

甘草次酸脂化乳的质量评价指标探讨[△]

金 粟*,李士远,张秀荣,陈芳宁,王秀丽[△](北京中医药大学中药学院,北京 100102)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0800-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.22

摘要 目的:为甘草次酸脂化乳的质量评价提供参考指标。方法:采用冷冻透射电子显微镜检测甘草次酸脂化乳粒子形态,激光纳米粒度仪测定其粒径、多分散系数(PDI)及电位情况;采用超高效液相色谱法测定其中有效成分甘草次酸的载药量;在30℃下放置10 d考察该制剂的稳定性。结果:制备的甘草次酸脂化乳轮廓清晰、结构完整、呈类圆形、排列紧密;平均粒径为(245.2±4.29) nm, PDI为(0.054±0.01),平均电位为(-6.25±0.54) mV;甘草次酸的载药量平均值为(1.25±0.09) mg/mL;质量浓度为0.82 mg/mL的样品在10 d内稳定性良好。结论:粒径、电位、载药量、稳定性可作为甘草次酸脂化乳的评价指标。

关键词 甘草次酸脂化乳;质量评价;指标;载药量

Quality Evaluation and Index Exploration of the Glycyrrhetic Acid Lipo-emul

JIN Su, LI Shiyuan, ZHANG Xiurong, CHEN Fangning, WANG Xiuli (School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference indexes for the quality evaluation of Glycyrrhetic acid lipo-emul. METHODS: Cryo-TEM was used to detect the morphology of Glycyrrhetic acid lipo-emul, laser nano-particle size analyzer was used to determine the particle size, polydispersity index (PDI) and the zeta potential; UPLC was used to determine the drug loading of its active ingredient glycyrrhetic acid; placing 10 d in 30 °C, then stability was detected. RESULTS: Prepared Glycyrrhetic acid lipo-emul was clear outline, structural integrity, roundlike and arranged closely; the mean particle size was (245.2 ± 4.29) nm, PDI was (0.054 ± 0.01) and the mean zeta potential was (-6.25 ± 0.54) mV; the average drug loading of glycyrrhetic acid was (1.25 ± 0.09) mg/mL; the sample with mass concentration of 0.82 mg/mL showed good stability in within 10 d. CONCLUSIONS: Particle size, zeta potential, drug loading and stability can be used as the evaluation index of Glycyrrhetic acid lipo-emul.

KEYWORDS Glycyrrhetic acid lipo-emul; Quality evaluation; Index; Drug loading

脂化乳是一种新型给药系统,其结构与脂质体有相似之处,均属于脂质体系,能够促进药物的肠淋巴转运,从而促进药物吸收。脂质体可以通过将药物包封脂质层内,以增加难溶性药物溶解度,提高药物稳定性,降低药物刺激性等^[1-3];但脂质体口服吸收会在胃肠道受到明显破坏,降低载药量,所以脂质体难以通过口服给药实现理想的药物递送。而脂化乳的稳定性和载药量较脂质体有明显提升,经高压乳匀纳米化后,脂化乳剂粒径分布均匀(可实现粒径为200 nm左右),制剂质地均匀。脂化乳制剂制备方法简单,辅料安全,具有良好的应用前景。作为一种全新的给药系统,需要建立合理的评价体系,以便对该制剂质量进行合理评价。而现有文献并未有该制剂的质量评价标准。因此,本课题组以甘草次酸为模型药物,制备甘草次酸脂化乳,鉴于脂化乳与脂质体结构有相似之处,在选择评价指标时参考了脂质体

的评价指标^[4],通过对粒径、电位、载药量、包封率、稳定性等的检测,确定脂化乳的评价指标,以期脂化乳制剂的应用提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相色谱(UPLC)Accuracy系统,包括二元超高压溶剂系统、自动进样恒温样本管理器、二极管阵列检测器、Empower3色谱工作站(美国Waters公司);NANO-pure Diamond Ro+型纯水仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);FA1204B型电子天平(上海越平科学仪器有限公司);KQ-300VDB型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率:300 W,频率:50 kHz);SCI-ENTZ-II D型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);HD-3型紫外检测仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);Zetasizer Nano ZS90型激光纳米粒度仪(英国Malvern公司);G16型医用高速离心机(安新县白洋离心机厂);Tecna G2-T20型冷冻透射电子显微镜,包括CCD数字成像系统、X射线能谱仪、扫描透射、高角环形暗场探测器、电子能量损失谱仪(美国FEI公

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81202928)

* 硕士研究生。研究方向:中药药剂学。电话:010-84738657。

E-mail: Jinsu9010@foxmail.com

通信作者:副研究员,博士。研究方向:中药复方新型给药系统与新型辅料。E-mail: Lnwangxiuli@163.com

司)。

1.2 试剂

甘草次酸提取物(宝鸡国康生物科技有限公司,批号:111215,纯度:≥98%);甘草次酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110723-200411,纯度:96.2%);甲酸、甲醇为色谱纯,胆固醇(PC-98T型)、蛋黄卵磷脂(PL-100M型)、大豆卵磷脂、氢化大豆磷脂、无水乙醇为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 甘草次酸脂化乳的制备

精密称取甘草次酸提取物 25 mg、油相辅料(胆固醇、蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、氢化大豆磷脂)1 025 mg、油脂 2 mL,置于 50 mL 烧杯中,于(60±2)℃水浴上加热,并加入 1 mL 无水乙醇助溶,使其全部溶解;另取 18 mL 水,置于 50 mL 小烧杯中(60±2)℃水浴加热,作为水相。待无水乙醇挥发完全(无乙醇味)、油相溶解完全,用 20 mL 的一次性注射器将水相匀速、缓慢滴入到油相中,并在油相中加入转子使其充分混匀,以 120 r/min 低速搅拌 10 min,在搅拌过程中温度始终保持(60±2)℃;混匀后,高压乳匀机 600 bar 压制 60 s,即得。

2.2 形态观察、粒径分布及电位测定

2.2.1 形态观察 采用相关文献中记载的方法^[5],取样品适量,置于 1 mL 离心管中,加入适量水稀释 20 倍,混合均匀。用移液枪精密吸取 10 μL 稀释后的样品准确滴加在微栅膜铜网上(微栅膜铜网预先进行亲水性处理),滤纸吸去多余液体,快速冲投到已被液氮充分冷却的液态乙烷中,液体水形成非晶态的冰,样品无损地包埋在其中;保持微栅膜铜网浸没在液氮中,迅速转移到预冷的样品杆中,将样品杆转移到冷冻样品传输架上,采用冷冻透射电子显微镜在 10 万倍下显像,加速电压 300 kV,用 CCD 数字成像系统记录脂化乳粒子形态。甘草次酸脂化乳冷冻电镜图见图 1。由图 1 可知,甘草次酸脂化乳轮廓清晰,结构完整,呈类圆形,排列紧密。

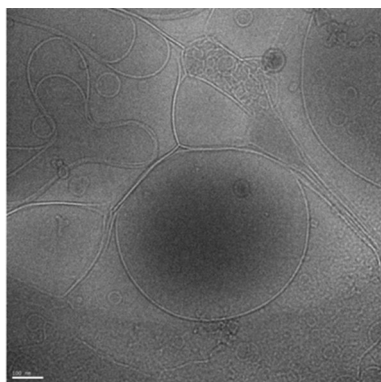


图1 甘草次酸脂化乳冷冻电镜图(×100 000)

Fig 1 Cryo-TEM photograph of glycyrrhetic acid lipo-emul (×100 000)

2.2.2 粒径和电位分布情况 取样品适量,置于 50 mL 烧杯中,加入适量水,稀释 100 倍,混合均匀,取 1.5 mL

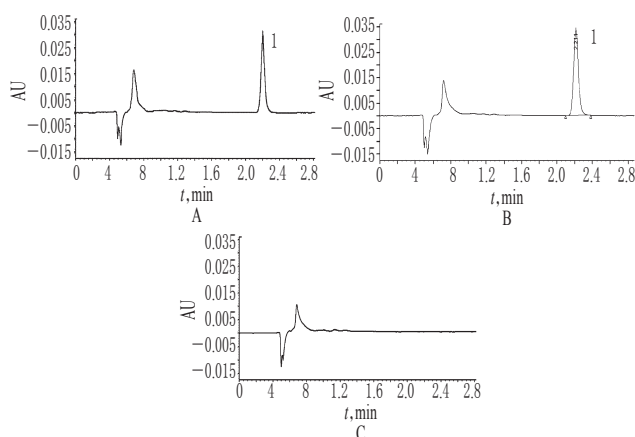
稀释液装入粒径杯中,用 Zetasizer Nano ZS90 型激光纳米粒度仪检测粒径及多分散系数(PDI)。用 5 mL 注射器吸取上述稀释液,注入电位杯,排空气泡,用 Zetasizer Nano ZS90 型激光纳米粒度仪检测电位情况。结果,甘草次酸的平均粒径为(245.2±4.29) nm,PDI 为(0.054±0.01),平均电位为(-6.25±0.54) mV。

2.3 载药量测定

2.3.1 超高效液相色谱条件 色谱柱:ACQUITY BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:甲醇-0.5%甲酸水溶液(77:23,V/V);流速:0.4 mL/min;检测波长:251 nm;柱温:30℃;进样量:2 μL。

2.3.2 溶液的制备 ①对照品溶液:精密称取甘草次酸对照品 15.05 mg,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,超声处理 5 min,使其充分溶解,放至室温,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,弃去前 3 滴,制得甘草次酸质量浓度为 602 μg/mL 的对照品溶液。②供试品溶液:精密量取样品 0.1 mL,置于 5 mL 量瓶中,加 1 mL 甲醇,超声处理 5 min 破乳,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。③阴性对照溶液:按样品的处方比例和制备工艺制备缺甘草次酸的阴性样品,再按供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2.3.3 系统适用性试验 精密量取“2.3.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,进行稀释,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 2。由图 2 可知,在该色谱条件下,分离度>1.5;理论板数以甘草次酸峰计>5 000;甘草次酸保留时间为 2.3 min。结果表明,其他辅料对甘草次酸主峰的测定没有干扰。



A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.甘草次酸

A.reference substance; B.test sample; C.negative cotrol; 1.glycyrrhetic acid

图2 超高效液相色谱图

Fig 2 UPLC chromatograms

2.3.4 线性关系考察 精密量取“2.3.2”项下对照品溶液适量,加甲醇稀释制备甘草次酸质量浓度分别为 36.12、72.24、96.32、150.50、301.00、602.00 μg/mL 的系列对照品溶液。取上述溶液各适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以甘草次酸质量浓度

(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得甘草次酸的回归方程为 $y=2\ 201.9x-30\ 792$ ($r=0.999\ 9$)。结果表明,甘草次酸检测质量浓度线性范围为 $36.12\sim 602.00\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 精密密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,甘草次酸峰面积的 $\text{RSD}=0.37\%$ ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.3.6 稳定性试验 取“2.3.2”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、1、2、3、5、7、9、11、13 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甘草次酸峰面积的 $\text{RSD}=1.25\%$ ($n=9$),表明供试品溶液在室温下放置13 h内稳定性良好。

2.3.7 重复性试验 按“2.1”项下方法制备样品,按“2.3.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,甘草次酸峰面积的 $\text{RSD}=1.19\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.8 回收率试验 取阴性对照品溶液适量,共9份,各置于5 mL量瓶中,分别加入一定质量的甘草次酸对照品,按“2.3.2”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液。取上述溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery test($n=9$)

加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
301.00	303.00	100.66		
301.00	296.80	98.60		
301.00	294.45	97.82		
270.90	275.30	101.62		
270.90	276.15	101.94	99.43	1.63
270.90	268.40	99.08		
225.75	219.75	97.34		
225.75	223.65	99.07		
225.75	222.80	98.69		

2.4 载药量的测定

精密吸取“2.1”项下制备的样品0.1 mL,置于2 mL离心管中,加1 mL甲醇,超声处理5 min破乳,再经 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。将峰面积带入标准曲线计算甘草次酸含量,得到甘草次酸脂化乳中甘草次酸载药量的平均值为 $(1.25\pm 0.09)\ \text{mg/mL}$ 。

2.5 稳定性考察

按“2.1”项下方法分别制备一系列质量浓度的样品,恒温($30\ ^\circ\text{C}$)下避光放置,分别于放置1、5、10 d时观察制剂状态,再按“2.4”项下方法测定载药量,以考察样品的稳定性。甘草次酸脂化乳稳定性试验结果见表2。由表2可知,样品放置1 d时,各组制剂状态稳定;放置5 d时,2.53 mg/mL组(A组)产生少量沉淀,1.25 mg/mL组(B组)和0.82 mg/mL组(C组)无沉淀产生;放置10 d时,A

组产生较多沉淀,B组产生少量沉淀,C组未见沉淀;由载药量变化情况可见,A组放置5 d载药量已降至71%,B组虽未见沉淀但载药量略降低,C组稳定性状况较好。

表2 甘草次酸脂化乳稳定性试验结果

Tab 2 Results of stability test of glycyrrhetic acid

放置时间, d	载药量, mg/mL			制剂状态		
	2.53	1.25	0.82	A组	B组	C组
1	2.53	1.25	0.82	乳白色均匀	乳白色均匀	乳白色均匀
5	1.80	1.20	0.81	少量沉淀	乳白色均匀	乳白色均匀
10	1.26	1.19	0.81	较多沉淀	少量沉淀	乳白色均匀

3 讨论

在脂化乳质量评价标准考察过程中,因脂化乳与脂质体具有相似结构,笔者曾以脂质体考察指标中的包封率(大小)来评价甘草次酸脂化乳。脂质体包封率测定方法^[4,6-7]较多,常用的方法包括葡聚糖凝胶法^[8-11]、透析法^[12]、超滤法^[13]、离心法^[14]和鱼精蛋白法^[15]等。经过预试验,排除了透析法、超滤法、鱼精蛋白法,最终确定尝试葡聚糖凝胶法和离心法。

葡聚糖凝胶法测定甘草次酸脂化乳包封率时,本课题组考察了不同上样量(0.2、0.5、1 mL),以纯水、生理盐水、0.5%十二烷基硫酸钠为洗脱溶剂对脂化乳包封率结果的影响,最终确定上样量为0.5 mL、以生理盐水为洗脱溶剂条件下进行洗脱。结果,以上述最佳条件对葡聚糖凝胶柱进行柱效考察,3次回收率平均值不足80%,表明葡聚糖凝胶柱对甘草次酸脂化乳存在一定吸附。另笔者参考相关文献以低速离心法对甘草次酸脂化乳包封率进行考察^[4,13-14],以半径为2 cm,1 000、2 000、3 000、4 000 r/min的转速分别离心5或10 min的条件来处理本品,通过测定离心后上层甘草次酸含药量与未离心甘草次酸脂化乳制剂含药量的差值,计算脂化乳包封率,初步确定最佳离心条件为以半径为2 cm、2 000 r/min的转速离心5 min。以此最佳条件对离心效率进行考察,结果显示离心效率为80%,回收率结果均较低。

这可能是由于油脂的存在,使得脂溶性药物部分以溶解于油相的状态存在,部分包封于脂质层中,而不是脂质体中而导致包封率过低。所以,包封率不适合作为脂化乳的评价指标。

综上所述,初步确定粒径、电位、载药量、稳定性可作为甘草次酸脂化乳的评价指标。

参考文献

- [1] 吴军,张玉良,马卓.脂质体新剂型的研究进展[J].广东化工,2014,41(10):69-70.
- [2] 曹健,陆锦芳.眼用制剂的研究进展[J].中国药学杂志,2003,38(3):161-163.
- [3] 黄梓源,孙玉琦,胡海洋,等.脂质体制剂学稳定性的研究技术与方法[J].药学学报,2016,51(3):356-361.
- [4] 林珈好,王秀丽,曹唯仪,等.甘草次酸-丹参酮II A复方脂质体包封率测定方法研究[J].北京中医药大学学报,2013,36(10):701-704.
- [5] 李茵茵,李鲲鹏,李向辉,等.含水纳米材料冷冻电镜直接

黄芩素中有关物质的检测及其降解机制初步研究^Δ

王玮珏^{1*},董武军¹,张培成²,苏倩倩¹,范茹涵³,刘玉玲^{1#}(1.中国医学科学院/北京协和医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;2.中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室,北京 100050;3.郑州大学药学院,郑州 450001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)06-0803-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.06.23

摘要 目的:建立黄芩素中有关物质的分离检测方法,鉴定其结构并初步探讨降解机制。方法:采用高效液相色谱法(HPLC)检测黄芩素与合成过程中的有关杂质及强制破坏降解产物;色谱柱为ES Industries[®] FluoroSep-RP Phenyl,流动相为0.3%甲酸-甲醇-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为275 nm,柱温为10 ℃,进样量为10 μL。采用LC-串联质谱法鉴定有关物质并推测降解机制;色谱柱为ES Industries[®] FluoroSep-RP Phenyl,流动相为0.3%甲酸-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为275 nm,柱温为10 ℃,进样量为10 μL;离子源为电喷雾离子源,正负离子同时检测,雾化器压力为55 psi,干燥气体流速为11 L/min,干燥气体温度为350 ℃,毛细管电压为4.0 kV,检测模式为全扫描一级质谱和选择离子全扫描二级质谱,扫描范围为 m/z 100~1 000(一级质谱),50~500(二级质谱),电离电压为80~135 eV,碰撞能量为10~30 eV。结果:黄芩素检测质量浓度线性范围为2.4~480 μg/mL($r=0.9999$);精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;定量限、检测限分别为7.2、2.4 ng。黄芩素与有关物质及3个主要降解产物分离良好,有关物质为化学合成前体木蝴蝶素;碱降解产物为6,7位邻醌衍生物和7,8位邻醌衍生物,两者互为异构体;氧化降解产物为苯甲酸苯酯类衍生物。结论:黄芩素碱降解和氧化降解的主要机制包括吡喃环开环、互变更排和氧化反应等;该研究所建方法专属性好、灵敏度高,可用于黄芩素有关物质的分离检测。

关键词 黄芩素;有关物质;降解机制;高效液相色谱法;液相色谱-串联质谱法

Detection of Related Substances and Preliminary Study on the Degradation Mechanism of Baicalein

WANG Weijue¹, DONG Wujun¹, ZHANG Peicheng², SU Qianqian¹, FAN Ruhan³, LIU Yuling¹ (1.Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2.State Key Laboratory of Bioactive Substances and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3.School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the separation and detection of related substances in baicalein, identify its

- 成像研究[J].电子显微学报,2012,31(4):346-349.
- [6] 陈召红,刘皈阳,魏亚超.脂质体包封率测定方法研究进展[J].解放军药学报,2011,27(1):79-82.
- [7] 邵红霞,奉建芳,龙晓英.脂质体包封率的测定方法[J].中南药学,2009,7(3):212-215.
- [8] 陈蓓,袁明奎,王建华,等.葡聚糖凝胶柱色谱法测定阿苯达唑纳米脂质体包封率的方法研究[J].中国药房,2012,23(45):4281-4284.
- [9] 赵锋,栾瀚森,罗华菲,等.葡聚糖凝胶色谱法用于纳米粒包封率的测定[J].中国药学杂志,2012,47(17):1385-1390.
- [10] 李学涛,唐炜,姜英,等.转铁蛋白修饰长春新碱-粉防己碱脂质体中主药含量及包封率的测定[J].中国药房,2016,27(22):3034-3036.
- [11] 万胜利,钟萌,赵德璋,等.葡聚糖凝胶柱色谱法测定姜黄素囊泡包封率[J].激光杂志,2015(2):142-144.
- [12] 白兰,赵明琴,尹蓉莉,等.龙胆苦苷脂质体含量测定及包封率考察[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):48-50.
- [13] 郑杭生,佐拉·沙肯迪克,王湘林,等.离心沉淀-离心超滤法测定盐酸青藤碱脂质体的包封率[J].中草药,2011,42(8):1523-1527.
- [14] 李琅琅,王文喜,牛泱平.低速离心法测定荧光红GG脂质体包封率[J].浙江工业大学学报,2009,37(5):535-537.
- [15] 刘卫斌,薛彦宁,秦永刚.鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J].中国药房,2010,21(39):3695-3697.

(收稿日期:2016-10-16 修回日期:2016-12-12)

(编辑:刘柳)

Δ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(No.2012ZX09301002-001-008);中央高校基本科研业务费专项“创新药物发现与新技术专项”(No.2012CHX03)

* 硕士研究生。研究方向:纳米给药系统。电话:010-83160332。E-mail: doggiejue@163.com

通信作者:研究员,博士生导师。研究方向:新型微粒载体构建及肿瘤靶向制剂等。电话:010-63159373。E-mail: ylliu@imm.ac.cn