

姜黄中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的光稳定性分析

赵欣¹, 王爱里¹, 袁园², 袁丹^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 武警四川总队医院, 四川 乐山 614000

摘要: 目的 研究姜黄中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的光稳定性, 并对双去甲氧基姜黄素光化学反应产物进行考察。方法 姜黄的甲醇提取液于棕色量瓶储存, 在自然光/避光条件下放置 0、1、2、4、6、8 h 后, HPLC 法测定其指标成分姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素量的变化; LC-MS 法分析双去甲氧基姜黄素光化学反应产物。结果 姜黄素、去甲氧基姜黄素在自然光/避光条件下均有良好的稳定性; 双去甲氧基姜黄素在避光条件下稳定, 见光条件下发生光化学反应。结论 姜黄素和去甲氧基姜黄素具有良好稳定性, 双去甲氧基姜黄素在自然光照射下不稳定, 因此, 姜黄药材分析供试液应于棕色量瓶中避光保存。

关键词: 姜黄素; 去甲氧基姜黄素; 双去甲氧基姜黄素; 光稳定性; HPLC; LC-MS

中图分类号: R286.011 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1338-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.026

Photostability of curcumine, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin in rhizomes of *Curcuma longa*

ZHAO Xin¹, WANG Ai-li¹, YUAN Yuan², YUAN Dan¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Sichuan Police General Hospital, Leshan 614000, China

Abstract: Objective To study the photostability of curcumin (Cur), demethoxycurcumin (DMCur), and bisdemethoxycurcumin (BDMCur) in the rhizomes of *Curcuma longa*, and to investigate the photochemical conversion product of BDMCur. **Methods** The stock solution of the extracts from the rhizomes of *C. longa* was kept in brown volumetric flasks. Then the absorbances of Cur, DMCur, and BDMCur were determined by HPLC analysis, and the solutions were placed in the daylight or daylight/dark conditions for 0, 1, 2, 4, 6, and 8 h. The photochemical conversion products of BCMCur were detected by LC-MS analysis. **Results** Both Cur and DMCur were stable in the daylight and daylight/dark conditions. BDMCur was liable to photochemical reaction in the daylight condition. **Conclusion** Both Cur and DMCur have good photostabilities, but BDMCur is not stable in daylight condition. As a result, the sample solution of the rhizomes of *C. longa* should be conserved in dark.

Key words: curcumin; demethoxycurcumin; bisdemethoxycurcumin; photostability; HPLC; LC-MS

姜黄中的有效成分姜黄素类化合物为姜黄属植物姜黄、郁金、莪术等干燥根茎的主要活性物质, 包括姜黄素 (curcumin, Cur)、去甲氧基姜黄素 (demethoxycurcumin, DMCur)、双去甲氧基姜黄素 (bisdemethoxycurcumin, BDMCur) 等。其安全性高, 长期以来作为一种常用的天然色素被广泛应用于食品工业^[1]。这 3 种成分结构相近, 具有多种相似的药理活性, 如具有抗诱变、抗癌、

抗炎、抗氧化、调血脂、保肝、利胆等活性^[2-4]。但 3 种成分药理活性也有所区别, 如抗诱变、抗癌方面, 以姜黄素活性最强; 调血脂方面, 以去甲氧基姜黄素的活性最强; 而利胆及对内皮细胞生长的抑制作用方面, 均以双去甲氧基姜黄素活性最强^[5-7]。对去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素药理活性的研究日益引起重视。但姜黄素类化合物不稳定, 易受温度、光线、湿度、pH 等影响。

收稿日期: 2012-09-20

基金项目: 国家科技重大专项“辽宁省国家创新药物孵化(本溪)基地建设”课题(2010ZX09401-304-504)

作者简介: 赵欣(1980—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药质量评价及中药成分代谢研究。Tel: (024)23986502 E-mail: lvjingsy@163.com

*通信作者 袁丹 Tel: (024)23986502 E-mail: yuandan_kampo@163.com

因此,本研究对姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素在自然光和避光条件下的稳定性及光解产物进行研究,为姜黄素类化合物及姜黄提取物的质量控制提供理论依据。

1 仪器与试剂

Shimadzu 高效液相色谱仪 (LC—6A 泵, SPD—10A vp 紫外-可见检测器, SCL—6A 系统控制仪, 日本 Shimadzu 公司), N2000 工作站 (浙江大学智能信息工程研究所), LCQ 型液相色谱-质谱联用仪 (美国 Finnigan 公司), AG—245 电子分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司), DL—360 型超声波清洗仪 (浙江象山石浦海天仪器厂); H—26F 型离心机 (Kokusan 公司, 日本); PHS—2C 型数字式酸度计 (上海虹益仪器厂); 粉碎机 (Master 公司, 日本)。姜黄药材 (批号 2010-925) 购于广东药材公司, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为姜黄 *Curcuma longa* L. 的根茎, 姜黄素对照品购自中国药品生物制品检定所, 去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素对照品本实验室自制, 质量分数大于 98%。乙腈 (天津市四友生物医学技术有限公司)、甲醇 (山东禹王实业有限公司禹城化工厂) 为色谱纯, 自制重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 HPLC 测定条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈 (1:1); 检测波长: 425 nm; 柱温 5 °C; 体积流量 1.2 mL/min; 检测灵敏度 0.02 AUFS。

2.1.2 LC-MS 测定条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 检测波长 425 nm; 柱温: 室温; 体积流量 0.5 mL/min; 流动相为乙腈-1%醋酸水溶液 (70:30)。离子源为 ESI 源; 正离子检测方式; 离子源喷射电压: 4.5 kV; 毛细管温度: 200 °C; 毛细管电压: 13 V; 鞘气体积流量: 70 a.u.; 辅助气体积流量 10 a.u.; 检测方式为二级全扫描方式。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取姜黄粉末 0.1 g (过 500 μm 筛), 加甲醇 20 mL, 42 kHz 超声 15 min, 离心 10 min (3 500 r/min), 吸取上清液。药渣加甲醇 20 mL, 同法提取。药渣以少量甲醇洗涤, 洗液与上清液合并, 加甲醇定容至 50 mL 棕色量瓶

中, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得续滤液, 即为药材供试液, 避光保存。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取姜黄素对照品 2.0 mg, 去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素对照品各 1.0 mg, 于 20 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解、定容, 摇匀得储备液。精密吸取储备液 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mL 至 10 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液即为各对照品混合溶液, 避光保存。

2.2.3 LC-MS 供试品溶液制备 精密称取双去甲氧基姜黄素对照品 1.0 mg, 于 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解, 定容、摇匀, 配制成 0.02 mg/mL 溶液, 在自然光/避光条件下室温放置 1 h, 即为双去甲氧基姜黄素见光/避光供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 色谱系统适用性试验 理论塔板数按姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素峰计算均为 10 000 以上, 3 种成分之间分离度大于 1.5, 色谱图见图 1。

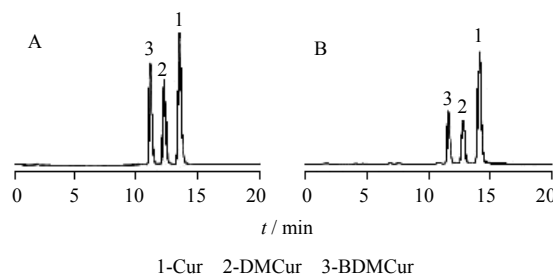


图1 姜黄素对照品 (A) 和姜黄供试品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of Curcuma reference substance (A) and rhizomes of *C. longa* (B)

2.3.2 标准曲线绘制 精密吸取各质量浓度对照品混合溶液 10 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 重复测定 3 次, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。姜黄素 $Y=3.919 \times 10^7 X - 1.614 \times 10^4$, $r=0.9999$, 线性范围 4.80~76.80 mg/L; 去甲氧基姜黄素 $Y=4.139 \times 10^7 X - 3.949 \times 10^3$, $r=0.9998$, 线性范围 2.58~41.20 mg/L; 双去甲氧基姜黄素 $Y=4.251 \times 10^7 X - 7.129 \times 10^3$, $r=0.9998$, 线性范围 2.63~42.00 mg/L。结果表明, 各指标成分在相应的浓度范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密吸取对照品混合储备液 10 μL, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 重复测定 5 次, 姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素峰面积的 RSD 分别为 0.3%、0.5%、0.8%。

2.3.4 稳定性试验 取姜黄素、去甲氧基姜黄素、

双去甲氧基姜黄素对照品溶液适量，分别于棕色量瓶中避光保存，于 0、1、2、4、6、8 h 按照“2.1.1”项色谱条件进样分析，重复测定 3 次，其峰面积值 RSD 在 0.7%~2.0%。结果表明，于棕色量瓶中避光保存的对照品溶液在 8 h 内均有良好的稳定性。

2.3.5 重复性试验 取姜黄粉末，精密称取 5 份，按“2.2.1”项下配制供试品溶液，各精密吸取 10 μL，按“2.1.1”项下色谱条件分别进样分析，每份重复测定 3 次，姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素峰面积的 RSD 分别为 1.4%、2.0%、2.6%。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已测定的姜黄粉末 0.05 g (过 500 μm 筛)，共 6 份，精密加入适量混合对照品溶液，按“2.2.1”项下配制供试液，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，3 个指标成分平均回收率分别为 97.1%、97.0%、96.9%，RSD 值分别为 1.5%、2.4%、11.7%。

2.4 光稳定性实验

2.4.1 姜黄素类成分光稳定性实验 取姜黄供试品溶液各 2 份，置于棕色量瓶中，分别在自然光和避光条件下放置，于 0、1、2、4、6、8 h 时取样，按“2.1.1”项色谱条件进样分析，测定样品中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素质量分数，结果见图 2。在见光条件下，姜黄甲醇提取液保存 8 h 后，其中姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素的量别为 98.4%、98.1%和 85.4%，而避光条件下，则分别为 98.9%、98.5%和 98.4%。本研究表明，在自然光照射条件下，姜黄素、去甲氧基姜黄素在甲醇溶液中具有良好的稳定性，而双去甲氧基姜黄素在 1 h 后质量分数明显降低。而避光条件下，姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素均有良好的稳定性，可进行定量分析，因此，

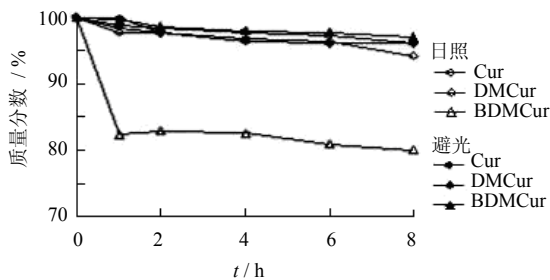


图 2 姜黄甲醇提取液中姜黄素类成分的光稳定性
Fig. 2 Photostability of curcuminoids in rhizomes of *C. longa*

姜黄素类成分和姜黄药材分析供试品溶液应于棕色量瓶中避光保存。

2.4.2 双去甲氧基姜黄素光化学反应产物考察 取双去甲氧基姜黄素见光/避光供试液 20 μL，按“2.1.2”项色谱条件进行 LC-MS 分析，所得 HPLC-ESI-MS 谱图见图 3。由图 3 可见，双去甲氧基姜黄素及其光解产物的保留时间分别为 10.7 min 和 11.1 min，二者均产生了 m/z 309 的 $[M+H]^+$ 峰，提示双去甲氧基姜黄素及其光化学反应产物的相对分子质量一致。

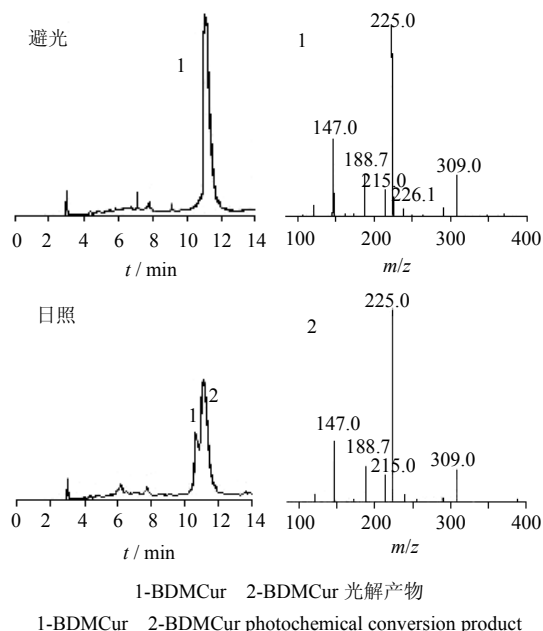


图 3 双去甲氧基姜黄素及其光解产物 HPLC-ESI-MS 图谱
Fig. 3 HPLC-ESI/MS spectra of BDMCur and its photochemical conversion products

3 讨论

本研究结果证明，姜黄素、去甲氧基姜黄素甲醇在甲醇溶液于自然光照射和避光 8 h 条件下，稳定性均良好，而双去甲氧基姜黄素在自然光照射条件下不稳定，见光 1 h 后出现分解，但继续光照分解峰的峰面积不再增加。在避光条件下 8 h 内，双去甲氧基姜黄素也具有稳定性。同时，采用液-质联用法测定了光分解样品，结果显示，双去甲氧基姜黄素及其光解产物具有相同的 $[M+H]^+$ 离子峰，由此推测双去甲氧基姜黄素在一定时间的自然光照射下，吸收能量，引起电子转移，部分分子在溶液中由酮式结构转变为具有一定稳定性的六元环烯醇结构，而非发生了光降解反应。此结果对于含姜黄类成分药材的存储和提取工艺优化具有重要的意义，对于完善药材的质量控制提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] 王 琰, 王慕邹. 姜黄属常用中药研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2001, 36(2): 81-84.
- [2] Kawamori T, Lubet R, Steele V E, *et al.* Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion / progression stages of colon cancer [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(3): 597-601.
- [3] Ammon H, Wahl M. Pharmacology of *Curcuma longa* [J]. *Planta Med*, 1991, 57(1): 1-7.
- [4] 贾淑杰, 刘庆焕, 王文彤, 等. 姜黄素、去甲氧基姜黄素和二去甲氧基姜黄素对照品的制备及姜黄素细胞毒性初步研究 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1118-1121.
- [5] Deters M, Siegers C, Muhl P, *et al.* Choleretic effects of curcuminoids on an acute cyclosporine-induced cholestasis in the rat [J]. *Planta Med*, 1999, 65(7): 610-613.
- [6] 李剑明, 杨和平, 刘松青. 3种姜黄色素单体抑制人内皮细胞作用的实验研究 [J]. 重庆医学, 2002, 31(9): 804-805.
- [7] 洪行球, 黄燕芬, 陈敏敏, 等. 二脱甲氧基姜黄素的降血脂和抗脂质过氧化作用 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 121-124.