

· 化学与分析 ·

## HPLC 同时测定莪术油中 6 种倍半萜成分

李文庭<sup>1</sup>, 祝明<sup>2\*</sup>, 陈碧莲<sup>2</sup>, 唐登峰<sup>2</sup>, 张鹏<sup>1</sup>, 程勇<sup>3</sup>

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验所, 杭州 310004; 3. 浙江天草生物制品有限公司, 安吉 浙江 313300)

**[摘要]** 目的: 建立反相高效液相色谱法同时测定莪术油中 6 种倍半萜类(莪术二酮、莪术醇、牻牛儿酮、呋喃二烯、莪术烯、 $\beta$ -榄香烯)成分含量的方法。方法: 色谱条件 Agilent Extend C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈(A)-甲醇(B)-水(C), 梯度洗脱(0~20 min, 30%~65% A, 40%~30% B; 21~30 min, 65% A, 30% B), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30  $^{\circ}$ C, 检测波长 216 nm。结果: 6 种倍半萜类化合物莪术二酮、莪术醇、牻牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯和  $\beta$ -榄香烯分别在为 43.72~2 186, 44.37~2 219, 15.49~774.4, 28.30~1 415, 40.13~2 007, 16.74~837.0 ng 呈现良好的线性关系( $r > 0.999$ ); 平均加样回收率在 98.46%~103.9%; 6 种倍半萜类化合物含量重复性试验 RSD < 1.29%。结论: 方法快速准确、具有良好的重复性和稳定性, 可用于莪术油的质量控制。

**[关键词]** 莪术油; 倍半萜; 高效液相色谱; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0048-05

## Simultaneous Determination of Six Sesquiterpenes in Oleum Curcumae by HPLC

LI Wen-ting<sup>1</sup>, ZHU Ming<sup>2\*</sup>, CHEN Bi-lian<sup>2</sup>, TANG Deng-feng<sup>2</sup>, ZHANG Peng<sup>1</sup>, CHENG Yong<sup>3</sup>

(1. College of Pharmacy Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;  
2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China;  
3. Zhejiang Skyherb Ingredients Co., Ltd, Anji 313300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of six sesquiterpenes (curdione, curcumol, germacrone, curzerene, furanodiene,  $\beta$ -elemene) in Oleum Curcumae. **Method:** HPLC was performed on an Agilent Extend C<sub>18</sub> analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m) with gradient elution (0-20 min, 30%-65% A, 40%-30% B, 21-30 min, 65% A, 30% B) of acetonitrile (A) - methanol (B) - water (C) at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was maintained at 30  $^{\circ}$ C. Detection wavelength was 216 nm. **Result:** The six sesquiterpenes had good linearity with correlation coefficient > 0.999, ranging from 43.72-2 186, 44.37-2 219, 15.49-774.4, 28.30-1 415, 40.13-2 007 ng and 16.74-837.0 ng respectively. The average recoveries were between 98.46%-103.9%, repeatability experiments showed that RSD values of their contents were less than 1.29%. **Conclusion:** The developed method is rapid, accurate with high repeatability and stability, which is helpful to control the quality of Oleum Curcumae.

**[收稿日期]** 20110425(007)

**[基金项目]** 国家十一五支撑项目(2009ZX09308-004); 浙江省重大科技专项(2008C13037)

**[第一作者]** 李文庭, 硕士研究生, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 0571-86459414, E-mail: liwenting05@163.com

**[通讯作者]** \* 祝明, 主任中药师, 研究生导师, 从事中药有效成分及质量标准研究, Tel: 0571-86459425, E-mail: zhumingd@hotmail.com

[Key words] Oleum Curcumae; sesquiterpenes; HPLC; determination

莪术油为姜科姜黄属植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎(温莪术)经水蒸气蒸馏提取而得的挥发油<sup>[1]</sup>,是常用抗病毒药、抗癌药的原料药。牻牛儿酮、呋喃二烯、莪术二酮等倍半萜类衍生物既是莪术油的主要成分,又是其抑菌、抗癌、保肝等多种药理作用得以实现的重要物质基础<sup>[2-5]</sup>。近年来,国内外对莪术的化学成分、药理、药效、临床应用等的报道较多,有文献采用HPLC二元流动相梯度洗脱测定莪术油中多个成分的含量<sup>[6-7]</sup>,其个别成分分离情况不理想,且基线噪音明显。本研究采用RP-HPLC三元梯度洗脱对莪术油中莪术二酮、莪术醇、牻牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯6种主要活性成分含量进行同时测定,为建立全面质量标准提供实验依据,有利于提高产品品质和确保临床用药安全。

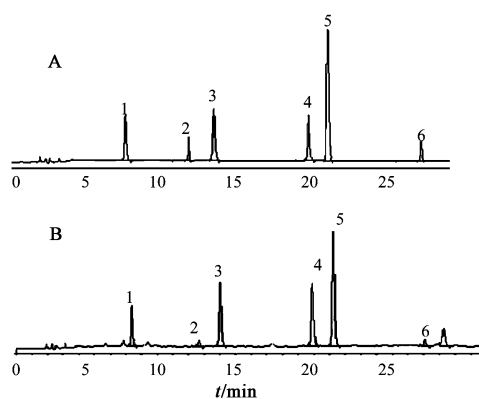
## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1100系列高效液相色谱仪(G1322A脱气机、G1313A自动进样仪、G1316A柱温箱、G1315B二极管阵列检测器)和Agilent Chemstation工作站, METILER AE240型电子天平。

**1.2 试剂与试药** 莪术醇(中国药品生物制品检定所,100185-200506),牻牛儿酮(中国药品生物制品检定所,111665-220401,纯度94.96%), $\beta$ -榄香烯(中国药品生物制品检定所,100268-200401,纯度99.2%),莪术二酮(上海沪云医药开发有限公司,经本所标准化纯度为99.1%),呋喃二烯和莪术烯从温莪术中分离、纯化所得,呋喃二烯经HPLC归一化法测定含量为99.4%<sup>[8]</sup>。莪术油样品(10批,批号030101,050603,060101,060301,070101,071101,080320,浙江天瑞药业有限公司;批号080306,080407,080408,四川达州天然植物药业有限公司)。乙腈、甲醇为色谱纯,水为重蒸水,无水乙醇为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent Extend C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相乙腈(A),甲醇(B),水(C),梯度洗脱(0~20 min, 30%~65% A, 40%~30% B), 21~30 min, 65% A, 30% B;流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长216 nm,进样量5  $\mu$ L,外标法。对照品及供试品溶液色谱图见图1。



A. 对照品 B. 样品 1. 莪术二酮;2. 莪术醇 3. 牻牛儿酮;  
4. 莪术烯;5. 呋喃二烯;6.  $\beta$ -榄香烯

图1 莪术油的HPLC

**2.2 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取莪术二酮、莪术醇、莪术烯、呋喃二烯、 $\beta$ -榄香烯, 88.23, 88.74, 56.59, 80.75, 33.75 mg, 至50 mL量瓶, 牻牛儿酮, 16.31 mg 至30 mL量瓶, 无水乙醇定容, 精密吸取以上溶液各1 mL至20 mL量瓶即得莪术二酮、莪术醇、牻牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯及 $\beta$ -榄香烯为87.44, 88.74, 30.98, 56.59, 80.27, 33.48 mg·L<sup>-1</sup>的对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取莪术油0.1 g于50 mL量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取5 mL至25 mL量瓶中, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45  $\mu$ m)滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 测定方法** 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各5  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 测定, 计算, 即得。

**2.5 线性关系、定量限与检测限** 精密量取2.2项下混合对照品溶液0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 以色谱峰峰面积(Y)为纵坐标, 进样量(X, ng)为横坐标绘制标准曲线, 计算回归方程。并以各对照品信噪比10:1为定量限(LOQ), 信噪比3:1为检测限(LOD), 结果见表1, 表明6种倍半萜类成分在实验浓度内线性关系良好。

**2.6 仪器精密度** 精密吸取混合对照品溶液5  $\mu$ L, 按2.1项下色谱条件连续进样6次, 测定其峰面积的RSD分别为0.22%, 0.39%, 0.27%, 0.21%, 0.29%, 0.24%。6种倍半萜成分峰面积的RSD均<1%, 仪器精密度良好。

表 1 6 种倍半萜类成分的线性关系、检测限和定量限

被测成分	线性方程	线性范围/ng	r <sup>2</sup>	检测限/ng	定量限/ng
莪术二酮	Y=0.780 0X+1.450 7	43.72~2 185.90	1.000 0	1.80	6.00
莪术醇	Y=14.418 5X-1.127 3	44.37~2 218.50	0.999 9	13.72	45.75
牻牛儿酮	Y=2.932 5X+1.121 9	15.49~774.40	1.000 0	0.45	1.50
莪术烯	Y=1.682 4X+0.775 7	28.30~1 414.75	1.000 0	1.07	3.58
呋喃二烯	Y=2.861 8X+3.407 4	40.13~2 006.64	1.000 0	0.63	2.11
β-榄香烯	Y=0.420 5X-0.024 0	16.74~837.00	1.000 0	1.20	3.99

**2.7 溶液稳定性的考察** 取供试品溶液按 2.1 项下色谱条件分别在 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样, 测定莪术二酮, 莪术醇, 牻牛儿酮, 莪术烯, 呋喃二烯, β-榄香烯峰面积, 莪术油 (批号 080320) 供试品溶液 6 种倍半萜成分峰面积 RSD 分别为 0.45%, 1.66%, 0.48%, 0.49%, 0.29%, 1.41%, 试验结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 重复性试验** 精密量取同一批号的莪术油 (批号 080320) 各 6 份, 依 2.3 项下方法分别制备供试品溶液, 测定莪术二酮, 莪术醇, 牻牛儿酮, 莪术烯, 呋喃二烯, β-榄香烯 6 种倍半萜类成分的含量并计算 RSD, 结果莪术油中 6 种成分的平均含量 (n=6) 分别为 170.93, 56.34, 86.92, 137.91, 162.41, 64.51 mg·g<sup>-1</sup>; RSD 依次为 0.44%, 0.64%, 0.20%, 0.41%, 0.47%, 1.29%。

**2.9 回收率试验** 精密称取已知含量的莪术油 (批号 080320) 约 20 mg, 共 6 份, 按被测成分含量分别加入对照品溶液 (莪术二酮 0.68 g·L<sup>-1</sup>、莪术醇 0.23 g·L<sup>-1</sup>、牻牛儿酮 0.31 g·L<sup>-1</sup>、莪术烯 0.56 g·L<sup>-1</sup>、呋喃二烯 0.60 g·L<sup>-1</sup>、β-榄香烯 0.20 g·L<sup>-1</sup>) 5 mL, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 依法测定峰面积并计算回收率, 结果见表 2。

**2.10 样品含量测定** 取各批次莪术油, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 用外标法计算莪术二酮、莪术醇、牻牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯、β-榄香烯的含量, 结果见表 3。

### 3 讨论

**3.1 色谱柱耐用性考察** 实验依正文色谱条件考察了 5 个厂家的色谱柱 ① Agilent Extend C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), ② Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), ③ Shimadzu Shimpack VP-ODS (4.6 mm×250 mm, 5 μm), ④ Ultimate<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm), ⑤ Kromasil KR-100 ODS (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 结果 5 个厂家的色谱柱均能

较好地分离莪术油中的主要色谱峰, 表明本方法对色谱柱无特殊要求, 普遍适用性良好。

**3.2 测定方法的确定** 莪术油中主要为单萜、倍半萜及其衍生物, 其中很多成分如: 呋喃二烯、牻牛儿酮、莪术二酮等具有不对称的 1,5-二烯结构受热易发生 [3,3]δ-迁移 (cope 重排), 对其进行 GC 研究时发现进样方式、温度、程序升温以及色谱柱选择的不同可使测定结果出现较大差异进而造成定量不准确, 故而选择 HPLC 作为含量测定方法<sup>[9]</sup>。

**3.3 检测波长的选择** DAD 扫描 (波长 200~400 nm) 表明莪术油中该 6 种倍半萜均为末端吸收, 根据 DAD 检测的三维色谱图、等吸收图综合考虑 6 种被测成分的吸收系数, 样品中相应成分含量, 干扰峰以及检测器灵敏度, 本研究确定 216 nm 作为检测波长。

**3.4 流动相组成、比例选择** 因被测成分 β-榄香烯极性远小于其他 5 种成分, 分配系数差异较大, 而呋喃二烯与莪术烯为异构体保留行为非常相似, 等度难以分离或无法达到基线分离, 实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水以及甲醇-乙腈-水梯度洗脱系统, 结果甲醇-水系统分离效果好, 但由于甲醇末端吸收, 导致基线噪音明显。乙腈-水系统基线较平、理论塔板数高, 但呋喃二烯与莪术烯分离效果不太理想, 而甲醇-乙腈-水三元梯度洗脱分析时间短、基线平、分离效果佳。经对比研究, 本研究的三元梯度洗脱程序为乙腈 (A)-甲醇 (B)-水 (C) (0~20 min, 30%~65% A, 40%~30% B; 21~30 min, 65% A, 30% B), 分离效果优于文献报道的二元梯度洗脱<sup>[6-7]</sup>。

本研究建立了测定莪术油中的主要活性成分莪术二酮, 莪术醇, 牻牛儿酮, 莪术烯, 呋喃二烯, β-榄香烯 6 种倍半萜类成分的 HPLC 方法, 并对 10 批莪术油的含量进行了测定, 结果 10 批样品中莪术醇、牻牛儿酮含量波动较小, 莪术二酮、莪术烯、呋喃二烯和 β-榄香烯的含量波动较大, 故同时测定莪术油

表2 莪术油加样回收率试验( $n=6$ )

被测成分	称样量/mg	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收/%	RSD/%
莪术二酮	20.07	3.43	3.40	6.80	99.10	98.46	0.92
	19.92	3.40	3.40	6.71	97.06		
	19.95	3.41	3.40	6.76	98.56		
	19.99	3.42	3.40	6.81	99.67		
	20.01	3.42	3.40	6.75	97.94		
	20.12	3.44	3.40	6.79	98.43		
莪术醇	20.07	1.13	1.13	2.32	105.30	103.88	1.14
	19.92	1.12	1.13	2.28	102.65		
	19.95	1.12	1.13	2.29	102.76		
	19.99	1.13	1.13	2.30	103.39		
	20.01	1.13	1.13	2.30	103.89		
	20.12	1.14	1.13	2.33	105.31		
牻牛儿酮	20.07	1.74	1.53	3.29	100.65	100.44	1.01
	19.92	1.73	1.53	3.29	101.87		
	19.95	1.73	1.53	3.25	99.01		
	19.99	1.74	1.53	3.27	100.00		
	20.01	1.74	1.53	3.27	99.91		
	20.12	1.75	1.53	3.30	101.17		
莪术烯	20.07	2.77	2.78	5.57	100.83	100.16	0.63
	19.92	2.75	2.78	5.55	100.91		
	19.95	2.75	2.78	5.53	100.10		
	19.99	2.76	2.78	5.53	99.60		
	20.01	2.76	2.78	5.52	99.35		
	20.12	2.77	2.78	5.56	100.15		
呋喃二烯	20.07	3.26	3.00	6.28	100.76	100.64	0.72
	19.92	3.24	3.00	6.29	102.01		
	19.95	3.24	3.00	6.25	100.27		
	19.99	3.25	3.00	6.25	100.31		
	20.01	3.25	3.00	6.25	99.96		
	20.12	3.27	3.00	6.28	100.53		
$\beta$ -榄香烯	20.07	1.27	1.02	2.31	101.68	102.28	1.60
	19.92	1.27	1.02	2.32	104.15		
	19.95	1.27	1.02	2.33	104.45		
	19.99	1.27	1.02	2.29	100.68		
	20.01	1.27	1.02	2.30	100.82		
	20.12	1.28	1.02	2.31	101.89		

表3 莪术油中6种倍半萜成分的含量测定( $n=2$ )mg·g<sup>-1</sup>

批号	莪术二酮	莪术醇	牻牛儿酮	莪术烯	呋喃二烯	$\beta$ -榄香烯
030101	174.24	45.77	84.85	176.68	122.98	23.61
050603	164.87	56.35	61.74	182.31	113.93	39.08
060101	137.97	57.47	59.71	195.90	110.09	42.94
060301	137.39	56.93	62.71	200.11	111.29	45.80
070101	177.98	49.93	73.37	162.49	135.45	48.44
071101	171.11	43.89	75.16	160.03	139.70	61.06
080320	170.93	56.34	86.92	137.91	162.41	64.51
080306	193.04	50.65	83.14	117.84	213.37	74.90
080407	181.22	56.77	82.06	149.78	187.51	66.30
080408	192.35	50.81	77.56	146.72	181.51	58.04

中多个主要成分的含量更有利于控制产品的质量。

# 原子吸收火焰法测定药用辅料山梨醇中的镍元素及其不确定度评价

吕尚<sup>1</sup>, 魏惠珍<sup>1</sup>, 饶毅<sup>1\*</sup>, 罗晓健<sup>2</sup>, 饶小勇<sup>1</sup>

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的: 以原子吸收火焰法测定药用辅料山梨醇中的镍元素, 并建立其不确定度评价。方法: 药用辅料山梨醇经甲基异丁酮提取后, 采用火焰-原子吸收光谱法测定镍元素, 并同时对该方法进行不确定度评价。结果: 对 2 个厂家共 12 批样品进行测定, 镍含量分别为 0.035 1, 0.027 3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 0.54%, 定量检测限为 0.02  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 回收率 100.15%, 专属性试验表明阴性样品无干扰。供试品溶液及原子吸收光谱仪不确定度贡献率分别为 84.01%, 15.99%。结论: 方法具有操作简单、灵敏度高、重现性好等优点, 能满足镍元素的测定要求, 为药用辅料山梨醇的质量控制提供依据。

**[关键词]** 火焰-原子吸收法; 山梨醇; 镍; 不确定度

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0052-04

## Determination of Niccolum in Officinal Accessories Sorbitol with Flame-atomic Absorption Spectroscopy and Measurement Uncertainty of the Method

LV Shang<sup>1</sup>, WEI Hui-zhen<sup>1</sup>, RAO Yi<sup>1\*</sup>, LUO Xiao-jian<sup>2</sup>, RAO Xiao-yong<sup>1</sup>

(1. The National Plarmaceutical Engineering Cenrer for Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine niccolum in sorbitol with flame-atomic absorption spectroscopy, and

**[收稿日期]** 20110321(001)

**[基金项目]** 中医药行业科研专项项目(200807032)

**[通讯作者]** \* 饶毅, 教授, 研究方向: 中药复方质量控制, Tel: 0791-7119609, E-mail: raoyi99@126.com

### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2005: 89.
- [2] 葛跃伟, 高慧敏, 王智民. 姜黄属药用植物研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2462.
- [3] Xiao Y, Yang F Q, Ling S P. Furanodiene induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK signaling and mitochondria-caspase pathway in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Cancer Bio. & Ther., 2007, 6(7): 1044.
- [4] Makabe H, Maru N, Kuwabara A, et al. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria* [J]. Nat Prod Res, 2006, 20: 680.
- [5] Sun X, Liu Z, Zheng Y, et al. Studies on the chemical constituents of sesquiterpenoids from *Curcuma wenyujin* [J]. Instrum. Anal, 2006, 25: 27.
- [6] 何欢, 马双成, 田颂九, 等. HPLC 测定莪术油及其注射液中 6 种成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(5): 593.
- [7] 何欢, 马双成, 张启明, 等. HPLC 替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中 6 种成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1892.
- [8] Nicolas B, Felix T, Joseph C. Identification and quantitative determination of furanodiene, a heat-sensitive compound, in essential oil by <sup>13</sup>C-NMR [J]. Phytochem. Anal, 2001, 12: 58.
- [9] 林观样, 潘晓军, 蔡进章. 低温冷藏对原料用温莪术中挥发油的影响 [J]. 天津药学, 2006, 18(3): 4.

[责任编辑 蔡仲德]