

# 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<sup>Δ</sup>

许娜<sup>1\*</sup>, 牟玉侦<sup>1</sup>, 李文兵<sup>2</sup>, 傅超美<sup>1</sup>, 陈胡兰<sup>1</sup>, 王世宇<sup>1</sup>, 卢君蓉<sup>1,3#</sup>(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.西南民族大学青藏高原研究院, 成都 610225; 3.四川大学华西药学院, 成都 610041)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)23-2833-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.23.04

**摘要** 目的:建立同时测定香附挥发油中香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮含量的方法,并比较不同产地香附样品中4种成分的含量差异,为该药材的种质筛选和开发利用提供参考。方法:以12个产地共46批香附为样品,提取挥发油后,采用高效液相色谱法(HPLC)测定挥发油中香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮含量。色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-水(68:32, V/V),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为242 nm,进样量为20  $\mu$ L。以上述4个成分的含量为评价指标,通过雷达图分析、聚类热图分析和主成分分析等多元统计分析,比较不同产地香附样品的质量。结果:含量测定方法学考察结果均符合相关要求;不同产地香附挥发油中4种成分的总含量范围为136.986 4~538.832 1 mg/g,其中以云南产样品的总含量最高(平均值为476.059 2 mg/g)。雷达图分析结果显示,广东、江西、广西、云南4个产地样品的整体轮廓较大、分布平衡度较好,其中以云南产样品的整体轮廓最大、分布平衡度最好;聚类热图分析结果显示,12个产地样品可聚成两大类,即产地为湖北、江西、云南、四川、广东、山东、河南、陕西的样品聚为第Ⅰ类,产地为广西、山西、安徽、海南的样品聚为第Ⅱ类,且第Ⅰ类产地样品的质量优于第Ⅱ类;主成分分析结果显示,前3个主成分的累计贡献率为96.1%,12个产地样品主要聚为两大类,与聚类热图分析结果一致。结论:本研究建立HPLC法可用于香附挥发油中香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮和马兜铃酮含量的同时测定;12个产地样品中以云南产香附的质量更优。

**关键词** 香附;产地;挥发油;含量测定;高效液相色谱法;雷达图分析;聚类热图分析;主成分分析

22]. <http://www.pbs.gov.au/info/industry/listing/participants/pbac>.

[12] 李艳博,陈校云,余中光,等.欧洲卫生技术评估网络的核心评估模型及应用[J].中国卫生信息管理杂志,2016,13(4):370-375.

[13] SCHEY C, KRABBE PFM, POSTMA MJ, et al. Multi-criteria decision analysis (MCDA): testing a proposed MCDA framework for orphan drugs[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2017. DOI:10.1186/s13023-016-0555-3.

[14] LAKDAWALLA DN, DOSHI JA, GARRISON LP JR, et al. Defining elements of value in health care: a health economics approach: an ISPOR special task force report: 3[J]. *Value Health*, 2018, 21(2):131-139.

[15] 刘树林.多属性决策理论方法与应用研究[D].北京:北京航空航天大学,1997.

[16] MÜHLBACHER AC, KACZYNSKI A. Making good decisions in healthcare with multi-criteria decision analysis: the use, current research and future development of MCDA [J]. *Appl Health Econ Health Policy*, 2016, 14(1):29-40.

[17] THOKALA P, DEVLIN N, MARSH K, et al. Multiple criteria decision analysis for health care decision making: an introduction: report 1 of the ISPOR MCDA emerging good practices task force[J]. *Value Health*, 2016, 19(1):1-13.

[18] MARSH K, IJZERMAN M, THOKALA P, et al. Multiple criteria decision analysis for health care decision making: emerging good practices: report 2 of the ISPOR MCDA emerging good practices task force[J]. *Value Health*, 2016, 19(2):125-137.

[19] 姚嘉奇,周挺,管欣,等.英国NICE卫生技术评估介绍及对我国医保目录动态调整的启示[J].中国循证医学杂志,2018,18(9):984-989.

[20] 茅艺伟,陈英耀,唐榛,等.澳大利亚卫生技术评估的应用[J].中国卫生资源,2014,17(6):484-486.

(收稿日期:2020-06-15 修回日期:2020-09-07)

(编辑:胡晓霖)

<sup>Δ</sup>基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(No.8180-3730);四川省科技计划项目(No.18YYJC0960);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划-“青年学者”项目(No.QNXZ2019032)

\*硕士研究生。研究方向:中药有效成分的分析应用。E-mail:415367102@qq.com

#通信作者:讲师,博士研究生。研究方向:生药学、中药学。E-mail:634589580@qq.com

## Comparative Study on the Contents of 4 Components in the Volatile Oil of *Cyperus rotundus* from Different Origins Based on HPLC Method and Multivariate Statistical Analysis

XU Na<sup>1</sup>, MOU Yuzhen<sup>1</sup>, LI Wenbing<sup>2</sup>, FU Chaomei<sup>1</sup>, CHEN Hulan<sup>1</sup>, WANG Shiyu<sup>1</sup>, LU Junrong<sup>1,3</sup> (1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610225, China; 3. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of the contents of cyperotundone, nootkatone,  $\alpha$ -cyperone and aristolone in the volatile oil of *Cyperus rotundus*, compare the content differences of 4 components in *C. rotundus* samples from different origins, and to provide reference for germplasm screening, development and utilization of the medicinal material. METHODS: The volatile oil was extracted from 46 batches of *C. rotundus* from 12 origins. The contents of cypermenone, nootkatone,  $\alpha$ -cyperone and aristolone in volatile oil were determined by HPLC. The determination was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-water (68:32, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min; the column temperature was 30 °C; the detection wavelength was set at 242 nm; the sample size was 20  $\mu$ L. Using the contents of above 4 components as evaluation indexes, radar image analysis, cluster thermal map analysis and principal component analysis were performed for comparing the quality of *C. rotundus* from different origins. RESULTS: The results of content determination methodology investigation met relevant requirements; the total contents of 4 components in volatile oil from *C. rotundus* from different origins ranged from 136.986 4 to 538.832 1 mg/g, of which the total content of samples from Yunnan was the highest (the average value was 476.059 2 mg/g). Radar image analysis results showed that the whole contour in the 4 origins of Guangdong, Jiangxi, Guangxi and Yunnan was large relatively and better balanced, among which the samples from Yunnan had the largest overall contour and the best balance. The cluster thermal map analysis results showed that the samples from 12 origins could be grouped into 2 categories, the first category was from Hubei, Jiangxi, Yunnan, Sichuan, Guangdong, Shandong, Henan and Shaanxi; the second category was from Guangxi, Shanxi, Anhui and Hainan; the quality of samples from the first category were better than that of samples from the second category. The principal component analysis results showed that the cumulative contribution rate of the first three principal components was 96.1%, and the samples from 12 origins were mainly clustered into two categories, which was consistent with the results of cluster thermal map analysis. CONCLUSIONS: Established HPLC method can be used for simultaneous determination of cypermenone, nootkatone,  $\alpha$ -cyperone and aristolone in volatile oil of *C. rotundus* from different origins. Among the samples from 12 origins, the quality of medicinal material from Yunnan is better.

**KEYWORDS** *Cyperus rotundus*; Origins; Volatile oil; Content determination; HPLC; Radar image analysis; Cluster thermal map analysis; Principal component analysis

香附是莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎,最早记载于《名医别录》,划分为草部项下,被列为中品<sup>[1]</sup>。香附具有疏肝解郁、调经止痛的功效,故古人称之为“气病之总司,女科之主师”<sup>[2-3]</sup>。现代药理研究发现,香附具有抗炎、抗氧化、促进胃肠吸收以及雌激素样等作用<sup>[4-7]</sup>。香附中主要含有黄酮类、萜类、生物碱类和挥发油类成分,其中挥发油类成分是香附的主要活性成分,主要由单萜类、倍半萜类及其含氧衍生物组成<sup>[8-9]</sup>。2015年版《中国药典》(一部)香附药材及饮片含量测定项下仅以“挥发油总量”为指标进行质量评价<sup>[10]</sup>,质控指标较单一,缺乏对有效成分的含量控制,无法完全评价多成分、多靶点的香附药材质量。综合以往文献发现,香附药材中香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮具有明显的抗氧化、镇痛、促进胃肠动力以及雌激素样作用<sup>[11-13]</sup>,马兜铃酮具有明显的杀伤癌细胞作用<sup>[14-16]</sup>。因此,本研

究选用香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮等含量较高且活性较强的化学成分作为评价指标,建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定这4种成分的含量,以期更好地控制香附药材的质量。

此外,香附原植物广泛分布于全世界各个国家,在我国香附属于“南药”,主产区为河南、山东、浙江等地<sup>[17-19]</sup>。近年来,国内外关于香附挥发油的研究日益增多,涉及化学成分、药理作用以及工艺设计(提取、炮制)等多个方面<sup>[20-24]</sup>。但由于该药材分布范围广,质量参差不齐,为了相对全面地了解不同产地香附的质量差异,本研究收集了全国12个产地共46批次香附药材为检测样品,覆盖了华北、华中、华东、华南、西南、西北等6个产区,旨在通过探索香附中挥发油类成分(以香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮4个成分为代表)含量的地区差异,从而为其种质筛选与开发利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Ultimate 3000 型 HPLC 仪(德国 Thermo Fisher Scientific 公司);FA2004N 型电子天平(上海津平科学仪器有限公司);ZA305AS 型十万分之一电子天平(上海赞衡仪器有限公司);KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);ZDHW 型调温电热套(北京中兴伟业仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

实验室共收集到来自 12 个不同产地的香附药材共 46 批,经成都中医药大学药学院中药资源与鉴定系裴瑾教授鉴定均为莎草科植物莎草 *C. rotundus* L. 的干燥根茎,具体来源信息见表 1。香附烯酮对照品(批号:19091601,纯度:≥95%)、 $\alpha$ -香附酮对照品(批号:20011502,纯度:≥99%)、马兜铃酮对照品(批号:20061706,纯度:≥91%)均购自成都普菲德生物技术有限公司;圆柚酮对照品(美国 Sigma 公司,批号:10112423,纯度:>98%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

表 1 香附药材的产地来源

Tab 1 Origins of *C. rotundus*

批次	样品编号	产地	批次	样品编号	产地
1	HB-1	湖北	24	GX-1	广西
2	HB-2	湖北	25	GX-2	广西
3	JX-1	江西	26	GX-3	广西
4	JX-2	江西	27	GX-4	广西
5	JX-3	江西	28	GX-5	广西
6	JX-4	江西	29	GX-6	广西
7	GD-1	广东	30	GX-7	广西
8	GD-2	广东	31	GX-8	广西
9	GD-3	广东	32	GX-9	广西
10	GD-4	广东	33	HN-1	海南
11	GD-5	广东	34	HN-2	海南
12	GD-6	广东	35	HN-3	海南
13	GD-7	广东	36	HN-4	海南
14	GD-8	广东	37	AH-1	安徽
15	GD-9	广东	38	AH-2	安徽
16	GD-10	广东	39	YN-1	云南
17	GD-11	广东	40	YN-2	云南
18	SD-1	山东	41	SX-1	山西
19	SD-2	山东	42	SX-2	山西
20	SD-3	山东	43	SC-1	四川
21	SD-4	山东	44	SC-2	四川
22	HN*-1	河南	45	SX*-1	陕西
23	HN*-2	河南	46	SX*-2	陕西

注:产地海南用“HN”表示,河南用“HN\*”表示;产地山西用“SX”表示,陕西用“SX\*”表示

Note: Origin of Hainan is represented by “HN”, Henan by “HN\*”; Origin of Shanxi is represented by “SX”, Shaanxi by “SX\*”

## 2 方法与结果

### 2.1 香附挥发油的提取及得率计算

分别称取不同批次香附粉末各 100 g,参照 2015 年

版《中国药典》(四部)“2204 挥发油测定法”<sup>[25]</sup>进行挥发油的提取。将挥发油转移至棕色玻璃瓶中,称定并记录其质量,然后计算挥发油得率[挥发油得率(%) =  $m/M \times 100\%$ , 式中  $m$  为挥发油质量,  $M$  为药材样品质量]<sup>[26]</sup>。结果显示,不同产地香附中挥发油的得率差异较大,其中以海南产样品中挥发油的平均得率最高(1.13%),以四川产样品中挥发油的平均得率最低(0.63%);12 个不同产地香附中挥发油的平均得率为 0.90%。不同产地香附中挥发油得率测定结果见表 2。

表 2 不同产地香附中挥发油得率测定结果

Tab 2 Volatile oil yield of *C. rotundus* from different origins

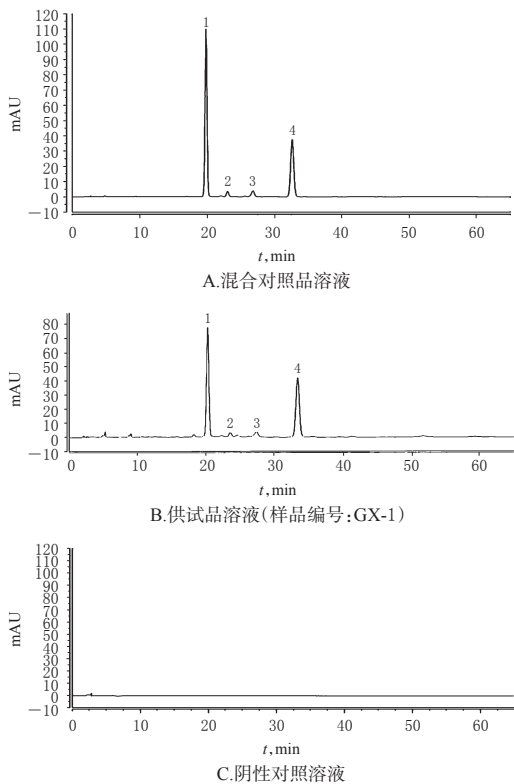
样品编号	挥发油得率, %	样品编号	挥发油得率, %	样品编号	挥发油得率, %	样品编号	挥发油得率, %
HB-1	1.00	GD-7	0.70	GX-2	0.80	AH-1	1.10
HB-2	0.90	GD-8	0.70	GX-3	0.90	AH-2	1.10
JX-1	1.10	GD-9	0.90	GX-4	0.70	YN-1	0.80
JX-2	1.00	GD-10	1.10	GX-5	0.70	YN-2	0.80
JX-3	1.00	GD-11	0.70	GX-6	1.20	SX-1	1.20
JX-4	0.80	SD-1	0.70	GX-7	0.90	SX-2	0.90
GD-1	1.00	SD-2	1.20	GX-8	0.60	SC-1	0.55
GD-2	0.70	SD-3	1.00	GX-9	1.10	SC-2	0.70
GD-3	0.90	SD-4	0.80	HN-1	1.10	SX*-1	0.60
GD-4	0.80	HN*-1	1.00	HN-2	1.20	SX*-2	0.70
GD-5	0.85	HN*-2	0.80	HN-3	1.00		
GD-6	0.70	GX-1	0.80	HN-4	1.20		

### 2.2 香附挥发油中 4 种成分的含量测定

2.2.1 溶液的制备 (1)混合对照品溶液:精密称取香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮各对照品适量,用甲醇制备成质量浓度分别为 0.295 4、0.005 3、0.064 2、0.046 2 mg/mL 的混合对照品溶液,备用。(2)供试品溶液:精密称取“2.1”项下香附挥发油 6 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇定容,即得。(3)阴性对照溶液:以甲醇作为阴性对照溶液。

2.2.2 色谱条件与系统适用性试验 色谱条件参考本课题组前期发表的文献<sup>[27]</sup>,并进行优化后设置。色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:甲醇-水(68:32, V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30  $^{\circ}$ C;检测波长:242 nm;进样量:20  $\mu$ L。取“2.2.1”项下混合对照品溶液、供试品溶液(样品编号:GX-1)和阴性对照溶液,分别按此色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮 4 种成分的色谱峰与其相邻峰间的分离度均大于 1.5,理论板数均不低于 10 000,且阴性对照溶液对测定无干扰。色谱图见图 1。

2.2.3 线性关系考察 取“2.2.1(1)”项下混合对照品溶液 2、4、6、8、10、12  $\mu$ L,分别按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品进样量( $x$ ,  $\mu$ g)为横坐标、色谱峰峰面积为纵坐标( $y$ )绘制标准曲线。结果显示,各成分在其进样量范围内与其各自峰面积的线性关系均良好( $r$ 均大于 0.999 0),结果见表 3。



注: 1. 香附烯酮; 2. 圆柚酮; 3. 马兜铃酮; 4.  $\alpha$ -香附酮  
 Note: 1. cyperotundone; 2. nootkatone; 3. aristolone; 4.  $\alpha$ -cyperone

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表3 4种成分的回归方程、线性范围、检测限和定量限测定结果

Tab 3 Regression equation, linear range, detection limit and quantitation limit of 4 components

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围, $\mu\text{g}$	定量限, $\mu\text{g}$	检测限, $\mu\text{g}$
香附烯酮	$y=34.745x+0.0889$	1.000 0	0.541 9~3.251 3	0.009 4	0.002 8
圆柚酮	$y=80.37x-0.031 4$	1.000 0	0.009 2~0.054 9	0.004 6	0.001 4
$\alpha$ -香附酮	$y=81.588x+0.007 1$	1.000 0	0.125 2~0.751 2	0.006 3	0.001 9
马兜铃酮	$y=12.813x+0.054 6$	0.999 1	0.081 1~0.486 5	0.036 5	0.010 9

2.2.4 检测限和定量限 取“2.2.1(1)”项下混合对照品溶液适量,用甲醇逐级稀释后,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以信噪比10:1、3:1分别计算各待测成分的定量限和检测限,结果见表3。

2.2.5 精密度试验 取香附挥发油(样品编号:GX-1)适量,按“2.2.1(2)”方法制备供试品溶液,然后按“2.2.2”项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果显示,香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮峰面积的RSD分别为0.57%、0.56%、0.76%、1.64%( $n=6$ ),说明该方法精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液(样品编号:GX-1)适量,分别在室温条件下放置0、2、4、6、8、12、24 h后,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,香

附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮峰面积的RSD分别为0.59%、0.53%、0.69%、1.60%( $n=7$ ),表明供试品溶液在室温条件下放置24 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取香附挥发油(样品编号:GX-1)适量,共6份,分别按“2.2.1(2)”项下方法制成供试品溶液,然后按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并根据标准曲线计算各成分的含量。结果,香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮含量的RSD分别为1.06%、1.92%、1.80%、1.65%( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的香附挥发油(样品编号:GX-1)3 mg,共6份,均按“2.2.1(2)”项下方法制备成供试品溶液,然后分别按与已知成分含量约1:1( $m/m$ )的比例精密加入各对照品溶液(均以甲醇为溶剂制备)适量,然后按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,根据标准曲线方程计算出各成分的含量并计算其加样回收率。结果显示,香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮的平均加样回收率分别为95.54%、100.57%、99.23%、96.86%,RSD分别为1.28%、2.34%、0.68%、1.75%( $n=6$ ),表明该方法准确度良好,结果见表4。

表4 4种成分的加样回收率测定结果( $n=6$ )

Tab 4 Results of recovery tests of 4 kinds of components( $n=6$ )

待测成分	取样量, g	样品中含 量,mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收 率,%	平均加样回 收率,%	RSD, %			
香附烯酮	0.003 1	0.487 6	0.455 2	0.920 8	95.17	95.54	1.28			
	0.002 9	0.456 2	0.455 2	0.893 5	96.07					
	0.003 0	0.471 9	0.455 2	0.903 2	94.75					
	0.003 1	0.487 6	0.455 2	0.920 4	95.08					
	0.002 9	0.456 2	0.455 2	0.901 2	97.76					
	0.003 0	0.471 9	0.455 2	0.901 6	94.40					
	圆柚酮	0.003 1	0.009 0	0.008 8	0.017 6			97.73	100.57	2.34
		0.002 9	0.008 4	0.008 8	0.017 3			101.14		
		0.003 0	0.008 7	0.008 8	0.017 7			102.27		
0.003 1		0.009 0	0.008 8	0.017 9	101.14					
0.002 9		0.008 4	0.008 8	0.017 5	103.41					
0.003 0		0.008 7	0.008 8	0.017 3	97.73					
$\alpha$ -香附酮		0.003 1	0.120 0	0.130 3	0.248 8	98.85	99.23	0.68		
		0.002 9	0.112 2	0.130 3	0.241 3	99.08				
		0.003 0	0.116 1	0.130 3	0.247 0	100.46				
	0.003 1	0.120 0	0.130 3	0.248 5	98.62					
	0.002 9	0.112 2	0.130 3	0.241 0	98.85					
	0.003 0	0.116 1	0.130 3	0.245 8	99.54					
	马兜铃酮	0.003 1	0.082 8	0.077 0	0.159 6	99.74			96.86	1.75
		0.002 9	0.077 4	0.077 0	0.151 1	95.71				
		0.003 0	0.080 1	0.077 0	0.154 6	96.75				
0.003 1		0.082 8	0.077 0	0.156 8	96.10					
0.002 9		0.077 4	0.077 0	0.150 6	95.06					
0.003 0		0.080 1	0.077 0	0.155 4	97.79					

2.2.9 耐用性试验 取香附挥发油(样品编号:GX-1)适量,共3份,分别按“2.2.1(2)”项下方法制成供试品溶液,

保持“2.2.2”项下其他色谱条件不变的情况下,分别考察其在不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同柱温(25、30、35 ℃)、不同检测波长(242、254、280 nm)条件下的测定结果,记录峰面积,并根据标准曲线方程计算出各成分的含量。平行3次试验,取平均值。结果,香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮在不同流速下测得的含量的RSD分别为0.53%、0.88%、0.34%、0.77% ( $n=3$ );在不同柱温下测得的含量的RSD分别为0.33%、0.34%、1.28%、0.39% ( $n=3$ );在不同检测波长下测得的含量的RSD分别为0.35%、0.49%、0.68%、0.72% ( $n=3$ )。在3种条件下4种成分含量的RSD均小于3%,表明该方法耐用性良好。

2.2.10 样品含量测定 取46批香附挥发油样品适量,分别按“2.2.1(2)”项下方法制备成供试品溶液,然后按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并根据标准曲线计算出各成分的含量。结果,不同产地香附挥发油中4种成分的含量范围跨度较大。香附烯酮的含量范围为65.785 3~417.977 0 mg/g,其中以云南产香附挥发油中含量最高(平均值为315.159 6 mg/g);圆柚酮的含量范围为0.049 3~16.042 6 mg/g(除未检出外),其中以广东产香附挥发油中含量最高(平均值为5.853 9 mg/g); $\alpha$ -香附酮的含量范围为0.935 3~181.615 6 mg/g,其中以陕西产香附挥发油中含量最高(平均值为142.251 6

mg/g);马兜铃酮的含量范围为6.563 4~112.485 5 mg/g,其中以山西产香附挥发油中含量最高(平均值为95.002 6 mg/g)。不同产地香附挥发油中4种成分的总含量范围为136.986 4~538.832 1 mg/g,其中以云南产香附挥发油中总含量最高(平均值为476.059 2 mg/g),结果见表5。

### 2.3 多元统计分析

为了进一步了解不同产地香附挥发油中4种成分的含量差异,本研究分别采用雷达图分析、聚类热图分析和主成分分析对12个产地共46批香附样品进行分析。

2.3.1 雷达图分析 以香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮含量为质量评价因子,采用Excel 2010版软件绘制46批香附样品的雷达图,通过比较其轮廓大小以及各成分平衡分布情况来反映不同产地香附样品的质量差异<sup>[28-29]</sup>,结果见图2。结果显示,以广东、江西、广西、云南产香附挥发油中4种成分的轮廓较大且分布平衡度较好,其中又以云南产香附的整体轮廓最大、分布平衡度最好,提示云南产香附样品质量较好。

2.3.2 聚类热图分析 以香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮4种成分的含量为评价指标,采用Heml-1.0软件对46批香附样品进行聚类热图分析。聚类热图纵向聚类结果反映不同产地样品的含量差异关系,横向聚类结果反映4种成分的含量差异关系,热图颜色深浅反映各成分含量的高低(颜色由浅到深代表含量由低到

表5 不同产地香附挥发油中4种成分的含量测定结果(mg/g,  $n=3$ )

Tab 5 Content determination results of 4 components in volatile oil of *C. rotundus* from different origins (mg/g,  $n=3$ )

样品编号	单一成分含量				总含量	样品编号	单一成分含量				总含量
	香附烯酮	圆柚酮	$\alpha$ -香附酮	马兜铃酮			香附烯酮	圆柚酮	$\alpha$ -香附酮	马兜铃酮	
HB-1	134.971 7	未检出	51.738 3	31.585 5	218.295 5	GX-1	157.302 1	2.902 4	38.705 3	26.667 2	225.577 0
HB-2	123.323 2	0.169 2	33.844 9	24.832 4	182.169 7	GX-2	310.403 0	1.535 6	43.974 5	108.153 4	464.066 5
JX-1	344.653 9	0.095 9	75.843 4	53.209 5	473.802 7	GX-3	141.849 9	2.911 1	38.102 2	25.107 9	207.971 1
JX-2	265.981 8	0.274 6	57.560 8	46.531 0	370.348 2	GX-4	211.183 8	0.704 2	18.497 3	39.788 9	270.174 2
JX-3	183.250 5	未检出	44.227 8	32.328 9	259.807 2	GX-5	309.914 0	1.671 0	32.272 0	54.709 0	398.566 0
JX-4	186.804 1	未检出	43.904 5	31.942 2	262.650 8	GX-6	101.108 5	0.267 7	3.801 7	31.808 5	136.986 4
GD-1	75.875 3	2.105 9	66.647 7	11.681 3	156.310 2	GX-7	295.639 3	1.231 8	14.235 9	50.808 1	361.915 1
GD-2	110.235 6	2.387 0	109.803 9	24.201 0	246.627 5	GX-8	417.977 0	2.557 3	43.481 7	74.816 1	538.832 1
GD-3	165.177 5	7.290 4	87.885 6	21.409 4	281.762 9	GX-9	323.263 3	0.881 9	16.419 4	83.803 4	424.368 0
GD-4	191.521 0	5.424 7	93.997 9	29.320 8	320.264 4	HN-1	146.310 0	0.203 3	3.231 9	59.641 8	209.387 0
GD-5	65.785 3	16.042 6	108.240 7	6.563 4	196.632 0	HN-2	192.701 2	0.561 9	5.562 9	60.147 4	258.973 4
GD-6	101.830 6	10.402 8	109.744 9	13.258 6	235.236 9	HN-3	171.219 0	0.049 3	1.061 2	65.950 6	238.280 1
GD-7	182.806 8	7.667 4	109.522 3	25.628 4	325.624 9	HN-4	179.499 0	0.172 9	0.935 3	57.025 3	237.632 5
GD-8	263.942 8	8.818 8	142.954 7	35.773 5	451.489 8	AH-1	259.437 8	1.570 2	29.323 2	64.402 0	354.733 2
GD-9	192.277 3	1.660 1	14.170 0	60.225 9	268.333 3	AH-2	174.340 2	未检出	5.063 3	62.964 9	242.368 4
GD-10	205.525 0	0.339 7	4.343 6	61.666 5	271.874 8	YN-1	331.954 2	4.164 4	115.019 1	52.323 8	503.461 5
GD-11	251.535 7	2.253 3	40.389 9	58.503 8	352.682 7	YN-2	298.364 9	2.029 0	96.841 9	51.421 2	448.657 0
SD-1	87.738 6	未检出	107.364 9	19.524 9	214.628 4	SX-1	362.732 4	1.051 0	11.315 9	112.485 5	487.584 8
SD-2	77.650 7	0.636 8	99.629 1	17.116 7	195.033 3	SX-2	215.922 6	0.087 2	2.017 4	77.519 6	295.546 8
SD-3	139.257 8	0.284 3	121.328 1	26.694 8	287.565 0	SC-1	189.832 5	未检出	71.867 2	23.512 8	285.212 5
SD-4	118.287 7	未检出	124.169 6	23.987 4	266.444 7	SC-2	174.689 1	未检出	67.363 1	21.019 4	263.071 6
HN*-1	108.146 7	未检出	114.288 4	15.414 0	237.849 1	SX*-1	84.885 5	0.214 2	102.887 5	13.506 4	201.493 6
HN*-2	158.731 4	未检出	124.809 6	19.749 0	303.290 0	SX*-2	106.077 8	0.280 9	181.615 6	19.009 0	306.983 3

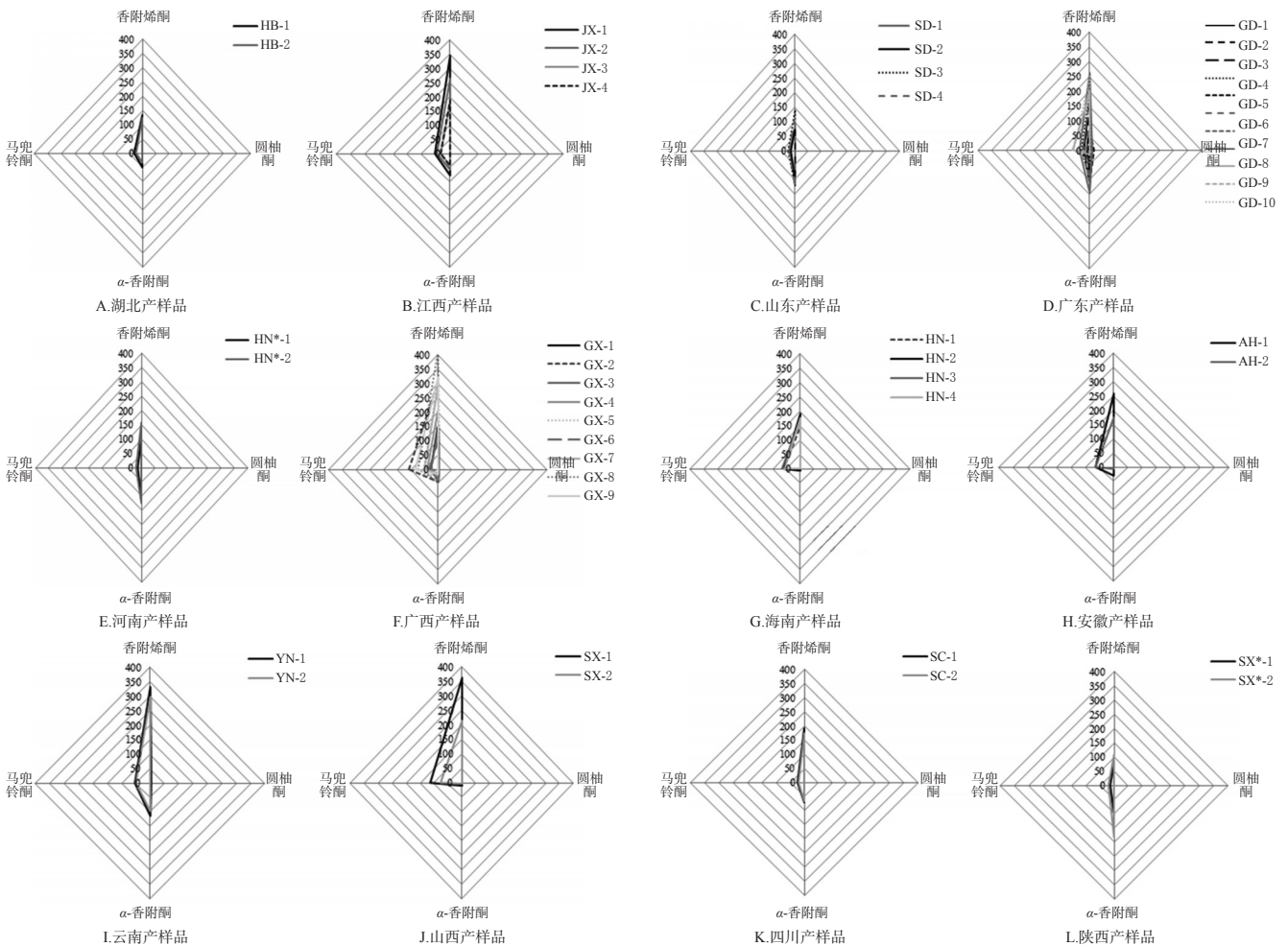


图2 不同产地香附挥发油中4种成分含量的雷达图

Fig 2 Radar chart of the contents of 4 components in volatile oil of *C. rotundus* from different origins

高)<sup>[30-32]</sup>,结果见图3。产地聚类分析结果显示,除编号为GD-9、GD-10、GD-11、GX-1、GX-3的5批样品分布较为分散外,其余41批样品按产地可聚为两大类,即产地为湖北、江西、云南、四川、广东、山东、河南、陕西的样品聚为第I类,产地为广西、山西、安徽、海南的样品聚为第II类。成分聚类分析结果显示,香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮这3个成分聚为一类,马兜铃酮单独聚为另一类,表明香附烯酮、圆柚酮、马兜铃酮是区分不同产地样品质量的差异性成分。比较图3中12个产地样品的香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮条带颜色,第I类产地样品整体条带颜色偏深,第II类产地样品整体颜色相对较浅,这提示第I类产地样品质量较II类产地样品更好。

2.3.3 主成分分析 以香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮、马兜铃酮等4个主要成分含量为变量,采用SIMCA-P 14.1统计软件对不同产地的46批样品进行主成分分析。结果显示,前3个主成分的累计贡献率为96.1%,说明提取的3个主成分可以反映主要成分含量的大部分信息,主成分得分图见图4。结果显示,同种形状的样品聚在一

起(一种形状代表一个产地),这与聚类热图中产地聚类结果基本一致,即主要聚为两大类(编号为GD-9、GD-10、GD-11、GX-1、GX-3、JX-1、JX-2的样品除外):产地为湖北、江西、云南、四川、广东、山东、河南、陕西的样品聚为第I类,产地为广西、山西、安徽、海南的样品聚为第II类。主成分分析结果与热图聚类分析结果相互印证,进一步说明聚类热图的结果可靠。

### 3 讨论

以往文献研究发现,香附烯酮、 $\alpha$ -香附酮、圆柚酮是香附中的主要活性成分,具有抗氧化、镇痛、促进胃肠动力以及雌激素样等作用,是香附及其炮制品含量测定比较常用的指标成分<sup>[11-13]</sup>。为了进一步了解香附挥发油中主要活性成分有哪些,本课题组首先选用了多种对照品对色谱图中含量较高的色谱峰进行定位,结果发现除了香附烯酮、 $\alpha$ -香附酮、圆柚酮外,马兜铃酮在香附挥发油中的含量也较高,且广泛分布在各批样品中。查阅文献后发现,马兜铃酮具有明显的抗氧化、杀伤癌细胞活性<sup>[14-16]</sup>,因此本研究最终确定以含马兜铃酮在内的上述4

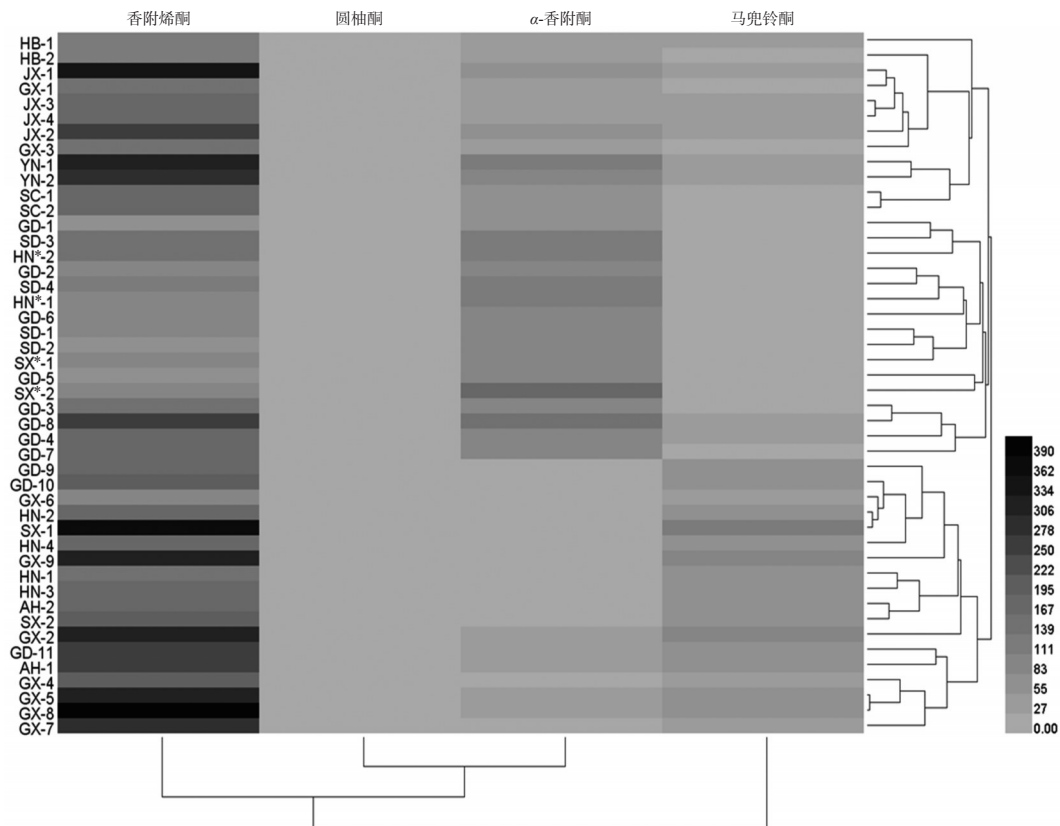


图3 不同产地香附挥发油中4种成分含量聚类热图

Fig 3 Cluster thermal map of 4 components in volatile oil of *C. rotundus* from different origins

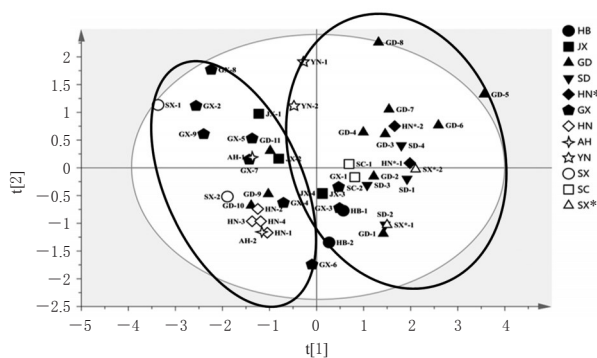


图4 不同产地香附挥发油中4种成分的主成分得分图

Fig 4 Principal component score chart of 4 components in volatile oil of *C. rotundus* from different origins

种成分共同作为含量测定的指标成分。但目前尚未有与这4种成分相关产品的文献报道,在后续研究中可以加强对其作用机制与毒副作用的探索,以期开发与此4种成分相关的产品服务于临床。

本研究基于多元统计分析方法,对不同产地香附挥发油中4种主要活性成分进行了定量分析。综合雷达图轮廓大小及平衡情况分析结果,发现云南产香附中4种成分的轮廓最大、分布平衡度最好,且云南产香附中4种成分的总含量也最高,这提示云南产香附质量优于其他

产地的样品。聚类热图结果显示,12个产地的香附样品可聚为两大类,产地为湖北、江西、云南、四川、广东、山东、河南、陕西的样品聚为第I类,产地为广西、山西、安徽、海南的样品聚为第II类,该分类结果与主成分分析结果一致;根据聚类热图颜色深浅、雷达图整体轮廓大小及平衡情况判断,本研究中第I类产地样品质量优于第II类。

综上所述,本研究所建HPLC含量测定方法可用于香附挥发油中香附烯酮、圆柚酮、 $\alpha$ -香附酮和马兜铃酮的同时测定;12个产地样品中以云南产香附药材的质量更优。但本研究只测定了4个活性较强的挥发油类成分,指标成分较少,在后续研究中,可以增加样品收集的产地与批次,综合生物碱类、黄酮类、酚类等多个类别的成分作为香附的含量测定指标成分,以更加全面地评价该药材的质量。

### 参考文献

[1] 季宁平,卢君蓉,王世宇,等.香附的本草考证[J].中药与临床,2015,6(3):56-61.  
 [2] 王世宇,卢君蓉,陈秋薇,等.香附炮制的历史沿革及现代研究进展[J].中药与临床,2011,2(6):62-64.  
 [3] 季宁平,周莉江,严鑫,等.醋制香附不同提取部位对肝郁血瘀模型大鼠的影响[J].中药与临床,2017,8(2):57-60.

- [4] 郭慧玲,王进诚,胡律江,等.香附不同炮制品的抗炎镇痛作用比较[J].江西中医药大学学报,2017,29(1):74-75、83.
- [5] ARDESTANI A, YAZDANPARAS R. Cyperus rotundus suppresses AGE formation and protein oxidation in a model of fructose mediated protein glycoxidation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2007, 41(5):572-578.
- [6] 张跃飞,李鑫,孟宪生,等.香附挥发油的生物活性及其GC-MS分析[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(14):32-35.
- [7] 丁平,田友清,陈国胜.香附油滴丸抗痛经作用研究[J].中药新药与临床药理,2015,26(1):57-60.
- [8] KAMALA A, MIDDHA SK, KARIGAR CS. Plants in traditional medicine with special reference to *Cyperus rotundus* L.: a review[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(7):309.
- [9] KUMAR HK, RAZACK S, NALLAMUTHU I, et al. Phytochemical analysis and biological properties of *Cyperus rotundus* L.[J]. *Ind Crops Prod*, 2014. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.11.040.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:258.
- [11] 李艳苹,孟辉,苏海潇,等.不同炮制方法对醋香附中主要成分含量的影响[J].华西药学杂志,2019,34(4):427-430.
- [12] 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.
- [13] 卢君蓉,李文兵,王世宇,等.香附醋制前后香附烯酮、圆柚酮和 $\alpha$ -香附酮的含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(20):24-27.
- [14] MEMARIANI T, HOSSEINI T, KAMALI H, et al. Evaluation of the cytotoxic effects of *Cyperus longus* extract, fractions and its essential oil on the PC3 and MCF7 cancer cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2):1353-1360.
- [15] PRIYA RM, PADMAKUMARI KP. HPTLC and reverse phase HPLC methods for the simultaneous quantification and in vitro screening of antioxidant potential of isolated sesquiterpenoids from the rhizomes of *Cyperus rotundus*[J]. *J Chromatogr B*, 2012. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.05.042.
- [16] ANJUM B, KUMAR R, KUMAR R, et al. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and insect anti-feeding activity of *Ardisia solanacea* Roxb. extracts[J]. *J Biol Act Prod Nat*, 2019, 9(5):372-386.
- [17] DHAR P, DHAR DG, RAWAT AKS. Medicinal chemistry and biological potential of *Cyperus rotundus* Linn: an overview to discover elite chemotype(s) for industrial use[J]. *Ind Crop Prod*, 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.05.053.
- [18] AGHASSI A, NAEEMY A, Feizbakhsh A. Chemical composition of the essential oil of *Cyperus rotundus* L. from Iran[J]. *J Essent Oil Bear Pl*, 2013, 16(3):382-386.
- [19] LAWAL OA, OYEDEJI AO. Chemical composition of the essential oils of *Cyperus rotundus* L. from South Africa[J]. *Molecules*, 2009, 14(8):2909-2917.
- [20] 刘欢,张孟历,于猛,等.醋制香附挥发油抗抑郁活性及化学成分分析[J].药物评价研究,2020,43(3):436-442.
- [21] 宋必卫,杨轶安.香附挥发油诱导A549细胞凋亡作用[J].浙江工业大学学报,2019,47(1):92-97.
- [22] 梁国娉,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.
- [23] 李世英,谢云亮.香附挥发油对慢性束缚应激小鼠焦虑行为的影响[J].中成药,2018,40(10):2140-2143.
- [24] 林三清,周中流,张华林,等.香附挥发油 $\beta$ -CD包合物制备工艺及其化学成分研究[J].亚太传统医药,2017,13(14):8-13.
- [25] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:203.
- [26] 赵永艳,张军银,彭腾,等.不同产地佛手的挥发油成分比较分析[J].中国药房,2020,31(4):423-428.
- [27] 王世宇,李文兵,卢君蓉,等. HPLC法同时测定不同产地香附药材中香附烯酮、圆柚酮和 $\alpha$ -香附酮[J].中成药,2015,37(3):588-591.
- [28] YANG JJ, YANG J, DU J, et al. General survey of *Fructus Psoraleae* from the different origins and chemical identification of the roasted from raw *Fructus Psoraleae*[J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(2):807-814.
- [29] 梁悦,刘涛,蒋天宇,等.生脉注射液物理指纹图谱的建立及其质量评价[J].中草药,2018,49(11):2571-2576.
- [30] 杨正明,威则日沙,李学学,等.基于多元统计分析的川产道地药材江油附子和川乌中6种生物碱含量比较研究[J].中草药,2019,50(6):1461-1471.
- [31] 杨正明,刘哲,邓秋林,等.四川道地产区江油附子和川乌中4种核苷类成分含量测定及多元统计分析[J].中草药,2018,49(23):5657-5664.
- [32] 许莉,黄晓婧,高鹏,等.基于多组分含量测定和化学计量学的风寒感冒颗粒整体质量评价研究[J].中草药,2020,51(14):3670-3678.

(收稿日期:2020-08-10 修回日期:2020-11-04)

(编辑:林 静)