

RP-HPLC 测定桂郁金中吉玛酮的含量

潘小姣, 杨秀芬*, 陈勇, 韦玉燕, 陈秋燕, 唐璐
(广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC 测定桂郁金中吉玛酮的含量。方法: 采用正交试验优化样品处理的提取条件, 采用 RP-HPLC 检测吉玛酮的含量, Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 76% 乙腈, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 217 nm。结果: 吉玛酮在 0.056 7 ~ 2.324 7 μg 呈良好的线性关系 ($r=0.999\ 99$), 平均回收率 98.05%, RSD 0.69%; 容县产桂郁金吉玛酮含量最高, 而平南产含量最低; 桂郁金块根炮制品及桂郁金茎叶中吉玛酮的含量明显低于自然阴干的桂郁金块根。结论: 吉玛酮含量测定方法简单、准确、快速; 不同产地、不同部位以及不同炮制品的桂郁金吉玛酮含量相差很大。

[关键词] 桂郁金; 吉玛酮; 正交试验; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0081-03

Determination of Content of Germacrone in *Curcuma kwangsiensis* by RP-HPLC

PAN Xiao-jiao, YANG Xiu-fen*, CHEN Yong, WEI Yu-yan, CHEN Qiu-yan, TANG Lu
(Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of germacrone in *Curcuma kwangsiensis*. **Method:** After using the orthogonal test to optimize extracting conditions, germacrone was separated on Phenomenex C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column and detected at 217 nm, with 76% acetonitrile as mobile phase, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Germacrone was linear in the range of 0.056 7-2.324 7 μg ($r=0.999\ 99$) and the average recovery of germacrone was 98.05% with RSD 0.69%. The most and the least content of germacrone in *C. kwangsiensis* was from Rong county and Pingnan county respectively. The germacrone in processed root tubers and stems and leaves of *C. kwangsiensis* were much less than that in the root tubers dried in the shade. **Conclusion:** The method is simple, accurate and rapid. The content of germacrone in *C. kwangsiensis* from different producing areas, medicinal parts and processed products make a great difference.

[Key words] *Curcuma kwangsiensis*; germacrone; orthogonal test; HPLC

桂郁金为姜科姜黄属植物广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 的干燥块根, 其性味辛、苦、寒, 归肝、心、肺经, 具有活血止痛、行气

解郁、清心凉血、利胆退黄等功效, 用于胸胁刺痛、胸痹心痛、经闭痛经、乳房胀痛、热病神昏、癫痫发狂、血热吐衄、黄疸尿赤等症^[1-2]。郁金的有效成分吉玛酮具有抗肿瘤的生理活性^[3], 故不少论文报道都选择选吉玛酮作为郁金类药材和莪术类药材的质量评价指标之一^[4-6]。目前市场上, 桂郁金的产地众多, 而对不同产地桂郁金吉玛酮的含量比较还未见有文献报道。本实验拟采用正交试验对吉玛酮的提取工艺进行优化, 并建立 RP-HPLC 法测定桂郁金不同产地及茎叶的吉玛酮含量, 并进行比较分析。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国

[收稿日期] 20110701(011)

[基金项目] 广西自然科学基金课题 (0832006, 2011GXNSFF01806); 广西教育厅课厅课题 (200810LX100, 200103YB081)

[第一作者] 潘小姣, 硕士, 副教授, 从事中药活性成分筛选及其质量标准研究, Tel: 0771-3137585, E-mail: pxjgx@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 杨秀芬, 医学博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药药心血管活性的物质基础及作用机制研究, Tel: 0771-2279423, E-mail: xiufenyang@163.com

安捷伦科技公司), LG16-W 型高速离心机(北京医用离心机厂), B3500S-MT 型超声清洗仪(上海必能信超声有限公司), BP211D 型电子分析天平(德国赛多利斯)。

1.2 试药 桂郁金药材于 2010 年 12 月至 2011 年 1 月采自广西各产地, 经广西中医学院何报作教授鉴定均为姜科姜黄属植物广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 的块根, 其中桂郁金生品为为自然阴干的块根, 桂郁金炮制品为水煮至透心再烘干的块根, 桂郁金茎叶为桂郁金干燥的地上部位, 以上药材均粉碎成细粉, 并过 40 目筛后备用; 吉玛酮(牻牛儿酮, 中国药品生物制品检定所, 批号 111665-200401); 乙腈为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 76% 乙腈, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 217 nm, 检测温度为室温。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取吉玛酮对照品 5.67 mg, 加甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.0567 mg 的溶液, 即得。

2.3 线性关系考察 分别精密吸取吉玛酮对照品溶液 1, 9, 17, 25, 33, 41 μL 进样检测, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 得到回归方程为 $Y = 2\,910.32X - 0.168\,75$ ($r = 0.999\,99$)。结果表明, 吉玛酮在 0.056 7 ~ 2.324 7 μg 进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 精密吸取 2.2 项下对照品溶液 10 μL, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算峰面积 RSD 0.31%。

2.5 正交试验设计

2.5.1 供试品处理的正交试验 采用正交试验 L₉(3⁴) 进行吉玛酮的提取工艺研究。以吉玛酮的含量为评价指标, 选择甲醇用量、甲醇浓度、超声时间 3 个因素, 每个因素设 3 个水平, 因素水平见表 1。精密称取同一产地的桂郁金药材粉末 9 份, 每份约重 10 g, 分别置塞锥形瓶中, 照表 2 分别精密加适量倍数和适量浓度的甲醇, 密塞, 称定质量, 照表 2 分别超声提取适当时间, 放冷, 用甲醇补足减少的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液离心, 取上清液以 2.1 项色谱条件, 精密吸取各样品 10 μL 进样分析, 试验结果见表 2。将试验结果用统计软件 SPSS 17.0 进行方差分析, 结果见表 3。

2.5.2 最佳提取工艺的确定 表 2 极差大小显示,

表 1 吉玛酮的提取工艺因素水平

水平	A 甲醇用量/倍数	B 甲醇浓度/%	C 超声时间/min
1	5	50	20
2	8	75	40
3	10	100	60

表 2 正交试验表 L₉(3⁴)

No.	因素				吉玛酮含量 /mg · g ⁻¹
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.135 4
2	1	2	2	2	0.224 0
3	1	3	3	3	0.420 6
4	2	1	2	3	0.123 9
5	2	2	3	1	0.191 6
6	2	3	1	2	0.279 3
7	3	1	3	2	0.170 6
8	3	2	1	3	0.180 4
9	3	3	2	1	0.355 3
k ₁	0.260 0	0.143 3	0.198 4	0.227 4	
k ₂	0.198 3	0.198 7	0.234 4	0.224 6	
k ₃	0.235 4	0.351 7	0.260 9	0.241 6	
极差 R	0.061 7	0.208 4	0.062 6	0.017 0	

表 3 方差分析

方差来源	离差平方和	f	均方	F	P
A	0.006	2	0.003	11.627	
B	0.070	2	0.035	140.305	<0.01
C	0.006	2	0.003	11.870	
D(误差)	0.000	2			

各因素作用主次为 B > C > A, 由极差分析应选择最佳工艺 A₁B₃C₃, 但从表 3 方差分析可知因素 A, C 对结果无显著性影响, 从节约成本考虑选择 A₁, 而为节省时间考虑选择 C₁, 故得到最佳提取工艺 A₁B₃C₁, 即 100% 甲醇 5 倍量, 超声提取 20 min。

2.5.3 验证试验 精密称取同一产地桂郁金粉末 3 份, 每份约 10g, 各置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 20 min, 放冷, 用甲醇补足减少的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液离心即得供试品。以 2.1 项色谱条件精密吸取 10 μL 进样分析。结果吉玛酮含量为 0.453 5, 0.454 0, 0.464 9 mg · L⁻¹, RSD 1.41%, 表明本法的提取效果稳定。

2.6 稳定性试验 取同一份样品, 按 2.5.3 项下方

法制备供试品溶液,以 2.1 项下色谱条件分别在 0, 2, 6, 12, 18, 24 h 进样 10 μL , 测定吉玛酮峰面积, RSD 1.46%。

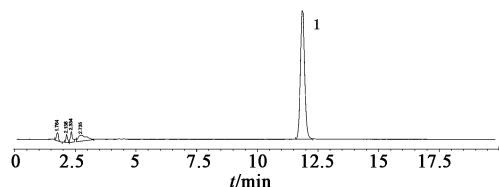
2.8 重复性试验 取同一产地桂郁金,均匀取样 6 份,分别按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,以 2.1 项下色谱条件各进样 10 μL ,测定吉玛酮峰面积, RSD 1.13%,表明本法重复性良好。

2.9 加样回收试验 取同一产地已知含量的供试品 6 份,分别精密加入一定量的吉玛酮对照品,按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,以 2.1 项下色谱条件进样,测定吉玛酮的含量。结果吉玛酮的平均回收率为 98.05%,RSD 0.69%,表明本法准确度较好,结果见表 4。

表 4 样品中吉玛酮加样回收率测定 ($n=6$)

No.	取样量 /g	加入量 /mg	已知量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	5.024 0	2.28	2.278 4	4.539 9	99.19	98.05	0.69
2	5.032 4	2.28	2.284 8	4.524 9	98.25		
3	5.035 2	2.28	2.286 0	4.519 9	97.98		
4	5.014 0	2.28	2.275 4	4.495 0	97.35		
5	5.018 8	2.28	2.333 2	4.570 1	98.11		
6	5.046 0	2.28	2.356 7	4.577 3	97.39		

2.10 样品的含量测定 按 2.5.3 项下方法制备供试品溶液,以 2.1 项下色谱条件进行分析,对 8 个不同产地的自然阴干桂郁金及产自灵山的桂郁金炮制品和茎叶进行吉玛酮含量测定,色谱图见图 1,2,结果见表 5。



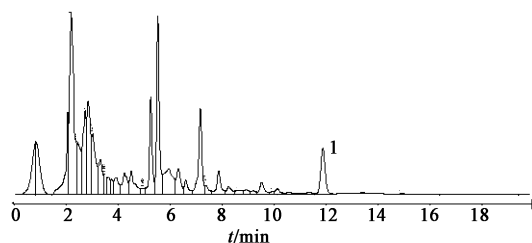
1. 吉玛酮

图 1 桂郁金对照品色谱

3 讨论

采用正交实验法对样品的提取条件进行了优化,确定了采用 100% 甲醇 5 倍量为提取溶液,超声提取 20 min 的样品前处理方法。

测定了不同产地、不同部位桂郁金吉玛酮的含量,结果表明不同产地桂郁金中吉玛酮的含量差异



1. 吉玛酮

图 2 桂郁金样品色谱

表 5 不同产地、不同部位桂郁金吉玛酮的含量

样品名称	取样量/g	浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
兴业桂郁金(生品)	10.006 3	0.117 6	0.587 6
容县桂郁金(生品)	10.008 9	0.218 0	1.089 0
桂平桂郁金(生品)	9.999 3	0.124 6	0.623 0
贵港桂郁金(生品)	10.004 4	0.161 6	0.807 6
平南桂郁金(生品)	10.008 7	0.047 2	0.235 8
玉林桂郁金(生品)	10.005 4	0.090 3	0.451 3
钦州桂郁金(生品)	10.004 4	0.164 7	0.823 1
灵山桂郁金(生品)	10.008 5	0.092 6	0.462 6
灵山桂郁金(炮制品)	10.000 9	0.006 4	0.032 0
灵山郁桂金茎叶	10.005 2	0.008 7	0.043 5

较大,其中以容县产含量最高,其次钦州、贵港,而以平南产最低。而来自同一产地灵山的桂郁金,其炮制品中吉玛酮的含量明显比自然阴干的生品低,有可能是因为在高温水煮的条件下使吉玛酮挥发所致;其茎叶中吉玛酮的含量也明显比块根中的低,可见在桂郁金药材原植物的不同部位,吉玛酮分布是不一样的。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:194.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草.第 24 卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:637.
- [3] 李敏.中药材市场动态及应用前景[M].北京:中国医药科技出版社,2006,196.
- [4] 李敏,张娜,林琪宇.HPLC 测定郁金类药材中的吉玛酮和莪术二酮[J].华西药理学杂志,2008,23(1):105.
- [5] 王建,刘雯,张炜,等.广西不同产地莪术中吉玛酮的含量比较[J].时珍国医国药,2009,20(5):1091.
- [6] 韦相忠,岳丽,秦松梅.HPLC 测定广西莪术不同炮制品超微细粉中牻牛儿酮的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):45.

[责任编辑 顾雪竹]