

# 醋酸曲安奈德固脂纳米粒载药量及包封率的反相液相色谱法测定

刘 卫, 朱姚亮, 陈华兵, 杨祥良

(华中科技大学 生命科学与技术学院 药物研究所, 湖北 武汉 430074)

**摘 要:** 建立了醋酸曲安奈德固脂纳米粒载药量及包封率测定的反相高效液相色谱法; 采用 Hypersil ODS 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水-乙醚(体积比 68:32:4)为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 紫外检测波长 240 nm, 柱温 30℃, 进样量为 20 μL, 炔诺酮作内标; 通过调节纳米粒表面 Zeta 电位使纳米粒凝聚, 离心分离游离药物和纳米粒; 该方法结果准确、简便、重复性好, 可用于醋酸曲安奈德固脂纳米粒包封率及载药量的测定。

**关键词:** 反相高效液相色谱法; 醋酸曲安奈德; 固脂纳米粒; 包封率; 载药量

**中图分类号:** O657.72; R943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2005)02-0035-03

## RP- HPLC Determination of Entrapment Efficiency and Drug Loading of Triamcinolone Acetonide Acetate Solid Lipid Nanoparticles

LIU Wei, ZHU Yao-liang, CHEN Hua-bing, YANG Xiang-liang

(Institute of Materia Medica, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** A method for determining entrapment efficiency and drug loading of triamcinolone acetonide acetate solid lipid nanoparticles was developed with the use of reversed phase high performance chromatography (RP- HPLC). The separation was performed with a Hypersil ODS column(250 mm ×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol - water - ether(62:38:4 by volume), column temperature of 30℃, and a flow rate of 1.0 mL/min. UV detection wavelength was 240 nm, and an internal standard method was used. The free drug and nanoparticles were separated by adjusting the Zeta potential and centrifugation method. The method was accurate, convenient, and reproducible, and was suitable for determination of entrapment efficiency and drug loading of triamcinolone acetonide acetate solid lipid nanoparticles.

**Key words:** RP- HPLC; Triamcinolone acetonide acetate; Solid lipid nanoparticle; Entrapment efficiency; Drug loading

固脂纳米粒(solid lipid nanoparticles)是具有良好应用前景的靶向-控释给药系统<sup>[1]</sup>, 它是以天然或合成的高熔点固体脂质为骨架材料制成粒径为 10~1000 nm 的固态胶粒体系。药物可包裹或溶解在纳米粒内部, 也可吸附或耦合在其表面, 固脂纳米粒骨架材料在体内可以降解、生物相容性好。该给药系统既有聚合物纳米粒物理稳定性高、药物泄漏慢、控制药物的释放、良好的靶向性等特点, 也有脂质体毒性低、可实现工业化规模生产的优点, 近年来研究十分活跃。国内开展了将固脂纳米粒作为脂溶性药物载体的研究工作<sup>[2-4]</sup>。

醋酸曲安奈德(triamcinolone acetonide acetate, TAA), 又名醋酸曲安缩松<sup>[5]</sup>, 是人工合成的含氟的中长效肾上腺糖皮质激素, 化学名称为 16β,17-[(1-甲基亚乙基)双(氧)]-11β,21-二羟基-9-氟孕甾-1,4-二烯-3,20-二酮 21-醋酸酯。该药物具有强而持久的抗炎和抗变态反应作用, 临床多用于局部给药, 对骨关节炎、腱鞘炎以及急性肌肉损伤等有消炎、止痛作用, 还可用于多种皮肤病的治疗以及变态反应性疾病(过敏性鼻炎、支气管哮喘)的治疗。有关 TAA 固脂纳米粒及其分析方法的研究尚未见文献报道。本文采用高压乳匀法制备了 TAA 固脂纳米粒, 应用反相高效液相色谱法, 通过调节纳米粒表面 Zeta 电位, 离心分离游离药物和纳米粒, 确立了一种准确、简便、重复性好的测定固脂纳米粒载药量及包封率的方法, 为 TAA 固脂纳米粒制剂的研究及应用提供依据。

收稿日期: 2004-03-02; 修回日期: 2004-11-25

作者简介: 刘 卫(1966-), 男, 湖北武汉人, 副教授, 在职博士研究生; 杨祥良, 联系人, Tel: 027-87794711, E-mail: wliu@mail.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 高效液相色谱系统: GI310A 泵, GI314A 紫外检测器, GI326-AA105 自动进样器, Agilent 色谱工作站; Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度/电势分析仪(英国 Malvern 仪器公司); Labconco 6L 冷冻干燥系统(美国 Labconco 公司); HERMLE Z323K 型全自动高速冷冻离心机(德国 Hermle Labortechnik 公司); RE-52 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); 膜过滤器及微孔滤膜(上海兴亚材料厂)。

TAA 原料药(天津药业有限公司, 批号 TAAC030802, 含量 98.6%), TAA 对照品(中国药品生物制品检定所), 炔诺酮(中国药品生物制品检定所), TAA 固脂纳米粒(自制), 甲醇为色谱纯, 乙醚为分析纯, 纯化蒸馏水(二次蒸馏后经 0.45  $\mu\text{m}$  膜过滤), 其它试剂均为分析纯。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 甲醇-水-乙醚(体积比 68:32:4) 为流动相, 紫外检测波长 240 nm, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 流速 1.0 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ , 进样量为 20  $\mu\text{L}$ , 内标法定量。

### 1.3 对照品及内标溶液的配制

精密称取 TAA 对照品 12.0 mg、内标物炔诺酮 15.0 mg, 分别用甲醇定容于 100 mL 容量瓶中, 得到 TAA(120 mg  $\cdot$  L $^{-1}$ ) 和炔诺酮(150 mg  $\cdot$  L $^{-1}$ ) 的贮备液, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱避光保存。

### 1.4 固脂纳米粒的制备方法

激光粒度/电势分析仪测定结果显示, 本工作采用高压乳匀法制备的 TAA 固脂纳米粒的平均粒径为 107~253 nm(多分散系数 PI: 0.152~0.305), 表面 Zeta 电位为 -30~-63 mV。将空白固脂纳米粒溶液和相应的 TAA 固脂纳米粒混悬液置于培养皿中, 控制冷冻干燥条件(-75  $^{\circ}\text{C}$ 、72 h) 于冷冻干燥系统中冻干, 得到固脂纳米粒粉末, 充 N $_2$  气密封保存备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱的专一性评价

根据 TAA 对照品及 TAA 固脂纳米粒色谱图(见图 1), 可知内标物峰与药物峰分离良好, 分离度  $>4$ , 固脂纳米粒辅料对药物 TAA 的测定无干扰, 色谱的专一性良好。

### 2.2 线性范围及回归方程

分别精密吸取 TAA 对照品贮备液 0.025、0.05、0.10、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0 mL 和内标物贮备液 0.40 mL, 以流动相定容至 10 mL, 摇匀, 得 TAA 质量浓度为 0.3、0.6、1.2、3.0、6.0、12.0、24.0、48.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  及内标物质量浓度为 6.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的一系列溶液。分别进样 20  $\mu\text{L}$  进行色谱分析, 以峰面积比为横坐标, 对照品与内标物质量比为纵坐标进行线性回归, 得回归方程:  $Y=0.1767 X+0.02124$ (相关系数  $r=0.9955$ ,  $n=5$ ),  $Y$  与  $X$  之间线性关系良好, 线性范围为 0.3~48.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。其中  $X$  为色谱峰面积,  $Y$  为对照品与内标物质量比。

### 2.3 精密度试验

取上述质量浓度为 0.3、0.6、1.2、3.0、6.0、12.0、24.0、48.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的醋酸曲安奈德对照品溶液, 每个样品 1 d 内重复进样 5 次, 测定其含量, 计算日内 RSD 分别为 0.13%~1.37%。样品在 7 d 内连续每天测定其含量, 计算日间 RSD 分别为 0.50%~5.95%。

### 2.4 加标回收试验

精密量取 TAA 对照品贮备液 0.05、0.50、4.0 mL 及内标溶液 0.40 mL 置于 10 mL 容量瓶中; 取冻干

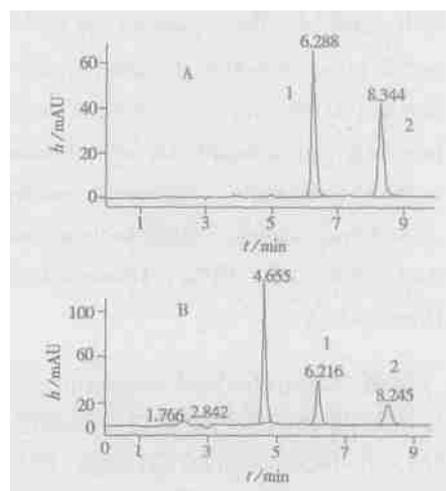


图 1 对照品(A)和 TAA 固脂纳米粒样品(B)的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of chemical reference substance(A) and sample(B)

1. 炔诺酮(norethisterone); 2. 醋酸曲安奈德(TAA)

的空白固脂纳米粒粉末用甲醇溶解, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 得续滤液; 用该滤液将上述样品定容至刻度, 进行色谱分析, 测定峰面积, 连续 5 次, 计算加标回收率见表 1。

## 2.5 TAA 固脂纳米粒载药量及包封率的测定

精密称取 TAA 固脂纳米粒冻干粉末适量于 10 mL 的容量瓶中, 以纯化蒸馏水水合恢复至冻干前的浓度, 精吸该溶液 2 mL 至小烧杯中, 微热蒸发溶剂至干, 加入甲醇分散溶解完全, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 转入到 10 mL 容量瓶中并用流动相定容至刻度, 摇匀即得样品溶液, 进样 20  $\mu\text{L}$  进行色谱分析, 测定固脂纳米粒中药物总质量  $m_{\text{药}}$ 。另精密称取等量的 TAA 固脂纳米粒冻干粉末, 纯化蒸馏水水合, 以 0.1 mol  $\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液调节水分散液的 pH 2.5, 使纳米粒凝聚, 离心分离纳米粒(离心条件: 4、12 000 r/min、15 min), 纯化蒸馏水洗涤纳米粒 2 次, 离心分离, 上清液合并定容, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 续滤液进样 20  $\mu\text{L}$  进行色谱分析, 测定游离药物的质量  $m_{\text{游}}$ 。

经换算后按下式计算载药量(DL%)和包封率(EE%):

$$\text{DL} \% (\text{载药量}) = (m_{\text{药}} - m_{\text{游}}) / m_{\text{总}} \times 100 \%$$

$$\text{EE} \% (\text{包封率}) = (m_{\text{药}} - m_{\text{游}}) / m_{\text{药}} \times 100 \%;$$

式中,  $m_{\text{总}}$ : 固脂纳米粒的总质量。

测定不同批号 TAA 固脂纳米粒的载药量和包封率结果见表 2。

## 2.6 讨论

采用超速离心-紫外分光光度法测定固脂纳米粒药物含量及包封率, 用低温高速离心法分离游离药物与纳米粒, 由于固脂纳米粒脂质密度低, 纳米粒粒径小(95% 粒子粒径低于 200 nm), 经 40 000 r/min、4 离心 1 h 后上清液中仍有固脂纳米粒, 没有沉淀的纳米粒使吸收产生较大波动, 对测定结果产生影响; 而且通过紫外扫描图谱发现上清液中水溶性较好的辅料对 TAA 的紫外吸收有干扰。

根据文献采用葡聚糖(Sephadex G-50)凝胶柱层析法测定固脂纳米粒药物含量及包封率<sup>[6]</sup>, 发现游离药物和纳米粒的分离不好, 曾尝试在同一体系中用不同的洗脱液, 效果也不理想。TAA 不溶于水, 存在柱壁吸附现象, 每过一个样品需要洗柱, 操作繁琐, 耗时。

纳米粒表面 Zeta 电位被用来评价纳米粒分散体系的稳定性<sup>[7]</sup>, 具有较高表面 Zeta 电位的纳米粒分散体系由于电性排斥作用粒子间不会发生聚集, 体系保持稳定; 当体系的 Zeta 电位降低到接近于零时, 弱的电性排斥力导致纳米粒相互聚集, 体系稳定性被破坏。我们利用这一原理通过改变体系酸性条件(pH)调节纳米粒的 Zeta 电位, 使固脂纳米粒在水分散液中凝聚, 结合低温高速离心技术, 达到与游离药物的完全分离。经实验测定纳米粒水分散液体系 pH 2.5 时粒子 Zeta 电位趋近于零, 此时固脂纳米粒在水分散液中发生凝聚, 这时只需要较低的离心速率(12 000 r/min)和较短的离心时间(15 min)就可将纳米粒从水分散液体系分离出来。

参考文献:

- [1] MEHNERT W, MADER K [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(2/3): 165 - 196.
- [2] YANG S C, ZHU J B. [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28(3): 265 - 274.
- [3] MEI Z N, CHANG H B, WENG T, *et al.* [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 56(2): 189 - 196.
- [4] HOU D Z, XIE C S, HUANG K J, *et al.* [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 1781 - 1785.
- [5] China Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia Vol.* [M]. Beijing: Chemical Industry Press(中国药典委员会. 中国药典(二部) [M]. 北京: 化学工业出版社), 2000. 1021 - 1022.
- [6] LU Bing. *New Techniques and New Dosage Forms of Drugs* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House(陆彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社), 1998. 121.
- [7] HEURTAUL B, SAULNIER P, PECH B, *et al.* [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 4283 - 4300.

表 1 加标回收率实验结果 (n = 5)

Table 1 Results of recovery tests (n = 5)

Added $A/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Found $F/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Average recovery $R/ \%$	RSD $s/ \%$
0.6	0.63	105.0	1.57
6.0	5.84	97.3	1.09
48.0	48.11	100.2	0.56

表 2 纳米粒药物含量及包封率测定结果 (n = 3)

Table 2 Results of entrapment efficiency and drug loading of nanoparticles (n = 3)

Lot No.	Entrapment efficiency	Drug loading
	EE/ % ( $\bar{x} \pm s$ )	DL/ % ( $\bar{x} \pm s$ )
03110703	46.61 $\pm$ 0.82	0.86 $\pm$ 0.07
03111607	60.33 $\pm$ 1.07	1.21 $\pm$ 0.10
03112312	53.59 $\pm$ 2.21	0.93 $\pm$ 0.18
04010502	65.82 $\pm$ 1.63	1.97 $\pm$ 0.09
04010703	74.27 $\pm$ 0.94	1.35 $\pm$ 0.14
04011505	50.36 $\pm$ 1.33	1.12 $\pm$ 0.06