

高效液相色谱法测定莪术油葡萄糖注射液的稳定性

何海冰, 唐 星

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 建立莪术挥发油中吉马酮高效液相色谱含量测定方法, 并用此方法对莪术油葡萄糖注射液进行稳定性考察。**方法** 含量测定采用 HPLC 法。选用 ODS C₁₈ 柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 200 mm), 流动相为甲醇-水 (80:20), 流速 0.8 mL \cdot min⁻¹, 测定波长 204 nm。稳定性研究采用高温加速试验法。**结果** 吉马酮进样量在 0.496~3.968 μ g 内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$), 平均回收率 101.0%, RSD 为 1.78% ($n=9$)。用 HPLC 法和药典方法考察自制莪术油葡萄糖注射液的降解 $t_{1/2}$ 分别为 21.52 h 和 12.05 h。**结论** HPLC 法能很好地分离检测莪术油中的吉马酮, 可用于莪术油原料及制剂的含量测定; 自制莪术油葡萄糖注射液的稳定性较差。

关键词: 药剂学; 稳定性; 含量测定; 高温加速试验法; 高效液相色谱法; 莪术油注射液

中图分类号: R94 **文献标识码:** A

莪术是姜科植物蓬莪术 (*Curcuma phaeocaulis* Val.)、广西莪术 (*C. kwangxiensis* s.g. Lee et C.F.Liang) 或温郁金 (*C. wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling) 的干燥根茎。后者习称“温莪术”。莪术根茎中含挥发油 1%~1.5%, 油中的主要成分为倍半萜烯类。主要有莪术醇 (curcumol)、吉马酮 (germacrone)、莪术酮 (zedoarone) 和莪术烯 (curzerene) 等。其挥发油成分具有抗肿瘤、抗病毒、抗真菌, 兴奋胃肠道作用。文献报道的莪术油及其制剂的含量测定方法主要有薄层扫描法^[1]、气相色谱法及紫外显色法等^[2, 3]。薄层扫描法多用于测定莪术醇或吉马酮的含量, 因影响因素较多, 显色后扫描结果不稳定; 气相色谱法操作比较繁琐, 重现性较差; 药典所用的紫外显色法测定莪术油葡萄糖注射液中莪术醇含量不能反映内在质量, 方法专属性差。作者以吉马酮为测定指标, 采用 HPLC 法对莪术油中吉马酮的含量进行测定。并采用 HPLC 法对自制莪术油葡萄糖注射液进行了稳定性考察, 与药典的紫外显色法进行比较。

1 仪器与试剂

Jasco 高效液相色谱仪(日本分光公司), PU-1580 泵、UV-1575UV-VIS 检测器、AS-1555 自动进样器, BORWIN 色谱工作站(日本分光公司), 色谱柱为 DiamonsilTM (钻石) C₁₈ 柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 200 mm, 北京迪马公司), WFZ800-D₂ 紫外-可见分光光度计 (北京第二光学仪器厂)。

吉马酮对照品 (由本校天然药化教研室提供, 归一化测定含量 96% 以上), 莪术油 (浙江蓬莪术油、温郁金挥发油, 由浙江瑞安制药厂提供; 盘锦蓬莪术油, 由盘锦华城制药厂提供)。甲醇为

收稿日期: 2003-04-30

作者简介: 何海冰 (1979-), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 在读硕士, 主要从事药剂学研究; 唐星 (1964-), 陕西西安人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事药剂学研究。Tel: (024)23953240, E-mail: tangpharm@yahoo.com.cn。

色谱纯，水为重蒸水，其他试剂均为化学纯或色谱纯。

2 方法

2.1 HPLC 法的建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱 Diamonsil™ (钻石) C₁₈ 柱 (5 μm, 4.6 mm×200 mm), 流动相为甲醇-水 (80:20), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 测定波长 204 nm。

2.1.2 供试品溶液的制备

精密称取莪术油适量, 用甲醇制成每 mL 含莪术油 1 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察

精密称取吉马酮对照品适量, 用甲醇制成每 mL 含吉马酮 0.500 mg 的溶液, 制成对照品贮备溶液。精密量取贮备溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 各取 20 μL 注入液相色谱仪, 测定吉马酮的峰面积, 以进样量 (μg) 为横坐标, 测得的峰面积为纵坐标作线性回归, 求得回归方程为: $Y=4\times 10^6X+8.229\times 10^4$, $r=0.999\ 9$ 。进样量在 0.496~3.968 μg 内线性关系良好。

2.1.4 精密度考察

精密吸取对照品 20 μL, 连续进样 6 次, 峰面积 RSD 为 0.44%。

2.1.5 重现性考察

取一批莪术油, 取样 6 份, 按“2.1.2”条方法平行操作, 各取 20 μL 注入液相色谱仪, 测定, 峰面积 RSD 为 1.4%。

2.1.6 供试品稳定性考察

取供试品溶液, 每间隔 2 h 测定吉马酮含量, 10 h 内峰面积无明显变化, RSD 为 0.38%。

2.1.7 加样回收率试验

精密称取吉马酮对照品适量加甲醇制成每毫升含 0.496 mg 的对照品溶液。另精密称取浙江产蓬莪术油适量, 加甲醇制成每毫升含 5.01 mg 的供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 共 9 份, 分别加入不同量的对照品溶液, 加甲醇至刻度。测得溶液中吉马酮, 减去已知含量, 分别计算回收率, 平均回收率为 101.0%, RSD 为 1.8%。

2.2 不同产地及种类的莪术油中吉马酮含量测定

分别取浙江产蓬莪术、温郁金与盘锦产蓬莪术挥发油, 照“2.1.2”条方法操作, 进样, 测定。

2.3 自制浓缩型莪术油葡萄糖注射液稳定性研究

2.3.1 浓缩型莪术油葡萄糖注射液的制备

参照原莪术油葡萄糖注射液处方, 采用均匀设计法, 以灭菌前后澄清度为考察指标, 研制了浓缩型莪术油葡萄糖注射液。处方组成为: 莪术油(浙江产蓬莪术挥发油)0.1 g、乙醇 0.73 mL、丙二醇 0.82 mL、吐温 80 0.38 g、poloxamer 0.28 g、加 5%葡萄糖注射液至 100 mL。灭菌前后均呈现出均匀澄明的液体。自制浓缩型莪术油葡萄糖注射液的规格为 1 g·L⁻¹。

2.3.2 稳定性考察

采用高温加速试验法。将制备好的浓缩型莪术油葡萄糖注射液经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后灌封于 10 mL 安瓿中, 于沸水浴中加热, 定时取样。

2.3.3 吉马酮相对含量测定

采用 HPLC 法。色谱条件同“2.1.1”条, 将各时间取样的样品经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 进样 $20\ \mu\text{L}$, 记录峰面积, 以 0 时间的含量为 100%。计算各时间取样样品中吉马酮的相对含量。

2.3.4 莪术醇相对含量测定

采用药典法(比色法)。供试液的配制: 精密量取各取样点莪术油葡萄糖注射液($1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)5 mL 置 25 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度。测定时将上述溶液各 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 加香草醛硫酸溶液(0.2 g 香草醛溶于 1 mL EtOH 中加入浓硫酸(1→2)100 mL 中)稀释至刻度。空白液的配制: 取 tween80 乙醇溶液(1 mL→10 mL)1 mL 置 50 mL 量瓶中, 加香草醛硫酸溶液稀释至刻度。测定法: 将空白液与供试液在室温下避光放置 1 h 后在 520 nm 处测定吸收值, 以 0 时间的吸收值为 100%。计算各时间取样样品中以莪术醇计的相对含量。

3 结果

3.1 色谱图

在选定的色谱条件下测得的 HPLC 色谱图见图 1、2, 莪术油中吉马酮的保留时间与对照品保留时间一致。

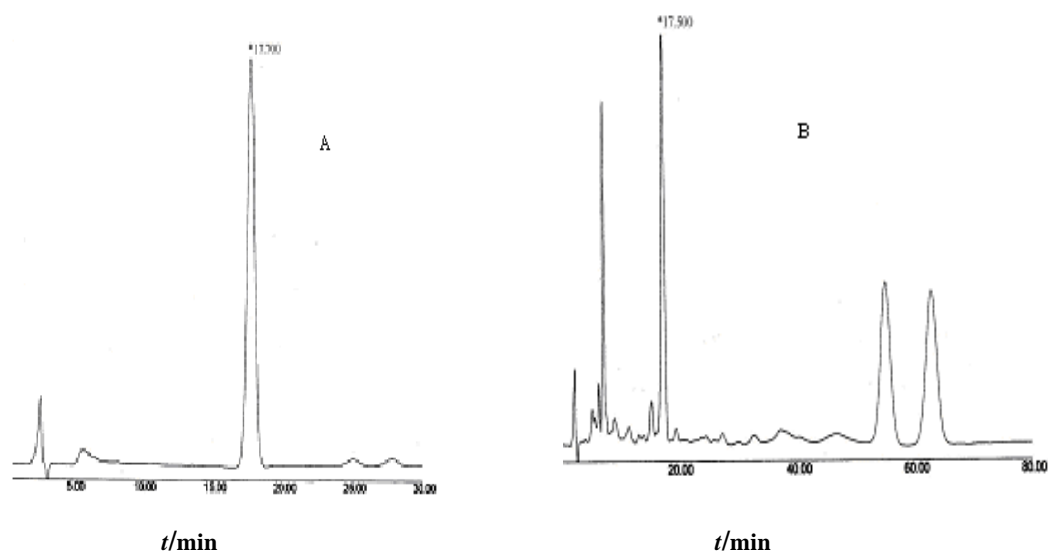
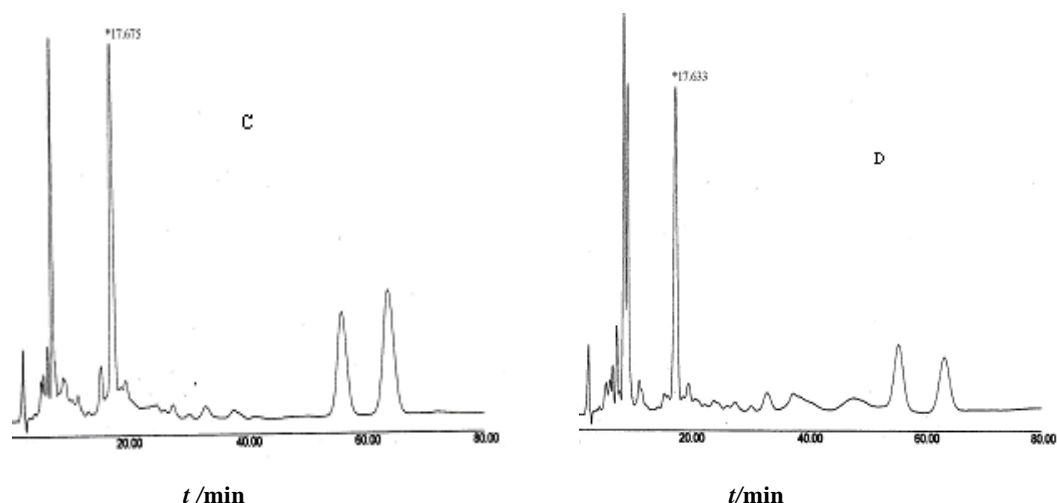


Fig.1 HPLC chromatograms of germacrone reference substance and volatile oil samples

A—Reference substance; B—Zhejiang *Curcuma phaeocaulis* Val; C—*C. wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling ;

D—Panjin *Curcuma phaeocaulis* Val; * Germacrone



Continued Fig.1 HPLC chromatograms of germacrone reference substance and volatile oil samples

A—Reference substance; B—Zhejiang *Curcuma phaeocaulis* Val; C—*C. wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling ;

D—Panjin *Curcuma phaeocaulis* Val; * Germacrone

3.2 三种莪术油样品中吉马酮含量

三种莪术油样品中吉马酮含量测定结果见表 1。

Table 1 The contents of germacrone in sample($n=3$)

Samples name	Content of germacrone/ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$
zhejiang <i>Curcuma phaeocaulis</i> Val volatile oil	94.1
zhejiang <i>C. wenyujin</i> Y.H.Chen et C.Ling volatile oil	80.8
panjin <i>Curcuma phaeocaulis</i> Val volatile oil	74.4

3.3 稳定性

用药典法和 HPLC 法测定的相对含量结果见表 2，其中药典法以莪术醇计算相对含量，HPLC 法以吉马酮为指标性成分计算相对含量。以 $\ln C$ (C 为相对含量) 对 t 作图，求得两种方法的降解速率常数和降解半衰期 $t_{1/2}$ 分别为 0.0575 h^{-1} 和 0.0322 h^{-1} ， 12.05 h 和 21.52 h 。

Table 2 Determination of relative contents by UV and HPLC methods

t/h	Relative contents/%	
	UV(counted by curcuminol)	HPLC (counted by germacrone)
0	100	100
2	90.4	103.8
4	71.1	92.5
6	67.5	84.2
8	57.6	76.3
10	53.2	82.1
12	52.6	72.5

3 讨论

吉马酮在波长 190~400 nm 作紫外光谱扫描, 最大吸收波长为 203.2 nm, 虽为末端吸收, 但并不影响其含量测定。因此, 选择 204 nm 作为吉马酮的检测波长。

关于吉马酮的测定方法文献报道较少, 通过实验摸索, 建立了 HPLC 法测莪术挥发油中吉马酮的含量, 方法简便、专属性强、灵敏度高、重现性好, 适用于挥发油中吉马酮的含量测定。

在采用 HPLC 法测定莪术挥发油中吉马酮的含量时, 曾采用多种不同配比的流动相, 通过试验证明以 MeOH-H₂O (80:20) 为流动相, 可达到较为理想的分离效果。

采用 HPLC 法进行稳定性考察时发现, 经过加热煮沸 12 h, 注射液样品中的莪术醇相对含量并未降低, 反而升高, 可能是由其他物质转化而来。用药典法测得的相对含量随时间降低较 HPLC 法快, 可能是莪术油中其他与莪术醇结构相似成分的含量下降较快的综合结果。

从样品测定的结果可知, 不同物种和产地的莪术油中吉马酮的含量差异比较大。所含主要成分种类基本相近(图 1), 所含各种成分中吉马酮的含量较高, 而莪术醇的含量较低。故测定吉马酮更能反映莪术油及其制剂的质量。在生产中应严格控制原药材的来源, 以保证制剂的质量。

参考文献:

- [1] Tian SJ, Liang WF. Study on volatile oil of zedoaria IV: TLC densitometric determination of germacrone in the essential oil from *Curcuma wenyujin* and *C. kwangsinensis* [J]. Bulletin of Chin Materia Medica (药学通报), 1985, 10(11): 29-31.
- [2] Gu MC, Yang Y. Gas chromatographic determination of curcumol in oil of *Curcuma aromatica* Salisb and menthol in oil of *Mentha hypocalyx* Briq [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1982, 2(2): 75-78.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[Z]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 697.

Determination of stability of glucose injection of curcuma zedoaria oil by HPLC method

HE Hai-bing, TANG Xing

(School of pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To develop a method for the determination of germacrone in volatile oil of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rose. and inspect the stability of glucose injection of curcuma zedoaria oil.

Methods An HPLC method was developed. ODS C₁₈ column was used in HPLC with mobile phase: MeOH-water (80:20), detection wavelength: 204 nm. Hyperthermy acceleration method was used to study the stability. **Results** The linear range of HPLC is from 0.496 to 3.968 μg ($r=0.9999$). The average recovery is 101.0%, RSD=1.78% ($n=9$). Degradation $T_{1/2}$ of preparation are 21.52 h and 12.05 h, respectively, by HPLC and UV methods.

Conclusion This method is reliable, accurate and suitable for the determination of germacrone in the volatile oil and the stability of glucose injection of curcuma zedoaria oil is poor.

Key words: pharmaceuticals; stability; content analysis; hyperthermy acceleration method; HPLC; curcuma zedoaria oil injection

（本篇责任编辑：高明）