

· 研究报告 ·

用 HPLC 法测定丹参素棕榈醇酯脂质体药物含量

王晶¹, 张川², 栗意³, 任金妹¹, 唐扣明¹ (1. 复旦大学附属中山医院青浦分院药剂科, 上海 201700; 2. 上海大学医学院, 上海 200003; 3. 上海健康医学院附属周浦医院, 上海 201318)

[摘要] **目的** 建立 HPLC 法测定丹参素棕榈醇酯脂质体中药物含量的方法。**方法** 采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm); 以乙腈-水(50:50)含 0.02% 甲酸和 0.02% 三乙胺水、以 pH 6~7 的溶液为流动相, 流速为 1 ml/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为室温。**结果** 本色谱条件下丹参素棕榈醇酯与辅料及溶剂分离度符合要求, 在 0.05~0.45 mg/ml 范围内线性关系良好($r=0.999\ 5$, $n=5$), 回收率在 96%~102% 之间, 日内及日间 RSD 均小于 2% ($n=5$)。3 批样品的含量分别为 97.81%、101.20%、98.53%。**结论** 该方法准确可靠、简单快速, 可用于丹参素棕榈醇酯脂质体含量的测定。

[关键词] 丹参素; 脂质体; 高效液相色谱; 包封率

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)05-0450-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.012

Determination of palmitol 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate liposome by HPLC method

WANG Jing¹, ZHANG Chuan², LI Yi³, REN Jinmei¹, TANG Kouming¹ (1. Department of Pharmacy, Qingpu Branch of Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700, China. 2. Department of Medicine, Shanghai University, Shanghai 200003, China. 3. Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for the assay of palmitol 3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoate (PDSS) in liposomes. **Methods** The separation was performed with an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (4.6 mm×200 mm, 5 μm) at room temperature. The mobile phase was acetonitrile-aqueous solution (500 ml water + 0.1 ml triethylamine + 0.1 ml formic acid, pH=6-7) (50:50) with the flow rate of 1 ml/min. Zidovudine palmitate was detected at 280 nm. **Results** PDSS had a good linear recovery between 0.05-0.45 mg/ml. The intra-day and inter-day RSD were <2%. The extracted recovery was in the range of 96% to 102%. The assay results for three batches were 97.81%, 101.20% and 98.53%. **Conclusion** This method is simple, accurate and reliable. It can be used for the determination of PDSS in liposomes.

[Key words] Danshensu; liposome; HPLC; entrapment efficiency

根据《中国心血管病报告(2017)》报道, 因心血管病死亡人数占因疾病死亡的 40% 以上, 高于肿瘤及其他疾病, 成为导致人类死亡的首位疾病。尽管近年来心血管疾病的防治工作已经取得了初步成效, 但是心血管病的患病率和病死率仍呈上升趋势, 医疗工作者面临严峻的挑战^[1]。丹参是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。性微苦, 微寒, 归心、肝经。具有活血通经, 祛瘀止痛, 清心除烦, 养血安神的功效, 在我国已被广泛用

于治疗心血管疾病和脑血管疾病^[2]。丹参素是丹参的水溶性活性成分之一, 具有抗心肌缺血及缺氧^[3]、抗心肌缺血再灌注损伤^[4]、扩张冠脉^[5]、抗心肌肥大^[6]、抗心律失常^[7]、抗血栓^[8]等多种药理作用, 对心血管系统具有明显的保护作用^[9]。前期研究表明, 丹参素钠在 SD 大鼠体内的绝对生物利用度仅为 9.84%, 作为口服制剂, 存在生物利用度低、吸收较差的问题。因此, 提高丹参口服类制剂的生物利用度研究势在必行。

脂质体是由磷脂双分子层排列而成的纳米微囊, 具有亲水和疏水能力的新型药物载体。因具有溶解度高、稳定性好^[10], 并具有促进药物靶向、增强治疗效果^[11] 以及提高生物利用度^[12-13] 等优势, 被作为药物载体广泛应用。

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研项目资助 (20164Y0101)

[作者简介] 王晶, 硕士, 主管药师, 研究方向: 临床药学, Email: laoe-wangjing@163.com

[通讯作者] 唐扣明, 主任药师, Email: menshishan@126.com

笔者对丹参素进行结构修饰,制成脂溶性更高的前药丹参素棕榈醇酯(PDSS),能更大程度地提高脂质体对药物的包封率,在体内广泛存在的酯酶作用下转化为丹参素,进一步发挥药理活性。同时,提高丹参素的生物利用度,为进一步开发口服制剂提供参考和依据。本实验采用逆向蒸发法制备 PDSS 脂质体,应用 HPLC 法建立 PDSS 的质量控制标准进行含量测定,为丹参素脂质体的进一步研究提供参考。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);BS124S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司);R-205 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);SK5210HP 水浴超声仪(上海 KUDOS 超声仪器有限公司);NANO-S 粒径仪(英国 Malvern 公司);TGL-16C 离心机(上海安亭仪器厂);Mili-QUF-PLUS 纯水仪(美国 Milipore 公司);微孔滤膜(规格:0.45 μm 和 0.22 μm)。

1.2 药品与试剂

丹参素对照品(纯度 99.6%,中国药品生物制品检定所);丹参素原料药(批号:150801,纯度 $>99\%$);PDSS(自制,纯度 $>95\%$);胆固醇(含量 $>98\%$,上海海捷生物科技有限公司);大豆卵磷脂(含量 $>97\%$,上海海捷生物科技有限公司);色谱纯甲醇、乙腈(德国默克公司);三乙胺、甲酸(国药集团化学试剂有限公司);PBS 缓冲液为自制,水为去离子水。

2 PDSS 脂质体的制备

精密称取胆固醇 5.75 mg,大豆卵磷脂 16.79 mg 和 PDSS 3.16 mg,置于 250 ml 的圆底烧瓶中,加入 20 ml 氯仿超声至完全溶解,置于旋转蒸发仪中(转速 100 r/min,水浴温度 45 $^{\circ}\text{C}$),旋蒸 1 h 除去氯仿,在圆底烧瓶上形成均匀薄膜,加入 4 ml 去离子水,非真空旋蒸 30 min(转速 60 r/min,水浴温度为 45 $^{\circ}\text{C}$),迅速冰浴超声处理(超声时间 1 min),分别用 0.45、0.22 μm 微孔滤膜各过滤 3 次,得到 PDSS 脂质体溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3 方法与结果

3.1 色谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(50:50)含 0.02%甲酸和 0.02%三乙胺水(pH 为 6~7);流速:1 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;进样

量:20 μl 。在上述色谱条件下,PDSS 峰的理论塔板数为 10 000 以上,分离度 >1.5 。

3.2 溶液的配制

3.2.1 空白脂质体溶液

按照处方比例称取大豆卵磷脂、胆固醇,按照“2”项下方法制备不加入 PDSS 的空白脂质体,去离子水破乳,得到空白脂质体溶液。

3.2.2 对照品溶液

精密称取 PDSS 对照品 1 mg,用约 1 ml 流动相溶解,配制与脂质体溶液等浓度的溶液,过膜后取 100 μl 加入 900 μl 流动相,离心,取上清液进样。

3.2.3 供试品溶液

精密量取 PDSS 脂质体 100 μl ,加入 900 μl 流动相,水浴超声 30 min,离心,取上清液进样分析。

3.3 方法学考察

3.3.1 专属性试验

取 PDSS 对照品溶液和供试品溶液,按照上述色谱条件注入液相色谱仪;另取处方辅料,置于 EP 管中,按照拟定方法制备空白对照品溶液,注入液相色谱仪,分别记录 HPLC 图(图 1),考察系统适用性。结果表明,在该色谱条件下,辅料对 PDSS 的测定无干扰。

3.3.2 线性关系考察

分别精密移取 0.5、1.5、2.5、3.5、4.0、4.5 ml 上述对照品溶液置 10 ml 棕色量瓶中,用流动相定容。用微孔滤膜过滤后,按“3.1”项下色谱条件进样。以 PDSS 峰面积(Y)为纵坐标,溶液质量浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线,得到回归方程($n=6$): $Y=82.2108X-0.6560$ ($r=0.9997$),线性范围为 0.05~0.45 mg/ml。结果表明 PDSS 在质量浓度 0.05~0.45 mg/ml 范围内线性关系良好。

3.3.3 重复性试验

取适量的 PDSS 脂质体,按照“3.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液,分别进样,测定峰面积。PDSS 平均含量为 0.2821 mg/ml,RSD 为 0.58%,表明该方法的重复性良好。

3.3.4 精密度试验

精密移取“3.2.2”项下对照品储备液适量,分别配制质量浓度为 0.05、0.25、0.45 mg/ml 的溶液,按照“3.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。连续 5 d 的 6 份样本分析,考察日内、日间精密度。低、中、高 3 个浓度的日内精密度分别为 1.58%、1.13%、1.56%;日间精密度分别为 1.16%、1.54%、1.83%。结果显示,PDSS 峰面积的 RSD 均 $<2\%$,符合定量测定要求。

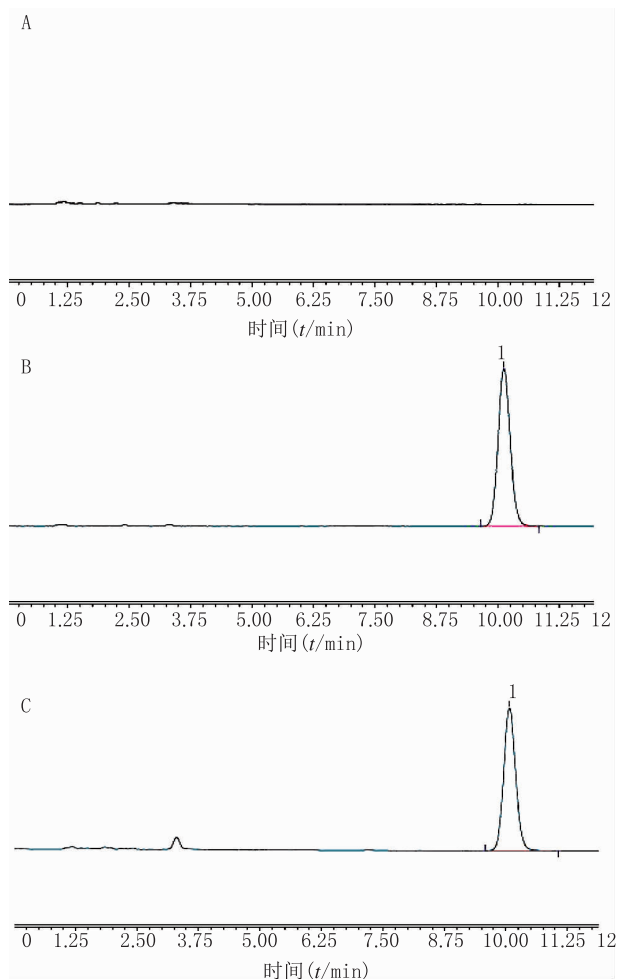


图1 丹参素棕榈醇酯 HPLC 图

A. 空白对照溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液;
1. 丹参素棕榈醇酯(PDSS)

3.3.5 稳定性试验

取同一批次(批号:20181215-1)对照品溶液和供试品溶液,分别在0、2、4、6、8、12 h依次进样,测定峰面积,其RSD分别为0.26%和1.32%,结果表明供试品溶液稳定性良好。

3.3.6 加样回收率试验

精密量取空白脂质体溶液 100 μl 共 9 份,置于 10 ml 量瓶中,分别加入质量浓度为 1 mg/ml 的 PDSS 对照品储备液 100、500、900 μl 各 3 份,用乙腈定容至刻度,摇匀,水浴超声 30 min,超速离心 10 min,取上清液进样分析。结果见表 1。

表1 PDSS 脂质体的回收率试验结果

加入量 ($\rho_{\text{B}}/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	测得量 ($\rho_{\text{B}}/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD (%)
0.050	0.053	105.90	1.81
0.250	0.257	102.80	1.22
0.450	0.433	96.20	1.66

3.4 样品含量测定

按照“2”项下方法制备 PDSS 脂质体 3 批(批号:20181215-1、20181215-2、20181215-3),按照建立的 HPLC 方法进行分析,记录色谱图,以 PDSS 峰面积按照外标法计算 3 批样品的含量。结果显示,3 批样品含量分别为 97.81%、101.20%、98.53%,RSD 为 1.2%。

3.5 脂质体包封率的测定

精密量取 1 ml 的脂质体溶液,采用低温超速离心法,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,以 3 500 r/min,离心 10 min,精密称取超滤管下层溶液 100 μl ,测得游离药物含量为 W_1 ,另外精密移取 PDSS 溶液 100 μl 加入 900 μl 乙腈并且超声破乳,测定药物含量为 W_2 ,包封率(EE)计算公式为: $\text{EE}(\%) = (W_2 - W_1)/W_2 \times 100\%$ 。结果测得 PDSS 脂质体的平均包封率为 77.2%。

4 讨论

本研究建立了丹参素棕榈醇酯脂质体含量和包封率测定的 HPLC 方法。药物的水溶性通常作为参数用以预测药物吸收率和口服生物利用度。丹参素为水溶性成分,亲脂性差、口服吸收差,导致生物利用度低。本实验通过对丹参素进行结构修饰,制成亲脂性前药,以提高丹参素的口服生物利用度。

4.1 流动相的选择

PDSS 为脂溶性药物,极性较小,不溶于水,而易溶于甲醇、乙醇、乙腈、DMSO 等有机溶剂。选择流动相时,曾选用甲醇-水-冰醋酸、乙腈-水-甲酸^[13]等体系作为流动相,流速为 1 ml/min。在甲醇-0.1%冰醋酸水体系中,多次实验后发现 PDSS 与杂质不能基线分离。通过本实验发现,采用乙腈作为流动相即可实现化合物和溶剂峰良好的分离,辅料对于 PDSS 脂质体的含量测定无干扰,能够满足检测要求。在乙腈-甲酸-水体系中,经过多次实验调整流动相比比例,得出乙腈-水(含 0.05% 三乙胺和 0.05% 甲酸)(50 : 50)为流动相。PDSS 化合物的出峰时间为 11.587 min,且辅料对 PDSS 化合物的峰值无干扰。

4.2 包封率测定方法的选择

测定脂质体包封率的方法有凝胶柱层析法、阳离子交换树脂法、超滤膜过滤法、透析法、低速离心法、逆向蒸发法等。其目的主要是有效分离脂质体和游离药物,常用的是葡聚糖凝胶柱法与离心法,但是葡聚糖凝胶法中凝胶会吸附脂质体,导致柱回收率较低,并且操作烦琐、洗脱体积大、药物浓度低,

(下转第 480 页)

- 141;111-120.
- [22] BIGGADIKE K. Fluticasone furoate/fluticasone propionate-different drugs with different properties[J]. Clin Respir J, 2011,5(3):183-184.
- [23] BIGGADIKE K, BLEDSOE R K, HASSELL A M, et al. X-ray crystal structure of the novel enhanced-affinity glucocorticoid agonist fluticasone furoate in the glucocorticoid receptor ligand binding domain [J]. J Med Chem, 2008, 51 (12): 3349-3352.
- [24] SALTER M, BIGGADIKE K, MATTHEWS J L, et al. Pharmacological properties of the enhanced-affinity glucocorticoid fluticasone furoate in vitro and in an in vivo model of respiratory inflammatory disease[J]. Am J Physiol-Lung C, 2007, 293(3):L660-L667.
- [25] VALOTIS A, HOGGER P. Human receptor kinetics and lung tissue retention of the enhanced-affinity glucocorticoid fluticasone furoate[J]. Respir Res, 2007,8:54.
- [26] ALLEN A, BAREILLE P J, ROUSELL V M. Fluticasone furoate, a novel inhaled corticosteroid, demonstrates prolonged lung absorption kinetics in man compared with inhaled fluticasone propionate[J]. Clin Pharmacokinet, 2013, 52(1):37-42.
- [27] ROSSIOS C, TO Y, TO M, et al. Long-acting fluticasone furoate has a superior pharmacological profile to fluticasone propionate in human respiratory cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 670(1):244-251.
- [28] PROCOPIOU P A, BARRETT V J, BEVAN N J, et al. Synthesis and structure activity relationships of long-acting β_2 adrenergic receptor agonists incorporating metabolic inactivation; an antedrug approach[J]. J Med Chem, 2010, 53(11): 4522-4530.
- [收稿日期] 2018-10-10 [修回日期] 2018-12-29
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 452 页)

不适用于 PDSS 包封率的测定。而低速离心法适用于溶解度小的药物且预实验结果表明,其可用于 PDSS 脂质体包封率的测定。

综上所述,本实验建立的 HPLC 法操作简便、快捷,专属性、回收率以及重复性均符合要求,能用于测定 PDSS 脂质体中 PDSS 成分的含量。

【参考文献】

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 中国心血管病报告 2016(概要)[J]. 中国循环杂志,2017,32(6):521-530.
- [2] ZHOU L M, ZUO Z, CHOW M S S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use[J]. J Clin Pharmacol, 2005, 45(12):1345-1359.
- [3] WU L, QIAO H, LI Y, et al. Protective roles of puerarin and Danshensu on acute ischemic myocardial injury in rats[J]. Phytomedicine, 2007, 14(10):652-658.
- [4] YIN Y, GUAN Y, DUAN J L, et al. Cardioprotective effect of Danshensu against myocardial ischemia/reperfusion injury and inhibits apoptosis of H₉c2 cardiomyocytes via Akt and ERK_{1/2} phosphorylation[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 699(1-3):219-226.
- [5] LAM F F, YEUNG J H, CHAN K M, et al. Relaxant effects of danshen aqueous extract and its constituent Danshensu on rat coronary artery are mediated by inhibition of calcium channels[J]. Vascul Pharmacol, 2007, 46(4):271-277.
- [6] TANG Y Q, WANG M H, LE X Y, et al. Antioxidant and cardioprotective effects of Danshensu (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxy-propanoic acid from *Salvia miltiorrhiza*) on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy in rats [J]. Phytomedicine, 2011, 18(12):1024-1030.
- [7] LE X Y. Effects of danshensu on the incidence of ischemia-reperfusion induced arrhythmia in hypertrophy rat heart[J]. Chin J Nat Med, 2009, 6(6):461-465.
- [8] WANG F, LIU Y Y, LIU L Y, et al. The attenuation effect of 3,4-dihydroxy-phenyl lactic acid and salvianolic acid B on venular thrombosis induced in rat mesentery by photochemical reaction[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2009, 42(1):7-18.
- [9] TANG Y Q, WANG M H, CHEN C L, et al. Cardiovascular protection with Danshensu in spontaneously hypertensive rats [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(10):1596-1601.
- [10] LIU D, HU H Y, LIN Z X, et al. Quercetin deformable liposome; Preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo[J]. J Photochem Photobiol B, 2013, 127:8-17.
- [11] SLINGERLAND M, GUCHELAAR H J, GELDERBLOM H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road [J]. Drug Discov Today, 2012, 17 (3-4): 160-166.
- [12] 纪周新,刘琳琳,李艺养,等. 丹参素脂质体的制备及体外释放度研究[J]. 中国药师, 2015, 18(10):1649-1651, 1660.
- [13] GUO X J, FAN X J, QIAO B, et al. A lipophilic prodrug of Danshensu: preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation[J]. Chin J Nat Med, 2017, 15(5):355-362.
- [收稿日期] 2019-02-14 [修回日期] 2019-05-06
[本文编辑] 李睿旻