

· 化学与分析 ·

姜的 HPLC 指纹图谱研究

申玲玲¹, 纪彬¹, 段红福², 崔瑛^{1*}, 王君明¹, 冯志毅¹

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 郑州市中医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 建立生姜、干姜、炮姜的高效液相指纹图谱, 为整体控制和评价生姜、干姜、炮姜的药材质量提供依据。方法: 采用高效液相色谱法, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 240 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 分别对 10 批生姜、干姜、炮姜分别进行检测, 采用药典委员会指定的指纹图谱相似度评价软件(2004 A 版)进行相似度评价, 分别计算不同批次生姜、干姜、炮姜的相似度。结果: 建立了生姜、干姜、炮姜的指纹图谱, 分别确定了 6 个共有峰, 10 批次的生姜、干姜、炮姜的色谱图与各自对照指纹图谱的相似度分别 >0.902, 0.911, 0.929。结论: 通过方法学考察, 仪器精密性、稳定性、以及重复性试验均符合指纹图谱的技术要求, 该法准确可靠, 可为控制和评价姜的质量提供依据。

[关键词] 生姜; 干姜; 炮姜; HPLC; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0069-05

[doi] 10.11653/zgxyfjxzz2013070069

HPLC Fingerprint of Ginger

SHEN Ling-ling¹, JI Bin¹, DUAN Hong-fu², CUI Ying^{1*}, WANG Jun-ming¹, FENG Zhi-yi¹

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450008, China;

2. Zhengzhou Hospital of TCM, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprint of Ginger, dried Ginger and roasted Ginger to provide evidence for its quality control. **Method:** A gradient mobile system was applied to the measurement of ten batches of Ginger, dried Ginger and roasted Ginge. Mobile Phase was acetonitrile-water. The UV detection wave length was at 240 nm, and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The chromatogram fingerprints were evaluated by the similarity evaluation software published by the committee of codex and calculate the similarity of ten batches of Ginger, dried Ginger and roasted Ginge. **Result:** The HPLC fingerprint of Ginger was established and six co-possessing peaks were selected separately as the fingerprint peaks of Ginger, dried Ginger and roasted Ginger. The similarity of ten batches of Ginger, dried Ginger and roasted Ginge was respectively more than 0.902, 0.911 and 0.929. **Conclusion:** The instrument precision, stability test and replicate test were in accord with the technical requirements of fingerprint. This method shows the high precision and reliability, and can be used to the quality control of Ginger.

[Key words] ginger; dried ginger; roasted ginger; HPLC; fingerprint

[收稿日期] 20120923(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30772794); 河南中医学院科技创新团队计划项目(2011XCXD01)

[第一作者] 申玲玲, 硕士研究生, 从事中药药性及中药抗焦虑研究, Tel: 0371-65680967, E-mail: shenling510@163.com

[通讯作者] * 崔瑛, 教授, 医学博士, 硕士生导师, 从事中药药性、药效与应用研究, Tel: 0371-65680967, E-mail: cyxin@sina.com

姜为姜科植物姜的根茎。作为中药使用, 姜又分为生姜、干姜和炮姜 3 个不同的炮制品种。生姜偏于解表散寒, 干姜偏于温中回阳, 炮姜偏于温经止血, 分别作为发散风寒药、温里药和止血药使用。相关研究显示, 姜化学成分主要包括挥发油^[1-2]、烷基酚类^[3-4]、长链不饱和脂肪酸酯苷^[5-6]类等成分, 其中烷基酚类成分为姜属植物中所特有的成分, 且含量较高, 挥发油类^[7-8]成分报道较多, 但是其含量较低^[9]。本研究采用高效液相色谱法对 10 批不同产

地的生姜、干姜、炮姜进行了相似度评价,建立了指纹图谱,可以为姜的品种鉴别和质量评价提供依据。

1 材料

1.1 仪器 美国 Waters2695 高效液相色谱仪, 2996 型 DAD 检测器, METTLER AE240 型电子分析天平, KQ3200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), 上海安亭 TDL-40B 型离心机, RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈(色谱纯):迪马科技有限公司;水为自制双蒸水,6-姜酚对照品(河南省中医研究院中药药研究所馈赠,纯度≥98.73%)。

1.3 样品采集 生姜,分别购自郑州、民权、廊坊、北京、潍坊、成都等地,均由河南中医学院陈随清教授鉴定为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的根茎。切片,即得。

干姜:取生姜切厚片(2~4 cm),晾晒,低温干燥,即得。

炮姜:取上述干姜片,照 2010 年版《中国药典》附录 II D 烫法,用砂烫至鼓起,表面棕褐色,筛去砂子,放凉,即得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Dikma Platisil ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 A 为水, B 为乙腈,洗脱梯度为:10% B (0 min)~20% B (10 min)~50% B (20 min)~70% B (40 min)~85% B (55 min)~100% B (60 min);检测波长 240 nm;流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,进样体积 10 μL。

2.2 标准溶液的制备 精密称取 6-姜酚对照品 3.12 mg,置 10 mL 量瓶中,以初始流动相(10% 乙腈溶液)稀释至刻度,摇匀即得对照溶液。

2.3 姜样品溶液的制备 分别取姜的不同炮制品,精密称取 10 g,放置于平底烧瓶中,第 1 次加 80 mL 甲醇,回流提取 30 min。第 2 次加 50 mL 甲醇,回流提取 30 min。将两次提取液合并,回收甲醇,定容至 10 mL。

2.4 方法学考察

2.4.1 仪器精密度考察 取姜各炮制品溶液,按照 2.1 项下的色谱条件连续 5 次进样测定,结果生姜共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别在 0.21%~0.377%,0.432~1.393%;干姜分别在 0.147%~0.314%,0.739%~2.955%;炮姜分别在 0.079%~0.124%,0.760%~2.356%,说明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性考察 取生姜、干姜、炮姜供试品溶液分别于制备后 0,4,8,12,24 h 进样测定,结果生

姜共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别在 0.094%~0.264%,1.281%~3.250%;干姜分别在 0.020%~0.256%,0.882%~2.911%;炮姜分别在 0.026%~0.144%,0.621%~2.303%,表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.4.3 重复性试验 分别取生姜、干姜、炮姜同一批药材 5 份,按照供试品溶液的制备方法平行制备,分别进样,记录色谱图,分别计算共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD,生姜分别在 0.038%~0.205%,0.849%~2.498%;干姜分别在 0.060%~0.359%,0.522%~3.203%;炮姜分别在 0.070%~0.358%,1.190%~3.303%,表明重复性良好。

2.4.4 对照品对照试验 吸取 2.2 项下的 6-姜酚对照品溶液 10 μL,进样,采集色谱图,结果见图 1。经空白对照试验证实 45 min 以后的峰为杂质峰。

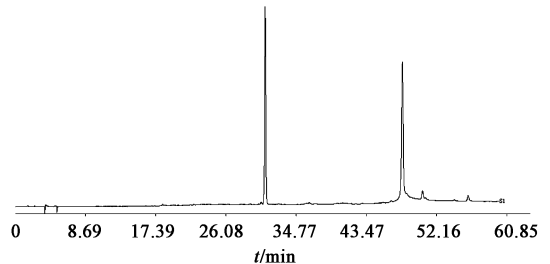


图 1 6-姜酚对照品色谱

2.5 姜指纹图谱的构建 将 10 批生姜、干姜、炮姜分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定。分别对 10 批生姜、干姜、炮姜色谱图进行分析,分别确定了 6 个共有峰,并以 6-姜酚的色谱峰为参照峰(S),并分别计算生姜、干姜、炮姜各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,见表 1~3,并以其中的 6-姜酚作为参照峰(S)见图 2~4。

表 1 生姜共有峰相对峰面积

No.	峰号					
	1	2(S)	3	4	5	6
S1	0.102	1.000	0.938	1.453	0.179	0.151
S2	0.096	1.000	0.954	1.478	0.179	0.140
S3	0.100	1.000	0.749	1.145	0.157	0.089
S4	0.114	1.000	1.304	1.973	0.155	0.133
S5	0.103	1.000	0.747	1.147	0.156	0.100
S6	0.144	1.000	1.310	1.998	0.154	0.124
S7	0.132	1.000	0.803	1.580	0.176	0.113
S8	0.123	1.000	0.987	1.328	0.164	0.125
S9	0.156	1.000	1.276	1.874	0.175	0.141
S10	0.147	1.000	0.798	1.496	0.169	0.125

表 2 干姜共有峰相对峰面积

No.	峰号					
	1	2(S)	3	4	5	6
S1	0.122	1.000	1.869	0.742	0.372	0.473
S2	0.138	1.000	1.321	0.595	0.468	0.966
S3	0.11	1.000	1.277	0.427	0.329	0.739
S4	0.143	1.000	1.317	0.569	0.466	0.953
S5	0.133	1.000	1.129	0.382	0.323	0.654
S6	0.114	1.000	1.855	0.685	0.352	0.524
S7	0.112	1.000	1.136	0.719	0.332	0.876
S8	0.135	1.000	1.287	0.347	0.423	0.734
S9	0.124	1.000	1.568	0.543	0.357	0.658
S10	0.14	1.000	1.87	0.425	0.461	0.49

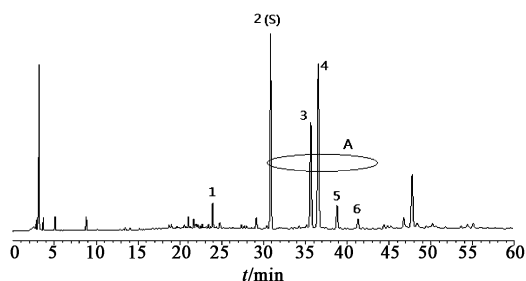


图 2 生姜 HPLC 指纹图谱共有模式

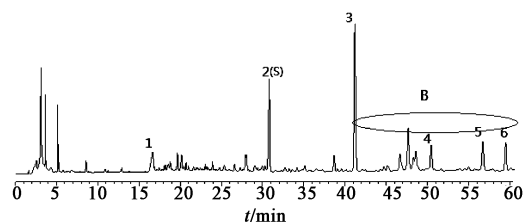


图 3 干姜 HPLC 指纹图谱共有模式

表 3 炮姜共有峰相对峰面积

No.	峰号					
	1(S)	2	3	4	5	6
S1	1.000	2.763	0.479	0.731	0.493	0.629
S2	1.000	2.759	0.483	0.730	0.491	0.645
S3	1.000	2.157	0.546	0.440	0.530	0.426
S4	1.000	2.154	0.541	0.435	0.526	0.527
S5	1.000	2.358	0.531	0.582	0.513	0.416
S6	1.000	2.361	0.517	0.580	0.510	0.418
S7	1.000	2.256	0.522	0.723	0.532	0.616
S8	1.000	2.378	0.480	0.465	0.525	0.548
S9	1.000	2.568	0.538	0.608	0.501	0.438
S10	1.000	2.743	0.542	0.438	0.498	0.630

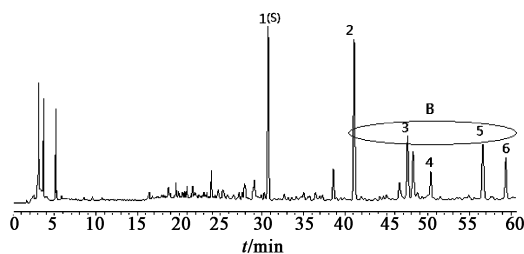


图 4 炮姜 HPLC 指纹图谱共有模式

2.6 姜指纹图谱的相似度计算 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版, 分别将生姜、干姜、炮姜的色谱图导入相似度评价系统, 生成对照图谱 (R) 即共有模式图, 见图 2~4, 并计算相似度, 见表 4~6。

表 4 10 批生姜药材相似度分析

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.908	0.920	0.911	0.920	0.912	0.923	0.942	0.922	0.962	0.906
S2	0.908	1.000	0.987	0.969	0.988	0.988	0.912	0.910	0.930	0.984	0.983
S3	0.920	0.987	1.000	0.982	1.000	0.971	0.964	0.901	0.961	0.976	0.982
S4	0.911	0.969	0.982	1.000	0.969	0.999	0.972	0.911	0.901	0.964	0.979
S5	0.920	0.988	1.000	0.969	1.000	0.970	0.926	0.961	0.913	0.933	0.982
S6	0.912	0.988	0.971	0.999	0.970	1.000	0.943	0.933	0.921	0.944	0.978
S7	0.923	0.912	0.964	0.972	0.926	0.943	1.000	0.936	0.988	0.918	0.902
S8	0.942	0.910	0.901	0.911	0.961	0.933	0.936	1.000	0.942	0.925	0.981
S9	0.922	0.930	0.961	0.901	0.913	0.921	0.988	0.942	1.000	0.958	0.974
S10	0.962	0.984	0.976	0.964	0.933	0.944	0.918	0.925	0.958	1.000	0.932
R	0.906	0.983	0.982	0.979	0.982	0.978	0.902	0.981	0.974	0.932	1.000

表 5 10 批干姜药材相似度分析

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.920	0.940	0.910	0.734	0.997	0.820	0.913	0.915	0.865	0.911
S2	0.920	1.000	0.880	0.998	0.869	0.919	0.950	0.869	0.820	0.849	0.980
S3	0.940	0.880	1.000	0.879	0.995	0.749	0.886	0.933	0.872	0.771	0.946
S4	0.910	0.998	0.879	1.000	0.880	0.920	0.800	0.911	0.929	0.951	0.966
S5	0.734	0.869	0.995	0.880	1.000	0.742	0.817	0.853	0.767	0.901	0.942
S6	0.997	0.919	0.749	0.920	0.742	1.000	0.905	0.802	0.835	0.853	0.917
S7	0.820	0.950	0.886	0.800	0.817	0.905	1.000	0.891	0.799	0.965	0.931
S8	0.913	0.869	0.933	0.911	0.853	0.802	0.891	1.000	0.925	0.870	0.922
S9	0.915	0.820	0.872	0.929	0.767	0.835	0.799	0.925	1.000	0.886	0.921
S10	0.865	0.849	0.771	0.951	0.901	0.853	0.965	0.870	0.886	1.000	0.934
R	0.911	0.980	0.946	0.966	0.942	0.917	0.931	0.922	0.921	0.934	1.000

表 6 10 批炮姜药材相似度分析

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.999	0.912	0.922	0.979	0.989	0.930	0.982	0.967	0.978	0.992
S2	0.999	1.000	0.900	0.912	0.979	0.969	0.932	0.971	0.979	0.931	0.991
S3	0.912	0.900	1.000	0.996	0.929	0.931	0.915	0.961	0.938	0.967	0.955
S4	0.922	0.912	0.996	1.000	0.930	0.928	0.961	0.981	0.915	0.953	0.955
S5	0.979	0.979	0.929	0.930	1.000	0.998	0.922	0.976	0.910	0.943	0.993
S6	0.989	0.969	0.931	0.928	0.998	1.000	0.921	0.967	0.933	0.983	0.993
S7	0.930	0.932	0.913	0.961	0.922	0.921	1.000	0.956	0.965	0.964	0.984
S8	0.982	0.971	0.961	0.981	0.976	0.967	0.956	1.000	0.982	0.979	0.987
S9	0.967	0.979	0.938	0.915	0.910	0.933	0.965	0.982	1.000	0.961	0.929
S10	0.978	0.931	0.967	0.953	0.943	0.983	0.964	0.979	0.961	1.000	0.987
R	0.992	0.991	0.955	0.955	0.993	0.993	0.984	0.987	0.929	0.987	1.000

3 讨论

3.1 前处理方法的选择 以生姜提取液为例,本研究考察了超声提取法和甲醇回流提取法对生姜色谱图的影响,结果发现二者峰数目相同,但甲醇提取法峰面积较大,故选择甲醇提取法。

3.2 检测波长的选择^[10] 采用 DAD 检测器对生姜样品在 190 ~ 400 nm 扫描,经过比较发现在 240 nm 波长下生姜各成分色谱峰呈现较为完全,故选择 240 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择 分别以甲醇-水、乙腈-水系进行梯度洗脱,考察了其对生姜提取液峰数目、峰面积、峰分离度的影响,结果发现乙腈-水系统色谱峰峰形较锐,分离度较好,优于甲醇-水系统,故选择乙腈-水系统洗脱。

3.4 相似度分析 从三者的相似度分析结果(表 4 ~ 6)来看,干姜的各批次之间及各批次和对照图谱

之间的相似度波动较大,而从干姜的共有峰的相对峰面积来看,可能因为其共有峰相对峰面积的 RSD 过大所致。生姜、炮姜的相似度则都相对稳定,均 > 0.90。

3.5 三者化学成分的讨论 从生姜、干姜、炮姜的共有模式图(图 2 ~ 4)可以看出三者化学成分的差异性,以及化学成分的色谱峰从生姜、干姜到炮姜的变化趋势。干姜和生姜相比,干姜的共有峰主要集中于 B 区,生姜主要集中于 A 区,生姜的 1 号共有峰在干姜的色谱图上缺失。有文献报道^[11-12] 生姜和干姜的化学成分确有差异。炮姜和干姜相比,二者的共有峰都集中于 B 区,而干姜的 1 号共有峰在炮姜的色谱图上缺失。炮姜为干姜砂烫的炮制品,经过高热炮制,采用 GC-MS 检测,其化学成分发生了量变和质变^[9]。

本研究在相同色谱条件下建立了姜 3 个炮制品

鬼针草属药材的 HPLC 指纹图谱鉴别

夏清^{1,2}, 刘圆^{2*}

(1. 四川中医药高等专科学校, 四川 绵阳 621000; 2. 西南民族大学民族医药研究院, 成都 610041)

[摘要] 目的: 建立鬼针草属药材的 HPLC 指纹图谱方法, 鉴别 5 种鬼针草药材。方法: 采用 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1% 磷酸水溶液为流动相(梯度洗脱), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 290 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。结果: 通过对 10 批鬼针草属药材的研究建立了鬼针草属药材的指纹图谱, 利用 HPLC 指纹图谱相似性评价软件评价, 应用主成分分析法、系统聚类分析法将药材分成 5 类, 计算相似度。结论: 该提取方法简单, 具有很好的稳定性、重复性和可行性, 可使大部分化学成分得到较好的分离, 可为鬼针草属药材提供更为科学的依据和有效的鉴别方法。

[关键词] 鬼针草属; HPLC; 指纹图谱; 系统聚类法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0073-04

[doi] 10.11653/zgsyxfjxzz2013070073

Study on HPLC Fingerprint of Herba Bidentis

XIA Qing^{1,2}, LIU Yuan^{2*}

(1. Shichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang 621000, China;

[收稿日期] 20120908(001)

[基金项目] 国家科技部“重大新药创制”项目(2011ZX09307-002-01); 国家科技支撑计划项目(2012BAI27B07); 国家自然科学基金项目(81173653); 四川省杰出青年学术技术带头人后续计划项目(2011JQ0051)

[第一作者] 夏清, 讲师, 硕士, 从事中药药剂的教学与科研, Tel: 18030999327, E-mail: qingxia4663@yahoo.cn

[通讯作者] * 刘圆, 教授, 从事少数民族药物的研究与教学, Tel: 13808091609, E-mail: yuanliu163@yahoo.com.cn

种的指纹图谱, 色谱峰分离良好, 基线平稳, 信息量丰富, 峰的数目、强度较为理想, 基本可以呈现姜化学成分的全貌, 并经过方法学的验证, 结果符合指纹图谱的技术要求^[13]。

[参考文献]

[1] 邱琴, 张国英, 刘辛欣, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取法与水蒸气蒸馏法提取干姜片挥发油化学成分的比较[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(3): 55.

[2] 黄鹤归, 叶晓川, 田连起, 等. 超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取桂枝-干姜药对的化学成分比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 24(17): 85.

[3] 孟江, 卢国勇, 程轩轩, 等. 一测多评法同时测定干姜中 4 种姜酚类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 7(18): 77.

[4] 吕力, 高晓雨, 张君严, 等. 生姜有效成分的研究进展[J]. 科技信息, 2012, 19: 194.

[5] 周洪雷, 张义虎, 魏璐. 雪干姜化学成分的研究[J]. 中医药学报, 2001, 29(4): 33.

[6] Kikuzaki H, Tsai Saiu-Mei, Nakatain N. Gingerdiol related compounds from the rhizomes of *Zingiber officinale* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(5): 1783.

[7] 何文珊, 严玉霞, 郭宝江. 生姜的化学成分及生物活性研究概况[J]. 中药材, 2001, 24(5): 376.

[8] 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 等. 正交法优选干姜挥发油提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 19.

[9] 王维皓, 王智民. 姜的化学、药理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(20): 1569.

[10] 贾玉梅, 段红福, 崔瑛, 等. 怀鲜地黄 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2011, 33(5): 732.

[11] 李计萍, 王跃生, 马华, 等. 干姜与生姜主要化学成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(11): 748.

[12] 营大礼. 干姜化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(18): 1435.

[13] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J]. 中成药, 2000, 22(10): 673.

[责任编辑 顾雪竹]