

基于“表里关联”的大黄酒蒸过程质量传递规律分析

宋亚南^{1,2}, 王云^{1*}, 高雅^{1,3}, 郑颖豪¹, 刘天良⁴, 张村^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 山东第一医科大学 药理学研究所, 山东 泰安 271016;

3. 安徽中医药大学 药学院, 合肥 230012; 4. 北京同仁堂股份有限公司, 北京 100062)

[摘要] 目的:研究熟大黄炮制过程样品表观颜色与高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱色谱峰所表征成分的相关性,以揭示大黄酒蒸过程中的质量传递规律。方法:运用视觉分析仪分析熟大黄不同炮制时间点样品粉末的颜色变化,采用HPLC指纹图谱进行共有成分指认及其相对峰面积计算,利用多元统计学和Pearson相关性分析进行表观颜色和HPLC指纹图谱中成分变量的聚类、判别和相关性分析。结果:在熟大黄炮制过程中,样品粉末 a^* (红绿色值)变化幅度不大, L^* (明度值), b^* (黄蓝色值), E^*ab (总色度值)呈下降趋势,颜色由亮转暗,由黄色到棕褐色转变。在254 nm和280 nm处,指纹图谱中共指认了46个色谱峰,经对照品比对鉴定出了其中18个成分。 L^* , b^* , E^*ab 的变化趋势与鞣质类(儿茶素、表儿茶素和没食子酸乙酯),二苯乙烯苷类(反-3,5,4'-三羟基苯乙炔基-4'- O - β -D-葡萄糖苷),4'-羟基苯基-2-丁酮-4'- O - β -D-[2''- O -没食子酰基-6''-(4''-羟基)-桂皮酰基]-葡萄糖苷(苯丁酮苷类),结合蒽醌类(芦荟大黄素-8- O -葡萄糖苷、大黄酸-8- O -葡萄糖苷和大黄素-8- O -葡萄糖苷)及 ω -羟基大黄素的含量呈显著或极显著正相关($P<0.05$, $P<0.01$),与游离蒽醌类(大黄素、芦荟大黄素和大黄素甲醚)的含量则呈负相关。与254 nm相比,280 nm的过程样品色谱峰的相似度变化较为明显,检测到的共有峰数目也更多,该波长可反映更多大黄酒蒸过程中化学成分组成上细微的差异。结论:鞣质类、二苯乙烯苷类、苯丁酮苷类成分主要与 L^* 的相关性较强,蒽醌类成分则与 b^* 的相关性较强; E^*ab 的下降与游离蒽醌类成分含量升高及儿茶素、二苯乙烯苷类、结合蒽醌类、苯丁酮苷类和 ω -羟基大黄素等成分的下降密切相关。过程样品颜色指标的变化一定程度上可反映熟大黄药效成分含量的变化趋势。

[关键词] 大黄; 酒蒸; 表里关联; 高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱; 质量控制; 色度值; 多元统计分析

[中图分类号] R28;R943.1;Q436;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)19-0157-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211758 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210601.1541.007.html>

[网络出版日期] 2021-06-02 11:20

Analysis on Quality Transfer Law of Rhei Radix et Rhizoma Steamed with Rice-wine During Processing Based on Correlation Between External Appearance Color and Internal Component

SONG Ya-nan^{1,2}, WANG Yun^{1*}, GAO Ya^{1,3}, ZHENG Ying-hao¹, LIU Tian-liang⁴, ZHANG Cun^{1*}

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

China; 2. Institute of Pharmacology, Shandong First Medical University, Taian 271016, China;

3. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Heifei 230012, China;

4. Beijing Tongrentang Co. Ltd., Beijing 100062, China)

[Abstract] **Objective:** The correlation between the appearance color of cooked rhubarb samples and the components characterized by high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint was studied to reveal

[收稿日期] 20210507(017)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务项目(ZXKT17044,ZZ13-019);北京市中药炮制技术传承基地项目

[第一作者] 宋亚南,在读硕士,从事生药药效物质基础、中药炮制研究,Tel:010-64032658,E-mail:synsong@163.com

[通信作者] *张村,研究员,博士生导师,从事中药炮制、中药化学研究,Tel:010-64032658,E-mail:zhc95@163.com;

*王云,博士,助理研究员,从事中药炮制研究,Tel:010-64032658,E-mail:ywang@icmm.ac.cn

the quality transfer law in the steaming process of processed products with rice-wine. **Method:** The visual analyzer was used to analyze the change of the appearance color of cooked rhubarb sample powder at different processing time, the common components and their relative peak areas of processed products with rice-wine were identified by HPLC fingerprint, as well as multivariate statistics and Pearson correlation analysis were used to cluster, discriminate and analyze the appearance color and the component variables in HPLC fingerprint. **Result:** During the processing of cooked rhubarb, the a^* (red-green value) of sample powder had no obvious change, but the L^* (lightness value), b^* (yellow-blue value) and E^*ab (total chromaticity value) showed a decreasing trend, and the appearance color changed from bright to dark, from yellow to brown. A total of 46 chromatographic peaks in the fingerprint were identified at 254 nm and 280 nm, and 18 of them were identified by comparison with reference standards. The change trend of L^* , b^* and E^*ab were positively correlated with the contents of tannins (catechin, epicatechin and ethyl gallate), stilbene glycoside (*trans*-3,5,4'-trihydroxystyryl-4'-*O*- β -D-glucoside), phenylbutanone glycoside of 4'-hydroxyphenyl-2-butanone-4'-*O*- β -D-[2''-*O*-gallic-6''-*O*-(4''-hydroxy)-cinnamoyl]-glucoside, conjugated anthraquinones (aloe emodin-8-*O*-glucoside, rhein-8-*O*-glucoside, emodin-8-*O*-glucoside) and ω -hydroxyemodin ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and negatively correlated with the contents of free anthraquinones (emodin, aloe emodin and physcion). Compared with 254 nm, the similarities of chromatographic peaks at 280 nm was more obvious, and the number of detected common peaks was more, which could reflect more subtle differences in chemical composition. **Conclusion:** Tannins, stilbene glycosides and phenylbutanone glycosides are strongly correlated with L^* , while anthraquinones are strongly correlated with b^* , the decrease of E^*ab is mainly related to the increase of free anthraquinone content and the decrease of catechins, ω -hydroxyemodin, stilbene glycosides, conjugated anthraquinone and phenylbutanone glycosides. The change of appearance color index of process samples can reflect the change trend of the contents of medicinal components in cooked rhubarb to some extent.

[Keywords] Rhei Radix et Rhizoma; steaming with rice-wine; correlation between external appearance color and internal component; high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint; quality control; chromatic value; multivariate statistical analysis

大黄“炮生为熟”是临床上生熟异治的典型范例。大黄苦寒之性较强,攻下作用猛烈,在临床上主要用于治疗热结便秘。大黄经蒸制加工为熟大黄,泻下作用明显缓和,同时活血化瘀作用增强。熟大黄配伍应用于多个经典名方中,如治疗血瘀内停、腹部肿块、月经停闭的大黄廑虫丸,治疗跌打损伤、瘀血凝积、气绝欲死、烦躁疼痛的鸡鸣散(《三因极一病证方论》)等^[1]。《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)自1963年版开始收录熟大黄至今,黑龙江、安徽、北京等20余个省市炮制规范也收录了熟大黄饮片,但在蒸制时间、辅料用量及蒸制程度判定标准上有明显不同。熟大黄“炮制适中”程度多依据老药工的主观经验而定,致使产品质量参差不齐,疗效难以保障,因此,该饮片的炮制工艺客观化、标准化问题亟待解决。

中药炮制是一个动态的变化过程。在熟大黄的炮制过程中,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“炮制适中”的颜色进行定量描述。利用色差分析仪进行颜色分析,将物质颜色转化为多参数进行量化分析,克服了肉眼判断可信度低的弊端,使颜色的定性及定量描述更为准确^[2]。随着相关分析仪器的的发展,色差分析技术被多领域广泛应用^[3-5]。基于本课题组提出的“表里关联”研究思路,前期已开展了栀子内在成分与表观颜色的关联性研究^[6-7]。而熟大黄成分复杂,其炮制过程中内在成分的变化与表观颜色的关联性目前尚无研究报道。指纹图谱技术可较为全面地反映中药多成分的特征,将指纹图谱主要色谱峰与中药颜色变化进行相关性分析可获取较完整的信息^[8]。因此,本研究拟探讨熟大黄炮制过程饮片的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱动态变化与其颜色的相关性,以系统阐释熟大黄炮制过程中主要物质群的传递规律,为熟大黄饮片的生产工艺技术标准制定提供数据支撑。

1 材料

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司), VA400型视觉分析仪[法国 ALPHA M.O.S公司,含互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器的镜头、颜色校准板与Alpha Soft V14.3数据分析软件], XS105DU型1/10万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司), LD-T100A型高速万能粉碎机(上海顶帅电器有限公司), FX101-2型电热鼓风干燥箱(上海树立仪器仪表有限公司)。

黄酒(绍兴三江酒厂,批号20200805),没食子酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号YA0505YA14,纯度 $\geq 98\%$),5-羟甲基糠醛对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号MUST-18031202,纯度 $\geq 98\%$),芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素、大黄素甲醚对照品(成都埃法生物科技有限公司,批号分别为AF9081621, AF8041804, AF9071403, AF8041803, AF9062601,纯度均 $\geq 98\%$),儿茶素、表儿茶素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为877-200001, 110878-200102,纯度均 $\geq 98\%$);芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷,大黄酸-8-O-葡萄糖苷,大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷,大黄酚-8-O-葡萄糖苷,大黄素-8-O-葡萄糖苷, ω -羟基大黄素,反-3,5,4'-三羟基苯乙烯基-4'-O- β -D-葡萄糖苷,4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O- β -D-[2''-O-没食子酰基-6''-O-(4''-羟基)-桂皮酰基]-葡萄糖苷,没食子酸乙酯对照品[自制,经核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$),核磁共振碳谱($^{13}\text{C-NMR}$)和质谱法(MS)鉴定结构,纯度经HPLC面积归一化法测定均 $\geq 98\%$];大黄和熟大黄饮片(北京本草方源药业集团有限公司,产地甘肃,批号均为20180613),经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定为蓼科植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* 干燥根和根茎的生品及其炮制品;熟大黄以同批大黄饮片为原料,依据2020年版《中国药典》(一部)“熟大黄”项下要求炮制而成;水为娃哈哈纯净水,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 熟大黄炮制过程样品的制备 以2020年版《中国药典》记载的熟大黄炮制工艺为依据,共称取11份大黄饮片,每份50.0 g,分别置于烧杯内,掰成小块,加入黄酒(每10 g黄酒加去离子水20 g稀释)拌匀,闷润1.5 h,待黄酒被吸尽,以保鲜膜及锡箔纸封口,隔水蒸制20 h。在大黄酒蒸第0,4,8,12,13,14,15,16,17,18,20 h分别取样,共平行制备3批大黄酒蒸样品。各过程样品于40℃烘干后粉碎过四

号筛,作为熟大黄炮制过程样品,供实验研究用。

2.2 熟大黄炮制过程样品的颜色测定

2.2.1 饮片颜色 取熟大黄炮制过程样品及企业生产的熟大黄饮片进行表观颜色观察,见网络附件材料。结果发现大黄饮片经酒蒸后,颜色变化明显,随着炮制时间延长,饮片颜色呈现由黄棕色、棕黑色至黑色变化的规律。且20 h样品及企业生产熟大黄饮片的表观颜色均符合2020年版《中国药典》一部“熟大黄”项下描述的“黑色”特征。

2.2.2 粉末颜色 拍照模式为单一快照;图像尺寸(像素)2 558 px \times 1 942 px;镜头 Computar 5 mm;照明模式为顶部及底部照明。利用颜色标准比色板对色彩分析仪进行校准后,取熟大黄各炮制过程样品粉末适量置于培养皿中,压制平整后,利用色彩分析仪采集图像,每个样品调整角度平行拍照3次。结果发现熟大黄炮制过程样品粉末颜色由中度黄色转变为中度棕色,炮制过程颜色变化明显。根据色彩编码分别记录熟大黄炮制过程样品颜色空间参数红绿色值(a^*),明度值(L^*),黄蓝色值(b^*)和总色度值(E^*ab),并依据公式 $E^*ab = \sqrt{L^{*2} + a^{*2} + b^{*2}}$ 计算各样品的 E^*ab ,见表1。结果发现随着炮制的进行,样品粉末颜色 L^* , b^* 和 E^*ab 整体呈下降趋势,以 b^* 下降幅度最大,其次是 L^* 。表明样品颜色由亮转暗,由黄色向棕褐色转变,通过肉眼观察到的样品颜色变化与色度值表征结果一致,具体图片见网络附件材料。

表1 熟大黄炮制过程样品的色度值变化($n=3$)

Table 1 Changes of chromatic values of cooked rhubarb samples during processing ($n=3$)

样品	L^*	a^*	b^*	E^*ab
0 h(大黄)	76.67	7.13	39.71	86.64
4 h	57.30	6.37	28.83	64.47
8 h	56.80	5.18	27.76	63.44
12 h	57.48	6.66	25.62	63.28
13 h	56.42	3.86	25.24	61.94
14 h	50.81	6.94	19.43	54.83
15 h	53.16	3.79	17.56	56.11
16 h	53.03	6.66	21.69	57.67
17 h	51.52	8.35	21.09	56.30
18 h	53.95	5.92	22.58	58.78
20 h	45.55	8.09	13.42	48.17
熟大黄(企业生产)	39.64	3.93	17.95	43.70

将表1中熟大黄过程样品的颜色参数 L^* , a^* , b^* , E^*ab 导入 SIMCA 13.0 进行聚类分析(HCA),结果

发现不同炮制时间点的熟大黄炮制过程样品被分为四类,第1类为0 h样品(大黄);第2类为4, 8, 12, 13 h样品;第3类为14~18 h样品;第4类为20 h样品和企业生产的熟大黄饮片。就颜色分析结果而言,熟大黄炮制过程粉末颜色可划分为炮制前期(0 h),中期(4~13 h),后期(14~18 h)和适中(20 h),说明过程样品颜色的数据量化表征可反映整个炮制程度外观颜色的变化。其中20 h样品和企业生产的熟大黄的饮片颜色及粉末颜色均相近,且HCA可归为一类,进一步表明20 h的过程样品在外观颜色符合2020年版《中国药典》项下“熟大黄”的要求。

2.3 熟大黄炮制过程指纹图谱的动态变化规律

2.3.1 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸,儿茶素,表儿茶素,5-羟甲基糠醛,芦荟大黄素,大黄酸,大黄酚,大黄素,大黄素甲醚,芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷,大黄酸-8-O-葡萄糖苷,大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷,大黄酚-8-O-葡萄糖苷,大黄素-8-O-葡萄糖苷, ω -羟基大黄素,反-3,5,4'-三羟基苯乙烯基-4'-O- β -D-葡萄糖苷,4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O- β -D-[2''-O-没食子酰基-6''-O-(4''-羟基)-桂皮酰基]-葡萄糖苷,没食子酸乙酯18个对照品各适量,分别置于不同的10 mL量瓶中,加甲醇使溶解并定容至刻度,摇匀,得各对照品溶液。取各对照品适量,制成混合对照品溶液。

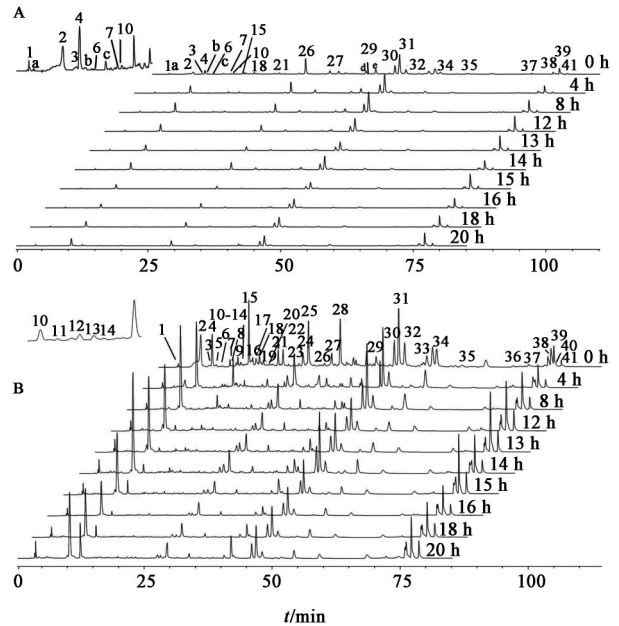
2.3.2 供试品溶液的制备

分别精密称定熟大黄过程样品粉末0.5 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,超声10 min(300 W, 40 kHz),取出,冷却至室温,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得。

2.3.3 色谱条件

Phenomenex Luna C₁₈(2) 100A 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),检测波长254 nm和280 nm,流速0.8 mL \cdot min⁻¹,柱温30 $^{\circ}$ C,进样量设定10 μ L,流动相甲醇(A)-1%冰乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~30%A; 10~40 min, 30%~60%A; 40~60 min, 60%A; 60~70 min, 60%~100%A; 70~85 min, 100%A)^[9]。在该色谱条件下,一共检出46个共有色谱峰,其中22个色谱峰在2个波长下均检出,254 nm下检出5个特征共有色谱峰[图1(A)的a~e],280 nm下检出19个特征共有色谱峰[图1(B)的5, 8, 9, 11~14, 16, 17, 19, 20, 22~25, 28, 33, 36, 40],基本可反映熟大黄炮制过程样品HPLC特征图谱的变化情况。在280 nm下,峰28与29,33与34,35与36之间也存在色谱峰,这些峰主要存在于0 h样品(大黄)中,随着炮制时间的延长,这些成分

急剧降低甚至消失。



A. 254 nm; B. 280 nm; 4. 没食子酸; 6. 5-羟甲基糠醛; 15. 儿茶素; 19. 表儿茶素; 21. 反-3,5,4'-三羟基苯乙烯基-4'-O- β -D-葡萄糖苷; 22. 没食子酸乙酯; 26. 芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷; 27. 大黄酸-8-O-葡萄糖苷; d. 4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O- β -D-[2''-O-没食子酰基-6''-O-(4''-羟基)-桂皮酰基]-葡萄糖苷; 30. 大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷; 31. 大黄酚-8-O-葡萄糖苷; 32. 大黄素-8-O-葡萄糖苷; 34. ω -羟基大黄素; 35. 芦荟大黄素; 37. 大黄酸; 38. 大黄素; 39. 大黄酚; 41. 大黄素甲醚

图1 大黄酒蒸过程样品的HPLC指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of cooked rhubarb samples during steaming with rice-wine

2.3.4 共有峰指认

将熟大黄各炮制过程样品的HPLC指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)进行Mark峰匹配,按照中位数法生成对照图谱。以对照图谱中各峰面积为基准“1”,利用相对峰面积定量法比较共有峰在熟大黄过程样品中的动态变化。经对照品指认,254 nm共识别出熟大黄过程样16个共有成分,其中峰d在280 nm下未检出。280 nm下,熟大黄过程样品共指认出了17个共有成分,表儿茶素和没食子酸乙酯在254 nm下未检出,见图1。

2.3.5 相似度评价

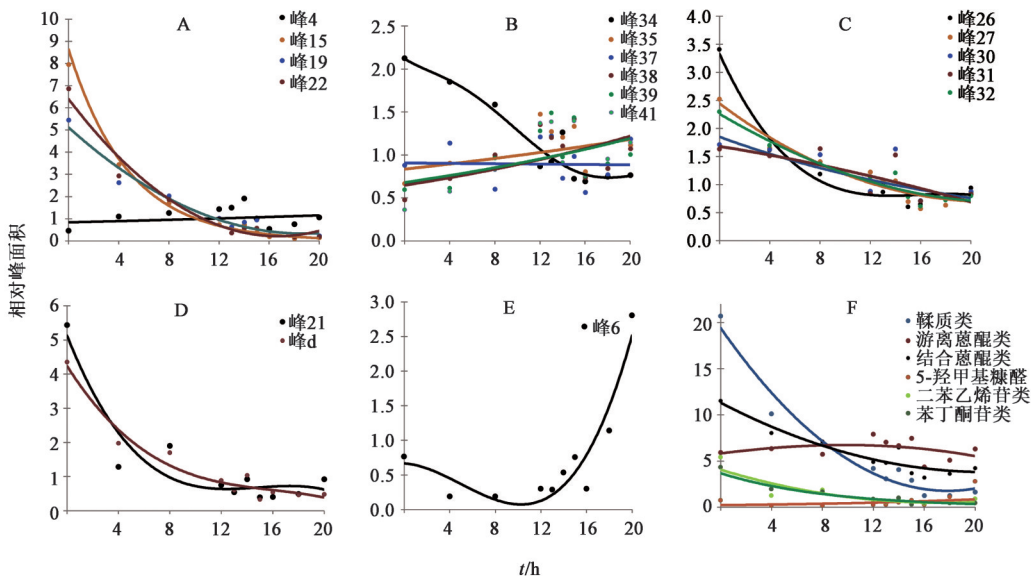
以大黄(0 h样品)指纹图谱作为参照图谱,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)对熟大黄炮制过程样品进行相似度评价,结果发现在254 nm下,0, 4, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20 h样品与0 h样品的相似度分别为1.000, 0.953, 0.896, 0.812, 0.768, 0.834, 0.695, 0.815, 0.760, 0.784;而在280 nm下,相似度则依次

为 1.000, 0.823, 0.753, 0.648, 0.615, 0.597, 0.570, 0.630, 0.584, 0.560。结果发现随着炮制时间的延长,各样品相似度呈下降趋势,酒蒸 12 h 后相似度明显变低。相似度随时间呈逐渐下降的趋势,说明炮制过程对大黄成分影响较大,内在成分的改变势必导致其药效及药性的变化,达到“生熟异治”的炮制作用。研究表明熟大黄一般酒蒸时间在 18~24 h,大黄受热时间较长,部分成分会遭到破坏^[10]。另外,18 h 样品与 20 h 样品的指纹图谱相差不大,20 h 样品(适中)的相似度较小,且以 280 nm 下变化最为明显。

2.3.6 指纹图谱的多元统计分析 分别将波长 254, 280 nm 下指纹图谱所有共有峰的相对峰面积导入 SIMCA 13.0 软件进行正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),结果 R^2X (在 X 轴方向的累积解释率)分别为 0.928 和 0.993, R^2Y (在 Y 轴方向的累积解释率)分别为 0.861 和 0.985,说明建立的 OPLS-DA 模型预测率良好。OPLS-DA 显示,在 254 nm 下,不同炮制时间点的熟大黄炮制过程样品被分为四类,第 1 类为 0 h 样品(大黄),第 2 类为 4~8 h 样品,第 3 类为 12~18 h 样品,第 4 类为 20 h 样品。在 280 nm 下,不同炮制时间点的熟大黄炮制过程样品被分为五类,第 1 类为 0 h 样品(大黄),第 2 类为 4~8 h 样品,第 3 类为 12~15 h 样品,第 4 类为 16~18 h 样品,第 5 类为 20 h 样品。与 254 nm 相比,280 nm 下每一类样品内的变化程度比较相近,这可能与 280 nm 下检测到共有峰的数目较多,可反映化学

成分的组成更细微有关。在 2 个检测波长下,大黄(0 h 样品),4~8 h 样品及 20 h 样品始终被分别聚为一类,指纹图谱的分析结果与外观颜色结果基本一致。

2.3.7 指认成分的变化趋势 为了进一步辨识熟大黄炮制过程中的化学成分变化,依照大黄所含化学成分基本类型,将 2 个波长下指认的 18 种成分划分为鞣质类(峰 4,峰 15,峰 19,峰 22),5-羟甲基糠醛(峰 6),二苯乙烯苷类(峰 21),苯丁酮苷类(峰 d),结合蒽醌类(峰 26,峰 27,峰 30~32),游离蒽醌类(峰 34,峰 35,峰 37~39,峰 41)6 种类型。对这六类成分相对峰面积随炮制时间延长的变化趋势进行对比分析,见图 2。结果显示,鞣质类、游离蒽醌类成分分别在 10, 13 h 时,存在成分破坏与生成成分的交叉点;结合表 1 可以看出,鞣质类成分中儿茶素、表儿茶素和没食子酸乙酯,二苯乙烯苷类,苯丁酮苷类,结合蒽醌类,游离蒽醌类中的 ω -羟基大黄素含量呈下降趋势且与 L^* , b^* , E^*ab 的变化趋势相似;鞣质类成分没食子酸,5-羟甲基糠醛,游离蒽醌成分中的芦荟大黄素、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚含量升高与 L^* , b^* , E^*ab 的变化趋势相反。鞣质类、结合蒽醌类、二苯乙烯苷类和苯丁酮苷类成分总量分别呈下降趋势,5-羟甲基糠醛和游离蒽醌类总量含量分别呈上升趋势。在颜色参数与指认成分相对峰面积变化的整体趋势相似或相反变化下,对颜色参数及共有峰的相对峰面积进行相关性分析以进一步探究二者趋势变化的关联性。



A. 鞣质类; B. 游离蒽醌类; C. 结合蒽醌类; D. 二苯乙烯苷类+苯丁酮苷类; E. 5-羟甲基糠醛; F. 六类成分总量

图2 熟大黄炮制过程样品中不同成分含量的变化趋势

Fig. 2 Variation trends of different component contents in cooked rhubarb during processing

2.4 熟大黄过程样品颜色与成分动态关联分析

2.4.1 颜色参数 L^* , a^* , b^* 与成分的相关性分析 将254 nm与280 nm下共有峰的相对峰面积与熟大黄炮制过程中的相关色值参数数据输入SPSS 22.0进行Pearson相关性分析,检验类型为双侧检验,获取Pearson相关系数及双侧 P ,见表2,3。结果表明 a^* 与化学成分无显著相关性; L^* , b^* 与化学成分有较强相关性。对 P 大小进一步比较后发现,在两波长下,均与 L^* 呈极显著相关的成分共7种($P<0.01$),分别为峰2,7,15,18,21,26,32;除此之外,254 nm下的峰d,34,38及280 nm下的峰1,5,8,9,11,13,16,17,19,22,24,25,27,28也与 L^* 呈极显著相关($P<0.01$)。在两波长下,均与 b^* 呈极显著相关的成分为峰2,15,18,21,26,27,32,34($P<0.01$);除此之外,254 nm下的d,e,38及280 nm下的峰1,5,7~9,11,16,17,19,22,24,25,28,33,41也与 b^* 呈极显著相关($P<0.01$)。比较不同类型成分与 L^* , b^* 的 P 发现,鞣质类、二苯乙烯苷类、苯丁酮苷类成分主要与 L^* 的相关性更强,蒽醌类成分则与 b^* 的相关性更强。

2.4.2 E^*ab 与成分的相关性分析 在不同波长下,经对照品指认的18个成分在Pearson相关性分析中显著性程度存在明显差异。在254 nm下,与 E^*ab 变化具有显著或极显著相关性的成分包括儿茶素,4'-羟基苯基-2-丁酮-4'- O - β -D-[2''- O -没食子酰基-6''- O -(4''-羟基)-桂皮酰基]-葡萄糖苷,反-3,5,4'-三羟基苯乙烯基-4'- O - β -D-葡萄糖苷,4种游离蒽醌(大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚及 ω -羟基大黄素)及5种结合蒽醌类成分(芦荟大黄素-8- O -葡萄糖苷、大黄酸-8- O -葡萄糖苷、大黄素-8- O -葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- O -葡萄糖苷、大黄酚-8- O -葡萄糖苷)。在280 nm下,与 E^*ab 变化具有显著或极显著相关性的成分包括3种鞣质类成分(儿茶素、表儿茶素、没食子酸乙酯),1种二苯乙烯苷类成分(反-3,5,4'-三羟基苯乙烯基-4'- O - β -D-葡萄糖苷),3种结合蒽醌类成分(芦荟大黄素-8- O -葡萄糖苷、大黄酸-8- O -葡萄糖苷、大黄素-8- O -葡萄糖苷)及2种游离蒽醌(ω -羟基大黄素、大黄素甲醚)。就特征性而言,254 nm下识别出显著性相关的特征成分包括3种游离蒽醌类(大黄素、芦荟大黄素和大黄素甲醚)和苯丁酮苷类成分4'-羟基苯基-2-丁酮-4'- O - β -D-[2''- O -没食子酰基-6''- O -(4''-羟基)-桂皮酰基]-葡萄糖苷,280 nm下的特征性成分为鞣质类表儿茶素、没食子酸乙酯。Pearson相关性分析结果说明在熟大黄炮制过程中, E^*ab 的下降主要与游离蒽醌类成分含量升

表2 熟大黄颜色参数与254 nm处成分的相关性分析

Table 2 Pearson correlation analysis between chromatic values of cooked rhubarb and its components at 254 nm

峰号	L^*		a^*		b^*		E^*ab	
	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P
1	-0.451	0.191	0.248	0.489	-0.307	0.389	-0.411	0.239
a	0.065	0.859	-0.049	0.891	0.058	0.873	0.071	0.846
2	0.915 ²⁾	<0.001	0.267	0.456	0.825 ²⁾	0.003	0.908 ²⁾	<0.001
3	0.156	0.668	-0.403	0.248	0.174	0.630	0.158	0.663
4	-0.189	0.600	-0.107	0.769	0.047	0.899	-0.129	0.723
b	0.018	0.960	0.384	0.273	-0.185	0.609	-0.025	0.945
6	-0.372	0.290	0.474	0.167	-0.506	0.135	-0.397	0.257
c	-0.378	0.282	0.438	0.205	-0.554	0.096	-0.416	0.232
7	0.854 ²⁾	0.002	0.334	0.345	0.744 ¹⁾	0.014	0.843 ²⁾	0.002
10	-0.242	0.501	0.49	0.150	-0.420	0.228	-0.278	0.438
15	0.907 ²⁾	<0.001	0.288	0.420	0.845 ²⁾	0.002	0.907 ²⁾	<0.001
18	0.888 ²⁾	0.001	0.269	0.452	0.889 ²⁾	0.001	0.905 ²⁾	<0.001
21	0.880 ²⁾	0.001	0.300	0.400	0.809 ²⁾	0.005	0.878 ²⁾	0.001
26	0.850 ²⁾	0.002	0.362	0.304	0.860 ²⁾	0.001	0.870 ²⁾	0.001
27	0.743 ¹⁾	0.014	0.372	0.290	0.807 ²⁾	0.005	0.777 ²⁾	0.008
d	0.898 ²⁾	<0.001	0.285	0.425	0.883 ²⁾	0.001	0.910 ²⁾	<0.001
29	-0.489	0.151	0.447	0.196	-0.585	0.075	-0.507	0.135
e	0.717 ¹⁾	0.020	0.252	0.482	0.813 ²⁾	0.004	0.756 ¹⁾	0.011
30	0.632 ¹⁾	0.049	0.375	0.284	0.751 ¹⁾	0.012	0.679 ¹⁾	0.031
31	0.603	0.065	0.301	0.399	0.740 ¹⁾	0.014	0.653 ¹⁾	0.041
32	0.918 ²⁾	<0.001	0.285	0.424	0.889 ²⁾	0.001	0.927 ²⁾	<0.001
34	0.784 ²⁾	0.007	0.357	0.311	0.840 ²⁾	0.002	0.815 ²⁾	0.004
35	-0.669 ¹⁾	0.035	-0.210	0.559	-0.578	0.081	-0.653 ¹⁾	0.041
37	-0.046	0.900	-0.044	0.904	-0.076	0.835	-0.050	0.890
38	-0.784 ²⁾	0.007	-0.042	0.909	-0.815 ²⁾	0.004	-0.799 ²⁾	0.006
39	-0.513	0.129	-0.525	0.120	-0.555	0.096	-0.538	0.108
41	-0.659 ¹⁾	0.038	-0.368	0.295	-0.710 ¹⁾	0.021	-0.685 ¹⁾	0.029

注: ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ (表3同)。

高,以及儿茶素、二苯乙烯苷类、结合蒽醌类、苯丁酮苷类和 ω -羟基大黄素等成分的下降低密切相关。

3 讨论

3.1 数据处理方法的选择 观察饮片的颜色是判断炮制程度的主要方法,但该方法易受主观因素和检测环境的影响,通过测量色度值可客观、准确、快速得到饮片的颜色数据,其 E^*ab 可在一定程度上反映炮制品含量的大小,可作为评价炮制程度及其合格与否的标准,弥补传统人为判断造成炮制品质量无法统一的不足,亦可通过客观化、自动化的数据

表3 熟大黄颜色参数与280 nm处成分的相关性分析

Table 3 Pearson correlation analysis between chromatic values of cooked rhubarb and its components at 280 nm

峰号	L^*		a^*		b^*		E^*ab		峰号	L^*		a^*		b^*		E^*ab	
	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P		相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P	相关系数	P
1	-0.802 ²⁾	0.005	-0.035	0.923	-0.821 ²⁾	0.004	-0.815 ²⁾	0.004	22	0.916 ²⁾	<0.001	0.233	0.517	0.878 ²⁾	0.001	0.922 ²⁾	<0.001
2	0.911 ²⁾	<0.001	0.279	0.435	0.816 ²⁾	0.004	0.903 ²⁾	<0.001	23	0.074	0.839	-0.414	0.235	0.177	0.625	0.098	0.788
3	-0.249	0.487	-0.524	0.120	-0.257	0.474	-0.263	0.463	24	0.787 ²⁾	0.007	0.024	0.949	0.812 ²⁾	0.004	0.805 ²⁾	0.005
4	-0.415	0.233	-0.170	0.638	-0.320	0.367	-0.399	0.254	25	0.864 ²⁾	0.001	0.015	0.968	0.829 ²⁾	0.003	0.868 ²⁾	0.001
5	0.926 ²⁾	<0.001	0.231	0.521	0.876 ²⁾	0.001	0.928 ²⁾	<0.001	26	0.880 ²⁾	0.001	0.331	0.350	0.830 ²⁾	0.003	0.884 ²⁾	0.001
6	-0.562	0.091	0.340	0.336	-0.694 ¹⁾	0.026	-0.590	0.073	27	0.861 ²⁾	0.001	0.234	0.516	0.873 ²⁾	0.001	0.880 ²⁾	0.001
7	0.925 ²⁾	<0.001	0.241	0.501	0.825 ²⁾	0.003	0.914 ²⁾	<0.001	28	0.914 ²⁾	<0.001	0.271	0.449	0.807 ²⁾	0.005	0.902 ²⁾	<0.001
8	0.949 ²⁾	<0.001	0.115	0.751	0.855 ²⁾	0.002	0.937 ²⁾	<0.001	29	-0.039	0.915	0.244	0.498	-0.281	0.432	-0.093	0.798
9	0.930 ²⁾	<0.001	0.262	0.464	0.856 ²⁾	0.002	0.926 ²⁾	<0.001	30	0.511	0.131	0.203	0.574	0.607	0.063	0.548	0.101
10	0.520	0.124	-0.486	0.154	0.454	0.188	0.500	0.141	31	0.511	0.131	0.101	0.782	0.610	0.061	0.547	0.102
11	0.923 ²⁾	<0.001	0.119	0.743	0.857 ²⁾	0.002	0.920 ²⁾	<0.001	32	0.830 ²⁾	0.003	0.227	0.527	0.856 ²⁾	0.002	0.852 ²⁾	0.002
12	0.568	0.087	0.092	0.801	0.376	0.285	0.531	0.114	33	0.751 ¹⁾	0.012	-0.070	0.848	0.787 ²⁾	0.007	0.768 ²⁾	0.009
13	0.859 ²⁾	0.001	0.012	0.974	0.750 ¹⁾	0.012	0.841 ²⁾	0.002	34	0.726 ¹⁾	0.017	0.194	0.591	0.807 ²⁾	0.005	0.761 ¹⁾	0.011
14	0.618	0.057	-0.161	0.658	0.517	0.126	0.597	0.069	35	-0.451	0.191	-0.344	0.330	-0.493	0.148	-0.473	0.167
15	0.910 ²⁾	<0.001	0.240	0.504	0.871 ²⁾	0.001	0.916 ²⁾	<0.001	36	-0.573	0.083	-0.122	0.737	-0.609	0.062	-0.590	0.072
16	0.840 ²⁾	0.002	0.005	0.990	0.825 ²⁾	0.003	0.848 ²⁾	0.002	37	0.395	0.259	0.411	0.239	0.311	0.382	0.386	0.271
17	0.861 ²⁾	0.001	0.116	0.750	0.813 ²⁾	0.004	0.863 ²⁾	0.001	38	-0.548	0.101	-0.459	0.182	-0.608	0.062	-0.578	0.080
18	0.876 ²⁾	0.001	0.150	0.680	0.821 ²⁾	0.004	0.876 ²⁾	0.001	39	-0.369	0.294	-0.646 ¹⁾	0.044	-0.454	0.187	-0.407	0.244
19	0.908 ²⁾	<0.001	0.160	0.659	0.878 ²⁾	0.001	0.915 ²⁾	<0.001	40	-0.139	0.702	-0.141	0.698	0.109	0.764	-0.076	0.834
20	0.730 ¹⁾	0.017	0.074	0.840	0.509	0.133	0.684 ¹⁾	0.029	41	-0.562	0.005	-0.471	0.923	-0.635 ²⁾	0.004	-0.595 ²⁾	0.004
21	0.907 ²⁾	<0.001	0.245	0.495	0.787 ²⁾	0.007	0.891 ²⁾	0.001									

规范生产工艺指标。对色度值进行化学计量学分析发现,不同炮制时间的样品可分为炮制前期、中期、后期和适中,随着炮制时间的延长,粉末颜色由中度黄色转变为中度棕色,肉眼观察到样品颜色的变化与色度值表征的结果一致。可用颜色的数据量化表征饮片炮制程度的变化。2020年版《中国药典》规定,熟大黄应为生大黄照酒炖或酒蒸法炖或蒸至内外均呈黑色,断面中间隐约可见放射状纹理^[1]。色度值测定结果显示,20 h样品与熟大黄可就颜色参数划分为一类,表明20 h样品在外观颜色上符合2020年版《中国药典》的相关要求。本研究以饮片企业生产的熟大黄饮片作为参比,基本反映出了熟大黄实际生产炮制过程样品的变化情况。

据报道,游离蒽醌类成分在254 nm下有较强吸收^[8],大黄在280 nm下检出峰数目较多^[11],故本实验选择254 nm和280 nm作为检测波长。通过对这2个波长下的HPLC指纹图谱进行OPLS-DA,得到了与颜色整体相一致的结果。280 nm下熟大黄炮

制过程样品的相似度变化更为明显,适中点的指纹图谱相似度仅为生品的0.56,且该波长下熟大黄的过程样品的OPLS-DA结果也表明每类样品的组内变化差异不大,该波长可反映主要化学成分随着炮制时间延长的细微变化趋势。

3.2 颜色和成分的相关性分析 在实际生产过程中,熟大黄的炮制过程呈颜色加深的趋势,本研究中颜色的量化参数的变化趋势也与肉眼观察的结果基本一致。鞣质类、蒽醌类、二苯乙烯苷类及苯丁酮苷类成分对颜色影响较为显著。熟大黄中鞣质类成分包括以没食子酸、儿茶素为结构单元的可水解鞣质和缩合鞣质,以及由两类鞣质组成的复合鞣质。这些鞣质易受热分解为鞣质单体和糖,再进一步被降解破坏,褐变,引起儿茶素、表儿茶素等鞣质单体含量不同程度降低,见图2(A);而没食子酸的含量上升推测与聚合鞣质类成分及含没食子酰基类成分在蒸制过程中的没食子酸生成作用大于其分解破坏作用所致。

蒽醌类成分包括结合蒽醌和游离蒽醌,结合蒽醌多以游离蒽醌与糖结合成苷的形式存在,随着炮制时间的延长,结合蒽醌在炮制过程中逐渐分解导致其整体含量下降,而游离蒽醌成分的含量则上升,见图2(B,C)。大黄蒸制过程中聚合鞣质、结合蒽醌类、二苯乙烯苷类、苯丁酮苷类等成分分解为糖及其相应的苷元而呈现出整体下降趋势,糖类物质在一定温度、湿度下易发生美拉德反应,生成黑色素,此反应会使饮片的颜色发生从黄色到暗棕色的变化;而5-羟甲基糠醛含量上升也进一步反映出大黄炮制过程中的颜色褐变趋势,见图2(E)。结合2020年版《中国药典》,以游离蒽醌和总蒽醌作为大黄质量控制的关键性指标,由此推测以表观颜色指标的变化来反映熟大黄内在游离蒽醌及结合蒽醌含量的变化是可行的。

从大黄蒸制过程中六类成分总量的变化趋势来看,鞣质类、结合蒽醌类及游离蒽醌类成分总量的交叉点为8 h,5-羟甲基糠醛、二苯乙烯苷类及苯丁酮苷类总量的交叉点约为16 h。说明不同类型成分之间也可能存在相互影响的关系,且影响熟大黄炮制的因素并不局限于这几类成分。从同类成分之间及不同类成分之间的交叉点的分布时间可知,4~18 h是各成分发生主要变化的时间范围,也是完成从生大黄到熟大黄这一量变过程的重要阶段。另外,熟大黄炮制过程中游离蒽醌类成分 ω -羟基大黄素含量呈现出与其他游离蒽醌类成分变化趋势相反(整体下降)的现象,推测可能与其结构含有多个酚羟基有关,具体原因尚需进一步研究。

熟大黄的功效是以活血化瘀为主,泻下作用缓和。研究报道与活血化瘀相关的主要成分为没食子酸和游离蒽醌类成分,其泻下作用主要为结合蒽醌类和番泻苷。随着炮制时间的延长,结合蒽醌逐渐被分解为游离蒽醌,二苯乙烯苷及苯丁酮苷类成分逐渐被分解为苷元,同时生成没食子酸,与此同时,含没食子酸的结合物也逐渐分解成没食子酸,番泻苷结构也被破坏,因而其泻下作用缓和,活血作用增强^[12]。这与本实验炮制过程中蒽醌类成分及鞣质类成分的变化相一致,提示其泻下、活血作用的变化可间接与表观颜色进行关联。在实际生产中可根据色度值的变化范围预测结合蒽醌和游离蒽醌等活性成分的含量,以实现熟大黄炮制质量

的控制,但化学成分、颜色与药效水平的关系还需要进一步实验验证。本实验以中医理论为指导,基于“表里关联”研究思路,通过对熟大黄炮制过程样品的颜色及指纹图谱进行多元统计分析,揭示了熟大黄炮制过程样品的质量传递规律,可为熟大黄炮制过程样品的监测提供一种简便、快速、高效的表观判别方法,并可为其他饮片的质量控制提供参考。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:24-25.
- [2] 何晓凤,王露露,张晶. 基于色度学原理的颜色分析方法在药物研究领域的应用概况[J]. 药物分析杂志,2018,38(9):1471-1475.
- [3] 陈仕妍,卢文彪,王凤梅. 基于颜色匹配模板的中药饮片图像识别[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(6):158-162.
- [4] 李倩,何芳,艾青青,等. 模拟加速实验研究大黄贮藏过程中颜色变化与药效成分的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(23):139-144.
- [5] GÓMEZ A, BUENO D, GUTIÉRREZ J M. Electronic eye based on RGB analysis for the identification of tequilas[J]. Biosensors,2021,11(3):68.
- [6] 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.
- [7] 李晓庆,王云,张雪,等. 基于表里关联的栀子饮片炮制过程中表观颜色变化与其内在成分含量的相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13):1-5.
- [8] 陈慧荣,林相龙,杨瑞琦,等. 甘草颜色与HPLC指纹图谱信息相关性研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2018,20(6):935-940.
- [9] 张村,肖永庆,李丽,等. 大黄不同饮片指纹图谱研究[J]. 北京中医药大学学报,2009,32(2):118-121.
- [10] 杨涛. 大黄生熟异用相关研究[D]. 成都:成都中医药大学,2012.
- [11] 张村,李丽,肖永庆,等. 大黄5种饮片中游离蒽醌类成分比较研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(15):1914-1916.
- [12] 扶垣东,张晶,刘颖,等. 生、熟大黄饮片及其活性组分的泻湿双向调节作用分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(11):127-132.

【责任编辑 刘德文】