

# 激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒度的研究<sup>△</sup>

陈春燕<sup>1\*</sup>, 赵 军<sup>2</sup>, 陈 蓓<sup>2</sup>, 高惠静<sup>2</sup>, 王建华<sup>2#</sup> (1.新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830054)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3131-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.21

**摘要** 目的: 确定激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒度的最佳条件。方法: 结合透射电镜的测量结果, 与不加分散剂样品进行对比, 考察加入聚山梨酯80作为分散剂及分散体系的其他因素对激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒度的影响。结果: 激光散射法测定不加分散剂样品的平均粒度为(663.5±93.0) nm, 而按照最佳分散条件即10%聚山梨酯80-阿苯达唑脂质体体积配比为4:1、0.9%氯化钠溶液稀释20倍时测定其平均粒度为(240.6±2.8) nm, 同时透射电镜法测量样品的平均粒度为226.5 nm ( $P>0.05$ )。结论: 激光散射法测定阿苯达唑脂质体粒径时加入聚山梨酯80能改善脂质体团聚现象, 在最佳分散条件下能获得与透射电镜基本一致的测定结果, 同时不影响脂质体结构。该法稳定、快速、简便、重现性好, 可用于阿苯达唑脂质体粒度测定。

**关键词** 阿苯达唑脂质体; 粒度; 激光散射法; 透射电镜; 聚山梨酯80

## Determination of Particle Size of Albendazole Liposome by Laser Scattering Method

CHEN Chun-yan<sup>1</sup>, ZHAO Jun<sup>2</sup>, CHEN Bei<sup>2</sup>, GAO Hui-jing<sup>2</sup>, WANG Jian-hua<sup>2</sup> (1.Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To confirm the best condition for the determination of particle size of Albendazole (ABZ) liposome by laser scattering method. **METHODS:** Combined with the results by transmission electron microscopy and contrasted with the sample without dispersant, the influence of polysorbate 80 as dispersant and other factors of dispersed system on the determination of particle size of ABZ liposome by laser scattering method were investigated. **RESULTS:** The average particle size of samples without dispersant by laser scattering method was (663.5±93.0) nm; that of samples was (240.6±2.8) nm under optimum dispersing condition: i.e. the volume ratio 10% polysorbate 80 to ABZ liposome was 4:1, and was diluted by 0.9% sodium chloride for 20 times; that of samples was 226.5 nm by transmission electron microscopy ( $P>0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Polysorbate 80 is able to solve the agglomeration when laser scattering method is used for the determination of particle size of ABZ liposome. It's close to the result by transmission electron microscopy under optimum dispersing condition and doesn't affect the structure of the liposome. The method is stable, rapid, simple and reproducible for the determination of particle size of ABZ liposome.

**KEY WORDS** Albendazole liposome; Particle size; Laser scattering method; Transmission electron microscopy; Polysorbate 80

来发现添加其他新出现的壮阳类药物的情况越来越常见, 这些药物安全性无法得到保证且没有相关的检验检测方法与法规, 是不法分子钻监督检验漏洞的新手段。由于中药及保健品中成分较为复杂, 存在众多干扰物质, 单纯采用HPLC法较难将待测物质与干扰物质完全分离, 灵敏度与特异性相对较低, 从而影响检测的准确性。而气相色谱-质谱联用法使用固相萃取法进行样品预处理, 操作繁琐, 所需时间长, 有机溶剂使用量大且分析时间长。本试验建立的HPLC-MS/MS法能够通过一次检测同时对非法添加的7种壮阳类物质进行定性与

定量检测, 不仅检验操作简单、快速, 且灵敏度与专属性高。

## 参考文献

- [1] 颜杰, 刘志强, 程振田. 中成药及中药保健食品中非法添加化学药品现状与对策[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(9): 716.
- [2] 王一红, 冯家力, 潘振球, 等. 液相色谱-质谱-质谱方法同时测定抗疲劳保健食品中伐地那非、西地那非、他达那非[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 8(43): 727.
- [3] 王朝晖, 赵宏冰, 蒋晓煌, 等. 15种壮阳类保健品中西地那非和他达那非的含量分析[J]. 中国药师, 2012, 6(15): 895.
- [4] 高青, 张喆, 郭洪祝, 等. 中药及保健品中PDE5抑制剂监测方法研究及未知衍生物的发现[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(2): 142.

(收稿日期: 2013-01-04 修回日期: 2013-02-03)

<sup>△</sup> 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)项目资助(No. 2007AA021805); 新疆医科大学第一附属医院药学专项基金资助(No. 2012YX03)

\* 硕士研究生。研究方向: 药物新剂型和新制剂。电话: 0991-4363438。E-mail: cindychen218@163.com

# 通信作者: 主任药师, 副教授, 硕士。研究方向: 临床药理学、药物新剂型和新制剂。电话: 0991-4363293。E-mail: jhw716@163.com

阿苯达唑(Albendazole, ABZ)是苯并咪唑类广谱抗寄生虫药,其在抗棘球蚴的疗效、毒性作用以及药物经济学方面明显优于其他药物,成为细粒棘球蚴病药物治疗的首选,也是世界卫生组织(WHO)推荐抗包虫病的一线药物<sup>[1]</sup>。但ABZ既难溶于水,又难溶于大多数有机溶剂,脂/水分配系数小,跨膜转运速度慢<sup>[2]</sup>。制成传统的片剂、胶囊等口服后肠道吸收差、生物利用度低,在一定程度上影响了ABZ的推广应用。

脂质体是以磷脂和胆固醇为骨架形成的球状小囊,能包封药物并选择性地运送到肝、脾等网状内皮丰富的器官,是一种靶向给药的新型药物载体。临床研究<sup>[3]</sup>表明,ABZ脂质体能够很好地提高生物利用度和肝脏靶向性。粒度作为ABZ脂质体质量控制的一项重要指标,不仅关乎药品的安全性和有效性,而且与包封率和稳定性有关,直接影响脂质体在机体组织的分布、吸收与代谢,是评价其生物化学、生物物理学及药物传递系统的重要参数<sup>[4]</sup>。目前常用的脂质体粒度测定方法是透射电镜法和激光散射法。透射电镜法通过测量粒子本身,能够客观直接地观察脂质体的真实大小、形状和分散情况。但该方法检测成本高、分析速度慢,必须逐个测量每个微粒并借助大量的统计工具,不仅费时且容易引起系统误差,也不能得出脂质体群体的粒度分布曲线。激光散射法较透射电镜法具有测量粒径分布范围广、操作简便快速、可排除粒子的内干涉和多点散射的干扰、无需进行复杂的数学计算即可获得平均粒度及其分布等优点<sup>[5]</sup>。但是,采用此法测定粒度的前提是要获得分散均匀的悬浮液。在分散介质中,脂质体的表面电势的作用导致其多以聚合体的形式存在,尤其是粒径较小的样品,表面积和粒子间的相互作用力增大,极易形成团聚体和复聚体。而进入激光粒度仪检测的正是这些聚合体的粒径,因此该法测定的结果往往较透射电镜法偏高<sup>[6]</sup>。ABZ脂质体的Zeta电位较小( $<10$  mV),颗粒在范德华力的作用下容易聚集。本试验前期采用稀释、超声等基本手段并未获得显著的分散效果,而本品的粒度测定方法以及分散剂能否改善ABZ脂质体团聚的研究至今仍未见文献报道。

聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯(聚山梨酯80)是一种药用表面活性剂,含亲水性和疏水性的长链,连接到脂质体表面后,亲水性部分伸展于脂质体的表面形成水化膜以增加脂质体的稳定性<sup>[7]</sup>。本研究拟以聚山梨酯80作为ABZ脂质体分散剂,使用马尔文激光粒度分布仪进行粒度测定,着重研究分散介质、分散条件、分散剂用量、分散体系等对粒径测定的影响,并结合透射电镜结果确定能准确表征ABZ脂质体粒度的最佳分散条件;同时进行稳定性、重复性及重现性考察。

## 1 材料

### 1.1 仪器

JSM-1230透射电子显微镜(日本电子公司);ZEN3690激光粒度分布仪(英国马尔文公司)。

### 1.2 药品与试剂

ABZ脂质体(新疆医科大学第一附属医院药学部,批号:20121225,药物含量:10 g/L);0.9%氯化钠溶液(国药集团新疆制药有限公司,批号:12080232);聚山梨酯80(湖南尔康制药有限公司,批号:20120801);试验用水为重蒸馏水。

## 2 方法与结果

### 2.1 透射电镜法

透射电镜的工作原理是以波长极短的电子束作为照明源照射在样品上,通过接收带有样品内部信息的电子,然后经过电磁透镜聚焦放大成像,即可获得高分辨率、肉眼可观察的、

高放大倍数的透射电子像<sup>[8]</sup>。

取ABZ脂质体样品适量,加入0.9%氯化钠溶液稀释,用1%醋酸双氧铀负染法制样,干燥后置于透射电镜下观察形态和粒径大小,结果见图1。

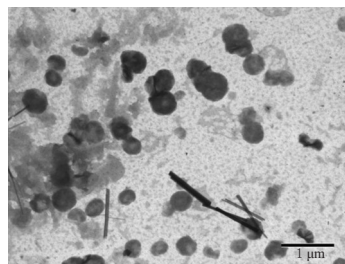


图1 阿苯达唑脂质体的透射电镜图( $\times 7\ 000$ )

Fig 1 Micrograph of ABZ liposome by transmission electron microscopy( $\times 7\ 000$ )

由图1可见,电镜下ABZ脂质体呈圆形或椭圆形,粒径大小均一,存在脂质体团聚体。采用JEOL图像-数字处理软件对ABZ脂质体10个视野进行数据统计,计算出平均粒径为226.5 nm,粒度分布范围为100.8~724.4 nm。

### 2.2 激光散射法

激光散射法是通过微粒在液体中的扩散率来测定粒子的粒径。基于该法的马尔文激光粒度分布仪的工作原理是光源照射到含有待测样品的某一空间,颗粒的布朗运动产生光的散射<sup>[9]</sup>。通常颗粒小时散射角度大,颗粒大时散射角度小。最终计算机对所接收的散射光信号进行处理,即可从中得到粒径大小及分布的信息。为保证测量的准确性,本研究分别对测定的分散介质、分散剂用量、分散体系等进行了考察。

2.2.1 分散介质的选择。分散介质是指用来分散样品的溶液,应具有良好的亲和性、稳定性,尽量避免发生团聚且对样品测定无干扰。本试验综合考虑折光率、黏度、表面张力、密度及等性能参数对脂质体的分散的影响,同时根据ABZ脂质体的制备方法,选择0.9%氯化钠溶液作为分散介质。

2.2.2 分散条件的选择。样品必须完全分散在介质中,才可能反映颗粒真实的粒度。对于ABZ脂质体,超声分散后所测定的平均粒径[(600.0 $\pm$ 75.5) nm,  $n=5$ ]与不进行分散处理直接测定的平均粒径[(663.5 $\pm$ 93.0) nm,  $n=5$ ]相差不大,且与透射电镜测量结果有很大差异,故超声不能获得较好的分散效果。

分散剂是一种少量的、能使液体表面张力显著降低,从而使颗粒之间良好分散的物质。配制聚山梨酯80水溶液(质量分数为10%)为分散剂,经0.22  $\mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤后备用。

取ABZ脂质体适量,加入0.9%氯化钠溶液稀释,一组不加分散剂,一组加入分散剂,混匀后放入激光粒度分布仪样品池中测定,检测温度为25  $^{\circ}\text{C}$ ,连续测定3次取平均值。考察分散剂对ABZ脂质体粒度测定结果的影响( $n=5$ )。未加分散剂样品测定平均粒径为(663.5 $\pm$ 93.0) nm,多分散指数(PDI)为0.239 $\pm$ 0.02。加入分散剂后,粒径测定结果为(244.0 $\pm$ 7.5) nm,较未加分散剂组明显减小( $P<0.05$ ),与透射电镜测量统计结果较为接近( $P>0.05$ );其PDI值为0.170 $\pm$ 0.01,较未加分散剂组也明显减小( $P<0.05$ )。

2.2.3 分散剂用量对粒径测量结果的影响。取ABZ脂质体10  $\mu\text{L}$ ,调整分散剂在0.9%氯化钠溶液中的加入量,考察分散剂用量对脂质体粒径测量结果的影响,结果见图2。

由图2可见,ABZ脂质体粒径测定值随分散剂用量的增加表现出急剧减小,到达稳定值后又呈现出缓慢增大的趋势。

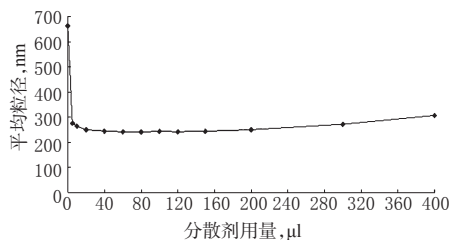


图2 分散剂用量对粒度测量结果的影响( $n=5$ )

Fig 2 The effects of dispersant dosage on particle size measurement( $n=5$ )

经统计学处理分析,分散剂用量在20~120 μl时分散性能最佳,各组间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。根据与透射电镜测量结果的吻合程度及用量最少原则,选择40 μl聚山梨酯80水溶液,即分散剂与脂质体体积配比为4:1为最佳分散剂用量。

2.2.4 稀释倍数对粒径测量结果的影响。固定分散剂与脂质体体积配比(4:1),使用0.9%氯化钠溶液进行不同倍数的稀释,结果见图3。

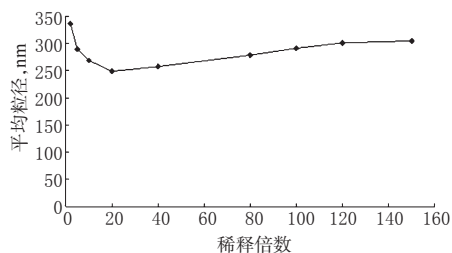


图3 稀释倍数对粒度测量结果的影响( $n=5$ )

Fig 3 Effects of particle size measurement on different concentrations of gradients( $n=5$ )

由图3可见,ABZ脂质体粒径测量结果随稀释倍数增加表现为先减小,达到谷值后又逐渐增大的趋势。结合透射电镜统计结果可知,分散介质稀释20倍可获得最佳的分散测定结果,且与透射电镜结果最接近。

2.2.5 稳定性试验。脂质体属于粗分散体系,放置过程中易聚合导致稳定性下降。为考察优选的分散体系的稳定性,分别配制不加分散剂和加入分散剂的两组样品溶液,于不同时间测定脂质体粒径,详见图4。

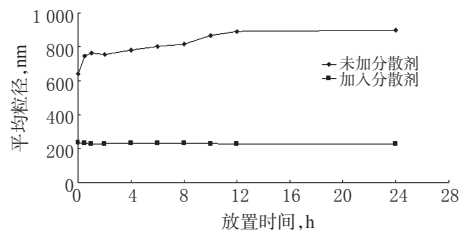


图4 放置时间对粒度测量结果的影响( $n=5$ )

Fig 4 The effects of storage time on particle size measurement( $n=5$ )

由图4可见,未加分散剂组的ABZ脂质体由于沉降与团聚的作用导致测定的平均粒径逐渐增大,加入分散剂组的ABZ脂质体平均粒径在放置的24 h内变化无统计学意义( $P>0.05$ ), $RSD=1.01\%$ ( $n=9$ ),表明其稳定性良好。

2.2.6 重复性试验。按照上述试验确定的最佳分散条件配制1组样品,平行测定5次。测得ABZ脂质体平均粒径为(238.8±2.3)nm,粒度分布范围为78.4~679.5 nm, PDI值为0.169±0.01,  $RSD=1.04\%$ ( $n=5$ )。

2.2.7 重现性试验。平行配制5份样品,均按照10%聚山梨酯80-ABZ脂质体为4:1的体积比,0.9%氯化钠溶液稀释20倍的最佳分散条件,混匀后测定ABZ脂质体的粒径及粒径分布,结果详见图5。

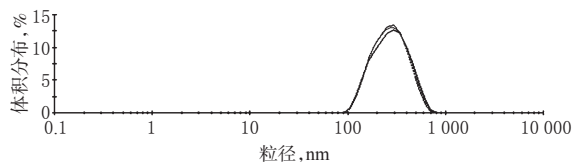


图5 重现性试验测定结果( $n=5$ )

Fig 5 Results of reproducibility tests( $n=5$ )

由图5可知,测得其平均粒径为(240.6±2.8) nm,粒度分布范围为72.1~681.7 nm, PDI值为0.170±0.01,  $RSD=1.05\%$ ( $n=5$ )。该测定结果与透射电镜测量结果具有较好的一致性( $P>0.05$ )。

2.2.8 最佳分散条件下ABZ脂质体的电镜观察。为验证本试验筛选出的最佳分散条件是否对ABZ脂质体的结构产生影响,透射电镜观察加入分散剂后的脂质体形貌见图6。

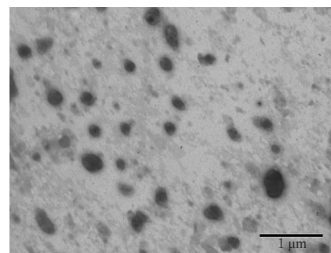


图6 阿苯达唑脂质体加分散剂的透射电镜图(7 000倍)

Fig 6 Micrograph of ABZ liposome with dispersant by transmission electron microscopy(7 000 times)

由图6可见,加入分散剂后脂质体形态特征依旧完整呈圆形或椭圆形,脂质双分子层表面可见聚山梨酯80透明薄被膜,分布均一,基本无团聚。

### 3 讨论

在本试验分散条件的选择中,超声的物理手段仅能改善脂质体之间的软团聚,而急剧增加体系的能量使破碎的粒子更加活泼,反而加速了脂质体的聚集和沉降<sup>[10]</sup>,因此未获得显著的分散效果。聚山梨酯80作为分散剂能有效地改善脂质体团聚现象的原因主要有两个:一是其物理吸附并覆盖于脂质双层表面,形成有一定厚度的亲水相<sup>[11]</sup>,脂质体分子之间相互吸引、聚集的机会减少,这也是激光粒度仪测定脂质体粒径稍大于透射电镜测量结果的原因;二是聚山梨酯80增加了分散介质的微黏度<sup>[12]</sup>,脂质体沉降速度及膜的流动性减小,提高了物理稳定性,因此该分散体系也具有较好的稳定性。分散剂用量影响粒径变化是由于分散剂用量过少时,不能够完全分散ABZ脂质体的团聚状态,此时脂质体粒径较大;当用量过多时,其在水相与脂质间分配达到饱和,导致脂质体双层囊泡膨胀,粒径表现为逐渐增大。脂质体粒径随分散体系稀释倍数变化的趋势是由于脂质体浓度过高时分散空间有限,仪器检测的多为团聚体或非团聚体的粒径,  $PDI>0.5$ ,此时测定的粒径也偏大;浓度过低时归因于马尔文激光粒度分布仪的仪器特点,进入仪器测定的脂质体分子数量有限,散射强度太低,检测器分辨率限制不能获得足够的强度信号,表现为粒径稍增大。

对于ABZ脂质体,不加分散剂应用马尔文激光粒度仪测定时,测定结果不稳定,偏差大,表现为  $PDI>0.5$ ,每组样品之

# LC-MS/MS法检查注射用氟氯西林钠中的有关物质

赵丽娜<sup>1,2\*</sup>, 钟文英<sup>1#</sup>, 杨汉煜<sup>2#</sup>, 赵曦<sup>2</sup>, 汪玉梅<sup>2</sup>(1.中国药科大学, 南京 211100; 2.石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 石家庄 050035)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3134-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.22

**摘要** 目的:检查注射用氟氯西林钠中的有关物质。方法:采用液相色谱-质谱/质谱技术。液相条件:色谱柱为Hypersil ODS, 柱温为20℃, 流动相为乙腈-0.5 mmol/L醋酸铵溶液(pH=5.0)(30:70), 流速为1.0 ml/min; 质谱条件:ESI离子源; 正离子模式, Q1全扫描, Q2扫描, 多离子反应监测(MRM)模式, 扫描范围100~1 000 amu。结果:从注射用氟氯西林钠中鉴别出5种有关物质, 并初步确定成分及主要离子碎片结构。结论:本法能够快捷、方便地检查出注射用氟氯西林钠中的有关物质。

**关键词** 注射用氟氯西林钠; 液相色谱-质谱/质谱法; 有关物质; 检查; 结构确证

## Determination of Related Substances in Flucloxacillin Sodium for Injection by LC-MS/MS

ZHAO Li-na<sup>1,2</sup>, ZHONG Wen-ying<sup>1</sup>, YANG Han-yu<sup>2</sup>, ZHAO Xi<sup>2</sup>, WANG Yu-mei<sup>2</sup>[1.China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China; 2.CSPC Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China]

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine the related substances in Flucloxacillin sodium for injection. METHODS: LC-MS/MS was used. The determination was performed on Hypersil ODS column with mobile phase of acetonitrile-0.5 mmol/L ammonium acetate (pH=5.0)(30:70) at the flow rate of 1.0 ml/min, and the column temperature was 20℃. MS parameter: ESI ion source, positive monitoring, Q1 full scan mode, Q2 scan mode, MRM, scanning scope of 100-1 000 amu. RESULTS: 5 related substances were identified in Flucloxacillin sodium for injection, and the components and main fragment structure were determined primarily. CONCLUSIONS: The method is rapid and convenient for the determination of related substances in Flucloxacillin sodium for injection.

**KEY WORDS** Flucloxacillin sodium for injection; LC-MS/MS; Related substances; Determination; Structure confirmation

间的团聚程度难以预测和控制,重现性较差。本试验通过加入分散剂同时考察相关影响因素,筛选出应用马尔文激光粒度分布仪测定ABZ脂质体的最佳分散体系:按照10%聚山梨酯80-ABZ脂质体体积比为4:1,0.9%氯化钠溶液稀释20倍。该方法经验证具有操作简便、快速、准确性、稳定性、重现性好等特点,在有效解决团聚现象的同时未破坏脂质体双分子层的结构,可用于ABZ脂质体平均粒径的测量。

本研究根据ABZ脂质体的特点选择10%的聚山梨酯80作为分散剂,获得了良好的分散效果,其测定结果也与透射电镜测量统计结果相吻合。但是该方法是否适用于测定包封其他药物的脂质体,仍有待进一步的研究与考察。

### 参考文献

- [1] Panwar P, Pandey B, Lakhera PC, et al. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes[J]. *Int J Nanomedicine*, 2010(5):101.
- [2] Koradia DK, Parikh HR. Dissolution enhancement of albendazole through nanocrystal formulation[J]. *J Pharm*

\* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail:shangxianyueyue@163.com

# 通信作者a:教授,博士。研究方向:药物分析、药用纳米材料。电话:025-86185217。E-mail:wyzhong@cpu.edu.cn

# 通信作者b:高级工程师,硕士。研究方向:药动学。电话:0311-67808866。E-mail:sjzzhongqi@163.com

*Bioallied Sci*, 2012, 4(1):62.

- [3] 李海涛,单骄宇,邵英梅,等.阿苯达唑脂质体和阿苯达唑片治疗囊型包虫病的临床疗效及安全性[J]. *中国肝脏病杂志*, 2011, 19(7):532.
- [4] 邓英杰.脂质体技术[M].北京:人民卫生出版社, 2007:39-40.
- [5] 王振新,钱彦虎.激光粒度仪测定PTA粒径分布[J]. *聚酯工业*, 2004, 17(3):50.
- [6] 许波,田颂九,吴如金,等.两性霉素B脂质体粒度测定方法研究[J]. *药物分析杂志*, 2004, 24(3):307.
- [7] 张晶晶,陈军,方芸.吐温80对9-硝基喜树碱脂质体药物动力学性质的影响[J]. *药学与临床研究*, 2011, 19(1):32.
- [8] 程益军,宋鹏.激光粒度仪与透射电镜测试结果的对比[J]. *中国粉体技术*, 2010, 16(4):23.
- [9] 万牡华,赵美霞,欧阳健明.激光散射法对尿液中纳米微晶粒径及其分布的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2009, 29(1):217.
- [10] 程海斌,刘桂珍,李立春,等.激光散射法测定粒径的样品处理方法[J]. *武汉理工大学学报*, 2003, 25(3):7.
- [11] 胥传来,姚惠源.吐温-80与脂质体膜相互作用机理的研究[J]. *西安石油大学学报:自然科学版*, 2005, 20(6):45.
- [12] 王继波,岳旺,孙衍增,等.藻酸双酯钠脂质体的制备及粒度分布的测定[J]. *中国海洋药物杂志*, 2007, 26(6):28.

(收稿日期:2013-04-26 修回日期:2013-05-21)