

异亚丙基莽草酸脂质体的包封率测定方法比较

曲昌海, 尹兴斌, 张慧, 林龙飞, 闫磊, 杨培, 田晶辰, 付京, 倪健*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究异亚丙基莽草酸脂质体含量和包封率的测定方法,建立一套准确度好、简便可行的质控方案。方法:采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液(10:90),检测波长 220 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL。采用 HPLC 测定脂质体中异亚丙基莽草酸的含量;比较超滤法、凝胶色谱法和透析法用于包封率的测定。结果:异亚丙基莽草酸脂质体采用 4 倍量甲醇破乳并高速离心沉淀后,取上清液进行测定,药物专属性良好,线性范围 1.004 ~ 150.6 mg·L⁻¹($r=0.9999$),加样回收率(102.01 ± 1.18)%,准确度和精密度良好,异亚丙基莽草酸对照品溶液于 6 h 内稳定;超滤法、葡聚糖凝胶法及透析法测得的包封率分别为(92.96 ± 1.91)%,(91.23 ± 2.23)%,(73.66 ± 7.10)%。结论:所建立的 HPLC 稳定可靠、准确度良好,可用于异亚丙基莽草酸脂质体的质量控制和体外分析;超滤法测定包封率简便快捷,测定结果与凝胶色谱法相当,可作为本品包封率测定的常规方法;透析法由于测定条件的限制,其测定结果受脂质体溶液稳定性、药物在脂质体中存在状态的影响较大,可能会造成测定结果偏低。

[关键词] 异亚丙基莽草酸; 包封率; 超滤法; 透析法; 凝胶柱色谱; 甲醇沉淀

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0021-05

Comparative Study of Entrapment Efficiency Determination for Isopropylidene Shikimic Acid Liposome

QU Chang-hai, YIN Xing-bin, ZHANG Hui, LIN Long-fei, YAN Lei,
YANG Pei, TIAN Jing-chen, FU Jing, NI Jian*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a simple, feasible and precise quality control strategy for determination of concentration and entrapment efficiency of isopropylidene shikimic acid liposome. **Method:** Chromatographic conditions were: Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm), column temperature of 30 °C, mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (10:90), flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, injection volume of 20 μL and detection wavelength at 220 nm. The content of ISA in liposomes was determined by HPLC; Encapsulation efficiency was determined by ultrafiltration, gel chromatography and dialysis method, respectively, and results were compared with each other. **Result:** After demulsification by adding 4 times the amount of methanol into ISA liposome and high speed centrifugal sedimentation, supernatant was used to determine, determination results showed a good specificity, precision and accuracy, regression equation showed a good linearity ($r=0.9999$) within range of 1.004-150.6 mg·L⁻¹, recovery was (102.01 ± 1.18)%, reference substance solution of ISA was stable in 6 h; Entrapment efficiency of ISA liposome determined by ultrafiltration method, gel permeation method and dialysis method were (92.96 ± 1.91)%, (91.23 ± 2.23)%, (73.66 ± 7.10)%, respectively. **Conclusion:** This established HPLC method was stable and reliable, it could be used for quality control and *in vitro* analysis; In determination of encapsulation efficiency, ultrafiltration method was simple and efficient, its results were close to gel permeation chromatography; Due to limit of measurement conditions,

[收稿日期] 20120816(009)

[基金项目] 北京中医药大学复方中药制剂创新团队基金项目(2011-CX70-13);北京中医药大学自主选题项目(2011-JYBZZ-XS037)

[第一作者] 曲昌海,博士,从事制剂新剂型及体内过程研究,E-mail:qchxyz3213@126.com

[通讯作者] *倪健,教授,博士生导师,从事制剂新剂型及体内过程研究,Tel:010-84738607,E-mail:njtem@263.net

determination result of dialysis method might be lower for its time-consuming process and higher temperature, and also depending on stability of liposome solution and existence state of drugs in liposome.

[Key words] isopropylidene shikimic acid; entrapment efficiency; ultrafiltration method; dialysis method; gel column chromatography; precipitation with methanol

异亚丙基莽草酸 (3, 4-oxo-isopropylidene shikimic acid, ISA) 是木兰科植物八角茴香中有效成分莽草酸的合成衍生物, 具有明确的抗血栓、抗炎及脑缺血再灌注后的脑保护作用^[1-4]。作为一种脑缺血的保护性药物, 在血栓发生初期及时分布入脑非常关键, 提前发挥保护作用, 既可延长治疗时间窗, 又可减少水肿和炎症的发生, 为临床溶栓争取时间^[5-10]。在前期试验中发现, 由于异亚丙基莽草酸本身结构中含有羧基, 极性较强, 正常情况下无法通过血脑屏障进入脑组织^[11-12]。脂质体给药系统是一种有效的脑部递药实现缺血再灌注后损伤的治疗策略^[13]。在脂质体的各种评价指标中, 包封率由于关系到药物在脂质体溶液中的存在状态, 所以显得尤为重要。目前, 有多种包封率的测定方法^[14], 在应用过程中各有优劣, 适合于不同类型的脂质体^[15-26]。为选择一种简便可行、准确度高的包封率测定方法, 较好地评价 ISA 脂质体的体外特性, 本试验在建立了 ISA 脂质体的样品前处理及 HPLC 分析的基础上, 分别采用超滤法、凝胶色谱法和透析法测定同一批 ISA 脂质体的包封率, 以考察 3 种不同测定方法的优劣, 为本品建立一套准确度好、简便可行的质量控制方案。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), BT-125D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器 (郑州长城科工贸有限公司), G16 型医用高速离心机 (安新县白洋离心机厂)。

异亚丙基莽草酸原料药 (批号 091206), 异亚丙基莽草酸对照品 (纯度约 99.7%), 均由北京中医药大学中药学院提供。超滤管 (Nanosep 10K OMEGA, Pall 公司), 葡聚糖凝胶 (G-50, HA-0240-02, 北京瑞达恒辉科技发展有限公司), 透析袋 (相对分子质量 5 000, 北京拜尔迪生物技术有限公司), 天然磷脂 (Lipoid S100, 德国 Lipoid 公司), 胆固醇 (阿拉丁化学试剂公司), 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱

(4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm), 流动相乙腈-0.05% 磷酸溶液 (10:90), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm, 进样量 20 μL。

2.2 溶液的配制

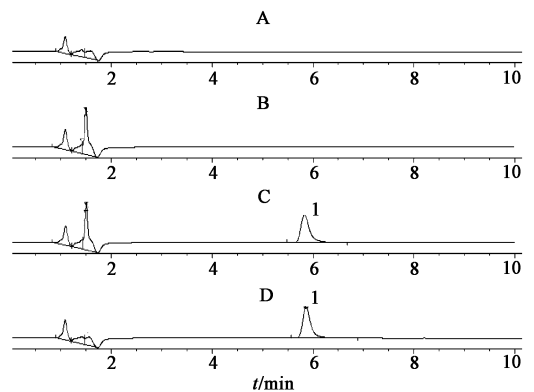
2.2.1 pH 7 磷酸盐缓冲液的配制 称取磷酸二氢钾 1.36 g, 三水合磷酸氢二钾 2.28 g, 加水溶解并定容至 1 L, 即得。

2.2.2 对照品溶液的配制 称取 ISA 对照品约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 pH 7 磷酸盐缓冲液, 超声使溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品母液; 精密量取对照品母液 0.2 mL 至 10 mL 量瓶中, 加 pH 7 磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 即得。

2.2.3 供试品溶液的配制 取 ISA 脂质体 0.1 mL, 置一次性离心管中, 加入 0.4 mL 甲醇, 涡旋 30 s 使之充分混合、沉淀, 加入 pH 7 磷酸盐缓冲液 2 mL, 涡旋 10 s, 离心 5 min (10 000 r·min⁻¹), 取上清液, 即得。

2.3 含量测定方法学考察

2.3.1 专属性试验 取空白脂质体 0.1 mL, 按 2.2.3 项下方法配制溶液, 同时取 pH 7 磷酸盐缓冲液、对照品溶液、供试品溶液依次进样测定, 记录色谱图 (图 1)。说明空白脂质体及溶媒在 ISA 出峰的位置附近均不出峰, 方法专属性良好。



A. pH 7 磷酸盐缓冲液; B. 空白脂质体; C. 供试品溶液; D. 对照品溶液; 1. 异亚丙基莽草酸

图 1 异亚丙基莽草酸脂质体 HPLC

2.3.2 标准曲线及线性范围 取 2.2.2 项下对照品母液适量, 依次用 pH 7 磷酸盐缓冲液稀释制成质量浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 150 mg·L⁻¹ 的系列

ISA 溶液,依次进样测定,记录峰面积,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 39.159X + 34.834 (r = 0.9999)$,线性范围 $1.004 \sim 150.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 精密度试验 取 2.3.2 中质量浓度为 2, 20, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ISA 对照品溶液,分别进样 3 次,记录峰面积,计算 RSD 依次为 0.39%, 0.12%, 0.08%, 说明精密度良好。

2.3.4 准确度试验 分别精密称取约 20, 25, 30 mg 的 ISA 对照品,按 2.2.2 项下方法配制质量浓度分别约为 16, 20, 24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ISA 对照品溶液,每个质量浓度平行配制 3 份,分别进样测定,按外标法计算测得的质量浓度,结果回收率分别为 99.75%, 100.55%, 100.15%, 说明准确度良好。

2.3.5 加样回收率试验 取空白脂质体溶液,按一定比例加入 ISA 对照品母液,配制成质量浓度分别约 16, 20, 24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合溶液,涡旋混匀后,按 2.2.3 项下制备供试品溶液,测定,计算 ISA 质量浓度,结果见表 1。表明该方法回收率良好,脂质体的存在不会影响 ISA 的测定。

表 1 ISA 脂质体加样回收率试验

质量浓度 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	加入量 mg	测得量 mg	回收率 $\%$	平均 回收率	RSD $\%$
16	0.036 8	0.037 3	101.32	102.01	1.18
	0.036 8	0.0376	102.04		
	0.036 8	0.038 3	104.13		
20	0.046	0.046 4	100.77		
	0.046	0.047 1	102.32		
	0.046	0.047 6	103.48		
24	0.055 2	0.055 7	100.86		
	0.055 2	0.056 4	102.13		
	0.055 2	0.055 8	101.04		

2.3.6 稳定性试验 取质量浓度约 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ISA 对照品溶液,分别于 0, 2, 4, 6 h 进样测定。记录峰面积,计算 RSD 0.16%, 说明 ISA 对照品溶液在 6 h 内非常稳定。

2.4 包封率的测定 采用同一批制备的 ISA 脂质体样品(批号 20120320)。按下式计算:

$$Q = W_{\text{包}} / W_{\text{总}} \times 100\% = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%。$$

式中, $W_{\text{总}}$, $W_{\text{游}}$, $W_{\text{包}}$ 分别代表系统中包封与未包封的总药量、未包封的药量和包封的药量。

2.4.1 总含量 ($W_{\text{总}}$) 的测定 取 ISA 脂质体 0.1 mL, 按 2.2.3 项下方法制备溶液,测定,计算 $W_{\text{总}}$ 。

2.4.2 超滤法测定 超滤膜规格分子量 5 000, 离心 10 min ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 上样量 0.2 mL。将滤液完全转移至 10 mL 量瓶中,加 pH 7.0 磷酸盐缓冲

液定容至刻度,混匀,取样测定,计算 $W_{\text{游}}$, 计算包封率。结果平均包封率约 $(92.96 \pm 1.91)\%$ 。

2.4.3 凝胶色谱法测定 葡聚糖凝胶规格相对分子质量 5 000, 柱体积约 20 mL, 洗脱液 pH 7 磷酸盐缓冲液, 上样量 0.2 mL, 洗脱速度 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。收集洗出液, 每 4 mL 作为一份样品, 处理后进样。洗脱趋势见图 2。脂质体分子体积较大, 在 1~2 BV 时被洗脱; 而 ISA 相对分子量较小, 可完全进入凝胶颗粒网孔内, 空白对照试验中发现, 原料药溶液约在 3 BV 后才被洗脱。计算 1~10 号洗出液中所测得的药物总量, 即已包封的药量 $W_{\text{包}}$, 计算包封率为 $(91.23 \pm 2.23)\%$ 。

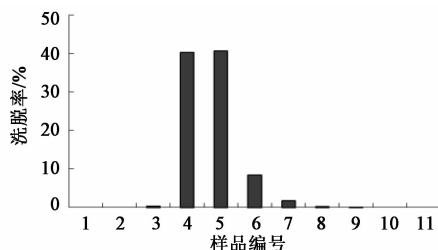


图 2 异亚丙基莽草酸脂质体凝胶柱洗脱趋势

2.4.4 透析法测定 透析袋规格相对分子质量 5 000, 透析液 pH 7 磷酸盐缓冲液 250 mL, 样品体积 5 mL, 透析温度 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 透析时间 3 h。在规定时间内测定透析外液中药物质量浓度, 即未包封的药物, 计算 $W_{\text{游}}$, 计算包封率为 $(73.66 \pm 7.10)\%$ 。

综上所述, 3 种测定方法所测得的包封率略有差别。其中超滤法与凝胶柱层析法所测得的结果较为接近(约 90%), 而透析法所测得的包封率仅为 73%, 且误差较大, RSD 约 10%。可能是由于在透析过程中, $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下放置时间较长, 部分药物已从脂质体中释放, 导致测得结果偏低。故确定采用超滤法为本品的常规包封率测定手段。

3 讨论

研究中发现, 异亚丙基莽草酸为酸性药物, pKa 约 3.88, 进行稳定性试验时发现, 在一定范围内, 药物稳定性随 pH 降低而降低, 经对比, 在 pH 7.0 时药物最稳定, 溶液状态下放置 24 h, 含量仅约下降 1%。故稀释介质选 pH 7.0 磷酸盐缓冲液。

脂质体总含量测定时, 需破坏脂质体稳定的脂质双分子层结构, 使药物释放出来, 通过离心沉淀等方法去除水不溶物, 进行测定。在预试验中, 曾选择甲醇破乳法, 对甲醇用量进行考察。发现甲醇比例偏高时 (> 10 倍), 脂质可沉淀完全, 但在选定的 HPLC 条件下主药峰出现分岔现象。经多次试验考

察,最终确定 4 倍量甲醇离心沉淀后,则可避免峰分岔,且回收率良好。

本试验中透析法所测得的包封率,明显低于超滤法和凝胶法。脂质体中药物的存在状态,可能是造成这一结果的主要原因。如存在少量未完全包封的药物,其聚集于脂质双分子层或外亲水层,处于一种半包埋的状态,在温度较高的透析条件下,非常容易扩散至外水相中,进而穿过透析袋而被检测到。而超滤法和凝胶法则在室温下进行,可能这种扩散相对偏少。同时这与脂质体的稳定性有关,因此在本品制剂的进一步开发过程中应引起重视。

[参考文献]

[1] 孙文燕,孙建宁,刘振权,等. 异亚丙基莽草酸对大鼠中动脉缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. 北京中医药大学学报,2005,8(3):34.

[2] 邢建峰,孙建宁,侯家玉,等. 异亚丙基莽草酸抗炎作用的研究[J]. 中国药理学杂志,2006,41(24):1861.

[3] 马怡,孙建宁,徐秋萍,等. 异亚丙基莽草酸对血管内皮细胞释放前列环素的影响[J]. 北京中医药大学学报,2003,26(4):25.

[4] 马怡,孙建宁,徐秋萍,等. 异亚丙基莽草酸对 H₂O₂ 损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 药理学学报,2003,38(12):897.

[5] 贺茂林,陈清棠. 急性脑梗死的溶栓治疗时间窗及其病理生理[J]. 中国危重病急救医学,2000,12(5):315.

[6] 马可夫,褚晓凡. 急性脑梗死的溶栓治疗及并发症[J]. 国外医学:脑血管疾病分册,2001,9(2):104.

[7] 孙伟伟,何俊俊. 脑血栓和脑栓塞的症状鉴别和院前急救护理[J]. 中国实用神经疾病杂志,2012,15(8):91.

[8] 初振才,卢海山. 卒中辨证急救的临床体会[J]. 中医杂志,1991,4(4):6.

[9] 张晓双,赵林涛,宋延平,等. 参蛭疏血滴丸对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):173.

[10] 刘明,孙建宁,董世芬,等. 大鼠脑缺血不同时间脑能量代谢的变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):216.

[11] 张桂燕,马红飞,李淑芝,等. 异亚丙基莽草酸原料及其制剂抗栓素片的含量及稳定性研究[J]. 中国药理学杂志,2005,40(13):1020.

[12] 姚珏成,倪健,任天池,等. 3,4-O-异亚丙基莽草酸 (ISA) 在 Beagle 犬体内的药代动力学研究[J]. 药物分析杂志,2007,27(2):161.

[13] Ishii T, T Asai, Oyama D, et al. Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin [J]. J

Controlled Release,2012,160(1):81.

[14] 陈召红,刘饭阳,魏亚超. 脂质体包封率测定方法研究进展[J]. 解放军药学学报,2011,27(1):79.

[15] 白兰,赵明琴,尹蓉莉,等. 龙胆苦苷脂质体含量测定及包封率考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):48.

[16] 郭丹,熊阳,孙鹏,等. Nobiliside-A 脂质体包封率测定方法的研究[J]. 中成药,2009,31(2):208.

[17] 李鑫,程岚,李学涛. 异长春花碱脂质体中主药的含量以及包封率的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):50.

[18] 李文静,杨志强,王杏林. 两种硫酸长春新碱脂质体包封率测定方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(14):71.

[19] Xuan T, Zhang J A, Ahmad I, et al. HPLC method for determination of SN-38 content and SN-38 entrapment efficiency in a novel liposome-based formulation, LE-SN38[J]. J Pharm Biomed Anal,2006,41(2):582.

[20] Zelaya I A, Anderson J A, Owen M D, et al. Evaluation of spectrophotometric and HPLC methods for shikimic acid determination in plants: models in glyphosate-resistant and-susceptible crops[J]. J Agric Food Chem, 2011,59(6):2202.

[21] Grohganz H, Schlafl O, Rischer M, et al. Development and validation of a HPLC method for routine quantification of the decapeptide Cetrorelix in liposome dispersions [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 34(5):963.

[22] Chen X, Xia Y, Lu Y, et al. Screening of permeable compounds in Flos Lonicerae Japonicae with liposome using ultrafiltration and HPLC [J]. J Pharm Biomed Anal,2011,54(2):406.

[23] 郝艳丽,马颖哲,牛凤兰. HPLC 测定 3,4,5-三羟基苯甲酸脂质体药物含量及包封率[J]. 中国药理学杂志, 2010,45(15):1176.

[24] 董晓辉,刘欣荣,石莉,等. RP-HPLC 法测定半乳糖化肝靶向葫芦素 B 脂质体中药物含量[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(10):816.

[25] Cagdas F M, Ertugral N, Bucak S, et al. Effect of preparation method and cholesterol on drug encapsulation studies by phospholipid liposomes [J]. Pharm Dev Technol,2011,16(4):408.

[26] Gonzalez-Rodriguez M L, Barros L B, Palma J, et al. Application of statistical experimental design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes [J]. Int J Pharm, 2007, 337(1/2):336.

[责任编辑 全燕]