

标准研讨

基于一测多评法的高良姜质量评价方法研究*

王慧^{1,2}, 朱小玲^{2,3}, 孙国园^{2,3}, 胡锦涛^{1,2}, 向广军^{1,2}, 董玉^{1,2**}

(1. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古自治区蒙药药效物质与质量控制工程技术研究中心, 呼和浩特 010110; 3. 内蒙古自治区国际蒙医医院药学部, 呼和浩特 010065)

摘要 目的: 建立一测多评法同时测定高良姜水提物中山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素和高良姜素-3-O-甲醚的含量。**方法:** 采用高效液相色谱法(HPLC)测定, 色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.3% 乙酸水溶液(A) - 乙腈(B) 为流动相, 梯度洗脱(0 ~ 2 min, 10%B → 15%B; 2 ~ 5 min, 15%B → 20%B; 5 ~ 20 min, 20%B → 35%B; 20 ~ 30 min, 35%B → 40%B; 30 ~ 55 min, 40%B; 55 ~ 60 min, 40%B → 100%B), 柱温 30 °C, 体积流量 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm。以高良姜素为内参物, 计算各化学成分相对校正因子, 并进行含量测定, 与外标法测定结果进行比较, 并结合化学模式识别评价不同产地高良姜的质量。**结果:** 山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素和高良姜素-3-O-甲醚进样量分别在 0.005 5 ~ 0.110 0、0.140 0 ~ 2.800 0、0.149 6 ~ 2.992 0、0.021 5 ~ 0.430 0 和 0.022 2 ~ 0.444 0 μg 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 100.7%、101.4%、99.9%、100.9% 和 101.7%, RSD 分别为 1.3%、2.8%、0.83%、1.4% 和 1.8%。一测多评法与外标法所测结果无明显差异。**结论:** 该方法快速准确且专属性强, 可为高良姜的质量控制提供参考依据。

关键词: 一测多评; 高良姜; 含量测定; 聚类分析; 质量评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)12 - 2154 - 10

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024 - 0218

Research on the quality evaluation method of *Alpiniae Officinarum Rhizoma* based on quantitative analysis of multi - components by single marker method*

WANG Hui^{1,2}, ZHU Xiao - ling^{2,3}, SUN Guo - yuan^{2,3},
HU Jin - yang^{1,2}, XIANG Guang - jun^{1,2}, DONG Yu^{1,2**}

(1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2 Engineering Technology Research Center for Medicinal Substances and Quality Control of Mongolian Medicines, Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010110, China; 3 Department of Pharmacology, Inner Mongolia International Mongolian Medicine Hospital, Hohhot 010065, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative analysis of multi - components by single marker (QAMS) method to simultaneously determine the contents of kalangin, diphenylheptane A, galangin, kaempferin and galangin - 3 - O - methyl ether. **Methods:** Hypersil ODS2 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used by high performance

* 国家自然科学基金项目(No. 82060773); 内蒙古自治区科技成果转化项目(No. 2020GG0117); 内蒙古自治区高等学校青年科技人才发展计划项目(No. NMGIRT2226); 内蒙古自治区自然科学基金重点项目(No. 2019ZD16)

** 通信作者 Tel: (0471)6653081; E - mail: dongyu010@126.com

第一作者 Tel: (0471)6653081; E - mail: 1806797493@qq.com

liquid chromatography (HPLC) and was eluted with 0.3% acetic acid in water (A) and acetonitrile (B) (0–2 min, 10%B→15%B; 2–5 min, 15%B→20%B; 5–20 min, 20%B→35%B; 20–30 min, 35%B→40%B; 30–55 min, 40%B; 55–60 min, 40%B→100%B), the column temperature was 30 °C, the volume flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 254 nm. The relative correction factors of each chemical component were calculated with gingerin as the internal reference, and the content was determined, which was compared with the results of the external standard method, and the quality of galangal from different origins was evaluated by chemical pattern recognition. **Results:** Kaempferol, diphenylheptane A, galangin, kaempferin and galangin-3-O-methyl ether had a good linear relationship in the ranges of 0.005 5–0.110 0, 0.140 0–2.800 0, 0.149 6–2.992 0, 0.021 5–0.430 0 and 0.022 2–0.444 0 μg, respectively, and the average sample recoveries were 100.7%, 101.4%, 99.9%, 100.9% and 101.7%, respectively. The RSDs were 1.3%, 2.8%, 0.83%, 1.4% and 1.8%, respectively. Quantitative analysis of multicomponents by single marker method and external standard method was no significant difference in the results. **Conclusion:** This method is rapid, accurate and specific, which can provide a reference for the quality control of galangal.

Keywords: QAMS; galangal; content determination; cluster analysis; quality evaluation

高良姜是姜科山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎,呈圆柱形,外表皮棕红色至暗棕色,气香,味辛辣^[1]。高良姜中含有的主要化学成分为挥发油类、黄酮类、二苯基庚烷类、苯丙素类、糖苷类等^[2-3],具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、抗溃疡和胃黏膜保护等药理作用^[4-8]。高良姜的化学成分较多,有些对照品很难获取,有些化学性质不稳定容易变质,有些价格昂贵。一测多评(QAMS)是从量上阐述主要化学成分或药效成分间的相互关系^[9],解决对照品短缺的问题,为中药多指标成分的含量测定以及质量控制提供参考。

因此,本课题组尝试将 QAMS 法应用于高良姜中山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素、高良姜素-3-O-甲醚 5 个化学成分的含量测定,为高良姜质量评价提供研究思路。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(安捷伦公司)和 Shimadzu LC-16 型二元高效液相色谱仪(岛津仪器有限公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),KQ-250DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品山柰酚(批号 20221227001,纯度 ≥ 98%)、二苯基庚烷 A(批号 20210326001,纯度 ≥ 98%)、山柰素(批号 20221120001,纯度 ≥ 98%)和高良姜

素-3-O-甲醚(批号 20210511001,纯度 ≥ 98%)购于上海鼓臣生物技术有限公司,高良姜素(批号 111699-202204,纯度 ≥ 98%)购于中国食品药品检定研究院;HPLC 级乙腈和甲醇购于 Fisher 公司,水为纯净水,其余试剂为分析纯。13 个批次高良姜购买于内蒙古天力药业有限公司,经内蒙古医科大学药学院李骁副教授鉴定为姜科山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎,样品信息见表 1。

表 1 高良姜药材来源

Tab. 1 Sources of *Alpiniae Officinarum* Rhizoma medicinal materials

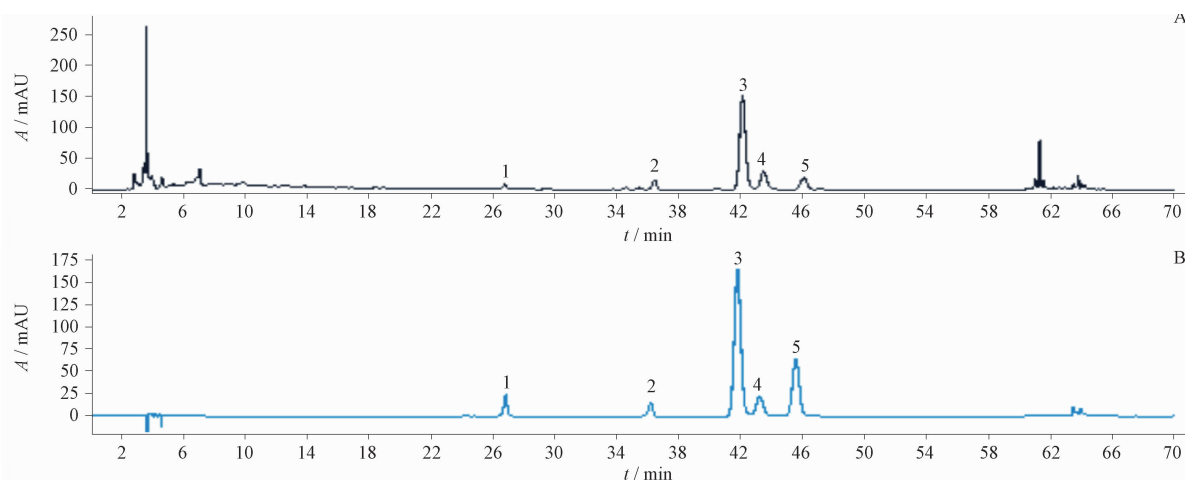
批号 (batch No.)	编号 (sample No.)	产地 (habitat)
202001	S1	广东徐闻曲界(Xuwen Qu'jie, Guangdong)
202002	S2	广东徐闻海安(Xuwen Hai'an, Guangdong)
202003	S3	广东徐闻龙塘(Xuwen Longtang, Guangdong)
202004	S4	广东海康(Haikang, Guangdong)
202005	S5	广东徐闻城北(North of Xuwen City, Guangdong)
202006	S6	广东惠阳(Huiyang, Guangdong)
202007	S7	广东徐闻仙桥(Xuwen xian Bridge, Guangdong)
202008	S8	广东徐闻前山(Xuwen qian Mountain, Guangdong)
202009	S9	广东徐闻(Xuwen, Guangdong)
202010	S10	广东徐闻南山(Xuwen Nanshan, Guangdong)
21120603	S11	广西(Guangxi)
202011	S12	广西百色(Baise, Guangxi)
202012	S13	广西陆川(Luchuan, Guangxi)

2 方法和结果

2.1 色谱条件

采用 Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), 以 0.3% 乙酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0 ~ 2 min, 10% B → 15% B; 2 ~ 5

min, 15% B → 20% B; 5 ~ 20 min, 20% B → 35% B; 20 ~ 30 min, 35% B → 40% B; 30 ~ 55 min, 40% B; 55 ~ 60 min, 40% B → 100% B), 体积流量 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μ L。色谱图如图 1 所示。



1. 山柰酚 (kaempferol) 2. 二苯基庚烷 A (diphenylheptane A) 3. 高良姜素 (galangin) 4. 山柰素 (kaempferin) 5. 高良姜素-3-O-甲醚 (galangin-3-O-methyl ether)

图 1 高良姜样品 (A) 及混合对照品 (B) 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Alpiniae Officinarum Rhizoma* test sample (A) and mixed reference substances (B)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取山柰酚对照品 2.31 mg、高良姜素-3-O-甲醚对照品 5.54 mg、山柰素对照品 2.15 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.231 mg · mL⁻¹ 的山柰酚储备液、0.554 mg · mL⁻¹ 的高良姜素-3-O-甲醚储备液和 0.215 mg · mL⁻¹ 的山柰素储备液。精密称取高良姜素对照品 3.74 mg, 二苯基庚烷 A 对照品 3.50 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 并加入上述山柰酚储备液 0.6 mL, 高良姜素-3-O-甲醚储备液 1 mL 及山柰素 2.5 mL, 加甲醇定容, 摇匀, 制成山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素、高良姜素-3-O-甲醚质量浓度分别为 0.005 5、0.140 0、0.149 6、0.021 5、0.022 2 mg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品母液的制备

取过 5 目筛的高良姜药材粉末适量, 置于圆底烧瓶中, 加 10 倍量蒸馏水, 采用水蒸气蒸馏法回流提取 2 次, 第 1 次提取 5 h, 第 2 次提取 1 h, 趁热过滤合并滤液, 真空浓缩即得。

2.4 线性关系考察

取“2.2”项混合对照品溶液, 分别按“2.1”项下

色谱条件进样 1、2、5、10、15、20 μ L, 记录峰面积。以化学成分的进样量 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。结果见表 2。

2.5 精密度试验

取“2.2”项混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 测得山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素和高良姜素-3-O-甲醚峰面积的 RSD ($n = 6$) 分别为 0.95%、0.10%、0.12%、0.18% 和 0.17%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取高良姜供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 时进样测定, 计算得到山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素、高良姜素-3-O-甲醚峰面积的 RSD 分别为 2.4%、0.75%、0.45%、1.1% 和 0.63%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取高良姜药材 (S11) 6 份, 每份约 50.0 g, 精密称定, 按“2.3”项方法制备供试品母液, 分别用水定容于 250 mL 量瓶中, 精密吸取 2 mL, 用甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 超声 (40 kHz, 250 W) 溶解 15 min,

表 2 回归方程、相关系数和线性范围

Tab. 2 Regression equations, correlation coefficients, and linear ranges

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/ μg
山柰酚(kaempferol)	$Y = 4\ 193X - 0.265\ 3$	0.999 9	0.005 5 ~ 0.110 0
二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)	$Y = 238.2X + 1.372$	0.999 9	0.140 0 ~ 2.800 0
高良姜素(galangin)	$Y = 4\ 865X + 17.93$	0.999 9	0.149 6 ~ 2.992 0
山柰素(kaempferin)	$Y = 4\ 585X - 0.919\ 0$	0.999 9	0.021 5 ~ 0.430 0
高良姜素-3-O-甲醚(galangal-3-O-methyl ether)	$Y = 5\ 396X + 2.134$	0.999 9	0.022 2 ~ 0.444 0

定量滤纸过滤,取续滤液,过 0.45 μm 的有机微孔滤膜,取续滤液作为供试溶液。按“2.1”项下色谱条件分别进样分析,测得山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素、高良姜素-3-O-甲醚的平均含量分别为 0.015 8、1.149 3、0.527 3、0.128 2、0.077 0 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.9%、1.5%、0.75%、1.9% 和 1.8%,符合方法学验证要求,表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的高良姜药材(S11)6份,每份约 25.0 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品母液,用水分别定容于 250 mL 量瓶中,精密吸取 2 mL,

且分别精密加入 0.002 24 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的山柰酚对照品溶液 1.4 mL、0.231 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的二苯基庚烷 A 对照品溶液 1 mL、0.106 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的高良姜素对照品溶液 1 mL、0.026 0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的山柰素对照品溶液 1 mL、0.015 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的高良姜素-3-O-甲醚对照品溶液 1 mL,用甲醇定容于 10 mL 量瓶中,超声(40 kHz, 250 W)溶解 15 min,定量滤纸过滤,取续滤液,过 0.45 μm 的有机微孔滤膜,取续滤液作为供试溶液。按“2.1”项下色谱条件分别进样分析,计算山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素、山柰素、高良姜素-3-O-甲醚的平均加样回收率和 RSD,结果见表 3,表明方法的准确度良好。

表 3 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 3 Results of sample recovery test

成分 (component)	样品含量 (content in sample)/ μg	加入量 (added content)/ μg	测得量 (measured content)/ μg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
山柰酚(kaempferol)	3.177 4	3.136 0	6.333 8	100.7	100.7	1.3
	3.177 7	3.136 0	6.381 7	102.2		
	3.177 8	3.136 0	6.290 4	99.3		
	3.178 3	3.136 0	6.371 4	101.8		
	3.178 4	3.136 0	6.360 7	101.5		
	3.177 7	3.136 0	6.284 0	99.1		
二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)	230.595 5	231.000 0	458.523 7	98.7	101.4	2.8
	230.617 6	231.000 0	461.384 8	99.9		
	230.629 5	231.000 0	472.602 8	104.8		
	230.660 8	231.000 0	469.909 5	103.6		
	230.670 9	231.000 0	470.067 0	103.6		
	230.621 2	231.000 0	457.285 2	98.1		
高良姜素(galangin)	105.791 9	106.000 0	211.964 4	100.2	99.9	0.83
	105.802 0	106.000 0	212.437 2	100.6		
	105.807 5	106.000 0	210.433 0	98.7		
	105.821 8	106.000 0	212.399 5	100.5		
	105.826 5	106.000 0	212.119 5	100.3		

表 3(续)

成分 (component)	样品含量 (content in sample) / μg	加入量 (added content) / μg	测得量 (measured content) / μg	回收率 (recovery) / %	平均回收率 (average recovery) / %	RSD/ %
山奈素(kaempferin)	105.803 7	106.000 0	210.679 0	98.9	100.9	1.4
	25.729 9	26.000 0	52.187 0	101.8		
	25.732 3	26.000 0	52.266 2	102.1		
	25.733 7	26.000 0	51.466 5	99.0		
	25.737 2	26.000 0	52.169 0	101.7		
	25.738 3	26.000 0	52.168 6	101.7		
高良姜-3-O-甲醚 (galangal-3-O-methyl ether)	25.732 8	26.000 0	51.515 1	99.2	101.7	1.8
	15.450 7	15.500 0	30.982 5	100.2		
	15.452 2	15.500 0	30.972 5	100.1		
	15.453 0	15.500 0	31.393 0	102.8		
	15.455 1	15.500 0	30.975 0	100.1		
	15.455 8	15.500 0	31.628 2	104.3		
	15.452 5	15.500 0	31.337 6	102.5		

2.9 QAMS 法的研究

2.9.1 相对校正因子的计算 取“2.2”项混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样 1、2、5、10、15、20 μL ,记录峰面积,以高良姜素为内参

物,计算相对校正因子($f_{s/i}$) = $C_i A_s / C_s A_i$,式中 C_i 为组分 i 的浓度,式中 A_s 为内标物 s 的峰面积, C_s 为内标物 s 的浓度, A_i 为组分 i 的峰面积。结果见表 4。

表 4 4 个化学成分的 $f_{s/i}$
Tab. 4 $f_{s/i}$ for the four components

进样量 (injection volume) / μL	$f_{s/i}$			
	山奈酚 (kaempferol)	二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)	山奈素 (kaempferin)	高良姜素-3-O-甲醚 (galangal-3-O-methyl ether)
1	1.189 3	21.308 3	1.139 5	0.893 1
2	1.191 7	19.722 7	1.048 5	0.902 3
5	1.167 6	20.177 7	1.062 5	0.902 6
10	1.164 3	20.496 2	1.067 6	0.904 2
15	1.164 0	20.422 0	1.071 1	0.904 9
20	1.1623	20.387 3	1.058 8	0.900 1
平均值(mean)	1.173 2	20.419 0	1.074 7	0.901 2
RSD/%	1.2	2.5	3.0	0.48

2.9.2 不同仪器及色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响 取“2.2”项混合对照品溶液,考察了 2 种 HPLC 系统及 3 种不同品牌的色谱柱对 $f_{s/i}$ 的影响,结果表明均无显著性差异。见表 5。

2.9.3 不同体积流量对 $f_{s/i}$ 的影响 取“2.2”项混合对照品溶液,采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪系统, Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱,考察不同体积流量(0.7、0.8、0.9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)对各个化学成分 $f_{s/i}$ 的影响,各成

分之间 $f_{s/i}$ 重复性良好,其 RSD 均 $< 3.0\%$,表明不同体积流量对各成分 $f_{s/i}$ 无显著性影响。见表 6。

2.9.4 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响 取上述同一混合对照品溶液,采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪系统, Hypersil ODS2 C_{18} 色谱柱,考察不同柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)条件下的各个化学成分 $f_{s/i}$,结果显示各成分之间 $f_{s/i}$ 的 RSD 均 $< 3.0\%$,表明柱温对各成分的 $f_{s/i}$ 无显著性影响。见表 7。

表 5 不同仪器及色谱柱测得的 $f_{s/i}$

Tab. 5 $f_{s/i}$ measured by different instruments and columns

仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	$f_{s/i}$			
		山柰酚 (kaempferol)	二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)	山柰素 (kaempferin)	高良姜素-3-O-甲醚 (galangal-3-O-methyl ether)
Agilent 1260	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	1.169 4	20.942 8	1.082 5	0.941 2
	Hypersil ODS2	1.162 3	20.387 3	1.058 8	0.900 1
	Shimadzu Shim-pack GIST	1.187 1	20.943 7	1.089 2	0.907 6
Shimadzu	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	1.101 1	20.345 8	1.044 5	0.903 3
	Hypersil ODS2	1.124 7	20.060 6	1.030 0	0.877 2
	Shimadzu Shim-pack GIST	1.126 7	20.360 9	1.060 4	0.908 4
平均值(mean)		1.145 2	20.506 8	1.060 9	0.906 3
RSD/%		2.9	1.7	2.1	2.3

表 6 不同流速对 $f_{s/i}$ 的影响

Tab. 6 Effect of different flow rates on $f_{s/i}$

流速 (flow rate)/ (mL · min ⁻¹)	$f_{s/i}$				
	山柰酚 (kaempferol)	二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)	山柰素 (kaempferin)	高良姜素-3-O-甲醚 (galangal-3-O-methyl ether)	
0.7	1.204 3	20.924 5	1.064 8	0.893 2	
0.8	1.162 3	20.387 3	1.058 8	0.900 1	
0.9	1.167 1	21.068 6	1.063 3	0.897 1	
平均值(mean)		1.177 9	20.793 5	1.062 3	0.896 8
RSD/%		2.0	1.7	0.29	0.38

表 7 不同柱温对 $f_{s/i}$ 的影响

Tab. 7 Effect of different column temperatures on the $f_{s/i}$

柱温 (column temperatures)/°C	$f_{s/i}$				
	山柰酚 (kaempferol)	二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)	山柰素 (kaempferin)	高良姜-3-O-甲醚 (galangal-3-O-methyl ether)	
25	1.146 4	21.032 2	1.073 3	0.895 0	
30	1.162 3	20.387 3	1.058 8	0.900 1	
35	1.187 5	21.147 8	1.054 3	0.896 4	
平均值(mean)		1.165 4	20.855 7	1.062 1	0.897 1
RSD/%		1.8	2.0	0.93	0.29

2.9.5 待测成分色谱峰定位 取“2.2”项混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别计算各个化学成分的相对保留时间($r_{i/s}$),结果见表 8, RSD < 5.0%,表明可利用相对保留时间对各成分进行定位。

2.9.6 样品含量测定 取 13 批样品,分别按“2.3”项下方法制备供试品母液,定容于 100 mL 量瓶中,

精密量取 4 mL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,超声(40 kHz, 250 W)溶解 15 min,摇匀,滤纸过滤,取续滤液,再经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果显示,QAMS 法和外标法(ESM)所测结果无显著差异,见表 9,表明 QAMS 法可用于高良姜药材的含量测定。

表 8 各成分相对保留时间

Tab. 8 Relative retention time of each component

仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	$t_{r/s}$			
		山柰酚 (kaempferol)	二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)	山柰素 (kaempferin)	高良姜素-3-O-甲醚 (galangal-3-O-methyl ether)
Agilent1260	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.577 4	0.850 9	1.032 8	1.137 9
	Hypersil ODS2	0.656 8	0.881 8	1.038 2	1.080 0
	Shimadzu Shim-pack GIST	0.593 1	0.813 2	1.044 4	1.119 4
Shimadzu	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	0.609 0	0.852 5	1.028 5	1.125 3
	Hypersil ODS2	0.638 2	0.868 0	1.034 4	1.088 2
	Shimadzu Shim-pack GIST	0.621 2	0.824 0	1.039 9	1.108 1
平均值(mean)		0.615 9	0.848 4	1.036 4	1.109 8
RSD/%		4.7	3.1	0.54	2.0

表 9 高良姜中 5 个成分的含量测定结果

Tab. 9 Determination results of five components in *Alpiniae Officinarum Rhizoma*

样品编号 (sample No.)	含量(content)/(mg·g ⁻¹)												
	高良姜素 (galangin)		山柰酚 (kaempferol)		二苯基庚烷 A (diphenylheptane A)		山柰素 (kaempferin)		高良姜素-3-O-甲醚 (galangal-3-O-methyl ether)				
	ESM	QAMS	ESM	RSD/%	QAMS	ESM	RSD/%	QAMS	ESM	RSD/%	QAMS	ESM	RSD/%
S1	0.555 8	0.018 2	0.018 1	0.66	1.078 2	1.076 5	0.11	0.126 8	0.124 9	1.0	0.072 4	0.072 3	0.14
S2	0.563 5	0.021 4	0.021 3	0.093	0.877 1	0.875 8	0.11	0.120 0	0.118 2	1.1	0.103 9	0.103 8	0.10
S3	0.446 5	0.019 7	0.019 5	0.66	1.027 2	1.025 6	0.11	0.082 7	0.081 5	1.1	0.061 2	0.061 1	0.16
S4	0.262 8	0.007 6	0.007 5	0.67	0.610 3	0.609 4	0.11	0.059 2	0.058 3	1.0	0.040 9	0.040 8	0.090
S5	0.409 5	0.018 8	0.018 7	0.64	0.969 9	0.968 4	0.11	0.083 7	0.082 5	1.1	0.071 1	0.071 0	0.14
S6	0.201 0	0.007 6	0.007 5	0.67	0.527 1	0.526 3	0.11	0.039 6	0.039 0	1.0	0.036 8	0.036 8	0.090
S7	0.650 0	0.011 4	0.011 3	0.62	1.229 9	1.227 9	0.11	0.119 5	0.117 8	1.1	0.057 1	0.057 1	0.18
S8	0.322 3	0.009 9	0.009 8	0.71	1.561 7	1.559 3	0.11	0.118 0	0.116 2	1.0	0.130 8	0.130 6	0.77
S9	0.537 3	0.020 8	0.020 6	0.68	1.201 5	1.199 6	0.11	0.118 1	0.116 3	1.0	0.082 5	0.082 4	0.12
S10	0.468 4	0.023 4	0.023 2	0.64	1.108 4	1.106 7	0.11	0.097 0	0.095 6	1.0	0.071 3	0.071 3	0.14
S11	0.286 5	0.006 8	0.006 7	0.59	0.705 5	0.704 4	0.11	0.060 1	0.059 2	1.0	0.041 6	0.041 5	0.090
S12	0.278 3	0.008 3	0.008 3	0.60	0.525 8	0.525 0	0.11	0.051 4	0.050 6	1.0	0.041 7	0.041 6	0.090
S13	0.241 1	0.007 7	0.007 6	0.65	0.676 2	0.675 2	0.11	0.049 8	0.049 1	1.0	0.045 0	0.044 9	0.090

2.10 化学模式识别分析

2.10.1 聚类分析 采用 SIMCA 14.1 分析软件对“2.9”项 QAMS 法测定的 13 批高良姜 5 个成分含量数据进行聚类分析。如图 2 所示,可将 13 批样品分为 3 类:S1、S2、S3、S5、S7、S9、S10 聚为 1 类,S8 聚为 1 类,S4、S6、S11、S12、S13 聚为 1 类。由表 1 可知,S1、S2、S3、S5、S7、S8、S9、S10 采集于广东徐闻,但 S8 采集于广东徐闻前山,该地属于热带季风气候,气候温暖,雨量充沛,山柰酚、二苯基庚烷 A、高良姜素-3-O-甲醚的含量与其他产地差异明显,故单

独聚为 1 类。第 3 类采集于广东海康、广东惠阳、广西等地,此类高良姜含量间并无明显差异,故归为 1 类。

2.10.2 主成分分析 采用 SPSS 25.0 分析软件对 QAMS 法测定的 13 批高良姜中 5 个成分含量数据进行主成分分析。由总方差结果看出,前 2 个主成分特征值分别为 73.473%、15.496%,累计贡献率 88.969%。因此,前 2 个成分即可代表高良姜 88.969% 的信息量,其中,第一主成分反映了山柰酚的信息,第二主成分反映了二苯基庚烷 A 的信息。见表 10。

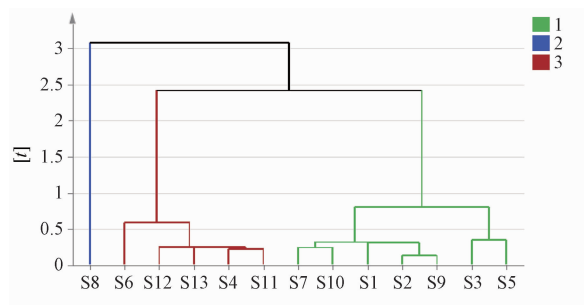


图2 13批高良姜样品聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of 13 batches of Alpiniae Officinarum Rhizoma samples

2.10.3 正交偏最小二乘-判别分析 采用SIMCA 14.1分析软件对QAMS法测定的13批高良姜5个化学成分含量数据进行正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)分析,其中,模型参数分别为 $R^2 X = 0.89$, $R^2 Y = 0.953$, 预测指数 $Q^2 = 0.854$,表明所建立的模型较为稳定可靠,可以用来区分不同批次的药材,见图3。对构建的OPLS-DA进行置换检验200次,结果显示, R^2 截距值为0.0594 (< 0.3),所建立的模型稳定可靠, Q^2 截距值为-0.555 (< 0),说明所建立的模型稳定可靠,未过度拟合。可用于13批

表10 5个主成分的特征值和方差贡献率

Tab. 10 Eigenvalues and variance contribution rates of the five principal components

主成分 (principal component)	特征值 (eigenvalue)	方差贡献率 (variance contribution rate)/%	累计方差贡献率 (cumulative variance contribution rate)/%
1	3.674	73.473	73.473
2	0.775	15.496	88.969
3	0.381	7.616	96.585
4	0.152	3.049	99.635
5	0.018	0.365	100.000

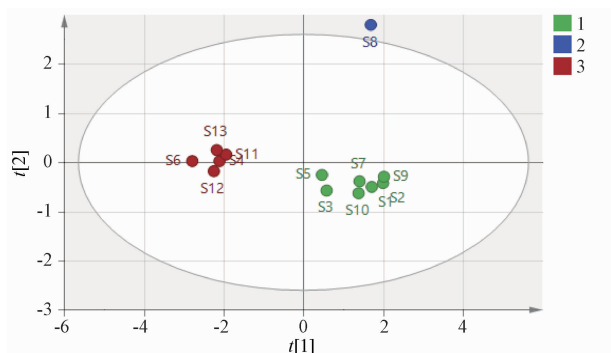


图3 13批高良姜样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 3 OPLS-DA score plot of 13 batches of Alpiniae Officinarum Rhizoma samples

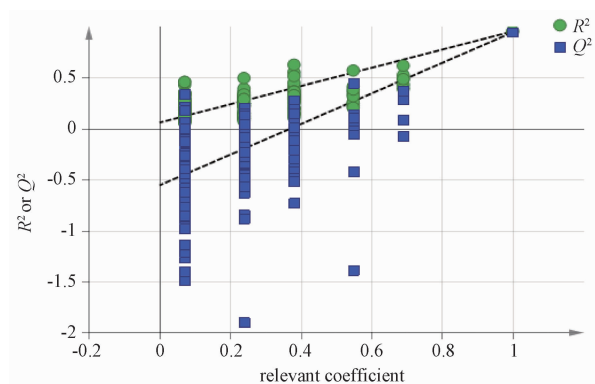


图4 13批高良姜样品 OPLS-DA 置换检验图

Fig. 4 OPLS-DA displacement test diagram of 13 batches of Alpiniae Officinarum Rhizoma samples

样品质量差异的有效判别。见图4。以变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) > 1 为标准,筛选出高良姜素-3-O-甲醚、高良姜素、二苯基庚烷A,这3个化学成分可能是高良姜药材的标志性成分。见图5。

3 讨论

3.1 提取方法考察

本试验采用的提取溶剂为水,为后续配方颗粒的研究提供了参考,采用正交实验分别考察了提取

次数、提取时间、加水体积及粉碎粒度,以所检测到高良姜中5个化学成分的含量为指标,最终确定的最佳提取工艺为提取2次,第1次提取5h,第2次提取1h,加10倍量的水,粉碎粒度为5目。

3.2 液相色谱条件的考察

采用二极管阵列检测器在200~400nm范围内扫描得到光谱图,结果显示5个化学成分在254nm波长处均有较大吸收。流动相分别比较了乙腈-水、

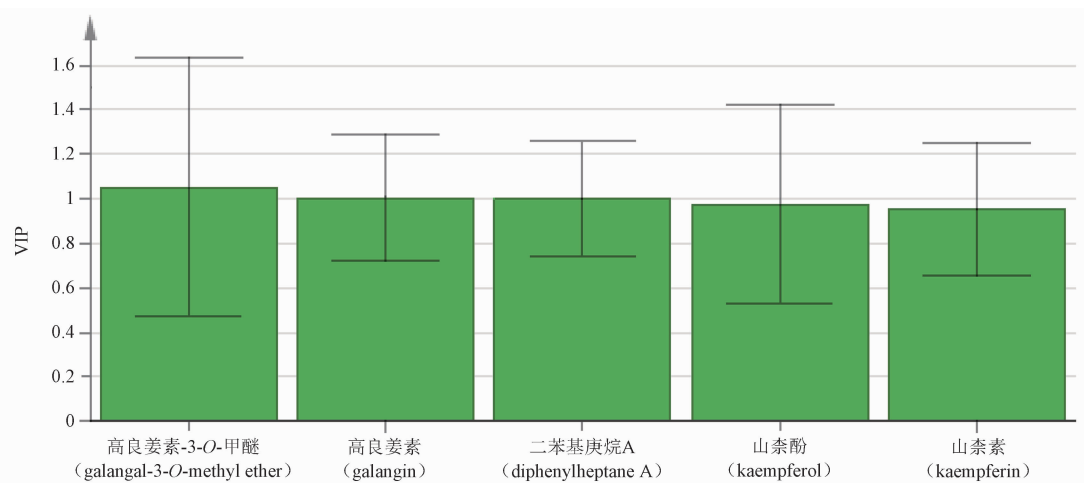


图5 13批高良姜样品VIP图

Fig. 5 VIP diagram of 13 batches of *Alpiniae Officinarum Rhizoma* samples

乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.3%乙酸水、甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液；柱温比较了25、30和35℃。结果表明，柱温为30℃，波长为254nm，流动相为乙腈-0.3%乙酸水溶液梯度洗脱时，待测成分的峰形较好，且分离度高，可用于高良姜中5个化学成分的含量测定。

3.3 指标性成分的选择

山柰酚、高良姜素、山柰素、高良姜素-3-O-甲醚具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、免疫调节、预防心血管疾病等药理作用^[10-13]。二苯基庚烷A在抗炎、抗氧化、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等方面也表现出较好的药理活性^[14-15]。高良姜中黄酮类和二苯基庚烷类是主要的活性成分^[2]，因此本文选择4个黄酮类和1个二苯基庚烷类作为指标性成分进行研究。

3.4 内参物的选择

高良姜素在高良姜中的含量较其他4个成分高，是主要的药理活性成分，且化学性质稳定，对照品价格较便宜，并且容易获得，保留时间适中，有助于其他化学成分色谱峰的相对保留时间的计算，故选择高良姜素为内参物。

3.5 小结

本研究建立了以高良姜素为内参物，同时测定高良姜药材中山柰酚、二苯基庚烷A、高良姜素、山柰素、高良姜素-3-O-甲醚5个成分含量的QAMS法，该方法检测简便，耐用性好，准确度高，成本较低，与各成分单独采用ESM测定含量比较，

分析结果差异较小。同时，在试验过程中消耗的有机溶剂更少，在降低成本的同时减少了环境污染。通过QAMS法和ESM分析比对13批样品，并结合化学模式识别分析了影响药材质量标志性成分。QAMS法具有较好的精密度和准确度，方法学考察结果良好，可为高良姜药材的质量评价及标准制订提供依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典2020年版·一部[S]. 2020: 300
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 300
- [2] 欧虹雅, 屈慧娟, 周小妹, 等. 高良姜的化学成分及抗肿瘤活性研究[J]. 海南医学院学报, 2023, 29(4): 241
OU HY, QU HJ, ZHOU XM, *et al.* Study on chemical composition and antitumor activity of galangal [J]. J Hainan Med Univ, 2023, 29(4): 241
- [3] 熊远果, 沈瑶, 张洪, 等. 高良姜药理活性研究新进展[J]. 中南药学, 2017, 15(10): 1418
XIONG YG, SHEN Y, ZHANG H, *et al.* New progress in the study of pharmacological activity of galangal [J]. Cent South Pharm, 2017, 15(10): 1418
- [4] 黄慧珍, 杨丹. 高良姜的化学成分及药理活性研究进展[J]. 广东化工, 2009, 36(1): 77
HUANG HZ, YANG D. Research progress on chemical composition and pharmacological activity of galangal [J]. Guangdong Chem Ind, 2009, 36(1): 77
- [5] LU H, YAO H, ZOU R, *et al.* Galangin suppresses renal inflammation via the inhibition of NF- κ B, PI3K/AKT and NLRP3 in uric acid treated NRK-52E tubular epithelial cells [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 3018357
- [6] ZHU L, LUO Q, BI J, *et al.* Galangin inhibits growth of human

- head and neck squamous carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 224: 149
- [7] 李洪福, 李永辉, 王勇, 等. 高良姜化学成分及药理活性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 236
LI HF, LI YH, WANG Y, *et al.* Study on chemical composition and pharmacological activity of galangal[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2014, 20(7): 236
- [8] 桂蓓, 高振虎, 贾真, 等. 高良姜不同部位胃肠解痉及镇痛作用的比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(2): 158
GUI B, GAO ZH, JIA Z, *et al.* Comparative study on gastrointestinal antispasmodic and analgesic effects of different parts of galangal[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2021, 32(2): 158
- [9] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925
WANG ZM, GAO HM, FU XT, *et al.* Research on the methodology of the quality evaluation mode of traditional Chinese medicine using the method of “quantitative analysis of multi-components by single marker”[J]. *China J Chin Mater Med*, 2006, 31(23): 1925
- [10] NAM SY, JEONG HJ, KIM HM. Kaempferol impedes IL-32-induced monocyte-macrophage differentiation[J]. *Chem Biol Interact*, 2017, 274: 107
- [11] 王晓晴, 孙允红, 赵方舒, 等. 高良姜素的药理作用及机制研究进展[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(8): 115
WANG XQ, SUN YH, ZHAO FS, *et al.* Research progress on pharmacological effects and mechanisms of galangal[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2023, 39(8): 115
- [12] 李凤兰. 山柰素中试级工艺优化及降血糖活性研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016
LI FL. Optimization of Pilot Process and Hypoglycemic Activity of Kaempferol[D]. Guiyang: Guizhou University, 2016
- [13] 秦华珍, 牛新迈, 谢旭格, 等. 高良姜、大高良姜黄酮类成分对胃溃疡寒证大鼠胃组织 PGE₂、EGF 和血清 IL-8、TNF- α 等指标的影响[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(11): 2612
QIN HZ, NIU XM, XIE XG, *et al.* Effects of galangal and galangal turmeroids on PGE₂, EGF and Serum IL-8 and TNF- α in gastric tissue of rats with cold syndrome of gastric ulcer[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(11): 2612
- [14] 赖伟勇, 李海龙, 谭银丰. 高良姜二苯基庚烷类成分药理作用研究综述[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(12): 2030
LAI WY, LI HL, TAN YF. A review of the pharmacological effects of diphenylheptane components in galangal[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2016, 28(12): 2030
- [15] SONG W, YAN CY, ZHOU QQ, *et al.* Galangin potentiates human breast cancer to apoptosis induced by TRAIL through activating AMPK[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 845

(本文于 2024 年 4 月 1 日收到)