

毛郁金药材 HPLC 指纹图谱

张琳¹, 周福军^{2,3}, 单淇^{2,3}, 郭青玲⁴, 侯文彬^{2,3*}

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津药物研究院, 天津 300193;
3. 天津市中药质量控制技术工程实验室, 天津 300193; 4. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:建立毛郁金药材的 HPLC 指纹图谱方法,为其质量控制提供依据。方法:采用 Agela Promosil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.5% 冰乙酸水为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 250 nm,分析时间 65 min。对 10 批毛郁金药材进行指纹图谱检测,并对不同产地的药材进行相似度评价和系统聚类分析。结果:建立了毛郁金药材的 HPLC 指纹图谱,确立了 12 个共有峰,相似度评价结果表明,各产地毛郁金药材相似度均 > 0.9。聚类系统分析将来自不同产地的 10 批药材分为 3 类。结论:该方法简便,快速,准确,可作为毛郁金药材的质量控制参考。

[关键词] 毛郁金; 高效液相; 指纹图谱; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0062-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140062

HPLC Fingerprint of Curcumae Aromatic Radix ZHANG Lin¹, ZHOU Fu-jun^{2,3}, SHAN Qi^{2,3}, GUO Qing-ling⁴, HOU Wen-bin^{2,3*} (1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. Tianjin Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines, Tianjin 300193, China; 4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint method of *Curcuma aromatica*, for its quality control. **Method:** Agela Promosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used and eluted with the mobile phase of acetonitrile-0.5% acetic acid solution in a gradient mode, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was at 250 nm, the analytical time was 65 min. 10 batches of *Curcumae Aromatica Radix* were detected, the similarity evaluation and system cluster analysis were conducted for the *Curcumae Aromatica Radix* different origin. **Result:** The HPLC fingerprint of *Curcumae Aromatica Radix* was established. 12 common peaks were indentified in the fingerprint. The similarity comparison indicated that the similarities were all over 0.90. The 10 batches of *Curcumae Aromatica Radix* from different regions can be divided into 3 categories by the hierarchical cluster analysis. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate and can be used for quality control of *Curcumae Aromatica Radix*.

[Key words] *Curcumae Aromatica Radix*; HPLC; fingerprint; cluster analysis

毛郁金是我国重要的民族药材之一,主要分布于广西横县、灵山、南宁等地,具有破血行气、通经止痛作用,主治胸肋刺痛、风湿肩背疼痛、跌扑肿痛等^[1]。现代药理实验证明,毛郁金还具有抗炎^[2]、免疫抑制^[3]、镇痛止血^[4]、抗氧化^[5]等作用。毛郁金根茎中主要含有姜黄素类^[6]和挥发油类成分,此

外还包括树脂类、甾醇类、多肽类、三萜类等成分。目前国内对毛郁金药材的研究仅为化学成分研究,冯洁等^[7]对毛郁金挥发油成分进行 GC-MS 分析,黄艳等^[8]通过多种色谱柱从毛郁金 95% 乙醇提取物中分离并鉴定了 17 种化合物,而未见其指纹图谱研究。本实验通过对 10 批来源不同的毛

[收稿日期] 20141225(008)

[第一作者] 张琳,硕士,从事中药质量标准研究, Tel:15822942635, E-mail:824570454@qq.com

[通讯作者] * 侯文彬,硕士生导师,研究员,从事天然药物研究, Tel:022-23006903, E-mail:houbw@tjipr.com

郁金药材进行 HPLC 指纹图谱分析,以期整体、全面地控制毛郁金药材的质量,为今后其开发利用提供科学依据。

1 材料

P680 型高效液相色谱仪, (包括 P680 型输液泵、ASI-100 型自动进样器、柱温箱及紫外检测器, chameleon 色谱工作站, 美国戴安)。BK-240A 型超声波清洗机 (巴克超声波科技集团有限公司), BP211 型电子分析天平 (德国赛多利斯)。莪术二酮对照品 (成都普菲德生物技术有限公司, 批号 130713), 莪术二醇、原莪术醇对照品均为自制, 所有对照品纯度均 >98%。乙腈 (美国 Fisher 化学试剂公司, 色谱纯), 冰乙酸 (天津市康科德科技有限公司, 分析纯), 甲醇 (天津市康科德科技有限公司, 分析纯), 水为纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。10 批毛郁金药材产地见表 1。所有药材均经天津药物研究院中药部侯文彬研究员鉴定为姜科植物毛郁金 *Curcuma aromatica* 的干燥根茎。

表 1 毛郁金药材来源

Table 1 Origins of Curcuma Aromatica Radix

No.	产地	No.	产地
S1	广西横县	S6	广西横县
S2	广西桂林	S7	广西桂林
S3	湖北黄冈	S8	湖北黄冈
S4	广西桂林	S9	湖北黄冈
S5	湖南新田	S10	湖北黄冈

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agela Promosil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 250 nm, 进样量 20 μL, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 流动相乙腈(A)-0.5%冰乙酸水(B)梯度洗脱(0~50 min, 15%~85% A; 50~50.1 min, 85%~15% A; 50.1~65 min, 15% A)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取莪术二酮、莪术二醇、原莪术醇对照品适量, 分别加甲醇制成 0.199 0 g·L⁻¹ 的莪术二酮对照品溶液, 0.015 2 g·L⁻¹ 的莪术二醇对照品溶液, 0.029 5 g·L⁻¹ 的原莪术醇对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取毛郁金药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取毛郁金 (S1) 供试品溶液, 连续进样 6 次, 分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明, 各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1.5%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.4%。表明该方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取毛郁金 (S1) 药材样品 6 份, 按 2.2.2 项下方法操作制备供试品溶液, 进样分析, 测得各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1.8%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3.8%。表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取毛郁金 (S1) 供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 进行分析, 考察其共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.6%, 相对峰面积 RSD 均 < 3.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.4 毛郁金药材指纹图谱的建立^[9-10]

2.4.1 毛郁金样品 HPLC 指纹图谱测定 按 2.1 项下色谱条件测定 10 批样品, 根据检测结果建立毛郁金药材的 HPLC 指纹图谱, 见图 1~4。以保留时间 9.73 min 的 1 号峰作为参照峰 S, 共确立 12 个共有峰, 并对各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积进行计算, 其中各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.15%, 但各相对峰面积的 RSD 均较大, 说明不同产地的药材成分含量相差较大, 结果见表 2, 3。

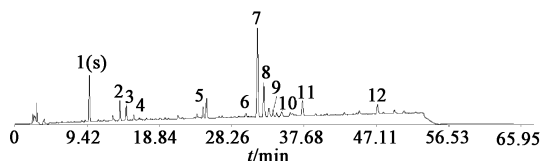


图 1 毛郁金对照药材 HPLC 指纹谱

Fig.1 Reference fingerprint of Curcuma Aromatica Radix

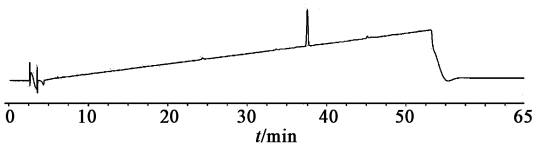


图 2 莪术二酮对照品 HPLC

Fig.2 HPLC chromatograms of curdione

2.4.2 相似度分析 将 10 批不同来源的毛郁金药材的色谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A)版相似度软件, 以均值法生成对照指纹图谱。10 批样品与对照指纹图谱相似度在 0.943~0.995, 提示药材质量相对较稳定, 结果见表 4。

2.5 系统聚类分析 将不同来源的毛郁金 HPLC

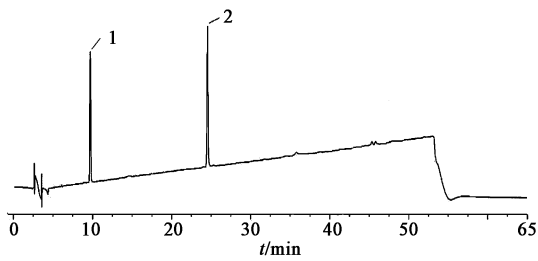


图 3 莪术二醇(1),原莪术醇(2)对照品 HPLC

Fig.3 HPLC chromatograms of aerugi-diol and procurcumenol

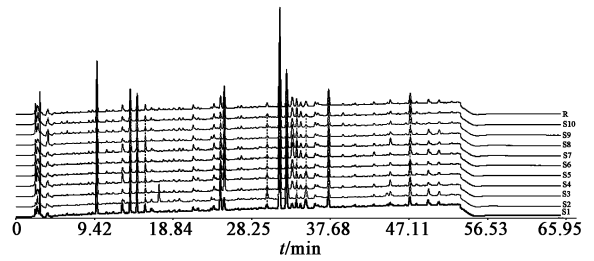


图 4 10 批毛郁金药材 HPLC 指纹谱

Fig.4 HPLC fingerprint of 10 batches of Curcuma Aromatica Radix

表 2 10 批药材共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks of 10 batches of Curcuma Aromatica Radix

No.	1(S)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	1.000 0	1.409 5	1.494 9	1.595 7	2.523 7	3.096 7	3.252 1	3.336 4	3.459 9	3.576 1	3.853 9	4.858 0
S2	1.000 0	1.409 0	1.494 3	1.595 1	2.522 1	3.094 6	3.249 7	3.335 0	3.458 4	3.573 5	3.852 0	4.856 1
S3	1.000 0	1.410 1	1.495 4	1.596 1	2.523 1	3.095 6	3.249 7	3.335 0	3.457 3	3.572 5	3.851 0	4.854 1
S4	1.000 0	1.410 1	1.495 4	1.594 0	2.522 1	3.094 6	3.248 7	3.334 0	3.456 3	3.572 5	3.851 0	4.855 1
S5	1.000 0	1.408 6	1.494 9	1.593 4	2.520 5	3.091 4	3.246 4	3.331 6	3.453 8	3.569 8	3.848 0	4.850 1
S6	1.000 0	1.410 1	1.495 4	1.594 0	2.522 1	3.094 6	3.249 7	3.334 0	3.457 3	3.572 5	3.852 0	4.855 1
S7	1.000 0	1.409 7	1.494 9	1.594 5	2.520 5	3.093 4	3.247 4	3.332 6	3.456 9	3.570 8	3.849 1	4.852 2
S8	1.000 0	1.410 5	1.494 9	1.596 7	2.523 7	3.098 8	3.253 1	3.338 5	3.463 0	3.576 1	3.856 0	4.862 1
S9	1.000 0	1.410 9	1.495 4	1.597 3	2.525 2	3.103 0	3.256 4	3.341 9	3.466 5	3.579 8	3.859 9	4.868 2
S10	1.000 0	1.411 3	1.495 9	1.599 0	2.527 8	3.106 2	3.259 8	3.345 4	3.471 1	3.583 5	3.862 9	4.872 2

表 3 10 批药材共有峰相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks of 10 batches of Curcuma Aromatica Radix

No.	1(S)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S1	1.000 0	0.396 0	0.474 8	0.154 2	0.669 8	0.100 5	1.573 9	0.879 2	0.180 4	0.301 1	0.379 5	0.225 4
S2	1.000 0	0.883 8	0.789 1	0.275 9	1.098 9	0.784 0	7.741 5	3.456 7	0.290 1	1.118 2	0.987 4	0.920 9
S3	1.000 0	0.437 7	0.383 7	0.145 9	0.259 5	0.106 2	3.640 6	1.230 8	0.205 3	0.160 2	0.590 3	0.364 3
S4	1.000 0	0.410 9	0.447 1	0.120 4	0.487 1	0.140 0	3.708 7	1.464 4	0.205 7	0.336 3	0.593 2	0.469 4
S5	1.000 0	0.436 0	0.275 1	0.169 5	0.200 4	0.067 3	1.490 4	0.705 1	0.088 2	0.111 5	0.358 2	0.156 4
S6	1.000 0	0.417 9	0.332 8	0.132 2	0.285 7	0.115 2	4.465 8	1.480 0	0.393 9	0.201 3	0.601 4	0.449 7
S7	1.000 0	0.457 8	0.367 4	0.158 8	0.183 9	0.071 9	1.593 1	0.718 1	0.136 6	0.116 2	0.361 7	0.166 5
S8	1.000 0	0.457 4	0.346 6	0.102 0	0.152 3	0.076 0	2.609 4	0.950 1	0.185 8	0.124 3	0.418 6	0.298 4
S9	1.000 0	0.479 9	0.349 5	0.086 8	0.130 9	0.093 9	2.307 0	0.841 1	0.174 2	0.075 1	0.448 0	0.387 9
S10	1.000 0	0.473 3	0.341 3	0.092 1	0.131 4	0.094 7	2.510 2	0.856 5	0.189 3	0.083 0	0.487 2	0.373 3

图谱中 12 个共有峰峰面积标准化组成 10×12 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 19.0 软件,采用组间联接法,利用 Euclidean 距离为测度,进行系统聚类分析,见图 5。根据聚类分析结果,可将 10 批毛郁金药材分为 3 类,其中 S2,S3,S4,S6,S8,S9,S10 聚为 I 类,S5,S7 聚为 II 类,S1 为 III 类。

3 讨论

考察比较了甲醇,70% 乙醇和 90% 乙醇等不同

溶剂和超声、回流、冷浸等方法,其中以甲醇超声 30 min 提取的样品色谱峰信息较丰富。分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-冰乙酸水、乙腈-冰乙酸水等流动相系统,结果显示本实验采用的流动相具有较高的分离度。对莪术二酮、莪术二醇、原莪术醇 3 种对照品溶液在 200 ~ 400 nm 紫外波长进行扫描,发现在 250 nm 波长处均有吸收,综合考虑分离度和色谱峰信息等方面,选择 250 nm 作为检测波长。

表 4 毛郁金药材指纹图谱相似度评价

Table 4 Similarity analysis of HPLC fingerprint of *Curcuma Aromatica Radix*

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照
S1	1.000	0.883	0.912	0.933	0.957	0.894	0.961	0.931	0.938	0.929	0.950
S2	0.883	1.000	0.948	0.946	0.855	0.944	0.863	0.929	0.920	0.924	0.943
S3	0.912	0.948	1.000	0.991	0.945	0.994	0.949	0.988	0.984	0.990	0.992
S4	0.933	0.946	0.991	1.000	0.947	0.990	0.956	0.985	0.980	0.981	0.993
S5	0.957	0.855	0.945	0.947	1.000	0.925	0.994	0.964	0.970	0.968	0.970
S6	0.894	0.944	0.994	0.990	0.925	1.000	0.935	0.986	0.974	0.978	0.985
S7	0.961	0.863	0.949	0.956	0.994	0.935	1.000	0.972	0.979	0.972	0.976
S8	0.931	0.929	0.988	0.985	0.964	0.986	0.972	1.000	0.991	0.990	0.995
S9	0.938	0.920	0.984	0.980	0.970	0.974	0.979	0.991	1.000	0.997	0.994
S10	0.929	0.924	0.990	0.981	0.968	0.978	0.972	0.990	0.997	1.000	0.994
对照	0.950	0.943	0.992	0.993	0.970	0.985	0.976	0.995	0.994	0.994	1.000

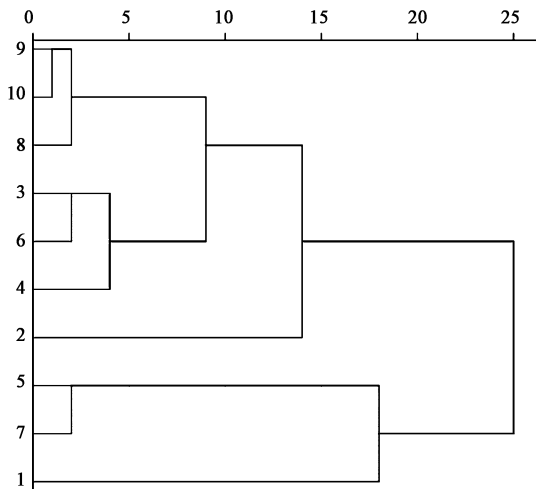


图 5 10 批药材指纹图谱聚类分析

Fig. 5 Clustering analysis of fingerprint of 10 batches of *Curcuma Aromatica Radix*

建立了毛郁金药材的指纹图谱,该方法具有良好的精密度、重复性和稳定性,确立了 12 个共有峰,其中可用对照品确定的有 3 个,分别为莪术二醇,莪术二酮,原莪术醇,但其他共有峰的归属还有待进一步研究。

相似度评价结果表明,10 批药材相似度均 > 0.9,表明不同产地的毛郁金药材质量比较稳定,但从相对峰面积比来看,药材成分含量差异较大。采用聚类分析将不同来源的毛郁金药材分为 3 类,发现分类结果与产地分布并不完全吻合,结合相似度评价结果说明来源不同的毛郁金药材的质量存在一定差异,可能还和药材的种植、采收和贮藏等因素有关,需进一步进行考察研究。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局编. 广西壮族自治区壮药质量标准. 第 2 卷[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2011:53.
- [2] 黄勇其,耿晓照,叶世芸,等. 黔产毛郁金与姜黄的抗炎镇痛作用及急性毒性比较[J]. 时珍国医国药, 2007,18(5):1053-1054.
- [3] 李陵夫,贾宽,杨宝华,等. 郁金 1 号注射液对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 中医学报,1987,27(2):39-41.
- [4] 黄勇其,莫艳珠,耿晓照,等. 黔产毛郁金的镇痛、止血作用实验研究[J]. 现代中药研究与实践,2004,18(4):46-48.
- [5] Al-Reza S M, Rahman A, Sattar M A, et al. Essential oil composition and antioxidant activities of *Curcuma aromatica* Salisb. [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(6):1757-1760.
- [6] 梁冰,覃兰芳,赖茂祥,等. 高效液相色谱法测定广西壮药毛郁金中姜黄素的含量[J]. 广西科学,2012,19(2):149-151.
- [7] 冯洁,徐明明,黄秀兰,等. 不同生长期毛郁金挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 中药材,2013,36(12):1926-1929.
- [8] 黄艳,柴玲,蒋秀珍,等. 毛郁金的化学成分研究[J]. 中草药,2014,45(16):2307-2311.
- [9] 徐锋,杨焯,舒秋娥,等. 芭蕉根的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(15):111-114.
- [10] 史国玉,刘伟,耿岩玲,等. 瓜蒌皮药材的 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(1):73-76.

[责任编辑 顾雪竹]