

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.14.021

高效液相色谱法测定温郁金药材醋制前后5种成分含量*

乔溪莹¹, 瓮学智^{2△}

(1. 北京中医药大学附属护国寺中医医院, 北京 100035; 2. 北京市丰台区食品药品安全监控中心, 北京 100071)
摘要:目的 建立测定温郁金药材醋制前后5种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Waters Sunfire - C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.5% 冰醋酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 214 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 莪术烯醇、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、β-榄香烯的进样量分别在 0.019 89~0.318 30 μg ($r=0.999\ 5, n=5$), 0.127 80~2.046 00 μg ($r=0.999\ 3, n=5$), 0.019 05~0.304 80 μg ($r=0.999\ 7, n=5$), 0.062 94~1.007 00 μg ($r=0.999\ 8, n=5$), 0.064 68~1.035 00 μg ($r=0.999\ 5, n=5$) 范围内与峰面积线性关系良好; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.5%; 平均加样回收率分别为 101.48%, 98.27%, 97.14%, 103.41%, 101.84%, RSD 分别为 1.75%, 1.15%, 1.03%, 1.42%, 1.00% ($n=6$); 温郁金药材醋制后上述5种成分含量均减少。结论 该方法简单、可行, 重复性和稳定性良好, 能有效评价温郁金药材的质量, 可为温郁金药材资源可持续开发利用提供参考。

关键词: 温郁金; 醋制; 高效液相色谱法; 莪术烯醇; 莪术二酮; 莪术醇; 吉马酮; β-榄香烯

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)14-0092-04

Content Determination of Five Components in *Curcuma Wenyujin* Before and After Processing with Vinegar by HPLC

QIAO Xiying¹, WENG Xuezh²

(1. Huguosi Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing, China 100035; 2. Beijing Fengtai District Food and Drug Safety Monitoring Center, Beijing, China 100071)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of five components in *Curcuma wenyujin* before and after processing with vinegar. **Methods** The chromatographic column was Waters Sunfire - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.5% glacial acetic acid aqueous solution with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 214 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of curcumenol, curdione, curcumol, germacrone and β-elemene were 0.019 89 - 0.318 30 μg ($r=0.999\ 5, n=5$), 0.127 80 - 2.046 00 μg ($r=0.999\ 3, n=5$), 0.019 05 - 0.304 80 μg ($r=0.999\ 7, n=5$), 0.062 94 - 1.007 00 μg ($r=0.999\ 8, n=5$) and 0.064 68 - 1.035 00 μg ($r=0.999\ 5, n=5$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 1.5%. The average recoveries of curcumenol, curdione, curcumol, germacrone and β-elemene were 101.48%, 98.27%, 97.14%, 103.41% and 101.84% with RSDs of 1.75%, 1.15%, 1.03%, 1.42% and 1.00% ($n=6$), respectively. The contents of the above five components in vinegar-processed *Curcuma wenyujin* decreased. **Conclusion** The method is simple, feasible, reproducible and stable, which can effectively evaluate the quality of *Curcuma wenyujin* before and after processing with vinegar. It can provide a reference for the sustainable development and utilization of *Curcuma wenyujin*.

Key words: *Curcuma wenyujin*; process with vinegar; HPLC; curcumenol; curdione; curcumol; germacrone; β-elemene

温郁金为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥块根, 具有活血止痛、行气解郁功效, 是中医治疗痛经、乳房胀痛、胸腹刺痛的常用药物^[1]。温郁金药材中含有莪术烯醇、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、β-榄香烯等活性成分, 可通过醋制、酒制等加工提纯方式制成多种成品^[2]。醋制是常用的加工炮制方式, 会影响中药成分含量^[3]。目前, 针对温郁金药材醋制前后有效成分含量的变化仍有争议。因此, 本研究中探讨了温郁金药材醋制前后莪术烯醇、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、β-榄香烯5种有效成分含量的变化情况,

旨在明确该炮制方式对温郁金药材有效活性成分的影响, 为后续温郁金药材的加工炮制及临床应用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); CP225D 型分析天平 (德国 Sartorius 公司, 精度为十万分之一); KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); FW100 型万能粉碎机 (天津市泰斯特仪器有限公司); Millipore 超纯水处理系统 (美国 Millipore 公司)。

* 基金项目: 北京市卫生科技发展专项基金 [2018-4-085]。

第一作者: 乔溪莹, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为临床中药学, (电子信箱) 573350284@qq.com。

△ 通信作者: 瓮学智, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药饮片真伪鉴定, (电子信箱) 627307592@qq.com。

1.2 试药

莪术二酮对照品(批号为111800-201302,含量99.8%),莪术醇对照品(批号为100185-201908,含量99.9%),吉马酮对照品(批号为111665-201906,含量99.8%), β -榄香烯对照品(批号为100268-201903,含量99.4%),均购自中国食品药品检定研究院;莪术烯醇对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号为R21M9F61833,含量 $\geq 98\%$);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。温郁金药材样品,2020年2月采集于浙江省温州市的温郁金种植示范基地,由北京市药品检定研究院中药饮片检验员杜小伟鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

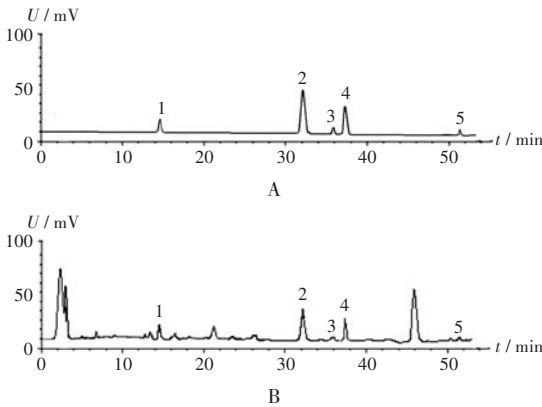
色谱柱:Waters Sunfire-C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-0.5%冰醋酸水溶液(B),梯度洗脱(0~13 min时42%A,13~20 min时42%A $\rightarrow$ 50%A,20~40 min时50%A $\rightarrow$ 80%A,40~42 min时80%A $\rightarrow$ 90%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:214 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

取莪术烯醇、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯对照品各10 mg,精密称定,置5 mL棕色容量瓶中,加甲醇充分溶解并定容,得质量浓度分别为1.061,1.023,1.016,1.007,1.035 mg/mL的单一对照品贮备液;分别吸取适量置10 mL棕色容量瓶中,加甲醇定容,按2倍稀释法稀释,获得对应的对照品溶液,加甲醇定容即得混合对照品溶液。取药材样品适量,制备温郁金生片,以5:1(m/V)比例混合温郁金生片与米醋,密封2 h后蒸15 h,取出晾干并研磨成粉,取1 g(过40目筛),精密称定,加入甲醇20 mL,密塞称定质量,超声(功率200 W,频率50 kHz)处理40 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液各10 μ L,按2.1项下色谱条件进样测



1. 莪术烯醇 2. 莪术二酮 3. 莪术醇 4. 吉马酮 5. β -榄香烯
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Curcumenol 2. Curdione 3. Curcumol 4. Germacrone 5. β -elemene
A. Mixed reference solution B. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

定,记录色谱图。供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相应位置有吸收峰,且分离度均大于1.5,基线分离良好;理论板数按莪术烯醇峰计应大于3 000。详见图1。

线性关系考察:取2.2项下混合对照品溶液适量,加甲醇稀释,得莪术烯醇质量浓度分别为31.830,15.915,7.957,3.979,1.989 μ g/mL,莪术二酮质量浓度分别为204.60,102.30,51.15,25.58,12.79 μ g/mL,莪术醇质量浓度分别为30.480,15.240,7.620,3.810,1.905 μ g/mL,吉马酮质量浓度分别为100.700,50.350,25.180,12.590,6.294 μ g/mL, β -榄香烯质量浓度分别为103.500,51.750,25.880,12.940,6.469 μ g/mL的系列混合对照品溶液。取适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(X , μ g)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程。结果见表1。

精密度试验:取醋制后饮片样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定6次,记录峰面积。结果见表1,表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液,室温下放置0,2,4,8,16,24 h时,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰

表1 线性关系考察及精密度、稳定性、重复性试验结果

Tab. 1 Results of the linear relation, precision, stability and repeatability tests

成分	回归方程	r	线性范围(μ g)	精密度试验	稳定性试验	重复性试验	
				RSD(%)	RSD(%)	含量(μ g/g)	RSD(%)
莪术烯醇	$Y_1 = 2\,485\,030\,X_1 + 624.2$	0.999 5	0.019 89~0.318 30	1.26	1.12	0.045 1	1.08
莪术二酮	$Y_2 = 852\,043\,X_2 + 153.2$	0.999 3	0.127 80~2.046 00	1.15	1.22	1.992 0	1.31
莪术醇	$Y_3 = 522\,035\,X_3 + 512.5$	0.999 7	0.019 05~0.304 80	0.92	0.94	0.084 2	0.74
吉马酮	$Y_4 = 3\,122\,571\,X_4 + 234.4$	0.999 8	0.062 94~1.007 00	0.89	0.99	0.586 5	0.72
β -榄香烯	$Y_5 = 202\,457\,X_5 + 357.8$	0.999 8	0.064 68~1.035 00	1.43	1.35	0.406 3	1.13

面积。结果见表1,表明供试品溶液室温放置24 h内稳定。
重复性试验:取醋制后饮片样品,按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果见表1,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取醋制后饮片样品共6份,每份0.5 g,精密称定,分别精密加入一定质量浓度的混合对照品溶液,再定容至20 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取醋制前后的样品粉末各1 g,分别按2.2项下方法平行制备3份供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,结果见表3。可见,醋制后的饮片

表2 加样回收试验结果(n=6)

Tab.2 Results of the recovery test (n=6)						
成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
莪术烯醇	0.023 7	0.022 5	0.046 3	100.44	101.48	1.75
	0.022 1	0.022 5	0.045 4	103.55		
	0.021 9	0.022 5	0.044 2	99.11		
	0.022 8	0.022 5	0.045 6	101.33		
	0.022 3	0.022 5	0.045 6	103.56		
莪术二酮	0.023 4	0.022 5	0.046 1	100.89	98.27	1.15
	0.992 1	0.995 2	1.968 5	98.11		
	0.992 8	0.995 2	1.967 1	97.90		
	0.995 5	0.995 2	1.987 3	99.66		
	0.991 7	0.995 2	1.965 4	97.84		
莪术醇	0.993 6	0.995 2	1.983 5	99.47	97.14	1.03
	0.997 1	0.995 2	1.958 9	96.64		
	0.042 2	0.042 0	0.083 3	97.86		
	0.042 1	0.042 0	0.082 8	96.90		
	0.042 2	0.042 0	0.082 5	95.95		
吉马酮	0.042 3	0.042 0	0.083 2	97.38	103.41	1.42
	0.042 2	0.042 0	0.082 6	96.19		
	0.042 2	0.042 0	0.083 6	98.57		
	0.288 3	0.293 1	0.593 2	104.03		
	0.282 6	0.293 1	0.590 1	104.91		
β -榄香烯	0.285 4	0.293 1	0.592 5	104.78	101.84	1.00
	0.286 1	0.293 1	0.589 2	103.41		
	0.283 4	0.293 1	0.582 1	101.91		
	0.289 5	0.293 1	0.586 7	101.40		
	0.202 1	0.203 3	0.408 7	101.62		
β -榄香烯	0.205 7	0.203 3	0.409 5	100.25	101.84	1.00
	0.203 5	0.203 3	0.412 3	102.71		
	0.203 1	0.203 3	0.413 6	103.53		
	0.204 4	0.203 3	0.410 2	101.23		
β -榄香烯	0.205 2	0.203 3	0.411 9	101.67		

表3 温郁金药材醋制前后的5种成分含量变化($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/g}$, n=3)

Tab.3 Content changes of five components in *Curcuma wenyujin* before and after processing with vinegar ($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/g}$, n=3)

时间	莪术烯醇	莪术二酮	莪术醇	吉马酮	β -榄香烯
醋制前	0.055 1±0.000 7	2.077 0±0.012	0.092 8±0.001 8	0.615 4±0.001 4	0.433 1±0.002 1
醋制后	0.045 8±0.001 1	1.995 0±0.014	0.084 1±0.002 2	0.586 0±0.002 1	0.405 7±0.001 5

样品中莪术烯醇、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯的含量均较醋制前低。

3 讨论

莪术烯醇、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯是温郁金中的主要有效成分,均为倍半萜类化合物,主要分布于挥发油成分中并可以发挥抗肿瘤、抗血栓、抗炎功效,5种成分分离度均大于1.5,且5种有效成分进样量与峰面积间均存在良好的线性关系。因此,本研究中选此5种成分为温郁金药材醋制前后成分变化的检测指标。

吉马酮、莪术醇等具有1,5-二烯结构化合物若采用常用的气相色谱法、气相色谱-质谱联用法检测,在色谱柱高温条件下会造成挥发油活性成分重排、转化并产生数据偏差,影响数据的真实性与可参考价值^[4]。HPLC法是检测有效成分的常用技术之一,具有准确度高、检测速度快等多项优势^[5]。本研究结果显示,采用HPLC法检测温郁金饮片片中5种有效成分,其精密性、稳定性及重复性均较好,且具有较高的适用性。因此,本研究选用HPLC法检测温郁金药材/饮片有效活性成分的变化情况。

酯类物质是醋中的主要成分,酯类、醇类物质在醋制加热条件下与温郁金药材/饮片中的活性成分相互作用,进而导致温郁金中成分含量的升高或降低^[6]。温郁金药材醋制前后的药效功能各有所倚重,生温郁金长于行气解郁、清心凉血,醋制后主入肝经,尤善于散瘀止痛。本研究中醋制后温郁金饮片的莪术烯醇、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 β -榄香烯含量均降低,其中莪术二酮降低最显著。童黄锦^[7]的研究表明,温郁金药材醋制后能增强其对血小板聚集、疼痛因子、改善血液循环等药效学指标的调节控制作用。温郁金药材醋制前后 β -榄香烯、吉马酮等成分含量减少而其疗效反而增强,其原因为中药炮制加工及辅料会影响各成分在体内的转化过程,进而导致药效学存在差异,因此温郁金药材醋制后可增强散瘀止痛疗效^[8-10]。但本研究的结果与部分文献结果存在一定差异,其原因可能是选取的温郁金药材产地不同,其受到土壤养分、水质、光照等地域因素影响导致活性成分含量不同,因此醋制前后的成分变化情况存在差异,后续可针对不同产地的温郁金醋制前后成分变化情况进行深入研究。本研究中莪