

鸦胆子油乳注射剂 HPLC-ELSD 指纹图谱分析

李炳东¹, 田金苗^{2*}, 郭汉文², 王怡君², 孔令锋²

(1. 辽河油田总医院, 辽宁 盘锦 124000; 2. 辽宁省药品检验检测院, 沈阳 110023)

[摘要] 目的:建立鸦胆子油乳注射剂的 HPLC-ELSD 指纹图谱,为科学评价其质量提供依据。方法:运用岛津 2010C 高效液相色谱仪和奥泰 2000 蒸发光检测器,采用 Waters C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-二氯甲烷(65:35),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测温度 70 °C,柱温 30 °C,进样量 10 μL。结果:在 10 批鸦胆子油乳注射剂基础上,建立了有 8 个共有峰的鸦胆子油乳注射剂的 HPLC-ELSD 色谱图,方法的精密度、重复性与稳定性良好,相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,相似度均 > 0.99,各峰分离度良好,指纹信息完整,符合指纹图谱技术规范。结论:所建方法简单、可靠,可作为鸦胆子油乳注射剂质量控制的重要依据之一。

[关键词] 指纹图谱; 鸦胆子油乳注射剂; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0084-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014220084

HPLC-ELSD Fingerprint of Bruceae Fructus Oil Latex Injection

LI Bing-dong¹, TIAN Jin-miao^{2*}, GUO Han-wen², WANG Yi-jun², KONG Ling-feng²

(1. Liaohe Oilfield General Hospital, Panjin 124000, China;

2. Liaoning Provincial Institute for Control of Drug, Shenyang 110023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of fingerprint analysis on Brucea Javanica oil latex Injection by HPLC-ELSD and provide a reference for the quality evaluation of Brucea Javanica oil latex Injection. **Method:** The sample were determined by shimadzu 2010C HPLC and Alltech 2000 ESLD with Waters C₁₈ analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), by using acetonitrile-dichloromethane (65:35) as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detection temperature of 70 °C, column temperature 30 °C, inject volume 10 μL. **Result:** Its fingerprint exhibited better separation for each peak, revealing amount of finger information, based on the ten batches

[收稿日期] 20140806(020)

[第一作者] 李炳东,从事医院制剂的制备与分析研究,Tel:0427-7650589,E-mail:libingdong@sina.com

[通讯作者] * 田金苗,主管药师,从事药品检验及中药质量标准研究,Tel:024-25425645,E-mail:tianjinmiao@sina.com

- [4] 王彧丽,戴德雄,朱莹. 高效液相色谱法测定骨刺胶囊中土的宁[J]. 中草药,2010,41(9):1482.
- [5] 李丽敏,王欣美,王柯,等. RP-HPLC 测定镇痛活络酊中 3 种乌头类生物碱含量[J]. 中成药,2008,30(12):1785.
- [6] 翟小燕,梁基智,邓洁芳,等. 反相高效液相色谱法测定马红丸中马钱子碱和土的宁的含量[J]. 中药材,2010,33(7):1179.
- [7] 陈军,肖寒露,蔡宝昌,等. 磷脂组成对马钱子总生物碱脂质体药动学的影响[J]. 中国药学杂志,2010,45(24):1944.
- [8] 于蓓蓓,闫雪生,高雅. 马钱子缓释片的制备及其释放度研究[J]. 中成药,2011,33(8):1333.
- [9] 简晖,董宁霞,郑晗,等. 附子中 3 种双酯型生物碱的定量分析[J]. 中草药,2008,39(9):1413.
- [10] 李明梅. 高效液相色谱法测定麝香风湿片中乌头碱的含量[J]. 中国生物药物杂志,2012,33(6):836.
- [11] 安益强,汤道权,印晓星,等. HPLC 法同时测定双黄连颗粒中 9 种成分[J]. 中草药,2012,43(1):91.
- [12] 李智勇,邓亚利,孙冬梅. HPLC 法测定癌痛巴布剂中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱[J]. 中成药,2011,33(6):988.

[责任编辑 刘德文]

of *Brucea Javanica* oil latex Injection, eight common peaks were selected in chromatograms. The precision reproducibility and stability of the method is good, and RSD of the relative retention time and relative peak area were less than 3.0%, the similarity is greater than 0.99, according to the technical requirements of fingerprint on Chinese traditional medicine. **Conclusion:** Proposed HPLC fingerprint is convenient, reliable and can be used as the important evidences for the quality control of *Brucea Javanica* oil latex Injection.

[**Key words**] fingerprint; *Brucea Javanica* oil latex Injection; HPLC

鸡胆子油乳注射液处方组成为精制鸡胆子油、精制豆磷脂、甘油^[1]。其中鸡胆子油为苦木科植物鸡胆子 *Brucea javanica* 的干燥成熟果实中提取得到的脂肪油^[2]。用其制得的鸡胆子油乳剂能透过血脑屏障,在脑内产生较高的浓度,并能使颅内压下降。鸡胆子油不仅用于治疗肺癌、肺癌脑转移、肝癌、胃癌和乳腺癌等多种恶性肿瘤,还可用于治疗慢性胃炎、结肠炎和尖锐湿疣等非肿瘤疾病,与化疗药合用可提高疗效,毒副反应少,很少出现恶心、呕吐、厌食、脱发、血项下降和骨髓抑制等常规化疗药的毒副反应。鸡胆子油中主要含 85% 三油酸甘油酯,以及饱和或不饱和脂肪酸[油酸(约占总油量的 10%)、软脂酸、硬脂酸、亚油酸、十七碳烷酸、花生烯酸,豆蔻酸等]。其中油酸、亚油酸与肿瘤细胞膜有特异的亲和力,具有很强的抗癌活性。三油酸甘油酯不具有抗癌活性,但可以水解得到油酸。研究发现鸡胆子油的三油酸甘油酯水解后的产物油酸具有很强的抗肿瘤活性,而且亚油酸及其共轭亚油酸也具有抗肿瘤活性^[3]。

中成药的整体作用特点决定了中药的质量控制方法必须能对起效的全成分进行控制,应注重中药质量控制的整体性和均一性,指纹图谱可以较好地体现中药多靶点作用的特性。因此,所建立的质量控制体系才能真正达到控制中成药质量、保证中成药用药安全有效的目的^[4]。本次实验,采用指纹图谱法,用蒸发光检测器,对鸡胆子油乳注射液整体情况进行全面控制。经对样品进行检验,建立的鸡胆子油乳注射剂的指纹谱图,可作为质量控制的重要依据之一。

1 材料

1.1 仪器 2010C 型高效液相色谱仪(日本岛津), 2000 型蒸发光检测器(奥泰),甲醇、乙腈、二氯甲烷(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),水为重蒸水,其他试剂为分析纯。

1.2 试药 甘油三油酸酯、甘油三亚油酸酯对照品(批号 111692-201203, 111693-200501, 中国食品药品检定研究院提供)。1,2-亚油酸-3-油酸甘油酯,

1,2-亚油酸-3-棕榈酸甘油酯,1,2-油酸-3-亚油酸甘油酯,1,2-油酸-3-棕榈酸甘油酯,1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯,1,2-油酸-3-硬脂酸甘油酯对照品(批号 D9164, D0301, P8577, D2032, D9925, D3152, 西格玛公司提供)。

鸡胆子油乳注射剂为广州白云山明兴制药有限公司提供 5 批(批号 130704, 130801, 131006, 131101, 131107),沈阳药大药业有限责任公司提供 5 批(批号 13042511, 13042611, 13071011, 13071111, 13071211),共 10 批。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[5] Waters C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-二氯甲烷(65:35),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测温度 70 °C,柱温 30 °C,进样量 10 μL,分析时间 60 min,理论塔板数按甘油三油酸酯计算不低于 4 000。

2.2 对照品溶液 精密称取三油酸甘油酯,甘油三亚油酸酯,1,2-亚油酸-3-油酸甘油酯,1,2-亚油酸-3-棕榈酸甘油酯,1,2-油酸-3-亚油酸甘油酯,1,2-油酸-3-棕榈酸甘油酯,1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯,1,2-油酸-3-硬脂酸甘油酯对照品适量,分别加流动相混合制成每 1 mL 含 0.2 mg 的溶液。

2.3 供试品溶液 取本品 0.5 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入流动相 40 mL,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz) 30 min,放冷,用流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 方法学考察^[4]

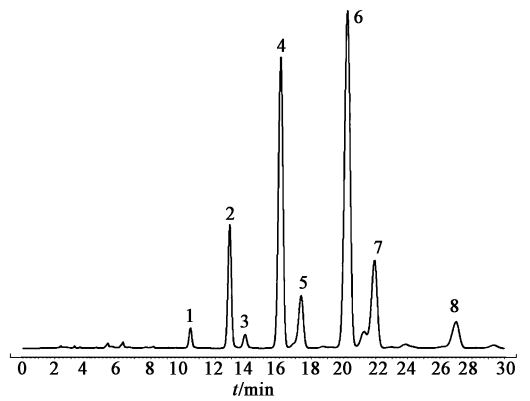
2.4.1 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液,连续进样 6 次,每次 10 μL,以甘油三油酸酯为参照峰,对 8 个共有峰的相对保留时间及相对峰面积进行统计,RSD 均 < 3.0%,同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,结果表明仪器稳定,精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于配制后的 0, 8, 15, 20, 25 h,精密吸取 10 μL,注入液相色谱仪,测定。以甘油三油酸酯为参照峰,对 8 个共有峰的的相对保留时间及相对峰面积进行统计,

RSD 均 < 3.0% ,同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,结果表明,供试品溶液在配制后 25 h 内基本稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批号样品共 6 份,按照 2.3 项进行供试品溶液制备,测定并计算,结果 8 个共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3.0% ,同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,表明本方法重复性较好

2.5 指纹图谱分析的建立 10 批鸦胆子油乳注射剂分别按照 2.3 项进行供试品溶液制备,按 2.1 项色谱条件测定,将从色谱工作站导出的 AIA 文件导入国家药典会推荐使用的“中药指纹图谱相似度评价系统(2012.1 版)”,见图 1。软件自动生成对照谱图,拟合成胆子油乳注射剂共有模式图谱,见图 2。在 8 个特征峰中选择 6 号峰(甘油三油酸酯)为参照峰。确定 8 个共有峰为构成鸦胆子油乳注射剂指纹图谱的特征峰,样品中共有峰的相对保留时间和相对峰面积分别列于表 1, 2。10 批鸦胆子油乳注射剂与对照指纹图谱相似度计算结果分别为 0.998, 0.999, 0.996, 0.999, 0.996, 0.999, 0.998, 0.998, 0.998, 0.999。



1. 甘油三油酸酯;2. 1,2-亚油酸-3-油酸甘油酯;
3. 1,2-亚油酸-3-棕榈酸甘油酯;4. 1,2-油酸-3-亚油酸甘油酯;
5. 1-棕榈酸-2-油酸-3-亚油酸甘油酯;6. 甘油三油酸酯;
7. 1,2-油酸-3-棕榈酸甘油酯;8. 1,2-油酸-3-硬脂酸甘油酯

图 2 鸦胆子油乳注射剂 HPLC 共有指纹谱

3 讨论

3.1 蒸发光温度的选择^[5] 参考蒸发光检测器检测温度的设置原则,考察了相同色谱条件下蒸发光检测器检测温度为 60, 70, 85 ℃ 时对供试品分离结果的影响。结果显示 60, 85 ℃ 条件下基线噪音比较大, 70 ℃ 效果较好。

3.2 流动项的选择^[5] 分别考察了乙腈-二氯甲烷(65:35)、乙腈-异丙醇-正己烷(66:20:14)为流动相,实验结果表明,乙腈-二氯甲烷(65:35)为流动相,使各色谱峰分离效果理想。

3.3 提取溶剂和提取时间的选择 参照《中国药典》2010 年版一部薏苡仁油中三油酸甘油酯的含量测定方法,采用流动相作为提取溶剂,以超声处理作为提取方法,以供试品溶液完全澄清作为指标考察超声处理的时间,结果表明超声时间为 30 min 即可保证鸦胆子油乳注射液完全破乳,溶解于流动相。

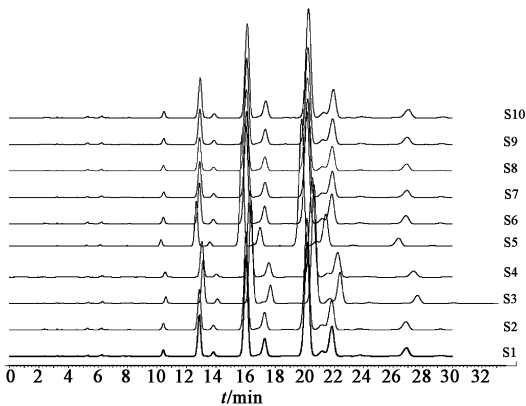


图 1 10 批鸦胆子油乳注射剂 HPLC 指纹(特征)谱叠加

表 1 10 批鸦胆子油乳注射剂共有峰的相对峰面积

No.	样品号										平均	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.031	0.031	0.032	0.032	0.033	0.032	0.033	0.031	0.032	0.034	0.032	2.8
2	0.235	0.231	0.225	0.227	0.228	0.227	0.232	0.235	0.227	0.231	0.230	1.5
3	0.028	0.026	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	2.0
4	0.698	0.690	0.695	0.691	0.695	0.700	0.696	0.698	0.700	0.704	0.697	0.6
5	0.112	0.111	0.112	0.111	0.109	0.108	0.107	0.112	0.108	0.111	0.110	1.6
6(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.0
7	0.233	0.227	0.231	0.228	0.235	0.232	0.240	0.233	0.232	0.227	0.232	1.7
8	0.091	0.089	0.091	0.090	0.092	0.090	0.087	0.091	0.090	0.092	0.090	1.7

表 2 10 批鸦胆子油乳注射剂共有峰的相对保留时间

No.	样品号										平均	RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10		
1	0.517	0.517	0.517	0.517	0.517	0.517	0.525	0.517	0.517	0.517	0.518	0.5
2	0.638	0.638	0.638	0.638	0.638	0.638	0.650	0.638	0.638	0.638	0.639	0.6
3	0.685	0.685	0.685	0.685	0.686	0.686	0.699	0.685	0.685	0.685	0.687	0.6
4	0.795	0.795	0.795	0.795	0.795	0.795	0.811	0.795	0.795	0.795	0.797	0.6
5	0.858	0.857	0.857	0.857	0.857	0.858	0.876	0.858	0.857	0.858	0.859	0.7
6(s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.023	1.000	1.000	1.000	1.002	0.7
7	1.083	1.083	1.083	1.083	1.084	1.083	1.110	1.083	1.083	1.083	1.086	0.8
8	1.334	1.333	1.332	1.333	1.334	1.333	1.370	1.333	1.332	1.333	1.337	0.9

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂. 第14册[S]. 1998:103.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:238.
- [3] 马玉坤,胡安新,邹满. 鸦胆子油临床应用进展[J]. 山东医药,2004,44(17):61.
- [4] 王海波,裴世柱. 指纹图谱技术在重要研究中的应用[J]. 辽宁中医学院学报,2005,7(4):395.
- [5] 郭辉,胡晨,钱俊青,等. 鸦胆子油 HPLC-ELSD 指纹图谱研究[J]. 中成药,2012,34(7):1311.
- [6] 李宏,邱昌林,项其. 高效液相色谱法测定鸦胆子油乳注射剂中脂肪酸含量[J]. 中国现代应用药学杂志,2006,23(4):329.
- [7] 项其,周莉玲,姚崇舜,等. HPLC 法测定鸦胆子油中脂肪酸[J]. 中草药,2006,3(37):383.
- [8] 周春玲,刘艳. 鸦胆子挥发油 GC 指纹图谱相似度分析[J]. 西北药学杂志,2006,21(6):249.
- [9] 周春玲,陈小辉,毕开顺. GC 法测定鸦胆子中油酸和亚油酸的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(7):996.
- [10] 中国医学科学院药物研究所. 中药志. 第3册[S]. 北京:人民卫生出版社,1984:527.

[责任编辑 顾雪竹]