

莪术油的 HPLC 指纹图谱研究

祝明^{1*}, 张鹏², 唐登峰¹, 陈碧莲¹, 陆静娴², 方丽²

1. 浙江省食品药品检验所, 浙江 杭州 310004

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 建立莪术油的 HPLC 指纹图谱鉴别方法。方法 以呋喃二烯为参照物, 采用 HPLC 检测方法; 色谱条件: Agilent Extend C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-水二元梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 216 nm, 柱温 30 °C。结果 确定了 8 个共有峰, 建立了莪术油的 HPLC 指纹图谱, 可区别同属其他植物的挥发油。结论 本法操作简便, 专属性强, 重现性好, 可有效控制莪术油的质量。

关键词: 莪术油; 呋喃二烯; 指纹图谱; 相似度; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2011)01-0081-04

Fingerprints of Zedoary Turmeric Oil by HPLC

ZHU Ming¹, ZHANG Peng², TANG Deng-feng¹, CHEN Bi-lian¹, LU Jing-xian², FANG Li²

1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China

2. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China

Key words: Zedoary Turmeric Oil; furanodiene; fingerprint; similarity; HPLC

莪术油为姜科姜黄属温郁金 *Curcuma wenyujin* Y.H. Chen et C. Ling 的干燥根茎经水蒸气蒸馏提取而得的挥发油^[1], 具有显著的行气活血、祛腐生肌、抗炎、抗肿瘤的功效, 临床应用广泛^[2-5]。近年来国内外对莪术的化学成分、药理作用、生产工艺、临床应用等研究较多, 而对莪术油以及蓬莪术、广西莪术、郁金、姜黄等同属植物的挥发油同时进行鉴别的研究较少。而《中国药典》2010 年版一部莪术油项下所收载的薄层色谱鉴别以及牻牛儿酮测定, 亦无法与同属其他植物的挥发油相区别。本实验采用 HPLC-UV 法建立了莪术油的指纹图谱, 经比较考察, 结果表明采用本法可较好地鉴别莪术油与同属其他植物的挥发油, 操作简便, 重现性好, 可作为莪术油指纹图谱鉴别方法与品质评价手段。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪 (G1322A 脱气机、G1311A 四元泵、G1329A 自动进样仪、G1316A 柱温箱、G1315D 二极管阵列检测器), Agilent Chemstation 工作站; Mettler Toledo AG285

型电子天平 (瑞士 Mettler 公司)。

呋喃二烯对照品从温莪术中分离、纯化所得, 经 ¹H-NMR、¹³C-NMR 鉴定并用 HPLC 归一化法测定质量分数大于 98%; 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 无水乙醇为分析纯。

莪术油样品 22 批分别由浙江天瑞药业有限公司和达州天然植物药业有限公司提供; 莪术药材 11 批均由浙江省食品药品检验所中药室郭增喜鉴定, 包括温莪术 3 批 (产地为浙江瑞安)、蓬莪术 3 批 (产地为四川双流)、广西莪术 2 批 (产地为广西贵港)、福建莪术 1 批 (产地为福建)、温郁金 1 批 (产地为浙江瑞安)、片姜黄 1 批 (产地为福建)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

Agilent Extend C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈-水为流动相, 梯度洗脱: 0~20 min, 乙腈 60%~95%; 21~35 min, 乙腈 95%; 记录时间为 35 min; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 216 nm; 柱温为 30 °C。理论板数按呋喃二烯峰计算应不低于 5 000。

收稿日期: 2010-03-08

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2008C13037)

作者简介: 祝明 (1958-), 女, 浙江金华人, 主任中医师, 硕士生导师, 浙江省食品药品检验所中药室主任, 长期从事中药的检验、中药质量标准的制订研究及中药化学成分的研究和新药开发研究工作。Tel: (0571)86459425 E-mail: zhumingd@hotmail.com

2.2 参照物溶液的制备

精密称取呋喃二烯对照品适量，加无水乙醇制成 80 μg/mL 的溶液，摇匀，即得。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取莪术油 0.1 g 于 50 mL 量瓶中，加无水乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀，精密量取 5 mL 至 25 mL 量瓶中，加无水乙醇稀释至刻度，摇匀，离心，取上清液，即得。

2.4 测定方法

精密吸取参照物和供试品溶液各 5 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图，以供试品指纹图谱中与参照物呋喃二烯色谱峰相应的峰为 S 峰，分别计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积，采用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004 版）计算相似度。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取重复性试验项下的 1 号供试品溶液，连续进样 6 次，记录指纹图谱，结果显示各共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别为 0.01%~0.03% 和 0.13%~0.85%，相似度均为 1.000。

2.5.2 重现性试验 精密称取莪术油（批号 080103）6 份，依法制备供试液，进样测定并记录色谱图，计算各共有色谱峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别为 0.01%~0.03% 和 0.50%~1.77%，相似度均为 1.000。

2.5.3 稳定性试验 取供试品溶液分别于 0、4、8、16、32、64 h 进样分析，记录色谱图。结果各共有峰相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别为 0.07%~0.31%、0.29%~0.66%，相似度均为 1.000；

表明供试品溶液在 64 h 内稳定。

2.6 对照指纹图谱与相似度评价

采用 2 家企业提供的 22 批莪术油样品进行 HPLC 分析，生成莪术油对照指纹图谱，见图 1。结果各批次供试品指纹图谱与对照指纹图谱相似，呈现 8 个共有峰；供试品指纹图谱中与参照物呋喃二烯色谱峰相应的峰为 S 峰，8 个共有峰的相对保留时间分别为：0.374 (1)、0.408 (2)、0.568 (3)、0.687 (4)、0.975 (5)、1.000 (S)、1.296 (7)、1.359 (8)，其 RSD 不得超过 ±10%；非共有峰峰面积不得超过总峰面积的 10%。采用国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行计算，样品的指纹图谱与莪术油对照指纹图谱比较，相似度不得低于 0.95。

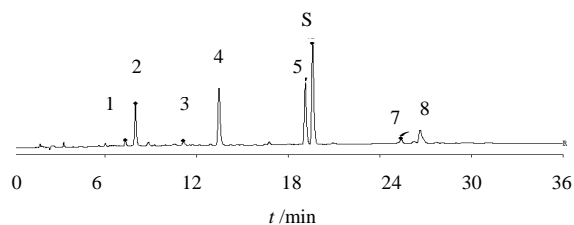


图 1 莪术油对照指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of Zedoary Turmeric Oil

2.7 样品测定

取各批次样品，制备供试品溶液，进样测定，进行分析评价。结果 22 批样品的主要色谱峰整体图貌基本一致，相似度均大于 0.990，共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1%，以浙江天瑞药业有限公司提供的 10 批样品测定结果为例，见表 1~4 和图 2。

表 1 样品共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks of samples

峰号	相对保留时间										均值	RSD/%	
	030101	050102	060301	070101	080320	080321	080401	080501	080701	080901			
1	0.372	0.373	0.372	0.374	0.374	0.373	0.377	0.377	0.377	0.377	0.377	0.375	0.60
2	0.405	0.407	0.405	0.408	0.408	0.407	0.411	0.412	0.411	0.412	0.412	0.409	0.63
3	0.566	0.567	0.566	0.568	0.568	0.567	0.571	0.572	0.572	0.572	0.572	0.569	0.44
4	0.685	0.686	0.685	0.686	0.687	0.686	0.690	0.690	0.690	0.691	0.691	0.688	0.35
5	0.975	0.975	0.975	0.975	0.976	0.975	0.976	0.976	0.976	0.976	0.976	0.975	0.04
S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
7	1.298	1.297	1.299	1.296	1.295	1.296	1.293	1.293	1.292	1.292	1.292	1.295	0.19
8	1.362	1.360	1.363	1.359	1.358	1.359	1.358	1.356	1.356	1.356	1.356	1.359	0.18

表 2 样品共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks of samples

峰号	相对峰面积										均值	RSD/%
	030101	050102	060301	070101	080320	080321	080401	080501	080701	080901		
1	0.039	0.048	0.040	0.039	0.042	0.042	0.049	0.047	0.052	0.049	0.045	10.45
2	0.273	0.462	0.309	0.308	0.293	0.308	0.385	0.354	0.380	0.404	0.348	17.15
3	0.041	0.039	0.037	0.037	0.037	0.039	0.041	0.044	0.042	0.036	0.039	6.95
4	0.467	0.706	0.591	0.588	0.586	0.573	0.608	0.594	0.634	0.645	0.599	10.16
5	0.445	0.622	0.983	0.980	0.623	0.513	0.565	0.518	0.583	0.593	0.642	29.06
S	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
7	0.057	0.035	0.060	0.060	0.068	0.066	0.062	0.078	0.086	0.070	0.064	20.92
8	0.207	0.193	0.263	0.262	0.254	0.220	0.226	0.237	0.254	0.250	0.237	10.23

表 3 非共有峰占总峰面积比

Table 3 Percent of uncommon peak areas

批号	非共有峰所占比例/%	批号	非共有峰所占比例/%
030101	2.43	080321	3.81
050102	2.47	080401	4.12
060301	7.01	080501	6.00
070101	7.02	080701	6.98
080320	2.11	080901	5.14

表 4 样品的相似度

Table 4 Results of sample similarity

批号	相似度	批号	相似度
030101	0.997	080321	0.997
050102	0.990	080401	0.999
060301	0.979	080501	0.997
070101	0.977	080701	0.998
080320	1.000	080901	0.998

2.8 莪术油与其他同科挥发油的指纹图谱比较

为考察该方法的专属性，莪术油提取方法采用水蒸气蒸馏法对 3 批蓬莪术、2 批广西莪术、1 批福建莪术、2 批温郁金以及 1 批片姜黄药材进行挥发油提取，依法制备供试液，进样测定，见图 3。以莪术油为对照 (R)，与广西莪术油 (S1)、蓬莪术油 (S2)、福建莪术油 (S3)、片姜黄油 (S4)、温郁金油 (S5) 的相似度分别为 0.674、0.332、0.719、0.193、0.905。结果表明：莪术油与蓬莪术、桂莪术以及郁金和片姜黄等相关品种的挥发油的色谱图以及相应的相似度进行比较，虽然存在共有峰，但均可得到很好的区别，具有较好的专属性。

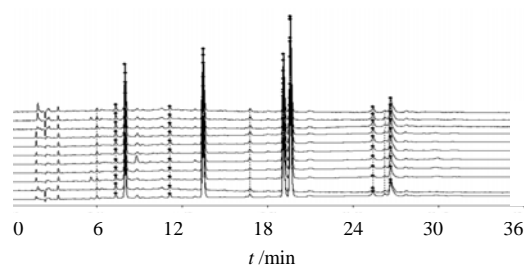


图 2 莪术油样品的指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of Zedoary Turmeric Oil samples

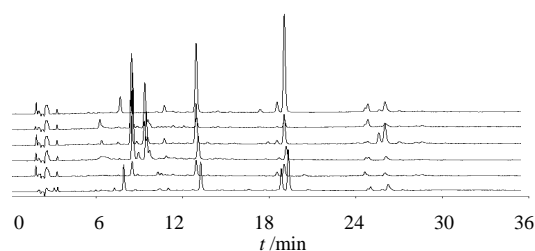


图 3 莪术与其他相关品种的指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of Curcumae Rhizoma and other relative species from same family

3 讨论

气相色谱法是分析挥发性成分的常见手段，但莪术油中的倍半萜类成分多具有 1,5-二烯结构（如牻牛儿酮、莪术二酮、呋喃二烯等），气相色谱测定易导致相关成分热重排和热转化，方法的重现性和可操作性不理想。通过文献查阅和实验研究^[7-9]，液相色谱能够真实地反映莪术油的整体信息，将莪术油与其他品种莪术以及郁金、姜黄的挥发油加以区别，故选择 HPLC 法用于莪术油指纹图谱测定。

莪术油中含有牻牛儿酮、呋喃二烯等倍半萜成分，其中呋喃二烯在整张色谱图中位置居中，分离

良好,为 22 批莪术油样品的共有成分,故选择呋喃二烯作为指纹图谱参照物。

考察了甲醇-水、乙腈-0.1%TFA、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-水等流动相,结果乙腈-水系统样品色谱分离较好,基线较平稳。另因采用恒梯度洗脱不能使样品中主要色谱峰在短时间内得到较好分离,应该采用梯度洗脱。通过全梯度扫描和反复比较,综合考虑峰数、分离度、峰形、峰面积以及基线噪音等因素,确定采用乙腈-水梯度洗脱。在此条件下,采用 DAD 在 200~400 nm 进行全波长扫描,提取不同波长的等吸收图和三维图谱进行比较,发现在 216 nm 处,莪术油的组分成分信息量较多,响应值较高,且色谱图中基线较平稳,故选择检测波长为 216 nm。

目前中药莪术及其挥发油指纹图谱的研究方法大多采用气相色谱^[10-11],少说采用液相色谱法^[12-13],但本实验使用梯度洗脱条件使得呋喃二烯与莪术烯得到有效的分离,且明显缩短了分析时间,由此建立的指纹图谱基本反映了莪术油的内在化学特征。另外在色谱图整体面貌和相似度评价指标两方面较好地反映出莪术油与其他同科莪术以及郁金、姜黄等挥发油内在成分的差异,从而可以很好地鉴别莪术油,有利于整体质量控制,使综合评价结果更加客观真实。

参考文献

- [1] 崔友,孙秀燕,张慧. 薄层色谱法鉴定莪术油中倍半萜类成分的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1120-1121.
- [2] Jacobi S A, Kikuchi A, Gianni S A, et al. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies in mango ginger (*Curcuma armada* Roxb.; Zingiberaceae) [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(6): 507.
- [3] Wilson B, Abraham G, Manju V S, et al. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 99(1): 147.
- [4] 成晓静,刘华钢,赖茂祥,等. 莪术的化学成分及药理作用研究概况 [J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(1): 79-81.
- [5] 黄臣虎,陆茵,孙志广,等. 莪术抗癌作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1745-1747.
- [6] 雷宇,李森,林霖,等. 活血化瘀类中药逆转多药耐药作用的研究概况 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 135-138.
- [7] Auffray B. Protection against singlet oxygen, the main actor of sebum squalene peroxidation during sun exposure, using *Commiphora myrrha* essential oil [J]. *Inter J Cosmet Sci*, 2007, 29: 23.
- [8] Racine P, Auffray B. Quenching of singlet molecular oxygen by *Commiphora myrrha* extracts and menthofuran [J]. *Fitoterapia*, 2005, 76(3-4): 316.
- [9] Adio A M. Germacrenes A-E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations [J]. *Tetrahedron*, 2009, 65(8): 1533.
- [10] 陈旭,曾建红. 广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8): 1363-1366.
- [11] 万明珠,梁逸曾,赵晨曦,等. 温莪术挥发性化学成分分析和指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10): 2428-2430.
- [12] 李敏,张钰苓,贾君君,等. 蓬莪术 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2008, 31(12): 1806-1809.
- [13] 兰泽伦,李敏,李校堃,等. 温莪术 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 920-922.