

草苔虫内酯冻干脂质体的制备及质量评价

俞园媛, 陈建明* (第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的:制备草苔虫内酯冻干脂质体,建立该脂质体的质量标准。方法:采用经典的旋转薄膜分散法制备草苔虫内酯脂质体,以氯仿为脂质溶媒,旋转蒸发挥发有机溶剂,水化后探针超声乳化,加入支撑剂后冻干即得。采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定草苔虫内酯冻干脂质体的含量,以Agilent C₁₈为色谱柱,以甲醇-水75:25(0~38 min),73.7:26.3(38~45 min),79:21(45~48 min)为流动相;柱温为25℃;流速为1.5 ml/min;紫外检测波长为228 nm。采用Zetasizer粒径测定仪测定脂质体粒径;采用离心超滤法测定脂质体的包封率。结果:草苔虫内酯冻干脂质体粒径大小均匀,平均粒径0.423 μm;RP-HPLC法测定,在44~220 μg/ml浓度范围内线性关系良好, $r=0.9998$;日内和日间精密度均良好(RSD<2%);高、中、低(88、110、132 μg/ml)3个浓度的回收率分别为100.8%、98.4%、100.9%;最低检测限4.4 ng;最低定量限为17.6 ng;脂质体包封率达98.68%。结论:本制备方法适于制备草苔虫内酯脂质体,所建立的分析方法准确可靠,重现性好、操作简便、专属性强,符合质量测定要求。

[关键词] 草苔虫内酯;脂质体;含量;包封率

[中图分类号] R 944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1254-04

Preparation and quality evaluation of bryostatins freeze-dried liposomes

YU Yuan-yuan, CHEN Jian-ming* (Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare bryostatins freeze-dried liposomes and to establish a quality standard for the liposomes. **Methods:** Film dispersion technique was used to encapsulate bryostatins with liposomes. Chloroform was taken as the solvent and was volatilized by revolving. Emulsification was performed with the probe after hydration, then the supporting agent was added for freeze drying. An RP-HPLC method was developed to determine the freeze-dried liposome content. The separation was performed with a Agilent C₁₈ Column and the mobile phase was methanol-water in gradient elution 75:25(0-38 min), 73.7:26.3(38-45 min), 79:21(45-48 min) by a flow rate of 1.5 ml/min, with the UV detector set at 228 nm. Zetasizer was used to determine the size of liposomes and the entrapment efficiency was determined with centrifugal ultrafilter. **Results:** The freeze-dried liposomes were homogeneous and the mean diameter was 0.423 μm. The standard curve was linear over the range of 44-220 μg/ml, $r=0.9998$. The intra-day and inter-day RSDs were less than 2.0%. The recoveries of the high, middle and low concentrations (88, 110, and 132 μg/ml) were 100.8%, 98.4%, and 100.9%, respectively. The detection limit was 4.4 ng, the quantitation limit was 17.6 ng, and the entrapment efficiency was 98.68%. **Conclusion:** The film dispersion technique is suitable for preparation of bryostatins liposomes. The method in this study is easy-to-use, accurate, and with good repeatability.

[KEY WORDS] bryostatins; liposome; content; entrapment efficiency

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11):1254-1257]

草苔虫内酯是来源于海洋生物总合草苔虫中的大环内酯类化合物,对多种肿瘤细胞株具有很强的细胞毒作用,草苔虫内酯是一类极具开发前景的抗肿瘤药物。1982年美国 Pettit 教授所领导的小组首先分离并鉴定了草苔虫内酯(bryostatin) 1^[1],发现其对 P388 淋巴瘤白血病细胞具有很强的细胞毒活性。随后,美国、日本和中国的科学家先后从总合草苔虫中发现了 19 种草苔虫内酯^[2~5]。其中 bryostatin 1 已经在美国进入 I 期临床试验, bryostatin 4 是继 bryostatin 1 之后的另外一种处于临床试验中的药物。但是草苔虫内酯脂溶性强、不良反应大,阻碍

了它作为临床制剂的应用。为此,我们开发了草苔虫内酯脂质体,希望能克服这些问题。

本实验建立了草苔虫内酯的高效液相色谱的分析检测方法,并进行了方法学考察,对草苔虫内酯脂质体进行性质研究。

[基金项目] 上海市科委中药现代化专项基金(05DZ19714-4)。Supported by Fund for Modernization of Traditional Chinese Herbs of Shanghai of Science and Technology Committee(05DZ19714-4)。

[作者简介] 俞园媛,硕士。E-mail: yuyuan@ sina.com

* Corresponding author. E-mail: yjcjm@163.com

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Agilent 高效液相色谱 (1100 型); Agilent C₁₈ 色谱柱 (Agilent Technologies); BS124S 型电子天平 (德国赛多利斯公司); NANO-S 型 Zetasizer 纳米粒径分析仪 (英国马尔文仪器公司); 超滤离心管 (美国 Millipore 公司); TGL-16C 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); JY92-N 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 草苔虫内酯 (由第二军医大学药学院海洋药物研究室提供, 纯度 98%); 空白脂质体 (自制); 水为去离子蒸馏水; 其余试剂均为分析纯。

1.2 脂质体的制备 采用薄膜分散法制备草苔虫内酯脂质体, 规格为 0.5 mg/ml。精密称取大豆磷脂 1.0 g、胆固醇 0.15 g 及草苔虫内酯 25 mg 共溶于 20 ml 氯仿中, 所得溶液置 250 ml 梨形瓶中, 水浴温度为 37 ℃、压力为 0.1 MPa、转速为 80 r/min 下旋转蒸发, 除去有机溶剂, 在梨形瓶内壁上形成均匀的薄膜后加入 50 ml 蒸馏水, 继续在 37 ℃ 水浴常压下旋转洗膜 45 min, 得脂质体混悬液^[6], 将该混悬液于 500 W 探针超声处理 10 min, 得稳定的草苔虫内酯脂质体, 调节 pH 值至 6.5, 加入 7.5 g 的甘露醇, 溶解, 置 -50 ℃ 超低温冰箱中预冻 12 h 后在冷冻干燥机中冻干, 即得。

1.3 脂质体粒径的测定 取重建草苔虫内酯脂质体溶液适量, 采用 Zetasizer 粒径测定仪测定粒径, 以蒸馏水为分散介质, 测定温度为 25 ℃, 黏度为 0.887 2 MPa·s, 此仪器所测定的粒径范围为 0.6 ~ 6 000 nm。

1.4 脂质体中草苔虫内酯含量测定方法的建立

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Agilent C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水, 二元梯度洗脱: 75 : 25 (0 ~ 38 min), 73.7 : 26.3 (38 ~ 45 min), 79 : 21 (45 ~ 48 min); 流速: 1.5 ml/min; 紫外检测波长: 228 nm; 进样量: 20 μl; 柱温: 25 ℃。

1.4.2 方法的专属性考察 本实验所用的草苔虫内酯主要含有 bryostatin 4、5、8、10 等多种成分^[7], 由于 bryostatin 5 出峰时间最短, 分离度较好, 含量较高, 因此本研究选用 bryostatin 5 作为主要的定量成分。取 bryostatin 5 对照品溶液、空白冻干脂质体破乳液和草苔虫内酯冻干脂质体水合后破乳液各 20 μl 进样分析。

1.4.3 线性关系考察 取 60 ℃ 减压干燥至恒重的 bryostatin 5 对照品约 11 mg, 精密称定, 置 10 ml 容量瓶中 (1.1 mg/ml), 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得对照品储备液; 精密量取对照品储备液适量, 用甲醇定量稀释成 44、88、110、132、220 μg/ml 不同浓度的溶液, 摇匀, 同法配制 3 份。吸取上述各溶液 20 μl 分别进样。

1.4.4 检测灵敏度考察 取线性关系项下的稀溶液, 用甲醇稀释成 bryostatin 5 0.1、0.2、0.25、0.5 μg/ml 4 个浓度的溶液, 以空白流动相 (甲醇 : 水 = 75 : 25) 做对照, 仪器灵敏度 AUFS 为 -0.000 5 ~ +0.000 5, 依次进样 20 μl, 在 228 nm 处检测, 考察信噪比 S/N (信号峰高/噪声峰高) 为 3 时的样品浓度。

1.4.5 定量限考察 取线性关系项下的稀溶液, 用甲醇稀释成 bryostatin 5 0.2、0.5、0.8、1.0 μg/ml 4 个浓度的溶液, 以空白流动相 (甲醇 : 水 = 75 : 25) 做对照, 仪器灵敏度 AUFS 为 -0.000 5 ~ +0.000 5, 依次注入 20 μl, 在 228 nm 处检测, 考察信噪比 S/N 为 10 时的样品浓度。

1.4.6 精密度实验 取标准溶液 (110 μg/ml), 分别在日内 (0、3、6、9、12 h)、日间 (0、1、2、3、4 d) 的规定实验时间内进样。

1.4.7 回收率实验 于 3 个 10 ml 容量瓶中加入准确配制的 1.1 mg/ml bryostatin 5 的甲醇溶液各 0.8、1.0、1.2 ml, 再分别精密移取空白脂质体 2 ml 于上述容量瓶中, 各加入甲醇溶液破乳并定容, 摇匀得高、中、低 3 个浓度的样品溶液。分别进样 20 μl, 测定峰面积, 重复 3 次。

1.4.8 样品的含量测定 精密量取重建草苔虫内酯脂质体溶液 2 ml 于 10 ml 容量瓶中, 加甲醇溶液破乳并定容, 摇匀得供试品溶液。进样 20 μl, 测得草苔虫内酯的峰面积, 重复 3 次, 代入标准曲线方程计算出草苔虫内酯的含量。

1.5 脂质体包封率的测定 取适量草苔虫内酯冻干脂质体, 加入注射用水适量, 轻摇, 取 5 ml 该溶液, 置超滤膜分子质量截留值为 50 000 的超滤器中, 15 000 r/min 离心 3 min, 取澄清的离心液适量, 用甲醇稀释至适当浓度, 20 μl 进样, 测定峰面积后根据标准曲线计算游离药物含量 m_{free} ; 根据 1.4.8 项计算得脂质体中药物的总含量 m_{tot} , 并按公式计算药物包封率 En (%) : En (%) = $(m_{tot} - m_{free}) /$

$m_{tot} \times 100\%^{[8]}$,式中 m_{tot} 和 m_{free} 分别表示脂质体中药物总含量和游离药物含量。

1.6 脂质体稳定性考察 将密封于西林瓶中的样品于 (40 ± 2) 下放置 0、1、2、3、6 个月,考察脂质体外观、粒径、含量等的变化,并以 0 个月时脂质体中草苔虫内酯的含量为 100%,其他各时间药物含量与之作比较,计算出药物含量变化的百分率。

2 结果

2.1 形态和粒径 该方法制得的草苔虫内酯冻干脂质体呈疏松、白色固体状态,水分散性好。结果显示重建的草苔虫内酯冻干脂质体粒径大小均匀;粒径基本呈正态分布,平均粒径为 $0.423 \mu\text{m}$ (图 1)。

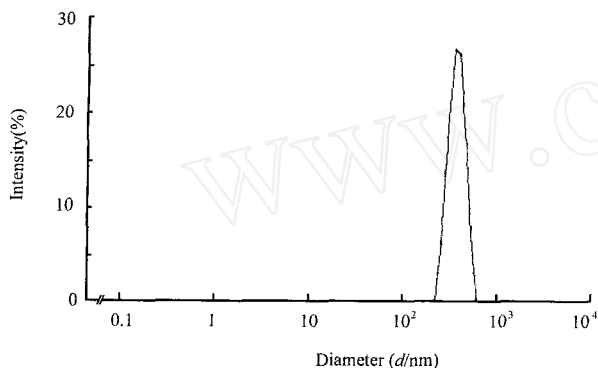


图 1 草苔虫内酯脂质体粒径分布图

Fig 1 Size distribution profile of bryostatins liposomes derived from bryostatins freeze-dried liposomes

2.2 草苔虫内酯脂质体的含量测定

2.2.1 方法专属性 由图 2 可知,辅料峰出峰时间为 12 min 左右,而 bryostatin 5 的出峰时间为 27 min 左右,因此辅料对药物测定无干扰。

2.2.2 线性关系 以浓度 (c) 为横座标、bryostatin 5 的峰面积 (A) 为纵座标进行线性回归,得回归方程 ($n=3$): $A = 11.358 c - 225.6$, $r = 0.9998$ 。线性范围为 $44 \sim 220 \mu\text{g/ml}$ 。

2.2.3 最低检测限和定量限 通过信噪比 $S/N > 3$ 检验,确定本色谱系统对 bryostatin 5 的最低检测限为 4.4 ng 。通过信噪比 $S/N > 10$ 检验,确定本色谱系统对 bryostatin 5 的定量限为 17.6 ng 。

2.2.4 方法精密度 实验结果表明重复性较好, bryostatin 5 峰面积日内 $RSD = 1.29\%$ ($n=5$),日间 $RSD = 1.34\%$ ($n=5$),均小于 2.0% ,可以满足定量分析的要求。

2.2.5 回收率 计算回收率 ($n=3$) 分别为 100.8% 、 98.4% 、 100.9% ; RSD 分别为 0.98% 、 1.32% 、 1.26% 。

2.2.6 样品含量测定 3 批草苔虫内酯脂质体中草苔虫内酯的测定结果(标示量)分别为 101.5% 、 97.8% 、 103.6% ; RSD 分别为 1.29% 、 1.06% 、 1.45% 。

2.3 草苔虫内酯冻干脂质体的封装率 通过测定脂质体中游离药物含量和药物总含量,得脂质体的封装率为 98.68% (表 1)。

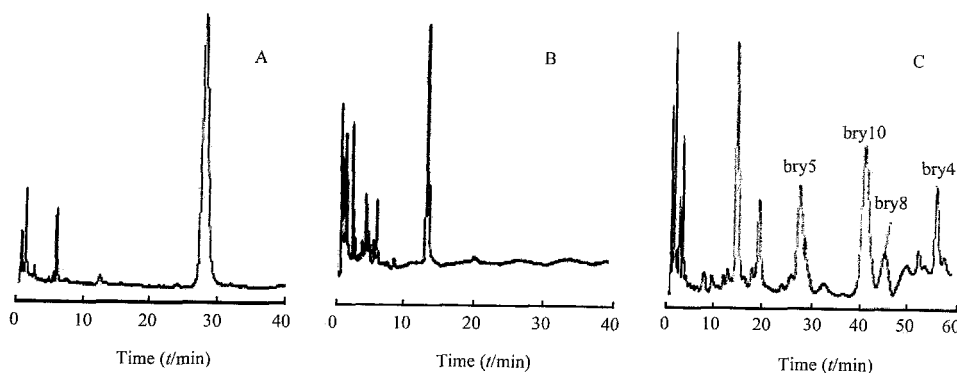


图 2 草苔虫内酯 5 对照品(A)、空白脂质体(B)、草苔虫内酯脂质体(C)色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of bryostatins reference substance(A), blank liposomes(B), and bryostatins liposomes(C)

表 1 草苔虫内酯冻干脂质体的封装率

Tab 1 Entrapment efficiency of bryostatins freeze-dried liposomes

(n = 3)				
No.	m_{tot} (mB/ μ g)	m_{rec} (mB/ μ g)	En (%)	RSD (%)
1	111.65	1.412	98.73	1.56
2	107.58	2.195	97.96	1.68
3	113.96	0.741	99.35	1.95

2.4 脂质体稳定性考察 样品于(40 ±2) 恒温箱中放置 0、1、2、3、6 个月后表现良好, 粒径和药物含量均变化不大(表 2)。

表 2 草苔虫内酯冻干脂质体稳定性结果

Tab 2 Stability of bryostatins freeze-dried liposome

(n = 3)			
Time (t/ month)	Appearance	Particle diameter (d/ μ m)	Content efficiency (%)
0	Loose white solid	0.423	98.68
1	Loose white solid	0.435	98.32
2	Loose white solid	0.451	99.26
3	Loose white solid	0.456	98.02
6	Loose white solid	0.459	97.98

3 讨论

草苔虫内酯是一类具有相同母核的大环内酯类化合物, 本实验所用的草苔虫内酯其主要成分是 bryostatin 4、5、8、10, 我们在室温下以 73.7% ~ 79% 的甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱, 虽然保留时间较长, 但 bryostatin 4、5、8 和 10 各峰的峰形和分离度均良好, 该色谱条件用于制剂的检测不受干扰杂质的影响, 效果较好。在用 HPLC 检测过程中发现, bryostatin 5 由于极性较大, 能够实现完全

分离检测; 而其他草苔虫内酯成分易受杂质干扰, 无法满足基线分离的要求。因此, 以 bryostatin 5 为考察对象, 进行了草苔虫内酯的方法学考察。

将草苔虫内酯制成脂质体有利于提高药物的靶向性, 降低药物的毒性反应, 以更好地发挥草苔虫内酯抗肿瘤疗效; 制成冻干脂质体有利于提高药物的稳定性。本研究制得的草苔虫内酯冻干脂质体呈疏松、白色固体状态, 水分散性好, 脂质体粒径分布均匀, 药物封装率高, 具有很好的实际应用前景。

[参考文献]

- [1] Pettit GR, Herald CL, Doubek DE, et al. Isolation and structure of bryostatin 1 [J]. J Am Chem Soc, 1982, 104: 6846-6848.
 - [2] Pettit GR, Kamano Y, Herald CL. Isolation and structure of bryostatin 10 and 11 [J]. J Org Chem, 1987, 52: 2848-2854.
 - [3] Sako T, Yuspa SH, Herald CL, et al. Partial parallelism and partial blockage of bryostatin 1 of effects of phorbol ester tumor promotes on primary mouse epidermal cells [J]. Cancer Res, 1987, 47: 5445-5450.
 - [4] 林厚文, 易杨华, 李文林, 等. 中国南海总合草苔虫中新的抗癌活性成分 bryostatin 19 [J]. 中国海洋药物, 1998, 17(1): 1-3.
 - [5] 林厚文, 姚新生, 易杨华, 等. 中国南海总合草苔虫中抗肿瘤活性成分研究. Bryostatin 4-6 的分离鉴定及其体外抗肿瘤活性 [J]. 中国海洋药物, 1998, 17(3): 1-6.
 - [6] 罗霄, 宋民宪, 蒲旭峰, 等. 灯盏花素脂质体的制备工艺 [J]. 华西药理学杂志, 2006, 21: 54-56.
 - [7] 孙鹏, 李玲, 易杨华, 等. 高效液相色谱-质谱法鉴定总合草苔虫中的草苔虫内酯成分 [J]. 色谱, 2004, 3: 144-146.
 - [8] 雷国峰, 陈琳, 邓英杰, 等. 超滤法-HPLC 法测定灯盏花素脂质体封装率 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23: 237-239.
- [收稿日期] 2006-07-27 [修回日期] 2006-10-30
[本文编辑] 尹茶

《腔内泌尿外科彩色图谱》已出版

本书由谷现恩、刘瑞强、闫治安主编, 共分 5 章, 介绍尿道、前列腺、膀胱、输尿管及肾盂疾病的病理、临床表现、影像学检查结果, 并重点介绍了经尿道前列腺电切术、钬激光前列腺剜出术、经尿道膀胱肿瘤电切术、经尿道输尿管镜取石术及经皮肾镜取石术等, 插图 490 余幅, 供泌尿外科临床和技术人员参考阅读。

由第二军医大学出版社出版、发行, ISBN 7-81060-528-3, 定价: 120.00 元。

订购电话: 021-65493093, 地址: 上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科, 邮编: 200433