

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.13.005

一测多评法测定毛郁金中姜黄素和去甲氧基姜黄素含量*

刘偲翔¹, 黄艳², 蒋秀珍², 柴玲², 赖茂祥², 林霄², 刘布鸣^{2△}

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011; 2. 广西中医药研究院·广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要:目的 建立毛郁金药材中姜黄素和去甲氧基姜黄素含量的一测多评法。方法 以姜黄素为内参物, 确立其与去甲氧基姜黄素的相对校正因子。分别采用外标法和一测多评法测定毛郁金中姜黄素和去甲氧基姜黄素的含量, 评价一测多评法的计算值与外标法实测值的相对误差, 验证一测多评法的合理性、可行性和可重复性。结果 所建立的校正因子重复性良好, 毛郁金药材中采用校正因子计算的含量值与外标法实测值间无明显差异。结论 一测多评法可作为新的质量评价模式, 用于毛郁金药材的质量评价。

关键词:一测多评法; 相对校正因子; 毛郁金; 姜黄素; 去甲氧基姜黄素; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)13-0019-03

Content Determination of Curcumin and Demethoxycurcumin in *Curacuma Aromatica* by QAMS

LIU Sixiang¹, HUANG Yan², JIANG Xiuzhen², CHAI Ling², LAI Maoxiang², LIN Xiaoxiao², LIU Buming²

(1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530011; 2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences & Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, China 530022)

Abstract: **Objective** To establish a QAMS method for the content determination of curcumin and demethoxycurcumin in *Curacuma aromatica*. **Methods** Curcumin was used as the internal reference substance, and the relative correlation factors(RCF) of demethoxycurcumin to curcumin were calculated and evaluated. The contents of curcumin and demethoxycurcumin in *Curacuma aromatica* were determined by the external standard method and QAMS, respectively. The relative error between the calculated value of QAMS method and the measured value of external standard method was compared to verify the rationality, feasibility and repeatability of QAMS method. **Results** The RCF had good reproducibility, and there was no significant difference between the value calculated by RCF and the value measured by external standard method. **Conclusion** The QAMS method can be used as a new quality assessment model for the quality control of *Curacuma aromatica*.

Key words: QAMS; relative correlation factors; *Curacuma aromatica*; curcumin; demethoxycurcumin; content determination

一测多评(QAMS)是一种用于多成分质量控制的分析方法,可解决中药质量控制中对照品短缺问题,降低中药质量控制分析成本。目前,该方法已成功应用于黄连、木通、人参等20多种常用中药的质量控制评价。毛郁金为姜科植物毛郁金 *Curacuma aromatica* Salisb. 的干燥根茎,其标准收载于《广西壮族自治区壮药质量标准·第二卷》^[1],具有行气解郁、凉血破瘀和利胆作用,用于治疗胸闷胁痛、胃腹胀痛、黄疸、吐血、尿血、月经不调和癫痫等病症^[2]。药理试验证明,毛郁金具有镇痛、止血^[3]、抗炎^[4]及免疫抑制^[5]等作用。姜黄素类化合物是毛郁金药材的主要活性成分,具有良好的抗氧化、抗炎、抗肿瘤、降血糖、抗HIV功效,可治疗心血管疾病和阿尔茨海默病等^[6]。本课题组前期研究中已分离得到毛郁金中姜黄素、去甲氧基姜黄素等17个化合物,其中大部分为倍半萜化合物^[7],还含有挥发油等化合物^[8-9],并采用高效液相色谱(HPLC)法建立了毛郁金中姜黄素的含量测定方法^[10]。但仅以姜黄素为指标性成分对毛郁金药材进行质量控制,且其含量较低,尚不能真正体现和保证毛郁金的内在本质及其相关制剂的质

量。姜黄素和去甲氧基姜黄素为同一化学母核,在药材中的相对含量相当,为了更好地保证毛郁金的有效性、安全性和专属性,故以两者为指标评价毛郁金质量。本研究中采用一测多评法测定了毛郁金中姜黄素和去甲氧基姜黄素的含量,以探讨一测多评法在毛郁金多指标质量评价中的适用性和可行性。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器:KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XS205型分析天平(梅特勒-托利多公司);UC3282型高效液相色谱仪,UC3292型紫外检测仪,均购于南宁威玛龙色谱科技有限公司;Waters1525-1998型高效液相色谱仪(沃特世公司);UV2550紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。

试剂:姜黄素(纯度>98%,批号为111530-201208),去甲氧基姜黄素对照品(纯度>98%,批号为111531-201208),均购自中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱级,赛默飞世尔科技有限公司),磷酸(分析纯,广州新建精细化工厂),其他试剂均为分析纯;毛郁金 *Curacuma aromatica* Salisb. 根茎采自广西横县、灵山和南

*基金项目:广西科技攻关重大专项[桂科重1355001-4;桂科重14124002-11]。

第一作者:刘偲翔,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为药品质量控制和管理,(电子信箱)58802468@qq.com。

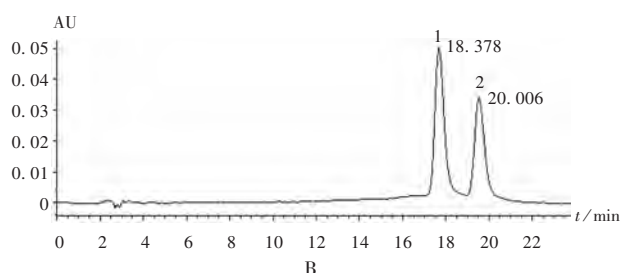
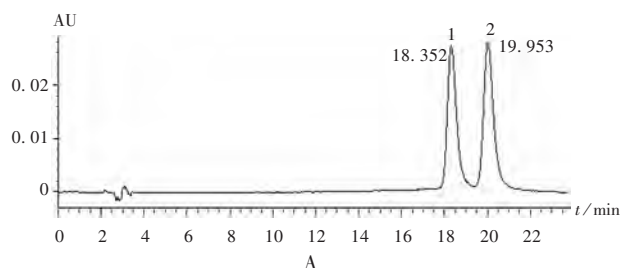
△通信作者:刘布鸣,男,大学本科,研究员,研究方向为中药、天然药化学成分与质量标准,(电子信箱)liu_buming@163.com。

宁西郊,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Ecosil ODS-Extremnd 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-4%磷酸溶液(42:58, V:V);流速:1.0 mL/min;检测波长:425 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。理论板数按姜黄素峰计算应不低于5000,在此色谱条件下,可完全分离。该色谱条件下色谱图见图1。



1. 去甲氧基姜黄素 2. 姜黄素
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

2.2 溶液制备

取姜黄素对照品和去甲氧基姜黄素对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,制成质量浓度姜黄素为20.04 μg/mL、去甲氧基姜黄素为19.96 μg/mL的混合对照品溶液。取毛郁金根茎粉末1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声提取1 h,放至室温,补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,再用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

标准曲线制备:精密吸取混合对照品溶液1,2,3,4,5,6 mL,分别置10 mL容量瓶,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配成系列对照品溶液,以进样量(X)为横坐标、峰面

积分值(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 毛郁金中2个姜黄素类成分回归方程及线性范围(n=6)

成分	回归方程	r	线性范围(μg)
A	$Y = 7.2 \times 10^6 X - 21\ 096$	0.999 7	0.020 0~0.120 2
B	$Y = 6.6 \times 10^6 X - 81\ 46.3$	0.999 7	0.019 9~0.119 8

注:A为姜黄素,B为去甲氧基姜黄素。下表同。

相对校正因子计算:取标准曲线制备项下制备的6个不同质量浓度的混合对照品溶液,分别进样10 μL,以姜黄素为内标,在上述特定范围内按照相对校正因子计算公式 $f_i = f_i / f_s = (m_i \times A_s) / (m_s \times A_i)$ 计算姜黄素对去甲氧基姜黄素的相对校正因子,其中i为某化合物,s为内标物,m为质量,A为峰面积。结果见表2。

表2 不同浓度对照品溶液的相对校正因子($f_{A/B}$)

项目	成分	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}(\mu\text{g})$	RSD(%)
进样量	A	0.020 0	0.040 1	0.060 1	0.080 2	0.100 2	0.120 2		
(μg)	B	0.020 0	0.039 9	0.059 9	0.079 8	0.099 8	0.119 8	0.958 7	1.51
$f_{A/B}$		0.936 4	0.972 8	0.974 6	0.960 8	0.958 6	0.948 8		

精密度试验:取同一供试品溶液,精密吸取10 μL,连续进样6次,测定峰面积。结果姜黄素和去甲氧基姜黄素峰面积日内精密度的RSD分别为1.50%和1.33%(n=6),表明仪器精密度高。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10 h时进样,测定峰面积。结果姜黄素和去甲氧基姜黄素面积的RSD分别为1.65%和1.38%(n=6),表明供试品溶液10 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品粉末,依法制备供试品溶液6份,按色谱条件测定。结果姜黄素和去甲氧基姜黄素的平均含量分别为0.111 3 mg/g和0.119 4 mg/g,RSD分别为1.76%和2.10%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的毛郁金根茎粉末约0.5 g,共6份,精密称定,置平底烧瓶中,分别加入精密称定的姜黄素60.12 μg,去甲氧基姜黄素对照品59.88 μg,依法制备供试品溶液,进样测定。结果见表3。

2.4 校正因子的重复性考察

色谱柱考察:取标准曲线制备项下系列混合对照品溶液,分别进样10 μL,以姜黄素为内标,计算姜黄素对去甲氧基姜黄素的校正因子,考察Hypersil BDS C₁₈柱、

表3 加样回收试验结果(n=6)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得含量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}(\%)$		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.511 6	0.511 6	0.059 6	0.067 0	0.060 1	0.059 9	0.120 3	0.127 4	101.00	101.83				
0.518 6	0.518 6	0.060 0	0.067 2	0.060 1	0.059 9	0.119 4	0.127 5	98.84	100.67				
0.510 9	0.510 9	0.059 4	0.066 8	0.060 1	0.059 9	0.121 1	0.127 0	102.66	100.50				
0.505 6	0.505 6	0.059 0	0.066 4	0.060 1	0.059 9	0.117 8	0.125 8	97.84	99.17	100.09	99.97	1.70	1.23
0.505 9	0.505 9	0.058 6	0.066 0	0.060 1	0.059 9	0.118 5	0.125 1	99.67	98.66				
0.507 5	0.507 5	0.058 8	0.066 1	0.060 1	0.059 9	0.119 2	0.125 4	100.50	99.00				

Ultimate XB-C₁₈柱和 ECOSIL ODS-3 柱的影响。结果见表 4。可见,不同色谱柱所得相对校正因子相差不大。

表 4 不同色谱柱的相对校正因子($f_{A/B}$)

色谱柱	质量浓度($\mu\text{g/mL}$)						$\bar{X}$	RSD(%)
	0.020 0	0.040 1	0.060 1	0.080 2	0.100 2	0.120 2		
Hypersil BDS C ₁₈ 柱	0.964 6	0.971 6	0.976 6	0.965 4	0.955 2	0.931 5	0.960 8	1.67
Ultimate XB-C ₁₈ 柱	0.928 6	0.965 5	0.977 4	0.975 2	0.946 8	0.957 8	0.958 6	1.93
ECOSILODS-3 柱	0.936 4	0.972 8	0.974 6	0.960 8	0.958 6	0.948 8	0.958 7	1.51

高效液相色谱考察:取上述混合对照品溶液,于 Waters1525-1998 型和威玛龙 UC3282-3292 型高效液相色谱仪分别进样各 10 μL ,以姜黄素为内标,计算姜黄素对去甲氧基姜黄素的校正因子,结果见表 5,表明在不同液相色谱系统下所得的相对校正因子基本一致。

表 5 不同高效液相色谱的相对校正因子

仪器	色谱柱	$f_{A/B}$
Waters1525-1998 型	Hypersil BDS C ₁₈ 柱	0.976 6
威玛龙 UC3282-3292 型	Hypersil BDS C ₁₈ 柱	0.985 4

色谱峰专属性考察:利用相对保留值($r = t_{R1}/t_{R2}$)定位,即以待测组分与姜黄素色谱峰的相对保留时间来确定。去甲氧基姜黄素与姜黄素峰的相对保留时间的平均值为 1.111 7, RSD 为 1.54% ($n=6$)。结果见表 6。

表 6 2 种成分的保留时间及相对保留时间

仪器	色谱柱	理论板数	$t_{R1}(\text{min})$	$t_{R2}(\text{min})$	t_{R1}/t_{R2}
Waters1525-1998 型	Hypersil BDS C ₁₈ 柱	9 648	20.400	18.520	1.101 5
	Ultimate XB-C ₁₈ 柱	9 664	22.054	19.642	1.122 8
	ECOSILODS-3 柱	9 718	26.645	24.258	1.098 4
威玛龙 UC3282-3292 型	Hypersil BDS C ₁₈ 柱	11 445	28.000	25.400	1.102 4
	Ultimate XB-C ₁₈ 柱	11 803	31.825	28.846	1.103 3
	ECOSILODS-3	11 100	35.648	31.226	1.141 6

注: t_{R1} 为姜黄素的保留时间, t_{R2} 为去甲氧基姜黄素的保留时间。

2.5 一测多评法与外标法结果比较

取不同产地样品粉末各 1.0 g,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别采用一测多评法和外标法计算含量。结果见表 7。

表 7 不同产地毛郁金含量测定结果(mg/g , $n=2$)

产地	采收时间	A	B	
			一测多评	外标
广西横县 1	2013 年 05 月	0.110 6	0.126 8	0.119 7
广西横县 2	2013 年 10 月	0.114 5	0.124 3	0.122 5
广西灵山	2013 年 10 月	0.108 7	0.119 8	0.114 6
南宁西郊	2013 年 10 月	0.094 1	0.111 7	0.110 5

3 讨论

本研究中采用超声、回流提取毛郁金药材,结果显示,两者提取方式差异不明显,而超声提取方法简单,故

采用超声提取。考察了甲醇、50% 甲醇、50% 乙醇作为毛郁金药材的提取溶剂,结果表明用甲醇提取干扰杂质较少,噪音少,因此选用甲醇为提取溶剂。提取时间考察了 30, 60, 90, 120 min,结果显示,超声提取 60 min 基本可将供试品溶液中的姜黄素和去甲氧基姜黄素提取完全,90 min 后其含量有所下降,故确定提取时间为 60 min。

参照 2015 年版《中国药典(一部)》莪术中姜黄素含量测定方法^[11],以乙腈-4% 磷酸溶液(48:52, V:V)为流动相洗脱,姜黄素特征峰未能与去甲氧基姜黄素特征峰较好地分离。此方法对于毛郁金药材姜黄素与去甲氧基姜黄素的分离效果不理想。通过反复试验,选用乙腈-4% 磷酸溶液(42:58, V:V)为流动相,色谱峰峰形尖锐,姜黄素特征峰与去甲氧基姜黄素特征峰能较好分离,样品检测 25 min 完成,节省了试验成本和时间。

本研究首次采用“一测多评”法测定毛郁金药材中姜黄素和去甲氧基姜黄素的含量,考察了不同品牌的色谱柱和色谱仪对姜黄素、去甲氧基姜黄素之间相对校正因子的影响,该方法与外标法测得的含量无显著性差异,说明建立的不同化合物之间的校正因子具有较高的可信度,可在仅有一个对照品时通过一测多评技术实现同步测定药材中多成分的指标成分,为毛郁金药材的多指标质量控制模式提供了新方法。

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] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1975:87.
- [3] 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.
- [4] 郭晓应,陈敏珠,徐叔云. 郁金对大鼠抗炎作用[J]. 药学通报, 1982,17(6):1.
- [5] 李凌夫,贾宽,杨宝华,等. 郁金 I 号注射液对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 中医药学报,1987,27(2):39.
- [6] 吴杰,李丹,沈秉正,等. 姜黄素类化合物的药理活性研究进展[J]. 中国药师,2013,16(12):1918-1920.
- [7] 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.
- [8] 柴玲,刘布鸣,林霄,等. 毛郁金挥发油化学成分的 GC/MS 分析[J]. 中药材,2012,35(7):1102-1104.
- [9] 蒋秀珍,黄艳,林霄,等. 毛郁金脂溶性成分的 GC/MS 分析[J]. 广西中医药,2014,37(2):75-78.
- [10] 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.
- [11] 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,2015:274-275.

(收稿日期:2018-09-11)