

红芪颜色与类胡萝卜素类成分的相关性研究

王 燕, 强正泽*, 李成义*, 贾妙婷, 魏小成, 王明伟, 李 硕

甘肃中医药大学, 兰州 730000

摘要:采用精密色差仪获取红芪的颜色值数据,应用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)测定红芪中类胡萝卜素类代谢产物的含量,并采用单因素方差分析、PCA分析、聚类分析、相关性分析、OPLS-DA分析等方法,研究红芪颜色与类胡萝卜素类成分的相关性。结果显示,红芪中有17种类胡萝卜素类成分被检出;棕黄色、红棕色、红褐色与黄棕色红芪样品间颜色值具有显著差异性;红芪颜色值与类胡萝卜素类代谢产物含量间存在关联关系,4种颜色样品间17种类胡萝卜素类成分含量存在极大值与极小值的特征,含量分布具有差异性;4种颜色间的差异性代谢产物有2类(胡萝卜素类与叶黄素类)11种,分别为 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素二月桂酸酯、叶黄素二肉豆蔻酸酯、紫黄质二丁酸酯、紫黄质肉豆蔻酸酯、花药黄质、玉米黄质、紫黄质、叶黄素、 β -隐黄质月桂酸,其是红芪产生颜色的呈色物质之一。棕黄色、红棕色、红褐色与黄棕色红芪样品的呈色原因可能与类胡萝卜素类代谢产物的含量及种类有关。

关键词:红芪;颜色;类胡萝卜素类成分;LC-MS/MS

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)10-1679-20

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.10.004

Correlation between color and carotenoids in Hedysari Radix

WANG Yan, QIANG Zheng-ze*, LI Cheng-yi*, JIA Miao-ting, WEI Xiao-cheng, WANG Ming-wei, LI Shuo

Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

Abstract: A precision colorimeter was used to obtain color values, and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was applied to determine the contents of carotenoid metabolites in Hedysari Radix. One-way ANOVA, PCA analysis, cluster analysis, correlation analysis, OPLS-DA analysis were also used to study the correlation between color and carotenoids in Hedysari Radix. The results showed that 17 carotenoids were detected, and there were significant differences in color values of brown, reddish brown, auburn and yellow-brown samples. It was also found that there was a correlation between color values and contents of carotenoids. Seventeen carotenoids were characterized by maximum and minimal values between the 4 color samples, and the distribution of contents was differential. Eleven differential metabolites were involved in two categories (carotenoids and luteolin), namely α -carotene, β -carotene, lutein dilaurate, lutein dimyristate, violaxanthin dibutyrate, violaxanthin myristate, antheraxanthin, zeaxanthin, violaxanthin, lutein, and β -cryptoxanthin laurate, which is one of the color-presenting substances in the production of color in Hedysari Radix. The reasons for the colouration of brown, reddish brown, auburn and yellow-brown Hedysari Radix samples may be related to the content and type of carotenoid metabolites.

Key words: Hedysari Radix; color; carotenoids; LC-MS/MS

红芪(Hedysari Radix)为甘肃道地药材和特产药材,是甘肃南部地区振兴乡村经济的支柱产业之一,甘肃武都区已成为“中国红芪之乡”,所产红芪药材已形成“米仓红芪”品牌。课题组实验观察发

现,红芪呈现出棕黄色、红棕色、红褐色、黄棕色等多样化的颜色特征。

颜色不仅是中药辨色论质理论的重要组成部分^[1],而且“颜色”作为中药最直观的特征,与其内在质量有着紧密联系。汉代以前人们便开始重视药物颜色^[2,3],如《神农本草经》中以青、赤、黄、白、黑等颜色命名的药物有68种,《本草经集注》^[4]记载朴硝“色青白者佳,黄者伤人,赤者杀人”;《新修本草》^[5]记载秦皮“取皮水渍,便碧色,书纸看背,青色

收稿日期:2023-05-06 接受日期:2023-07-24

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(82104345);国家自然科学基金(82160730);甘肃省教育厅2023年高校教师创新基金(2023A-081);甘肃中医药大学引进人才科研启动基金(2023YJRC-04)

*通信作者 E-mail:gslichengyi@163.com, qiangzhengze@163.com

者是”；《本草原始》^[6]记载白术“惟白为胜”、黄连“黄色鲜明者为胜”、丹参“根皮丹而肉紫者佳”、木香“肉色青者优，黄白者次之，色黑油者下”；《本草纲目》^[7]中还记载了药材颜色与产地的关系，如黄芩“西芩……色黔，北芩……深黄”，说明颜色与中药的名称、功效、药物鉴定、品质、产地等方面存在密切关系。不仅如此，现代研究表明，中药颜色与其药性、化学成分密切相关^[8-9]，是药材“外部优形”与“内部优质”互为统一的桥梁^[10]，利用颜色可对药材的产地、品种^[11]、采收期^[12]、贮藏^[13,14]、炮制工艺^[15]等进行判别和评价。同时，颜色可作为药材质量的评价指标^[16]，《中华人民共和国药典》(一部)2020年版^[17]中200余种药材亦将“颜色”作为其质量评价的指标之一。高等植物的叶、花、果及根因富含类胡萝卜素，其结构为四萜烯色素，呈现出黄色、橙红色、红色和紫色，与植物的颜色形成具有密切关系，同时具备抗氧化、光保护、着色、增强免疫力、防癌抗癌等功能与生理活性，已被广泛应用于食品、保

健、护肤与化妆、医药、饲养等行业^[18-21]。

基于此，课题组以红芪为研究对象，采用精密色差仪及液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)开展红芪颜色与类胡萝卜素类成分的相关性研究，分析颜色与类胡萝卜素类成分间的关联关系，解析不同颜色红芪样品中类胡萝卜素类代谢产物的差异性规律，以期红芪颜色多样性产生的原因及质量评价提供参考。

1 材料

1.1 实验样品

2021年10月收集12份不同颜色红芪样品，经甘肃中医药大学药学院李成义教授鉴定为豆科植物多序岩黄芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz. 的根，标本(编号:Y-2021-AH-01)现保存于甘肃中医药大学药学院中药鉴定学实验室。后经过除杂、搓条加工、干燥等产地加工环节制成实验样品，以“肉眼”主观判断按照颜色分为4组，其中HC1为棕黄色、HC2为红棕色、HC3为红褐色、HC4为黄棕色。样品信息见表1，不同颜色红芪样品见图1。

表1 不同颜色红芪样品信息

Table 1 Samples information of *Hedysari Radix* with different color

样品分组编号 Group	样品编号 Sample No.	颜色 Color	产地 Origin	采集时间 Collection time
HC1	H1	棕黄色	陇南市武都区甘泉镇	2021.10
	H2	棕黄色	陇南市武都区角弓镇	2021.10
	H3	棕黄色	陇南市宕昌县哈达铺镇	2021.10
HC2	H4	红棕色	陇南市宕昌县将台乡	2021.10
	H5	红棕色	定西市岷县麻子川镇	2021.10
	H6	红棕色	陇南市武都区鱼龙镇	2021.10
HC3	H7	红褐色	陇南市宕昌县贾河乡	2021.10
	H8	红褐色	定西市渭源县麻家集镇	2021.10
	H9	红褐色	陇南市宕昌县理川镇	2021.10
HC4	H10	黄棕色	定西市陇西县首阳镇	2021.10
	H11	黄棕色	定西市岷县麻子川镇	2021.10
	H12	黄棕色	定西市渭源县麻家集镇	2021.10

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器

液相色谱串联质谱 LC-MS/MS (QTRAP 6500 +, SCIEX); 离心机 (5424R, Eppendorf); 电子天平 (AS 60/220. R2, RADWAG); 球磨仪 (MM400, Retsch); 离心浓缩仪 (CentriVap, LABCONCO); 多管涡旋振荡器 (MIX-200, 上海净信); 超声清洗仪

(KQ5200E, 昆山舒美); 高速中药粉碎机 (ZN-04A, 北京兴时利); 精密色差仪 (NR110, 深圳三恩时)。

1.2.2 试剂

甲醇、乙腈、乙醇 (色谱纯, Merck); 丙酮 (色谱纯, 国药); 甲酸 (色谱纯, Sigma-Aldrich); 氯化钠 (分析纯, 罗恩); 氢氧化钾 (分析纯, 沪试); 甲基叔丁基醚、正己烷 (色谱纯, 安谱实验 CNW); 2,6-二叔丁基



图1 不同颜色红芪样品

Fig. 1 Pictures of Hedysari Radix samples with different color

对甲酚(BHT)(色谱纯, Aladdin); 标准品: α -胡萝卜素(BOC Sciences, 7488-99-5-10 mg, 纯度 95%); 番茄红素(罗恩, R007285-100 mg, 纯度 98%); γ -胡萝卜素(Sigma, 54765-1 mg, 纯度 $\geq 90\%$); β -胡萝卜素(罗恩, R019713, 纯度 96%); 六氢番茄红素(BOC Sciences, 27664-65-9-1 mg, 纯度 95%); α -隐黄质(BOC Sciences, 24480-38-4-1 mg, 纯度 $> 98\%$); 海胆烯酮(BOC Sciences, 432-68-8-1 mg, 纯度 98%); β -柠乌素(BOC Sciences, 650-69-1-1 mg, 纯度 95%); 八氢番茄红素(BOC Sciences, 13920-14-4-250 μg , 纯度 $> 95\%$); ε -胡萝卜素(ZCN, ZCN-0020, 纯度 95%); 玉米黄质二棕榈酸酯(zzstandard, ZCN-0126-1 mg, 纯度 95%); 花药黄质(ZCN, ZCN-0231, 纯度 95%); 玉米黄质(毕得, BD2134-5 mg, 纯度 98%); 紫黄质(sigma, 52444-1 mg, 纯度 $\geq 90\%$); 新黄质(BOC Sciences, 14660-91-4-1 mg, 纯度 $\geq 99\%$); 叶黄素(阿拉丁, X109574-10 mg, 纯度 90%); β -隐黄质(ExtraSynthese, ZES-0317S-1 mg, 纯度 $\geq 95\%$); 虾青素(罗恩, R004353-25 mg, 纯度 96%); $8'\beta$ -阿朴胡萝卜素醛(阿拉丁, A106806, 纯度 96%); 辣椒红素(ExtraSynthese, ZES-0312S-5 mg, 纯度 $\geq 95\%$); 辣椒玉红素(BOC Sciences, 470-38-2-1 mg, 纯度 $\geq 90\%$); 角黄素(BOC Sciences, 514-78-3-5 mg, 纯度 95%)。

2 方法

2.1 红芪药材颜色值测定

2.1.1 供试品的制备方法

取红芪样品, 粉碎, 过 4 号筛。将粉末置于粉末测试盒中, 以测试盒中粉末不随意晃动为准, 盖上石英镜片, 备用。

2.1.2 样品测量方法

按上述制备方法制备供试品后, 采用精密色差仪(测量条件: 照明光源: D65; 观察者角度: 10 度视角; 测量口径 Φ : 4 mm), 连续测量 6 次, 每份样品重复 3 次, 记录 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 等颜色值(注: ① L^* 表示颜色亮度, 即当 $L^* = 0$ 时, 为黑色; 当 $L^* = 100$ 时, 为白色; ② a^* 表示红绿色轴, 即当 $a^* < 0$ 时, 为绿色; 当 $a^* > 0$ 时, 为红色; ③ b^* 表示黄蓝色轴, 即当 $b^* < 0$ 时, 为蓝色; 当 $b^* > 0$ 时, 为黄色; ④ C^* 表示饱和度值; ⑤ h° 表示色调角度值)。

选择道地产区陇南武都红芪样品为标准试样, 按照上述供试品制备方法及测量方法进行颜色值测定。其颜色值分别为 $L^* = 76.96$ 、 $a^* = 4.72$ 、 $b^* = 3.81$ 、 $C^* = 13.98$ 、 $h^\circ = 70.27$ 。然后用样品所测的初始颜色值分别和标准颜色值作差, 计算其总色差 ΔE_{ab}^* 值: $\Delta E_{ab}^* = [(L_{(试样)}^* - L_{(标准)}^*)^2 + (a_{(试样)}^* - a_{(标准)}^*)^2 + (b_{(试样)}^* - b_{(标准)}^*)^2]^{1/2}$ 。

2.1.3 重复性考察

取陇南武都红芪样品, 按上述供试品制备方法

制备供试品 6 份,并按上述测定方法进行测量。测量结果 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 的 RSD 分别为 0.21%、0.41%、0.90%、0.82%、0.19%,均小于 1%;且结果间 ΔE_{ab}^* 均小于 0.5,平均值为 0.37,色差低于人眼可辨范围。表明方法重复性良好。

2.1.4 精密度考察

取陇南武都红芪样品,按上述供试品制备方法制备供试品 1 份,并按上述测定方法连续测量 6 次,连续三天,分别记录 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 及 ΔE_{ab}^* 值,分析其日内精密度和日间精密度。日内精密度测量结果 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 的 RSD 分别为 0.06%、

0.53%、0.28%、0.30%、0.10%,均小于 1%;且结果间 ΔE_{ab}^* 均小于 0.5,平均值为 0.33。日间精密度测量结果 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 的 RSD 分别为 0.03%、0.68%、0.64%、0.57%、0.27%,均小于 1%;且结果间 ΔE_{ab}^* 均小于 0.5,平均值为 0.29,色差低于人眼可辨范围。表明仪器精密度良好。

2.2 红芪药材类胡萝卜素类成分的测定

2.2.1 检测的类胡萝卜素类成分信息

红芪药材中共检测类胡萝卜素类成分 68 种,信息见表 2。

表 2 68 种类胡萝卜素类化合物信息

Table 2 Information of 68 carotenoids

序号 No.	物质简称 Compound abbreviation	物质名称 Compound name	分类 Class
1	Car_01	α -胡萝卜素 α -Carotene	胡萝卜素
2	Car_02	番茄红 Lycopene	胡萝卜素
3	Car_03	γ -胡萝卜素 γ -Carotene	胡萝卜素
4	Car_04	β -胡萝卜素 β -Carotene	胡萝卜素
5	Car_05	六氢番茄红素 Phytofluene	胡萝卜素
6	Car_06	八氢番茄红素 (<i>E/Z</i>)-Phytoene	胡萝卜素
7	Car_07	ϵ -胡萝卜素 ϵ -Carotene	胡萝卜素
8	Car_08	花药黄质二棕榈酸酯 Antheraxanthin dipalmitate	叶黄素
9	Car_09	叶黄素癸酸酯 Lutein caprate	叶黄素
10	Car_10	叶黄素月桂酸酯 Lutein laurate	叶黄素
11	Car_11	叶黄素肉豆蔻酸酯 Lutein myristate	叶黄素
12	Car_12	叶黄素棕榈酸酯 Lutein palmitate	叶黄素
13	Car_13	叶黄素硬脂酸酯 Lutein stearate	叶黄素
14	Car_14	5,6 环氧叶黄素二月桂酸酯 5,6-Epoxy-lutein dilaurate	叶黄素
15	Car_15	叶黄素二月桂酸酯 Lutein dilaurate	叶黄素
16	Car_16	5,6 环氧叶黄素-发酸酯-棕榈酸酯 5,6-Epoxy-lutein-caprate-palmitate	叶黄素
17	Car_17	叶黄素二肉豆蔻酸酯 Lutein dimyristate	叶黄素
18	Car_18	叶黄素二棕榈酸酯 Lutein dipalmitate	叶黄素
19	Car_19	叶黄素二硬脂酸酯 Lutein distearate	叶黄素
20	Car_20	叶黄素二油酸酯 Lutein dioleate	叶黄素
21	Car_21	叶黄素油酸酯 Lutein oleate	叶黄素
22	Car_22	新色素棕榈酸酯 Neochrome palmitate	叶黄素
23	Car_23	玉红黄质发酸酯 Rubixanthin caprate	叶黄素
24	Car_24	玉红黄质月桂酸酯 Rubixanthin laurate	叶黄素
25	Car_25	玉红黄质肉豆蔻酸酯 Rubixanthin myristate	叶黄素
26	Car_26	玉红黄质棕榈酸酯 Rubixanthin palmitate	叶黄素
27	Car_27	紫黄质二丁酸酯 Violaxanthin dibutyrate	叶黄素

续表 2 Continued Tab. 2

序号 No.	物质简称 Compound abbreviation	物质名称 Compound name	分类 Class
28	Car_28	紫黄质月桂酸酯 Violaxanthin laurate	叶黄素
29	Car_29	紫黄质肉豆蔻酸酯 Violaxanthin myristate	叶黄素
30	Car_30	紫黄质棕榈酸酯 Violaxanthin palmitate	叶黄素
31	Car_31	紫黄质棕榈油酸酯 Violaxanthin palmitoleate	叶黄素
32	Car_32	紫黄质二月桂酸酯 Violaxanthin dilaurate	叶黄素
33	Car_33	紫黄质-肉豆蔻酸酯-发酸酯 Violaxanthin-myristate-caprate	叶黄素
34	Car_34	紫黄质-肉豆蔻酸酯-月桂酸酯 Violaxanthin-myristate-laurate	叶黄素
35	Car_35	紫黄质二肉豆蔻酸酯 Violaxanthin dimyristate	叶黄素
36	Car_36	紫黄质-肉豆蔻酸酯-棕榈酸酯 Violaxanthin-myristate-palmitate	叶黄素
37	Car_37	紫黄质二棕榈酸酯 Violaxanthin dipalmitate	叶黄素
38	Car_38	紫黄质-肉豆蔻酸酯-油酸酯 Violaxanthin-myristate-oleate	叶黄素
39	Car_39	紫黄质二油酸酯 Violaxanthin dioleate	叶黄素
40	Car_40	玉米黄质肉豆蔻油酸酯 Zeaxanthin myristoleate	叶黄素
41	Car_41	玉米黄质棕榈酸酯 Zeaxanthin palmitate	叶黄素
42	Car_42	玉米黄质-辛酸酯-月桂酸酯 Zeaxanthin-caprate-laurate	叶黄素
43	Car_43	玉米黄质二月桂酸酯 Zeaxanthin dilaurate	叶黄素
44	Car_44	玉米黄质-月桂酸酯-肉豆蔻酸酯 Zeaxanthin-laurate-myristate	叶黄素
45	Car_45	玉米黄质二肉豆蔻酸酯 Zeaxanthin dimyristate	叶黄素
46	Car_46	玉米黄质-月桂酸酯-棕榈酸酯 Zeaxanthin-laurate-palmitate	叶黄素
47	Car_47	玉米黄质-肉豆蔻酸酯-棕榈酸酯 Zeaxanthin-myristate-palmitate	叶黄素
48	Car_48	玉米黄质二棕榈酸酯 Zeaxanthin dipalmitate	叶黄素
49	Car_49	玉米黄质-棕榈酸酯-硬脂酸酯 Zeaxanthin-palmitate-stearate	叶黄素
50	Car_50	玉米黄质-油酸酯-棕榈酸酯 Zeaxanthin-oleate-palmitate	叶黄素
51	Car_51	β -隐黄质月桂酸 β -Cryptoxanthin laurate	叶黄素
52	Car_52	β -隐黄质肉豆蔻酸酯 β -Cryptoxanthin myristate	叶黄素
53	Car_53	β -隐黄质棕榈酸酯 β -Cryptoxanthin palmitate	叶黄素
54	Car_54	β -隐黄质油酸酯 β -Cryptoxanthin oleate	叶黄素
55	Car_55	花药黄质 Antheraxanthin	叶黄素
56	Car_56	玉米黄质 Zeaxanthin	叶黄素
57	Car_57	紫黄质 Violaxanthin	叶黄素
58	Car_58	新黄质 Neoxanthin	叶黄素
59	Car_59	叶黄素 Lutein	叶黄素
60	Car_60	β -隐黄质 β -Cryptoxanthin	叶黄素
61	Car_61	虾青素 Astaxanthin	叶黄素
62	Car_62	8'- β -阿朴胡萝卜素醛 8'-Apo- β -carotenal	叶黄素
63	Car_63	辣椒红素 Capsanthin	叶黄素
64	Car_64	α -隐黄质 α -Cryptoxanthin	叶黄素
65	Car_65	辣椒玉红素 Capsorubin	叶黄素
66	Car_66	角黄素 Canthaxanthin	叶黄素
67	Car_67	海胆烯酮 Echinenone	叶黄素
68	Car_68	β -柠乌素 β -Citraurin	叶黄素

2.2.2 样品前处理

红芪药材样品真空冷冻干燥后用球磨仪研磨(30 Hz, 1 min)至粉末状,称取 50 mg 研磨后的样本,用 0.5 mL 含 0.01% BHT(g/mL)的正己烷/丙酮/乙醇混合溶液(1:1:1, V/V/V)进行提取,室温下涡旋 20 min 后,4 °C 条件下,12 000 r/min,离心 5 min,取上清液,重复提取一次后离心合并上清液,将得到的提取液浓缩后,用 100 μ L 甲醇/甲基叔丁基醚混合溶液(1:1, V/V)复溶,过 0.22 μ m 滤膜后,保存于棕色进样瓶中,用于 LC-MS/MS 分析。

2.2.3 色谱质谱采集条件

数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)(ExionLC™ AD, <https://sciex.com.cn/>)和串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS)(QTRAP® 6 500+, <https://sciex.com.cn/>)。液相条件主要包括:

色谱柱:YMC C30(3 μ m, 100 mm \times 2.0 mm i. d.);流动相:A 相,甲醇/乙腈(1:3, V/V)加入 0.01% BHT 和 0.1% 甲酸;B 相,甲基叔丁基醚加入 0.01% BHT;梯度洗脱程序:0 min A/B 为 100:0(V/V),3 min 为 100:0(V/V),5 min 为 30:70(V/V),9 min 为 5:95(V/V),10 min 为 100:0(V/V),11 min 为 100:0(V/V);流速 0.8 mL/min;柱温 28 °C;进样量 2 μ L。质谱条件主要包括:大气压化学离子源(atmospheric pressure chemical ionization source, APCI)温度 350 °C,气帘气(curtain gas, CUR)25 psi。在 Q-Trap 6 500+ 中,每个离子对是根据优化的去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE)进行扫描检测。

2.2.4 类胡萝卜素类成分含量测定数据预处理

采用 Analyst 1.6.3 软件分析处理质谱数据,得到总离子流图(A)和提取离子流图(B)(见图 2),

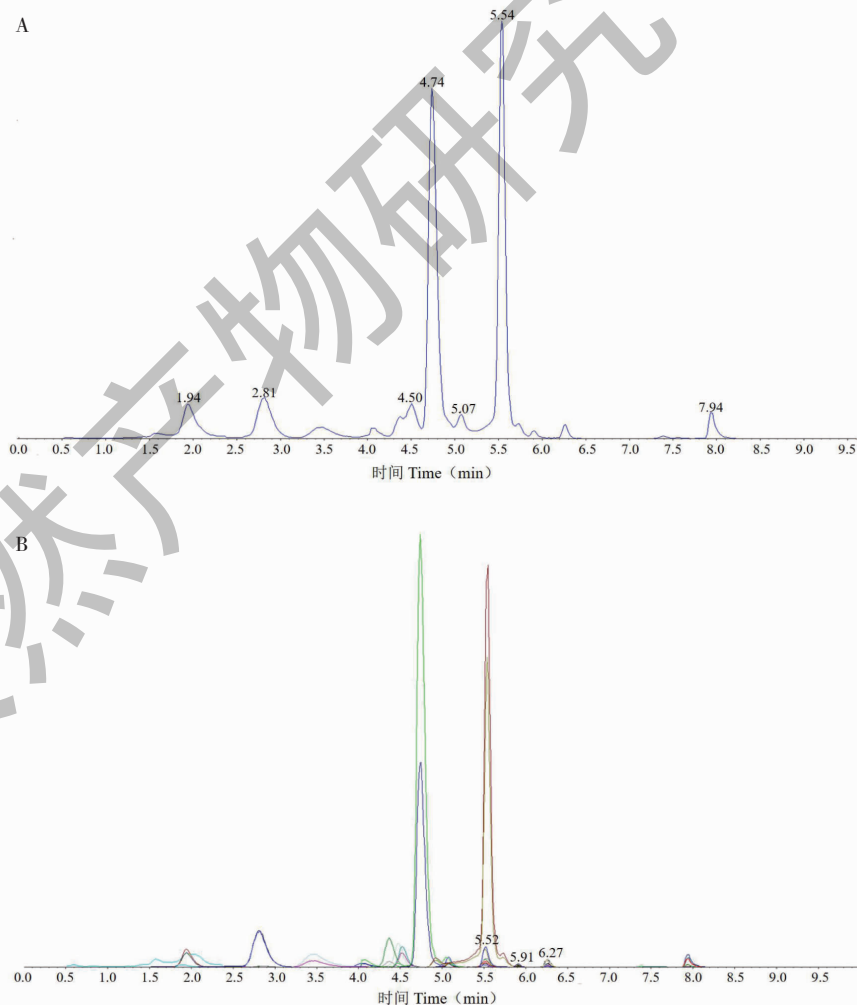


图 2 红芪样品的总离子流色谱图(A)和提取离子流色谱图(B)

Fig. 2 Total ion chromatogram (A) and extracted ion chromatogram (B) of Hedysari Radix samples

其横坐标为检测的保留时间 (min), 纵坐标为离子检测的离子流强度 (cps)。采用 MultiQuant 3.0.3 软件处理质谱数据, 参考标准品的保留时间与峰型信息, 对待测物在不同样本中检测到的色谱峰进行积分校正, 以确保定性定量的准确。

2.2.5 标准曲线绘制

取 Car_01 ~ Car_07、Car_48、Car_55 ~ Car_68, 共 22 种类胡萝卜素类成分的标准品配制 0.001、0.005、0.010、0.050、0.100、0.500、1.000、5.000、

10.000、50.000、100.000、250.000、400.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的标准品溶液, 获取各个浓度标准品的对应定量信号的色谱峰强度数据; 以标准品浓度为横坐标, 标准品峰面积为纵坐标, 绘制不同物质的标准曲线。其中 Car_8 ~ Car_47、Car_49 ~ Car_54, 共 46 种类胡萝卜素类成分以新黄质 (Car_58) 为对照, 采用半定量法进行测定。所检测物质的线性方程、相关系数、定量下限 (lower limit of quantification, LLOQ)、定量上限 (upper limit of quantitation, ULOQ) 见表 3。

表 3 类胡萝卜素类成分的线性方程

Table 3 Linear equations for carotenoids

物质简称 Compound abbreviation	t_R (min)	线性方程 Linear equation	相关系数 r	权重 Weighting	定量下限 LLOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量上限 ULOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Car_01	5.91	$y = 3.46281 \times 10^5 x + 1083.99781$	0.99458	$1/x^2$	0.0500	250.0000
Car_02	8.34	$y = 1.17062 \times 10^5 x - 569.47533$	0.99160	$1/x^2$	1.0000	250.0000
Car_03	7.39	$y = 5.65435 \times 10^4 x - 18140.05327$	0.99127	$1/x^2$	0.5000	250.0000
Car_04	6.26	$y = 6.91386 \times 10^4 x - 853.60233$	0.99463	$1/x^2$	2.0000	250.0000
Car_05	1.90	$y = 2.26494 \times 10^5 x - 801.01114$	0.99557	$1/x^2$	0.1000	25.0000
Car_06	4.98	$y = 1.03263 \times 10^5 x + 129.86713$	0.99666	$1/x^2$	0.5000	250.0000
Car_07	5.51	$y = 1.21098 \times 10^6 x - 1467.90989$	0.99413	$1/x^2$	0.0100	25.0000
Car_08	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_09	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_10	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_11	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_12	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_13	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_14	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_15	7.16	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_16	7.10	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_17	7.39	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_18	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_19	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_20	7.31	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_21	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_22	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_23	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_24	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_25	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_26	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_27	6.22	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_28	-	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_29	6.03	$y = 1.62798 \times 10^6 x - 189.25861$	0.99367	$1/x^2$	N/A	N/A

续表 3 (Continued Tab. 3)

物质简称 Compound abbreviation	t_R (min)	线性方程 Linear equation	相关系数 r	权重 Weighting	定量下限 LLOQ ($\mu\text{g/mL}$)	定量上限 ULOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Car_30	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_31	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_32	6.63	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_33	6.85	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_34	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_35	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_36	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_37	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_38	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_39	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_40	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_41	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_42	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_43	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_44	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.99 367	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_45	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_46	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_47	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_48	7.94	$y = 2.797\ 47e6\ x + 4\ 137.539\ 18$	0.996 27	$1/x^2$	0.500 0	5.000 0
Car_49	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_50	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_51	6.97	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_52	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_53	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_54	-	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	N/A	N/A
Car_55	2.86	$y = 5.792\ 00e5\ x + 313.496\ 95$	0.993 92	$1/x^2$	0.050 0	125.000 0
Car_56	4.63	$y = 2.991\ 49e5\ x - 731.123\ 82$	0.991 76	$1/x^2$	0.100 0	50.000 0
Car_57	1.58	$y = 3.241\ 66e6\ x - 980.486\ 23$	0.994 38	$1/x^2$	0.100 0	100.000 0
Car_58	1.95	$y = 1.627\ 98e6\ x - 189.258\ 61$	0.993 67	$1/x^2$	0.010 0	50.000 0
Car_59	4.05	$y = 6.993\ 52e5\ x + 287.406\ 13$	0.995 61	$1/x^2$	2.000 0	250.000 0
Car_60	5.52	$y = 4.842\ 21e5\ x - 1\ 428.273\ 43$	0.992 71	$1/x^2$	0.100 0	250.000 0
Car_61	3.47	$y = 3.204\ 67e6\ x - 566.005\ 47$	0.994 10	$1/x^2$	0.500 0	25.000 0
Car_62	4.53	$y = 2.270\ 99e6\ x - 3\ 245.462\ 21$	0.992 26	$1/x^2$	0.010 0	125.000 0
Car_63	4.48	$y = 3.287\ 54e6\ x - 7.928\ 45e4$	0.992 08	$1/x^2$	0.005 0	100.000 0
Car_64	5.08	$y = 6.430\ 21e5\ x - 2\ 554.690\ 30$	0.991 54	$1/x^2$	0.050 0	50.000 0
Car_65	4.37	$y = 3.131\ 33e6\ x - 1\ 466.669\ 91$	0.993 15	$1/x^2$	0.005 0	125.000 0
Car_66	4.74	$y = 3.773\ 04e7\ x - 10.891\ 73$	0.997 04	$1/x^2$	0.005 0	100.000 0
Car_67	5.54	$y = 1.690\ 30e7\ x - 1\ 226.133\ 36$	0.995 48	$1/x^2$	0.005 0	50.000 0
Car_68	2.81	$y = 5.434\ 72e6\ x - 380.887\ 48$	0.992 33	$1/x^2$	0.010 0	100.000 0

注: N/A 表示未检出。

Note: N/A means not detected.

2.2.6 样品含量测定

按照“2.2.2”样品前处理方法处理红芪样品,采用“2.2.3”色谱质谱采集条件进行进样,获得不

同样本的质谱分析数据后,对所有目标物的色谱峰进行积分,通过标准曲线进行定量分析。将检测到的所有红芪药材样本的积分峰面积代入标准曲线

性方程及公式(1)计算红芪样品中该类胡萝卜素类成分的含量。

$$\text{含量} = \frac{C \times V}{1000 \times m} \quad (1)$$

式中:含量单位为 $\mu\text{g/g}$, c 表示样本中积分峰面积代入标准曲线得到的浓度值($\mu\text{g/mL}$), V 表示复溶时所用溶液的体积(μL); m 表示称取的样本质量(g)。

2.2.7 样本质控分析

2.2.7.1 总离子流图分析

为确保检测仪器的稳定性,以混合溶液作为 QC

样本,在仪器分析过程中,每隔 10 个检测分析样本插入一个质控样本,通过对同一质控样本质谱检测分析的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)进行重叠展示分析,可以判断项目检测期间仪器的稳定性,仪器的高稳定性为数据的重复性和可靠性提供了重要的保障。由图 3 可知,代谢物检测总离子流的曲线重叠性高,即保留时间和峰强度均一致,表明质谱对同一样品不同时间检测时,信号稳定性较好。

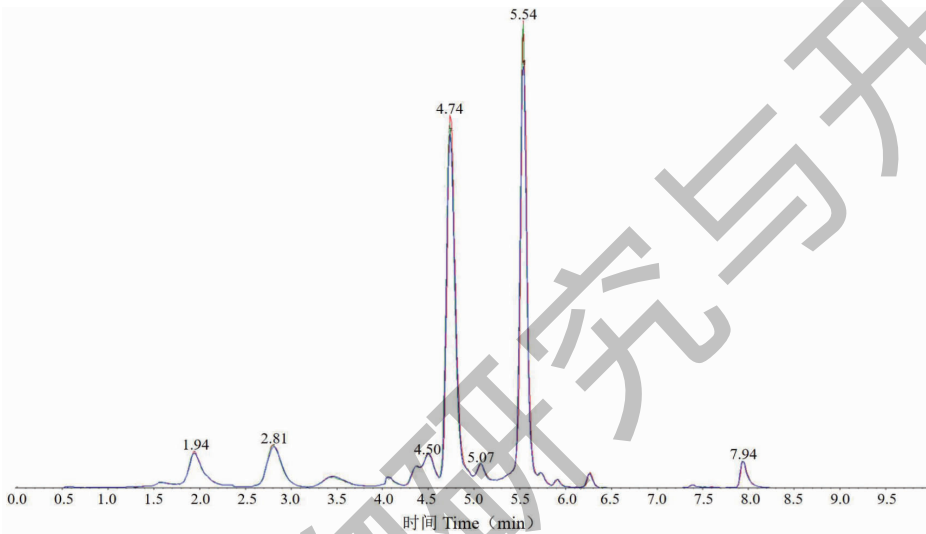


图 3 总离子流重叠图

Fig. 3 Overlapping chart of TIC

2.2.7.2 QC 样本的 CV 值分布图分析

CV 值即变异系数(coefficient of variation),是原始数据标准差与原始数据平均数的比,可反映数据离散程度。使用经验累积分布函数可以分析小于参考值的物质 CV 出现的频率,QC 样本的 CV 值较低

的物质占比越高,代表实验数据越稳定:QC 样本 CV 值小于 0.3 的物质占比高于 80%,表明实验数据稳定;QC 样本 CV 值小于 0.2 的物质占比高于 80%,表明实验数据非常稳定。由图 4 可知,类胡萝卜素类成分的实验数据较为稳定,图中横坐标代表 CV

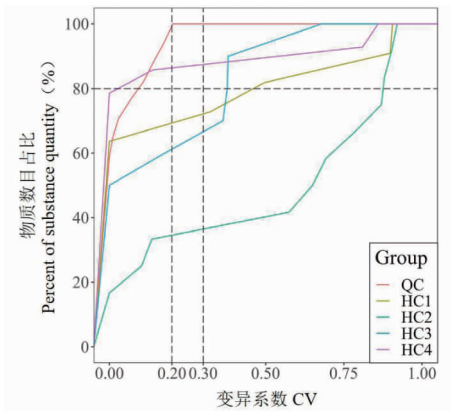


图 4 不同颜色红芪样品 CV 值分布图

Fig. 4 Distribution of CV values for Hedysari Radix samples with different color

值,纵坐标表示小于对应 CV 值的物质数目占总物质数的比例,不同颜色代表不同的分组样本,QC 为质控样本,其中与 X 轴垂直的两条参考线对应的 CV 值为 0.2 和 0.3,与 X 轴平行的参考线对应物质数目占总物质数的 80%。

2.3 数据统计分析

以不同颜色 4 组 12 份红芪样品的色度值数据,17 种类胡萝卜素类成分含量组成数据库(未检出的 51 种成分舍去,17 种成分中部分成分在部分样品未检出的数据处理时用 0 代替),开展单因素方差分析、PCA 分析、聚类分析、相关性分析、OPLS-DA 模型的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)与差异倍数(fold change, FC)相结合的差异性类胡萝卜素类代谢产物筛选,研究不同颜色红芪的色度值及类胡萝卜素类代谢产物的变化规律。

3 结果

3.1 不同颜色红芪样品的色度值分析

按照“2.1.2”项下样品测量方法,测定红芪色度值并记录(见表 4)。由表 4 可知,HC1 棕黄色颜色值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 及总色差 ΔE_{ab}^* 的范围分别为 82.62 ~ 84.15、4.46 ~ 4.49、13.96 ~ 15.91、14.66 ~ 16.53、72.21 ~ 74.23、5.88 ~ 7.24。HC2 红棕色颜色值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 及总色差 ΔE_{ab}^* 的范围分别为 75.38 ~ 79.89、4.74 ~ 5.16、12.71 ~ 15.25、

13.63 ~ 16.10、68.77 ~ 71.30、1.58 ~ 2.97。HC3 红褐色颜色值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 及总色差 ΔE_{ab}^* 的范围分别为 78.23 ~ 81.44、3.95 ~ 4.32、11.52 ~ 14.62、12.31 ~ 15.23、69.44 ~ 73.81、1.66 ~ 4.75。HC4 黄棕色颜色值 L^* 、 a^* 、 b^* 、 C^* 、 h° 及总色差 ΔE_{ab}^* 的范围分别为 79.64 ~ 85.41、4.40 ~ 5.03、13.51 ~ 13.95、14.41 ~ 14.66、69.59 ~ 72.37、2.80 ~ 8.49。6 个颜色值的均值显示, L^* 值: HC1 棕黄色 > HC4 黄棕色 > HC3 红褐色 > HC2 红棕色; a^* 值: HC2 红棕色 > HC4 黄棕色 > HC1 棕黄色 > HC3 红褐色; b^* 值: HC1 棕黄色 > HC4 黄棕色 > HC2 红棕色 > HC3 红褐色; C^* 值: HC1 棕黄色 > HC2 红棕色 = HC4 黄棕色 > HC3 红褐色; h° 值: HC1 棕黄色 > HC3 红褐色 > HC4 黄棕色 > HC2 红棕色; 总色差 ΔE_{ab}^* 值: HC1 棕黄色 > HC4 黄棕色 > HC3 红褐色 > HC2 红棕色。

以此为数据采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析发现(见表 5),不同颜色的 4 组样品间 L^* ($P = 0.000 < 0.01$)、 a^* ($P = 0.000 < 0.01$)、 b^* ($P = 0.011 < 0.05$)、 C^* ($P = 0.008 < 0.01$)、 h° ($P = 0.001 < 0.01$) 及 ΔE_{ab}^* ($P = 0.000 < 0.01$) 值均有显著性差异,其中不同颜色红芪样品间 L^* 、 a^* 、 C^* 、 h° 及 ΔE_{ab}^* 值达极显著性差异, b^* 值达显著性差异,说明肉眼主观判别的颜色具有代表性,能反映出样品颜色的差异。

表 4 红芪样品颜色值

Table 4 Color values of Hedysari Radix samples

组别 Group	L^*	a^*	b^*	C^*	h°	ΔE_{ab}^*
HC1	83.18 ± 0.84	4.48 ± 0.02	14.62 ± 1.12	15.29 ± 1.07	72.91 ± 1.14	6.47 ± 0.70
HC2	77.23 ± 2.36	4.95 ± 0.21	13.66 ± 1.38	14.53 ± 1.36	70.03 ± 1.27	2.25 ± 0.70
HC3	80.23 ± 1.75	4.17 ± 0.20	12.85 ± 1.59	13.52 ± 1.52	71.87 ± 2.23	3.61 ± 1.69
HC4	82.62 ± 2.89	4.65 ± 0.34	13.76 ± 0.23	14.53 ± 0.13	71.35 ± 1.53	5.72 ± 2.85

表 5 不同颜色红芪样品色度值的单因素方差分析

Table 5 One-way ANOVA on the color values of Hedysari Radix samples with different color

颜色值 Color value	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
L^*	198.292	3	66.097	19.878	0.000
a^*	2.815	3	0.938	24.642	0.000
b^*	14.073	3	4.691	4.324	0.011
C^*	14.235	3	4.745	4.715	0.008
h°	38.716	3	12.905	6.687	0.001
ΔE_{ab}^*	100.907	3	33.636	15.012	0.000

3.2 不同颜色红芪样品类胡萝卜素代谢产物检测结果

按照“2.2.6”方法测定不同颜色红芪样品类胡萝卜素代谢产物含量,共计检测 68 种类胡萝卜素类成分(见表 2),其中检测出 17 种成分,包含 2 种胡萝卜素与 15 种叶黄素类成分。已检出的物质在不同颜色组别之间的含量差异见图 5、表 6。由图 5、表 6 可知,4 种颜色间 17 种类胡萝卜素成分含量间具有差异,Car_01、Car_17、Car_20 三种成分在 HC2 红棕色、HC3 红褐色样品中均有检出,且都在 HC3 红褐色样品中含量最高,其平均含量分别为 0.036

9、0.016 3、0.010 8 $\mu\text{g/g}$,而在 HC1 棕黄色、HC4 黄棕色样品中未检出;Car_04 只在 HC2 红棕色中检出 0.028 6 $\mu\text{g/g}$,在 HC1 棕黄色、HC3 红褐色、HC4 黄棕色样品中均未检出;Car_15、Car_56、Car_67 三种成分在 HC1 棕黄色、HC2 红棕色、HC3 红褐色中均有检出,且 Car_15 在 HC3 中含量最高 0.047 2 $\mu\text{g/g}$,Car_56、Car_67 在 HC2 中含量最高,其平均含量分别为 0.049 6、0.000 5 $\mu\text{g/g}$,而在 HC4 黄棕色样品中未检出;Car_16 在 HC2 红棕色、HC4 黄棕色样品中均有检出,且在 HC2 中含量最高 0.010 7 $\mu\text{g/g}$,在 HC1 棕黄色、HC3 红褐色样品中未检出;Car_

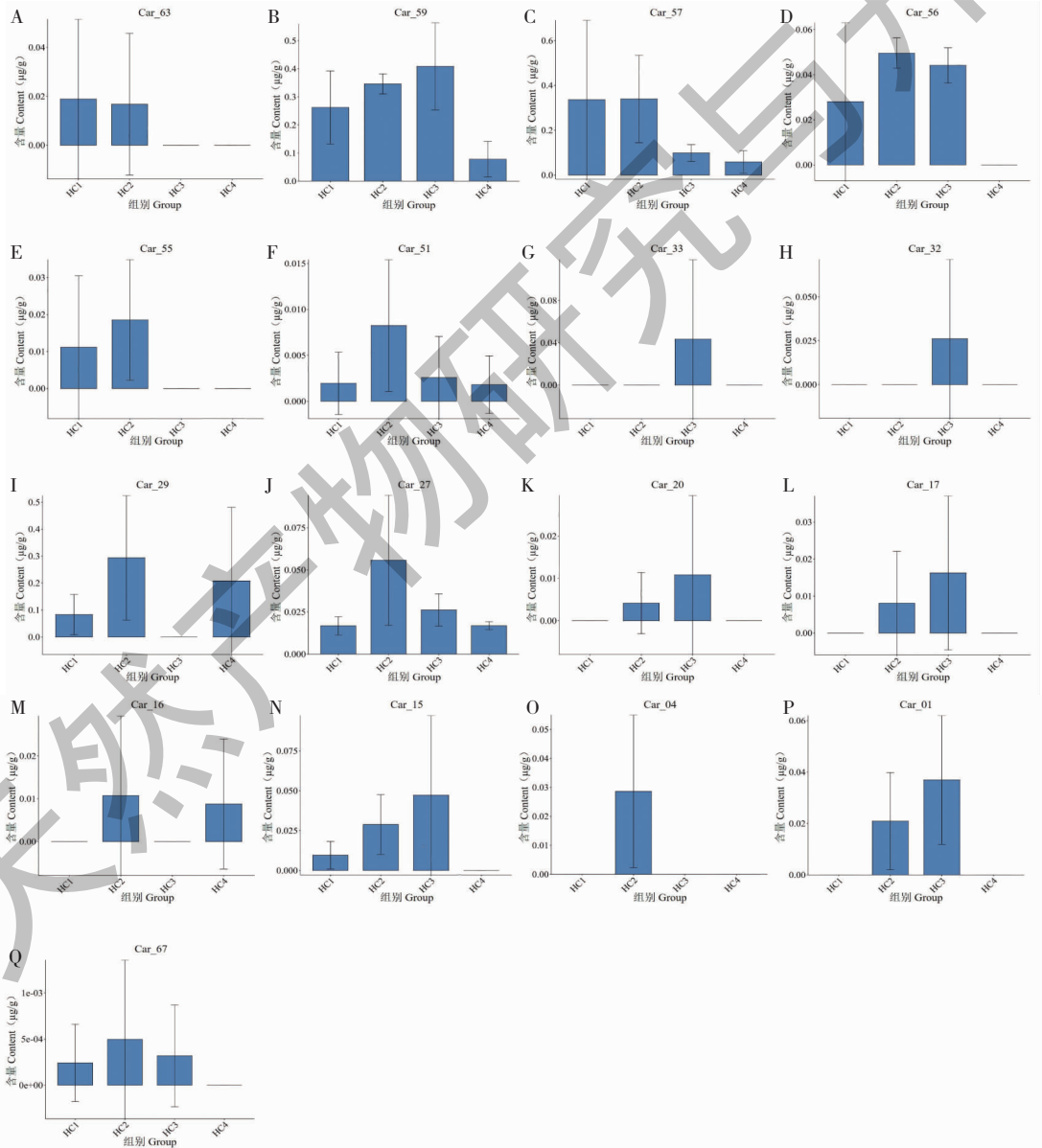


图 5 不同颜色组别中类胡萝卜素类成分含量分布

Fig. 5 Distribution of carotenoid metabolites contents in different color groups

27、Car_51、Car_57、Car_59 四种成分在 HC1、HC2、HC3、HC4 四种颜色样品中均有检出,其中 Car_27、Car_51、Car_57 三种成分在 HC2 红棕色样品中含量最高,其平均含量分别为 0.055 7、0.008 2、0.339 2 $\mu\text{g/g}$,而 Car_59 在 HC3 红褐色样品中含量最高 0.408 7 $\mu\text{g/g}$;Car_29 在 HC1 棕黄色、HC2 红棕色、HC4 黄棕色样品中均有检出,且在 HC2 中含量最高 0.293 7 $\mu\text{g/g}$,而在 HC3 红褐色样品中未检出;Car_32、Car_33 两种成分只在 HC3 红褐色样品中检出,其平均含量分别为 0.026 1、0.043 4 $\mu\text{g/g}$,在 HC1

棕黄色、HC2 红棕色、HC4 黄棕色样品中均未检出;Car_55、Car_63 两种成分在 HC1 棕黄色、HC2 红棕色样品中均有检出,且 Car_55 在 HC2 中含量最高 0.018 5 $\mu\text{g/g}$,Car_63 在 HC1 中含量最高 0.018 9 $\mu\text{g/g}$,而在 HC3 红褐色、HC4 黄棕色样品中均未检出,说明 17 种类胡萝卜素类成分在不同颜色红芪样品中的分布具有差异性。在此基础上,进一步由单因素方差分析结果(见表 7)可知,4 种颜色样品间 Car_59、Car_56 两种成分具有显著性差异($P < 0.05$),其他 15 种成分差异性未达显著。

表 6 不同颜色红芪样品中类胡萝卜素类成分的含量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Content of carotenoids in Hedysari Radix samples with different color ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

物质简称 Compound abbreviation	含量 Content($\mu\text{g/g}$)			
	HC1	HC2	HC3	HC4
Car_01	-	0.020 9 \pm 0.018 9	0.036 9 \pm 0.025 1	-
Car_04	-	0.028 6 \pm 0.026 4	-	-
Car_15	0.009 6 \pm 0.008 7	0.028 8 \pm 0.018 7	0.047 2 \pm 0.050 0	-
Car_16	-	0.010 7 \pm 0.018 6	-	0.008 8 \pm 0.015 2
Car_17	-	0.008 1 \pm 0.014 0	0.016 3 \pm 0.020 8	-
Car_20	-	0.004 2 \pm 0.007 2	0.010 8 \pm 0.018 8	-
Car_27	0.016 8 \pm 0.005 4	0.055 7 \pm 0.038 6	0.026 2 \pm 0.009 5	0.016 9 \pm 0.002 3
Car_29	0.083 3 \pm 0.074 8	0.293 7 \pm 0.230 8	-	0.208 1 \pm 0.273 0
Car_32	-	-	0.026 1 \pm 0.045 3	-
Car_33	-	-	0.043 4 \pm 0.075 2	-
Car_51	0.002 0 \pm 0.003 4	0.008 2 \pm 0.007 2	0.002 6 \pm 0.004 5	0.001 8 \pm 0.003 1
Car_55	0.011 2 \pm 0.019 3	0.018 5 \pm 0.016 3	-	-
Car_56	0.028 1 \pm 0.035 1	0.049 6 \pm 0.006 7	0.044 1 \pm 0.007 8	-
Car_57	0.336 5 \pm 0.354 6	0.339 2 \pm 0.195 1	0.098 7 \pm 0.037 2	0.059 0 \pm 0.050 8
Car_59	0.262 3 \pm 0.129 9	0.346 1 \pm 0.035 7	0.408 7 \pm 0.155 2	0.078 1 \pm 0.063 3
Car_63	0.018 9 \pm 0.032 7	0.016 7 \pm 0.029 0	-	-
Car_67	0.000 2 \pm 0.000 4	0.000 5 \pm 0.000 9	0.000 3 \pm 0.000 6	-

注:“-”表示未检出。

Note:“-” means not detected.

表 7 不同颜色红芪中类胡萝卜素类成分单因素方差分析

Table 7 One-way ANOVA on the contents of carotenoids in Hedysari Radix samples with different color

物质简称 Compound abbreviation	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F-value	P 值 P-value
Car_01	0.003	3.000	0.001	3.929	0.054
Car_04	0.002	3.000	0.001	3.539	0.068
Car_27	0.003	3.000	0.001	2.511	0.132
Car_57	0.204	3.000	0.068	1.617	0.261
Car_59	0.186	3.000	0.062	5.350	0.026

续表 7 (Continued Tab. 7)

物质简称 Compound abbreviation	平方和 Sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	<i>F</i> 值 <i>F</i> -value	<i>P</i> 值 <i>P</i> -value
Car_15	0.004	3.000	0.001	1.803	0.224
Car_56	0.004	3.000	0.001	4.445	0.041
Car_29	0.153	3.000	0.051	1.526	0.281
Car_51	0.000	3.000	0.000	1.229	0.361
Car_17	0.001	3.000	0.000	1.150	0.387
Car_67	0.000	3.000	0.000	0.421	0.743
Car_55	0.001	3.000	0.000	1.551	0.275
Car_16	0.000	3.000	0.000	0.673	0.592
Car_20	0.000	3.000	0.000	0.777	0.539
Car_63	0.001	3.000	0.000	0.669	0.594
Car_32	0.002	3.000	0.001	1.000	0.441
Car_33	0.004	3.000	0.001	1.000	0.441

3.3 不同颜色红芪样品类胡萝卜素类代谢产物的 PCA 分析

为分析不同颜色红芪样品间类胡萝卜素类成分的变化特征,采用 SIMCA 14.1 软件中非监督模式识别的主成分分析 (principal component analysis, PCA) 方法分析数据。不同颜色红芪样品间类胡萝卜素成分的 PCA 散点图 6 (PC1 41.5%、PC2 23.1%) 显示,不同颜色的 4 组 12 份样品均在 95% 的置信区间内,HC1 (H1、H2、H3) 棕黄色,HC2 (H4、H5、H6 红棕色),HC3 (H7、H8、H9 为红褐色) 样品分布较为分散,HC4 (H10、H11、H12) 黄棕色分布较

为紧密,进一步分析发现,H10、H11、H12、H2、H3 分布较为接近,类胡萝卜素类成分信息量较为相似,H4、H8、H9 分布较为接近,类胡萝卜素类成分信息量较为相似,H1、H5 分布较为接近,类胡萝卜素类成分信息量较为相似,H6、H7 分布较为接近,类胡萝卜素类成分信息量较为相似,4 种颜色样品间类胡萝卜素类成分的分布存在交叉信息与共有信息共存特征。4 种颜色整体物质信息组成显示,红芪药材颜色的变化特征与类胡萝卜素类成分存在联系,类胡萝卜素类成分对红芪药材颜色的形成具有贡献。

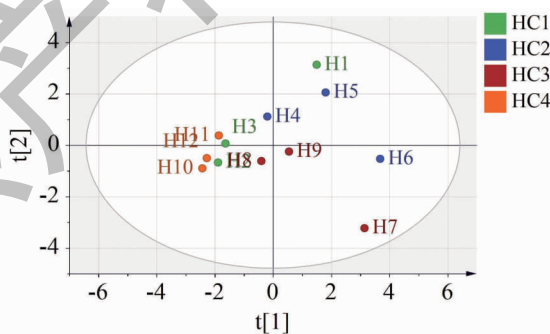


图 6 不同颜色红芪样品间类胡萝卜素成分的 PCA 图

Fig. 6 PCA score plots of carotenoids in Hedysari Radix samples with different color

3.4 不同颜色红芪样品类胡萝卜素类代谢产物的聚类分析

分析不同颜色红芪样品类胡萝卜素代谢产物的聚类特征,对不同颜色 4 组 12 份红芪样品 17 种类胡萝卜素代谢物含量数据采用 UV (unit variance scaling) 归一化方法处理,通过 R 软件 ComplexHeat-

map 包中 R 程序脚本的绘制聚类热图,对代谢物在不同颜色红芪样品间的积累模式进行层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA),代谢物和样品同时进行聚类分析 (见图 7)。图 7 左侧聚类线为代谢物聚类线,中上方聚类线为样品聚类线。由图可知,4 组 12 份样品聚为 4 类,H2、H3、H8、H10、H11、

H12 聚为一类, H1、H5、H6、H9 为一类, H4 为一类, H7 为一类, 结合样品信息表主观颜色分类, H1、H2、H3 为棕黄色, H4、H5、H6 为红棕色, H7、H9、H8 为红褐色, H10、H11、H12 为黄棕色, 说明主观颜色分类与类胡萝卜素代谢产物分类一致性不高, 未严格按照 4 种颜

色聚类, 不同颜色的样品间类胡萝卜素代谢产物种类具有一定的同一性, 同一颜色红芪药材样品间类胡萝卜素代谢产物含量具有差异性, 颜色与类胡萝卜素代谢产物含量间存在一定关系, 不同颜色的红芪样品间存在差异性代谢物。

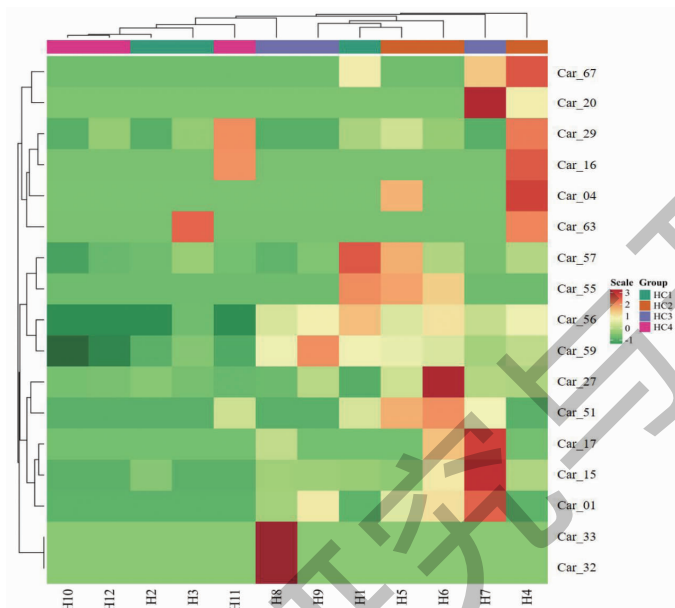


图 7 不同颜色红芪样品类胡萝卜素代谢产物聚类热图

Fig. 7 Clustering heat map of carotenoids from Hedysari Radix samples with different color

3.5 红芪样品色度值与类胡萝卜素类成分的相关性分析

关联分析方法采用 pearson, 关联分析阈值为 0.55 (根据样品色度值与类胡萝卜素类成分含量相

关系数高于 0.55 且显著或极显著相关筛选), 显著性 (P 值) 阈值为 0.05, 作图计算范围为“组间或组内”, 采用迈维代谢云平台“高级相关性网络图”组件作图 (见图 8)。由图 8 可知与红芪颜色值 L^* 呈

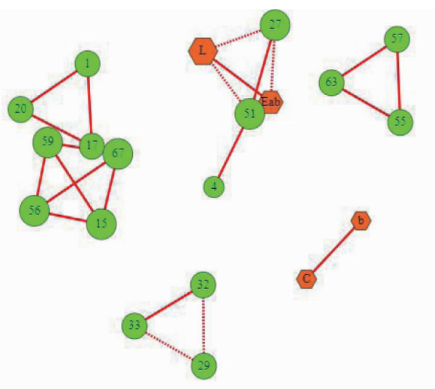


图 8 红芪样品色度值与类胡萝卜素类成分的相关性网络图

Fig. 8 Network diagram of correlation between color values and carotenoids

注: 红色实线代表正相关, 红色虚线代表负相关; 六边形字母代表不同色度值, 六边形大小与关联成分的多少呈正相关; 绿色圆圈中的数字为类胡萝卜素类代谢产物后缀编号, 如 Car₂₇, 用“27”表示。Note: The red solid lines represent positive correlations and the dotted lines negative correlations; the hexagonal letters represent different chromaticity values and the size of the hexagon is positively correlated with the number of associated components; the numbers in the green circles are carotenoid metabolite suffix numbers, e. g. Car₂₇, indicated by "27".

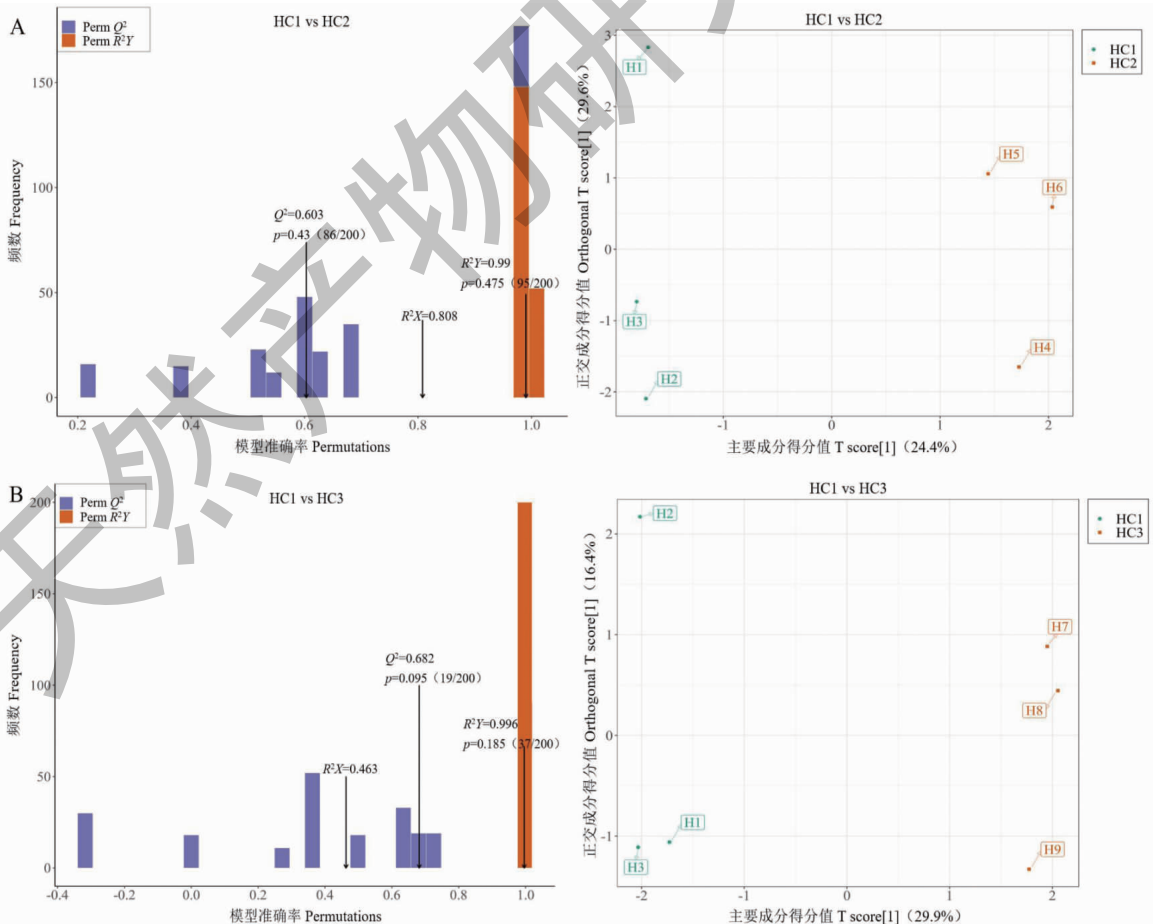
显著负相关的类胡萝卜素代谢产物有 2 个 (Car_51、Car_27), 与总色差 ΔE_{ab}^* 值呈显著负相关的类胡萝卜素代谢产物 1 个 (Car_27), 与其他类胡萝卜素类成分的相关性未达显著; L^* 与总色差 ΔE_{ab}^* 值间呈显著正相关, 颜色值 b^* 与 C^* 间呈显著的正相关性, 部分类胡萝卜素成分间存在显著的正相关或负相关关系。

3.6 不同颜色红芪样品类胡萝卜素类代谢产物筛选

为进一步分析 HC1 组棕黄色、HC2 组红棕色、HC3 组红褐色、HC4 组黄棕色红芪样品间类胡萝卜素类代谢产物的差异性规律及差异性代谢物, 建立正交偏最小二乘法判别分析模型 (OPLS-DA), 分别比较 HC1 与 HC2, HC1 与 HC3, HC1 与 HC4, HC2 与 HC3, HC2 与 HC4, HC3 与 HC4 间的差异性代谢产物。正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 结合了正交信号矫正 (OSC) 和 PLS-DA 方法, 能够将 X 矩阵信息分解成与 Y 相关和不相关的两类信息, 通过去除不相关的差异来筛选差异变量。OPLS-DA

对原始数据进行 \log_2 转换后, 再进行中心化处理, 然后利用 R 软件中的 MetaboAnalystR 包 OPLSR. Anal 函数进行 OPLS-DA 模型建立, 根据 OPLS-DA 模型分析代谢组数据, 绘制各分组的得分图, 进一步展示各个分组之间的差异, 筛选变量重要性投影 VIP 值 ≥ 1 的代谢物, 作为差异性代谢物。评价模型的预测参数有 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 , 其中 R^2X 和 R^2Y 分别表示所建模型对 X 和 Y 矩阵的解释率, Q^2 表示模型的预测能力, 理论上接近于 1 时表示模型越稳定可靠, 值越低说明模型的拟合准确性较差, $Q^2 \geq 0.4$ 较为理想, $Q^2 > 0.9$ 时为出色的模型^[22]。

HC1 与 HC2、HC1 与 HC3、HC1 与 HC4、HC2 与 HC3、HC2 与 HC4、HC3 与 HC4 间的类胡萝卜素类差异性代谢产物 OPLS-DA 模型见图 9。由图 9 可知, HC1 与 HC2、HC1 与 HC3、HC1 与 HC4、HC2 与 HC3、HC2 与 HC4、HC3 与 HC4 等 6 个比较组的 OPLS-DA 模型中 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 值符合要求, 初步获得 OPLS-DA 模型的变量重要性投影 VIP ≥ 1 的代谢物, 筛选出的不同颜色红芪样品间差异类胡萝卜



续图 9 (Continued Fig.9)

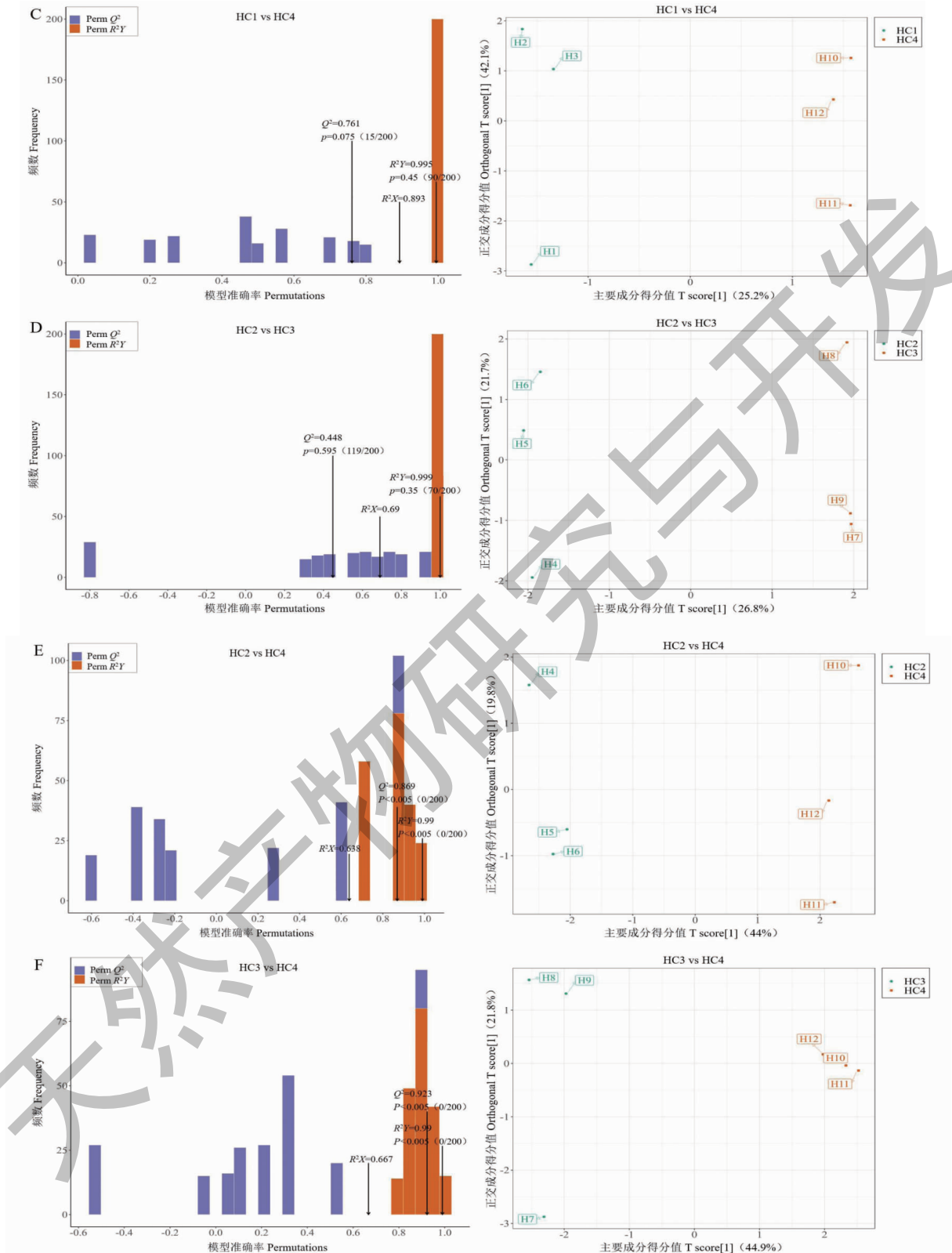


图9 不同颜色红芪 OPLS-DA 模型

Fig. 9 OPLS-DA models of Hedysari Radix samples with different color

注:左图为 OPLS-DA 模型验证 Permutation Test 图;右图为 OPLS-DA 得分图。Note: The left is permutation test plot for OPLS-DA model validation; The right is scores of OPLS-DA plot.

素类代谢物具有意义。

基于 OPLS-DA 结果,从获得的多变量分析 OPLS-DA 模型的 VIP 值,初步筛选出不同颜色红芪样品间差异类胡萝卜素类代谢物。因代谢组学数据具有“高维、海量”的特点,因此需要结合单变量统计分析和多元统计分析的方法,并根据数据特性从多角度分析,最终准确地挖掘差异代谢物。本研究不同组之间存在 3 个生物学重复,因此采取差异倍数 FC 与 VIP 值相结合的方法来进一步准确筛选差异代谢物。对于两组比较,选取 $VIP \geq 1$ 的代谢物 (VIP 值表示对应代谢物的组间差异在模型中各组样本分类判别中的影响强度,一般认为 $VIP \geq 1$ 的代谢物则为差异显著),同时选取 $FC \geq 2$ 和 $FC \leq 0.5$ 的代谢物(代谢物在对照和实验组中差异为 2 倍以上或 0.5 以下,则认为差异显著)进行差异性代谢产物筛选,HC1 与 HC2、HC1 与 HC3、HC1 与

HC4、HC2 与 HC3、HC2 与 HC4、HC3 与 HC4 间的类胡萝卜素类差异性代谢产物见表 8。由表 8 可知,HC1 棕黄色与 HC2 红棕色、HC1 棕黄色与 HC3 红褐色、HC1 棕黄色与 HC4 黄棕色、HC2 红棕色与 HC3 红褐色、HC2 红棕色与 HC4 黄棕色、HC3 红褐色与 HC4 黄棕色的差异性类胡萝卜素类代谢产物分别为 6 个、4 个、4 个、5 个、6 个、6 个,4 种颜色间涉及的差异性代谢产物主要为 10 种,分别为 Car_01 (α -胡萝卜素)、Car_04 (β -胡萝卜素)、Car_15 (叶黄素二月桂酸酯)、Car_17 (叶黄素二肉豆蔻酸酯)、Car_27 (紫黄质二丁酸酯)、Car_29 (紫黄质肉豆蔻酸酯)、Car_55 (花药黄质)、Car_56 (玉米黄质)、Car_57 (紫黄质)、Car_59 (叶黄素),棕黄色、红棕色、红褐色与黄棕色红芪样品的颜色形成可能与上述代谢产物有关。

表 8 不同颜色红芪类胡萝卜素类差异性代谢产物

Table 8 Differential metabolites of carotenoids from *Hedysari Radix* with different color

组别 Group	物质简称 Compound abbreviation	物质名称 Compound name	变量重要性投影 VIP	P 值 P value	差异倍数 FC	Log ₂ FC
HC1 vs HC2	Car_01	α -胡萝卜素 α -Carotene	1.43	0.20	Inf	Inf
	Car_04	β -胡萝卜素 β -Carotene	1.30	0.20	Inf	Inf
	Car_27	紫黄质二丁酸酯 Violaxanthin dibutyrate	1.67	0.22	3.32	1.73
	Car_15	叶黄素二月桂酸酯 Lutein dilaurate	1.14	0.21	3.01	1.59
	Car_29	紫黄质肉豆蔻酸酯 Violaxanthin myristate	1.03	0.25	3.53	1.82
	Car_17	叶黄素二肉豆蔻酸酯 Lutein dimyristate	1.06	N/A	Inf	Inf
HC1 vs HC3	Car_01	α -胡萝卜素 α -Carotene	1.80	0.13	Inf	Inf
	Car_15	叶黄素二月桂酸酯 Lutein dilaurate	1.08	0.32	4.93	2.30
	Car_29	紫黄质肉豆蔻酸酯 Violaxanthin myristate	1.26	0.19	0.00	-Inf
	Car_17	叶黄素二肉豆蔻酸酯 Lutein dimyristate	1.32	0.31	Inf	Inf
HC1 vs HC4	Car_57	紫黄质 Violaxanthin	1.28	0.31	0.18	-2.51
	Car_59	叶黄素 Lutein	1.47	0.12	0.30	-1.75
	Car_15	叶黄素二月桂酸酯 Lutein dilaurate	1.48	0.20	0.00	-Inf
	Car_56	玉米黄质 Zeaxanthin	1.35	0.30	0.00	-Inf
HC2 vs HC3	Car_04	β -胡萝卜素 β -Carotene	1.40	0.20	0.00	-Inf
	Car_27	紫黄质二丁酸酯 Violaxanthin Dibutyrate	1.11	0.32	0.47	-1.09
	Car_57	紫黄质 Violaxanthin	1.63	0.16	0.29	-1.78
	Car_29	紫黄质肉豆蔻酸酯 Violaxanthin myristate	1.92	0.16	0.00	-Inf
	Car_55	花药黄质 Antheraxanthin	1.37	0.19	0.00	-Inf
HC2 vs HC4	Car_04	β -胡萝卜素 β -Carotene	1.08	0.20	0.00	-Inf
	Car_27	紫黄质二丁酸酯 Violaxanthin dibutyrate	1.19	0.22	0.30	-1.72
	Car_57	紫黄质 Violaxanthin	1.12	0.12	0.17	-2.52

续表 8(Continued Tab. 8)

组别 Group	物质简称 Compound abbreviation	物质名称 Compound name	变量重要性投影 VIP	<i>P</i> 值 <i>P</i> value	差异倍数 FC	Log ₂ FC
	Car_59	叶黄素 Lutein	1.29	0.01	0.23	-2.15
	Car_15	叶黄素二月桂酸酯 Lutein dilaurate	1.49	0.12	0.00	-Inf
	Car_56	玉米黄质 Zeaxanthin	1.50	0.01	0.00	-Inf
HC3 vs HC4	Car_01	α-胡萝卜素 α-Carotene	1.46	0.13	0.00	-Inf
	Car_59	叶黄素 Lutein	1.22	0.05	0.19	-2.39
	Car_15	叶黄素二月桂酸酯 Lutein dilaurate	1.46	0.24	0.00	-Inf
	Car_56	玉米黄质 Zeaxanthin	1.48	0.01	0.00	-Inf
	Car_29	紫黄质肉豆蔻酸酯 Violaxanthin myristate	1.04	0.32	Inf	Inf
	Car_17	叶黄素二肉豆蔻酸酯 Lutein dimyristate	1.10	0.31	0.00	-Inf

注:Log₂FC 表示差异倍数以 2 为底取对数;Inf 表示无穷大;-Inf 表示负无穷。

Note:Log₂FC means difference multiplier logged at 2;Inf means infinity;-Inf means negative infinity.

4 讨论与结论

本文以不同颜色红芪样品为研究对象,采用精密色差仪、LC-MS/MS 等检测方法,测定了不同颜色红芪样品的颜色值及 68 种类胡萝卜素类代谢产物(检测出 17 种)的含量,应用单因素方差分析、PCA 分析、聚类分析、相关性分析、OPLS-DA 模型的变量重要性投影 VIP 与差异倍数等方法,研究不同颜色红芪间颜色值及类胡萝卜素类代谢产物的变化规律,研究红芪颜色与类胡萝卜素类成分的关联关系。结果显示,棕黄色、红棕色、红褐色、黄棕色红芪样品的 6 个颜色值 L^* 值范围为 75.38 ~ 85.41, a^* 值范围 3.95 ~ 5.16, b^* 值范围 11.52 ~ 15.91, C^* 值范围为 12.31 ~ 16.53, h° 值范围为 68.77 ~ 74.23, 总色差 ΔE_{ab}^* 值范围为 1.58 ~ 8.49。HC1 棕黄色的 L^* 值、 b^* 值、 C^* 值、 h° 值、总色差 ΔE_{ab}^* 值在 4 种颜色中最高,HC2 红棕色 a^* 值在 4 种颜色中最高, L^* 值、 h° 值、总色差 ΔE_{ab}^* 值在 4 种颜色中最低,HC3 红褐色 a^* 值、 b^* 值、 C^* 值在 4 种颜色中最低。HC4 黄棕色的 6 个颜色值分布处于中间水平。不同颜色的 4 组红芪样品间 L^* 、 a^* 、 C^* 、 h° 及 ΔE_{ab}^* 值达极显著性差异, b^* 值达显著性差异,说明肉眼主观判别的颜色具有代表性,能反映出红芪样品间颜色的差异。

类胡萝卜素类成分检测结果显示,不同颜色红芪样品中共计检测 68 种类胡萝卜素类成分,其中检测出 17 种成分,包含 2 种胡萝卜素与 15 种叶黄素类成分,未检出的代谢产物可能是因不含此类成分或者其含量低于仪器的检测限度。进一步对其含量分析发现,4 种颜色样品间 17 种类胡萝卜素类成分含量存在极大值与极小值的特征,在不同颜色红芪

样品中的分布具有差异性,4 种颜色样品间叶黄素、玉米黄质两种成分具有显著性差异($P < 0.05$),其他 15 种成分差异性未达显著。药材中类胡萝卜素等成分的合成受到光、采收、产地加工及炮制的影响,因此差异性的形成可能与这些因子的综合作用有关^[10]。

PCA 研究结果显示,4 种颜色红芪样品间类胡萝卜素类成分的分布存在交叉信息与共有信息共存特征。红芪药材颜色的变化特征与类胡萝卜素类代谢产物存在联系,类胡萝卜素类成分对红芪药材颜色的形成具有贡献。HCA 结果显示,主观颜色分类与类胡萝卜素代谢产物分类一致性不高,未严格按照 4 种颜色聚类,不同颜色的样品间类胡萝卜素代谢产物种类具有一定的同一性,同一颜色红芪药材样品间类胡萝卜素代谢产物含量具有差异性,颜色与类胡萝卜素代谢产物含量间存在一定关系,不同颜色的红芪样品间存在差异性代谢物,与 PCA 得到的结果具有相似性。

相关性分析结果显示,红芪颜色值与类胡萝卜素类代谢产物含量间存在关联关系,红芪颜色值 L^* 呈显著负相关的类胡萝卜素代谢产物有 2 个,分别为 β -隐黄质月桂酸和紫黄质二丁酸酯,与总色差 ΔE_{ab}^* 值呈显著负相关的类胡萝卜素代谢产物有 1 个,为紫黄质二丁酸酯,与其他类胡萝卜素类成分的相关性未达显著; L^* 与总色差 ΔE_{ab}^* 值间呈显著正相关,颜色值 b^* 与 C^* 间呈显著的正相关性;部分类胡萝卜素成分间存在显著的正相关或负相关关系,说明在红芪生长过程类胡萝卜素成分间的生物合成途径上存在关联信息。上述结果印证了单因素方差分

析、PCA、HCA 的分析结果。

OPLS-DA 模型的变量重要性投影 VIP 与差异倍数相结合的方法筛选不同颜色红芪间类胡萝卜素类代谢产物结果显示,HC1 棕黄色与 HC2 红棕色、HC1 棕黄色与 HC3 红褐色、HC1 棕黄色与 HC4 黄棕色、HC2 红棕色与 HC3 红褐色、HC2 红棕色与 HC4 黄棕色、HC3 红褐色与 HC4 黄棕色的差异性类胡萝卜素类代谢产物分别为 6 个、4 个、4 个、5 个、6 个、6 个,4 种颜色间涉及的差异性代谢产物主要为 10 种,分别为 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素二月桂酸酯、叶黄素二肉豆蔻酸酯、紫黄质二丁酸酯、紫黄质肉豆蔻酸酯、花药黄质、玉米黄质、紫黄质、叶黄素。

结合其他分析结果,与颜色值具有显著关系的两种成分为 β -隐黄质月桂酸、紫黄质二丁酸酯,不同颜色红芪样品间类胡萝卜素类成分单因素方差分析具有显著性差异的叶黄素、玉米黄质两种成分,因此,与红芪颜色有相关性的成分主要有 11 种,分别为 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素二月桂酸酯、叶黄素二肉豆蔻酸酯、紫黄质二丁酸酯、紫黄质肉豆蔻酸酯、花药黄质、玉米黄质、紫黄质、叶黄素、 β -隐黄质月桂酸,可分为胡萝卜素类与叶黄素类两类。因植物细胞中类胡萝卜素类代谢产物的累积受到合成、降解、存储等方式的多层次调控^[23,24],同时药材的生产还涉及“种、采、制、用”等过程的影响,因此药材所含类胡萝卜素的总体含量不仅与生物合成途径上的内部因素有关,而且受到外部因素的调控,综合作用使不同商品药材中类胡萝卜素类成分含量及种类具有差异性,从而使植物表现出不同的颜色。

颜色是电磁辐射或光作用于人体视觉器官后产生的一种心理感受,受到物理性质与心理感受的共同影响,其本质是连续的物理光谱^[1]。药材的呈色机理主要与其呈色物质的共轭体系结构密切相关,分子共轭体系中的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和含有杂原子的不饱和有机物的 $p \rightarrow \pi$ 共轭体系中的 $n \rightarrow \pi^*$ 或 $n \rightarrow \sigma^*$ 跃迁是其呈色的主要原因^[1,25]。不同颜色红芪样品中类胡萝卜素成分属于异戊二烯类化合物,是红芪的显色成分之一,均含有很多的共轭双键,棕黄色、黄棕色、红褐色、红棕色的红芪可能是因其显色成分(类胡萝卜素类代谢产物)的“基态电子”分别吸收了它们的补色紫、绿色 2 种波段的光产生跃迁而呈色^[1],另外,光辐射在传播过程中遇到散射质点后不同线度的散射质点产生不同类型的散射、折射、干

涉及衍射^[25],因此红芪样品棕黄色、黄棕色、红褐色、红棕色的产生可能与类胡萝卜素类成分的共轭双键的电子跃迁及光传播至药材时产生的散射、折射、干涉及衍射等物理现象有关。

综上所述,棕黄色、红棕色、红褐色与黄棕色红芪样品颜色值具有显著差异性。其颜色值与类胡萝卜素类代谢产物含量间存在关联关系,4 种颜色样品间 17 种类胡萝卜素成分含量存在极大值与极小值的特征,含量分布具有差异性;4 种颜色间涉及的差异性代谢产物包括胡萝卜素类与叶黄素类 2 类 11 种,分别为 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、叶黄素二月桂酸酯、叶黄素二肉豆蔻酸酯、紫黄质二丁酸酯、紫黄质肉豆蔻酸酯、花药黄质、玉米黄质、紫黄质、叶黄素、 β -隐黄质月桂酸,其是红芪产生颜色的呈色物质之一。棕黄色、红棕色、红褐色与黄棕色红芪样品的呈色原因可能与上述类胡萝卜素类代谢产物的含量及种类有关。

参考文献

- 1 Liu QQ, Wang SJ, Ren CX, et al. Inheritance and innovation of theory and method of color grading of traditional Chinese medicine[J]. Chin Tradit Herb Drug(中草药), 2021, 52: 3121-3132.
- 2 Gu GG. Shennong's Classic of Materia Medica(神农本草经)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1956.
- 3 Peng XX, Wang DQ. Formation rule of traditional Chinese name of "Shennong bencaojing"[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2015, 17: 977-979.
- 4 Tao HJ. Annotation of Materia Medica(本草经集注)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994: 27-57.
- 5 Su J. Tang Dynasty Compendium of Herbal Medicine(新修本草)[M]. Shanghai: Shanghai Medical Publishing House, 1957.
- 6 Li MZ. Bencao Yuanshi(本草原始)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- 7 Li SZ. Compendium of Materia Medica(本草纲目)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 58.
- 8 Ma TT, Gong MX, Wang ZM, et al. Study on correlation between color and effective components contents of *Glycyrrhiza uralensis*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42: 3776-3785.
- 9 Wei GF, Li J, Liu Q, et al. Correlation analysis between Radix Salviae Miltiorrhizae colour and contents of active ingredients[J]. Shandong Agric Sci(山东农业科学), 2015, 47: 59-62.

- 10 Liu TR, Jin Y, Meng HB, et al. Biological research of color and quality evaluation in "quality discrimination by character" of Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2020, 45: 4545-4554.
- 11 Jin Y, Huang LQ, Yuan Y, et al. Discussion on the classification of color quantity of Phellodendron Cortex[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2015, 40: 3766-3769.
- 12 Pei JG, Liu J, Fu XM, et al. Correlation between color values and compounds of Gardeniae Fructus in different harvest period[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40: 2280-2285.
- 13 Wang ZL, Wu QF, Liu SJ, et al. Appraising storage periods of *Citrus reticulata* 'Chachi' based on colorimetry[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1355-1361.
- 14 Gong JT, Zhao LY, Rudolf B, et al. Rancidness of Armeniaceae Semen Amarum involving Bianzhuang Lunzhi[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41: 4375-4381.
- 15 Chai CC, Mao M, Yuan JF, et al. Correlation between color of Scutellariae Radix pieces and content of five flavonoids after softening and cutting by different methods[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44: 4467-4475.
- 16 Xu MF, Wu ZS, Liu XN, et al. Quality evaluation method for Chinese medicine based on color grading[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41: 177-181.
- 17 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- 18 Ren JM. Carotenoid structure, function and physiological activity in plants and animals[J]. J Chongqing Technol Bus Univ; Nat Sci(重庆工商大学学报: 自科版), 2021, 38: 102-107.
- 19 Tian YR, Rao SP, Li QQ, et al. The coloring mechanism of a novel golden variety in *Populus deltoides* based on the RGB color mode[J]. For Res, 2021, 1: 5.
- 20 Xu PQ, Chukhutsina Volha U, Nawrocki Wojciech J, et al. Photosynthesis without β -carotene [J]. eLife, 2020, 9: e58984.
- 21 Zhou L, Liang XM, Zhao L. Biosynthesis of natural carotenoids: progress and perspective[J]. Biotechnol Bull(生物技术通报), 2022, 38: 119-127.
- 22 Westerhuis JA, Hoefsloot HCJ, Smit S, et al. Assessment of PLS-DA cross validation[J]. Metabolomics, 2008, 4: 81-89.
- 23 Lu CF, Liu YT. Regulation of carotenoid metabolism and plant colour variation[J]. North Horticulture(北方园艺), 2016, 16: 193-199.
- 24 Li L, Hui Y. Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation[J]. Arch Biochem Biophys, 2013, 539: 102-109.
- 25 Tu HM. Experimental discussion of the physical and chemical origins of colour—a discussion of levinsky's answer(27)[J]. Univ Chem(大学化学), 1991, 6: 47-51.