

· 中药饮片“性状”客观化研究专题 ·

基于“内外结合”分析马钱子的炮制火候

解达帅¹, 刘玉杰¹, 杨诗龙², 严丹¹, 吴纯洁^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 荆州市中医医院, 湖北荆州 434000)

[摘要] 目的:通过机器视觉和电子鼻技术实现生马钱子饮片及其不同炮制火候砂炒马钱子饮片的鉴别与区分,并研究其颜色、气味与内在成分的相关性。**方法:**采用机器视觉技术和电子鼻技术获取生马钱子及其炮制品的颜色和气味信息,结合化学计量学方法(主成分分析、判别因子分析)分析炮制过程中的变化规律;采用 HPLC 测定不同炮制程度的马钱子饮片中生物碱成分土的宁和马钱子碱的含量;通过相关性分析法分析不同样品颜色值、气味值与成分的相关性。**结果:**马钱子炮制过程中随着炮制程度的加深,色调 H 值逐渐变小,饱和度 S 值逐渐变大,亮度 V 值逐渐变小,通过主成分分析和判别因子分析可实现炮制品的区分和判别;不同炮制程度的马钱子气味呈一定规律性变化;随着炮制程度的加深,马钱子中土的宁和马钱子碱的含量不断降低;通过相关性分析得出色调 H 及亮度 V 的颜色值变化与土的宁和马钱子碱的变化呈显著相关性,而气味与 2 种成分变化之间的相关性不显著。**结论:**通过机器视觉与电子鼻技术对颜色、气味的客观化评价,可实现马钱子与其不同炮制火候饮片的鉴别区分。传统以颜色作为马钱子炮制过程中的控制指标具有一定的科学性。

[关键词] 马钱子; 颜色; 气味; 化学成分; 相关性分析; 土的宁; 马钱子碱

[中图分类号] R283.1;R283.3;R283.4;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080001

Processing Degree of Strychni Semen Based on Combination of Inside and Outside Analysis

XIE Da-shuai¹, LIU Yu-jie¹, YANG Shi-long², YAN Dan¹, WU Chun-jie^{1*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. Jingzhou Hospital of TCM, Jingzhou 434000, China)

[Abstract] **Objective:** Using machine vision and electronic nose technology to identify Strychni Semen pieces and its processed products with different processing degree, and to explore correlation of its color, smell and internal components. **Method:** Machine vision and electronic nose was employed to obtain information of color and odor of Strychni Semen and its processed products, variation in processing process was analyzed by combining chemometric methods (principal component analysis and discriminant factor analysis). HPLC was adopted to determine contents of strychnine and brucine in pieces with different processing degree, correlation between value of color, odor and composition in different samples was analyzed by correlation analysis. **Result:** With deepening of processing degree of Strychni Semen, statistical analysis of samples concluded its processing color change present that hue H value became smaller, saturation S became larger, brightness V value became smaller; differentiation and identification of processed products can realize by principal component analysis (PCA) and discriminant factor analysis (DFA). Smell of different processing degree of Strychni Semen had significant different and showed some variation; with increasing of processing time, contents of strychnine and brucine in Strychni Semen decreased. Correlation analysis showed that there were significant correlation between color change (hue H and brightness V) and contents of strychnine and brucine, but correlation between odor changes and contents of these two components

[收稿日期] 20150715(010)

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAI29B11)

[第一作者] 解达帅,在读硕士,从事中药炮制与制剂研究,Tel:028-61801001,E-mail:670801249@qq.com

[通讯作者] *吴纯洁,博士,研究员,从事中药炮制与制剂研究,Tel:028-61801001,E-mail:wcj-one@263.net

was not obvious. **Conclusion:** By objective evaluation of machine vision and electronic nose technology to color and odor can achieve identification between Strychni Semen and its processed products. Color as a control index in processing of Strychni Semen has certain scientific in traditional method.

[**Key words**] Strychni Semen; color; odor; chemical component; correlation analysis; strychnine; brucine

马钱子有大毒,具有通络止痛、散结消肿之功效,用于治疗风湿顽痹、麻木瘫痪、跌扑损伤、痈疽肿痛、小儿麻痹后遗症、类风湿性关节炎痛等^[1],临床须经炮制减毒后方可使用。中药炮制讲究火候,毒剧类中药,若炮制太过,有效成分损失较多,难以保证临床药效;若炮制不及,则毒性成分破坏较少,难以保证用药安全。因此,掌控马钱子炮制火候对保证其药效和用药安全十分重要。

传统的马钱子炮制火候评价主要依据老药工的经验,通过眼看、鼻闻、口尝等方式获取中药性状信息来判断炮制程度,如棕褐色或棕深色、微有香气等^[2]。但传统经验评价方式存在较大的主观性及操作性不强、重复性差等问题,且随着老药工的减少,其经验传承变得越来越难。另外,还可通过分析马钱子饮片的内在成分来体现马钱子炮制火候,如采用 HPLC 测定马钱子中土的宁和马钱子碱等的含量^[3],但不能全面反映饮片质量,需要结合性状等其他指标来综合分析。

本实验以性状及指标成分含量均可反映马钱子炮制火候的特点为依据,通过客观化性状并结合含量测定方法对马钱子炮制火候进行评价。采用机器视觉及电子鼻技术实现对马钱子及其不同炮制火候饮片的颜色和气味的客观量化,结合化学计量学方法对不同样品进行鉴别区分。通过 HPLC 测定不同样品中马钱子碱、土的宁的含量,结合颜色、气味值变化规律,建立内在成分与外在颜色、气味相结合的马钱子炮制火候综合评价法。

1 材料

机器视觉系统(自制,含新药工中药颜色识别系统 V1.0)^[4],EOS 60D 型数码相机(日本 Canon 公司),HAD QT-310 型摄影箱(上海胜林珠宝首饰有限公司),CYDH-600T 型可控温滚筒式炒药机(杭州春江自动化研究所),LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),FOX 4000 型电子鼻(法国 Alpha Mos 公司),BP211D 型电子天平(德国赛多利斯公司)。马钱子碱、土的宁对照品(中国食品药品检定研究院,纯度分别为 95.9%,97.0%,批号依次为 110706-200505,110705-200306),水为去离子水,乙

腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。马钱子药材购自四川省中药饮片有限公司,并委托其进行炮制,经成都中医药大学马逾英教授鉴定为马钱科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* 的干燥成熟种子;该药材不同火候的炮制品经成都中医药大学吴纯洁教授鉴定合格。

2 方法与结果

2.1 马钱子的炮制^[5] 取河砂过筛得 300 ~ 600 μm 的颗粒,洗净,备用。按砂药比 7:1 在炒药机加入河砂,待温度升至 210 $^{\circ}\text{C}$ 时加入马钱子药材(灰棕色或灰绿色),炒制温度 200 ~ 220 $^{\circ}\text{C}$,炒制时间 8 min。每批投料约 5 kg,同法炒制 3 批。分别在炮制 6,8,10 min 时取马钱子样品($n=3$),得炮制不及(浅褐色或黄褐色),炮制适中(棕褐色或深棕色)与炮制太过(深褐色或黑棕色)的样品。

2.2 机器视觉分析 马钱子样品分为生品、炮制不及样品、炮制适中样品与炮制太过样品,采用机器视觉技术对其颜色进行测定。图片的采集统一以白色作为背景,以发光二极管(LED)灯做光源,拍摄前打开 LED 灯 60 min,稳定光源,设置相机画质 M;相机参数为快门响应时间 1/60 s,光圈值 10,感光度 640;镜头 EF-S 60 mm f/2.8;选择 45/0 观察条件为最佳测量几何条件,通过计算机进行遥控拍摄^[6]。马钱子炮制过程共 4 份样品,平行炮制 3 批,每份样品中随机挑选完整饮片各 100 个进行拍照。在机器视觉特定的、稳定的成像环境中,对上述饮片逐一进行拍照成像,饮片放置于系统视野中央,每个样品饮片获取 1 个图像,共获得 400 张样品图片。将图片导入颜色识别系统进行特征提取,获取颜色变量 H, S, V 数据值。按上述方法重复测定生马钱子 6 次,结果显示颜色值 H, S, V 的 RSD 分别为 1.5%, 0.6%, 0.5%,说明仪器精密度高。

2.3 电子鼻分析

2.3.1 分析参数 数据获取持续时间 120 s,获取周期 1 s,延滞时间 600 s,空气流速 150 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,注射体积 2 mL,注射速度 2 $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$;自动进样器参数为孵化时间 600 s,孵化温度 60 $^{\circ}\text{C}$,冲洗时间 120 s,注射器温度 70 $^{\circ}\text{C}$,搅动速度 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,单

次搅动时间 5 s, 搅动暂停时间 2 s。

2.3.2 样品测定 取生马钱子, 打粉过 3 号筛。精密称取马钱子粉末 1.0 g 置于 20 mL 顶空进样瓶中, 顶空进样 3 批生品 ($n=3$)。另取炮制不同程度的马钱子样品, 同法制备与测定。

2.3.3 精密度考察 电子鼻是由 17 根传感器组成, 分别为 LY2/LG, LY2/G, LY2/AA, LY2/gCTL, LY2/gCT, T30/1, P40/2, T40/2, TA/2, P10/1, P10/2, P40/1, T70/2, PA/2, P30/1, P30/2, T40/1。横坐标为测量时间, 纵坐标为传感器响应强度, 以 120 s 内传感器最大(或最小)特征响应值作为输出值, 输出值以 0.3~0.8 为佳, 见图 1。按 2.3.2 项下方法对同一批炮制适中的马钱子进行 6 次测定, 结果各传感器的 RSD 均 < 3%。证明数据结果可靠, 仪器稳定性良好。

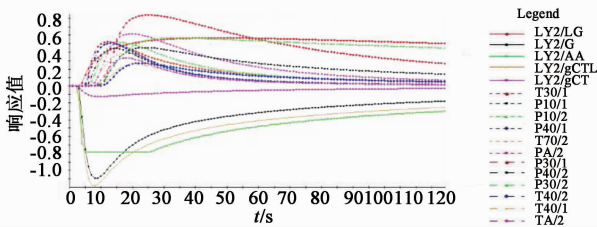


图 1 制马钱子电子鼻传感器响应强度曲线

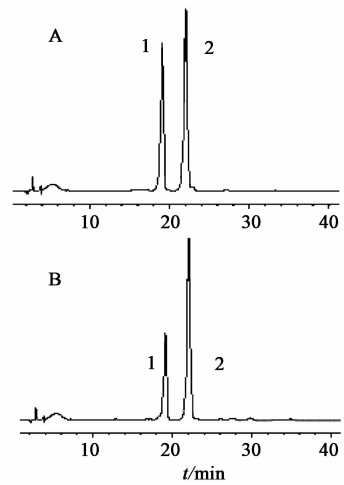
Fig.1 Electronic nose sensor response intensity curves of processed Strychni Semen

2.4 指标成分的含量测定^[3]

2.4.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 庚烷磺酸钠与 0.02 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾等量混合液(用 10% 磷酸调 pH 2.8) (21:79), 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL。理论塔板数按士的宁峰计算 ≥ 5 000, 见图 2。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取士的宁、马钱子碱对照品 10.11, 10.08 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加三氯甲烷适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀。各精密量取 2 mL 置同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称取各马钱子样品粉末(过 3 号筛)约 0.6 g, 置具塞锥形瓶中, 加氢氧化钠试液 3 mL, 混匀后静置 30 min, 精密加入三氯甲烷 20 mL, 密塞, 称定质量, 回流提取 2 h, 放冷后称定质量, 用三氯甲烷补足减失质量, 摇匀, 分取三氯甲烷液。用滤纸(铺有少量无水硫酸钠)滤过, 初滤液弃去, 精密量取续滤液 3 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 马钱子碱; 2. 士的宁

图 2 马钱子生品 HPLC

Fig.2 HPLC of Strychni Semen

2.4.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 按 2.4.1 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得马钱子碱、士的宁回归方程分别为 $Y = 7\ 645.8X + 9\ 636.4$ ($R^2 = 0.9997$), $Y = 10\ 896X - 2\ 074.8$ ($R^2 = 0.9998$), 线性范围 20.16~201.6, 20.22~202.2 mg·L⁻¹。

2.5 颜色分析

2.5.1 颜色数值分析 通过中药颜色识别软件处理马钱子炮制过程中的 4 份样品(每份样品均有 3 批, 每批样品的生品及不同炮制品的数量均为 33 或 34 个)各 100 张照片, 得生品及不同炮制火候饮片颜色的 H, S, V 数据的平均值, 见表 1。

HSV 空间中, 绿色 H 值要大于棕色, 依据本软件的颜色统计方式(图像中所有像素点颜色的加权平局), 若绿色所占比例降低, 则总体色调 H 值表现为降低。随着炮制程度加深, H 值逐渐降低。表明随着炮制程度加深, 马钱子表面颜色逐渐转变为以棕色为主, 这与绿色所占比例逐渐减少有关。S 值为颜色饱和度, S 值越大, 表明颜色越深, 越鲜艳; 随着马钱子炮制加深, 颜色逐渐变深。这与炮制颜色变化结果相一致, 生马钱子由灰棕色变为制马钱子深棕色。V 为亮度, V 值越小, 表明越暗; 随着炮制加深, 马钱子颜色效果越暗。制马钱子棕褐色的“褐”表明了炮制之后的此特征。另外, 炮制太过马钱子在颜色明暗效果上与其他马钱子差异较大。这与实际效果相一致, 见图 3。

2.5.2 主成分分析 将机器视觉获取的马钱子炮制过程中的 4 份样品各 100 组数据的颜色值进行主

表 1 马钱子颜色双侧 90% 置信区间统计分析 ($n=3$)

Table 1 Sided 90% confidence interval statistical analysis of Strychni Semen color ($n=3$)

炮制程度	H 值	S 值	V 值
生品	21.25 ± 1.99	81.55 ± 12.16	159.03 ± 10.23
不及	19.65 ± 1.70	105.94 ± 13.92	151.42 ± 10.93
适中	17.77 ± 1.35	127.57 ± 11.08	132.33 ± 16.13
太过	13.86 ± 2.16	133.81 ± 15.25	93.88 ± 20.63



图 3 马钱子饮片示意

Fig. 3 Sketch map of Strychni Semen decoction pieces

成分分析, 见图 4。结果可知 PC1 与 PC2 总贡献率约 99.95%, 较好地反映了原始数据信息。且马钱子及其不同炮制火候的饮片颜色存在差别。

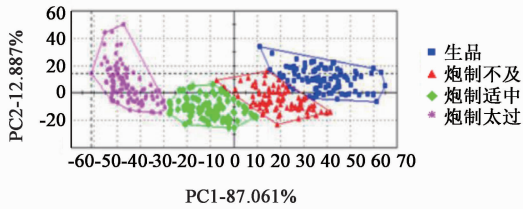


图 4 马钱子及其不同炮制程度饮片颜色数据的 PCA 分析

Fig. 4 PCA analysis of color data about Strychni Semen and its processed products with different processing degree

2.5.3 判别因子分析 (DFA) 基于马钱子颜色存在差异的分析结果, 将机器视觉获取 4 份样品各 100 组颜色值数据进行了 DFA 分析。随机挑取马钱子及其炮制品获取的 280 组数据 (炮制过程中 4 份样品各 70 组数据) 建立 DFA 模型, 另将剩余的 120 组数据 (炮制过程中 4 份样品各 30 组数据) 作为模型测试集, 见图 5。结果 DF1 与 DF2 总贡献率达 99.83%, 较好地反映了原始数据信息, 处理结果可靠。依据建立的 DFA 模型, 对未知测试组的 120 组样品判别识别率 90.7%, 判别效果良好。

在颜色方面, 机器视觉所量化的马钱子不同炮制火候颜色值与肉眼所观察到的颜色变化一致。由 PCA, DFA 二维图可知, 不同炮制火候的马钱子饮片的颜色均具有明显差异, 依据颜色数据所建

的 DFA 模型对未知火候的马钱子饮片可进行区分别。

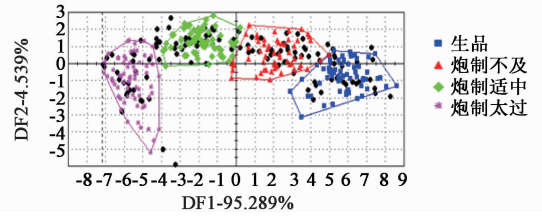


图 5 马钱子及其不同炮制品颜色数据的 DFA 分析

Fig. 5 DFA analysis of color data about Strychni Semen and its processed products

2.6 气味相关性分析

2.6.1 传感器响应值分析^[7] 马钱子及其不同炮制程度的饮片传感器气味响应强度雷达图见图 6。结果显示生马钱子、炮制不及品、炮制适中品、炮制太过品在电子鼻传感器响应上存在较大差异, 说明不同炮制程度的马钱子的气味具有很大差异。当炮制适中时 (微有香气), 17 根传感器响应值达最大。

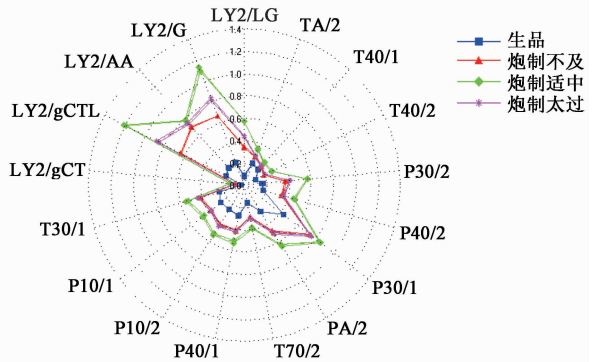


图 6 马钱子及其不同炮制品气味雷达

Fig. 6 Odor radar map of Strychni Semen and its processed products

2.6.2 主成分分析 将电子鼻获取的马钱子各炮制品传感器响应值 (炮制过程中 4 份样品各 9 组数据) 进行主成分分析, 见图 7。结果 PC1 与 PC2 总贡献率达 99.33%, 较好地反映了原始数据信息, 处理结果可靠, 实现了马钱子及其不同炮制火候饮片的区分。

2.7 含量测定分析 马钱子炮制过程中, 生品、炮制不及品、炮制适中品、炮制太过品的士的宁质量分数分别为 1.68%, 1.53%, 1.34%, 1.10%, 马钱子碱质量分数分别为 0.94%, 0.90%, 0.81%, 0.64%。随着炮制时间的延长, 马钱子中的毒性成分士的宁和马钱子碱成分不断降低, 通过分析马钱子饮片中士的宁和马钱子碱含量, 发现除炮制太过的饮片外, 生品、炮制不及品、炮制适中品均符合 2015 年版《中国药典》中制马钱子的含量测定要求,

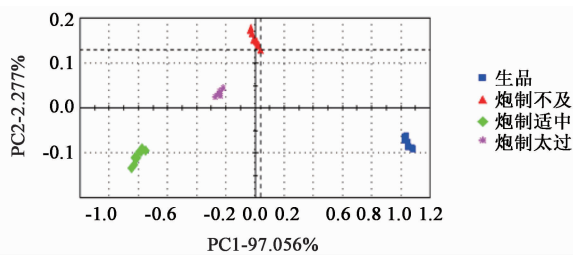


图 7 马钱子及其不同炮制品气味 PCA 分析

Fig. 7 PCA analysis of odor data about Strychni Semen and its processed products

说明通过含量测定能较好地反映马钱子的炮制火候。

2.8 相关性分析

2.8.1 颜色与成分的相关性分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行相关性分析。取 3 批马钱子生品及不同火候的炮制品颜色的 H, S, V 值 3 组数据的平均值, 与成分进行 Pearson 相关性分析, 结果土的宁的相关系数分别为 0.992, -0.944, 0.978; 马钱子碱的相关系数分别为 0.996, -0.869, 1.000。色调 H 与土的宁具有极显著相关性 ($P < 0.01$), 亮度 V 与土的宁具有显著相关性 ($P < 0.05$); 色调 H, 亮度 V 与马钱子碱均有极显著相关性 ($P < 0.01$)。

2.8.2 气味与成分的相关性分析

取 3 批马钱子生品及不同火候的炮制品气味 17 组数据的平均值, 通过主成分分析方法进行降维处理^[8], 得 1 组数据 (个体第一主成分得分 FAC1), 该组数据的贡献率达 98.40%, 能较好地反映原始数据的信息, 将该组数据与成分进行 Pearson 相关性分析, 结果 FAC1 与马钱子碱、土的宁的相关性均不显著。

3 讨论

本文采用机器视觉技术, 将炮制适中的制马钱子饮片颜色量化, 通过对 3 批饮片颜色值进行统计分析, 发现颜色值具有一定的范围分布。依据颜色范围分布可制定炮制适中的颜色标准, 进而保证该饮片的质量。但实验中仍还存在一些不足, 如制定该饮片的颜色标准应统计各省市各个厂家多批次的饮片, 而本文采集样本量不足, 分析得到的颜色标准存在一定局限性; 同时本研究中采用的机器视觉系统还处于开发阶段, 其所测定样品颜色与实际颜色还存在一定差别, 系统仍需不断完善。

本文通过应用电子鼻技术实现了不同火候马钱子饮片的鉴别区分。通过对电子鼻响应值分析, 发现不同炮制程度的马钱子气味差异较大, 且呈现一定变化规律。当炮制适中时 (微有香气), 17 根传感器响应值达最大; 当炮制太过时, 其响应值开始回

落, 这可能与气味成分高温遭到破坏有关, 或者气味成分发生类别、比例等方面的变化有关。

马钱子颜色与成分的相关性分析结果表明, 炮制过程中颜色变化中色相 H, 亮度 V 与马钱子碱、土的宁的含量显著相关。表明传统炮制生产中依据颜色判别马钱子的炮制火候具有一定的科学性, 即通过颜色能够对马钱子的炮制火候进行判别。马钱子炮制过程气味变化与马钱子碱、土的宁的含量相关性不显著, 这是因为 HPLC 测定的是马钱子碱、土的宁成分, 并不是挥发性成分, 而电子鼻获取的是气味, 主要来自挥发性成分, 说明其挥发性成分与土的宁、马钱子相关性不大, 但对于该挥发性成分仍有待进一步研究。

在对马钱子炮制火候的研究中, 通过机器视觉、电子鼻技术的应用, 实现了不同炮制火候马钱子饮片颜色和气味的数值化, 这不仅有利于炮制经验的传承和发展, 而且能够更好地指导炮制饮片的规范加工与生产; 通过具体数值分析颜色与成分变化的相关性为传统以颜色作为马钱子炮制过程中的控制指标提供了一定的科学依据。本文研究结果表明, 性状与内在成分均可作为饮片质量的控制指标, 因此在目前饮片质量标准基础上, 通过增加颜色、气味等性状客观化的检查, 结合其内在成分的定量研究, 建立外在性状和内在质量相结合的饮片质量综合评价方式, 这对保证饮片的质量具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 刘玉杰, 吴伯英, 徐颖, 等. 马钱子本草考证与炮制沿革研究[J]. 中药与临床, 2014, 5(2): 90-92.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 48.
- [3] 王丹丹, 李俊松, 蔡宝昌. 马钱子炮制前后土的宁及马钱子碱氮氧化物的含量变化研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(2): 435-436.
- [4] 谢绍鹏, 杨添钧, 杨诗龙. 中药图像获取装置: 中国, CN203465206U[P]. 2014-03-05.
- [5] 徐颖, 刘玉杰, 孙涛, 等. 砂烫马钱子炮制工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 25-28.
- [6] 杨添钧, 杨诗龙, 黎量, 等. 基于电子鼻及机器视觉技术的山楂不同炮制品判别研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(10): 2399-2402.
- [7] 胥敏, 杨诗龙, 张超, 等. 基于气味客观化的黄连及其炮制品鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 89-93.
- [8] 黎量, 杨诗龙, 刘玉杰, 等. 基于相关性分析的山楂炮制过程气味变化机制研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(17): 3283-3286.

[责任编辑 刘德文]