

浙江产温郁金挥发油的 HPLC 指纹图谱研究

刘 敏¹, 楚生辉¹, 崔 友², 李校堃^{1*}

(1. 温州医学院, 浙江 温州 325035; 2. 浙江天瑞药业有限公司, 浙江 瑞安 325200)

摘要:目的 利用高效液相色谱建立温郁金挥发油的指纹图谱。方法 采用 Shimadzu VP-ODS C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1 磷酸溶液梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 210 nm。结果 以牻牛儿酮对照, 通过对 19 批浙江不同产地温郁金样品测定, 标定了 14 个共有峰, 并通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”和聚类分析等辅助手段, 计算相似度等有关参数。结论 该方法准确可靠, 重现性好, 为更好的控制温郁金内在质量提供了科学依据。

关键词:温郁金挥发油; 指纹图谱; 牻牛儿酮; 高效液相色谱

中图分类号: R286.06 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)06-0883-03

HPLC Fingerprints of volatile oil of *Curcuma wenyujin* in Zhejiang Province

LIU Min¹, CHU Sheng-hui¹, CUI You², LI Xiao-kun¹

(1. Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2. Zhejiang Tianrui Pharmaceutical Co., Ltd., Ruian 325200, China)

Abstract : Objective To establish the chromatographic fingerprint of *Curcuma wenyujin* by HPLC. **Methods** The chromatographic fingerprint of *C. wenyujin* was established by HPLC with Shimadzu VP-ODS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), acetonitrile-water (0.1 phosphoric acid) gradient elution, the flow rate of 1.0 mL/min, column temperatures of 30 ℃, and detective wavelength at 210 nm. **Results** Taking germacrone as the reference peak, 14 common-peaks were selected as the fingerprint peaks. The similarities among samples of *C. wenyujin* among 19 approved samples and their standard chromatographic fingerprints were calculated with a software “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica” published by GPC (Version 2004A) and cluster analysis. **Conclusion** This method with better accuracy and reproducibility could be used in the quality control of *C. wenyujin*.

Key words: volatile oil of *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling; fingerprint; germacrone; HPLC

温郁金为“浙八味”之一, 是姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的根茎, 有行气破血, 消肿止痛之功。以产于浙江温州地区质量最优, 故温州为其历史道地产区。主要用于瘀血经闭、食积胀痛、早期宫颈癌。由于其具有消炎、止痛、活血化瘀、去腐生肌、增强机体免疫力、抗病毒、抗癌等良好的药理作用, 被广泛应用于临床。现代研究表明, 莪术的主要成分为挥发油, 油中含有成分为牻牛儿酮、莪术二酮、莪术醇等。本实验采用 HPLC 指纹图谱法和 SPSS 聚类分析法, 结合牻牛儿酮的测定, 对浙江不同产地 19 个样品采用进行聚类, 为全面有效地评价温郁金挥发油的质量控制提

供研究依据。

1 仪器与试剂

日本岛津 Shimadzu LC-10AT_v 液相色谱仪, 二级阵列检测器, 1100 色谱工作站。乙腈, 磷酸均为色谱纯, 水为纯净水。

9 批样品来自浙江温州温郁金 GAP 基地, 其余 10 批分别来自浙江乐清、新江、马屿、金华、年和、仙隆、荆谷。样品均由中国药品生物制品检定所中药标本馆徐纪民鉴定为姜科植物温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎, 药材来源见表 1。

2 方法和结果

2.1 色谱条件: Shimadzu VP-ODS C₁₈ 色谱柱 (250

* 收稿日期: 2008-08-03

基金项目: 浙江省科技攻关重大项目 (2005C13019); 瑞安市重大科技资助项目 (20052005); 温州市科技计划资助项目 (S2005B001)

作者简介: 刘 敏 (1978—), 女, 陕西咸阳人, 助理研究员, 硕士研究生, 研究方向: 温莪术规范化种植与新药开发研究。

* 通讯作者: 李校堃 6699350 E-mail: liumin2008@21cn.com

表 1 温郁金药材产地和批号

Table 1 Source and lot numbers of *C. wenyujin*

样品	来源	批号	样品	来源	批号
s1	浙江乐清	051223	s11	浙江温州陶山	050608
s2	浙江乐清	051225	s12	浙江温州陶山	051228
s3	浙江新江	051228	s13	浙江温州陶山	060602
s4	浙江马屿	051115	s14	浙江温州陶山	061225
s5	浙江马屿	051135	s15	浙江温州陶山	061115
s6	浙江金华	051205	s16	浙江温州陶山	060125
s7	浙江年和	051215	s17	浙江温州陶山	050225
s8	浙江仙降	051225	s18	浙江温州陶山	050125
s9	浙江仙降	060104	s19	浙江温州陶山	061205
s10	浙江荆谷	060114			

mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈-0.1 磷酸溶液为流动相, 洗脱梯度: 0 ~ 20 min, 60% 乙腈, 20 ~ 30 min, 75% 乙腈, 30 ~ 40 min, 80% 乙腈, 40 min 以后, 90% 乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 210 nm。

2.2 对照品溶液的制备: 取牻牛儿酮对照品 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用乙腈溶解, 并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取温郁金药材细粉(过四号筛)5 份, 约 20 g, 精密称定, 置 1 000 mL 圆底烧瓶中, 加水 400 mL, 混匀, 照挥发油测定法(《中国药典》2005 年版一部附录 D)测定, 自测定器上端加水使充满刻度部分, 并溢入烧瓶中为止, 再加醋酸乙酯 3 mL, 加热至沸腾, 并保持微沸 4 h, 冷却, 分取醋酸乙酯层, 测定器用醋酸乙酯洗涤 5 次, 每次 5 mL, 合并醋酸乙酯液, 通过铺有醋酸乙酯的漏斗, 转移至 50 mL 量瓶中, 用少量醋酸乙酯洗涤漏斗, 洗液并入同一量瓶中, 加醋酸乙酯至刻度, 摇匀。精密量取 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加乙腈稀释并至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 测定方法: 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 进行分析, 测定, 以牻牛儿酮为对照, 计算相对保留时间和相对峰面积。

2.4.2 分析时间考察: 吸取供试品溶液 10 μ L, 注入高效液相色谱仪, 运行 120 min, 记录色谱图, 发现 60 min 以后已无明显色谱峰, 因此分析时间定为 60 min。

2.4.3 空白试验: 为考察流动相中是否有杂质干扰样品分析, 故先用流动相走空白梯度, 试验结果表明流动相中几乎没有杂质干扰样品分析。

2.4.4 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 制备供试品溶液, 分别在 0、2、6、12、24 h 检测指纹图。结果表明各色谱峰的相对保留时间和单峰面积/5% 总峰面积的色谱峰的比值基本没有明显变化, RSD < 3%, 说明至少在 24 h 稳定。

2.4.5 精密度试验: 取同一份供试品溶液, 连续进样 5 次, 结果表明各色谱峰的相对保留时间和单峰面积/5% 总峰面积的色谱峰的比值基本一致, RSD < 2%。

2.4.6 重复性试验: 取同一批供试品溶液 6 份, 同法检测, 结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD < 2%。

2.5 指纹图谱相似性评价: 将 19 批样品进样分析, 记录色谱图, 确定了 14 个特征峰构成温郁金挥发油的指纹图谱, 其中 8# 为牻牛儿酮。对照指纹图谱中各色谱的保留时间(峰面积)分别为: 9.114、9.769、10.093(1~3 195)、11.348(293)、12.453(2 612)、16.944(93)、17.898(549)、22.053(4 260)、34.047(583)、34.678(9 225)、47.267(810)、49.359(1 308)、50.294(432)、51.955(147)。保留时间按 t_R 为 22.097 min 的 8# 峰牻牛儿酮为参照物峰, 以其保留时间和峰面积为 1, 计算各峰的相对保留时间和峰面积比值。色谱图见图 1。

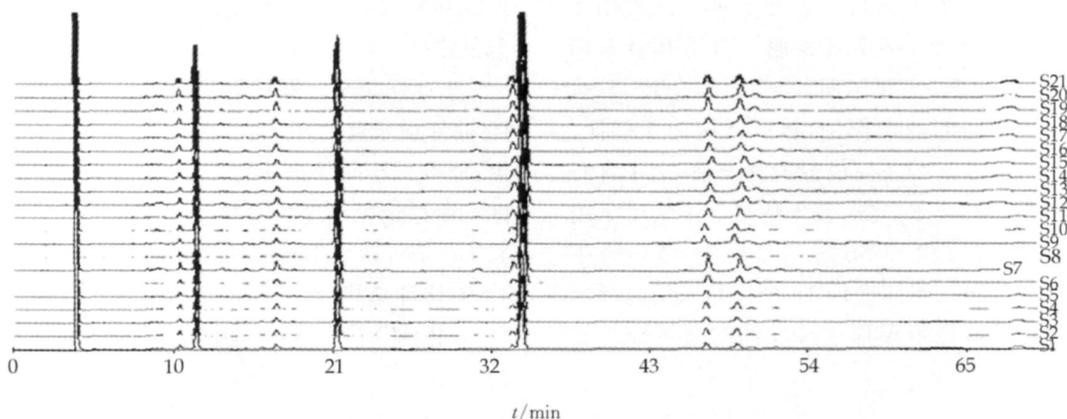


图 1 19 批温郁金挥发油的 HPLC 指纹图谱

Fig 1 Fingerprints of volatile oils from 19 batches of *C. wenyujin*

2.5.1 聚类分析:应用 SPSS 统计软件,以皮尔逊相关系数(Person correlation)为间隔尺度,进行 19 批样品的系统聚类分析,结果见图 2。将各类之间的距离标定为 1~25,可以看出:9 批道地温郁金先与浙江马屿、年和、荆谷产地聚为一类,再与浙江乐清、仙降产地聚为一大类,浙江金华被单独聚为一类,说明金华产温郁金挥发油的指纹图谱与其他样品存在着较大差别,因此将其排除。

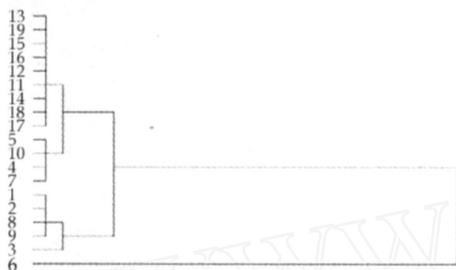


图 2 19 批温郁金挥发油聚类分析的结果 (以相对峰面积聚类)

Fig 2 Cluster analysis of volatile oils from 19 batches of C wenyujin (cluster with relative peak area)

2.5.2 共有模式的建立及相似度分析:依据聚类分析的结果,将其中 10 批药材进行色谱分析,采用药典委员会颁发的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 版”软件,进行色谱峰自动匹配,以中位数法建立对照指纹图谱即共有模式,见图 3。各样品与共有模式之间的相似度在 0.95 以上,相似度计算结果见表 2。可知 9 批道地温郁金挥发油相似度极高,可以建立道地温郁金挥发油指纹图谱。

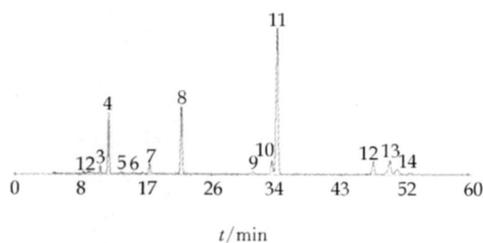


图 3 温郁金挥发油共有模式指纹图谱

Fig 3 Fingerprints of common peaks in samples C wenyujin

3 讨论

采用药典方法 CN 基柱等度洗脱系统,各色谱

表 2 相似度计算结果

Table 2 Similarity of ten batches of C wenyujin

样品	相似度	样品	相似度
S3	0.997	S13	0.986
S9	0.973	S14	0.997
S5	0.999	S18	0.984
S8	0.994	S16	0.997
S11	0.988	S19	0.999

峰不能较好分离。本实验比较了 Shimadzu VP-ODS C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) 与 Waters Xterra RP18 (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Waters SunFire C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zobax SB-C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Shiseido CAPCELL PAK C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Inertsil ODS-2 (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm)、Waters symmetry C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) 的分离效果。结果表明 Waters SunFire C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) 与 Phenomenex Gemini C₁₈ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) 分离结果较差,第 3、4 号大峰重叠为一个峰;而 Waters Xterra RP18 色谱柱保留较小,其他剩余的色谱柱所得的色谱图较为相似,但第 3、4 号大峰分离度不及 Shimadzu VP-ODS C₁₈ 色谱柱的分离效果好。所以本实验采用 Shimadzu VP-ODS C₁₈ 色谱柱。

本实验比较了供试品以甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液梯度洗脱系统为流动相分离样品效果,结果发现样品以乙腈-磷酸溶液梯度洗脱结果较好。

通过莪术药材指纹图谱特征峰的制定,能有效地控制温莪术的质量,为该药材的质量标准的制定及规范化种植质量控制提供科学依据与参考。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
 [2] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.
 [3] 方洪壮,崔友,史权,等. 多元分辨方法比较分析不同莪术油指纹图谱[J]. 计算机与应用化学,2007,24(5):629-632.
 [4] 孙国祥,慕善学,侯志飞,等. 连翘的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2007,29(2):161-163.