

龙胆苦苷脂质体含量测定及包封率考察

白兰, 赵明琴, 尹蓉莉*, 李东芬
(成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] **目的:** 建立龙胆苦苷脂质体含量及包封率测定的方法。**方法:** 通过方法学考察, 建立 HPLC 测定龙胆苦苷含量的方法; 分别采用离心法和透析法从龙胆苦苷脂质体中分离龙胆苦苷, 分别测定, 计算包封率。**结果:** 确定龙胆苦苷脂质体含量测定条件为流动相甲醇-水 (30:70), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 270 nm; 离心法和透析法测得平均包封率分别为 69.67%, 76.12%。**结论:** 建立的 HPLC 条件可用于龙胆苦苷脂质体的含量测定, 离心法测得的包封率较透析法小。

[关键词] 龙胆苦苷脂质体; HPLC; 包封率; 离心法; 透析法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0048-03

Content Determination and Entrapment Efficiency Investigation of Gentiopicroside Liposome

BAI Lan, ZHAO Ming-qin, YIN Rong-li*, LI Dong-fen
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish conditions for content determination and entrapment efficiency determination of gentiopicroside liposome. **Method:** Establish a HPLC method for determination of the content of gentiopicroside by methodology investigation; Separated gentiopicroside from gentiopicroside liposome by centrifugation and equilibrium dialysis method, and determined respectively, calculated entrapment efficiency. **Result:** HPLC conditions for determination of gentiopicroside liposome were: mobile phase of methanol-water (30:70), flow rate $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, detection wavelength 270 nm; The average entrapment efficiency with centrifugation was 69.67%, and it was 76.12% with equilibrium dialysis method. **Conclusion:** This established HPLC conditions could used for determination of the content of gentiopicroside liposome, determined entrapment efficiency with centrifugation was less than equilibrium dialysis.

[Key words] gentiopicroside liposome; HPLC; entrapment efficiency; centrifugation; equilibrium dialysis

龙胆苦苷是从龙胆、秦艽等龙胆科植物中提取的环烯醚萜苷类化合物, 易溶于水, 可溶于甲醇、乙醇等亲水性有机溶剂, 易被酸水解。药理实验表明龙胆苦苷具有明显的保肝利胆、镇痛抗炎作用^[1-2]。本文考察了龙胆苦苷脂质体的含量测定方法, 同时采用离心法和透析法 2 种方法测定龙胆苦苷脂质体的包封率。

1 材料

龙胆苦苷对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110770-200712), 龙胆苦苷(含量 $\geq 98\%$, 成都普思生物科技有限公司, 批号 ps09030601), 大豆卵磷脂, 胆固醇, 三氯甲烷, 乙醇, 甲醇均为分析纯。

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦), UV-1100 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), LG10-2.4A 型离心机(北京医用离心机厂), BS-200S 和 BP-211D 型电子分析天平(北京赛多利斯电子天平有限公司)。

2 方法与结果

2.1 龙胆苦苷脂质体的制备 采用逆相蒸发法制备龙胆苦苷脂质体, 即精密称取磷脂 200 mg, 胆固

[收稿日期] 20111104(003)

[第一作者] 白兰, 博士生, 从事中药新制剂和新技术研究, Tel:13880910445, E-mail:blci@163.com

[通讯作者] *尹蓉莉, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂和新技术研究, E-mail:yinronglili@163.com

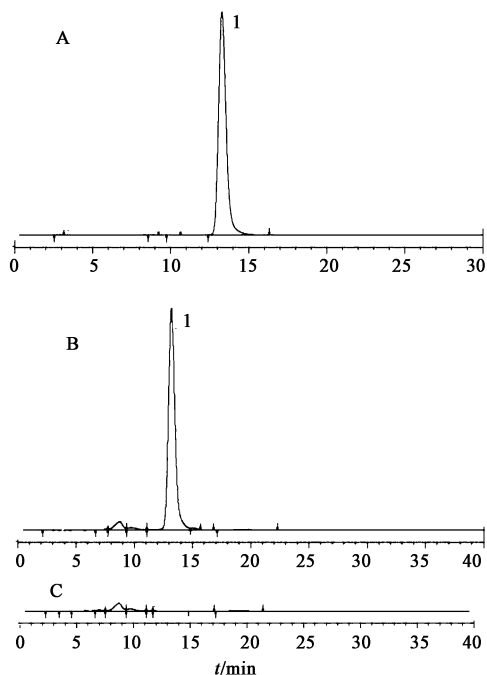
醇 100 mg,置于 250 mL 圆底烧瓶,加三氯甲烷 25 mL 溶解,加含龙胆苦苷 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 10 mL,超声 10 min 得乳浊液,恒温水浴 $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压蒸发除去有机溶剂,即得。

2.2 龙胆苦苷脂质体含量测定

2.2.1 色谱条件^[3-4] DiamonsilTM C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$,流动相甲醇-水 (30:70),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$,检测波长 270 nm 。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取龙胆苦苷对照品 10.23 mg,置于 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释成 $1.023 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,分别精密吸取储备液 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 至 50 mL 量瓶,甲醇定容,即得质量浓度为 0, 2.046, 10.23, 20.46, 30.69, 40.92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列对照品溶液。分别吸取上述供试液 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 进样,回归结果显示,龙胆苦苷面积 (A) 与其质量浓度 (C) 在 $0 \sim 40.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性良好,回归方程为 $A = 724.83C - 248.69$ ($r = 0.9999$)。

2.2.3 专属性考察 分别以对照品,样品,空白脂质体样品溶液进样,结果阴性在对照品保留时间没有出峰,说明处方中的大豆卵磷脂与胆固醇在 270 nm 处对样品测定无干扰,见图 1。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性对照; 1. 龙胆苦苷

图 1 龙胆苦苷脂质体 HPLC

2.2.4 精密度试验 取 2.2.2 项下制备的 $20.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的龙胆苦苷对照品溶液,重复进样 5 次,结果 RSD 0.43%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精密移取龙胆苦苷脂质体 1 mL,甲醇溶解,超声 5 min 破乳,甲醇定容至 50 mL,即为龙胆苦苷脂质体供试品溶液。按上述操作平行制备 6 份,进样,试验结果表明,6 次平行试验得样品平均含量 $1.045 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,RSD 1.92%,表明重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 按 2.2.5 项下制备龙胆苦苷脂质体供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 4, 8 h,测定峰面积,结果 RSD 0.59%,表明样品供试液在 8 h 内稳定。

2.2.7 回收率试验 精密移取 2.2.5 重复性试验项下同一批龙胆苦苷脂质体 0.5 mL,分别取 $1.023 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 龙胆苦苷对照品溶液 0.4, 0.5, 0.6 mL,加甲醇适量,超声 5 min 破乳,甲醇定容至 50 mL,即得。分别平行试验 3 份,计算回收率,结果见表 1。

表 1 龙胆苦苷回收率试验

No.	脂质体中加 入量/mg	对照品加 入量/mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
1	0.522 5	0.409 2	0.926	98.65	1.73
2	0.522 5	0.409 2	0.939	101.86	
3	0.522 5	0.409 2	0.938	101.45	
4	0.522 5	0.511 5	1.042	101.49	1.12
5	0.522 5	0.511 5	1.033	99.76	
6	0.522 5	0.511 5	1.031	99.39	
7	0.522 5	0.613 8	1.132	99.35	0.78
8	0.522 5	0.613 8	1.128	98.59	
9	0.522 5	0.613 8	1.137	100.15	

实验结果表明,样品回收率在 98% ~ 102%, RSD < 3%,说明回收率良好。

2.3 包封率测定 试验设计采用离心和透析 2 种方法测定自制龙胆苦苷脂质体的包封率。

2.3.1 离心法^[5-6] 精密吸取制备好的龙胆苦苷脂质体溶液 1 mL,分别离心 30, 60, 90, 120 min ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),沉淀用甲醇溶解,超声 5 min 破乳,甲醇定容至 50 mL,吸取 $10 \text{ } \mu\text{L}$,按拟定的 HPLC 条件测定包含在脂质体中药物的含药量 (W_1)。精密吸取制备好的龙胆苦苷脂质体溶液 1 mL,用甲醇溶解,超声 5 min 破乳,甲醇定容至 10 mL,吸取 $10 \text{ } \mu\text{L}$,按拟定的 HPLC 条件测定龙胆苦苷脂质体溶液中全部所含药量 ($W_{\text{总}}$)。按下式计算包封率分别为 57.88%, 70.24%, 74.03%, 78.25%。

$$\text{包封率} = \frac{W_1}{W_{\text{总}}} \times 100\%$$

实验结果说明,包封率随离心时间增长而增加,可能在离心过程中,由于重力原因游离药物逐渐附着于脂质体表面。60 min 后,包封率的增加幅度减小,到 120 min 仅增加 8.05%,说明离心 60 min 就能基本分离游离药物和脂质体,因此将离心时间定为 60 min。

2.3.2 透析法^[7]

2.3.2.1 透析时间的确定 精密移取 5 mL 龙胆苦苷脂质体放入透析袋中(分子截留量 140 000),pH 7.0 磷酸缓冲液 50 mL 透析 24 h。分别于 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24 h 吸取介质 10 μ L 进样,测定峰面积,峰面积随时间变化曲线见图 2。

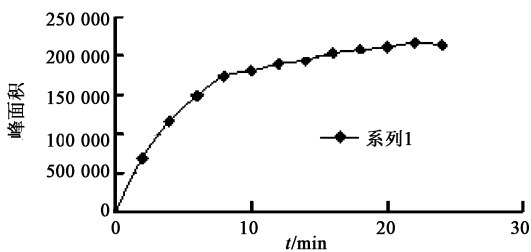


图 2 透析介质峰面积随时间变化曲线

实验结果说明随着时间的增加,透析介质中游离龙胆苦苷含量增加,18 h 后曲线趋于平稳,因此确定透析时间为 18 h。

2.3.2.2 透析法测定包封率 精密移取 5 mL 龙胆苦苷脂质体放入透析袋中,pH 7.0 磷酸缓冲液 50 mL 透析 18 h 后,吸取 10 μ L,按拟定的 HPLC 条件测定透析液峰面积。按 2.3.1 离心法项下测定所含药量($W_{总}$)。按下式计算包封率,得龙胆苦苷脂质体包封率为 76.33%。

$$\text{包封率} = \frac{W_{总} - W_{游离}}{W_{总}} \times 100\%$$

2.3.2.3 包封率验证 取 3 批龙胆苦苷脂质体,按上述条件进行离心法和透析法包封率测定,结果平均包封率分别为 69.67%,76.12%。结果表明离心法测得的包封率比透析法小。

3 讨论

大豆卵磷脂和胆固醇对龙胆苦苷脂质体中的龙胆苦苷含量测定不造成干扰,可选择 2010 年版《中国药典》中 HPLC 条件进行测定。

离心法是根据脂质体与游离药物比重不同所受到的离心力不同,沉降速度不同,从而达到分离,测定包封率^[8]。本试验中,包封率随离心时间增长而增加,可能是在离心过程中,由于重力原因游离药物逐渐附着于脂质体表面,60 min 后,包封率的增加幅度减小,可能是因为本品为水溶性药物,在 pH 7.0 的磷酸缓冲液中有一定溶解性,因此 60 min 后离心时间的增加对脂质体的包封率影响不大。透析法是利用游离药物可透过半透膜而脂质体不能透过而分离。在透析过程中,游离药物被稀释可能会破坏脂质体与游离药物的动态平衡,使得包在脂质体中的药物渗漏出来,且试验时间比较长。透析过程中由于脂质体的不稳定性可能会产生渗漏。在实际试验中,确实出现过透析膜泄露或破裂。综合以上因素最终选定离心法作为龙胆苦苷脂质体的包封率测定方法。

[参考文献]

- [1] 刘占文,陈长勋,金若敏,等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药,2002,33(1):47.
- [2] 陈雷,王海波,孙晓丽,等. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2008(20):903.
- [3] 何禄仁,赵建邦,马潇. HPLC 法测定秦艽炮制品中龙胆苦苷的含量[J]. 中国药事,2008,22(8):689.
- [4] 李小芳,李敏,蒋卫,等. 龙胆炮制品中龙胆苦苷的 HPLC 含量测定研究[J]. 中成药,2006,28(10):1449.
- [5] 鞠静红,张志荣,韩静. 穿琥宁脂质体包封率的测定[J]. 中国医药工业杂志,2008,39(7):514.
- [6] 姚亚红,张立伟. 黄芩素脂质体的制备及体外释放的研究[J]. 中医药学报,2006,34(3):31.
- [7] 熊非,朱家璧,王维. 灯盏花素纳米脂质体包封率测定方法研究[J]. 药学学报,2004,39(9):755.
- [8] 朱琨,刘晓红. 脂质体分离及包封率测定方法[J]. 江苏教育学院学报:自然科学版,2009,26(2):33.

[责任编辑 全燕]