

金港莪术油指纹图谱研究

王淑玲¹ 谢 恬^{1,2} 曾昭武^{1,2} 庞潇卿¹ 刘 楠² 杨友剑² 赵 宏² 张涤菲²

摘要 目的 研究金港榄香烯原料药莪术油指纹图谱,实现产品的安全、有效、稳定、可控。**方法** 采用气相色谱法对其指纹图谱进行测定,以 β -榄香烯的峰为参照峰(S),计算各共有峰的相对峰面积、相对保留时间,以共有模式为参照,通过中药指纹图谱相似度计算软件,对 10 批金港莪术油 GC 指纹图谱进行相似度计算。**结果** 采用气相色谱法对金港莪术油指纹图谱进行测定,测定方法稳定可靠,标示出金港莪术油共有特征峰 19 个,各批次金港莪术油指纹图谱相似度 ≥ 0.96 。**结论** 测定方法准确可靠,重复性良好。建立的金港莪术油指纹图谱可以保证不同批次产品的质量稳定性和安全性。

关键词 莪术油;榄香烯;气相色谱;指纹图谱

Study on the Fingerprint of Kingkong Zedoary Turmeric Oil WANG Shu-ling¹, XIE Tian^{1,2}, ZENG Zhao-wu^{1,2}, PANG Xiao-qing¹, LIU Nan², YANG You-jian², ZHAO Hong², and ZHANG Di-fei²
1 Medical College of Hangzhou Normal University, Hangzhou (310012); 2 Dalian Holley Kingkong Pharmaceutical Co., Ltd., Liaoning (116000)

ABSTRACT Objective To study the fingerprint of Zedoary Turmeric Oil (ZTO) as the bulk drug of Kingkong Elemene for making it safe, effective, stable, and controllable. **Methods** Fingerprints were detected by gas chromatography. β -elemene peak was regarded as reference peak (S). The relative peak area of each common peak and the relative retention time were calculated. With a total of modes for reference, the fingerprints of 10 batches of Kingkong ZTO were detected, and their similarity was calculated by traditional Chinese medicine (TCM) fingerprint similarity calculation software. **Results** The determination method was stable and reliable. Totally 19 common characteristic peaks of Kingkong ZTO was found. The fingerprint similarity of these batches of Kingkong ZTO were not lower than 0.96. **Conclusions** Gas chromatography for detecting the fingerprint of Kingkong ZTO was reliable and repeatable. The established fingerprint of Kingkong ZTO could guarantee the quality stability and safety of different product batches.

KEYWORDS Zedoary Turmeric Oil; elemene; gas chromatography; fingerprint

莪术油是姜科姜黄属温郁金(*Curcuma wenyujin* Y.H. Chen et C. Ling)的干燥根茎采用水蒸气蒸馏法提取得到的挥发油^[1],临床上广泛应用于抗炎、抗肿瘤,具有行气活血、祛腐生肌的功效^[2-5]。榄香烯(elemene, $C_{15}H_{24}$,分子量 204.35)系传统中药姜科植物郁金(*Curcuma aeruginosa* Roxb.)中的单环结构的倍半萜烯类有效部位,据有明显的肿瘤抑制作用。

循证医学系统评价证实金港安全有效,对多种肿瘤甚至恶性肿瘤均有明显抑制作用^[6-8],与放化疗结合可提高恶性肿瘤治疗有效率,具有延长生存期、改善生活质量和抗转移复发等作用^[9,10]。莪术油作为金港榄香烯脂质体注射液原料药的原材料,对其进行指纹图谱研究,控制药品生产质量安全十分重要。

材料与方法

1 药物(表 1) 采集于浙江瑞安境内的温莪术药材提取的莪术油 10 批(基地加工);药材采集地名、药材及莪术油编号对应关系见表。

表 1 采集地与批号对应表

采集地名	下林	岱西	八甲	绿屿	登阳	涂头	东川	四甲	马屿	焦坑村
药材编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
莪术油编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

基金项目:杭州市科技发展计划(No. 20130432B05);杭州市科技发展计划(No. 20131232i37);辽宁省“百千万人才工程”(No. 2013921005);大连市科技计划项目(No. 2013E11SF052)

作者单位:1 杭州师范大学医学院(杭州 310012);2 大连华立金港药业有限公司(辽宁 116000)

通讯作者:谢 恬, Tel: 0571-28868269, xbs@dljg.sina.net

DOI: 10.7661/CJIM.2016.06.0744

2 试剂及仪器 β -榄香烯对照品(100268-200401,纯度 99.2%,中国药品生物制品检定所),乙酸乙酯、甲醇均为色谱纯。Agilent6890N 气相色谱仪,HP-5(30 m $\times$ 0.32 mm,0.25 μ m)弹性石英毛细管柱,FID 检测器(美国 Agilent 公司),DF-101S 集热式恒温加热搅拌器(河南省予华仪器有限公司)。

3 检测指标及方法

3.1 色谱条件 按照气相色谱法^[11]并结合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》^[12],确定原药材温莪术 GC 系统适用性试验条件为:弹性石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.32 mm,0.25 μ m);HP-5(交联 5% 苯基甲基聚硅氧烷为固定相,30 m $\times$ 0.32 mm,0.25 μ m);检测器(FID)温度:250 $^{\circ}$ C;进样口温度:150 $^{\circ}$ C;载气为氮气,流速:1.0 mL/min;氢气:40 mL/min;空气:400 mL/min;分流比为 20:1;柱温采用程序升温;初始温度:125 $^{\circ}$ C,保持 8 min,以 5 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 90 $^{\circ}$ C,保持 14 min,再以 10 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 115 $^{\circ}$ C,然后以 1 $^{\circ}$ C/min 升至 130 $^{\circ}$ C,保持 25 min,以 2 $^{\circ}$ C/min 升至 140 $^{\circ}$ C,保持 30 min,以 10 $^{\circ}$ C/min 升至 260 $^{\circ}$ C;载气:进样量 1 μ L;理论板数按 β -榄香烯峰计算应 $\geq 10\,000$ ^[13-15]。

3.2 对照品溶液的制备 选定 β -榄香烯作为参照物。将 β -榄香烯对照品溶解于甲醇,稀释至刻度,定量吸取,注入气相色谱仪中进行分析。

3.3 供试品溶液制备 按照金港莪术油的制备方法制备供试品,取 10 批金港莪术油作为供试品,分别取 100 μ L,用乙酸乙酯稀释,定容至 1 mL。定量吸取各 1 μ L,直接注入气相色谱仪中进行分析。

3.4 稳定性及精密度试验 取金港莪术油适量,按“供试品溶液的制备”操作,得供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8 h 重复进样 5 次,记录各共有特征峰保留时间和积分峰面积。以 β -榄香烯为参照峰(S),换算出各共有峰的相对保留时间,相对峰面积的 RSD 均小于 3%,结果表明,仪器等整个检测系统的精密度良好,样品在 8 h 内较稳定,符合指纹图谱研究的技术要求。

3.5 重现性试验 取同一批金港莪术油 5 份,按照“供试品溶液的制备”操作,得供试品溶液,并进行检测,记录各共有特征峰保留时间和积分峰面积,以 β -榄香烯为参照峰(S),换算出各共有峰的相对保留时间及相对峰面积,两者的 RSD 均小于 3%,表明符合指纹图谱研究的技术要求。

经方法学考察,其精密度、稳定性、重现性均符合要求,故此色谱条件也适用于金港莪术油的检测条件。

3.6 指纹图谱选择及特征峰的标定 取 10 份不

同批次的金港莪术油,按照“供试品溶液的制备”操作,得供试品溶液,按“色谱条件”进行检测,得出供试品的所有成分的色谱峰,且在 117 min 之内全部出完,选取经典的金港莪术油 GC 指纹图谱。比较各批供试品的色谱图,确定共有特征指纹峰和相对保留时间。

3.7 指纹图谱相似度的计算 以 β -榄香烯的峰为参照峰(S),计算各共有峰的相对峰面积、相对保留时间,以共有模式为参照,通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(版本 2004A)计算,得到各批次莪术油 GC 指纹图谱和相似度^[16,17]。

3.8 分别取原药材供试品溶液和参照物溶液各 1 μ L,注入气相色谱仪,按照 3.1 色谱条件进行测定,记录 50 min,抗肿瘤主要活性成分 β -elemene、 γ -elemene、 δ -elemene 均已出峰,得色谱 3;色谱条件与系统适应性试验同上,分别取金港莪术油供试品溶液和参照物溶液各 1 μ L,注入气相色谱仪,记录 50 min,得色谱 4。

结 果

1 指纹图谱及特征峰(图 1,表 2) 检测 10 份不同批次的金港莪术油色谱峰,且在 117 min 之内全部出完,与经典的金港莪术油 GC 指纹图谱比较。观察各批供试品的色谱图,发现有 19 个符合要求的色谱峰是各批样品所共有的,因此确定它们为共有特征指纹峰。

表 2 10 批金港莪术油指纹图谱相对保留时间和相对峰面积

峰号	相对保留时间	相对峰面积($\bar{x} \pm s$)
1	0.285 7	0.121 6 $\pm$ 0.010 0
2	0.301 1	0.219 8 $\pm$ 0.017 0
3	0.342 8	0.057 2 $\pm$ 0.004 2
4	0.481 9	0.269 3 $\pm$ 0.024 0
5	0.564 9	0.497 3 $\pm$ 0.030 8
6	0.590 4	0.195 3 $\pm$ 0.014 4
7	0.639 4	0.041 6 $\pm$ 0.003 1
8	0.674 5	0.082 3 $\pm$ 0.005 7
9	0.907 3	0.154 5 $\pm$ 0.001 1
10	0.986 1	0.033 5 $\pm$ 0.000 1
S	1.000 0	1.000 0
11	1.045 3	0.187 3 $\pm$ 0.006 0
12	1.064 0	0.020 5 $\pm$ 0.000 6
13	1.072 3	0.065 3 $\pm$ 0.002 3
14	1.107 4	0.109 6 $\pm$ 0.005 1
15	1.162 9	0.373 1 $\pm$ 0.008 4
16	1.172 6	0.090 5 $\pm$ 0.007 7
17	1.345 5	0.563 9 $\pm$ 0.021 6
18	1.506 2	0.240 6 $\pm$ 0.061 7

2 指纹图谱相似度(图 2,表 3) 各批次金港莪术油指纹图谱的相似度均>0.960。

3 温莪术药材图谱与金港莪术油图谱比较(图 3,4) 比较 50 min 内温莪术药材与金港莪术油 GC 图谱,温莪术药材 GC 图谱中得到 13 个分离度良好的色谱峰,金港莪术油 GC 图谱相应的保留时间的位置

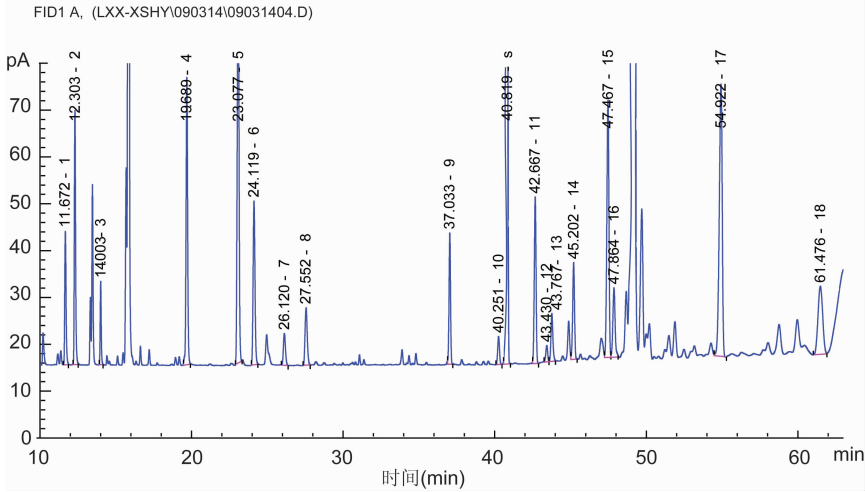


图 1 金港莪术油 GC 指纹图谱

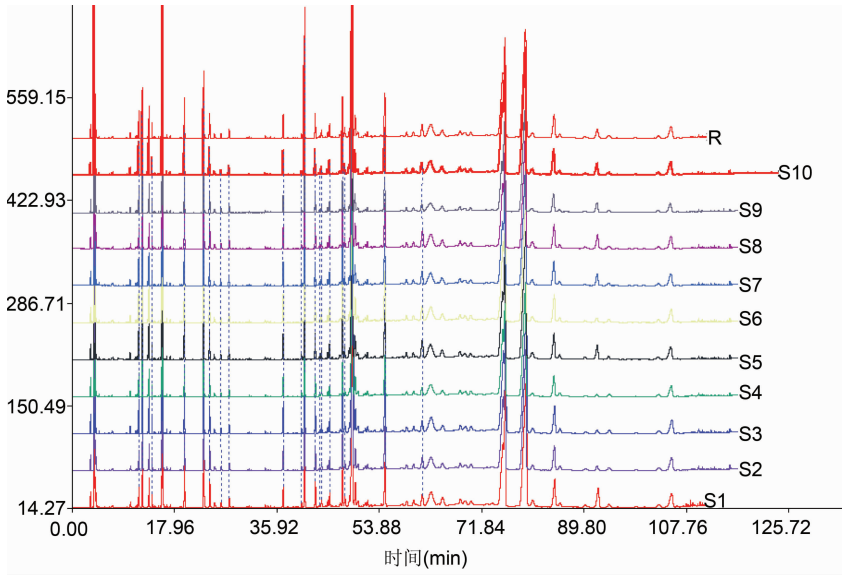
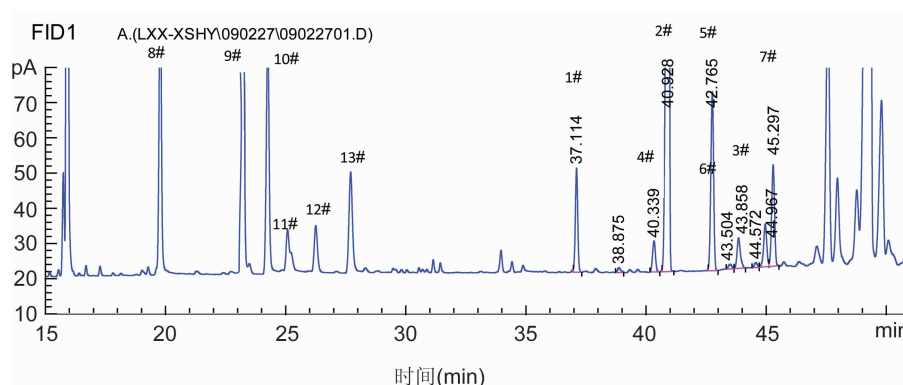


图 2 10 批金港莪术油指纹图谱比较分析

表 3 10 批金港莪术油指纹图谱相似度

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	对照指纹图谱
1	1.000	0.947	0.947	0.947	0.947	0.949	0.948	0.946	0.950	0.950	0.960
2	0.947	1.000	0.999	0.996	0.995	0.997	0.996	0.994	0.996	0.997	0.998
3	0.947	0.999	1.000	0.998	0.993	0.997	0.995	0.992	0.996	0.997	0.998
4	0.947	0.996	0.998	1.000	0.992	0.997	0.996	0.990	0.996	0.998	0.997
5	0.947	0.995	0.993	0.992	1.000	0.998	0.998	0.999	0.994	0.995	0.997
6	0.949	0.997	0.997	0.997	0.998	1.000	0.998	0.998	0.997	0.998	0.999
7	0.948	0.996	0.995	0.996	0.998	0.998	1.000	0.996	0.994	0.996	0.998
8	0.946	0.994	0.992	0.990	0.999	0.998	0.996	1.000	0.994	0.994	0.996
9	0.950	0.996	0.996	0.996	0.994	0.997	0.994	0.994	1.000	1.000	0.998
10	0.950	0.997	0.997	0.998	0.995	0.998	0.996	0.994	1.000	1.000	0.998
对照指纹图谱	0.960	0.998	0.998	0.997	0.997	0.999	0.998	0.996	0.998	0.998	1.000



注:其中 1#、2#、3#、4#、5#……为共有特征峰的峰序号;其中 1#、2#、3#分别为 δ -elemene、 β -elemene、 γ -elemene,图 4 同

图 3 温莪术药材 GC 图谱

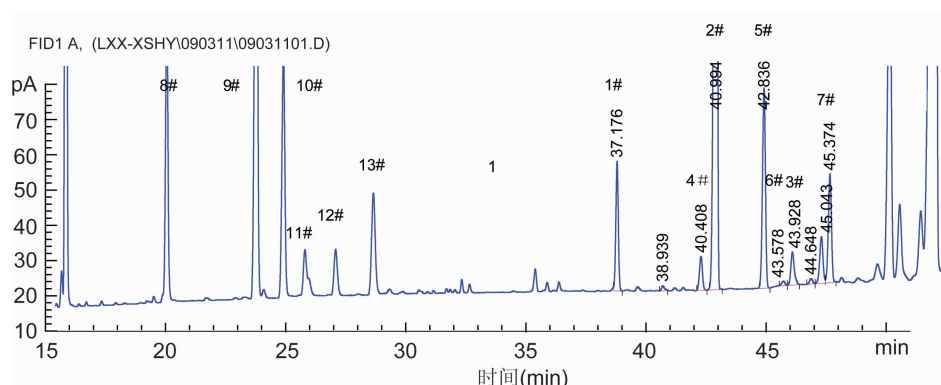


图 4 金港莪术油 GC 图谱

亦有对应的峰。其中主要抗肿瘤活性成分 β -elemene、 δ -榄香烯、 γ -elemene 在莪术油和温莪术的相应位置均已出峰。

讨 论

榄香烯是从传统中药姜科植物郁金 (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) 提取的抑制肿瘤活性成分,目前以 β -榄香烯为主要活性成份,自 1993 年起陆续上市的品种已有榄香烯原料药、榄香烯注射液(小容量、静脉乳剂)、榄香烯口服乳等产品,大连华立金港药业有限公司拥有独家生产权。莪术油为榄香烯系列产品的原材料,其安全、稳定、可靠性至关重要。以金港莪术油 GC 指纹图谱为指标考察其质量,比以单一有效成分作为含量测定指标控制质量更准确、综合、全面。以往文献报道莪术油的 GC 指纹图谱研究多为单独的莪术油质量研究^[18-20],本实验的指纹图谱研究属于结合工艺,进行在线质量控制。旨在为榄香烯系列制剂提供稳定、可控的原料-莪术油。经实验,确定了金港莪术油较多的(19 个)GC 共有特征指纹峰;各主要抗

肿瘤活性物质(δ -elemene、 β -elemene、 γ -elemene 等)色谱峰均可在原药材指纹图谱中得到追踪,说明具有一定相关性,证明了金港莪术油制备工艺的合理性、可行性,以及质量的可控性。建立的此法,为保证不同批次金港莪术油的质量控制提供科学依据,为莪术油进一步加工生产中药制剂,制定指纹图谱奠定基础。但是,由于供试品浓度及其他实验条件因素的影响,莪术油 GC 图谱中的 19 个特征未能全部在原药材温莪术中找到;后续的实验有望进一步完善。

利用中药指纹图谱相似度软件计算相似度,得到大于 0.960 的相似度。考虑批量生产,规定供试品指纹图谱与质量标准所附的对照指纹图谱暂定相似度应不低于 0.95,即符合本品要求。利用相似度软件计算相似度,反映整体质量特征,克服了“只见树木不见森林”的缺点和峰面积计算过程中的人为因素。评价指纹图谱的相似度方法可分成三种类型:采用差异评价指纹图谱的相似度;通过图谱间的相似性评价相似度(如夹角余弦法,相关系数法和 Nei 系数法;在相似性的基础上引入差异来评价相似度^[21]。在药材加工和

提取过程中,指纹图谱中小峰的缺失比较常见。采用相关系数,夹角余弦和距离系数评价相似度较为适宜。在后续的实验,应进一步比较这三种方法评价莪术油的 GC 指纹图谱的相似度。

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] 成晓静,刘华钢,赖茂祥.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.
- [3] Jacobi SA, Kikuchi A, Gianni SA, et al. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies in mango ginger (*Curcuma armata* Roxb.; Zingiberaceae)[J]. Phytother Res, 2007, 21(6): 507-516.
- [4] Wilson B, Abraham G, Manju VS, et al. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 99(1): 147-151.
- [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] Wang B, Peng XX, Sun R, et al. Systematic review of β -elemene injection as adjunctive treatment for lung cancer[J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(11): 813-823.
- [7] 苏影,王成昆,彭波. β -榄香烯对 HepG2 和 HT-29 细胞体外抗癌作用的实验研究[J].当代医学,2008,14(11):1-3.
- [8] 周洪语,沈健康,侯菊生,等.榄香烯诱导神经胶质瘤细胞凋亡的实验研究[J].癌症,2003,22(9):959-963.
- [9] 侯菊生,徐英辉,陈玉仁,等.榄香烯治疗颅内恶性肿瘤临床研究(附 30 例报告)[J].中华神经外科杂志,1994,10(4):225-228.
- [10] 闫涛,黄惠玲,杨栓雀.榄香烯乳和放疗联合治疗晚期宫颈癌疗效观察[J].陕西肿瘤医学,1999,7(3):167-169.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:化学工业出版社,2005 版一部附录 VI E.
- [12] 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)[Z].北京,2000-08-15.
- [13] 杨丰庆,李绍平,陈莹,等.中药莪术 GC-MS 指纹图谱研究[J].药学学报,2005,40(11):1013-1018.
- [14] 周欣,陈华国,赵超,等.蓬莪术药材的指纹图谱研究[J].时珍国医国药,2008,19(6):1359-1360.
- [15] 王世勇,宋力飞,黄晓玲,等.郁金的指纹图谱研究[J].中药新药与临床药理,2004,15(6):406-409.
- [16] 王淑玲,孙秀梅,张兆旺,等.半夏白术天麻汤 4 种方法提取液指纹图谱比较[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2010,9(2):127-134.
- [17] 曾建红.广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱的构建及其谱效关系的研究[D].长沙:中南林业科技大学,2007.
- [18] 李想,孙艳涛,张振秋.毛细管气相色谱法建立中药莪术油指纹图谱研究[J].中成药,2010,32(2):176-179.
- [19] 周欣,李章万,王道平,等. GC-MS 法建立温莪术挥发油指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2004,29(12):1138-1141.
- [20] 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):2438-2430.
- [21] 聂磊,曹进,罗国安,等.中药指纹图谱相似度评价方法的比较[J].中成药,2005,27(3):249-252.

(收稿:2013-09-22 修回:2016-03-03)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅