

CO₂超临界流体色谱法同时测定莪术油中3个倍半萜类成分的含量

唐登峰, 马临科, 龚青, 方翠芬(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要:目的 建立 CO₂超临界流体色谱法测定莪术油中呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮含量的方法。方法 采用 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm), 以 CO₂-乙腈为流动相, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 216 nm, 柱温为 55 °C, 背压为 2 000 psi。结果 呋喃二烯在 2.67~1 337.26 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=1.000$), 加样回收率为 97.94%($n=6$, RSD=1.50%)。牻牛儿酮在 2.77~1 386.00 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=1.000$), 加样回收率为 96.07%($n=6$, RSD=1.68%); 莪术二酮在 6.99~3 493.00 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=1.000$), 加样回收率为 99.33%($n=6$, RSD=1.88%)。结论 本方法快捷准确、稳定且绿色环保, 可用于莪术油中上述 3 个倍半萜类成分的质量控制。

关键词: CO₂超临界流体色谱法; 呋喃二烯; 牻牛儿酮; 莪术二酮; 莪术油

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)20-2539-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.010

引用本文: 唐登峰, 马临科, 龚青, 等. CO₂超临界流体色谱法同时测定莪术油中 3 个倍半萜类成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2539-2542.

Simultaneous Determination of Three Sesquiterpenoids in the Zedoary Turmeric Oil by CO₂-Supercritical Fluid Chromatography

TANG Dengfeng, MA Linke, GONG Qing, FANG Cuifen(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE A CO₂-Supercritical Fluid Chromatography(CO₂-SFC) method was established for the simultaneous determination of furanodiene, curdione and germacrone in the Zedoary Turmeric Oil. **METHODS** A UPC² HSS C₁₈ SB analytical column(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm) was adopted and the mobile phase consisted of CO₂-acetonitrile with linear gradient elution(0–8 min, 99.5%→84% of CO₂) at the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 216 nm, the column temperature was maintained at 55 °C, and the back pressure was kept at 2 000 psi. **RESULTS** The linear range of furanodiene was 2.67–1 337.26 μg·mL⁻¹ ($r=1.000$), and the average recovery($n=6$) was 97.94% with RSD of 1.50%. The linear range of curdione was 2.77–1 386.00 μg·mL⁻¹ ($r=1.000$), and the average recovery($n=6$) was 96.07% with RSD of 1.68%. The linear range of germacrone was 6.99–3 493.00 μg·mL⁻¹ ($r=1.000$), and the average recovery($n=6$) was 99.33% with RSD of 1.88%. **CONCLUSION** The established method is rapid, accurate, and it can protect environment, which provides a new method for the quality control of furanodiene, curdione and germacrone in the Zedoary Turmeric Oil.

KEYWORDS: CO₂-supercritical fluid chromatography; furanodiene; curdione; germacrone; Zedoary Turmeric oil

超临界流体色谱法(supercritical fluid chromatography, SFC)是以超临界流体作为流动相的一种色谱方法, 该方法收载于中国药典四部^[1]。超临界流体具有独特的、介于气体和液体之间的物理性质, 使得超临界流体色谱兼具气相色谱和液相色谱的特点, 它的扩散系数和黏度接近气体, 因此溶质的传质阻力小, 用作流动相可以获得快速高效分离; 另一方面, 它的密度与液体类似, 具有较高的溶解能力, 这样就便于在较低温度下分离难挥发、热不稳定性及相对分子质量大的物质。在超临界流体色谱中, 最广泛使用的流动相是 CO₂ 流体, 它无色、无味、无毒、易获取, 并

且价廉, 溶解性好, 临界温度 31 °C, 临界压力 7.38×10⁶ Pa, 较易控制, 使得在色谱分离中对温度、压力有比较宽的选择空间。SFC 利用 CO₂ 和不同共溶剂形成的流动相, 在强度、压力、温度、固定相种类等多种因素的协同下, 在结构类似物、同分异构体、对映异构体和非对映异构体混合物的分离和分析测试中显示了较强的优势^[2-4]。随着仪器设备的换代和科技的进步, 克服了超临界流体色谱早期在定量分析上的种种不足(如仪器灵敏度、重现性、准确度以及耐用性较差等问题), 超临界流体色谱法在定量测定上越来越受到重视, 经方法学验证和比较, 已经达到和超高效液相色谱

基金项目: 浙江省科技计划项目(2016C37064)

作者简介: 唐登峰, 男, 博士, 主任中药师

Tel: (0571)87180345

E-mail: tdfengde@163.com

谱比肩的水平^[5],也达到 GMP 实验室对数据分析的要求^[6],它将成为与 HPLC 和 GC 互为补充的一种常规的实验室定量分析方法。已有文献报道了 SFC 在中药、天然产物定量测定的应用研究^[7-12]。

莪术油为温莪术的干燥根茎(*Curcuma wenyujin* Y.H.Chen et C.Ling)经水蒸气蒸馏提取的挥发油^[13],现有的含量测定方法收载于中国药典,课题组参与了该方法的制订^[14],限于当时技术条件,该方法 1 次色谱测定的耗时较长(35 min),且色谱图中呋喃二烯色谱峰和它边上的另一色谱峰的分度一般为 2.0 左右,尽管符合药典要求,但很难达到>2.2,分离状况不是令人很满意,同时该方法仅测定了牻牛儿酮和呋喃二烯 2 个成分的含量。故课题组尝试采用 CO₂ 超临界流体色谱法,对莪术油中牻牛儿酮、莪术二酮和呋喃二烯 3 个成分进行含量测定研究。

1 仪器、试剂与试药

沃特世超高效合相色谱仪(Waters ACQUITY UPC²),包括两相管理器(Covergence Manager)、二元溶剂管理器(Binary Solvent Manager)、单区色谱柱管理器(Column Manager-30S)、样品管理器(Sample Manager-FL)、光电二极管阵列检测器(PDA Detector);XPE-205 电子天平(METTLER TOLEDO);5430R 高速冷冻离心机(Eppendorf Centrifuge)。

呋喃二烯对照品(批号:111824-201102,含量以 99.4%计)、莪术二酮对照品(批号:111800-201302,含量以 99.8%计)、牻牛儿酮对照品对照品(批号:111665-201605,含量以 99.8%计)均为冷藏保存,使用前均不需干燥处理,均购自中国食品药品检定研究院。

高纯 CO₂(杭州新世纪混合气体有限公司,纯度:99.995%);乙腈、甲醇、异丙醇和正己烷均为色谱纯,均购自 Merck 公司。

莪术油样品为市售 2 家企业的 9 批产品,批号见表 2,方法学考察选用批号:A090702 的莪术油。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm);以 CO₂(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱:0~8 min, 99.5%→84%A;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:216 nm;柱温:55 ℃;背压 2 000 psi;进样量:1.0 μL。在此条件下,混合对照品以及样品中的目标色谱峰与其他组分均

能达到良好分离,对照品和样品色谱图见图 1。

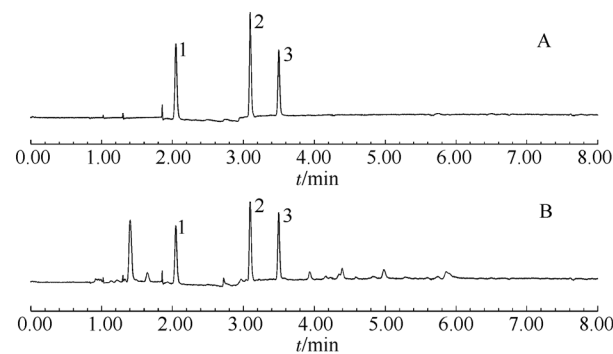


图 1 超临界流体色谱图

A-对照品溶液; B-供试品溶液; 1-呋喃二烯; 2-牻牛儿酮; 3-莪术二酮。

Fig. 1 Supercritical fluid chromatography

A-standard solution; B-sample solution; 1-furanodiene; 2-curdione; 3-germacrone.

2.2 混合对照品溶液的制备

取呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮对照品适量,加乙腈制成浓度分别为 26.75, 27.72, 69.86 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

取批号为 A090702 的莪术油样品,称取约 50 mg,精密称定,加乙腈使溶解,置于 25 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,精密量取 2 mL 至 10 mL 量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

取呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮混合的对照品储备液(含呋喃二烯 0.267 5 mg·mL⁻¹、牻牛儿酮 0.277 2 mg·mL⁻¹和莪术二酮 0.698 6 mg·mL⁻¹),加乙腈稀释成不同浓度的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,以浓度(X , μg·mL⁻¹)对峰面积(Y)进行线性回归,呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮回归方程分别为 $Y=2\ 286.9X-22.284$ 、 $Y=2\ 471.3X+3\ 606.6$ 和 $Y=666.79X+130.92$, r 均为 1.000,在 2.67~1 337.26 μg·mL⁻¹、2.77~1 386.00 μg·mL⁻¹和 6.99~3 493 μg·mL⁻¹内线性关系良好。

2.5 仪器精密度试验

取“2.2”项下的呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮混合对照品溶液,按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次,进样量 1 μL,记录色谱峰面积,计算得呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮峰面积的 RSD 分别为 1.18%, 0.74%和 0.83%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取批号为 A090702 的莪术油样品约 50 mg, 共称取 6 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样, 测定峰面积并计算呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮含量, 结果三者的 RSD 分别为 0.87%, 0.35%和 0.98%, 表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0, 1, 4, 7, 11, 16.5, 19, 24 h 进样, 分别测定呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮的峰面积, 计算三者的 RSD 分别为 0.57%、1.04%和 1.22%($n=8$), 结果表明供试品溶液在室温下放置 24 h 保持稳定。

2.8 检测限和定量限

实验中对 3 个倍半萜类成分的检测限和定量限进行了考察, 取“2.2”项下制备的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 进样 1 μL , 测得的信噪比分别为14.80, 17.50, 10.83, 经折算呋喃二烯的检测限和定量限分别为 0.54 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 1.81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 牻牛儿酮的检测限和定量限分别为 0.48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 1.58 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 莪术二酮的检测限和定量限分别为 1.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 6.47 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 该方法能够检测出较低浓度的 3 个成分。

2.9 加样回收率试验

分别取已知含量的莪术油共 6 份, 每份 25 mg, 加入适量的呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮对照品, 按“2.3”项下供试品制备方法及“2.1”项下色谱条件测定, 分别计算回收率和 RSD 值, 呋喃二烯 97.94%, 1.50%; 牻牛儿酮 96.07%, 1.68%; 莪术二酮 99.33%, 1.88%, 结果见表 1。结果表明, 回收率符合试验要求。

2.10 样品测定

取不同来源和批次的样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。分别测定了 9 批样品中呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮的含量, 结果见表 2。

3 讨论

方法学验证结果显示: CO_2 超临界流体色谱法同时测定莪术油中 3 个倍半萜类成分的含量, 该方法仅以 1 个梯度在 8 min 内使得呋喃二烯、牻牛儿酮和莪术二酮得到良好的分离, 比现行标准 (35 min) 节省了很多时间, 且 3 个测定的色谱峰周

表 1 回收率试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery test($n=6$)

成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
呋喃 二烯	1.198 0	1.203 6	2.402 7	100.09	97.94	1.50
	1.193 8	1.203 6	2.372 0	97.89		
	1.200 9	1.203 6	2.351 0	95.56		
	1.191 9	1.203 6	2.366 8	97.62		
	1.187 7	1.203 6	2.366 8	97.97		
牻牛 儿酮	1.203 2	1.203 6	2.389 2	98.54	96.07	1.68
	1.491 2	1.524 5	2.978 9	97.59		
	1.485 9	1.524 5	2.909 7	93.39		
	1.494 7	1.524 5	2.946 1	95.20		
	1.483 6	1.524 5	2.970 4	97.53		
莪术 二酮	1.478 3	1.524 5	2.940 0	95.88	99.33	1.88
	1.497 7	1.524 5	2.973 9	96.84		
	4.213 8	4.191 5	8.476 4	101.70		
	4.198 9	4.191 5	8.290 0	97.60		
	4.223 8	4.191 5	8.276 2	96.68		
	4.192 3	4.191 5	8.366 8	99.60		
	4.177 3	4.191 5	8.365 8	99.93		
	4.232 1	4.191 5	8.443 9	100.49		

表 2 不同来源和批次的莪术油测定结果($n=2$)

Tab. 2 Results of the determination of the Zedoary Turmeric Oil($n=2$)

批号	呋喃二烯		牻牛儿酮		莪术二酮	
	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/ %	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/ %	含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/ %
A090702	47.51	0.97	58.78	0.94	164.82	1.17
B120302	177.19	0.60	88.53	1.05	341.67	1.05
A110402	103.03	0.67	81.40	0.25	314.15	0.25
A100301	88.66	0.61	72.38	0.11	279.34	0.11
B120706	154.03	0.89	90.36	1.12	348.72	1.12
B120312	176.14	0.23	85.18	0.11	328.74	0.11
B100807	139.72	0.07	86.19	0.15	332.63	0.15
B110908	136.53	0.13	88.01	1.29	339.64	1.29
A080903	107.27	0.12	84.29	0.70	325.32	0.70

围无干扰, 克服了现行标准中分离度欠佳的不足; 同时由于所使用的流动相主要为 CO_2 , 廉价易得且环境友好, 减少了有机溶剂的用量, 不但绿色环保, 而且也节约了成本, 该方法作为莪术油的质量控制具有优势。

实验中对呋喃二烯色谱峰前面的一个较大的色谱峰进行了研究, 为另一个倍半萜类成分——莪术烯, 由于受到周边的干扰峰影响, 加样回收率大约在 110%左右, 没有能够通过方法学的验证, 还有待于色谱条件的进一步优化。

由于目前专用于超临界流体色谱的分析柱品

种不如液相色谱宽泛和成熟,选择空间不大。课题组在实验中尝试了沃特世的主要色谱柱,包括 ACQUITY UPC² BEH 色谱柱、ACQUITY UPC² Torus 2-PIC 色谱柱、ACQUITY UPC² Torus 1-AA 色谱柱、ACQUITY UPC² Torus DIOL 色谱柱、ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱,发现只有 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 在合适的流速和背压等条件下,能够使得色谱峰有良好的分离,有的色谱柱存在峰重叠合并或峰形很差的现象,影响因素尚不清楚,目前认为主要可能是柱填料表面的活性位点与倍半萜类成分吸附机制的规律性认识不够,故方法中选用 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱。

实验过程中发现,不同的共溶剂对色谱的行为影响比较大,实验中分别考察了乙腈、甲醇和异丙醇等多种有机溶剂作为共溶剂,结果发现乙腈作为共溶剂,在 ACQUITY UPC² HSS C₁₈ SB 色谱柱上的色谱行为效果最好。

实验过程中发现,对样品以不同的溶剂溶解,尽管进样量为 1 μL,但对整个色谱行为有很大的影响,主要考察了无水乙醇、异丙醇、甲醇、乙腈以及乙腈和一定比例的正己烷,均能使样品完全溶解,但会影响峰形,特别是无水乙醇会导致牻牛儿酮和莪术二酮的色谱峰严重钝化,但却能够使呋喃二烯色谱峰更加尖锐,极少量由进样带入的共溶剂对色谱行为影响较大,它的原因尚在进一步研究中。综合比较,选择以乙腈作为溶剂来溶解样品。

波长的确定,通过 DAD 光谱扫描,3 个对照品中呋喃二烯和莪术二酮在 216 nm 附近有最大吸收且较为平坦,牻牛儿酮略差,综合比较后选择 216 nm 作为检测波长。

由于柱温对超临界流体的影响较大,故实验过程中考察了 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C 等不同柱温,结果发现随着柱温的上升,色谱峰的保留时间逐渐变大,色谱峰之间分离逐步增加,考虑到莪术油中倍半萜类成分对热的不稳定性,故将柱温控制在 55 °C。

背压的合理设置也是超临界流体色谱分离的关键要素,实验中考察了背压分别为 1 600, 1 800, 2 000, 2 200, 2 400 psi,随着背压的上升,色谱峰的保留时间逐渐变小,峰形也变好,但会有很

小的干扰峰合并,故选择背压为 2 000 psi。

尽管 CO₂ 超临界流体色谱在中药含量测定的分析测试报道相对较少,但该方法在莪术油中倍半萜成分的测定上显示了它独特的优势,为莪术油的质量控制提供了一种新的参考。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 四部[S]. 2015: 64-65.
- [2] XUE Q, RONG A, YUN H, et al. Separation of 25R/S-ergostane triterpenoids in the medicinal mushroom *Antrodia camphorata* using analytical supercritical-fluid chromatography [J]. J Chromatography A, 2014(1358): 252-260.
- [3] KVETA K, TEREZA S, JIRI V, et al. Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation [J]. Anal Chimica Acta, 2014(821): 1-33.
- [4] ZHANG L S, SONG Z R, DONG Y Q, et al. Enantiomeric separation of 1,4-dihydropyridines by liquid-phase microextraction with supercritical fluid chromatography [J]. J Supercritical Fluids, 2016(107): 129-136.
- [5] AMANDINE D, PIERRE L, ERIC Z, et al. Evaluation of the quantitative performances of supercritical fluid chromatography: From method development to validation [J]. J Chromatography A, 2014(1353): 78-88.
- [6] HICKS M B, REGALADO E L, TAN F, et al. Supercritical fluid chromatography for GMP analysis in support of pharmaceutical development and manufacturing activities [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016(117): 316-324.
- [7] ZHU R J, WANG B, HU F, et al. Qualitative and quantitative analysis of bushen jiannao grains by ultra performance convergence chromatography [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2015, 43(2): 288-293.
- [8] MARKUS G. Supercritical fluid chromatography for the separation of isoflavones [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015(107): 364-369.
- [9] AICHNER D, GANZERA M. Analysis of anthraquinones in rhubarb (*Rheum palmatum* and *Rheum officinale*) by supercritical fluid chromatography [J]. Talanta, 2015(144): 1239-1244.
- [10] XU Y W, HUANG J, SUN Q L, et al. Prospect of ultra performance convergence chromatography technology and applications in TCM research and quality control [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med(世界科学技术-中医药现代化), 2015, 16(3): 543-548.
- [11] YANG J f, XU C L, ZHANG J, et al. Determination of the enantiomer of iopamidol by supercritical fluid chromatography [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(12): 1566-1569.
- [12] ZHU L I, ZHAO Y, SUN X g, et al. Application of supercritical fluid chromatography in natural products [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2016, 36(8): 1317-1323.
- [13] 中国药典. 一部[S]. 2015: 412-413.
- [14] ZHANG P, ZHU M, TANG D f, et al. Simultaneous HPLC determination of three sesquiterpenes content in *Oleum Curcumae* [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(11): 1825-1827.

收稿日期: 2018-12-28

(本文责编: 蔡珊珊)