

四制香附炮制前后 UPLC 指纹图谱比较及指标成分含量测定

刘聪^{1,2}, 王丽霞², 杨晓芸², 陈晓旭², 蒋彤², 唐力英^{2*}, 张琼^{1*}, 王祝举²

(1. 山西医科大学药学院, 太原 030001;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:研究四制香附的质量评价方法。方法:建立香附和四制香附的超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱并通过化学计量学方法比较炮制前后指纹图谱中总体化学成分的变化,流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱(0~10 min, 5%~40%A; 10~30 min, 40%~70%A; 30~40 min, 70%A),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量3 μL,柱温35 °C,检测波长280 nm。采用UPLC比较香附四制前后主要指标成分香附烯酮和α-香附酮的含量变化,流动相甲醇-水(75:25),检测波长242 nm。结果:四制对香附指纹图谱中化学成分的总体特征产生了显著影响。香附和四制香附的指纹图谱中共标示了28个特征峰,其中峰1,2,4为四制香附的特有峰,峰5为香附的特有峰,经指认峰2为5-羟甲基糠醛,峰24为香附烯酮,峰27为α-香附酮。香附四制后产生的5-羟甲基糠醛来源于四制辅料中的米醋、黄酒及香附中多糖类成分的美拉德反应。定量分析结果显示,四制前后香附烯酮含量差异无统计学意义,但α-香附酮含量明显降低。结论:香附四制过程中存在结构转化产生新成分且伴随着指标成分含量变化,可作为区别香附和四制香附的专属特征标识和差异性特征标识。该研究从定性和定量2个方面快速有效地评价了香附和四制香附,建立的方法准确性强、稳定性好,为完善香附和四制香附的质量评价体系提供了实验依据。

[关键词] 四制香附; 美拉德反应; 指纹图谱; 炮制; 香附烯酮; α-香附酮; 超高效液相色谱法(UPLC)

[中图分类号] R22;R914;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)15-0076-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210850

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210201.1359.002.html>

[网络出版日期] 2021-02-01 16:25

Comparison of UPLC Fingerprint and Determination of Index Components Before and After Processing of Cyperi Rhizoma Processed with Four Excipients

LIU Cong^{1,2}, WANG Li-xia², YANG Xiao-yun², CHEN Xiao-xu², JIANG Tong²,
TANG Li-ying^{2*}, ZHANG Qiong^{1*}, WANG Zhu-ju²

(1. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the quality evaluation method of Cyperi Rhizoma processed with four excipients. **Method:** Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) fingerprints of raw products and processed products with four excipients of Cyperi Rhizoma were established, and the changes of chemical components in the fingerprints before and after processing were compared by chemometric analysis. The mobile phase was consisted of methanol (A)-water (B) for gradient elution (0-10 min, 5%-40%A; 10-30 min, 40%-70%A; 30-40 min, 70%A) at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The injection volume was 3 μL, the column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 280 nm. The content changes of main index

[收稿日期] 20201222(015)

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2018YFC1707106)

[第一作者] 刘聪,在读硕士,从事饮片化学成分及炮制原理研究,E-mail:wanlc919919@163.com

[通信作者] *唐力英,副研究员,从事饮片化学成分及炮制原理研究,E-mail:bjtangliying@163.com;

*张琼,教授,从事天然产物研究,E-mail:zhangqiong_83@hotmail.com

components in *Cyperi Rhizoma* before and after processing were compared by UPLC. The mobile phase was methanol-water (75:25) and the detection wavelength was 242 nm. **Result:** Processing with four excipients had a significant impact on the overall characteristics of chemical components in the fingerprint of *Cyperi Rhizoma*. A total of 28 characteristic peaks were identified in fingerprints of the raw and processed products. Among them, peaks 1, 2 and 4 were specific peaks of the processed products, peak 5 was characteristic peak of the raw products. Peak 2 was identified as 5-hydroxymethylfurfural, peak 24 as cyperenone and peak 27 as α -cyperone. The 5-hydroxymethylfurfural produced by the processing with four excipients came from rice vinegar, rice wine and Maillard reaction of polysaccharides in *Cyperi Rhizoma*. The results of determination showed that there was no significant difference in the content of cyperenone after processing, but the content of α -cyperone decreased significantly. **Conclusion:** In the process of *Cyperi Rhizoma* processed with four excipients, there are new components produced by structural transformation, which are accompanied by changes in the content of index components. In this study, the quality of raw and processed products of *Cyperi Rhizoma* can be rapidly and effectively evaluated from qualitative and quantitative aspects.

[Keywords] *Cyperi Rhizoma* processed with four excipients; Maillard reaction; fingerprint; processing; cyperenone; α -cyperone; ultra-performance liquid chromatography (UPLC)

香附具有疏肝解郁、理气宽中、调经止痛的功效,是常用疏肝解郁药和“血中之气药”。其始载于《名医别录》,在我国药用历史悠久,目前已被开发成多种中药制剂。据统计,在2015年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)(一部)中含香附的制剂有107种,占收录的成方制剂和单味制剂总品种数的7.14%^[1-2]。

四制香附,即4种辅料(酒、姜、醋、盐较为常用)联用对香附进行炮制,是一种具有传统特色的炮制方法。该品种主要应用于成方制剂中,如2020年版《中国药典》收录的四制香附丸、抱龙丸和调味消滞丸等。目前,在四制香附的质量评价方面,有高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱方面的研究报道^[3],还有采用气相色谱-质谱法(GC-MS)比较炮制前后总挥发油成分的变化^[4-6],关于其主要药效成分的定量研究尚无报道。有药理研究表明,四制香附在抗痛经作用方面优于香附^[7-8],其中香附烯酮和 α -香附酮是四制香附抗痛经作用的主要药效物质^[9],可作为四制香附的定量评价指标。

基于上述分析,本研究拟建立香附四制前后的超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱,通过化学计量学方法比较四制前后香附指纹图谱化学成分的总体变化,确认并指认香附和四制香附的特征峰;在此基础上,结合香附四制前后具有药效作用的特征指标成分,建立四制香附定量分析方法,对15批不同产地的香附和四制香附进行含量测定。从定性和定量2个方面准确、快速地评价香附和四制香附,以期完善二者的质量评价体系提供依据。

1 材料

LC-30AD型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),DFT-50A型手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司),XS205DU型1/10万电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司),BSA124S-CW型1/1万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],JY-5002型电子天平(上海衡平仪器仪表厂)。

香附烯酮(批号CHB180315), α -香附酮(批号CHB180316),5-羟甲基糠醛(批号CHB180118)对照品购自成都克洛玛生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$;米醋(江苏恒顺醋业股份有限公司,执行标准GB/T 18187),黄酒(上海金枫酒业股份有限公司,执行标准GB/T 13662),净制食用盐(中盐长江盐业有限公司,执行标准GB/T 5461),生姜购于鲜汇超市,水为娃哈哈纯净水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。1批香附药材购于河北安国药材市场(编号XF-00),用于方法学考察;另15批香附药材[产地为河南(编号XF-01~05),海南(编号XF-06~10),广东(编号XF-11~15)]由广州采芝林药业有限公司提供,作为样品检测;均经中国中医科学院中药研究所王祝举研究员鉴定为莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 香附及四制香附饮片的制备 香附饮片的制备参考2020年版《中国药典》(一部)“香附”项下香附饮片的制法。将香附药材除去毛须及杂质,碾碎,即得。四制香附饮片制备参考2020年版《中国药典》(一部)“抱龙丸”项下香附(四制)炮制方法。

即称取净香附 200 g,用酒、醋、姜汁各 12 g 和盐 4 g 的混合液体拌匀,闷润 12 h,取出,蒸 3 h 至透心,取出,晒干,即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取香附烯酮和 α -香附酮对照品适量,加 80% 甲醇制成质量浓度分别为 0.243, 0.296 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。精密称取 5-羟甲基糠醛对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 0.242 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。精密量取上述 2 种溶液各 1 mL,置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,得到 3 个对照品的混合溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备 取不同产地香附和四制香附粉末(过三号筛,下同)约 0.5 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 10 min,放冷,称定质量,用 80% 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。

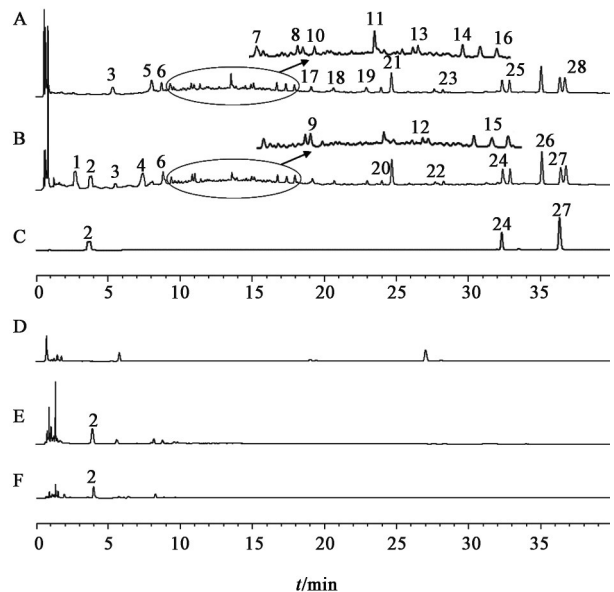
2.4 UPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 色谱条件 采用 Shim-pack GIST C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 2 μm),流动相甲醇(A)-水(B)梯度洗脱 (0~10 min, 5%~40%A; 10~30 min, 40%~70%A; 30~40 min, 70%A),检测波长 280 nm,流速 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 3 μL ,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.2 方法学考察 取样品粉末(编号 XF-00)适量,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件连续进样 6 次,以 27 号峰为参照,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好。取同一供试品溶液(编号 XF-00),分别于制备后 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 按 2.4.1 项下色谱条件测定,以 27 号峰为参照,结果各特征峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致, RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。取同一样品(编号 XF-00)6 份,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件测定,以 27 号峰为参照,计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明该方法重复性良好。

2.4.3 特征图谱的建立 按 2.3 项下方法制备 15 批香附和四制香附的供试品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件测定,见图 1(A, B)。将相关色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行处理,以样品 XF-01 的图谱为参照图谱,时间窗宽度设定 0.1 min,采用中位数法,以 Mark 峰进行峰匹配,结果发现 15 批香附的 UPLC 指纹图谱与其对照图谱之间的相似度处于 0.976~1.000; 15 批四制香附的

UPLC 指纹图谱与其对照图谱之间的相似度处于 0.979~0.998。通过图谱对比后发现,峰 1, 2, 4 为四制香附的特有峰,峰 5 为香附的特有峰,其余 24 个峰为两者的共有峰;经对照品比对初步确认峰 2 为 5-羟甲基糠醛,峰 24 为香附烯酮,峰 27 为 α -香附酮。



A. 香附; B. 四制香附; C. 混合对照品; D. 生姜汁; E. 黄酒; F. 米醋; 2. 5-羟甲基糠醛; 24. 香附烯酮; 27. α -香附酮

图 1 不同香附样品的 UPLC 指纹谱

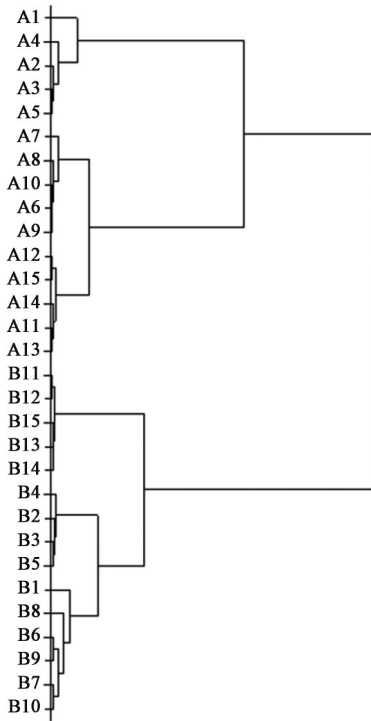
Fig. 1 UPLC fingerprints of different *Cyperis Rhizoma* samples

在建立指纹图谱的同时,为了考察炮制辅料对香附成分的影响,尝试将辅料生姜汁、米醋和黄酒在同样色谱条件下进行对比(姜汁和食盐没有出现相关的色谱峰)。将生姜汁、米醋、黄酒分别与甲醇按 4:1 混匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按 2.4.1 项下色谱条件测定,见图 1(D, E, F)。将二者与香附、四制香附的图谱进行比对,结果发现米醋和黄酒中也有明显的 5-羟甲基糠醛色谱峰,提示四制香附中的这个成分有可能来源于米醋和黄酒。

2.5 多元统计分析 为研究四制对香附指纹图谱中色谱峰的影响,将 15 批香附和四制香附进行特征图谱研究,统计 30 批样本中 28 个色谱峰的峰面积,并将其除以每个样品的称样量,以消除称样量差异造成的影响^[10]。将所得的数据软件导入 SIMCA-P 13.0 统计软件进行聚类分析(HCA),主成分分析(PCA)和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)处理,找出能反映香附与四制香附各自特征的色谱峰或化学物质,以阐述香附四制前后化学成分的变化。

2.5.1 HCA 以香附和四制香附中的 28 个特征峰

峰面积量化后的数据为变量,运用SIMCA-P 13.0软件对样品进行HCA。结果显示30批样品被明显分为两类,香附(A1~A15)为一类,四制香附(B1~B15)为一类,见图2,即香附和四制香附能被明显区分,说明香附四制后化学成分从整体上有一定改变,可通过指纹图谱数据的HCA将其进行分类。

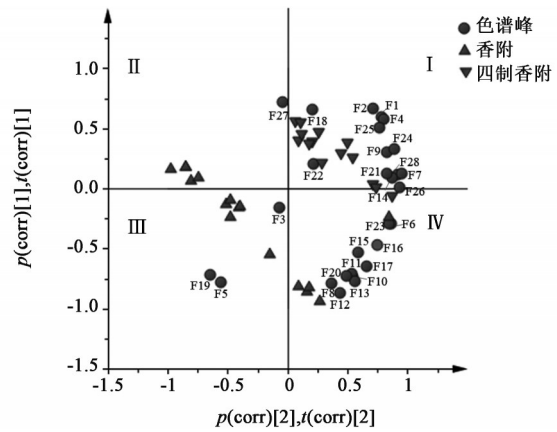


A1~A15. 香附; B1~B15. 四制香附

图2 不同香附样品的HCA

Fig. 2 HCA of different Cyperi Rhizoma samples

2.5.2 PCA 为进一步探讨香附和四制香附之间的差异,在HCA基础上,对指纹图谱数据进行PCA处理,模型参数为 R^2X (在X轴方向模型的解释率)=0.961, Q^2 (模型预测率)=0.778,得到以第1和第2主成分为变量的双标图,见图3, R^2X, R^2Y (在Y轴方向模型的解释率)和 Q^2 这3个指标越接近1表示模型拟合数据效果越好。在这种无监督的识别模式下,香附样品自动划分为两类,一类(A1~A15)为香附,在第II~IV象限均有分布,另一类(B1~B15)为四制香附,主要集中在第I象限。第1,2主成分对区分这两类的贡献率分别为46.3%和30.1%,两者共同可有效区分香附和四制香附,因此,在这2个主成分中的权重值之和越大表明该峰在决定样品区分中的作用越大。前5名权重之和值分别为1.380 3, 1.379 6, 1.379 5, 1.363 9, 1.333 2,依次对应峰1,峰4,峰2(5-羟甲基糠醛),峰19和峰5,说明这些色谱峰在区分香附和四制香附指纹图谱中影响最大。



F1~F28. 图1中标记的色谱峰1~28(图5同)

图3 不同香附样品的PCA双标分析

Fig. 3 PCA biplots of different Cyperi Rhizoma samples

2.5.3 PLS-DA 作为一种有监督的识别模式, PLS-DA可以放大组间的差异,有助于筛选负责分类的特征成分。为了寻找香附和四制香附之间的潜在差异成分,将处理后的峰面积数据导入SIMCA-P 13.0软件中进行了PLS-DA,模型参数为 $R^2X=0.763, R^2Y=0.984, Q^2=0.978$,见图4,5。结果发现在得分散点图中,香附和四制香附得到了非常明确的区分,并显示了30个观测值之间的相对位置和可能存在的其他关系。为了衡量每个特征峰对区分香附和四制香附的重要性,绘制了各个色谱峰的变量投影重要性(VIP)图。变量对分类的重要程度可以由VIP值的大小来衡量, VIP值越大,对应变量对分类的贡献就越大,选择VIP值>1.2的色谱峰作为对分类具有重要意义。结果发现峰4,2(5-羟甲基糠醛),1,19,5,25,24(香附烯酮),9,28,7的变化对香附四制前后的区分有重大贡献。该分析结果与HCA和PCA结果一致。

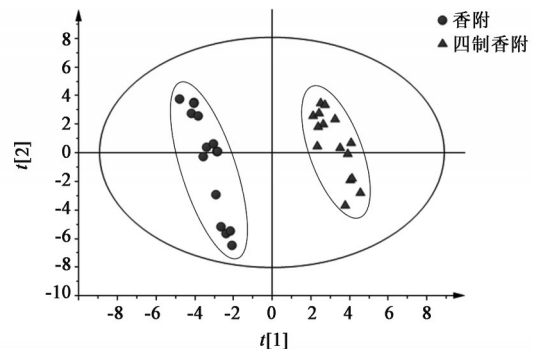


图4 不同香附样品的PLS-DA得分散点

Fig. 4 PLS-DA score scatter plot of different Cyperi Rhizoma samples

香附四制前后UPLC指纹图谱和化学计量学分析手段的结合表征了香附和四制香附在总体化学

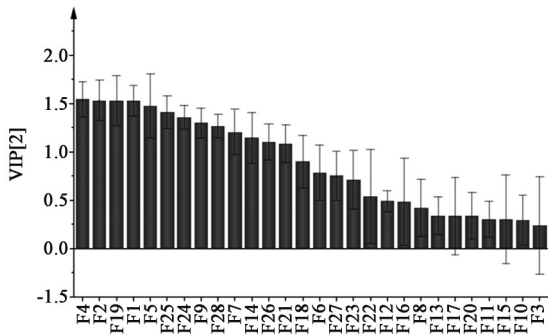
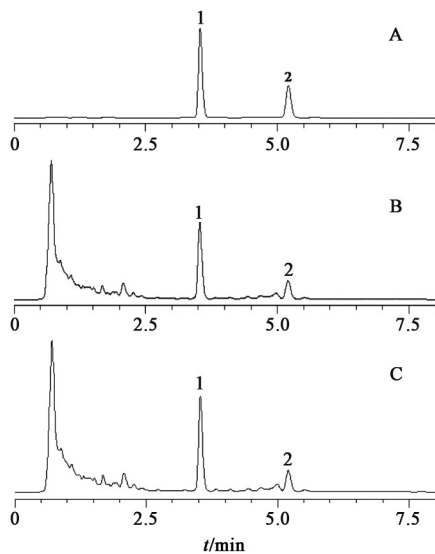


图5 不同香附样品PLS-DA的VIP分析
Fig. 5 VIP analysis of different Cyperi Rhizoma by PLS-DA

成分上的区别,特征性和整体性较强,但具有一定的模糊性,因此还需对炮制前后专属性指标成分进行定量控制,以利于更为全面地评价香附和四制香附的质量。同时,香附烯酮和 α -香附酮作为四制香附的主要药效成分,可作为定量控制的指标^[9]。

2.6 指标成分的含量测定

2.6.1 色谱条件 采用Shim-pack GIST C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2 μ m),流动相甲醇-水(75:25),检测波长242 nm,流速0.3 mL·min⁻¹,进样量3 μ L,柱温35 $^{\circ}$ C。见图6。



A. 对照品; B. 香附; C. 四制香附; 1. 香附烯酮; 2. α -香附酮

图6 不同香附样品的UPLC

Fig. 6 UPLC chromatograms of different Cyperi Rhizoma samples

2.6.2 线性关系考察 将2.2项下混合对照品溶液适量,分别用80%甲醇稀释2, 3, 5, 10, 50倍,按2.6.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得香附烯酮和 α -香附酮回归方程分别为 $Y=8\ 762\ 031.806\ 8X+32\ 483.877\ 8$ ($r=0.999\ 4$), $Y=9\ 646\ 063.463\ 7X+40\ 479.476\ 6$ ($r=0.999\ 7$),线性

范围分别为14.58~364.5, 17.76~444 ng。

2.6.3 精密度试验 取香附粉末(编号XF-00,下同)适量,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.6.1项下色谱条件连续进样6次,计算香附烯酮和 α -香附酮峰面积的RSD分别为0.4%, 0.7%,表明仪器精密度良好。

2.6.4 重复性试验 取同一批香附粉末,称取6份,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.6.1项下色谱条件测定,计算样品中香附烯酮和 α -香附酮的质量分数分别为1.165 0, 1.674 4 mg·g⁻¹, RSD分别为0.4%, 0.5%,表明该方法重复性良好。

2.6.5 稳定性试验 取同一样品的供试品溶液适量,分别于制备后0, 2, 4, 8, 16, 24 h按2.6.1项下色谱条件测定,计算香附烯酮和 α -香附酮峰面积的RSD分别为1.2%, 1.1%,表明供试品溶液在24 h内的稳定性良好。

2.6.6 加样回收试验 取香附粉末约0.5 g,精密称定,共6份,分别精密加入混合对照品溶液20 mL(香附烯酮和 α -香附酮的质量浓度分别为29.75, 38.65 mg·L⁻¹),按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.6.1项下条件测定,计算平均加样回收率,见表1。

2.6.7 样品测定 取不同产地的香附和四制香附粉末适量,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.6.1项下条件测定,计算香附烯酮和 α -香附酮含量。结果发现15批香附四制前后香附烯酮的含量无显著性差异,其质量分数范围分别为1.70~2.20, 1.75~2.22 mg·g⁻¹; α -香附酮的含量均明显下降,四制前后质量分数范围分别为0.83~1.17, 0.54~0.95 mg·g⁻¹;两者比值(香附烯酮/ α -香附酮)均显著升高。见表2。

3 讨论

综合指纹图谱统计分析结果可知,四制对香附中化学成分的总体特征产生了显著影响,峰4, 2, 1, 19, 5, 25, 24, 9, 28, 7对香附四制前后的区分有重大贡献。其中,峰1, 2, 4为四制香附的特有峰,峰5为香附的特有峰,这些色谱峰对区分香附和四制香附的贡献最大,可作为两者的专属性特征标识。四制后,峰25, 24, 9, 28, 7的变化呈增加趋势;峰19的贡献值仅次于特有峰,呈下降趋势变化;经SPSS 22.0软件对这6个峰的峰面积进行配对样品t检验,发现变化显著($P<0.01$)。

经对照品指认,四制香附指纹图谱中的峰2为5-羟甲基糠醛,峰24为香附烯酮,峰27为 α -香附酮。由图1可以初步判断峰2可能来源于米醋和黄酒。

表1 不同香附样品中指标成分含量测定的加样回收试验

Table 1 Recovery test of two index components in different Cyperi Rhizoma samples

成分	称样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
香附烯酮	0.500 2	0.582 7	0.595 0	1.197 2	103.27	102.92	0.6
	0.500 1	0.582 6	0.595 0	1.188 5	101.83		
	0.500 1	0.582 6	0.595 0	1.197 1	103.27		
	0.500 3	0.582 9	0.595 0	1.196 3	103.10		
	0.500 3	0.582 9	0.595 0	1.198 1	103.41		
	0.500 2	0.582 7	0.595 0	1.193 3	102.62		
α-香附酮	0.500 2	0.837 5	0.773 0	1.582 0	96.31	96.40	0.8
	0.500 1	0.837 4	0.773 0	1.572 9	95.16		
	0.500 1	0.837 5	0.773 0	1.581 0	96.20		
	0.500 3	0.837 7	0.773 0	1.587 3	96.98		
	0.500 3	0.837 7	0.773 0	1.590 9	97.44		
	0.500 2	0.837 5	0.773 0	1.582 1	96.32		

表2 香附四制前后2种指标成分的含量比较

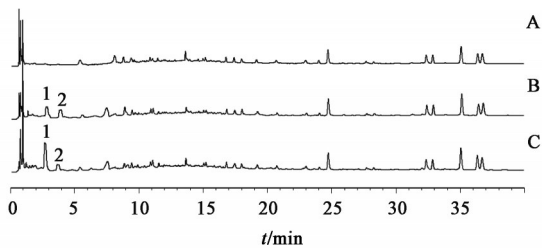
Table 2 Comparison of contents of two index components in Cyperi Rhizoma before and after processing

产地	批次	香附			四制香附		
		香附烯酮/mg·g ⁻¹	α-香附酮/mg·g ⁻¹	香附烯酮/α-香附酮	香附烯酮/mg·g ⁻¹	α-香附酮/mg·g ⁻¹	香附烯酮/α-香附酮
河南周口	XF-01	2.16	0.87	2.47	1.94	0.64	3.04
	XF-02	2.06	0.95	2.17	2.02	0.54	3.77
	XF-03	2.20	0.87	2.52	2.09	0.66	3.18
	XF-04	2.09	0.95	2.19	2.07	0.59	3.50
	XF-05	2.01	1.02	1.97	1.98	0.69	2.86
海南琼海	XF-06	2.04	1.04	1.96	2.14	0.61	3.50
	XF-07	2.08	0.98	2.12	2.14	0.57	3.77
	XF-08	1.99	0.83	2.41	2.03	0.58	3.51
	XF-09	2.15	0.94	2.29	2.22	0.54	4.08
	XF-10	2.06	0.98	2.10	2.04	0.67	3.07
广东湛江	XF-11	1.79	1.15	1.55	1.77	0.85	2.07
	XF-12	1.78	1.17	1.52	1.86	0.90	2.06
	XF-13	1.85	1.12	1.65	1.88	0.88	2.13
	XF-14	1.70	1.15	1.48	1.75	0.95	1.85
	XF-15	1.84	1.12	1.65	1.88	0.86	2.19

同时,根据文献报道,炮制过程中长时间的加热会使很多含有多糖的中药发生美拉德反应,产生5-羟甲基糠醛和5-羟基麦芽酚^[11-12],故推测峰1可能为5-羟基麦芽酚,峰2(5-羟甲基糠醛)既可能来源于四制辅料中米醋和黄酒,也可能与峰1同为多糖结构转化的产物。为验证这一观点,按2.1项下方法但不添加4种辅料对香附进行炮制,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.4.1项下色谱条件检测,得到参照品图谱,见图7。结果显示峰1,2仍然出现,说明

四制香附样品中峰1为炮制过程中香附多糖转化的产物,5-羟甲基糠醛(峰2)也可以通过香附炮制后自身含有的多糖类成分产生。四制后峰4出现、峰5消失,且这2个峰位置相近,推测炮制过程中可能还有其他成分转化,尚需进一步的实验探索。

在确定供试品溶液的制备方法时,笔者考察了提取溶剂(甲醇、石油醚、乙酸乙酯),提取溶媒体积分数(50%,80%,100%)和提取方法(超声法和回流法),结果确定2.3项下方法为最佳。考察色谱条件



A. 香附; B. 四制香附; C. 参照品; 1. 5-羟基麦芽酚; 2. 5-羟甲基糠醛
图7 香附、四制香附及参照品的UPLC指纹谱比较

Fig. 7 Comparison of UPLC fingerprints of raw, processed and reference products of *Cyperi Rhizoma*

时,香附烯酮和 α -香附酮在242 nm的波长下吸收为最佳,因指纹图谱还要兼顾更多化学成分整体性的体现,故选择280 nm为检测波长。样品含量测定的结果显示,四制前后香附烯酮的含量无显著性差异,但 α -香附酮的含量均显著下降($P < 0.01$),平均下降率30.84%,推测四制过程中加热可能会导致一些挥发性成分损失。另外,有研究认为四制香附的主要药效成分香附烯酮, α -香附酮和sugeonol存在明显的协同作用,三者达到一定的配比时,抗痛经作用达到最佳^[13-14]。本文研究结果显示,四制后香附烯酮和 α -香附酮的含量比值均显著升高,香附四制后抗痛经药效提高是否与这2种成分的含量比例变化有关,还需开展谱效学实验研究。

目前,全国各地的炮制规范和历版《中国药典》中香附四制的炮制方法不太统一,所用辅料品种、用量及炮制工艺各不相同,药品标准中的具体操作内容也并不一致。四制香附的指纹图谱结合药效研究确定5-羟基麦芽酚,5-羟甲基糠醛,香附烯酮和 α -香附酮的含量范围有助于评价不同的四制工艺,使“四制香附”更加明确,促进四制香附的临床应用。本实验通过多元统计分析手段研究香附四制前后指纹图谱中特征成分的变化,明确区分香附和四制香附的特征色谱峰,测定了2个主要药效成分的含量,从定性和定量2个方面对香附和四制香附进行了质量评价,提高了专属性和准确性,可为香附和四制香附的质量评价和鉴别提供依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:258.

[2] 陈雅兰,兰杨,王世宇,等.《中国药典》2015年版含香附制剂中香附质量控制的探讨[J]. 成都中医药大学学报,2017,40(2):12-14.

[3] 胡志方,谢颖,胡律江,等. 基于高效液相色谱法的建昌帮四制香附指纹图谱相似度评价[J]. 江西中医学院学报,2011,23(5):45-47.

[4] 胡律江,胡志方,郭慧玲,等. 四制香附与生品香附挥发油成分的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):112-116.

[5] 梁国斌,蔡萍,黄莉.“建昌帮”四制香附与生品香附挥发油成分的差异分析[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(99):5-7.

[6] 胡律江,郭慧玲,赵晓娟,等. 中药香附炮制前后的GC-MS分析[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(2):24-27.

[7] 胡律江,郭慧玲,胡志方,等. 建昌帮四制香附对小鼠痛经模型的影响[J]. 江西中医药,2011,42(12):66-67.

[8] 郭慧玲,许茜茜,胡志方,等. 四制香附对大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响及作用机制研究[J]. 江西中医药大学学报,2014,26(5):76-78.

[9] 郭慧玲,董能峰,胡律江,等. 基于成分敲出策略辨识四制香附抗痛经的主要效应成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(10):7-11.

[10] 王宇卿,庄果,张须学,等. 多元统计分析比较宛艾及31个产地艾叶HPLC指纹图谱[J]. 中成药,2018,40(3):653-658.

[11] 钱晓东,周桂芬,吕圭源. 不同产地当归炮制前后多糖与新产生成分5-羟甲基糠醛和5-羟基麦芽酚含量变化规律性研究[J]. 中华中医药学刊,2014,32(6):1320-1323.

[12] MA Z, YANG Z, LU D, et al. Determination of bioactive components of *Cistanche deserticola* (Roucongong) by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detectors[J]. Anal Lett, 2014, 47(17): 2783-2794.

[13] 胡律江,许茜茜,赵晓娟,等. 混料均匀设计优化四制香附活性成分配伍[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):1-3.

[14] 郭慧玲,胡强,胡律江,等. 香附烯酮在Caco-2细胞模型中的转运机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(23):110-115.

[责任编辑 刘德文]