齐墩果酸脂质体包封率的测定

许伯慧[1], 李晓霞[2*], 孟璐[1], 王军[1], 易伟[1]
(1. 南通大学医学院药学系, 江苏 南通 226001; 2. 如皋市人民医院, 江苏 如皋 226500)

[摘要] **目的**:建立齐墩果酸脂质体的包封率测定方法。**方法**:采用薄膜分散法制备脂质体,葡聚糖凝胶柱色谱法分离脂质体和游离药物,以蒸馏水和 0.5% SLS 为洗脱介质分别洗脱脂质体和游离药物,采用高效液相色谱法测定脂质体中齐墩果酸的含量。**结果**:齐墩果酸在 0.302 ~ 30.2 mg·L^{-1},线性关系良好(r = 0.999 9),平均回收率为 99.92%, RSD 1.59%;葡聚糖凝胶柱色谱法分离游离药物平均柱回收率为 100.22%, RSD 1.23%,平均柱加样回收率为 99.04%, RSD 0.99%;样品的平均包封率为 83.4%。**结论**:齐墩果酸脂质体包封率测定方法准确可信,可用于测定齐墩果酸脂质体的包封率。

[关键词] 齐墩果酸; 脂质体; 包封率; 葡聚糖凝胶柱层析法; 高效液相色谱法
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0086-05

Determination of Entrapment Efficiency of Oleanolic Acid Liposomes

XU Bo-hui[1], *LI Xiao-xia*[2*], *MENG Lu*[1], *WANG Jun*[1], *YI Wei*[1]
(1. *Department of Pharmacy*, *Nantong University*, *Nantong* 226001, *China*;
2. *The People's Hospital of Rugao*, *Rugao* 226500, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a method to determine the entrapment efficiency of oleanolic acid liposomes. **Method**: Oleanolic acid liposomes were prepared by film dispersion method. Entrapment efficiency was determined after the separation of the unentrapped drug by glucan gel column chromatography. Distilled water was used to elute liposomes, 0.5% SLS was used to elute unentrapped drug. The content of oleanolic acid was deternined by HPLC. **Result**: The linear range of oleanolic acid was 0.302-30.2 mg·L^{-1} (r = 0.999 9). The average recovery was 99.92% (RSD 1.59%). The recovery of glucan gel column chromatography was 100.22% (RSD 1.23%), and the recovery of oleanolic acid was 99.04% (RSD 0.99%). The average entrapment efficiency of oleanolic acid liposomes was 83.4%. **Conclusion**: This method is accurate, credible and it can be used to determine the entrapment efficiency of oleanolic acid liposomes.

[**Key words**] oleanolic acid; liposomes; entrapment efficiency; glucan gel column chromatography; HPLC

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)属于齐墩果烷型五环三萜类化合物,以游离体和配糖体的形式分布于女贞子、青叶胆、枇杷叶、夏枯草等多种植物中。它具有广泛的药理作用,如护肝降酶、抗炎、降脂、降糖、免疫调节、抑制变态反应、对染色体损伤的保护等[1],临床上主要用于急性病毒性肝炎、慢性肝炎、抗结核药物肝损害的预防及癌症的辅助治疗,具有疗效好、毒性低、副作用少等优势,开发前景广阔[2]。但因其水溶性差,生物利用度低,临床应用受到一定的限制[3]。作者拟将齐墩果酸制备成脂质体以提高其靶向性[4],进而增加其治疗效果。本文采用葡聚糖凝胶柱色谱法对载药脂质体和游离药物进行有效分离,并通过 HPLC 进行药物含量的检测,确立齐墩果酸脂质体包封率的分析方法。

1 仪器和试药

1.1 仪器 BS124S 型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),岛津 LC-20AD 型液

[收稿日期] 20120704(011)
[第一作者] 许伯慧,硕士,讲师,药物新剂型与新技术,Tel: 0513-85051749, E-mail: xuzi_2001@ntu.edu.cn
[通讯作者] *李晓霞,本科,主管药师,医院制剂管理,Tel: 0513-87512315, E-mail: xu21_2001@163.com

相色谱仪(SPD-20A 紫外检测器),R-1002N 型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司),UV-7502PC 型紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)

1.2 药品与试剂 OA 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110709-200505),OA 原料药(南京都莱生物科技有限公司,批号 111202),注射用大豆磷脂 Lipod S-100(上海东尚生物科技有限公司,批号 579000-2110666),胆固醇(中国惠兴生化试剂有限公司,批号 120116),Sephadex G-50(Pharmacia 分装,批号 20100306),色谱级甲醇(TEDIA COMPANY, INC.),色谱级乙腈(TEDIA COMPANY, INC),冰醋酸(西陇化工股份有限公司),十二烷基硫酸钠(上海润捷化学试剂有限公司),二氯甲烷(西陇化工股份有限公司)

2 OA 脂质体含量测定方法的建立

2.1 OA 脂质体的制备 取处方量的 OA、大豆磷脂、胆固醇溶于 10 mL 二氯甲烷中,将此溶液置于 250 mL 茄形瓶中,35 ℃水浴下减压旋转蒸发形成类脂质薄膜后,转移至真空干燥器中,继续干燥过夜以除尽有机溶剂。待有机溶剂除尽后,加入 10 mL pH 6.8 磷酸盐缓冲液,水合 1 h,超声 30 min(100 KHz),过 0.22 μm 微孔滤膜,即得 OA 脂质体混悬液。

2.2 检测波长的确定 精密称取 10 mg 的 OA 对照品,用甲醇配制成 1 g·L^{-1}的溶液备用;按处方比例称取适量的辅料混合物,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,过滤后备用。分别取上述两溶液于紫外扫描仪上在 200 ~ 400 nm 扫描,结果见图 1。从紫外扫描图中可以看出,OA 和辅料混合物均在 206 nm 处有最大吸收。

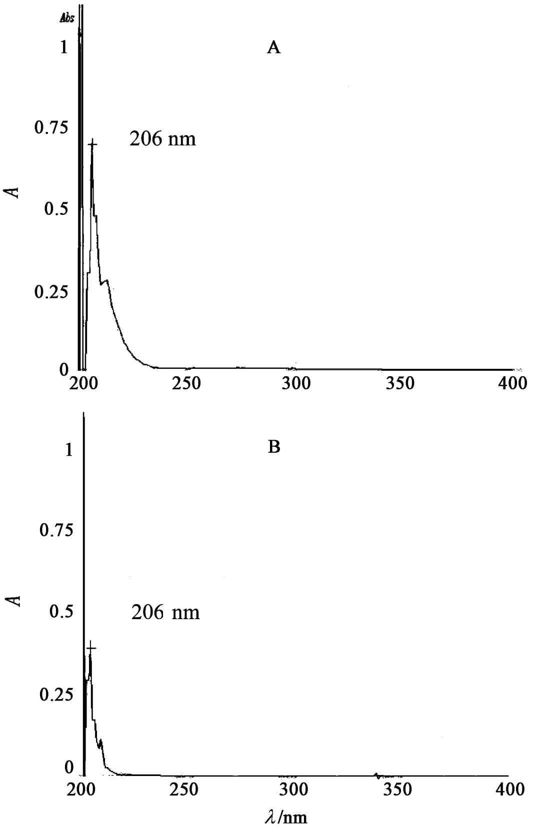

图 1 OA(A)和辅料混合物(B)的紫外扫描图谱

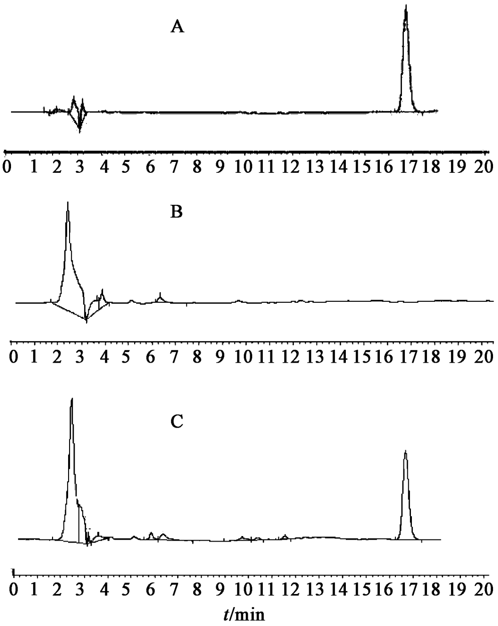

图 2 OA(A)、空白脂质体(B)、OA 脂质体(C)的 HPLC

2.3 色谱条件 YMC-Pack Pro C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 乙腈-0.1% 醋酸(85∶15),流速 1 mL·min^{-1},检测波长 206 nm,柱温 25 ℃,进样量 20 μL。

2.4 系统适用性 用甲醇配制质量浓度为 1 g·L^{-1}的 OA 对照品贮备液,精密量取 0.2 mL 置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,制备得 OA 质量浓度为 20.0 mg·L^{-1}的溶液,即得 OA 对照品溶液。取空白脂质体 0.2 mL 置于 10 mL 的量瓶中,用甲醇定容至刻度,相当于 20.0 mg·L^{-1}的 OA 对应的处方量,即得空白脂质体破乳液。取 OA 脂质体 0.2 mL 置于 10 mL 的量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得 OA 脂质体破乳液。

取 OA 对照品溶液、空白脂质体破乳液和 OA 脂质体破乳液各 20 μL 进样分析。色谱图见图 2。

由图可见,在该色谱条件下,OA 的保留时间约为 16.7 min,理论塔板数为 8 571,OA 与相邻色谱峰能达到基线分离且峰形稳定,脂质体辅料及破乳剂等试剂不干扰 OA 的测定。

2.5 标准曲线的绘制和线性关系的考察 精密称

取 OA 对照品适量,以甲醇配制成质量浓度为 60.4 mg·L^{-1}的贮备液。分别精密吸取 OA 对照品贮备液 0.05,0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,5.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,以甲醇定容至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 0.302,0.604,1.208,3.02,6.04,12.08,30.2 mg·L^{-1}的系列溶液,按照 **2.3** 项下色谱条件进样20 μL 进行检测。将峰面积(A)与浓度(C)进行线性回归,得标准曲线 $A=6\ 916C+237.9(r=0.999\ 9)$。结果表明,OA 在 0.302 ~ 30.2 mg·L^{-1}峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 配制低、中、高浓度分别为 0.604,3.02,12.08 mg·L^{-1}的 OA 标准溶液,分别于 1 天和 1 周内重复进样 5 次,进样量为 20 μL,记录峰面积,计算 RSD。高、中、低 3 个浓度的日内精密度的 RSD($n=6$)分别为 1.12%,0.73%,0.86%,日间精密度的 RSD($n=6$)分别为 1.58%,1.32%,0.96%。结果表明,仪器的日内和日间精密度良好。

2.7 稳定性试验 取 **2.4** 项下 OA 脂质体破乳液,按照 **2.3** 项下色谱条件,分别于 0,1,2,4,8,12,24 h 进样 20 μL,测定峰面积,计算 RSD 1.46%,结果表明该溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 按 **2.4** 项下 OA 脂质体破乳液制备方法平行操作 6 份,按照 **2.3** 项下色谱条件进行测定,结果脂质体中 OA 的含量均值为 1.03 g·L^{-1},RSD 1.72%,结果表明该方法重复性良好。

2.9 回收率试验 称取处方量的辅料,制备空白脂质体。分别精密吸取 0.2 mL 空白脂质体加入对照品溶液中制备得 0.604,3.02,12.08 mg·L^{-1}的低、中、高 3 个质量浓度的样品溶液,每个质量浓度配制 3 份,分别进样 20 μL,测定峰面积,代入标准曲线得到实际测定浓度,计算回收率,回收率 = ($C_{测得}$/$C_{加入}$)×100%。结果见表 1。

表 1 OA 回收率实验结果

$C_{加}$ /mg·L^{-1}	$C_{测}$ /mg·L^{-1}	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.604	0.613	101.49	99.92	1.59
	0.620	102.65		
	0.601	99.50		
3.02	2.95	97.68		
	3.05	100.99		
	3.00	99.34		
12.08	12.04	99.67		
	11.84	98.01		
	12.07	99.92		

平均回收率为 99.92%,RSD 1.59%,回收率试验符合要求。

3 OA 脂质体包封率的测定

3.1 葡聚糖凝胶柱色谱条件 称取 Sephadex-G50 10 g,用蒸馏水充分溶胀 24 h 后,湿法上柱,装填于内径 2 cm 的层析柱中,柱床高 35 cm。以蒸馏水为洗脱介质,洗脱脂质体,待脂质体洗脱完全,换用 0.5% SLS 洗脱药物。流速为 1 mL·min^{-1},室温下洗脱。

3.2 洗脱曲线的绘制 精密移取 OA 脂质体和 OA 的 0.5% SLS 溶液的混合液 0.2 mL 上样,用 50 mL 水洗脱后换用 0.5% SLS 洗脱,分段收集,每 5 mL 收集 1 份,共收集 150 mL。每管取 2 mL 用甲醇稀释定容至 5 mL,按 **2.3** 项下色谱条件测定药物含量,以每管的药量为纵坐标,洗脱液累计洗脱体积为横坐标绘制洗脱曲线,结果见图 3。

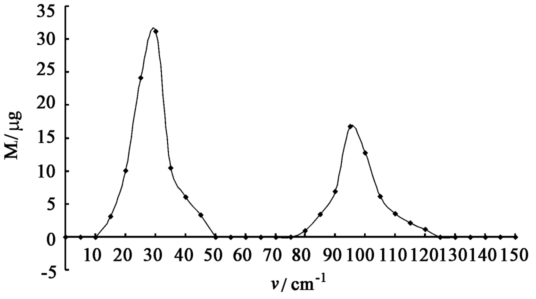

图 3 OA 脂质体和游离药物洗脱曲线

由洗脱曲线可以看出,OA 脂质体从 10 mL 处开始流出,在 50 mL 处全部洗脱,而游离药物从第 75 mL 处开始流出,到 125 mL 处全部洗脱。此洗脱条件能很好的分离脂质体和药物。

3.3 游离药物柱回收率试验 配制质量浓度分别为 82.1,105.5,136.7 mg·L^{-1}的低、中、高 3 种浓度的 OA 的 0.5% SLS 溶液,分别精密移取 1 mL 上柱,按 **3.1** 项下条件进行洗脱,收集游离药物组分后,用甲醇稀释定容,按 **2.3** 项下色谱条件测定峰面积,代入标准曲线后得实际浓度,计算总的洗脱药量,计算回收率。每个浓度平行测定 3 次,结果见表 2。

平均柱回收率为 100.22%,RSD 1.23%。结果表明,Sephadex-G50 对 OA 没有吸附作用,该洗脱条件可以将 OA 洗脱完全。

3.4 柱加样回收率试验 精密量取 **3.3** 项下 3 个浓度溶液 1 mL 分别与 0.2 mL 空白脂质体混合后上样,按 **3.1** 项下条件进行洗脱,收集游离药物组分

表 2 OA 柱回收率

加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
82.1	83.2	101.34		
	82.7	100.73		
	81.4	99.15		
105.5	107.4	101.80		
	106.9	101.33	100.22	1.23
	105.1	99.62		
136.7	137.5	100.59		
	134.1	98.10		
	135.8	99.34		

后,用甲醇稀释定容,按 **2.3** 项下色谱条件测定峰面积,代入标准曲线后得实际浓度,计算总的洗脱药量,计算回收率。每个浓度平行测定 3 次,结果见表 3。

表 3 OA 柱加样回收率

加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
82.1	80.6	98.17		
	81.7	99.51		
	80.5	98.05		
105.5	105.3	99.81		
	103.9	98.48	99.04	0.99
	104.0	98.58		
136.7	136.5	99.85		
	134.1	98.10		
	137.8	100.80		

3.5 OA 脂质体包封率测定 取不同批次(20120424,20120502,20120509)的 OA 脂质体各 3 份,精密量取 0.2 mL 上样,按 **3.1** 项下条件进行洗脱,以 50 mL 蒸馏水洗脱脂质体后换用 0.5% SLS 洗脱游离药物,收集 75 ~ 125 mL 游离药物流出液,用甲醇稀释定容后, 按 **2.3** 项下色谱条件进样分析,计算游离药物含量($W_{游离}$);另取 0.2 mL OA 脂质体,用甲醇破乳稀释至 10 mL 量瓶中,进样分析,计算脂质体中药物总量($W_{总}$)。包封率 = $(1 - W_{游离}/W_{总}) \times 100\%$。不同批次的 OA 脂质体包封率检测结果见表 4。

表 4 OA 脂质体包封率测定($n=4$)

批号	包封率/%	RSD
20120424	86.73	1.93
20120502	81.00	2.05
20120509	83.80	1.43

4 讨论

4.1 检测波长的确定 紫外扫描的结果表明,齐墩果酸的甲醇溶液和辅料混合物溶液的最大吸收波长均为 206 nm,若采用紫外分光光度法测定脂质体中药物含量,辅料将干扰测定,因此采用高效液相色谱法,在检测的过程中达到分离并检测的目的。由于齐墩果酸在水系溶剂中的溶解度极小,为了保证有效的检测限,我们选择在齐墩果酸的最大吸收波长处来检测,因此,确定检测波长为 206 nm。

4.2 脂质体中游离药物的分离 《中国药典》2010 年版规定[5]脂质体与游离药物分离可以使用凝胶柱色谱法、离心法或透析法等[6-8],除此之外,一些文献还报道了微柱凝胶离心分离[9]、超滤法[10]、鱼精蛋白沉淀法[11]、离子交换树脂法[12]等分离脂质体和游离药物。由于齐墩果酸在水及磷酸盐缓冲液中几乎检测不到,透析介质的选择受到一定的限制,药物无法透析完全。我们尝试采用高速离心法对游离药物进行分离,在 16 000 $r \cdot min^{-1}$转速条件下离心 30 min,得到的上层液依旧为乳白色混悬液,说明此方法也无法完全分离脂质体和游离药物。

本实验采用葡聚糖凝胶柱色谱法来分离脂质体和游离药物。我们考察了齐墩果酸在水、不同 pH 值的磷酸盐缓冲液及相同浓度的一系列表面活性剂溶液中的溶解度,发现其在 0.5% SLS 中的溶解度最高,可以达到 160.7 $mg \cdot L^{-1}$。考虑到 0.5% SLS 对脂质体具有的轻度破乳行为,因此我们采用水先洗脱脂质体,0.5% SLS 洗脱游离药物。由洗脱曲线可以看出,脂质体和游离药物得到很好的分离。柱回收率和柱加样回收率实验均表明,葡聚糖凝胶对药物的洗脱没有干扰,该方法可以用于齐墩果酸脂质体包封率的测定。

对于像齐墩果酸这种难溶性药物而言,采用葡聚糖凝胶柱色谱法来分离脂质体和游离药物也存在着一定的问题,如常用的洗脱介质难以将游离药物完全洗脱、洗脱过程中可能存在药物的析出、洗脱介质量大、时长等。因此,还需要不断地尝试,摸索出更好的方法用于此类药物的包封率的测定。

LC-MS 法测定消癌平注射液中两种主要成分的含量

谢丽艳[1],刘史佳[2],徐洁[1],居文政[1,2*],钦松[3],张仓[3],谈恒山[4]
(1. 南京中医药大学药学院,南京 210009;
2. 南京中医药大学附属医院临床药理科,南京 210029;
3. 南京圣和药业有限公司,南京 210038; 4. 南京军区总医院,南京 210002)

[**摘要**] **目的**:建立同时测定消癌平注射液中两种甾体皂苷 17*β*-tenacigenin B 和 tenacigenoside A 含量的液相色谱-质谱联用法。**方法**:Agilent Zorbax SB-C_{18}色谱柱 (3.0×100 mm, 3.5 μm),保护柱为 Agilent Zorbax SB-C_{18}(2.1×12.5 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(90∶10),流速 0.25 mL·min^{-1}。甲睾酮为内标,质谱采用电喷雾离子化(ESI)方式,正离子采集,以选择离子反应监测(SIR)模式对两种甾体皂苷进行含量测定。**结果**:17*β*-tenacigenin B 和 tenacigenoside A 的线性范围分别为 0.625 ~ 20 mg·L^{-1}(r=0.998 3),0.375 ~ 12 mg·L^{-1}(r=0.999 4),加样回收率分别为 100.8%(RSD 3.95%)101.6%,(RSD 2.71%)。**结论**:该方法简便,准确,重复性好,可为消癌平注射液提供质量控制依据。

[**关键词**] 消癌平注射液; 17*β*-tenacigenin B; tenacigenoside A; 含量测定
[**中图分类号**] R284.1 [**文献标识码**] A [**文章编号**] 1005-9903(2012)23-0090-04

[**收稿日期**] 20120617(011)
[**基金项目**] 中药新药临床评价研究技术平台(南京)建设(2012ZX09303009-002);江苏省中医药领军人才(LJ200906);江苏高校优势学科建设工程项目 2010
[**第一作者**] 谢丽艳,硕士研究生,中药学专业,E-mail: xieliyan_2008@163.com
[**通讯作者**] * 居文政,主任药师,博士生导师,从事中药临床药代动力学研究,Tel: 025-86617141-80518, E-mail: wzhju333@163.com

[参考文献]

[1] 王奇,卢柏震. 齐墩果酸的研究进展[J]. 中国药房,2008,19(9):711.
[2] 胡华杰. 齐墩果酸药理作用与临床应用研究进展[J]. 海峡药学,2012,24(3):92.
[3] 王德仁. 齐墩果酸研究新进展[J]. 天津药学,2003,15(3):57.
[4] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(16):212.
[5] 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:附录 204.
[6] 张晓丽,吴品昌,刘宇,等. 乙醇注入法制备莪术醇脂质体[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(4):10.
[7] 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.
[8] 戎丽娜,张敏,徐云龙,等. 顺磁脂质体包封率测定方法的研究[J]. 药物分析杂志,2010, 30(8):1435.
[9] 王素芳,刘利萍,边可君,等. 微柱凝胶离心-HPLC 测定酮康唑醇质体包封率[J]. 中国现代应用药学,2011,28(6):527.
[10] 雷国峰,陈琳,邓英杰,等. 超滤法-HPLC 法测定灯盏花素脂质体包封率[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(4):237.
[11] 刘卫斌,薛彦宁,秦永刚,等. 鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J]. 中国药房,2010,21(39):3695.
[12] 吴瑾瑾,朱雨晴,葛卫红,等. 猕猴桃多糖脂质体包封率测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):20.

[责任编辑 顾雪竹]