

黄丝郁金和绿丝郁金中姜黄素类成分含量比较

李锐^{1*}, 和心依², 肖燕¹

(1. 西华大学生物工程学院, 成都 610039; 2. 四川大学, 成都 610015)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 高效液相色谱法对黄丝郁金和绿丝郁金中姜黄素、单脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素的含量进行比较研究。方法: 分别搜集 10 个批次的药材样品, 以甲醇超声提取 60 min, 以 YMC-Pack-ODS-A C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分离, 流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液 (45:55), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 425 nm, 进行外标法定量分析。结果: 姜黄素在 3.516 ~ 450 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率 101.36%, RSD 2.62% ($n=5$); 脱甲氧基姜黄素在 2.734 ~ 350 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 9$), 平均回收率 102.19%, RSD 2.75% ($n=5$); 双脱甲氧基姜黄素在 2.422 ~ 310 mg·L⁻¹ 呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 8$), 平均回收率 102.86%, RSD 3.06% ($n=5$)。结论: 文章所建立的 HPLC 方法可用于有效控制中药郁金的药材质量; 黄丝郁金中含有姜黄素类成分, 而绿丝郁金中未检测到姜黄素类成分。

[关键词] 黄丝郁金; 绿丝郁金; 姜黄素类成分; 高效液相色谱法; 含量比较

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0088-04

[doi] 10.11653/syjf2013100088

Quantitative Analysis of Curcuminoids in Huangsi Yujin and Lvsu Yujin Derived from Cucurmae Radix

LI Rui^{1*}, HE Xin-yi², XIAO Yan¹

(1. School of Bioengineering, Xihua University, Chengdu 610039, China;

2. Sichuan University, Chengdu 610015, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for quantitative analysis of curcuminoids in Huangsi Yujin and Lvsu Yujin derived from Cucurmae Radix. **Method:** Ten batches of samples were collected respectively,

[收稿日期] 20121030(010)

[基金项目] 中国博士后科学基金项目(2012M511935); 四川省教育厅重点项目(11ZA005); 西华大学重点科研项目(E112053)

[通讯作者] *李锐, 讲师, 博士学位, 从事食品、药物的化学分析及其体内代谢研究, Tel: 028-87825898, E-mail: liruielite@gmail.com

- [3] 文丹丹, 王敏. 蝉蜕及其配伍治疗哮喘的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 242.
- [4] 刘丽萍, 任翠爱, 赵宏艳. 甘草酸的免疫调节作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 273.
- [5] 赵保胜, 桂海水, 朱寅荻, 等. 阿魏化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 279.
- [6] Christiane Lakenbrink, T My Loc Lam, Ulrich H Engelhardt, et al. New flavonol triglycosides from tea (*Camellia sinensis*) [J]. Nat Prod Res, 2000, 14(4): 233.
- [7] 杨小龙, 朱应成, 方圣涛, 等. 非洲隔囊蚁巢伞的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22(6): 972.
- [8] 张起辉, 周莲娣, 闫小玉, 等. 海洋真菌 *Nigrospora sphaerica* 化学成分的分离与鉴定(I) [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(5): 350.
- [9] 赵海誉, 范妙璇, 石晋丽, 等. 北葶苈子化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 14.
- [10] 王付荣, 葛喜珍, 杨秀伟. 通脉方化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 63.
- [11] 朱向东, 张庆华, 王飞, 等. 酸叶胶藤的化学成分研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 237.
- [12] 王安平, 刘明川, 杨胜杰, 等. 柘木的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 113.

[责任编辑 邹晓翠]

and were extracted with methanol in ultrasonic bath for 60 min, the separation was performed on a YMC ODS-A C₁₈ reversed column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid in water (45:55), the mobile phase flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the UV detector was monitored 425 nm for quantitative analysis. **Result:** The linear of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin were within 3.516-450 mg · L⁻¹ ($r=0.9998$), 2.734-350 mg · L⁻¹ ($r=0.9999$) and 2.422-310 mg · L⁻¹ ($r=0.9998$) respectively. The average recoveries of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin were 101.36% (RSD 2.62%, $n=5$), 102.19% (RSD 2.75%, $n=5$) and 102.86% (RSD 3.06%, $n=5$) respectively. **Conclusion:** The validated HPLC method could be used as quality control method for Cucurmae Radix. Curcuminoids were only detected in Huangsi Yujin, while not detected in Lvsu Yujin.

[**Key words**] Huangsi Yujin; Lvsu Yujin; curcuminoids; HPLC; quantitative comparison

郁金是我国的传统中药,具有活血行气止痛的功效,在中医临床上应用广泛^[1]。“黄丝郁金”和“绿丝郁金”作为中药郁金的2个药用品种收载入《中国药典》2010年版,其中:“黄丝郁金”为植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥块根,主要产于四川的彭州、乐山、犍为以及浙江、广西等地区;“绿丝郁金”为植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val. 的干燥块根,主要产于我国的广西、云南、江西等地^[2]。文献报道表明郁金中的主要化学成分为姜黄素类、挥发油、多糖、生物碱类等^[3-5],其中挥发油类以莪术醇、莪术二酮、莪术酮等倍半萜类为主,而姜黄素类以姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素为主^[6-8]。然而由于郁金存在中药分类中典型的“同名多基源”现象,将不同基源的植物作为同一药材归类的合理性尚未得到充分证实,且目前该领域的研究结果尚不明确^[9-12]。本文拟采用 HPLC,通过对“黄丝郁金”和“绿丝郁金”中所含的姜黄素类成分进行含量测定,对2种“郁金”中姜黄素类成分含量进行比较研究,为进一步明确郁金类中药材的化学成分差异,建立其完善质量标准奠定基础。

1 材料

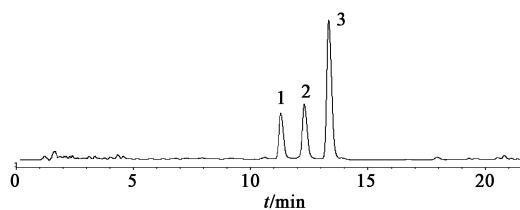
Agilent 1200 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies, USA),配有四元泵溶剂洗脱系统,自动进样器及紫外检测仪,Satorius 型电子天平 (Satorius, Germany),KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q 型超纯水系统 (Millipore, USA)。

2010-2012年,从全国各地分别收集了不同批次的黄丝郁金药材10批和绿丝郁金药材6批。全部药材均由作者鉴定,样本存放于西华大学食品生物技术四川省高校重点实验室。

姜黄素 (curcumin)、脱甲氧基姜黄素 (demethoxycurcumin)、双脱甲氧基姜黄素

(bisdemethoxycurcumin) 分别由作者自中药姜黄的干燥根茎提取物中分离得到。所有化合物经 NMR 和 MS 检测,纯度均 >98%。

乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,双蒸水经 Milli-Q 系统净化。HPLC 色谱图见图 1。



1. 姜黄素;2. 脱甲氧基姜黄素;3. 双脱甲氧基姜黄素

图1 黄丝郁金的含量测定 HPLC 图谱

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验 YMC-Pack-ODS-A C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 及 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 保护柱 (4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸溶液 (45:55), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 420 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。将混合对照品溶液连续重复进样 5 次来评价系统适用性,对于所有分析物,要求拖尾因子 < 1.2,分离度 > 1.5,理论塔板数不低于 1 万。

2.2 药材供试品溶液制备 精密称定干燥的黄丝郁金、绿丝郁金药材粉末各 0.30 g (60 目),加入 30 mL 甲醇溶液,称质量,室温超声提取 (40 kHz, 300 W) 提取 60 min,溶液蒸干后以甲醇精确定容至 2 mL,取上清液过 0.45 μm 滤膜,进样 10 μL 供 HPLC 分析。

2.3 对照品溶液的制备 分别取姜黄素、脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素 3 个对照品,精密称定,置于同一 1 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,得到 450 mg · L⁻¹ (姜黄素),350 mg · L⁻¹ (脱甲氧基

姜黄素), 310 mg·L⁻¹ (双脱甲氧基姜黄素) 的对照品储备液。将储备液依次稀释至不同质量浓度, 用于标准曲线的建立。每条标准曲线包含 6 个不同的浓度点, 每个浓度的对照品溶液平行测定 3 次。

2.4 线性关系考察 采用外标法, 每个分析物测定 6 个不同的质量浓度, 每个质量浓度的对照品溶液重复配制测定 3 次, 通过峰面积与样品质量浓度的比值建立标准曲线, 将 3 次结果平均得到最终标准曲线。3 个被测物在标准曲线的线性范围 (dynamic ranges) 内均呈良好的线性 ($r > 0.999$): 姜黄素在 6 个不同质量浓度范围内 (450, 115.5, 56.25, 28.125, 14.06, 3.516 mg·L⁻¹) 的线性方程为 $Y = 70.5001X + 206.1856$ ($r = 0.9998$); 脱甲氧基姜黄素在 6 个不同质量浓度范围内 (350, 87.5, 43.75, 21.875, 10.938, 2.734 mg·L⁻¹) 的线性方程为 $Y = 109.5762X + 279.1115$ ($r = 0.9999$); 双脱甲氧基姜黄素在 6 个不同质量浓度范围内 (310, 77.5, 38.75, 19.375, 9.688, 2.422 mg·L⁻¹) 的线性方程为 $Y = 139.0965X + 300.6399$ ($r = 0.9998$); 结果表明姜黄素、脱甲氧基姜黄素和双脱甲氧基姜黄素 3 个被测物的线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密度的考察为测定样品的日内、日间精密度。日内精密度是在同一天内对同一样品连续测定 6 次, 而日间精密度则是在连续 3 d 内对同一样品进行测定。通过计算 RSD 来评价方法精密度。日内精密度和日间精密度的 RSD 分别为 0.45% ~ 0.75%, 1.31% ~ 1.80%, 说明本实验建立的方法具有良好的精密度。

2.6 重复性试验 取同一样品 6 份, 按照上述方法平行操作、分析、计算, 以 RSD 来评价该方法的重复性。结果显示 3 个化合物的 RSD 在 2.42% ~ 3.10%, 说明建立的方法重复性良好。

2.7 回收率试验 回收率实验用来进一步评价方法的准确度。向含量已知的药材样品中加入已知量的混合对照品储备液, 然后进行提取和 HPLC 分析, 通过计算测定的理论值和真实加入量的比值来计算回收率。回收率试验中也考察了标准曲线的低、中、高 3 个浓度, 每个浓度重复 3 次, 计算平均回收率。结果见表 1, 方法的回收率在 98.3% ~ 105.21%, 说明该方法具有良好的准确度。

2.8 黄丝郁金与绿丝郁金药材样品含量测定 按 2.2 项下药材供试品溶液制方法制备不同批次的供试品溶液, 按照 2.1 项下的色谱条件测定样品中 3 种姜黄素类成分的含量, 结果见表 2。

表 1 姜黄素 (curcumin), 脱甲氧基姜黄素 (DMC), 双脱甲氧基姜黄素 (BDMC) 加样回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
Curcumin	3.046	1.501	1.476	98.30	2.62
	3.110	2.505	2.580	102.90	
	3.162	3.516	3.621	102.90	
DMC	1.391	1.520	1.588	104.50	2.75
	1.404	2.556	2.532	99.06	
	1.392	3.532	3.639	103.02	
BDMC	1.325	1.516	1.595	105.21	3.06
	1.337	2.525	2.628	104.08	
	1.326	3.528	3.503	99.29	

表 2 黄丝郁金和绿丝郁金中 3 种姜黄素类成分的含量

样品批次	药材基源	药材产地	curcumin	DMC	BDMC
H1	黄丝郁金	温江, 四川	1.51	0.82	0.51
H2		温江, 四川	1.86	0.97	0.58
H3		温江, 四川	2.18	1.21	0.85
H4		彭州, 四川	1.05	0.60	0.07
H5		彭州, 四川	1.14	0.53	0.18
H6		乐山, 四川	1.29	0.71	0.36
H7		乐山, 四川	1.58	0.67	0.46
H8		犍为, 四川	1.50	0.74	0.60
H9		犍为, 四川	1.85	0.81	0.27
H10		犍为, 四川	1.67	0.72	0.34
L1	绿丝郁金	桂林, 广西	nd	nd	nd
L2		桂林, 广西	nd	nd	nd
L3		南昌, 江西	nd	nd	nd
L4		南昌, 江西	nd	nd	nd
L5		德宏州, 云南	nd	nd	nd
L6		德宏州, 云南	nd	nd	nd

注: nd 为未检测到。

3 讨论与分析

3.1 HPLC 色谱条件的优化

3.1.1 提取条件的考察 比较了提取方法、提取溶剂和提取时间对提取效率的影响。50% 甲醇和 100% 甲醇对提取效率的影响, 结果显示 100% 甲醇为最佳提取溶剂, 这于姜黄素类化合物具有极差的水溶性而易在甲醇中溶解有关; 随后比较了不同的提取方法, 包括超声提取、回流提取和温浸提。结果显示超声提取的效率最高; 最后在不同提取时间内

(30,60,90 min)进行考察,60 min内姜黄素类成分基本被提取完全,因此选定提取时间为60 min。

3.1.2 色谱分离条件的优化 对色谱柱,柱温,检测波长、流速等主要影响因素进行了考察。比较了不同品牌和类型的色谱柱(Agilent-SB-C₁₈柱,Ultimate-X13-C₁₈柱,YMC-Pack-ODS-A-C₁₈柱),最终选择可以得到良好的分离效果的YMC-Pack-ODS-A-C₁₈色谱柱进行实验;在姜黄素类化合物定量研究中为了获得更高灵敏度,检测波长设定为该类化合物的最大紫外吸收波长425 nm。考察了25,30,35℃柱温下的分离效果,结果表明柱温对分离效果无显著影响,设定为30℃;流速1.0 mL·min⁻¹时可以得到良好的分离效果。

3.2 两种郁金类中药材中3种姜黄素类成分的含量差异分析 黄丝郁金和绿丝郁金同为源于姜黄属的中药,《中国药典》2010年版将二者一同收载入中药“郁金”项下,2种中药材不但在药材市场上作为同种中药销售,并且在中医临床上也大量应用^[13-15]。10批次黄丝郁金中均检测到3种姜黄素类成分(表2);而具有产地代表性的6批次绿丝郁金中全部都没有检测到该类成分。研究结果证明2种同收载为“郁金”的中药在化学成分的种类及含量上差异巨大,临床上将黄丝郁金和绿丝郁金一并作为“郁金”入药的应用方式以及目前《中国药典》对其归类方式都是值得商榷的,建议在今后的临床应用上对2种不同基源的药材加以区分,并在新的药典版本中对其制定不同的质量控制标准,以便促进其市场销售和临床应用的规范。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:144.

- [2] 李敏,张娜. 郁金类药材质量控制方法的研究[J]. 中药材,2008,31(4):540.
- [3] 刘华钢,刘俊英,赖茂祥,等. 郁金化学成分及药理作用的研究进展[J]. 广西中医学院学报,2008,11(2):81.
- [4] 李洪梅,周爱香,李小芹,等. 郁金与姜黄药性差异的药理活性研究(一)[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):273.
- [5] 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.
- [6] 潘小姣,杨秀芬,陈勇,等. RP-HPLC测定桂郁金中吉玛酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):81.
- [7] 刘雪梅,杨秀芬,刘耀泉,等. 超临界CO₂萃取桂郁金挥发油的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):114.
- [8] 肖长坤. 姜黄属植物的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):339.
- [9] 王晓华,朱华,陈旭,等. 郁金化学成分及其质量控制研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(10):5873.
- [10] 李艳萍. 中药郁金的化学成分研究[J]. 西北大学学报,2000,30(5):411.
- [11] 沈世杰,韩纠纒. 郁金挥发油化学成分的研究[J]. 中草药,1997,28(1):10.
- [12] 朱晶晶,张清哲. 郁金质量标准研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2106.
- [13] 林国彪,苏姜羽,杨秀芬. 桂郁金提取物的抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,16(17):171.
- [14] 葛跃伟,高慧敏,王智民. 姜黄属药用植物研究进展[J]. 中国中药杂志,2007,32(23):2461.
- [15] 王琰,王慕邹. 姜黄属常用中药的研究进展[J]. 中国药学杂志,2001,36(2):80.

[责任编辑 邹晓翠]