HPLC-ELSD法测定黑乳海参皂苷甲 nobiliside A 冻干脂质体中药物含量以及包封率*

郭丹[1], 熊阳[1,2], 张悦[1], 崔黎丽[1], 孙鹏[1], 陈建明[1**]

(1.第二军医大学药学院, 上海 200433; 2.浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要 目的: 建立 HPLC-ELSD法测定黑乳海参皂苷甲 nobiliside A 冻干脂质体药物含量以及包封率。方法: 采用 SB-C_{18}柱; 流动相为甲醇-0.5%醋酸二元梯度洗脱; 检测器为蒸发光散射检测器; 采用微柱离心法分离重建后的 nobiliside A脂质体和游离药物。结果: nobiliside A在 0.120~1.92 μg线性关系良好(r=0.9993); 方法平均回收率为 99.12% (n=9)。结论: 本方法简便快速, 结果准确可靠, 可用于 nobiliside A冻干脂质体含量及包封率的测定。

关键词: HPLC-ELSD; nobiliside A 冻干脂质体; 包封率; 微柱离心法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0373-05

HPLC-ELSD determination of content and entrapment efficiency of *Holothuria nobilis* saponins nobiliside A freeze-dried liposome*

GUO Dan[1], XIONG Yang[1,2], ZHANG Yue[1], CUI Li-li[1], SUN Peng[1], CHEN Jian-ming[1**]

(1. College of Pharmacy, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;
2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract **Objective**: To develop an HPLC-ELSD method for determination of content and entrapment efficiency of nobiliside A freeze-dried liposome. **Methods**: HPLC-ELSD was adopted in the quantitative analysis with Agilent SB-C_{18} column and methanol-0.5% HAc by gradient elution of mobile phase with ELSD detector. Microcolumn centrifugation method was used to determine entrapment efficiency of nobiliside A freeze-dried liposome. **Result**: The linear range for nobiliside A was 0.120-1.92 μg (r=0.9993). The average recovery was 99.12% (n=9). **Conclusion**: The HPLC-ELSD method is simple, accurate and reliable for the determination of the content and the entrapment efficiency of nobiliside A freeze-dried liposome.

Key words: HPLC-ELSD; nobiliside A freeze-dried liposome; entrapment efficiency; microcolumn centrifugation method

黑乳海参皂苷甲(nobiliside A, 结构式见图 1)是从黑乳海参中提取出来的三萜皂苷类成分, 作为海参体内主要的有毒物质和化学防御物质, 它具有较强的抗肿瘤活性, 是很有前景的抗肿瘤药物[1], 目前已经申请了该化合物的专利[2]。同时研究也表明 nobiliside A的不良反应很大, 而脂质体是一种新型的药物载体, 通过包埋药物可降低药物毒性、降低溶血作用(如两性霉素 B[3]), 并且作为具有生物降解性和生物相容性载药系统, 脂质体已得到广泛研究和应用, 是迄今为止唯一上市的可用于静脉注射的纳米给药载体[4], 鉴于脂质体作为给药系统的诸多优点, 本文研究制备了 nobiliside A脂质体。但是液体脂质体在贮存过程中, 易出现聚结、分层等不稳定现象。为使 nobiliside A能更好地发挥其生物活性、降低毒性, 本研究以冷冻干燥法将 nobiliside A制成了冻干脂质体, 其研究在国内外未见报道。为了有效地控制其质量, 作者采用 HPLC-ELSD法建立了定量分析 nobiliside A冻干脂质体的含量及包封率的方法, 为建立 nobiliside A冻干脂质体制剂质量评价体系奠定了基础, 结果表明该方法简明、准确, 重现性好, 可以用于制剂的质量评价。

* "十一五"国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA090304)
** 通讯作者 Tel: (021) 25074593; E-mail: yjcjm@163.com
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

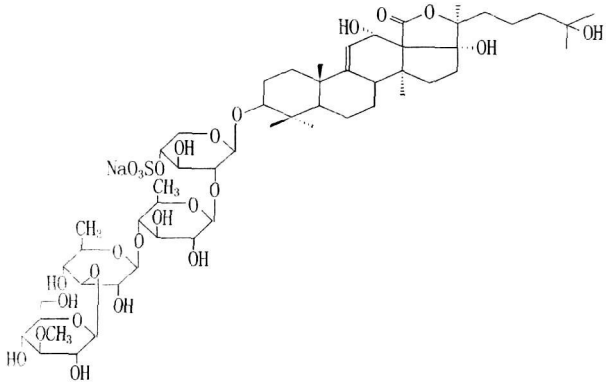

图 1　nobiliside A结构式

Fig 1　Structure of nobiliside A

1　仪器与试药

1.1　仪器　Agilent 1100 series高效液相色谱仪, Agilent化学工作站(G1311A泵, G1314A紫外检测器); Alltech ELSD 2000ES型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技有限公司), XWK-3A空气泵(天津分析仪器厂); Hitech-Kflow超纯水机, METTLER TOLEDO G135电子天平(德国梅特勒公司); Agilent 8453紫外可见光谱仪(美国惠普公司), JEOL-2010型透射电子显微镜(日本电子公司); TGL-16C高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); JY92-ⅡN超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); R-205型旋转蒸发仪(瑞典 BUCHI公司); NANO-S型 Zetasizer纳米粒径分析仪(英国马尔文仪器公司); Advantage型冷冻干燥机(美国 Virtis)。

1.2　试药　注射用大豆磷脂(S80, 上海太伟有限公司, 注射级); nobiliside A 对照品(由第二军医大学药学院海洋药物研究室提供, 纯度≥98%); 胆固醇(国药集团化学试剂有限公司); 蔗糖(云南省勐永药业有限公司); Sephadex G-50(瑞典 Pharmacia公司进口分装, 40~150 μm); 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

2　Nobiliside A冻干脂质体以及空白冻干脂质体的制备

采用薄膜超声法制备。取适量的磷脂与胆固醇(W/W为 2∶1), 置茄形瓶中, 加入无水乙醇和氯仿(V/V为 7∶3)的混合液, 振荡使完全溶解, 即得类脂溶液。将茄形瓶置旋转蒸发器上, 于 50 ℃减压蒸发溶剂使类脂溶液形成一层均匀薄膜。向薄膜中加入 nobiliside A浓度为 0.5 mg·mL^{-1}的水溶液 10 mL, 轻摇, 将类脂膜洗脱并水合成含药脂质体混悬液, 再将含药脂质体水浴超声 45 min, 直至近透明, 200 W探头超声 1 min即得(工作 6 s, 间隙 6 s, 共 10次), 于冰箱 4 ℃保存备用。将所得的 nobiliside A脂质体加入 10%(W/V)的蔗糖作为支撑剂预冻 5 h后冷冻干燥, 即得 nobiliside A冻干脂质体。上述的水化介质中不加 nobiliside A, 同法操作即可制得空白冻干脂质体。

2.1　nobiliside A冻干脂质体显微形态的观察　取重建后的冻干脂质体混悬液适量, 将其吸附于覆盖有碳膜的铜网上, 自然晾干后置透射电镜下观察。本实验中制备的脂质体为略带蓝色乳光的胶体溶液。透射电镜照片结果表明, nobiliside A冻干脂质体粒子均匀圆整, 为球形或近球形, 可见清晰的脂质体双层膜结构(见图 2)。

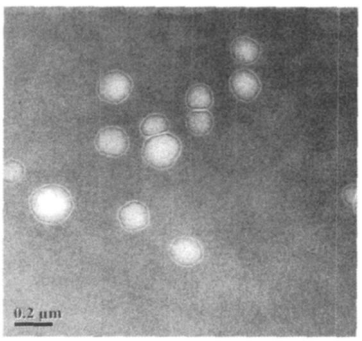

图 2　nobiliside A冻干脂质体的电镜图片

Fig 2　Transmission electron microscopy (TEM) of nobiliside A freeze-dried liposomes

2.2　nobiliside A冻干脂质体平均粒径及 Zeta电位的测定　将用蒸馏水重建后的 nobiliside A冻干脂质体采用 Zetasizer纳米粒径分析仪测定粒径大小和分布以及 Zeta电位, 此仪器所测定的粒径范围为 0.6 nm~6 μm, 测得重建后的脂质体的平均粒径为 116.8 nm。重建后脂质体溶液的 Zeta电位为 -15.9 mV。

3　nobiliside A冻干脂质体含量测定方法的建立

3.1　溶液制备

3.1.1　对照品溶液　精密称取 nobiliside A对照品 15.00 mg 置于 10 mL量瓶中, 加 50%甲醇定容至刻度, 作为储备液。再取储备液 160 μL于 5 mL量瓶中, 加 50%甲醇至刻度, 即得对照品溶液。

3.1.2　供试品溶液　精密吸取重建后的 nobiliside A冻干脂质体 200 μL于 2 mL量瓶中, 加入甲醇和异丙醇的混合液(7∶3, V/V)破乳并稀释至刻度, 摇匀, 16000 r·min^{-1}离心 5 min, 取上清液作为供试品溶液。

3.1.3　空白溶液　精密吸取重建后的空白冻干脂

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

质体 200 μL于 2 mL量瓶中, 加入甲醇和异丙醇的混合液 (7∶3, V/V) 破乳并稀释至刻度, 摇匀, 16000 r·min^{-1}离心 5 min, 取上清液作为空白溶液。

3.2 色谱条件 色谱柱: Agilent SB-C_{18}反相色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 0.5%醋酸 (B), 二元梯度洗脱: 28% B→20% B (0~5 min), 20% B→2% B (5~12 min), 2% B→0% B (12~25 min); 平衡时间 5 min, 流速 1 mL·min^{-1}; 柱温: 室温; 检测器为蒸发光散射检测器; 漂移管温度: 80 ℃; 空气流量: 2.0 L·min^{-1}; 撞击器: 关; 进样量: 20 μL。

3.3 方法的专属性考察 在上述色谱条件下, 分别取"3.1"项下的对照品溶液、供试品溶液、空白溶液各 20 μL注入液相色谱仪, 记录色谱图 (图 3)。由图可见在此色谱条件下, 辅料和试剂对药物测定无干扰, nobiliside A 峰的保留时间约为 7.6 min。

3.4 线性关系考察 精密量取"3.1.1"项中的储备液 20, 40, 80, 160, 240, 320 μL, 置于 5 mL量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度。精密吸取上述 6个不同浓度的对照品溶液各 20 μL, 进样, 测定峰面积。以对照品峰面积的自然对数 (lnY) 对进样量的自然对数 (lnX) 进行线性回归, 回归方程为:

$$\ln Y = \ln X \times 0.7281 - 0.8246 \quad r = 0.9993$$

线性范围为 0.120~1.92 μg。

3.5 精密度试验 按"3.4"项方法配制 nobiliside A 对照品溶液 6.00, 48.00, 96.00 μg·mL^{-1}低、中、高 3种浓度, 各精密吸取 20 μL, 重复进样 6次, 记录色谱峰峰面积, 结果低、中、高浓度对照品溶液的峰面积的 RSD (n = 6) 分别为 2.8%, 1.3%, 0.49%。说明日内精密度良好。精密吸取上述低、中、高浓度对照品各 20 μL于第 1, 2, 3 d进样, 根据峰面积计算日间精密度, 结果低、中、高浓度对照品溶液的峰面积的 RSD (n = 6) 分别为 1.2%, 1.6%, 1.5%。说明日间精密度良好。

3.6 回收率试验 取蒸馏水重建后的空白冻干脂质体 200 μL于 2 mL量瓶中, 分别加入不同量的对照品储备液, 各加入甲醇和异丙醇的混合液破乳并稀释至刻度, 得浓度分别为 6.00, 48.00, 96.00 μg·mL^{-1}的 nobiliside A 溶液, 制备上述溶液各 3份, 按"3.2"项色谱条件测定峰面积, 代入回归方程换算成浓度, 计算回收率 (回收率 = 测定浓度/配制浓度 ×100%), 结果见表 1。平均回收率为 99.12% (n = 9)。

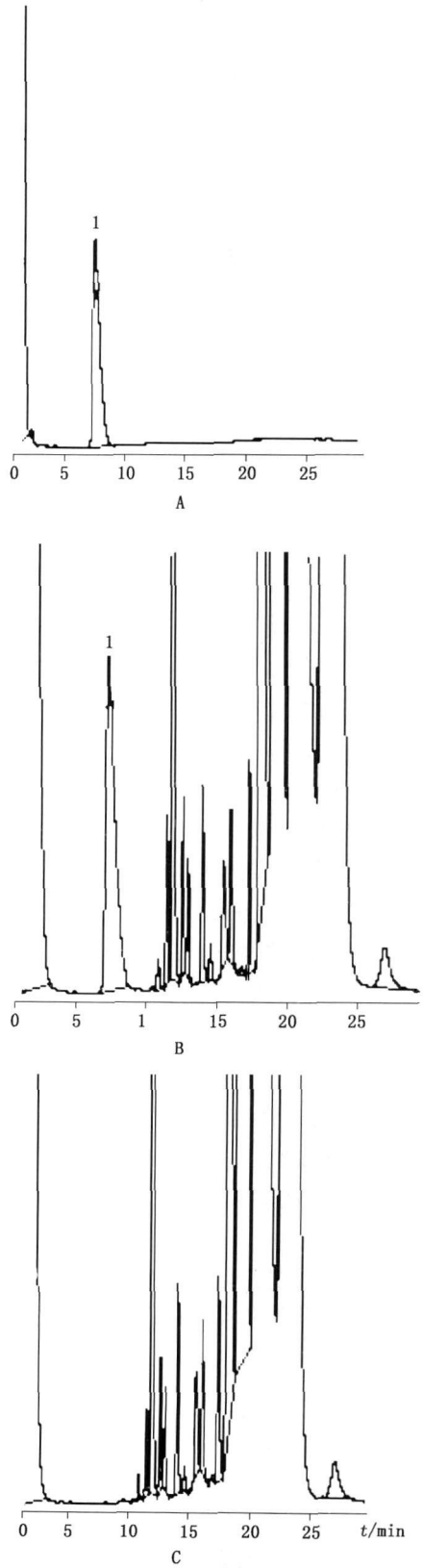

图 3 nobiliside A 对照品溶液 (A)、nobiliside A 脂质体 (B)、空白脂质体 (C) 的色谱图

Fig 3 The chromatograms of nobiliside A solution (A), nobiliside A liposome (B) and blank liposome (C)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　样品的回收率 (n = 3)

Tab 1　Recovery determination of nobiliside A liposome

加入量 (added) /μg·mL⁻¹	测定结果 (found) /μg·mL⁻¹	回收率 (recovery) /%	RSD /%
6.00	6.03	100.5	1.3
48.00	47.94	99.87	1.9
96.00	95.40	99.38	1.5

3.7　含量测定　精密吸取 3批用蒸馏水重建后的 nobiliside A冻干脂质体 200 μL于 2 mL量瓶中, 加入甲醇和异丙醇的混合液破乳并稀释至刻度, 摇匀, 16000 r·min^{-1}离心 5 min, 取上清液作为供试品溶液, 进样 20 μL, 测定含量, 按外标法计算出样品中 nobiliside A的含量。结果 3批冻干脂质体中 nobiliside A 的平均含量 (n = 3) 分别为 0.491, 0.494, 0.501 mg·mL^{-1}, RSD分别为 1.3%, 1.5%, 1.0%。

3.8　稳定性试验　取同一批次的 nobiliside A冻干脂质体的含量测定项下供试品溶液, 分别于室温放置 0, 2, 4, 6, 8 h按照"3.2"项下方法进样测定, 结果 5次测定的含量的 RSD (n = 5) 为 2.0%, 说明供试品溶液在 8 h内稳定。

3.9　重复性试验　取同一批制备的 nobiliside A冻干脂质体 6份, 用蒸馏水重建后, 精密吸取 200 μL置于 2 mL量瓶中, 加入甲醇和异丙醇的混合液破乳并稀释至刻度, 摇匀, 16000 r·min^{-1}离心 5 min, 取上清液进样 20 μL, 测定含量, 结果 RSD (n = 6) 为 2.4%。

4　nobiliside A冻干脂质体含量测定方法的建立

4.1　微型柱的制备　取 1 mL注射针筒, 底部放一略小于其内径的圆形滤纸, 加入用蒸馏水溶胀的 Sephadex G-50凝胶。将装好的注射器放入离心管内 2000 r·min^{-1}离心 3 min, 除去多余的蒸馏水, 备用。

4.2　洗脱曲线的考察　精密吸取 nobiliside A药物水溶液和空白脂质体各 0.1 mL, 分别缓缓加于 2个微柱的顶部 (注意勿滴入柱床边缘), 500 r·min^{-1}离心 3 min, 使 nobiliside A和空白脂质体分别进入凝胶柱中。由柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 每次 2000 r·min^{-1}离心 5 min, 收集洗脱液, 再于柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 重复以上操作, 收集每次的洗脱液。每管空白脂质体洗脱液用异丙醇破乳定容至 2 mL, 以异丙醇和水混合液空白溶剂于 278 nm处测定吸收度; 每管药物洗脱液按照"3.2"项下方法进样测定。根据每管空白脂质体的吸收度或药物浓度制备洗脱曲线。其中 1~5管洗脱液为空白脂质体混悬液, 6~16管洗脱液为游离 nobiliside A溶液。结果表明药物和脂质体能够完全分开。

4.3　药物柱回收率试验　精密量取已知含量的游离 nobiliside A水溶液 0.1 mL, 缓缓加于柱顶部 (注意勿滴入柱床边缘), 500 r·min^{-1}离心 3 min, 使 nobiliside A进入凝胶柱中。由柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 2000 r·min^{-1}离心 5 min, 收集洗脱液, 再于柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 重复以上操作, 收集第 6管到第 16管的洗脱液用甲醇定容到 2 mL后, 采用 HPLC-ELSD法测定药物的含量。精密量取已知含量药物水溶液 0.1 mL用甲醇定容到 2 mL后, 采用 HPLC-ELSD法测定药物的含量。计算药物的柱回收率, 结果药物的平均柱回收率为 97.34% (n = 3), 基本达到要求。

4.4　空白脂质体柱回收率试验　精密量取空白脂质体溶液 0.1 mL, 缓缓加于柱顶部 (注意勿滴入柱床边缘), 500 r·min^{-1}离心 3 min, 使空白脂质体进入凝胶柱中。由柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 2000 r·min^{-1}离心 5 min, 收集洗脱液, 再于柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 重复以上操作, 收集前 0.5 mL洗脱液用异丙醇破乳定容到 2 mL后, 摇匀, 以异丙醇-水体积比为 3∶1的溶液为空白溶剂在 278 nm处测定吸收度。精密量取空白脂质体混悬液 0.1 mL, 加入 0.4 mL蒸馏水后用异丙醇定容至 2 mL, 摇匀, 同样以异丙醇-水体积比为 3∶1的溶液为空白溶剂在 278 nm处测定分别测定吸收度, 计算空白脂质体回收率。空白脂质体柱回收率 = 上柱后吸收度 /上柱前吸收度 × 100%。结果平均回收率为 96.34% (n = 3), 表明空白脂质体的柱回收率基本达到要求。

4.5　样品包封率的测定　精密吸取用蒸馏水重建后的 nobiliside A冻干脂质体混悬液 0.1 mL, 缓缓加于柱顶部, 500 r·min^{-1}离心 3 min。由柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 2000 r·min^{-1}离心 5 min, 收集洗脱液, 再于柱顶部加入相同体积的蒸馏水, 重复以上操作, 合并前 0.5 mL洗脱液, 用异丙醇稀释至 2 mL, 摇匀。按"3.2"项下的色谱条件进样, 测定峰面积, 代入标准曲线计算 nobiliside A的含量; 另精密吸取重建后 nobiliside A冻干脂质体混悬液 0.1 mL, 用异丙醇破乳定容至 2 mL, 摇匀。精密吸取溶液 20 μL, 同法测定, 计算包封率。测定结果见表 2。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 nobiliside A脂质体包封率测定结果($n=3$)

Tab 2 The entrapment efficiency of nobiliside A liposome among three batches

批号(Lot No.)	EE/%	RSD/%
070714	96.8	0.76
070715	96.2	1.4
070716	95.4	0.92

5 讨论

5.1 nobiliside A是一种三萜皂苷成分,紫外扫描图谱可以看出其没有明显的紫外吸收,所以不宜用UV检测。而ELSD检测器为质量通用型检测器,可检测任何挥发性低于流动相的化合物,同时灵敏度和稳定性亦能符合含量测定的要求,是分析无紫外吸收类成分的有力工具。作者首次建立了nobiliside A冻干脂质体含量和包封率测定的HPLC-ELSD方法。通过筛选流动相组成、调节不同时间流动相的比例,使nobiliside A峰在7.6 min左右出峰,使其避开了溶剂峰以及脂质体中磷脂和胆固醇峰的干扰;流动相中不同有机相和有机相不同时间的比例对nobiliside A的分离影响较大,经多次试验比较,以本文所用的比例较佳。

5.2 在配制包封率测定的供试品溶液时,考察了单纯使用甲醇破乳、加入曲拉通等表面活性剂破乳以及异丙醇破乳。单纯选用甲醇作为破乳剂时,由于在微柱离心法测定包封率时脂质体被稀释,破乳不完全;加入曲拉通等表面活性剂作为破乳剂对nobiliside A检测有干扰;用异丙醇作为破乳剂,破乳完全且对nobiliside A的测定没有影响。

5.3 脂质体包封率的测定方法有很多,如葡聚糖柱层析法、微柱离心法、透析法、超速离心法[4]等。作者曾试用过葡聚糖凝胶柱过滤法、透析法分离脂质体和游离药物,均可达到分离的效果,但是微柱离心法更为简便、快速,同时重现性较好,适合于nobiliside A冻干脂质体包封率的测定。从而为nobiliside A冻干脂质体处方工艺筛选和质量控制奠定了基础。

参考文献

1 YI Yang-hua(易杨华), WU Jun(巫军), LIU Bao-shu(刘宝姝), *et al*. An antitumor compound nobiliside A in Holothuria nobilis Selenka and its monoacetylated derivatives (黑乳海参中抗肿瘤化合物nobiliside A及其单乙酰化衍生物). Chinese Patent(中国专利), Appl. No.(申请号): 200510029586.5

2 Lopez-Berestein, Gabriel(Houston, TX), Fainstein, *et al*. Composition and method for treatment of disseminated fungal infections in mammals. *United States Patent, Appl*. 2007(2): 455

3 Portney NG, Ozkan M. Nano-oncology: drug delivery, imaging and sensing. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384, 620.

4 CUI Fu-de(崔福德). Pharmaceutics(药剂学). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2002. 501

(本文于2008年1月31日收到)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net