

【 评价方法学 】

一测多评法测定毛郁金中 5 种成分

郭青玲¹, 周福军², 单 淇², 黄景华³, 王习著³, 华 洁², 王 淼², 侯文彬^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 桂林八加一药业股份有限公司, 广西 桂林 541000

摘要: **目的** 建立毛郁金药材中不同成分同时测定的一测多评法。**方法** 以毛郁金中莪术二酮为指标, 建立莪术二酮、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇和姜黄素的相对校正因子, 在考察相对校正因子的重现性后, 进一步采用外标法对一测多评法所计算出的成分含量进行验证。**结果** 10 批毛郁金药材中, 各成分采用相对因子计算的含量与采用外标法计算的结果无显著差异。**结论** 以莪术二酮为参照物, 采用一测多评测定和计算其他 4 种成分含量的方法是可行的, 结果较为准确。

关键词: 一测多评; 毛郁金; 莪术二酮; 莪术二醇; ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one; 原莪术醇; 姜黄素

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)09-1274-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.09.015

Quantitative analysis on content of different components in *Curcumae Aromaticae Radix* by QAMS

GUO Qing-ling¹, ZHOU Fu-jun², SHAN Qi², HUANG Jing-hua³, WANG Xi-zhu³, HUA Jie², WANG Miao², HOU Wen-bin¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Guilin Bajiyi Pharmaceutical Ltd. Co., Guilin 541000, China

Abstract: Objective To develop a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for simultaneously determining five compounds in *Curcumae Aromaticae Radix*. **Methods** An HPLC method was developed as QAMS to determine curcuma diol, ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one, original curcumol and curcumin in *Curcumae Aromaticae Radix*, using curdione as internal reference substance, and the relative correction factor (RCF) of the four components was determined by HPLC with good reproducibility. Their contents in 10 batches of samples, collected from different areas, were determined by both external standard method and QAMS. **Result** No significant differences were found in the quantitative results of four compounds in 10 batches of *Curcumae Aromaticae Radix* determined by external standard method and QAMS. **Conclusion** It is feasible and suitable to evaluate the quality of *Curcumae Aromaticae Radix* by QAMS.

Key words: quantitative analysis of multi-component with a single-marker (QAMS); *Curcumae Aromaticae Radix*; curdione; curcuma diol; ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one; original curcumol; curcumin

毛郁金为姜科植物毛郁金 *Curcuma aromatica* Salisb. 的干燥根茎, 临床中根据其破血行气、温经止痛的功能, 主要用来治疗气滞血瘀所致的疼痛。在壮医的记录中, 其可以通火路、龙路, 止疼痛。

收稿日期: 2016-01-08

基金项目: 国家新药创制项目(2014ZX09101-021-001)

作者简介: 郭青玲, 硕士, 从事中药药物分析与检验研究。Tel: 18822183369 E-mail: qingling0024@163.com

*通信作者 侯文彬, 硕士生导师, 研究员, 主要从事中药新药的研究与开发。TEL: (022)23006903 E-mail: houwb@tjipr.com

此外据研究^[1-2],毛郁金还具有抗癌、保肝等活性。但因毛郁金为地方品种,鲜少有人对其进行研究,目前国内仅有的研究也仅限于化学方面,虽然张琳^[3]曾对其进行过指纹图谱的测定,但在各成分的含量测定方面却未做论述,而在广西壮族自治区壮药质量标准中,也只是对其含量较低的姜黄素和总挥发油含量进行了规定,极大的限制了毛郁金的开发与应用。故笔者在前人研究的基础上,以含量较高的莪术二酮为内标成分,采用一测多评法^[4-6]对毛郁金进行多指标的质量控制,并对其中的其他4个成分进行了含量分析,希望为今后毛郁金的研究提供参考和帮助。

1 材料

1.1 仪器

Agilent-1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent-1220 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Luna C₁₈(2)色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 广州菲罗门科学仪器有限公司)、Promosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 博纳艾杰尔科技有限公司)、ReproSil-Pur Basic C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 德国迈克公司); BK-240A 型超声波清洗机(巴克超声波科技集团有限公司)。

1.2 药材

毛郁金药材购自于广西,经天津药物研究院中药部侯文彬研究员鉴定为姜科植物毛郁金 *Curcuma aromatica* Salisb.的干燥根茎。

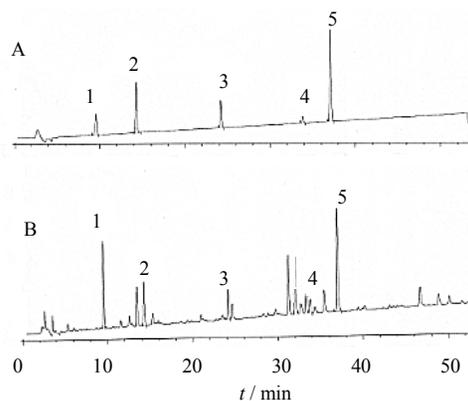
1.3 对照品与试剂

实验中所用乙腈(美国 Fisher 化学试剂公司)为色谱纯,其余为分析纯,所用为超纯水。莪术二酮对照品(批号 111800-201302)、姜黄素(批号 0823-9802)均购于中国食品药品检定研究院; ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、莪术二酮和原莪术醇,自制,质量分数均在 98%以上。

2 方法与结果

2.1 一测多评方法学考察

2.1.1 色谱条件^[3] 采用 Luna C₁₈(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,检测波长 240 nm,柱温 30 °C,进样量 20 μL,体积流量 1.0 mL/min,流动相为乙腈(A)-0.5%冰乙酸水(B),梯度洗脱(0~50 min, 15%A~85%A; 50~50.1 min, 85%A~15%A; 50.1~65 min, 15%A)。理论板数按莪术二酮计算不低于 6 000。色谱图见图 1。



1- 莪术二酮; 2-ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one; 3-莪术醇; 4-姜黄素; 5-莪术二酮
1-curcuma diol; 2- ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one; 3- original curcuminol; 4-curcumin; 5-curdione

图1 混合对照品(A)和毛郁金样品(B)的HPLC色谱图
Fig. 1 HPLC of mixed control (A) and *Curcuma Aromatica* Radix samples

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取莪术二酮、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素、莪术二酮对照品适量,加甲醇溶解,分别配制成质量浓度为 24.6、21.4、13.2、3.04、202 μg/mL 的混合对照品溶液,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称定毛郁金粉末(过 40 目筛) 0.4 g 至 50 mL 的锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,超声处理 60 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,放冷,滤过,备用。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 5、10、15、20、25、30、50 μL 注入液相色谱仪,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归分析,结果见表 1。可见 5 种对照品的峰面积与相应的进样量呈良好线性关系。

2.1.5 相对因子的计算 以莪术二酮为内标,计算莪术二酮、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素的校正因子,见表 2。

2.1.6 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液,连续进样 6 次,准确记录 5 种成分的峰面积,结果显示莪术二酮、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素、莪术二酮峰面积的 RSD 分别为

表1 5种对照品的线性关系考察
Table 1 Results of linear relationship

成分	回归方程	R ²	线性范围/μg
莪术二醇	$Y=656.41X-0.1553$	1.000	0.123~1.230
ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one	$Y=1643.9X+3.2426$	1.000	0.107~1.070
原莪术醇	$Y=1423.7X-1.3612$	0.9997	0.066~0.660
姜黄素	$Y=1581.3X+0.8255$	0.9998	0.015~0.152
莪术二酮	$Y=366.34X+8.8013$	1.000	1.010~10.10

0.34%、0.39%、0.29%、0.78%、0.29%，仪器精密度较好。

2.1.7 稳定性试验 精密称取毛郁金香药材(广西1)制备的供试品溶液20 μL，分别于制备后的0、2、4、6、12、16 h进样，记录峰面积，结果显示其莪术二醇、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素、莪术二酮峰面积的RSD分别为0.24%、0.31%、0.18%、0.93%、0.25%，仪器具有较好的稳定性。

2.1.8 重复性试验 精密称取毛郁金香粉末(广西1)6份，并按“2.1.3”项下方法制备成供试品溶液，进样分析，结果可见莪术二醇、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素、莪术二酮的平均质量分数为1.82、1.79、1.16、0.36、24.42 mg/g，其RSD分别为0.74%、0.81%、0.68%、1.13%、0.27%，表明本法重复性较好。

2.1.9 加样回收率 精密称取毛郁金香粉末(广西1)9份，每份约0.2 g，置50 mL锥形瓶中，精密加入对照品溶液(添加对照品量约相当于半量的80%、100%和120%)于上述锥形瓶中，再分别加甲醇至25 mL于锥形瓶中，依“2.1.3”项下方法制备成供

试品溶液。分别取对照品溶液和供试品溶液，注入液相色谱仪进行测定，计算，结果显示莪术二醇、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素、莪术二酮的平均回收率为99.1%、98.5%、95.2%、97.7%、98.6%，其相对应的RSD分别为0.65%、1.31%、1.27%、0.87%、1.14%。

2.2 一测多评法的耐用性试验

2.2.1 校正因子重现性考察

(1) 不同仪器对校正因子的影响 分别采用Agilent 1260, Agilent 1200、戴安P680HPL液相色谱仪进行采样检测，色谱柱为Luna C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm, 5 μm)，进样量分别为5、10、15、20、25、30、50 μL。测定结果见表3。由分析结果可见，不同色谱仪所得的相对校正因子无明显差异。

(2) 不同色谱柱对校正因子的影响 选取Agilent 1260色谱仪，分别采用Luna C₁₈(2)色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Promosil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、ReproSil-Pur Basic C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)进行采样检测，进样量分别为5、10、15、20、25、30、50 μL。测定结果见表4。由分析结果可见，不同色谱柱所得的相对校正因子无明显差异。

表2 不同成分的相对校正因子
Table 2 RCFs in different components

进样体积/μL	$f_{D/A}$	$f_{C/A}$	$f_{E/A}$	$f_{J/A}$
5	0.573 4	0.224 6	0.269 1	0.237 0
10	0.562 1	0.224 8	0.255 7	0.233 5
15	0.563 4	0.223 2	0.261 2	0.230 3
20	0.561 7	0.222 7	0.259 9	0.230 5
25	0.561 4	0.223 1	0.258 1	0.229 4
30	0.561 4	0.222 4	0.263 5	0.229 4
50	0.559 2	0.223 2	0.257 2	0.232 5
平均值	0.563 2	0.223 4	0.260 7	0.231 8
RSD%	0.828 9	0.405 1	1.748 3	1.193 8

A- 莪术二酮; C-ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one; D-莪术二醇; E-原莪术醇; J-姜黄素; 下表同
A- curdione; C- ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one; D-curcuma diol; E- original curcumol; J-curcumin; same as bellow

表3 不同色谱仪对相对校正因子的影响

Table 3 RCFs in different instruments

仪器	$f_{D/A}$	$f_{C/A}$	$f_{E/A}$	$f_{J/A}$
Agilent 1260	0.563 2	0.223 4	0.260 7	0.231 8
Agilent 1200	0.555 2	0.221 8	0.255 6	0.231 1
戴安P680HPL	0.557 2	0.222 6	0.258 5	0.233 5
平均值	0.558 5	0.222 6	0.258 3	0.232 1
RSD%	0.745 4	0.359 4	0.990 4	0.531 7

表4 不同色谱柱对相对校正因子的影响

Table 4 RCFs in different columns

色谱柱	$f_{D/A}$	$f_{C/A}$	$f_{E/A}$	$f_{J/A}$
Luna C ₁₈ (2)	0.563 2	0.223 4	0.260 7	0.231 8
Agela Promosil C ₁₈	0.560 9	0.221 7	0.255 8	0.229 1
ReproSil-Pur Basic C ₁₈	0.552 1	0.224 1	0.259 0	0.231 3
平均值	0.558 7	0.223 1	0.258 5	0.230 7
RSD%	1.048 6	0.553 3	0.962 5	0.622 6

2.3.3 不同实验室对相对校正因子的影响 采用 Agilent 1260 色谱仪和 Luna C₁₈(2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 分别由 3 组实验人员和 3 间实验室对校正因子进行考察。进样量分别为 5、10、15、20、25、30、50 μL。结果见表 5, 表明不同实验室所得的相对校正因子无明显差异。

2.3.4 待测组分色谱峰的定位 根据莪术二酮的保留时间, 利用待测成分相对于莪术二酮的相对保留时间 (RRT) 对待测峰进行定位, 其中 $RRT = \frac{RT_{待测峰}}{RT_{内标峰}}$, 结果见表 6。实验结果表明, 不同液相色谱仪和色谱柱所测得的相对保留时间相对误差均小于 5%, 因此可得此法是可行的。

表5 不同实验室对相对校正因子的影响

Table 5 RCFs in different labs

实验室	$f_{D/A}$	$f_{C/A}$	$f_{E/A}$	$f_{J/A}$
实验室 (1)	0.563 2	0.223 4	0.260 7	0.231 8
实验室 (2)	0.566 6	0.221 7	0.255 9	0.239 9
实验室 (3)	0.549 8	0.228 7	0.264 5	0.233 1
平均值	0.559 9	0.224 6	0.260 4	0.234 9
RSD%	1.586 5	1.625 6	1.655 2	1.851 6

表6 不同色谱柱相对保留时间的影响

Table 6 RRTs obtained from different columns and instruments

仪器	色谱柱	t_R			
		$f_{D/A}$	$f_{C/A}$	$f_{E/A}$	$f_{J/A}$
Agilent 1260	Agela Promosil C ₁₈	0.258 8	0.385 8	0.652 9	0.912 5
	ReproSil-Pur Basic C ₁₈	0.262 7	0.387 9	0.654 6	0.911 0
	Luna C ₁₈ (2)	0.255 7	0.384 7	0.652 2	0.914 1
Agilent 1200	LC-solution C ₁₈	0.256 6	0.385 6	0.654 4	0.914 5
戴安P680HPL	LC-solution C ₁₈	0.253 7	0.386 7	0.673 3	0.913 3
平均值		0.257 5	0.386 1	0.657 5	0.913 1
RSD%		1.334 3	0.314 3	1.353 8	0.152 6

2.4 一测多评法与外标法测定结果比较

称取来自不同产地的毛郁金粉末 0.4 g, 按上述 2.1.3 供试品溶液的制备方法进行制备, 并按上述色谱条件进行测定, 进样量为 20 μ L, 然后计算莪术二 醇、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-

(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素、莪术二酮的量, 并与外标法计算结果进行比较。见表 7。可见其相对误差均小于 3%, 因此推断利用一测多评法在毛郁金药材中进行多指标成分的测定具有适应性和可行性。

表 7 一测多评法与外标法测定结果比较
Table 7 Comparison on results by two methods

药材产地	莪术二酮		ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one		原莪术醇		姜黄素		
	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	
广西 (1)	24.436	1.824	1.831	1.813	1.819	1.156	1.158	0.323	0.321
广西 (2)	31.260	3.786	3.792	2.131	2.132	2.035	2.041	0.459	0.454
广西 (3)	16.470	2.223	2.226	1.534	1.539	1.169	1.172	0.281	0.283
广西 (4)	12.154	0.977	0.981	1.086	1.082	0.835	0.839	0.251	0.252
广西 (5)	22.045	2.794	2.799	1.623	1.626	2.004	2.006	0.420	0.424
广西 (6)	13.056	1.458	1.461	0.941	0.948	1.462	1.465	0.271	0.268
湖北 (1)	17.434	2.061	2.062	2.024	2.030	1.382	1.389	0.413	0.414
湖北 (2)	10.893	0.962	0.967	0.812	0.815	1.109	1.113	0.193	0.196
湖北 (3)	28.150	3.663	3.669	2.058	2.062	1.375	1.381	0.392	0.396
湖南 (1)	18.126	2.801	2.804	2.547	2.550	1.981	1.983	0.361	0.359

3 讨论

3.1 供试品溶液的选择

在前人研究的基础上, 本实验分别对提取溶剂和超声时间进行了考察。分别采取了甲醇、80%甲醇、乙醇作为提取溶剂, 结果显示甲醇的提取效果最好, 且各色谱峰峰形也较好, 达到基线分离, 故选择甲醇作为提取溶剂。在提取时间上, 笔者分别进行了 90、60、30 min 提取时间的考察, 结果以提取 60 min 效果好, 故选择提取时间定为 60 min。

3.2 耐用性考察

本实验分别在 3 台高效液相色谱仪和 3 根不同厂家的色谱柱上, 对莪术二 醇、ocathydro-1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)azulen-5(1H)-one、原莪术醇、姜黄素、莪术二酮之间的相对校正因子进行了考察, 并对一测多评在毛郁金药材质量控制的评价方面进行了验证试验, 结果表明, 相对校正因子具有一定的稳定性和可重复性, 而通过一测多评所计算出的成分含量与采用外标法实测的含量之间无明显区别, 故表明一测多评适应于毛郁金药材成分含量的计算。

3.3 目标色谱峰的定位

针对药材质量的评价模式, 本文分别考察了各待测峰成分之间的保留时间和相对保留值, 并采用 3 台不同的高效液相色谱仪和 3 根不同品牌的色谱

柱对上述参数进行了评价, 结果表明, 虽然各种成分的出峰顺序是一定的, 但根据保留时间对成分峰进行定位则难以达到理论要求 ($RSD > 10\%$), 故在实际情况中, 若未对液相色谱仪和色谱柱进行定位, 则不宜使用保留时间定位色谱峰。而相对保留值则可作为待测成分出峰的依据, 其相对应的 $RSD < 5\%$, 且具有一定程度的普遍适应性。

参考文献

- [1] 曾建红, 莫炫永, 戴平. 广西莪术挥发油抗肿瘤作用的谱效关系研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 91-93.
- [2] 王佳丽, 王秀, 夏泉. 莪术油中 3 种倍半萜类化合物对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 中成药, 2014, 36(7): 1535-1536.
- [3] 张琳, 周福军, 单淇, 等. 毛郁金药材 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(14): 62-65.
- [4] 李丹, 李会军, 高雯, 等. 一测多评法测定山银花提取物中 6 种绿原酸类成分 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2305-2309.
- [5] 陈静, 王淑美, 孟江, 等. 一测多评法测定苦参中 5 种生物碱的含量 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 77-80.
- [6] 李倩, 刘伟, 罗祖良, 等. 一测多评法测定丹参中丹参酮 II A、隐丹参酮、丹参酮 I、二氢丹参酮 I 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(6): 824-828.