

一测多评法测定姜黄中姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素

李文兵^{1,2}, 卢君蓉³, 胡麟³, 胡昌江^{2,3*}, 黄宇^{1,2}, 周维^{1,2}, 冯健^{1,2}

1. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 四川 成都 611900

2. 国家中医药管理局“中药配方颗粒质量与疗效评价”重点研究室, 四川 成都 611900

3. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要: 目的 建立姜黄一测多评测定方法, 同时测定其中3种姜黄素类成分, 并进行方法学考察。方法 采用高效液相色谱法, Chromstar™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-4%冰醋酸溶液 (48:52), 检测波长为 422 nm, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃; 以姜黄素为参照物, 建立其与去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素相对校正因子, 分别以外标法和一测多评法计算3种姜黄素类成分质量分数。结果 该方法可同时测定姜黄中3种姜黄素类成分, 且测定结果与外标法相比无显著性差异 (RSD<2.0%)。结论 本法简便、可行、重复性好, 可为进一步完善姜黄的质量标准提供参考。

关键词: 一测多评; 姜黄; 相对校正因子; 姜黄素; 去甲氧基姜黄素; 双去甲氧基姜黄素

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)03-0573-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.03.024

Determination of curcumin, desmethoxycurumin, and bisdesmethoxycurum in *Curcuma longa* by QAMS

LI Wen-bing^{1,2}, LU Jun-rong³, HU Lin³, HU Chang-jiang^{2,3}, HUANG Yu^{1,2}, ZHOU Wei^{1,2}, FENG Jian^{1,2}

1. Neo-Green Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu 611900, China

2. Key Laboratory of Chinese medicine formulations particle mass and Clinical Evaluation, Chengdu 611900, China

3. Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To establish a quality evaluation method for *Curcuma longa*, quantitative of multi-component with a single-marker (QAMS), to determine the contents of three curcuminoids at the same time. **Methods** An HPLC method was used, and a Chromstar™ C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was methanol-4% glacial acetic acid (48:52) at a flow of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 422 nm and column temperature was 30 ℃. Curcumin was used as the internal reference substance. The relative correlation factors of curcumin, desmethoxycurumin, and bisdesmethoxycurumin to curcumin were calculated and evaluated by standard curve method and QAMS. **Results** The QAMS method could be used to determine the contents of three curcuminoids at the same time, and with no significant difference between the results of standard curve method (RSD < 2.0%). **Conclusion** QAMS method is simple, feasible, and reproducible, which could provide a reference for further research on completing the quality control of raw material and processed *C. longa*.

Key words: QAMS; *Curcuma longa* L.; relative correlation factors; curcumin; desmethoxycurumin; bisdesmethoxycurum

姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎, 始载于唐《新修本草》, 具有破血行气、通经止痛之功效, 为治疗气滞血瘀之癥瘕、积聚、肩臂疼痛的良药^[1]。现代研究表明, 姜黄具有抗肿瘤^[2-3]、抗炎^[4]、调血脂^[5]、抗纤维化^[6]等多种药理作用, 其

主要活性成分为姜黄素及其衍生物^[7]。目前, 姜黄药材及饮片质量标准还不够完善, 《中国药典》2015年版对姜黄药材及饮片质量控制仅以姜黄素量作为指标, 难以全面反映和控制姜黄的质量。近年来, 虽有采用 HPLC 同时测定姜黄中3种姜黄素类成分

收稿日期: 2016-08-13

基金项目: 四川省科技支撑计划 (2014SZ0075, 2015SZ0031)

作者简介: 李文兵 (1988—), 男, 博士, 工程师, 研究方向为中药配方颗粒质量评价。Tel: 13540876731 E-mail: 285892232@qq.com

*通信作者 胡昌江 (1952—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药炮制原理及饮片质量标准。Tel: 13980980796 E-mail: hhccjj@hotmail.com

量的文献报道^[8-9],但需要多种对照品,不仅增加了实验成本,还限制了其在实际工作中的应用。

本研究以姜黄素为参照物,建立姜黄药材一测多评方法,可同时测定姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的量。该方法简便、重复性好,且节约了成本,可为其质量标准的修订提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司), Waters 2695 高效液相色谱仪(美国沃特世科技有限公司), Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司), ME204E 型电子天平(德国 Mettler Toledo), 1810A 摩尔原子型超纯水器(上海摩勒科学仪器有限公司), 超声波清洗器 KQ5200DB(昆山市超声仪器有限公司)。

姜黄素(批号 110823-201004, 质量分数为 98.8%) 购于中国食品药品检定研究院; 去甲氧基姜黄素(批号 141021-20, 质量分数 99.8%)、双去甲氧基姜黄素(批号 140911-10, 质量分数 99.8%) 购于美国 Stanford Chemicals 公司。乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。样品从四川沐川、犍为、双流、崇州、铁炉, 广西桂林、百色, 广东, 云南, 福建收集, 经成都中医药大学胡昌江教授鉴定为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎。

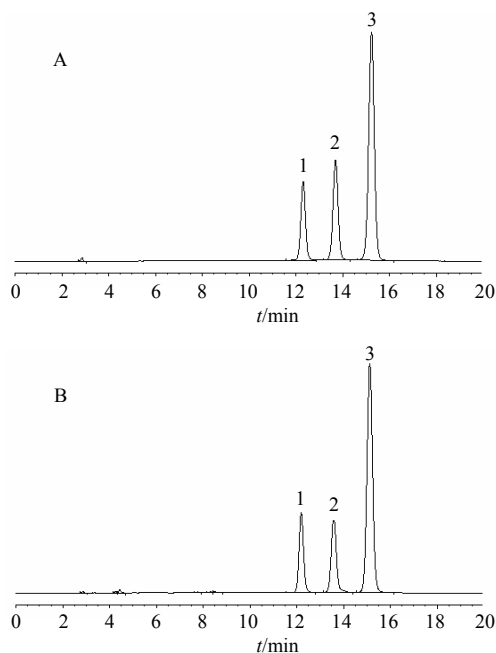
2 方法与结果

2.1 色谱条件

Chromstar™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-4%冰醋酸溶液(48:52); 检测波长为 422 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃。在选定条件下, 各色谱峰与样品中其他组分色谱峰达基线分离, 其理论塔板数均大于 5 000, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

取姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素对照品适量, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶内, 用色谱甲醇溶解并稀释至刻度, 得混合对照品储备液, 质量浓度分别为 98.88、44.40、25.92 μg/mL。精密量取上述储备液 0.3、0.6、1.2、2.5、5.0 mL, 分别



1-双去甲氧基姜黄素 2-去甲氧基姜黄素 3-姜黄素
1-bisdesmethoxycurum 2-desmethoxycurumin 3-curcumin

图 1 混合对照品溶液 (A) 和样品 (B) HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of reference substance (A) and samples (B)

用色谱甲醇稀释至 5 mL, 得系列混合对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取姜黄粉末约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2”项混合对照品溶液, 进样 10 μL, 测定各色谱峰峰面积。以对照品进样量为横坐标(X), 色谱峰峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程。结果表明姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素在 61.8~988.8 ng、27.8~444.0 ng、16.2~259.2 ng 内线性关系良好, 见表 1。

表 1 3 种姜黄素类成分的线性范围考察

Table 1 Linear ranges survey of contents of three curcuminoids

化合物名称	回归方程	线性范围/ng	r
姜黄素	$Y=9\,159.46 X-19.16$	61.8~988.8	0.999 9
去甲氧基姜黄素	$Y=8\,154.79 X-15.07$	27.8~444.0	0.999 9
双去甲氧基姜黄素	$Y=9\,867.85 X-9.27$	16.2~259.2	0.999 9

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2”项混合对照品溶液 10 μL ，重复进样 6 次，测定姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素峰面积，其 RSD 分别为 0.76%、0.83%、0.52%，表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一批样品（四川沐川）6 份，分别按“2.3”项方法制备，进样 10 μL ，测定峰面积，计算。姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素质量分数 RSD 分别为 1.02%、0.76%、1.13%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别于 0、1、2、4、8、16、24 h 进样 10 μL ，测定峰面积，计算。姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素 RSD 分别为 1.01%、1.76%、1.45%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取 6 份已测定的样品（四川沐川）0.10 g，精密称定，分别加入混合对照品溶液 1 mL（姜黄素 3.002 mg/mL、去甲氧基姜黄素 2.252 mg/mL、双去甲氧基姜黄素 1.204 mg/mL）。按供试品溶液的制备方法制备，进样 10 μL ，测定峰面积，计算回收率，结果表明姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素平均加样回收率分别为 98.10%、98.57%、97.72%，RSD 分别为 1.32%、1.67%、1.24%，说明该方法准确度高。

3 相对校正因子测定及耐用性考察

3.1 相对校正因子及相对保留时间测定

以姜黄素（c）为参照物，计算各待测成分去甲氧基姜黄素（d）和双去甲氧基姜黄素（b）相对校正因子 $f_{d/c}$ 、 $f_{b/c}$ ，相对保留时间 $T_{d/c}$ 、 $T_{b/c}$ ，结果见表 2。

3.2 不同仪器对相对校正因子的影响

考察了 Agilent 1200、Shimadzu LC-20A、Waters

表 2 相对校正因子及相对保留时间测定结果

Table 2 Results of relative correction factor and relative retention time

编号	相对校正因子		相对保留时间	
	$f_{d/c}$	$f_{b/c}$	$T_{d/c}$	$T_{b/c}$
1	1.131	0.938	0.903	0.817
2	1.142	0.944	0.904	0.817
3	1.139	0.937	0.904	0.817
4	1.130	0.930	0.904	0.818
5	1.125	0.930	0.904	0.818
平均值	1.133	0.936	0.904	0.817
RSD/%	0.610	0.630	0.050	0.070

2695 3 种型号高效液相色谱仪对相对校正因子的影响，结果 $f_{d/c}$ 、 $f_{b/c}$ 的 RSD 分别为 0.18% 和 0.33%，表明不同仪器设备对相对校正因子影响不大，见表 3。

3.3 不同色谱柱对相对校正因子影响

在同一台检测设备上（Agilent 1200），考察 ChromstarTM、Phenomenex、Diamonsil 3 种型号 C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm ），结果 $f_{d/c}$ 、 $f_{b/c}$ 的 RSD 分别为 0.76% 和 0.39%，说明不同型号色谱柱对相对校正因子无明显影响，见表 4。

表 3 不同仪器对相对校正因子的影响 ($n=3$)

Table 3 Influence of different instruments on relative correction factor ($n=3$)

仪器型号	相对校正因子	
	$f_{d/c}$	$f_{b/c}$
Agilent 1200	1.127	0.925
Shimadzu LC-20A	1.131	0.927
Waters 2695	1.129	0.931
RSD/%	0.180	0.330

表 4 不同色谱柱对相对校正因子的影响 ($n=3$)

Table 4 Influence of different chromatographic columns on relative correction factor ($n=3$)

色谱柱型号	相对校正因子	
	$f_{d/c}$	$f_{b/c}$
Chromstar TM	1.125	0.934
Phenomenex	1.131	0.929
Diamonsil	1.142	0.927
RSD/%	0.760	0.390

3.4 不同柱温对相对校正因子的影响

在同一色谱条件下，考察了 25、30、35 $^{\circ}\text{C}$ 3 个柱温对相对校正因子的影响，结果 $f_{d/c}$ 、 $f_{b/c}$ 的 RSD 分别为 0.27% 和 0.22%，表明柱温的变化对相对校正因子影响不大，见表 5。

3.5 不同波长对相对校正因子的影响

在同一色谱条件下，考察了 420、422、424 nm 3 个波长对相对校正因子的影响，结果 $f_{d/c}$ 、 $f_{b/c}$ 的 RSD 分别为 0.84% 和 0.54%，表明测定波长在 ± 2 nm 范围内变化对相对校正因子影响不大，见表 6。

表 5 不同柱温对相对校正因子的影响 ($n=3$)

Table 5 Influence of different column temperature on relative correction factors ($n=3$)

柱温/ $^{\circ}\text{C}$	相对校正因子	
	$f_{d/c}$	$f_{b/c}$
25	1.129	0.918
30	1.126	0.920
35	1.123	0.916
RSD/%	0.270	0.220

表 6 不同波长对相对校正因子的影响 ($n = 3$)Table 6 Influence of different wavelengths on relative correction factors ($n = 3$)

检测波长/nm	相对校正因子	
	$f_{d/c}$	$f_{b/c}$
420	1.117	0.924
422	1.127	0.929
424	1.136	0.934
RSD/%	0.840	0.540

3.6 不同体积流量对相对校正因子的影响

在同一色谱条件下,考察了 0.95、1.00、1.05 mL/min 3 个体积流量对相对校正因子的影响,结果 $f_{d/c}$ 、 $f_{b/c}$ 的 RSD 分别为 0.05% 和 0.13%,表明在同一台色谱仪上体积流量的变化对相对校正因子影响不大,见表 7。

表 7 不同体积流量对相对校正因子的影响 ($n = 3$)Table 7 Influence of different flow rates on relative correction factors ($n = 3$)

体积流量/(mL·min ⁻¹)	相对校正因子	
	$f_{d/c}$	$f_{b/c}$
0.95	1.126	0.920
1.00	1.126	0.920
1.05	1.127	0.922
RSD/%	0.050	0.130

3.7 样品测定

取不同产地的姜黄药材,用本实验所确定的方法进行样品处理和成分定量测定,并分别采用一测多评法和外标法计算质量分数,结果见表 8。

由表 8 结果可知,不同产地姜黄药材中姜黄素、去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素的量分别在

表 8 不同产地姜黄测定结果 ($n = 3$)Table 8 Determination results of contents of three curcuminoids in *C. Longae Rhizoma* from different habitats ($n = 3$)

编号	产地	姜黄素/(mg·g ⁻¹)	去甲氧基姜黄素/(mg·g ⁻¹)		双去甲氧基姜黄素/(mg·g ⁻¹)	
			一测多评法	外标法	一测多评法	外标法
1	四川沐川	31.699	23.422	23.416	12.875	12.869
2	四川犍为	21.367	6.768	6.749	4.154	4.142
3	四川双流	15.291	4.865	4.837	3.764	3.752
4	四川崇州	17.537	5.087	5.061	4.132	4.128
5	四川铁炉	9.464	3.516	3.532	2.332	2.338
6	广西桂林	8.705	4.693	4.738	3.852	3.878
7	广西百色	11.170	4.052	4.027	2.751	2.741
8	广东	3.170	2.364	2.342	1.295	1.287
9	云南	1.120	1.592	1.631	0.115	0.103
10	福建	14.911	5.229	5.192	3.829	3.812

1.120~31.699 mg/g、1.592~23.422 mg/g、0.115~12.875 mg/g,不同产地间质量分数差异较大,其中四川沐川、犍为、双流、崇州等产地质量最佳。与外标法测定结果相比,一测多评法测得去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素质量分数无显著性差别,说明该方法测定结果具有较高可信度。

4 讨论

一测多评法是根据化学成分在一定线性范围,其质量和检测器响应值成正比的原理,通过测定药物中一种成分量,并依据成分间内在函数和比例关系推算其他多种待测成分量的一种质量控制方法^[10]。该方法具有分析成本低、效率高等优点。国内最早由王智民教授提出^[11],并运用于中药木通中皂苷类成分测定,近年来广泛的运用于单味中药及复方中多指标成分的测定^[12-16]。本

实验建立了姜黄药材及饮片一测多评测定方法,并进行了该方法的耐用性、系统适应性考察,结果表明,该方法测定结果与外标法一致,可作为该品种质量标准的修订提供参考。

实验过程中,采用二级阵列检测器(DAD 检测器),对姜黄混合对照品进行了全波长扫描(190~800 nm),结果各对照品在 422 nm 处均有最大吸收,故选择 422 nm 为检测波长,与《中国药典》2015 年版姜黄项下测定方法 430 nm 略有区别。

参考文献

- [1] 中国药典. [S]. 一部. 2015.
- [2] 陈茜, 陈丽娟, 党媛媛, 等. 姜黄素对人子宫内膜癌细胞 HEC-1-B 侵袭转移的影响 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2016, 37(1): 134-138.
- [3] Chen J, Wang F L, Chen W D. Modulation of apoptosis

- related cell signaling pathways by curcumin as a strategy to inhibit tumor progression [J]. *Mol Bio Rep*, 2014, 41(7): 4583-4594.
- [4] Bengmark S. Curcumin an atoxic antioxidant and natural NF-kappa B, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases [J]. *JPENJ Parenter Enteral Nutr*, 2006, 30(1): 45-51.
- [5] Rukkumani R, Sri-Balasubashini M, Vishwanathan P, *et al*. Comparative effects of eucumin and photo-irradiated curcumin on alcohol and polyunsaturated fatty acid induced hyperlipidemia [J]. *Pharmacol Res*, 2002, 46(3): 257-264.
- [6] 郑旭锐, 樊英华. 姜黄素对肝星状细胞 JAK2-STAT3 信号通路的影响 [J]. *陕西中医*, 2013, 34(9): 1255-1257.
- [7] 韩刚, 崔静静, 毕瑞, 等. 姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素稳定性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(22): 2611-2613.
- [8] 彭炳先, 周欣, 王道平, 等. HPLC 法测定姜黄、莪术、郁金中三种姜黄色素的含量 [J]. *中药材*, 2004, 27(11): 813-815.
- [9] 李明, 周欣, 赵超, 等. HPLC 同时测定姜黄中 3 种姜黄色素的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(11): 1810-1814.
- [10] 朱春胜, 林志健, 牛红娟, 等. 一测多评法测定菊苣中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的量 [J]. *中草药*, 2016, 47(4): 666-670.
- [11] 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): 1925-1928.
- [12] 吴珊珊, 胡昌江, 吕非非, 等. 一测多评法测定黄柏中 5 种生物碱 [J]. *中成药*, 2014, 36(1): 130-134.
- [13] 宋丽萍. 一测多评法测定茵陈中 4 种酚酸类成分含量 [J]. *中药材*, 2015, 38(4): 774-776.
- [14] 陈建维, 刘圆, 刘晟楠, 等. 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1374-1377.
- [15] 石伟, 王振中, 倪付勇, 等. 一测多评法在六味地黄软胶囊质量评价中的应用 [J]. *中草药*, 2015, 46(19): 2880-2886.
- [16] 符映均, 胡浩彬. 一测多评法测定倍力舒合剂中 4 种三萜酸的含量 [J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(3): 277-279.