

高效液相色谱法测定葫芦素 B 人血清白蛋白纳米粒中药物含量

王 宁,邓意辉,王绍宁,周欣羽,赵 静,沈 琳,董晓辉
(沈阳药科大学药学院,沈阳 110016)

[摘要] 目的:建立葫芦素 B 人血清白蛋白纳米粒中药物含量的测定方法。方法:采用 Diamonsil C_{18} 柱 (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);以乙腈-水-磷酸 (45:55:0.1) 作为流动相;流速为 1 mL $\cdot$ min⁻¹;检测波长为 228 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C。结果:在本实验条件下蛋白纳米粒中辅料对葫芦素 B 的测定无干扰,在 1.0~20 mg $\cdot$ L⁻¹ 浓度范围内线性关系良好 ($r=0.9999$, $n=5$),葫芦素 B 平均回收率为 100.2%,RSD 为 0.8% ($n=3$)。结论:本法准确可靠,简便易行,可用于葫芦素 B 人血清白蛋白纳米粒中药物含量的测定。

[关键词] 葫芦素 B;人血清白蛋白纳米粒;高效液相色谱法;含量测定

[中图分类号] R286.91;R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2007)23-1968-03

Determination of cucurbitacin B in human serum albumin nanoparticles by HPLC

WANG Ning, DENG Yi-hui, WANG Shao-ning, ZHOU Xin-yu, ZHAO Jing, SHEN Lin, DONG Xiao-hui
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of cucurbitacin B in human serum albumin nanoparticles. **Methods:** The separation was performed on a Diamonsil C_{18} column (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) at 30 $^{\circ}$ C, and the mobile phase was acetonitrile-water-phosphoric acid (45:55:0.1), the flow rate was 1 mL $\cdot$ min⁻¹. Cucurbitacin B was detected at 228 nm. **Results:** The linear range of cucurbitacin B was in the range of 1.0~20 mg $\cdot$ L⁻¹ ($r=0.9999$, $n=5$). The average recovery of cucurbitacin B was 100.2%, and RSD was 0.83% ($n=3$). **Conclusion:** An accurate and simple method was established for the determination of cucurbitacin B in human serum albumin nanoparticles.

[Key words] cucurbitacin B; human serum albumin nanoparticle; HPLC; assay

葫芦素 (cucurbitacins) 是从葫芦科植物中提取得到的苦味苷元成分,是一类高度氧化的四环三萜类化合物,至今已发现几十种。葫芦素是一类水难溶性化合物,目前国内仅有葫芦素 BE 片剂用于临床,但其毒副作用明显^[1]。据报道,葫芦素 B、D、E, 都具有比阳性对照物多柔比星更强的抗癌活性,而其中葫芦素 B (cucurbitacin B, CuB) 对人结肠、乳腺、肝脏及中枢神经系统的癌细胞均表现出最强的生长抑制作用^[2]。

为降低毒性,提高生物利用度,本实验室对市售的葫芦素混合物进行分离纯化后得到单一的 CuB, 并根据其疏水性,成功地用高压乳化法制备了 CuB 的人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 纳米粒。近年来,白蛋白纳米粒作为新型的药物传递系统受到了广泛的关注,由于其具有生物相容性、毒性及刺激性低、无抗原性,并且相对容易制备,同时可实现靶向和缓释作用等优点,白蛋白纳米粒常被作

为药物甚至反义寡核苷酸的良好载体^[3]。白蛋白是向细胞输注营养的蛋白质,能够在迅速生长的肿瘤组织中蓄积,使药物定向释放至肿瘤细胞,提高疗效。由美国生命科学公司 (American bioscience) 开发的紫杉醇蛋白纳米粒注射液 (paclitaxel, ABRAXANE) 已获得美国 FDA 批准上市^[4]。白蛋白纳米粒作为成功的抗肿瘤药物载体展现出广阔的开发前景。

作为一种具有较强抗肿瘤活性的中草药提取成分,CuB 新剂型的研究开发具有重要意义。目前国内外尚未见到关于 CuB HSA 纳米粒的报道,为了对所制备的 CuB HSA 纳米粒进行有效的质量控制,本实验建立了用高效液相色谱法测定 CuB HSA 纳米粒中 CuB 含量的方法。

仪器与试剂

高效液相色谱仪 (P230 高压恒流泵, UV228 紫

外可见检测器, HW-2000 色谱数据处理工作站, 大连依利特科学仪器有限公司); Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm, 迪马公司)。葫芦素原料药 (天津药物研究院药业有限责任公司, 批号: 050701, 纯度 67.91%, HPLC 面积归一化法测定); CuB 纯品 (本实验室自制, 批号: 20060907, 纯度 99.97%, HPLC 面积归一化法测定); 乙腈 (色谱纯, 江苏汉邦科技公司); 甲醇 (色谱纯, 江苏汉邦科技公司); 无水乙醇 (色谱纯, 天津科密欧化学试剂开发中心); 磷酸 (分析纯, 沈阳经济技术开发区试剂厂); 水为重蒸水。

由本实验室制备的 CuB HSA 纳米粒, 批号分别为 20061024 (平均粒径 137.3 nm); 20061101 (平均粒径 138.8 nm); 20061110 (平均粒径 145.5 nm), 经 Nicomp-380 激光粒度测定仪 (美国 PSS 公司) 测定, 所有样品粒度分布均匀。

方法与结果

色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm, 迪马公司); 流动相: 乙腈-水-磷酸 (45:55:0.1); 紫外检测波长: 228 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1 mL · min⁻¹; 进样量: 20 μL。外标法测定含量。

空白辅料的干扰

分别取制备的空白 HSA 纳米粒 (除不加入主药外, 制备工艺与供试品相同) 和 CuB HSA 纳米粒 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量乙腈沉淀蛋白, 30 °C 水浴超声 (功率: 200 W, 频率: 40 kHz) 提取 5 min, 加乙腈至刻度。将提取液通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除去蛋白沉淀, 分别取 20 μL 注入高效液相色谱仪。同时取 CuB 对照品溶液 20 μL 进样。由图 1 可知空白辅料对主药的含量测定无干扰。

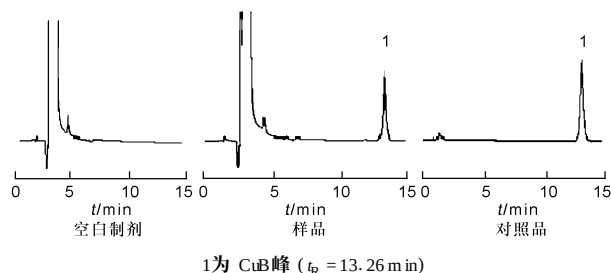


图 1 CuB 的 HPLC 色谱图

线性关系考察

精密称取 CuB 对照品 10.0 mg 置 100 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并定容至刻度 (作为储备液)。精密量取 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 分别置于 10 mL 棕

色量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即分别制得浓度为 1, 5, 10, 15 和 20 mg · L⁻¹ 的对照品溶液。分别精密量取 20 μL 进样, 记录峰面积。以峰面积 (A) 对浓度 (C, mg · L⁻¹) 绘制标准曲线, 计算线性回归方程为 $A = 155.67C - 962.43$, $r = 0.9999$ 。表明 CuB 对照品在 1.0 ~ 20 mg · L⁻¹ 浓度范围内峰面积与浓度的线性关系良好。

精密度试验

取“3”项下浓度为 10.0 mg · L⁻¹ 的 CuB 溶液 20 μL 进样, 连续测定 6 次, 记录峰面积。所得 CuB 峰面积的 RSD 值为 0.5%。

稳定性试验

取待测的 CuB HSA 纳米粒样品, 按照“2”项中提取方法处理, 最终得到的 CuB 溶液, 于室温环境下放置, 并在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别取 20 μL 进样, 记录峰面积。所得 CuB 峰面积的 RSD 值为 0.7%。说明该溶液在 12 h 内稳定。

检测限及定量限

将 CuB 对照品溶液稀释不同倍数, 分别取 20 μL 进样。信噪比为 3:1 时, 检测限为 0.625 ng。当信噪比为 10:1 时, 定量限为 2.5 ng。

回收率试验

精密量取 9 份 1.0 mL 的空白 HSA 纳米粒, 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别加入精密量取的对照品储备液 0.8, 1.0 和 1.2 mL 各 3 份, 充分混匀。加入适量乙腈沉淀蛋白, 30 °C 水浴超声提取 5 min, 加乙腈至刻度。将提取液通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤除去蛋白沉淀。另精密量取 CuB 对照品储备液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加乙腈定容至刻度, 制成 10.0 mg · L⁻¹ 的 CuB 溶液, 精密量取上述溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 计算回收率。测定结果见表 1, 该法回收率符合要求。

表 1 CuB 的回收率 $n = 3$

加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 / %	平均值 / %	RSD / %
8.0	8.126	101.6		
8.0	7.964	99.6		
8.0	7.979	99.7		
10.0	9.914	99.1		
10.0	9.976	99.8	100.2	0.8
10.0	9.968	99.7		
12.0	12.03	100.3		
12.0	12.01	100.6		
12.0	12.16	101.3		

样品含量测定结果

分别精密量取 3 批自制的 CuB HSA 纳米粒 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 按回收率项下的方法沉淀提

取,得到的供试品溶液,分别精密量取 20 μ L 注入高效液相色谱仪。另取 CuB 对照品溶液,同法测定。记录色谱峰面积,计算得到 3 批样品的含量分别为:批号 20061024 为 100.2%,批号 20061101 为 99.6%,批号 20061110 为 100.7%,RSD = 0.5%。

讨 论

本实验采用了文献报道的 CuB 的最大吸收波长作为检测波长,但文献报道的色谱条件多为甲醇-水流动相系统^[5,6],所得色谱峰有拖尾,理论塔板数较低。因此本实验采用了乙腈-水系统,并加入磷酸,改善峰形的同时缩短保留时间,提高了理论塔板数。在其他色谱条件相同的情况下,作者考察的甲醇-水(62:38)的流动相,理论塔板数仅为 2 875,而本实验所采用的流动相理论塔板数提高到 8 212,有利于 CuB 的分离检测。

由于蛋白纳米粒是一种比较特殊的制剂,所以本方法的关键之处在于选择一种合适的方法将蛋白与药物分离开来,避免其对测定产生干扰。考虑到 CuB 是一种脂溶性极强的物质,本实验选定有机溶剂沉淀蛋白的方法来处理样品,有机溶剂可破坏蛋白的水化层,使之发生沉淀反应。一方面,制剂中的蛋白被沉淀分离,另一方面脂溶性极强的药物充分溶解于有机溶剂中而被提取出来。

在本法建立的过程中,作者考察过甲醇、乙腈以及无水乙醇 3 种蛋白沉淀剂。其中甲醇产生的蛋白沉淀量较少,且不易过滤除去,有可能沉淀不完全;无水乙醇沉淀迅速,但生成较大的团块,不利于药物溶出;乙腈能够形成均匀疏松的沉淀,既能保证药物的充分提取又容易过滤除去沉淀。因此本实验选择

了乙腈作为蛋白沉淀剂。

本法较酶解蛋白然后测定的方法更为简便省时^[7]。蛋白纳米粒样品经有机溶剂沉淀提取后可直接进样测定,适合强脂溶性药物蛋白纳米粒制剂的分离检测。

[作者简介] 王宁(1982-),女,硕士研究生。联系电话:(024) 23986316, E-mail: wangning_9728@163.com。

[通讯作者] 邓意辉(1964-),男,教授,博士生导师,主要从事药物靶向新剂型的研究。联系电话:(024) 23986316, E-mail: dds-666-happy@163.com。

[参 考 文 献]

- [1] 方新德. 葫芦素类成分的化学与生物活性的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 1985, 12(3): 132 - 135.
- [2] JAYA PRAKASHAM B, SEERAM NP, NARAYAN MG. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*[J]. *Cancer Lett*, 2003, 189 (1): 11 - 16.
- [3] WARTLIK H, SPÄNKUCH-SCHMITT B, STREBHARDT K, et al. Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles[J]. *J Control Release*, 2004, 96 (3): 483 - 495.
- [4] MICHA JP, GOLDSTEIN GH, BIRK CL, et al. Abraxane in the treatment of ovarian cancer: the absence of hypersensitivity reactions[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 100 (2): 437 - 438.
- [5] 黄璐琦,姚三桃. 高效液相色谱法测定异叶马交儿根中葫芦素 B 的含量[J]. 中草药, 1994, 25(10): 555.
- [6] 李超英,候世祥,杨凯,等. 血浆中葫芦素 B 的高效液相色谱测定方法研究[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(8): 557 - 559.
- [7] 王恺,马光辉. 白蛋白药物载体的制备及表征[J]. 过程工程学报, 2004, 4(2): 156 - 159.

编辑:周卓 接受日期:2007-07-10

(上接第 1961 页)

[作者简介] 高丽梅(1974-),女,硕士,主要从事药物化学工作。联系电话:(010) 63033012, E-mail: gaolimei1205@hotmail.com。

[通讯作者] 宋丹青(1964-),女,博士,硕士生导师,主要从事药物化学工作。联系电话:(010) 63165268, E-mail: songdanqingsdq@sina.com。

[参 考 文 献]

- [1] WILLITZER H, BRAUNIGER H, ENGELMANN D. Synthese und antivirale Wirksamkeit von substituierten 5-ureido und 5-thioureido-

benzimidazolinderivaten[J]. *Pharmazie*, 1978, 33(1): 30 - 38.

- [2] VON WERNER O, KREBS D. ω -[Bis-(β -chloräthyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]propion-bzw. -buttersäuren als potentielle Cytosatatika[J]. *J Fur Praktische Chemie*, 1963, 20(4): 178 - 186.
- [3] TEICHERT J, SOHR R, BAUMANN F. Synthesis and characterization of some new phase II metabolites of the alkylator bendamustine and their identification in human bile, urine, and plasma from patients with cholangiocarcinoma[J]. *Drug Metab Dispos*, 2005, 33(7): 984 - 992.

编辑:王宇梅 接受日期:2007-06-29