

GC – MS 测定莪术油聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒中 4 个成分的含量*

陈旭¹, 曾建红^{**}, 林家逊¹, 罗小勤², 覃万玲²

(1. 桂林医学院药学院 桂林 541002; 2. 广西万丰药业有限公司 桂林 541000)

摘要 目的: 建立测定莪术油聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒(ZTO – PBCA – NP) 中莪术油的主要成分 β – 榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮含量的气相色谱 – 质谱方法。**方法:** 采用 HP – 5MS 毛细管色谱柱(30.0 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m), 进样温度 250 $^{\circ}$ C, 不分流; 程序升温: 初始 65 $^{\circ}$ C 恒温 2 min, 以 5 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 90 $^{\circ}$ C 恒温 3 min, 以 20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 103 $^{\circ}$ C 恒温 3 min, 以 8 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 150 $^{\circ}$ C 恒温 15 min, 以 20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 280 $^{\circ}$ C。**结果:** β – 榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮进样浓度在 4.00 ~ 40.00 μ g \cdot mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r = 0.9979 \sim 0.9997$); 平均回收率 ($n = 4$) 分别为 98.3% (RSD = 2.8%), 99.4% (RSD = 2.1%), 95.5% (RSD = 1.6%), 101.2% (RSD = 2.5%)。**结论:** 该方法专属性强, 准确度高, 重复性好, 可用于 ZTO – PBCA – NP 的质量控制。

关键词: 气相色谱 – 质谱联用; 莪术油; 聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒; 药物载体; 靶向制剂; β – 榄香烯; 莪术酮; 莪术醇; 莪术二酮

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2011)09 – 1790 – 04

GC – MS determination of four components in ketoprofen – ploybutylcyanoacrylate – nanoparticles*

CHEN Xu¹, ZENG Jian – hong^{**}, LIN Jia – xun¹,
LUO Xiao – qin², QIN Wan – ling²

(1. School of Pharmacy, Guilin Medical College, Guilin 541002, China;
2. Guangxi Wanfeng Pharmaceutical Co. Ltd., Guilin 541000, China)

Abstract Objective: To establish a GC – MS method for determination the content of β – elemene, curzerenone, curcumol and curdione of ketoprofen – ploybutylcyanoacrylate – nanoparticles of zedoary turmeric oil(ZTO – PBCA – NP). **Methods:** The contents of β – elemene, curzerenone, curcumol and curdione of ZTO – PBCA – NP were determined by Agilent 5973N – 6890 GC – MS on a HP – 5MS column(30.0m \times 250 μ m \times 0.25 μ m); Inlet temperature 250 $^{\circ}$ C, splitless sampling; Temperature programming started at 65 $^{\circ}$ C, holding for 2 min, then increased at 90 $^{\circ}$ C at a rate of 5 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹, and then increased at 103 $^{\circ}$ C at a rate of 20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹, holding for 3 min, after that increased at 150 $^{\circ}$ C at a rate of 8 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹, holding for 15 min, finally increased at 280 $^{\circ}$ C at a rate of 20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹. **Results:** When the sample concentration of β – elemene, curzerenone, curcumol and curdione were 4.00 – 40.00 μ g \cdot mL⁻¹, the concentration and peak area showed good linear relationship ($r = 0.9979 \sim 0.9997$); The average recoveries($n = 4$) of β – elemene, curzerenone, curcumol and curdione were 98.3% (RSD = 2.8%), 99.4% (RSD = 2.1%), 95.5% (RSD = 1.6%) and 101.2% (RSD = 2.5%), respectively. **Conclusion:** The established method has strong specificity, high accuracy and good reproducibility. It can be used for quality control of ZTO – PBCA – NP.

Key words: GC – MS; zedoary turmeric oil; ketoprofen – ploybutylcyanoacrylate – nanoparticles; drug carrier; targeting preparation; β – elemene; curzerenone; curcumol; curdione

* “广西科学攻关与新产品试制(0630002 – 4G)”项目资助

** 通讯作者 Tel: (0773) 5899905; E – mail: zjhong0621@163.com

莪术油 (zedoary turmeric oil, ZTO) 为姜科植物蓬莪术 (*Curcuma phaeocaulis* Val.)、广西莪术 (*Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang) 和温郁金 (*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling) 的干燥根茎经水蒸气蒸馏或超临界萃取而得。其含有多种活性成分, 主要为 β -榄香烯 (β -elemene)、莪术酮 (curzerenone)、莪术醇 (curcumol)、莪术二酮 (curdione) [1-2]。莪术油高效、低毒, 且对多种疾病有效 [3]。其制剂在宫颈癌、肝癌及心血管疾病治疗方面均取得了满意的疗效 [4]。由于莪术油难溶于水, 不稳定, 生物利用度低, 味苦, 不易口服等缺点限制了在临床上的广泛应用。目前临床上使用的莪术油剂型一般包括注射液、乳剂、乳膏剂、栓剂, 但这远不能满足临床用药需求 [5]。改变药物体内分布的途径之一是将其包封于亚微粒药物载体中, 在这些载体中, 脂质体、纳米粒、毫微粒及药质体已得到了广泛研究 [6]。氰基丙烯酸正丁酯 (BCA) 具有毒副作用小、生物相容性好、生物可降解等特性, 其毫微粒作为药物载体具有靶向性好, 可缓控释并保护药物等特点 [7-8]。应用价值日益受到人们的关注。本课题组已采用乳化聚合法成功制备了莪术油聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒 (ZTO-PBCA-NP), 但有关其质量标准控制目前还没有开展。因此, 本研究采用 GC-MS 法测定 ZTO-PBCA-NP 中莪术油的主要成分 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮的含量, 旨在为 ZTO-PBCA-NP 的质量控制提供理论依据。

1 仪器与试剂

L8-80M 超速冷冻离心机 (美国 BECKMAN 公司), Agilent5973N-6890 气相色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent), pH 计 (梅特勒-托利多仪器有限公司), AR1140 电子天平 (美国 OHAUS)。

β -榄香烯对照品 (批号 100268-200401)、莪术醇对照品 (批号 100185-200305), 中国药品生物制品检定所; 莪术二酮对照品 (批号 13657-68-6), 上海沪云医药开发有限公司; 莪术酮对照品为本课题组自制, 经鉴定纯度为 98.0%; 氰基丙烯酸正丁酯 (BCA), 深圳南方医用公司; Pluronic F68 (SIGMA 公司)、右旋糖肝-70 (Dxenart-70, AMER-SHAM 公司) 为药用规格, 甲醇、盐酸、乙醇等试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 ZTO-PBCA-NP 毫微粒的制备 分别将 10 mL 的 0.08% Pluronic F68 (称取 0.08 g 的 Pluronic F68 溶于 100 mL 的纯化水中, 即得) 和 10 mL 的

0.06% Dextran-70 (称取 0.06 g 的 Dextran-70 溶于 100 mL 的纯化水中, 即得) 充分溶于 20 mL 的 4 个成分的乙醇混合溶液中 (精密称取 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇、莪术二酮各 10.0 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加乙醇溶解并定容至刻度即得 4 个成分的乙醇混合溶液), 用乙醇定容至 50 mL, 用稀盐酸调 pH 至 2.0, 在不断搅拌下缓慢滴加入 BCA 1 mg, 磁力搅拌器上搅拌 1 h, 再用氢氧化钠溶液调 pH 至 7.0, 0.45 μ m 微孔滤膜抽滤, 高速冷冻离心 (3000 r \cdot min⁻¹, 10 min) 沉淀即得 ZTO-PBCA-NP。

2.2 对照品储备液配制 [7] 精密称取 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇、莪术二酮各 4.0 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 0.45 μ m 滤膜过滤, 即得 4 个成分的混合溶液。

2.3 供试品溶液的制备 将“2.1”项下制备的 ZTO-PBCA-NP 用 10 mL 的甲醇溶解, 0.45 μ m 滤膜过滤, 即得。

2.4 色谱-质谱条件 [1] 采用 Agilent5973N-6890 气相色谱-质谱联用仪, 色谱柱为 HP-5MS 毛细管色谱柱 (30.0 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m), 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹; 程序升温: 65 $^{\circ}$ C 恒温 2 min, 65 ~ 90 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹) 恒温 3 min, 90 ~ 103 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹) 恒温 3 min, 103 ~ 150 $^{\circ}$ C (8 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹) 恒温 15 min, 150 ~ 280 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹); 不分流, 进样温度 250 $^{\circ}$ C。倍增器电压 1.435 kV; 接口温度 280 $^{\circ}$ C; 离子源温度 230 $^{\circ}$ C, 电离方式 EI; 电子能量 70.1 eV; 溶剂延迟 3 min; 扫描质量范围: 45 ~ 550 amu。在上述条件下, β -榄香烯、莪术酮、莪术醇、莪术二酮能有效分离, 见图 1。

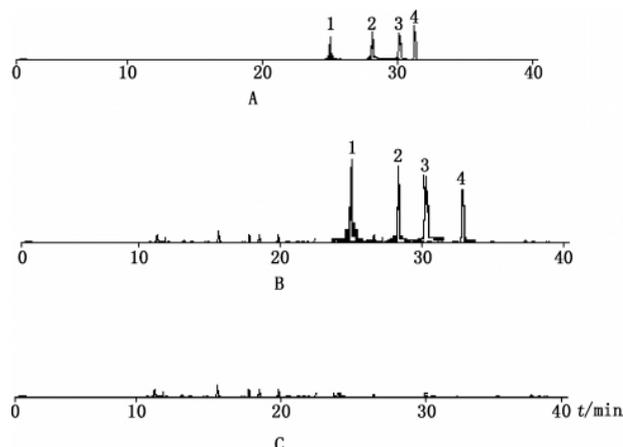


图1 混合对照品 (A)、样品 (B) 和 PBCA-NP 乳液 (C) 的 GC-MS 图谱
Fig 1 GC-MS chromatograms of mixed standards (A), sample (B) and PBCA-NP galacta (C)

1. β -榄香烯 (β -elemene) 2. 莪术酮 (curzerenone) 3. 莪术醇 (curcumol) 4. 莪术二酮 (curdione)

2.5 线性关系考察 精密取对照品储备液 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成浓度为 4.00 ~ 40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。取各系列溶液 1 μL 注入气相色谱仪, 按上述色谱条件, 以各对照品选择性离子峰面积对进样浓度进行回归。 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮进样浓度均在 4.00 ~ 40.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r = 0.9979 \sim 0.9997$)。见表 1。

表 1 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮标准曲线测定结果

Tab 1 Standard curve determination results of β -elemene, curzerenone, curcumol and curdione

成分(component)	回归方程(regression equation)	r
β -榄香烯(β -elemene)	$Y = 2.76 \times 10^5 X - 1.32 \times 10^6$	0.9997
莪术酮(curzerenone)	$Y = 2.02 \times 10^5 X - 2.41 \times 10^6$	0.9993
莪术醇(curcumol)	$Y = 2.46 \times 10^5 X - 2.17 \times 10^6$	0.9992
莪术二酮(curdione)	$Y = 2.94 \times 10^5 X - 2.46 \times 10^6$	0.9979

2.6 精密度和稳定性考察 取对照品储备液用甲醇稀释, 配制成浓度为 2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按上述分析条件连续进样 5 次。 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮 4 个成分峰面积的 RSD 分别为 1.4%, 2.3%, 1.4%, 2.0%, 表明仪器精密度高。另取上述对照品溶液 1 mL 分别在 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h 各进样 1 μL 。 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮 4 个成分峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 3.2%, 1.6%, 2.2%, 表明溶液中各成分在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率考察 取 4 份已知 4 个主要成分含量的 PBCA-NP 乳液各 10 mL, 0.45 μm 微孔滤膜抽滤, 精密吸取滤液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 每份分别加入浓度为 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 5 mL, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件进行测定, 根据回归方程计算各待测成分的量及回收率。结果 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮的回收率 ($n = 4$) 分别为 98.3% (RSD = 2.8%), 99.4% (RSD = 2.1%), 95.5% (RSD = 1.6%) 和 101.2% (RSD = 2.5%)。

2.8 样品含量的测定 按“2.1”项下的方法平行制备样品 3 批, 分别按“2.3”项下方法制备供试品

溶液, 按“2.4”项下的条件进行测定, 根据回归方程计算 ZTO-PBCA-NP 样品中的莪术油的主要成分 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮的含量。3 批样品的测定结果见表 2。

表 2 样品中 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮含量测定结果 (%)

Tab 2 Content determination results of β -elemene, curzerenone, curcumol and curdione

样品号 (sample No.)	β -榄香烯 (β -elemene)	莪术酮 (curzerenone)	莪术醇 (curcumol)	莪术二酮 (curdione)
1	68.23	71.64	63.10	60.89
2	67.15	65.81	64.82	59.33
3	66.42	65.09	63.79	58.59

3 讨论

PBCA-NP 制备方法简单, 可行性好^[9]。药物装载于该毫微粒后可降低药物毒性、保持药物活性、提高药物靶向性, 而且研究表明 BCA 类材料毒性较低, 在体内可降解^[10, 11], 应用前景广泛。因此, 本研究在莪术微粒的制备中选用 PBCA-NP 载药。

目前有关莪术油分析方法较多, 主要有分光光度法、气相色谱法。本文采用 GC-MS 法测定 ZTO-PBCA-NP 中莪术油的主要成分 β -榄香烯、莪术酮、莪术醇和莪术二酮的含量, 通过 GC-MS 分离参数的选择, 得出了最佳的 GC-MS 分离条件, 并对样品的回收率和精密度的进行了考察, 该法操作重复性良好, 准确度较高, 因此, 该方法可以作为 ZTO-PBCA-NP 的质量控制。

参考文献

- 1 CHEN Xu(陈旭), ZHENG Jian-hong(曾建红). GC-MS study on fingerprint of essential oil from *Curcuma kwangsiensis* (广西莪术挥发油 GC-MS 指纹图谱研究). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2008, 28(8): 1363
- 2 LI Xiang(李想), SUN Yan-tao(孙艳涛), ZHANG Zhen-qiu(张振秋) et al. GC determination of β -element, curcumol, germacrone and curdione of zedoary turmeric oil (毛细管气相色谱法测定莪术油中 β -榄香烯、莪术醇、吉马酮和莪术二酮的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2009, 29(11): 1832
- 3 ZHOU Hong(周红), ZHONG Yi(钟毅), WANG Qin(王沁) et al. Experimental investigation on the purification of Leucocythemias cells by zedoary turmeric oil in vitro (莪术油对白血病细胞体外净

- 化作用的实验研究). *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志), 2004, 19(4): 256
- 4 Chen Xu, Zhong Haiyan, Zeng Jianhong *et al.* The pharmacological effect of polysaccharides from *Curcuma kwangsiensis* on the oxidative status and expression of VCAM-1 mRNA of thoracic aorta endothelial cell in high-fat-diet rats. *Carbohydr Polym* 2008, 74(4): 445
- 5 XU Yuan-long(徐元龙), LI Xue-ming(李学明), LIN Sheng-zhao(蔺胜照). Preparation of solid lipid nanoparticles containing the zedoary turmeric oil(莪术油固体脂质纳米粒的制备). *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志) 2005, 20(6): 497
- 6 LU Man(卢曼), ZHU Jia-bi(朱家璧), SHI Zhen-yan(石振艳). Studies on the ketoprofen-polybutylenoacrylate-nanoparticles of oxymatrin(氧化苦参碱聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒制备工艺研究). *Jiangsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2006, 14(2): 7
- 7 YANG Xi-xiao(杨西晓), CHEN Jian-hai(陈建海), GUO Dan(郭丹) *et al.* HPLC determination of content of mitomycin C in mitomycin C-polybutylenoacrylate nanoparticles(HPLC法测定丝裂霉素C聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒中丝裂霉素C的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志) 2007, 27(5): 693
- 8 SHI Xin-ying(石歆莹), FAN Xue-gong(范学工). Progress of study of nanoparticles across biological barrier(纳米粒跨越生物屏障研究进展). *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报) 2005, 33(3): 169
- 9 TAN Rong(谭蓉), LIU Ying(刘颖), FENG Nianping(冯年平) *et al.* Preparation and in vitro release characteristics of vincristine sulphate loaded poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles(硫酸长春新碱聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒制备及药剂学性质研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志) 2011, 36(11): 1431
- 10 HE Qin(何勤), ZHANG Zhi-rong(张志荣). Determination of valaciclovir in polybutylenoacrylate nanoparticles(聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒中万乃洛韦的含量测定). *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志) 2000, 15(1): 60
- 11 ZHOU Yi(周焱), ZHAO De-an(赵德安), LUO Qi-cong(骆启聪). Construction of polybutylenoacrylate nanoparticles(PBCA-NPs) loaded P16a gene and expression in Hep-2 cell(聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒载P16a基因的制备及在喉癌细胞中的表达). *China Med Eng* (中国医学工程) 2010, 18(1): 1

(本文于2011年8月10日修改回)

《俞永新论文集》已出版

中国食品药品检定研究院李云龙院长组织编辑的《俞永新论文集》由中国人口出版社于2010年9月出版。2010年中国药品生物制品检定所(中检所)迎来了她60华诞。在中检所60华诞之际,编辑出版老一代中检人的论著文集,让人们了解中国药检人的奋斗历程,从对历史的回顾中看看中检人在药检领域的发展过程的拼搏与付出。中检所涉及多学科的药品检验检测及相关专业,前辈们在各个专业领域的成绩均是中检所的宝贵财富。收集整理这些财富,系统而忠实地记录中检人在各专业的成就和历程。论著集的收集编辑工作,以体现专业特性为主线,反映团队成就为宗旨,并以年代代表人物冠以书名编辑成册。

《俞永新论文集》以俞永新院士为核心,收集俞永新院士及与其他作者合著论文244篇,包括乙型肝炎病毒和疫苗类87篇,出血热病毒和疫苗类91篇,狂犬病病毒和疫苗类18篇,虫媒病毒和疫苗类25篇,综述23篇。此外还收集了俞永新院士主编及参与编辑的书籍10部。论文以全文收载并尊重原文,著作收载前言或序、著者、目录或书名摘要。对论文有贡献的中检所的专家作者还有李河民、王太江、敖坚、吴慧英、郎书惠、朱荫耕、严子林、聂子林、李雪东、罗惠蓉等。对书籍有贡献的中检所前辈们还有李河民、李德富、袁曾麟、聂子林、周国安、黄建、张华远、辜清吾等。本论著集的编辑出版亦蕴涵了对所有参与工作的老专家们为中检所发展所作贡献的敬重。

本书定价298.00元。联系人:刘小帅;电话:010-67095201;地址:100050北京市东城区天坛西里2号中国食品药品检定研究院《药物分析杂志》编辑部