

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.12.007

不同产地姜黄药材高效液相色谱指纹图谱与化学模式识别研究*

黄卫娟, 韦卓纯, 姜松, 林绘, 杨丽玲[△]

(暨南大学医学院附属东莞医院药学部, 广东 东莞 523900)

摘要:目的 建立姜黄药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,结合化学模式识别技术,为姜黄药材鉴别和质量评价提供依据。方法 色谱柱为 Shimadzu ODS-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2% 甲酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,柱温为 35℃,检测波长为 254 nm,进样量为 10 μL。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)”计算相似度,结合聚类分析和主成分分析对姜黄药材进行模式识别。结果 姜黄药材的 HPLC 对照指纹图谱中有 11 个共有峰,并指认了其中 3 个共有峰成分;10 批药材可聚为 3 类,分析确定了 4 个主成分。结论 该 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别可为姜黄药材的质量控制和品质评价提供参考。

关键词:姜黄;高效液相色谱指纹图谱;化学模式识别;主成分分析;聚类分析

中图分类号:R932;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)12-0024-04

HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition of *Curcuma Longa* from Different Regions

HUANG Weijuan, WEI Zhuochun, JIANG Song, LIN Hui, YANG Liling

(Department of Pharmacy, The Dongguan Affiliated Hospital of Medical College of Jinan University, Dongguan, Guangdong, China 523900)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of *Curcuma longa*, and to provide the basis for the identification and quality evaluation of *Curcuma longa* by combining with chemical pattern recognition. **Methods** The chromatographic column was Shimadzu ODS-C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% formic acid solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 35℃, the detection wavelength was 254 nm, and the sample size was 10 μL. The similarity was calculated by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM(2004 A edition). The pattern recognition of *Curcuma longa* was carried out by cluster analysis and principal component analysis. **Results** There were 11 common peaks in the HPLC reference fingerprint of *Curcuma longa* and 3 common peaks were identified. 10 batches of medicinal materials could be grouped into 3 categories and 4 main components were identified. **Conclusion** The HPLC fingerprint of *Curcuma longa* combined with chemical pattern recognition can provide reference for quality control and quality evaluation of *Curcuma longa*.

Key words: *Curcuma longa*; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition; principal component analysis; cluster analysis

姜黄为姜科姜黄属多年生草本植物,具有破血行气、通经止痛的功效,临床用于治疗胸痹心痛、痛经经闭、跌扑肿痛等^[1]。姜黄主要成分是姜黄素类化合物,包括姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素等成分,具有抗癌^[2-4]、抗炎^[5]、抗氧化^[6]、抗动脉粥样硬化^[7-8]和保护中枢神经系统^[9-11]等多种药理活性,已被广泛用于食品添加剂(无毒天然色素^[12])、化妆品(抗氧化、抗衰老)和医药(抗癌、抗抑郁^[13-15])等领域。姜黄和片姜黄均为姜科植物,前者源于姜黄干燥根茎,性温,祛瘀力强,常用于治疗寒凝气滞血瘀之证;后者源于温郁金干燥根茎,性寒,行气力强,以治疗血热瘀滞之证效佳^[16]。但因两者名称相似,来源相近,药典收录的功能主治相同^[1],临床使用中时常混淆,加之市场上流通的姜黄药材品种混乱,质量差异较大,直接影响姜黄的药效。中药指纹图谱能全面反映中药的质量与临床疗效,常被用于

控制中药的质量及区分易混淆的中药材^[17]。而聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA)常被用于色谱指纹图谱的数据处理^[17],进而比较各药材样品的质量差异。本研究中基于高效液相色谱(HPLC)技术,应用化学模式识别技术中的 HCA 和 PCA 技术研究市售姜黄药材的质量差异,为姜黄药材的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

C-15C 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司); BT25S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); BY-320C 型低速医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司); KQ-300 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

姜黄素对照品(批号为 DST170111-014,纯度≥99%),去甲氧基姜黄素对照品(批号为 DST160920-30,纯度≥

*基金项目:广东省中医药局面上科研课题[20171274]。

第一作者:黄卫娟,女,大学本科,副主任药师,研究方向为中药学,(电子信箱)710753877@qq.com。

[△]通信作者:杨丽玲,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药学,(电话)0769-85010062(电子信箱)yll138@126.com。

98%),双去甲氧基姜黄素对照品(批号为DST160920-21,纯度 $\geq 98\%$),均购自成都德思特生物技术有限公司;乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);无水乙醇(分析纯,广州市中南化学试剂有限公司);水为超纯水。10批姜黄药材(具体信息见表1)。

表1 姜黄药材样品来源

序号	产地	批号	序号	产地	批号
S1	四川	20160801	S6	四川	201608192
S2	福建	1608001	S7	广东	0706051-02
S3	福建	1701001	S8	云南	150601
S4	四川	20170501	S9	四川	161101
S5	福建	1706001	S10	安徽	170901

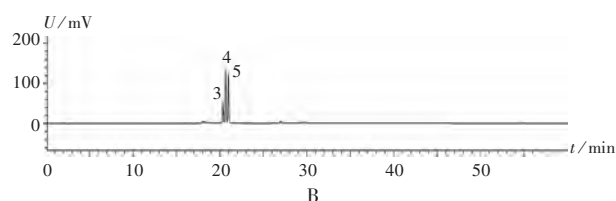
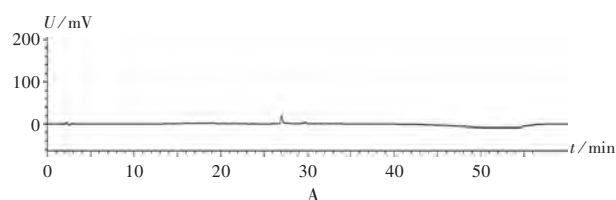
2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimadzu ODS-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.2%甲酸溶液,梯度洗脱(见表2);检测波长:254 nm;柱温:35 $^{\circ}$ C;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μ L。在此色谱条件下的色谱图见图1。

表2 流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	乙腈 (%)	0.2%甲酸 溶液(%)	时间 (min)	乙腈 (%)	0.2%甲酸 溶液(%)
5	10	90	50	100	0
15	60	40	52	10	90
35	75	25	60	10	90
45	100	0			



3. 双去甲氧基姜黄素 4. 去甲氧基姜黄素 5. 姜黄素
A. 空白对照溶液 B. 混合对照品溶液

图1 高效液相色谱图

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:称取姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素各2.5 mg,精密称定,分别置25 mL具塞锥形瓶中,加甲醇溶解并定容,得质量浓度均为100 μ g/mL的单一对照品溶液;分别精密量取2.5 mL,置10 mL棕色容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得。

供试品溶液:取药材样品适量,粉碎,过5号筛,称取0.2 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入75%乙醇20 mL,超声提取(功率300 W,频率40 kHz)20 min,冷却,摇匀,5 000 r/min离心10 min,取上清液,经0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

空白对照溶液:以流动相作为空白对照溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:依法制备供试品(批号为20160801)溶液,按拟订色谱条件,连续进样6次,测定,以姜黄素峰(5号峰)为参照峰,分别测得其中11个色谱峰的相对峰面积和相对保留时间,并计算RSD。结果11个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.03% ($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.00% ($n=6$),表明方法精密程度良好。

稳定性试验:依法制备供试品(批号为20160801)溶液,按拟订色谱条件,室温下分别于0,2,6,8,12,24,48 h时进样测定,以姜黄素(5号峰)为参照峰,分别测得其中11个色谱峰的相对峰面积和相对保留时间,并计算RSD。结果11个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.10% ($n=7$),相对峰面积的RSD均小于2.64% ($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置48 h内稳定。

重复性试验:称取同一姜黄药材样品(批号为20160801)6份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,以姜黄素峰(5号峰)为参照峰,分别测得其中11个色谱峰的相对峰面积和相对保留时间,并计算RSD。结果11个共有峰相对保留时间的RSD均小于0.20% ($n=6$),相对峰面积的RSD均小于2.00% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立与分析

共有模式的建立及共有峰确定:取10批药材样品各适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录色谱图。通过“中药指纹图谱相似度评价系统(2012 A版)”软件生成对照指纹图谱色谱图,并对10批姜黄样品的色谱指纹峰进行匹配并叠加(见图2),得11个共有峰(见图3)。可见,10批药材样品的指纹图谱无明显差异,均可用于共有峰的确定。

相似度评价:采用“中药指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”对药材样品指纹图谱进行相似度评价,结果对照指纹图谱的相似度均不小于0.919,见表3,表明不同批次药材间相似度良好。

聚类分析:采用SPSS 19.0统计学软件对图3中11个共有峰的相对峰面积进行系统聚类,采用组间联接的聚类方法,以欧氏距离为区间进行聚类分析,生成聚类树状图(见图4),10批药材样品大致可分为3类,

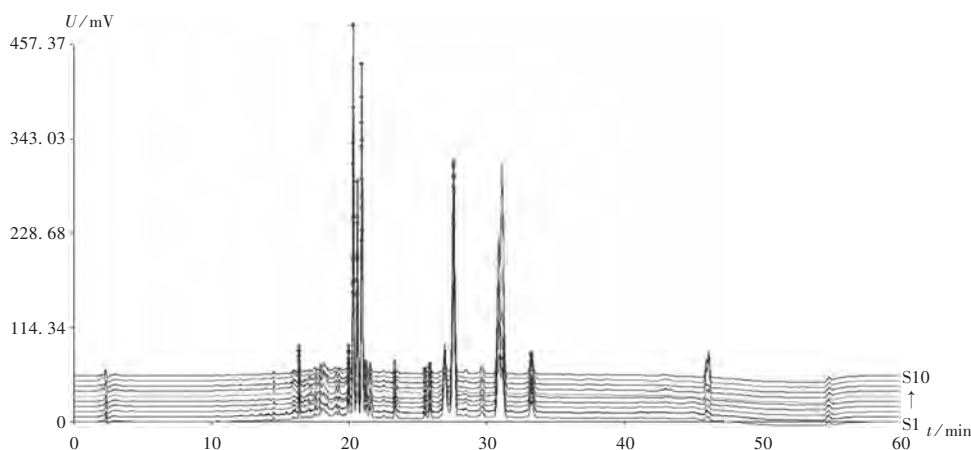


图2 10批药材样品的HPLC叠加指纹图谱

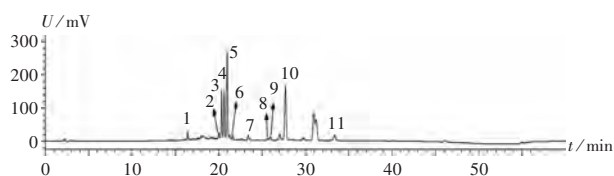


图3 10批药材样品HPLC对照指纹图谱

表3 10批药材样品的相似度评价

样品	相似度	样品	相似度	样品	相似度
S1	0.985	S5	0.919	S9	0.989
S2	0.990	S6	0.975	S10	0.974
S3	0.994	S7	0.984		
S4	0.999	S8	0.984		

S2,S3,S6,S8,S1,S9,S4,S7 为第一类;S5 为第二类;S10 为第三类,可见,S5,S10 与其余 8 批次药材样品比较有明显差异。

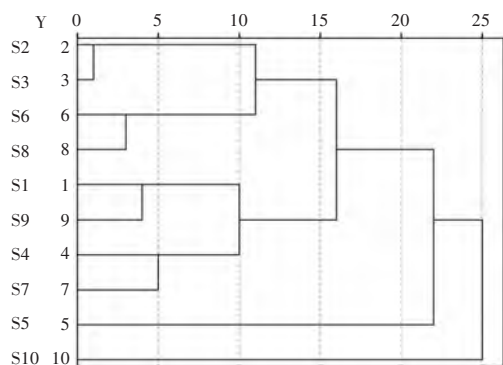


图4 聚类分析树状图

主成分分析:采用 SPSS 19.0 统计学软件,以 10 批药材样品中 11 个共有峰面积原始值为变量,计算主成分特征值、累积贡献率及主成分得分。由主成分特征值和累积贡献率(表 4)、碎石图(图 5)得知,前 4 个特征值的累积贡献率达 92.902%,说明前 4 个因子在反映不同来源姜黄与 11 个共有成分的相互关系中起主导作用,能用于评价姜黄药材的品质。其中,主成分 1 主要反映了 3,4,5,8,9 号色谱峰的信息,主成分 2 主要反映了 1,2,10,11 号色谱峰的信息,主成分 3 主要反映了 7 号

色谱峰的信息,主成分 4 主要反映了 6 号色谱峰的信息(见表 5)。结果表明,通过 PCA 分析降维处理后所提取的 4 个主成分能代表姜黄指纹图谱中 11 个共有峰的主要信息。以主成分的变量得到的载荷图(图 6)结果与初始因子载荷矩阵表相同,距离原点较远的几个点就是主成分 1 中权重较大的成分,表明其在决定不同批次样品质量差异上起重要作用。

表4 主成分特征值和累积贡献率

主成分	特征值(λ)	贡献率(%)	累积贡献率(%)
1	4.610	41.905	41.905
2	2.997	27.246	69.151
3	1.469	13.350	82.501
4	1.144	10.401	92.902

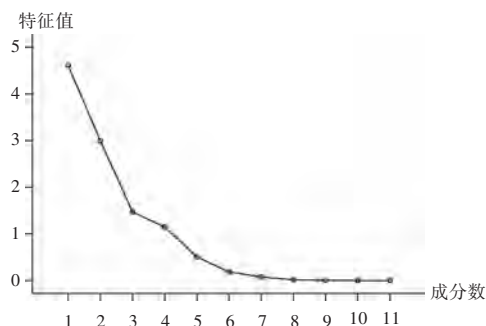


图5 碎石图

3 讨论

预试验中比较了水、无水乙醇、40%乙醇、75%乙醇、甲醇、30%甲醇、60%甲醇 7 种提取溶剂,加热回流、超声 2 种提取方法,10,20,30,60 min 4 种提取时间及 10,20,40,50 mL 4 种提取溶剂体积等制备方法,结果以 20 mL 75%乙醇超声提取 20 min 时所得提取率最佳。

比较了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.2%甲酸溶液 5 种流动相及 13 个梯度洗脱条件,结果以乙腈-0.2%甲酸溶液为流动相时,梯度洗脱获得色谱峰多且分离度好。考察了 254 nm 和 265 nm 2 个检测波长,结果显示,在

表5 初始因子载荷矩阵

峰号	主成分			
	1	2	3	4
1	-0.429	0.729	0.391	0.158
2	-0.291	0.800	-0.217	-0.295
3	0.867	-0.036	0.195	-0.393
4	0.959	-0.123	0.065	-0.097
5	0.873	0.142	-0.200	0.349
6	0.116	0.467	0.437	0.730
7	0.141	0.069	0.892	-0.326
8	0.960	0.226	0.086	-0.101
9	0.905	-0.121	-0.071	0.237
10	0.149	0.943	-0.024	-0.198
11	0.331	0.782	-0.432	-0.045

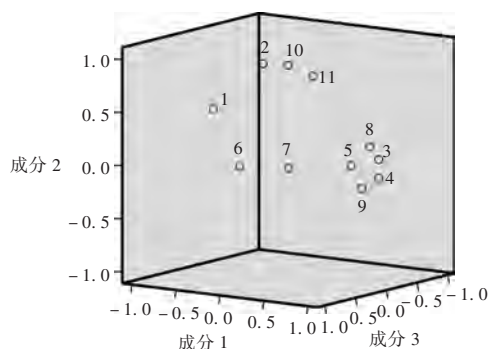


图6 10批药材样品的载荷图

254 nm 波长处各色谱峰峰形好且峰面积较大,故选定为检测波长。比较了 30, 35, 40 °C 3 种柱温,结果柱温为 35 °C 时获得的各色谱峰峰面积、拖尾因子、分离度均较好。分别以 0.8, 1.0 mL/min 为流速进行比较,结果 1.0 mL/min 流速下峰面积较大且出峰时间合适。

10 批药材样品与对照指纹图谱的相似度为 0.919 ~ 0.999,说明不同产地姜黄药材间相似度较好。这也提示了单一的相似度评价难以全面地反映不同产地姜黄药材的差异性。为了更全面、整体地评价各个产地姜黄的质量差异,采用化学模式识别方法中的 HCA 和 PCA 进一步分析,建立药材样品的 HCA 和 PCA 分类模型,发现批次 S5 和 S10 与其余 8 批次比较有明显差异,并确定了 4 个主成分,筛选出 5 个差异性成分,指出了其中 3 个成分,分别为姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素。

综上所述,本研究中建立的姜黄 HPLC 指纹图谱较理想,结合化学模式识别技术可用于姜黄药材的质量控制,为中药材的识别和化学成分的比较提供了参考,亦为课题组后续关于单味中药姜黄对斑马鱼内毒素性炎症损伤保护作用及作用机制的研究提供了试验用材、试验用制剂质量控制的依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 74, 264.
- [2] 朱亚平, 卜淑蕊. 姜黄素抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(3): 91-93.
- [3] 赵建通, 张磊, 刘文瞻, 等. 姜黄素通过 Erk1/2 信号通路抑制人肾癌细胞 786-O 在裸鼠体内增殖[J]. 温州医科大学学报, 2017, 47(10): 735-738.
- [4] 陈昌明, 刘慧芳, 曹雪姣, 等. 姜黄素对人宫颈癌 Hela 细胞增殖的抑制作用[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 1006-1008.
- [5] 姜程曦, 林良义, 宋娇, 等. 姜黄素类似物抑制炎症反应缓解 1 型糖尿病肾损伤实验研究[J]. 中草药, 2015, 46(12): 1785-1790.
- [6] 宋立敏, 张迪, 张杰, 等. 姜黄素类化合物体外抗氧化作用及其构-效关系研究[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2018, 31(2): 121-126.
- [7] 周音频, 宁琳, 向立权, 等. 姜黄素增强脂多糖跨膜转运的机制及其抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(7): 1617-1619.
- [8] 邱韵, 李家富, 冯健, 等. 酸化环境对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响及姜黄素对此的作用[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(2): 199-206.
- [9] 陈飞, 王皓香, 向鑫, 等. 姜黄素对神经干细胞 Wnt/p-catenin 信号通路表达影响的离体研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(8): 764-768.
- [10] YENER GG, BASAR E. Biomarkers in Alzheimer's disease with a special emphasis on event-related oscillatory responses[J]. Suppl Clin Neurophysiol, 2013, 62: 237-273.
- [11] 马翊弦, 俞春江, 李峰, 等. 姜黄素应用于阿尔茨海默病的机制研究进展[J]. 疑难病杂志, 2014, 13(5): 539-541.
- [12] 张娜, 翁伟锋. 天然可食用姜黄色素的研究进展[J]. 山东化工, 2017, 27(21): 72-73.
- [13] 马致洁, 张祎, 董捷鸣, 等. 基于代谢组学方法的姜黄素抗抑郁作用生物标志物初步筛查[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(18): 3596-3601.
- [14] 王雪婷, 李宁, 刘婷, 等. 姜黄素脂质体载药量与体外抗肿瘤效果的关系[J]. 中国药业, 2018, 27(8): 1-5.
- [15] 陈永宏, 高月. 姜黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖凋亡和侵袭能力的影响[J]. 中国药业, 2018, 27(23): 9-12.
- [16] 吴东雪, 候宁, 李晶, 等. 基于药性组合的姜黄、郁金、莪术的性效关系研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 229-234.
- [17] 童凯, 李昭玲, 闫桑, 等. 基于 HPLC 指纹图谱比较分析川牛膝及其混淆品的化学成分特征[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2424-2427.

(收稿日期: 2019-02-02)