

· 化学与分析 ·

两种硫酸长春新碱脂质体包封率测定方法的比较

李文静^{1,2}, 杨志强^{1,3}, 王杏林^{1,3*}

(1. 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193;
2. 天津中医药大学, 天津 300193; 3. 天津药物研究院, 天津 300193)

[摘要] 目的: 建立两种测定硫酸长春新碱脂质体包封率的方法, 并对测定结果进行比较。方法: 分别以葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱和阳离子交换树脂柱分离硫酸长春新碱脂质体和游离药物, 采用 HPLC 法测定药物含量, 计算包封率, 并用 SPSS 软件进行 *t* 检验。结果: 两种方法测定不同药脂比的硫酸长春新碱脂质体包封率, 测定结果无显著性差异。结论: 葡聚糖凝胶柱法的建立需详细考察凝胶的种类对分离度的影响; 阳离子交换树脂法分离度良好, 分离速度快, 为优选的方法。

[关键词] pH 梯度法; 硫酸长春新碱脂质体; 葡聚糖凝胶柱法; 阳离子交换树脂法; 包封率

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0071-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1540.012.html>

[网络出版时间] 2012-05-15 15:40

Comparison of Two Methods for Determination of Entrapment Efficiency of Vincristine Sulfate Liposome

LI Wen-jing^{1,2}, YANG Zhi-qiang^{1,3}, WANG Xing-lin^{1,3*}

(1. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin 300193, China;
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;
3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** Establish the two methods for the determination of entrapment efficiency of liposomes. **Method:** Sephadex G-50 and cation exchange resin were used to separate free vincristine sulfate from liposomes. The concentration of vincristine sulfate was determined by HPLC. The result was analyzed with SPSS. **Result:** The entrapment efficiency of the different drug loading liposome determined by the two methods was consistent. **Conclusion:** Both methods can be used to determine the entrapment efficiency of vincristine sulfate liposomes.

[Key words] pH gradient method; vincristine sulfate liposome; sephadex method; cation exchange method; entrapment efficiency

长春新碱是长春花碱类抗肿瘤药物, 主要用于治疗急性淋巴细胞白血病、何杰金氏病、恶性淋巴瘤

瘤等疾病^[1-2]。目前临床用药为硫酸长春新碱注射液, 其抗肿瘤作用良好, 但由于严重的神经毒性和组织刺激性等不良反应, 使其临床应用受到限制^[3]。脂质体作为一种理想的药物载体, 具有生物相容性^[4-5]、靶向性、缓释性、降低药物毒性等特点。大量研究表明, 将硫酸长春新碱制备成脂质体, 可以提高其治疗指数, 降低或减少药物的不良反应^[6-8]。

包封率是评价脂质体质量的重要指标, 其测定方法包括葡聚糖凝胶法、离子交换树脂法等^[9-10]。

[收稿日期] 20111229(016)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划项目 (2010CB735602)

[第一作者] 李文静, 硕士, Tel: 022-23006876, E-mail: liwenjing198610@126.com

[通讯作者] *王杏林, 研究员, Tel: 022-23006885, E-mail: wangxl@tjipr.com

文献^[11-17]报道了多种硫酸长春新碱脂质体包封率测定方法,但均未给出详细的试验方案或方法考察。本文选择葡聚糖凝胶色谱法和阳离子交换树脂法,进行了详细的试验条件筛选与方法学考察。并对两种方法的结果进行比较,验证其准确性与可靠性。

1 材料

高效液相色谱仪 (Laballiance Series III 泵, Waters486 检测器, Agilent1200 自动进样器), 硫酸长春新碱原料药 (广州汉方现代中药研究开发有限公司), 硫酸长春新碱脂质体 (自制), 空白脂质体 (自制), Triton-X 100 (天津光复精细化工研究所), Sephadex G-50 葡聚糖凝胶 (美国 Pharmacia 公司, 按湿胶球粒径分为 3 种规格: coarse 200 ~ 610 μm, medium 100 ~ 300 μm, fine 40 ~ 160 μm, 北京凌峰源生物科技有限公司产品, 干颗粒粒径 50 ~ 150 μm), 001 × 7 型阳离子交换树脂 (南开大学化工厂), 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 水为去离子水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

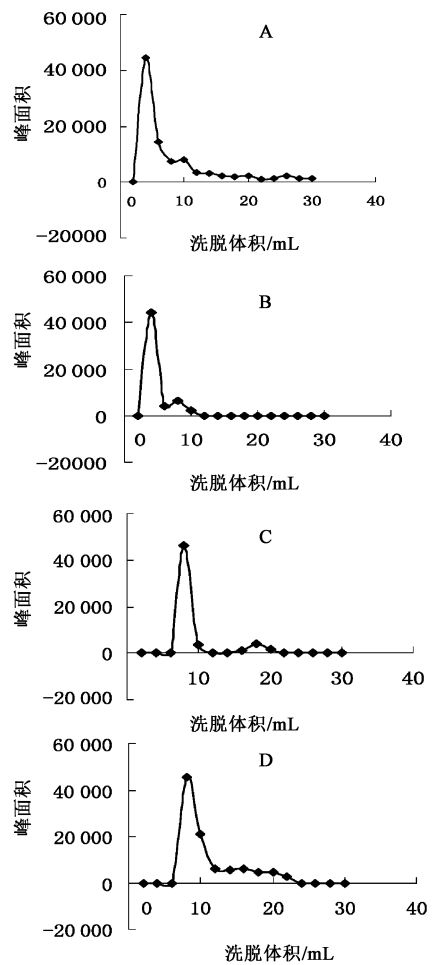
2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-三乙胺 (70:30:0.5, 用磷酸调 pH 7.0), 紫外检测波长 297 nm, 柱温 40 °C, 流速 1.2 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL。

2.2 葡聚糖凝胶柱法的建立

2.2.1 凝胶种类对凝胶柱分离能力的考察 使用 Pharmacia 生产 (进口) 的 3 种规格葡聚糖凝胶 (coarse 200 ~ 610 μm, medium 100 ~ 300 μm, fine 40 ~ 160 μm) 及北京凌峰源生物科技有限公司生产 (国产) 的葡聚糖凝胶 (粒径 50 ~ 150 μm) 填装色谱柱 (1.0 × 20 cm), 填装柱高 10 cm。测定载药脂质体的洗脱曲线, 考察凝胶种类与粒径对游离药物和脂质体分离能力的影响。

取载药脂质体溶液 0.5 mL, 滴加于凝胶色谱柱上, 以水为介质进行洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 每 2 mL 收集一份流出液, 破乳, 照 2.1 项下色谱条件测定药物峰面积。以峰面积对洗脱体积作图, 即得洗脱曲线, 见图 1。

由图 1 可知, 凝胶的产地和粒径对游离药物和脂质体的分离度有明显影响。国产凝胶无法将脂质体和游离药物完全分离, 且游离药物峰拖尾严重, 需要很大的洗脱体积才能将药物完全洗脱。Pharmacia 生产 (进口) 凝胶能完全洗脱药物, 但不同粒径分离能力有很大差异。粗颗粒和细颗粒凝胶无法将脂质体和游离药物完全分离。中颗粒凝胶的



A. 国产凝胶; B. Pharmacia 粗颗粒凝胶; C. Pharmacia 中颗粒凝胶; D. Pharmacia 细颗粒凝胶

图 1 4 种 Sephadex G-50 洗脱曲线图

分离能力好, 脂质体在 8 ~ 10 mL 被洗脱出来, 游离药物在 16 ~ 20 mL 被洗脱出来, 脂质体与游离药物的分离度高, 游离药物可在 20 mL 以内可被完全洗脱下来, 明显缩短了分析时间。因此, Pharmacia 公司生产的中颗粒凝胶为最优。

2.2.2 上样量的考察 分别取硫酸长春新碱脂质体 0.3, 0.5, 1.0 mL 上样, 以硫酸长春新碱的回收率和洗脱曲线是否拖尾为评价指标来确定最佳的上样量。结果见表 1。

表 1 上样量选择 (n = 3)

上样量/mL	回收率/%	拖尾
0.3	97.32	无
0.5	96.95	无
1.0	98.28	有

由表 1 可知, 上样量为 0.3, 0.5 mL 时, 回收率较高且无拖尾现象; 上样量为 1.0 mL 时, 回收率满足方法学要求, 但由于上样量过大, 导致葡聚糖凝胶

柱过载,有拖尾现象的产生。考虑到减小误差及操作的方便性,最终优选 0.5 mL 作为上样量。

2.2.3 游离药物的回收率 取低($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、中($1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、高($2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)3 个质量浓度的硫酸长春新碱溶液 0.5 mL 各 2 份。1 份用去离子水稀释至 50 mL。另 1 份滴加于葡聚糖凝胶柱顶端,用水洗脱。于 50 mL 量瓶,定容至刻度,摇匀。照 2.2.1 项下色谱条件测定。结果表明,葡聚糖凝胶柱对游离硫酸长春新碱不吸附,回收率在 98% 以上。

2.2.4 空白脂质体的回收率 采用浊度法考察葡聚糖凝胶柱对空白脂质体的吸附情况。将空白脂质体稀释至质量浓度为 $2.5, 5.0, 10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。取 0.5 mL 上述 3 种空白脂质体各 2 份,一份用于 25 mL 量瓶中直接定容;另一份加于葡聚糖凝胶柱顶端,用水洗脱并收集 0~13 mL 洗脱液于 25 mL 量瓶中,用水定容至刻度,摇匀。用紫外分光光度计在 450 nm 下测定脂质体浊度,结果见表 2。

表 2 葡聚糖凝胶柱对空白脂质体的回收($n=3$)

$C/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	A_1	A_2	回收率/%
2.5	0.041	0.040	97.56
5.0	0.074	0.072	97.33
10.0	0.161	0.155	97.27

注: A_1 ,通过葡聚糖凝胶柱前空白脂质体的浓度; A_2 ,通过葡聚糖凝胶柱后空白脂质体的浓度。

由表 2 可知,葡聚糖凝胶色谱柱对空白脂质体基本无吸附,回收率 $>97\%$,符合方法学要求。

2.2.5 方法回收率 取 0.5 mL 硫酸长春新碱脂质体 2 份。1 份加于葡聚糖凝胶柱顶端上样,收集 0~30 mL 的洗脱液至 50 mL 量瓶,加入适量 10% 的 Triton-X 100 破乳,去离子水定容至刻度。照 2.1 项下色谱条件测定其含药量(m_1)。另 1 份直接加入到 50 mL 量瓶中,加水适量,混匀后加入适量 10% 的 Triton-X 100,振摇破乳,去离子水定容至刻度。HPLC 测得含药量(m_2),回收率为 $m_1/m_2 \times 100\%$ 。平行操作 3 次。结果表明,葡聚糖凝胶柱对硫酸长春新碱脂质体的平均回收率为 97.50%,RSD $<2\%$,满足方法学要求。

2.3 阳离子交换树脂法的建立

2.3.1 阳离子交换树脂柱的制备 取适量阳离子交换树脂进行酸碱预处理,用去离子水洗至中性后装于色谱柱(2.0 cm \times 20 cm)中,填装柱高 10 cm,去离子水洗脱平衡,待用。

2.3.2 阳离子交换树脂柱对空白脂质体的吸附 采用浊度法考察阳离子交换树脂柱对空白脂质体的吸附情况。具体操作同 2.2.5,结果表明空白脂质体可从阳离子柱上完全洗脱下来,回收率 $>98\%$ 。

2.3.3 阳离子交换树脂柱对硫酸长春新碱水溶液的吸附 取低($0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),中($1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),高($2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)3 个浓度的硫酸长春新碱溶液 0.5 mL 加于阳离子交换树脂柱顶端,收集洗脱液,HPLC 法测定药物含量。结果显示,每次过柱后药物的峰面积均为 0,表明阳离子交换树脂柱对硫酸长春新碱溶液完全吸附。

2.3.4 阳离子交换树脂柱对空白脂质体与药物物理混合液中硫酸长春新碱的吸附 精密量取 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸长春新碱溶液 1.0,3.0,5.0 mL 至 10 mL 量瓶中,分别加入空白脂质体 1.0 mL,用去离子水稀释至刻度,摇匀,得硫酸长春新碱质量浓度分别为 $0.5, 1.5, 2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的物理混合物。将物理混合物加于阳离子交换树脂柱顶端,收集洗脱液,破乳测定药物含量。结果显示,药物含量均为 0,表明阳离子交换树脂柱对空白脂质体和硫酸长春新碱物理混合液中的硫酸长春新碱完全吸附。

2.4 包封率的测定 取 $1.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 VCR 储备液 0.5 mL,至 250 mL 量瓶内,加入 10% 的 Triton-X 100 溶液 1.0 mL,去离子水定容至刻度,得 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 VCR 对照品溶液,HPLC 测定其峰面积。取 0.15 mL 硫酸长春新碱脂质体至 10 mL 量瓶,加水适量,混匀后加入适量 10% 的 Triton-X 100,振摇破乳,去离子水定容至刻度。以 HPLC 测定峰面积,按外标法,计算总药量(m_{tot})。

葡聚糖凝胶柱法中,取 0.5 mL 载药脂质体上样于葡聚糖凝胶柱顶端,以水为洗脱介质。收集 5~13 mL 洗脱液,摇匀,取 5 mL 至 10 mL 量瓶,加入适量 10% 的 Triton-X100 溶液破膜,去离子水定容至刻度,摇匀,以 HPLC 测定峰面积,按外标法计算脂质体部分药物含量(m_{lip})。阳离子交换树脂法中,取 0.5 mL 载药脂质体上样于阳离子交换树脂柱顶端,以水为洗脱介质。收集 0~20 mL 洗脱液至 25 mL 量瓶,破乳,去离子水定容。以 HPLC 法测定,计算脂质体部分药物含量(m_{lip})。

根据公式包封率(EE%) = $m_{\text{lip}}/m_{\text{tot}}$ 计算药物包封率。照上述方法测定 3 批不同药脂比的脂质体包封率,并用 SPSS 统计软件对结果进行 t 检验,结果见表 3。

表 3 硫酸长春新碱脂质体包封率 (n=3)

药物含量 /脂质含量	No.	包封率/%					
		葡萄糖凝胶柱 G 50		阴离子树脂柱		RSD	P _{value}
0.05	1	82.4	1.2	83.6	2.6		
	2	81.7		84.1			
	3	80.5		80.2			
0.1	1	90.7	2.1	89.8	1.5	0.269	
	2	88.0		91.9			
	3	87.2		89.3			
0.2	1	78.1	1.2	79.2	1.1	0.800	
	2	77.5		77.5			
	3	79.3		78.8			

对比不同药脂比的硫酸长春新碱脂质体包封率, *t* 检验 *P* 均 < 0.05, 两种方法测定结果无显著性差异, 且重复性良好。

3 结论

葡聚糖凝胶柱法和阳离子交换树脂法均可用来测定硫酸长春新碱脂质体包封率, 两种方法测定结果无显著性差异。葡聚糖凝胶柱法建立时需详细考察凝胶的种类对分离度的影响, 该方法分离时间较长, 而阳离子交换树脂法分离度良好, 分离速度快, 为优选的方法。

4 讨论

葡聚糖凝胶柱色谱法无法完全分离硫酸长春新碱游离药物和载药脂质体^[12]。作者研究发现, 葡聚糖凝胶柱层析法分离长春新碱游离药物和载药脂质体确实存在一定的难度, 凝胶的产地和粒度均会影响分离效果, 需葡聚糖凝胶进行详细的筛选考察, 才能找到分离度良好的凝胶。

葡聚糖凝胶会对脂质体产生吸附^[18], 从而使载药脂质体的回收率降低, 需在测定包封率之前用空白脂质体对葡聚糖凝胶进行预饱和。亦有报道称凝胶不吸附脂质体^[12]。在本文涉及实验条件下, Pharmacia 公司生产的 3 种粒度的进口凝胶对脂质体无吸附作用, 而北京凌峰源生物科技有限公司生产的凝胶对脂质体有一定的吸附作用, 需进行预饱和。不能一概而论的认为葡聚糖凝胶对脂质体是否有明显吸附作用, 葡聚糖凝胶的内在质量是影响吸附性质的决定性因素。

硫酸长春新碱为生物碱类物质, 在溶液状态下可形成有机胺盐离子, 可通过离子交换作用, 被阳离子交换树脂完全吸附, 因而, 采用阳离子交换树脂法可有效的分离硫酸长春新碱游离药物和载药脂质

体。该方法具有样品用量少、耗时短、操作简单、成本低等优点。此外, 阳离子交换树脂还可用于脂质体生产工艺, 采用阳离子树脂可方便的除去载药脂质中的游离药物, 与凝胶过滤法相比, 可以避免载药脂质体的稀释。

[参考文献]

- [1] 杜琴, 胡兵, 沈克平. 抗癌中药配伍研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 232.
- [2] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 212.
- [3] 卢懿, 侯世祥, 陈彤. 长春花抗癌成分长春新碱研究的进展[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1006.
- [4] 熊欣, 刘淑芝, 项佳音, 等. 新型载体经皮凝胶剂的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 248.
- [5] 王森, 欧水平, 朱卫丰, 等. 柔性脂质体在中药经皮给药制剂中的应用[J]. 中国新药杂志, 2011, 17(1): 245.
- [6] 胡歌, 王华庆, 阎昭, 等. 长春新碱脂质体 I 期临床单次耐受性试验[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(7): 631.
- [7] 赵妍, 邓意辉, 孟胜男, 等. 硫酸长春新碱脂质体的释放度和药效学研究[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(1): 25.
- [8] Waterhouse D N, Madden T D, Cullis P R, et al. Preparation, characterization, and biological analysis of liposomal formulations of vincristine [M]. Methods Enzymol, 2005, 391: 40.
- [9] 李鑫, 程岚, 李学涛. 异长春花碱脂质体中主药的含量以及包封率的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 50.

HPLC 定量特征图谱在补阳还五汤质量评价中的应用

周琴妹^{*}, 张源, 陈武
(江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**采用定量特征图谱对补阳还五汤进行质量评价,以此来定量控制其煎煮液的质量。**方法:**采用 HPLC 法建立补阳还五汤特征图谱,并进行方法学考察,以芍药苷为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD,考察精密性、稳定性、重复性;建立 10 批补阳还五汤的特征图谱,并比较特征图谱的技术参数,通过计算其相关系数、夹角余弦和程度相似度,并结合数量相似度,综合评定了其质量。**结果:**精密性、稳定性、重复性考察中共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%;样品的相关系数和夹角余弦计算结果都在 0.95 以上,无法反映样品间的差异;而程度相似度的结果差异较大,能反映样品间的差异。用程度相似度结合数量相似度的方法比通过相关系数、夹角余弦等计算相似度的方法可更好的反映出不同批次样品间的差异,达到控制产品质量的目的。**结论:**该方法准确、可行,对中药质量评价是一种合理、有效的技术手段。

[关键词] 补阳还五汤; 特征图谱; 程度相似度; 数量相似度

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0075-04

Application of Quantitative Characteristic Spectrum to Quality Evaluation of Buyanghuanwutang

ZHOU Qin-mei^{*}, ZHANG Yuan, CHEN Wu
(Jiangsu Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210029, China)

[收稿日期] 20110610(004)

[基金项目] 中医药行业科研专项项目(201007010)

[通讯作者] *周琴妹,本科,主任中药师,从事中药制剂质量控制和新药开发研究, Tel:025-86529291, E-mail:joy_zhouqinmei@yahoo.com.cn

- [10] 吴瑾瑾,朱雨晴,葛卫红,等. 猕猴桃根多糖脂质体包封率测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):21.
- [11] 陈彤,侯世祥,张文生,等. 复方硫酸长春新碱脂质体包封率的 HPLC 测定[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(12):841.
- [12] 赵妍,于彬,邓意辉,等. 主动载药法制备硫酸长春新碱脂质体及其包封率的测定[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(20):1559.
- [13] NANCY L B. Optimization of liposomal retention properties of vincristine [D]. British: Univ. of British Columbia, 1994;33.
- [14] Waterhouse D N, Santos N D, Mayer L D, et al. Drug-drug interaction from the use of liposomal vincristine in combination with other anticancer drugs[J]. Pharm Res, 2001, 18(9):1331.
- [15] Zhigaltsev I V, Maurer N, Akhong Q F, et al. Liposome encapsulated vincristine, vinblastine and vinorelbine. A comparative study of drug loading and retention [J]. J Control Release, 2005, 104(1):103.
- [16] Johnston M J, Semple S C, Klimuk S K, et al. Characterization of the drug retention and pharmacokinetic properties of liposomal nanoparticles containing dihydrosphingomyelin [J]. Biochim et Biophys Acta, 2007(768): 1121.
- [17] Masahiro Y, Kyoko T, Masayuki A, et al. Release of drugs from liposomes varies with particle size [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(5): 963.
- [18] 张灵芝. 脂质体的制备及其在生物医学中的应用 [M]. 北京:北京医科大学、协和医科大学联合出版社, 1998:5.

[责任编辑 顾雪竹]