

## 姜黄标准汤剂 UPLC 指纹图谱的建立和 4 种成分定量分析研究

李振雨<sup>1,2</sup>, 刘晓霞<sup>1,2</sup>, 冯涌微<sup>1,2</sup>,  
位翠杰<sup>1,2</sup>, 何民友<sup>1,2</sup>, 邓淙友<sup>1,2</sup>, 陈向东<sup>1,2\*</sup>, 孙冬梅<sup>1,2</sup><sup>1</sup>广东一方制药有限公司; <sup>2</sup>广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244

**摘要:**采用超高效液相色谱法 (ultra-high performance liquid chromatography, UPLC) 建立姜黄标准汤剂指纹图谱并同时测定 4 种有效成分的含量, 为姜黄标准汤剂质量标准的制定提供依据。建立姜黄标准汤剂指纹图谱, 采用质谱分析和对照品比对, 对共有指纹峰进行指认, 借助化学计量学方法对 16 批样品指纹图谱进一步处理和分析。同时, 对姜黄标准汤剂中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和阿魏酸的含量进行测定。结果显示, 姜黄标准汤剂具有 10 个共有峰, 指认出其中 8 个成分; 聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 和主成分分析 (principal component analysis, PCA) 将 16 批样品归为两类, 正交偏最小二乘法-判别式分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 共找到 6 个差异性标志物。含量测定结果显示, 云南大理的姜黄原料制备的标准汤剂姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素及阿魏酸的含量要高于四川宜宾和乐山的样品。该方法准确可靠, 能够为姜黄标准汤剂的质量评价提供参考。

**关键词:**姜黄; 标准汤剂; UPLC 指纹图谱; 化学计量学分析; 含量测定

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)5-0807-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.5.009

## Establishment of UPLC fingerprint and quantitative analysis of four components of Curcumae Longae Rhizoma standard decoction

LI Zhen-yu<sup>1,2</sup>, LIU Xiao-xia<sup>1,2</sup>, FENG Yong-wei<sup>1,2</sup>,  
WEI Cui-jie<sup>1,2</sup>, HE Min-you<sup>1,2</sup>, DENG Cong-you<sup>1,2</sup>, CHEN Xiang-dong<sup>1,2\*</sup>, SUN Dong-mei<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd.; <sup>2</sup>Guangdong Provincial  
Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China

**Abstract:** Ultra high performance liquid chromatography (UPLC) was used to establish the fingerprint of Curcumae Longae Rhizoma standard decoction and determine the contents of four active ingredients simultaneously to provide a basis for the formulation of quality standard. The fingerprints of Curcumae Longae Rhizoma standard decoction were established, and the common fingerprint peaks were identified by mass spectrometry analysis and comparison with reference materials. The fingerprints of 16 batches of samples were further processed and analyzed by chemometrics. At the same time, the contents of curcumin, noroxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and ferulic acid in the standard decoction were determined. Results showed that there were 10 common peaks in the fingerprints and 8 of them were identified. Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) classified 16 batches of samples into two categories, and six differential markers were found by orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The content determination results showed that the content of curcumin, noroxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and ferulic acid in the standard decoction prepared from the raw material of in Dali, Yunnan Province was higher than that of the samples in Yibin and Leshan, Sichuan Province. The method is accurate and reliable, and can provide reference for the quality evaluation of Curcumae Longae Rhizoma standard decoction.

**Key words:** Curcumae Longae Rhizoma; standard decoction; UPLC fingerprint; chemometric analysis; content determination

收稿日期: 2022-10-08

接受日期: 2022-12-20

基金项目: 国家工业和信息化部 2019 年产业技术基础公共服务平台项目 (2019-00902-1-2); 佛山市应急科技攻关专项 (2020001000206)

\* 通信作者 Tel: 86-757-85128602; E-mail: chenxd66@126.com

汤剂经过几千年的用药实践,目前仍为中药临床用药的主要剂型,随着社会的发展和科技的进步,汤剂被赋予新的“内涵”,中药“标准汤剂”也应运而生。中药标准汤剂是参考传统中药汤剂煎煮方式,采用标准化煎药模式制备得到的一种标准物质,可标化中药临床用药,规范中药配方颗粒等新型中药饮片在临床上的使用,为中药配方颗粒、经典名方制剂等产品的研发提供参考<sup>[1,2]</sup>。

姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎,具有破血行气,通经止痛的功效<sup>[3]</sup>,为临床常用的中药。姜黄中的主要化学成分为酚类和萜类,此外,还含有少量的生物碱、黄酮、甾醇类,其具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗糖尿病、保肝、降血脂等作用<sup>[4,5]</sup>。目前姜黄药材主要分布于四川、云南和陕西等地区,四川、云南为姜黄药材的道地产区和主产区,市场供应均以栽培为主,野生资源少,难以形成规模<sup>[6,7]</sup>。目前对姜黄的质量评价多集中在对姜黄素类成分和挥发油的分析测定上<sup>[8-10]</sup>,对其他类型成分的研究较少。

随着现代分析技术的发展,中药质量控制取得了较大的进步,指纹图谱/特征图谱、一测多评、多成分定量、多组分薄层鉴别等质量控制模式的应用使得中药的“整体质量控制”理念越来越清晰<sup>[11,12]</sup>。本次研究通过建立姜黄标准汤剂 UPLC 指纹图谱结合化学计量学分析,寻找差异性质量标志物,并结合多成分定量分析,为姜黄标准汤剂及其相关制剂的鉴别和质量控制提供参考。

## 1 仪器、试剂与试药

### 1.1 仪器

Waters 超高效液相色谱仪 (ACQUITY H-class, 美国沃特世公司); Waters ACQUITY HSS T3 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 百万分之一天平 (XP26, 美国梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 试剂

乙醇、甲醇 (西陇科学股份有限公司) 为分析纯; 液相用磷酸 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 乙腈、甲醇 (默克股份有限公司) 为色谱级; 水为超纯水 (实验室自制)。

### 1.3 试药

对香豆酸 (批号: 151016, 含量: 98.0%, 成都普菲德生物技术有限公司); 香兰素 (批号: 20211016, 含量: 98.0%)、对羟基苯甲醛 (批号: Wkq20220204, 纯度: 98.0%) 对照品购自四川维克奇生物技

术有限公司; 姜黄素 (批号: 110823-201706, 含量: 98.7%)、去甲氧基姜黄素 (批号: 112003-201801, 含量: 98.5%)、双去甲氧基姜黄素 (批号: 112004-201801, 含量: 95.0%)、阿魏酸 (批号: 110773-201915, 含量: 99.4%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 环姜黄素对照品 (批号: CFN95103, 含量: 98.0%, ChemFaces 公司); 本次实验所用 16 批姜黄药材由广东一方制药有限公司采购管理部采收, 产地信息见表 1 所示, 经广东一方制药有限公司主任中药师孙冬梅鉴定为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎, 经广东一方制药有限公司质量中心检定合格。16 批姜黄药材参照 2020 年版《中国药典》“姜黄”饮片项下炮制规定, 制备成 16 批姜黄饮片。

表 1 姜黄药材产地信息

Table 1 Origin information of *Curcuma Longae* Rhizoma

编号 No.	产地 Origin
S1	四川省宜宾市
S2	四川省宜宾市
S3	四川省宜宾市
S4	四川省乐山市
S5	四川省乐山市
S6	四川省乐山市
S7	四川省宜宾市
S8	四川省宜宾市
S9	四川省乐山市
S10	四川省乐山市
S11	云南省大理白族自治州
S12	云南省大理白族自治州
S13	云南省大理白族自治州
S14	云南省大理白族自治州
S15	云南省大理白族自治州
S16	云南省大理白族自治州

## 2 方法与结果

### 2.1 指纹图谱的建立

#### 2.1.1 色谱条件

选择 Waters ACQUITY HSS T3 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 以乙腈-甲醇 (2:1) 为流动相 A, 0.1% 磷酸溶液为流动相 B, 质谱分析时 B 为 0.1% 甲酸溶液; 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 10% → 40% A; 20 ~ 25 min, 40% → 45% A; 25 ~ 45 min, 45% →

53% ;45 ~ 48 min, 53% → 85% A); 流速: 0.25 mL/min; 柱温为 40 °C; 检测波长: 0 ~ 18 min 为 280 nm, 18 ~ 48 min 为 400 nm; 进样量为 2 μL。

### 2.1.2 对照品溶液的制备

取姜黄素对照品、去甲氧基姜黄素对照品、双去甲氧基姜黄素对照品和阿魏酸对照品适量, 加 70% 甲醇制成每 1 mL 含姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素各 20 μg、阿魏酸 30 μg 的混合溶液, 即得。

### 2.1.3 供试品溶液的制备

姜黄饮片标准汤剂的制备参照《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》和《医疗机构中药煎药室管理规范》, 经水提、减压浓缩并冻干制备得到干燥冻干粉。

取姜黄标准汤剂冻干粉适量, 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加 70% 甲醇 20 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.1.4 方法学验证

#### 2.1.4.1 精密度考察

取姜黄标准汤剂(编号: S12) 供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 针, 以峰 8 双去甲氧基姜黄素为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.15% ~ 0.53% 范围内, 相对峰面积 RSD 值在 0.52% ~ 1.02% 范围内, 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

#### 2.1.4.2 重复性考察

取同一批姜黄标准汤剂冻干粉(编号: S12), 平行 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件, 进样分析, 以峰 8 双去甲氧基姜黄素为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.13% ~ 0.47%, 相对峰面积 RSD 值在 0.56% ~ 1.35% 范围内, 均小于 3.0%, 说明该方法重复性良好。

#### 2.1.4.3 稳定性考察

取姜黄标准汤剂(编号: S12) 供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析, 记录样品指纹图谱, 以峰 8 双去甲氧基姜黄素为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.97% ~ 1.02% 范围内, 相对峰面积 RSD 值在 1.81% ~ 2.35% 范围内, 均小于 3.0%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

#### 2.1.5 指纹图谱的建立及共有峰标定

取 16 批姜黄标准汤剂冻干粉, 按“2.1.3”项下方法制备 16 批标准汤剂供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进行指纹图谱测定, 将 16 批样品指纹图谱采用 Waters Empower 3 液相色谱软件以 CDF 格式导出, 并导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版)》中, 以编号 S1 样品指纹图谱为参照, 进行多点校正和峰匹配, 16 批姜黄标准汤剂指纹图谱共标识出 10 个共有峰, 结果见图 1, 以中位数法生成姜黄标准汤剂对照指纹图谱(见图 2)。

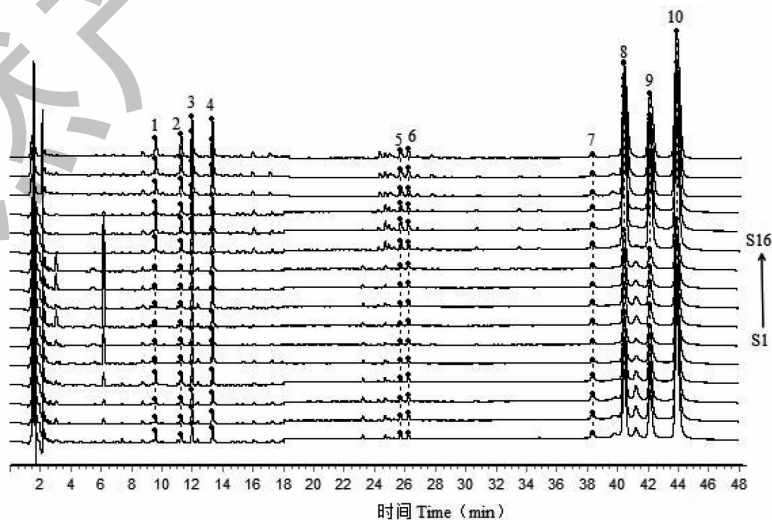


图 1 16 批姜黄标准汤剂指纹图谱叠加图

Fig. 1 Superimposed fingerprint of 18 batches of Curcuma Longae Rhizoma standard decoction

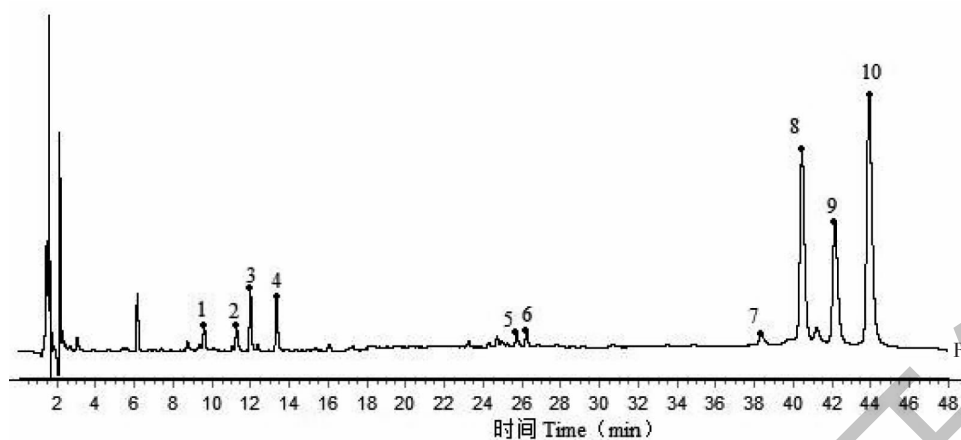


图2 姜黄标准汤剂对照指纹图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of Curcumae Longae Rhizoma standard decoction

### 2.1.6 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版)》计算16批姜黄标准汤剂指纹图谱与对照指纹图谱的相似度,结果见表2,16批标准汤剂指纹图谱相似度均在0.95以上,表明指纹图谱整体相似度较高,可作为共性质量特征,用于姜黄标准汤剂的鉴别和质量控制。

表2 相似度评价结果

Table 2 Evaluation results of the similarity

编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.972
S2	0.981
S3	0.978
S4	0.993
S5	0.963
S6	0.983
S7	0.986
S8	0.990
S9	0.992
S10	0.993
S11	0.984
S12	0.989
S13	0.992
S14	1.000
S15	0.999
S16	1.000

### 2.1.7 共有峰的指认

通过质谱精确分子量、碎片离子对比分析,对姜

黄标准汤剂指纹图谱的共有峰进行指认,液相色谱条件同“2.1.1”项下,质谱条件为:采用电喷雾离子源(HESI),喷雾电压为3.20 kV,扫描模式为正、负离子模式;扫描范围为100~1 000  $m/z$ ;鞘气流速为35 Arb;辅助气流速为10 Arb;毛细管温度为350 ℃;辅助器加热温度为350 ℃;一级扫描分辨率为70 000 FWHM;二级扫描分辨率为17 500 FWHM;二级碰撞能量为40 eV;S-lens电压为50 V。分别采集供试品溶液在正、负离子模式下总离子流图(total ion chromatogram, TIC)及紫外吸收色谱图(见图3)。

采用Compound Discoverer 2.1质谱分析软件对目标色谱峰的一级和二级质谱进行解析,确定目标成分的精确分子量及加合物离子信息,通过与mz-Cloud标准数据库下碰撞能量为40 eV的二级质谱数据库进行比对,指认出峰1为对羟基苯甲醛,峰2为香兰素,峰3为对香豆酸,峰4为阿魏酸,峰6为环姜黄素,峰8为双去甲氧基姜黄素,峰9为去甲氧基姜黄素,峰10为姜黄素。化合物信息见表3。

### 2.1.8 有峰的确证

精密称取阿魏酸对照品、对羟基苯甲醛对照品、香兰素对照品、姜黄素对照品、去甲氧基姜黄素对照品、双去甲氧基姜黄素对照品、环姜黄素对照品和对香豆酸对照品适量,加甲醇分别制成每1 mL含阿魏酸100  $\mu\text{g}$ 、对羟基苯甲醛100  $\mu\text{g}$ 、香兰素、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、环姜黄素和对香豆酸各80  $\mu\text{g}$ 的溶液,作为对照品溶液,取姜黄标准汤剂冻干粉(编号:S16)约0.1 g,精密称定,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别取上述对照品溶液和供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件

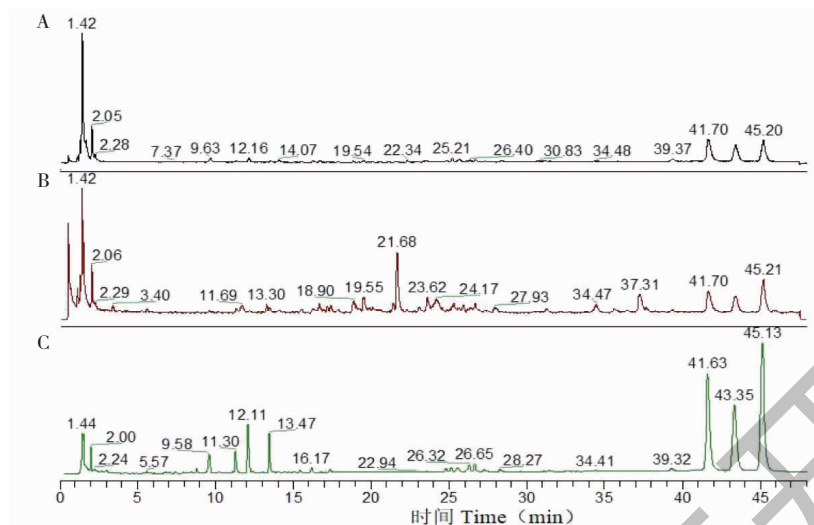


图 3 姜黄标准汤剂共有峰的指认

Fig. 3 Identification of common peaks of Curcuma Longae Rhizoma standard decoction

注:A:负离子模式下 TIC 图;B:正离子模式下 TIC 图;C:UV 色谱图。Note:A:TIC diagram in negative ion mode;B:TIC diagram in positive ion mode;C:UV chromatogram.

表 3 姜黄标准汤剂指纹图谱共有峰的质谱指认结果

Table 3 Identification of common peaks in the fingerprint of Curcuma Longae Rhizoma standard decoction by mass spectrometry

峰号 Peak No.	保留时间 Retention time (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	分子离子峰 Molecular ion peak	实验值 Experimental value (m/z)	理论值 Theoretical value (m/z)	二级碎片 Secondary fragment (m/z)
1	9.58	对羟基苯甲醛 <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	123.044 1	122.036 8	95.049 5、 88.023 5
2	11.30	香兰素 Vanillin	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	153.054 4	152.047 3	125.059 7、 111.044 3、 93.033 9
3	12.11	对香豆酸 <i>p</i> -Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	163.038 4	163.047 3	190.926 9、 235.924 9、 119.048 4
4	13.47	阿魏酸 Ferulic acid	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	193.049 1	193.148 0	134.035 7、 178.025 5、 137.028 8
6	26.65	环姜黄素 Cyclocurcumin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	367.117 2	367.126 0	134.035 7、 149.059 1、 158.035 7
8	41.63	双去甲氧基姜黄素 Bisdemethoxycurcumin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	307.096 5	307.053 9	119.048 4、 143.048 6、 187.038 4
9	43.35	去甲氧基姜黄素 Noroxycurcumin	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	339.122 1	338.353 9	147.043 8、 177.054 4、 223.075 0
10	45.13	姜黄素 Curcumin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	367.117 1	367.379 9	134.035 7、 149.059 1、 158.035 7

进行分析,结果见图 4。经与对照品保留时间及紫外吸收光谱比对,进一步确定峰 1 为对羟基苯甲醛,峰 2 为香兰素,峰 3 为对香豆酸,峰 4 为阿魏酸,峰 6 为环姜黄素,峰 8 为双去甲氧基姜黄素,峰 9 为去甲

氧基姜黄素,峰 10 为姜黄素。

## 2.2 化学计量学分析

### 2.2.1 聚类分析(HCA)

采用 IBM SPSS 20.0 软件,以 16 批姜黄标准汤

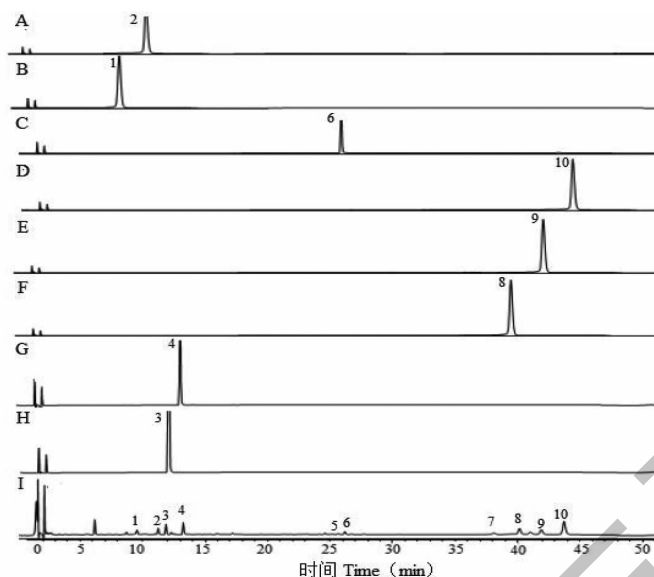


图4 指纹图谱共有峰的指认

Fig. 4 Identification of common peaks in fingerprints

注:A: 香兰素对照品;B: 对羟基苯甲醛对照品;C: 环姜黄素对照品;D: 姜黄素对照品;E: 去甲氧基姜黄素;F: 双去甲氧基姜黄素对照品;G: 阿魏酸对照品;H: 对香豆酸对照品;I: 供试品。1: 对羟基苯甲醛;2: 香兰素;3: 对香豆酸;4: 阿魏酸;6: 环姜黄素;8: 双去甲氧基姜黄素;9: 去甲氧基姜黄素;10: 姜黄素。Note: A: Vanillin reference; B: *p*-Hydroxybenzaldehyde reference; C: Cyclocurcumin reference; D: Curcumin reference; E: Noroxycurcumin reference; F: Bisdemethoxycurcumin reference; G: Ferulic acid reference; H: *p*-Coumaric acid reference; I: Sample. 1: Vanillin; 2: *p*-Hydroxybenzaldehyde; 3: *p*-Coumaric acid; 4: Ferulic acid; 6: Cyclocurcumin; 8: Bisdemethoxycurcumin; 9: Noroxycurcumin; 10: Curcumin.

剂指纹图谱 10 个共有峰的峰面积为变量,采用 Z 得分法对峰面积进行标准化处理,采用组间联接法度量标准为平方 Euclidean 距离,对 16 批姜黄标准汤剂进行系统聚类分析,结果见图 5。组间联接距离

在 10~25 时,16 批姜黄标准汤剂被分为两类,其中编号 S1~S10 的样品聚为一类,编号 S11~S16 的样品聚为另一类。

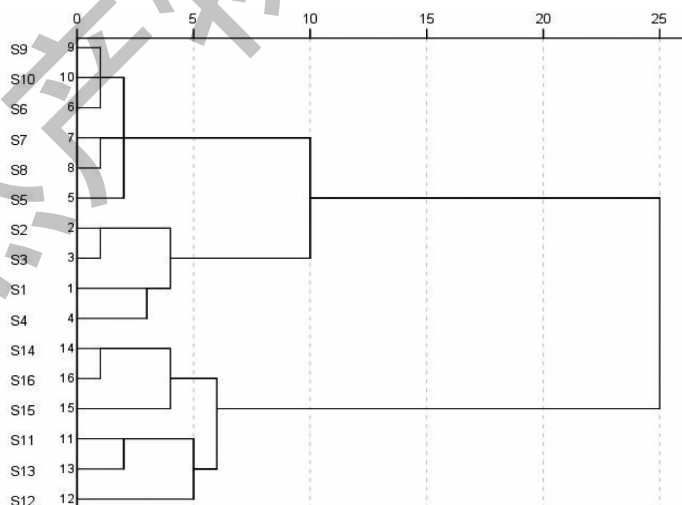


图5 聚类分析树状图

Fig. 5 Dendrogram of cluster analysis

### 2.2.2.2 主成分分析(PCA)

以姜黄标准汤剂指纹图谱 10 个共有峰的峰面积为变量,导入 SIMCA14.1 软件,进行 PCA 分析,

共生成 2 个主成分,累计贡献率为 91.4%, $Q^2$  为 0.795,证明模型有效,并生成 PCA 得分图(见图 6)。结果显示,16 批姜黄标准汤剂基本可以分为两

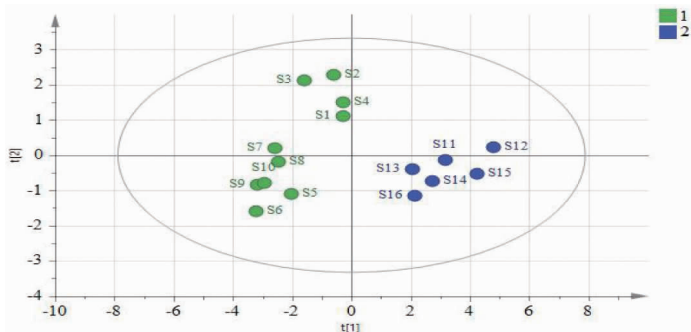


图 6 PCA 得分图

Fig. 6 PCA scores diagram

类,其中编号为 S1 ~ S10 的样品归为一类,编号 S11 ~ S16 的样品归为第二类,与聚类分析的结果基本一致。

### 2.2.3 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)

采用 SIMCA14.1 软件,以 10 个共有峰的峰面积为变量进行 OPLS-DA 分析,运用统计推断方法分析该模型,将模型随机排列 200 次做置换检验,结果见图 7。由图 7 可知, $R^2$  和  $Q^2$  截距值分别为 0.221 和 -0.806,所有位于左边的  $R^2$  和  $Q^2$  值均低于其最右边的值,且  $Q^2$  为负值,说明建立的 OPLS-DA 模型没有出现拟合现象,所建立的模型有效。模型中

累积解释能力参数  $R^2 X(cum)$  为 0.939,累积解释能力参数  $R^2 Y(cum)$  为 0.968,预测能力参数  $Q^2(cum)$  为 0.927,这三个参数值均接近于 1,表明该模型的拟合准确性好,具有较强的解释和预测能力,OPLS-DA 将 16 批姜黄标准汤剂分为两类(见图 8),并自动生成峰面积变量 VIP 图(见图 9),并以  $VIP > 1.0$  表示差异具有显著性,共找到 6 个差异性标志物(见图 9),分别为峰 5、峰 4(阿魏酸)、峰 8(双去甲氧基姜黄素)、峰 9(去甲氧基姜黄素)、峰 2(香兰素)和峰 1(对羟基苯甲醛)。

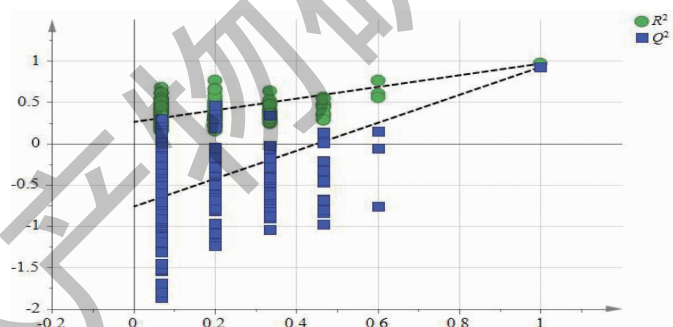


图 7 OPLS-DA 模型置换验证图

Fig. 7 OPLS-DA model permutation test diagram

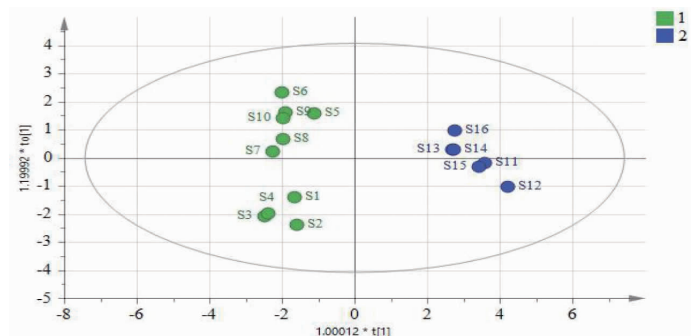


图 8 OPLS-DA 得分图

Fig. 8 OPLS-DA scores diagram



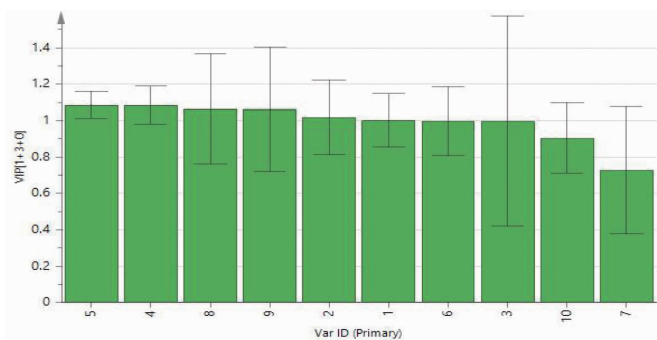


图9 OPLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 9 VIP diagram of OPLS-DA

## 2.3 4种指标性成分含量测定

### 2.3.1 精密度考察

精密吸取姜黄标准汤剂(编号:S6)供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件重复进样6次,记录姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和阿魏酸的色谱峰面积,并计算峰面积RSD分别为0.96%、0.90%、0.91%和0.47%,表明该方法精密度良好。

### 2.3.2 线性关系考察

精密称取姜黄素对照品5.532 mg、去甲氧基姜黄素对照品3.148 mg、双去甲氧基姜黄素对照品2.904 mg、阿魏酸对照品2.005 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇制成每1 mL含姜黄素546.008  $\mu\text{g}$ 、去甲氧基姜黄素310.078  $\mu\text{g}$ 、双去甲氧基姜黄素275.880  $\mu\text{g}$ 、阿魏酸199.297  $\mu\text{g}$ 的混合对照品贮备

液,即得。

精密吸取上述对照品贮备液1.0、1.0、1.0、1.0、2.0、3.0 mL,分别置100、20、10、5、5、5 mL的量瓶中,分别加甲醇制成每1 mL含姜黄素5.460、27.300、54.601、109.202、218.403、327.605  $\mu\text{g}$ ,去甲氧基姜黄素3.101、15.504、31.008、61.016、124.031、186.047  $\mu\text{g}$ ,双去甲氧基姜黄素2.759、13.794、27.588、55.176、110.352、165.528  $\mu\text{g}$ ,含阿魏酸1.993、9.965、19.930、39.859、79.719、119.578  $\mu\text{g}$ 的混合溶液,作为线性对照品溶液,分别精密吸取上述对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件依次分析,记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),对照品浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,如表4所示,各化学成分在相应的浓度内峰面积与对照品浓度线性关系良好。

表4 各成分线性关系

Table 4 Linear relationship of various constituents

成分 Component	回归方程 Regression equation	$r$	线性范围 Linear range( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
姜黄 Curcumin	$Y = 0.897X - 2.036$	1.000 0	5.460 ~ 327.605
去甲氧基姜黄素 Noroxycurcumin	$Y = 0.956X - 1.212$	1.000 0	3.101 ~ 186.047
双去甲氧基姜黄 Bisdemethoxycurcumin	$Y = 0.959X - 1.330$	1.000 0	2.759 ~ 165.528
阿魏酸 Ferulic acid	$Y = 0.685X + 0.741$	0.999 8	1.993 ~ 119.578

### 2.3.3 重复性考察

取同一批姜黄标准汤剂(编号:S6)约0.1 g,精密称定,平行称定6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.1.1”项下色谱条件测定,计算姜黄标准汤剂中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和阿魏酸的含量分别为2.786、0.849、1.063、0.529 mg/g。

### 2.3.4 加样回收率考察

精密称取姜黄素对照品8.075 mg,去甲氧基姜黄素对照品2.257 mg,双去甲氧基姜黄素对照品2.978 mg,阿魏酸对照品1.231 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇制成每1 mL含姜黄素159.401  $\mu\text{g}$ 、去甲氧基姜黄素44.463  $\mu\text{g}$ 、双去甲氧基姜黄素56.582  $\mu\text{g}$ 、阿魏酸24.472  $\mu\text{g}$ 的混合溶液。精密吸取上述



混合对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL, 分别置具塞锥形瓶中, 分为 3 组, 每组平行 3 份, 置氮吹仪下吹干, 依次加入精密称定且含量已知的姜黄标准汤剂(编号:S6)冻干粉约 0.05 g, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 9 份, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 分别计算姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和阿魏酸的加样回收率, 见表 5 所示, 姜黄素的

加样回收率在 97.49% ~ 104.89%, 去甲氧基姜黄素的加样回收率在 96.40% ~ 103.60%, 双去甲氧基姜黄素的加样回收率在 92.23% ~ 100.35%, 阿魏酸的加样回收率在 95.92% ~ 102.44%, RSD 分别为 2.27%、2.43%、2.81% 和 2.15%, 表明该方法准确度良好。

表 5 加样回收率实验结果

Table 5 Results of the sample recovery rate

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample weight (g)	测得量 Measured quantity (mg)	已知量 Known quantity (mg)	对照品加入量 Reference substance added amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
姜黄 Curcumin	1	0.053 21	0.227 6	0.148 2	0.079 7	99.62	2.27
	2	0.052 94	0.229 2	0.147 5	0.079 7	102.51	
	3	0.051 22	0.226 3	0.142 7	0.079 7	104.89	
	4	0.053 11	0.306 5	0.148 0	0.159 4	99.44	
	5	0.051 86	0.305 5	0.144 5	0.159 4	101.00	
	6	0.050 35	0.299 1	0.140 3	0.159 4	99.62	
	7	0.050 71	0.380 2	0.141 3	0.239 1	99.92	
	8	0.052 56	0.380 8	0.146 4	0.239 1	98.03	
	9	0.052 18	0.378 5	0.145 4	0.239 1	97.49	
去甲氧基姜黄素 Noroxycurcumin	1	0.053 21	0.066 6	0.045 2	0.022 2	96.40	2.43
	2	0.052 94	0.067 5	0.044 9	0.022 2	101.80	
	3	0.051 22	0.066 5	0.043 5	0.022 2	103.60	
	4	0.053 11	0.089 4	0.045 1	0.044 5	99.55	
	5	0.051 86	0.088 8	0.044 0	0.044 5	100.67	
	6	0.050 35	0.086 3	0.042 7	0.044 5	97.98	
	7	0.050 71	0.109 4	0.043 0	0.066 7	99.55	
	8	0.052 56	0.109 7	0.044 6	0.066 7	97.60	
	9	0.052 18	0.108 8	0.044 3	0.066 7	96.70	
双去甲氧基姜黄素 Bisdemethoxycurcumin	1	0.053 21	0.083 7	0.056 6	0.028 3	95.76	2.81
	2	0.052 94	0.084 6	0.056 3	0.028 3	100.00	
	3	0.051 22	0.080 6	0.054 5	0.028 3	92.23	
	4	0.053 11	0.112 9	0.056 5	0.056 6	99.65	
	5	0.051 86	0.111 9	0.055 1	0.056 6	100.35	
	6	0.050 35	0.107 8	0.053 5	0.056 6	95.94	
	7	0.050 71	0.138 1	0.053 9	0.084 9	99.18	
	8	0.052 56	0.137 7	0.055 9	0.084 9	96.35	
	9	0.052 18	0.136 6	0.055 5	0.084 9	95.52	
阿魏酸 Ferulic acid	1	0.053 21	0.040 7	0.028 1	0.012 3	102.44	2.15
	2	0.052 94	0.040 1	0.028 0	0.012 3	98.37	
	3	0.051 22	0.039 5	0.027 1	0.012 3	100.81	

续表 5 (Continued Tab. 5)

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample weight (g)	测得量 Measured quantity (mg)	已知量 Known quantity (mg)	对照品加入量 Reference substance added amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
阿魏酸 Ferulic acid	4	0.053 11	0.051 6	0.028 1	0.024 5	95.92	2.15
	5	0.051 86	0.051 3	0.027 4	0.024 5	97.55	
	6	0.050 35	0.050 8	0.026 6	0.024 5	98.78	
	7	0.050 71	0.062 4	0.026 8	0.036 8	96.74	
	8	0.052 56	0.063 9	0.027 8	0.036 8	98.10	
	9	0.052 18	0.064 7	0.027 6	0.036 8	100.82	

### 2.3.5 稳定性试验

精密吸取姜黄标准汤剂(编号:S6)供试品溶液,按照“2.1.1”项下色谱条件,分别在0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析,记录姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和阿魏酸的色谱峰面积,并计算峰面积 RSD 值分别为 1.07%、1.92%、0.89% 和 0.74%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

### 2.3.6 样品测定

采用“2.1.3”项下方法,对 16 批不同产地的姜

黄制备的标准汤剂中的姜黄素、去甲基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和阿魏酸的含量进行测定(见表 6)。结果显示,16 批姜黄制备的标准汤剂姜黄素含量均值为 5.635 mg/g,去甲氧基姜黄素含量均值为 2.269 mg/g,双去甲氧基姜黄素含量均值为 2.889 mg/g,阿魏酸含量均值为 0.760 mg/g;其中云南大理的姜黄原料制备的标准汤剂姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素及阿魏酸的含量要高于四川宜宾和乐山的样品。

表 6 16 批姜黄标准汤剂含量测定结果

Table 6 Content determination results of 16 batches of Curcumae Longae Rhizoma standard decoction

编号 No.	含量 Content (mg/g)			
	姜黄 Curcumin	去甲氧基姜黄素 Noroxycurcumin	双去甲氧基姜黄素 Bisdemethoxycurcumin	阿魏酸 Ferulic acid
S1	6.984	2.087	2.589	0.589
S2	6.184	1.825	2.352	0.488
S3	5.199	1.588	2.193	0.537
S4	5.262	1.602	2.346	0.555
S5	5.116	1.402	1.622	0.801
S6	3.099	0.944	1.182	0.588
S7	4.079	1.187	1.714	0.551
S8	3.507	1.091	1.631	0.687
S9	3.452	1.123	1.555	0.609
S10	3.504	1.129	1.607	0.639
S11	7.217	4.410	5.423	0.773
S12	8.019	4.604	5.337	0.828
S13	7.209	4.229	5.132	0.768
S14	7.007	2.968	3.585	1.139
S15	6.922	3.020	3.958	1.222
S16	7.404	3.088	3.997	1.388
均值 Mean	5.635	2.269	2.889	0.760
SD	1.688	1.276	1.469	0.267

注:含量测定结果均以干燥品计。

Note: The content determination results were calculated by dry sample.

### 3 讨论与结论

#### 3.1 含测指标的选择

姜黄素类和挥发油是姜黄的主要活性成分之一,但是上述成分水溶性较小,标准汤剂以水为溶剂,水溶性成分应是汤剂发挥药效的重要物质基础,因此,在标准汤剂质量标准研究中,除了测定姜黄素类成分,同时增加了阿魏酸的测定,与姜黄素类成分相比,阿魏酸的水溶性相对较好,是姜黄素类成分的合成前体<sup>[13]</sup>,同时在标准汤剂煎煮过程中,姜黄素类成分亦能转化为阿魏酸<sup>[14]</sup>,现代药理学研究证实,阿魏酸具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗血栓、降血脂、降低心肌缺血和耗氧量等作用,其药用价值越来越受到重视<sup>[15]</sup>,标准汤剂中阿魏酸的量,反映了标准汤剂煎煮过程中姜黄化学成分的变化。对以“标准汤剂”为基准的中药配方颗粒等现代中药制剂生产工艺的优化,具有较强的指导意义。

#### 3.2 分析方法的建立

姜黄标准汤剂中化学成分极性差异较大,既有姜黄素等脂溶性较大的活性成分,又有阿魏酸等水溶性较大的成分,因此,指纹图谱的建立需要最大限度地将上述成分提取出来,同时又要考虑将不同极性的化学成分进行很好的色谱分离,并建立与指纹图谱条件一致的多成分定量方法。因此,我们对流动相系统、检测波长和供试品溶液制备方法进行了系统的考察,确定最佳的色谱条件和供试品溶液制备方法。

#### 3.3 指纹图谱和含量测定结果评价

16 批姜黄标准汤剂指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.95 以上,说明指纹图谱整体相似度较高,能够用于姜黄标准汤剂的鉴别和质量控制。相似度计算能够反映指纹图谱峰的稳定组成和特征比例,但是,无法完整描述和区分指纹图谱中所包含的复杂成分的分布规律和相互作用关系<sup>[16]</sup>,因此,采用化学计量学中的模式识别方法对指纹图谱进行研究,结果显示,16 批姜黄标准汤剂样品具有一定的产地差异性,以 10 个共有峰峰面积为变量,HCA 和 PCA 均将 16 批样品分为两类,其中四川产区样品归为一类,云南产区样品归为另一类,共找到 6 个差异性标志物,分别为峰 5、峰 4(阿魏酸)、峰 8(双去甲氧基姜黄素)、峰 9(去甲氧基姜黄素)、峰 2(香兰素)和峰 1(对羟基苯甲醛),其中峰 5 经过高分辨质谱指认,推测可能为 1-(4-羟基-3,5-二甲氧基苯基)-7-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,4,6-庚三烯-3-酮,目

前缺少对照品,有待于进一步研究与确证。通过对阿魏酸、双去甲氧基姜黄素、去甲氧基姜黄素和姜黄素的含量进行测定,结果显示,云南大理的姜黄原料制备的标准汤剂姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素及阿魏酸的含量均高于四川宜宾和乐山的样品,这也为企业生产时原料的选购提供参考。

目前,对姜黄指纹图谱和含量测定的研究较多,但主要集中在对挥发油和姜黄素类成分的特征和测定上<sup>[17,18]</sup>,而对水溶性相对较大的成分研究不足,本次研究通过建立姜黄标准汤剂 UPLC 指纹图谱并同时 4 种有效成分进行测定,为姜黄药材质量标准完善,以及姜黄中药配方颗粒和经典名方制剂等产品质量标准的建立提供重要的参考。该方法操作简便,稳定可靠,重复性良好。

#### 参考文献

- 1 Li Y, Bai M, Song YG, et al. Research and reflection on standard decoction of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49:3977-3980.
- 2 Deng Z, Jing WG, Wang SH, et al. Discussion and research progress in standard decoction of medicinal slices[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44:242-248.
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 264.
- 4 Sun LL, Qiao L, Tian ZH, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Curcuma longa* L. [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med(山东中医药大学学报), 2019, 43:207-212.
- 5 Wei YF, Yu HC, Liu XL, et al. Research progress on main chemical constituents and pharmacological effects of *Curcuma Longae Rhizoma*[J]. J Xinxiang Med Univ(新乡医学院学报), 2020, 37:990-995.
- 6 Xia Q. The selective breeding research on the new materials from *Curcuma Radix*, *Curcuma longa* and the research on the quality standard of turmeric extract[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM(成都中医药大学), 2016.
- 7 Jia K, Li R, Zhang Q. Chemical fingerprint and quantitative analysis of Chinese herbal medicines *C. longa* deriving from different cultivation areas[J]. Southwest China(西南农业学报), 2015, 28:1920-1925.
- 8 Xie YH, Luo B, Li QM, et al. Simultaneous quantitative determination of three compositions of curcuminoids in *Curcuma longa* L. by QAMS[J]. Sichuan J Tradit Chin Med(四川中医), 2021, 39:27-31.

- 9 Jiang JL, Jin XL, Qiao B, et al. Analysis of curcuminoids in *Curcuma longa* L. by HPLC-ESI-MS/MS[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2012, 24:1582-1588.
- 10 Song YD. Study and evaluation on the quality of *Curcuma longa* L. in Qianwei [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM(成都中医药大学), 2015.
- 11 Wu WY, Guo DA. Strategies for elaboration of comprehensive quality standard system on traditional Chinese medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2014, 39:351-356.
- 12 Yang LW, Wang HN, Geng L, et al. Discussion on whole quality control mode of traditional Chinese medicine based on standard decoction[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2018, 24:1-6.
- 13 Wang LY, Han X, Wang FZ, et al. Research progresses in the biosynthesis of curcuminoids[J]. Chin J Biotech(生物工程学报), 2021, 37:404-417.
- 14 Yuan YM, Cao YP. Study on the degradation of curcumin under the ultrasonic field[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2013, 34:287-290.
- 15 Zhang X, Gao ZP. Research progress in ferulic acid[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2020, 22:138-147.
- 16 Zhan XY, Shi XY, Duan TX, et al. Study on chromatography fingerprint similarity algorithms[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17:248-251.
- 17 Deng Z, Zhang F, Jiao MJ, et al. Research on standard decoction of processed *Curcuma Longae Rhizoma* containing volatile oil[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43:879-884.
- 18 Song JH, Wang YH, Ying HM, et al. Quality evaluation of *Curcuma longa* in Muchuan based on HPLC fingerprint pattern and chemical pattern recognition method with multi-component content analysis[J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2021, 33:2307-2315.

## 《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wanmeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周文	胡友财	袁涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiang	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		