

RP-HPLC法测定去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体的包封率[△]

何文生^{1*}, 冷静², 尚京川³(1.重庆市大足区人民医院药剂科, 重庆 402360; 2.重庆市中医院药剂科, 重庆 400021; 3.重庆医科大学药学院, 重庆 400016)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)09-1238-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.09.30

摘要 目的: 建立测定去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体包封率的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Thermo Sycronis C₁₈, 流动相为磷酸水溶液(pH=3.2)-甲醇(梯度洗脱), 流速为 1.0~1.7 ml/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 50 μl。结果: 去甲斑蝥素、齐墩果酸的质量浓度分别在 20~300、10~150 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.999\ 8$ 、 $0.999\ 7$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD≤5.89%; 去甲斑蝥素的平均回收率为 99.15%~100.11%, RSD≤3.20% ($n=5$), 齐墩果酸的回收率为 99.22%~100.30%, RSD≤3.34% ($n=5$); 去甲斑蝥素、齐墩果酸平均包封率分别为 $(48.01 \pm 2.34)\%$ 、 $(87.31 \pm 0.56)\%$ ($n=5$)。结论: 该方法简便、快速、可靠, 可用于去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体包封率的测定。

关键词 反相高效液相色谱法; 脂质体; 去甲斑蝥素; 齐墩果酸; 包封率

Determination of Encapsulation Efficiency of Norcantharidin and Oleanolic Acid Liposome by RP-HPLC

HE Wen-sheng¹, LENG Jing², SHANG Jing-chuan³(1. Dept of Pharmacy, Chongqing Dazu District People's Hospital, Chongqing 402360, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China; 3. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of encapsulation efficiency of Norcantharidin and oleanolic acid liposome. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The column was Thermo Sycronis C₁₈ and the mobile phase was phosphoric acid (pH=3.2)-methanol (gradient elution) with the flow rate of 1.0-1.7 ml/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 30 ℃, the volume was 50 μl. RESULTS: There was a good linear relationship between the quality concentration of norcantharidin and the peak area in the range of 20-300 μg/ml ($r=0.999\ 8$) and oleanolic acid was in the range of 10-150 μg/ml ($r=0.999\ 7$); the RSDs of precision, stability and repeatability tests was no more than 5.89%; the average recovery of oleanolic acid was in the range of 99.15%-100.11% (RSD≤3.20%, $n=5$), that of norcantharidin was 99.22%-100.30% (RSD≤3.34%, $n=5$); the average encapsulation efficiency of norcantharidin and oleanolic acid were $(48.01 \pm 2.34)\%$, $(87.31 \pm 0.56)\%$ ($n=5$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, fast and reliable to determine the encapsulation efficiency of Norcantharidin and oleanolic acid liposome.

KEYWORDS RP-HPLC; Liposome; Norcantharidin; Oleanolic acid; Entrapment efficiency

去甲斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)是由马来酞和呋喃反应后制得的一种人工全合成化合物, 具有较强的抑制肝癌等多种癌细胞生长的作用, 对泌尿系统、胃肠道、骨髓的毒副作用较低^[1-2]。齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)为五环三萜类天然化合物, 对肝癌细胞具有明显的抑制作用, 且呈时间和浓度依赖性^[3], 同时还具有抗炎、抗病毒等作用^[4]。脂质体是由磷脂分散在水中形成的具有双分子层的超微球状粒子, 其进入体内后, 主要被网状内皮系统摄取, 具有肝靶向性, 载药脂质体可

用于治疗肝肿瘤及防止淋巴系统肿瘤等的扩散和转移。结合三者优点, 制得去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体。为控制其质量, 笔者采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定了该复合脂质体的包封率。

1 材料

1.1 仪器

1260型 HPLC 仪, 包括 G1312C 型二元泵、G1314F 型紫外检测器、G1329B 型自动进样器及 Chemstation 化学工作站(美

[8] 孔华丽, 胡琳, 宁萌, 等. 高效液相色谱法测定复方刺五加片中紫丁香苷的含量[J]. 解放军药学学报, 2009, 25(4): 347.

△ 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(No.CSTC, 2010BB5347); 重庆市卫生局中医药科技项目(No.2011-2-161)

* 副主任中药师。研究方向: 中药化学与药事管理。电话: 023-43780213

[9] 姜文红, 刘静, 仲昭庆, 等. HPLC法同时测定刺五加浸膏3种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1145.

[10] 彭敏, 谭洁. 高效液相色谱法测定五加参颗粒中紫丁香苷含量[J]. 中国药业, 2012, 21(4): 39.

(收稿日期: 2014-02-16 修回日期: 2014-09-04)

(编辑: 孙冰)

国 Agilent 公司); BS210S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司); KQ-3200E 型超声仪(金坛市医疗仪器厂); Micro 21/21R 型冷冻超速离心机(美国 Thermo 公司); LD-50G-D 型超纯水处理器(重庆利迪实验仪器设备有限公司); 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 药品与试剂

去甲斑蝥素、齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100414-200501、110709-201206); 去甲斑蝥素、齐墩果酸(南京泽朗医药科技有限公司, 纯度分别为: 98%、98%); 去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体(自制, 批号: 20130619、20130625、20130720); 大豆卵磷脂(成都市科龙化工试剂厂, 纯度: 99%); 胆固醇(成都市科龙化工试剂厂, 纯度: 99%); Triton X-100(上海晶纯实业有限公司, 分析纯); 甲醇(美国 Teddy 公司, 色谱纯); 其余试剂均为分析纯, 试验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Sycronis C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 保护柱: Agilent Zorbax C₁₈(12.5 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 磷酸水溶液(pH=3.2), 流动相 B: 甲醇, 梯度洗脱(洗脱条件见表 1); 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 进样体积: 50 μl。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Conditions of gradient elution

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %	流速, ml/min
0	65	35	1.0
3	65	35	1.0
3.5	5	95	1.0
4.5	5	95	1.7
10	5	95	1.7

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取去甲斑蝥素和齐墩果酸对照品各 50.0、25.0 mg, 分别用甲醇溶解并定容至 50 ml 量瓶中, 配制成各自质量浓度为 1.0、0.5 mg/ml 的对照品贮备液, 于 4 °C 保存。

分别精密量取去甲斑蝥素和齐墩果酸对照品贮备液各适量, 用甲醇稀释, 依次配制成质量浓度为 40、100、200、400、600 μg/ml 的系列去甲斑蝥素对照品溶液和质量浓度为 20、50、100、200、300 μg/ml 的系列齐墩果酸对照品溶液, 于 4 °C 保存。

取质量浓度为 40 μg/ml 的去甲斑蝥素对照品溶液和质量浓度为 20 μg/ml 的齐墩果酸对照品溶液等体积混合, 摇匀, 即得含 20 μg/ml 去甲斑蝥素和 10 μg/ml 齐墩果酸的混合对照品溶液; 以同样方法分别配制含 50、100、200、300 μg/ml 去甲斑蝥素和 25、50、100、150 μg/ml 齐墩果酸的混合对照品溶液。

2.3 脂质体的制备

空白脂质体混悬液的制备: 精密称取卵磷脂 240 mg、胆固醇 80 mg, 溶于 30 ml 二氯甲烷中, 将此溶液置于 250 ml 圆底烧瓶中, 于 35 °C 水浴下旋转蒸发形成类脂质薄膜, 然后加入 15 ml 磷酸盐缓冲液(pH=7.0), 水合 2 h, 超声(功率: 150 W, 频率: 40 kHz)处理 20 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

含药脂质体混悬液的制备: 精密称取卵磷脂 240 mg、胆固醇 80 mg、去甲斑蝥素 20 mg、齐墩果酸 10 mg, 溶于 30 ml 二氯甲烷中, 将此溶液置于 250 ml 圆底烧瓶中, 于 35 °C 水浴下旋转蒸发形成类脂质薄膜, 然后加入 15 ml 磷酸盐缓冲液(pH=7.0), 水合 2 h, 超声(功率: 150 W, 频率: 40 kHz)处理 20 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 方法专属性考察

取“2.2”“2.3”项下的混合对照品溶液、空白脂质体混悬液和含药脂质体混悬液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 见图 1。由图 1 可见, 去甲斑蝥素约在 3.7 min 左右出峰, 齐墩果酸约在 8.5 min 左右出峰, 且杂质峰不干扰主峰, 表明本方法具有良好的专属性。

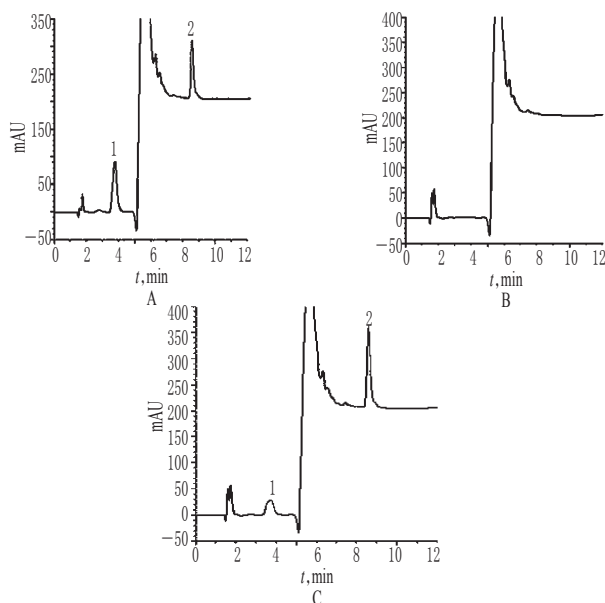


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 空白脂质体; C. 含药脂质体; 1. 去甲斑蝥素; 2. 齐墩果酸

Fig 1 HPLC chromatogram

A. mixed reference; B. blank liposome; C. drug-containing liposome; 1. norcantharidin; 2. oleanolic acid

2.5 线性关系与检测限考察

取“2.2”项下甲斑蝥素质量浓度为 20、50、100、200、300 μg/ml 和齐墩果酸质量浓度为 10、25、50、100、150 μg/ml 的系列混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得去甲斑蝥素的回归方程为 $y=2.17x+5.19$ ($r=0.9998$, $n=5$), 表明去甲斑蝥素的质量浓度在 20~300 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系, 且以信噪比为 3 测得其检测限为 4.5 μg/ml; 齐墩果酸的回归方程为 $y=22.10x-73.49$ ($r=0.9997$, $n=5$), 表明齐墩果酸的质量浓度在 10~150 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系, 且以信噪比为 3 测得其检测限为 4.0 μg/ml。

2.6 精密度试验

取“2.2”项下配制的去甲斑蝥素质量浓度为 20、100、300 μg/ml 和齐墩果酸质量浓度为 10、50、150 μg/ml 的混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积, 重复 5 次。

结果,去甲斑蝥素低、中、高质量浓度的RSD≤3.25%,齐墩果酸低、中、高质量浓度的RSD≤3.04%,表明仪器精密度高。

2.7 稳定性试验

按“2.3”项下方法制备含药脂质体混悬液,精密量取适量,于4℃保存,于放置1、3、5、7、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,记录峰面积。结果,去甲斑蝥素和齐墩果酸的RSD分别为3.46%、3.79%,表明含药脂质体混悬液在24 h内稳定。

2.8 重复性试验

按“2.3”项下方法制备含药脂质体混悬液,精密量取适量,共5份,于4℃保存,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,记录峰面积。结果,去甲斑蝥素和齐墩果酸的RSD分别为4.15%、4.95%,表明该方法重复性良好。

2.9 回收率试验

按“2.3”项下方法制备空白脂质体混悬液适量,分别加入低、中、高质量浓度的去甲斑蝥素和齐墩果酸混合对照品溶液适量,制备含去甲斑蝥素和齐墩果酸不同量的脂质体。各取50 μl加入1 ml 10% Triton X-100甲醇溶液破乳,按“2.1”项下色谱条件进样测定,每个质量浓度连续测定5次,计算回收率,结果见表2。

表2 回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of recovery test($\bar{x} \pm s, n=5$)

成分	加入质量浓度, μg/ml	测得质量浓度, μg/ml	平均回收率, %	RSD, %
去甲斑蝥素	20	19.83±0.63	99.15	3.20
	100	99.75±1.84	99.75	1.84
	300	300.31±4.46	100.11	1.49
齐墩果酸	10	9.92±0.33	99.22	3.34
	50	50.11±1.46	100.21	2.91
	150	150.46±2.72	100.30	1.81

2.10 脂质体包封率的测定

精密量取按“2.3”项下方法制备的3批含药脂质体(批号:20130619、20130625、20130720)混悬液1.0 ml,置于冷冻超速离心机中,于4℃下,以半径8 cm、14 800 r/min离心95 min,取上清液按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算游离药物浓度 $c_{游离}$;同时,将离心前的脂质体混悬液用10% Triton X-100甲醇溶液破乳并稀释至适当倍数测定,计算总药物浓度 $c_{总}$ 。按以下公式计算药物包封率:包封率(%)=($c_{总}-c_{游离}$)/ $c_{总} \times 100\%$ 。结果,脂质体中去甲斑蝥素的平均包封率为(48.01±2.34)%($n=5$),齐墩果酸的平均包封率为(87.31±0.56)%($n=5$)。

3 讨论

3.1 脂质体包封率测定方法的确定

测定脂质体包封率的常用方法有透析法^[5]、葡聚糖凝胶柱色谱法^[6]、鱼精蛋白凝聚法^[7]和离心法^[8]等。透析法简单,不需要昂贵的仪器,但是耗时比较长;葡聚糖凝胶柱色谱法分离脂质体和游离药物时,洗脱液对脂质体进行了大量稀释,可能导

致脂质体的渗漏;鱼精蛋白凝聚法的测定结果易受脂质体Zeta电位影响;超速离心法对离心机要求比较高,但是操作简单、耗时短,可以有效分离脂质体与游离药物。因此,本研究选用超速离心法测定脂质体的包封率。

3.2 HPLC色谱条件的确定

去甲斑蝥素和齐墩果酸的结构相差较大,在色谱柱中的保留行为有差异。笔者以混合标准溶液试验了等度和梯度两种洗脱方式,考察了流动相磷酸水溶液(pH=3.2)-甲醇体积比为65:35、45:55、25:75、5:95(V/V)等度洗脱时去甲斑蝥素与齐墩果酸的分离情况。结果表明,去甲斑蝥素与齐墩果酸色谱峰的出峰时间随着流动相中有机相含量的增加而逐渐减小。由于齐墩果酸的脂溶性较强,只有在高比例的有机相条件下出峰较快,而此时去甲斑蝥素色谱峰与溶剂峰不能完全分离,故考虑使用梯度洗脱使两种物质得到最佳分离并缩短分析时间。经过考察,选择本文中的梯度洗脱条件时去甲斑蝥素与齐墩果酸能得到最佳分离,且分析时间大大缩短。

综上所述,本方法简便、快速、可靠,可用于去甲斑蝥素齐墩果酸复合脂质体包封率的测定。

参考文献

- [1] 李功权,张水军,吕建锋,等.去甲斑蝥素诱导肝癌细胞凋亡的实验观察[J].中华医学杂志,2010,90(30):2145.
- [2] Sun ZX, Ma QW, Zhao TD, et al. Apoptosis induced by norcantharidin in human tumor cells[J]. *World J Gastroentero*, 2000,6(2):263.
- [3] 吴英俊,王超男,刘洁婷,等.蛇莓中齐墩果酸对肝癌细胞SMMC-7721的抑制作用[J].中国生化药物杂志,2011,32(4):306.
- [4] 王晓峰,李继尧,于继人.齐墩果酸对肝损伤小鼠血清及肝细胞培养液转氨酶作用的研究[J].中国药理学杂志,1999,34(6):377.
- [5] 熊非,朱家璧,王维,等.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.
- [6] 张蓓,王东凯,宋扬,等.细辛脑脂质体的制备及包封率的测定[J].中国中药杂志,2007,32(1):67.
- [7] 孙维彤,黄桂华,叶杰胜,等.鱼精蛋白凝聚法测定脂质体和纳米脂质体包封率[J].中国药理学杂志,2006,41(22):1716.
- [8] 陆伟根,陈亭亭,任德权.草乌甲素多囊脂质体包封率的测定[J].中成药,2007,29(6):825.

(收稿日期:2015-01-30 修回日期:2015-02-13)

(编辑:周 箐)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅