

# 青蒿油多相脂质体中维 A 酸的薄层鉴别及含量测定

何兵, 田吉, 冯文宇, 李春红, 艾洪兵

(泸州医学院药学院药物研究所, 泸州 646000)

**摘要** 目的: 建立青蒿油多相脂质体中维 A 酸的鉴别及含量测定方法。方法: 采用薄层色谱法对维 A 酸进行定性鉴别, 并采用高效液相色谱法同时测定维 A 酸及其降解产物异维 A 酸的含量。色谱柱: Dikma Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.1% 磷酸溶液 (88: 12); 检测波长: 355 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量: 10 μL。结果: 在薄层层析色谱中能检出维 A 酸, 维 A 酸在 0.1016 ~ 1.016 μg 范围内具有良好的线性关系 ( $r = 0.9999$ ); 平均回收率为 99.4%, RSD 为 0.35%。结论: 该方法简便、快速、准确, 具有良好的重复性和回收率, 可作为该制剂中维 A 酸的质量控制方法。

**关键词:** 青蒿油多相脂质体; 维 A 酸; 薄层鉴别; 含量测定; 包封率; 渗漏率; 体外释放度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)08-1309-04

## TLC identification and content determination of tretinoin in Artemisia oil polyphase liposome

HE Bing TIAN Ji FENG Wen-yu LI Chun-hong AI Hong-bing

(Institute of Materia Medica of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

**Abstract Objective** To establish the method for the identification and determination of tretinoin in artemisia oil polyphase liposome. **Methods** Tretinoin in Artemisia oil polyphase liposome was identified by TLC, and the content of tretinoin and isotretinoin were detected simultaneously by HPLC. The separation was carried out on a Dikma Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution (88: 12), the detection wavelength was set at 355 nm, the column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the injection volume was 10 μL. **Results** Tretinoin could be detected by TLC, the calibration curve showed good linearity over the range of 0.1016 - 1.016 μg ( $r = 0.9999$ ). The average recovery was 99.4% with RSD 0.35%. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and with good repeatability and recovery, it can be used as the quality control method for this preparation.

**Key words** Artemisia oil polyphase liposome; tretinoin; TLC identification; content determination; entrapment efficiency; leakage rate; *in vitro* release

青蒿油多相脂质体是我所研究的中药新药, 由青蒿油、维 A 酸、甘草酸铵等组成, 经体内、外药理学试验表明, 该制剂具有抗肝癌、肺癌、白血病的作用。为完善其质量控制标准, 采用薄层色谱法对维 A 酸进行定性鉴别, 并采用高效液相色谱法测定了维 A 酸及其降解产物异维 A 酸的含量, 同时检测了维 A 酸的包封率、渗漏率和体外释放度。该方法简单快速, 重复性好, 可作为该制剂中维 A 酸的质量控制标准。

### 1 仪器与试剂

戴安高效液相色谱仪 (P680A 四元低压梯度泵, PDA-100 二极管阵列检测器, TCC-100 柱温箱, Chromleon 色谱工作站); 瑞士 Precisa 电子天平 (XR 205SM-DR); ZRS-8G 智能溶出仪 (天津市天大天发科技有限公司); HSE-12 固相萃取装置 (天津恒奥科技发展有限公司); 固相萃取小柱 (Besp SPE Column C<sub>18</sub>, 500 mg · 6 mL<sup>-1</sup>); 硅胶 G 薄层预制板 (青岛海洋化工厂); 透析袋 (截留相对分子质量 8000~14000 美国进口分装)。

对照品维 A 酸 (批号: 100307-200401)、异维

A 酸(批号: 100224-200402), 中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为重蒸馏水; 青蒿油多相脂质体及阴性对照样品(自制, 批号: 050615 050623 050629, 规格: 10 mL)。

## 2 方法与结果

### 2.1 薄层鉴别

#### 2.1.1 溶液制备

对照品溶液: 取维 A 酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 作为维 A 酸对照品溶液。

供试品溶液: 取本品 1 mL, 加水稀释到 10 mL, 过预处理好的  $\text{C}_{18}$  固相萃取小柱(甲醇 10 mL 活化, 水 10 mL 平衡), 用 80% 甲醇 5 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 再用甲醇 2 mL 洗脱, 收集洗脱液即得。

阴性对照液: 取按处方比例及制备工艺制得缺维 A 酸的阴性对照样品, 按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

2.1.2 薄层层析 吸取上述溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚(60~90  $^{\circ}\text{C}$ ) - 乙酸乙酯 - 甲酸(40:5:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 香草醛 10% 磷酸乙醇溶液, 在 105  $^{\circ}\text{C}$  加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上显相同深蓝色斑点, 阴性对照无此斑点。结果见图 1。

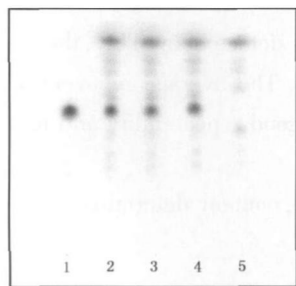


图 1 维 A 酸薄层层析图谱

Fig 1 TLC chromatogram of tretinoin

1. 维 A 酸对照品 (tretinoin reference substance) 2~4. 样品 (samples) 5. 阴性对照样品 (negative sample)

## 2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Dkm a Kromasil  $\text{C}_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈 - 0.1% 磷酸溶液 (88:12); 检测波长: 355 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速:  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

#### 2.2.2 溶液制备

对照品溶液: 取经五氧化二磷减压干燥至恒重的维 A 酸及异维 A 酸对照品适量, 精密称定, 置棕

色量瓶中, 加异丙醇制成每 1 mL 含维 A 酸 50.8  $\mu\text{g}$  异维 A 酸 5.3  $\mu\text{g}$  的溶液, 即得。

供试品溶液: 精密量取本品 1 mL, 置棕色量瓶中, 以异丙醇稀释至 25 mL, 摇匀即得。

阴性对照溶液: 精密量取按处方比例及制备工艺制得不含维 A 酸的阴性对照样品 1 mL, 以异丙醇稀释到 25 mL, 摇匀即得。

2.2.3 系统适应性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、缺维 A 酸的阴性对照溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 2。从图 2 可见, 维 A 酸的保留时间约为 11.3 min, 维 A 酸峰与异维 A 酸的分离度为 5.59, 拖尾因子为 1.02, 理论塔板数以维 A 酸峰计为 18162, 以异维 A 酸峰计为 17575。维 A 酸及异维 A 酸峰纯度因子分别为 999 和 982。阴性对照溶液的色谱图中, 在维 A 酸出峰位置处无干扰, 即本试验条件下维 A 酸与其他组分分离完全。

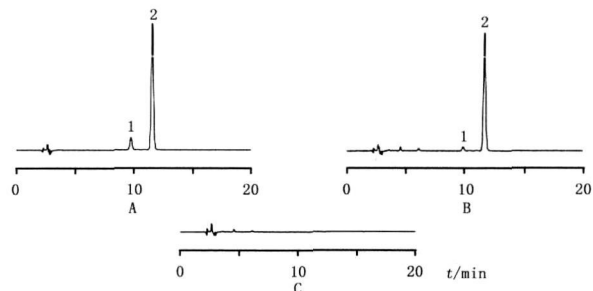


图 2 青蒿油多相脂质体 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of artenisia oil polyphase liposome

A. 对照品 (reference substances) B 供试品 (sample) C. 阴性对照 (negative sample)

1. 异维 A 酸 (isotretinoin) 2. 维 A 酸 (tretinoin)

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20  $\mu\text{L}$ , 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积  $A$  对进样量  $C$  ( $\mu\text{g}$ ) 进行线性回归, 维 A 酸和异维 A 酸的回归方程分别为:

$$A = 112.0C + 0.5459 \quad r = 0.9999$$

$$A = 108.7C + 0.0632 \quad r = 0.9999$$

结果表明, 维 A 酸进样量在 0.1016~1.016  $\mu\text{g}$  范围内, 异维 A 酸进样量在 0.0106~0.106  $\mu\text{g}$  范围内与峰面积有良好的线性关系。当信噪比为 10:1 时, 异维 A 酸的定量限为 0.65 ng。

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 测得维 A 酸和异维 A 酸峰面积的 RSD 分别为 0.26% 和 0.58% ( $n=6$ ),

表明仪器精密度良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取本品(批号: 050615)的供试品溶液, 避光 5 °C 放置, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 24, 36 h 进样测定, 测得维 A 酸和异维 A 酸峰面积的 RSD 分别为 1.1% 和 1.7% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在 36 h 内稳定。

**2.2.7 重复性试验** 取同一批样品(批号: 050615), 照“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 测得维 A 酸和异维 A 酸含量分别为 0.9601 和 0.0295  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , RSD 分别为 0.39% 和 0.56% ( $n = 6$ ), 表明本法重复性良好。

**2.2.8 回收率试验** 精密量取已知含量的本品(批号: 050615) 9 份, 每份 1 mL, 分成 3 组, 每组 3 份, 分别精密添加浓度为 0.2406  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的维 A 酸和 0.0075  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的异维 A 酸对照品溶液 3, 4, 5 mL, 照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 并计算回收率。结果维 A 酸和异维 A 酸的平均加样回收率分别为 99.4% 和 98.3%, RSD 为 0.35% 和 0.82% ( $n = 9$ )。表明本法测定有效成分和杂质含量均具有良好的回收率及较高的准确度。

**2.2.9 样品测定** 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 按上述色谱条件测定, 记录维 A 酸和异维 A 酸的峰面积, 并用外标法计算维 A 酸及其降解产物异维 A 酸的含量, 结果见表 1。

表 1 青蒿油多相脂质体中维 A 酸和异维 A 酸含量测定结果 ( $n = 3$ )

Tab 1 Determination results of tretinoin and isotretinoin in Artemisia oil polyphase liposome

批号 (Lot No.)	维 A 酸 (tretinoin)		异维 A 酸 (isotretinoin)	
	含量 (content)	RSD	含量 (content)	RSD
	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	%
050615	0.9603	0.51	0.0298	0.97
050623	0.9362	0.32	0.0316	0.64
050629	0.9538	0.47	0.0265	0.82

**2.3 包封率测定** 由于维 A 酸脂溶性极强, 在透析时, 包封于脂质体内的药物和游离药物之间的动态平衡不易破坏, 即不易发生渗漏, 故可采用透析法测定维 A 酸的包封率。经试验发现, 在透析袋中, 10 h 药物的释放就可以达到平衡, 为保证药物完全释放, 实验选择在 12 h 取样测定药物包封率。取脂质体 1 mL, 加入已处理的透析袋内, 将透析袋浸入透析液(即制备脂质体的水合介质) 100 mL 中, 置于

磁力搅拌器上搅拌, 定时更换透析液, 透析 12 h 将透析袋内容物取出置 25 mL 量瓶中, 加异丙醇稀释至刻度, 按上述色谱条件测定含量, 作为  $W_{\text{包}}$ 。另取脂质体 1 mL, 加异丙醇稀释到 25 mL, 测定含量, 作为总药量  $W_{\text{总}}$ 。根据公式包封率  $EE(\%) = (W_{\text{包}} / W_{\text{总}}) \times 100\%$  计算包封率。测得 3 批脂质体中维 A 酸的包封率分别为 97.3%, 96.8%, 98.3%; RSD 为 1.2%, 0.93%, 1.4% ( $n = 3$ )。

**2.4 体外释放度试验**

取脂质体 1 mL, 置透析袋内(扎紧两端, 除去气泡), 固定于溶出仪的搅拌桨上, 以 200 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) - 异丙醇 (60:40) 为介质, 在 37 °C 水浴中以 100  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  搅拌, 分别在 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 24 h 吸取透析液 1 mL, 并及时补充等量同温介质, 进样测定, 以此作为释放的游离药物总量  $W_{\text{游}}$ 。以含量测定项下测得含量作为总药物量  $W_{\text{总}}$ , 以公式  $Q(\%) = (W_{\text{游}} / W_{\text{总}}) \times 100\%$  计算累积释药率。另取 1 mg 维 A 酸原料, 加异丙醇 1 mL 溶解, 同法测定维 A 酸溶液的体外释放度, 以累积释药率  $Q(\%)$  对释药时间  $t(\text{h})$  作图, 见图 3。

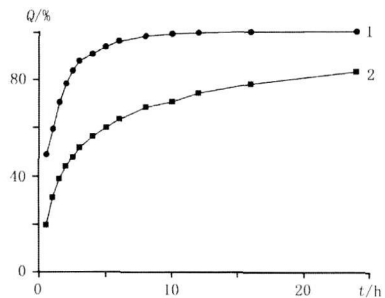


图 3 青蒿油多相脂质体和维 A 酸溶液体外释放曲线

Fig 3 Release curves of tretinoin in Artemisia oil polyphase liposome and tretinoin solution

1. 维 A 酸溶液 (tretinoin solution) 2. 青蒿油多相脂质体 (Artemisia oil polyphase liposome)

从图 3 可见, 维 A 酸溶液在 1 h 释药接近 60%, 6 h 趋于平衡; 而青蒿油多相脂质体中的维 A 酸释放较缓慢, 前 6 h 内仅释放了 60% 的药物。对脂质体和溶液的 0~24 h 体外释药数据分别以零级、一级、Higuchi 和 Weibull 对数正态分布方程进行拟合, 结果脂质体以对数正态分布方程拟合最好, 而溶液以一级方程拟合最好, 体外释放方程分别为:

$$Q_{\text{脂质体}} = 0.1685 \ln t + 0.3220 \quad r = 0.9985$$

$$\ln(100 - Q_{\text{溶液}}) = -0.3568t - 0.8289 \quad r = 0.9972$$

**2.5 渗漏率检测** 同包封率测定法, 分别在 0, 3

6 9 12 18月测定各月包封率  $W_{包n}$ , 以公式渗漏率  $LR(\%) = [(W_{包0} - W_{包n}) / W_{包0}] \times 100\%$  计算各月的渗漏率。结果见表 2。

表 2 青蒿油多相脂质体中维 A 酸的渗漏率测定结果 (%)

Tab 2 Leakage rate of tretino in in Artemisia oil polyphase liposome

批号 (Lot No.)	时间 (time) / month				
	3	6	9	12	18
050615	0.26	0.53	0.93	1.49	2.02
050623	0.12	0.32	0.75	1.18	1.63
050629	0.23	0.47	0.86	1.29	1.86

### 3 讨论

**3.1 薄层鉴别提取方法选择** 试验尝试多种破乳和提取方法, 但效果均不理想, 主要是常规提取方法易导致维 A 酸分解为异维 A 酸, 二者合并为一椭圆斑点。后来发现  $C_{18}$  SPE 小柱能吸附脂质体内药物, 故以脂质体通过预处理的 SPE 小柱, 以 80% 甲醇洗脱尽量除去其他杂质后, 再以甲醇洗脱获得维 A 酸供试品溶液, 其展开斑点圆整, 维 A 酸也未大量分解为异维 A 酸, 异维 A 酸干扰较小。

**3.2 薄层鉴别展开系统选择** 在鉴别维 A 酸时尝试了文献报道的所有展开系统<sup>[1~3]</sup>, 但效果均不理想, 主要是由于维 A 酸与青蒿油中某一成分无法分离, 即空白有干扰。后采用鉴别方中青蒿油的展开系统: 石油醚 (60~90 °C) - 乙酸乙酯 (36:5), 再加适当甲酸, 并增加石油醚的比例, 即石油醚 (60~90 °C) - 乙酸乙酯 - 甲酸 (45:5:1), 可有效分离维 A 酸和青蒿油, 分离效果良好。

**3.3 薄层鉴别显色剂选择** 维 A 酸的薄层鉴别, 文献<sup>[1~3]</sup> 普遍采用  $GF_{254}$  薄层板, 并在紫外灯下检视, 但实验发现紫外灯下维 A 酸的斑点对比度并不强, 给照相带来一定困难, 且背景色亮绿色荧光也很难冲印出来, 故实验比较了其他显色剂。当喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液和 10% 硫酸乙醇溶液时, 维 A 酸显淡黄色。而 0.1% 溴酚蓝乙醇溶液在蓝紫色背景下所显黄色斑点也不强。最后发现喷以 2% 香草醛 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热 2 min, 维 A 酸即显深蓝色, 而空白中的青蒿油斑点在维 A 酸位置不显色, 即空白无干扰。但此显色剂中硫酸具有强氧化性, 很容易将薄层板烤黄, 试验发现将磷酸代替硫酸, 即 2% 香草醛 10% 磷酸乙醇溶液显色, 虽然显色烘烤时间要加长至 4~5 min, 但薄层板不会烤黄, 效果较 2% 香草醛 10% 硫酸乙醇溶液好。

**3.4 测定波长的选择** 采用二极管阵列检测器在 190~380 nm 范围内分别扫描对照品溶液及供试品溶液中维 A 酸峰的紫外吸收, 其分别在 355.355 nm 有最大吸收, 故检测波长选择 355 nm。

**3.5 流动相的选择** 维 A 酸的降解产物一般为 13-顺维 A 酸 (异维 A 酸)、9-顺维 A 酸等, 它们与维 A 酸很难分离, 在选择流动相系统时, 尝试用多组流动相系统<sup>[4~7]</sup> 的不同比例、流速及柱温。试验发现流动相以乙腈 - 0.1% 磷酸 (88:12), 流速为  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温为 30 °C 时保留时间适宜, 维 A 酸与异维 A 酸及其他降解产物分离效果最理想, 故采用此流动相。

**3.6 小结** 实验采用薄层色谱法对青蒿油多相脂质体中维 A 酸进行定性鉴别, 并采用 HPLC 测定了维 A 酸及其降解产物异维 A 酸的含量, 并检测了维 A 酸的包封率、渗漏率及体外释放度。结果薄层鉴别专署性强, 斑点圆整, 日光下显深蓝色, 对比度强; 含量测定准确可靠, 精密度好, 具有良好的重复性和回收率, 可用于该制剂中维 A 酸的质量控制。该分析方法也适用于其他含维 A 酸的制剂定性和定量分析。

### 参考文献

- 1 WU Wen-ying (恽文英), LI Xing-hua (李兴华), LEI Jian-lin (雷建林), et al. Quantitative determination of retinoic acid in compound retinoic acid capsules by TLC scanning (薄层扫描法测定复方维 A 酸胶囊中维 A 酸的含量). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2001, 21(7): 411
- 2 GUO Hui-zhong (郭怀忠), LIU Hui-jun (刘惠军), LI Jun-ying (李俊英). Studies on the quality specification of compound tretinoin cream (复方维 A 酸乳膏质量标准研究). *Tianjin Pharm* (天津药学), 2002, 14(1): 60
- 3 JIANG Yi-na (姜义娜), YU Xiang-an (于香安), YU Li (于丽). Quantitative determination of tretino in in compound tretino in ointment by TLC scanning (薄层扫描法测定复方软膏中维 A 酸的含量). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2003, 23(2): 84
- 4 WANG Fu-xin (王福霞), FENG Wen-ju (冯文菊), JIANG Wu-min (姜武民). HPLC determination of tretino in and isotretino in (HPLC 法测定维 A 酸与异维 A 酸含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(4): 585
- 5 YAN Wei (闫玮), LI Ling-jun (李玲珺), WEI Jun (魏峻), et al. Determination of tretino in liniment by HPLC (HPLC 法测定维 A 酸搽剂中维 A 酸的含量). *Jiangsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2004, 12(6): 19
- 6 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 661
- 7 USP 30-NF 25. 2007. 3388

(本文于 2008 年 12 月 8 日修改回)