

## HPLC 法测定不同主产地莪术饮片中莪术二酮、莪术醇、吉马酮和 $\beta$ -榄香烯

毛春芹<sup>1</sup>, 陆兔林<sup>1</sup>, 姜国非<sup>1</sup>, 苏桃<sup>2</sup>, 蔡宝昌<sup>2</sup>

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210046

**摘要:** 目的 采用 HPLC 法同时测定不同产地莪术饮片中莪术二酮、莪术醇、吉马酮和  $\beta$ -榄香烯的量, 为临床合理用药提供科学依据。方法 固定相为依利特 Hypersil ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 乙腈-水为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25  $^{\circ}$ C; 检测波长 214 nm; 进样量 10  $\mu$ L。结果 在上述色谱条件下测得莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 $\beta$ -榄香烯分别在 8~264、7~214、2~52、8~253  $\mu$ g/mL 时与色谱峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为 98.3%、98.0%、98.2%、97.3%, RSD 分别为 2.9%、1.5%、2.0%、2.7%。结论 该方法准确、灵敏, 可作为不同产地莪术饮片的质量控制方法; 测定结果表明, 不同主产地莪术饮片中 4 种成分的量差异较大, 临床应用时应注意区分。

**关键词:** 莪术; 莪术二酮; 莪术醇; 吉马酮;  $\beta$ -榄香烯; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)03-0305-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.03.014

## Determination of curdione, curcuminol, germacrone, and $\beta$ -elemene in processed *Curcumae Rhizoma* from different habitats

MAO Chun-qin<sup>1</sup>, LU Tu-lin<sup>1</sup>, JIANG Guo-fei<sup>1</sup>, SU Tao<sup>2</sup>, CAI Bao-chang<sup>2</sup>

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

**Key words:** *Curcumae Rhizoma*; curdione; curcuminol; germacrone;  $\beta$ -elemene; HPLC

莪术为姜科姜黄属植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val、广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 和温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎, 主产于广西、四川、浙江等地。现代研究显示, 莪术中主要含有挥发油(1%~2.5%)和姜黄素两大类成分<sup>[1]</sup>。姜黄素类物质具有抗炎、抗肿瘤、调血脂、抗氧化等作用<sup>[2-3]</sup>。挥发油中的主要成分为单萜和倍半萜类, 如莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 $\beta$ -榄香烯等<sup>[4]</sup>。吉马酮和莪术二酮具有明显的抗肿瘤生理活性<sup>[5]</sup>, 莪术醇是莪术抗癌、抗病毒、抗菌等作用的有效成分之一<sup>[6]</sup>,  $\beta$ -榄香烯作为一种新型非细胞毒性抗癌药已被广泛应用于临床<sup>[7]</sup>。《中国药典》2010年版莪术饮片定量测定项下仅用总挥发油量来控制其质量, 不能完全真实地反映其内在品质, 有违同质同效的原理。国内外文献对于莪术的

研究主要集中于生药和莪术油<sup>[8]</sup>, 同时测定莪术饮片中多个挥发性成分的研究报道较少; 本实验首次对莪术饮片中莪术二酮、莪术醇、吉马酮和  $\beta$ -榄香烯的量进行同时测定, 能更好地控制莪术饮片质量。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)包括: 四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器; 色谱柱: 依利特 Hypersil ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m, 大连依利特分析仪器有限公司)。

#### 1.2 试剂

莪术二酮对照品(批号 13657-68-6)购于上海沪云医药开发有限公司, 莪术醇对照品(批号 100185-200506), 吉马酮(牻牛儿酮)对照品(批号

收稿日期: 2012-05-16

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目(2009ZX09308-004); 江苏省高校自然科学研究重大项目(09KJA360001); 《中国药典》2010年版课题(YZ-108)

作者简介: 毛春芹(1963—), 女, 江苏南京人, 高级实验师, 主要研究方向为中药质量控制及新药研发。Tel: (025)85811835 E-mail: mcq63@163.com  
网络出版时间: 2013-01-08 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130108.0950.006.html>

111665-200902,  $\beta$ -榄香烯对照品(批号 100268-200401)购于中国药品生物制品检定所。

样品均购自莪术主产地(四川、广西、浙江),经南京中医药大学药学院巢建国教授鉴定为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val、广西莪术

*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 及温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎。分别取净莪术按《中国药典》2010年版制得各产地相应的莪术饮片。样品来源及批次见表1。乙腈、甲醇为色谱纯,其他所用试剂均为分析纯。

表1 样品来源及批次

Table 1 Sources and batches of samples

批号	产地	来源
SW080716	浙江	浙江中医药大学饮片厂
SW091203	浙江	浙江中医药大学饮片厂供原药自制
SW100124	浙江	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司
SW100118	浙江	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司
SW080717	浙江	浙江中医药大学饮片厂
SW091204	浙江	浙江中医药大学饮片厂供原药自制
SW100204	浙江	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司供原药自制
SW100207	浙江	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司供原药自制
SP100123	四川	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司
SP100127	四川	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司
SP100203	四川	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司供原药自制
SK100122	广西	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司
SK100202	广西	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司供原药自制
SK100209	广西	安徽丰原铜陵中药饮片有限公司供原药自制

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[9]</sup>

以依利特 Hypersil ODS-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m); 乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 乙腈(A)-水(B), 0~30 min, 40%~60% A; 30~40 min, 60%~80% A; 40~60 min, 80%~90% A。下一个循环前用 100%乙腈冲洗色谱柱 10 min, 继续用 40%乙腈平衡 10 min。柱温 25  $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 214 nm。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 对照品储备液的制备** 精密称取各对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得含莪术二酮 0.264 mg/mL、莪术醇 0.214 mg/mL、吉马酮 0.052 mg/mL、 $\beta$ -榄香烯 0.253 mg/mL 的对照品储备液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取莪术饮片粉末 0.5 g, 精密称定, 加乙醚超声提取 3 次, 每次用量为 10 mL, 时间为 10 min, 合并滤液, 用少量乙醚洗涤残渣及滤器, 合并乙醚液, 挥干乙醚, 残渣加甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 滤过, 即得。

**2.2.3 混合对照品溶液的配制** 精密吸取上述对照

品储备液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 重复此操作再连续稀释 4 次, 最终使莪术二酮分别为 264、132、66、33、17、8  $\mu$ g/mL; 莪术醇分别为 214、107、53、27、13、7  $\mu$ g/mL; 吉马酮分别为 52、26、13、7、3、2  $\mu$ g/mL;  $\beta$ -榄香烯分别为 253、127、63、32、16、8  $\mu$ g/mL。

### 2.3 专属性试验

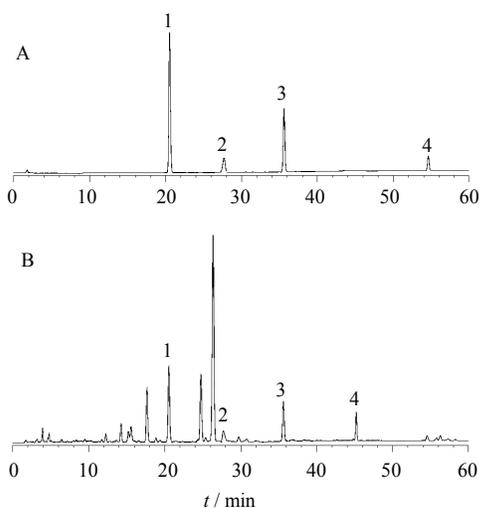
分别取混合对照品溶液、供试品溶液, 注入液相色谱仪中, 按“2.1”项色谱条件, 进样 10  $\mu$ L, 测定, 结果见图 1。表明, 莪术二酮、莪术醇、吉马酮和  $\beta$ -榄香烯分离良好, 在各出峰处均无干扰。

### 2.4 标准曲线及线性范围

各对照品溶液分别进样 10  $\mu$ L, 重复 2 次, 按“2.1”项下测定峰面积值, 以峰面积平均值和对照品质量浓度进行回归处理, 计算线性回归方程、线性范围和相关系数( $r$ ), 结果见表 2。

### 2.5 精密度试验

取同一混合对照品储备液(莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 $\beta$ -榄香烯分别为 0.264、0.214、0.052、0.253 mg/mL), 连续进样 6 次, 进样量 10  $\mu$ L, 测定莪术二酮、莪术醇、吉马酮、 $\beta$ -榄香烯的峰面积值,



1-莪术二酮 2-莪术醇 3-吉马酮 4-β-榄香烯  
1-curdiene 2-curcumol 3-germacrone 4-β-elemene

图1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

表2 对照品的标准曲线、线性范围及相关系数

Table 2 Standard curve, linearity range, and correlation coefficient of reference substances

对照品	标准曲线	线性范围 / (μg·mL <sup>-1</sup> )	r
莪术二酮	$Y=1.643 \times 10^4 X+284.31$	8~264	0.999 7
莪术醇	$Y=3.271 \times 10^3 X+ 45.98$	7~214	0.999 8
吉马酮	$Y=3.851 \times 10^4 X+128.51$	2~ 52	0.999 9
β-榄香烯	$Y=1.981 \times 10^3 X+ 33.55$	8~253	0.999 8

mg/mL 莪术二酮、1.068 mg/mL 莪术醇、0.316 mg/mL 吉马酮、0.506 mg/mL β-榄香烯对照品溶液 1.2、1.0、0.8 mL (每个质量浓度取 3 份), 照供试品溶液制备项下方法制备样品, 注入液相色谱仪中, 色谱条件同前, 进样 10 μL, 计算加样回收率。结果莪术二酮、莪术醇、吉马酮、β-榄香烯的平均回收率分别为 98.3%、98.0%、98.2%、97.3%, RSD 分别为 2.9%、1.5%、2.0%、2.7%。

### 2.9 样品测定

取样品(过 3 号筛)约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液。按上述测定方法分别测定其中 4 种成分的量, 结果见表 3。

### 3 讨论

中药饮片是中成药、中药汤剂和中药配方颗粒的处方药。既可根据处方调配入汤药, 又可作为原料生产中成药和中药配方颗粒。其质量优劣和能否合理地应用, 直接关系到中药的临床疗效。所以必须制定安全、有效和可控的临床常用中药饮片的质

量标准, 使中药饮片、中药汤剂、中成药的安全、有效及可控性得到保证。本实验结果表明, 3 个主产地的莪术饮片中 4 种所测成分差异较大, 同一产地差异也较大, 《中国药典》2010 年版规定莪术来源有 3 个, 而其成分的种类和数量均有较大的差异, 这样的差异使其在临床的疗效无法保持一致性, 建议《中国药典》2005 年版中如葛根、粉葛, 关黄柏、云黄柏等一样, 将其分列使用以保证临床使用的有效性和准确性。建立规范的 GAP 生产基地, 保证中药饮片原料的一致性。

### 2.6 稳定性试验

取批号为 SW100204 的样品粉末 0.5 g, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 每隔 2 h 进样 10 μL, 进行测定, 计算峰面积在 12 h 内的 RSD 值, 结果莪术二酮、莪术醇、吉马酮、β-榄香烯的 RSD 分别为 0.8%、0.5%、0.3%、0.6%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

### 2.7 重复性试验

取批号为 SW100204 的样品粉末 0.5 g, 精密称定, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 在上述色谱条件下, 进样量 10 μL, 进行测定, 计算莪术二酮、莪术醇、吉马酮、β-榄香烯峰面积的 RSD, 结果分别为 2.1%、2.0%、2.8%、2.3%。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取 9 份批号为 SW100204 的莪术粉末 0.25 g, 分别置于具塞锥形瓶中, 再精密加入 1.320

量标准, 使中药饮片、中药汤剂、中成药的安全、有效及可控性得到保证。本实验结果表明, 3 个主产地的莪术饮片中 4 种所测成分差异较大, 同一产地差异也较大, 《中国药典》2010 年版规定莪术来源有 3 个, 而其成分的种类和数量均有较大的差异, 这样的差异使其在临床的疗效无法保持一致性, 建议《中国药典》2005 年版中如葛根、粉葛, 关黄柏、云黄柏等一样, 将其分列使用以保证临床使用的有效性和准确性。建立规范的 GAP 生产基地, 保证中药饮片原料的一致性。

Table 2 Standard curve, linearity range, and correlation coefficient of reference substances

量标准, 使中药饮片、中药汤剂、中成药的安全、有效及可控性得到保证。本实验结果表明, 3 个主产地的莪术饮片中 4 种所测成分差异较大, 同一产地差异也较大, 《中国药典》2010 年版规定莪术来源有 3 个, 而其成分的种类和数量均有较大的差异, 这样的差异使其在临床的疗效无法保持一致性, 建议《中国药典》2005 年版中如葛根、粉葛, 关黄柏、云黄柏等一样, 将其分列使用以保证临床使用的有效性和准确性。建立规范的 GAP 生产基地, 保证中药饮片原料的一致性。

贮藏时间也是保证莪术饮片质量的一个重要因素<sup>[10-11]</sup>。研究发现莪术饮片贮存 2 年以上, 本实验所测 4 种成分损失均较大, 提示饮片在使用过程中应注意贮藏条件, 注意样品保质期。因本实验收集的批次较少, 没有系统跟踪其成分损失的变化规律和贮存环境的相关性, 相关研究有待下一步开展。

在流动相的选择方面, 选用依利特 Hypersil ODS 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 分别

表3 不同产地莪术中4种成分的量 (n=3)

Table 3 Determination of four ingredients in *Curcuma Rhizoma* from different habitats (n=3)

批号	莪术二酮 / (mg·g <sup>-1</sup> )	莪术醇 / (mg·g <sup>-1</sup> )	吉马酮 / (mg·g <sup>-1</sup> )	β-榄香烯 / (mg·g <sup>-1</sup> )
SW080716	0.10	0.10	0.09	0.43
SW091203	0.20	2.00	0.23	1.33
SW100124	2.60	2.98	0.59	0.56
SW100118	2.99	1.78	1.62	0.99
SW080717	0.19	0.48	0.05	0.42
SW091204	0.19	1.70	0.19	0.73
SW100204	2.62	2.99	0.70	0.88
SW100207	3.30	1.90	1.56	1.80
SP100123	2.80	1.50	0.85	0.94
SP100127	2.67	1.52	0.51	1.00
SP100203	3.00	2.82	0.98	3.01
SK100122	1.85	2.13	0.89	1.86
SK100202	1.73	2.17	0.89	2.13
SK100209	1.87	1.93	0.75	0.41

采用不同梯度的流动相进行色谱分离,结果表明流动相为乙腈(A)-水(B), 0~30 min, 40%~60% A; 30~40 min, 60%~80% A; 40~60 min, 80%~90% A, 分离效果最佳。

在供试品溶液提取制备条件方面,对提取溶剂、提取方式及提取次数进行了考察。发现采用乙醚超声提取,提取效果较好,为保证超声提取温度不至升高到影响成分测定的程度,确定提取时间为10 min;提取次数为3次。

本实验方法简便、快速、准确,为制定莪术饮片的质量标准和质量控制提供了依据,同时对于含莪术饮片的中成药制剂的质量标准和质量控制也有参考价值。

#### 参考文献

- [1] 谢永忠,夏泉. 高效液相色谱法测定莪术中吉马酮的含量[J]. 中国药房, 2005, 16(6): 461-462.
- [2] 戚爱棣. HPLC法测定姜黄、郁金、广西莪术中姜黄素的含量[J]. 中草药, 2002, 33(6): 510-511.
- [3] 黄臣虎,陆茵,孙志广,等. 莪术抗癌作用机制研究进展[J]. 中草药, 2010, 41(10): 1745-1747.
- [4] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [5] 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.
- [6] 王琰,王慕邹. 莪术的质量研究[J]. 药学学报, 2001, 36(11): 849.
- [7] 刘孟忠,何立儒,卢泰祥,等. 甘氨酸钠对鼻咽癌放疗增敏作用的长期疗效[J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(12): 932-937.
- [8] 顾娟娟,姜国非,陆兔林,等. 莪术不同炮制品挥发油中4种倍半萜类成分的比较[J]. 中草药, 2012, 43(4): 702-705.
- [9] Yang F Q, Wang Y T, Li S P. Simultaneous determination of 11 characteristic components in three species of *Curcuma* rhizomes using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1134(1/2): 226-231.
- [10] 宋珅,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): 61-64.
- [11] 姜程曦,王晓慧,赵秋月,等. 温莪术贮藏过程中质量稳定性研究[J]. 北方园艺, 2009(11): 208-211.