

CO₂超临界流体色谱法建立片姜黄指纹图谱检查方法的研究

唐登峰, 黄琴伟, 周颖, 毛思浩(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要:目的 采用 CO₂超临界流体色谱法, 建立片姜黄指纹图谱的检查方法。方法 相似度测定采用 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm), 以 CO₂-乙腈为流动相, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 216 nm, 柱温为 55 °C, 背压为 2 000 psi。结果 建立的片姜黄指纹图谱检查方法可用于片姜黄相似度的测定, 15 批样品的平均相似度为 0.968, RSD 为 2.6%, 而测定其他非正品来源的相似度均<0.400。结论 建立的方法快捷、稳定且环境友好, 能够较好地地区分片姜黄和其他非正品。

关键词: CO₂超临界流体色谱法; 片姜黄; 指纹图谱

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)18-2285-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.18.010

引用本文:唐登峰, 黄琴伟, 周颖, 等. CO₂超临界流体色谱法建立片姜黄指纹图谱检查方法的研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(18): 2285-2289.

Study on the Fingerprint of Wenyujin Rhizoma Concisum by CO₂-supercritical Fluid Chromatography

TANG Dengfeng, HUANG Qinwei, ZHOU Ying, MAO Sihao(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop the fingerprint of Wenyujin Rhizoma Concisum by CO₂-supercritical fluid chromatography(CO₂-SFC). **METHODS** The determination of similarity was performed on a ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB analytical column(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm) with CO₂(A)-acetonitrile(B) as mobile phase in a gradient elution program at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 216 nm. The column temperature was maintained at 55 °C. And the back pressure was 2 000 psi. **RESULTS** The established determination method for the fingerprint of Wenyujin Rhizoma Concisum could be used for the similarity determination on it, the average similarities of the 15 batches was 0.968 with RSD was 2.6%, while the unofficial samples were <0.400. **CONCLUSION** The developed method is simplify, rapidly, stability, and environmental friendly, which is helpful to identify the official and unofficial samples of Wenyujin Rhizoma Concisum.

KEYWORDS: CO₂-supercritical fluid chromatography; Wenyujin Rhizoma Concisum; fingerprint

超临界流体色谱法(supercritical fluid chromatography, SFC)收载于中国药典 2015 年版四部^{[1]64-65}, 主要是以 CO₂超临界流体作为流动相的一种色谱方法。该方法具有较好的流动性和较高的溶解性能, 且具有绿色环保、价格低廉、可调节的空间宽泛等特点, 特别是在 CO₂流体和不同的共溶剂等多种因素(如温度、背压以及柱填料等)的协同调控下, 大大提高了分离物质的极性范围和色谱峰之间的分离能力。虽然 CO₂-SFC 法不及 HPLC/UPLC 或 GC 应用广泛, 但由于它独特的分离能力, 已成为一种与 HPLC 和 GC 相互补充的实验室定量定性分析方法。SFC 除了在异构体等结构类似物的测定中有突出的优势外^[2], 它在中药、天然产物研究中的报道也越来越多^[3-7]。

片姜黄药材收载于中国药典 2015 年版一部, 具有破血行气、通经止痛的功效。该药材的法定

来源仅为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎^{[1]74}。它和温莪术均来源于同一药用部位(温郁金的根茎), 因炮制方法不同而分别收载于中国药典。而莪术药材在药典中有 3 个来源, 另有同科同属的蓬莪术(*Curcuma phaeocaulis* Val.) 和广西莪术(*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang)^{[1]274-275}, 制法均为“……蒸或煮至透心, 晒干或低温干燥后除去须根和杂质”, 但也有文献, 如《中药大辞典》(第二版)中记载的莪术采收加工方法有 2 种^[8], 除了蒸或煮以外, “也可将根茎放入清水中浸泡, 捞起, 沥干水, 润透, 切薄片, 晒干或烘干”, 这种制法也见于其他文献^[9-10], 该法基本上就与片姜黄的制法没有差别, 切片只是有厚薄之分, 特别是蓬莪术或广西莪术若是按此法加工, 临床使用中, 它们就很有可能与片姜黄发生混淆。

基金项目: 浙江省科技厅分析测试科技计划项目(2016C37064)

作者简介: 唐登峰, 男, 博士, 主任中药师

Tel: (0571)87180345

E-mail: tdfengde@163.com

片姜黄作为温郁金根茎的厚切片, 在中国药典中也有一定的应用, 如中国药典 2015 年版收载的成方制剂“人参再造丸”“丹桂香颗粒”“朴沉化郁丸”“再造丸”以及“舒肝丸”等处方中就涉及片姜黄^[1465-466, 679-680, 827-829, 1600-1602], 虽然有不少文献报道了片姜黄的研究^[11-13], 但尚未见以 CO₂-SFC 对片姜黄研究的文献报道, 笔者所在课题组实地采收并加工制成的片姜黄药材 15 批次, 采用 CO₂-SFC 法建立了指纹图谱检查方法, 并进行了相似度的测定, 同时取得另外 2 个来源莪术, 同片姜黄切厚片法制成的切制品进行了测定比较。

药典中是通过总挥发油的测定来作为片姜黄的含量测定项目^[174], 提示所含挥发性成分仍是目前所关注的主要功效成分, 但该方法专属性较差, 没有从所含的主要化学成分上表征药材的品质, 故笔者考虑通过建立片姜黄指纹图谱的方法, 采用 CO₂-SFC 建立片姜黄的指纹图谱模板, 根据测定的相似度结果研究片姜黄和所采集到的另外 2 种来源的莪术(同片姜黄切厚片法)的切制品之间的差别, 为后续研究温郁金道地性奠定基础。

1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPC² 超高效合相色谱仪, 包括两相管理器、二元溶剂管理器、单区色谱柱管理器、样品管理器、光电二极管阵列检测器; XPE-205 电子天平(Mettler Toledo); MM400 冷冻混合球磨机(德国 Retsch 公司); 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); ASE350 加速溶剂萃取仪(美国 Thermo 公司)。

呋喃二烯对照品(批号: 111824-201102; 含量以 99.4% 计)、莪术二酮对照品(批号: 111800-201302; 含量以 99.8% 计)、牻牛儿酮对照品对照品(批号: 111665-201605; 含量以 99.8% 计), 均供含量测定用, 均购自中国食品药品检定研究院。

高纯 CO₂(杭州新世纪混合气体有限公司, 纯度: 99.995%); 氮气(杭州新世纪混合气体有限公司); 乙腈、甲醇均为色谱纯, 均购自 Merck 公司; 己烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 硅藻土(Dionex ASE PrepDE, 美国 Thermo 公司)。

片姜黄药材是从温郁金主产地(浙江瑞安)经实地采收并加工而得; 另外 2 种来源莪术的切制品, 也是在 2 个主产地(广西玉林和四川双流)经实地采样并切制干燥而得, 上述 3 种莪术均经浙江省食品药品检验研究院郭增喜主任中药师鉴定, 共 21 批样品, 批号分别为 PJH-1706, PJH-1708,

PJH-1710, PJH-1711, PJH-1712, PJH-1713, PJH-1714, PJH-1715, PJH-1830, PJH-1831, PJH-1707, PJH-1709, PJH-1828, PJH-1832, PJH-1833, SC-001, SC-002, SC-003, GX-001, GX-002, GX-003 方法学考察采用片姜黄 PJH-1711 批次的样品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱 (3.0 mm×150 mm, 1.8 μm); 以 CO₂(A)-乙腈(B) 为流动相进行梯度洗脱: 0→10 min, 99.5%→80%A; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 216 nm, 柱温: 55 °C, 背压 2 000 psi; 进样量: 5.0 μL。在此条件下, 片姜黄的色谱图中目标色谱峰与其他组分均能达到良好分离, 参照物溶液色谱图和样品溶液色谱图见图 1。

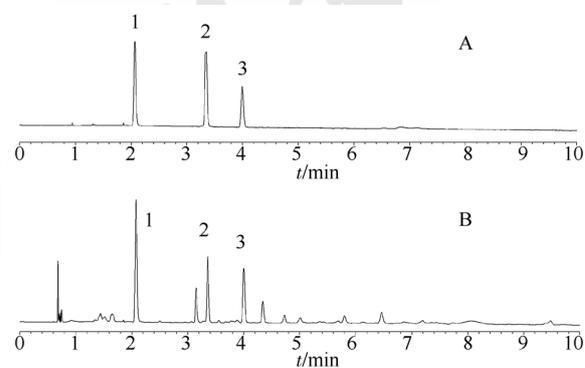


图 1 超临界流体色谱图

A-混合参照物溶液; B-供试品溶液; 1-呋喃二烯; 2-牻牛儿酮; 3-莪术二酮。

Fig. 1 Supercritical fluid chromatography

A-mixed reference solution; B-sample solution; 1-furanodiene; 2-curdione; 3-germacrone.

2.2 混合参照物溶液的制备

取呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮对照品适量, 加乙腈制成浓度分别为 26.75, 27.72 和 69.86 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

分别取各批片姜黄样品以及蓬莪术和广西莪术同法制成的切制品, 粉碎后再经冷冻混合球磨机粉碎 30 s, 称取粉末约 1.0 g, 精密称定, 加入硅藻土 4.0 g, 拌匀, 加入萃取池中, 以己烷为萃取溶剂, 萃取池温度为 60 °C, 加热时间为 5 min, 静态萃取时间为 5 min, 循环 2 次; 冲洗体积: 100%; 气体吹扫: 120 s, 取收集瓶的溶液, 离心, 取上清液, 即得。

2.4 测定方法

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μL , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 并将图谱转换成 AIA 文件, 再导入中药指纹图谱相似度软件(2012 年版), 建立模板, 并以建立的模板来测定各样品的相似度, 即得。

2.5 仪器精密度试验

取片姜黄样品(批号: PJH-1711)约 1.0 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 针测定, 导出每针样品的 AIA 文件, 导入中药指纹图谱相似度软件(2012 年版)测定相似度, 结果分别为 0.998, 0.999, 1.000, 1.000, 0.999 和 0.999, 均值为 0.999, RSD 为 0.08%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

分别取片姜黄样品(批号: PJH-1711)各约 1.0 g, 共称取 6 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定, 导出每针样品的 AIA 文件, 导入中药指纹图谱相似度软件(2012 年版)测定相似度, 结果分别为 0.996, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000 和 1.000, 均值为 0.999, RSD 为 0.1%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别在 1, 2, 4, 10, 16, 22, 25 h 进样测定, 导出每针样品的 AIA 文件, 导入中药指纹图谱相似度软件(2012 年版)测定相似度, 结果分别为 0.994, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 1.000, 0.999 和 0.999, 均值为 0.999, RSD 为 0.21%, 结果表明供试品溶液在室温下放置 25 h 保持稳定。

2.8 指纹图谱相似度测定模板的建立

分别取 15 批次的片姜黄样品, 称取各约 1.0 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备各样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 导出它们的 AIA 文件, 用中药指纹图谱相似度软件(2012 年版)测定相似度, 选用相似度较高的 10 批样品, 按相似度软件建立其测定模板。参与指纹图谱模板建立的 10 批样品色谱图见图 2, 它们建立的模板见图 3。片姜黄样品和另外 2 个来源切制品的典型图谱比较见图 4。

2.9 指纹图谱相似度的测定结果及评价

分别取 15 批样品以及其他 2 种来源的莪术(同

片姜黄切厚片法)的切制品各 3 批, 按片姜黄指纹图谱模板进行测定, 相似度结果见表 1。

测定的相似度结果显示, 15 批次分别实地采样的样品, 虽然跨时 2 年(分别采于 2017 年和 2018 年), 但相似度都 >0.930 , 15 批样品的平均相似度为 0.968, RSD 为 2.6%, 而其他 2 种来源的莪术(同片姜黄切制法)的切制品相似度均 <0.400 , 能够很好地予以区分。

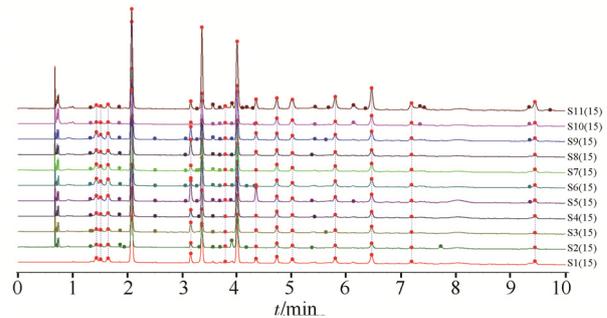


图 2 合成模板的 10 批片姜黄样品色谱图

Fig. 2 Chromatography of 10 samples for integrated template of Wenyujin Rhizoma Concisum

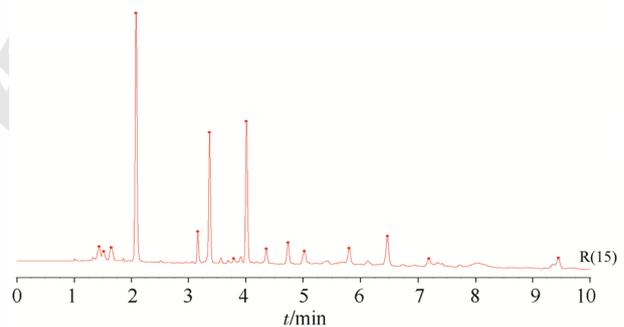


图 3 片姜黄的指纹图谱模板

Fig. 3 Integrated template of Wenyujin Rhizoma Concisum for fingerprint

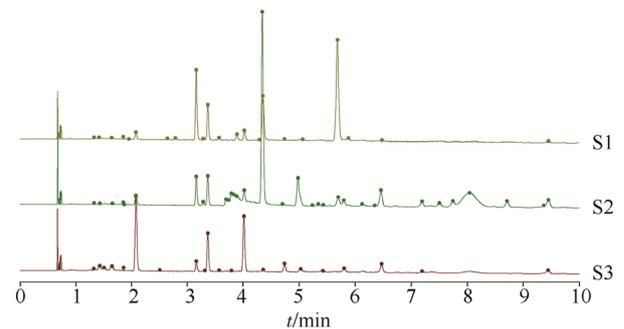


图 4 片姜黄和另外 2 个来源切制品的图谱比较

S1-广西莪术的切制品; S2-蓬莪术的切制品; S3-片姜黄。

Fig. 4 Comparison of Wenyujin Rhizoma Concisum with the other two unofficial samples

S1-prepared from *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang; S2-prepared from *Curcuma phaeocalis* Val.; S3-Wenyujin Rhizoma Concisum.

表 1 不同来源和批次的样品相似度测定结果

Tab. 1 Results of the similarity of the samples with different sources and batch number

序号	编号	相似度	序号	编号	相似度
1	PJH-1706	0.961	12	PJH-1709	0.933
2	PJH-1708	0.982	13	PJH-1828	0.932
3	PJH-1710	0.993	14	PJH-1832	0.936
4	PJH-1711	0.987	15	PJH-1833	0.932
5	PJH-1712	0.985	16	SC-001	0.293
6	PJH-1713	0.992	17	SC-002	0.205
7	PJH-1714	0.993	18	SC-003	0.177
8	PJH-1715	0.989	19	GX-001	0.251
9	PJH-1830	0.941	20	GX-002	0.365
10	PJH-1831	0.976	21	GX-003	0.336
11	PJH-1707	0.985			

3 讨论

方法学验证结果显示, CO₂-SFC 能够建立片姜黄低极性成分的指纹图谱, 该方法仅以 1 个梯度且在 10 min 内使得色谱图中各成分均得到良好的分离; 且能够很好地区分其他 2 种来源的莪术切制品, 可用于片姜黄指纹图谱的检测和区分, 方法所使用的流动相主要为 CO₂, 成本低廉, 污染少, 且快捷方便。

在片姜黄的前处理过程中, 笔者采用了加速溶剂萃取的方法, 主要是考虑到片姜黄所含的某些倍半萜类成分具有吉马烯结构, 其中有的成分易受到热、光和酸诱导而发生跨环环合^[14], 故萃取池加热温度设为 60 °C, 另用氮气作为吹扫气体, 能够很好地保护其中不稳定成分; 实验证明, 选用己烷作为溶剂, 在上述条件下, 一次性即可萃取完全, 由于指纹图谱不涉及定量, 笔者直接取收集的溶剂进样, 整个测定过程没有类似 GC 进样口高温受热的步骤, 避免了不稳定成分在高温等过程中可能会发生变化^[15], 能够真实地表征片姜黄中所含有的化学成分。

笔者所在课题组在实验中尝试了 Waters 的色谱柱主要有 ACQUITY UPC² BEH 色谱柱、ACQUITY UPC² Torus 1-AA 色谱柱和 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱, 在现有条件下, 只有 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱能够使得片姜黄低极性成分色谱峰有良好的分离效果, 故方法中选用 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱。

在波长的确定过程中, 通过 DAD 光谱扫描, 3 个参照物中呋喃二烯和莪术二酮在 216 nm 附近

有最大吸收, 且较为平坦, 牻牛儿酮略差, 综合比较后选择 216 nm 作为检测波长。

由于柱温对超临界流体的影响较大, 故实验过程中考察了 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C 等不同柱温, 随着柱温的上升, 色谱峰的保留时间逐渐变大, 峰之间分离逐步增加, 它们的相似度测定结果分别为 0.993, 0.992, 0.997, 0.999, 0.995 和 0.981, 均值为 0.993, RSD 为 0.64%, 认为不同的柱温对指纹图谱的相似度影响不大, 考虑到莪术油中倍半萜类成分对热的不稳定性, 故将柱温控制在 55 °C。

实验中考察的背压分别为 1 600, 1 800, 2 000, 2 200, 2 400 psi, 随着背压的上升, 色谱峰的保留时间逐渐变小, 峰形也变好, 但也会很小的干扰峰会合并, 他们的相似度分别为 0.998, 1.000, 0.999, 0.999, 0.998, 尽管峰的保留时间变化较大, 但它们的相似度很接近, 均值为 0.999, RSD 为 0.08%, 综合考虑, 本实验选择背压为 2 000 psi 的条件。

实验中考察的流速分别为 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 和 1.4 mL·min⁻¹, 随着流速的提高, 类似于背压的上升, 色谱峰的保留时间逐渐变小, 峰形也变好, 但会有很小的干扰峰会合并, 它们的相似度分别为 0.998, 1.000, 1.000, 0.999, 0.998, 尽管峰的保留时间变化较大, 但它们的相似度很接近, 均值为 0.999, RSD 为 0.05%, 综合考虑, 本实验选择流速为 1.0 mL·min⁻¹ 的条件。

尽管 CO₂-SFC 在中药指纹图谱的分析测试报道则相对较少, 但该方法联合 ASE 萃取, 对于含有不稳定、易挥发性成分的中药如片姜黄低极性成分的指纹图谱相似度的测定上显示了它快捷、绿色的特点, 特别是蓬莪术或广西莪术若是按《中药大辞典》或《中华本草》中采收加工的第二法, 本方法也能够将片姜黄与它们区分, 它为片姜黄的质量考察和区分非正品的混淆提供了一种不同于 HPLC/UPLC 和 GC 的考察方法。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2015: 64-65, 74, 274-275, 465-466, 679-680, 827-829, 1600-1602.
- [2] YANG J F, XU C L, ZHANG J, et al. Determination of the enantiomer of iopmamidol by supercritical fluid chromatography [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(12): 1566-1569.

- [3] ZHU R J, WANG B, HU F, et al. Qualitative and quantitative analysis of bushen jiannaoy grains by ultra performance convergence chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2015, 43(2): 288-293.
- [4] GANZERA M. Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015(107): 364-369.
- [5] AICHNER D, GANZERA M. Analysis of anthraquinones in rhubarb(*Rheum palmatum* and *Rheum officinale*) by supercritical fluid chromatography [J]. *Talanta*, 2015(144): 1239-1244.
- [6] XU Y W, HUANG J, SUN Q L, et al. Prospect of ultra performance convergence chromatography technology and applications in tcm research and quality control [J]. *World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med Mater Med*(世界科学技术-中医药现代化), 2015, 16(3): 543-548.
- [7] ZHU L L, ZHAO Y, SUN X G, et al. Application of supercritical fluid chromatography in natural products [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2016, 36(8): 1317-1323.
- [8] 南京中医药大学. 中医药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.
- [9] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 精选本(上、下册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [10] 邓家刚, 韦松基. 广西道地药材[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [11] YIN G P. Studies on the chemical constituents from Rhizome [D]. Zhenzhou: Henan College of Traditional Chinese Medicine, 2013.
- [12] GAO L H, ZHANG Y M, LIU Y X, et al. Analysis of essential oil components in *Curcuma longa* L. and *Wenyujin* Rhizoma *Concisum* by GC-MS method and research on their anti-tumor effects *in vitro* [J]. *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2014, 14(1): 18-21
- [13] 李依哲, 张杰. 片姜黄主要化学成分在关节炎治疗中的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2016, 5(8): 73-76.
- [14] ADEWALE M A. Germacrenes A-E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. [J]. *Tetrahedron*, 2009(65): 1533-1552.
- [15] YANG F Q, WANG Y T, LI S P. Simultaneous determination of 11 characteristic components in three species of *Curcuma* rhizomes using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134(1/2): 226-231.

收稿日期: 2018-12-19
(本文责编: 李艳芳)