

异长春花碱脂质体中主药的含量以及包封率的测定

李鑫,程岚*,李学涛

(辽宁中医药大学,辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:建立异长春花碱脂质体中主药含量以及脂质体包封率的测定方法。方法:采用高效液相色谱法测定药物含量,依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.06 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾(38:62);流速 1.0 mL · min⁻¹;检测波长 215 nm;柱温 30 °C;采用葡聚糖凝胶法分离异长春花碱脂质体游离药物以测定包封率。结果:异长春花碱在 2.08 ~ 20.8 μg · mL⁻¹ 线性良好($r=0.9999$),平均加样回收率 98.64% (RSD 1.09%),所测脂质体的平均包封率为 86.83%。结论:该方法准确可靠,简单快速,重复性好,可用于异长春花碱脂质体药物含量及包封率的测定。

[关键词] 异长春花碱;脂质体;含量测定;包封率

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0050-04

Determination of Content and Entrapment Efficiency of Vinorelbine Encapsulated in Liposomes

LI Xin, CHENG Lan*, LI Xue-tao¹

(The Medicine Institute of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to determine the content and entrapment efficiency of vinorelbine encapsulated in liposomes. **Method:** The HPLC analysis was carried out on a ELITE C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.06 mol · L⁻¹ KDP buffer (38:62) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was at 215 nm and the column temperature was 30 °C. The free drug was isolated by Gel-filtration for the entrapment efficiency determination. **Result:** The linear range of vinorelbine was 2.08 ~ 20.8 μg ($r = 0.9999$). The average recovery was 98.64% (RSD 1.09%). The average entrapment efficiency was 86.83%. **Conclusion:** This method is simple, precise and replicable and it can be used to determine the content of total vinorelbine in liposomes and entrapment efficiency.

[Key words] vinorelbine; liposome; content determination; entrapment efficiency

异长春花碱(vinorelbine, VRB)是从长春花 *Catharathus roseus* (L) G. Don 提取出来的 1 种半合成的长春花生物碱。现代药理研究表明异长春花碱通过作用于肿瘤细胞微管蛋白而干扰肿瘤细胞代谢,临床主要用于治疗急性淋巴细胞白血病、何杰金及非何

杰金淋巴瘤,也用于乳腺癌、支气管肺癌、软组织肉瘤及神经母细胞瘤等^[1-2]。将异长春花碱用脂质体为载体进行包裹,可以把药物靶向到患者的病变组织^[3],同时可以减少药物对患者其他组织及外周血管的不良反应^[4]。本文以 HPLC 测定脂质体中 VRB 的含量,并通过葡聚糖凝胶法测定 VRB 脂质体的包封率。

1 仪器与试剂

安捷伦 LC-1100 液相色谱仪(G21771AA-UV 检测器、安捷伦色谱工作站),KQ3200 超声波清洗器(江苏昆山),AY220 电子分析天平(SHIMADZU),RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),DF2101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义市

[收稿日期] 20100508(003)

[基金项目] 辽宁中医药大学青年药学人才基金(yxrc0911)

[第一作者] 李鑫,在读硕士研究生,主要从事靶向制剂的研究,E-mail:lixin850801@126.com

[通讯作者] *程岚,硕士生导师,副教授,新药研究与开发。Tel:0411-87586010, E-mail:sychenglan@163.com

予华仪器厂)。

异长春花碱对照品(美国 Sigma 公司,含 C₄₅H₅₄N₈ 纯度 >99.0%,批号 FOC242);异长春花碱(海南国栋药业有限公司,20080512),注射用大豆卵磷脂(上海太伟磷脂有限公司,20080126),胆固醇(上海惠兴生化试剂有限公司,20080113),Sephadex G-50(上海华蓝化学科技有限公司),TritonX-100(北京赛百盛生物工程公司),乙腈(色谱纯),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 VRB 脂质体的制备 取处方量的 VRB、卵磷

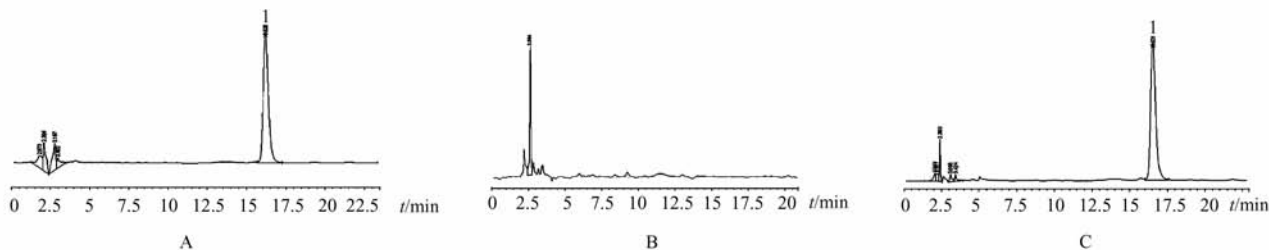


图 1 异长春花碱脂质体高效液相色谱图

A. 对照品溶液;B. 空白脂质体;C. 供试品溶液;1. 异长春花碱

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取 VRB 脂质体 1.0 mL,用 TritonR X-100 破乳,超声 10 min,再加入 0.1 mmol·L⁻¹的氢氧化钠 1.0 mL,将溶液转移至 60 mL 分液漏斗中,加入乙醚 30 mL,密塞,剧烈震荡 1 min,静置,分出乙醚层置蒸发皿中,乙醚液水浴蒸干,用流动相定容至 2 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取 VRB 对照品 10.4 mg 至 100 mL 量瓶内,用流动相使其溶解,加流动相至刻度,制备成 104.0 mg·L⁻¹的 VRB 标准液,即得。

2.2.4 空白溶液的制备 制备出不含 VRB 的脂质体,再按供试品溶液方法制备,即得。

2.2.5 线性关系的考察 精密量取上述标准液用流动相稀释成质量浓度分别为 2.08, 5.2, 10.4, 15.6, 20.8 mg·L⁻¹的系列标准溶液,按照 2.2.1 项下色谱条件进行操作,测定色谱峰面积,以进样量(mg·L⁻¹)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程为 $Y = 4.00 \times 10^4 X - 10.205$ ($r = 0.9999$),结果表明 VRB 在 2.08 ~ 20.8 mg·L⁻¹ 内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 取 10.4 mg·L⁻¹的对照品溶液,按照 2.2.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,测定

脂、胆固醇溶于 10 mL 氯仿中,39.5 °C 下减压旋转蒸发 60 min 除去氯仿,保持水浴温度 39.5 °C,将形成的均匀白色薄膜加入 25 mL pH 7.6 磷酸盐缓冲液,水化 30 min,超声 20 min(50 KHz),过 0.45 μm 微孔滤膜,即得^[5]。

2.2 脂质体中主药含量的测定

2.2.1 色谱条件的选择 依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.06 mol·L⁻¹磷酸二氢钾(38:62)为流动相,柱温 30 °C,检测波长为 215 nm,流速为 1.0 mL·min⁻¹,进样量为 10 μL。理论塔板数不低于 3 000^[6-7],见图 1。

VRB 的峰面积,结果峰面积的 RSD 为 1.23%,表明仪器的精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一样品,按 2.2.2 项下制备方法,平行操作 6 份,依法测定,结果脂质体中 VRB 含量为 0.212 1 g·L⁻¹,RSD 1.56%,表明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一样品,按 2.2.1 项下色谱条件,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进行测定,进样量 10 μL。VRB 峰面积基本不变,RSD 0.64%,表明样品溶液在 12 h 内是稳定的。

2.2.9 回收率试验 取同一样品 6 份,精密称定 1.0 mL,再分别加入 5.0 mL 的对照品溶液(VRB 质量浓度为 0.044 g·L⁻¹),按 2.2.2 项下制备方法进行制备,照 2.2.1 项下色谱条件,计算回收率。结果平均加样回收率为 98.64%,RSD 1.09% ($n = 6$),见表 1。

表 1 回收率试验结果

No.	样品中含量/mg	对照品含量/mg	总含量/mg	回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
1	0.217 5	0.22	0.434 5	98.62	98.64	1.09
2	0.215 6	0.22	0.436 4	100.36		
3	0.214 5	0.22	0.429 3	97.64		
4	0.216 7	0.22	0.433 7	98.64		
5	0.225 6	0.22	0.439 8	97.36		
6	0.229 5	0.22	0.447 8	99.23		

2.2.10 系统适应性 取 VRB 对照品溶液,空白脂

质体和 VRB 脂质体各 10 μL 进样析,VRB 的保留时间约为 18.5 min,空白脂质体只在 5 min 之前有色谱峰,空白脂质体对 VRB 无干扰。

2.2.11 样品含量测定 取不同批号 090701, 090702, 090703, 090704, 090705, 090706, 090707, 090708, 090709, 090710 各 3 份,精密称定 1.0 mL,按 2.2.2 项下制备方法进行制备,照 2.2.1 项下色谱条件,进样量 5 μL,测定 VRB 的含量,结果见表 2。

表 2 异长春花碱脂质体样品含量结果

No.	异长春花碱 /g·L ⁻¹	RSD /%	No.	异长春花碱 /g·L ⁻¹	RSD /%
090701	0.212 4	0.45	090706	0.220 4	1.34
090702	0.210 4	1.34	090707	0.225 5	1.12
090703	0.209 8	1.22	090708	0.215 6	0.83
090704	0.213 4	0.34	090709	0.215 4	0.62
090705	0.215 4	0.75	090710	0.210 5	0.73

2.3 VRB 脂质体包封率的测定

2.3.1 洗脱曲线的绘制 称取 Sephadex G-50 2.0 g,置于 pH 7.6 磷酸盐缓冲液中浸泡 24 h,湿法装柱。精密吸取 VRB 脂质体 0.5 mL,加至凝胶柱(1.0 cm × 12 cm)上方,以 pH 7.6 的 PBS 溶液进行洗脱,流速为 1.0 mL·min⁻¹,每份 2 mL,共收集 20 份;从 20 份中分别吸取 1 mL,加入 1 mL pH 7.6 的 PBS 溶液,混匀,超声使其澄清,以 PBS 溶液为空白,于 215 nm 处测定吸光度,绘制洗脱曲线,见图 2。可见脂质体和未包封的游离药物可以实现完全分离,第 1~7 管为含药脂质体,第 10~18 管为游离药物^[8]。

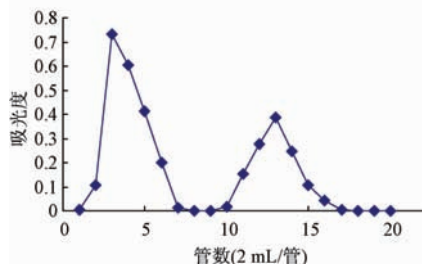


图 2 VRB 脂质体洗脱曲线

2.3.2 上柱回收率的测定 吸取 3 种不同浓度的 VRB 对照品溶液 0.2 mL 上柱,按照 2.3.1 项下条件进行分离,合并游离组分,按照 2.2.1 项测定 VRB 含量,计算 VRB 柱回收率为 101.03%,RSD 2.01% (n=3);取上述 3 种浓度 VRB 对照品溶液,分别加入一定量的空白脂质体,混合均匀后精密移取 0.2

mL 上柱,收集游离药物,测定其含量,求得平均加样回收率为 100.03%,RSD 1.06% (n=3)。

2.3.3 包封率的测定 取不同批次 090701, 090702, 090703 份,精密吸取 VRB 脂质体 0.5 mL,按 2.3.1 项操作,收集游离药物部分,混合,水浴蒸干,残渣用流动相溶解,滤过,滤液定容至 5 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取滤液 10 μL 测定,计算游离 VRB 的浓度,按照以下公式计算脂质体的包封率测得 3 批 VRB 脂质体包封率,结果见表 3。

$$\text{包封率} = \frac{M_{\text{总}} - M_{\text{游}}}{M_{\text{总}}} \times 100\%$$

式中: M_总 为 VRB 总量, M_游 为未被脂质体包裹的 VRB 的量。

表 3 VRB 包封率测定结果 (n=3) %

No.	包封率	RSD
090701	86.4	1.04
090702	87.2	0.87
090703	86.9	0.92

3 讨论

通过紫外扫描发现异长春花碱在 215 nm 处有最大吸收峰,因此选取 215 nm 为检测波长。

分离脂质体中游离药物的方法有凝胶过滤法、超速离心法、鱼精蛋白沉淀法、透析法等,在预试验中发现:鱼精蛋白沉淀法在沉淀脂质体时,鱼精蛋白对游离的药物也有一定的吸附沉淀作用;超速离心法无法将包封的药物和游离的药物完全分开,导致包封率的测量结果偏低;采用透析法测定脂质体的包封率时需要脂质体的量大(10 mL),且透析过程操作时间过长。本文采用凝胶过滤法测定脂质体的包封率,该法操作简单、快捷、药物分离效果较好。

目前,国内外对于异长春花碱含量测定的方法报道较少,仅有少数长春属类生物碱的含量测定。本方法测定异长春花碱脂质体的含量,操作简便,快捷,精密度和准确度都较好,方法的建立,有利于更好的提高和控制药品质量。

在脂质体主药含量测定过程中,我们对供试品溶液的制备方法进行了考察,萃取溶剂考察了乙醚、氯仿和石油醚,萃取次数考察了 1 次、2 次和 3 次,萃取溶剂用量考察了 10, 30, 50 mL。结果表明采用乙醚 30 mL 萃取 1 次,可以将脂质体中主药提取完全。经方法学验证,该方法的加样回收率为 98.64%。

(下转第 55 页)

表 2 回收率试验结果

化合物	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
异秦皮啶	0.344	0.32	0.653	96.5	97.3	1.6
	0.344	0.32	0.658	98.0		
	0.344	0.32	0.661	99.2		
	0.344	0.32	0.659	98.4		
	0.344	0.32	0.648	94.8		
	0.344	0.32	0.654	96.8		
迷迭香酸	0.445	0.513	0.959	100.0	98.9	1.3
	0.445	0.513	0.96	100.5		
	0.445	0.513	0.945	97.5		
	0.445	0.513	0.946	97.7		
	0.445	0.513	0.949	98.2		
	0.445	0.513	0.954	99.2		

表 3 清热消炎宁胶囊含量测定结果 (n = 3)

批号	异秦皮啶/(mg/粒)	RSD/%	迷迭香酸/(mg/粒)	RSD/%
N12015	1.77	0.4	2.33	1.7
N10011	1.39	2.0	2.36	2.8
N08012	1.10	1.5	1.79	1.9
H01001	1.46	1.8	1.49	1.4

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 异秦皮啶和迷迭香酸的最大紫外吸收波长分别为 340 nm, 330 nm, 故选择 340 nm 作为最大吸收波长。

考察了乙腈-0.1% 乙酸水、乙腈-0.1% 磷酸水 2 种流动相体系, 结果 0.1% 磷酸能明显改善迷迭香酸峰形, 大大提高柱效, 故选择在水相中加入 0.1% 磷酸。

比较了 40 ℃, 30 ℃ 2 种不同柱温, 结果 30 ℃ 柱温时迷迭香酸出峰时间明显延迟。

3.2 样品处理方法的优化 考察了不同溶剂及不同提取方法(超声处理、加热回流、浸渍)及溶剂用量倍数对 2 指标成分提取效率的影响。结果显示, 100 倍体积用量 70% 甲醇热回流提取 1 h, 提取效率最高, 重现性最好。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. WS3-B-1842-94.
- [2] 骆维康, 黄湘穗, 刘文坚. RP-HPLC 法测定清热消炎宁胶囊中异秦皮啶的含量[J]. 中药材, 2003, 26(6): 439.
- [3] 吴建章, 郁建平, 赵东亮. 迷迭香酸的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 383.

[责任编辑 顾雪竹]

(上接第 52 页)

[参考文献]

- [1] Vivian K Ngan, Krista Bellman, Dulal Panda, et al. Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules[J]. Cancer Research, 2000, 60: 5045.
- [2] 祖元刚, 罗猛. 长春花生物碱成分及其药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 325.
- [3] Maruyama K, Ishidao, Takizawa, et al. Possibility of active targeting to tumor tissues with liposomes[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 40(1/2): 89.
- [4] 陈彤, 侯世祥. 复方硫酸长春新碱脂质体对乳腺癌荷瘤裸鼠的疗效与毒性[J]. 生物医学工程学杂志, 2009,

26(1): 127.

- [5] 宋力, 范文源. 优福定脂质体的处方与工艺优化[J]. 中国药房, 2007, 18(19): 1479.
- [6] Gauvin A, Pinguet F, Poujol S. High-performance liquid chromatographic determination of vinorelbine in human plasma and blood[J]. Chromatogram B, 2000, 748(2): 389.
- [7] 罗猛, 付玉杰. 反相高效液相色谱法快速测定长春花中 4 种生物碱[J]. 分析化学, 2005, 33(1): 87.
- [8] 刘硕, 作文英. 黄芩苷脂质体的包封率测定和体外释放度考察[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(5): 342.

[责任编辑 顾雪竹]