

- [7] Qusmail M, Bennear M. Determination of various hydraulic resistances during cross flow filtration of starch grain suspension throw in organic membranes [J]. *J Membr Sci*, 1995, 105: 1-21.
- [8] 赵之平, 陈澄华. 超声传质过程机理[J]. 化工设计, 1997, 6: 30-33.

## 微柱离心-HPLC 法测定鬼臼毒素醇质体的包封率研究

于燕燕, 赵继会, 冯年平\*, 翁海挺, 张永太

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

**摘要:**目的 建立鬼臼毒素醇质体包封率的测定方法。方法 采用葡聚糖凝胶微柱离心法分离醇质体与游离药物;用 HPLC 法测定醇质体中鬼臼毒素, 计算包封率。结果 在本法选择的色谱条件下, 鬼臼毒素得到良好的分离, 辅料不干扰测定, 鬼臼毒素在 2.5~101.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r=0.9999$ ) 线性关系良好。微柱离心法能有效的将鬼臼毒素醇质体与游离药物分离, 用该方法测得鬼臼毒素醇质体的包封率为 51.03%, RSD 为 1.24% ( $n=3$ )。结论 建立了微柱离心-HPLC 法, 该方法便捷, 准确, 重现性好, 可用于测定鬼臼毒素醇质体的包封率。

**关键词:** 鬼臼毒素; 醇质体; 微柱离心; 包封率

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1634-04

### Entrapment efficiency of podophyllotoxin encapsulated ethosome by minicolumn centrifugation HPLC

YU Yanyan, ZHAO Jihui, FENG Niarping, WENG Haiting, ZHANG Yongtai

(College of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract: Objective** To establish a method for determining the entrapment efficiency of podophyllotoxin in ethosomes. **Methods** Glucose gel minicolumn centrifugation was employed to separate the free drug from the ethosomes. The content of podophyllotoxin was quantified by HPLC. **Results** In the current chromatograph condition, the excipient had no influence on the determination of podophyllotoxin. The assay was linear during the podophyllotoxin concentration range of 2.5–101.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r=0.9999$ ). The ethosomes were well separated using the method of minicolumn centrifugation. The entrapment efficiency of podophyllotoxin encapsulated ethosomes was 51.03%, with RSD 1.24% ( $n=3$ ). **Conclusion** The established minicolumn centrifugation HPLC method is simple, accurate, reproducible, and applicable for the determination of entrapment efficiency of podophyllotoxin encapsulated ethosomes.

**Key words:** podophyllotoxin; ethosomes; minicolumn centrifugation; entrapment efficiency

鬼臼毒素是从小檗科植物桃儿七、八角莲或六角莲的根及根茎中提取分离得到的木脂素类化合物<sup>[1]</sup>, 它是世界卫生组织 (WHO) 推荐使用治疗尖锐湿疣 (CA) 的一线药物, 主要作用机制是通过其细胞毒作用使受人类乳头瘤 (HPV) 感染的细胞死亡, 常用的是 0.5% 鬼臼毒素酊剂。鬼臼毒素酊剂虽然能去除肉眼可见的病变, 但过量大面积的使用会产生严重的毒副作用, 因此寻找低毒的鬼臼毒素衍生物已成为现代抗肿瘤药物研究的热点<sup>[2]</sup>。通过脂质

体包封虽然能够减少不良反应, 但是其作用也仅限于皮肤表层, 所以难以消除皮肤深部的 HPV 潜伏感染而导致其复发<sup>[3-4]</sup>。醇质体 (ethosomes) 与普通脂质体相比, 显著提高了透皮速率、皮肤滞留量, 且具有良好的生物相容性<sup>[5]</sup>。包封率是评价醇质体质量的重要指标<sup>[6-7]</sup>。目前常用于测定包封率的方法有柱色谱法、渗析法、离心法等, 本实验采用微柱离心法测定鬼臼毒素醇质体的包封率, 取得了较好的效果。

①收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NECT08-0898); 上海市教委重点学科建设项目 (J50302)

作者简介: 于燕燕 (1982-), 女, 江苏滨海人, 讲师, 博士, 2007-2010 年就读于上海中医药大学, 现工作于上海应用技术学院, 从事中药新型给药系统研究。E-mail: sshnhyyy@163.com

\* 通讯作者 冯年平 Tel/Fax: (021) 51322198 E-mail: npfeng@hotmail.com

## 1 仪器与试药

LC 2010 高效液相色谱仪(日本岛津公司); LXJ-11B 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂); CP225D 微量电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

鬼臼毒素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 111645-200301); 鬼臼毒素原料药(福建华海药业公司,批号 081201); Sephadex G-50 葡聚糖凝胶(瑞典 Pharmacia 公司); 大豆磷脂(上海太伟药业有限公司); 鬼臼毒素醇质体(自制,含鬼臼毒素 3.5 mg/mL,含磷脂为 5.0% W/V,乙醇体积分数为 30%,平均粒径为 97 nm,分散系数为 0.137); 甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件: Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1%醋酸(65:35); 检测波长: 292 nm, 体积流量 1 mL/min; 柱温: 25 °C。

2.1.2 标准曲线的绘制: 精密称取鬼臼毒素对照品 25.28 mg, 置 25 mL 棕色量瓶中, 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 得 1011.2 μg/mL 对照品储备液。用乙醇分别将对照品溶液稀释成 101.1、50.6、10.1、5.1、2.5 μg/mL, 液相色谱仪进样 20 μL 测定, 以鬼臼毒素的峰面积(A)对质量浓度(C)进行回归, 得  $A = 12808.31C - 2099.14$  ( $r = 0.9999$ ), 结果表明鬼臼毒素质量浓度在 2.5~101.1 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。色谱图见图 1。

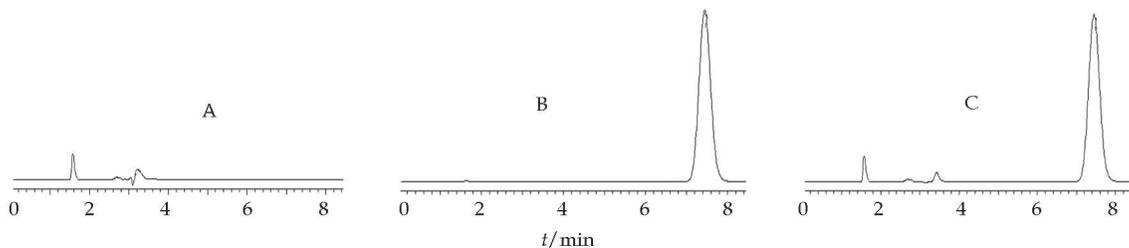


图1 空白醇质体(A)、鬼臼毒素对照品(B)、鬼臼毒素醇质体(C)色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of blank ethosomes (A), podophyllotoxin reference substance (B), and podophyllotoxin encapsulated ethosomes (C)

2.1.3 回收率试验: 精密量取空白醇质体 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 依次准确加入鬼臼毒素储备液, 用乙醇定容, 配制成质量浓度为 10.1、50.6、101.1 μg/mL 供试品溶液; 另取相同质量浓度的鬼臼毒素对照品溶液; 分别精密量取上述溶液 20 μL 注入液相色谱仪进行测定, 结果低、中、高浓度回收率( $n=5$ )分别为 99.83%、100.26%、100.10%; RSD 分别为 0.73%、0.81%、0.29%。

2.1.4 精密度试验: 精密吸取鬼臼毒素醇质体 0.2 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀得供试品溶液, 分别于 1 天内测定 5 次, 连续进样 5 d, 记录出峰面积, 计算日内和日间精密度。结果在该色谱条件下日内及日间精密度分别为 0.57% 和 0.91%, RSD < 2%。

### 2.2 微柱离心对脂质体及游离药物的分离

2.2.1 微型凝胶柱的制备: 将 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶浸泡在蒸馏水中, 100 °C 煮沸 1 h, 充分溶胀后冷却, 装入 2.5 mL 注射器。待水分自然留下, 将注射器置于离心机, 3000 r/min 离心 3 min, 使凝胶柱失水皱缩, 皱缩后凝胶高度不得少于 2.5 cm, 待用。

2.2.2 微型凝胶柱对空白醇质体的吸附: 空白醇质

体中磷脂、乙醇的浓度及制备方法同鬼臼毒素醇质体。精密量取空白醇质体 0.2 mL, 加于微型凝胶柱的顶端, 3000 r/min 离心 3 min, 收集离心液, 继续加入 0.2 mL 蒸馏水于凝胶柱的顶端, 3000 r/min 离心 3 min, 连续洗脱 4 次后, 合并 5 次离心液用蒸馏水定容至 10 mL, 另精密吸取 0.2 mL 空白醇质体蒸馏水定容至 10 mL, 分别于 500 nm 处<sup>[8,9]</sup>测定上柱前后空白醇质体的吸附情况, 经过 3 次测定, 上柱后与上柱前空白醇质体的回收率分别为 103.3%、98.5%、98.4%, 表明 Sephadex G-50 对空白醇质体基本无吸附。

2.2.3 微型凝胶柱对鬼臼毒素的吸附: 取浓度 3.5 mg/mL 鬼臼毒素溶液 0.2 mL, 加于微型凝胶柱的顶端, 3000 r/min 离心 3 min, 继续加入 0.2 mL 蒸馏水于凝胶柱的顶端, 连续洗脱 6 次后, 每次加入蒸馏水的量改为 0.5 mL, 再连续洗脱 16 次, 每次收集的洗脱液用蒸馏水定容至 0.5 mL。分别按 2.1.1 项下色谱条件检测药物量, 并绘制洗脱曲线, 结果见图 2。

可知, 鬼臼毒素游离药物在第 9 次离心后的洗脱液中被检出, 说明 Sephadex G-50 微型凝胶柱对鬼臼毒素具有一定吸附能力, 回收率为 99.92%,

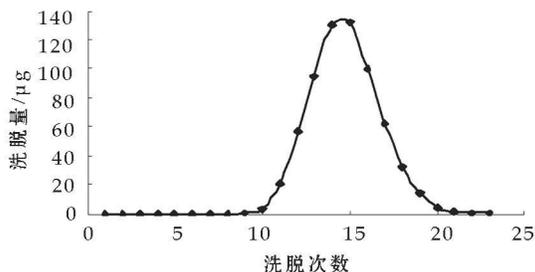


图 2 微型凝胶柱对鬼臼毒素的洗脱曲线

Fig 2 Elution curve of podophyllotoxin on minicolumn of Sephadex G 50

RSD 为 0.15% (n=3)。

2.2.4 微型柱对空白醇质体及鬼臼毒素水溶液物理混合物的分离: 精密量取 0.2 mL 质量浓度为 3.5 mg/mL 的鬼臼毒素 30% 乙醇溶液及 0.2 mL 空白醇质体溶液, 离心方法同 2.2.3 微型凝胶柱对鬼臼毒素的吸附前 5 次的洗脱液用乙醇破乳, 与其他洗脱液注入高效液相色谱仪进行测定, 并绘制洗脱曲线, 结果见图 3。

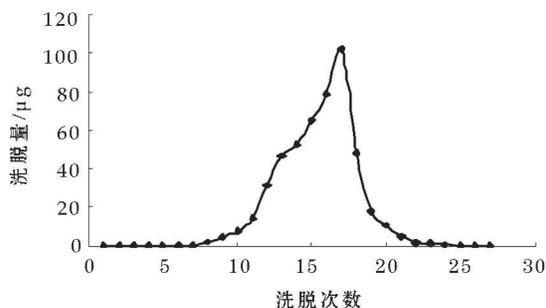


图 3 微型凝胶柱对空白醇质体及鬼臼毒素物理混合物的洗脱曲线

Fig 3 Elution curve of blank ethosomes and podophyllotoxin on minicolumn of Sephadex G 50

可知, 第 8 次洗脱液中含有微量的鬼臼毒素, 微型凝胶柱对物理混合物中鬼臼毒素的吸附能力没有受到空白醇质体的影响。

2.2.5 微型柱对鬼臼毒素醇质体的分离: 精密量取鬼臼毒素醇质体 0.2 mL 上样于微型凝胶柱中, 3 000 r/min 离心 3 min, 补加 0.2 mL 蒸馏水, 再次离心, 连续洗脱 6 次后, 每次加入蒸馏水的量改为 0.5 mL, 再连续洗脱 16 次, 带乳光的流份用乙醇破乳, 其他流份定容至 0.5 mL, HPLC 测定浓度, 绘制洗脱曲线, 结果见图 4。可知, 微型凝胶柱能够较好的分离含药醇质体与游离药物, 微型柱对鬼臼毒素醇质体的回收率为 99.85%, RSD 为 0.55% (n=3)。

2.2.6 包封率的测定: 精密量取 0.2 mL 醇质体溶液, 加入乙醇定容于 10 mL 量瓶中, 按 2.1.1 项下

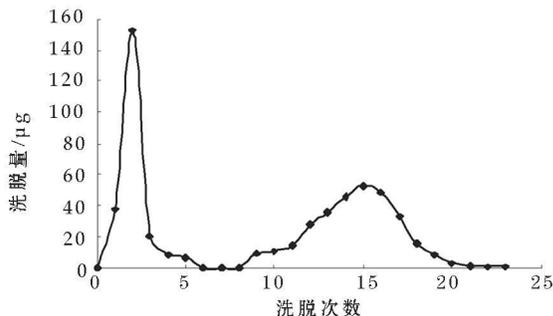


图 4 微型凝胶柱对鬼臼毒素醇质体的洗脱曲线

Fig 4 Elution curve of podophyllotoxin ethosomes on minicolumn of Sephadex G 50

色谱条件检测总的药物量 ( $W_T$ )。精密量取 0.2 mL 醇质体溶液, 加于微型凝胶柱顶端, 3 000 r/min 离心 3 min, 再加入 0.2 mL 蒸馏水溶液, 再次离心, 连续 4 次后合并洗脱液于 10 mL 量瓶中, 加入乙醇定容, 注入 HPLC 检测被包封药物的量 ( $W_E$ ), 根据公式  $E = W_E / W_T \times 100\%$ , 结果平均包封率为 51.03%, RSD 为 1.24% (n=3)。

### 3 讨论

采用不同的有机试剂破坏醇质体, 并溶解药物, 测定醇质体中的药物, 考察不同溶剂对醇质体的破坏效果。结果 10% Triton X-100 不能完全破坏醇质体, 溶液有乳光; 加入丙酮后溶液变浑浊; 加入乙醇和甲醇效果较好, 能够完全溶解脂质囊泡, 综合考虑选择乙醇作为破坏醇质体的溶剂。

常用分离醇质体的方法有凝胶柱色谱法, 超速离心法, 超滤法等。笔者曾尝试采用超速冷冻离心法, 在 4 °C, 15 000 r/min 条件下离心 2 h, 未能很好的分离出醇质体, 在试管底部有极少量沉淀, 乳光显著, 与未离心时几乎没有差异。改用 4 °C, 80 000 r/min 离心 2 h, 出现了分层现象, 共三层, 上层为乙醇水溶液, 下层为醇质体沉淀, 中间有一层占很多比例的胶体溶液, 上述实验说明超速冷冻离心法不能够很好的将醇质体与游离药物乙醇水溶液分离开来, 可能因为醇质体的膜流动性较大, 强大的离心力造成了脂质囊泡的变形破裂造成了药物的泄露, 还有一部分的磷脂溶解于乙醇水溶液中形成了较小的胶态溶液。采用凝胶柱色谱法分离醇质体及游离药物, 由于极大的稀释了醇质体而造成包封在囊泡中的药物泄露严重。采用超滤离心法分离醇质体和游离药物, 由于醇质体的黏度较大, 选择相对分子质量为 10 000 及 30 000 的超滤管, 4 °C, 15 000 r/min 离心时, 醇质体不能透过超滤膜。

在分离醇质体和游离药物实验过程中发现使用

水平式离心机效果较好,且离心速度及时间对微型凝胶柱的分离能力有很大影响,转速过低则醇质体的洗脱速度较慢,稀释倍数增大,造成药物的泄露;转速过高则容易引起凝胶柱的断裂而导致分离效果不好。经实验证实,3 000 r/min 离心 3 min 能够达到理想的分离效果。

洗脱游离药物过程中,为加快速率,将洗脱体积加大至每次 0.5 mL,既节约了时间又达到了较好的分离效果。

参考文献:

[1] 杨显志,邵华. 鬼臼毒素资源研究现状[J]. 中草药, 2001, 32(11): 1042-1044  
 [2] 吕晶晶,陈虹,曹波,等. 鬼臼毒素衍生物 CIP-36 诱导 KBV200 细胞凋亡[J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 256-261  
 [3] 朱学俊,孔繁荣,王家璧,等. 0.5% 鬼臼毒素酊治疗尖锐湿疣

1839 例疗效观察[J]. 中华皮肤科杂志, 1996, 29(3): 218  
 [4] Strand A, Wilander E, Zehbe I, et al. High risk HPV persists after treatment of genital papillomavirus infection but not after treatment of cervical intraepithelial neoplasia [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1997, 76(2): 140-144  
 [5] Paolino D, Lucania G, Mardente D, et al. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizinate: *in vitro* percutaneous permeation through human skin and *in vivo* anti-inflammatory activity on human volunteers [J]. *J Controlled Release*, 2005, 106(1-2): 99-110  
 [6] 李志浩,李鹏,朱雪松. 藁本内酯脂质体制备工艺的研究[J]. 中草药, 2010, 41(4): 564-568  
 [7] 郭波红,程怡,林绿萍. 甘草次酸脂质体的制备及其药剂学性质的研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 380-383  
 [8] 高晓非,邓英杰,曹金娜,等. 微柱离心-HPLC 法测定六甲蜜胺脂质体包封率[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(2): 247-249  
 [9] 王秀敏,邓英杰,郝艳丽,等. 微柱离心气相色谱法测定β-榄香烯脂质体包封率[J]. 沈阳药科大学学报. 2004, 21(6): 416-419

## 银杏内酯注射液的 HPLC 指纹图谱研究

章晨峰<sup>1,2</sup>, 付小环<sup>2</sup>, 毕宇安<sup>2</sup>, 尚强<sup>2</sup>, 王振中<sup>2</sup>, 盛龙生<sup>1\*</sup>

(1 中国药科大学, 江苏南京 210009; 2 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

**摘要:**目的 建立银杏内酯注射液的合适质量控制方法。方法 采用 HPLC/ELSD 法, 指纹图谱相似度用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(版本 2004A)计算。结果 10 批注射液的指纹图谱相似度均大于 0.95, 确定了 4 个共有峰, 建立了该注射液的指纹图谱。结论 本法可作为银杏内酯注射液的质量控制方法。

**关键词:** 银杏内酯注射液; 指纹图谱; HPLC/ELSD

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1637-03

### HPLC Fingerprint of Ginkgolide Injection

ZHANG Chenfeng<sup>1,2</sup>, FU Xiaohuan<sup>2</sup>, BI Yuran<sup>2</sup>, SHANG Qiang<sup>2</sup>, WANG Zhenzhong<sup>2</sup>, SHENG Longsheng<sup>1</sup>

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China)

**Abstract: Objective** To establish the proper quality control method for Ginkgolide Injection. **Methods** The Ginkgolide Injection was analyzed by using HPLC/ELSD technology. The similarity of fingerprints was calculated by the *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Traditional Medicine* (Version 2004A). **Results** Similarity of ten batches of injections was all over 0.95. The fingerprint for Ginkgolide Injection was established and four common peaks were indicated. **Conclusion** This method is suitable for the quality control of Ginkgolide Injection.

**Key words:** Ginkgolide Injection; fingerprint; HPLC/ELSD

银杏内酯是银杏叶中含有的一组具有较强生物活性的萜类化合物, 已分离得到的包括银杏内酯

①收稿日期: 2010-04-15

基金项目: 国家 863 计划课题(2002AA2Z3215, 2005AA2Z3E60)

作者简介: 章晨峰(1976-), 男, 江西抚州市人, 工程师, 博士, 主要从事中药质量控制方法研究。

Tel: (0518)85521955 E-mail: zhanchenfc@163.com

\* 通讯作者 盛龙生 Tel: (025)83307338 E-mail: shenglongsh@yahoo.com.cn