

# 基于 Fisher 判别分析的槐花、炒槐花 标准汤剂特征图谱差异性研究\*

高 晗<sup>1,2</sup>, 孙福仁<sup>1,2</sup>, 李 争<sup>1</sup>, 李军山<sup>1,2,3</sup>, 梁彩娟<sup>1,2</sup>, 廖明丽<sup>1,2,Δ</sup>, 李振江<sup>1</sup>

1 神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 051430;

2 石家庄市中药配方颗粒产业技术研究院, 河北 石家庄 050002;

3 云南神威施普瑞药业有限公司, 云南 楚雄 675000

**[摘要]** 目的: 建立槐花、炒槐花标准汤剂特征图谱, 区分图谱差异。方法: 采用了 UPLC 色谱仪与 WATERS BEH C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸水为流动相, 柱温为 35 ℃, 流速为 0.3 mL/min, 检测波长为 257 nm。结果: 应用特征图谱提取槐花、炒槐花标准汤剂特征图谱中特征成分, 共确定 5 个特征峰。结论: 槐花、炒槐花标准汤剂 UPLC 特征图谱方法可靠、稳定, 可用于槐花、炒槐花配方颗粒的定性鉴别。

**[关键词]** 槐花; 炒槐花; 标准汤剂; 特征图谱; 芦丁; 槲皮素; Fisher 判别分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)01-0011-07

## Study on the Differences of the Characteristic Mapping of Standard Decoction of Huaihua and Fried Huaihua Based on Fisher Discriminant Analysis

GAO Han<sup>1,2</sup>, SUN Furen<sup>1,2</sup>, LI Zheng<sup>1</sup>, LI Junshan<sup>1,2,3</sup>, LIANG Caijuan<sup>1,2</sup>, LIAO Mingli<sup>1,2,Δ</sup>, LI Zhenjiang<sup>1</sup>

1 China Shineway Pharmaceutical Group Ltd., Shijiazhuang 051430, China;

2 Shijiazhuang Industrial Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine Formula Granules,

Shijiazhuang 050002, China; 3 Yunnan Shineway Spirin Pharmaceutical Co., Chuxiong 675000, China

**Abstract** Objective: To establish the feature chromatograms of standard decoction of Huaihua (*Sophora japonica* L) and fried one, and to distinguish the differences in the mapping. Methods: A UPLC chromatographic instrument and WATERS BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) chromatographic column were employed, with acetonitrile-0.1% aqueous phosphate as the mobile phase, column temperature 35 ℃, flow rate 0.3 mL/min and the detection wavelength 257 nm. Results: Five characteristic peaks were confirmed through the extraction of characteristic components from standard decoction of Huaihua and fried Huaihua with characteristic mapping. Conclusion: The method of UPLC characteristic spectrum of Huaihua and fried Huaihua, which is reliable and stable, could be used for qualitative identification of the formula granules.

**Keywords** Huaihua; fried Huaihua; standard decoction; characteristic mapping; rutin; quercetin; Fisher discriminant analysis

槐花为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥花。夏季花开放时采收, 及时干燥, 除去枝、梗及杂质<sup>[1]</sup>。槐花为常用中药, 含有芦丁、槲皮素、山柰酚、异鼠李素和染料木素等多种黄酮类成分。药理学研究表明, 槐花中的芦丁和槲皮素具有止血、降血糖、抗炎等药理作用<sup>[2-5]</sup>。

有报道显示槐花与炒槐花饮片化学成分无明显差异<sup>[6]</sup>, 槐花、炒槐花标准汤剂是槐花、炒槐花饮片按传统煎药方式提取、低温浓缩、冷冻干燥制备, 是用来评价槐花、炒槐花配方颗粒的质量控制方法。由于配方颗粒失去了饮片的性状鉴别特征, 所以, 需要应用特征图谱对饮片及炮制品进行区分。本研究以不同产地槐花饮片及其炮制品制备而成的标准汤剂为研究对象, 通过建立特征图

谱的方法, 结合判别函数分析, 对 15 批槐花、炒槐花标准汤剂进行定性鉴别研究, 为槐花、炒槐花配方颗粒的质量控制提供参考。

### 1 材料

**1.1 仪器** WATERS AQUITY UPLC H CLASS 超高效液相色谱仪(沃特世, 美国); WATERS BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm, 沃特世, 美国); CPA225D 型电子分析天平(赛多利斯股份公司, 德国); 养生药膳壶(合肥荣事达小家电有限公司); KH3200E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); MH-2000 调温型电热套(北京科伟永兴仪器有限公司); R502B 旋转蒸发器(上海申科生物技术有限公司); LGJ-12 压盖型真空冷冻干燥机(河南兄弟仪器设备有限公司); 2L 圆底烧瓶及

量筒、烧杯均由四川蜀玻有限责任公司生产。

1.2 试剂 芦丁对照品(中国药品食品检定研究院,批号:100080-201811,纯度:91.7%);槲皮素对照品(成都谱菲德生物技术有限公司,批号:908220S,纯度:98.7%);磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20170309,分析纯);甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20170313,色谱纯);乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20171213,色谱纯);水为超纯水。

1.3 标准汤剂制备

1.3.1 饮片来源 15批槐花药材采购于河北、河南、山西、山东、内蒙古产地市场,拣选,除去杂质。经检验,15批槐花饮片均符合《中华人民共和国药典:一部》“槐花”项下要求<sup>[1]</sup>。将检验合格的槐花饮片按照文献[1]中清炒法炒至表面深黄色,倒出,放凉,筛去灰屑,即得符合标准的炒槐花<sup>[1]</sup>。见表1。

表1 饮片批号及来源产地

编号	槐花 饮片批号	产地	编号	炒槐花 饮片批号	产地
S1	1705132	河北	S16	1807191	河北
S2	1705133	河北	S17	1807192	河北
S3	1705134	河南	S18	1807193	河南
S4	1705135	河南	S19	1807194	河南
S5	1705136	河南	S20	1807195	河南
S6	1705137	山西	S21	1807196	山西
S7	1705138	山西	S22	1807197	山西
S8	1705139	山西	S23	1807198	山西
S9	1705141	内蒙古	S24	1807199	内蒙古
S10	1705142	内蒙古	S25	1807181	内蒙古
S11	1705143	内蒙古	S26	1807182	内蒙古
S12	1705144	山东	S27	1807183	山东
S13	1705145	山东	S28	1807184	山东
S14	1705146	山东	S29	1807185	山东
S15	1804021	河北	S30	1807186	河北

1.3.2 槐花、炒槐花标准汤剂制备方法 分别取槐花、炒槐花饮片约100 g,加水煎煮二次,一煎加12倍水,浸泡30 min,煮沸,保持微沸煎煮30 min,200目筛网过滤,立即冷却至室温;二煎加10倍水,煮沸,保持微沸煎煮20 min,200目筛网过滤,立即冷却至室温,合并两次煎液,于60℃水浴加热下真空浓缩,浓缩至生药量与浓缩液体积比约为1:3(g:mL),将浓缩液冷冻干燥即得,分别为槐花标准汤剂、炒槐花标准汤剂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 液相色谱仪为WATERS ACQUITY UPLC H CLASS;色谱柱为WATERS BEH C18(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液;检测波长为257 nm;流速为0.3 mL/min;柱温为35℃;进样量为1 μL。梯度洗脱程序。见表2。

表2 梯度洗脱条件

时间 (min)	乙腈 (%)	0.1%磷酸 (%)	时间 (min)	乙腈 (%)	0.1%磷酸 (%)
0	10	90	14	50	50
7	18	82	15	10	90
12	35	65	20	10	90

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取芦丁对照品17.24 mg、槲皮素对照品10.70 mg,转移至10 mL容量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度得对照品母液。精密量取母液3 mL至100 mL容量瓶中,加甲醇稀释至刻度即得芦丁浓度为0.052 mg/mL、槲皮素浓度为0.032 mg/mL的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取标准汤剂约0.05 g,精密称定,置100 mL具塞量瓶中,精密加入甲醇95 mL,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)10 min,取出放冷,用甲醇定容至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度 分别取槐花、炒槐花标准汤剂样品(S9、S23)0.05 g,按供试品溶液制备项下所述方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下,分别连续进样测定6次,将所得色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2008版),并以特征峰2为参照,计算各特征峰相对保留时间与相对峰面积的RSD。槐花特征峰相对保留时间的RSD为0.00%~0.34%,相对峰面积的RSD为0.00%~0.89%,炒槐花特征峰相对保留时间的RSD为0.00%~0.46%,相对峰面积的RSD为0.00%~1.42%,均小于5.00%,说明该仪器的精密度符合分析方法的要求。

2.4.2 重复性 分别取槐花、炒槐花标准汤剂样品(S9、S23)0.05 g,按供试品溶液制备项下所述方法,分别平行制备6个样品溶液,按照“2.1”项下测定。将所得色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2008版),并以特征峰2为参照,计算各特征峰相对保留时间与相对峰面积的RSD。特征峰相对保留时间的RSD为0.00%~0.23%,相对峰面积的RSD为0.00%~1.62%,炒槐花特征峰相对保留时间的RSD为0.00%~0.13%,相对峰面积的RSD为0.00%~2.29%,均小于5.00%,说明该方法的重复性符合分析方法的要求。

2.4.3 稳定性 分别取槐花、炒槐花标准汤剂样品(S9、S23)0.05 g,按供试品溶液制备项下所述方法,制备样品溶液,按照“2.1”项下,同一样品溶液分别于0、2、4、6、8、12 h测定。将所得色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2008版),并以色谱峰2为参照,计算各特征峰相对保留时间与相对峰面积的RSD。特征峰相对保留时间的RSD为0.00%~0.48%,相对峰面积的RSD为0.00%~1.26%,炒槐花特征峰相对保留时间的RSD为0.00%~0.33%,相对峰面积的RSD为0.00%~

0.92%,均小于5.00%,说明样品在12 h以内测定,稳定性符合分析方法的要求。

2.5 槐花、炒槐花标准汤剂特征图谱测定 15批槐花、炒槐花标准汤剂按照“2.1”项下方法进行处理,并测定,结果见图1—2。对15批槐花、炒槐花标准汤剂特征图谱进行分析,确定了5个特征峰。通过查阅文献<sup>[7]</sup>,与标准品保留时间及最大吸收波长比对,指认了5个特征峰中的2个成分:2号峰为芦丁,5号峰为槲皮素。见图3。

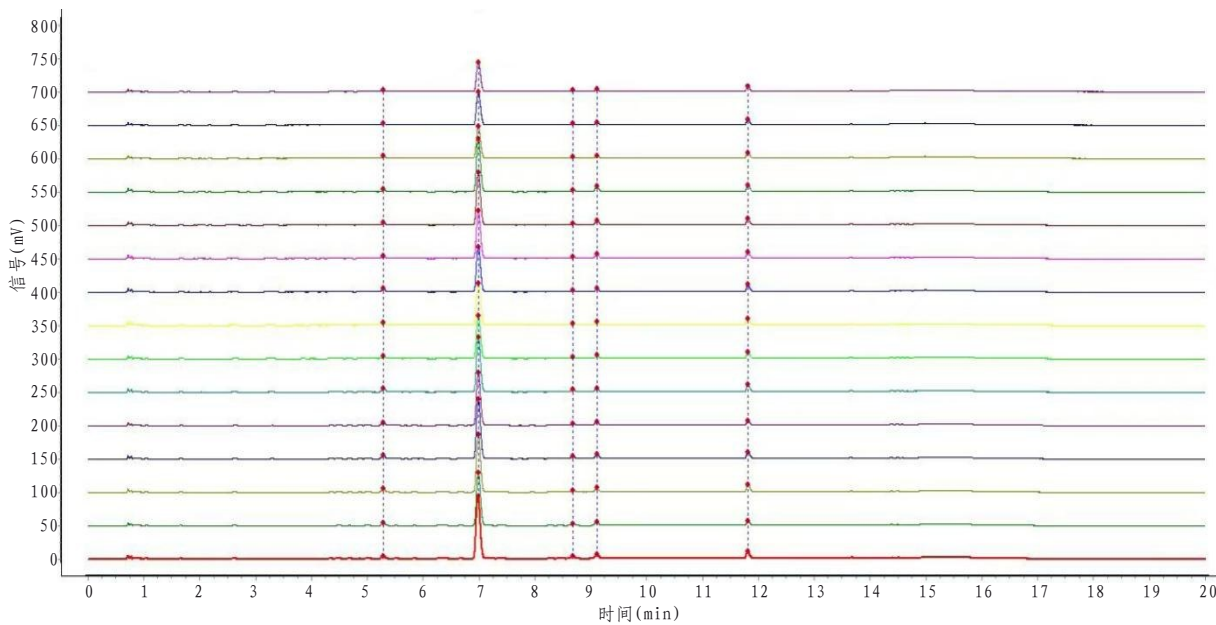


图1 15批槐花标准汤剂UPLC图

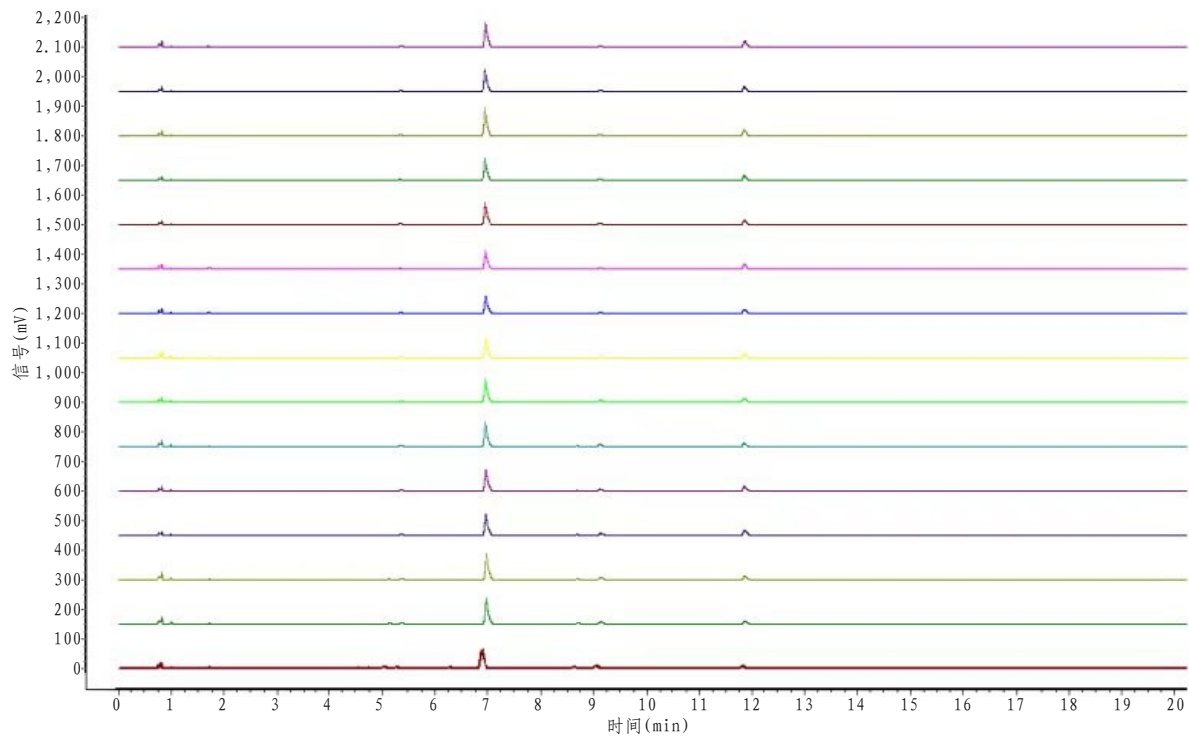
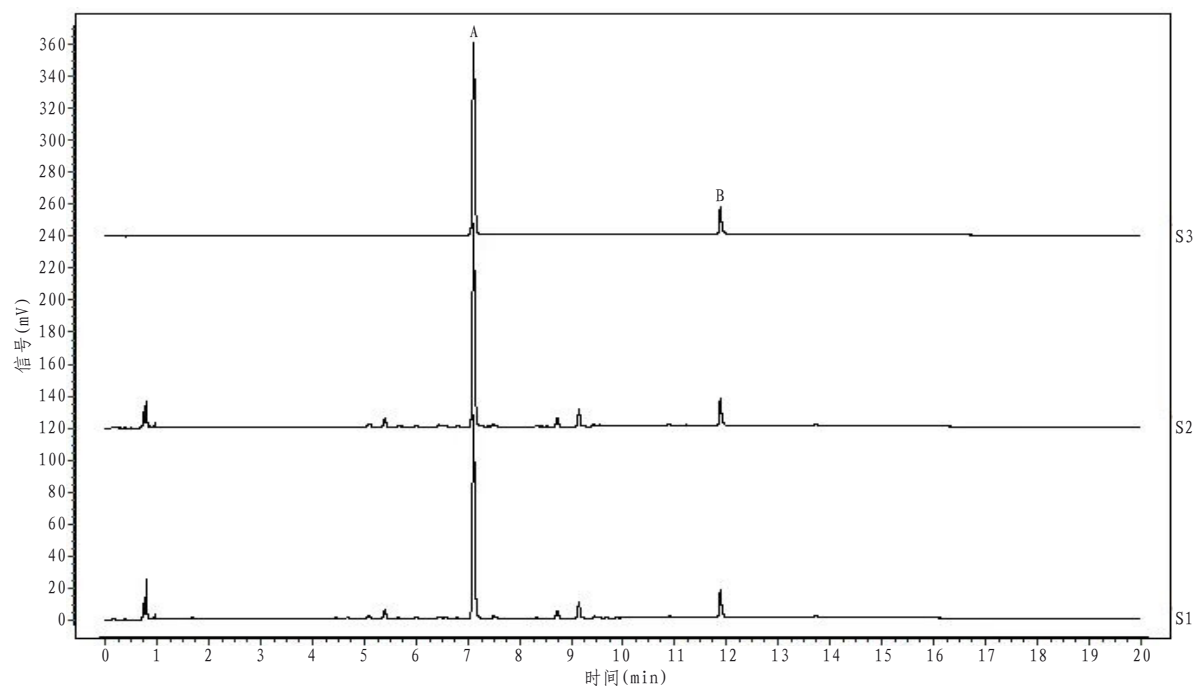


图2 15批炒槐花标准汤剂UPLC图



注:S1:槐花;S2:炒槐花;S3:A为芦丁、B为槲皮素

图3 标准汤剂对照图谱

2.6 数据分析

2.6.1 特征峰匹配 采用《中药色谱指纹图谱和相似度评价系统》(2012版),选取时间窗宽度为0.1 min,以中位数生成对照色谱图,经过多点校正后自动匹配,生成槐花、炒槐花标准汤剂UPLC特征图谱对照谱图,见图1—2。15批槐花、炒槐

花标准汤剂5个特征峰中2号特征峰(芦丁)峰面积稳定,分离度良好,故选做参比峰。计算其他特征峰的相对保留时间(relative retention time, RRT)和相对峰面积(relative hazard peak area, RPA),结果见表3—6。

表3 15批槐花标准汤剂特征峰相对保留时间

编号	t1/t2	t2/t2	t3/t2	t4/t2	t5/t2
S1	0.757	1.000	1.242	1.303	1.688
S2	0.758	1.000	1.241	1.303	1.687
S3	0.758	1.000	1.241	1.302	1.686
S4	0.759	1.000	1.239	1.300	1.686
S5	0.758	1.000	1.241	1.302	1.688
S6	0.757	1.000	1.241	1.302	1.687
S7	0.759	1.000	1.241	1.302	1.686
S8	0.758	1.000	1.242	1.304	1.691
S9	0.757	1.000	1.242	1.303	1.688
S10	0.758	1.000	1.240	1.301	1.687
S11	0.760	1.000	1.241	1.303	1.689
S12	0.757	1.000	1.242	1.303	1.689
S13	0.758	1.000	1.241	1.302	1.687
S14	0.758	1.000	1.239	1.300	1.688
S15	0.767	1.000	1.194	1.232	1.537
AVE	0.759	1.000	1.238	1.297	1.678
SD	0.002	0.000	0.012	0.018	0.039
RSD(%)	0.33	0.00	0.98	1.40	2.32

表4 15批槐花标准汤剂特征峰相对峰面积

编号	A1/A2	A2/A2	A3/A2	A4/A2	A5/A2
S1	0.057	1.000	0.04	0.084	0.387
S2	0.068	1.000	0.043	0.076	0.301
S3	0.065	1.000	0.042	0.079	0.393
S4	0.065	1.000	0.043	0.077	0.397
S5	0.062	1.000	0.042	0.076	0.359
S6	0.067	1.000	0.041	0.072	0.314
S7	0.071	1.000	0.044	0.079	0.296
S8	0.071	1.000	0.043	0.077	0.315
S9	0.050	1.000	0.036	0.092	0.369
S10	0.046	1.000	0.038	0.095	0.455
S11	0.044	1.000	0.037	0.091	0.349
S12	0.056	1.000	0.040	0.070	0.332
S13	0.063	1.000	0.042	0.076	0.464
S14	0.054	1.000	0.042	0.071	0.249
S15	0.039	1.000	0.044	0.082	0.138
AVE	0.059	1.000	0.041	0.080	0.341
SD	0.010	0.000	0.002	0.008	0.081
RSD(%)	17.33	0.00	6.02	9.60	23.76



表6 15批炒槐花标准汤剂特征峰相对峰面积

编号	A1/A2	A2/A2	A3/A2	A4/A2	A5/A2
S16	0.045	1.000	0.040	0.085	0.108
S17	0.042	1.000	0.039	0.085	0.120
S18	0.051	1.000	0.034	0.084	0.201
S19	0.042	1.000	0.032	0.081	0.188
S20	0.044	1.000	0.039	0.086	0.122
S21	0.054	1.000	0.033	0.085	0.162
S22	0.070	1.000	0.036	0.069	0.201
S23	0.047	1.000	0.038	0.071	0.213
S24	0.040	1.000	0.036	0.065	0.253
S25	0.048	1.000	0.035	0.076	0.188
S26	0.046	1.000	0.035	0.075	0.200
S27	0.054	1.000	0.036	0.075	0.216
S28	0.058	1.000	0.037	0.073	0.202
S29	0.051	1.000	0.038	0.068	0.225
S30	0.056	1.000	0.038	0.071	0.240
AVE	0.050	1.000	0.036	0.077	0.189
SD	0.008	0.000	0.002	0.007	0.043
RSD(%)	15.64	0.00	6.38	9.37	22.95

表5 15批炒槐花标准汤剂特征峰相对保留时间

编号	t1/t2	t2/t2	t3/t2	t4/t2	t5/t2
S16	0.771	1.000	1.249	1.312	1.701
S17	0.771	1.000	1.249	1.312	1.700
S18	0.772	1.000	1.249	1.314	1.703
S19	0.771	1.000	1.250	1.313	1.703
S20	0.771	1.000	1.250	1.313	1.704
S21	0.771	1.000	1.251	1.314	1.704
S22	0.771	1.000	1.250	1.313	1.702
S23	0.766	1.000	1.250	1.313	1.703
S24	0.770	1.000	1.250	1.314	1.704
S25	0.770	1.000	1.250	1.313	1.705
S26	0.770	1.000	1.250	1.314	1.706
S27	0.771	1.000	1.250	1.314	1.706
S28	0.772	1.000	1.251	1.315	1.706
S29	0.772	1.000	1.250	1.314	1.708
S30	0.769	1.000	1.250	1.314	1.706
AVE	0.771	1.000	1.250	1.313	1.704
SD	0.002	0.000	0.001	0.001	0.002
RSD(%)	0.20	0.00	0.05	0.06	0.13

15批槐花、炒槐花标准汤剂各特征峰的相对保留时间RSD小于2.5%,槐花标汤相对峰面积RSD

处于0.00%~23.76%之间,炒槐花标汤相对峰面积RSD处于0.00%~22.95%之间。炒槐花标准汤剂与槐花标准汤剂特征图谱均为5个特征峰,且相对保留时间基本一致,说明炒制对槐花中化学成分种类影响较小。

2.6.2 判别分析 为进一步分析槐花、炒槐花标准汤剂图谱的差异性,以槐花、炒槐花标准汤剂图谱中5个特征峰峰面积比值为分析对象,应用SPSS 19.0软件建立Fisher判别函数,整体分析槐花、炒槐花标准汤剂图谱,强化特征图谱的定性能力。

2.6.2.1 判别分析前提条件检验 5个特征峰峰面积比值的均值分别为0.054、1.000、0.039、0.078、0.265,变化幅度不大,见表7。由峰度、偏度计算可知,各指标均呈现近正态分布。特征峰峰面积比值的Wilks的Lambda值分别为0.803、0.490、0.953、0.406,除峰4外,各组间差异有统计学意义( $P<0.05$ ),组均值不等,见表8。可进行下一步判别分析<sup>[8]</sup>。

2.6.2.2 判别函数建立 将15批槐花、炒槐花标准汤分别编号1、2,然后将与其对应的特征峰比值输入到SPSS19.0软件中,应用Fisher线性判别式进行分析,得到判别函数为:

$$Y=-0.017X_1+1.021X_3+0.557X_4+0.961X_5 \quad (1)$$

式中, $X_1$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 分别为分组样品中特征峰1、3、4、5的相对峰面积。

将槐花标汤各特征峰比值均值: $\bar{X}_1=0.059$ ; $\bar{X}_3=0.041$ ; $\bar{X}_4=0.080$ ; $\bar{X}_5=0.341$ 及炒槐花标汤各特征峰比值均值: $\bar{X}_1=0.050$ ; $\bar{X}_3=0.036$ ; $\bar{X}_4=0.077$ ; $\bar{X}_5=0.189$ 分别代入到判别式(1)中,得到槐花标汤 $Y_A=0.413$ ;炒槐花标汤 $Y_B=0.260$ ,再将 $Y_A$ 、 $Y_B$ 值代入式(2)中。

$$\text{临界值函数: } Y_0=(s \times Y_A+n \times Y_B)/(s+n) \quad (2)$$

式中,s、n分别为分组中样本数; $Y_A$ 、 $Y_B$ 分别为分组样品代入判别函数计算所得。

计算得到槐花、炒槐花判别临界值为 $Y_0=(15 \times 0.413+15 \times 0.260)/30=0.337$ 。即 $Y \geq 0.337$ 可判断为槐花类别; $Y<0.337$ 可判断为炒槐花类别。

在30个初始案例中,判别函数对100.0%个案进行了正确分类。在交叉验证分组案例中,对96.7%个案进行了正确分类,说明所建立的判别函数较好地地区分槐花、炒槐花标准汤剂,可应用于槐花、炒槐花配方颗粒的分析。见表9。

表7 特征峰峰面积比值描述分析

序号	组数	极小值	极大值	均值	标准差	方差	偏度		峰度	
							统计量	标准误	统计量	标准误
峰1	30	0.039	0.071	0.054	0.010	0.00	0.271	0.427	-1.136	0.833
峰2	30	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00	-	-	-	-
峰3	30	0.032	0.044	0.039	0.003	0.00	-0.143	0.427	-0.934	0.833
峰4	30	0.065	0.095	0.078	0.007	0.00	0.447	0.427	-0.365	0.833
峰5	30	0.108	0.464	0.265	0.100	0.01	0.316	0.427	-0.849	0.833

注：“-”表示该参数未参与计算

表8 组均值的均等性检验

序号	Wilks Lambda	F	自由度1	自由度2	P
峰1	0.803	6.884	1	28	0.014
峰2	-	-	-	-	-
峰3	0.490	29.163	1	28	0.000
峰4	0.953	1.393	1	28	0.248
峰5	0.406	40.924	1	28	0.000

注：“-”表示该参数未参与计算

表9 判别函数验证

函数	指标	分组变量	预测组成员		合计
			1	2	
初始	计数	1	15	0	15
		2	0	15	15
	占比(%)	1	100	0	100
		2	0	100	100
交叉验证α	计数	1	14	1	15
		2	0	15	15
	占比(%)	1	93.3	6.7	100
		2	0	100	100

3 讨论

3.1 色谱条件考察 分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%乙酸水3个流动相体系。结果表明,采用乙腈-0.1%磷酸水溶液时,特征图谱中主要特征峰分离较好,基线波动小。因此,确定乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相

3.2 提取溶剂的比较 对50%、70%甲醇与100%甲醇进行比较,100%甲醇作为提取溶剂时所得图谱色谱峰峰面积大,分离效果好,因此选择100%甲醇作为提取溶剂。对比超声与回流提取方式,两种处理方式色谱峰数量、峰面积差异较小,而超声提取法简便、快捷,因此选用超声提取。

3.3 槐花、炒槐花标准汤剂特征图谱分析 景佳麟等<sup>[7]</sup>应用紫外-可见分光光度法与HPLC建立炒槐花饮片总黄酮、芦丁、槲皮素含量测定方法,限度与2020年版《中华人民共和国药典:一部》中“槐花”含量测定项下一致。与槐花比较,炒槐花

中总黄酮、芦丁含量差异较小,而槐花炭中总黄酮、芦丁含量明显下降<sup>[9]</sup>。马艳琴等<sup>[10]</sup>运用正交试验法优化槐花总黄酮提取工艺,发现不同炮制品提取率有明显不同,炒槐花为14.23%,生品为13.17%。提示槐花与炒槐花差异较小,单独以含量测定无法区分槐花与炒槐花饮片。李娆娆等<sup>[11]</sup>采用特征图谱方法对槐花、炒槐花和槐花炭进行分析,应用大孔吸附树脂法对样品进行处理,分别得到20%、50%和95%乙醇洗脱部位,结果显示炒槐花的成分组成与槐花相同,仅在含量上稍有差异。为进一步分析炮制对槐花中特征性成分的影响,采用1H NMR法和HPLC法对槐花饮片特征提取物B进行指纹图谱分析,试验表明槐花及炒槐花、槐花炭3种饮片的特征提取物SCE B的1H NMR基本一致,炮制后其特征成分未发生显著性变化,提示槐花与炒槐花饮片化学成分无明显差异。

槐花、炒槐花标准汤剂特征图谱均为5个特征峰,其中特征峰2为芦丁,特征峰5为槲皮素<sup>[7]</sup>。炒槐花标汤图谱中特征峰5的峰面积比值较槐花标汤呈下降趋势,考虑是槐花炮制过程中,芦丁含量降低,槲皮素含量上升<sup>[10]</sup>,而槲皮素由于糖苷键断裂,炮制过程中受热,极易发生氧化造成。由于无法从特征峰个数及峰面积比值对槐花、炒槐花标准汤剂进行定性区分,所以,本研究采用Fisher判别分析对5个特征峰比值进行全面考察,通过数据分析,建立的判别函数可将槐花、炒槐花标准汤剂区分。同时,应用该判别函数对10批槐花、炒槐花配方颗粒(神威药业提供样品)进行分析,