

基于 HPLC 指纹图谱与颜色 RGB 的厚朴发汗前后成分与颜色变化相关性研究

宋 姚, 张芮苑, 刘 芳*, 王 迪

成都中医药大学药学院/现代中药产业学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

摘要: 目的 探究厚朴 *Magnoliae Officinalis Cortex* (MOC) 发汗前后外观颜色和内在化学成分变化的相关性, 评价发汗对厚朴品质的影响。方法 采用 HPLC 法建立厚朴发汗前后指纹图谱, 结合层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等多种化学模式识别方法对其进行质量评价; 采用 RGB 颜色模式客观量化未发汗厚朴与发汗厚朴粉末的 RGB 值; 运用 Origin 2024 软件分析指纹图谱共有峰与颜色 R、G、B 值之间的相关性。结果 未发汗厚朴与发汗厚朴 HPLC 指纹图谱相似度较高, 标定了 11 个共有峰, 并指出其中 5 种成分, 分别为紫丁香苷 (峰 1)、木兰花碱 (峰 3)、厚朴苷 A (峰 4)、和厚朴酚 (峰 10) 与厚朴酚 (峰 11); HCA、PCA 和 OPLS-DA 识别模型有效区分未发汗厚朴与发汗厚朴。HPLC 指纹图谱与颜色 RGB 值相关性分析表明, 厚朴发汗前后颜色变化主要与紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、厚朴酚等成分相关。结论 厚朴发汗前后外观颜色与内在成分变化高度关联, 有利于揭示厚朴产地加工发汗的科学内涵, 为基于“辨色论质”评价厚朴品质提供依据。

关键词: 厚朴; 发汗; HPLC; 指纹图谱; 颜色 RGB 值; 相关性; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 化学模式识别; 紫丁香苷; 木兰花碱; 厚朴苷 A; 和厚朴酚; 厚朴酚

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)16-5772-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.16.007

Correlation study on composition and color changes of *Magnoliae Officinalis Cortex* before and after sweating based on HPLC fingerprint and color RGB

SONG Yao, ZHANG Ruiyuan, LIU Fang, WANG Di

School of Pharmacy, College of Modern Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, State Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resources with Southwest Characteristics, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To explore the correlation between the appearance color and internal chemical composition of Houpo (*Magnoliae Officinalis Cortex*, MOC) before and after sweating, and to evaluate the effect of sweating on the quality of MOC. **Methods** The fingerprints of MOC before and after sweating were established by HPLC, and the quality evaluation was carried out by combining multivariate chemical pattern recognition methods, including hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). The RGB values of non-sweating MOC and sweating MOC powder were objectively quantified by RGB color pattern. The correlation between the common peaks of HPLC fingerprint and the color R, G, and B values was analyzed by Origin 2024 software. **Results** The HPLC fingerprints of non-sweating MOC and sweating MOC were similar, with 11 common peaks identified, and five components were recognized, which were syringin (peak 1), magnoflorine (peak 3), magnolioside A (peak 4), honokiol (peak 10) and magnolol (peak 11). The HCA, PCA, and OPLS-DA recognition models effectively distinguished non-sweating MOC and sweating MOC. The correlation analysis between the HPLC fingerprint and color RGB value indicated that the color changes of MOC before and after sweating were mainly related to components including syringin, magnoflorine, magnolioside A and magnolol. **Conclusion** This study shows that the appearance color and internal component changes of MOC before and after sweating are highly correlated, which is conducive to revealing the scientific connotation

收稿日期: 2025-03-30

基金项目: 四川省自然科学基金资助项目 (2023NSFSC0661)

作者简介: 宋 姚 (1999—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药炮制与制剂研究。E-mail: 3256057875@qq.com

*通信作者: 刘 芳 (1986—), 女, 博士, 高级实验师, 主要从事中药炮制与制剂研究。E-mail: bittercafe1@126.com

of MOC sweating in processing area, and providing a basis for evaluating the quality of MOC based on the principle of “distinguishing colors to judge quality”.

Key words: *Magnoliae Officinalis Cortex*; sweating; HPLC; fingerprint; color RGB value; correlation; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; chemical pattern recognition; syringin; magnoflorine; magnolol; honokiol; magnolol

厚朴 *Magnoliae Officinalis Cortex* (MOC) 为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 或凹叶厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils. 的干燥干皮、根皮及枝皮, 始载于《神农本草经》, 性温, 味苦、辛, 具有燥湿消痰、下气除满的功效^[1]。厚朴主要含有木脂素类、苷类、生物碱类、挥发油、多糖类等化学成分^[2], 现代药理研究表明厚朴具有调节胃肠运动^[3]、抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗抑郁^[4]、保肝^[2]等作用, 临床上常用于治疗消化、神经、心血管、呼吸系统疾病^[5]。“发汗”法是经典的中药产地加工炮制方法, 历版《中国药典》均规定厚朴需进行“发汗”处理。

产地加工发汗是厚朴优质品质形成的重要环节。南北朝梁代医药学家陶弘景描述厚朴药材外观颜色“以肉紫色为好”^[6], 历版《中国药典》亦规定厚朴干皮需经发汗至内表面变紫褐色或棕褐色, “紫油厚朴”成为优质厚朴的代名词。有学者^[7-8]利用色差仪研究发现厚朴发汗后颜色变化与成分变化相关, 但与颜色变化密切相关的成分尚不够明晰, 且色差仪使用的仪器成本较高, 样品前处理复杂。RGB 颜色模式借助相机、手机等常见成像设备和简单的图像处理即可迅速获取药材外观的颜色 RGB 值数据, 其是一种基于加法混色原理即通过不同程度地混合红色 (red)、绿色 (green)、蓝色 (blue) 3 种基础色彩通道 (每个通道从 0 到 255 被分为共计 256 个等级) 来表示 $256 \times 256 \times 256$ 种颜色的方式^[9-10], 可实现中药颜色信息的客观量化, 适用于中药材分类、炮制程度评价以及快速直观的质量定性鉴别^[11]。本研究采用图像 RGB 颜色模式比较厚朴发汗前后颜色差异, 采用 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别方法分析厚朴发汗前后化学成分变化, 将颜色 RGB 值与 HPLC 指纹图谱信息相关联, 探索厚朴发汗前后颜色与成分变化的内在关系, 为建立厚朴药材“辨色论质”质量评价体系提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, 德国 Thermo Fisher 公司; CPA225D 型十万分之一天平, 赛多利

斯科学仪器北京有限公司; WK-1000A 型高速粉碎机, 山东精诚医药装备制造有限公司; 101-2AB 型电热鼓风干燥箱, 北京中兴伟业仪器有限公司; PENTAX K-3 型数码相机, 日本 Ricoh Imaging 公司; KQ-100E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; Milli-Q 型超纯水仪, 美国 Millipore 公司。

1.2 试剂

对照品紫丁香苷 (批号 DST200914-012)、木兰花碱 (批号 DSTDM000402)、厚朴苷 A (批号 DSTDH024301)、和厚朴酚 (批号 DSTDH003601)、厚朴酚 (批号 DST200701-035), 质量分数均 $\geq 98\%$, 均购于成都德思特生物技术有限公司; 乙腈、甲醇为质谱纯, 均购于西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 磷酸为分析纯, 购于成都市科隆化学品有限公司; 水为 Milli-Q 超纯水, 由美国 Millipore 公司的 Milli-Q 型超纯水仪制得。

1.3 药材

厚朴新鲜样品采自四川省都江堰市虹口乡, 经成都中医药大学裴瑾教授鉴定为木兰科木兰属植物厚朴 *M. officinalis* Rehd. et Wils. 的干皮。采集的厚朴干皮共 10 个批次, 每一批次切至成段, 并随机等分为 2 组, 结合《中国药典》2020 年版规定的“发汗”方法和课题组前期研究优化得到的“发汗”工艺^[12]对厚朴进行发汗处理: 将 1 组干皮样品放至干燥通风处自然阴干, 即得未发汗厚朴样品组 (A); 将另 1 组干皮样品置沸水中微煮 2 min, 样品变软后捞出, 沥干多余水分, 将样品堆放于阴凉通风处进行“发汗”, 堆置高度设置为 40 cm, 本研究以厚朴药材内表面变紫褐色或棕褐色作为评定“发汗”结束的标准, “发汗”共计 12 d, 即得发汗厚朴样品组 (C)。典型药材照片见图 1。最后, 将得到的 10 批未发汗厚朴样品 (A1~A10) 和 10 批发汗厚朴样品 (C1~C10) 用粉碎机粉碎, 过二号筛。

2 方法与结果

2.1 厚朴发汗前后 HPLC 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 采用 Hypersil Gold™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱: 0~5 min, 5%乙腈; 5~20



图 1 厚朴药材图

Fig. 1 Pictures of MOC medicinal materials

min, 5%~20%乙腈; 20~30 min, 20%~70%乙腈; 30~35 min, 70%~80%乙腈; 35~40 min, 80%乙腈; 40~45 min, 80%~5%乙腈; 检测波长 294 nm; 进样量 10 μ L; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、和厚朴酚、厚朴酚对照品适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶解并定容, 制成含紫丁香苷 1.08 mg/mL、木兰花碱 1.13 mg/mL、厚朴苷 A 1.09 mg/mL、和厚朴酚 1.04 mg/mL、厚朴酚 1.02 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取各样品粉末(过二号筛)约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 准确称定质量并密封, 超声提取 40 min, 冷却至室温后加 70% 甲醇补足减少的质量, 摇匀, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.1.4 空白溶液的制备 除不加样品粉末外, 其余按照“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法, 制得空白溶液。

2.1.5 方法学考察

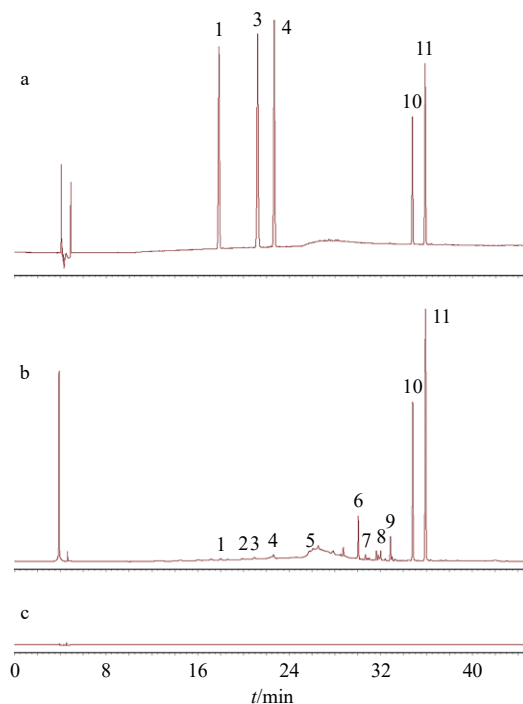
(1) 精密度试验: 精密称取未发汗厚朴样品粉末(A1), 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以厚朴酚为参照峰, 计算各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 2.80%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.15%, 表明该仪器精密度良好。

(2) 稳定性试验: 精密称取未发汗厚朴样品粉末(A1), 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、16、24 h, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 以厚朴酚为参照峰, 计算各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 3.00%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.15%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

(3) 重复性试验: 精密称取未发汗厚朴样品粉末(A1), 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 6

份, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 以厚朴酚为参照峰, 计算各共有峰相对峰面积的 RSD 均小于 3.00%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.15%, 表明此方法重复性良好。

(4) 专属性试验: 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液(A1)和空白溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 结果如图 2 所示。结果显示, 在供试品溶液色谱图中, 与混合对照品溶液色谱图相对应的色谱峰的出峰时间稳定, 与相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 理论塔板数按厚朴酚峰计算均大于 3 800, 且空白溶液不干扰测定, 表明该方法专属性良好。

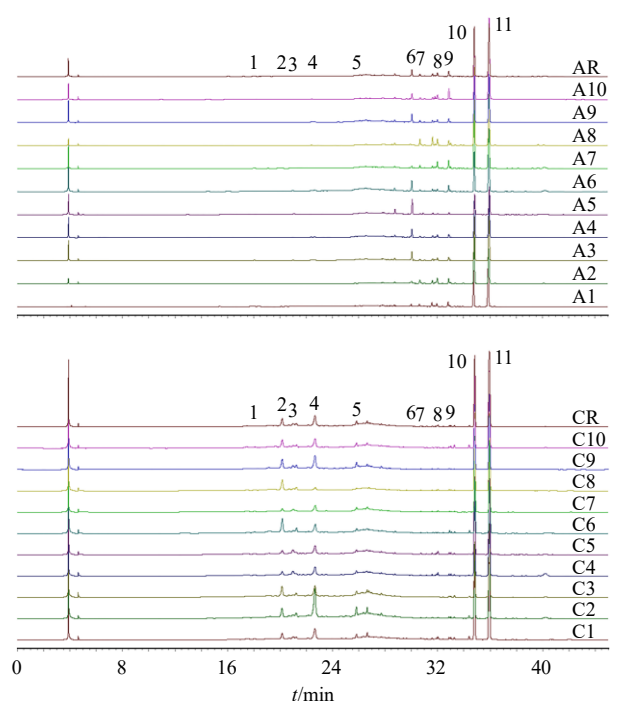


1-紫丁香苷; 3-木兰花碱; 4-厚朴苷 A; 10-和厚朴酚; 11-厚朴酚。
1-syringin; 3-magnoflorine; 4-magnolioside A; 10-honokiol; 11-magnolol.

图 2 混合对照品溶液 (a)、供试品溶液 (A1, b) 和空白溶液 (c) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed reference substances solution (a), test solution (A1, b) and blank solution (c)

2.1.6 指纹图谱的建立 分别取 10 批未发汗厚朴 (A1~A10) 与 10 批发汗厚朴 (C1~C10) 样品粉末, 按照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 并将所得的各样品色谱图分别导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版) 进行分析。以 A1 和 C1 作为参照图谱, 采用中位数法, 设置时间窗宽度为 0.1 s, 进行多点校正和全谱峰匹配, 分别生成未发汗厚朴 (A1~A10)、发汗厚朴 (C1~C10) 的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (R)。其中共标定了 11 个共有峰, 通过与对照品色谱图中的保留时间进行对比, 指认出 5 个共有峰, 峰 1 为紫丁香苷, 峰 3 为木兰花碱, 峰 4 为厚朴苷 A, 峰 10 为和厚朴酚, 峰 11 为厚朴酚。结果如图 3 所示。



1-紫丁香苷; 3-木兰花碱; 4-厚朴苷 A; 10-和厚朴酚; 11-厚朴酚。
1-syringin; 3-magnolflorine; 4-magnolside A; 10-honokiol; 11-magnolside.

图 3 未发汗厚朴 (A1~A10) 和发汗厚朴 (C1~C10) 的 HPLC 指纹图谱及其对照指纹图谱 (AR, CR)

Fig. 3 HPLC fingerprints of non-sweating MOC (A1—A10) and sweating MOC (C1—C10) and their reference fingerprints (AR, CR)

2.1.7 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 年版) 软件, 分别以 10 批未发汗厚朴与 10 批发汗厚朴生成的对照指纹图谱 R 为参照, 计算各批次之间的相似度。结果 10 批未发汗厚朴 (A1~A10) 的相似度分别为 0.985、0.958、0.993、0.955、0.920、0.956、0.993、0.974、0.993、

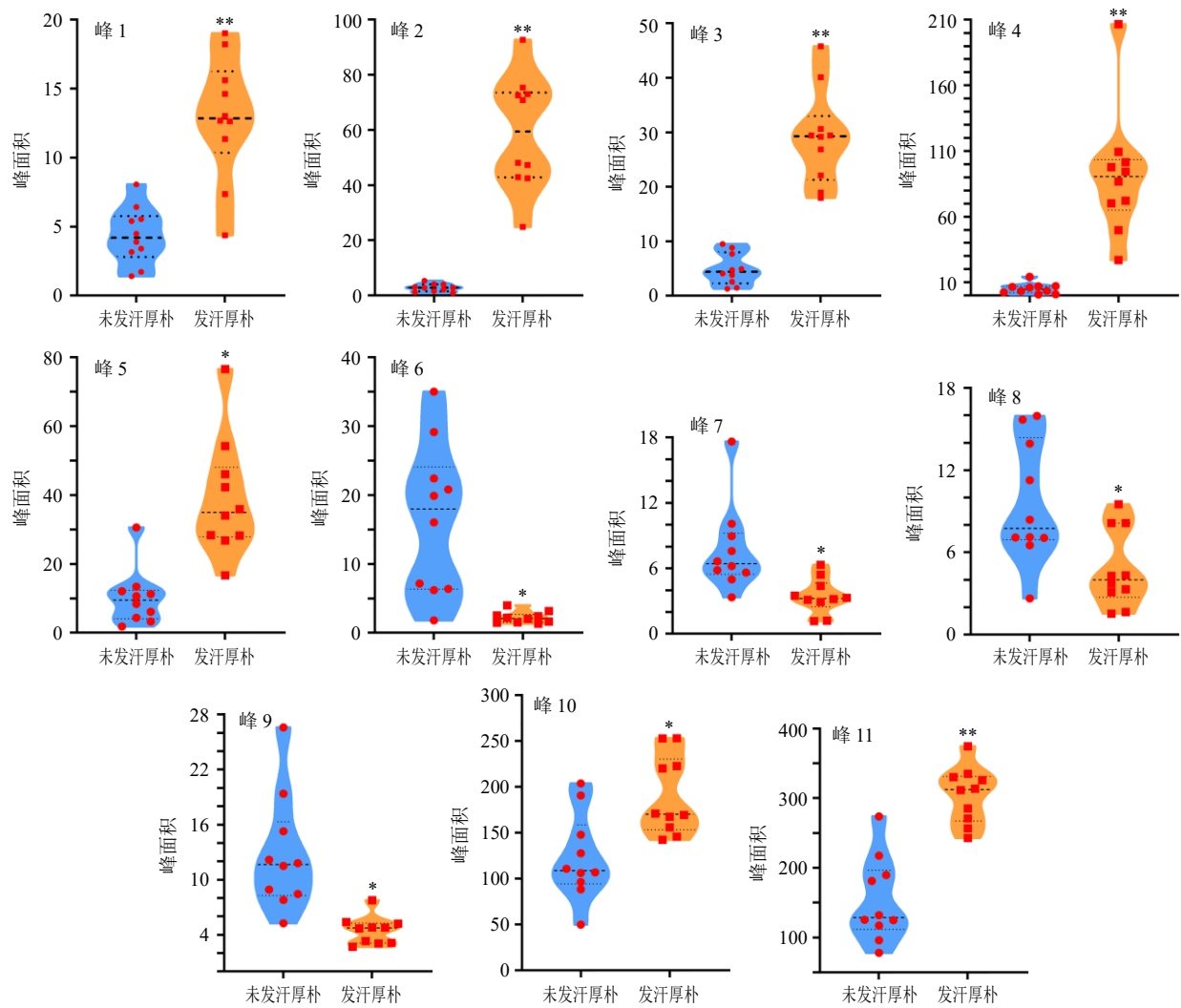
0.977, 10 批发汗厚朴 (C1~C10) 的相似度分别为 0.972、0.956、0.964、0.972、0.963、0.969、0.953、0.961、0.971、0.979。可见 10 批未发汗厚朴与 10 批发汗厚朴各自的相似度均较好, 均在 0.9 以上。

2.1.8 指纹图谱共有峰比较分析 比较未发汗厚朴与发汗厚朴的 HPLC 指纹图谱, 结果发现共有峰峰面积均有所不同, 利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘制小提琴图, 可快速直观分析厚朴发汗前后共有峰的峰面积变化。小提琴图是一种结合箱线图与核密度图特点来显示数据分布情况的可视化图表, 能直观比较组间差异。由图 4 可知, 与未发汗厚朴相比, 发汗厚朴中峰 1 (紫丁香苷)、2、3 (木兰花碱)、4 (厚朴苷 A)、5、10 (和厚朴酚)、11 (厚朴酚) 的峰面积出现不同程度的升高趋势, 且均具有显著性变化差异; 峰 6~9 的峰面积呈降低趋势, 且均具有显著性变化差异。由此可见, 厚朴发汗后其化学成分的含量较发汗前发生了明显变化, 其中已指认出的紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、和厚朴酚与厚朴酚的峰面积在发汗后均显著增加, 提示厚朴发汗后有效成分含量增加。

2.2 化学模式识别研究

2.2.1 层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 将厚朴发汗前后所有样品 11 个共有峰的峰面积作为变量导入 SPSS 25.0 软件, 采用组间连接法, 以平方欧氏距离为样品相似度的距离公式, 进行层次聚类分析, 结果如图 5 所示。当聚类距离为 15 时, 20 批厚朴样品明显被分为 2 类, 未发汗厚朴 (A1~A10) 聚为一类, 发汗厚朴 (C1~C10) 聚为一类。HCA 结果表明, 厚朴发汗前后在化学成分上存在一定差异, 可通过指纹图谱共有峰峰面积的 HCA 进行区分。

2.2.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 以厚朴发汗前后所有样品中 11 个共有峰的峰面积为变量进行 PCA。利用 SPSS 25.0 软件对色谱峰峰面积进行抽样适合性检验 (Kaiser Meyer Olkin, KMO, 检验值 ≥ 0.6) 和 Bartlett's 球形检验 (检验值 ≤ 0.05)^[13], 可得 KMO 检验统计量为 0.732, Bartlett's 检验统计量为小于 0.001, 表明本研究所得结果适合进行 PCA。采用 Origin 2024 软件进行 PCA 并生成特征值和方差贡献率、主成分载荷矩阵以及 PCA 得分图, 结果如表 1、2 和图 6 所示。由表 1 可知, 以特征值大于 1 为标准, 可提取得到 2 个主成分, 特征值分别为 6.558、1.963, 方差贡献率分别为



与未发汗厚朴比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs non-sweating MOC.

图 4 厚朴发汗前后共有峰峰面积小提琴图

Fig. 4 Violin plots of peak areas of common peaks of MOC before and after sweating

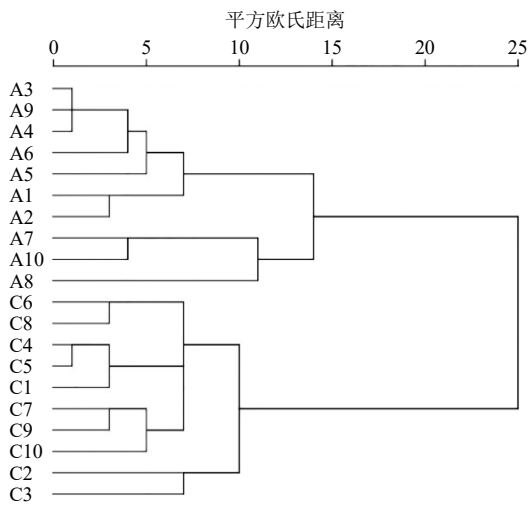


图 5 20 批厚朴样品聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of 20 batches of MOC samples

表 1 特征值和方差贡献率

Table 1 Eigenvalues and variance contribution rates			
主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	6.558	59.616	59.616
2	1.963	17.848	77.464
3	0.671	6.099	83.563
4	0.550	4.996	88.559
5	0.427	3.884	92.443
6	0.320	2.907	95.350
7	0.177	1.612	96.962
8	0.162	1.474	98.436
9	0.102	0.926	99.362
10	0.039	0.359	99.720
11	0.031	0.280	100.000

表 2 主成分载荷矩阵

Table 2 Principal component load matrix

成分数	载荷矩阵		成分数	载荷矩阵	
	主成分 1	主成分 2		主成分 1	主成分 2
1	0.338	-0.035	7	-0.245	0.443
2	0.359	-0.003	8	-0.246	0.492
3	0.351	0.049	9	-0.263	0.250
4	0.352	0.051	10	0.228	0.451
5	0.335	-0.068	11	0.312	0.255
6	-0.242	-0.469			

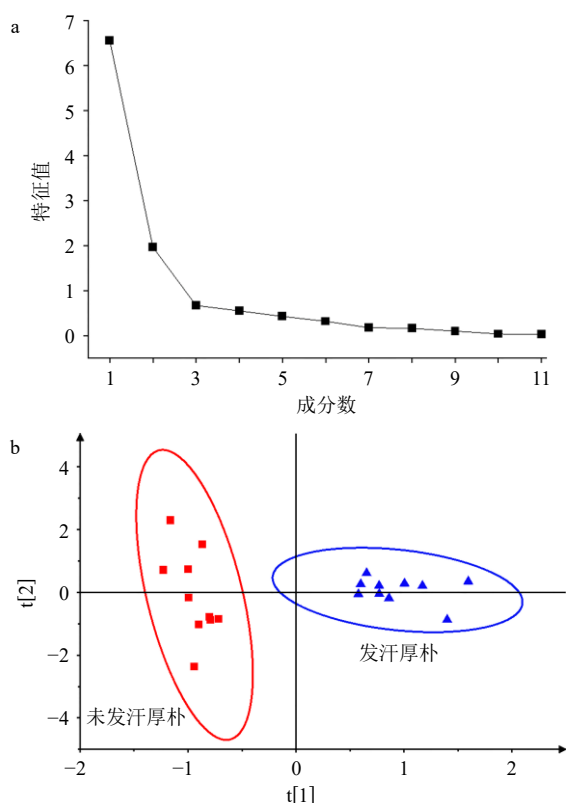


图 6 厚朴样品 PCA 碎石图 (a) 和 PCA 得分图 (b)

Fig. 6 PCA scree plot (a) and PCA score plot (b) of MOC samples

59.616%、17.848%，累积方差贡献率为 77.464%，且在图 6-a 碎石图中前 2 个成分特征值的变化曲线陡峭，表明这 2 个主成分能比较全面地揭示厚朴发汗前后样品的变异信息。主成分载荷矩阵可用于表示各个因子在主成分上的贡献率，载荷的绝对值越大，表明该因子在相应主成分上的贡献越大，二者相关性越好。由表 2 可得，峰 1（紫丁香苷）、2、3（木兰花碱）、4（厚朴苷 A）、5、11（厚朴酚）对主成分 1 的贡献率较大且均与主成分 1 呈正相关，主成分 1 主要反映了这 6 个成分的信息；峰 6~8、10（和厚朴酚）对主成分 2 的贡献率较大，主成分 2 主

要反映了这 4 个成分的信息。从图 6-b 可见，PCA 能够很好地将未发汗厚朴（A1~A10）与发汗厚朴（C1~C10）样品区分开来，其结果与 HCA 一致。综上所述，PCA 结果表明，厚朴发汗前后存在的差异可能是由多种化学成分共同引起的。

2.2.3 正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 以厚朴发汗前后指纹图谱 11 个共有峰的峰面积为变量，采用 SIMCA 14.1 分析软件进行有监督模式的 OPLS-DA，以确定对区分未发汗厚朴与发汗厚朴贡献度大的特征成分，结果如图 7 所示。拟合得到的模型的 $R_X^2=0.719$ ， $R_Y^2=0.968$ ， $Q^2=0.933$ ，均大

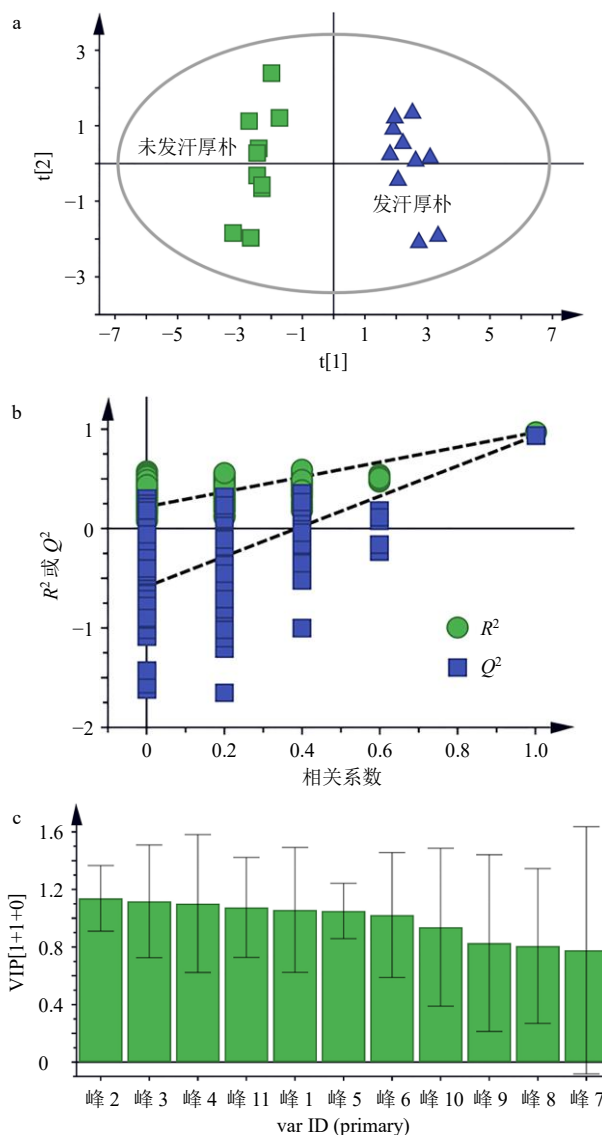


图 7 厚朴样品 OPLS-DA 得分图 (a)、置换检验 (b) 和 VIP 图 (c)

Fig. 7 OPLS-DA score plot (a), permutation test (b) and VIP value (c) of MOC samples

于 0.5, 表明所建立的模型稳定性及预测能力较强。OPLS-DA 得分图中未发汗厚朴 (A1~A10) 与发汗厚朴 (C1~C10) 样品明显聚为 2 类, 与 HCA、PCA 结果一致, 表明未发汗厚朴与发汗厚朴之间差异性良好。对建立的 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验, 结果发现位于最右边的 R^2 和 Q^2 值均大于 0.9, 且均高于最左边的 R^2 和 Q^2 值, 斜率为正, Q^2 回归线的截距为负, 说明所建立的识别模型未出现过拟合现象, 具有较好的预测能力且结果可靠, 能对未发汗厚朴和发汗厚朴进行有效的判别分析, 并用于差异标志物的筛选。

在 OPLS-DA 模型的 VIP 图中, VIP 值越大, 相应变量对色谱峰引起的组间差异的贡献越大^[14]。为进一步筛选厚朴发汗前后的差异性成分, 提取 11 个变量的 VIP 值, 如图 7-c 所示, 以 VIP 值 > 1 为标准筛选得到 7 个共有峰, 分别为峰 2、3 (木兰花碱)、4 (厚朴苷 A)、11 (厚朴酚)、1 (紫丁香苷)、5、6; 以 VIP 值 > 0.9 为标准筛选得到 8 个共有峰, 分别为峰 2、3 (木兰花碱)、4 (厚朴苷 A)、11 (厚朴酚)、1 (紫丁香苷)、5、6、10 (和厚朴酚)。建立的 OPLS-DA 识别模型无过度拟合现象, 结合小提琴图显示发汗前后和厚朴酚的含量发生显著变化 ($P < 0.05$), 且和厚朴酚是药典中明确规定的厚朴含量测定的指标性成分, 故综合考虑以 VIP 值 > 0.9 作为筛选标准, 即峰 2、木兰花碱、厚朴苷 A、厚朴酚、紫丁香苷、峰 5、峰 6、和厚朴酚是厚朴发汗前后的主要差异成分。

2.3 厚朴发汗前后颜色 RGB 值研究

2.3.1 样品图像采集和 RGB 值提取 取厚朴发汗前后各样品粉末适量, 均匀平铺于同一白色透明的培养皿中, 并固定一张空白 A4 纸作为白色背景。通过机械支架将 PENTAX K-3 数码相机垂直固定于培养皿上方一定高度不变, 在同一摄影棚环境、同一光照条件下, 固定相机参数进行拍摄, 焦距: 50 mm; 光圈: F/3.5; 曝光时间: 1/100 s, 无闪光; ISO 速度: ISO-100; 白平衡: Auto; 储存格式: JPEG, 所有样品的图像采集 1 式 3 份。将采集的样品图像导入 Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) 软件, 使用其中的颜色直方图工具获取图像的 RGB 值, 每个样品得到 3 个 RGB 值, 计算平均值以表示为该样品的 RGB 值^[9,15], 结果如表 3 和图 8 所示。

由表 3 可知, 未发汗厚朴、发汗厚朴的 R 值分别为 228.109~233.414、233.113~239.827, G 值分

表 3 厚朴样品 R、G、B 值分布范围

Table 3 Distribution ranges of R, G and B values of MOC samples

编号	RGB 颜色模式			编号	RGB 颜色模式		
	R 值	G 值	B 值		R 值	G 值	B 值
A1	232.019	221.952	213.825	C1	233.829	224.662	215.437
A2	230.680	219.848	212.261	C2	239.328	231.834	221.626
A3	233.414	223.810	215.193	C3	239.421	232.021	221.573
A4	231.416	221.659	213.444	C4	233.113	223.484	214.942
A5	232.499	224.233	215.791	C5	237.293	227.821	217.246
A6	231.501	221.360	213.452	C6	239.805	231.680	221.174
A7	229.294	219.655	212.910	C7	233.940	226.102	216.978
A8	231.994	222.547	214.598	C8	237.650	229.325	219.850
A9	231.662	222.985	215.075	C9	239.827	232.588	222.541
A10	228.109	217.522	211.614	C10	234.982	225.808	215.532

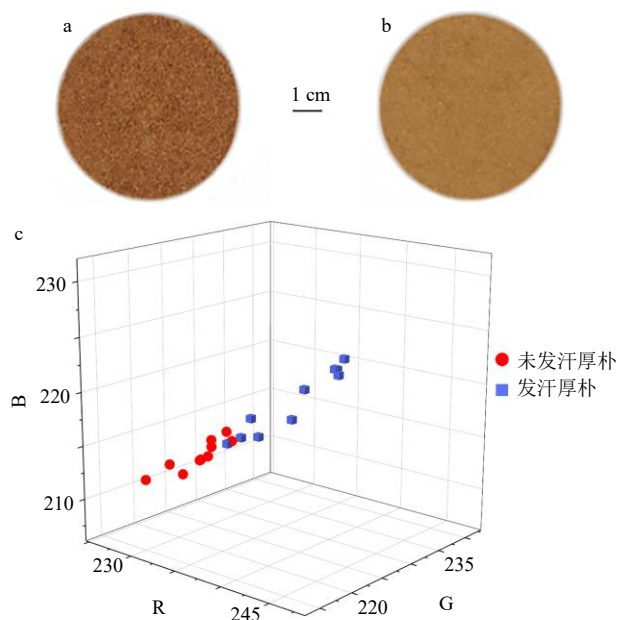


图 8 未发汗厚朴样品粉末图 (a)、发汗厚朴样品粉末图 (b) 和厚朴样品 RGB 值三维坐标空间图 (c)

Fig. 8 Powder image of no-sweating MOC samples (a), powder image of sweating MOC samples (b) and RGB values three-dimensional coordinate space diagram of MOC samples (c)

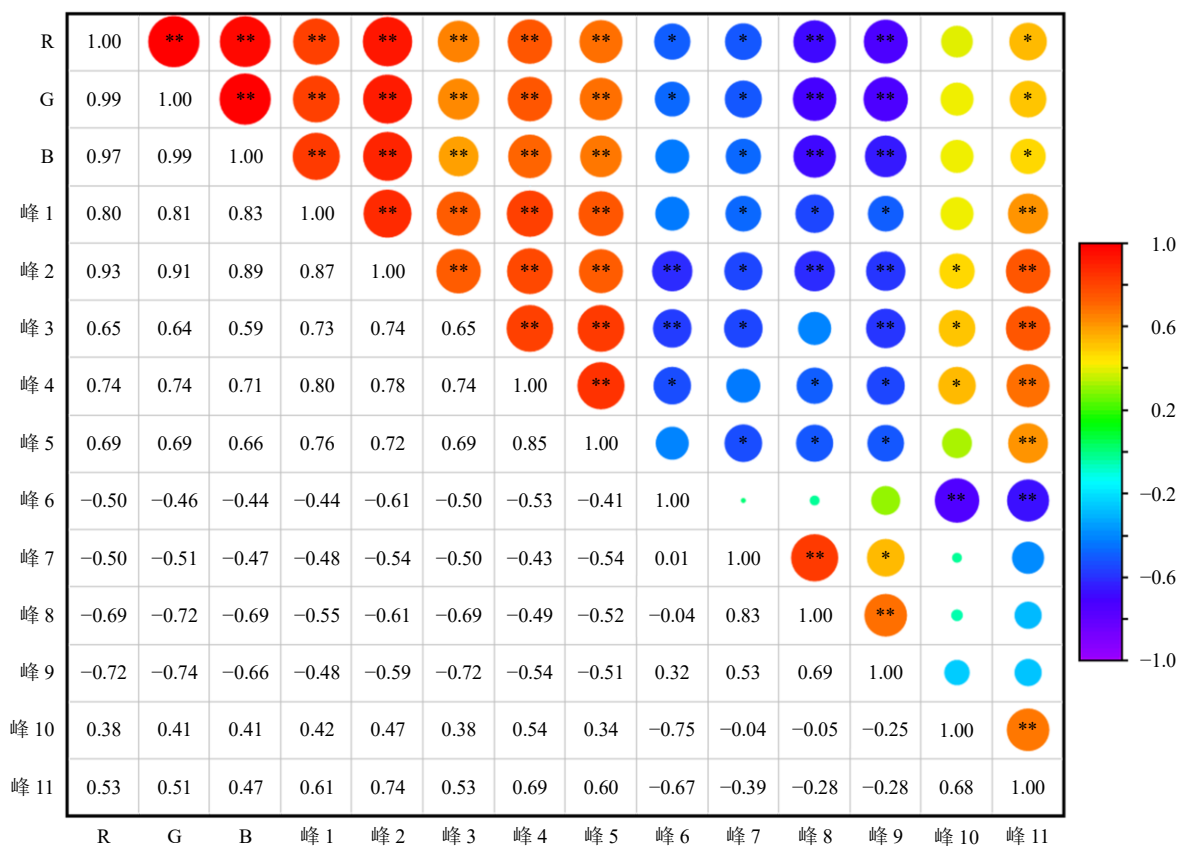
别为 217.522~224.233、223.484~232.588, B 值分别为 211.614~215.791、214.942~222.541, 说明未发汗厚朴与发汗厚朴的 RGB 值具有明显特征, 发汗厚朴的 RGB 值更高。进一步分析发现, 厚朴发汗前 R、G、B 值大小呈现 R 值 > G 值 > B 值的趋势, 提示厚朴发汗前粉末颜色的整体色调偏向红色调; 厚朴发汗后 R、G、B 值呈上升趋势且 R 值 > G 值 > B 值, 而 G 值的增长幅度大于 R 值, 提示厚朴发汗

后粉末颜色的整体色调可能趋向于温暖柔和的黄色调。此外，从图 8-c 可以看出，未发汗厚朴与发汗厚朴的颜色点形成 2 簇，表明未发汗厚朴与发汗厚朴之间存在颜色差异。

R、G、B 值不均满足正态性分布和方差齐性，故为了更好地分析未发汗厚朴与发汗厚朴在整体颜色分布上是否存在显著差异，利用 SPSS 25.0 软件进行非参数检验。Mann-Whitney U 检验用于分析两组独立样本之间是否存在显著差异，以样品粉末 R、G、B 值为变量，与分组类别进行 Mann-Whitney U 检验^[16]，结果显示三者的 P 值均小于 0.01，表明厚朴样品 R、G、B 值与分组类别之间存在显著的相关性。综上所述，未发汗厚朴与发汗厚朴之间存在显著的颜色差异，颜色 RGB 值能将两者有效区分开来。

2.3.2 颜色 RGB 值与指纹图谱共有峰的相关性分析 为探究厚朴发汗前后颜色 RGB 值与化学成分之间的关联，将厚朴发汗前后指纹图谱 11 个共有

峰的峰面积与 R、G、B 值导入 Origin 2024 软件进行相关性分析，并绘制相关热图，如图 9 所示。R 值与峰 1（紫丁香苷）、2、3（木兰花碱）、4（厚朴苷 A）、5 呈极显著正相关（相关系数 r 分别为 0.8、0.93、0.65、0.74、0.69， $P < 0.01$ ），与峰 6、7 呈显著负相关（ r 分别为 -0.5、-0.5， $P < 0.05$ ），与峰 8、9 呈极显著负相关（ r 分别为 -0.69、-0.72， $P < 0.01$ ），与峰 11（厚朴酚）呈显著正相关（ r 为 0.53， $P < 0.05$ ）；G 值与峰 1~5 呈极显著正相关（ r 分别为 0.81、0.91、0.64、0.74、0.69， $P < 0.01$ ），与峰 6、7 呈显著负相关（ r 分别为 -0.46、-0.51， $P < 0.05$ ），与峰 8、9 呈极显著负相关（ r 分别为 -0.72、-0.74， $P < 0.01$ ），与峰 11 呈显著正相关（ r 为 0.53， $P < 0.05$ ）；B 值与峰 1~5 呈极显著正相关（ r 分别为 0.83、0.89、0.59、0.71、0.66， $P < 0.01$ ），与峰 7 呈显著负相关（ r 为 -0.47， $P < 0.05$ ），与峰 8、9 呈极显著负相关（ r 分别为 -0.69、-0.66， $P < 0.01$ ），与峰 11 呈显著正相关（ r 为 0.47， $P < 0.05$ ）；R、G、



* $P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著。

* $P < 0.05$, the difference is significant; ** $P < 0.01$, the difference is very significant.

图 9 厚朴发汗前后指纹图谱共有峰峰面积与颜色 RGB 值的相关性分析

Fig. 9 Correlation analysis between peak areas of common peaks of fingerprint and RGB values of MOC before and after sweating

B 值与峰 10 (和厚朴酚) 存在相关性但均不显著 (r 分别为 0.38、0.41、0.41, $P>0.05$)。结合成分指认结果和颜色 RGB 值结果分析, 提示厚朴发汗后颜色变化主要与紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、厚朴酚等成分相关, 即厚朴发汗后颜色 RGB 值可以一定程度反映紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、厚朴酚等成分的含量变化。

3 讨论

本研究建立了未发汗厚朴与发汗厚朴的 HPLC 指纹图谱, 其相似度均大于 0.9, 且标定的 11 个共有峰的峰面积均有所不同, 小提琴图结果表明厚朴发汗后紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、和厚朴酚与厚朴酚等成分的含量显著增加。化学模式识别研究显示, HCA、PCA、OPLS-DA 模型可有效区分未发汗厚朴与发汗厚朴, 并筛选出了 8 个对区分未发汗厚朴和发汗厚朴具有重要贡献的代表成分, 影响大小依次为峰 2>峰 3>峰 4>峰 11>峰 1>峰 5>峰 6>峰 10, 结合成分指认和小提琴图分析结果, 说明木兰花碱 (峰 3)、厚朴苷 A (峰 4)、厚朴酚 (峰 11)、紫丁香苷 (峰 1)、和厚朴酚 (峰 10) 等可作为厚朴发汗前后主要的差异性成分, 此研究结果与课题组前期预测厚朴酚、和厚朴酚、紫丁香苷、厚朴苷 A 和木兰花碱为厚朴发汗前后质量标志物的研究结果^[17]相吻合。

厚朴外观颜色与药材品质紧密相关, 南北朝时期《本草经集注》^[6]记载厚朴“极厚, 肉紫色为好, 壳薄而白者不如”, 明代《本草原始》^[18]有云“皮鳞皱而厚, 紫色油润者, 俗呼紫油厚朴, 入剂最佳。薄而白者, 俗呼山厚朴, 不堪用”, 历版《中国药典》规定厚朴干皮发汗至内表面变紫褐色或棕褐色。数千年临床用药经验形成厚朴“色紫油润者佳”的共识, 紫油厚朴也成为优质厚朴的代名词^[19]。本研究采用 RGB 颜色模式, 通过数字图像处理实现对厚朴发汗前后粉末颜色的客观量化, 发现 RGB 值能有效区分未发汗厚朴与发汗厚朴样品。将 HPLC 指纹图谱 11 个共有峰峰面积与颜色 R、G、B 值进行相关性分析, 结果显示颜色 R、G、B 值分别与紫丁香苷、峰 2、木兰花碱、厚朴苷 A、峰 5 呈极显著正相关 ($P<0.01$), 与厚朴酚呈显著正相关 ($P<0.05$), 与峰 8 和峰 9 呈极显著负相关 ($P<0.01$), 与峰 7 呈显著负相关 ($P<0.05$)。

进一步分析还发现, 紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、厚朴酚等成分的含量变化可能对厚朴药材

外观颜色 RGB 值中的 R (红色) 和 G (绿色) 分量的变化产生较大影响, 这与学者^[7]利用基于 $L^*a^*b^*$ 颜色模式的色差仪发现红绿色度是厚朴发汗前后颜色评价的主要指标的研究结果相吻合。本研究采用 RGB 颜色模式量化分析了厚朴粉末颜色, 后续将进一步针对厚朴药材内表皮颜色进行分析, 以更全面地阐释厚朴传统经验“肉紫色为好”的科学性。

现有研究初步发现, 厚朴发汗过程颜色的变化与酶、微生物群落等相关, 如厚朴发汗水煮环节可能会抑制酪氨酸酶的活性, 厚朴发汗过程过氧化酶的活性随发汗时间整体呈下降趋势, 多酚氧化酶的活性呈现先降低后上升的趋势^[7-8,20-21], 进而影响药材外观颜色; 厚朴发汗过程中微生物群落的结构、多样性及特征均发生改变, 曲霉属、假丝酵母菌属等优势真菌的代谢可能促进厚朴药材内表面变为棕褐色或紫褐色^[22-23]。同时厚朴发汗过程亦通过酶、微生物等作用使其成分发生变化^[7-8,24]。本研究发现厚朴发汗后颜色变化与紫丁香苷、木兰花碱、厚朴苷 A、厚朴酚等成分含量变化密切相关, 与课题组前期研究发现厚朴发汗后可能发生成分转化而影响厚朴酚、紫丁香苷、厚朴苷 A 等成分含量相吻合^[12,17], 为厚朴“辨色论质”的品质评价提供了依据。

本研究后续将进一步针对厚朴发汗的动态过程展开研究, 并深入探究发汗过程中酶活性、微生物群落等对药材颜色、成分变化的影响, 更好地指导厚朴产地加工发汗终点的确定。同时, 本研究采用 RGB 数字图像证实了厚朴颜色与成分紧密相关, 后续将结合机器学习算法、人工智能等技术进一步构建厚朴发汗外观颜色-内在成分的定量模型, 以期促进中药材质量的数字化、智能化控制。

综上, 本研究将 RGB 数字图像与指纹图谱成分信息相结合, 发现厚朴发汗后的颜色变化与紫丁香苷、厚朴苷 A、木兰花碱、厚朴酚等成分变化密切相关, 为基于“辨色论质”评价厚朴品质提供了理论依据。

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: 263.
- [2] 张晓娟, 左冬冬, 胡妮娜, 等. 厚朴的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(2): 85-89.
- [3] 张明发, 沈雅琴. 中药厚朴对肠道的药理作用及其机制的研究进展 [J]. 抗感染药学, 2022, 19(9): 1243-

- 1247.
- [4] 张明发, 沈雅琴. 厚朴酚及和厚朴酚抗抑郁药理作用及机制的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(2): 450-456.
- [5] 谭珍媛, 邓家刚, 张彤, 等. 中药厚朴现代药理研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 228-234.
- [6] 南朝·梁·陶弘景编. 尚志钧尚元胜辑校. 本草经集注: 辑校本 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 276.
- [7] 刘红亮. 从药材性状及化学成分的角度诠释产地初加工“发汗”对厚朴质量的影响 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [8] 朱兴龙, 卢丽洁, 吴清华, 等. 基于成分变化研究厚朴“发汗”过程中颜色与酶促反应的关系 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1262-1272.
- [9] 贾斐斐. 菊花花色表型的数量化评价与全基因组关联分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- [10] 赵阳. 基于番茄叶片图像的叶绿素含量研究 [D]. 银川: 宁夏大学, 2021.
- [11] 陈庆梅, 陶鹏, 邹奕璋. 基于 MATLAB 的中药炮制色泽客观化辨识技术研究 [J]. 现代信息科技, 2024, 8(20): 149-152.
- [12] 刘畅, 王潇, 刘芳, 等. 基于多指标质量差异关键属性优化厚朴产地加工“发汗”工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 677-684.
- [13] 李鹏飞, 岳倩侠, 孙叶芬, 等. 基于指纹图谱与化学计量学的白芍酒炙前后差异性标志物研究 [J]. 中草药, 2023, 54(8): 2398-2407.
- [14] 竹炳, 吴杭莎, 葛卫红, 等. 杜仲盐制前后胶丝力度与色度值及特征成分含量的相关性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3291-3299.
- [15] Underhill A N, Hirsch C D, Clark M D. Evaluating and mapping grape color using image-based phenotyping [J]. *Plant Phenomics*, 2020, 2020: 8086309.
- [16] Zhang Q, Xue R, Su L L, *et al.* Quality difference analysis of raw and vinegar-processed products of Qingpi based on color and component correlation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, 241: 115968.
- [17] 刘畅, 王潇, 刘芳, 等. “发汗”前后厚朴质量标志物的预测分析 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2686-2690.
- [18] 明·李中立撰绘. 郑金生, 汪惟刚, 杨梅香整理. 本草原始 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 256.
- [19] 钱锦秀, 孟武威, 刘晖晖, 等. 经典名方中厚朴的本草考证 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(10): 306-317.
- [20] 段金殿, 宿树兰, 严辉, 等. 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1219-1225.
- [21] 陈茹, 陈成, 杨兴鑫, 等. 中药“发汗”炮制法的现代研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 489-493.
- [22] 魏担, 吴清华, 刘钰萍, 等. 基于高通量测序研究厚朴“发汗”过程中微生物群落多样性及其特征 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5405-5412.
- [23] 李玉平, 严春兰, 骆进程, 等. 中药厚朴发汗过程中微生物群落结构及特征的分析 [J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(7): 78-84.
- [24] Wu Q, Wei D, Dong L L, *et al.* Variation in the microbial community contributes to the improvement of the main active compounds of *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils in the process of sweating [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 45.

[责任编辑 郑礼胜]