

一测多评法同时测定干姜中 4 种姜酚类成分的含量

孟江^{*}, 卢国勇, 程轩轩, 廖华卫, 梁慧超
(广东药学院 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立干姜药材中 4 种姜酚类成分同时测定的一测多评含量测定方法。方法: 以 6-姜辣素为指标, 建立药材中该成分与 6-姜酚、8-姜辣素及 10-姜辣素的相对校正因子, 利用校正因子计算 4 种酚类成分的含量, 实现一测多评, 同时采用外标法测定 4 种酚类成分的含量, 比较计算值与实测值的差异。结果: 28 批干姜中 4 种姜酚类成分的含量可以用一测多评法进行测定, 其计算值与实测值间无显著差异。结论: 以 6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素及 10-姜辣素同步测定的一测多评法控制干姜的药材质量是可行的、准确的。

[关键词] 一测多评法; 校正因子; 高效液相; 干姜; 姜酚类成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0077-04

Quantitative Analysis of Four Gingerol Components in *Zingiberis Rhizoma* by QAMS

MENG Jiang^{*}, LU Guo-yong, CHENG Xuan-xuan, LIAO Hua-wei, LIANG Hui-chao
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for simultaneously determining four gingerol compounds in zingiberis rhizoma. **Method:** A HPLC method was developed as QAMS to determine 6-gingerol, 6-shogaol, 10-gingerol and 8-gingerol in zingiberis rhizoma. Using 6-gingerol as the internal reference substance, the relative correction factor (RCF) of the three components was determined by HPLC with good reproducibility. The contents of the four components in 28 batches of samples was determined by QAMS and external standard method. **Result:** No significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method were observed. **Conclusion:** It is feasible and suitable to evaluate the quality of zingiberis rhizoma by QAMS.

[Key words] quantitative analysis multi-components by single marker (QAMS); relative correction factor (RCF); HPLC; zingiberis rhizoma; gingerol

干姜为姜科植物姜的干燥根茎, 具有温中散寒, 回阳通脉, 燥湿消痰的功效^[1]。干姜的活性成分主要是姜酚类, 包括 6-姜辣素、8-姜辣素、10-姜辣素、12-姜酚等 10 余种成分^[2]。关于干姜的质量控制, 2010 年版《中国药典》仅以 6-姜辣素作为质量控制指标, 不能全面反映干姜药材及饮片的内在品质。文献报道也有以 6-姜辣素、8-姜辣素及 10-姜辣素为

指标的多成分含量测定^[3]。但由于姜辣素类成分不稳定, 很容易被氧化成姜烯酚、姜酮及相应的醛类成分, 限制了这一方法的广泛应用。本文引入一测多评法对干姜进行多指标的质量控制, 以 6-姜辣素为内参物, 通过建立其与 8-姜辣素、10-姜辣素及 6-姜酚间的相对校正因子进行含量计算, 探讨一测多评法在干姜药材质量评价中应用的可行性。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1120 高效液相色谱仪, Waters 2695 高效液相色谱仪, 色谱柱 Ultimate™ XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), SepaxSapphire-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), DS-8510 型超声波清洗器(上

[收稿日期] 20111102(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102809)

[通讯作者] * 孟江, 博士, 副教授, 从事中药炮制及饮片质量标准化研究, Tel: 020-39352169, E-mail: jiangmeng666@126.com

海生析超声仪器有限公司)。

1.2 药材 干姜药材购自广州市药材公司中药饮片厂,经广东药学院中药学院程轩轩博士讲师鉴定为姜科植物姜 *Zingiber officinale* (willd) Rosc. 的干燥根茎。

1.3 对照品与试剂 6-姜辣素(批号 23513-14-6)购自北京金宝在线科技有限公司、10-姜辣素(批号 P0131)、6-姜酚(批号 P0621)购自上海纯优生物科技有限公司,8-姜辣素(批号 FY13430828)购自南通飞宇生物科技有限公司。实验所用试剂甲醇、乙腈为色谱纯,屈臣氏蒸馏水。

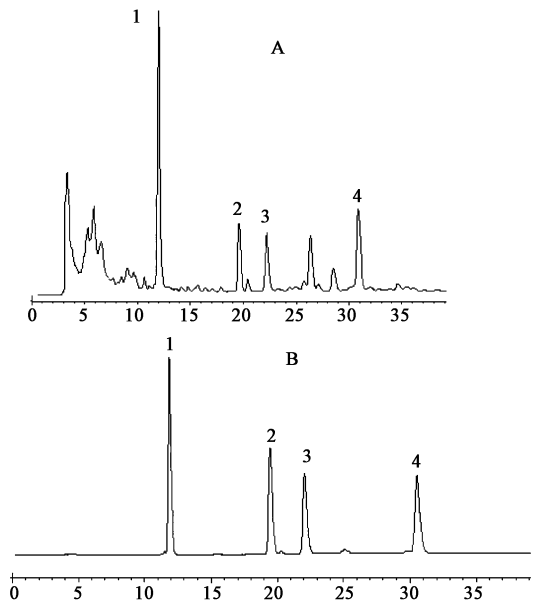
2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 Ultimate™ XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),洗脱梯度(0~20 min,60%~75% A,20~45 min,70%~85% A),检测波长 280 nm,流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温 30℃。上述色谱条件下,各组分分离度良好,结果见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别取 6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素对照品适量,精密称定,甲醇溶解,配置成质量浓度分别为 10.01,4.00,4.49,2.19 g·L⁻¹的对照品溶液。分别精密移取上述 4 个对照品溶液 24,25,50,100 μL 置于 1 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得混和对照品溶液,于 4℃ 保存备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取干姜药材粉末(过 80 目筛)0.5 g,精密称定,置于 50 mL 带塞锥形瓶,



1. 6-姜辣素;2. 8-姜辣素;3. 6-姜酚;4. 10-姜辣素
图 1 药材(A)及对照品(B)的高效液相色谱图

精密加入 20 mL 甲醇,称定,超声 40 min,放冷,再称定质量,补足质量,摇匀,用滤膜(0.22 μm)滤过,取续滤液即得。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取上述混合对照品溶液 0.5,1,2.5,5,7.5,10,15 μL 进样分析,每个浓度进样 2 次。以进样量对峰面积积分值进行回归,6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素的标准曲线见表 1。

表 1 干姜药材中 4 种酚类成分的标准曲线

成分	回归方程	r	线性范围
6-姜辣素	$Y = 17\ 622\ 354.86X - 9\ 211.63$	0.999 9	0.120 ~ 3.60
6-姜辣素	$Y = 24\ 660\ 714.62X + 24\ 179.76$	0.999 8	0.050 ~ 1.500
8-姜辣素	$Y = 13\ 786\ 784.72X - 44\ 389.65$	0.999 9	0.112 ~ 3.368
10-姜辣素	$Y = 13\ 570\ 191.45X - 18\ 415.14$	0.999 7	0.110 ~ 3.285

2.1.5 校正因子计算^[4] 以 6-姜辣素为内标,按公式 $f_{ks} = \frac{f_k}{f_s} = \frac{W_k \times A_s}{W_s \times A_k}$,分别计算 6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素对 6-姜辣素的校正因子,结果见表 2。

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL 连续进样 6 次,记录峰面积,6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素的精密度分别为 0.35%,1.01%,0.48%,0.13%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL 分别于配后的 0,2,4,8,12,24,48 h 进样分析记

录峰面积,6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素稳定性的 RSD 分别为 0.64%,1.01%,0.92%,0.49%,表明处理后的样品在 48 h 内稳定。

2.1.8 重复性试验 称取干姜药材粉末约 0.5 g 共 6 份,精密称定,按供试品溶液处理方法制备样品,测定,结果 6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素的平均质量分数分别为 8.97,1.26,2.61,4.03 mg·g⁻¹,RSD 分别为 0.87%,1.16%,0.53%,0.22%。

2.1.9 加样回收率 称取干姜药材粉末约 0.25 g

表2 干姜药材中4个酚类成分相对校正因子

进样体积/ μL	$f_{6\text{-姜辣素}/6\text{-姜酚}}$	$f_{6\text{-姜辣素}/8\text{-姜辣素}}$	$f_{6\text{-姜辣素}/10\text{-姜辣素}}$
0.5	0.693	1.289	1.283
1	0.716	1.311	1.309
2.5	0.713	1.282	1.302
5	0.711	1.282	1.300
7.5	0.713	1.280	1.301
10	0.713	1.280	1.298
15	0.715	1.279	1.299
Mean	0.711	1.286	1.299
RSD(%)	1.080	0.880	0.610

共9份,精密称定,分别按已知质量分数的50%,100%,150%3个水平加入6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素对照品,按2.1.3项下操作,在上述色谱条件下进样测定,计算加样回收率,6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素的加样回收率分别为102.5%,101.3%,103.3%,102.7%,RSD分别为1.5%,2.79%,1.44%,1.89%。

2.2 校正因子的重复性考察

2.2.1 不同仪器及不同色谱柱考察 精密吸取2.1.2项下混合对照品溶液1,2.5,5,7.5,10 μL ,进样分析,每个质量浓度进样3次,取平均值。分别计

算6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素对6-姜辣素的校正因子。试验分别考察了Agilent 1120,Waters 2695高效液相色谱仪和UltimateTM XB-C₁₈(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),SepaxSapphire-C₁₈(4.6 mm \times 250 mm,5 μm)2种色谱柱,所得的相对校正因子及其相对标准差见表3。结果显示,不同的仪器及不同的色谱柱所得的相对校正因子差异并不显著。

2.2.2 不同实验室考察 建立的一测多评试验方法在经两个实验室进行试验UltimateTM XB-C₁₈(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),不同实验室所得的相对校正因子差异较小,RSD在1.12%~2.86%。

2.3 待测组分数谱峰的定位 知道6-姜辣素的保留时间,利用待测成分对于6-姜辣素的保留时间及相对保留值,即可对峰进行定位,考察以上2个参数在不同仪器和不同规格色谱柱中的重复性,保留时间波动的RSD在2.42%~2.63%,见表4。各待测成分的相对保留值波动较小,RSD在0.53%~0.79%,见表5。因此认为选相对保留值作为干姜中上述待测成分的定位指标。在一测多评法的实际应用中可参考药材典型色谱图,利用相对保留值定位,并结合待测成分色谱峰的紫外吸收特征,能正确判断待测成分峰的位置。

表3 不同仪器和色谱柱测得相对校正因子

仪器	色谱柱	相对校正因子		
		$f_{6\text{-姜辣素}/6\text{-姜酚}}$	$f_{6\text{-姜辣素}/8\text{-姜辣素}}$	$f_{6\text{-姜辣素}/10\text{-姜辣素}}$
Waters 2695	Ultimate TM XB-C ₁₈	0.701	1.287	1.295
	Sepax Sapphire-C ₁₈	0.718	1.292	1.305
Agilent 1120	Ultimate TM XB-C ₁₈	0.709	1.286	1.289
	SepaxSapphire-C ₁₈	0.72	1.305	1.298
	Mean	0.712	1.292	1.297
	RSD/%	1.23	0.68	0.51

表4 不同色谱柱下待测成分间保留时间差

仪器	色谱柱	保留时间差		
		$\Delta t_{R6\text{-姜酚}/6\text{-姜辣素}}^{1)}$	$\Delta t_{R8\text{-姜辣素}/6\text{-姜辣素}}$	$\Delta t_{R10\text{-姜辣素}/6\text{-姜辣素}}$
Waters 2695	Ultimate TM XB-C ₁₈	9.47	7.02	17.32
	Sepax Sapphire-C ₁₈	9.90	7.37	18.15
Agilent 1120	Ultimate TM XB-C ₁₈	9.81	7.31	17.98
	Sepax Sapphire-C ₁₈	10.03	7.47	18.37
	Mean	9.80	7.29	17.96
	RSD/%	2.42	2.63	2.53

注: ¹⁾ $\Delta t_{R6\text{-姜辣素}/6\text{-姜酚}} = t_{R6\text{-姜酚}} - t_{R6\text{-姜辣素}}$ 。

表 5 不同色谱柱下待测成分的相对保留值

仪器	色谱柱	相对保留值		
		$R_{t_{R6-姜辣素/6-姜酚}}^{(1)}$	$R_{t_{R6-姜辣素/8-姜辣素}}$	$R_{t_{R6-姜辣素/10-姜辣素}}$
Waters 2695	Ultimate™ XB-C ₁₈	1.85	1.63	2.55
	Sepax Sapphire-C ₁₈	1.87	1.65	2.60
Agilent 1120	Ultimate™ XB-C ₁₈	1.85	1.63	2.56
	Sepax Sapphire-C ₁₈	1.86	1.64	2.58
	Mean	1.86	1.64	2.57
	RSD/%	0.56	0.53	0.79

注: $^{(1)} R_{t_{R6-姜酚/6-姜辣素}} = t_{R6-姜酚} / t_{R6-姜辣素}$ 。

2.4 一测多评法与外标法结果比较研究 取 28 批干姜药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 按 2.1.3 项下操作, 制成供试品溶液。分别精密吸取不同批次药材供试品溶液及对照品溶液进样分析测定。采用外标法和一测多评法分别计算干姜药材中 6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素和 10-姜辣素的含量, 结果见表 6。

表 6 外标法和一测多评法(QAMS)法测定干姜中姜酚成分含量 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

来源	6-姜辣素		6-姜酚		8-姜辣素		10-姜辣素	
	b		a	b	a	b	a	b
	四川 1	9.05	1.24	1.24	2.64	2.64	4.05	4.05
四川 2	10.11	0.94	0.94	2.95	2.94	4.05	4.06	
四川 3	9.97	0.98	0.98	2.92	2.91	4.02	4.02	
四川 4	10.09	0.96	0.96	2.94	2.93	4.01	4.02	
四川 5	9.98	0.98	0.98	2.92	2.91	4.03	4.03	
四川 6	10.08	0.96	0.96	2.93	2.93	4.01	4.02	
四川 7	10.05	0.97	0.97	2.94	2.93	4.02	4.03	
四川 8	8.96	1.25	1.25	2.63	2.63	4.06	4.06	
四川 9	8.86	1.24	1.24	2.61	2.60	4.03	4.03	
四川 10	8.86	1.43	1.43	2.29	2.29	4.01	4.02	
四川 11	9.04	1.45	1.45	2.30	2.30	4.03	4.03	
广东 1	10.61	1.34	1.34	3.00	3.00	3.81	3.82	
广东 2	10.63	1.36	1.37	3.00	3.00	3.82	3.83	
广东 3	10.62	1.39	1.39	3.00	3.00	3.83	3.83	
广东 4	10.58	1.38	1.39	3.00	2.99	3.83	3.83	
广东 5	11.65	1.11	1.11	3.79	3.78	5.43	5.43	
广东 6	11.34	1.14	1.14	3.32	3.32	4.56	4.56	
广东 7	11.58	1.15	1.15	3.34	3.33	4.58	4.58	
广东 8	5.39	2.69	2.69	1.57	1.57	2.44	2.44	
广东 9	4.98	2.68	2.69	1.62	1.63	2.42	2.42	
广西 1	7.96	2.90	2.91	2.52	2.52	3.25	3.26	
广西 2	4.78	3.57	3.58	1.47	1.47	2.07	2.08	
广西 3	3.96	4.26	4.28	1.12	1.12	1.95	1.96	
湖北 1	5.22	2.78	2.79	2.13	2.13	2.85	2.86	
湖北 2	5.05	2.69	2.70	1.95	1.95	2.62	2.63	
湖北 3	4.36	3.28	3.29	1.46	1.47	1.97	1.97	
云南 1	3.48	2.94	2.95	1.45	1.45	2.05	2.06	
云南 2	4.96	2.77	2.78	1.60	1.60	2.39	2.39	

注: a. 一测多评法所得含量; b. 外标法实测含量。

表明两种含量测定方法得到的含量值之间无显著性差异, 一测多评法可用于干姜药材的多成分质量评价研究。

3 讨论

在查阅文献、借鉴前人研究结果的基础上^[3-5], 本实验分别考察了甲醇、丙酮、乙醇、乙酸乙酯提取溶剂, 超声、回流、浸泡等不同提取方法, 结果以甲醇作为溶剂, 超声提取, 目标成分提取率较高, 分离度较好, 干扰的杂质峰较少, 且方法简单, 成本较低。比较了甲醇-水、乙腈-水, 加入磷酸等流动相系统, 结果发现乙腈-0.1% 磷酸水的分离度较好, 干扰的杂质峰较少。

6-姜辣素、6-姜酚、8-姜辣素、10-姜辣素是干姜中的主要特征性成分, 含量较高, 药理活性显著且与干姜的功能主治相关, 是公认评价干姜质量的适宜指标性成分。因 6-姜辣素对照品价廉易得, 故本实验选用 6-姜辣素为内参物, 建立干姜中 4 个成分的一测多评法。一测多评所得成分含量的计算值与传统的外标法所得实测值间没有显著性差异, 说明一测多评法可以应用于干姜药材多成分的含量测定。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:13.
- [2] 郭振德, 张相年, 张镜澄. 超临界 CO₂ 萃取姜油的组成研究[J]. 色谱, 1995, 13(3): 156.
- [3] 钮翠然, 陆娟, 宋丽丽, 等. RP-HPLC 法测定干姜中 3 种姜酚的含量. [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12):2008.
- [4] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评法”中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1925.
- [5] 王维皓, 王智民, 徐丽珍, 等. HPLC 法测定生姜中有效成分 6-姜辣素的含量[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5):348.

[责任编辑 蔡仲德]