

# 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\*

何欢, 马双成<sup>\*\*</sup>, 张启明, 田颂九

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

**摘要** 目的: 建立 HPLC 替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中 6 种成分含量。方法: 本文采用 HPLC 方法, 在不同条件下测定= 牛儿酮与其他 5 种成分 (莪术二酮、莪术醇、莪术烯、呋喃二烯及  $\beta$ - 榄香烯) 间的相对校正因子 (RCF)。以上述 6 种成分为指标, 分别利用替代对照品法和常规含量测定方法对莪术油及其注射液进行含量测定。色谱条件: 采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱, 流动相为甲醇 - 水, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 215 nm。结果: 以替代对照品法测得的结果与常规含量测定方法结果一致。结论: 本试验在高效液相色谱仪上使用替代对照品法同时测定了莪术油及其注射液中的 6 种成分的含量, 结果证明, 本方法经济实用, 可以高效、准确地对莪术油及其注射液进行质量控制。

**关键词:** HPLC; 替代对照品法; 莪术油; 莪术油注射液; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254- 1793(2009) 11- 1892- 08

## Simultaneous determination by HPLC of 6 components in zedoary turmeric oil and its related injections with replacement method of chemical reference substance\*

HE Huan, MA Shuang- cheng<sup>\*\*</sup>, ZHANG Qi- ming, TIAN Song- jiu

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective** To establish and validate an HPLC method with single marker to simultaneously determine six components in zedoary turmeric oil and its related injections. **Methods** The relative correction factors (RCF) of the five components (curdione, curcumin, curzerone, furanodiene,  $\beta$ - elemene) were measured by HPLC under different conditions with germacrone as standard reference. Assay of zedoary turmeric oil and its related injections was determined by replacement method of chemical reference substance and the conventional HPLC method with the above six components as the index components. The analysis was performed on a Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m) column. The mobile phase was composed of methanol-water with a linear gradient elution. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the temperature of column was 30 °C; The UV detection wavelength was set at 215 nm.

**Results** The quantitative results of the new method were almost consistent with the results of conventional HPLC method. **Conclusion** For the first time, the replacement method of chemical reference substance is adopted in HPLC simultaneous determination of zedoary turmeric oil and its related injections. The new method is economical and practical which is highly effective and accurate for quality control of zedoary turmeric oil and its related injections.

**Key words** HPLC; replacement method of chemical reference substance; zedoary turmeric oil; zedoary turmeric oil injection; assay

现行中国药典、部颁及局颁药品标准收录了大量应用中药化学对照品及对照药材的检验项目。然而, 由于中药的品种繁多, 成分复杂, 从含量很低的药材中提取、分离、制备标准物质, 对分离、制备技术

及成本要求很高<sup>[1]</sup>。因此, 目前中药化学对照品的品种和数量远远不能满足药品的监督检验、质量标准的研究与提高, 以及新药研制等方面的要求。在很大程度上, 中药标准物质品种和质量的相对滞后,

\* 国家十一五科技支撑计划: 常见与重要药品安全标准研究 (2006BA114B01)

\*\* 通讯作者 Tel: (010) 67095272, E-mail: mshuangcheng@yahoo.com

已成为中药标准制定与提高的制约因素。

莪术油、莪术油注射液及莪术油葡萄糖注射液在抗病毒、抗肿瘤方面有显著疗效<sup>[2]</sup>, 收载于中国药典。目前, 已从莪术油中分离鉴定成分 30 余种<sup>[3-7]</sup>, 但莪术油及其注射液的含量测定仅用单一成分作为质量控制指标, 且莪术油及其注射液的指标成分不一致。另外, 莪术油与其注射液的含量测定方法也不一致。如中国药典 2005 年版规定: 莪术油的含量测定方法采用 HPLC 法, 以  $\beta$ - 牛儿酮作为指标; 莪术油注射液及莪术油葡萄糖注射液的含量测定方法均为紫外分光光度法, 以莪术醇作为指标。但莪术醇不稳定, 与莪术二酮可以相互转化<sup>[8]</sup>, 而且目前莪术醇的抗癌活性也存在较大争议<sup>[9]</sup>。因此, 如何建立起一个专属性好、灵敏度高, 能够科学合理控制莪术油及其注射液质量的质量标准成为该药研究的一个重点。

为解决对照品短缺问题以及进一步完善质量标准, 参考有关文献<sup>[10]</sup>, 本文提出用替代对照品同时对莪术油及其注射液中多种成分进行含量测定的方法。该方法只需测定其中 1 个易得到而稳定的成分 ( $\beta$ - 牛儿酮), 利用其余 5 种待测成分 (莪术二酮、莪术醇、莪术烯、呋喃二烯、 $\beta$ - 榄香烯) 与它的相对校正因子 (RCF) 来计算其含量。6 种成分的化学结构式见图 1。

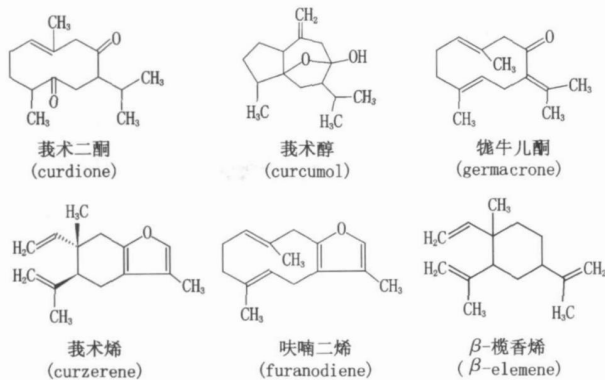


图 1 6 种成分的结构示意图

Fig 1 Chemical structures of 6 components

### 1 仪器与试剂

色谱仪 (均为多元低压梯度): Waters 2690-2487 高效液相色谱仪 (色谱仪 1), Shimadzu LC-10ATvp (色谱仪 2), Agilent 1100 Series (色谱仪 3); 色谱柱: Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (色谱柱 1), Waters Atlantis C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (色谱柱 2), Alltima C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (色谱柱 3), Inertsil ODS-P (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (色谱柱 4); Waters Symmetry

C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) (色谱柱 5), Mettler AE240 十万分之一天平。

对照品: 莪术醇 (批号 100185-200506 按含量 100% 折算)、 $\beta$ - 牛儿酮 (批号 111665-200401, 按含量 94.96% 折算)、 $\beta$ - 榄香烯 (批号 100268-200401, 按含量 99.2% 折算) 均购自中国药品生物制品检定所, 莪术烯 (含量按 100% 计)、呋喃二烯 (含量按 100% 计)、莪术二酮 (含量按 100% 计) 由澳门大学李绍平教授提供。

样品: 10 批莪术油, 其中 7 批由浙江天瑞制药股份有限公司提供, 3 批由达州市天然植物药业有限公司提供; 15 批莪术油注射液样品, 分别由哈尔滨三联药业有限公司、黑龙江迪龙制药有限公司、浙江天瑞药业有限公司、华夏药业有限公司、黑龙江瑞格制药和徐州莱恩药业有限公司提供; 12 批莪术油葡萄糖注射液样品, 分别由黑龙江迪龙制药有限公司、四川科伦药业股份有限公司、丽珠集团利民制药有限公司和山东鲁抗辰欣药业有限公司提供。

试剂: 甲醇为色谱纯, 水为去离子水 (Millipore 超纯水系统制备)。

### 2 溶液的制备

2.1 系列浓度混合对照品溶液 精密称取对照品莪术二酮 34.71 mg 莪术醇 47.53 mg  $\beta$ - 牛儿酮 49.71 mg 莪术烯 41.25 mg 呋喃二烯 50.46 mg 及  $\beta$ - 榄香烯 47.75 mg 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为单一对照品对照品储备液。分别精密吸取上述 6 个储备液 1, 1, 1, 1, 2, 2 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释成分别含莪术二酮、莪术醇、 $\beta$ - 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯及  $\beta$ - 榄香烯 347.1, 475.3, 497.1, 412.5, 1009.2, 955 μg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 作为混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 即得系列浓度混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液 取莪术油 0.1 g 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得莪术油供试品溶液; 精密量取莪术油注射液 1 mL, 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得莪术油注射液供试品溶液; 取莪术油葡萄糖注射液即得莪术油葡萄糖注射液供试品溶液。

### 3 色谱条件与系统适用性

色谱柱: Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0~14 min, 78% A; 14~19 min, 78% A → 90% A;

19~50 min, 90% A); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 215 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。理论塔板数按= 牛儿酮峰计算不应低于 5000。莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯及 β- 榄香烯色谱峰与其相邻峰的分离度在 1.5~ 5.8 范围内。色谱图见图 2

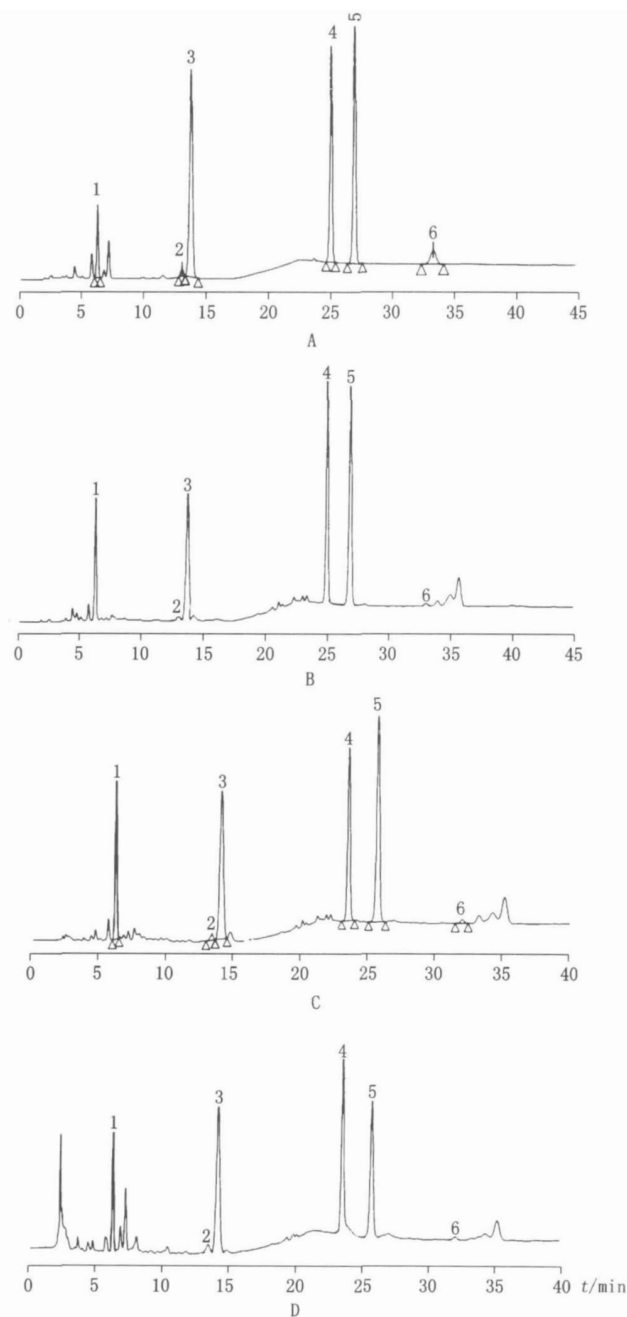


图 2 对照品 (A)、莪术油 (B)、莪术油注射液 (C) 及莪术油葡萄糖注射液 (D) HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substance (A), zedoary turmeric oil (B), zedoary turmeric oil injection (C) and zedoary turmeric oil and glucose injection (D)

1 莪术二酮 (curdione) 2 莪术醇 (curcuminol) 3 = 牛儿酮 (gemanone) 4 莪术烯 (curzerene) 5 呋喃二烯 (furanodiene) 6 β- 榄香烯 (β-elemene)

#### 4 基本原理

在一定的范围 (线性范围) 内成分的量 (质量或浓度) 与检测器响应成正比, 即:  $f = W/A^{[11]}$ 。在多指标质量评价时, 以样品中某一典型成分 (有对照品供应者) 为替代对照品, 建立该成分与其他成分间的相对校正因子 RCF, 如:

$$f_{is} = \frac{f_i}{f_s} = \frac{W_i \times A_s}{W_s \times A_i} = \frac{C_i \times V_i \times A_s^{[12-13]}}{C_s \times V_s \times A_i}$$

$f_{is}$  为待测成分  $i$  相对于替代对照品  $s$  的相对校正因子 (RCF);  $C$  为对照品的浓度;  $C_s$  为替代对照品的浓度;  $A_i$  为对照品的峰面积;  $A_s$  为替代对照品的峰面积;  $V$  为对照品溶液体积;  $V_s$  为替代对照品溶液体积。

测定样品时, 用替代对照品进行测定, 被测样品浓度:

$$C = f \times \frac{A}{A_s/C_s}$$

$A$  为被测样品峰面积。根据测定结果, 观察替代对照品进行药品质量控制的可行性。

#### 5 方法学考察

5.1 线性关系的考察 精密吸取上述混合对照品储备液和系列浓度混合对照品溶液 20 μL 进样, 每个浓度进样 3 次, 取平均值。按色谱条件测定峰面积, 以峰面积  $Y$  为纵坐标, 以对照品浓度  $X$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标, 求得莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯和 β- 榄香烯的线性回归方程分别为:

$$Y = 1.503 \times 10^4 X + 850.4 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 8.120 \times 10^3 X + 633.5 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 6.034 \times 10^4 X + 8.611 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 8.208 \times 10^3 X + 8.661 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 5.477 \times 10^4 X + 2.179 \times 10^4 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 4.170 \times 10^3 X + 443.2 \quad r = 0.9999$$

结果表明: 上述 6 个成分进样浓度分别在 1.74~347.0, 2.38~475.0, 2.49~497.0, 2.07~826.0, 5.05~1009, 4.78~955.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好。

#### 5.2 校正因子的测定及测定方法的耐用性考察

根据样品的线性范围, 精密吸取系列浓度混合对照品溶液 20 μL 进样测定, 每个浓度进样 3 次, 取平均值。以= 牛儿酮为替代对照品 (S), 莪术二酮、莪术醇、莪术烯、呋喃二烯、β- 榄香烯为待测成分

( $i$ ), 按公式  $f_{is} = \frac{f_i}{f_s} = \frac{W_i \times A_s}{W_s \times A_i} = \frac{C_i \times V_i \times A_s}{C_s \times V_s \times A_i}$  计算系

列浓度下的  $f_{is}$  得到同一待测成分 ( $i$ ) 系列浓度下  $f_{is}$  的平均值, 即= 牛儿酮对莪术二酮、莪术醇、莪术

烯、呋喃二烯、β- 榄香烯的相对校正因子 (RCF)。

5.2.1 不同品牌同类型色谱柱对 RCF 值测定的影响 HPLC 测定时会用到不同品牌的同类型色谱柱。使用同一台液相色谱仪 Waters 2690- 2487 高效液相色谱仪 (色谱仪 1), 分别用 4 种不同品牌相

同尺寸相同填料的色谱柱测定对照品= 牛儿酮和其他 5 种对照品标准曲线的斜率, 计算 RCF 见表 2 考察更换不同色谱柱对 RCF 值的影响。由表 1 可以看出在同一台高效液相色谱仪上, 更换不同品牌的色谱柱对 RCF 值影响不大。

表 1 不同品牌同类型色谱柱对 RCF 值测定的影响

Tab 1 RCFs in different HPLC columns

色谱柱 (column)	$f_{\text{莪术二酮}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curdione}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{莪术醇}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curcumenol}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{莪术烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curzerene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{呋喃二烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{furanodiene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\beta\text{-榄香烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\beta\text{-elemene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )
1	4.0420	7.4628	7.3763	1.1081	14.6050
2	4.1009	7.4447	7.3792	1.1001	14.5287
3	4.2134	7.4541	7.3876	1.0875	14.4113
4	4.1062	7.5990	7.4766	1.0967	14.4936
平均值 (average)	4.1156	7.4901	7.4049	1.0981	14.5097
RSD %	1.5	1.0	0.7	0.8	0.6

5.2.2 不同柱温对 RCF 值测定的影响 HPLC 的柱温箱存在偏差, 用同一台液相色谱仪 Waters 2690- 2487 高效液相色谱仪 (色谱仪 1), 分别在 25, 27, 30, 35 °C 用相同的色谱柱 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250

mm, 5 μm) (色谱柱 1) 测定对照品= 牛儿酮和其他 5 种对照品标准曲线的斜率, 计算 RCF 见表 2 考察不同柱温对 RCF 值的影响。由表 2 可以看出, 在同一台高效液相色谱仪上, 柱温变化对 RCF 值影响不大。

表 2 柱温变化对 RCF 值测定的影响

Tab 2 RCFs in different column temperatures

温度 (temperature) /°C	$f_{\text{莪术二酮}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curdione}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{莪术醇}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curcumenol}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{莪术烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curzerene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{呋喃二烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{furanodiene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\beta\text{-榄香烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\beta\text{-elemene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )
20	4.0220	7.4428	7.3563	1.1001	14.5047
25	4.0530	7.5477	7.3648	1.1005	14.4759
27	4.1219	7.4502	7.3664	1.0981	14.5131
30	4.0420	7.4628	7.3763	1.1081	14.6050
35	4.1323	7.6469	7.4625	1.1296	14.4979
平均值 (average)	4.0743	7.5101	7.3852	1.1073	14.5193
RSD %	1.2	1.2	0.6	1.2	0.3

5.2.3 不同液相色谱仪对 RCF 值测定的影响 用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250mm, 5 μm) 柱, 分别在 3 台高效液相色谱仪: Waters 2690- 2487 (色谱仪 1)、Shimadzu LC- 10ATvp (色谱仪 2) 和 Agilent 1100 Series (色谱仪 3) 上测定, 计算 RCF 值, 结果见

表 3。由表 3 可以看出, 不同高效液相色谱仪对 RCF 值影响不大。在实际检验工作中, 不同色谱柱和不同仪器是主要变化因素, 用“不同品牌同类型色谱柱”和“不同液相色谱仪”求得的 RCF 平均值计算, 见表 4。

表 3 不同液相色谱仪对 RCF 值测定的影响

Tab 3 RCFs in different HPLC instruments

仪器 (instrument)	$f_{\text{莪术二酮}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curdione}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{莪术醇}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curcumenol}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{莪术烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curzerene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\text{呋喃二烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\text{furanodiene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )	$f_{\beta\text{-榄香烯}}/f_{\text{牛儿酮}}$ ( $f_{\beta\text{-elemene}}/f_{\text{gemma crone}}$ )
1	4.0420	7.4628	7.3763	1.1081	14.5047
2	4.0863	7.5990	7.5864	1.1267	14.6636
3	3.9569	7.4509	7.5066	1.1124	14.5301
平均值 (average)	4.0284	7.5042	7.4898	1.1157	14.5661
RSD %	1.6	1.1	1.4	0.9	0.6

表 4 不同液相色谱仪与不同品牌同类型色谱柱的 RCF 平均值

Tab 4 RCFs average value in different HPLC instruments and columns

影响因素 (influencing factors)	$f_{\text{莪术二酮}}/f_{\text{= 牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curdione}}/f_{\text{gemacron}}$ )	$f_{\text{莪术醇}}/f_{\text{= 牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curcumenol}}/f_{\text{gemacron}}$ )	$f_{\text{莪术烯}}/f_{\text{= 牛儿酮}}$ ( $f_{\text{curzerene}}/f_{\text{gemacron}}$ )	$f_{\text{呋喃二烯}}/f_{\text{= 牛儿酮}}$ ( $f_{\text{furanodiene}}/f_{\text{gemacron}}$ )	$f_{\beta\text{- 榄香烯}}/f_{\text{= 牛儿酮}}$ ( $f_{\beta\text{- elemene}}/f_{\text{gemacron}}$ )
1	4.1156	7.4901	7.4049	1.0981	14.5097
2	4.0284	7.5042	7.4898	1.1157	14.5661
平均值 (average)	4.0720	7.4972	7.4473	1.1069	14.5379

注 (note): 1- 不同品牌同类型色谱柱 RCF 平均值 (RCFs average value in different HPLC columns); 2- 不同液相色谱仪 RCF 平均值 (RCFs average value in different HPLC instruments)

**5.3 检测限与定量限** 逐级稀释各单一对照品对照品储备液, 按 3 倍信噪比 ( $SN = 3$ ) 计算莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯和  $\beta$ - 榄香烯的检测限分别为 0.85, 2.38, 0.50, 2.07, 0.51, 6.69  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 按 10 倍信噪比 ( $SN = 10$ ) 计算上述 6 个成分的定量限分别为 3.25, 9.50, 1.49, 8.26, 2.02, 19.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**5.4 精密度试验** 精密吸取同一莪术油供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯和  $\beta$ - 榄香烯的 RSD ( $n = 6$ ) 分别在 0.4%, 1.0%, 0.5%, 1.0%, 0.4%, 0.7%。

**5.5 重复性试验** 按“2.2”项下方法制备 3 种样品的供试品溶液各 6 份。分别在本文色谱条件下试验, 计算含量。结果莪术油样品中莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯和  $\beta$ - 榄香烯的平均含量 ( $n = 6$ ) 为 181.30, 22.04, 78.35, 536.54, 141.75, 25.04  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; RSD 分别为 0.2%, 1.3%, 0.5%, 0.2%, 0.3%, 1.1%。莪术油注射液样品中上述 6 个成分的平均含量 ( $n = 6$ ) 分别为 1.82, 0.30, 0.78, 6.79, 1.15, 0.34  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; RSD 分别为 0.6%, 0.8%, 0.7%, 0.8%, 0.6%, 1.0%。莪术油葡萄糖注射液样品中上述 6 个成分的平均含量 ( $n = 6$ ) 分别为 0.07, 0.02, 0.04, 0.28, 0.04, 0.02  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; RSD 分别为 0.9%, 0.6%, 1.2%, 1.2%, 1.2%, 1.2%。

**5.6 供试品溶液稳定性试验** 精密量取供试品溶液 20  $\mu\text{L}$  分别于配制后的 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 h 测定峰面积。结果莪术油供试品溶液中莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯和  $\beta$ - 榄香烯峰面积的 RSD ( $n = 8$ ) 分别为 0.4%, 1.2%, 0.5%, 0.9%, 0.4%, 1.0%; 莪术油注射液供试品溶液中上述 6 个成分峰面积的 RSD ( $n = 8$ ) 分别为 0.1%,

1.3%, 0.3%, 0.3%, 0.8%, 1.8%; 莪术油葡萄糖注射液供试品溶液中上述 6 个成分峰面积的 RSD ( $n = 8$ ) 分别为 0.3%, 0.3%, 0.5%, 1.7%, 1.2%, 1.5%。表明 3 种样品的供试品溶液均于 36 h 内稳定。

**5.7 加样回收率试验** 精密称取“5.5”项下已测知含量的莪术油样品约 0.125 g 共 9 份, 分别置 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 按 80%, 100%, 120% 浓度分别添加一定量的对照品, 用甲醇定容, 摇匀, 测定, 计算回收率; 精密量取“5.5”项下已测知含量的的莪术油注射液 5 mL 共 9 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 按 80%, 100%, 120% 浓度分别添加一定量的对照品, 用甲醇定容, 摇匀, 测定, 计算回收率; 精密量取“5.5”项下已测知含量的的莪术油葡萄糖注射液 5 mL 置 10 mL 量瓶中, 共 9 份, 按 80%, 100%, 120% 浓度分别添加一定量的对照品, 用甲醇定容, 摇匀, 测定, 计算回收率。结果见表 5。

## 6 样品含量测定

**6.1 外标法** 精密称取 6 种对照品适量, 加甲醇制成莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯及  $\beta$ - 榄香烯浓度分别为 0.03, 0.03, 0.06, 0.07, 0.06, 0.07  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合溶液, 作为对照品溶液。精密量取此对照品溶液及供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 在本文色谱条件下进样测定, 以外标法计算上述 6 种成分含量。结果见表 6~8。

**6.2 替代对照品法** 精密称取 = 牛儿酮对照品适量, 加甲醇制成 0.07  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 作为对照品溶液。精密量取此对照品溶液及供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 在本文色谱条件下进样测定, 以替代对照品法计算莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯及  $\beta$ - 榄香烯 6 种成分含量。结果见表 6~8。

表 5 莪术油及其注射液加样回收率试验结果 (n = 9)

Tab 5 Results of average recoveries of zedoary turmeric oil and its related injections

名称 (name)	莪术油 (zedoary turmeric oil)		莪术油注射液 (zedoary turmeric oil injection)		莪术油葡萄糖注射液 (zedoary turmeric oil and glucose injection)	
	平均回收率 (average recovery) %		平均回收率 (average recovery) %		平均回收率 (average recovery) %	
	RSD %		RSD %		RSD %	
莪术二酮 (curdione)	100.2	1.0	100.7	1.2	100.9	1.7
莪术醇 (curcuminol)	99.16	0.88	99.72	1.2	100.3	1.4
= 牛儿酮 (gemacronolide)	99.94	0.71	100.7	1.4	100.8	2.1
莪术烯 (curzerene)	101.7	0.9	99.95	0.8	100.4	0.4
呋喃二烯 (furanodiene)	100.4	0.8	99.53	0.9	100.1	0.5
β-榄香烯 (β-elemene)	99.63	0.9	98.49	1.1	98.15	1.5

表 6 2种方法测定莪术油的含量 (mg g<sup>-1</sup>)

Tab 6 Comparison of contents of zedoary turmeric oil by two methods

编号 (No.)	莪术二酮 (curdione)		莪术醇 (curcuminol)		= 牛儿酮 (gemacronolide)		莪术烯 (curzerene)		呋喃二烯 (furanodiene)		β-榄香烯 (β-elemene)	
	a		b		a		a		b		a	
	b		a		b		b		a		b	
1	182.61	183.69	22.21	22.36	78.49	543.04	547.39	140.37	141.18	25.74	25.94	
2	181.36	182.44	24.22	24.38	73.59	505.61	509.69	133.64	134.34	32.83	33.03	
3	168.25	169.21	25.57	25.74	72.11	509.03	513.12	133.51	134.21	30.54	30.74	
4	177.65	178.69	26.57	26.83	74.17	509.82	513.90	134.34	135.04	29.59	29.69	
5	166.94	167.90	25.64	25.82	72.15	495.38	499.38	141.40	142.19	30.03	30.23	
6	173.21	174.36	—	—	52.74	50.07	50.42	217.77	218.99	10.68	10.68	
7	194.29	194.99	—	—	62.30	65.23	65.75	222.96	224.18	14.39	14.49	
8	170.09	171.13	24.63	24.80	71.53	426.24	429.72	146.12	146.90	34.54	34.74	
9	140.14	140.92	14.48	14.57	64.35	390.49	393.71	175.78	176.73	28.21	28.31	
10	153.21	154.06	26.93	27.11	69.61	741.11	747.02	117.24	117.85	49.02	49.22	

注 (note): a- 外标法 (external standard method); b- 替代对照品法 (replacement method of chemical reference substance); “—”: 未检出 (undetected)

表 7 2种方法测定莪术油注射液的含量 (mg mL<sup>-1</sup>)

Tab 7 Comparison of contents of zedoary turmeric oil injection by two methods

编号 (No.)	莪术二酮 (curdione)		莪术醇 (curcuminol)		= 牛儿酮 (gemacronolide)		莪术烯 (curzerene)		呋喃二烯 (furanodiene)		β-榄香烯 (β-elemene)	
	a		b		a		a		b		a	
	b		a		b		b		a		b	
1	1.83	1.84	0.30	0.30	0.81	6.72	6.78	1.29	1.29	0.36	0.36	
2	1.81	1.82	0.30	0.31	0.78	6.81	6.86	1.15	1.16	0.33	0.33	
3	1.84	1.85	0.30	0.30	0.79	6.66	6.71	1.29	1.29	0.35	0.35	
4	1.98	1.99	0.47	0.48	1.00	8.53	8.60	1.52	1.53	0.52	0.53	
5	1.99	2.00	0.45	0.45	1.00	8.50	8.57	1.51	1.52	0.50	0.50	
6	1.99	2.00	0.47	0.48	0.99	8.68	8.75	1.52	1.53	0.54	0.55	
7	1.98	2.00	0.33	0.33	0.88	6.09	6.14	1.36	1.37	0.32	0.32	
8	1.99	2.00	0.33	0.33	0.87	6.15	6.20	1.37	1.38	0.34	0.34	
9	1.99	2.00	0.34	0.34	0.87	6.14	6.18	1.36	1.36	0.32	0.33	
10	1.58	1.59	0.46	0.47	0.76	8.21	8.27	0.66	0.66	0.44	0.44	

续表 7

编号 (No)	莪术二酮 (curdione)		莪术醇 (curumol)		= 牛儿酮 (gemacrone)	莪术烯 (curzerene)		呋喃二烯 (furanodiene)		β- 榄香烯 (β-elemene)	
	a	b	a	b	a	a	b	a	b	a	b
11	1.54	1.55	0.44	0.44	0.89	8.23	8.30	0.66	0.66	0.41	0.41
12	1.57	1.58	0.48	0.48	0.76	8.19	8.26	0.66	0.67	0.41	0.41
13	1.84	1.85	0.31	0.31	0.81	5.56	5.60	1.52	1.53	0.32	0.32
14	1.84	1.85	0.29	0.30	0.82	5.25	5.29	1.52	1.53	0.33	0.33
15	1.98	2.00	0.38	0.38	0.89	7.06	7.12	1.38	1.38	0.36	0.36

注 (note): a- 外标法 (external standard method); b- 替代对照品法 (replacement method of chemical reference substance)

表 8 2种方法测定莪术油葡萄糖注射液的含量 (mg mL<sup>-1</sup>)

Tab 8 Comparison of contents of zedoary turmeric oil and glucose injection by two methods

编号 (No)	莪术二酮 (curdione)		莪术醇 (curumol)		= 牛儿酮 (gemacrone)	莪术烯 (curzerene)		呋喃二烯 (furanodiene)		β- 榄香烯 (β-elemene)	
	a	b	a	b	a	a	b	a	b	a	b
1	0.07	0.07	0.02	0.02	0.04	0.28	0.28	0.04	0.04	0.02	0.02
2	0.06	0.06	0.02	0.02	0.04	0.28	0.28	0.04	0.04	0.01	0.02
3	0.06	0.06	0.02	0.02	0.03	0.27	0.27	0.03	0.03	0.02	0.02
4	0.07	0.07	0.02	0.02	0.04	0.26	0.26	0.04	0.04	0.02	0.02
5	0.07	0.07	0.02	0.02	0.04	0.22	0.23	0.03	0.03	0.02	0.02
6	0.07	0.07	0.02	0.02	0.04	0.24	0.24	0.03	0.03	0.01	0.01
7	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.20	0.20	0.02	0.02	0.02	0.02
8	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.20	0.20	0.02	0.02	0.02	0.02
9	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.21	0.21	0.02	0.02	0.02	0.02
10	0.06	0.06	0.02	0.02	0.04	0.23	0.23	0.04	0.04	0.02	0.02
11	0.06	0.06	0.02	0.02	0.04	0.23	0.23	0.04	0.04	0.02	0.02
12	0.06	0.06	0.02	0.02	0.04	0.23	0.23	0.04	0.04	0.02	0.02

注 (note): a- 外标法 (external standard method); b- 替代对照品法 (replacement method of chemical reference substance)

### 6.3 莪术油及其注射液含量测定外标法与替代对照品法比较

将以外标法和替代对照品法分别测定的 10批莪术油、15批莪术油注射液、12批莪术油葡萄糖注

射液中莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯及 β- 榄香烯的含量结果 (表 6~ 8) 分别进行配对样本的 *t* 检验, 结果显示 *p* 值均大于 0.05, 无显著性差异, 见表 9。

表 9 配对 *t* 检验

Tab 9 Paired *t* test

样品 (sample)	莪术二酮 (curdione)	莪术醇 (curumol)	= 牛儿酮 (gemacrone)	莪术烯 (curzerene)	呋喃二烯 (furanodiene)	<i>t</i> <sub>0.05/2, n-1</sub>
莪术油 (zedoary turmeric oil) <i>n</i> = 10	2.154	0.708	0.521	1.328	0.853	2.262
莪术油注射液 (zedoary turmeric oil injection) <i>n</i> = 15	1.692	1.287	1.565	0.996	1.288	2.145
莪术油葡萄糖注射液 (zedoary turmeric oil and glucose injection) <i>n</i> = 12	1.281	2.127	2.029	1.203	0.667	2.201

## 7 讨论与结论

7.1 目前, 中药注射剂质量标准是借鉴化学药品注射剂的质量控制模式, 但由于中药注射剂又有自己的多组分特色, 因此, 如何建立起一个专属性好、灵

敏度高, 能够科学合理控制药品质量的质量标准成为中药注射剂研究的一个重点。针对中药中化学对照品不易获得的问题, 本试验以莪术二酮、莪术醇、= 牛儿酮、莪术烯、呋喃二烯及 β- 榄香烯 6种成分

作为含量测定的指标成分, 利用替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中 6 种成分, 并将该法测定结果与相同液相色谱测定条件常规外标法的测定结果进行比较, 发现 2 种测定结果基本一致。

7.2 本试验用= 牛儿酮作替代对照品, 建立该成分与其他 5 种成分间的相对校正因子 (RCF) 是由于= 牛儿酮的纯品与其他成分的纯品相比较易获得, 而且在莪术油中含量较高, 具有药理活性, 对癌细胞有一定的抑制<sup>[9]</sup>。

7.3 在相对校正因子的耐用性考察中, 不同试验条件下= 牛儿酮与其他 5 种成分间的相对校正因子有较好的重现性 (RSD 均 < 2%), 说明用替代对照品法进行中药及其制剂的质量控制是可行的、实用的。

### 7.4 色谱条件的选择

7.4.1 色谱柱的选择 C<sub>18</sub>柱对莪术油中成分的分 离效果较好<sup>[10]</sup>, 但莪术油中化学成分复杂, 相同品牌相同填料不同长度的色谱柱对莪术油的分离效果有明显差别。本试验分别采用 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (色谱柱 1) 和 Waters Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) (色谱柱 5) 2 根色谱柱, 在相同的色谱条件下进行试验, 结果发现经过色谱柱 5 莪术醇与= 牛儿酮两色谱峰分离度达不到要求, 说明色谱柱长度对于莪术油及其注射液的分离有显著影响, 最终试验均选用长 250 mm 的色谱柱。

7.4.2 检测波长的选择 莪术油中主要成分为末端吸收, 参考有关文献<sup>[10]</sup>, 确定 215 nm 作为检测波长。

7.4.3 流动相的选择 本文分别对乙腈-水、乙腈-磷酸溶液 (0.1%)、甲醇-水、甲醇-磷酸溶液 (0.1% ~ 0.4%) 梯度洗脱分离样品的效果进行了考察, 结果发现, 甲醇-水较好分离。有研究采用甲醇-水等度洗脱<sup>[10]</sup>, 但发现等度洗脱时莪术醇与= 牛儿酮的分离度不理想, 经过摸索最终确定了本文所述的梯度洗脱条件。

7.5 供试品溶液制备方案的选择 莪术油(葡萄糖)注射液处方中, 莪术油注射液约含莪术油 10 mg·mL<sup>-1</sup>, 莪术油葡萄糖注射液约含莪术油 0.4 mg·mL<sup>-1</sup>。根据供试品溶液中待测 6 种化合物的分离度及峰面积, 确定供试品制备的浓度。由于莪术油不易溶于水, 易溶于甲醇、乙醇等, 制备供试品时选甲醇作为溶剂。

### 参考文献

1 WANG Zhi-min(王智民). Chemical reference substances and standard materials are one of the key bottleneck of Chinese herbal medicine industry(中药化学对照品和标准品是中药行业快速发展的瓶颈之一). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2006, 26

(10): 1527  
 2 ZHAO Yi(赵艺), YANG Ru-gang(杨汝刚), LUO M in(罗岷). Studies on the Pharmacological effects and clinical application of zedoary turmeric oil(莪术油的药理作用及临床应用研究进展). *J Pract Tradit Chin Intern Med*(实用中医内科杂志), 2006, 20(2): 125  
 3 YANG M in-yan(汤敏燕), SUN Ling-feng(孙凌峰), WANG Hong-wu(汪洪武). Study on the chemical constituents of essential oil from Chinese traditional drug Eshu (tubers of Curcuma) (中药莪术挥发油化学成分的研究). *Chem Ind Forest Prod*(林产化学与工业), 2000, 20(3): 65  
 4 H k i n o H, M e g u r o K, S a k u r a l Y, et al Structure of Curumol *Chem Pharm Bull* 1965, 13(12): 1484  
 5 H k i n o H, M e g u r o K, S a k u r a l Y, et al Structure of Curumol *Chem Pharm Bull* 1966, 14(11): 1241  
 6 GUO Yong-tian(郭永田), WU Xiu-ying(吴秀英), CHEN Yu-ren(陈玉仁). Isolation and identification of elemene in zedoary turmeric oil 莪术挥发油中榄香烯的分离与鉴定. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1985, 8(3): 31  
 7 Yang FQ, Li SP, Chen Y, et al Identification and quantitation of eleven sesquiterpenes in three species of Curcuma rhizomes by pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2005, 39: 552  
 8 Yang FQ, Li SP, Zhao J et al Optimization of GC-MS conditions based on resolution and stability of analytes for simultaneous determination of nine sesquiterpenoids in three species of Curcuma rhizomes. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 43: 73  
 9 WANG Yan(王琰), WANG Mu-zou(王慕邹). Study on the quality of Rhizoma Curcumae(莪术的质量研究). *Acta Pharm Sin*(药学报), 2001, 36(11): 849  
 10 ZHANG Hu(张慧), SUN Xiu-yan(孙秀燕), ZHENG Yan-ping(郑艳萍). RP-HPLC simultaneous determination of six constituents of sesquiterpenoids in oil of Curcuma wenyujin(RP-HPLC法分离分析莪术油中 6 种倍半萜类成分). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(12): 1993  
 11 XIE Yuan-chao(谢元超), JIN Shao-hong(金少鸿). Determination of Radix Salviae Miltiorrhizae and compound Danshen tablets by substitute reference substance(替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(4): 497  
 12 ZHU Jing-jing(朱晶晶), WANG Zhi-min(王智民), KUANG Yan-hui(匡艳辉), et al A quantitative method using one marker for simultaneous assay of ginsenosides in Panax ginseng and P. notoginseng(一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量). *Acta Pharm Sin*(药学报), 2008, 43(12): 1211  
 13 WEI Feng(魏峰), LI Qi-yan(李启艳), MA Ling-yun(马玲云), et al Simultaneous determination of 6 isoflavones in traditional Chinese medicine and functional foods with replacement method of chemical reference substance(对照品替代法同时测定中药和保健食品中 6 种大豆异黄酮类成分的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(5): 725

(本文于 2009 年 10 月 23 日修改回)