

# 高良姜药材高效液相指纹图谱研究<sup>①</sup>

王丽峰, 彭敬东, 王 宁

西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

**摘要:** 采用 Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-乙腈-水(冰乙酸调 pH=3.0), 梯度洗脱, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长 254 nm, 建立了高良姜 HPLC 指纹图谱分析方法. 确定了 12 个不同产地高良姜药材乙醇提取部分 13 个共有峰, 各产地药材指纹图谱与对照指纹图谱相似度均大于 0.9, 可以用来作定性研究.

**关键词:** 高良姜; 指纹图谱; 高效液相色谱法

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2

**文献标识码:** A

高良姜为姜科多年生草本植物 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎, 具有温胃散寒、消食止痛功效, 用于脘腹寒痛、胃寒吐泻、消积食滞、消化不良等病症<sup>[1]</sup>, 含有多种化学成分, 其中黄酮类化合物为主要有效成分. 由于受地理环境和生长因素的影响, 不同产地高良姜的化学组成及其含量差异较大, 造成药材质量不规范, 品质各异. 对于单组分的检测显然不能说明药材的整体质量, 且缺乏专属性. 为更好的开发利用高良姜药材, 需要建立一套能严格控制药材内在质量的技术手段.

中药指纹图谱是近些年迅速发展起来的一种中药质量控制模式, 相对于用单个或少数主要成分作为指标来控制中药材质量的方法, 中药指纹图谱能较为全面的反映药材的内在质量, 具有系统性、整体性和稳定性等特点<sup>[2]</sup>. 已有文献<sup>[3-4]</sup>报道采用薄层色谱法对高良姜醋酸乙酯提取部位进行了分析, 但该方法灵敏度和选择性有限, 对于一些含量低且极性相近的物质无法准确鉴别. 本研究采用正交设计优化了高良姜的超声提取条件, 并用反相高效液相色谱建立了高良姜乙醇提取部位的指纹图谱分析方法, 分析了 12 种不同产地的高良姜药材, 分离效果好, 标出典型共有峰 13 个, 比文献<sup>[3-4]</sup>中得到的指纹谱更加丰富, 为进一步评价和控制高良姜药材质量提供了依据.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, 包括 G1315B 二级管阵列检测器), Acculab 电子天平(德国赛多利斯股份公司), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂), KH-3200B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), pH S-3C 型精密 pH 计(上海精密仪器科技有限公司). 中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004)(国家药典委员会).

乙腈、甲醇(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 冰乙酸(分析纯, 重庆北碚化学试剂厂); 水为

① 收稿日期: 2008-01-02

作者简介: 王丽峰(1977-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事色谱分析的研究.

通讯作者: 彭敬东, 副教授, 硕士生导师.

二次蒸馏水.

高良姜药材分别购自云南(S1)、贵州(S2)、广西(S3)、广东(S4)、四川(S5)、重庆(S6)、河南郑州(S7)、河南南阳(S8)、河南商丘(S9)、湖北(S10)、河北(S11)、天津(S12). 均由重庆工学院傅善权副研究员鉴定为姜科植物的干燥根茎.

## 1.2 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm). 流动相为甲醇-乙腈-水(冰乙酸调 pH 3.0). 采用梯度洗脱: 0~30 min, 三者的体积比由 8:2:90 线性变化至 35:23:42; 30~38 min, 三者的体积比保持不变; 38~52 min, 体积比由 35:23:42 线性变化至 55:45:0. 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL.

## 1.3 供试品溶液制备

称取高良姜药材粉末约 1 g, 过 60 目筛, 精密称定, 准确加入 15 mL 95% 乙醇, 超声提取 30 min, 过滤, 滤渣再加入 15 mL 95% 乙醇, 超声提取 30 min, 过滤, 合并两次提取液, 将提取液减压浓缩, 用甲醇定容至 10 mL, 摇匀, 并用 0.45 μm 的一次性针筒过滤器过滤后置于 4 °C 冰箱中备用.

## 1.4 检测方法

精密吸取样品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录 60 min 的色谱图即得. 根据参照峰的保留时间和峰面积计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积值.

# 2 结果与讨论

## 2.1 样品前处理条件的优化

### 2.1.1 提取溶剂的选择

分别考察了 3 种溶剂甲醇、95% 乙醇、乙酸乙酯的超声提取效果, 结果表明, 95% 乙醇提取时, 其共有峰的峰面积之和最大, 且能够较全面的反映高良姜药材中化学成分的信息, 故选择 95% 乙醇为提取溶剂.

### 2.1.2 超声提取条件的优化

考察了 95% 乙醇用量、提取次数和提取时间对提取效率的影响. 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>) 正交表设计实验, 因素水平见表 1, 得到各提取样品的 HPLC 色谱图及峰面积, 标定共有峰共 13 个(图 1).

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素		
	乙醇每次用量/mL	提取时间/min	提取次数
1	10	20	1
2	15	30	2
3	20	40	3

比较发现, 13 个共有峰中 2, 5, 6, 7, 8, 11 号峰的色谱峰面积均大于总面积的 3%, 它们的峰面积之和占总峰面积的 90% 以上. 故以此 6 个峰的总峰面积作为正交实验的评价指标. 数据处理和直观分析结果见表 2, 方差分析结果见表 3.

实验结果表明, 各因素对实验结果的影响从大到小次序为: 溶剂用量(A), 提取时间(B), 提取次数(C). 本实验条件下确定超声提取最佳工艺为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>, 即每次用 15 倍量 95% 乙醇超声提取 2 次, 每次 30 min. 由方差分析结果看出, 因素 A 溶剂用量对试验指标的影响具有显著意义, 因素 B 超声时间对试验指标的影响不很显著, 因素 C 提取次数的影响较小.

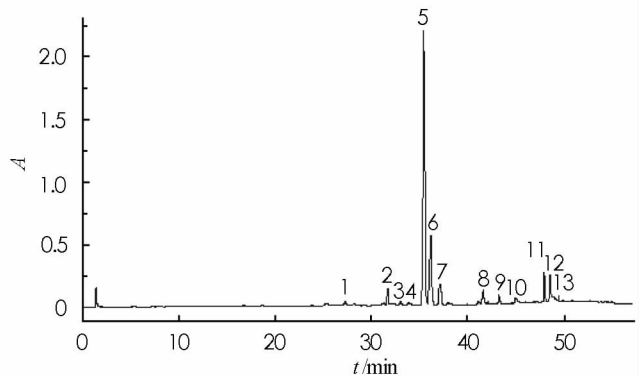


图 1 高良姜药材的对照指纹图谱

表 2 正交实验数据处理和直观分析结果

实验号	因 素			实验结果
	A 提取溶剂量/mL	B 提取时间/min	C 提取次数	
1	10	20	1	42 689
2	10	30	2	44 707
3	10	40	3	43 754
4	15	20	2	45 887
5	15	30	3	47 961
6	15	40	1	47 249
7	20	20	3	45 787
8	20	30	1	46 389
9	20	40	2	47 201
$T_1$	131 150	134 363	136 327	411 624
$T_2$	141 097	139 057	137 795	
$T_3$	139 377	138 204	137 502	
$m_1$	43 717	44 788	45 442	
$m_2$	47 032	46 352	45 932	
$m_3$	46 459	46 068	45 834	
$R$	3 315	1 564	490	

注:  $n=3$ .

表 3 正交实验方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	平均偏差平方和	$F$	$F$ 临界值	显著性
A	18 842 086	2	9 421 043	3.126	3.11	*
B	4 167 968	2	2 083 984	0.692	3.11	
C	402 486	2	201 243	0.067	3.11	
Error	696 664	2	348 332			

注: \* 表示显著,  $n=3$ .

## 2.2 色谱条件的优化

### 2.2.1 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器对检测波长进行了优化, 分别记录了 360, 260, 254, 250 nm 波长下的色谱图, 结果表明 254 nm 时色谱信息最为丰富, 峰强度较高, 且分离效果好, 基线平稳, 故选 254 nm 作为检测波长.

### 2.2.2 流动相的选择

高良姜含有丰富的黄酮类成分且极性范围跨度很大, 故采用梯度洗脱; 黄酮类成分含有多个酚羟基, 呈弱酸性, 故使用酸性缓冲系统; 最终确定甲醇-乙腈-水(冰乙酸调 pH=3.0)为流动相, 该系统分离效果较好, 大部分色谱峰达到了基线分离, 且较稳定.

## 2.3 方法学考查

### 2.3.1 运行时间

依据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》, 考察了运行时间为 120 min 的 HPLC 图谱, 确定 60 min 之后再无峰出现, 因此确定每次运行时间为 60 min.

### 2.3.2 精密度

取同一个供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性. 结果表明, 各共有峰的相对保留时间和相对峰面积均没有明显变化(相对标准偏差(RSD)关于 3%), 结果表明仪器性能良好.

### 2.3.3 稳定性

取新制备的供试品溶液, 分别在 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 检测, 计算各色谱峰相对保留时间的 RSD 值为

0.02%~0.56%, 相对峰面积的 RSD 值为 2.77%~4.63%。表明样品溶液在 48 h 内稳定。

### 2.3.4 重现性

取同一批样品 5 份, 按照 1.3 项下方法制备并检测, 各色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.01%~0.05%, 相对峰面积的 RSD 值为 3.59%~4.85%。结果表明, 样品制备和检测方法重现性良好。

## 2.4 指纹图谱分析

### 2.4.1 共有峰

考察 12 个不同产地高良姜药材样品的色谱图, 提取药材的共有模式作为对照指纹图谱(图 1), 60 min 内有 13 个色谱峰是 12 批高良姜共有的, 因此, 确定它们为共有指纹峰。以 6 号峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间, 结果见表 4。应用指纹图谱相似度评价软件对各个产地的高良姜药材指纹图谱进行谱图比较, 并对谱图进行自动匹配(图 2)。

表 5 是各批高良姜药材 13 个共有峰以第 4 批广东产高良姜药材相对应的色谱峰的峰面积为 1, 计算不同批号高良姜药材的相对峰面积值。通过比较指纹图谱中共有峰的组成和比例, 可以了解不同批号高良姜药材质量状况。比较发现: 不同批号高良姜主要成分相同, 但它们的含量(峰面积大小)差异显著。广东产高良姜整体成分的含量都较其它产地高, 且色谱峰 1,2,3,5,6,8,9,11 的峰面积最大; 云南产高良姜的色谱峰 4,7,10,12,13 的峰面积最高。

表 4 不同产地高良姜药材各共有峰的相对保留时间

峰号	样品号												RSD /%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	
1	0.754 3	0.754 4	0.754 4	0.754 7	0.754 5	0.754 8	0.754 8	0.754 8	0.754 7	0.754 7	0.754 5	0.754 5	0.05
2	0.884 7	0.884 5	0.884 7	0.884 7	0.884 8	0.885 1	0.885 2	0.885 3	0.885 3	0.885 0	0.884 9	0.885 0	0.05
3	0.922 1	0.921 8	0.921 9	0.922 0	0.922 0	0.922 2	0.922 3	0.922 4	0.922 3	0.922 0	0.921 9	0.921 8	0.04
4	0.940 5	0.940 4	0.940 5	0.940 6	0.940 6	0.940 8	0.940 9	0.940 9	0.940 9	0.940 6	0.940 9	0.940 4	0.04
5	0.981 4	0.981 3	0.981 5	0.981 4	0.981 5	0.981 5	0.981 7	0.981 6	0.981 6	0.981 6	0.981 6	0.981 6	0.05
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
7	1.027 3	1.027 2	1.027 3	1.027 3	1.027 4	1.027 5	1.027 5	1.027 4	1.027 5	1.027 4	1.027 5	1.027 6	0.05
8	1.160 1	1.160 2	1.160 3	1.160 2	1.160 4	1.160 6	1.160 6	1.160 1	1.160 8	1.160 6	1.160 9	1.160 8	0.05
9	1.209 9	1.209 9	1.209 6	1.209 9	1.209 9	1.210 2	1.210 3	1.210 0	1.210 7	1.210 3	1.210 2	1.210 0	0.04
10	1.261 1	1.262 1	1.261 7	1.262 5	1.261 8	1.262 5	1.262 6	1.262 5	1.263 1	1.262 7	1.262 0	1.262 2	0.05
11	1.351 8	1.351 6	1.350 7	1.351 7	1.351 0	1.351 5	1.351 7	1.351 6	1.352 0	1.351 7	1.350 7	1.350 5	0.02
12	1.368 4	1.368 3	1.367 4	1.368 5	1.367 7	1.368 1	1.368 2	1.368 2	1.368 9	1.368 2	1.367 2	1.366 9	0.02
13	1.395 7	1.395 3	1.394 5	1.395 5	1.394 7	1.395 2	1.395 4	1.395 4	1.395 9	1.395 3	1.394 5	1.394 1	0.01

表 5 不同产地高良姜药材各共有峰的相对峰面积

峰号	样品号											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.962 6	0.991 3	0.882 8	1	0.812 6	0.780 9	0.976 3	0.979 8	0.778 2	1.028 7	0.680 7	0.837 1
2	0.993 1	0.891 4	0.848 8	1	0.758 3	0.881 3	0.886 2	0.928 1	0.727 2	0.855 2	0.741 4	0.779 9
3	0.874 3	0.872 5	0.859 4	1	0.755 3	0.880 5	0.893 3	0.883 3	0.723 3	0.853 9	0.673 5	0.791 0
4	2.174 1	1.004 3	1.167 6	1	1.293 2	0.694 9	1.349 3	1.034 0	0.851 8	1.286 6	0.917 5	1.140 2
5	0.951 8	0.892 0	0.869 2	1	0.786 3	0.855 7	0.908 3	0.923 5	0.763 2	0.876 9	0.723 0	0.833 5
6	0.967 8	0.895 1	0.855 8	1	0.752 2	0.815 7	0.908 8	0.918 4	0.744 5	0.870 0	0.684 2	0.803 6
7	1.002 7	0.953 8	0.850 3	1	0.750 8	0.865 7	0.977 1	0.926 1	0.769 0	0.879 5	0.714 3	0.811 4
8	0.959 1	0.894 9	0.848 1	1	0.773 4	0.886 9	0.896 9	0.940 6	0.746 9	0.857 2	0.718 8	0.809 0
9	0.980 1	0.883 6	0.841 0	1	0.769 8	0.939 2	0.890 1	0.902 7	0.753 7	0.849 1	0.762 9	0.799 5
10	1.404 2	0.931 3	0.999 5	1	1.044 7	0.980 2	0.931 0	1.039 3	0.988 4	1.032 5	1.072 8	0.971 5
11	0.875 8	0.876 1	0.830 1	1	0.773 4	0.869 1	0.889 5	0.919 6	0.732 0	0.854 3	0.702 8	0.789 0
12	1.294 6	1.009 4	1.013 8	1	1.021 3	0.997 1	1.003 1	1.010 6	0.991 4	0.996 3	1.038 6	0.969 6
13	1.015 3	0.865 7	0.815 3	1	0.699 8	0.852 5	0.883 3	0.894 4	0.707 0	0.828 0	0.691 0	0.805 3

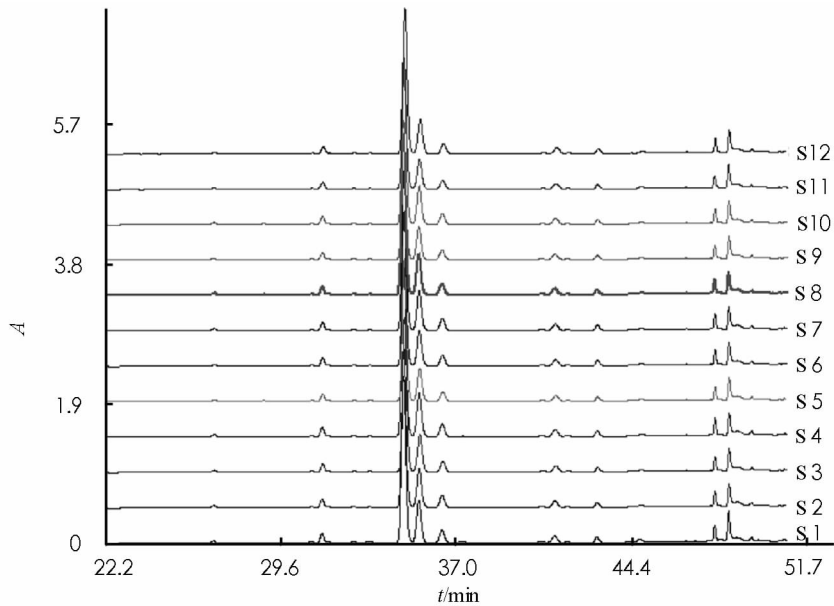


图2 12个产地高良姜药材匹配后 HPLC 图谱

#### 2.4.2 高良姜药材的指纹图谱相似度计算

应用指纹图谱相似度评价软件对各个产地的高良姜药材指纹图谱进行相似度评价,以云南的高良姜药材为相应的参照图谱,生成对照图谱,计算其他各个产地与对照图谱的相似度.相似度均在 0.9 以上,结果见表 6.

表6 12批高良姜药材指纹图谱相似度计算结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照指纹图谱
S1	1.000												0.991
S2	0.992	1.000											0.953
S3	0.991	0.986	1.000										0.968
S4	0.988	0.978	0.953	1.000									0.936
S5	0.999	0.969	0.987	0.963	1.000								0.995
S6	0.991	0.945	0.970	0.924	0.993	1.000							0.996
S7	0.979	0.981	0.972	0.915	0.998	0.990	1.000						0.995
S8	0.996	0.957	0.965	0.923	0.992	0.989	0.995	1.000					0.925
S9	0.978	0.924	0.972	0.943	0.990	0.997	0.994	0.935	1.000				0.928
S10	0.996	0.964	0.981	0.918	0.999	0.992	0.994	0.921	0.911	1.000			0.934
S11	1.000	0.958	0.968	0.905	0.997	0.999	0.998	0.944	0.935	0.925	1.000		0.926
S12	0.975	0.930	0.965	0.944	1.000	0.998	0.992	0.917	0.922	0.937	0.968	1.000	0.954
对照指纹图谱	0.991	0.953	0.968	0.936	0.995	0.996	0.995	0.925	0.928	0.934	0.926	0.954	1.000

### 3 结 论

1) 目前常用的中药提取方法主要有加热回流提取、索氏提取和超声提取等,与前两种方法相比,超声提取具有快速、方便、不需加热、节省时间、提取的有效成分含量较高等优点<sup>[5-6]</sup>. 本实验主要讨论了高良姜药材的超声提取条件的优化.

2) 高良姜药材的成分复杂,用正交设计方案选用高良姜色谱图中色谱峰面积较大的 6 个峰作为评价指标. 此评价指标能够客观的反应提取条件的优劣.

3) 本实验所建立的高良姜药材 HPLC 指纹图谱分析方法,多个成分间分离效果良好,能够较全面的反映高良姜药材的内在质量,符合中药质量控制的整体性、复杂性和全面性的要求和特点.

**参考文献:**

- [1] 安 宁, 杨世林, 邹忠梅, 等. 高良姜黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2006, 37 (5): 663 - 664.
- [2] 柴逸峰, 罗国安, 黄 晟, 等. 知母药材高效液相指纹图谱研究 [J]. 分析试验室, 2005, 24 (7): 1 - 7.
- [3] 周 漩, 梁汉明, 周毅凡. 高良姜薄层色谱特定(指纹)图谱的研究 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25 (8): 916 - 919.
- [4] 李彩君, 林巧玲, 谢培山, 等. 高良姜中黄酮类成分薄层色谱指纹图谱鉴别 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12 (3): 183 - 187.
- [5] 胡 燕, 王明亮, 邱国福, 等. 高效液相色谱法测定茯苓皮的指纹图谱 [J]. 分析科学学报, 2006, 22 (6): 636 - 640.
- [6] 严 军, 张志远, 刘绍璞. 反相高效液相色谱法分离测定 5 种黄酮类化合物 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29 (3): 41 - 44.

## Study on Fingerprints of *Rhizoma Alpiniae Officinarum* by HPLC

WANG Li-feng, PENG Jing-dong, WANG Ning

*School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China*

**Abstract:** To set up the HPLC fingerprints of *rhizoma alpiniae officinarum*. The HPLC separation was performed on a Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 (μm) analytical column gradient eluted with methanol-acetonitrile-water (adjust to pH 3.0 with acetic acid) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was controlled at 30 °C, and the detection wavelength was at 254 nm. 13 common peaks were found in the fingerprints of 12 batches *rhizoma alpiniae officinarum*, and good similarities with correlation coefficients higher than 0.9 were found in fingerprints between the herbs from different sources and the standard chromatographic fingerprint, which can be utilized for the identification of *rhizoma alpiniae officinarum*. The method is accurate and reproducible, providing a new reference for quality control of *rhizoma alpiniae officinarum*.

**Key words:** *rhizoma alpiniae officinarum*; fingerprint; high-performance liquid chromatography

责任编辑 潘春燕