

高效液相色谱法测定广西壮药毛郁金中姜黄素的含量^{*}

Determination of Curcumin in Rhizome of *Curcuma aromatica* by HPLC

梁冰¹, 覃兰芳¹, 赖茂祥^{1,2,*}, 刘布鸣^{1,2}, 刘华钢³, 赖克道¹

LIANG Bing¹, QIN Lan-fang¹, LAI Mao-xiang^{1,2,*}, LIU Bu-ming^{1,2}, LIU Hua-gang³, LAI Ke-dao¹

(1. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022; 3. 广西医科大学, 广西南宁 530021)

(1. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China; 3. Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要: 采用 Ultimate(XB-C₁₈) 色谱柱, 以乙腈-4% 冰乙酸(48:52) 为流动相, 流速 1.0 ml/min, 检测波长 430nm, 柱温为室温, 建立高效液相色谱法(HPLC) 测定广西壮药材毛郁金中姜黄素含量的方法。结果表明, 姜黄素在 0.00992~0.08928 μg 范围内的峰面积与其浓度呈良好线性关系($r=0.9995$), 平均回收率为 101.28%, RSD 为 1.67% ($n=6$)。本方法准确, 快速, 重现性好, 可以作为广西壮药材毛郁金的含量测定方法。

关键词: 含量测定 姜黄素 毛郁金 HPLC

中图分类号: O657.7⁺2, R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2012)02-0149-03

Abstract: A HPLC method was established to determine Curcumin in rhizome of *Curcuma aromatica*. Ultimate XB-C₁₈ column was used as chromatographic column. The mobile phase was acetonitrile-4% acetic acid solution (48:52). The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 430nm. The column temperature was maintained at room temperature. The calibration curve of Curcumin was in good linearity over the range of 0.00992~0.08928 (μg). The average recovery was 101.28%, with RSD of 1.67% ($n=6$). This method is convenient, sensitive, reliable and suitable for determination of Curcumin in rhizome of *Curcuma aromatica*.

Key words: content determination, curcumin, *Curcuma aromatica*, HPLC

壮族是我国人口最多的少数民族, 壮药是我国中医药的重要组成部分, 具有悠久的历史和丰富的内涵。毛郁金是壮族常用药物之一, 收载于《广西壮族壮族自治区壮药质量标准》第2卷。毛郁金来源于姜科植物毛郁金的干燥根茎。毛郁金植物主要分布于广西横县、灵山、南宁等地, 其根入药具有行气解郁, 凉血破瘀和利胆作用, 用于治疗胸闷胁痛, 胃腹胀痛, 黄

疸, 吐血, 尿血, 月经不调, 癫痫等病症^[1,2]。近年来的研究表明毛郁金还具有镇痛、止血^[3]、抗炎^[4]及免疫抑制^[5]等作用。目前有关壮药材毛郁金的化学成分和姜黄素的测定方法还未见有报道。我们在研究中发现毛郁金中含有姜黄素, 本文采用 HPLC 法测定其含量, 并进行了方法学研究, 建立了一种 HPLC 法测定毛郁金中姜黄素含量的方法。该方法简便、快捷、准确, 重现性好, 可以用于考察研究毛郁金药材及其同属其它中药质量。

1 实验仪器与试剂

主要仪器是日本岛津 10A 高效液相色谱仪(LC 10AT VP 泵, SPD-10AVP 检测器)。试剂姜黄素对照品(批号: 110823-201004) 供含量测定用, 由中国药品

收稿日期: 2012-02-07

作者简介: 梁冰(1981-), 女, 实习研究员, 主要从事中药质量标准研究。

* 广西创新能力建设项目(编号: 11-114-14D), 广西壮药质量标准研究项目(编号: MZY20100042), 广西自然科学基金项目(2010GXNSFD013044)资助。

** 通讯作者。

生物制品检定所提供;毛郁金药材分别采自广西境内不同产地,经广西中医药研究院赖茂祥研究员鉴定为姜科植物毛郁金(*Curcuma aromatica* Salisb.) 的干燥根茎,植物标本存于广西中医药研究院标本馆;乙腈(美国天地牌,色谱纯) ,水为纯净水,其余试剂为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Ultimate 柱(XB-C₁₈, 4. 6×250mm, 5μm) , 流动相: 乙腈-4% 冰醋酸(48 : 52) , 流速 1. 0 ml/min, 检测波长 430nm, 柱温为室温。理论塔板数以姜黄素峰计应不低于 5000。在上述条件下,姜黄素对照品与毛郁金药材供试品溶液的色谱图分别如图 1 和图 2 所示。

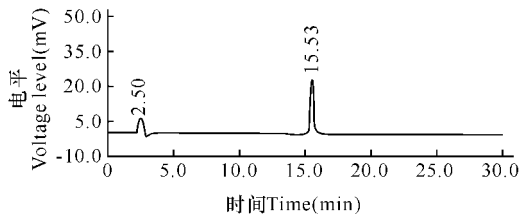


图 1 姜黄素对照品的 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of curcumin

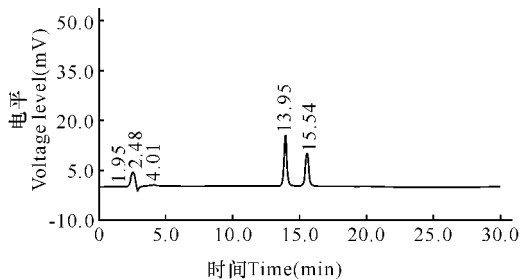


图 2 毛郁金药材供试品溶液 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of *Curcuma aromatica*

2.2 对照品溶液的制备

取姜黄素对照品约 12 mg 精密称定(准确值为 12.4 mg) , 置入 10 ml 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为姜黄素对照品储备液 A; 精密吸取 1 ml 姜黄素对照品储备液 A, 置入 10 ml 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为姜黄素对照品溶液储备液 B; 精密吸取 1ml 姜黄素对照品储备液 B, 置 25 ml 棕色量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,配制成浓度为 4. 96 μg/ml 的姜黄素对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取毛郁金药材粉末(过 2 号筛) 约 0. 5g,精密称定,置入具塞三角瓶中,精密加入甲醇 10ml,称定重量,先冷浸 30min,再超声处理 30min,静置,放冷至室温,再称定重量,用甲醇补足缺失的重量,上清液用

0. 45μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得毛郁金药材供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取上述姜黄素对照品储备液 B,制成浓度分别为 0. 992μg/ml、2. 976μg/ml、4. 96μg/ml、6. 944μg/ml、8. 928μg/ml 的对照品溶液,进样 10μl 测定姜黄素峰面积,以浓度(C) 为横坐标,以对照品峰面积(A) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $A = 3. 29 \times 10^4 + 8. 31 \times 10^6 C$, $r = 0. 9995$,说明对照品溶液进样浓度在 0. 992 ~ 8. 928(μg/ml) 范围内,进样浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度、稳定性和重复性试验

取上述对照品溶液(4. 96μg /ml) 10μl,按 2. 1 项色谱条件,连续进样 6 次,分析测定姜黄素峰面积,其 RSD 为 0. 62 % (n = 6) ,说明仪器精密度良好。取同一份供试品溶液,于制备后 0、1h、2h、4h、6h、8h 注入高效液相色谱仪,进样 10μl,测定姜黄素的峰面积,其峰面积的 RSD = 1. 05 % (n = 6) ,说明供试品溶液在 8 h 内保持稳定。取同一批号毛郁金药材(批号: 10120602) 样品细粉 6 份,精密称定,分别按 2. 3 项下供试品溶液的制备方法制备得供试品溶液后,在 2. 1 项色谱条件下分别进行测定,并计算姜黄素的含量,其 RSD 为 1. 46 % , (n = 6) ,说明方法的重复性比较好。

2.6 加样回收率试验和样品测定

精密称取毛郁金药材细粉(批号: 10120602; 已知含姜黄素 0. 0118%) 6 份,每份约 0. 25g,置入具塞三角瓶中,分别加入姜黄素对照品 49. 6μg,再分别加入 10ml 甲醇做溶剂,称定重量,先冷浸 30min 再超声 30min 后,静置,放冷却至室温,再称定重量,用甲醇补足缺失的重量,用 0. 45μm 微孔滤膜小心吸取上清液,滤过,取续滤液为供试品溶液,各进样 10μl,测定,按测得姜黄素峰面积值计算含量,计算回收率为 99. 80% ~ 103. 63% , RSD = 1. 6% (n = 6) ,详见表 1。加样回收率试验结果表明,加样回收效果良好,可以满足测定要求。

表 1 加样回收率试验结果(n=6)

Table 1 Recovery of sample(n=6)

序号 No.	样品含量 Sample contents (g)	加入量 Addition amount (mg)	测得量 Observa- tion(mg)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
1	0. 0300	0. 0496	0. 0814	103. 63	101. 28	1. 61
2	0. 0298	0. 0496	0. 0809	103. 02		
3	0. 0297	0. 0496	0. 0795	100. 40		
4	0. 0296	0. 0496	0. 0792	100. 00		
5	0. 0297	0. 0496	0. 0797	100. 81		
6	0. 0296	0. 0496	0. 0791	99. 80		

取不同批号的 6 批样品, 每批 2 份, 精密称定, 制备供试品溶液。精密吸取供试溶液 10 μ l, 按 2.1 项色谱条件测定的结果(表 2) 比较理想。

表 2 样品中的姜黄素测定结果 (n=2)

Table 2 Content of Curcumin samples (n=2)

产地 Growing areas	姜黄素含量 Content of curcumin(%)		平均含量 Average content (%)
	1	2	
横县那阳 Hengxian Nayang	0.024	0.024	0.024
横县莲塘 Hengxian Liantang	0.017	0.018	0.018
横县校椅 Hengxian Xiaoyi	0.017	0.017	0.017
灵山陆屋 Lingshan Luwu	0.024	0.024	0.024
灵山沙坪 Lingshan Shaping	0.017	0.017	0.017
南宁西郊 Nanning Xijiao	0.016	0.017	0.017

3 结论

参照中国药典中有关检测姜黄素的项目, 本实验采用 430nm 为检测波长, 以乙腈 : 4% 冰醋酸(48 : 52) 为流动相, 样品中姜黄素与其他杂质峰完全分

离, 并能在 20min 内出峰完毕, 达到分析要求。

本文以甲醇作为提取溶剂, 用先冷浸 30min 再超声 30min 作为提取方法, 建立高效液相色谱法测定广西壮药毛郁金中姜黄素含量, 结果准确, 重复性良好, 对广西壮药毛郁金的质量控制有实际的应用意义, 可以为进一步制定毛郁金的质量标准提供科学的依据。

参考文献:

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局编. 广西壮族自治区壮药质量标准 [M]. 第 2 卷. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [3] 黄勇其, 莫艳珠, 耿晓照, 等. 黔产毛郁金的镇痛、止血作用实验研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(4) : 48.
- [4] 郭晓应, 陈敏珠, 徐叔云. 郁金对大鼠抗炎作用 [M]. 药学报, 1982, 17(6) : 1.
- [5] 李凌夫, 贾宽, 杨宝华, 等. 郁金 1 号注射液对正常小鼠免疫功能的影响 [J]. 中医药学报, 1987, 27(2) : 39.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 148 页 Continue from page 148)

续表 2

Continued table 2

序号 No.	化合物 Compound	时间 (min)	分子式 Mole- cular formula	分子量 Mole- cular weight	相对百分含量 Relative content (%)	匹配度 Matching degree (%)
10	油酸 Oleic acid	25.21	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	2.16	95
11	叶绿醇 Phytol	25.39	C ₂₀ H ₄₀ O	296	7.70	91
12	硬脂酸 Stearic acid	25.79	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	3.13	99
13	二十酸 Eicosanoic acid	32.58	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312	1.26	99
14	10,11-(4',5'-二甲苯基并 [3,2] 二聚二甲苯-10,11-(4',5'-dimethylbenzo [3,2] paracyclophane	34.36	C ₂₃ H ₂₂	298	1.00	90
15	二十一碳酸 Heneicosanoic acid	35.75	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326	1.20	97
16	二十二碳酸 Docosanoic acid	38.25	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340	1.00	99
17	邻苯二甲酸单乙基己酯 Phthalic acid mono-2-ethylhexyl ester	38.62	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278	4.23	91
18	二十三碳酸 Tricosanoic acid	40.37	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354	1.00	99
19	木质素酸 Lignoceric acid	42.23	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368	1.00	98

3 结论

本研究对广西特色药材尖尾枫石油醚部位脂溶性成份进行化学成分分析, 检出的 29 个化合物均为首次在该植物中鉴定出。由于石油醚部位前流份主要成分为脂肪、脂肪酸类, 故进行甲酯化利于脂肪酸类成分的 GC-MS 分析鉴定。纯石油醚洗脱分离得到的流份样品 A 鉴定出 11 个化合物, 占总量的 76.18%, 主要为烯烃类, 占 68.49%; 石油醚-乙酸乙酯混合溶剂洗脱分离得到的流份样品 B 鉴定出 19 个化合物, 占总量的 83.27%, 主要为脂肪酸、脂肪醇类, 占 50.68%, 其中棕榈酸含量最高, 达到 14%。

参考文献:

- [1] 戴斌, 李钊东. “虎牛钻风”类传统瑶药的调查研究 [J]. 中国民族民间医药杂志, 1998(2) : 28-34.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典: 上册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 875.
- [3] 丛浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2003.

(责任编辑: 邓大玉)