

鸦胆子油自微乳化颗粒质量控制方法研究

李彤晖^{1*}, 李晔¹, 陈钢³, 蒋楠⁴, 孙雯², 辛永洁¹

(1. 陕西省中医药研究院, 西安 710003; 2. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046;
3. 广东药学院, 广州 510006; 4. 郑州大学附属洛阳市中心医院, 河南 洛阳 471000)

[摘要] **目的:**建立鸦胆子油自微乳化颗粒的质量控制方法。**方法:**以处方中的鸦胆子油为研究对象,依据《中国药典》有关规定,进行制剂质量评价,并采用HPLC对油酸、亚油酸进行含量测定。采用Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱,以甲醇-水(95:5)为流动相,流速1 mL·min⁻¹,检测波长242 nm。**结果:**制剂检查符合药典规定;油酸、亚油酸分别在进样质量浓度为0.004 362~0.043 62($r=0.999\ 5$)0.000 912~0.009 14 g·L⁻¹($r=0.999\ 6$)呈良好的线性关系($n=6$);平均回收率为98.04%,101.60%,方法精密度高,重复性好。**结论:**该方法灵敏、简便、准确,可作为鸦胆子油自微乳化颗粒质量控制的方法。

[关键词] 鸦胆子油自微乳化颗粒; 油酸; 亚油酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0089-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014080089

Study on the Quality Control for Self-microemulsifying Granule of Brucea Javanica Oil

LI Tong-hui^{1*}, LI Ye¹, CHEN Gang³, JIANG Nan⁴, SUN Wen², XIN Yong-jie¹

(1. Shaanxi Province Chinese Medicine Research Institute, Xian 710003, China;
2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;
3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
4. Luoyang Central Hospital of Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang 471000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the methods of quality control for self-microemulsifying granule of Brucea Javanica Oil. **Method:** According to Chinese Pharmacopoeia, the quality of preparation was estimated. The HPLC method was used to determine the content of oleic acid and linoleic acid. The product was analyzed by HPLC, using Venusil XBP-NH₂ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with methanol-water (95:5) as the mobile phase, the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength of 242 nm. **Result:** The quality of preparation accorded with Chinese Pharmacopoeia regulation. The calibration curve showed good linearity over the range of 0.004 362-0.043 62 g·L⁻¹ for oleic acid; the average recovery was 98.04%. The calibration curve showed good linearity over the range of 0.000 912-0.009 14 g·L⁻¹ for linoleic acid; the average recovery was 101.60%. The content method is convenient, accurate and reduplicative. **Conclusion:** TLC and HPLC methods are simple, accurate and fast, which could be used effectively for the quality control of self-microemulsifying granule of Brucea Javanica Oil.

[Key words] self-microemulsifying granule of Brucea Javanica Oil; oleic acid; linoleic acid

[收稿日期] 20130315(006)

[基金项目] 2009年陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项项目(2009ZDKG-82)

[通讯作者] *李彤晖,副研究员,从事中药及其制剂质量标准研究, Tel:029-87251837, E-mail:917754898@qq.com

近年来,自微乳化给药系统 (self-emulsifying drug delivery system, SMEDDS) 发展成为用于难溶性药物口服给药的一种新技术^[1],可在胃肠道内,通过胃肠道蠕动或温和搅拌自发乳化形成 O/W (粒径 10 ~ 100 nm) 微乳^[2]。鹅胆子油自微乳化颗粒是由鹅胆子油为主药制成的制剂,用于治疗消化道肿瘤、宫颈癌、肺癌^[3-4]、原发性肝癌^[5]及乳腺癌等多种恶性肿瘤^[6]。为了控制该制剂的质量,我们对该制剂中的有效成分进行鉴别、检查和含量测定的实验研究。本文依据《中国药典》2010 年版一部附录中 I C 颗粒剂项下的有关规定,对制剂中粒度、水分、溶化性、装量差异、微生物限度等^[6]进行考察,并采用 HPLC 对制剂中的油酸、亚油酸进行含量测定。

1 材料

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪 (日本岛津), LC-Solution 色谱数据工作站, BP211D 型电子分析天平 (d = 0.01 mg, 德国赛多利斯天平有限公司), KQ-100 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 20 ~ 200, 100 ~ 1 000 μ L 移液枪 (大龙), 水浴箱、冰箱、吹风机以及其他常用实验室仪器。鹅胆子油固体自微乳化颗粒 (实验室自制, 批号 20120320, 20120321, 20120322), 油酸 (sigma 公司, 含量 \geq 99%, 批号 BCBF5052V)、亚油酸 (sigma 公司, 含量 \geq 99.0%, 批号 BCBF2279V)、十七烷酸 (sigma 公

司, 含量 \geq 98.0%, 批号 081M1141V), 使用前置干燥器中干燥至恒重。 ω -溴代苯乙酮、氢氧化钾、冰乙酸、三乙醇胺、丙酮, 甲醇为色谱纯试剂, 水为纯净水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 性状 鹅胆子油固体自微乳化制剂为白色颗粒, 无味。

2.2 鉴别 取本品 1 g, 加石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液补加石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 至 20 mL, 作为供试品溶液。阴性样品制法同上。取油酸对照品, 加石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 制成每 1 mL 含 3 mg 的溶液, 作为对照品溶液。薄层色谱法照《中国药典》(附录 VIB) 试验, 吸取上述 3 种溶液各 1 ~ 3 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯-冰醋酸 (8.5:1.5:0.1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置碘蒸气中熏至斑点显清晰。结果表明供试品色谱中, 在与油酸对照品色谱相应的位置上显相同黄色斑点, 而阴性对照在相应位置未检出斑点。

2.3 检查项考察 根据《中国药典》2010 年版一部附录中 I C 颗粒剂项下的有关规定, 考察了鹅胆子油固体自微乳化颗粒 3 个批号 (20120320, 20120321, 20120322) 的粒度、水分、溶化性、装量差异、微生物限度等检查, 结果见表 1。

表 1 鹅胆子油固体自微乳化颗粒检查项试验

批号	检查					微生物限度				
	性状	粒度 / %	水分 / %	溶化性	装量差异	菌落总数 CFU/g	大肠菌群 MPN/g	霉菌 CFU/g	酵母菌 CFU/g	致病菌
20120320	内容物为白色颗粒	符合规定	4.5	符合规定	符合规定	<10	<30	<10	<10	未检出
20120321	内容物为白色颗粒	符合规定	4.2	符合规定	符合规定	<10	<30	<10	<10	未检出
20120322	内容物为白色颗粒	符合规定	5.1	符合规定	符合规定	<10	<30	<10	<10	未检出

注:致病菌包括沙门氏菌、志贺氏菌、溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌。

2.4 鹅胆子油含量分析方法的建立

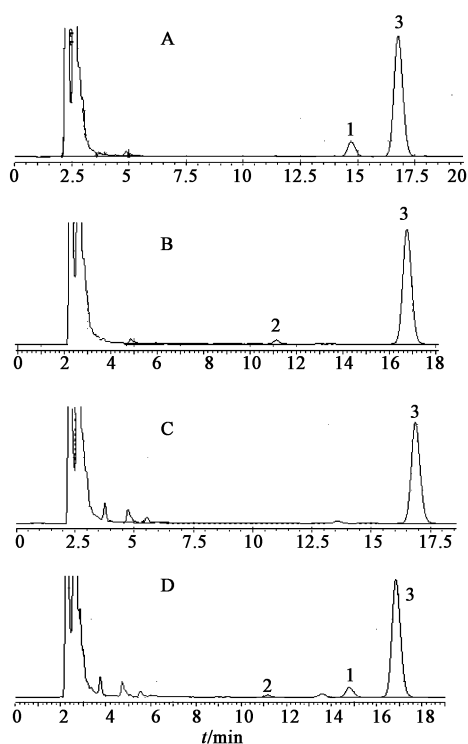
2.4.1 色谱条件及系统适应性 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-水 (95:5), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 242 nm, 流速 1 mL \cdot min⁻¹。

按处方比例和样品制备工艺制成不含鹅胆子油的阴性对照品, 按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 按上述色

谱条件测定。在油酸和亚油酸峰处, 阴性对照品无干扰。见图 1。

2.4.2 溶液的制备 精密吸取油酸、亚油酸对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成 2, 1 g \cdot L⁻¹ 的溶液。再分别精密吸取 0.5, 0.25 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密称取十七烷酸对照品 20 mg, 以甲醇定容至 10 mL 量瓶中制成 2 g \cdot L⁻¹ 的溶液。

2.4.3 供试品溶液的制备^[8] 取样品约 1 g, 精密



A. 油酸对照品; B. 亚油酸对照品; C. 阴性样品;
D. 鸦胆子油自微乳化颗粒剂;
1. 油酸; 2. 亚油酸; 3. 内标(十七烷酸)

图1 鸦胆子油固体自微乳化颗粒供试品 HPLC

称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中。精密加水 10 mL,称重,在 37 °C 水浴保温 30 min,取出后,超声处理 30 min,取出,放凉,称重,用甲醇溶液补足质量,静置待用。精密吸取续滤液 100 μL ,置于 10 mL 具塞离心管中,加氢氧化钾-甲醇溶液(0.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$,0.4 mL)漩涡振摇 1 min,于 60 °C 水浴加热 30 min,冷却至室温后加异丙醇-正庚烷-冰醋酸溶液(40:10:1) 2.5 mL,漩涡振摇 1 min,间断超声 2 min(间断 30 s,强度 100 W),室温下放置 10 min。再精密加入正庚烷 1 mL,双蒸水 1.5 mL,漩涡振摇 1 min,间断超声 2 min(间断 30 s,强度 100 W),离心(2 500 r $\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min 后精密吸取上清液 1.5 mL。

精密吸取上清液 100 μL ,置于 5 mL 具塞离心管中。精密加入内标溶液 50 μL ,氮气吹干。精密加入 20 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ω -溴代苯乙酮和 25 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 三乙醇胺丙酮溶液各 50 μL ,乙腈 300 μL ,试管加塞密封,混合摇匀。90 °C 加热 15 min,冷却至室温后,精密加入 10 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸溶液 75 μL ,于 90 °C 加热 5 min,氮气吹干。精密加入甲醇 500 μL ,振摇 1 min,0.45 μm 滤膜过滤,制备供试品溶液的衍生物溶液,注入液相色谱仪,测定,即得。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取油酸、亚油酸对照品溶液各 20,50,75,100,150,200 μL ,置于 5 mL 具塞离心管中。精密加入内标溶液 50 μL ,氮气吹干。按照 2.4.3 项下的操作,得到系列油酸、亚油酸对照品衍生物溶液,根据上述色谱条件进行进样测定。以质量浓度(g $\cdot\text{L}^{-1}$) X 和对应的峰面积比 Y 进行线性回归分析,得回归方程 $Y_{\text{油酸}} = 5.2106X - 0.0017$ ($r = 0.9995, n = 6$), $Y_{\text{亚油酸}} = 5.1358X + 0.0012$ ($r = 0.9996, n = 6$)。结果表明油酸在进样质量浓度为 0.004362~0.04362 g $\cdot\text{L}^{-1}$,亚油酸在进样质量浓度为 0.000912~0.00914 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

2.4.5 精密度试验 精密吸取油酸、亚油酸对照品溶液适量,按照 2.4.3 项下的操作后,连续进样 6 次,结果油酸、亚油酸的 RSD 分别为 0.47%,1.40%,说明仪器精密度良好。

2.4.6 重复性试验 称取同一样品 6 份,按照 2.4.3 项下的操作后,按上述色谱条件分别进样 10 μL ,测定。结果油酸、亚油酸含量的 RSD 分别为 2.29%,1.51%,表明方法重复性良好。

2.4.7 日内稳定性试验 精密称取同一样品适量,按照 2.4.3 项下的操作制备供试品溶液衍生物溶液。按上述色谱条件分别在放置 0,2,6,10,14,24 h 后,进样 10 μL ,测定。结果油酸、亚油酸的 RSD 分别为 1.11%,1.61%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.8 回收率试验 精密称取已知含量的样品 12 份,分别精密加入油酸、亚油酸对照品溶液适量,各 6 份,置 50 mL 具塞锥形瓶中。按照 2.4.3 项下方法制备供试品溶液衍生物溶液,注入液相色谱仪,测定,结果见表 2,3。

表2 油酸回收率试验

No.	样品 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	5.3173	10.366	95.10		
2	5.6742	10.962	99.60		
3	5.4830	10.542	95.29		
4	5.4023	10.512	96.25	97.26	2.93
5	5.5383	10.95	101.93		
6	5.4488	10.512	95.37		

注:加入量均为 5.309 mg。

2.4.9 样品测定 取鸦胆子油固体自微乳化颗粒 3 批,按照 2.4.3 项下方法制备供试品衍生物溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,测定。根据回归方程计算油酸、亚油酸的含量,结果见表 4。

表 3 亚油酸回收率试验

No.	样品 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.876 5	1.708 3	97.17		
2	0.915 3	1.805 4	103.98		
3	0.897 2	1.761 7	100.99		
4	0.851 8	1.676 7	96.37	100.25	2.90
5	0.922 3	1.792 5	101.66		
6	0.915 7	1.783 5	101.38		

加入量均为 0.856 mg。

表 4 鸦胆子油 3 批样品的含量测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	油酸	亚油酸
20120320	10.03	1.79
20120321	10.48	1.78
20120322	10.12	1.78

3 讨论

鸦胆子油固体自微乳化颗粒的薄层色谱鉴别结果显示色谱斑点清晰、无阴性干扰。

有关鸦胆子油制剂含量测定方法有气相色谱法、薄层扫描法和 HPLC, LC-MS^[9-13]。本实验先后考察了 GC(极性毛细管柱)和 HPLC 对制剂中鸦胆子油各组分的分离鉴定,发现 GC 分析过程中柱温过高,重复性较差;HPLC 灵敏,专属性强,柱温不高,状态较稳定。

ω -溴苯乙酮在三乙醇胺催化下的酯化反应简便快捷,优于 2,4-二溴苯乙酮衍生物^[12]。本实验以 ω -溴苯乙酮、三乙醇胺为衍生化试剂,并对供试品溶液制备过程中的提取溶剂、提取时间进行筛选,确定以水为提取溶剂,采用超声提取 30 min,此法提取较完全。

采用 HPLC 对鸦胆子油自微乳化颗粒进行分离鉴定,发现该制剂处方中辅料对鸦胆子油中油酸、亚油酸分离鉴定未有影响,对照品色谱峰与制剂色谱峰一致,且结果准确可靠。该方法可用于鸦胆子油

自微乳颗粒的含量测定和质量控制。

[参考文献]

- [1] 张建,叶珍珍,崔升森. 固体自乳化新剂型的研究进展[J]. 中南药学,2011, 9(5):358.
- [2] 樊艺婕,李彤晖,吴茵. 葛根素自微乳的制备工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(3):245.
- [3] 张宇,于力克,夏宁. 鸦胆子油乳联合 GP 方案化疗对晚期 NSCLC 患者免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):254.
- [4] 王权,王满才,何曦冉,等. 鸦胆子油乳联合含铂类一线化疗方案治疗非小细胞肺癌的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志,2012,37(13):2022.
- [5] 杨明镇,王慧,蒋国军,等. 鸦胆子油乳介入治疗老年中晚期原发性肝癌[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):235.
- [6] 林宏英,吴建梅,张文生. 鸦胆子油的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006,12(4):65.
- [7] 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.
- [8] 罗淑文,邓远辉,朱艳红. 柱前衍生化 HPLC 法测定鸦胆子油中油酸和亚油酸的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(3):328.
- [9] 孔繁晟,李晔,陈钢,等. 鸦胆子油自微乳的体外释放度考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):21.
- [10] 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.
- [11] 李盈,沈琦,段成才,等. RP-HPLC 法测定鸦胆子油中油酸和亚油酸的含量[J]. 中国药房,2009, 20(36):2836.
- [12] 居文政,蒋萌,张军,等. 液相色谱-质谱测定鸦胆子油脂肪乳注射液在癌症患者体内的血药浓度[J]. 中国临床药理学志, 2005, 21(6):456.
- [13] 李宏,岳昌林,项琪,等. 高效液相色谱法测定鸦胆子油乳注射液中脂肪酸含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(4):329.

[责任编辑 顾雪竹]