基于化学模式识别筛选清炒香附的差异标志物

杨颜溶[1,2]，田瀚举[1,2]，李莹莹[1,2]，贾　豪[1,2]，雷敬卫[1,2*]，龚海燕[1,2*]，谢彩侠[1,2]

1. 河南中医药大学，河南 郑州　450046
2. 河南省中药质量控制与评价工程技术中心，河南 郑州　450046

摘　要：目的　建立香附饮片、清炒香附、香附炭的 HPLC 指纹图谱，结合化学模式识别筛选差异标志物，并测定 6 种主要成分的含量，为进一步完善香附质量标准提供参考。**方法**　采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》建立 21 批香附样品的 HPLC 指纹图谱，进行相似度评价，确定共有峰个数；采用 SIMCA 14.1 软件进行层次聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）、正交偏最小二乘-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA），以变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）＞1 为标准筛选出差异标志物；测定 5-羟基甲基糠醛（5-hydroxymethylfurfural，5-HMF）、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮的含量。**结果**　21 批 HPLC 指纹图谱的相似度均不小于 0.934，共标定 23 个共有峰，指认 3、10、11、17、21、23 号峰分别为 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮；PCA 结果、OPLS-DA 结果与 HCA 结果一致，均可将 21 批香附样品分为 3 类；通过 VIP 筛选出 2、23（α-香附酮）、17（木犀草素）、10（对香豆酸）、11（阿魏酸）号峰为导致样品差异的主要标志色谱峰；5-HMF 的含量在香附炭中最高。对香豆酸、阿魏酸的含量在香附饮片、清炒香附、香附炭中逐渐增加。木犀草素在清炒香附中含量最高。α-香附酮含量经炒后略有增加。香附烯酮含量在香附饮片、清炒香附、香附炭中含量逐渐减少。**结论**　筛选出未知成分 2 号峰与已知成分 α-香附酮、木犀草素、对香豆酸、阿魏酸为差异标志物；所建立的清炒香附的 HPLC 指纹图谱存在一定差异，且 HPLC 指纹图谱与含量测定方法操作简单、准确，能够为清炒香附药效物质基础研究提供实验依据，可为进一步完善香附质量标准提供参考。

关键词：香附；清炒；指纹图谱；含量；化学模式识别；差异标志物；层次聚类分析；主成分分析；正交偏最小二乘-判别分析；5-羟基甲基糠醛；对香豆酸；阿魏酸；木犀草素；香附烯酮；α-香附酮

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)05 - 1411 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.007

Screening difference markers of stir-fried *Cyperi Rhizoma* based on chemical pattern recognition

YANG Yan-rong[1,2], TIAN Han-ju[1,2], LI Ying-ying[1,2], JIA Hao[1,2], LEI Jing-we[1,2], GONG Hai-yan[1,2], XIE Cai-xia[1,2]

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
2. Henan Provincial Chinese Medicine Quality Control and Evaluation Engineering Technology Center, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective　To establish the HPLC fingerprint of Xiangfu (*Cyperi Rhizoma*) decoction pieces, stir-fried *Cyperi Rhizoma*, and *Cyperi Rhizoma* charcoal, combine chemical pattern recognition to screen different markers, and determine the content of six main ingredients, providing a reference for further improving the quality standards of *Cyperi Rhizoma*. **Methods**　The HPLC fingerprints of 21 batches of *Cyperi Rhizoma* samples were established by the *Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 Edition)*, and the similarity evaluation was carried out to determine the total number of peaks. SIMCA 14.1 software was used for hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), and VIP > 1 was used as the criterion to screen out the difference markers; Determination of the content of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), *p*-coumaric acid, ferulic acid, luteolin, caryophyllone, α-cyperone. **Results**　The

收稿日期：2022-10-08

基金项目：国家重点研发计划项目（2018YFC1707000）；河南省中医药科学研究专项（20-21ZY2095）

作者简介：杨颜溶（1998—），硕士研究生，研究方向为中药质量分析研究。Tel: 15090522158　E-mail: yanrong202102@163.com

***通信作者：**雷敬卫，教授，硕士生导师，博士，从事中药质量分析研究。Tel: (0371)656955281　E-mail: 925390812@qq.com

龚海燕，副教授，硕士研究生，从事中药质量分析研究。Tel: 13838393243　E-mail: ghy_mz@163.com

similarity of the fingerprints of the 21 batches of HPLC was not less than 0.934, and a total of 23 common peaks were calibrated, and peaks 3, 10, 11, 17, 21 and 23 were identified as 5-HMF, *p*-coumaric acid, ferulic acid, luteolin, caryophyllone, α-cyperone, respectively. The results of PCA, OPLS-DA results were consistent with the results of HCA, and 21 batches of *Cyperi Rhizoma* samples can be divided into three categories; By VIP method, 2, 23 (α-cyperone), 17 (luteolin), 10 (*p*-coumaric acid), 11 (ferulic acid) were selected as the main marker chromatographic peaks that caused the difference in samples; The content of 5-HMF was highest in *Cyperi Rhizoma* charcoal. The content of coumaric acid and ferulic acid gradually increased in *Cyperi Rhizoma* decoction pieces, stir-fried *Cyperi Rhizoma* and *Cyperi Rhizoma* charcoal. Luteolin was the highest in stir-fried *Cyperi Rhizoma*. The content of α-cyperone increased slightly after stir-frying. The content of caryophyllone was gradually reduced in *Cyperi Rhizoma* decoction pieces, stir-fried *Cyperi Rhizoma*, and *Cyperi Rhizoma* charcoal. **Conclusion** The unknown ingredient peak 2 was screened and the known ingredients α-cyperone, luteolin, *p*-coumaric acid and ferulic acid were selected as markers of difference; There were certain differences in the HPLC fingerprint of the fried *Cyperi Rhizoma*, and the HPLC fingerprint and content determination method were simple and accurate to operate, which can provide experimental basis for the basic research of the medicinal substances attached to the stir-fried *Cyperi Rhizoma*, and provide a reference for further improving the quality standards of the *Cyperi Rhizoma*.

Key words: *Cyperi Rhizoma*; stir-frying; fingerprinting; content; chemical pattern recognition; difference markers; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; 5-hydroxymethylfurfural; *p*-coumaric acid; ferulic acid; luteolin; caryophyllone; α-cyperone

香附最早记载于《名医别录》[1]，为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L.的干燥根茎。《本草纲目》[2]记载：“生则上行胸膈，外达皮肤，熟则下走肝肾，外彻腰足。炒黑则止血，……青盐炒则补肾气，酒浸炒则行经络，醋浸炒则消积聚，姜汁炒则化痰饮”，表明清炒香附具有与辅料炮制香附不同的主治功效。中药炒制方法多样，包括清炒、麸炒、土炒等，香附清炒法最早见于《银海精微》，记载香附清炒法的本草古籍达 61 部[3]。香附虽为“女科要药”，但其味辛而行气力强，久用易耗伤根本之气血，因此《妙一斋医学正印种子编》中岳甫嘉多为炒用[4]。关于炒制程度，历代古籍中多有提及“微炒”“炒焦”“炒黑”，用于治疗不同病症[3]，明代《医学入门》[5]记载：“气病略炒”，清代《药品化义》[6]记载：“炒黑治淋漓及崩漏”，即不同清炒程度的香附确有不同主治功效。目前多为化学成分[7]、药理[8-11]、辅料炮制、药用部位以及产地等内容的研究[12-17]，未见涉及清炒。

中药指纹图谱具有整体性和稳定性的特点，是评价中药质量一致性和稳定性的有效方法[18]，能够对中药的主要化学成分进行宏观整体表征，层次聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）、正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）等化学模式识别技术，能够将指纹图谱所含有的信息进行处理表达，同时避免主观加权的弊端[19]。

基于以上内容，为排除产地等方面的影响，选择河南产地香附进行分析研究，采用高效液相色谱法（HPLC），结合化学模式识别，筛选出差异标志物，对香附饮片、清炒香附、香附炭的 HPLC 指纹图谱、指标成分等进行探讨，以期为清炒香附药效物质基础研究提供实验依据，为进一步完善香附质量标准提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；ME204E 型万分之一分析天平、AB135-S 型十万分之一分析天平，上海梅特勒-托利多仪器有限公司；HH-S6 型电子恒温水浴锅，巩义市予华仪器有限责任公司；KQ-700DB 型数控超声波清洗器，昆山超声仪器有限公司；FW-100 型高速万能粉碎机，北京科伟永兴仪器有限公司；101-3AB 型点热恒温鼓风干燥箱，北京中兴伟业仪器有限公司。

1.2 材料与试剂

对照品 α-香附酮（批号 MUST-22041007）、香附烯酮（批号 MUST-22011201）、阿魏酸（批号 MUST-19032928），质量分数均≥98.0%，成都曼斯特生物科技有限公司；对照品木犀草素，批号 DST191020-032，质量分数≥98.0%，上海源叶生物科技有限公司；对照品对香豆酸（批号 AF20041951）、5-羟基甲基糠醛（5-HMF，批号 AF21030751），质量分数均≥98.0%，成都埃法生物科技有限公司；甲醇，分析纯，天津市富宇精细化工有限公司；磷酸，天津市利密欧化学试剂有限公司；娃哈哈纯净水。

1.3 药材

7 批香附药材于 2021 年采集于河南省新郑市大关村，经河南中医药大学陈随清教授鉴定为莎草科莎草属植物莎草 *C. rotundus* L.的干燥根茎，燎后直接晒干，切成厚片，备用。7 批净香附饮片分别编号 S1～S7。

2 方法与结果

2.1 样品制备[4]

2.1.1 清炒香附 净香附饮片（S1～S7）文火加热，炒至内部焦黄，取出，放凉，即得清炒香附（S8～S14）。

2.1.2 香附炭 净香附饮片（S1～S7）中火加热，炒至表面焦黑色，内部焦褐色，喷淋清水少许，灭尽火星，取出，放凉，即得香附炭（S15～S21）。

2.2 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件 Venusil C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相，进行梯度洗脱：0～12 min，5%～20%甲醇；12～30 min，20%～30%甲醇；30～40 min，30%～48%甲醇；40～52 min，48%～50%甲醇；52～55 min；50%～59%甲醇；55～25 min；59%～70%甲醇；25～80 min；70%～77%甲醇；检测波长：0～65 min，310 nm；65～80 min，254 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温为 30 ℃；进样量为 10 μL。

2.2.2 供试品溶液的制备 样品粉碎，精密称取样品粉末适量，置具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 75%甲醇，称定质量，超声处理（250 W、40 kHz）45 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、α-香附酮和香附烯酮对照品适量，置于 5 mL 量瓶中，加入甲醇溶解，定容，分别得到质量浓度为 549.3、370.7、326.7、119.3、220.0、193.3 μg/mL 的对照品溶液；分别量取 6 种对照品溶液适量，配制成一定质量浓度的混合对照品溶液。

2.2.4 精密度试验 精密称取香附炭样品（S15），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定 6 次，以 α-香附酮为参照峰（S，较于其他成分峰面积大，峰形较好，故作为参照峰），计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0.49%、0.16%，表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精密称取香附炭样品（S15），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，以 α-香附酮为参照峰，计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0.48%、0.37%，表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 精密称取香附炭样品（S15），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于室温下放置 0、2、4、6、12、24 h，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，以 α-香附酮为参照峰，计算共有峰的相对峰面积和相对保留时间的 RSD 分别为 0.49%、0.37%，表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定

2.2.7 指纹图谱的建立、共有峰指认、相似度评价 精密称取香附样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，将所得数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》，以 S21 样品图谱为参照，采用中位数法，经多点校正、Mark 峰匹配后生成 21 批样品的叠加指纹图谱和对照指纹图谱（R），结果见图 1。通过与混合对照品指纹图谱（图 2）比对，指认出峰 3、10、11、17、21、23 分别为 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮。25 批香附样品与 R 的相似度分别为 0.934、0.987、0.935、0.934、0.936、0.966、0.937、0.987、0.967、0.987、0.987、0.967、0.937、0.987、0.966、0.987、0.967、0.987、0.966、0.935、0.966，均不小于 0.934。

2.2.8 HCA 将 23 个共有峰峰面积进行处理，导入 SPSS.19.0 软件，采用组间连接法，以欧氏距离为分类依据，对样品进行系统聚类分析，结果见图 3。可知，当组间距离为 2 时，21 批样品可聚为 3 类：S1～S7 聚为一类，S8～S14 聚为一类；当组间距离为 10 时，可聚为 2 类。

2.2.9 PCA 采用 SIMCA 14.1 软件对 21 批样品中 23 个共有峰进行 PCA，结果见图 4。结果显示 21 批样品可聚为 3 类：S1～S7 聚为一类，S8～S14 聚为一类。与 HCA 结果一致。

2.2.10 OPLS-DA 为进一步寻找影响不同样品间差异的成分，以 23 个共有峰峰面积为变量，采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA。结果显示，R^2_X=0.911、R^2_Y=0.988、Q^2=0.982 均大于 0.5，表明模型拟合度较好，具有较高的稳定性与预测能力，结果见图 5。可知，21 批样品可分为 3 类，与 HCA 结果、PCA 结果一致；为避免建立的 OPLS-DA 模型

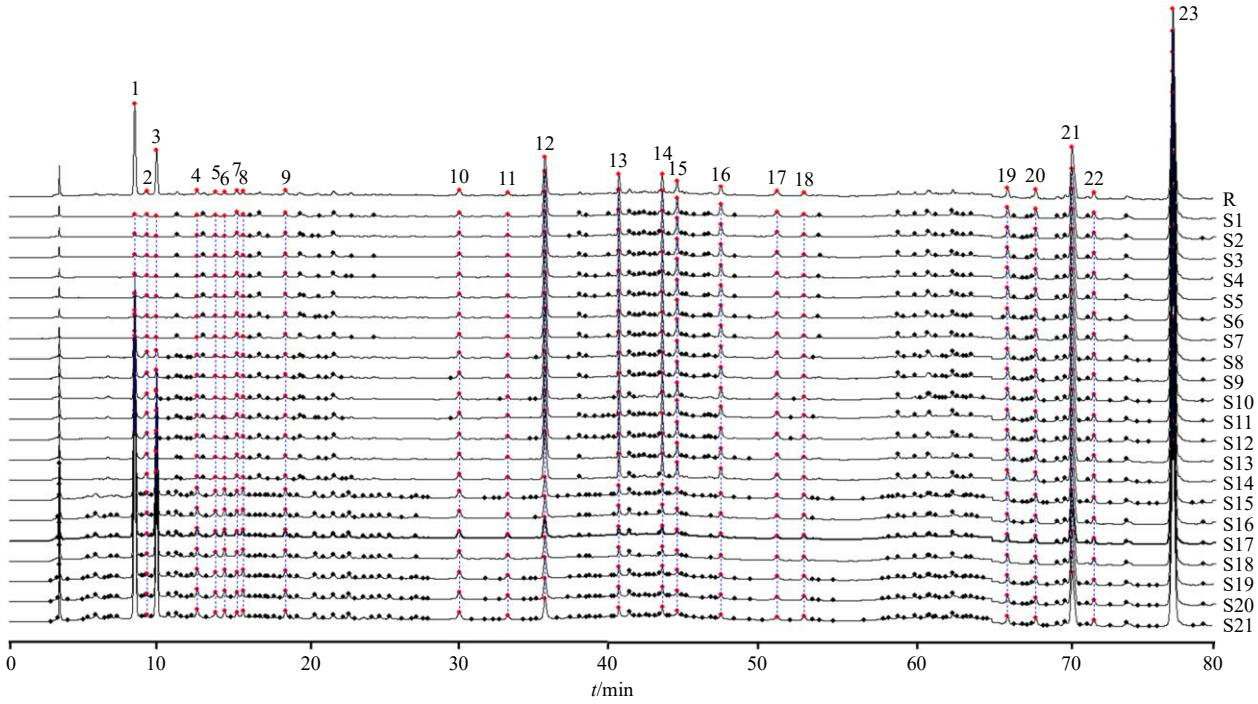
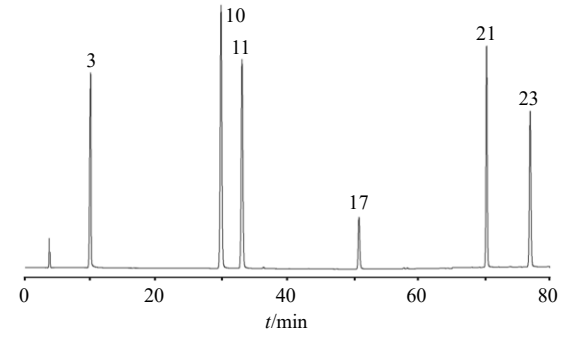


图 1　21 批样品的 HPLC 叠加指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1　HPLC overlay fingerprint and reference chromatogram (R) of 21 batches of samples



3-5-HMF　10-对香豆酸　11-阿魏酸　17-木犀草素　21-香附烯酮　23-α-香附酮

3-5-HMF　10-*p*-coumaric acid　11-ferulic acid　17-luteolin　21-caryophyllone　23-α-cyperone

图 2　混合对照品的 HPLC 图

Fig. 2　HPLC of mixed reference substances

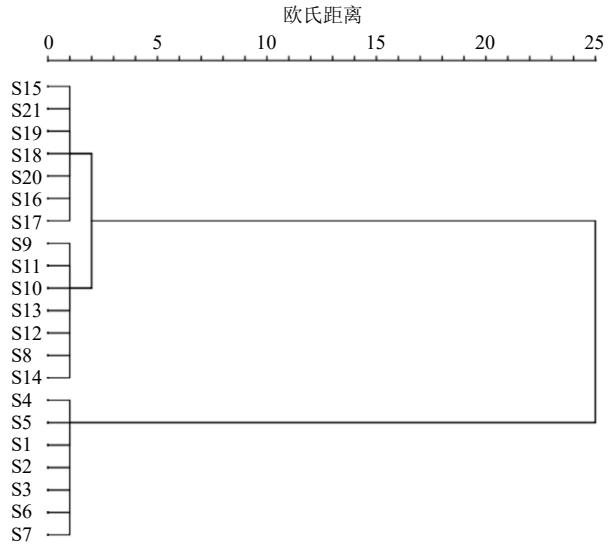


图 3　21 批样品的 HCA 树状图

Fig. 3　HCA tree view of 21 batches of samples

出现过度拟合而影响分析结果的准确性，利用 200 次置换试验分别进行置换检验，结果见图 6，显示置换后的 R^2＝−0.028 8＜0.3、Q^2＝−0.438＜0.05，表明所建模型可靠，未出现过度拟合现象，可用于标志物的筛选。

将 23 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件，对各共有峰的变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）值进行分析，并以 VIP＞1 为标准筛选贡献较大的差异性成分[20]，结果见图 7。可知，VIP＞1 的共有峰依次为 2、23（α-香附酮）、17（木犀草素）、10（对香豆酸）、11（阿魏酸），提示为导致样品间差异的主要标志色谱峰。

2.3　含量测定

2.3.1　系统适用性试验　取“2.2.3”项下混合对照品溶液及“2.2.2”项下供试品溶液 S10、空白溶剂（75%甲醇），按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录 HPLC 指纹图谱，结果见图 8。可知，供试品溶液、混合对照品溶液中各色谱峰的分离度良好，空白溶剂对测定无干扰。

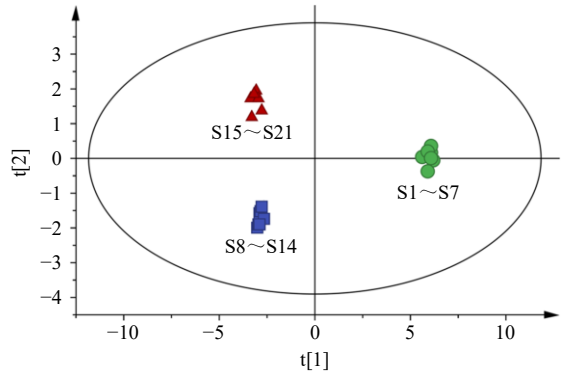


图 4 21 批样品的 PCA 得分图

Fig. 4 Score chart of PCA for 21 batches of samples

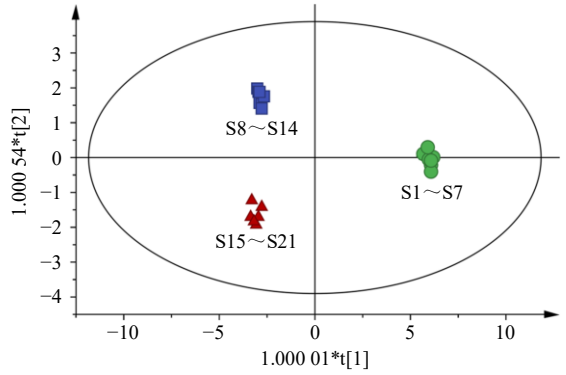


图 5 21 批样品的 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score chart for 21 batches of samples

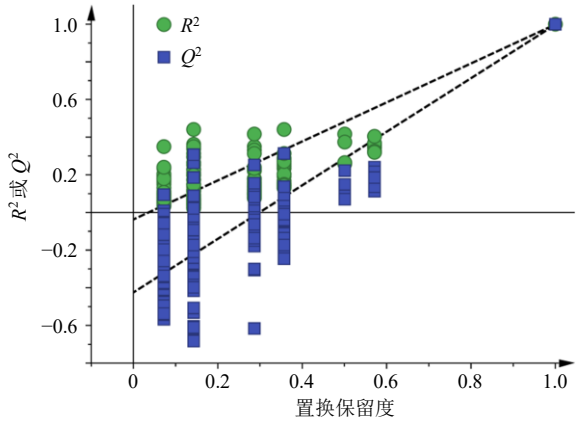


图 6 OPLS-DA 模型的 200 次响应排序检验

Fig. 6 200-time response ranking test for OPLS-DA models

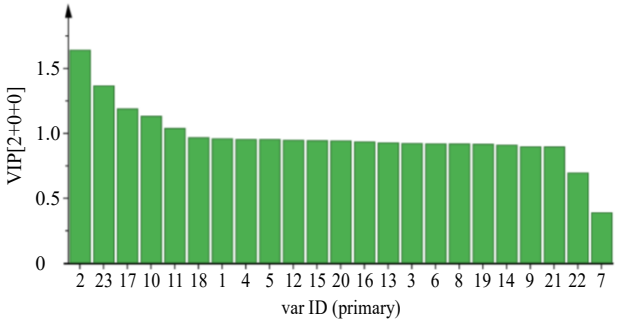


图 7 23 个共有峰的 VIP 值

Fig. 7 VIP value of 23 shared peaks

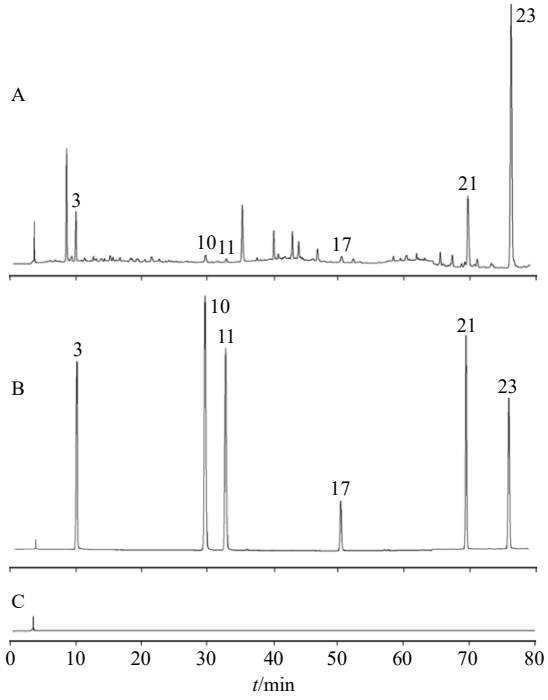


图 8 供试品溶液 (S10, A)、混合对照品 (B)、空白溶剂 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC fingerprint of test solution (S10, A), mixed reference substances (B) and blank solvent (C)

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.3”项下各对照品溶液，5-HMF 对照品溶液依次稀释 3.0、7.5、75.0、150.0 倍，得到质量浓度为 183.1、73.2、7.3、3.7 μg/mL 的系列对照品溶液；对香豆酸对照品溶液依次稀释 1.5、2.0、2.5、4.0 倍，得到质量浓度为 24.7、18.5、14.8、9.3 μg/mL 的系列对照品溶液；阿魏酸对照品溶液依次稀释 1.5、2.0、3.0、6.0 倍，得到质量浓度为 216.7、163.4、108.9、54.5 μg/mL 的系列对照品溶液；木犀草素对照品溶液依次稀释 1.5、2.0、2.5、3.0 倍，得到质量浓度为 79.6、59.7、47.7、39.8 μg/mL 的系列对照品溶液；香附烯酮对照品溶液依次稀释 1.2、1.3、1.5、2.0 倍，得到质量浓度为 161.1、148.7、128.9、96.7 μg/mL 的系列对照品溶液；α-香附酮对照品溶液依次稀释 2.5、2.8、3.0、3.5 倍，得到质量浓度为 176.0、157.1、146.7、125.7 μg/mL 的系列对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，以各待测成分的质量浓度为横坐标（X）、峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，经计算得各成分的回归方程与线性范围分别为 5-HMF Y＝3 458.8 X－0.153 1，r＝1.000 0，线性范围 3.7～549.3 μg/mL；对香豆酸 Y＝8 478.2 X－1.311 0，r＝0.999 6，线性范围 9.3～37.1 μg/mL；阿

魏酸 Y=685.7 X−0.107 1，r=0.999 7，线性范围 54.5～326.7 μg/mL；木犀草素 Y=2 404.3 X+2.712 7，r=0.999 6，线性范围 39.8～119.3 μg/mL；香附烯酮 Y=10 102 X−5.920 0，r=0.999 7，线性范围 96.7～193.3 μg/mL；α-香附酮 Y=31 040 X+11.946，r=1.000 0，线性范围 125.7～220.0 μg/mL。

2.3.3 精密度试验　取“2.2.2”项下香附炭供试品溶液（S15），按“2.2.1”项下色谱条件进样测定 6 次，记录 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮的峰面积，计算 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮峰面积的 RSD 分别为 1.48%、1.67%、0.57%、0.98%、0.51%、0.26%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验　取“2.2.2”项下香附炭供试品溶液（S15），分别于室温下放置 0、2、4、6、12、24 h 时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮的峰面积，得 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮峰面积的 RSD 分别为 1.54%、0.97%、0.67%、0.16%、0.49%、0.28%，表明供试品溶液于室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验　取香附炭样品（S15），共 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮的峰面积，并计算含量，得 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮质量分数的 RSD 分别为 2.19%、1.64%、0.79%、0.26%、0.37%、0.94%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验　分别精密称取已知含量的香附炭样品（S15）9 份，分为 3 组，分别按样品中成分含量的 50%、100%和 150%加入对应成分的单一对照品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮的峰面积并计算加样回收率与 RSD。计算得 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮的平均加样回收率分别为 98.17%、98.64%、97.68%、98.12%、98.69%、98.57%，RSD 分别为 1.69%、1.89%、1.34%、1.56%、1.49%、1.83%，表明方法准确度良好。

2.3.7 样品测定　分别精密称取 21 批香附样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样，记录峰面积，并计算样品中各指标成分含量，对香附饮片与清炒香附、香附炭中各成分含量的平均值进行比较，结果见表 1、2。由表 5 可知，5-HMF 含量在香附饮片、清炒香附、香附炭中逐渐增加，炒炭后 5-HMF 明显增加；对香豆酸、阿魏酸含量在香附饮片、清炒香附、香附炭中逐渐增加；清炒香附中木犀草素含量最高；香附烯酮含量在香附饮片、清炒香附、香附炭中呈下降趋势；α-香附酮在香附炭中含量最低，香附饮片经炒

表 1　21 批香附样品的质量分数测定结果

Table 1　Content determination results of 21 batches of *Cyperi Rhizoma*

编号	质量分数/(μg·g^{-1})					
	5-HMF	对香豆酸	阿魏酸	木犀草素	香附烯酮	α-香附酮
S1	4.1	10.7	58.1	53.7	132.6	152.3
S2	4.9	11.9	68.2	52.3	132.2	155.8
S3	4.6	10.2	56.7	52.3	133.6	157.2
S4	3.7	10.4	56.6	53.9	129.4	151.6
S5	4.2	10.5	56.4	60.0	129.3	1521
S6	4.0	12.4	69.5	53.5	134.4	151.9
S7	4.1	10.7	58.1	53.7	133.2	152.3
S8	30.0	16.9	93.3	66.3	125.8	159.2
S9	29.1	16.5	93.7	64.3	123.1	158.7
S10	30.6	16.8	86.7	66.8	123.2	158.9
S11	32.6	16.9	86.3	67.7	125.1	159.3
S12	30.6	17.0	88.0	65.0	125.3	159.3
S13	28.2	16.6	87.8	65.0	123.1	158.8
S14	29.8	16.9	88.6	67.5	1240	160.2
S15	510.7	24.2	146.7	42.1	122.5	149.8
S16	509.5	24.3	142.5	41.0	124.4	149.1
S17	515.9	24.5	144.9	41.5	125.1	151.0
S18	516.0	20.5	143.5	41.0	121.9	150.1
S19	513.2	20.3	143.3	41.1	122.2	149.9
S20	518.0	24.6	145.2	41.7	122.3	151.3
S21	513.7	24.3	147.5	40.8	122.5	150.6

表 2　各成分平均质量分数

Table 2　Comparison of the average content of each ingredient

编号	质量分数/(μg·g^{-1})					
	5-HMF	对香豆酸	阿魏酸	木犀草素	香附烯酮	α-香附酮
S1～S7	4.2	11.0	60.5	54.2	132.1	153.3
S8～S14	30.1	16.8	89.2	66.1	124.2	159.2
S15～S21	513.9	23.2	144.8	41.3	123.0	150.3

后 α-香附酮含量略有增加。

3 讨论

HPLC 指纹图谱研究结果显示，21 批样品的相似度均不小于 0.934，共标定 23 个共有峰，指认出 3 号峰为 5-HMF，10 号峰为对香豆酸，11 号峰为阿魏酸，17 号峰为木犀草素，21 号峰为香附烯酮，23 号峰为 α-香附酮；PCA 结果、OPLS-DA 结果与 HCA 结果一致，均可分为 3 类，即香附饮片、清炒香附、香附炭存在一定差异，其规律符合中药炮制基本原理[21]；通过 VIP 法筛选出对样品影响较大的成分，筛选出未知成分 2 号峰和已知成分 α-香附酮、木犀草素、对香豆酸、阿魏酸为差异标志物。

含量测定结果显示，5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮的质量分数分别为 3.7～518.0、10.2～24.6、56.4～147.5、40.8～67.7、121.9～134.4、149.1～160.2 μg/g；5-HMF 在香附炭中含量最高，推测与炮制程度有关[22-25]；对香豆酸、阿魏酸在香附饮片中含量最少，香附炭中含量最高，研究报道含有阿魏酸的药材在体外干燥过程中会与阿魏酸松柏酯相互转化[26]，推测与其有关；木犀草素在清炒香附中含量最高；α-香附酮含量经炒后略有增加，有研究报道在炮制过程中，香附烯酮转化为 α-香附酮，致使其含量增加[27]，推测与其有关；香附烯酮含量在香附饮片、清炒香附、香附炭中含量逐渐减少，推测与炮制过程中挥发性成分损失有关[28]，提示在炮制的过程中应控制时间与温度。

综上所述，本研究筛选出未知成分 2 号峰与已知成分 α-香附酮、木犀草素、对香豆酸、阿魏酸为差异标志物；所建立的 HPLC 指纹图谱与含量测定方法操作简单、准确，能够为清炒香附药效物质基础研究提供实验依据，可为进一步完善香附质量标准提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 梁·陶弘景集. 尚志钧辑校. 名医别录 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 154-156.

[2] 明·李时珍编纂. 刘衡如，刘山永校注. 本草纲目: 新校注本 [M]. 北京: 华夏出版社, 1998: 615-620.

[3] 于明, 张秀如, 张翠翠, 等. 香附炮制历史沿革及现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(3): 223-232.

[4] 徐新宇, 崔云, 王玉凤. 《妙一斋医学正印种子编》香附炮制特点及临床运用 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4839-4841.

[5] 明·李梴著. 金嫣莉等校注. 医学入门 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1995: 189-190.

[6] 明·贾所学撰. 李延昱补订. 王小岗, 郑玲校注. 药品化义 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2012: 29.

[7] 王凤霞, 钱琪, 李葆林, 等. 香附化学成分和药理作用研究进展及质量标志物（Q-Marker）预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5225-5234.

[8] 张康丽, 李凌宇, 于猛, 等. 香附醇提物抗神经炎症活性及化学成分分析 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(8): 1549-1557.

[9] 赵威, 于志勇. 香附烯酮与卡铂联合应用对三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 增殖、凋亡的影响及其机制 [J]. 山东医药, 2022, 62(21): 5-9.

[10] 候雯, 徐建. 中药香附在人体不同生理系统中的药理作用研究进展 [J]. 四川中医, 2022, 40(1): 213-216.

[11] 叶晓滨, 孙越. 含香附治疗肝郁脾虚证的中成药干预抑郁症伴功能性消化不良的研究进展 [J]. 中医研究, 2021, 34(10): 63-67.

[12] 许娜, 牟玉侦, 李文兵, 等. 基于 HPLC 法和多元统计分析的不同产地香附挥发油中 4 种成分含量的比较研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(23): 2833-2840.

[13] 纪亮, 雷敬卫, 张维方, 等. 基于 GC-MS 定性分析结合多成分含量测定评价香附不同部位药用价值 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 86-91.

[14] 刘泽华. 醋制香附的炮制工艺及对有效成分的影响 [J]. 农业科技与装备, 2021(6): 88-89.

[15] 乔璐, 张园园, 王若晨, 等. 不同炮制方法对香附中香附烯酮和 α-香附酮的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 49-53.

[16] 卢君蓉, 许娜, 牟玉侦, 等. 基于 GC-MS 指纹图谱结合化学计量学的不同产地香附挥发油化学成分比较研究 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(12): 106-110.

[17] 杨天歌, 倪诗婷, 高旭华, 等. HS-GC-MS 法分析醋香附挥发性化学成分 [J]. 中南药学, 2021, 19(5): 865-869.

[18] 王敏存, 贺琪珺, 周燕子, 等. 丹膝颗粒组成药味 UPLC 指纹图谱的 1 次稳态投料量研究 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 704-711.

[19] 赵宏苏, 赵茹, 乔金为, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1345-1353.

[20] 贾豪, 雷益铭, 张维方, 等. 牛膝药材的红外指纹图谱建立及多元统计分析 [J]. 中国药房, 2022, 33(2): 153-159.

[21] 李璎峪, 刘瑞连, 谭小娟, 等. 基于多元统计方法和成分差异分析辨识栀子药材与饮片质量标志物 [J/OL]. 中草药: 1-8 [2022-10-06]. https://kns.cnki.net/kcms2/

article/abstract?v=3uoqIhG8C46NmWw7YpEsKHTPvOGrUOOqX1coEOzL8AEaFu3kteAWWz8qOjh5W8xbx2blpwiq96-D_MlU81LX9Mk2Q_ivPG_Y&uniplatform=NZKPT.

[22] 王梅, 王越欣, 武英茹, 等. 米炒党参炮制过程中党参炔苷、5-HMF 和党参多糖含量动态变化研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(7): 2765-2772.

[23] 刘品华, 刘明研, 董建伟, 等. 蒸制温度、时间对滇黄精皂苷元及 5-HMF 含量的影响 [J]. 食品工业, 2020, 41(12): 172-177.

[24] 李蒙恩, 马彦江, 姚超, 等. 基于九蒸九制黄精中 5-HMF 和多糖含量分析的黄精炮制品质量评价模型的建立 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(8): 1897-1900.

[25] 徐斌, 张强, 刘亮镜. 丹参酒炙过程中炮制时间、颜色与化学成分含量的相关性 [J]. 中国药房, 2021, 32(14): 1715-1720.

[26] 雒军, 王引权, 吴国泰, 等. 当归根部中主要有效成分的动态积累和转化研究 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6663-6668.

[27] 乔璐, 张园园, 王若晨, 等. 不同炮制方法对香附中香附烯酮和 α-香附酮的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 49-53.

[28] 许娜, 梁媛媛, 李文兵, 等. 香附挥发油研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(6): 1882-1888.

[责任编辑　郑礼胜]