

何首乌“九蒸九晒”炮制过程“颜色-成分-抗氧化活性”的变化及相关性研究

唐 林, 高元航, 李海英, 廖 卓, 余亚胜, 王 璐, 杨 磊*, 胡 超*

湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410000

摘要: **目的** 研究“九蒸九晒”何首乌 *Polygoni Multiflori Radix* 炮制过程内在成分与表观颜色及抗氧化活性的关联性, 为“九蒸九晒”何首乌炮制程度判断和质量控制提供参考。**方法** 采用色差仪对何首乌不同蒸制次数样品的颜色进行客观量化; 采用 HPLC 法建立指纹图谱, 并对特征峰进行 HPLC-Q-TOF-MS 分析; 参照《中国药典》2025 年版方法测定醇溶性浸出物; 采用苯酚-硫酸法测定多糖含量; 通过 DPPH 自由基清除能力、ABTS 自由基清除能力和亚铁还原抗氧化能力 (ferric reducing antioxidant power, FRAP) 法测定总抗氧化能力评价抗氧化活性; 对上述成分与色度值、抗氧化活性进行 Pearson 相关性分析和回归分析; 运用聚类分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘回归 (partial least squares regression, PLSR) 分析确定“九蒸九晒”何首乌的炮制程度, 运用熵权-TOPSIS 法确定“九蒸九晒”何首乌的最佳炮制终点。**结果** 在“九蒸九晒”何首乌炮制过程中, 表观颜色逐渐加深, 色度值逐渐降低; 多糖含量逐渐增加, 醇溶性浸出物含量先增加后下降; 指纹图谱共建立了 26 个特征峰, 对其中 25 个特征峰进行了成分鉴定。相关性分析结果表明, 内在成分与色度值和抗氧化活性指标呈显著相关; 何首乌“九蒸九晒”过程划分为初期、中期和末期 3 个阶段, 七蒸七制综合评分最高。**结论** 何首乌在炮制过程中成分含量、颜色、抗氧化活性均发生显著变化, 且存在相关性, 而基于“颜色-成分-抗氧化活性”的综合分析, 能够实现“九蒸九晒”何首乌炮制工艺、质量控制的客观判别。

关键词: 何首乌; 九蒸九晒; 颜色-成分-抗氧化活性; 相关性分析; 炮制; 没食子酸; 5-HMF; 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

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)03-0897-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.03.010

Changes and correlations of “color-component-antioxidant activity” in “nine-steaming and nine-sun-drying” processing of *Polygoni Multiflori Radix*

TANG Lin, GAO Yuanhang, LI Haiying, LIAO Zhuo, YU Yasheng, WANG Lu, YANG Lei, HU Chao

The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China

Abstract: Objective To investigate the correlation between intrinsic components, visual color, and antioxidant activity during the “nine-steaming and nine-sun-drying” processing of Heshouwu (*Polygoni Multiflori Radix*, PMR), providing a reference for determining the processing degree and quality control. **Methods** A colorimeter was used to objectively quantify the color of samples at different steaming and sun-drying cycles. HPLC was used to establish fingerprints, HPLC-Q-TOF-MS was employed to analysis characteristic peaks. Alcohol-soluble extract content was determined according to the *Chinese Pharmacopoeia* (2025 edition). Polysaccharide content was measured using the phenol-sulfuric acid method. Antioxidant activity was evaluated through DPPH radical scavenging capacity, ABTS radical scavenging assays, and ferric reducing antioxidant power (FRAP) method to determine total antioxidant capacity. Pearson correlation and regression analyses were conducted between the components, color values, and antioxidant activity. Cluster analysis, principal component analysis (PCA), and partial least squares regression (PLSR) were applied to

收稿日期: 2025-08-15

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2024JJ8151); 湖南省自然科学基金资助项目 (2024JJ6362); 湖南省自然科学基金资助项目 (2025JJ60642); 中药创新能力提升项目 (湘中医药函 [2025] 5 号); 湖南省卫生健康高层次人才项目 (湘卫函 [2024] 43、182 号); 国家中医药管理局全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函 [2024] 255 号)

作者简介: 唐 林, 副主任药师, 从事中药炮制与制剂研究。E-mail: tanglin0018@163.com

***通信作者:** 杨 磊, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药炮制与制剂研究。E-mail: 263649560@qq.com

胡 超, 主管药师, 主要从事中药制剂的质量与评价研究。E-mail: 348009051@qq.com

determine the processing stages of “nine-steaming and nine-sun-drying” PMR, while entropy-weighted TOPSIS was used to identify its the optimal processing endpoint. **Results** During processing, the sample color gradually darkened, and chromaticity values decreased. Polysaccharide content increased progressively, while alcohol-soluble extract content first increased and then declined. A total of 26 chromatographic peaks were identified in the fingerprints, and the components of 25 of them were identified. Correlation analysis revealed significant relationships between intrinsic components, color values, and antioxidant activity. The processing stages were divided into initial, middle, and final phases, with the seven steaming and sun-drying cycle achieving the highest comprehensive score. **Conclusion** Significant changes in component content, color, and antioxidant activity occur during the processing of PMR, with notable correlations among them. The integrated “color-component-antioxidant activity” analysis enables objective discrimination of processing techniques and quality control in “nine-steaming and nine-sun-drying” PMR.

Keywords: *Polygoni Multiflori Radix*; nine-steaming and nine-sun-drying; color-component-antioxidant activity; correlation analysis; processing; gallic acid; 5-HMF; stilbenes glycosides; emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside; physcion-8-*O*- β -*D*-glucoside; emodin; physcion

何首乌 *Polygoni Multiflori Radix* (PMR) 为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 有生品与炮制品之分, 生何首乌具有解毒、消痈、截疟、润肠通便的功效, 制何首乌 *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* (PMRP) 具有益寿延年、补肝肾、益精血、乌须发、强筋骨、化浊降脂的功效。生、制何首乌临床应用均非常广泛, 是典型的生熟异用的品种^[1]。目前, 何首乌主要的炮制方法有黑豆制、酒制、黑豆黄酒制和蒸制等^[2]。宋代开始提出“九蒸九曝”经典的炮制方法, 《本草图经》首次记载何首乌经典“九蒸九晒”炮制方法: “采时乘湿以布帛拭去土, 后用苦竹刀切, 米泔浸一宿, 曝干, 九蒸九晒乃可服”。到明、清时期, “九蒸九曝”成为何首乌经典炮制方法^[3-4]。相较于繁琐的传统炮制方法而言, 何首乌的现代炮制方法略存敝处, “九蒸九曝”的经典炮制方法并没有被严格地传承下来。《中国药典》2025 年版记载何首乌炮制方法仅为炖法或蒸法, 且蒸晒仅 1 次^[5]。此外, 在何首乌“九蒸九晒”的炮制过程中, 饮片内部物理结构、化学成分和外观颜色均会随着炮制阶段的不同而变化, 但现有的判定标准无法对“棕褐色”的颜色进行定量描述, 因而, 无法制定规范合理的炮制工艺和质量标准, 导致药品质量参差不齐。

何首乌的化学成分是影响其功效的物质基础, 目前, 研究表明何首乌化学成分包括二苯乙烯苷类、蒽醌类(大黄素、大黄酚、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素及大黄酚蒽酮等)、鞣质类(没食子酸、儿茶素等)及多糖等^[6-7]。其中, 二苯乙烯苷、鞣质、糖类具有抗氧化、抗衰老等药理作用^[8-9]。以往研究大多局限于炮制对何首乌化学成分的变化, 较少将化学成分与其药理作用、颜色变化进行关联分析^[10-14], 因此, 难以系统阐明何首乌“九蒸九晒”

的科学内涵, 在一定程度上限制了制首乌的质量控制与应用开发。鉴于此, 本研究聚焦于何首乌炮制过程中的外观变化、化学成分和抗氧化活性的动态监测, 全面揭示何首乌炮制过程中颜色、化学组成及抗氧化活性的演变规律, 为优化何首乌炮制工艺、提升产品质量、阐明何首乌“九蒸九晒”理论内涵提供科学依据和实验方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司, 包括 G7117C 型 DAD 检测器, G7130A 柱温箱, G7129A 自动进样器, G7111A 四元泵; Q-Exactive 型超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱仪, 美国 Thermo Scientific 公司; SK5200H 型超声波清洗器(功率 200 W、频率 53 kHz), 上海科导超声仪器有限公司; UV-9000S 型紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; AUX-220 型分析天平, 日本 Shimadzu 公司; CS-820P 型台式分光测色仪, 宁波彩谱贸易有限公司。

1.2 试药

何首乌饮片(产地山东, 批号 20230801)、黑豆(产地湖南, 批号 20230501), 购于湖南省南国药都中药饮片有限公司, 经湖南中医药大学第一附属医院张裕民主任药师鉴定为正品, 何首乌为蓼科何首乌属植物何首乌 *P. multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 黑豆为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的干燥成熟种子。

对照品二苯乙烯苷(批号 DST221222-061, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 23313-21-5, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷(批号 23451-01-6, 质量分数 $\geq 98.0\%$)均购自成都德思特生物技术有限公司; 对照品没食子

酸(批号 110831-202407, 质量分数≥90.8%)、大黄素(批号 110756-201913, 质量分数≥96.0%)、5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF, 批号 111626-202417, 质量分数≥99.8%)、大黄素甲醚(批号 110758-202218, 质量分数≥98.9%)、无水 D-葡萄糖(批号 110833-202109, 质量分数≥99.9%)均购自中国食品药品检定研究院。乙腈, 色谱纯, 批号 W51A1H, 购自 Honeywell International; 其余试剂均为分析纯。

DPPH 自由基检测试剂盒(批号 KR354650)、亚铁还原抗氧化能力(ferric reducing antioxidant power, FRAP)法总抗氧化能力检测试剂盒(内含 Trolox 标准品, 批号 KR377564)、ABTS 检测试剂盒(批号 KR374587)均购自上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 炮制品制备

2.1.1 黑豆汁制备 参照《中国药典》2025 年版黑豆汁制备方法^[5], 取黑豆 1 kg, 加水适量, 煎煮 4 h, 熬汁约 1.5 kg, 豆渣再加水煎煮约 3 h, 熬汁约 1 kg, 合并黑豆汁约 2.5 kg。

2.1.2 “九蒸九晒”(黑豆)何首乌饮片的制备^[15] 取适量黑豆汁与何首乌饮片(标记为 HSW)拌匀后蒸制 4.5 h(电磁炉 1 800 W, 圆气开始计时), 66 °C

烘干至水分≤12%(GB 5009.3-2016 第三法), 留取适量作为一蒸一制何首乌饮片, 其余饮片再加入新的黑豆汁重复上述操作, 直至 9 次, 得到一蒸一制至九蒸九制何首乌饮片(标记为 ZH-1~ZH-9), 分别平行制备 3 份。每 10 kg 何首乌, 用黑豆汁 2.5 kg。

2.2 颜色测定

取何首乌不同蒸制次数样品粉末(过四号筛)适量, 利用分光测色仪在 CIE C 标准光源下(温度 25 °C、相对湿度 60%), 采用 10°标准观察者视角, 分别测定其色度值(L^*)、红绿色值(a^*)、黄蓝色值(b^*)和总色度值(E_{ab}^*), 并依据公式 $E_{ab}^*=(L^{*2}+a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ 计算 E_{ab}^* , 结果见图 1 和表 1。

随着蒸制次数的增加, L^* 、 b^* 、 a^* 和 E_{ab}^* 值总体呈下降趋势, ΔE_{ab}^* 值呈上升趋势。 L^* 代表亮度, L^* 越大, 亮度越大, 随着蒸制次数的增加, L^* 呈现明显的下降趋势, 直观反映了样品亮度逐渐减弱, 颜色逐渐加深。 a^* 表示从绿色到红色的范围, 其值越大, 表明颜色越红, 随后随着蒸制次数的增加, 红色成分逐渐褪去, 颜色向黑色演变。 b^* 表示蓝色到黄色的范围, 其值越大, 说明颜色越黄。 b^* 值逐渐下降也支持了上述结论。且与生何首乌相比, 蒸晒后其色度值(L^*)、红绿色值(a^*)、黄蓝色值(b^*)和总色度值(E_{ab}^*)均具有显著差异($P<0.01$)。此外, 随着蒸制次数的增加, ΔE_{ab}^* 不断升高, 其中五

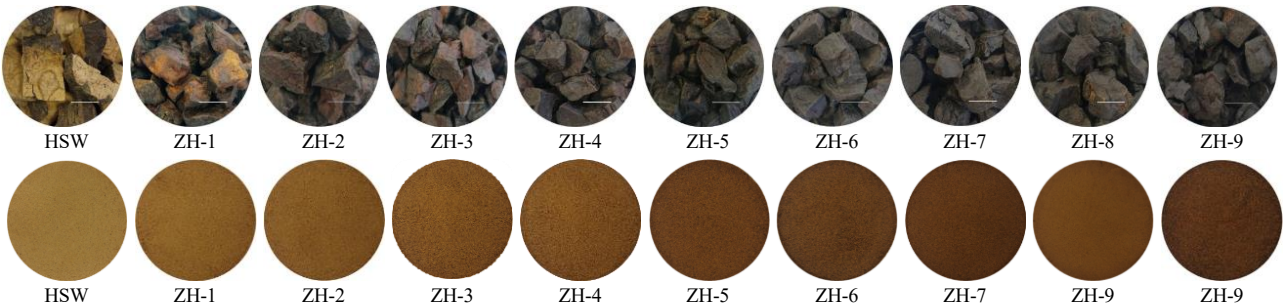


图 1 何首乌不同蒸制次数饮片及粉末图

Fig. 1 Images of PMR slices and powder with different steaming-drying times

表 1 何首乌不同蒸制次数饮片粉末色度值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Chromaticity values of PMR slices and powder with different steaming-drying times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*	ΔE_{ab}^*	样品	L^*	a^*	b^*	E_{ab}^*	ΔE_{ab}^*
HSW	64.07±0.18	7.53±0.05	18.67±0.16	67.16±0.22	—	ZH-5	47.57±0.07**	5.26±0.03**	6.72±0.08**	48.33±0.08**	18.83±0.08
ZH-1	54.80±0.07**	6.60±0.11**	11.92±0.04**	56.47±0.06**	10.69±0.06	ZH-6	48.94±0.06**	5.66±0.15**	8.03±0.07**	49.92±0.07**	17.24±0.07
ZH-2	52.27±0.28**	6.41±0.07**	10.50±0.16**	53.70±0.29**	13.46±0.29	ZH-7	48.51±0.21**	5.43±0.04**	7.56±0.06**	49.39±0.19**	17.76±0.19
ZH-3	53.12±0.09**	6.31±0.11**	11.09±0.06**	54.63±0.08**	12.53±0.08	ZH-8	44.13±0.05**	4.39±0.18**	6.48±0.08**	44.82±0.04**	22.34±0.04
ZH-4	53.42±0.08**	6.91±0.08**	11.61±0.04**	55.10±0.08**	12.06±0.08	ZH-9	42.60±0.13**	4.36±0.08**	4.47±0.05**	43.06±0.13**	24.10±0.13

与 HSW 组比较: ** $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs HSW group.

蒸五制呈现显著突增。说明随着蒸制次数的增加,炮制品与生品之间的色泽差异越来越大,直至达到相对稳定的色度值。

2.3 指纹图谱测定与分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为安捷伦 Poroshell 120 EC-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 4 μm);流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱: 0~5 min, 8%乙腈; 5~10 min, 8%~15%乙腈; 10~27 min, 15%~24%乙腈; 27~35 min, 24%~36%乙腈; 35~55 min, 36%~90%乙腈;柱温为(30±1)℃;检测波长为 254 nm;体积流量为 1 mL/min;进样体积 10 μL。

2.3.2 质谱条件 离子源为加热电喷雾离子化源(HESI),载气为氮气,毛细管温度为 320℃,辅助器加热温度为 375℃,鞘气压力 3.5 MPa,鞘气体积流量为 8 L/min,喷雾电压为+3.8 kV 和-3.5 kV,碰撞能量为 30 eV,质谱扫描范围为 m/z 100~1 500, Full Mass 分辨率为 70 000,数据依赖型二级质谱扫描模式 217 500。

2.3.3 对照品溶液的制备 取对照品没食子酸、5-HMF、二苯乙烯苷、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷适量,精密称定,加 70%乙醇制成分别含上述对照品 0.033、0.116、0.014、0.017、0.022、0.017、0.012 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.4 供试品溶液的制备 取何首乌各样品粉末(过四号筛)(500.0 g±0.5) mg,精密称定,加 70%乙醇 25 mL,超声处理 45 min(功率 300 W、频率 40 kHz),取出,放冷,用 70%乙醇补失减失的质量,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

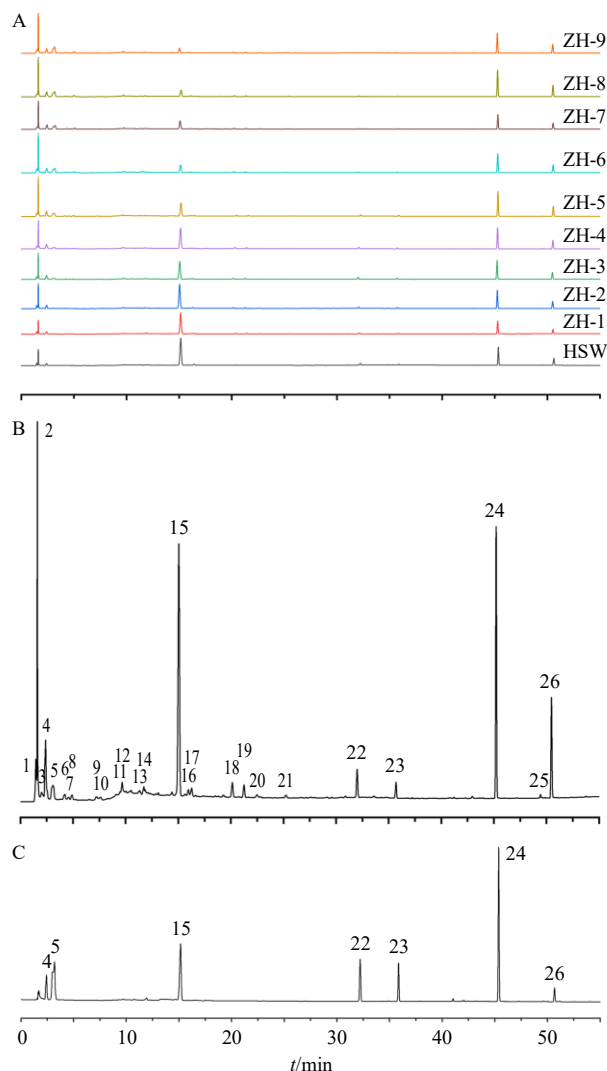
2.3.5 精密度试验 取 ZH-1 供试品溶液 10 μL,连续进样测定 6 次,按照“2.3.1”项下色谱条件进样检测,结果各共有峰相对峰面积及相对保留时间的 RSD 均<2.00%,表明该仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取 ZH-1 供试品溶液 10 μL,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h,按照“2.3.1”项下色谱条件进样检测,结果各共有峰相对峰面积及相对保留时间的 RSD 均<2.00%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 取 ZH-1 样品,按照“2.3.4”项下制备的供试品溶液 6 份,按照“2.3.1”项下色谱条件进样检测,结果各共有峰相对峰面积及相对保留时间的 RSD 均<2.00%,表明该方法重复性良好。

2.3.8 指纹图谱特征峰的归属指认与比较 取

“2.1.2”项下制备的各样品,按照“2.3.4”项下方法供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图见图 2-A。共确定 26 个特征峰,详见图 2-B(对照指纹图谱)。与混合对照品溶液色谱图(图 2-C)进行比对,共指认 7 个成分,即峰 4 为没食子酸,峰 5 为 5-HMF、峰 15 为二苯乙烯苷,峰 22 为大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷,峰 23 为大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷,峰 24 为大黄素,峰 26 为大黄素甲醚。采用 Thermo Scientific Xcalibur (4.1.50) 软件,



4-没食子酸; 5-5-HMF; 15-二苯乙烯苷; 22-大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷; 23-大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷; 24-大黄素; 26-大黄素甲醚。

4-gallic acid; 5-5-HMF; 15-stilbenes glycosides; 22-emodin-8-*O*-β-*D*-glucoside; 23-phycion-8-*O*-β-*D*-glucoside; 24-emodin; 26-phycion.

图2 不同蒸制次数何首乌 HPLC 指纹图谱 (A)、对照指纹图谱 (B) 和混合对照品的 HPLC 图 (C)

Fig. 2 HPLC fingerprints of PMR with different steaming-drying times (A), reference fingerprint (B), and HPLC chromatogram of mixed reference standards (C)

分析何首乌指纹图谱的质谱信息, 结果见表 2, 对其中 24 个特征峰进行了成分指认。采用归一化法计算特征峰相对峰面积, 26 个特征峰相对峰面积随蒸制次数延长的变化趋势进行对比分析, 结果如表

3 所示, 随着蒸制次数增加, P1、P4、P5、P8、P9、P12、P19、P2 先逐渐增加后逐渐稳定, P17、P15、P22、P23 先逐渐降低后逐渐稳定, P21、P7、P6 等未呈现显著变化趋势。

表 2 何首乌指纹图谱特征峰在 ESI⁻模式下的鉴定信息

Table 2 Identification information of characteristic peaks in fingerprint chromatogram of PMR under ESI⁻ mode

峰号	tr/ min	m/z		误差 (×10 ⁻⁶)	分子式	碎片离子	化合物
		实际	理论				
P1	1.47	179.054 9	179.055 0	0.56	C ₆ H ₁₂ O ₆	119.053 0, 113.023 2, 89.02 30	葡萄糖 ^[16]
P2	1.62	341.108 1	341.107 8	0.65	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	113.023 1, 119.033 5	蔗糖 ^[16]
P3	2.02	191.018 8	191.018 6	0.42	C ₆ H ₈ O ₇	173.0092	柠檬酸 ^[17]
P4	2.41	169.013 2	169.013 2	0.00	C ₇ H ₆ O ₅	125.023 1	没食子酸 ^[16]
P5	3.12				C ₆ H ₆ O ₃		5-HMF [*]
P6	4.21	577.133 7	577.133 0	0.39	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	457.087 5, 425.087 0, 289.089 3	procyanidin B ^[18]
P7	4.56	567.170 8	567.170 8	0.00	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	405.118 0, 243.064 8, 215.238 3	tetrahydroxystilbene- <i>O</i> -di-hexoside或异构体 ^[17]
P8	4.94	577.133 7	577.133 0	0.39	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	457.088 0, 425.087 3, 289.089 3	procyanidin B ^[18]
P9	7.18	289.071 4	289.070 8	2.37	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	245.081 0, 221.081 2, 203.070 6, 125.023 2	儿茶素 ^[19]
P10	7.78	289.071 4	289.070 8	2.37	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	245.080 7, 203.010 7, 161.057 5, 125.023 1	表儿茶素 ^[19]
P11	9.48	549.160 8	549.160 3	0.92	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	387.108 7, 255.067 0, 227.077 0, 209.061 5	liquiritigenin-hexose-Xyl/Ara或异构体 ^[20]
P12	9.73	549.160 8	549.160 3	0.92	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	387.108 8, 255.068 2, 227.077 0, 209.061 5	liquiritigenin-hexose-Xyl/Ara或异构体 ^[20]
P13	11.36	567.170 6	567.170 8	-0.43	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	405.118 2, 243.065 8, 215.238 3	tetrahydroxystilbene- <i>O</i> -di-hexoside或异构体 ^[17]
P14	11.90	461.108 5	461.107 8	1.48	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	331.073 2, 168.017 1, 131.056 9	cinnamyl-galloyl-hexose ^[20-21]
P15	15.15	405.118 3	405.118 0	0.69	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	243.065 5	二苯乙烯苷 ^[18]
P16	15.86	405.118 1	405.118 0	0.30	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	243.065 6	二苯乙烯苷异构体 ^[18]
P17	16.39	557.129 2	557.129 0	0.44	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	393.063 9, 313.055 0, 255.054 0, 243.065 0	tetrahydroxystilbene-(galloyl)- <i>O</i> -glucoside或异构体 ^[20]
P18	20.36	473.108 1	473.107 8	0.53	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁	269.045 5, 225.058 9	2-acetylmordin- <i>O</i> -glucopyranoside ^[22]
P19	21.49	555.113 4	555.113 3	0.15	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₃	393.062 7, 274.010 6	polygonumside A或异构体 ^[22]
P20	22.53	555.113 5	555.113 3	0.38	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₃	393.063 6, 274.010 6	polygonumside A或异构体 ^[22]
P21	25.27	557.128 9	557.129 0	-0.10	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	393.064 0, 313.057 0, 255.054 0, 243.064 6	tetrahydroxystilbene-(galloyl)- <i>O</i> -glucoside或异构体 ^[20]
P22	32.21	431.097 5	431.097 3	0.53	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	269.046 2, 241.050 7, 225.054 0, 197.061 2	大黄素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷 [*]
P23	35.88	445.113 2	445.112 9	0.53	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	283.062 0, 255.067 8, 240.045 0	大黄素甲醚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷 [*]
P24	45.56	269.045 0	269.044 4	0.56	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	225.055 8, 241.0487, 197.059 7	大黄素 [*]
P25	49.47	509.287 6	509.295 6	-15.84	C ₂₄ H ₄₅ O ₁₁		未知
P26	50.61	283.060 8	283.060 1	2.33	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	240.041 7, 269.044 9	大黄素甲醚 [*]

*系采用对照品进行指认确定。

*Identification was performed using reference standards.

2.4 多糖含量测定

2.4.1 对照品溶液制备 精密称取无水 *D*-葡萄糖对照品适量, 加水配制成质量浓度 0.1 mg/mL 的无水 *D*-葡萄糖对照品溶液。

2.4.2 供试品溶液制备 取各样品粉末 (1.000 ± 0.001) g (过四号筛), 精密称定, 加水 25 mL, 超声处理 50 min (功率 300 W、频率 40 kHz), 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液浓缩至近干, 用水稀释至 10 mL, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 摇匀, 4 ℃

冷藏过夜, 离心, 弃去上清液, 沉淀物挥干溶剂后, 用 10 mL 热水溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 定容, 即得何首乌粗多糖溶液。

2.4.3 线性关系考察 精密吸取 *D*-葡萄糖对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 加蒸馏水, 补足至 1 mL, 加入 5% 苯酚溶液 1.0 mL, 混匀, 再加浓硫酸溶液 5 mL, 静置 40 min, 在波长 490 nm 处测定吸光度 (*A*) 值, 空白对照为蒸馏水。以 *D*-葡萄糖对照品溶液质量浓度为横坐标 (*X*), *A* 值为纵坐

表 3 何首乌“九蒸九晒”过程的特征峰的变化趋势

Table 3 Variation trends of characteristic peaks during “nine-steaming and nine-drying” process of PMR																					
峰号	相对峰面积/%										峰号	相对峰面积/%									
	HSW	ZH-1	ZH-2	ZH-3	ZH-4	ZH-5	ZH-6	ZH-7	ZH-8	ZH-9		HSW	ZH-1	ZH-2	ZH-3	ZH-4	ZH-5	ZH-6	ZH-7	ZH-8	ZH-9
P1	2.24	2.96	3.37	3.00	3.29	3.59	5.32	3.91	3.74	4.84	P14	0.74	1.81	0.22	0.71	0.65	0.64	0.70	0.77	0.98	1.01
P2	8.60	10.17	13.33	12.05	14.53	15.94	20.77	18.60	18.42	21.23	P15	48.23	46.36	37.15	36.97	30.42	24.30	12.55	16.50	10.13	7.63
P3	0.49	0.84	0.94	0.46	0.69	0.80	0.35	0.40	0.32	0.60	P16	0.45	0.45	0.57	0.67	0.83	0.86	0.00	0.86	0.56	0.91
P4	2.83	4.65	5.11	4.57	6.28	6.36	6.18	7.42	6.27	6.26	P17	2.16	1.86	1.55	1.51	0.86	0.41	0.83	0.00	0.00	0.00
P5	0.00	0.00	0.96	1.66	3.18	5.20	11.77	11.79	11.83	15.42	P18	0.54	1.71	1.37	1.06	0.92	0.90	1.67	1.59	1.43	1.46
P6	0.00	0.56	0.53	0.38	0.70	0.80	1.29	1.35	1.25	1.14	P19	0.32	0.53	1.07	0.15	0.71	1.22	1.22	1.16	1.04	1.04
P7	0.00	0.00	0.20	0.20	0.21	0.31	0.58	0.61	0.50	0.61	P20	0.00	0.25	0.46	0.21	0.19	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00
P8	0.00	0.00	0.19	0.40	0.91	1.15	2.05	2.56	2.54	2.46	P21	0.00	0.00	0.00	0.20	0.35	0.42	0.65	0.62	0.69	0.64
P9	0.00	0.00	0.00	0.21	0.20	0.27	0.59	0.27	0.26	0.57	P22	2.27	1.80	1.84	2.66	1.85	1.69	0.76	0.61	0.69	0.33
P10	0.49	0.26	0.42	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	P23	1.13	1.01	1.13	1.35	1.12	1.14	0.71	0.56	0.73	0.43
P11	0.12	0.00	0.10	0.12	0.17	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	P24	19.13	17.16	19.33	20.21	19.89	20.93	20.41	19.10	24.63	21.10
P12	0.41	0.62	0.66	0.84	1.25	1.33	1.86	1.96	1.70	1.82	P25	0.29	0.18	0.24	0.28	0.31	0.31	0.00	0.20	0.10	0.12
P13	0.46	0.27	0.47	0.43	0.50	0.54	0.23	0.25	0.38	0.00	P26	8.47	6.55	8.80	9.06	8.83	9.64	9.50	8.90	11.63	10.37

标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.999\ 5\ X-0.002\ 3$, $R^2=0.999\ 7$, 结果表明 D-葡萄糖在 0.02~0.10 mg/mL 线性关系良好。

2.4.4 样品测定 取不同蒸制次数的何首乌粗多糖溶液, 精密吸取 1 mL, 加入 6%苯酚溶液 1.0 mL, 再加浓硫酸 5 mL, 静置 30 min, 在波长 490 nm 处测定 A 值, 代入标准曲线计算出不同蒸制次数何首乌样品中的多糖含量。结果见表 4, 随着蒸制次数的增加, 多糖含量逐渐增加。且与何首乌生品比较, 蒸制后多糖含量显著增加 ($P<0.01$)。

2.5 醇溶性浸出物测定

参考《中国药典》2025 年版四部通则 2201 浸出物测定法项下的热浸法测定不同蒸制次数何首乌中醇溶性浸出物^[5], 结果见表 4。随着蒸制次数增

加, 醇溶性浸出物含量先增加后降低, 以第 2 次蒸制后醇溶性浸出物含量最高, 第 7 次蒸制后最低。且与何首乌生品比较, 蒸制 2、3、4 次后醇溶性浸出物含量显著增加 ($P<0.01$)。

2.6 抗氧化活性测定

2.6.1 DPPH 法测定^[23]

(1) 供试品溶液的制备: 分别取各样品粉末 (50.00 ± 0.05) mg, 精密称定, 加氮自由基提取液 0.8 mL, 40 °C 水浴浸提 30 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 (以生药计, 质量浓度为 62.5 mg/mL) 备用检测。

(2) DPPH 自由基清除率的测定: 取供试品溶液, 按照上海源叶生物科技有限公司的 DPPH 法自由基清除率试剂盒说明书测定 A 值, 按公式计算 DPPH 自由基清除率, 每组重复 3 次, 计算 DPPH 自由基的清除能力。结果见表 5, 何首乌蒸制后 DPPH 自由基清除率逐渐增强, 二蒸二制后逐渐趋于稳定, 其中与何首乌生品比较, 二蒸二制至九蒸九制何首乌 DPPH 自由基清除率显著增强 ($P<0.05$)。

$$\text{清除率} = 1 - (A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}) / A_{\text{空白}} \quad (1)$$

$A_{\text{空白}}$ 为空白管的 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为样本对照管的 A 值, $A_{\text{测定}}$ 为供试液的 A 值

2.6.2 ABTS 法测定^[23]

(1) 供试品溶液的制备: 分别取各样品粉末 (50.00 ± 0.05) mg, 精密称定, 加 80%甲醇 1 mL, 超声 (功率 300 W、频率 40 kHz) 处理 30 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 (以生药计, 质

表 4 “九蒸九晒”何首乌多糖及醇溶性浸出物含量变化趋势 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Variation trends of polysaccharides and alcohol-soluble extracts in PMR during “nine-steaming and nine-drying” processing ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	多糖/(mg·g ⁻¹)	醇溶性浸出物/%	样品	多糖/(mg·g ⁻¹)	醇溶性浸出物/%
HSW	44.71±0.09	11.40±0.20	ZH-5	108.00±2.50**	10.90±0.14
ZH-1	62.84±1.46**	13.53±1.70	ZH-6	156.37±0.17**	11.17±0.42
ZH-2	70.14±0.47**	13.86±0.29**	ZH-7	154.81±0.25**	10.60±0.73
ZH-3	73.82±0.14**	13.60±0.12**	ZH-8	174.14±0.62**	10.97±0.25
ZH-4	79.32±4.42**	13.54±0.16**	ZH-9	149.72±0.23**	11.58±0.58

与 HSW 组比较: ** $P<0.01$ 。
** $P<0.01$ vs HSW group.

表 5 不同蒸制次数何首乌抗氧化活性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Antioxidant activity of PMR at different steaming-drying times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	自由基清除率/%		FRAP法总抗氧化能力/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)
	DPPH	ABTS	
HSW	75.27 \pm 2.94	76.80 \pm 0.35	157.07 \pm 0.09
ZH-1	82.42 \pm 2.06	77.08 \pm 0.18	159.89 \pm 0.14**
ZH-2	87.42 \pm 0.49*	77.29 \pm 0.26	167.82 \pm 0.10**
ZH-3	90.12 \pm 0.53*	78.08 \pm 0.23**	177.23 \pm 0.24**
ZH-4	87.38 \pm 0.10*	81.21 \pm 0.22**	176.42 \pm 0.06**
ZH-5	86.72 \pm 0.08*	82.32 \pm 0.22**	172.31 \pm 0.67**
ZH-6	90.97 \pm 0.04*	79.42 \pm 0.22**	172.11 \pm 0.73**
ZH-7	87.46 \pm 0.50*	79.77 \pm 0.26**	174.26 \pm 0.24**
ZH-8	88.48 \pm 0.59*	80.62 \pm 0.26**	171.86 \pm 0.32**
ZH-9	89.38 \pm 0.66*	81.79 \pm 0.38**	177.70 \pm 0.05**

与 HSW 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs HSW group.

量浓度为 50.0 mg/mL) 备用检测。

(2) ABTS⁺工作液的制备: 将 ABTS 溶液和过硫酸钾溶液 1:1 混合, 配制成 ABTS⁺储备液, 4℃ 避光保存过夜, 用乙醇稀释即得 ABTS⁺工作液。

(3) ABTS⁺自由基清除能力测定: 取供试品溶液, 按照上海源叶生物科技有限公司的 ABTS 法抗氧化能力测定试剂盒说明书进行测定 A 值, 按照式 (1) 计算 ABTS 自由基清除率, 每组重复 3 次。结果见表 5, 何首乌蒸制后 ABTS⁺自由基清除能力逐渐增强且稍有波动, 五蒸五制时 ABTS 自由基清除率达到顶峰, 其中与生品比较, 三蒸三制至九蒸九制 ABTS⁺自由基清除率显著增强 ($P<0.01$)。

2.6.3 FRAP 法测定^[23]

(1) 供试品溶液的制备: 分别取各样品粉末 0.1 g, 精密称定, 加入 80%乙醇 1 mL, 超声处理 30 min (功率 300 W、频率 40 kHz), 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 (以生药计, 质量浓度为 100.0 mg/mL) 备用检测。

(2) 标准曲线的绘制: 精密称取 2 mg 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸 (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 商品名为 Trolox) 标准品, 纯化水溶解定容至 2 mL, 得 4 nmol/ μL 的母液, 将上述母液分别稀释至 0.16、0.32、0.48、0.64、0.80 nmol/ μL 浓度的标准工作液。于波长 590 nm 处测定 A 值, 以标准品 Trolox 物质的量 (nmol) 为横坐标, ΔA ($\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得其回归方程

为 $Y = 1.0465X - 0.019$, $R^2 = 0.997$ 。结果表明, Trolox 在 0.16~0.80 nmol/ μL 与 A 呈现良好的线性关系。

(3) FRAP 法总抗氧化能力测定: 取供试品溶液, 按照上海源叶生物科技有限公司的 FRAP 法抗氧化能力测定试剂盒说明书测定 A 值, 按照式 (2) 计算总抗氧化能力, 每组重复 3 次。结果见表 5, 与何首乌生品比较, FRAP 总抗氧化活性蒸制后显著增强 ($P<0.01$), 三蒸三制后逐渐趋于稳定。

$$\text{总抗氧化能力} = (\Delta A + 0.019) / 1.0465 \times 10^{-3} / (0.15 / V \times W) \times D \quad (2)$$

V 为加入提取液体积, W 为样品质量, D 为稀释倍数, 0.019、1.0465 为回归方程对应系数, 0.15 为反应中样品体积 (mL)

2.7 表里关联与谱效相关分析

2.7.1 相关性分析 为了进一步解析何首乌九蒸九制炮制过程中颜色、化学成分和抗氧化活性之间的内在联系, 利用 Origin 2025 软件对不同蒸制次数下何首乌样品化学成分分别与色度参数 (L^* 、 a^* 、 b^* 、 E^*_{ab}) 和抗氧化能力进行 Person 相关性分析。结果如图 3 所示, 多糖、峰 P2 (蔗糖)、峰 P4 (没食子酸)、峰 P5 (5-HMF)、峰 P6 (原花青素 B)、峰 P7 (tetrahydroxystilbene- O -di-hexoside)、峰 P8 (原花青素 B)、峰 P12 (liquiritigenin-hexose-Xyl)、峰 P21 [tetrahydroxystilbene- O -(galloyl)-glucopyranoside] 与色度参数间存在显著负相关 ($P<0.05$); 峰 P15 (二苯乙烯苷)、峰 P17 [tetrahydroxystilbene-(galloyl)- O -glucoside] 则与色度参数均呈显著正相关 ($P<0.05$)。如图 3 所示, 多糖、峰 P2 (蔗糖)、峰 P4 (没食子酸)、峰 P7 (tetrahydroxystilbene- O -di-hexoside)、峰 P9 (儿茶素)、峰 P12 (liquiritigenin-hexose-Xyl)、峰 P21 [tetrahydroxystilbene- O -(galloyl)-glucopyranoside] 与 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率和 FRAP 总抗氧化能力存在显著正相关 ($P<0.05$); 峰 P10 (表儿茶素)、峰 P15 (二苯乙烯苷) 则与 DPPH 自由基清除率、ABTS⁺自由基清除率和 FRAP 总抗氧化能力均呈显著负相关 ($P<0.05$)。

2.7.2 回归分析 通过 SPSS 26.0 软件, 结合表里相关分析结果, 以多糖含量、峰 P2、P5、P6、P7、P8、P12、P15、P17、P21 的相对峰面积为因变量, 以色度值 L^* 、 a^* 、 b^* 值为自变量进行线性回归分析, 研究各成分与 L^* 、 a^* 、 b^* 值间的定量关系^[24-25]。结果见表 6~8。数据满足回归分析的模型假设检验正

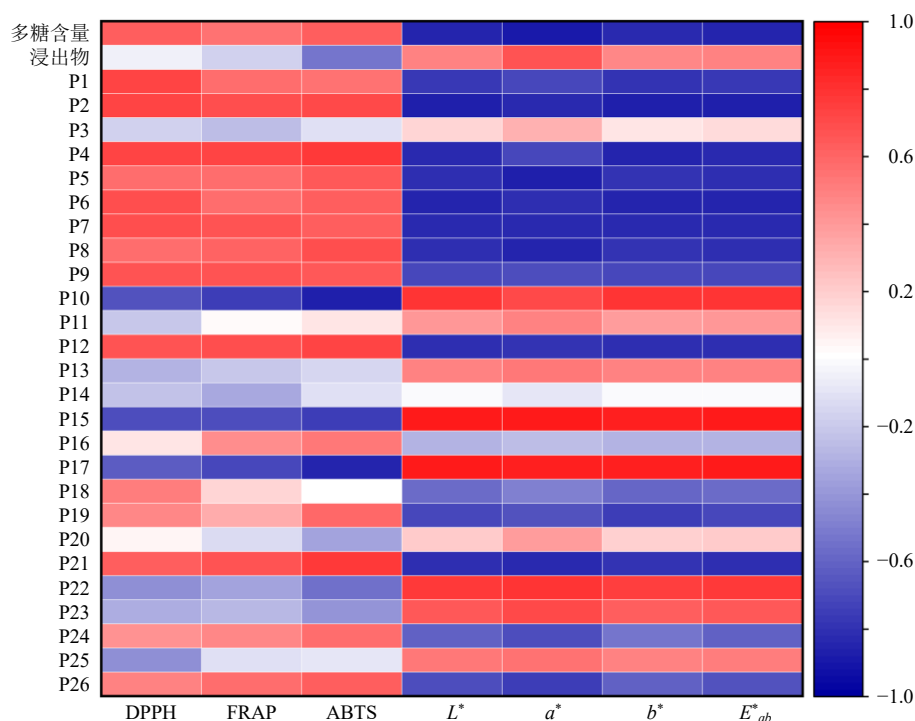


图 3 不同蒸制次数何首乌表里相关与谱效相关分析

Fig. 3 Correlation analysis between exterior-interior and spectrum-efficacy of PMR at different steaming-drying times

表 6 不同蒸制次数何首乌的表里线性回归模型汇总

Table 6 Summary of exterior-interior linear regression models for PMR at different steaming-drying times

成分	<i>R</i>	<i>R</i> ²	调整后 <i>R</i> ²	标准估算误差
多糖	0.884	0.782	0.673	2.70
P2	0.878	0.770	0.655	2.56
P4	0.881	0.776	0.665	0.76
P5	0.875	0.766	0.648	1.12
P6	0.837	0.701	0.552	2.76
P7	0.858	0.736	0.604	0.28
P8	0.851	0.724	0.586	0.69
P12	0.824	0.679	0.519	0.40
P15	0.904	0.817	0.725	7.86
P17	0.896	0.803	0.704	0.44
P21	0.829	0.688	0.531	0.19

态性、方差齐性要求。

通过表 6 可知, 多糖含量、峰 P2、P4、P5、P6、P7、P8、P12、P15、P17、P21 的相对峰面积与色度值的 *R*² 分别为 0.782、0.770、0.776、0.766、0.701、0.736、0.724、0.679、0.817、0.803、0.688, 表明这 11 种成分含量或相对峰面积分别在 78.2%、77.0%、77.6%、76.6%、70.1%、73.6%、72.4%、67.9%、81.7%、80.3%、68.8% 的程度上可以通过色度值来反映。

由表 7 可知, 3 个色泽指标值与多糖含量、P2、P4、P5、P6、P7、P8、P15、P17 相对峰面积及多糖

的含量构成的回归方差呈显著性。由表 8 可得回归方程 $Y_{\text{多糖含量}} = 410.997 - 2.371 L^* - 34.916 a^* + 2.338 b^*$, $Y_{P2 \text{ 相对峰面积}} = 37.639 - 0.316 L^* - 0.446 a^* - 0.365 b^*$, $Y_{P4 \text{ 相对峰面积}} = 8.239 - 0.088 L^* + 0.911 a^* - 0.365 b^*$, $Y_{P5 \text{ 相对峰面积}} = 22.345 - 0.314 L^* - 1.633 a^* + 0.514 b^*$, $Y_{P6 \text{ 相对峰面积}} = 15.993 + 0.206 L^* - 3.151 a^* - 0.360 b^*$, $Y_{P7 \text{ 相对峰面积}} = 2.545 - 0.019 L^* - 0.036 a^* - 0.058 b^*$, $Y_{P8 \text{ 相对峰面积}} = 8.934 - 0.082 L^* - 0.754 a^* + 0.094 b^*$, $Y_{P15 \text{ 相对峰面积}} = -106.564 + 2.280 L^* + 5.458 a^* - 1.516 b^*$, $Y_{P17 \text{ 相对峰面积}} = -4.727 + 0.084 L^* + 0.252 a^* - 0.009 b^*$ 。因此, 可通过色度值初步评价九蒸九制何首乌的内在品质。

采用 SIMCA-P14 软件进行偏最小二乘法回归 (partial least squares regression, PLSR) 分析^[25-26], 结合谱效相关分析结果, 以多糖含量以及特征相关峰 (峰 P2、P4、P7、P9、P12、P21) 的相对峰面积为自变量 (*X*), 抗氧化指标作为因变量 (*Y*)。对于回归模型的预测, 通常用拟合指数 (*R*²) 与模型的预测指数 (*Q*²) 来判断模型拟合的优劣程度。对因变量 DPPH、FRAP、ABTS 的拟合指数 (*R*²_Y) 值为 0.72、0.65、0.76, 表明模型对因变量的拟合能力良好; 模型的预测指数 *Q*² 表示模型的预测能力, 该值越大, 模型的预测能力越强。*Q*² 值分别为 0.91、0.85、0.84, 接近 1, 表明模型的预测能力良好。其最小二

表 7 不同蒸制次数何首乌样品的表里线性回归模型方差分析

Table 7 Variance analysis of exterior-interior linear regression models for PMR at different steaming-drying times

成分	模型	平方和	自由度	均方	F值	P值	成分	模型	平方和	自由度	均方	F值	P值
多糖	回归	15 725.440	3	5 241.815	7.171	0.02	P8	回归	7.654	3	2.551	5.241	0.04
	残差	4 385.933	6	730.989				残差	2.921	6	0.487		
	总计	20 111.380	9					总计	10.575	9			
P2	回归	132.715	3	44.238	6.702	0.02	P15	回归	1 654.713	3	551.571	8.919	0.01
	残差	39.607	6	6.601				残差	371.060	6	61.843		
	总计	172.322	9					总计	2 025.773	9			
P4	回归	11.996	3	3.999	6.947	0.02	P12	回归	2.057	3	0.686	4.237	0.06
	残差	3.453	6	0.576				残差	0.971	6	0.162		
	总计	15.449	9					总计	3.028	9			
P5	回归	24.641	3	8.214	6.530	0.03	P17	回归	4.797	3	1.599	8.130	0.02
	残差	7.547	6	1.258				残差	1.180	6	0.197		
	总计	32.188	9					总计	5.977	9			
P6	回归	107.747	3	35.916	4.692	0.05	P21	回归	0.521	3	0.174	4.403	0.06
	残差	45.932	6	7.655				残差	0.236	6	0.039		
	总计	153.679	9					总计	0.757	9			
P7	回归	1.338	3	0.446	5.583	0.04							
	残差	0.479	6	0.080									
	总计	1.818	9										

表 8 不同蒸制次数何首乌的表里线性回归分析

Table 8 Exterior-interior linear regression analysis of PMR at different steaming-drying times

成分	模型	非标准化系数	标准误差	标准化系数	t值	P值	成分	模型	非标准化系数	标准误差	标准化系数	t值	P值
多糖	常量	410.997	424.358		0.969	0.370	P8	常量	8.934	10.952		0.816	0.446
	L^*	-2.371	13.224	-0.307	-0.179	0.864		L^*	-0.082	0.341	-0.463	-0.240	0.818
	a^*	-34.916	29.477	-0.776	-1.185	0.281		a^*	-0.754	0.761	-0.731	-0.992	0.360
	b^*	2.338	16.623	0.199	0.141	0.893		b^*	0.094	0.429	0.347	0.218	0.834
P2	常量	37.639	40.326		0.933	0.387	P12	常量	2.999	6.314		0.475	0.652
	L^*	-0.316	1.257	-0.442	-0.252	0.810		L^*	-0.003	0.197	-0.030	-0.015	0.989
	a^*	-0.446	2.801	-0.107	-0.159	0.879		a^*	-0.143	0.439	-0.259	-0.326	0.756
	b^*	-0.365	1.580	-0.335	-0.231	0.825		b^*	-0.079	0.247	-0.548	-0.320	0.760
P4	常量	8.239	11.908		0.692	0.515	P15	常量	-106.564	123.431		-0.863	0.421
	L^*	-0.088	0.371	-0.409	-0.236	0.821		L^*	2.280	3.846	0.930	0.593	0.575
	a^*	0.911	0.827	0.731	1.101	0.313		a^*	5.458	8.574	0.382	0.637	0.548
	b^*	-0.365	0.466	-1.121	-0.783	0.463		b^*	-1.516	4.835	-0.406	-0.313	0.765
P5	常量	22.345	17.603		1.269	0.251	P17	常量	-4.727	6.961		-0.679	0.522
	L^*	-0.314	0.549	-1.017	-0.573	0.588		L^*	0.084	0.217	0.627	0.385	0.713
	a^*	-1.633	1.223	-0.907	-1.335	0.230		a^*	0.252	0.484	0.324	0.520	0.621
	b^*	0.514	0.690	1.093	0.745	0.484		b^*	-0.009	0.273	-0.046	-0.035	0.974
P6	常量	15.993	43.427		0.368	0.725	P21	常量	2.430	3.116		0.780	0.465
	L^*	0.206	1.353	0.306	0.152	0.884		L^*	-0.028	0.097	-0.597	-0.291	0.781
	a^*	-3.151	3.017	-0.801	-1.044	0.337		a^*	-0.139	0.216	-0.504	-0.643	0.544
	b^*	-0.360	1.701	-0.350	-0.212	0.839		b^*	0.019	0.122	0.268	0.159	0.879
P7	常量	2.545	4.437		0.574	0.587							
	L^*	-0.019	0.138	-0.259	-0.137	0.895							
	a^*	-0.036	0.308	-0.084	-0.117	0.911							
	b^*	-0.058	0.174	-0.522	-0.335	0.749							

乘回归方程分别为 $Y_{DPPH} = -0.419 X_{\text{多糖含量}} + 0.463 X_{P9\text{相对峰面积}} - 0.143 X_{P12\text{相对峰面积}} - 0.179 X_{P15\text{相对峰面积}} - 0.253 X_{P10\text{相对峰面积}} - 0.077 X_{P21\text{相对峰面积}} + 0.125 X_{P7\text{相对峰面积}} + 0.241 X_{P4\text{相对峰面积}} + 0.197 X_{P2\text{相对峰面积}}$; $FRAP = -0.796 X_{\text{多糖含量}} + 0.689 X_{P9\text{相对峰面积}} - 0.325 X_{P12\text{相对峰面积}} - 0.207 X_{P15\text{相对峰面积}} - 0.369 X_{P10\text{相对峰面积}} - 0.211 X_{P21\text{相对峰面积}} + 0.107 X_{P7\text{相对峰面积}} + 0.337 X_{P4\text{相对峰面积}} + 0.233 X_{P2\text{相对峰面积}}$; $ABTS = -0.200 X_{\text{多糖含量}} + 0.111 X_{P9\text{相对峰面积}} + 0.047 X_{P12\text{相对峰面积}} - 0.067 X_{P15\text{相对峰面积}} - 0.522 X_{P10\text{相对峰面积}} + 0.095 X_{P21\text{相对峰面积}} - 0.122 X_{P7\text{相对峰面积}} + 0.333 X_{P4\text{相对峰面积}} + 0.022 X_{P2\text{相对峰面积}}$ 。因此, 可通过成分初步评价“九蒸九晒”何首乌的抗氧化活性。

2.8 炮制终点判断

2.8.1 何首乌“九蒸九晒”监控标志物预测 本研究采用 Metabo Analyst6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 对色度值、特征峰相对峰面积、抗氧化活性进行层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和偏最小二乘法-判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA), 对何首乌炮制过程

饮片进行预测分类分析。

HCA 结果(图4)显示, 何首乌“九蒸九晒”过程样品被明显分为3类, 即 ZH-1~ZH-3、ZH-4和 ZH-5、ZH-6~ZH-9, 表明何首乌“九蒸九晒”样品的“颜色-成分-抗氧化活性”指标随着蒸制次数的延长呈阶段性变化, 可以通过“颜色-成分-抗氧化活性”综合评价将其划分为3个时期。

PCA 结果(图5)显示, 在无监督模式下, 何首乌“九蒸九晒”过程样品可被区分为3类, ZH1和 ZH2 一类为炮制初期; ZH3~ZH5 一类为炮制中期; ZH-6~ZH-9 一类为炮制末期。

运用有监督的模式识别法进行 PLS-DA, 在得分散点图(图6)中, 何首乌“九蒸九晒”过程样品大致可被区分为3大类, 炮制初期(ZH-1和 ZH-2)、炮制中期(ZH-3~ZH-5)、炮制末期(ZH-6~ZH-9), 其分类结果与 PCA 一致。因此, 根据 HCA、PCA、PLS-DA 3种分析结果, 综合“颜色-成分-抗氧化活性”多维度指标可区分“九蒸九晒”何首乌的不同炮制时期。

为了衡量每个指标对区分连续过程饮片的重

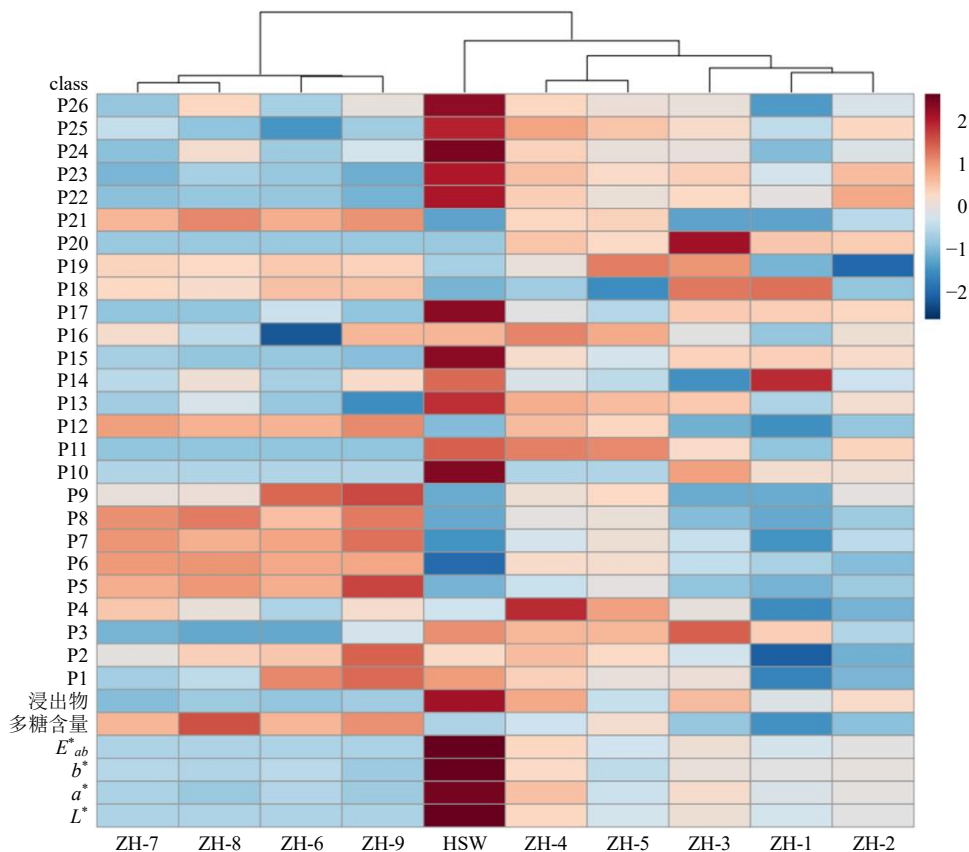


图4 基于“颜色-成分-抗氧化活性”的不同蒸制次数何首乌样品的 HCA 系统树图

Fig. 4 HCA dendrogram of multivariate analysis of PMR samples based on “color-component-antioxidant activity” relationships at different steaming-drying times

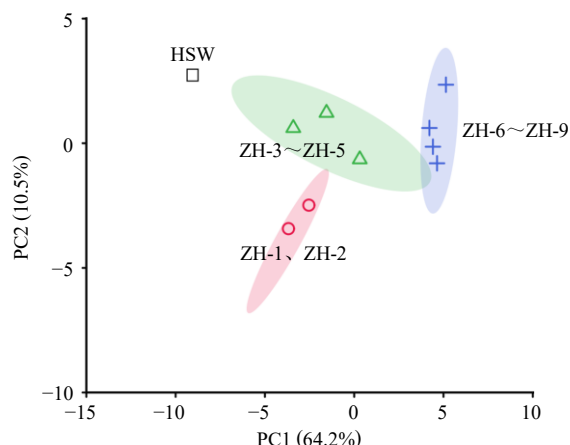


图 5 基于“颜色-成分-抗氧化活性”的不同蒸制次数何首乌样品的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot of multivariate analysis of PMR samples based on “color-component-antioxidant activity” relationships at different steaming-drying times

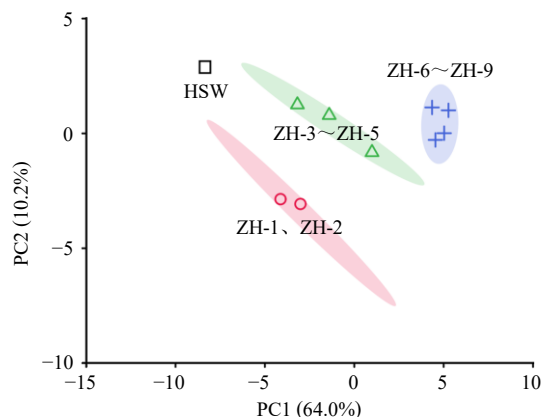


图 6 基于“颜色-成分-抗氧化活性”的不同蒸制次数何首乌样品的 PLS-DA 得分图

Fig. 6 PLS-DA score plots of multivariate analysis of PMR samples based on “color-component-antioxidant activity” relationships at different steaming-drying times

要性，结合变量重要性投影（variable importance projection, VIP）值对所有指标进行大小排列，结果发现 VIP 值 > 1 的指标，即为何首乌“九蒸九晒”的监控标志物，如图 7 所示，其分别为峰 P21 [tetrahydroxystilbene-*O*-(galloyl)-glucopyranoside]、峰 P8 (procyanidin B)、峰 P7 (tetrahydroxystilbene-*O*-di-hexoside)、峰 P5 (5-HMF)、峰 P12 (liquiritigenin-hexose-Xyl/Ara)、多糖、峰 P6 (procyanidin B)、峰 P3 (柠檬酸)、峰 P9 (儿茶素)、峰 P15 (二苯乙烯苷)、峰 P17 [tetrahydroxystilbene-(galloyl)-*O*-glucoside]、峰 P22 (大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷)、醇溶性浸出物、峰 P23 (大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷)、峰 P10 (表儿茶素)。

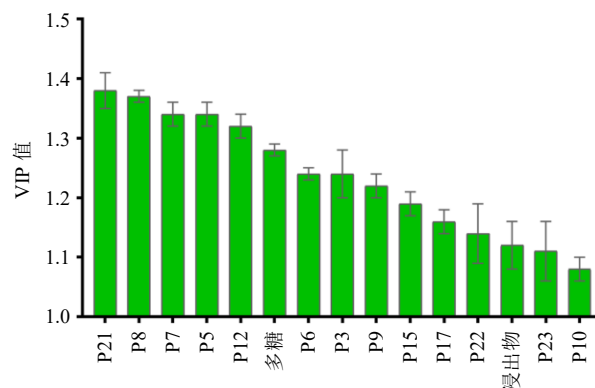


图 7 基于“颜色-成分-抗氧化活性”的不同蒸制次数何首乌样品的 PLS-DA 对应的 VIP 图

Fig. 7 PLS-DA corresponding VIP charts of multivariate analysis of PMR samples based on “color-component-antioxidant activity” relationships at different steaming-drying times

2.8.2 何首乌“九蒸九晒”炮制终点判断 结合 PLS-DA 所筛选的何首乌“九蒸九晒”监控标志物，以多糖含量、醇溶性浸出物以及峰 P21、P8、P7、P5、P12、P6、P3、P9、P15、P17、P22、P23、P20 的相对峰面积为指标，导入 SPSSAU 网站，选择熵权-TOPSIS 模型分析，对蒸制次数进行综合排序，其中， D^+ 代表每批样本中各评价指标与正理想解的距离， D^- 代表每批样本中各评价指标与负理想解的距离， C 代表每批样本与理想方案的相对贴近度。结果见表 9，所得何首乌最佳蒸制次数为七蒸七制。

表 9 不同蒸制次数何首乌熵权 TOPSIS 评价

Table 9 Entropy-weighted TOPSIS evaluation of PMR at different steaming-drying times

炮制品	D^+	D^-	C	排序
ZH-1	2.382	1.074	0.311	9
ZH-2	2.601	1.269	0.328	8
ZH-3	2.499	1.280	0.339	7
ZH-4	2.750	1.640	0.374	6
ZH-5	1.951	1.264	0.393	5
ZH-6	1.520	2.247	0.597	3
ZH-7	1.391	2.246	0.617	1
ZH-8	1.589	2.534	0.615	2
ZH-9	1.711	2.390	0.583	4

3 讨论

本研究通过颜色、成分、抗氧化活性变化探讨何首乌古法炮制过程动态变化规律。研究发现，随着蒸制次数的增加，何首乌饮片颜色逐渐加深，且逐渐向黑色演变，第 5 次蒸制后颜色逐渐趋于稳定。

另外,随着蒸制次数的增加,何首乌“九蒸九晒”过程中结合性蒽醌(二苯乙烯苷等)含量逐渐递减,游离性蒽醌以及 5-HMF、多糖含量逐渐递增,这一趋势与文献研究结果相一致^[11,13-14],且第 5、6 次蒸制后逐渐趋于稳定,此与颜色变化趋势基本一致。主要原因为何首乌炮制过程中化学成分发生水解、美拉德等化学反应有关。此外,随着蒸制次数的变化,何首乌抗氧化活性先增加后降低,可能主要与化学成分的变化密切相关,且相关及回归分析结果证实成分与颜色、成分与抗氧化活性均存在较好相关性。

本实验进行了流动相的比较,考察了甲醇-0.5%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液。结果发现以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱时,各成分峰形对称,所测色谱峰与相邻的杂质峰均能达到有效分离,并且基线平稳,故选用乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。在检测波长的选择中,对不同检测波长(254、280 nm)进行比较,结果发现在 280 nm 处均有较大吸收,故选择 280 nm 作为检测波长。在提取溶剂考察中,分别选择不同浓度乙醇和甲醇作为提取溶剂,发现 70%甲醇回流提取测得的指纹图谱特征峰较多且各成分含量较高。比较了回流提取和超声提取,发现两者无显著性差异。并对超声提取时间进行考察,分别选取超声时间 30、35、40、45、50、60 min,发现超声提取 45 min 最佳。

表观颜色作为中药炮制终点的重要判断指标,传统的判别方法以感官评价为主,但存在主观性强,且非经验丰富的老药工难以实现准确判断。而色度值测定可实现样品饮片或粉末颜色的量化,目前色度值测定被广泛应用于炮制品炮制终点测定中^[27-29]。本研究发现不同蒸制次数何首乌色度值存在显著区别,与肉眼观察到样品颜色的变化趋势一致,但比传统肉眼观察更加精细、客观、量化。越来越多研究表明炮制过程内在质量与表观颜色的呈现较好相关性^[30-31]。为将炮制工艺参数更加明确,将何首乌样品有效成分含量与色度相关联,探讨何首乌内在成分与表观颜色的关联性。Pearson 相关性分析发现,多糖含量与葡萄糖、5-HMF、原花青素 B、tetrahydroxystilbene-O-di-hexoside 的相对峰面积与 L^* 、 a^* 、 b^* 值的存在显著正相关,且回归分析表明,通过色度值可以初步评价上述主要成分的含量,从而判断其质量。后期在实际生产过程中,还需结合具体的炮制参数以及大量数据验证进而

确定“九蒸九晒”何首乌炮制终点的色度值范围,以期确定“九蒸九晒”何首乌颜色控制的数字化标准,逐步实现何首乌饮片炮制过程的智能化监控。

PLSR 分析相比较线性回归分析、相关分析和主成分分析,排除了自变量多重线性的干扰从而应用最广,可同时实现数据结构简化、相关分析及回归建模,具有较高的预测性,在谱效关系中运用广泛^[32-33]。本研究首先采用通过 Pearson 相关分析,发现多糖、葡萄糖、没食子酸、tetrahydroxystilbene-O-di-hexoside、儿茶素、liquiritigenin-hexose-Xyl、tetrahydroxystilbene-O-(galloyl)-glucopyranoside 与抗氧化指标存在显著正相关。同时结合 PLSR 分析的方法,成功建立了何首乌炮制指纹图谱与其抗氧化活性的谱效关系研究模型,从而实现通过特征峰相对峰面积或含量初步评价“九蒸九晒”何首乌抗氧化活性。结果显示多糖及 8 个峰代表的化学成分与“九蒸九晒”何首乌炮制品的抗氧化活性关联较大,具有抗氧化作用,文献研究也表明,其中多糖、没食子酸、儿茶素等均具有较好的抗氧化活性^[34-36],且多糖作为“九蒸九晒”何首乌的重要活性成分,具有重要的开发研究潜力,后期课题组将进一步分析探讨“九蒸九晒”何首乌多糖的化学结构与抗氧化活性的相关性。

本研究通过将化学计量学方法(HCA、PCA 和 PLS-DA)与熵权 TOPSIS 相结合,综合表观颜色、内在成分以及抗氧化活性等评价指标,构建何首乌“九蒸九晒”炮制终点判断体系。熵权 TOPSIS 法基于对试验数据的充分分析,减少了主观因素对试验结果的干扰,提升了多指标综合评价的科学性和合理性^[37],结果表明何首乌“九蒸九晒”炮制过程细分为炮制初期(一蒸一制至二蒸二制)、炮制中期(三蒸三制至五蒸五制)与炮制后期(六蒸六制至九蒸九制),且何首乌七蒸七制得分最高,为何首乌炮制的质量控制建立了科学的量化体系。因此,七蒸七制可能达到了何首乌炮制效果的最优状态。

在中药炮制研究中,随着色度表征技术发展,诸多学者已将表里关联作为中药炮制程度和质量控制的参考依据^[27-28,31],但基于多学科融合将性状评价、化学评价和生物评价相结合指导炮制工艺研究和质量控制的报道较少,本实验在综合色度、化学评价、生物活性评价确定何首乌古法炮制工艺,实现了“颜色-成分-抗氧化活性”相结合何首乌“九蒸九晒”质量评价新模式,使研究结果更有效

性和全面性,为后期中药炮制工艺研究和质量评价提供了新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王卓,钟凌云,解杨,等.基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(3):882-897.
- [2] 王一俊,王丽明,刘霁虹,等.基于CiteSpace的何首乌炮制历史沿革及现代研究进展分析[J].中草药,2024,55(17):6089-6106.
- [3] 苏颂.本草图经[M].尚志钧,辑校.合肥:安徽科学技术出版社,1994:108.
- [4] 张涛,张金莲,张青,等.何首乌炮制历史沿革及现代研究进展[J].中成药,2023,45(7):2308-2316.
- [5] 中国药典[S].一部.2025:190.
- [6] 廖海民,胡正海.何首乌的生物学及化学成分研究进展[J].中草药,2005,36(2):311-314.
- [7] 王丽.何首乌炮制后化学成分及药理作用分析[J].中国现代药物应用,2020,14(6):229-231.
- [8] 朱敏,姚毅.何首乌炮制前后及其主要成分体外抗氧化活性研究[J].中国医院药学杂志,2018,38(20):2119-2123.
- [9] 李学林,张帆,唐进法,等.何首乌炮制品有效成分与抗衰老功效的相关性研究[J].中国新药杂志,2018,27(9):1040-1046.
- [10] 史可,王春燕,姚超,等.基于粘度和色度探究九蒸九晒何首乌外观与内在质量的关联性及炮制火候分析[J].时珍国医国药,2023,34(10):2408-2411.
- [11] 于淼,代悦,刘涛涛,等.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[J].中草药,2023,54(11):3480-3488.
- [12] 张涛,张青,易海燕,等.基于指纹图谱结合化学计量法对何首乌不同炮制品多指标成分分析[J].中草药,2022,53(15):4653-4662.
- [13] 于淼,代悦,刘涛涛,等.古代经典九蒸九晒炮制过程中何首乌饮片物质基础与颜色特征的相关性分析[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(16):178-187.
- [14] 杨磊,张曼华,陈文明,等.基于经典与现代炮制方法对何首乌主要化学成分变化规律研究[J].中华中医药杂志,2018,33(2):770-772.
- [15] 蒲俊安,张思敏,刘梦娇,等.何首乌九蒸九晒炮制工艺的优化研究[J].中国药房,2020,31(22):2713-2719.
- [16] Wang T H, Zhang J, Qiu X H, et al. Application of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-orbitrap mass spectrometry for the qualitative and quantitative analysis of *Polygonum multiflorum* Thumb. and its processed products [J]. *Molecules*, 2015, 21(1): 21010040.
- [17] Yu X A, Ge A H, Zhang L, et al. Influence of different processing times on the quality of *Polygoni Multiflora Radix* by metabolomics based on ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(9): 1928-1941.
- [18] Tang J F, Li W X, Zhang F, et al. Discrimination of *Radix Polygoni Multiflori* from different geographical areas by UPLC-QTOF/MS combined with chemometrics [J]. *Chin Med*, 2017, 12: 34.
- [19] Wang G Y, Shang J, Wu Y, et al. Rapid characterization of the major chemical constituents from *Polygoni Multiflori Caulis* by liquid chromatography tandem mass spectrometry and comparative analysis with *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(10): 2107-2116.
- [20] Wang L L, Sang M M, Liu E W, et al. Rapid profiling and pharmacokinetic studies of major compounds in crude extract from *Polygonum multiflorum* by UHPLC-Q-TOF-MS and UPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 140: 45-61.
- [21] Wang Z H, Wang D M, Zheng S H, et al. Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight mass spectrometry with multivariate statistical analysis for exploring potential chemical markers to distinguish between raw and processed *Rheum palmatum* [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 302.
- [22] Huang J, Zhang J P, Bai J Q, et al. Chemical profiles and metabolite study of raw and processed *Polygoni Multiflori Radix* in rats by UPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ spectrometry [J]. *Chin J Nat Med*, 2018, 16(5): 375-400.
- [23] 孟娟,刘洪存,陆淑雯,等.广西不同产地绿茶中主要抗氧化物质含量及其抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2025,41(12):180-190.
- [24] 杨静容,陈亚楠,肖春萍,等.响应面法优化盐关黄柏炮制工艺及其成分与色度相关性分析[J].中草药,2024,55(15):5093-5103.
- [25] 栾飞,邹俊波,张小飞,等.茜草炒炭过程中颜色-成分变化相关性与其“炒炭存性”探索[J].中草药,2025,56(6):1945-1955.
- [26] 常星,王露,程江雪,等.基于偏最小二乘回归分析的逍遥软胶囊中柴胡-白芍药对抗抑郁作用谱-效关系研究[J].中草药,2023,54(8):2509-2515.
- [27] 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.
- [28] 黄宝泰,刘梦遥,刘星彤,等.基于“表里关联”和化学计量学的西洋参微波炮制过程中皂苷含量与色度变化的分析[J].世界科学技术—中医药现代化,2023,

- 25(1): 184-195.
- [29] 赵红菲, 郭俊杰, 庄鑫, 等. 基于色度空间理论的五味子炮制终点判定标准研究 [J]. 人参研究, 2021, 33(4): 29-32.
- [30] 位玉蝶, 李沁, 宋晨鸽, 等. 基于多指标响应曲面法优选醋炙香附炮制工艺及炮制终点量化研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 982-992.
- [31] 郑长辉, 马丽娜, 何婷, 等. 基于“表里关联”的酒柴胡炮制工艺优化及颜色与质量关联性分析 [J]. 中草药, 2025, 56(20): 7344-7354.
- [32] 胡超, 赵洪庆, 刘检, 等. 基于谱效关系及活性验证的百合地黄汤抗抑郁成分研究 [J]. 药学学报, 2024, 59(5): 1364-1373.
- [33] Tang L, Zhao H Q, Yang H, *et al.* Spectrum-effect relationship combined with bioactivity evaluation to discover the main anxiolytic active components of Baihe Dihuang Decoction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 1): 117090.
- [34] 陈宣斌. 没食子酸水凝胶给药系统的制备及抗氧化和抗菌作用研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2023.
- [35] 刘长梅, 陈悦鸣, 胡煜. 不同茶叶中儿茶素、芦丁含量和抗氧化性效果研究 [J]. 中国卫生工程学, 2022, 21(3): 453-455.
- [36] 毛丹丹. 何首乌多糖的分离纯化及抗氧化、抗炎活性研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2022.
- [37] 唐林, 赵洪庆, 刘检, 等. 基线等比增减设计结合熵权TOPSIS法优选百合地黄抗焦虑抑郁最佳配比 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(9): 2125-2129.

[责任编辑 郑礼胜]