

RP-HPLC法同时测定莪术油自乳化软胶囊中6种倍半萜成分的含量^Δ

姚慧娟^{1*},姚慧敏²,卜书红¹,李方¹,陆晓彤¹,张健^{1#}(1.上海交通大学医学院附属新华医院药剂科,上海200092;2.通化师范学院制药与食品科学系,吉林通化 134002)

中图分类号 R283.65;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-1010-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.18

摘要 目的:建立同时测定莪术油自乳化软胶囊中6种倍半萜成分(莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯)含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μ m),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为30 $^{\circ}$ C,进样量为20 μ l。结果:莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的质量浓度分别在17.58~131.85、2.70~20.22、9.78~73.32、40.22~301.62、11.88~89.10、3.06~22.92 mg/L范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 9、0.999 8、0.999 9、0.999 9、0.999 8、0.999 9);平均加样回收率分别为99.8%、99.5%、100.0%、99.4%、100.1%、99.3%,RSD分别为1.27%、0.71%、0.76%、1.21%、1.07%、1.51%(n 均为6)。结论:该方法简便、快速、准确、灵敏度高、重复性好、稳定可靠,可用于莪术油自乳化软胶囊的质量控制。

关键词 反相高效液相色谱法;梯度洗脱;莪术油;自乳化软胶囊;倍半萜类成分;含量测定

Simultaneous Determination of 6 Kinds of Sesquiterpenes in Zedoary Turmeric Oil Self-emulsifying Soft Capsules by RP-HPLC

YAO Hui-juan¹, YAO Hui-min², BU Shu-hong¹, LI Fang¹, LU Xiao-tong¹, ZHANG Jian¹(1. Dept. of Pharmacy, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Dept. of Pharmacy and Food Engineering, Tonghua Normal University, Jilin Tonghua 134002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 6 kinds of sesquiterpenes in Zedoary Turmeric Oil self-emulsifying soft capsule, including curdione, curcumol, germacrone, curzerene, furanodiene and β -elemene. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The injection volume was 20 μ l. RESULTS: The linear ranges of curdione, curcumol, germacrone, curzerene, furanodiene and β -elemene were 17.58-131.85 mg/L ($r=0.999 9$), 2.70-20.22 mg/L ($r=0.999 8$), 9.78-73.32 mg/L ($r=0.999 9$), 40.22-301.62 mg/L ($r=0.999 9$), 11.88-89.10 mg/L ($r=0.999 8$) and 3.06-22.92 mg/L ($r=0.999 9$), respectively. The average recoveries were 99.8% (RSD=1.27%, $n=6$), 99.5% (RSD=0.71%, $n=6$), 100.0% (RSD=0.76%, $n=6$), 99.4% (RSD=1.21%, $n=6$), 100.1% (RSD=1.07%, $n=6$) and 99.3% (RSD=1.51%, $n=6$), respectively. CONCLUSION: The method is simple, rapid, accurate, sensitive, reproducible, stable and reliable. It could be used for the quality control of Zedoary Turmeric Oil self-emulsifying soft capsule.

KEY WORDS RP-HPLC; Gradient elution; Zedoary Turmeric Oil; Self-emulsifying soft capsule; Sesquiterpene; Content determination

莪术油(Zedoary Turmeric Oil)是从姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Val.、广西莪术 *C. kwangsiensis* S.G.Lee et C. F.Liang 或温郁金 *C. wenyujin* Y.H. Chen et C.Ling 的干燥根茎中提取出的挥发油,呈浅棕或深棕色,具有很强的挥发性^[1]。其成分复杂,含有莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯等20种成分^[2-3]。莪术油具有破瘀、行气、消积和止痛的功效,还具有抗癌、抗早孕、抗凝血、抗氧化和保肝等活性。目前,它主要用于病毒性感染及癌症的治疗,因疗效确

切,已做成各种制剂广泛应用于临床,如莪术油注射液、复方莪术油栓等,均为国家药品标准收录的品种。这些制剂一般以莪术醇和吉马酮为指标性成分,采用气相色谱(GC)法进行含量测定。

莪术油自乳化软胶囊是以温郁金油为油相制备而成的自乳化制剂,可有效改善莪术油水溶性差、易挥发、生物利用度差、味苦、不宜口服的缺点,从而扩大其临床应用范围。为了更好地控制该制剂质量,本试验采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,选择其中6种主要有效成分——莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯为定量指标成分,参考相关文献^[4-7],建立了莪术油自乳化软胶囊中6种倍半萜成分的含量测定方法。

1 材料

1.1 仪器

^Δ 基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目资助(No.11DZ1972500)

* 药师,硕士。研究方向:中药新药。电话:021-25077154。E-mail:hj_yao@163.com

通信作者:主任药师,教授,硕士研究生导师。研究方向:临床药理学和临床药理。E-mail:zj_boss@126.com

1100型HPLC仪,含四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)、Chemstation色谱工作站(美国Agilent公司);AL-104型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);B3510E-DHT型超声波清洗器[必能信超声(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

莜术油自乳化软胶囊(上海交通大学医学院附属新华医院药剂科自制,批号:110301、110302、110303,规格:0.5 g/粒);莜术醇、吉马酮、 β -榄香烯对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为100185-200506、111665-200902、1002682-200907,纯度分别为99.8%、95.3%、95.4%);莜术二酮、莜术烯对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为20100415、20100610,纯度分别为98.5%、98.3%);呋喃二烯对照品(上海顺勃生物工程有限公司,批号:20101221,纯度:98.2%);乙腈为色谱纯,无水乙醇及其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~35 min, 55%→95% A; 35~50 min, 95% A);流速:1.0 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ l。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯对照品各适量,加乙醇溶解,制成质量浓度分别为0.879 0、0.134 8、0.488 8、2.010 8、0.594 0、0.152 8 g/L的溶液,作为混合对照品贮备液。精密吸取混合对照品贮备液1 ml,置于10 ml量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀,即得莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯质量浓度分别为87.90、13.48、48.88、201.08、59.40、15.28 mg/L的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品20粒的内容物,混合均匀,精密称定0.1 g,置于50 ml量瓶中,用乙醇稀释至刻度,超声处理(功率:50 W,频率:40 kHz)30 min后滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备

按处方量精密称定混合辅料(表面活性剂和助溶剂),再按“2.3”项下方法制得阴性对照溶液。

2.5 标准曲线的制备

分别精密吸取混合对照品贮备液0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 ml,置于10 ml量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀,取样20 μ l,注入HPLC仪,按上述色谱条件测定。分别以莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的质量浓度(x , mg/L)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程(见表1)。结果表明,莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的质量浓度分别在17.58~131.85、2.70~20.22、9.78~73.32、40.22~301.62、11.88~89.10、3.06~22.92 mg/L范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.6 专属性和系统适用性试验

在上述色谱条件下,分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各20 μ l,注入HPLC仪,测定。结果,莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的保留时间分别为12.934、17.727、20.511、35.140、37.719、44.479 min,莜

表1 线性回归结果($n=6$)

Tab 1 Results of linear regression($n=6$)

成分	回归方程	r	线性范围,mg/L
莜术二酮	$x=0.023 9y-0.106 0$	0.999 9	17.58~131.85
莜术醇	$x=0.042 3y-0.015 4$	0.999 8	2.70~20.22
吉马酮	$x=0.019 3y-0.084 8$	0.999 9	9.78~73.32
莜术烯	$x=0.091 1y-0.348 4$	0.999 9	40.22~301.62
呋喃二烯	$x=0.020 6y-0.102 3$	0.999 8	11.88~89.10
β -榄香烯	$x=0.056 7y-0.149 2$	0.999 9	3.06~22.92

术油自乳化软胶囊中各指标成分和其他组分达到了完全分离,阴性对照无干扰。莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的理论板数分别为4 203、3 465、4 113、3 725、3 271、3 508,系统适用性试验符合要求。色谱见图1。

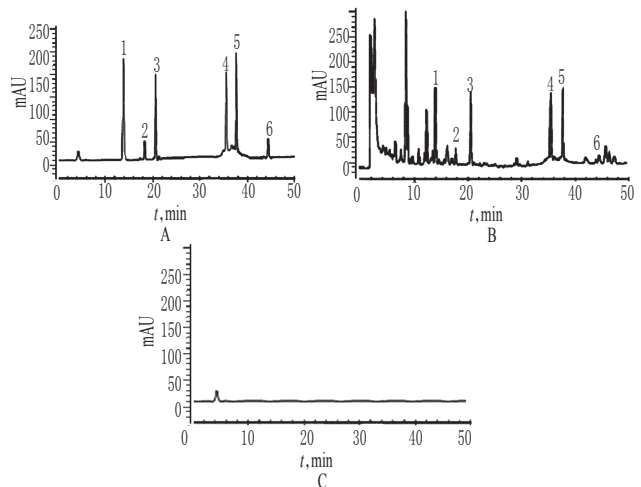


图1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 莜术二酮; 2. 莜术醇; 3. 吉马酮; 4. 莜术烯; 5. 呋喃二烯; 6. β -榄香烯

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. curdione; 2. curcuminol; 3. germacrone; 4. curzerene; 5. furanodiene; 6. β -elemene

2.7 检出限和定量限确定

经测定,本方法对莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的检出限分别为5.27、0.65、2.78、12.90、2.93、1.13 mg/L(信噪比为3),定量限分别为15.21、2.24、8.72、38.77、9.01、2.18 mg/L(信噪比为10)。

2.8 精密度的试验

精密吸取混合对照品溶液适量,日内和日间反复注入HPLC仪,均连续进样6次,每次20 μ l,记录峰面积。结果,莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯日内精密度的RSD分别为0.62%、0.42%、0.31%、0.87%、0.37%、0.68%(n 均为6),日间精密度的RSD分别为0.54%、0.28%、0.30%、0.75%、0.52%、0.82%(n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.9 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液,分别于0、2、4、8、12、24 h进样20 μ l,记录峰面积。结果,莜术二酮、莜术醇、吉马酮、莜术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯峰面积的RSD分别为1.02%、0.82%、1.08%、0.97%、0.57%、0.35%(n 均为6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.10 重复性试验

取同一批(批号:110301)样品适量,共6份,分别按“2.3”

项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果,每1 g样品中平均含莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯42.46、5.28、17.92、114.88、33.02、5.90 mg, RSD分别为0.40%、1.08%、0.85%、0.36%、0.48%、1.40%(n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.11 加样回收率试验

精密称取已知含量的莪术油自乳化软胶囊(批号:110301)样品0.05 g,共6份,分别精密加入适量的莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯对照品溶液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法定量,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
莪术二酮	2.131	2.120	4.243	99.6	99.8	1.27
	2.161	2.120	4.243	98.2		
	2.119	2.120	4.271	101.5		
	2.115	2.120	4.212	98.9		
	2.187	2.120	4.328	101.0		
	2.081	2.120	4.188	99.4		
莪术醇	0.265	0.260	0.523	99.2	99.5	0.71
	0.269	0.260	0.525	98.5		
	0.263	0.260	0.522	99.4		
	0.263	0.260	0.521	99.3		
	0.272	0.260	0.532	100.2		
	0.259	0.260	0.520	100.5		
吉马酮	0.900	0.900	1.805	100.6	100.0	0.76
	0.912	0.900	1.807	99.4		
	0.894	0.900	1.784	98.9		
	0.892	0.900	1.800	100.8		
	0.923	0.900	1.827	100.4		
	0.878	0.900	1.776	99.8		
莪术烯	5.767	5.740	11.472	99.4	99.4	1.21
	5.847	5.740	11.495	98.4		
	5.733	5.740	11.335	97.6		
	5.721	5.740	11.461	100.0		
	5.916	5.740	11.668	100.2		
	5.629	5.740	11.415	100.8		
呋喃二烯	1.658	1.650	3.294	99.2	100.1	1.07
	1.681	1.650	3.327	99.8		
	1.648	1.650	3.285	99.2		
	1.644	1.650	3.311	101.0		
	1.701	1.650	3.381	101.8		
	1.618	1.650	3.261	99.6		
β -榄香烯	0.296	0.300	0.595	99.6	99.3	1.51
	0.300	0.300	0.597	98.9		
	0.294	0.300	0.586	97.2		
	0.294	0.300	0.599	101.8		
	0.304	0.300	0.603	99.8		
	0.289	0.300	0.586	98.8		

2.12 样品含量测定

分别取3批莪术油自乳化软胶囊各20粒,每批平行取样3份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照上述色谱条件进样

20 μ l,记录峰面积,按外标法计算样品中莪术二酮、莪术醇、吉马酮、莪术烯、呋喃二烯和 β -榄香烯的含量,结果见表3。

表3 3批样品含量测定结果(mg/g, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 3 Results of content determination of samples (mg/g, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

批号	莪术二酮	莪术醇	吉马酮	莪术烯	呋喃二烯	β -榄香烯
110301	42.50 \pm 0.14	5.29 \pm 0.37	17.92 \pm 0.16	114.70 \pm 1.10	33.04 \pm 0.14	5.97 \pm 0.89
110302	42.62 \pm 0.18	5.31 \pm 0.05	17.89 \pm 0.19	114.95 \pm 0.81	33.20 \pm 0.30	5.93 \pm 0.05
110303	42.58 \pm 0.22	5.22 \pm 0.06	17.81 \pm 0.04	114.50 \pm 1.40	33.07 \pm 0.16	5.84 \pm 0.08

3 讨论

莪术油的主要活性成分为单萜、倍半萜及其衍生物,具有较强的挥发性^[2],可以采用GC法进行测定^[8],但由于呋喃二烯等成分为热敏性物质,在高温下易转化为莪术烯^[5],GC法无法测定其真实含量。而HPLC法的样品处理简便,测定结果准确可靠、重复性好,故本试验建立了RP-HPLC梯度洗脱法,参考相关文献^[4-7]同时测定莪术油中6种主要成分的含量。

本试验参考文献^[7]采用乙腈-水二元梯度洗脱程序对样品中有效成分进行分离、定量,并对洗脱程序进行了优化,较等度洗脱条件大大缩短了分析周期,获得了满意效果;同文献^[4-5]相比,提高了分离效果,改善了峰形拖尾现象,增加了检测器灵敏度,同时还减少了程序进样时的基线波动。

综上,本方法简便、快速,专属性强、准确度高,精密度和重复性好、稳定可靠,可用于莪术油自乳化软胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:257-258.
- [2] Zhao XL, Yang CR, Yang KL, et al. Preparation and characterization of nanostructured lipid carriers loaded traditional Chinese medicine, zedoary turmeric oil[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36(7):773.
- [3] 钟章锋,陈修平,吴铁,等. 莪术醇的研究进展[J]. *中国药房*, 2010, 21(3):2959.
- [4] 李文庭,祝明,陈碧莲,等. HPLC同时测定莪术油中6种倍半萜成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20):48.
- [5] 何欢,马双成,田颂九,等. HPLC测定莪术油及其注射液中的6种成分的含量[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(5):593.
- [6] 彭炳先,陈受惠. HPLC测定不同产地莪术中3种有效成分的含量[J]. *中国药理学杂志*, 2009, 44(22):1742.
- [7] 张鹏,祝明,唐登峰,等. HPLC同时测定莪术油中3种倍半萜类成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(11):1825.
- [8] 袁文娟,高文分,田颂九,等. GC法测定不同品种莪术药材中3种成分的含量[J]. *中国药事*, 2010, 24(6):578.

(收稿日期:2012-07-12 修回日期:2012-08-08)