

见,不同剂型各特征峰高低有差异,为今后银杏叶提取物及制剂质量-工艺相关性研究提供了分析手段。

参考文献

- [1] 魏刚,方永奇,刘东辉,等.GC-MS 建立石菖蒲挥发油特征指纹图谱方法学研究[J].中国中药杂志,2004,29(8):764-768.
- [2] 蔡华,叶方,黄良永,等.超高效液相质谱联用法研究柴胡特征指纹图谱[J].中国医院药学杂志,2014,34(5):359-364.
- [3] 施菁,王伟,陈柳蓉.白花土元胡药材的高效液相色谱法指纹图谱研究[J].医药导报,2008,27(9):1108-1110.
- [4] 王桂红,张远远,肖伊,等.不同产地个青皮高效液相色谱指纹图谱研究[J].医药导报,2011,30(4):429-431.
- [5] 王京辉,杜小伟,王萌萌,等.舒血宁注射液、银杏叶提取物及银杏叶指纹图谱研究[J].药物分析杂志,2008,28(7):1026-1030.
- [6] 赵一懿,王京辉,傅欣彤,等.银杏叶药材黄酮类成分指纹图谱研究及其中 11 种黄酮苷类成分定量分析[J].中国药学杂志,2013,48(18):1583-1588.
- [7] 陆晓峰,彭国平,金灯萍.银杏叶内酯成分的指纹图谱研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(4):460-462.
- [8] 周欣,李章万,张雪琴,等.银杏叶片剂中银杏黄酮的 HPLC 指纹图谱研究[J].中国药学杂志,2005,40(2):93-95.
- [9] 王敏娟,李静,李杨,等.玄参饮片 HPLC 特征图谱研究[J].药物分析杂志,2010,30(4):657-660.
- [10] 刘东辉,杨丽娥,黄月纯,等.铁皮枫斗 HPLC 特征图谱研究[J].中国现代应用药学,2013,30(4):390-394.
- [11] 陆静娴,祝明,陈勇,等.乌灵胶囊的 HPLC 化学成分特征图谱研究[J].药物分析杂志,2011,31(4):764-767.
- [12] 杨桃,陈新,李龙,等.鄂产竹节参高效液相特征图谱的建立和分析[J].医药导报,2013,32(11):1503-1507.

微柱离心-HPLC 法测定

载左旋多巴聚乙二醇化固体脂质纳米粒的包封率*

魏曼,张宇佳,陈谕园,张楠,郑稳生

(北京协和医学院、中国医学科学院药物研究所,药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室,北京 100050)

摘要 目的 建立测定左旋多巴聚乙二醇(PEG)化固体脂质纳米粒包封率的方法,进行质量评价。方法 采用葡聚糖凝胶(Sephadex G-50)微柱离心法分离固体脂质纳米粒和游离药物;高效液相色谱(HPLC)法测定固体脂质纳米粒中左旋多巴含量,计算包封率。结果 在所建立的色谱条件下,辅料不干扰测定,左旋多巴在 10.54~527.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,高、中、低浓度加样回收率分别为 99.13%,99.51%,99.04%,RSD 分别为 1.25%,1.91%,1.71%;所建立的微柱离心条件能有效分离左旋多巴固体脂质纳米粒与游离药物。空白固体脂质纳米粒的洗脱率为 98.84%,RSD 为 0.80%($n=3$),3 种浓度游离药物的平均吸附率分别为 100.00%,98.75%,98.56%,RSD 分别为 0.00%,0.19%,0.18%($n=3$);3 种不同浓度药物和空白 PEG 化固体脂质纳米粒物理混合液的吸附率分别为 99.68%,98.46%,99.21%,RSD 分别为 1.52%,0.23%,0.21%。结论 该方法方便快捷,准确度高,重复性好,可用于测定载左旋多巴 PEG 化固体脂质纳米粒的包封率。

关键词 左旋多巴;固体脂质纳米粒;微柱离心;色谱法,高效液相;包封率

中图分类号 R972;TQ460.1

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)07-0797-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.07.019

Determination of Entrapment Efficiency of Levodopa-loaded PEGylated-Solid Lipid Nanoparticles by Mini-Column Centrifugation- HPLC

WEI Man, ZHANG Yujia, CHEN Yuyuan, ZHANG Nan, ZHENG Wensheng (Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulations of Beijing, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT Objective To establish a mini-column centrifugation-HPLC method to determine the entrapment efficiency of levodopa-loaded PEGylated-solid lipid nanoparticles. **Methods** A dextran gel (Sephadex G-50) mini-column centrifugation was employed to separate the free drug from solid lipid nanoparticles. The content of levodopa was qualified by HPLC. **Results** Under the applied chromatographic condition, the excipients had no influence on the determination of levodopa. A calibrated linear of levodopa concentration was within 10.54~527.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The recoveries of high, medium and low concentrations of levodopa were 99.13%, 99.51% and 99.04% (RSD were 1.25%, 1.91% and 1.71%), respectively. The free levodopa was well separated from solid lipid nanoparticles by using mini-column centrifugation. The addition of blank solid lipid nanoparticles recovery was

98.84% with RSD of 0.80% ($n=3$). The average adsorption rates of the three concentrations of free levodopa were 100.00%, 98.75% and 98.56% (RSD were 0.00%, 0.19% and 0.18%, $n=3$), respectively. The adsorption rate of the physical mixtures of three different concentrations of drugs and empty PEGylated solid lipid nanoparticles were 99.68%, 98.46% and 99.21% (RSD were 1.52%, 0.23% and 0.21%), respectively. **Conclusion** The method was simple, accurate and reproducible, which can be used for determination of the entrapment efficiency of levodopa-loaded PEGylated-solid lipid nanoparticles.

KEY WORDS Levodopa; Solid lipid nanoparticles; Microcolumn centrifugation; Chromatography, high performance liquid; Entrapment efficiency

目前临床主要使用的抗帕金森病药物为左旋多巴 (levodopa, L-DOPA), 其本身并无药理活性, 透过血-脑屏障进入中枢后经多巴脱羧酶分解转化为多巴胺而发挥药理作用。然而左旋多巴口服生物利用度和脑摄取率很低, 主要是因为在外周循环中被芳香族氨基酸大量水解, 临床服用左旋多巴片剂后约 2 h 血药浓度即降至有效浓度 ($0.6 \sim 24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 以下^[1-2], 常与外周脱羧酶抑制药联合给药。固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLN) 以天然或合成的固态类脂化合物为载体, 将药物包裹于类脂核中制成的固态胶粒系统, 可以提高药物稳定性, 此外还具有可控释放、靶向定位释放、毒性低等优点^[3]。聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是一种无毒、无免疫原性和抗原性的亲水性化合物, 对药物的释放无影响。载体经低分子质量 PEG 修饰后, 血浆半衰期延长。有研究显示, SLN 表面用低分子质量高密度 PEG 修饰后, 粒子疏水性和静电作用均降低。笔者以聚乙二醇化单硬脂酸为脂材, 采用复乳-溶剂挥发法制备载左旋多巴的 PEG 化 SLN (LDP-pSLN), 以期提高 LDP 的口服生物利用度, 延长其血浆半衰期同时获得平稳的血药浓度。为控制 LDP-pSLN 的质量, 采用微柱离心-HPLC 法测定其包封率, 方法简捷, 结果重复性好。

1 仪器与试药

1.1 仪器 ZNCL-BS180 磁力搅拌仪 (北京瑞威伟业仪器设备有限公司); Hitachi 高效液相色谱仪 (四元泵、在线脱气机、自动进样器、DAD 检测器, 日本日立公司); 低速离心机 (湖南湘仪实验仪器开发有限公司); 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 380ZLS 粒径仪 (美国 PSS 公司)。

1.2 试药 左旋多巴 (上海阿拉丁试剂公司, 批号:

74847335); 三硬脂酸甘油酯 (上海安谱试剂公司, 批号: X322G005); 聚乙二醇单硬脂酸酯 (上海阿拉丁试剂公司, 批号: H1503075); 胆固醇 (国药集团化学试剂公司, 批号: 20141029); 大豆卵磷脂 (国药集团化学试剂公司, 批号: 20141204); Brij S10 (上海阿拉丁试剂, 批号: G1404054); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 LDP-pSLN 的制备 采用复乳-溶剂挥发法制备 LDP-PSLN。精密称取处方量三硬脂酸甘油酯、聚乙二醇单硬脂酸酯, 75 °C 水浴融化作为油相, 将此油相、内水相 LDP 的盐酸溶液以及相同温度的大豆卵磷脂/正丁醇溶液混合, 轻度搅拌形成 W/O 微乳^[4]; 得到的微乳缓慢滴加于 400 r · min⁻¹ 搅拌下 40 °C 的 Brij S10 水溶液中, 形成 W/O/W 复乳, 挥干有机溶剂后继续搅拌至体积浓缩为原来的四分之一时, 将得到的半透明体系进行冰浴固化, 2 h 后以 300 W 的功率探头超声 10 min, 得 LDP-pSLN 悬液。

2.2 空白 PEG 化固体脂质纳米粒 (Blank-pSLN) 的制备 除以纯化水代替 LDP 盐酸溶液作为内水相外, 按“2.1”项方法制备, 即得 Blank-pSLN。

2.3 溶液的配制 Blank-pSLN 破乳液: 精密量取 Blank-pSLN 悬液 0.1 mL, 置于 10 mL 量瓶, 加无水乙醇 0.5 mL 超声 5 min 破乳, 1% 盐酸定容至刻度, 摇匀, 即得。

LDP 对照品溶液: 精密称取 LDP 10 mg, 置于 10 mL 量瓶, 1% 盐酸溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。

LDP-pSLN 破乳液: 精密量取 LDP-pSLN 悬液 0.1 mL, 置 10 mL 量瓶, 加无水乙醇 0.5 mL 超声 30 min 破乳, 1% 盐酸定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 分析方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 0.1% 三氟乙酸溶液-乙腈 (96:4), 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长: 280 nm, 进样量: 10 μL, 柱温: 25 °C。

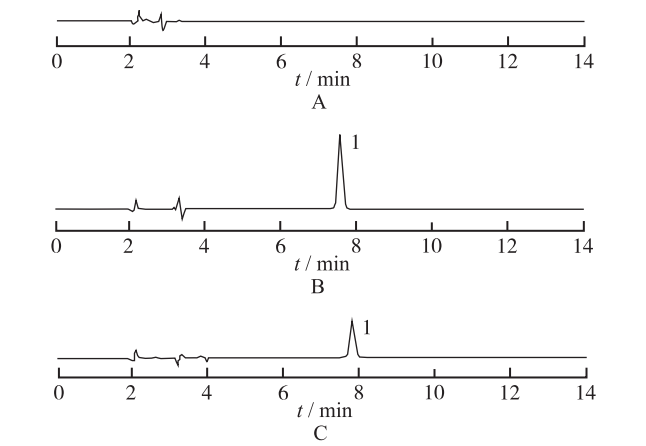
2.4.2 专属性考察 取 LDP 对照品溶液、Blank-pSLN 破乳液以及 LDP-pSLN 破乳液各 10 μL, 按“2.4.1”项色谱条件进样测定, 记录色谱图, 见图 1。可知固体脂质纳米粒辅料对药物测定无影响。

收稿日期 2016-07-02 修回日期 2016-08-26

基金项目 * 国家科技部十二五国家科技重大专项 (20120930ZX09301002-001-008)

作者简介 魏曼 (1986-) 女, 山东临沂人, 在读硕士, 研究方向: 纳米释药载体。E-mail: weiman2008@163.com。

通信作者 郑稳生 (1966-) 男, 安徽潜山人, 研究员, 博士, 研究方向: 中、西药物新制剂及新释药系统技术与开发。E-mail: zhengwensheng@imm.ac.cn。



A.空白 PEG 化固体脂质纳米粒;B.左旋多巴对照品溶液;
C.左旋多巴 PEG 化固体脂质纳米粒;1.左旋多巴

图 1 3 种溶液 HPLC 图

A.blank PEG-solid lipid nanoparticle; B.levodopa control; C.levodopa PEG- solid lipid nanoparticle; 1.levodopa

Fig.1 HPLC chromatograms of three kinds of solution

2.4.3 线性与范围 精密称取 LDP10.54 mg, 置 10 mL 量瓶, 用 1% 盐酸溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为贮备液, 分别稀释制成 10.54, 21.08, 42.16, 52.70, 105.4, 210.8, 527.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液, 按“2.4.1”项色谱条件进样测定, 记录峰面积。以 LDP 浓度 (C) 为横坐标、峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归, 得线性回归方程 $A = 30\,578C + 10\,265 (r^2 = 1.000)$ 。结果表明 LDP 在 10.54~527.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.4.4 仪器精密度实验 精密量取 52.70 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液, 重复进样测定 6 次, 记录峰面积, 计算得 RSD 为 0.49% ($n=6$)。表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性实验 取同一批 (批号: 20160415) 样品 1 mL, 平行 6 份, 置于 10 mL 量瓶, 加无水乙醇 0.5 mL 破乳后用 1% 盐酸定容至刻度, 摇匀, 按“2.4.1”项色谱条件进样测定。结果 LDP 平均含量 46.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 0.62% ($n=6$)。

2.4.6 稳定性实验 取同一批 (批号: 20160415) 样品, 按“2.4.5”项方法制备供试品溶液, 在室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 后分别进样检测, 记录峰面积, 计算 RSD 为 0.57% ($n=9$)。结果表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.4.7 方法回收率实验 分别精密量取“2.4.3”项储备液 0.1, 0.3, 1.0 mL 各 3 份, 置 10 mL 量瓶, 加入 Blank-pSLN 悬液 0.2 mL, 加无水乙醇 0.5 mL 破乳后用 1% 盐酸稀释并定容至刻度, 摇匀, 按“2.4.1”项色谱条件进样

测定, 记录峰面积, 计算加样回收率。高、中、低浓度加样回收率分别为 99.13%, 99.51%, 99.04%, RSD 分别为 1.25%, 1.91%, 1.71%, 表明该方法准确度良好。

2.5 固体脂质纳米粒与游离药物分离

2.5.1 微型凝胶柱的制备 称取一定量 Sephadex G-50 用纯化水溶胀 12 h 后, 装入 2 mL 去掉内塞的注射器中 (底部放两张略小于其内径的圆形滤纸) 排除气泡后, 以水平衡 2~3 个柱体积^[5], 以 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r = 15.7\text{ cm}$) 离心 2 min, 去除柱中多余水分, 得微柱 (柱高约 1.7 cm), 备用。

2.5.2 微型凝胶柱对 Blank-pSLN 的吸附 取 Blank-pSLN 0.1 mL 缓缓加入到微柱的顶端, 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min ($r = 15.7\text{ cm}$) 使 Blank-pSLN 进入微柱, 继续加入纯化水 0.2 mL 于微柱的顶端, 2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r = 15.7\text{ cm}$) 离心 2 min, 收集洗脱液, 连续重复操作 4 次。合并收集液于 10 mL 量瓶, 加无水乙醇 0.5 mL 超声破乳, 1% 盐酸稀释并定容至刻度, 摇匀, 于 208 nm 处测定吸光度 (A_n); 另取 Blank-pSLN 0.1 mL 于 10 mL 量瓶, 加无水乙醇 0.5 mL, 超声破乳后用 1% 盐酸稀释并定容至刻度, 摇匀, 于 208 nm 处测定吸光度 (A_0); 按照 $A_n/A_0 \times 100\%$ 计算微柱对 Blank-pSLN 的平均回收率, 结果为 98.84%, RSD 为 0.80% ($n=3$), 见表 1。表明此微柱几乎可以将 Blank-pSLN 全部洗脱。

表 1 Blank-pSLN 的微柱离心回收率
Tab.1 Recovery of Blank-pSLN by mini-column after centrifugation

样品编号	A_n	A_0	$n=3$
			回收率/%
1	0.316		99.68
2	0.311	0.317	98.10
3	0.313		98.74

2.5.3 微柱对游离药物的吸附 精密称取 L-DOPA 原料药 3 份, 以 1% 盐酸溶解并定容, 配制成浓度分别为 0.1, 0.5, 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液。精密吸取各浓度溶液 0.1 mL, 缓缓加入微柱顶端, 按“2.5.2”项条件离心洗脱, 合并收集的洗脱液置于 10 mL 量瓶, 用 1% 盐酸定容至刻度, 摇匀, 按“2.4.1”项色谱条件分别进样测定, 记录峰面积为 A_1 。精密量取各浓度溶液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中用 1% 盐酸稀释并定容至刻度, 按“2.4.1”项色谱条件测定峰面积为 A_0 。按 $[(A_0 - A_1)/A_0 \times 100\%]$ 计算微柱对游离药物的吸附率。结果 3 种浓度药物的吸附率分别为 100%, 98.75%, 98.56%, RSD 分别为 0.00%, 0.19%, 0.18% ($n=3$)。说明在洗脱范围

内微柱几乎可以将游离药物完全吸附。

2.5.4 微柱对 Blank-pSLN 和游离药物物理混合液的吸附 精密量取 0.1 mL 的空白 SLN 3 份置于 10 mL 量瓶,分别加入适量 L-DOPA 原料药,用 1% 盐酸定容至刻度,制成浓度分别为 0.1, 0.5, 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 物理混合液。按“2.4.1”项色谱条件测定过柱前药物的峰面积(A_0)。分别取 3 个不同浓度物理混合样液 0.1 mL 加于微柱顶端,按“2.5.2”项离心条件分离游离药物与 Blank-pSLN,收集洗脱液,加无水乙醇破乳后用 1% 盐酸定容至 10 mL,按“2.4.1”项色谱条件测定过柱后峰面积(A_1),按 $[(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%]$ 计算微柱对物理混合样品中游离药物的吸附率。结果 3 种不同浓度药物的吸附率分别为 99.68%, 98.46%, 99.21%; RSD 分别为 1.52%, 0.23%, 0.21%。

2.5.5 洗脱曲线的绘制 精密吸取 LDP-pSLN 悬液 0.1 mL 加到微柱顶端“2.4.2”项离心条件进行洗脱,收集每次的洗脱液,加无水乙醇破乳后用 1% 盐酸定容至 10 mL,按“2.4.1”项色谱条件测定峰面积,根据峰面积与收集管数绘制洗脱曲线,其中 1~4 管洗脱液为空白脂质体混悬液,5~14 管洗脱液为游离 L-DOPA 溶液, SephadexG-50 微型凝胶柱可较好地将 SLN 与游离 L-DOPA 药物分离,结果见图 2。

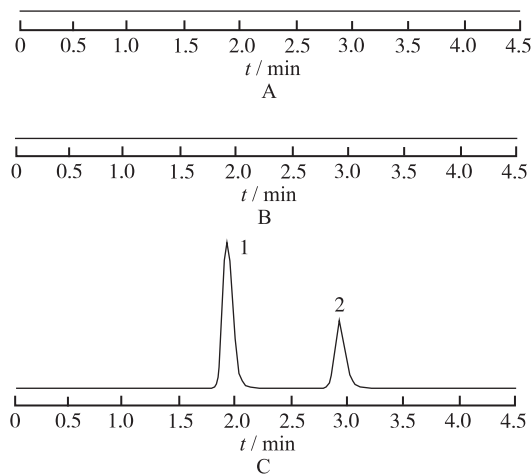


图 2 LDP-pSLN 洗脱曲线

Fig.2 Elution curve of LDP-pSLN

2.6 包封率的测定 精密量取 3 份不同批次的 LDP-pSLN 悬液各 0.1 mL,上样于微柱顶端,按“2.5.2”项方法分离游离药物和 SLN,最终洗脱液收集到 10 mL 量瓶,经无水乙醇破乳后,用 1% 盐酸稀释定容至刻度,

摇匀,按“2.4.1”项色谱条件测定包封于 SLN 中药物浓度 C_1 。再分别量取各批次 LDP-pSLN 悬液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶,经无水乙醇破乳后,用 1% 盐酸稀释定容至刻度,摇匀,按“2.4.1”项色谱条件测定总药物的浓度(C_0),以公式 $EE\% = C_1 / C_0 \times 100\%$ 计算包封率。最终测得脂质体的包封率分别为 36.6%, 37.5%, 35.0%; RSD 分别为 1.28%, 1.04%, 1.42% ($n=3$)。

3 讨论

文献[6]报道,离心转速和时间以及微柱的高度对葡聚糖凝胶微柱的分离效果有很大的影响。转速过高或离心的时间过长会使凝胶溶胀吸收的水分离出来,导致凝胶柱中出现大量气泡甚至断裂;转速过低或离心时间过短会减少洗脱体积,导致 S 纳米粒和游离药物分离效果不好。微柱的高度过高导致洗脱体积增大,稀释倍数增大,给破乳带来不便;微柱的高度过低,分离效果不好,易导致游离药物洗出。本实验对 3 种规格的葡聚糖凝胶 (SephadexG-25, 50, 100) 进行了考察,并对离心力、离心时间和柱高进行反复摸索,筛选出微柱离心分离的最佳条件为微柱高度 1.7 cm, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min。

紫外分光光度法对 Blank-pSLN 的破乳液进行全波长扫描,显示其在 208 nm 波长处有最大吸收,故选择 208 nm 测定 Blank-pSLN 破乳液的吸光度。

参考文献

- [1] SUMIT S, SHIKHA L, RSR M. Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticles and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery[J]. Drug Dev Res, 2014, 40(7): 869-878.
- [2] 叶龙, 宋磊, 杨飞, 等. 抗帕金森病小分子药物的研究进展[J]. 医药导报, 2015, 34(8): 1055-1058.
- [3] CE Q, YAN C, JING Q Z H, et al. Preparation and characterization of catalase-loaded solid lipid nanoparticles protecting enzyme against proteolysis[J]. Int J Mol, 2011, 12(7): 4282-4293.
- [4] 詹水明, 侯冬枝, 平其能, 等. 左旋多巴固体脂质纳米粒的制备及包封率测定[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(14): 1171-1175.
- [5] FU J W, TU Y S, SUN D M. Entrapment efficiency of curcumin and piperine in compound curcumin lipid-based liquid crystalline nanoparticles[J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol, 2013, 24(2): 200-205.
- [6] 刘阳, 陶胜尧, 郭伟英. 葡聚糖凝胶微柱-HPLC 测定奥沙利铂脂质体包封率[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(1): 74-77.