

基于指纹图谱和多指标成分定量结合化学模式识别法评价不同产地草果质量

陈肖¹, 管红梅^{1*}, 陈梦林¹, 王保山⁴, 代敏^{2*}, 蒲忠慧^{1,2,3*}

1. 成都医学院检验医学院, 四川 成都 610500

2. 四川省动物源性食品兽药残留防控技术工程实验室, 四川 成都 610500

3. 成都医学院 发育与再生四川省重点实验室, 四川 成都 610500

4. 北京生泰尔科技股份有限公司, 北京 102600

摘要: 目的 采用指纹图谱、多指标成分定量与化学模式识别相结合的方法, 评价不同产地草果 *Amomum tsaoko* 质量, 为其进一步开发利用提供依据。方法 采用 HPLC 法, 流动相为甲醇-0.2 mol/L 磷酸水溶液进行梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 对 15 批不同产地草果药材建立指纹图谱及 6 种有效成分含量测定, 运用聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)对草果进行化学模式识别研究。结果 建立了 15 批草果药材的指纹图谱, 相似度为 0.737~0.991, 共标定 21 个共有峰, 指认了 6 个成分, 含量测定结果表明不同产地草果中化学成分含量存在明显差异; HCA 分析 15 批草果明显分为 3 类; PCA 得到 4 个主成分的累计方差贡献率为 85.941%; OPLS-DA 表明原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸可能是影响草果药材质量的差异标志物。结论 建立的草果 HPLC 指纹图谱及 6 个成分含量测定方法的专属性强, 且准确、可靠, 结合化学模式识别可用于草果的药材鉴别和质量控制。

关键词: 草果; 指纹图谱; 多指标成分; 化学模式识别; 质量评价; 原儿茶酸; 原儿茶醛; 对羟基苯甲酸

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)11-3472-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.025

Quality evaluation of *Amomum tsao-ko* from different habitats by fingerprint combined with multi-component quantification and chemical pattern recognition

CHEN Xiao¹, GUAN Hong-mei¹, CHEN Meng-lin¹, WANG Bao-shan⁴, DAI Min², PU Zhong-hui^{1,2,3}

1. School of Laboratory Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

2. Sichuan Engineering Laboratory for Prevention and Control Technology of Veterinary Drug Residue in Animal-origin Food, Chengdu 610500, China

3. Sichuan Key Laboratory of Development and Regeneration, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

4. Beijing Centre Biology Co., Ltd., Beijing 102600, China

Abstract: Objective Based on the method of HPLC fingerprint, multi-component quantification and chemical pattern recognition, the quality of *Amomum Tsao-ko* from different habitats was evaluated to provide basis for further development and utilization.

Methods The methanol-0.2 mol/L phosphoric acid aqueous solution was used as mobile phase in HPLC analysis with gradient elution for the fingerprint establishment of *A. tsao-ko* from different habitats and the determination of six effective components. The detection wavelength was set at 270 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 10 μ L, and the column temperature was 30 ℃. The combination of hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were employed to distinguish the quality of 15 batches of *A. tsao-ko* from different producing

收稿日期: 2021-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31970137, 82102442); 四川省应用基础研究项目(2021YJ0158, 2020JDRC0071); 四川省省级大学生创新创业训练计划项目(S202113705988); 成都医学院发育与再生四川省重点实验室研究基金资助项目(SYS19-08)

作者简介: 陈肖(2001—), 男, 四川汉源人, 在读专科, 主要从事中药质量分析。E-mail: 1096362973@qq.com

*通信作者: 代敏(1974—), 女, 四川达州人, 博士, 教授, 主要从事中药抗耐药菌机制研究。E-mail: daimin1015@163.com

蒲忠慧(1982—), 女, 四川万源人, 博士, 副教授, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: zhonghui.pu@163.com

#共同第一作者: 管红梅(1996—), 女, 四川资阳人, 在读本科, 主要从事中药质量分析。E-mail: 2665330168@qq.com

areas. **Results** The fingerprint of 15 batches of *A. tsao-ko* were established and the similarity were 0.737—0.991, a total of 21 common peaks were calibrated and six of them were identified by comparing with reference substances; The content determination results showed that there were obvious differences in the content of chemical components of *A. tsao-ko* from different habitats; The results of HCA demonstrated that there were obvious three categories distinctions; PCA analysis indicated that the cumulative variance contribution rate of four principal components were 85.941%; OPLS-DA found protocatechuic acid, protocatechualdehyde and *p*-hydroxybenzoic acid may be the markers of quality difference between them. **Conclusion** The established fingerprint and the content determination method of the six components were highly specific, accurate and reliable. Furthermore, combined with chemical pattern recognition, it could be used for the identification and over all quality control of *A. tsao-ko*.

Key words: *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire; fingerprint; multiple index components; chemical pattern recognition; quality evaluation; protocatechuic acid; protocatechualdehyde; *p*-hydroxybenzoic acid

草果为姜科豆蔻属多年生草本植物草果 *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire 的干燥成熟果实, 主要分布于贵州、广西、云南等地。现代研究表明其含有挥发油、黄酮类、酚酸类、甾体类以及二苯庚烷类等化学成分^[1-6], 具有燥湿温中、截疟除痰之功效。草果的质量评价目前主要侧重于外观品质以及挥发油含量指标等项目^[7], 但不足以说明草果的内在品质, 更不能对草果质量从整体上进行分析和评价。指纹图谱作为整体、稳定的化学鉴别手段, 是当今国际公认的控制中药质量的质控模式^[8]。随着现代分析技术的发展以及中药质量控制要求的提高, 多指标成分含量测定已成为中药质量控制的关键^[9-10]。因此, 本研究采用指纹图谱与多指标含量测定相结合的方法, 同时结合聚类分析 (cluster analysis, HCA)、主成分分析主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 等化学模式识别综合分析各主产区草果药材的成分差异, 明确其产地差异及成分特征, 为草果药材的鉴别及质量标准的制定提供参考依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪 (G7114A 1260 VWD Detector, LC-1260 2.4.0.628 色谱工作站, 美国 Agilent 公司); ME204 型万分之一分析天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); SB25-12D 超声波清洗仪 (宁波新艺超声设备有限公司); MiLi-Q 纯水仪 (美国 milipore 公司)。

1.2 材料

原儿茶醛 (批号 PS020016)、对羟基苯甲酸 (批号 PS010279) 对照品均购自成都普思生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$ 。原儿茶酸 (批号

MUST-20110310)、龙胆酸 (批号 MUST-20082605)、香草酸 (批号 MUST-20072701)、对羟基苯丙酸 (批号 MUST-20091902) 对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$; 甲醇 (色谱级, Sigma 公司); 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

共收集草果药材 15 批, 分别来自主产区贵州 (5 批)、广西 (5 批) 和云南 (5 批) 等地。所有药材经成都医学院药学院李羿教授鉴定为姜科豆蔻属多年生草本植物草果 *A. tsao-ko* Crevost et Lemaire 的干燥成熟果实。具体信息详见表 1。

表 1 草果药材来源信息

Table 1 Sources of medicinal materials of *A. tsao-ko*

编号	产地	来源	收集时间
S1	贵州水城	北京时珍堂	2020-10
S2	贵州毕节	北京时珍堂	2020-10
S3	贵州纳雍	北京时珍堂	2020-10
S4	贵州镇宁	北京时珍堂	2020-10
S5	贵州三穗	北京时珍堂	2020-10
S6	广西那坡	自采	2019-10
S7	广西南宁	自采	2019-10
S8	广西横县	自采	2019-10
S9	广西灵山	自采	2019-10
S10	广西桂林	自采	2019-10
S11	云南红河	滇本草药业	2020-09
S12	云南怒江	滇本草药业	2020-09
S13	云南盈江	滇本草药业	2020-09
S14	云南文山	滇本草药业	2020-09
S15	云南腾冲	滇本草药业	2020-09

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse Plus C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3.5 μ m); 流动相为 0.2 mol/L 磷酸水溶液 (A)-甲醇 (B); 梯度洗脱: 0~5 min, 10%~15% B; 5~10 min, 15%~20% B; 10~30 min, 20%~40% B;

30~40 min, 40%~60% B; 40~50 min, 60%~70% B; 50~60 min, 70%~80% B。体积流量 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取草果粉末(过二号筛)约 5.0 g, 精密称定。置具塞三角瓶中, 精密加入 70%乙醇 50 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放至室温, 用 70%乙醇补足缺失的质量、摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得^[11]。

2.2.2 混合对照品溶液 分别精密称定原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、龙胆酸、香草酸、对羟基苯丙酸对照品适量, 加入甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 3.45、1.46、4.72、107.83、5.61、54.36 μ g/mL 的混合对照品储备液, 备用。

2.2.3 空白溶液 以样品的提取溶剂(70%乙醇)作为空白溶液。

2.4 指纹图谱的建立及分析

2.4.1 精密度试验 精密称取草果药材粉末(S2)约 5 g(过二号筛), 按“2.1.2”项下方法制备供试品, 按“2.1.1 项下”色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以 10 号峰(对羟基苯丙酸)为参照峰(S), 计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.39%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.18%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取同一草果药材粉末(S2)约 5 g(过二号筛), 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 以 10 号峰对羟基苯丙酸为参照峰(S), 计

算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.67%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.84%, 表明方法重复性好。

2.4.3 稳定性试验 取同一草果供试品溶液, 按“2.1.1 项下”色谱条件测定, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测定, 以 10 号峰对羟基苯丙酸为参照峰(S), 计算得到各共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 0.83%, 相对峰面积 RSD 均小于 1.48%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 指纹图谱建立及相似度评价 精密称取 15 批草果粉末各 5.0 g, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 然后分别按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。将 15 批草果样品的 HPLC 图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2008A 版)》中, 以 S11 号样品的色谱图作为参照图谱, 时间窗宽度为 0.5 min 中位数法生成对照图谱(R), 经多点校正后进行色谱峰匹配生成样品叠加指纹图谱(图 1); 然后以对照指纹图谱为参照, 进行各样品图谱的相似度评价。同时, 通过将对照指纹图谱与对照品色谱图进行比对, 进行色谱峰的指认。结果, 15 批草果样品中共标定了 21 个共有峰; 通过与对照品色谱图比对, 指认了其中 6 个成分, 分别为原儿茶酸(3 号峰)、原儿茶醛(4 号峰)、对羟基苯甲酸(5 号峰)、龙胆酸(6 号峰)、香草酸(8 号峰)、对羟基苯丙酸(10 号峰)。各样品图谱与对照指纹图谱的相似度为 0.737~0.991, 说明 15 批草果样品具有很高的相似性, 相似度评价结果见表 2。

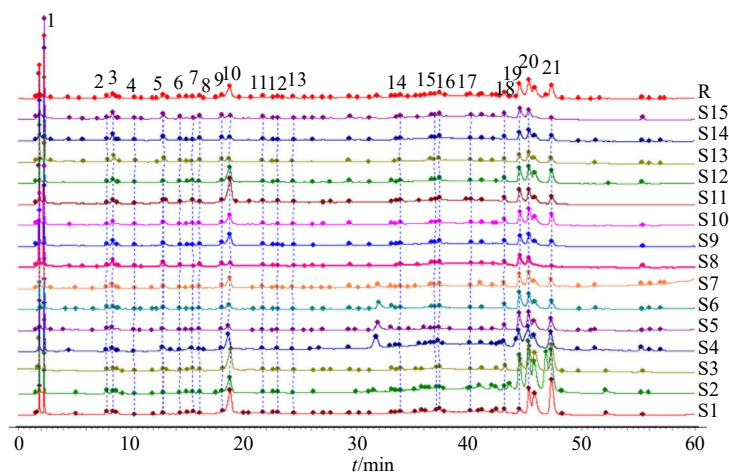


图 1 15 批草果样品的 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R)

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprint and control fingerprint (R) of 15 batches of *A. tsao-ko*

表 2 15 批草果样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Table 2 HPLC fingerprint similarity evaluation results of 15 batches of *A. tsao-ko*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	R
S1	1.000															
S2	0.977	1.000														
S3	0.912	0.862	1.000													
S4	0.824	0.814	0.822	1.000												
S5	0.986	0.988	0.889	0.834	1.000											
S6	0.932	0.961	0.824	0.823	0.968	1.000										
S7	0.824	0.859	0.771	0.820	0.863	0.924	1.000									
S8	0.752	0.794	0.739	0.796	0.820	0.892	0.937	1.000								
S9	0.803	0.760	0.777	0.763	0.783	0.872	0.927	0.991	1.000							
S10	0.773	0.844	0.772	0.765	0.851	0.929	0.915	0.940	0.949	1.000						
S11	0.737	0.825	0.883	0.858	0.824	0.878	0.804	0.833	0.848	0.949	1.000					
S12	0.841	0.895	0.764	0.802	0.909	0.943	0.892	0.923	0.923	0.968	0.944	1.000				
S13	0.753	0.851	0.833	0.899	0.824	0.864	0.750	0.809	0.823	0.871	0.934	0.857	1.000			
S14	0.893	0.940	0.781	0.821	0.949	0.971	0.901	0.897	0.889	0.955	0.924	0.977	0.892	1.000		
S15	0.819	0.899	0.873	0.886	0.801	0.756	0.809	0.815	0.814	0.852	0.877	0.880	0.828	0.790	1.000	
R	0.935	0.960	0.870	0.884	0.971	0.981	0.934	0.981	0.894	0.933	0.878	0.965	0.831	0.976	0.790	1.000

2.5 化学模式识别

2.5.1 HCA 采用多元统计分析软件 SIMCA-P 14.0 对 15 批样品中 21 个共有峰的标准化峰面积聚类分析, 样品被分为 3 类: 第一类为 S8、S13~S15; 第 2 类为 S2; 第 3 类为 S1、S3~S7、S9~S12。HCA 结果表明不同产区草果药材的质量存在一定地域差异性, 广西和贵州的大部分草果具有一定的相似性。

2.5.2 PCA 进一步探讨 3 个主产区草果化学成分之间的差异, 将 15 批样品 21 个共有峰的峰面积导入 SPSS.26 软件进行 PCA 分析, 计算相关矩阵的特征值及其方差贡献率^[12]。以特征值>1 为提取标准, 得到草果药材指纹图谱共有峰特征值 (表 3), 4 个主成分的累积方差贡献率达到 85.941%, 说明 4 个主成分在反映 3 个主产地草果样品共有成分关系中起到主导作用。其中第 1~4 个主成分贡献率分别为 45.632%、18.466%、12.320%和 9.523%。由主成分矩阵 (表 4) 可知各个共有峰对 4 个主成分不同的独立方差贡献率, 第 1 主成分主要代表了峰 1、2、4、5、9、10、12; 第 2 主成分主要代表了峰 3、15、20、21; 第 3 主成分代表了峰 8、11; 第 4 主成分代表了峰 17、19。

2.5.3 OPLS-DA 在 PCA 的基础上进一步选择有监督模式的 OPLS-DA 对不同产区 15 份草果样品进

表 3 15 批草果样品主成分特征值及贡献率

Table 3 Characteristic value and contribution rate of 15 batches of *A. tsao-ko*

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	9.583	45.632	45.632
2	3.878	18.466	64.098
3	2.587	12.320	76.418
4	2.000	9.523	85.941

行分析, 筛选出对引起组间差异贡献率较大的成分。在建立的 OPLS-DA 模型中, 累计解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.712、0.744, 预测能力参数 (Q^2) 为 0.916, 提示本实验所建立 OPLS-DA 模型的稳定性及预测能力较好^[13]。由 OPLS-DA 得分图 2 可知, 不同批次样品可分为 3 类, 贵州和广西大部分样品可以聚为一类, 与 HCA 结果一致。贵州和广西位置毗邻, 环境气候条件具有更多的相似性, 均属于亚热带气候区。对 3 组数据的差异性进行整体分析变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP)。VIP 是筛选差异性化合物的重要指标, 值越大, 表明该色谱峰的贡献越大^[14]。在 0.95 的置信区间内, 提取模型中 21 个变量的 VIP, 见图 3。选取 VIP>1 的 14 个化合物作为差异性标志物, 按 VIP 大小排序依次为 20 号峰>15 号峰>3 号峰 (原儿茶酸)>4 号峰 (原儿茶醛)>2 号峰>9 号

表 4 15 批草果样品共有峰成分矩阵
Table 4 Component matrix of common peaks of 15 batches of *A. tsao-ko*

峰号	共有峰	主成分			
		1	2	3	4
1	未指认	0.901	0.256	-0.048	-0.152
2	未指认	0.965	0.090	-0.116	0.011
3	原儿茶酸	-0.272	0.860	-0.253	-0.272
4	原儿茶醛	0.936	0.279	-0.065	0.017
5	对羟基苯甲酸	0.964	0.057	-0.183	0.132
6	龙胆酸	0.802	-0.119	0.224	0.456
7	未指认	0.804	0.458	-0.017	-0.102
8	香草酸	-0.313	0.146	0.838	-0.075
9	未指认	0.927	0.277	-0.050	0.089
10	对羟基苯丙酸	0.930	0.192	-0.111	-0.036
11	未指认	-0.557	0.233	0.605	-0.425
12	未指认	0.887	0.066	0.405	0.038
13	未指认	0.049	-0.781	0.249	0.461
14	未指认	0.601	0.000	0.544	-0.437
15	未指认	-0.103	0.808	-0.101	0.258
16	未指认	0.077	0.564	0.512	0.190
17	未指认	0.114	0.402	0.500	0.610
18	未指认	-0.019	-0.285	0.487	0.097
19	未指认	-0.579	0.203	-0.232	0.643
20	未指认	-0.685	0.593	0.009	0.387
21	未指认	-0.743	0.592	0.026	-0.140

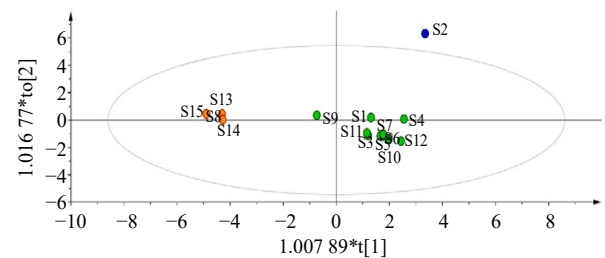


图 2 15 批草果药材正交偏最小二乘判别分析得分图
Fig. 2 Score plot of orthogonal partial least squares discriminant analysis for 15 batches of *A. tsao-ko*

峰>5 号峰（对羟基苯甲酸）>10 号峰（对羟基苯丙酸）>21 号峰>1 号峰>7 号峰>19 号峰>12 号峰>13 号峰，这些成分是区分不同产地草果差异的主要标志性物质，在将来的研究中建议多关注。

2.6 含量测定

2.6.1 专属性试验 取“2.2”项下制备供试品溶液、混合对照品溶液以及空白溶液，0.45 μm 滤膜滤过，

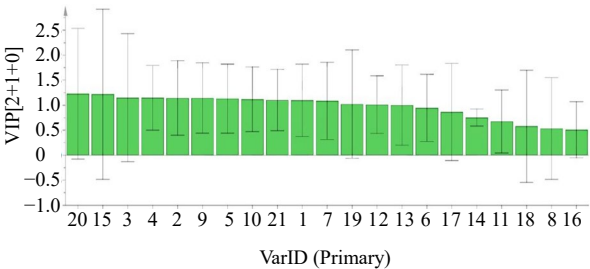


图 3 15 批次草果 21 个共有峰 VIP 值
Fig. 3 VIP value of 21 common peaks of 15 batches of *A. tsao-ko*

分别按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录色谱图。结果表明，各待测成分的色谱峰与相邻色谱峰间的分离度均大于 1.5，以各成分计的理论板数均在 6000 以上，且空白溶液对测定无干扰，说明此方法专属性良好。专属性试验的 HPLC 色谱图见图 4。

2.6.2 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下的混合对照品溶液适量，用甲醇稀释制成系列浓度的混合对照品溶液溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后，取

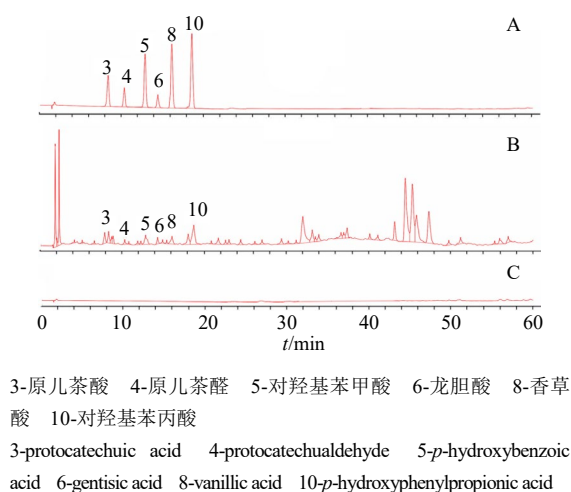


图 4 混合对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 及阴性对照 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatograms of mixed substance solution (A), test solution (B) and negative control (C)

续滤液 10 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 结果, 各待测成分均在其相应质量范围内与其峰面积的线性关系良好 (r 均不低于 0.999 1), 见表 5。

表 5 草果药材中 6 个成分线性关系考察
Table 5 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges of six components of *A. tsoko*

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
原儿茶酸	$Y=2\,795.2X-92.984$	0.999 2	0.004~4.000
原儿茶醛	$Y=6\,255.5X-169.84$	0.999 1	0.003~3.000
对羟基苯甲酸	$Y=5\,863.9X-63.062$	0.999 3	0.004~4.000
龙胆酸	$Y=44.433X+4.4212$	0.999 4	0.400~4.000
香草酸	$Y=6\,407.7X-151.94$	0.999 7	0.004~4.000
对羟基苯丙酸	$Y=503.17X+80.803$	0.999 3	0.200~4.000

2.6.3 精密度试验 取混合对照品储备液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。计算得到原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、龙胆酸、香草酸、对羟基苯丙酸峰面积的 RSD 分别为 0.94%、1.18%、0.83%、0.68%、1.04%、1.05%, 表明仪器精密度良好。

2.6.4 重复性试验 精密称取同一产地 (S8) 的草果粉末 1.0 g, 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件连续测定 6 次, 记录峰面积并按标准曲线法计算样品中 6 种成分含

量。结果, 原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、龙胆酸、香草酸、对羟基苯丙酸含量的 RSD 分别为 1.13%、0.81%、1.14%、0.90%、0.61%、1.84%, 表明方法重复性良好。

2.6.5 稳定性试验 取草果供试品溶液 (S8) 适量, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录峰面积。结果, 原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、龙胆酸、香草酸、对羟基苯丙酸峰面积的 RSD 分别为 RSD 分别为 1.13%、0.79%、1.19%、1.09%、0.98%、1.48%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的草果样品 (S8) 9 份, 分别按已知含量的 50%、100%、150% 加入各对照品 (按“2.3”项下方法制备), 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得到原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、龙胆酸、香草酸、对羟基苯丙酸的平均加样回收率分别为 95.43%、97.57%、95.05%、97.28%、97.13%、95.76%, RSD 分别为 1.97%、1.75%、2.35%、2.69%、1.84%、2.36%, 表明该方法准确度良好。

2.6.7 样品含量测定 精密称取 15 批不同产地草果药材粉末 (过二号筛) 1.0 g, 分别按“2.2”项下方法制备样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算 6 种有效成分含量, 结果见表 6, 可见不同产地草果化学成分含量存在明显差异。通过含量测定结果箱线图分析 (图 5), 可明确各产地草果中代表性化学成分。原儿茶酸在云南怒江 (S12) 采收的草果中含量最高, 达到 0.132 8 mg/g, 云南腾冲 (S15) 则为最低; 云南草果原儿茶醛和对羟基苯甲酸含量均在 0.031 8 和 0.032 2 mg/g 以上, 整体高于其他产地, 可作为区分云南草果与其他产地草果的 2 个指标成分; 云南草果龙胆酸量在 1.589 6~3.421 3 mg/g, 整体高于其它产区, 也可作为区分云南草果与其他产地草果的差异性成分; 云南产区的香草酸含量相对较高, 云南怒江含量最高, 达 0.048 1 mg/g; 贵州产区对羟基苯丙酸的含量明显高于其它产区, 可作为区分贵州草果与其他产地草果的差异性成分。广西草果龙胆酸和对羟基苯丙酸含量整体偏低。

3 讨论

本研究选择贵州、广西、云南 3 个草果主产区 15 批样品, 以指纹图谱质量控制模式定性, 多指标质量控制模式定量, 结合结合化学模式识别全面评价不同产地草果的质量。结果表明 15 批草果药材指

表 6 草果中 6 个成分的含量测定

Table 6 Contents determination of six components of *A. tsao-ko*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	原儿茶酸	原儿茶醛	对羟基苯甲酸	龙胆酸	香草酸	对羟基苯丙酸
S1	0.066 9	0.029 4	0.022 6	1.627 4	0.035 7	2.404 7
S2	0.074 1	0.030 4	0.023 5	1.861 7	0.037 3	1.603 3
S3	0.076 8	0.029 9	0.023 4	2.047 3	0.038 6	2.077 1
S4	0.078 8	0.029 7	0.028 1	2.343 7	0.040 7	2.260 0
S5	0.071 4	0.029 7	0.024 3	1.556 7	0.035 2	1.057 8
S6	0.081 6	0.032 1	0.030 6	0.806 4	0.035 9	0.950 9
S7	0.074 9	0.030 7	0.048 9	1.212 1	0.040 2	1.460 0
S8	0.062 9	0.031 3	0.031 1	0.820 3	0.036 8	0.409 1
S9	0.055 3	0.031 3	0.027 4	1.069 9	0.037 5	0.400 7
S10	0.069 7	0.029 7	0.024 2	0.535 4	0.032 6	1.412 9
S11	0.080 5	0.031 8	0.036 7	1.990 2	0.038 2	2.124 7
S12	0.132 8	0.037 5	0.046 1	3.421 3	0.048 1	0.357 3
S13	0.107 7	0.034 6	0.036 1	2.386 5	0.041 0	1.245 5
S14	0.071 8	0.031 9	0.032 2	1.589 6	0.035 4	1.502 3
S15	0.0438	0.031 8	0.033 4	1.710 0	0.036 3	0.903 9

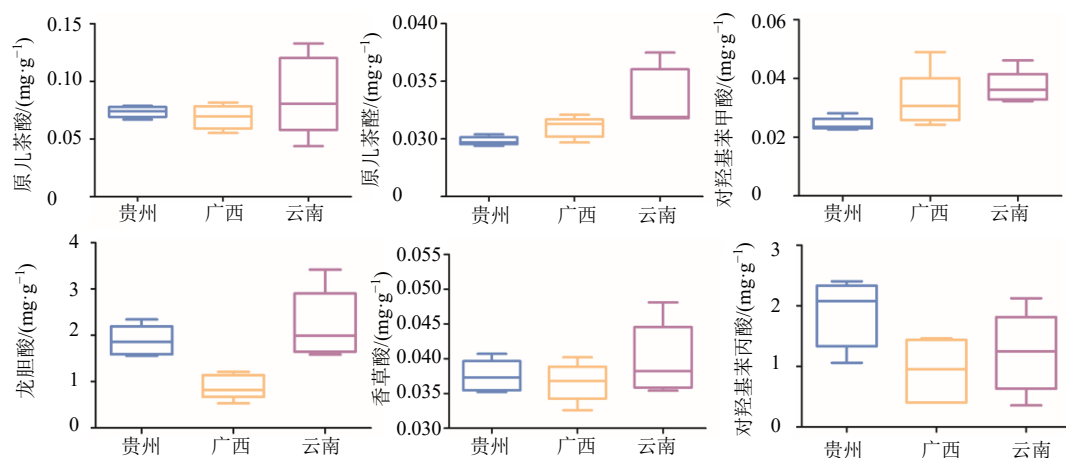


图 5 HPLC 指纹图谱各指标成分含量测定箱线图

Fig. 5 Determination results of marker components of HPLC fingerprint from *A. tsao-ko*

纹图谱的相似度在 0.737~0.991, 确定 21 个共有峰, 指认了 6 个成分。通过 HCA、PCA 和 OPLS-DA 等化学计量法分析表明 15 批草果样品明显分为 3 类, 4 个主成分累计方差贡献率为 85.941%; 通过变量权重重要性排序发现共有峰 20、15、2、9、10 (对羟基苯丙酸)、5 (对羟基苯甲酸)、1、21、3 (原儿茶酸)、7、19、12, 这些成分可作为区分和鉴别不同产区草果药材质量的主要标志性成分, 未知差异成分本课题组后续将会继续深入研究, 以期评价草果药材质量提供更为全面地参考。

酚酸类化合物是草果一类重要化学成分, 根据前期实验研究结果^[16]和文献数据^[11]表明草果中主要为苯甲酸为母核的 C₆-C₁ 型酚酸类成分。其中原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、龙胆酸、香草酸等酚酸类成分是草果发挥抗菌抗炎、抗氧化等作用的主要物质基础^[17-18], 因此本研究主要对草果中酚酸类成分进行了含量测定。在流动相选择上发现 0.2 mol/L 的磷酸溶液比 0.02 mol/L 的稀磷酸溶液^[11]色谱峰信息量多, 响应值更高。含量测定结果表明草果酚酸类成分具有明显的产地差异。通过产地差

异成分分析,明确了不同产地草果特征成分。云南草果原儿茶醛、对羟基苯甲酸和龙胆酸含量均整体高于广西和贵州产区,可作为区分云南草果与其他产地草果的 3 个差异性成分,贵州产区对羟基苯丙酸的含量明显高于其它产区,可作为贵州草果的差异性成分,广西草果龙胆酸和对羟基苯丙酸含量整体较低。

本研究所建立的不同产地草果 HPLC 指纹图谱及多指标成分含量测定方法的专属性较强,且准确、可靠。结合指纹图谱和酚酸类成分的定量研究,可以为区分草果的产地以及全面、准确地控制草果的质量提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨志清,徐绍忠,张薇,等. 云南草果茎叶挥发油含量及主要化学成分分析 [J]. 中药材, 2019, 42(2): 339-343.
- [2] Hong S S, Lee J H, Choi Y H, et al. Amotsaokonal A-C, benzaldehyde and cycloterpenal from *Amomum tsao-ko* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2015, 56(48): 6681-6684.
- [3] Kim J G, Jang H, Le T P L, et al. Pyranoflavanones and pyranochalcones from the fruits of *Amomum tsao-ko* [J]. *J Nat Prod*, 2019, 82(7): 1886-1892.
- [4] 柳航,王敏,许耶,等. 草果化学成分的研究 [J]. 中成药, 2020, 42(10): 2648-2651.
- [5] 赵雨鸿,沈华,代双亿,等. 草果总黄酮的大孔吸附树脂纯化工艺优化研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(7): 831-836.
- [6] 李志君,万红焱,顾丽莉,等. 草果多酚物质提取及 LC-MS/MS 分析 [J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 294-299.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 249-250.
- [8] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [9] 余一鸣,胡永慧,韩立云,等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [10] 陈丽华,肖发林,黄诗雨,等. 中药质量评价研究思路及创新发展趋势 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2541-2547.
- [11] 任洪涛,谭年文,周恒苍,等. 高效液相色谱法测定草果中 4 种酚酸含量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3694-3699.
- [12] 陈欢,高萌,罗小泉,等. 不同产地枳壳药材中 12 种有效成分的主成分分析和判别分析 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3433-3437.
- [13] 黄建猷,胡筱希,麦琬婷,等. 指纹图谱及多成分定量结合化学模式识别法评价不同产地消瘤藤质量 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4334-4340.
- [14] Gao S, Chen H G, Zhou X. Study on the spectrum-effect relationship of the xanthine oxidase inhibitory activity of *Ligustrum lucidum* [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(21): 3281-3292.
- [15] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [16] 沈华,管红梅,钟燕,等. 草果酚酸的提取工艺优化 [J]. 中国药房, 2021, 32(14): 1698-1702.
- [17] 雷智冬,黄锁义. 草果提取方法、生物活性与临床应用研究新进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1): 245-249.
- [18] Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications [J]. *Biotechnol Rep (Amst)*, 2019, 24: e00370.

[责任编辑 时圣明]