

RP-HPLC 同时测定莪术中莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的含量

任明*, 李九席

(郑州大学第二附属医院中药学部, 郑州 450014)

[摘要] 目的: 用 RP-HPLC 同时测定莪术中莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的含量, 对不同产地莪术的莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯成分进行研究。方法: 采用依利特 Hypersil ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 色谱柱, 流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B), 梯度洗脱, 检测波长 215 nm, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温 25 $^{\circ}$ C。结果: 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯分别在 0.544 ~ 5.44 μ g ($r=0.999\ 6$), 0.414 ~ 4.14 μ g ($r=0.999\ 8$), 0.122 ~ 1.22 μ g ($r=0.999\ 5$), 1.78 ~ 17.8 μ g ($r=0.999\ 3$), 0.318 ~ 3.18 μ g ($r=0.999\ 4$), 0.506 ~ 5.06 μ g ($r=0.999\ 5$) 呈良好线性关系, 平均回收率分别为 99.60% (RSD 2.71%), 101.48% (RSD 1.37%), 99.50% (RSD 2.47%), 100.29% (RSD 2.52%), 99.87% (RSD 1.51%), 100.58% (RSD 1.33%)。结论: 方法灵敏、准确, 分离效果较好, 无干扰, 可为莪术质量标准评价提供依据, 为临床合理用药提供科学依据。

[关键词] 高效液相色谱; 莪术二酮; 莪术醇; 吉马酮; 莪术烯; 呋喃二烯; β -榄香烯

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0155-04

[doi] 10.11653/syfy2013210155

Simultaneous Determination of Curdione, Curcumol, Germacrone, Curzerene, Furanodiene, and β -Elemene in *Curcuma zedoary* by RP-HPLC

REN Ming*, LI Jiu-xi

(Department of Chinese Medicine, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method for determining curdione, curcumol, germacrone, curzerene, furanodiene and β -elemene in *Curcuma zedoary* by RP-HPLC. **Method:** A Hypersil ODS column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) was used with the mixture of acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL \cdot min⁻¹. The column temperature was kept at 25 $^{\circ}$ C. The detection wavelength was set at 215 nm. **Result:** The calibration curves of curdione, curcumol, germacrone, curzerene, furanodiene and β -elemene were in good linearity over the ranges of 0.544-5.44 μ g ($r=0.999\ 6$), 0.414-4.14 μ g ($r=0.999\ 8$), 0.122-1.22 μ g ($r=0.999\ 5$), 1.78-17.8 μ g ($r=0.999\ 3$), 0.318-3.18 μ g ($r=0.999\ 4$), 0.506-5.06 μ g ($r=0.999\ 5$) respectively, and the average recoveries were 99.60% (RSD 2.71%), 101.48% (RSD 1.37%), 99.50% (RSD 2.47%), 100.29% (RSD 2.52%), 99.87% (RSD 1.51%), 100.58% (RSD 1.33%) respectively. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate; the separation effect is good without interference. It can provide a basis as evaluation standard for quality of Rhizoma Zedoariae, and provide scientific basis for clinical rational drug use.

[Key words] HPLC; curdione; curcumol; germacrone; curzerene; furanodiene; β -elemene

莪术,原名蓬莪茂,为姜科植物蓬莪术、广西莪术或温郁金的干燥根茎,辛、苦,温,归肝、脾经。能行气、破血、消积、止痛,主治心腹胀痛、症瘕、积聚、宿食不消、妇女血瘀经闭、跌打损伤^[1]。现代药理研究表明,莪术具有抗肿瘤、抗早孕、抗菌、抗炎、增加股动脉血流量、保肝、抑制血小板聚集和抗血栓形成等作用^[2-3]。莪术的主要成分为姜黄素和挥发油,其中挥发油占 1% ~ 2.5%。而挥发油中主要成分为单萜和倍半萜类,如莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯等,这些挥发油具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎等功效^[4-6],直接关系着莪术的药效作用。《中国药典》2010 年版中以挥发油总量来作为莪术质量控制的指标,本文用反相高效液相色谱法同时测定莪术中莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的含量,以建立莪术完善的质量控制方法。

1 材料

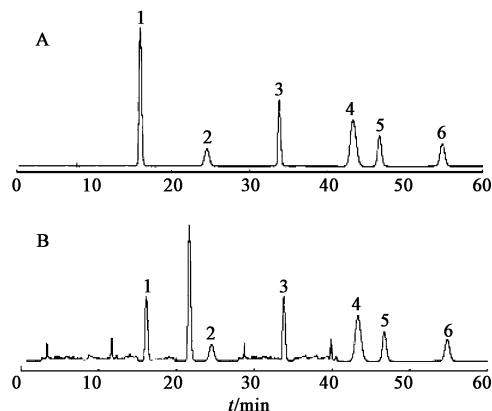
Waters 2695 型高效液相色谱仪(配置 2998 紫外检测器,Empowers 2 色谱工作站,四元梯度泵,柱温箱,自动进样器),KQ-100 型超声清洗器(昆明市超声仪器有限公司),Sartorius BP211D 型分析天平(德国赛多利斯), β -榄香烯对照品(批号 100268-200403)、莪术醇对照品(批号 100185-200505)、吉马酮对照品(批号 111665-200903),供 HPLC 含量测定用,均由中国药品生物制品检定所提供,莪术二酮对照品(批号 13657-68-5,含量 $\geq 98\%$),由上海沪云医药开发有限公司提供,莪术烯和呋喃二烯对照品由澳门大学李绍平教授提供,含量均 $\geq 99\%$;甲醇、乙腈为色谱纯(Dikma 公司),其他试剂均为分析纯,水为超纯水;莪术药材由河南中医学院董诚明教授鉴定为姜科植物蓬莪术、广西莪术或温郁金的干燥根茎,样品来源信息见表 1。

表 1 样品来源信息

No.	品种	来源	产地	批号
1	蓬莪术	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	四川	SP100125
2	蓬莪术	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	四川	SP100127
3	广西莪术	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	广西	SK100203
4	广西莪术	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	广西	SK100205
5	广西莪术	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	广西	SK100209
6	蓬莪术	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	浙江	SW100120
7	蓬莪术	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司	浙江	SW100122
8	温郁金	浙江中医药大学饮片厂	浙江	SW080716
9	温郁金	浙江中医药大学饮片厂	浙江	SW080717

2 方法与结果

2.1 色谱条件和系统适用性试验 依利特 Hypersil ODS (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) 色谱柱,流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min, 55% A; 16 ~ 40 min, 55% ~ 80% A; 40 ~ 60 min, 90% A),柱温 25 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长 215 nm。理论塔板数按莪术醇峰计算不低于 2 000,本检测器采用二极管阵列检测器,自动给出供试品中莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的峰纯度分别为 0.998 1, 0.997 5, 0.996 8, 0.998 5, 0.994 6, 0.997 3。见图 1。



1. 莪术二酮; 2. 莪术醇; 3. 吉马酮;
4. 莪术烯; 5. 呋喃二烯; 6. β -榄香烯

图 1 混合对照品溶液(A)和莪术供试品溶液(B) HPLC

2.2 对照品溶液的制备 取莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯对照品适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液(每 1 mL 含莪术二酮 0.272 mg, 莪术醇 0.207 mg, 吉马酮 0.061 mg, 莪术烯 0.89 mg, 呋喃二烯 0.159 mg, β -榄香烯 0.253 mg)。

2.3 供试品溶液的制备 取莪术粉末(过 3 号筛) 0.5 g,精密称定,加乙醚 20 mL,超声处理(功率 250 W, 50 kHz) 15 min,乙醚超声处理 3 次,合并滤液,用少量乙醚润洗残渣及滤器,合并乙醚液,挥干乙醚,残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,用 0.45 μ m 滤膜滤过,即得。

2.4 线性关系试验 精密吸取上述混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20 μ L,注入色谱仪,以进样量(μ g)为自变量,色谱峰面积(A)为因变量,绘制标准曲线,建立回归方程, $Y_{\text{莪术二酮}} = 477\ 758X + 17\ 987$ ($R^2 = 0.999\ 2$, 0.544 ~ 5.44 μ g), $Y_{\text{莪术醇}} = 124\ 936X + 4\ 840.2$ ($R^2 = 0.999\ 6$, 0.414 ~ 4.14 μ g), $Y_{\text{吉马酮}} = 1 \times 10^6 X - 61\ 105$ ($R^2 = 0.999\ 1$, 0.122 ~ 1.22 μ g),

$Y_{\text{莪术烯}} = 86\ 387X - 81\ 468$ ($R^2 = 0.998\ 6$, $1.78 \sim 17.8\ \mu\text{g}$), $Y_{\text{呋喃二烯}} = 304\ 229X - 29\ 020$ ($R^2 = 0.998\ 9$, $0.318 \sim 3.18\ \mu\text{g}$), $Y_{\beta\text{-榄香烯}} = 133\ 643X - 5\ 429.1$ ($R^2 = 0.998\ 6$, $0.506 \sim 5.06\ \mu\text{g}$), 该方法在较大范围内线性关系良好。

2.5 仪器精密度 精密吸取混合对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 连续进样 5 次, 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β-榄香烯峰面积的 RSD 分别为 0.43% , 1.53% , 1.12% , 1.92% , 0.87% , 2.02% 。

2.6 方法稳定性 精密吸取同一供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 于制备后 $0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24\ \text{h}$ 进样, 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β-榄香烯峰面积的 RSD 分别为 0.54% , 1.47% , 0.97% , 1.56% , 1.03% , 1.96% ($n = 5$)。

2.7 方法重复性 取同一批样品, 共 6 份, 按 **2.3** 项下方法制备供试品溶液, 进样体积 $10\ \mu\text{L}$, 计算含量, 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β-榄香烯的含量分别为 $2.03, 2.32, 0.57, 5.28, 1.54, 0.83\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.36% , 1.25% , 1.09% , 1.29% , 0.57% , 1.72% 。

2.8 方法回收率 取已经测定含量的样品 6 份, 每份约 $0.25\ \text{g}$, 精密称定, 按照供试品测定的莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β-榄香烯含量, 以其一半的 100% 比例精密加入混合对照品溶液, 挥干甲醇后加入样品, 再按照 **2.3** 项下色谱条件测定样品, 计算回收率, 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β-榄香烯的回收率分别为 99.60% , 101.48% , 99.50% , 100.29% , 99.87% , 100.58% , 见表 2。

2.9 含量测定 取所收集的 9 个不同来源莪术药材, 按照上述色谱条件下进样测定, 以外标法计算莪术中 6 种成分的含量。见表 3。

3 讨论

比较流动相甲醇-水系统和乙腈-水系统^[7-9], 发现乙腈-水系统效果较为理想, 分离效果俱佳, 保留时间合适。大多数文献报道^[10-11], 利用梯度洗脱, 梯度比例变化较大, 且变化步骤较多。而本文梯度洗脱变化比例简单, 克服了梯度洗脱复杂而导致重复性较低和基线不稳等现象出现。在流动相乙腈-水系统中, 各峰形不是很好, 对称因子未全部达到要求, 故考察了流动相 pH 的影响: 0.05% 磷酸水、 0.1% 磷酸水、 0.15% 磷酸水, 发现随着磷酸的浓度加大, 峰形变得越来越好, 其中 0.1% 磷酸水时, 分离效果较好, 且各峰的对数因子均在 $0.95 \sim 1.05$,

表 2 莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β-榄香烯加样回收率试验

成分	取样量	样品	加入量	测得量	回收率	平均回收率
	/g	原有量 /mg	/mg	/mg	/%	
莪术二酮	0.247 6	0.502 6	0.516 8	1.008 4	97.87	99.60 (2.71)
	0.250 5	0.508 5	0.516 8	1.028 3	100.58	
	0.247 5	0.502 4	0.516 8	0.999 6	96.20	
	0.250 9	0.509 3	0.516 8	1.016 6	98.16	
	0.251 2	0.509 9	0.516 8	1.032 6	101.13	
	0.247 9	0.503 2	0.516 8	1.038 9	103.65	
莪术醇	0.247 6	0.574 4	0.579 6	1.170 3	102.81	101.48 (1.37)
	0.250 5	0.581 2	0.579 6	1.161 8	100.18	
	0.247 5	0.574 2	0.579 6	1.159 8	101.04	
	0.250 9	0.582 1	0.579 6	1.160 2	99.74	
	0.251 2	0.582 8	0.579 6	1.180 4	103.11	
	0.247 9	0.575 1	0.579 6	1.166 5	102.03	
吉马酮	0.247 6	0.141 1	0.140 3	0.279 4	98.55	99.50 (2.47)
	0.250 5	0.142 8	0.140 3	0.280 5	98.16	
	0.247 5	0.141 1	0.140 3	0.286 8	103.87	
	0.250 9	0.143 0	0.140 3	0.279 4	97.21	
	0.251 2	0.143 2	0.140 3	0.284 7	100.87	
	0.247 9	0.141 3	0.140 3	0.279 3	98.36	
莪术烯	0.247 6	1.307 3	1.335	2.634 6	99.42	100.29 (2.52)
	0.250 5	1.322 6	1.335	2.704 2	103.49	
	0.247 5	1.306 8	1.335	2.667 5	101.93	
	0.250 9	1.324 8	1.335	2.683 1	101.75	
	0.251 2	1.326 3	1.335	2.639 8	98.39	
	0.247 9	1.308 9	1.335	2.600 4	96.74	
呋喃二烯	0.247 6	0.381 3	0.381 6	0.758 3	98.79	99.87 (1.51)
	0.250 5	0.385 8	0.381 6	0.759 9	98.04	
	0.247 5	0.381 2	0.381 6	0.767 3	101.19	
	0.250 9	0.386 4	0.381 6	0.771 6	100.95	
	0.251 2	0.386 8	0.381 6	0.774 2	101.51	
	0.247 9	0.381 8	0.381 6	0.758 5	98.72	
β-榄香烯	0.247 6	0.205 5	0.202 4	0.409 8	100.93	100.58 (1.39)
	0.250 5	0.207 9	0.202 4	0.410 7	100.19	
	0.247 5	0.205 4	0.202 4	0.412 8	102.46	
	0.250 9	0.208 2	0.202 4	0.408 3	98.84	
	0.251 2	0.208 5	0.202 4	0.409 9	99.51	
	0.247 9	0.205 8	0.202 4	0.411 3	101.55	

确定采用乙腈-0.1% 磷酸水系统作为流动相。另外在色谱柱柱温的考察中, 考虑到所测组分均为挥发

表 3 不同产地莪术中 6 种成分测定 %

No.	莪术二酮	莪术醇	吉马酮	莪术烯	呋喃二烯	β -榄香烯
1	2.76	1.52	0.93	3.89	1.48	0.98
2	2.88	1.48	0.87	4.13	1.38	1.08
3	1.84	2.06	0.94	5.08	1.34	1.92
4	1.79	2.15	0.85	5.15	1.28	1.87
5	1.68	2.13	1.04	4.96	1.33	1.96
6	2.03	2.32	0.57	5.28	1.54	0.83
7	2.65	2.74	1.34	4.93	1.62	0.74
8	0.22	0.53	0.10	1.58	0.73	0.58
9	0.17	1.28	0.17	1.42	0.66	0.61

油,容易挥发,结构不稳定,受温度的影响较大,故采用 25 ℃ 柱温。

在对不同产地莪术的含量考察中,梁小立等^[12]发现不同产地的莪术的挥发油成分差异较大,这与本文对不同产地的莪术的挥发油成分检测比较的结果相似,我们发现不同产地的莪术中莪术二酮和莪术醇的含量差异最大,而且宋坤等^[13]研究发现加工、贮藏过程对温郁金化学成分具有较大的影响,不仅表现在成分种类差异,也表现在成分含量差异。而本文 9 个不同来源莪术药材的莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯含量差异较大,这与药材的产地、加工、贮藏等因素有关。这提示我们,在对莪术质量控制的时候,不能把单一成分作为控制莪术的质量控制指标,并且在使用莪术的过程中,一定要注意加工、贮藏条件。

[参考文献]

[1] 孔一凡,史克莉. 莪术研究概述[J]. 湖北中医药大学学报,2011,13(1):47.

[2] 邵敬伟,董海燕,王涛,等. 中药莪术激活 PXR 及对大鼠肝细胞色素 P450 3A 的影响[J]. 中国药理学通报,2008,24(4):504.

[3] 唐渊,李晓辉. 莪术提取物对肝癌细胞系 HepG2 的抗癌作用及机制研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(6):790.

[4] 方丽,祝明,郑成,等. 温莪术药材指纹图谱的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):37.

[5] 宋步昌,鞠建峰. 莪术油的药理作用及临床应用[J]. 山东中医杂志,2003,22(9):555.

[6] 梁广,黄志峰,李校堃,等. 莪术油的药理学及临床应用研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2006(12):1541.

[7] 许金国,陆兔林,毛春芹,等. HPLC 法测定莪术饮片莪术二酮、莪术醇、吉马酮[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(2):173,191.

[8] 袁文娟,田颂九,张启明,等. HPLC 同时测定莪术油及其注射液 3 种成分的含量[J]. 中国药学杂志,2008,43(3):168.

[9] 祝明,张鹏,唐登峰,等. 莪术油的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2011,42(1):81.

[10] 张清哲,杨芹,朱晶晶,等. GC-MS 比较温郁金、温莪术、片姜黄中挥发油的化学组成[J]. 中国中药杂志,2010,35(19):2590.

[11] 牛冲,徐志洲,程琳,等. HPLC 法测定复方莪术油栓的含量[J]. 中国药品标准,2011,12(2):103.

[12] 梁小立,陈琳. 不同品种与产地莪术四个活性成分的比较[J]. 临床医学工程,2012,19(6):965.

[13] 宋坤,陈建伟,姜国非. HPLC 研究加工、贮藏过程对温郁金化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):61.

[责任编辑 顾雪竹]