

指纹图谱结合一测多评法评价拟草果质量的研究

冯 军, 柴 玲*, 陈明生, 袁健童, 刘布鸣*

广西中医药研究院 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西 南宁 530022

摘要: 目的 建立拟草果 *Amomum paratsao-ko* 药材的质量评价方法。方法 以鼠李柠檬素为参照峰确定共有峰, 建立拟草果的 HPLC 指纹图谱; 以鼠李柠檬素为内标, 确定鼠李素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮的相对校正因子并计算含量, 实现一测多评。同时采用外标法测定 3 种成分的含量, 比较计算值和实测值的差异。结果 建立了拟草果的 HPLC 指纹图谱, 10 批样品相似度均在 0.9 以上; 以鼠李柠檬素为内标建立的鼠李素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮的相对校正因子分别为 1.300、0.885, 重现性良好, 10 批拟草果样品一测多评法计算值与实测值无显著差异。结论 建立的 HPLC 指纹图谱和一测多评法可用于拟草果的质量评价。

关键词: 拟草果; 鼠李柠檬素; 高效液相色谱; 指纹图谱; 一测多评; 鼠李素; 3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)03-0852-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.03.029

Application of fingerprint combined with QAMS in quality evaluation of *Amomum paratsao-ko*

FENG Jun, CHAI Ling, CHEN Ming-sheng, YUAN Jian-tong, LIU Bu-ming

Guangxi Institute of Chinese Medicine Pharmaceutical Sciences, Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China

Abstract: Objective To establish a method for quality evaluation of *Amomum paratsao-ko*. **Methods** Using rhamonotin as the reference peak, the common peaks were determined to establish HPLC fingerprint of *A. paratsao-ko*. Rhamonotin was selected as internal reference and the relative correction factors (RCF) of three components were calculated and the contents were calculated by QAMS. Meanwhile, the contents of three components in *A. paratsao-ko* were determined by external standard method (EMS). The accuracy and feasibility of QAMS was evaluated by comparing the results between the measured values by EMS and calculated values by QAMS. **Results** The HPLC fingerprint of *A. paratsao-ko* was established and the similarity of fingerprints of 10 batches of test samples were above 0.9. The RCF of rhamnetin and 3,5-dihydroxy-7,4'-dimethoxy were 1.300, 0.885 and showed good reproducibility. The contents of three components showed no significant difference in the 10 batches of *A. paratsao-ko* determined by external standard method and QAMS. **Conclusion** The HPLC fingerprint and QAMS methods can be used to evaluate the quality of *A. paratsao-ko*.

Key words: *Amomum paratsao-ko* S. Q. Tong et Y. M. Xia; rhamonotin; HPLC; fingerprint; QAMS; rhamnetin; 3,5-dihydroxy-7,4'-dimethoxy

拟草果又称白草果、广西草果, 为姜科豆蔻属植物拟草果 *Amomum paratsao-ko* S. Q. Tong et Y. M. Xia 的干燥成熟果实, 主产于广西、云南等省区, 在广西主产地为那坡县壮族集居地, 靖西、隆林等地也有分布^[1-2]。在广西民间常作草果 *A. tsao-ko* Crevost et Lemarie 的代用品用作提香或者药用, 为常用壮药, 收载于《广西壮族自治区壮药质

量标准第三卷》, 用于寒湿内阻、脘腹胀痛、呕吐泄泻等症^[3], 其中含量测定项仅以总挥发油含量控制药材质量, 尚无具体化学成分的含量测定标准。目前, 对拟草果有少量的研究报道^[4-7], 尚未发现关于拟草果质量评价相关的研究报道。

课题组前期研究发现, 拟草果中含有多种黄酮类成分^[4], 其中鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟

收稿日期: 2020-09-15

基金项目: 广西自然科学基金项目 (2017GXNSFBA198091)

作者简介: 冯 军 (1984—), 男, 助理研究员, 主要研究方向为中药化学成分与质量控制。E-mail: fj12com@163.com

*通信作者: 柴 玲 (1986—), 女, 副研究员, 主要从事中药活性成分与质量标准研究工作。E-mail: cicichai001@163.com

刘布鸣 (1956—), 男, 研究员, 从事中药、天然药物化学成分与质量标准研究工作。E-mail: liubuming@aliyun.com

基-7,4'-二甲氧基黄酮化学结构类似。鼠李柠檬素含量较高,其他 2 个成分含量较低且市售对照品价格昂贵。本研究拟建立拟草果指纹图谱并采用一测多评(QAMS)法同时测定拟草果中鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮的含量,以期对拟草果药材的质量评价提供方法参考。

1 仪器与试剂

Agilent1260 高效液相色谱仪(美国,含四元梯度泵,自动进样器,柱温箱,DAD 检测器),梅特勒 XS-205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),KQ-5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),HH-S₄ 型数显恒温水浴锅(江苏金怡仪器科技有限公司)。

拟草果分别采自广西那坡县(批号 150907、150908、160828、160829)、隆林县(批号 170909、170910、181009、181010)、靖西市(批号 190912、190913),编号依次为 S1~S10。经广西中医药研究院黄云峰副研究员鉴定为姜科豆蔻属植物拟草果 *A. paratsao-ko* S. Q. Tong et Y. M. Xia 的干燥成熟果实;鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮为自制对照品,经光谱结构确定 HPLC 峰面积归一化法计算,质量分数均 $\geq 98\%$ 。乙腈、甲醇(Fisher 公司)为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),以乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱:0~10 min, 30%乙腈;10~65 min, 30%~90%乙腈;平衡时间 15 min;体积流量 1 mL/min;柱温 25 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L;DAD 双通道检测,检测波长 300、366 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别取鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 0.060、0.204、0.092 mg/mL 的对照品母液,分别精密吸取对照品母液 1、2.5、5 mL 至 10 mL 量瓶,加甲醇至刻度,摇匀,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液。鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮质量浓度分别为 30.0、51.0、9.2 μ g/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备 取拟草果粉末(过 40 目筛)约 1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,回流提取(64 $^{\circ}$ C) 1 h,取出,放冷,用甲醇补足质量,摇匀,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 精密吸取供试品溶液(批号 150907)10 μ L,在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,记录色谱图,以鼠李柠檬素为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积 RSD 均小于 1.5%,6 次进样指纹图谱相似度均大于 0.99,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取供试品溶液(批号 150907)10 μ L,在“2.1”项色谱条件下,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析,记录色谱图,以鼠李柠檬素为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积 RSD 均小于 3%,6 个时间点采集的指纹图谱相似度均大于 0.98,表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取拟草果样品(批号 150907)6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品,按“2.1”项色谱条件分析,记录色谱图,以鼠李柠檬素为参照峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积 RSD 均小于 3%,6 份样品的指纹图谱相似度均大于 0.99,表明方法重复性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度评价 分别取 10 个批次拟草果样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品,在“2.1”项下色谱条件分析,记录色谱图,图谱按《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 年版)分析,自动匹配确立 15 个共有峰,与混合对照品保留时间对比,共确认 3 个成分,分别是鼠李素(2 号峰)、鼠李柠檬素(6 号峰)、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮(9 号峰),采用平均值法生成对照指纹图谱。结果 10 批次样品指纹图谱与对照指纹图谱(R)相似度分别为 0.997、0.997、0.997、0.997、0.937、0.968、0.989、0.989、0.992、0.993,均大于 0.9。10 批拟草果样品指纹图谱见图 1,对照指纹图谱见图 2,混合对照品图谱见图 3。

2.3.5 共有峰相对保留时间及相对峰面积计算 鼠李柠檬素峰保留时间适中,峰形较好且峰面积较大,选择作为参考峰,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积,结果见表 1、2。

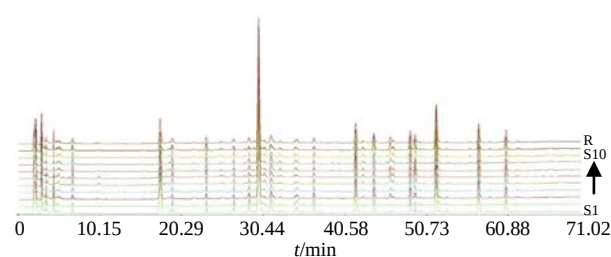


图1 10批拟草果样品指纹图谱

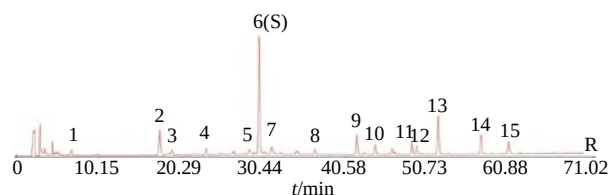
Fig. 1 Fingerprints of ten batches of *A. paratsao-ko* samples

图2 对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint

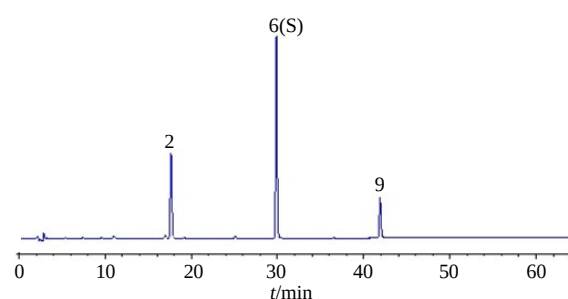
2-鼠李素 6-鼠李柠檬素 9-3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮
2-rhamnetin 6-rhamonotin 9-3,5-dihydroxy-7, 4'-dimethoxy

图3 混合对照品 HPLC 色谱图

Fig. 3 Chromatogram of reference substances

2.4 QAMS 法定量分析

2.4.1 色谱条件及样品制备同“2.1”“2.2.1”“2.2.2”项下方法。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取系列浓度的混合对照品溶液 10 μ L 进样，记录色谱图，以进样

表1 10批样品共有峰相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks of 10 batches of samples

批号	相对保留时间														
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰S	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14	峰15
S1	0.226	0.591	0.641	0.783	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.480	1.631	1.651	1.738	1.914	2.028
S2	0.226	0.591	0.641	0.783	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.629	1.650	1.737	1.914	2.027
S3	0.226	0.591	0.641	0.783	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.630	1.650	1.738	1.915	2.028
S4	0.226	0.591	0.641	0.783	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.629	1.649	1.737	1.914	2.028
S5	0.226	0.591	0.641	0.782	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.629	1.650	1.738	1.915	2.029
S6	0.226	0.591	0.641	0.783	0.960	1.000	1.052	1.230	1.403	1.479	1.630	1.650	1.738	1.915	2.027
S7	0.226	0.591	0.641	0.782	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.629	1.649	1.737	1.914	2.028
S8	0.226	0.590	0.640	0.783	0.960	1.000	1.052	1.230	1.403	1.479	1.630	1.650	1.738	1.915	2.028
S9	0.226	0.591	0.641	0.783	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.630	1.650	1.738	1.914	2.028
S10	0.226	0.591	0.641	0.782	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.630	1.650	1.738	1.914	2.028
平均值	0.226	0.591	0.641	0.783	0.960	1.000	1.052	1.229	1.403	1.479	1.630	1.650	1.738	1.914	2.028

表2 10批样品共有峰相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks of 10 batches of samples

批号	相对峰面积														
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰S	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14	峰15
S1	0.022	0.407	0.032	0.029	0.090	1.000	0.152	0.082	0.195	0.094	0.082	0.021	0.277	0.149	0.105
S2	0.022	0.407	0.032	0.029	0.090	1.000	0.152	0.082	0.196	0.094	0.082	0.021	0.278	0.150	0.106
S3	0.032	0.280	0.036	0.045	0.056	1.000	0.109	0.054	0.195	0.113	0.103	0.057	0.325	0.177	0.114
S4	0.032	0.280	0.036	0.044	0.056	1.000	0.109	0.055	0.195	0.113	0.104	0.057	0.325	0.177	0.114
S5	0.066	0.313	0.054	0.071	0.039	1.000	0.078	0.052	0.223	0.062	0.104	0.172	0.480	0.195	0.183
S6	0.066	0.313	0.053	0.071	0.039	1.000	0.077	0.051	0.223	0.062	0.103	0.172	0.480	0.195	0.183
S7	0.042	0.151	0.066	0.050	0.047	1.000	0.090	0.027	0.177	0.076	0.133	0.045	0.339	0.204	0.094
S8	0.042	0.152	0.064	0.050	0.046	1.000	0.089	0.026	0.176	0.076	0.132	0.044	0.335	0.203	0.093
S9	0.042	0.172	0.045	0.060	0.030	1.000	0.033	0.031	0.188	0.125	0.118	0.084	0.352	0.193	0.118
S10	0.040	0.172	0.044	0.060	0.030	1.000	0.033	0.032	0.189	0.125	0.118	0.084	0.352	0.193	0.117
平均值	0.041	0.265	0.046	0.051	0.052	1.000	0.092	0.049	0.196	0.094	0.108	0.076	0.354	0.184	0.122

量为横坐标(X)，峰面积积分值为纵坐标(Y)，得鼠李素回归方程： $Y=3\ 007.3\ X+0.577$ ， $r=0.999\ 99$ ；鼠李柠檬素回归方程： $Y=3\ 928.5\ X-4.7861$ ， $r=0.999\ 99$ ；3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮回归方程： $Y=4\ 473.9\ X-2.65$ ， $r=0.999\ 99$ 。结果表明：拟草果中鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮进样量分别在0.06~0.60、0.102~1.020、0.018 4~0.184 0 μg，进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.3 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液10 μL进样6次，记录色谱图，结果鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮峰面积的RSD值分别为0.14%、0.13%、0.15%，说明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(批号150907)，分别于0、2、4、8、12、24 h进样，测定峰面积，结果鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮峰面积的RSD值分别为0.41%、0.41%、0.44%，说明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批(批号150907)拟草果样品6份，每份约1 g，精密称定，按“2.2”项供试品溶液的制备方法制备供试品溶液，按“2.1”项色谱条件测定，结果鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮含量分别为1.25、2.42、0.40 mg/g，RSD值分别为0.57%、0.61%、0.67%，说明方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已测定的拟草果(批号150907)粉末(过40目筛)约0.5 g，精密称定，

平行称取9份，置具塞锥形瓶中，按标准品与供试品含量比为0.5:1、1:1、1.5:1分别加入各标准品，每个比例配置3份，分别精密加入50 mL甲醇，称定质量，回流提取(64℃)1 h，取出，放冷，用甲醇补足质量，摇匀，0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。各供试品溶液进样体积10 μL，测定峰面积，计算回收率，结果鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮平均回收率分别为100.31%、100.23%、100.63%，RSD分别为0.97%、1.44%、1.11%，结果表明方法回收率良好。

2.4.7 相对校正因子(f)的测定 分别吸取混合对照品溶液2、4、6、8、10、20 μL，测定各成分的峰面积和保留时间，根据文献研究方法^[8-9]，分别计算鼠李素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮与内参物鼠李柠檬素的f及相对保留值，结果 $f_{\text{鼠李柠檬素/鼠李素}}=1.300$ 、 $f_{\text{鼠李柠檬素/3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮}}=0.885$ ，RSD分别为0.20%、0.44%。

2.4.8 样品测定 分别取10个批号拟草果样品，按“2.2.2”项供试品溶液制备供试品，在“2.1”项色谱条件下测定，采用外标法(EMS)与QAMS法分别对拟草果中的3种黄酮类成分含量进行测定，结果2种方法测定的结果基本一致，采取QAMS法测定拟草果中鼠李素、3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮的含量结果准确可靠，见表3。

3 讨论

3.1 检测波长的确定

采用DAD检测器采集供试品溶液的三维光谱图，结果显示，鼠李素、鼠李柠檬素、3,5-二羟基-

表3 QAMS法与EMS法测定拟草果中3种成分的含量

Table 3 Contents of three compositions of *A. paratsao-ko* determined by QAMS and EMS

批号	鼠李柠檬素/(mg·g ⁻¹)	鼠李素/(mg·g ⁻¹)		3,5-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮/(mg·g ⁻¹)	
	EMS	EMS	QAMS	EMS	QAMS
S1	2.42	1.25	1.25	0.40	0.41
S2	2.39	1.18	1.18	0.38	0.39
S3	2.79	0.92	0.92	0.42	0.43
S4	2.80	0.92	0.91	0.42	0.43
S5	2.51	0.98	0.98	0.47	0.47
S6	2.51	0.98	0.98	0.47	0.47
S7	3.58	0.63	0.63	0.47	0.48
S8	3.59	0.63	0.63	0.47	0.48
S9	3.24	0.65	0.65	0.46	0.47
S10	3.20	0.65	0.65	0.46	0.47

7,4'-二甲氧基黄酮紫外吸收特征相似, 均在 366 nm 处有最大吸收, 而在 300 nm 处其他特征组分具有较好吸收, 故选择双波长法同时测定指纹图谱及 3 种成分的含量。

3.2 供试品制备方法的考察

经对比超声和回流 2 种提取方法, 结果显示, 2 种方法提取色谱图基本一致, 但回流法提取效率更高, 故选择回流提取。进一步考察提取溶剂、溶剂用量以及提取时间等参数, 最终确定上述本实验供试品制备方法。

3.3 方法应用

采用本实验建立的方法, 对不同批次的拟草果和草果分别进行分析, 结果显示, 二者特征图谱有明显差异, 拟草果中含有的黄酮类成分群均未在草果中检出。广西民间常将拟草果作为草果的代用品, 主要是利用其含有的挥发油成分起提香作用, 而作为临床药用时则不宜用于替代草果。

4 结论

QAMS 法结合指纹图谱技术, 既发挥 QAMS 法简便、易行、经济的优点, 又体现指纹图谱整体、全面的优势。指纹图谱与含量测定采用同一方法, 简化了分析过程, 降低分析成本。所建立的方法同时达到定性、定量 2 个目的, 可作为拟草

果药材的质量评价方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 北京科学出版社, 1992: 61.
- [2] 广西中药资源普查办公室. 广西中药资源名录 [M]. 南宁: 广西民族出版社, 1993: 271.
- [3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药材质量标准 (第 3 卷) [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2017: 99-100.
- [4] 柴玲, 林霄, 梁柏照, 等. 拟草果化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3217-3221.
- [5] 柴玲, 林霄, 李燕婧, 等. 拟草果乙酸乙酯部位抗炎作用及机制研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(3): 32-35.
- [6] 柴玲, 林霄, 李燕婧, 等. 拟草果甲醇提取物抗炎镇痛作用研究 [J]. 中医药导报, 2018, 24(10): 88-89.
- [7] 覃兰芳, 黄云峰, 胡琦敏, 等. 拟草果挥发油的 GC-MS 分析 [J]. 中医药导报, 2014, 20(11): 23-25.
- [8] 李颖硕, 张晓栋, 杨楠楠, 等. 指纹图谱结合一测多评模式在前胡质量评价中的应用 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1557-1560.
- [9] 高喜梅, 池玉梅, 张雯, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价酸橙枳实质量的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2548-2556.

[责任编辑 时圣明]