

HPLC-ELSD 法测定鸦胆子油中四种甘油三酯的含量

田金苗^{1,2} 陈大为¹ 胡海洋¹ (1. 沈阳药科大学 沈阳 110016;2. 辽宁省药品检验检测院)

摘要 目的: 建立鸦胆子油中 1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈甘油酯的含量测定方法。**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(250 mm ×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-二氯甲烷(65:35),流速1.0 ml · min⁻¹;检测温度:70℃。**结果:** 四种甘油三酯分别在0.184 ~2.763 μg、0.382 ~5.724 μg、0.406 ~6.084 μg和0.204 ~3.066 μg之间线性关系良好,*r* 值分别为0.999 0、0.999 2、0.999 1 和0.999 0,回收率分别为99.01%、98.70%、98.92%和98.46%,*RSD* 分别为0.7%、0.5%、0.8%和0.9%。**结论:** 该方法操作简单,分离效果好,灵敏度高,可更好的控制鸦胆子油的质量。

关键词 鸦胆子油;甘油三酯;含量测定;蒸发光检测器

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1008-049X(2014)07-1146-03

Determination of Four Kinds of Triglyceride in *Brucea Javanica* Oil by HPLC-ELSD

Tian Jinmiao^{1,2}, Chen Dawei¹, Hu Haiyang¹ (1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Liaoning Province Institute for Drug Control)

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC method for the determination of 1,2-dilinoleoyl-3-oleoyl-rac-glycerol, 1,3-dioleoyl-2-linoleoyl-rac-glycerol, glycerol trioleate and 1,2-dioleoyl-3-palmitoyl-rac-glycerol in *Brucea Javanica* oil. **Methods:** The determination was performed using a Shimadzu 2010C HPLC with an Alltech2000 ESLD and a Waters C₁₈ analytical column (250 mm ×4.6 mm,5 μm), acetonitrile-dichloromethane was used as the mobile phase at the flow rate of 1.0 ml · min⁻¹, the detection temperature was 70℃, and the column temperature was 30℃. **Results:** The linear range of four kinds of triglyceride was 0.184-2.763 μg, 0.382-5.724 μg, 0.406-6.084 μg and 0.204-3.066 μg (*r* = 0.999 0, 0.999 2, 0.999 1 and 0.999 0), and the average recovery was 99.01%, 98.70%, 98.92% and 98.46% with *RSD* of 0.7%, 0.5%, 0.8% and 0.9%, respectively. **Conclusion:** The method is simple and sensitive with good separation efficiency, and it can be used in the quality control of *Brucea Javanica* oil.

KEY WORDS *Brucea Javanica* oil; Triglyceride; Content determination; ELSD

鸦胆子油为苦木科植物鸦胆子[*Brucea javanica* (L.) Merr.]的干燥成熟果实中提取得到的脂肪油^[1,2]。鸦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、血象下降和骨髓抑制等常规化疗药的毒副反应。其化学成分鸦胆子油中主要含 85% 甘油三酯,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^[3]。鸦胆子油原标准收载于《卫生部品标准》中药成方制剂第 14 册,检验项目包括【性状】,【鉴别】吸光度法,【检查】相对密度、折光率、碘值、酸值,【含量测定】,其中【含量测定】采用滴定法测定总酸的含量,方法落后,且不能真实反应鸦胆子油的组成成分。为了能有效控制质量,保证疗效,本试验采用 HPLC 法对鸦胆子油的主要成分 4 种甘油三酯(1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯)的含量进行了测定,现

将研究结果报道如下。

1 仪器与试剂

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

三油酸甘油酯对照品(批号:111692-201203,纯度:100%,中国食品药品检定研究院提供),1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯对照品(批号:D9164、D0301、D1782,纯度均为 100%,西格玛公司提供)。

鸦胆子油为广州白云山明兴制药有限公司提供 1 批(批号:130401)、浙江九旭药业有限公司提供 1 批(批号:130475),沈阳药大药业有限责任公司提供 1 批(批号:1304241)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[5]

Waters C₁₈ 色谱柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);采用 Waters C₁₈ 色谱柱(250 mm ×4.6 mm,5 μm);

流动相为乙腈-二氯甲烷(65:35),流速 $0.5\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$;检测温度: 70°C ,柱温 30°C ,进样量为 $10\text{ }\mu\text{l}$;分析时间:60 min,理论塔板数按甘油三油酸酯计算应不低于4 000。蒸发光散射检测器检测,漂移管温度 70°C 及氮气流速 $2.0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

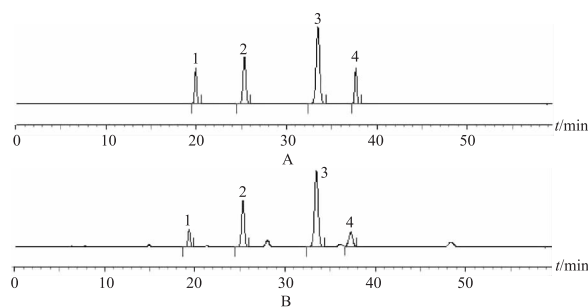
2.2 对照品溶液

精密称取1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯对照品适量,加乙腈-二氯甲烷(65:35)溶液制成每1 ml含1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯0.1 mg,含三油酸甘油酯0.2 mg的溶液。

2.3 供试品溶液

取本品50 mg,精密称定,置50 ml量瓶中,加入乙腈-二氯甲烷(65:35)混合溶液40 ml,超声处理(250 W,33 kHz)10 min,放冷,用乙腈-二氯甲烷(65:35)混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

取供试品溶液、对照品溶液各 $10\text{ }\mu\text{l}$ 进样,上述色谱条件下,四种甘油三酯与其他组分可得到基线分离。见图1。



A. 对照品 B. 供试品 1. 1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯
2. 1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯 3. 三油酸甘油酯
4. 1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯

图1 HPLC 色谱图

2.4 方法学考察^[4]

2.4.1 线性关系考察 精密称取1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯对照品适量,加乙腈-二氯甲烷(65:35)溶液制成每1 ml含1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯0.092 1 mg,含1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯0.190 8 mg,含三油酸甘油酯0.202 8 mg,含1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯0.102 2 mg的溶液,作为对照品溶液。分别精密量取对照品溶液2,5,10,20,30 μl ,注入液相色谱仪中,按上述色谱条件测定峰面积值。以进样量的对数为横座标($X, \mu\text{g}$),色谱峰面积的对数为纵座标(Y),得回归方程:1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯为 $Y = 1.732\ 1X + 6.531\ 4, r = 0.999\ 0$ 。由测定结果表

明,1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯对照品进样量在 $0.184 \sim 2.763\text{ }\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯为 $Y = 1.771\ 6X + 6.367\ 1, r = 0.999\ 2$ 。由测定结果表明:1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯对照品进样量在 $0.382 \sim 5.724\text{ }\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。三油酸甘油酯为 $Y = 1.688\ 5X + 6220\ 5, r = 0.999\ 1$ 。由测定结果表明:三油酸甘油酯对照品进样量在 $0.406 \sim 6.084\text{ }\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯为 $Y = 1.929\ 0X + 6.638\ 9, r = 0.999\ 0$ 。由测定结果表明:1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯对照品进样量在 $0.204 \sim 3.066\text{ }\mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 $10\text{ }\mu\text{l}$,连续进样6次,测定峰面积, RSD 为0.4%、0.3%、0.3%和0.3%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验考察 取供试品溶液,分别于0,10,17,25,30 h,按上述色谱条件进样 $10\text{ }\mu\text{l}$,测定色谱峰面积,测定结果 RSD 分别为0.5%、0.7%、1.0%和1.0%。结果表明,供试品溶液在所考察时间内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批供试品,精密称取6份,按供试品测定项下方法操作,重复测定6次,测得1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯的平均含量分别为 $52.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (RSD 为1.0%)、 $161.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (RSD 为0.8%)、 $232.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (RSD 为0.5%)、 $65.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (RSD 为0.5%),结果表明该法重复性好。

2.4.5 加样回收率试验 取已知1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯($52.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯($161.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、三油酸甘油酯($232.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯($65.2\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)含量的供试品6份,每份约25 mg,精密称定,分别精密加入1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯对照品溶液($0.921\ 0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)1.5 ml,1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯($1.908\ 0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)2.1 ml、三油酸甘油酯($2.028\ 0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)2.9 ml、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯($1.022\ 0\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)1.6 ml,加入乙腈-二氯甲烷(65:35)混合溶液30 ml,超声处理(250 W,33 kHz)10 min,放冷,用乙腈-二氯甲烷(65:35)混合溶液稀释至刻度,摇匀,即得。测定加标样品中的1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯、三油酸甘油酯、1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯含量,结果平均回收率为99.01%、98.70%、98.92%和98.46%, RSD 为0.7%、0.5%、0.8%和

0.9% ($n=6$)。

2.5 样品含量测定

分别取 3 批供试品溶液各 10 μl , 注入液相色谱仪, 测定, 结果见表 1。

表 1 含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

批号	1,2-二亚油酸-3-油酸甘油酯	1,3-二油酸-2-亚油酸甘油酯	三油酸甘油酯	1,3-二油酸-2-棕榈酸甘油酯
130401	50.2	157.7	227.3	60.1
130475	52.2	161.2	232.8	65.2
1304241	57.1	170.3	243.0	69.9

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。结果显色, 60℃、85℃ 条件下基线噪音比较大, 70℃ 效果较好。

3.2 流动相的选择^[5]

分别考察了以乙腈-二氯甲烷(65:35)、乙腈-异丙醇-正己烷(66:20:14) 为流动相, 结果表明, 本试验采取的乙腈-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, 以供试品溶液没有油滴作为指标考察超声处理的时间, 结果表明超声时间为 10 min 即可保证鸦胆子油完全溶解于流动相。

参 考 文 献

- 1 卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂. 第 14 册. 1998. 103-105
- 2 中国药典[S]. 2010 年版. 一部. 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): 61-62
- 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): 395-397
- 5 国辉, 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): 1311-1315
- 6 孔令锋, 苗颖. HPLC-ELSD 法测定鸦胆子油乳注射液中甘油三油酸酯的含量[J]. 中国药师, 2013, 16(5): 670-672

(2014-02-09 收稿 2014-04-01 修回)