

α-细辛脑原位凝胶体外分析方法的建立

连薇薇，张永萍*，徐剑，杨长福，刘明
(贵阳中医学院，贵阳 550002)

[摘要] 目的:建立 α-细辛脑原位凝胶含量测定和体外释放度测定方法。方法:采用 HPLC 法, SHIM-PACK VP-ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-水(75:25),检测波长 258 nm,采用磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)作为释放液。结果:含量测定中 α-细辛脑在 10.4~104 mg·L⁻¹与峰面积具有良好的线性关系($r=1$),平均回收率 100.6%,RSD 2.2%。体外释放度试验中 α-细辛脑在 2.06~82.4 mg·L⁻¹线性较好($r=0.999\ 9$),平均回收率 95.83%,RSD 2.5%。结论:建立的分析方法具有专属性好、准确和可靠的特点,可为后续研究奠定基础。

[关键词] α-细辛脑;原位凝胶;体外释放度

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)11-0042-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110042

Analysis Method of Alpha Asarone in Situ Gel in Vitro ZE Wei-wei, ZHANG Yong-ping*, XU Jian, YANG Chang-fu, LIU Ming (Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** Set up the analysis method of alpha asarone in situ gel and the analysis method of it's *in vitro* release. **Method:** HPLC instrument with SHIM-PACK VP-ODS column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of methanol-water (75:25), The wavelength for detection was 258 nm. And using pH 7.4 slightly PBS as release liquid. **Result:** The liner range of alpha asarone was 10.4-104 mg·L⁻¹($r=1$). The average recovery was 100.6%, RSD was 2.19% in the determination of experiment. The liner range of alpha asarone was 2.06-82.4 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$). The average recovery was 95.83%, RSD was 2.5% in the *in vitro* release experiment. **Conclusion:** The method is exclusive, accurate and reliable. And it can lay the foundation for follow-up study.

[Key words] alpha asarone; in situ gel; release degree *in vitro*

穴位埋线疗法对支气管哮喘有较好的疗效^[1],但病人顺应性很差,而且其吸收速度和刺激强度不易控制。因此,迫切需要寻找新的埋植材料,以发挥传统埋线疗法所特有的疗效,又能改善其存在的副作用。α-细辛脑又名 α-细辛醚(α-asarone),是多年生草本植物石菖蒲挥发油中的主要成分^[2]。能松弛支气管平滑肌,减轻黏膜充血和水肿,缓解下呼吸道阻塞^[3]。α-细辛脑可人工合成,国内已有多家生产原料药的企业,具有很好的应用前景。原位凝胶作为缓释靶向制剂的载体备受医药界关注,具有滞留时间长、制备简便、使用方便等优点^[4-5]。本课题拟采用 α-细辛脑作为模型药,原位凝胶作为埋植材

料,制备成 α-细辛脑原位凝胶替代传统埋植材料羊肠线,建立其体外分析方法,为后续该原位凝胶制剂的科研工作提供可靠的检测方法。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT 型和 LC-2010CHT 型高效液相色谱仪, AUY200 型分析天平(日本岛津); AE/240 型微量分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), MS-2 型旋涡混合仪(德国 IKA 公司), DKZ-1 型电热恒温振荡水槽(上海精宏实验设备有限公司)。

1.2 试药 α-细辛脑原料药购于湖北恒硕化工有限公司(批号 20100402), α-细辛脑对照品购于中国

[收稿日期] 20140904(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260647);贵州省优秀科技教育人才省长专项(黔省合专字[2009]87号)

[第一作者] 连薇薇,在读硕士,从事中药及民族药新剂型及新制剂研究, Tel:15086037790, E-mail: zvivilye@163.com

[通讯作者] *张永萍,教授,硕士生导师,从事中药及民族药新剂型及新制剂研究, Tel:13985171981, E-mail: gyzhyp@aliyun.com

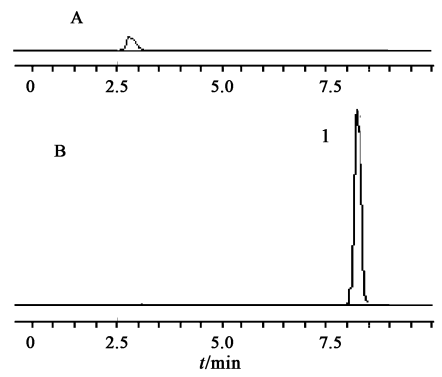
食品药品检定研究院(批号 100298-201002), PLGA(乳酸-羟基乙酸共聚物)购于山东省医疗器械研究所, *N*-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)购于天津市瑞金特化学品有限公司, 聚乙二醇 400(PEG400)购于天津市大茂化学试剂厂, 乙腈、甲醇(色谱纯)购于江苏汉邦科技有限公司, 无水乙醇(分析纯)购于重庆川东化工集团有限公司, 磷酸二氢钾购于西陇化工股份有限公司, 氢氧化钠购于上海试四赫维化工有限公司。

1.3 含药凝胶 PLGA(细粉) 2.5 g, PEG400 1 g, NMP 6 g 避光涡旋振荡, 待 PLGA 完全溶解后加入 α -细辛脑 0.3 g, 避光涡旋振荡至溶解, 即得含药凝胶 1 g, 避光放置。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 SHIM-PACK VP-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相 甲醇-水(75:25), 检测波长 258 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。在此条件下, α -细辛脑与其他色谱峰完全分开, 分离度 14.54, 拖尾因子 1.033, 理论塔板数大于 12 000。见图 1。



A. 空白凝胶; B. 供试品; 1. α -细辛脑

图 1 α -细辛脑凝胶 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *alpha asarone in situ gel*

2.1.2 对照品储备液的制备 精密称取 α -细辛脑对照品 10.4 mg, 用流动相溶解并稀释成含 α -细辛脑 416 mg·L⁻¹ 的对照品储备液, 此过程需避光操作。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取原位凝胶约 0.1 g, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加乙腈 1 mL 涡旋混合充分溶解原位凝胶, 加无水乙醇至刻度, 沉淀 PLGA, 涡旋混合, 精密移取上清液 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)定容至刻度, 涡旋混合充分后, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液

过 0.22 μ m 微孔滤膜, 续滤液作为供试品溶液。此过程需避光操作。

2.1.4 空白对照 取不含 α -细辛脑的空白原位凝胶约 0.1 g, 按 2.1.3 项下处理, 即得空白样品。

2.1.5 标准曲线的制备 分别精密移取 2.1.2 项下对照品储备液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 置 10 mL 棕色量瓶中, 用流动相稀释定容至刻度, 得 10.4, 20.8, 41.6, 62.4, 83.2, 104 mg·L⁻¹ 系列对照品溶液, 分别进样 10 μ L, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得标准曲线方程 $Y = 4.27 \times 10^7 X + 2.62 \times 10^4$ ($r = 1$), 结果表明 α -细辛脑在 10.4 ~ 104 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.6 定量限和检出限 取对照品储备液稀释, 按 S/N = 3 时进样, 得最低检出限为 1 ng, 按 S/N = 10 时进样, 得定量限 6 ng。

2.1.7 精密度试验 分别配制低、中、高(9.46, 58.76, 94.6 mg·L⁻¹) 质量浓度的 α -细辛脑对照品溶液, 于 1 d 内连续进样 6 次; 每天测 1 次, 连续 6 d。结果低、中、高质量浓度日内峰面积 RSD 分别为 0.4%, 0.3%, 0.6%; 日间峰面积 RSD 分别为 0.6%, 0.4%, 0.7%; 表明日间精密度和日内精密度均符合要求。

2.1.8 稳定性试验 取含药凝胶 1 份 0.1319 g, 依 2.1.3 项下方法制备, 所得样品溶液于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样测定, 结果峰面积 RSD 1.1%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 精密称取 6 份含药原位凝胶, 按 2.1.3 项下方法处理, 进样测定, 结果 α -细辛脑平均质量分数是 31.81 mg·g⁻¹, RSD 1.6%, 表明该分析方法重复性较好。

2.1.10 加样回收率试验 取 0.1 g 原位凝胶(含 α -细辛脑 30.15 mg) 9 份, 每 3 份为 1 组, 各组分别加入 α -细辛脑储备液(1.4344 g·L⁻¹) 1.6 mL(80%), 2 mL(100%), 2.4 mL(120%), 按 2.1.3 项下方法处理, 进样, 测定含量, 计算回收率, 见表 1。

2.1.11 样品含量测定 取 3 批含药原位凝胶样品, 每份约 0.1 g, 按 2.1.3 项下方法处理, 进样, 计算 α -细辛脑质量分数分别为 30.20, 28.70, 29.06 mg·g⁻¹。

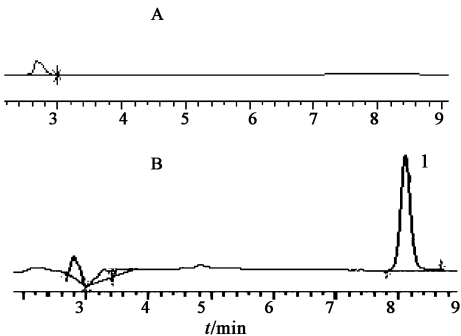
2.2 体外释放度测定方法 根据 2010 年版《中国药典》要求, 再结合本制剂的给药部位特点, 采用 PBS(pH 7.4) 作为释放液, 而 α -细辛脑的水溶性较差, 所以在释放液中加入 0.2% 聚山梨酯 80 增溶, 以下简述为 PBS 溶液。

表 1 含药原位凝胶中 α -细辛脑的加样回收率试验
Table 1 Result of recovery rate of *alpha* asarone in situ gel

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.100 1	3.02	2.30	5.26	97.39		
0.101 3	3.05	2.30	5.39	101.74		
0.103 4	3.12	2.30	5.30	94.78		
0.104 3	3.14	2.87	5.89	95.82		
0.102 7	3.10	2.87	5.98	100.35	97.21	2.4
0.101 1	3.05	2.87	5.80	95.82		
0.100 9	3.04	3.44	6.32	95.35		
0.100 4	3.03	3.44	6.34	96.22		
0.101 2	3.05	3.44	6.40	97.38		

2.2.1 空白凝胶供试品溶液的制备 取处方量空白凝胶约 0.1 g, 注入到 PBS 溶液中, 恒温振荡 1 h 后取样, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液进样。

2.2.2 含药凝胶供试品溶液的制备 取处方量含药凝胶约 0.1 g, 注入到 PBS 溶液中, 恒温振荡 1 h 后取样, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液进样。见图 2。



A. 空白凝胶; B. 含药凝胶; 1. α -细辛脑

图 2 α -细辛脑含药凝胶 HPLC

Fig.2 HPLC chromatogram of *alpha* asarone in situ gel

2.2.3 标准曲线的制备 精密称 α -细辛脑取对照品 0.103 0 g, 置 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇 5 mL 溶解, 用 PBS 溶液稀释至刻度, 得质量浓度为 412 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液。加 PBS 稀释为 2.06, 10.3, 20.6, 41.2, 61.8, 82.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列标准溶液, 分别进样 10 μL , 以峰面积(A)对质量浓度(C)进行回归得标准曲线。回归方程为 $A = 43\,763C + 18\,948$ ($r = 0.999\,9$), 表明 α -细辛脑在 2.06 ~ 82.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性较好。

2.2.4 日内精密度 取低 (10.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、中 (41.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、高 (82.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 质量浓度的对照品溶液, 1 d 内连续进样 6 次, 计算得低、中、高浓度

日内峰面积 RSD 分别为 0.6%、0.8%、0.5%。表明仪器日内精密度良好。

2.2.5 日间精密度 取低 (10.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、中 (41.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、高 (82.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 质量浓度的对照品溶液, 连续 6 d 测定, 得峰面积 RSD 分别为 0.5%、1.0%、0.6%。表明日间精密度良好。

2.2.6 回收率试验 分别向 10 mL 的棕色量瓶中加入低 (0.5 mL)、中 (1 mL)、高 (2 mL) 体积 α -细辛脑对照品溶液 (404 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 各 3 份, 用 PBS (pH 7.4, 含 0.2% 聚山梨酯 80) 溶液定容至刻度, 分别于各量瓶中加入约 0.1 g 空白原位凝胶, (37 ± 0.4) $^{\circ}\text{C}$ 振荡 1 h, 取样, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液进, 测定峰面积, 计算回收率, 见表 2。

表 2 空白原位凝胶中 α -细辛脑加样回收率试验
Table 2 Result of recovery rate of *alpha* asarone in situ gel

加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.202	0.207	102.48		
0.202	0.207	102.48		
0.202	0.206	101.98		
0.404	0.412	101.98		
0.404	0.405	100.25	100.57	2.2
0.404	0.414	102.48		
0.808	0.788	97.52		
0.808	0.786	97.28		
0.808	0.797	98.64		

3 讨论

3.1 检测波长的确定 用流动相配制 416 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 α -细辛脑溶液, 进行紫外全波长扫描可知在 258, 313 nm 处 α -细辛脑有最大吸收, 258 nm 处的吸收更大, 采用 258 nm 作为检测波长。对供试品溶液 α -细辛脑主峰起点、顶点、终点进行峰纯度检测。结果显示主峰为一纯峰, 纯度因子达 999.998, 表明在此色谱条件下制剂中其他成分和杂质对 α -细辛脑的含量测定无干扰。

3.2 释放方法 精密称取约 0.1 g α -细辛脑原位凝胶注入装有 10 mL PBS (pH 7.4, 含 0.2% 聚山梨酯 80) 溶液的棕色量瓶中, 待固化后放入 (37 ± 0.4) $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡水槽以 60 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度振荡、释放。分别于 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20 d 取出全部释放液, 立即补加等体积同温度新鲜释放介质, 放回恒温振荡水槽。取出释放液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样 10 μL , 按 2.1 项下方法

测定各时间点药物浓度,并计算出 α -细辛脑原位凝胶的累积释放度,结果见表 3。

表 3 α -细辛脑原位凝胶中药物的体外释放度($n=6$)
Table 3 Release degree of the α asarone in situ gel in vitro ($n=6$)

时间	释放度	RSD
1 h	4. 09	1. 5
2 h	6. 95	1. 6
4 h	11. 27	1. 3
6 h	15. 68	1. 4
8 h	19. 43	1. 4
10 h	22. 95	1. 5
0. 5 d	25. 99	1. 5
1 d	36. 76	1. 9
2 d	49. 08	1. 5
4 d	61. 94	1. 0
6 d	70. 61	0. 8
9 d	78. 61	0. 9
12 d	84. 25	1. 0
15 d	88. 38	1. 1
20 d	92. 00	0. 8

由上可知样品 20 d 的平均累积释放度均 > 90% ,释放很平稳,在 2 h 之内突释较小,平均仅为 6. 95% 。

本实验建立了高效液相色谱法测定 α -细辛脑原位凝胶药物含量的方法,方法专属性较强,以乙腈溶解高分子材料和药物,无水乙醇沉淀去除高分子材料,步骤较为简化,大大降低了样品处理过程中的损失,为 α -细辛脑原位凝胶含量测定提供了较准确、方便、可靠的方法。本实验还建立了 α -细辛脑原位凝胶体外释放度测定方法,为处方研究建立了方法学研究基础。以 PLGA 为材料的原位凝胶在含量测定方面研究不多,主要有紫外分光光度法^[6-7]和高效液相色谱法^[8]。本文采用高效液相色谱法,在样品的处理环节,高分子材料的去除是关键性问题,曾试过用乙腈溶解后加入 PLGA 不溶性溶剂无水乙醇沉淀,用 0. 22 μ m 微孔滤膜滤过,但是仍不能将其除尽,进样会造成色谱柱堵塞;用三氯甲烷溶解、再加用无水乙醇萃取其中的 α -细辛脑,挥去三

氯甲烷、滤过的方式可以除尽高分子材料,但是操作步骤繁琐会造成药物的降解,回收率较低;而采用乙腈溶解 PLGA 和 α -细辛脑,再用无水乙醇沉淀出 PLGA,使 α -细辛脑溶解在乙腈和无水乙醇中,离心后去除 PLGA 后测定出 α -细辛脑,该方法方便、快捷,而且能将高分子材料除尽;文献常用的 α -细辛脑紫外检测波长为 258,313 nm,258 nm 是最大吸收波长,辅料和溶剂在此波长处无干扰所以选择 258 nm 作为检测波长;在流动相的选择上,多以甲醇-水系统和乙腈-水系统,曾考察过 2 种系统都能得到良好的分离度和对称性,考虑到成本和污染问题,最终选择甲醇-水作为流动相,所测样品溶液浓度及加样回收率样品溶液测定浓度均在线性范围内,此分析方法简便、准确可靠,可作为此原位凝胶中 α -细辛脑的含量测定方法。

[参考文献]

[1] 梁春,伦新. 穴位埋线治疗支气管哮喘疗效观察[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(2):264-266.
[2] 韩琳,汤道权,印晓星,等. α -细辛脑的抗惊厥、抗癫痫作用及其机制研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(7):963-966.
[3] 张琳,陈金梅. 细辛脑治疗婴儿毛细支气管炎疗效观察[J]. 社区医学杂志,2011,9(3):29.
[4] 董芙蓉,朱红霞,刘莉,等. 芷冰原位凝胶兔体内的药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(2):144-147.
[5] 田芳,温成丽,王玉柱,等. 尼非韦罗微乳热敏原位凝胶的稳定性和流变性考察[J]. 中国新药杂志,2014,23(9):1019-1023.
[6] 祝磊. 五倍子牙周缓释凝胶的研制及体外实验的研究[D]. 西安:第四军医大学,2009.
[7] 孙海,曲淑君,周晓单. 环丙沙星温度敏感原位凝胶的制备及质量控制[J]. 中国药房,2009,20(16):1239-1241.
[8] 杨琳. 穴位注射植入原位凝胶的研究[D]. 贵阳:贵阳中医学院,2009.
[9] 陈燕军,李露,刘华凤,等. 注射用肿节风提取物温度第三原位凝胶制备及体外释药评价[J]. 中国中药杂志,2009,34(20):2586-2589.

[责任编辑 顾雪竹]