

基于 UPLC 特征图谱结合多模式识别和色度值的槐角炮制前后差异研究

邓李红, 王寿富, 陈仕妍, 邝 敏, 黄贵发, 林伟雄*, 张志鹏

广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244

摘 要: **目的** 测定槐角炮制前后的超高效液相色谱 (UPLC) 特征图谱和色度值, 结合不同模式识别方法比较槐角炮制前后的差异性, 为槐角和蜜槐角的质量控制及评价提供参考。**方法** 采用 UPLC 法对槐角炮制前后样品进行测定, 按《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》对色谱图进行匹配生成槐角炮制前后的 UPLC 特征图谱, 并对炮制前后的色度值 (L 、 a 、 b) 进行测定, 通过相似度分析、对照品比对、方差分析、聚类分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 对槐角炮制前后进行多模式识别研究。**结果** 建立了槐角炮制前后的 UPLC 特征图谱, 槐角和蜜槐角分别确定了 23、24 个共有峰, 指认 2、15、16、20、21 号峰为没食子酸、芦丁、染料木苷、槲皮苷、槐角苷, 炮制后新增成分 24 号峰为 5-羟甲基糠醛; 相似度分析结果显示槐角炮制前后相似度均大于 0.98, 聚类分析结果显示槐角炮制前后区分不明显, PCA 可将槐角和蜜槐角大致分为 2 类, OPLS-DA 分析可将槐角和蜜槐角明显区分为 2 类, 且结果显示 1、2、10、22、23、24 号峰是引起槐角和蜜槐角间成分差异的主要标志性成分, 与方差分析结果一致; 色度值 ΔE 范围为 5~13, 炮制前后色差可被肉眼识别。**结论** 建立的多指标特征图谱和色度值鉴别方法对槐角药材及其炮制品的质量控制及整体性评价具有重要意义。

关键词: 槐角; 蜜槐角; UPLC 特征图谱; 方差分析; 没食子酸; 芦丁; 染料木苷; 槲皮苷; 槐角苷; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6881-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.027

Comparative study on UPLC characteristic chromatogram combined with multiple chemical pattern recognition and chromatic value of *Sophorae Fructus* and its processed products

DENG Li-hong, WANG Shou-fu, CHEN Shi-yan, KUANG Min, HUANG Gui-fa, LIN Wei-xiong, ZHANG Zhi-peng
Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China

Abstract: Objective To determine Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) characteristic chromatogram and chromatic value of *Sophorae Fructus* and its processed products, and to compare their difference according to multiple chemical pattern recognition method, and to provide reference for quality control and evaluation of Huaijiao (*Sophorae Fructus*) and its processed products. **Methods** *Sophorae Fructus* and its processed products were determined by UPLC. According to the TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 edition), the chromatograms were matched to generate the UPLC characteristic chromatogram of *Sophorae Fructus* and its processed products, and the chromatic value (L , a , b) before and after fried with honey was determined. The chromatograms of *Sophorae Fructus* and its processed products were analyzed according to multiple chemical pattern recognition by variance analysis, cluster analysis, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** UPLC characteristic chromatogram of *Sophorae Fructus* and its processed products were established respectively, and 23 common peaks were confirmed for *Sophorae Fructus*; 24 common peaks were confirmed for *Sophorae Fructus* stir-fried with honey. No. 2, 15, 16, 20, 21 peaks were identified as gallic acid, rutin, genistin, quercitrin and sophoricoside respectively, and the new component No. 24 peaks were identified as 5-hydroxymethylfurfural after fried with honey. The results of similarity analysis showed that the similarity of *Sophorae Fructus* and its processed products was greater than 0.98. Cluster analysis showed that there were only a small part of distinctions of *Sophorae Fructus* and its processed products, and PCA

收稿日期: 2022-03-03

基金项目: 广东省科技计划项目 (2018B030323004); “广东特支计划” 科技创业领军人才项目 (2017TY04R197)

作者简介: 邓李红 (1995—), 女, 学士, 从事中药饮片及配方颗粒工艺和质量标准研究。Tel: (0757)85128603 E-mail: denglihongyz@163.com

*通信作者: 林伟雄 Tel: (0757)85128603 E-mail: linwx2020@163.com

can roughly divide *Sophorae Fructus* and its processed products into two categories respectively. PLS-DA can distinguish *Sophorae Fructus* and its processed obviously, and showed that No. 1, 2, 10, 22, 23, and 24 peaks were the main marker components that caused the differences of chemical components of *Sophorae Fructus* and its processed products, which is consistent with the results of variance analysis. The ΔE range of chromatic value was 5—13, and the color difference of *Sophorae Fructus* and its processed products can be recognized by the naked eye. **Conclusions** The characteristic chromatogram of multiple indicators and chromatic value identification method established in this study has vital significance for to the quality control and overall evaluation of *Sophorae Fructus* and its processed products.

Key words: *Sophorae Fructus*; *Sophorae Fructus* stir-fried with honey; UPLC characteristic chromatogram; variance analysis; cluster analysis; gallic acid; rutin; genistin; quercitrin; sophoricoside; 5-hydroxymethylfurfural

槐角始载于《神农本草经》，列为上品，为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥成熟果实，味苦，性寒，归肝、大肠经，具有清热泻火、凉血止血等功效。用于肠热便血、痔肿出血、肝热头痛、眩晕目赤等病症^[1]。现代研究证明，槐角中主要含有黄酮、异黄酮、生物碱、三萜皂苷、氨基酸和磷脂类等多种化学成分^[2-4]，其中以黄酮和异黄酮化合物含量最高^[5]，主要有槐角苷、槐角双苷、染料木苷、染料木素、芦丁等^[6-8]。槐角生品清热凉血力较强，用于血热妄行出血证，肝火目赤、肝热头痛、眩晕、阴疮湿痒等症；亦用于肠热便血和痔肿出血。槐角炮制后苦寒之性减弱，具有缓和药性兼具润肠通便的作用，用于便血、痔血，尤其适用于脾胃不健或兼有便秘的患者^[9-10]。

目前，关于槐角和蜜槐角的研究多集中于炮制工艺及染料木苷、槐角苷、芦丁等黄酮类成分的含量测定上^[11-14]，均以单个或多个含量指标表征槐角炮制前后的差异性，但不足以作为全面而准确地反映槐角炮制前后差异的主要变量指标，有必要对槐角炮制前后化学成分进行全面系统的分析。本研究采用超高效液相色谱法建立槐角炮制前后 UPLC 特征图谱，并运用方差分析、聚类分析、主成分分析（principal component analysis, PCA）与正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA）等多模式识别方法对 UPLC 特征图谱中多指标变量进行统计分析，同时增加饮片粉末色度值（ L 、 a 、 b ）的变化加以辅助分析，可有效区分槐角炮制前后的主要共性和差异性成分，为其药效物质基础及质量控制研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 仪器

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；ME204E 型万分之一天平、XP26 型百万分之一天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）；KQ-500DE 型数控超声清洗器（昆山市超声

仪器有限公司）；111B 型二两装高速中药粉碎机（浙江瑞安市永历制药机械有限公司）；MiliQ Direct 8 型超纯水机（德国 Merck 有限公司）。

1.2 药品与试剂

5-羟甲基糠醛（质量分数 99.20%，批号 111626-201912）、没食子酸（质量分数 90.8%，批号 110831-201906）、芦丁（质量分数 91.7%，批号 100080-201811）、染料木苷（质量分数 99.9%，批号 111709-201702）、槲皮苷（质量分数 90.6%，批号 111538-201606）、槐角苷（质量分数 99.6%，批号 111695-201703）对照品均购自中国食品药品检定研究院；乙腈为色谱级，其余试剂为分析纯，水为超纯水。

16 批槐角药材（编号 H1~H16）经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定本品为豆科植物槐 *S. japonica* L. 的干燥成熟果实，相应的 16 批蜜槐角（编号 M1~M16）为实验室严格按照《中国药典》2020 年版一部槐角项下蜜槐角炮制规定^[1]进行炮制，来源信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ 柱（150 mm×2.1 mm，1.7 μ m）；流动相为乙腈（A）-0.4%醋酸溶液（B），梯度洗脱，0~2 min，2% A；2~6 min，2%~5% A；6~8 min，5%~15% A；8~

表 1 16 批槐角和蜜槐角来源信息

Table 1 Source information of 16 batches of *Sophorae Fructus* and its processed products

槐角编号	蜜槐角编号	产地	槐角编号	蜜槐角编号	产地
H1	M1	安徽	H9	M9	河北
H2	M2	山西	H10	M10	河北
H3	M3	安徽	H11	M11	河北
H4	M4	安徽	H12	M12	山东
H5	M5	安徽	H13	M13	河北
H6	M6	安徽	H14	M14	河北
H7	M7	安徽	H15	M15	山东
H8	M8	山东	H16	M16	河北

18 min, 15%~22% A; 18~20 min, 22%~30% A; 20~29 min, 30%~40% A; 29~30 min, 40%~2% A; 检测波长 282 nm; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 1 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

取 5-羟甲基糠醛、没食子酸、芦丁、染料木苷、槲皮苷和槐角苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成分别含 30.85 μ g/mL 5-羟甲基糠醛、47.35 μ g/mL 没食子酸、55.07 μ g/mL 芦丁、57.39 μ g/mL 染料木苷、50.10 μ g/mL 槲皮苷和 53.04 μ g/mL 槐角苷的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 称定质量, 超声(功率 300 W, 频率 10 kHz)处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 以 50%甲醇补足减失质量, 摇匀, 采用 0.22 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取编号为 M9 的样品 1 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录色谱图。选取峰面积较大且为槐角指标性成分^[1]的 21 号峰槐角苷峰作为参照峰, 计算各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.06%, 相对峰面积的 RSD 为 0.02%~2.19%。

2.4.2 稳定性试验 精密称取编号为 M9 的样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 时, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以 21 号峰槐角苷为参照峰, 计算各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.16%, 相对峰面积的 RSD 为 0.11%~3.76%。

2.4.3 重复性试验 精密称取编号为 M9 的样品 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以 21 号峰槐角苷为参照峰, 计算各特征峰相对保留时间的 RSD 为 0.01%~0.09%, 相对峰面积的 RSD 为 0.01%~4.47%。

2.5 UPLC 特征图谱研究

2.5.1 UPLC 特征图谱的建立 按“2.3”项下方法分别制备 16 批槐角和蜜槐角供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》对色谱图进行匹配, 建立

槐角和蜜槐角的特征图谱。分别以 H1 和 M1 图谱作为参照图谱, 设置时间窗宽度为 0.1 min, 通过多点校正、全谱峰匹配分别生成 16 批槐角和蜜槐角的共有特征图谱, 同时采用中位数法分别生成对照特征图谱。16 批槐角共有特征图谱中共标定了 23 个共有峰, 16 批蜜槐角中共标定了 24 个共有峰, 其中 24 号峰为槐角炮制后生成。共有特征图谱见图 1, 对照特征图谱见图 2。

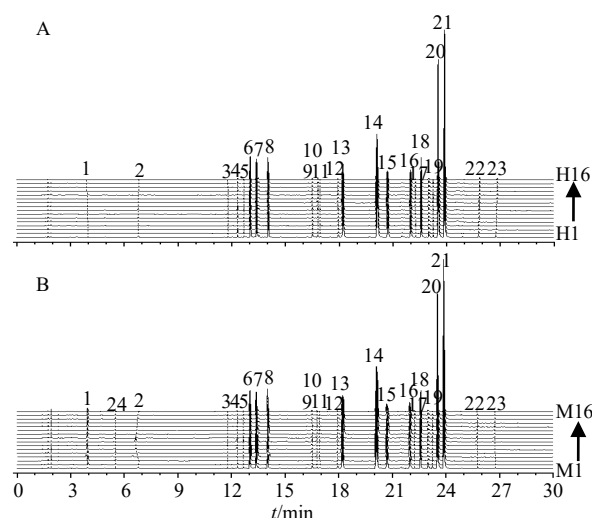


图 1 槐角 (A) 和蜜槐角 (B) 的 UPLC 特征图谱
Fig. 1 UPLC characteristic chromatogram of *Sophorae Fructus* (A) and its processed products (B)

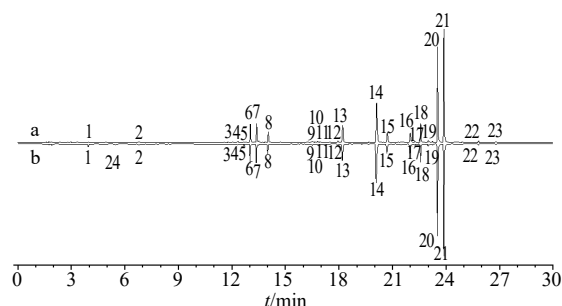
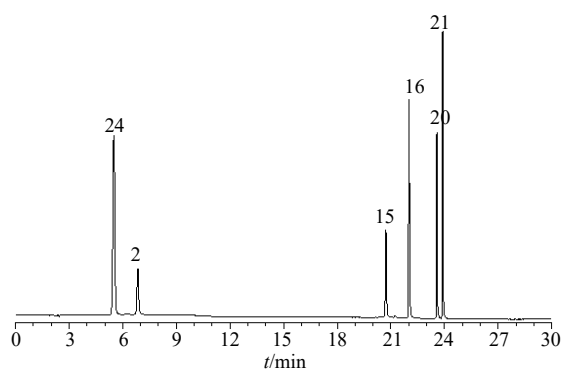


图 2 槐角 (a) 和蜜槐角 (b) 的对照特征图谱
Fig. 2 Comparative characteristic chromatogram of *Sophorae Fructus* (a) and its processed products (b)

2.5.2 色谱峰的指认 取“2.2”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 3。通过对比图 3 与图 2, 指认出槐角和蜜槐角 UPLC 特征图谱中的 2 号峰为没食子酸、15 号峰为芦丁、16 号峰为染料木苷、20 号峰为槲皮苷、21 号峰为槐角苷, 蜜槐角 UPLC 特征图谱中的 24 号峰为 5-羟甲基糠醛。

2.5.3 UPLC 特征图谱的相似度评价 根据《中药色



2-没食子酸 15-芦丁 16-染料木苷 20-槲皮苷 21-槐角苷 24-羟甲基糠醛
2-gallic acid 15-rutin 16-genistin 20-quercitrin 21-sophoricoside
24-5-hydroxymethylfurfural

图 3 混合对照品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of mixed reference substances

谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)分析软件,计算每批样品特征图谱相似度,每批槐角与其对照特征图谱相似度分别为 0.993、0.997、0.996、0.999、0.997、0.997、0.996、0.999、0.998、0.996、0.997、0.999、0.988、0.999、0.999、0.988,蜜槐角与其对照特征图谱相似度分别为 0.995、0.997、0.997、0.998、0.997、0.998、0.996、0.998、0.998、0.998、0.999、1.000、0.987、0.998、1.000、0.987,表明不同批次槐角与蜜槐角质量一致性较好;每批槐角与蜜槐角对照特征指纹图谱相似度分别为 0.993、0.997、0.996、0.999、0.997、0.997、0.996、0.998、0.998、0.995、0.996、0.998、0.988、0.998、0.998、0.988,每批蜜槐角与槐角对照指纹图谱相似度分别为 0.995、0.996、0.996、0.997、0.996、0.996、0.998、0.998、0.998、0.998、0.999、0.986、0.998、0.999、0.986,同批次槐角与蜜槐角相似度分别为 1.000、0.997、0.998、0.999、0.999、0.998、0.999、0.999、0.999、0.999、0.998、0.999、0.998、0.999、0.999、0.998、0.999,且槐角对照特征图谱与蜜槐角对照特征图谱相似度为 0.999,相似度均高于 0.98,根据特征图谱相似度结果,完全无法区分槐角与蜜槐角。

2.6 槐角与蜜槐角 UPLC 特征图谱多元统计分析

2.6.1 方差分析 采用 SPSS 20.0 软件对 16 批槐角和蜜槐角共有特征峰的单位峰面积进行单因素方差分析。结果显示,槐角与蜜槐角的 2、10、23 号峰的单位峰面积差异均有显著统计学意义 ($P < 0.05$),1、22 号峰的单位峰面积差异有极显著统计学意义 ($P < 0.01$)。经过炮制后,1、2 号峰的单

位峰面积显著增加,10、22、23 号峰的单位峰面积显著下降,其余各特征峰单位峰面积无显著变化,24 号峰在 16 批槐角中未检出,经炮制后产生,增长率为 100%。16 批槐角和蜜槐角特征图谱共有峰单位峰面积的方差分析结果见表 2。

2.6.2 聚类分析 聚类分析是一种无监督模式识别方法,将槐角和蜜槐角样本数据在没有先验知识的前提下,基于样品所表现的各种特征峰单位峰面积的变量特征,按照相似度进行归类,可直观地得到槐角和蜜槐角的样本分类结果^[5]。以 24 个共有峰单位峰面积为变量,采用 Origin 2018 软件以 Ward 连接法结合 Euclidean 距离进行聚类分析。结果显示(图 4),槐角和蜜槐角样品无法较好地聚类,其中 H1 与 M1、H5 与 M5、H7 与 M7、H8 与 M8 样品完全聚在一起,其余槐角样品、蜜槐角样品部分批次可分别聚在一起,表明槐角和蜜槐角样品相似度高,区分不明显。

2.6.3 PCA 与 OPLS-DA 分析 PCA 是一种无监督的多元统计分析方法,其主要是通过数学降维的原理,从槐角和蜜槐角原数据中提取几个具代表的综合性指标,根据贡献率大小代替多个原始变量,因此在相似度分析的基础上,可进一步采用主成分分析对槐角炮制前后进行比较^[15-16]。

以 24 个共有峰单位峰面积为变量,采用 SIMCA (14.0) 软件对槐角和蜜槐角样品进行 PCA 分析,结果提取到 6 个特征值大于 1 的主成分(PC),可用于反映槐角和蜜槐角 UPLC 特征图谱 91.75%以上信息,其中 PC1 贡献率为 45.29%,贡献率最大,PC2 贡献率为 16.30%,PC3 贡献率为 12.09%,见表 3。由前 3 个主成分建立坐标系,得到槐角和蜜槐角的 PCA 得分图(图 5),由图可见,在相似度大于 0.9 的基础上,槐角和蜜槐角样品能够分别集中地聚在一起,说明提取到的前 3 个主成分已能反映出槐角炮制前后的主要特征,可区分槐角和蜜槐角样品。

PCA 可以直观地区分出槐角和蜜槐变量间的差异程度,但为更好地观察 2 组间的差异,基于 PCA 结果,采用监督模式识别法进行两组间 OPLS-DA 分析,绘制 OPLS-DA 模型得分图,计算出对差异贡献较大的因素,寻找槐角炮制前后主要的差异成分。通过 OPLS-DA 得分图发现,槐角与蜜槐角明显集中分布在 2 个象限,槐角在模型得分图的左侧,蜜槐角在右侧,与 PCA 分析结果较为一致,表明其化学成分具有一定差异性。

表 2 槐角和蜜槐角特征图谱共有峰单位峰面积方差分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Variance analysis of common peak area of *Sophorae Fructus* and its processed products ($\bar{x} \pm s, n=6$)

共有峰号	相对峰面积	
	槐角	蜜槐角
1	14 105.50±10 424.57	288 656.50±106 005.60**
2	47 902.06±30 223.50	114 583.56±98 593.02*
3	28 680.13±7 082.14	27 219.38±6 762.81
4	104 106.38±69 084.66	70 083.50±27 206.04
5	39 211.38±18 873.04	47 419.75±20 848.10
6	1 145 514.31±174 808.91	1 211 979.31±203 298.84
7	1 281 882.31±263 000.00	1 285 876.69±277 823.19
8	735 268.94±361 436.22	723 166.13±344 439.14
9	131 253.13±30 050.42	118 125.50±43 710.25
10	99 206.94±26 193.03	66 688.63±25 428.34*
11	48 501.88±22 249.26	60 258.13±24 206.20
12	145 811.06±32 241.29	131 686.31±32 383.85
13	1 631 831.25±385 182.67	1 646 726.44±441 371.66
14	4 215 164.88±1 157 278.17	4 136 020.56±1 253 568.76
15	1 030 427.38±223 863.76	980 313.81±232 253.86
16	913 352.75±176 883.41	956 810.19±201 675.80
17	77 749.88±30 809.83	80 848.56±32 157.13
18	1 171 448.44±341 564.48	1 192 346.31±345 768.38
19	98 390.31±35 312.74	89 034.50±32 192.49
20	5 751 670.44±899 827.02	5 578 956.94±1 114 455.21
21	7 728 554.06±1 174 761.97	7 680 609.88±1 399 016.01
22	137 387.44±37 086.11	87 803.50±30 918.06**
23	85 919.81±25 021.75	63 930.13±24 284.38*
24	—	85 638.63±34 732.22

与槐角比较 * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs *Sophorae Fructus*

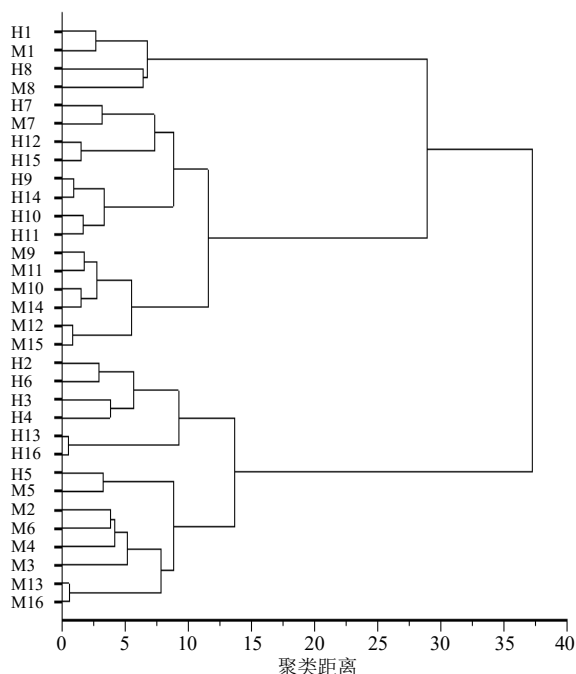


图 4 槐角和蜜槐角聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of hierarchical cluster analysis of *Sophorae Fructus* and its processed products

表 3 特征值和累积方差贡献率

Table 3 Eigenvalues and cumulative variance contribution rates

成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	10.869	45.289	45.289
2	3.913	16.303	61.592
3	2.901	12.089	73.681
4	1.674	6.974	80.654
5	1.562	6.508	87.162
6	1.101	4.586	91.748

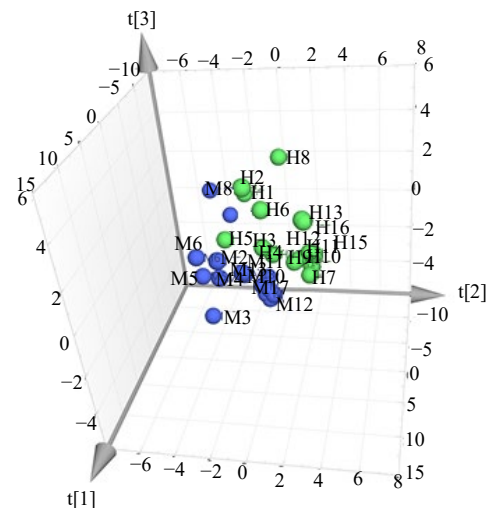


图 5 槐角和蜜槐角的 PCA 分析得分图

Fig. 5 Score scatter plot of *Sophorae Fructus* and its processed products by PCA

OPLS-DA 模型中的拟合参数 $R^2_X=0.791$, $R^2_Y=0.920$, 模型预测参数 (Q^2) = 0.842, 均大于 0.5, 表明所建模型稳定且预测能力较强^[15]。以模型变量投影 (VIP) 值为指标对引起槐角和蜜槐角组间差异的成分进行分析, 筛选贡献较大的 6 个变量 (以 VIP 值 > 1 为标准), 分别为 1 号峰 (VIP = 1.932 7)、24 号峰 (VIP = 1.901 8)、22 号峰 (VIP = 1.417 9)、10 号峰 (VIP = 1.332 5)、23 号峰 (VIP = 1.128 9) 和 2 号峰 (VIP = 1.120 4), 提示上述 6 个成分是引起槐角和蜜槐角间成分差异的主要标志性成分, 其余峰 VIP 值小于 1, 对样品的区分影响较小, 与方差分析结果一致。见图 6、7。

2.7 槐角与蜜槐角色度值分析

取 16 批槐角和蜜槐角粉末适量, 压制于载玻片上, 压制厚度约为 1 mm, 以国际照明委员会认可的 D65 光源作为光源, 白色作为背景, 对粉末图像进行色彩采集, 采用 Adobe Photoshop CS6 软件读取饮片粉末色度值 (L^* , a^* , b^*), 平行 3 次, 取平均值, 色度值见表 4。

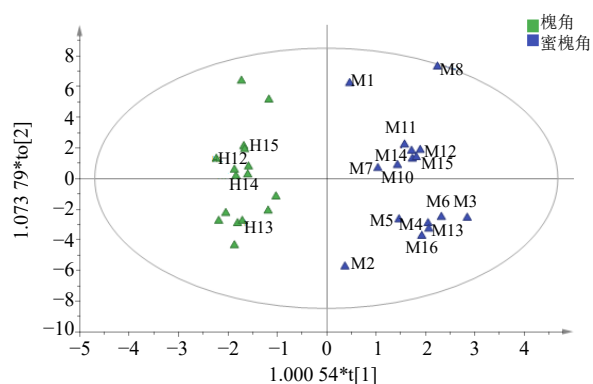


图 6 槐角和蜜槐角的 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA score plot of *Sophorae Fructus* and its processed products

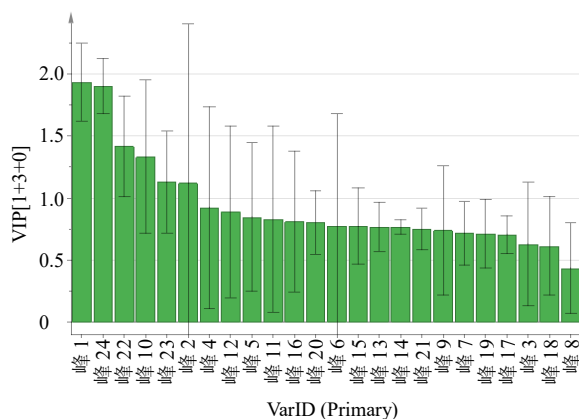


图 7 槐角和蜜槐角 24 个共有峰的 VIP 值

Fig. 7 VIP value of 24 common peaks of *Sophorae Fructus* and its processed products

Lab 色彩模式中 L 值表示物体明度指数, a (红-绿轴)、 b (黄-蓝轴) 值代表色品指数, 样品颜色可用总色值 (E) 表达。

$$E = (L^2 + a^2 + b^2)^{1/2}$$

明度差 (ΔL) 与色差 (ΔE) 用于表达生品到炮制品的颜色变化, 当 ΔL 为负值代表样品颜色明度低、颜色深, 为正值则相反; ΔE 值越大, 代表炮制品与生品色度值相差越大, $\Delta E > 3.5$ 时, 其色差可被肉眼识别。由表 4 可知, ΔL 中正负值均有, 无法明显区分 16 批次的生品与炮制品, 炮制品中整体上较生品明度下降, 颜色加深; ΔE 范围为 5~13, 即色差可被肉眼识别, 可用于辅助区分同批次槐角生品与炮制品。

3 讨论

本实验考察了甲醇、70%甲醇、50%甲醇、50%乙醇、70%乙醇等提取溶剂, 结果表明, 选择乙醇系统作为提取溶剂时, 1 和 24 号峰 5-羟甲基糠醛的色谱峰峰形内陷, 以甲醇作为提取溶剂系统且以 50%甲醇作为提取溶剂时各色谱峰的分离效果好且响应值高, 故选择 50%甲醇作为提取溶剂; 同时考察了不同柱温 (25、30、35 °C) 及不同体积流量 (0.2、0.3 mL/min) 条件下样品的 UPLC 特征图谱。结果发现柱温 25 °C、体积流量 0.2 mL/min 时, 样品分离度较高、峰形对称, 能够满足分析要求。

本研究从槐角和蜜槐角共有特征图谱中直观得知炮制后 1、2 号峰的峰面积明显增加, 经方差分析证实 1、2 号峰的增加具有显著统计学意义, 24

表 4 槐角和蜜槐角色度值数据

Table 4 Chromatic value data of *Sophorae Fructus* and its processed products

批次	槐角色度值				蜜槐角色度值				差值			
	L	a	b	E	L	a	b	E	ΔL	Δa	Δb	ΔE
1	40	3	27	49	53	3	29	60	13	0	1	13
2	44	2	29	52	44	8	31	55	1	6	2	6
3	40	3	27	49	42	11	33	55	2	8	6	10
4	34	7	23	42	38	9	28	48	4	3	5	7
5	36	8	27	46	40	10	30	51	4	2	3	6
6	41	2	27	49	42	9	31	53	1	7	4	8
7	41	4	24	47	39	10	25	47	-2	6	1	6
8	51	0	30	59	56	4	30	64	4	3	0	5
9	43	4	28	51	43	9	31	53	0	5	3	6
10	44	5	28	52	45	9	31	56	2	4	4	5
11	43	5	29	52	43	11	29	53	0	6	0	6
12	46	4	27	54	41	10	29	51	-5	6	2	8
13	43	5	30	53	41	11	32	53	-2	5	2	6
14	43	4	28	51	43	9	31	53	0	5	3	6
15	46	4	27	54	41	10	29	51	-5	6	2	8
16	43	5	30	53	41	11	32	53	-2	5	2	6

号峰 5-羟甲基糠醛为槐角炮制后产生。槐角炮制前后各批次样品间的相似度均大于 0.98, 依据相似性进行无监督模式聚类分析和 PCA, 聚类分析显示槐角炮制前后区分不明显, PCA 分析提取前 3 个主成分时可以将槐角和蜜槐角大致分为 2 类, 表明在各样品相似度极高的基础上通过化学计量学方法进行分析, 可有效区分槐角和蜜槐角样品间的细微差别。通过监督模式识别法进行 2 组间 OPLS-DA 分析, 能将原始数据 X 中与因变量 Y 不相关的信息去除, 提高类内聚集性, 使类与类之间的差异性得到最大化, 结果显示槐角和蜜槐角明显区分为 2 类, 且 1、2、10、22、23、24 号峰是引起槐角和蜜槐角间成分差异的主要标志性成分, 与方差分析结果一致。在外观颜色上通过色差 $\Delta E > 3.5$, 可辅助识别槐角和蜜槐角。化学成分是中药发挥疗效的物质基础, 槐角炮制前后所含各种成分信息无法直观地通过个体之间的差异展现, 本研究所采用的多模式识别结合 UPLC 特征图谱和色度值分析模式可区分槐角和蜜槐角样品间的细微差别, 用以解释测量值与槐角炮制前后体系状态之间的联系, 可为槐角和蜜槐角质量整体性评价提供依据, 也为其他炮制品种的研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 263.
- [2] 李文涛, 任伟光, 黄林芳. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的槐角蜜炙前后化学成分变化研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(10): 59-62.
- [3] 孙国东, 霍金海, 潘五九, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的槐角药材化学成分分析 [J]. 中草药, 2019, 50(16): 3774-3783.

- [4] 张庆贺, 柏金辰, 孙冰雪, 等. 槐角化学成分及其抗骨质疏松作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(9): 1517-1522.
- [5] 张博雅, 周丽, 王凤荣, 等. 加压溶剂法提取槐角总异黄酮的研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1108-1111.
- [6] 陈翔, 郑国平, 于治国. 一测多评法测定槐角中异黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(11): 1904-1909.
- [7] 王景华, 唐于平, 楼凤昌. 槐角化学成分与药理作用 [J]. 国外医药: 植物药分册, 2002, 17(2): 58-60.
- [8] 王志玲, 刘景东, 勾凌燕, 等. HPLC 同时测定槐角中的芦丁和槐角苷 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(1): 72-74.
- [9] 叶定江, 张世臣, 吴皓. 中药炮制学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 23.
- [10] 王笑, 王雨, 张冰, 等. 槐不同药用部位本草学、化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4461-4467.
- [11] 方艳夕, 何小菲, 路晓娟. 正交试验优选槐角蜜炙炮制工艺 [J]. 齐齐哈尔大学学报: 自然科学版, 2017, 33(1): 78-82.
- [12] 房敏峰, 曲欢欢, 文颂华, 等. 槐角不同炮制品中槐角苷的含量测定 [J]. 中药材, 2007, 30(1): 24-25.
- [13] 都盼盼, 石延榜, 张振凌, 等. 不同炮制方法对槐角黄酮类成分量的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3271-3274.
- [14] 牛晓静, 鲁静, 马彦江, 等. 基于多指标总评归一法优选槐角炮制工艺 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(11): 2617-2620.
- [15] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [16] 李士敏, 李强, 孙崇鲁, 等. 基于多模式识别结合指纹图谱的三叶青产地鉴别比较研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 197-203.

[责任编辑 时圣明]