗, 每次用三升三合三勺, 以水泡过, 砂锅内铺豆一层, 首乌一层, 重重铺尽, 蒸之, 豆熟, 取出去豆, 将何首乌晒干, 再以豆蒸, 如此九蒸九晒, 乃用”<sup>[7]</sup>, 应用较为广泛, 后因炮制方法繁琐, 无法满足现代化工业生产的需求而逐渐被无需反复蒸晒的现代炮制方法取代。但古籍记载何首乌炮制时曾有“(何首乌)制非九次, 勿寝其毒”之说<sup>[8]</sup>, 提示反复炮制减毒作用更强。同时, 现代研究也表明, 九蒸九晒法对何首乌减毒效果最好, 与药典法炮制的何首乌相比, 对肝细胞生长的抑制率更低、损伤更小<sup>[9-10]</sup>。因此, 九蒸九晒炮制方法不仅具有其合理性, 也为解决何首乌临床用药安全性问题提供了新的途径。

目前, 部分学者对九蒸九晒制何首乌饮片进行了相关研究, 采用谱学技术对其化学成分进行定性定

量分析, 并对其进行了肝毒性评价<sup>[11-12]</sup>, 但现有研究中记载的九蒸九晒方法多受现代方法影响, 采用液体辅料(黑豆汁)蒸/炖的方式, 而非古代文献记载的固体辅料(黑豆)蒸/炖<sup>[7]</sup>, 其炮制方法的复原有一定偏差性。同时, 现有研究多注重于对饮片内在物质的分析, 而忽略了传统性状在其工艺制订和质量评价中的作用。颜色作为中药饮片最直观的性状特征, 不仅是其质量评价的重要指标之一, 也是炮制工艺重点控制的主要参数<sup>[13-14]</sup>。何首乌饮片经炮制后颜色加深, 主观描述难以准确反映其颜色变化, 电子眼作为一种基于模拟人体感官而出现的人工智能感官技术, 可以客观表征饮片颜色, 尤其能准确区分不同炮制方法饮片间的微小色差, 兼具图像采集、数字图像处理和结果反馈功能<sup>[15]</sup>, 目前已广泛应用于中药饮片的颜色测定与质量评价<sup>[16-18]</sup>。为了追本溯源, 本实验将遵循古代文献记载方法制备九蒸九晒制何首乌饮片, 与《中国药典》2020 年版收载的炮制方法进行比较, 通过主要化学成分的定量分析、基于智能感官分析技术的颜色客观表征, 以及二者的相关性分析, 探讨制何首乌古今炮制方法的差异性。为进一步规范何首乌饮片炮制工艺, 稳定制何首乌饮片质量, 提高其临床应用安全性奠定基础。

## 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; VA400 型 IRIS 视觉分析仪, 含 CMOS 镜头、颜色校准板与 Alpha Soft 14.3 数据分析软件, 法国 Alpha M.O.S 公司; FA2204B 型电子天平, 万分之一, 上海精密科学仪器有限公司; XSR105DU 型电子分析天平, 十万分之一, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; ZN-08L 小型高速粉碎机, 中科耐驰技术(北京)有限公司; KQ-100DE 型数控超声波清洗器,

昆山市超声仪器有限公司; DK-98-IIA 型电热恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司。

何首乌药材购自四川宜宾, 黑豆药材购自甘肃, 经中国中医科学院中药研究所肖永庆研究员鉴定为蓼科何首乌属植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根和豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种子; 何首乌委托河北百草康神药业有限公司按照《中国药典》2020 年版何首乌项下方法加工为生品 (标记为 HSW)。

对照品没食子酸 (批号 wkq21090111)、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (批号 wkq21060404), 质量分数均  $\geq 98\%$ , 四川省维克奇生物科技有限公司; 对照品 5-羟甲基糠醛 (批号 20090201)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (以下简称二苯乙烯苷, 批号 19070305)、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 (批号 20120702), 质量分数均  $\geq 98\%$ , 成都普菲德生物技术有限公司; 对照品大黄素, 批号 D-029-190713, 质量分数  $\geq 98\%$ , 北京融城鑫德科技发展有限公司; 对照品大黄素甲醚, 批号 PS0291-0020, 质量分数  $> 98.5\%$ , 成都普思生物科技股份有限公司; 乙腈为色谱纯; 水为纯净水; 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 何首乌不同饮片的制备

**2.1.1 九蒸九晒何首乌饮片** 取黑豆 10.8 kg, 加 1.2 倍水浸泡 12 h。取生何首乌饮片约 3.6 kg, 拌入泡黑豆的水闷润至水被吸尽, 与浸泡后的黑豆间隔铺放至炖制容器中, 炖制 4 h (电磁炉 1800 W、圆气计时), 弃去黑豆, 取出何首乌饮片, 平铺摊开晾干, 作为一蒸一晒何首乌饮片, 再加入新的黑豆 (浸泡 12 h) 重复上述操作, 反复 9 次, 得到九蒸九晒何首乌饮片。平行制备 3 份 (标记为 ZSSW9-1~3)。

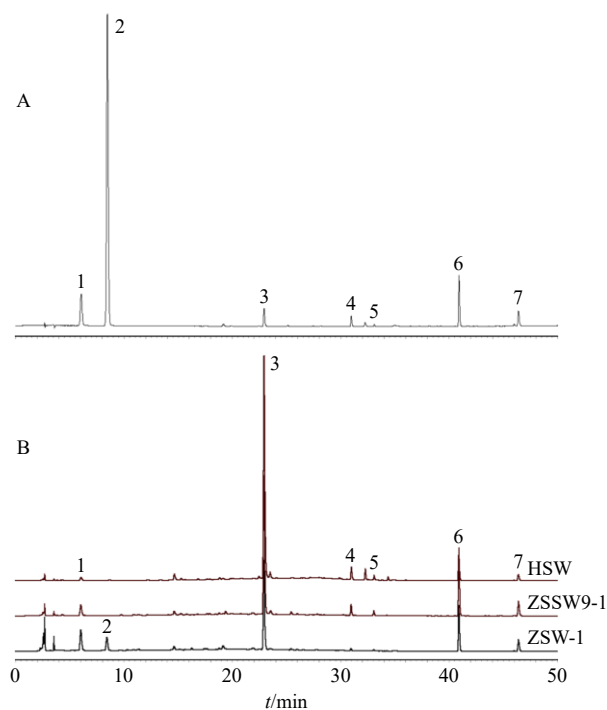
**2.1.2 药典法制何首乌饮片** 参照《中国药典》2020 年版一部制何首乌项下黑豆汁炖法制备, 取生何首乌饮片约 1 kg, 加黑豆汁拌匀, 炖至汁液吸尽, 取出, 自然晾晒至干燥后, 得到药典法制何首乌饮片。平行制备 3 份 (标记为 ZSW-1~3)。

**黑豆汁制法:** 取黑豆 300 g, 加水适量, 煮约 4 h, 熬汁约 450 g, 豆渣再加水煮约 3 h, 熬汁约 300 g, 合并得黑豆汁约 750 g。

### 2.2 何首乌不同饮片中 7 个成分的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相为乙腈-0.1%甲

酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 5%~25%乙腈; 20~26 min, 25%~35%乙腈; 26~30 min, 35%~50%乙腈; 30~35 min, 50%~70%乙腈; 35~45 min, 70%~90%乙腈; 45~50 min, 90%乙腈; 检测波长 280 nm; 体积流量 1.00 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}$ C; 进样量 10  $\mu$ L。此条件下所测各成分能够较好分离, 色谱图见图 1。



1-没食子酸 2-5-羟甲基糠醛 3-二苯乙烯苷 4-大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 5-大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷 6-大黄素 7-大黄素甲醚  
1-gallic acid 2-5-hydroxymethylfurfural 3-stilbene glycoside 4-emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside 5-phycion-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside 6-emodin 7-phycion

图 1 混合对照品 (A) 与何首乌供试品 (B) 的 HPLC 图  
Fig. 1 HPLC of standards and test samples of *Polygoni Multiflori Radix*

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称定没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚对照品各适量, 分别加 80%甲醇制成质量浓度分别为 57.6、68.4、625.0、50.2、8.6、180.0、0.216  $\mu$ g/mL 的对照品溶液, 即得。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取何首乌饮片粉末 (过 40 目筛) 约 1 g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入 80%甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流提取 30 min, 放冷, 密塞, 再称定质量, 用 80%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经微孔滤膜 (0.45  $\mu$ m)

滤过, 即得。

**2.2.4 线性关系考察** 分别精密吸取对照品溶液 1、5、10、15、20、25  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 以对照品质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ) 绘制标准曲线, 并计算得到回归方程与线性范围, 结果分别为没食子酸  $Y=28\,655.693\,5X-3\,449.895\,2$ ,  $R^2=1.000\,0$ , 线性范围 5.76~144.00 mg/L; 5-羟甲基糠醛  $Y=78\,294.955\,3X+11\,679.404\,8$ ,  $R^2=1.000\,0$ , 线性范围 6.84~171.00 mg/L; 二苯乙烯苷  $Y=16\,640.258\,1X+12\,599.471\,0$ ,  $R^2=0.999\,9$ , 线性范围 62.50~1562.50 mg/L; 大黄素-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷  $Y=30\,743.247\,5X-9\,558.630\,6$ ,  $R^2=0.999\,9$ , 线性范围 5.02~125.50 mg/L; 大黄素甲醚-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷  $Y=27\,693.578\,4X-241.880\,6$ ,  $R^2=1.000\,0$ , 线性范围 0.86~21.50 mg/L; 大黄素  $Y=34\,965.433\,1X-22\,341.082\,3$ ,  $R^2=0.999\,9$ , 线性范围 18.00~450.00 mg/L; 大黄素甲醚  $Y=37\,991.286\,3X+8\,456.727\,4$ ,  $R^2=1.000\,0$ , 线性范围 21.60~540.00 mg/L; 结果表明, 各对照品在各自范围内线性关系良好。

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取供试品溶液 (ZSW-1) 10  $\mu\text{L}$ , 重复进样 6 次, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 6 次测定结果显示, 没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷、大黄素-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.17%、0.39%、0.31%、0.54%、1.64%、0.21%、0.63%, 表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液 (ZSW-1) 10  $\mu\text{L}$ , 分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样共 6 次, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷、大黄素-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.82%、0.36%、1.38%、1.54%、0.39%、0.90%, 表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

**2.2.7 重复性试验** 取制何首乌粉末 (ZSW-1) 约 1 g, 精密称定, 共 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积并计算各成分含量, 结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷、大黄素-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚含量的 RSD 分别为 0.33%、0.92%、0.08%、1.65%、1.67%、

1.59%、1.90%, 表明该方法重复性良好。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密称定已测定指标成分含量的何首乌粉末 (ZSW-1) 约 0.5 g, 共 6 份, 置平底烧瓶中, 分别加入对照品适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液。精密吸取上述样品与对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积并计算加样回收率, 没食子酸、5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷、大黄素-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的平均加样回收率分别为 98.88%、97.99%、97.32%、102.85%、108.12%、96.67%、99.33%, RSD 分别为 0.36%、0.74%、0.33%、0.74%、0.93%、0.43%、1.16%, 均符合《中国药典》2020 年版规定标准。

**2.2.9 样品测定** 分别称取生何首乌、九蒸九晒何首乌、药典法制何首乌饮片适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 每个样品平行 2 次, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积并计算各成分含量, 结果见表 1。含量测定结果表明, 何首乌不同饮片中均含有没食子酸、二苯乙烯苷、大黄素-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- $O$ - $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚 6 种成分, 但不同饮片间各成分含量存在一定差异。九蒸九晒、药典法制何首乌中没食子酸及蒽醌苷元类成分的含量与生何首乌相比, 均有不同程度的增加, 其中以没食子酸含量增加最为显著, 药典法制何首乌约为生品的 3 倍, 九蒸九晒何首乌约为生品的 2 倍。炮制为制何首乌后, 苷类 (二苯乙烯苷、蒽醌苷) 成分含量显著减少, 与生何首乌相比, 九蒸九晒何首乌中二苯乙烯苷含量减少了约 44%, 蒽醌苷类成分含量减少了约 41%; 药典法制何首乌中二苯乙烯苷含量减少了约 69%, 蒽醌苷类成分含量减少了约 85%; 而 5-羟甲基糠醛仅在药典法制何首乌饮片中检出, 平均质量分数为 0.506 1 mg/g。

## 2.3 基于电子眼技术的颜色分析

电子眼采用的色彩系统中  $L^*$  代表明度指数,  $a^*$  (红-绿轴)、 $b^*$  (黄-蓝轴) 代表颜色对立维度。对于样品 1、2,  $\Delta L^*=L_1^*-L_2^*$ , 为正值时样品 1 颜色偏浅, 为负值时样品 1 颜色偏深。  $\Delta a^*=a_1^*-a_2^*$ , 为正值时样品 1 颜色偏红, 为负值时样品 1 颜色偏绿。  $\Delta b^*=b_1^*-b_2^*$ , 为正值时样品 1 颜色偏黄, 为负值时样品 1 颜色偏蓝。样品颜色可用色度值 ( $E_{ab}^*$ ) 表示, 计算公式为  $E_{ab}^*=(L^{*2}+a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ 。2 个样品之

表 1 何首乌不同饮片主要成分含量 ( $n=2$ )Table 1 Content of main components in different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix* ( $n=2$ )

| 样品      | 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> ) |         |          |                  |                    |         |         |
|---------|----------------------------|---------|----------|------------------|--------------------|---------|---------|
|         | 没食子酸                       | 5-羟甲基糠醛 | 二苯乙烯苷    | 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷 | 大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷 | 大黄素     | 大黄素甲醚   |
| HSW-1   | 0.214 0                    | —       | 22.516 7 | 1.175 1          | 0.159 9            | 1.727 1 | 2.662 1 |
| HSW-2   | 0.216 9                    | —       | 22.482 6 | 1.178 9          | 0.159 5            | 1.727 4 | 2.665 8 |
| HSW-3   | 0.220 3                    | —       | 22.580 3 | 1.183 0          | 0.160 6            | 1.729 6 | 2.669 1 |
| ZSSW9-1 | 0.508 8                    | —       | 12.408 4 | 0.658 9          | 0.121 4            | 2.088 1 | 2.824 7 |
| ZSSW9-2 | 0.507 5                    | —       | 12.516 5 | 0.663 5          | 0.121 5            | 2.084 4 | 2.820 2 |
| ZSSW9-3 | 0.506 5                    | —       | 12.513 8 | 0.671 4          | 0.123 3            | 2.097 8 | 2.832 3 |
| ZSW-1   | 0.653 3                    | 0.511 0 | 7.016 7  | 0.167 0          | 0.036 9            | 1.930 9 | 2.853 3 |
| ZSW-2   | 0.652 6                    | 0.504 1 | 7.091 5  | 0.165 5          | 0.036 5            | 1.885 6 | 2.773 1 |
| ZSW-3   | 0.651 4                    | 0.503 4 | 7.078 7  | 0.166 7          | 0.036 8            | 1.947 5 | 2.874 8 |

间的色差为  $\Delta E_{ab}$ , 计算公式为  $\Delta E_{ab}=(\Delta L^{*2}+\Delta a^{*2}+\Delta b^{*2})^{1/2}$ , 色差值与人眼感觉色差程度的关系见表 2。

**2.3.1 视觉分析仪参数设置及供试品前处理** 开启 IRIS 视觉分析仪, 预热 15 min, 待指示灯显示绿灯后, 校准仪器镜头的曝光度和焦距, 使用 24 色色彩校正板对仪器进行校准。校准完成后设置照明模式为顶部及底部照明, 拍照模式为单一快照。取适量何首乌供试品粉末(过 40 目筛)于扁形称量瓶中, 压平, 置于仪器测量白板上, 变换位置, 平行拍照 3 次, 记录样品粉末色号及比例, 计算样品色度空间参数  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值、样品色度值 ( $E_{ab}^*$  值) 及各样品间的  $\Delta E_{ab}$  值。

**2.3.2 何首乌不同饮片颜色比较** 观察各样品颜色, 可见何首乌不同饮片颜色差异明显, 结果见图 2。何首乌不同饮片样品色度值比较见表 3。经电子眼测定, 九蒸九晒何首乌与生何首乌的  $\Delta E_{ab}>6.0$ , 颜色色差感觉很明显, 两者  $\Delta L^*$  为负,  $\Delta a^*$  为正,  $\Delta b^*$  为负; 药典法制何首乌与生何首乌的  $\Delta E_{ab}>6.0$ , 颜色色差感觉很明显, 两者  $\Delta L^*$  为负,  $\Delta a^*$  为正,  $\Delta b^*$  为负,

表 2 色差值与感觉色差程度

Table 2 Color difference value and perceived color difference degree

| $\Delta E_{ab}$            | 感觉色差程度        |
|----------------------------|---------------|
| $\Delta E_{ab}<0.2$        | 不可见 (小于颜色宽容度) |
| $0.2\leq\Delta E_{ab}<1.0$ | 刚可察觉          |
| $1.0\leq\Delta E_{ab}<3.0$ | 感觉轻微          |
| $3.0\leq\Delta E_{ab}<6.0$ | 感觉明显          |
| $\Delta E_{ab}\geq 6.0$    | 感觉很明显         |

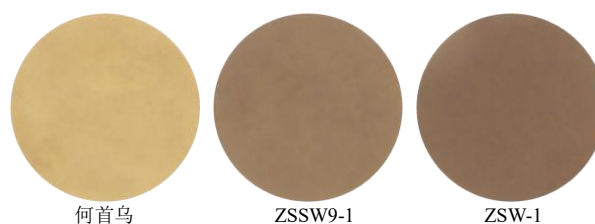


图 2 何首乌不同饮片颜色

Fig. 2 Color of different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix*表 3 何首乌不同饮片色度值 ( $n=3$ )Table 3 Chromaticity value of different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix* ( $n=3$ )

| 样品      | $L^*$ | $a^*$ | $b^*$ | $E_{ab}^*$ |
|---------|-------|-------|-------|------------|
| HSW-1   | 71.30 | 5.56  | 32.43 | 78.52      |
| HSW-2   | 71.03 | 5.45  | 32.41 | 78.26      |
| HSW-3   | 71.26 | 5.50  | 32.48 | 78.50      |
| ZSSW9-1 | 50.93 | 8.23  | 16.88 | 54.28      |
| ZSSW9-2 | 50.65 | 8.33  | 16.83 | 54.02      |
| ZSSW9-3 | 50.36 | 8.44  | 16.76 | 53.74      |
| ZSW-1   | 44.54 | 8.92  | 15.03 | 47.84      |
| ZSW-2   | 44.39 | 9.43  | 14.59 | 47.66      |
| ZSW-3   | 44.09 | 9.59  | 14.36 | 47.35      |

说明经九蒸九晒及药典法炮制后何首乌饮片颜色均变深变红变蓝; 药典法制何首乌与九蒸九晒何首乌的  $\Delta L^*$  为负,  $\Delta a^*$  为正,  $\Delta b^*$  为负, 说明药典法制何首乌饮片较九蒸九晒何首乌饮片颜色变化程度更深。

## 2.4 数据分析

**2.4.1 含量测定数据分析** 将何首乌不同饮片主要成分含量数据导入 SIMCA 14.1 进行系统聚类分析

(hierarchical cluster analysis, HCA) 与无监督的主成分分析 (principal component analysis, PCA), 观察何首乌不同饮片间聚类与自然聚集, 结果见图 3、4。HCA 结果显示, 何首乌不同饮片可各自聚类, 当分类距离大于 15 时, 3 种饮片聚为 2 类, 生何首乌聚为一类, 九蒸九晒何首乌与药典法制何首乌聚为一类。PCA 结果显示, PC1 和 PC2 的贡献率分别为 81.60% 和 17.50%, 累积贡献率达 99.10%, 说明该数据能较好反应何首乌不同饮片的整体信息。何首乌不同饮片各自聚集, 可分为 3 类, 生何首乌集中分布在 III 象限, 九蒸九晒何首乌集中分布在 I 象限, 药典法制何首乌集中分布在 IV 象限。

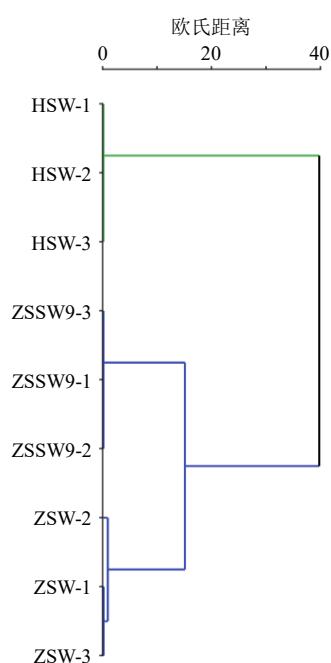


图 3 何首乌不同饮片主要成分含量 HCA

Fig. 3 HCA of contents of main components in different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix*

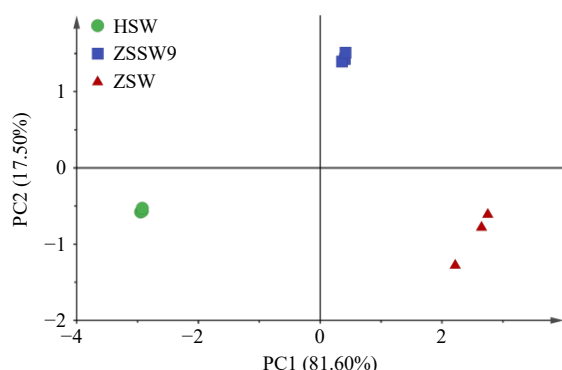


图 4 何首乌不同饮片主要成分含量 PCA

Fig. 4 PCA of contents of main components in different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix*

2.4.2 电子眼测定数据分析 将何首乌不同饮片色度值数据导入 SIMCA 14.1 进行 HCA 与 PCA, 观察何首乌不同饮片间聚类与自然聚集, 结果见图 5、6。HCA 结果显示, 何首乌不同饮片可各自聚类, 当分类距离为 10 时, 3 种饮片聚为 2 类, 生何首乌聚为一类, 九蒸九晒何首乌与药典法制何首乌聚为一类。PCA 结果显示, PC1 和 PC2 的贡献率分别为 99.60% 和 0.33%, 累积贡献率达 99.93%, 说明该数据能较好反映何首乌不同饮片的整体信息。何首乌不同饮片各自聚集, 可分为 3 类, 生何首乌集中分布在 I 象限, 九蒸九晒何首乌集中分布在 III 象限, 药典法制何首乌集中分布在 II 象限。

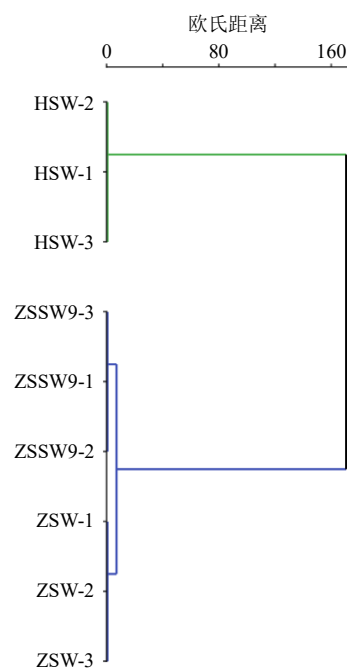


图 5 何首乌不同饮片色度值 HCA

Fig. 5 HCA of chromaticity value in different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix*

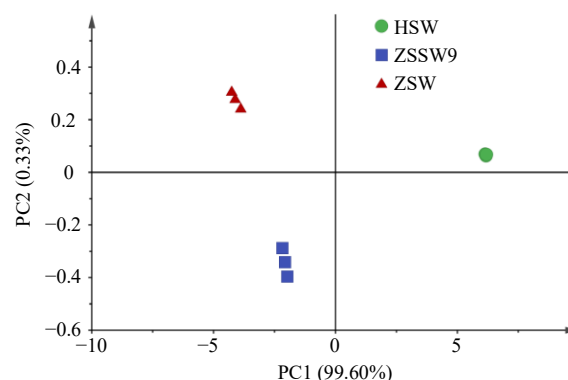


图 6 何首乌不同饮片色度值 PCA

Fig. 6 PCA of chromaticity value in different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix*



## 2.5 何首乌不同饮片主要成分含量与颜色变化的相关性分析

普通多元线性回归建模前提必须满足样本数量较多, 变量数量较少, 且变量之间无多重共线性的条件才具有合理性, 若数据不能完全满足上述条件, 则模型无法使用。本实验中变量较多, 且成分之间存在多重共线性的问题, 因此无法采用普通多元线性回归模型。偏最小二乘回归 (partial least squares regression, PLS) 法可以提取出对因变量解释最强、影响最大的综合变量, 辨识系统中的信息与噪声, 因此很大程度上能够克服变量之间的多重相关性在回归建模中的不良作用, 可以有效地解决在普通多元线性回归的建模过程中因自变量之间存在多重相关性而影响参数估计的准确性和合理性的问题, 缩小模型误差, 增强模型的稳健性<sup>[19]</sup>。

在 PLS 回归模型中,  $R^2_X$  和  $R^2_Y$  分别表示模型对自变量和因变量的解释能力,  $Q^2$  表示模型的预测能力, 通常认为上述 3 个指标以大于 0.5 为宜, 越接近 1 表示模型拟合数据效果越好; 自变量在解释因变量时作用的重要性可以用变量投影重要性指标 (VIP) 来度量, 通常认为 VIP 值大于 1 的自变量对因变量有显著影响。

将测得的成分含量数据与颜色指标  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  值导入 SIMCA 14.1 软件, 以成分含量作为自变量, 各颜色指标作为因变量, 建立 PLS 模型。建立的 PLS 模型  $R^2_X=0.991$ ,  $R^2_Y=0.988$ ,  $Q^2=0.981$ , 说明建立的模型稳定且预测能力较强。根据 VIP 值 > 1 的原则, 可发现没食子酸、二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚对何首乌的各颜色指标有显著影响, 5-羟甲基糠醛、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素对何首乌颜色无显著影响。见图 7。

根据 PLS 模型的回归系数 (表 4), 没食子酸、大黄素、大黄素甲醚的含量与  $L^*$ 、 $b^*$  值呈负相关, 与  $a^*$  值呈正相关; 5-羟甲基糠醛的含量与  $L^*$  值呈负相关, 与  $a^*$ 、 $b^*$  值呈正相关; 二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷的含量与  $L^*$ 、 $b^*$  值呈正相关, 与  $a^*$  值呈负相关。提示没食子酸、大黄素、大黄素甲醚这 3 种成分与何首乌饮片变深、变红、变蓝有关, 与炮制后何首乌饮片颜色总体变化相一致; 二苯乙烯苷、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷这 3 种成分与何首乌饮片变浅、变绿、变黄有关, 与炮制后何首乌饮片颜色总体变化相反。

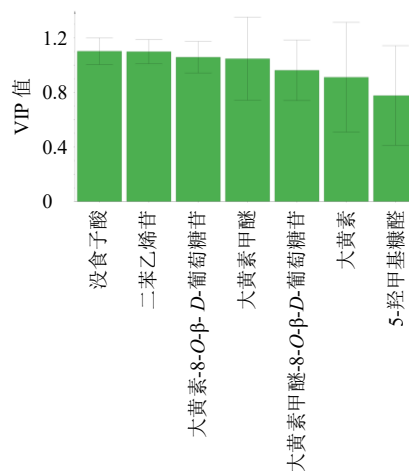


图 7 何首乌不同饮片成分与颜色 PLS 分析

Fig. 7 PLS analysis on composition and color of different decoction pieces of *Polygoni Multiflori Radix*

表 4 何首乌不同饮片成分-颜色标准化回归系数

Table 4 Standardized regression coefficient of composition and color of different prepared slices of *Polygoni Multiflori Radix*

| 成分                                  | $L^*$  | $a^*$  | $b^*$  |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|
| 没食子酸                                | -0.184 | 0.182  | -0.188 |
| 5-羟甲基糠醛                             | -0.053 | 0.065  | 0.007  |
| 二苯乙烯苷                               | 0.181  | -0.179 | 0.183  |
| 大黄素-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷   | 0.157  | -0.159 | 0.144  |
| 大黄素甲醚-8- <i>O</i> - $\beta$ -D-葡萄糖苷 | 0.117  | -0.123 | 0.082  |
| 大黄素                                 | -0.217 | 0.200  | -0.286 |
| 大黄素甲醚                               | -0.191 | 0.186  | -0.211 |

## 3 讨论

本实验分别采用 50%、80%、100% 甲醇及 50%、80%、100% 乙醇作为提取溶剂考察对各成分含量的影响, 结果表明以 80% 甲醇提取各成分含量较高且峰形良好, 因此选用 80% 甲醇作为提取溶剂; 分别比较了超声 15、30、45、60 min, 回流 30、60、90、120 min, 冷浸 4、8、12 h 对各成分含量的影响, 结果表明回流对各成分的提取率较高, 且不同回流时间下提取率差异不大, 因此选用回流 30 min 作为提取方法。通过对提取方法的考察, 最终确定本实验供试品溶液的制备方法为 80% 甲醇回流提取 30 min。本实验通过对古代经典九蒸九晒炮制法与药典法制何首乌饮片的对比研究, 发现二者主要成分含量及颜色的总体变化趋势较为相似, 但有程度上的差异, 且二者成分组成也有明显的区别。

何首乌中含有鞣质类成分和具有没食子酰基的苷类成分<sup>[20-21]</sup>, 在炮制过程中上述成分受热分解后

转化为没食子酸<sup>[22-23]</sup>，故炮制后没食子酸量显著增加。二苯乙烯和蒽醌类成分是何首乌中的主要有效成分，同时也是其肝毒性的主要物质基础<sup>[24-25]</sup>，二者的含量及结构与何首乌肝损伤的发生密切相关，可通过控制合理的炮制工艺，将上述 2 类成分的含量控制在安全有效的范围内，以便提高用药的安全性<sup>[26]</sup>。二苯乙烯及蒽醌类成分对光、热具有不稳定性<sup>[27-28]</sup>，在加热炮制过程中会发生分解，在反复蒸、晒过程中会发生光环加成反应<sup>[29]</sup>，因此，采用连续加热方式的药典法制何首乌比采用间隔蒸、晒方式的九蒸九晒何首乌中上述 2 类成分含量降低的幅度更为显著。

5-羟甲基糠醛既是 Maillard 反应产物，又可通过糖的直接降解或脱水产生<sup>[30-31]</sup>，温度的升高和加热时间的延长均可导致其含量增加<sup>[32]</sup>，因此 5-羟甲基糠醛成为很多采用加热炮制（炒制、蒸制、炖制等）中药饮片的特征性标志物。何首乌中含有的糖类成分以及炮制过程中苷类分解产生的糖类成分均可与氨基成分发生 Maillard 反应，从而生成 5-羟甲基糠醛。本实验中仅在药典法制何首乌饮片中检测到了 5-羟甲基糠醛，而九蒸九晒何首乌饮片中未检出该成分，说明 5-羟甲基糠醛的产生与炮制工艺密切相关。药典法采用液体辅料连续炖制，而九蒸九晒法采用固体辅料间隔蒸、晒，何首乌饮片在两种方法炮制过程中的受热程度、加热方式、加热时间及光照等都有着显著差异，且 5-羟甲基糠醛性质活泼，对温度、湿度、光、空气较为敏感<sup>[33]</sup>，可进一步分解为乙酰丙酸和甲酸或是聚合<sup>[34]</sup>，推测在九蒸九晒何首乌中由于“晒”这一工艺环节，导致已生成的 5-羟甲基糠醛分解，因此未能检出。

5-羟甲基糠醛具有抗心肌缺血、抗氧化等作用，同时，该成分还易导致结肠小囊异常生长（aberrant crypt foci, ACF），对人体横纹肌和内脏也具有毒副作用<sup>[34]</sup>。此外，不同炮制方法对何首乌饮片中主要成分的量比关系也有显著的影响，九蒸九晒制何首乌中各类成分的量比关系约为没食子酸-二苯乙烯苷-蒽醌苷-蒽醌苷元（1：25：2：10），而药典法制何首乌中上述成分的量比关系约为 1：11：0.3：7，各成分间量比关系差异显著，因此，古今 2 种方法制备的何首乌饮片主要药效物质组成及量比关系的显著差异极有可能会成为导致其药效及毒性差异的主要原因，后续将通过相关药效学实验进行系统的研究。

电子眼测定结果表明，不同炮制方法对何首乌饮片颜色的影响也不尽相同。颜色的变化主要源于 2 个方面，一方面是何首乌在炮制过程中自身化学成分在高温、高湿的条件下发生褐变反应，生成褐色聚合物，导致饮片颜色加深；另一方面是源于炮制过程中辅料的间接影响，药典法应用的液体辅料黑豆汁中含有大量色素类成分<sup>[35]</sup>，对何首乌饮片起赋色作用，导致其饮片颜色加深，而九蒸九晒方法中应用的是固体辅料黑豆，对何首乌饮片几乎无赋色作用，由此形成了两种方法炮制的何首乌饮片颜色上的差异。

为了进一步分析何首乌饮片物质基础与颜色的相关性，本实验对测定的 7 种主要化学成分含量与颜色特征值进行了多元统计分析，HCA 和 PCA 结果显示古今方法炮制的何首乌饮片可各自聚为一类，且与生何首乌相比，古、今方法炮制的何首乌饮片可聚为一类，进一步验证了九蒸九晒法与药典法制何首乌饮片的个性特征及共性规律。没食子酸及蒽醌苷元含量与何首乌饮片颜色变深呈正相关，二苯乙烯苷及蒽醌苷含量与何首乌饮片颜色变深呈负相关。因此，可通过快速无损的颜色检测，实现对何首乌饮片炮制工艺的控制及饮片质量的客观评价。本实验从物质基础与颜色变化的相关性角度对古代经典九蒸九晒炮制方法与现代药典收载的制何首乌炮制方法进行了对比研究，结果显示，2 种方法炮制的制何首乌饮片虽然在外观性状的主观评价上具有较高的相似性，但通过现代智能感官分析技术的客观表征和主要药效物质的分析，可以初步证明古今 2 种方法炮制的制何首乌饮片是 2 种独立的药效载体，传统经典炮制方法存在的合理性不仅有其悠久临床应用历史的佐证，也有现代科学技术对其科学内涵的阐释，二者不具有替代性。进一步系统开展 2 种炮制方法的药效学研究，将为全面分析何首乌古今炮制方法，解决何首乌炮制工艺不规范、质量不稳定等问题，提高何首乌临床应用的安全性和有效性提供新的依据。

**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: 183-184.
- [2] 赖潇潇, 欧爱华, 翁衡, 等. 基于 18265 例次患者分析制何首乌使用现状及肝功能异常率 [J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(13): 8-11.
- [3] 王海珍, 李秀惠. 33 例何首乌及其相关制剂致药物性肝



- 损伤临床分析 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2018, 28(1): 25-27.
- [4] 吴欣, 郭杨志, 杜霄壤, 等. 75 例中药诱导的肝损伤患者临床特征分析 [J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(5): 668-671.
- [5] 王虹, 高峰, 焦晨莉, 等. 何首乌致肝损伤发生的原因及机制分析 [J]. 河北中医, 2018, 40(2): 305-309.
- [6] 王怀隐. 太平圣惠方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1958: 1657.
- [7] 明·李时珍. 本草纲目 (第一册: 校点本) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 1289.
- [8] 明·倪朱谟撰. 郑金生, 甄雪燕, 杨梅香校点. 本草汇言 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2005: 260.
- [9] 刘梦娇, 蒲俊安, 戴冰, 等. 何首乌“九蒸九晒”炮制工艺优选及对 L02 肝细胞生长的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(4): 70-73.
- [10] 高峰, 唐瑜, 张依娜, 等. 基于网络药理学的不同方法炮制的何首乌肝毒性机制探讨及实验验证 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(8): 1522-1530.
- [11] 柯颖川, 陈继英, 陈锡培, 等. 何首乌炮制后化学成分定性定量分析 [J]. 中医临床研究, 2021, 13(22): 42-45.
- [12] 周杨静, 唐俊峰, 高峰, 等. 基于“九蒸九晒”炮制法的何首乌主要化学成分含量变化及对大鼠肝脏的影响实验研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(4): 543-548.
- [13] 李星, 敖明月, 强梦琴, 等. 炮姜饮片炮制过程中颜色变化与其成分含量的相关性分析 [J]. 中药材, 2022, 45(5): 1087-1094.
- [14] 张乐, 潘欢欢, 刘飞, 等. 白术麸炒过程中 5-羟甲基糠醛的含量变化规律及其与饮片温度、颜色变化的相关性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17): 11-14.
- [15] 刘瑞新, 陈鹏举, 李学林, 等. 人工智能感官: 药学领域的新技术 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 559-567.
- [16] 谢晋, 彭华胜, 张群林, 等. 基于颜色特征的牡丹皮贮藏年限鉴别及质量评价研究 [J]. 中药材, 2016, 39(6): 1232-1235.
- [17] 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.
- [18] 刘振东, 兰金旭, 陈随清. HPLC 结合电子眼技术分析不同采收期的枸橼药材质量 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5253-5259.
- [19] 陆洪涛. 偏最小二乘回归数学模型及其算法研究 [D]. 北京: 华北电力大学, 2014.
- [20] 许煜迪. 四种不同炮制方法制何首乌科学内涵变化共性原理研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2022.
- [21] 余意, 李佳兴, 金艳, 等. UPLC-MS/MS 法测定制何首乌中 9 种二苯乙烯苷类成分含量 [J]. 中药材, 2018, 41(6): 1395-1398.
- [22] 陈庆堂, 卓丽红, 徐文, 等. 何首乌炮制过程中 5 种化学成分的含量变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 66-71.
- [23] 杨丽. 大黄炭“形性-化学-生物”三性指标关联机制与炮制传递规律研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [24] 陶丽宇, 高月求, 王建茹, 等. 何首乌的临床应用及其相关肝损伤的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(11): 194-198.
- [25] Lv G Y, Lou Z H, Chen S H, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside from traditional Chinese medicine *Polygonum multiflorum* following oral administration to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 449-456.
- [26] 中华中医药学会中成药分会, 中华中医药学会肝胆病分会, 中国药学会临床中药学专业委员会, 等. 何首乌安全用药指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2687-2693.
- [27] 郭志烨, 韩丽, 杨明, 等. 制何首乌中二苯乙烯苷对光和热的不稳定性 [J]. 中成药, 2014, 36(11): 2280-2285.
- [28] 苏子仁, 周华, 刘中秋, 等. 大黄在提取精制工艺中的化学成分变化研究 (I) 大黄的湿热降解机理探讨 [J]. 药物分析杂志, 1998, 18(2): 83-86.
- [29] Li F Y, Zhuang J P, Jiang G Y, *et al.* A rewritable optical data storage material system by [2 + 2] photocycloreversion-photocycloaddition [J]. *Chem Mater*, 2008, 20(4): 1194-1196.
- [30] 刘振丽, 李林福, 宋志前, 等. 何首乌炮制后新产生成分的分离和结构鉴定 [J]. 中药材, 2007, 30(12): 1505-1507.
- [31] 刘振丽, 宋志前, 巢志茂, 等. 何首乌炮制后新产生成分含量分析 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2326-2329.
- [32] 王军, 李慧芸, 张宝善, 等. 热处理对红枣汁 5-HMF 变化的影响 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2011, 39(6): 91-95.
- [33] 徐芳辉, 胡志成, 易欣宜, 等. 5-羟甲基糠醛在中药质量标准中的应用现状 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(15): 47-50.
- [34] 傅紫琴, 王明艳, 蔡宝昌. 5-羟甲基糠醛(5-HMF)在中药中的研究现状探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(3): 508-510.
- [35] 顿倩, 彭瀚, 麦琦莹, 等. 基于液相色谱-质谱联用技术定性定量分析黑豆种皮中可溶型和结合型花青素 [J]. 食品科学, 2019, 40(10): 178-186.

[责任编辑 郑礼胜]