基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及多指标成分定量评价香附质量

乔俊昊[1,2]，杨颜溶[1,2]，孙静洋[1,2]，刘文俊[1,2]，王雨欣[1,2]，赵　云[1,2]，杨春静[2,3*]，雷敬卫[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研究中心，河南 郑州 450046
3. 河南中医药大学第三附属医院，河南 郑州 450046

摘　要：目的　采用指纹图谱结合化学模式识别评价不同产地香附 *Cyperus rotundus* 及其炮制品的质量并进行化学成分含量测定。**方法**　采用 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。结合聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）及正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）进行评价。对样品中 5-羟甲基糠醛（5-HMF）、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮 6 个成分进行定量分析。**结果**　建立不同产地香附、醋香附、酒香附、四制香附的高效液相指纹图谱，60 批样品共标定 17 个共有峰，指认出 6 个成分，3 号峰为 5-HMF，7 号峰为对香豆酸，8 号峰为阿魏酸，14 号峰为木犀草素，19 号峰为香附烯酮，21 号峰为 α-香附酮。PCA 分析结果、OPLS-DA 分析结果与聚类分析结果显示，香附、醋炙香附、醋煮香附、醋蒸香附、醋煮蒸香附存在一定差异。以 VIP＞1 为标准筛选贡献较大的差异性成分，筛选出 6、5、7（对香豆酸）、15、14（木犀草素）、8、1 号峰为差异标志物，提示在香附及其炮制品质量分析中应重点关注以上成分，含量测定结果表明不同产地香附及其炮制品之间存在一定差异。**结论**　建立的香附 HPLC 指纹图谱操作简便、结果可靠，5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮可以作为香附质量评价的指标性成分。

关键词：香附；HPLC 指纹图谱；化学识别模式；香附烯酮；α-香附酮；木犀草素；5-HMF；对香豆酸；阿魏酸

中图分类号：R286.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)17 - 5999 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.026

Quantitative evaluation of *Cyperus rotundus* quality based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition and multi-index components

QIAO Junhao[1, 2], YANG Yanrong[1, 2], SUN Jingyang[1, 2], LIU Wenjun[1, 2], WANG Yuxin[1, 2], ZHAO Yun[1, 2], YANG Chunjing[2, 3], LEI Jingwei[1, 2]

1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
2. Henan Engineering Research Center for Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China
3. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective　To identify and evaluate the quality of Xiangfu (*Cyperus rotundus*) and its processed products from different origins, a combination of fingerprinting techniques with chemical modelling and chemical composition content determination was employed. **Methods** A Venusil C_{18} chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used; methanol-0.1% phosphoric acid aqueous solution was used as the mobile phase, and gradient elution was performed. Evaluation was carried out by combining cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. The five components in the sample, 5-HMF, p-coumaric acid, ferulic acid, luteolin, cyperone, and α-cyperone, were quantitatively analyzed. **Results**　High-performance liquid chromatography fingerprints of *C. rotundus*, vinegar-processed *C. rotundus*, wine-processed *C. rotundus*, and *C. rotundus* processed with four excipients from different origins were established. A total of 17 common peaks were calibrated in 60 batches of samples, and six components were identified. Peak 3 was identified

收稿日期：2024-02-02

基金项目：河南省高等学校重点科研项目（24A360009）；2023 年河南省本科高校大学生创新创业训练计划项目（202310471041）

作者简介：乔俊昊，男，河南焦作人，硕士，研究方向为中药质量分析。E-mail: 1649679003@qq.com

***通信作者：**雷敬卫，男，河南郑州人，教授，硕士研究生导师，博士，研究方向为中药质量分析。E-mail: 925390812@qq.com

杨春静，女，河南郑州人，主任药师，研究方向为临床药学。E-mail: 925390812@qq.com

as 5-HMF, peak 7 is p-coumaric acid, peak 8 is ferulic acid, peak 14 is luteolin, peak 19 is cyperone, and peak 21 is α-cyperone. The results of PCA analysis, OPLS-DA analysis and cluster analysis showed that there were some differences between *C. rotundus*, vinegar-fired *C. rotundus*, vinegar-boiled *C. rotundus*, vinegar-steamed *C. rotundus* and vinegar-boiled *C. rotundus*. VIP > 1 was used as the criterion to screen the differentiating components with large contributions, and peak 6, peak 5, peak 7 (p-coumaric acid), peak 15, peak 14 (luteolin), peak 8 and peak 1 were screened as differential markers, suggesting that the above components should be focused on when analyzing the quality of *C. rotundus* and its processed products. The content measurement results showed that there were certain differences between *C. rotundus* and its processed products from different origins. **Conclusion** The established HPLC fingerprint of *C. rotundus* was simple to operate and the results are reliable, and 5-HMF, p-coumaric acid, ferulic acid, luteolin, cyperotundone and α-cyperone could be used as index components for the quality evaluation of *C. rotundus*.

Key words: C*yperus rotundus* L.; HPLC fingerprint; chemical recognition pattern; cyperotundone; α-cyperone; luteolin; 5-HMF; p-coumaric acid; ferulic acid

香附为莎草科植物莎草 C*yperus rotundus* L.的干燥根茎，最早记载于《名医别录》[1]。有行气解郁、调经止痛之效，常用于多种妇科疾病。现代研究表明香附主要含有挥发油类、黄酮类、生物碱类、酚酸类成分，具有抗肿瘤、抗抑郁、抑菌和抗炎、抗氧化等药理作用[2]。医家认为香附生熟异治，炮制方法不同，功效作用存在差异，《本草纲目》[3]中记载：“生则上行胸膈，外达皮肤，熟则下走肝肾，外彻腰足。酒浸炒则行经络，醋浸炒则消积聚，姜汁炒则化痰饮”，表明香附经不同辅料炮制后具有不同的主治功效。

《中国药典》2020 年版只收载了醋香附，且仅以挥发油含量为测定指标，指标较为单一，难以反映和区分不同香附药材质量差异。中药的药理药效是源自其复杂的化学成分，炮制的过程可能发生成分的转化，导致各成分比例的改变。有研究表明，香附醋制后总挥发油含量降低，但提高了关键成分香附烯酮的含量[4]；总黄酮类成分含量高于生品，木犀草素含量显著增加[5]。多为对醋制香附的研究，而对四制香附和酒制香附的有效成分分析鲜有报道。基于此，本实验以香附、醋香附、酒香附、四制香附为研究对象，采用高效液相色谱法，对香附、醋香附、酒香附、四制香附的质量差异进行分析，筛选出差异标志物，并进行含量测定，为今后香附相关制剂在炮制品上的选择提供相关参考，以取得更好的临床效果。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

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 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。

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；盐购自中国盐业股份有限公司；米醋购自佛山市海天调味食品股份有限公司；黄酒购自绍兴市越润酒业有限公司；甲醇（分析纯）购自天津市富宇精细化工有限公司；磷酸购自天津市利密欧化学试剂有限公司；娃哈哈水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

1.2 药材

香附药材于 2022 年采集于广东湛江市、浙江金华市、河南焦作市，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，即香附饮片，备用。

1.2.1 醋香附 按《中国药典》2020 年版炮制：取净香附片，加入定量米醋拌匀，稍闷润，待醋被吸尽后，置炒制容器内，用文火加热，炒干，取出，晾凉，筛去碎屑，即得醋香附饮片。香附片每 100 g 用米醋 20 g。

1.2.2 酒香附 按湖南省中药饮片炮制规范（2021 年版）炮制：取净香附片，加入定量黄酒拌匀，稍闷润，待酒被吸尽后，置炒制容器内，用文火加热，

炒干，取出，晾凉，筛去碎屑，即得酒香附饮片。香附片每 100 g 用黄酒 20 g。

1.2.3 四制香附 取净香附片，加入定量的生姜汁、米醋、黄酒、盐水拌匀，稍闷润，待汁液被吸尽后，置炒制容器内，用文火加热，炒干，取出，晾凉，筛去碎屑，即得四制香附饮片[6]。

1.2.4 香附饮片 每 100 g 用生姜 5 g（取汁），米醋、黄酒各 10 g，食盐 2 g（清水溶化）。

香附及其炮制品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of sample

产地	样品			
	醋香附	酒香附	四制香附	香附饮片
广东湛江	GDC1	GDJ1	GDS1	GDY1
	GDC2	GDJ2	GDS2	GDY2
	GDC3	GDJ3	GDS3	GDY3
	GDC4	GDJ4	GDS4	GDY4
	GDC5	GDJ5	GDS5	GDY5
浙江金华	ZJC1	ZJJ1	ZJS1	ZJY1
	ZJC2	ZJJ2	ZJS2	ZJY2
	ZJC3	ZJJ3	ZJS3	ZJY3
	ZJC4	ZJJ4	ZJS4	ZJY4
	ZJC5	ZJJ5	ZJS5	ZJY5
河南焦作	HNC1	HNJ1	HNS1	HNY1
	HNC2	HNJ2	HNS2	HNY2
	HNC3	HNJ3	HNS3	HNY3
	HNC4	HNJ4	HNS4	HNY4
	HNC5	HNJ5	HNS5	HNY5

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件[3] 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；55～60 min，59%～70%甲醇；60～80 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。

2.1.2 供试品溶液制备 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 75%甲醇 25 mL，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。

2.1.3 对照品溶液制备 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，配制成质量浓度依次为 329.0、112.7、53.1、331.0、570.0、165.4 μg/mL 的对照品溶液，用于确定 6 种指标性成分的相对保留时间以及外标法定量；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。

2.1.4 精密度试验 精密称取 HNC1 样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定 6 次，以香附烯酮为参照峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0～0.77%、0～1.99%，表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 精密称取 HNC1 样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，再按“2.1.1”项下色谱条件进样，以香附烯酮为参照峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0～1.46%、0～4.52%，表明该方法重复性良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称取 HNC1 样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，以香附烯酮为参照峰，计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0～1.18%、0～3.26%，表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

2.1.7 指纹图谱的建立与共有峰指认 精密称取各样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”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）》，分别以 GDC1、ZJC1、HNC1 样品图谱为参照，采用中位数法，经多点校正、Mark 峰匹配后生成叠加指纹图谱，共标定 17 个共有峰，结果见图 1。通过与混合对照品指纹图谱比对，指认出峰 1、4、5、11、16、17 分别为 5-HMF、对香豆酸、阿魏酸、木犀草素、香附烯酮、α-香附酮。结果见图 2。

2.1.8 图谱差异分析 HPLC 指纹图谱可以通过色谱峰高或峰面积的对比，判断药材内部的化学成分含量的增减，同时可以根据色谱峰的数量判断药材化学成分数量的变化。由图 3 可知，不同产地香附

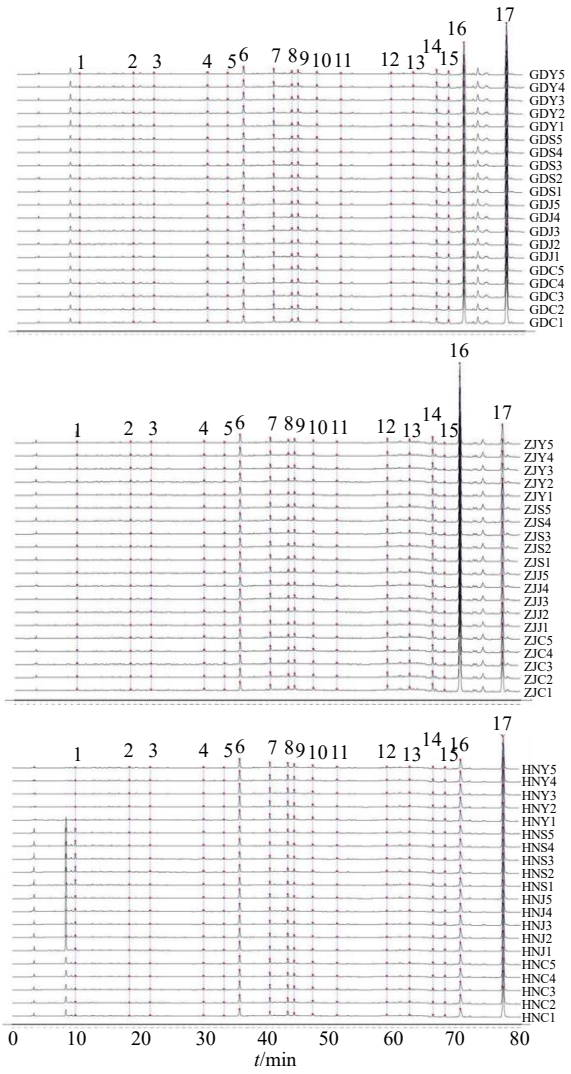
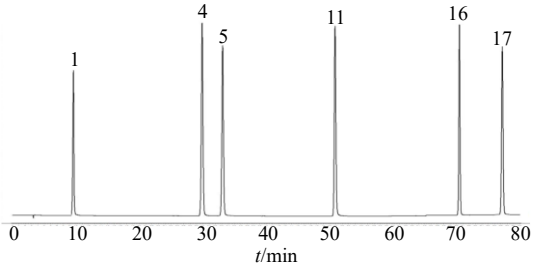


图 1　各产地香附炮制品 HPLC 叠加指纹图谱

Fig. 1　HPLC superimposed fingerprint of *C. rotundus* products from various origins



1-5-HMF；4-对香豆酸；5-阿魏酸；11-木犀草素；16-香附烯酮；17-α-香附酮。

1-5-HMF; 4-p-coumaric acid; 5-ferulic acid; 11-luteolin; 16-cyperone; 17-α-cyperone.

图 2　混合对照品指纹图谱

Fig. 2　Fingerprint of mixed reference substances

的色谱峰个数存在差异，a、b、d 峰为广东、河南共有，c、e 峰为广东、浙江共有。

2.2　化学识别模式

2.2.1　聚类分析（hierarchical cluster analysis，HCA）将广东产地 17 个共有峰峰面积进行处理，导入 SPSS 22.0 软件，采用组间连接法，以欧氏距离为分类依据，对样品进行 HCA，结果见图 4。由图 4 可知，当组间距离为 10 时，可聚为 3 类，其中 GDS1～GDS5 与 GDC1～GDC5 聚为一类，GDJ1～GDJ5 聚为一类，GDY1～GDY5 聚为一类。

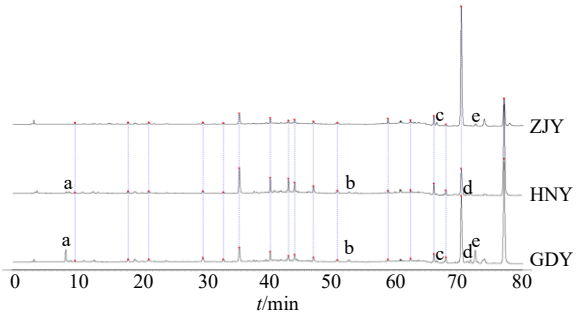


图 3　不同产地香附饮片 HPLC 指纹图谱差异图

Fig. 3　HPLC fingerprint difference map of *C. rotundus* slices from different origins

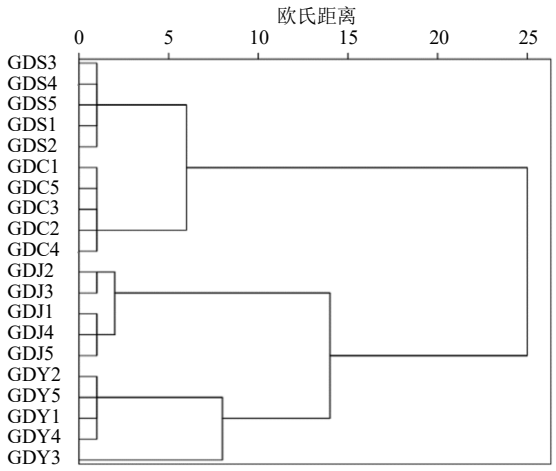


图 4　广东香附炮制品聚类分析树状图

Fig. 4　Tree diagram of cluster analysis of products of *C. rotundus* in Guangdong

将浙江产地 17 个共有峰峰面积进行处理，导入 SPSS 22.0 软件，采用组间连接法，以欧氏距离为分类依据，对样品进行 HCA，结果见图 5。由图 5 可知，当组间距离为 5 时，可聚为 3 类，其中 ZJS1～ZJS5 与 ZJJ1～ZJJ5 聚为一类，ZJC1～ZJC5 聚为一类，ZJY1～ZJY5 聚为一类。

将河南产地 17 个共有峰峰面积进行处理，导入 SPSS 22.0 软件，采用组间连接法，以欧氏距离为分

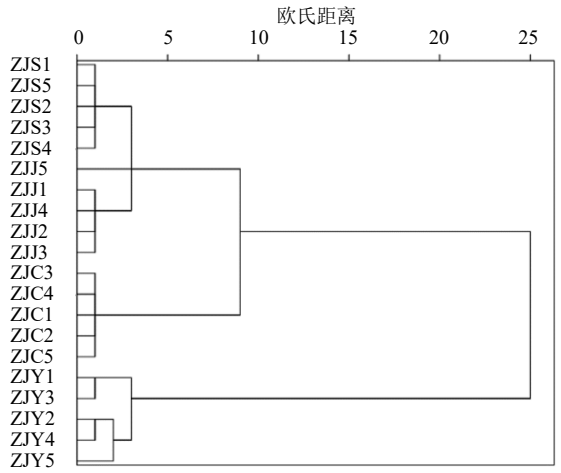


图 5 浙江香附炮制品聚类分析树状图

Fig. 5 Tree diagram of cluster analysis of products of *C. rotundus* in Zhejiang

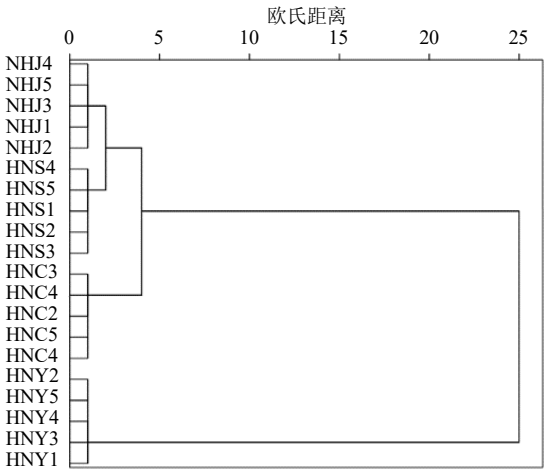


图 6 河南香附炮制品聚类分析树状图

Fig. 6 Tree diagram of cluster analysis of products of *C. rotundus* in Henan

类依据，对样品进行 HCA，结果见图 6。由图 6 可知，当组间距离为 5 时，可聚为 2 类，其中 HNS1～HNS5、HNJ1～HNJ5、HNC1～HNC5 聚为一类，HNY1～HNY5 聚为一类。

2.2.2 因子分析 通过 SPSS 22.0 软件进行因子分析，3 个产地的样品均提取了 3 个特征值大于 1 的主成分因子，广东产地的累积方差贡献率为 86.787%，浙江产地的累积方差贡献率为 89.941%，河南产地的累积方差贡献率为 92.063%，均＞85%，表明这些主成分因子能够反映各产地香附炮制品在炮制过程中产生差异的关键因素[7]。结果见表 2。

表 2 特征值和累积方差贡献率

Table 2 Eigenvalues and cumulative variance contributions

产区	主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
广东	1	8.286	48.740	48.740
	2	4.458	26.226	74.966
	3	2.009	11.821	86.787
浙江	1	11.104	65.316	65.316
	2	3.074	18.080	83.395
	3	1.113	6.546	89.941
河南	1	10.408	61.221	61.221
	2	4.233	24.900	86.121
	3	1.010	5.942	92.063

采用最大方差法得到旋转后的成分矩阵，由表 3 可知各个共有峰对特征值大于 1 的主成分的贡献率，广东第 1 主成分主要代表了峰 2、11～13、16，第 2 主成分主要代表了峰 7、8、10、15，第 3 主成分主要代表了峰 1、17；浙江第 1 主成分主要代表了峰 5～8，第 2 主成分主要代表了峰 4、11、13、16，第 3 主成分主要代表了峰 1；河南第 1 主成分主要代表了峰 7～10，第 2 主成分主要代表了峰 2、11～13，第 3 主成分主要代表了峰 3。

2.2.3 主成分分析（principal component analysis，PCA） 以 17 个共有峰的峰面积为原始数据进行 PCA。由图 7 可知，各产地香附炮制品均可聚为 4 类，酒香附、醋香附、四制香附、香附饮片各自聚为一类。结果显示，广东、浙江、河南 3 个产地数据矩阵的解释率参数 R^2_X、模型预测能力参数 Q^2，均大于 0.5，表明该模型有较好的预测能力[8]，结果见表 4。

2.2.4 正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）为进一步寻找影响不同样品间差异的成分，以 17 个

表 3　各产地旋转后的成分矩阵

Table 3　Rotated component matrix of each origin

峰号	载荷（广东）			载荷（浙江）			载荷（河南）		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	−0.113	−0.052	0.972	0.388	−0.072	0.897	−0.919	0.303	−0.2
2	0.896	−0.033	0.101	−0.843	−0.25	−0.307	0.016	0.946	0.16
3	0.805	0.334	0.183	−0.867	−0.141	−0.220	0.107	0.125	0.83
4	0.762	0.616	0.005	0.255	0.846	0.437	−0.974	0.176	−0.0
5	0.119	0.748	−0.080	0.817	0.381	0.220	−0.934	0.282	0.09
6	0.975	0.114	0.144	0.95	−0.185	−0.031	0.796	0.116	0.56
7	0.105	0.908	0.031	0.897	0.163	0.387	0.943	0.255	0.19
8	0.352	0.891	−0.163	0.832	0.387	0.282	0.950	0.219	0.19
9	−0.677	0.692	−0.093	0.784	0.304	0.315	0.936	0.251	0.17
10	−0.341	0.848	−0.154	0.458	0.692	0.504	0.961	0.147	0.19
11	0.930	0.302	−0.093	0.265	0.889	0.326	0.236	0.940	0.10
12	0.936	0.049	−0.093	0.256	0.779	0.548	0.012	0.805	0.10
13	0.908	0.091	−0.264	0.151	0.918	−0.096	−0.122	0.929	0.12
14	0.809	0.330	0.449	0.568	0.571	0.115	0.809	0.330	0.44
15	0.450	0.546	0.555	0.647	0.522	0.449	0.450	0.546	0.55
16	0.810	0.295	0.480	−0.053	0.923	−0.223	0.810	0.295	0.48
17	0.534	0.490	0.630	0.542	0.544	0.601	0.534	0.490	0.63

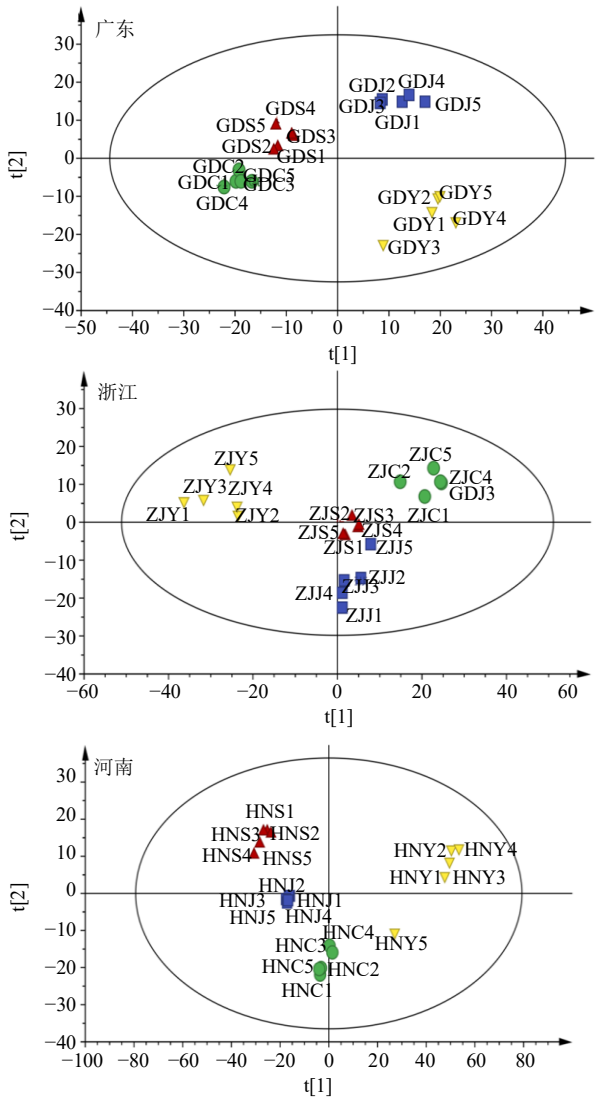


图 7　各产地主成分得分图

Fig. 7　Principal component score diagram for each origin

表 4　各产地模型的解释率及预测能力

Table 4　Explanation rate and prediction ability of each origin model

产地	解释率参数 R^2_X	模型预测能力
广东	0.948	0.798
浙江	0.960	0.806
河南	0.977	0.938

共有峰峰面积为变量，采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA。结果显示，广东、浙江、河南 3 个产地数据矩阵的解释率参数 R^2_X、模型区分参数 R^2_Y、模型预测能力参数 Q^2，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[9]，结果见表 5。由图 8 可知，3 个产地香附炮制品均可聚为 4 类。

将 3 个产地的 17 个共有峰峰面积分别导入 SIMCA 14.1 软件，对各共有峰的变量重要性投影值（variable importance in projection，VIP）进行分析，并以 VIP＞1 为标准筛选贡献较大的差异性成分[10]，结果见图 9。广东产地 VIP＞1 的共有峰依次为 17（α-香附酮）、16（香附烯酮）、6 号峰；浙江产地 VIP＞1 的共有峰依次为 17（α-香附酮）、16（香附烯酮）、6 号峰；河南产地 VIP＞1 的共有峰依次为 17（α-香附酮）、1（5-HMF）、6、16（香附烯酮）、8、7 号峰，提示这些共有峰可能是导致样品间差异

表 5　各产地 OPLS-DA 模型的解释率及预测能力

Table 5　Explanation rate and prediction ability of OPLS-DA models in different production areas

产地	解释率参数 R^2_X	模型区	模型预测
广东	0.948	0.924	0.892
浙江	0.990	0.984	0.934
河南	0.991	0.990	0.953

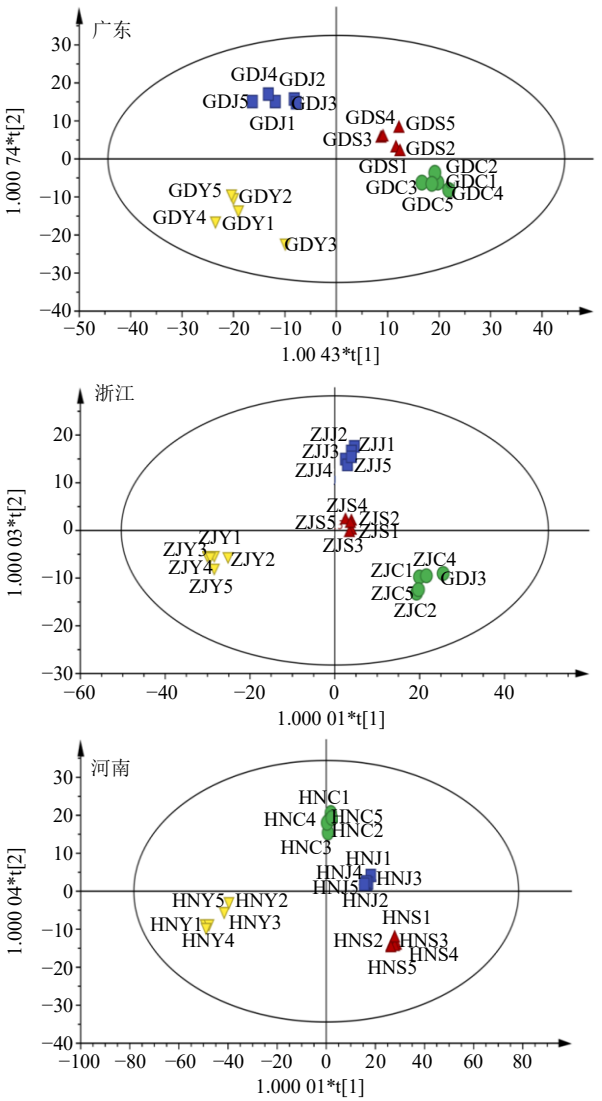


图 8 各产地 OPLS-DA 分析得分图

Fig. 8 OPLS-DA analysis score chart of each origin

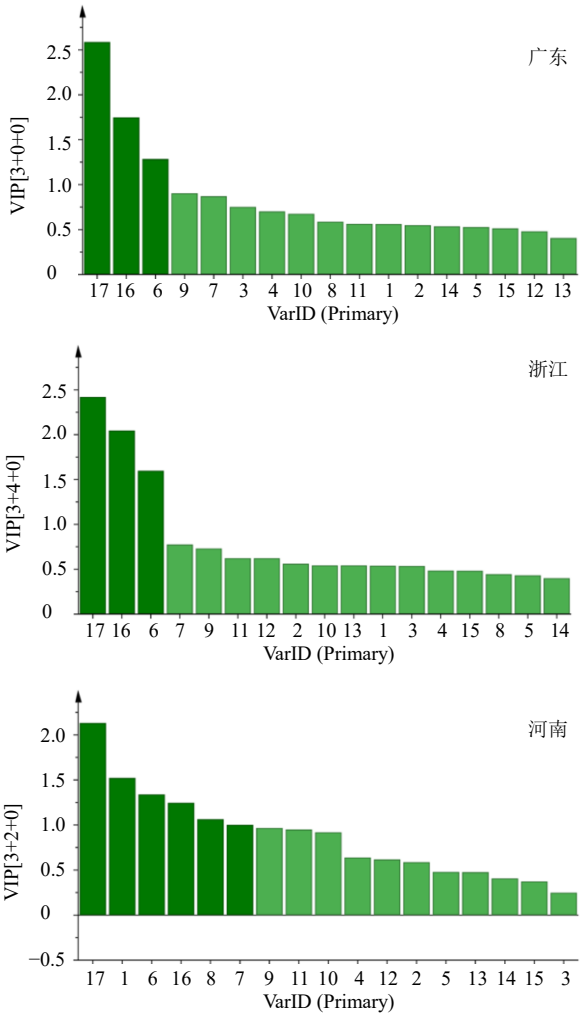


图 9 OPLS-DA 分析的 VIP 值图

Fig. 9 VIP value plot of OPLS-DA analysis

的主要潜在标志色谱峰。

2.3 样品含量测定

2.3.1 系统适用性试验 取“2.1.3”项下混合对照品溶液及“2.1.2”项供试品溶液、空白溶剂（75%甲醇），按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录其 HPLC 色图谱，结果见图 10。由图 10 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。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.1.3”项下各对照品溶液，分别配制成不同质量浓度的对照品溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并进行线性回归，绘制标准曲线。其中各待测成分的质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）。线性考察结果见表 6。

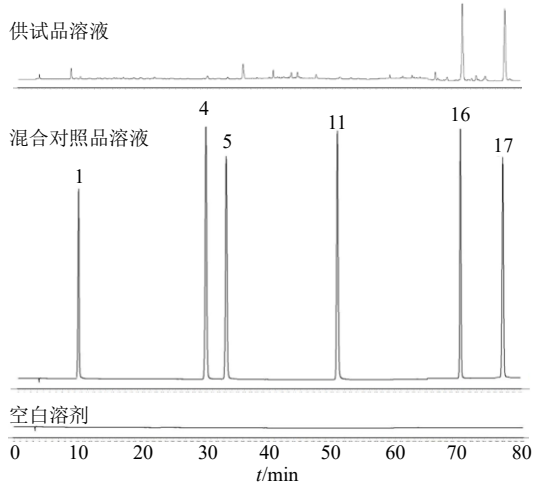


图 10 系统适应性的 HPLC 色谱图

Fig. 10 HPLC fingerprint of system suitability

表 6 线性关系考察结果

Table 6 Linear relationship investigation results

对照品	回归方程	相关系数	线性范围/(μg·mL^{-1})
5-HMF	Y=16 828 X+1.105 6	1.000 0	0.6～329.0
对香豆酸	Y=6 760.5 X−1.128 1	1.000 0	4.3～112.7
阿魏酸	Y=5 292.1 X+4.521 2	0.999 7	2.7～53.1
木犀草素	Y=2 270.5 X+6.411 6	0.999 7	4.4～130.2
香附烯酮	Y=29 706 X+0.733 4	1.000 0	28.5～285.0
α-香附酮	Y=30 376 X+15.913	0.999 9	16.5～165.4

2.3.3 精密度试验 取 GDC1 样品，按“2.1.2”项下制备供试品溶液，按“2.1.1”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，计算出 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 2.62%、0.72%、0.98%、1.32%、0.12%、0.10%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取 GDC1 样品，按“2.1.2”项下制备供试品溶液，分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.1.1”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，计算出 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 2.68%、0.99%、0.90%、2.18%、0.18%、0.13%，，表明供试品溶液于室温下放置 24 h 稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取 GDC1 样品共 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”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 1.89%、2.60%、2.47%、1.32%、1.03%、0.66%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取已知成分含量的 GDC1 样品共 6 份，精密称取各 1 g，分别按样品中成分含量的 100%加入对应成分的单一对照品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”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 98.51%、100.67%、100.58%、100.45%、100.38%、99.14%，RSD 分别为 2.25%、1.88%、1.68%、1.60%、1.88%、1.95%，RSD 均小于 3%。

2.3.7 样品测定 分别精密称取 60 批香附样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1.1”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，结果见表 7。对香附与醋香附、酒香附、四制香附中各成分含量进行比较分析，5-HMF 在香附中含量最低，炮制后均有增加，对香豆酸、阿魏酸在香附中含量最低，木犀草素在醋香附中含量最高，香附烯酮在香附中含量最高。广东与河南产地 α-香附酮含量高于香附烯酮含量，浙江产地香附烯酮含量高于 α-香附酮。对香豆酸与阿魏酸在浙江产地中含量最少，在广东产地中含量最高，木犀草素在浙江产地含量最高。

3 讨论

本实验前期对 HPLC 指纹图谱条件进行相关考察。实验选择甲醇-0.1%磷酸水溶液作为流动相，柱温 30 ℃，进样量 10 μL，体积流量 1 mL/min，以及检测波长 310 nm（0～65 min）和 254 nm（65～80 min）作为最佳条件，这些条件下色谱峰的分离度和峰形最佳，基线平稳。60 批样品中共标定了 17 个共有峰，其中 1 号峰为 5-HMF，4 号峰为对香豆酸，5 号峰为阿魏酸，11 号峰为木犀草素，16 号峰为香附烯酮，17 号峰为 α-香附酮。不同产地的香附在色谱峰数量和化学成分种类上存在差异。经过炮制的香附，其 HPLC 指纹图谱的部分峰高发生变化，但未出现新的峰，表明化学成分含量有所增减，成分种类未明显变化。

PCA 与 OPLS-DA 分析结果表明，香附与炮制品能够被完全区分开，这与中药炮制的基本原理相符合[11]。而醋香附、酒香附、四制香附之间的区分不明显，可能是由于炮制过程中使用了相同的辅料。通过 VIP 法（VIP＞1）筛选出了对样品组分影响较

表 7 样品测定结果 (*n*=3)

Table 7 Sample measurement results (*n*=3)

编号	指标成分/(μg·g^{-1})					
	5-HMF	对香豆酸	阿魏酸	木犀草素	香附烯酮	α-香附酮
GDY1	0.83	23.30	14.65	32.50	92.86	139.44
GDY2	0.83	23.28	14.52	32.62	91.43	140.47
GDY3	0.88	23.19	16.13	30.60	93.18	140.52
GDY4	0.82	23.38	17.14	31.07	93.56	138.01
GDY5	0.82	22.25	15.99	28.18	91.68	139.46
GDC1	1.37	25.87	18.06	39.61	85.48	150.52
GDC2	1.45	25.69	19.35	39.67	84.61	152.21
GDC3	1.26	26.08	18.30	39.93	86.14	144.58
GDC4	1.26	25.82	18.71	41.01	85.14	151.61
GDC5	1.15	25.67	17.38	39.87	86.28	152.60
GDJ1	2.25	25.18	17.34	34.12	86.80	156.85
GDJ2	2.45	24.82	16.95	31.28	86.00	155.23
GDJ3	2.22	24.99	16.67	31.86	85.79	154.88
GDJ4	2.36	25.01	17.06	33.39	86.92	157.83
GDJ5	2.28	25.47	17.50	34.05	87.79	158.52
GDS1	1.22	26.41	16.24	35.02	86.74	144.16
GDS2	1.20	26.35	19.35	34.52	86.35	143.64
GDS3	1.31	26.91	16.46	35.38	86.19	146.04
GDS4	1.26	27.44	16.94	35.27	86.48	146.02
GDS5	1.27	26.72	16.58	33.35	86.56	145.34
ZJY1	2.06	11.06	6.90	27.29	151.86	72.23
ZJY2	2.28	12.02	7.25	31.41	152.37	80.35
ZJY3	2.18	12.68	7.03	31.65	154.13	70.94
ZJY4	2.24	12.20	6.59	31.17	153.81	79.07
ZJY5	2.18	11.47	7.26	29.99	154.85	79.12
ZJC1	2.53	14.73	8.95	44.88	146.01	103.23
ZJC2	2.44	14.79	9.63	45.28	146.66	104.57
ZJC3	2.61	15.15	9.19	47.68	147.30	101.13
ZJC4	2.59	14.94	9.63	45.36	147.60	102.39
ZJC5	2.63	15.56	9.56	47.31	150.55	102.82
ZJJ1	2.87	12.10	7.89	32.12	141.96	115.73
ZJJ2	2.83	13.12	7.99	36.41	145.26	110.46
ZJJ3	2.87	13.09	8.01	35.01	144.58	114.71
ZJJ4	2.74	12.74	8.43	30.67	143.13	117.25
ZJJ5	2.83	13.19	7.89	36.68	149.20	111.85
ZJS1	2.95	13.88	9.28	38.47	145.72	105.68
ZJS2	2.89	13.86	8.88	39.42	148.03	104.82
ZJS3	3.08	13.97	8.84	40.20	147.20	105.08
ZJS4	2.91	13.73	9.60	35.22	147.05	109.33
ZJS5	3.09	13.89	9.70	38.27	146.03	103.85
HNY1	1.18	15.09	7.66	25.92	68.32	129.82
HNY2	1.54	14.53	8.34	26.59	66.01	130.92
HNY3	1.37	14.08	8.88	28.18	69.26	135.10
HNY4	1.10	13.77	8.39	27.93	70.31	134.41
HNY5	1.63	16.32	8.41	26.62	68.00	130.26
HNC1	9.31	16.21	9.99	36.06	56.33	136.56
HNC2	9.48	16.11	10.00	34.22	56.06	135.96
HNC3	9.42	16.32	10.06	35.92	56.70	134.87
HNC4	9.42	16.28	7.93	35.57	56.29	134.98
HNC5	9.39	15.00	8.27	34.54	55.42	135.34
HNJ1	2.88	21.21	12.35	21.95	52.66	155.58
HNJ2	2.70	21.18	12.13	22.87	52.89	162.12
HNJ3	2.90	21.17	12.11	21.94	52.68	159.12
HNJ4	2.87	21.40	11.30	21.47	53.86	162.62
HNJ5	2.77	21.38	11.37	21.48	53.91	142.06
HNS1	20.26	24.41	14.23	35.81	51.10	136.59
HNS2	20.53	24.37	14.31	34.04	51.48	136.34
HNS3	20.78	24.20	14.32	32.23	51.15	137.55
HNS4	20.09	23.90	13.21	32.62	51.10	133.25
HNS5	20.90	24.40	13.98	32.71	51.33	134.80

大的成分，如广东产地的 17（α-香附酮）、16（香附烯酮）、6 号峰，浙江产地的 17（α-香附酮）、16（香附烯酮）、6 号峰，河南产地的 17（α-香附酮）、1（5-HMF）、6、16（香附烯酮）、8、7 号峰，提示这些成分应在香附炮制品质量分析中受到重点关注。

香附具有广泛的药理作用，如抗抑郁、抗炎抗菌、解热镇痛等[12-13]。在同一产地中，5-HMF 的含量最低，但炮制后有所增加。木犀草素在醋香附中含量最高，研究报道醋制后能够增加黄酮类成分如木犀草素的溶出[14]。而香附烯酮在香附中含量最高，α-香附酮和香附烯酮是影响香附及其炮制品质量的重要成分，它们在不同产地的含量有所不同。α-香附酮含量经醋炙后增加，有研究报道[15]在醋炙过程中，香附烯酮转化为 α-香附酮，致使其含量增加。这些结果可以指导未来香附相关制剂的选择，通过利用不同炮制品或不同产地的化学成分差异，进行原料的针对性选择，为香附及其炮制品在临床上的选择应用提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 蔡金阳, 岳天祥, 张月林, 等. 经典名方越鞠丸的历史沿革与处方考证 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6511-6519.

[2] 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.

[3] 杨颜溶, 贾豪, 田瀚举, 等. 香附饮片与 4 种醋制香附饮片的快速鉴别 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(1): 122-129.

[4] 季宁平, 卢君蓉, 李文兵, 等. 不同醋制方法对香附中指标成分含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 5-7.

[5] 宋晓, 袁芮, 许晶晶, 等. HPLC 法比较 4 种醋香附中黄酮类成分含量研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(1): 120-124.

[6] 乔璐, 张瑞, 赵博宇, 等. 不同产地香附炮制品的快速鉴别 [J]. 中成药, 2022, 44(5): 1510-1515.

[7] 栾永福, 解盈盈, 周广涛, 等. 人参健脾丸多指标含量测定及化学计量学分析 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7044-7054.

[8] 曾秒, 谢孟君, 祝子喻, 等. 不同产地赤芝药材的质量分析 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7193-7201.

[9] 彭警, 樊箫雨, 王迪磊, 等. 基于成分定量和指纹图谱的化学模式识别法评价胆木不同部位的差异性 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3281-3291.

[10] 杨祖凡, 杨扬, 杨义芳, 等. UHPLC 同时测定不同产地和不同采收期裸花紫珠及同属植物中 9 种活性成分的含量与质量评价 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4631-4640.

[11] 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栀子及其炮制品质量 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6836-6843.

[12] 蒙雪雁, 丘琴, 甄汉深, 等. 香附质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(7): 192-197.

[13] 贾红梅, 唐策, 刘欢, 等. 基于网络药理学的香附抗抑郁作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 49-55.

[14] 李英霞, 陆永辉, 冯文, 等. HPLC 测定不同产地香附及醋炙香附中木犀草素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 56-58.

[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.

[责任编辑 时圣明]