

# HPLC法测定冬凌草甲素纳米脂质载体药物的含量及包封率\*

代文婷, 张典瑞\*\*, 郭晨煜, 段存贤, 魏玉芝

(山东大学药学院药物制剂研究所, 济南 250012)

**摘要** 目的: 建立冬凌草甲素纳米脂质载体药物含量及包封率测定的高效液相色谱法。方法: Kromasil C<sub>18</sub>柱 (4.60 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (52:48); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 242 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 25 °C。建立超滤离心法测定冬凌草甲素纳米脂质载体的包封率。结果: 在此色谱条件下冬凌草甲素与辅料及溶剂峰均得到良好分离, 冬凌草甲素在 1.0~100 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度范围内线性关系良好 ( $r=0.9998$   $n=7$ ), 冬凌草甲素纳米脂质载体的包封率为 (68.2 ± 0.60)%。结论: 该方法准确可靠、简单快速, 可用于冬凌草甲素纳米脂质载体药物含量及包封率的测定。

**关键词:** 冬凌草甲素; 含量测定; 包封率; 高效液相色谱法; 超滤离心法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0587-04

## HPLC determination of content and entrapment efficiency of oridonin nanostructured lipid carriers\*

DAIWENTING, ZHANG DIANRUI\*\*, GUO CHENYU, DUAN CUNXIAN, WEI YUZHIZHI

(Pharmaceutical Institute, College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract Objectives** To establish HPLC method to determine the drug content and entrapment efficiency of oridonin nanostructured lipid carriers. **Methods** Using methanol-water (52:48) as mobile phase, the separation was performed on a Kromasil C<sub>18</sub> column (4.60 mm × 150 mm, 5 μm) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 242 nm and the column temperature was 25 °C. **Results** Regression analysis of peak area against oridonin concentration showed good straight line fit over the range examined 1.0–100 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9998$   $n=7$ ). The entrapment efficiency of oridonin nanostructured lipid carriers was (68.2 ± 0.60)%. **Conclusions** This method was proved to be simple, accurate, sensitive and applicable for determination of drug content and entrapment efficiency of oridonin nanostructured lipid carriers.

**Key words** oridonin; content determination; entrapment efficiency; HPLC; ultrafiltration

冬凌草甲素 (oridonin, ORI) 是从唇形科香茶菜属植物中分离出的一种贝壳杉烯二萜类天然有机化合物, 该成分具有较强的抗肿瘤活性, 对多种移植性肿瘤有效, 临床上主要用于肝癌、食管癌、胰腺癌等的治疗<sup>[1]</sup>。冬凌草甲素几乎不溶于水, 口服后血药浓度较低, 肿瘤细胞周围的冬凌草甲素浓度更低, 很难达到有效治疗浓度, 从而影响冬凌草甲素的抗癌效果, 进而限制了其在临床上的应用。因此, 如何增大冬凌草甲素的水溶性和靶向性是提高冬凌草甲素疗效的关键。

包封率是评价纳米脂质载体质量的重要指标, 也是其发挥疗效的关键。为了评价冬凌草甲素纳米

脂质载体的质量, 作者建立了 HPLC 法测定冬凌草甲素纳米脂质体的药物含量以及超滤离心法<sup>[2,3]</sup> HPLC 测定冬凌草甲素纳米脂质载体的包封率, 主成分峰与辅料峰及溶剂峰均得到良好分离, 从而排除辅料对测定的干扰, 具有灵敏度高、专属性好、方便快捷的特点。

### 1 仪器与试剂

ER-182A 型电子天平 (日本); Amicon Ultra-4 离心超滤管 (Millipore); TGL-16G-A 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂); 8200HP 型超声仪 (上海科导超声仪器有限公司, 频率: 59 kHz, 功率: Max-450 W); Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美

\* 国家自然科学基金资助项目 (30472130)

\*\* 通讯作者: Tel: (0531) 88382015 E-mail: zhang\_dr2006@yahoo.com.cn

国 Agilent 公司)。

冬凌草甲素原料药(含量 98.17%, 陕西旭煌植物科技发展有限公司, 批号 XHO 070315); 冬凌草甲素纳米脂质载体(规格:  $0.40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )及空白纳米脂质载体(自制); 娃哈哈 h<sub>4</sub>纯净水; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

## 2 实验方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub>柱(4.60 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(52:48); 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长: 242 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 25 °C。

**2.2 标准曲线的绘制** 精密称取 ORI 对照品 20 mg 置于 100 mL 量瓶中, 加甲醇使之溶解, 并定容至刻度, 制成浓度为  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品储备液。分别精密量取对照品储备液 0.05, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL, 分置 7 只 10 mL 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 摇匀, 得浓度为 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的系列溶液, 分别取 20 μL 进样测定。以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归, 得到冬凌草甲素的回归方程为( $n=7$ ):

$$A = 21.529 C - 7.3195 \quad r = 0.9998$$

结果表明 ORI 在  $1.00 \sim 100.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内冬凌草甲素的峰面积和浓度呈良好的线性关系。

### 2.3 专属性试验

**2.3.1 对照品溶液的制备** 精密量取冬凌草甲素对照品储备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 得浓度为  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的冬凌草甲素对照品溶液。

**2.3.2 供试品溶液的制备** 精密量取冬凌草甲素纳米脂质载体溶液 1.0 mL 于 10 mL 的量瓶中, 加入 1 mL DMF 破乳, 超声 10 min, 用流动相定容至 10 mL,  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 上清液经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤后即得冬凌草甲素纳米脂质载体破乳液。

### 2.3.3 空白纳米脂质载体溶液的制备

精密量取空白纳米脂质载体溶液 1.0 mL, 按“2.3.2”项下方法操作, 即得空白纳米脂质载体破乳液。

取冬凌草甲素对照品溶液、空白纳米脂质载体破乳液和冬凌草甲素纳米脂质载体破乳液各 20 μL 进样, 色谱图见图 1。

由色谱峰可见辅料峰与冬凌草甲素峰分离良好, 辅料对冬凌草甲素测定无干扰, 方法专属性强, 冬凌草甲素色谱峰的保留时间约为 6.9 min。

### 2.4 精密度试验

精密配制低、中、高 3 种浓度(1,

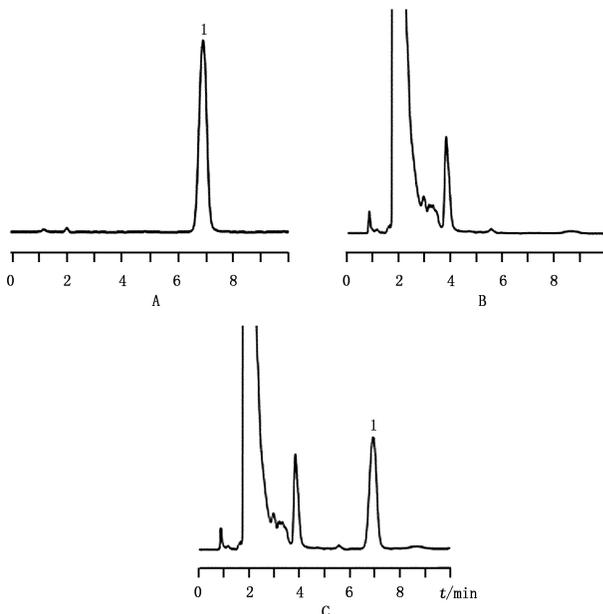


图 1 冬凌草甲素对照品(A)、空白纳米脂质载体(B)、冬凌草甲素纳米脂质载体(C)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of oridonin reference substance(A), blank nanostructured lipid carriers(B) and oridonin-loaded nanostructured lipid carriers(C)

1. 冬凌草甲素(oridonin)

$50, 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的冬凌草甲素对照品溶液各 5 份, 在“2.1”条件下分别进样 20 μL, 分别于 1 d 内测定 5 次, 连续测定 5 d 记录峰面积, 并计算日内和日间精密度。由测定结果可知, 3 种浓度对照品溶液的日内 RSD 分别为 1.6%, 0.54%, 0.72% ( $n=5$ ), 日间 RSD 分别为 1.3%, 0.40%, 0.71% ( $n=25$ )。结果表明该方法精密度良好。

**2.5 重复性试验** 取同一批样品, 按照“2.3.2”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 在“2.1”条件下分别进样 20 μL, 记录峰面积积分值, 计算含量, 结果冬凌草甲素含量为  $0.3975 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其 RSD 为 0.83% ( $n=6$ )。结果表明该方法重复性良好。

**2.6 回收率试验** 精密称取冬凌草甲素对照品适量于 10 mL 量瓶中, 加入空白纳米脂质载体适量配成浓度为 10, 50, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 各 5 份。精密量取上述各溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加入 DMF 1 mL 破乳, 超声 10 min, 用流动相定容至 10 mL, 分别配制成浓度为 1, 50, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的供试液,  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 上清液经  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤后取续滤液 20 μL 进样测定冬凌草甲素含量。计算冬凌草甲素的方法回收率。结果显示低、中、高 3 种浓度的平均回收率分别为 99.4%, 100.1%, 99.8%; RSD 分别为 1.1%, 0.78%,

0.44% ( $n = 5$ )。

**2.7 加样回收率试验** 按“2.6”项下方法测定冬凌草甲素含量 I。同时取同批次相应量的冬凌草甲素纳米脂质载体按“2.6”项下方法中“取 1 mL……进样 20  $\mu\text{L}$ ”测定冬凌草甲素含量 II。将冬凌草甲素含量 I 减去冬凌草甲素含量 II, 即得添加的冬凌草甲素回收量。计算冬凌草甲素的方法回收率。结果显示低、中、高 3 种浓度的平均回收率分别为 100.0%, 100.2%, 100.0%; RSD 分别为 1.6%, 0.31%, 0.24% ( $n = 5$ )。

### 2.8 含量测定

精密量取冬凌草甲素纳米脂质载体适量 (相当于冬凌草甲素 5.0 mg) 于 25 mL 量瓶中, 用注射用水定容至刻度。精密量取该溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加入 DMF 1 mL 破乳, 超声 10 min, 用流动相定容至 10 mL, 15000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后取续滤液 20  $\mu\text{L}$  进样测定, 即为纳米脂质载体中冬凌草甲素的含量。

3 批纳米脂质体溶液样品中冬凌草甲素的含量分别为标示量的 99.16%, 99.42%, 99.23%; RSD 分别为 0.56%, 0.42%, 0.47% ( $n = 5$ )。

### 2.9 包封率测定

**2.9.1 不同截留相对分子量的冬凌草甲素透过率实验** 精密量取 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的冬凌草甲素溶液各 4 mL 置离心超滤管内管中, 分别利用截留相对分子量为 5, 10, 30 K 的超滤管进行超滤, 3000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min, 超滤液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后取 20  $\mu\text{L}$  进样, 采用高效液相法测定冬凌草甲素含量。比较不同截留相对分子量的超滤管对冬凌草甲素的透过率。结果显示截留相对分子量为 5, 10, 30 K 的超滤管的透过率分别为 98.5%, 98.6%, 98.4%; RSD 分别为 0.81%, 0.71%, 0.72% ( $n = 5$ )。

结果表明不同截留相对分子量的超滤管对冬凌草甲素的透过率没有明显的差异, 为了更好地分离纳米脂质载体与游离药物, 并考虑速度问题, 本文选择截留相对分子量为 10 K 的超滤管进行冬凌草甲素包封率的考察。

**2.9.2 冬凌草甲素膜透过率实验** 精密配制低、中、高 3 种浓度 (1, 50, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的冬凌草甲素对照品溶液各 5 份, 精密量取各溶液 4 mL 置离心超滤管 (截留相对分子量为 10 K) 内管中, 3000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min, 超滤液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后取 20  $\mu\text{L}$  进样, 采用高效液相法测定冬凌草甲素含量。结果显示低、中、高 3 种浓度的平均透过率分别为

98.7%, 98.6%, 98.6%; RSD 分别为 0.72%, 0.67%, 0.46% ( $n = 5$ )。结果表明冬凌草甲素的浓度对其膜透过率无影响。

**2.9.3 超滤回收率** 精密称取冬凌草甲素对照品适量于 10 mL 量瓶中, 加入空白纳米脂质载体适量配成浓度为 1, 50, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 各 5 份。精密量取各溶液 4 mL 置离心超滤管 (截留相对分子量为 10 K) 内管中, 3000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min, 超滤液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后取 20  $\mu\text{L}$  进样测定冬凌草甲素含量。计算冬凌草甲素的方法回收率。结果显示低、中、高 3 种浓度的平均回收率分别为 98.9%, 98.6%, 99.3%; RSD 分别为 0.42%, 0.91%, 0.62% ( $n = 5$ )。结果表明, 回收率试验中冬凌草甲素与空白纳米脂质载体不发生吸附作用, 对包封率测定基本没影响, 此法符合要求。

**2.9.4 超滤加样回收率** 按“2.9.3”项下方法进行测定冬凌草甲素含量 I。同时取同批次相应量的冬凌草甲素纳米脂质载体按“2.9.3”项下方法中“取 4 mL……进样 20  $\mu\text{L}$ ”测定冬凌草甲素含量 II。将冬凌草甲素含量 I 减去冬凌草甲素含量 II, 即得添加的冬凌草甲素回收量。计算冬凌草甲素的方法回收率。结果显示低、中、高 3 种浓度的平均回收率分别为 98.9%, 98.7%, 99.2%; RSD 分别为 0.75%, 0.97%, 0.88%。结果表明, 加样回收率试验中冬凌草甲素与冬凌草甲素纳米脂质载体不发生吸附作用, 其对包封率测定基本没影响, 此法符合要求。

**2.9.5 包封率的测定** 精密量取纳米脂质载体乳液 4 mL 置离心超滤管 (截留相对分子量为 10 K) 内管中, 3000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min, 然后取超滤液 1.0 mL, 用流动相定容至 10 mL, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后取续滤液 20  $\mu\text{L}$  进样, 采用高效液相法测定, 得游离的冬凌草甲素含量, 即  $W_{\text{free}}$ 。另取纳米脂质载体乳液 1.0 mL, 加入 DMF 1.0 mL 破乳, 超声 10 min, 用流动相定容至 10 mL, 15000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min, 上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后取续滤液 20  $\mu\text{L}$  进样测定, 得 ORI-NLC 的总含药量, 即  $W_{\text{total}}$ 。

$$EE = \frac{W_{\text{total}} - W_{\text{free}}}{W_{\text{total}}} \times 100\%$$

$$DL = \frac{W_{\text{total}} - W_{\text{free}}}{W_{\text{lipid}}} \times 100\%$$

式中,  $W_{\text{total}}$  - 系统中的总药量;  $W_{\text{free}}$  - 介质中未包封的游离药物量;  $W_{\text{lipid}}$  - 纳米脂质载体中脂质总重量;  $EE$  - 包封率;  $DL$  - 载药量。

测得 3 批样品的包封率分别为 68.8%, 68.3%, 67.7%; 载药量分别为 4.8%, 5.0%, 4.8%。

### 3 讨论

包封率的测定方法有凝胶过滤法、透析法、冷冻超速离心法、超滤离心法等。但凝胶过滤法费时费力;透析法透析过程缓慢,样品被稀释,容易造成药物的泄露且比较费时;冷冻超速离心法由于其巨大的离心力容易造成部分亚微粒破碎,被包封或吸附的药物进入上清液和小粒径的亚微粒没有完全沉淀下来。本文曾尝试通过冷冻超速离心法测定药物的包封率,但由于单硬脂酸甘油酯的密度很低,通过该方法很难将游离药物和纳米粒很好分离。超滤离心法是在离心力的作用下,利用筛分原理对大分子和小分子物质进行分离:溶剂与部分低相对分子质量溶质穿过超滤膜的孔道到达膜的另一侧,而高相对分子质量溶质或纳米粒被截留。作者通过对不同截留相对分子质量的离心超滤管进行筛选,最终选择截

留相对分子量为 10 k 的离心超滤管。该方法简单易行,重现性好,且能达到很好的分离效果,更适于生产中进行质量控制,相信会在纳米制剂包封率的测定中具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- 1 ZHANG Di-an-ru (张典瑞), REN Tian-chi (任天池). Advances in the research of oridonin (冬凌草甲素的研究进展). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38 (11): 817.
- 2 XIONG Fei (熊非), ZHU Jia-bi (朱家璧), TIAN Xu (田煦), et al. RP-HPLC Determination of Content and Entrapment Efficiency of Brevipolysaccharide Nanoliposomes (RP-HPLC 法测定灯盏花素纳米脂质体药物含量及包封率). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2004, 24(4): 364
- 3 LI Bao-qi (李宝齐), DENG Ying-jie (邓英杰), YANG Jing-wen (杨静文). Determination of entrapment efficiency of topotecan liposomes by ultrafiltration-HPLC (超滤-HPLC 法测定盐酸拓扑替康脂质体包封率). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2007, 16(1): 58

(本文于 2008 年 7 月 7 日收到)

## 关于举办第四届“全国中药材鉴定和标本管理人员培训班”的通知

各有关单位:

根据第九届(湖北武汉)、第十届(河南南阳)全国中药检验工作研讨会会议精神,为加强中药基源鉴定方面人才培养,强化中药的安全与质量控制必须从源头抓起的理念,搭建全国中药标本数字化平台,提高中药检验整体水平,由中国药品生物制品检定所主办、重庆市药品检验所承办的第四期“全国中药材鉴定和标本管理人员培训班”拟定于 2009 年 5 月 18 日至 22 日在重庆市召开。培训班旨在培养和提高中药检验、监管人员的业务素质,缓解中药材鉴定后备人才不足的现状。同时促进各药检所标本管理工作,为建立全国药检所标本资源共享平台创造条件。关于培训对象、主要内容、培训方式、时间、地点、费用与报名方式,详见中检所网站: <http://www.nicpbp.org.cn>