

HPLC 法测定洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的药物含量及包封率

杨硕晔¹, 王杏林², 杨志强^{2*}, 司端运²

1 河南大学药学院, 河南 开封 475001

2 天津药物研究院, 天津 300193

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 法测定洛莫司汀-碘海醇复方脂质体中药物的含量及包封率。**方法:** 使用 DiamonsilTM (钻石) C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 水 (65 : 35), 柱温 25 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm, 鱼精蛋白凝聚法分离游离药物, 测定复方脂质体中洛莫司汀的含量及包封率; 使用 DiamonsilTM C₁₈ 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 - 水 (10 : 90), 柱温 25 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 244 nm, 鱼精蛋白凝聚法分离游离药物, 测定复方脂质体中碘海醇的含量及包封率。**结果:** 洛莫司汀与辅料及溶剂峰分离良好, 在 1.0 ~ 20.0 μg/mL 线性关系良好 ($r = 1.0, n = 5$), 回收率为 99.0 % ~ 101.0 %; 碘海醇与辅料及溶剂峰分离良好, 在 6.0 ~ 60.0 μg/mL 线性关系良好 ($r = 0.9999, n = 5$), 回收率为 99.0 % ~ 101.0 %。**结论:** 该方法准确、简单, 可用于洛莫司汀-碘海醇复方脂质体含量及包封率的测定。

关键词 洛莫司汀; 碘海醇; 复方脂质体; 含量测定; 包封率; 鱼精蛋白凝聚法

中图分类号: R927.2 TQ460.72 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2009) 01-0038-05

Determination of content and entrapment efficiency of lomustine-iohexol compound liposomes by HPLC

YANG Shuo-ye¹, WANG Xing-lin², YANG Zhi-qiang^{2*}, SI Duan-yun²

1 Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475001, China

2 Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determining the content and entrapment efficiency of lomustine-iohexol compound liposomes. **Methods:** The separation was performed with a DiamonsilTM C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (65 : 35), the drug was detected at 230 nm wavelength and the flow rate was 1.0 mL/min, with column temperature of 25 °C, protamine aggregation method was applied to separating the free drug and liposomes, for determining the content and entrapment efficiency of lomustine; the separation was performed with a DiamonsilTM C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water (10 : 90), the drug was detected at 244 nm wavelength and the flow rate was 1.0 mL/min, with column temperature of 25 °C, protamine aggregation method was applied to separating the free drug and liposomes, for determining the content and entrapment efficiency of iohexol. **Results:** Lomustine and iohexol can be well separated with a good linear relationship in the ranges

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: 国家 973 科技计划 (2006CB933303)

作者简介: 杨硕晔 (1983), 男, 河南省平顶山市人, 河南大学硕士研究生, 专业方向为药物制剂。

Tel: 15822947270; E-mail: wangyufeng345@163.com

* 通讯作者: 杨志强 Tel: (022) 23006885; E-mail: yangyqss@sina.com

of 1.0 — 20.0 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 1.0, n = 5$) and 6.0 — 60.0 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9999, n = 5$), their average recoveries were both between 99.0 % — 101.0 %, respectively. **Conclusion:** This method is accurate and simple, and can be well used to determine the content and entrapment efficiency of lomustine-iohexol compound liposomes.

Key words compound liposome; content determination; entrapment efficiency; iohexol; lomustine; protamine aggregation method

洛莫司汀 (lomustine) 为亚硝基脲类烷化剂, 具有广谱抗肿瘤作用, 临床主要用于治疗脑瘤、恶性淋巴瘤、肺癌及恶性黑色素瘤等。目前, 其临床应用的剂型主要是胶囊剂, 该剂型不良反应较为严重, 主要为消化道不良反应及迟发的骨髓抑制^[1]。碘海醇 (iohexol) 是常用非离子造影剂, 具有水溶性大、粘度小、渗透压低等优点, 在临床中主要用于脊髓造影、血管造影、CT 增强、泌尿系统造影、骨关节及淋巴管造影^[2]。将碘海醇和洛莫司汀一起包封, 制成复方脂质体, 通过造影明确肿瘤部位, 确定脂质体到达时间, 同时同步在肿瘤内定位释放化疗药物洛莫司汀, 从而提高了疗效, 避免了全身化疗的副作用。本研究采用 RP-HPLC 法分别测定复方脂质体中洛莫司汀和碘海醇的含量及包封率, 专属性强, 操作简单。

1 仪器与试剂

LabAlliance 高效液相色谱仪, 包括: Series1500 泵、As3000 自动进样器、Model 500 检测器、HT-230A 柱温箱、Anastar 色谱工作站; SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); Auto Science AS3120 超声清洗仪 (天津特纳科学仪器厂); KA-1000 低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

洛莫司汀对照品 (质量分数 99.6 %, 山东潍坊制药厂); 碘海醇对照品 (质量分数 99.4 %, 浙江司太立制药有限公司); 洛莫司汀-碘海醇复方脂质体 (自制, 批号 081102、0081103、081105, 含洛莫司汀 1 mg/mL, 碘海醇 240 mg/mL); 硫酸鱼精蛋白注射液 (上海第一生化药业有限公司); 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

洛莫司汀对照品溶液: 精密称取洛莫司汀对照品适量, 用甲醇溶解稀释得质量浓度 10 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

洛莫司汀供试品溶液: 精密吸取复方脂质体 1 mL (相当于洛莫司汀 1 mg) 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀即得。

洛莫司汀对照品储备液: 精密称取洛莫司汀对照品适量, 用甲醇溶解稀释得质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

碘海醇对照品溶液: 精密称取碘海醇对照品适量, 用流动相溶解稀释成质量浓度为 24 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

碘海醇供试品溶液: 精密吸取复方脂质体 1 mL (相当于碘海醇 240 mg) 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀。精密量取 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相定容, 摇匀即得。

碘海醇对照品储备液: 精密称取碘海醇对照品适量, 用甲醇溶解稀释得质量浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.2 洛莫司汀的含量及包封率测定

2.2.1 色谱条件与系统适应性实验

色谱柱为 DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 水 (65 : 35), 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 进样量 20 μL 。理论塔板数按洛莫司汀峰计为 7 600。

2.2.2 专属性考察

分别取洛莫司汀对照品溶液、空白脂质体 (按复方脂质体制备处方及工艺, 不加入洛莫司汀制得) 破乳溶液 (吸取空白脂质体 1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇破乳溶解并定容, 摇匀即得)、复方脂质体破乳溶液进样, 色谱图见图 1。由图 1 可知,

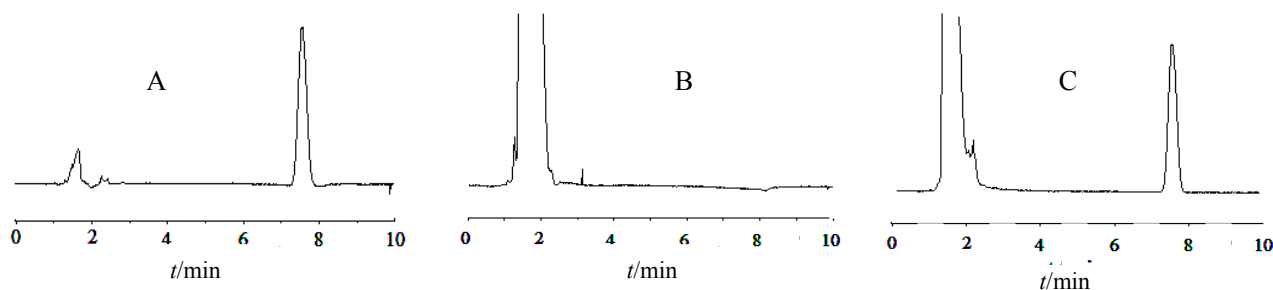


图 1 洛莫司汀对照品溶液 (A)、空白脂质体破乳溶液 (B)、复方脂质体破乳溶液 (C) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of lomustine standard (A), blank liposome (B) and compound liposomes (C)

洛莫司汀的保留时间为 7.7 min, 碘海醇及辅料的出峰时间在 3 min 以内, 不干扰测定。

2.2.3 标准曲线制备

取洛莫司汀对照品适量, 加甲醇制成 1.0、2.0、4.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列溶液, 分别测定, 以洛莫司汀浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行回归, 得标准曲线方程: $A = 1.3483 \times 10^4 C - 1666.8$, $r = 1.0$ 。结果表明, 在 1.0 ~ 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洛莫司汀质量浓度与峰面积线性关系良好。

2.2.4 重复性实验

精密吸取同一批号的复方脂质体样品适量, 共 6 份, 按“2.1”项下方法制得洛莫司汀供试品溶液, 进样测定, 计算得洛莫司汀含量的 RSD 为 0.48%。

2.2.5 回收率实验

按处方比例取空白脂质体 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 共 15 份, 分别精确加入 4.0、5.0、6.0 mL 洛莫司汀对照品储备液, 各 5 份, 用甲醇定容, 摇匀, 得质量浓度为 8.0、10.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液, 进样测定。另取洛莫司汀对照品溶液进样测定, 计算回收率分别为 99.6%、99.9% 和 100.2%, RSD ($n=5$) 分别为 1.26%、0.98% 和 1.14%。

2.2.6 稳定性实验

取供试品溶液 (洛莫司汀质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 份分别置避光与光照环境 (强度为 2000 LX) 中, 于 0、1、2、4、6、8、12 h 测定洛莫司汀的含量, 结果发现, 在避光环境中洛莫司汀的含量 12 h 内

基本不变, 峰面积的 RSD 为 0.23%, 而在光照环境中洛莫司汀的含量 12 h 内下降了约 20%, 因此在测定过程中须注意样品溶液的避光操作。

2.2.7 鱼精蛋白凝聚法的回收率测定

配制低 (80%)、中 (100%)、高 (120%) 浓度的洛莫司汀氯仿溶液 (以氯仿为溶剂配制) 各 3 份, 60 $^{\circ}\text{C}$ N_2 吹干, 分别加入空白脂质体适量使混合均匀, 得脂质体混悬液。分别吸取脂质体混悬液 100 μL , 加入 100 μL 鱼精蛋白注射液, 混匀, 放置约 3 min, 精确加入 5.0 mL 纯净水, 离心 15 min (相对离心力 350 $\times g$), 取上清液进样, 记录峰面积。计算得回收率分别为 97.2%、95.8% 和 98.1%, RSD ($n=9$) 为 1.58%。

2.2.8 洛莫司汀含量测定

分别取洛莫司汀对照品溶液和洛莫司汀供试品溶液进样, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算洛莫司汀含量。3 批供试品中洛莫司汀标示含量分别为 102.3%、100.9% 和 102.6%, RSD ($n=5$) 分别为 1.42%、2.18% 和 1.56%。

2.2.9 复方脂质体中洛莫司汀的封装率测定

采用鱼精蛋白凝聚法分离脂质体^[3]。精密吸取复方脂质体 100 μL 于离心管中, 加鱼精蛋白注射液 100 μL , 振摇混匀, 放置约 3 min, 精确加入 5.0 mL 纯净水, 离心 15 min (相对离心力 350 $\times g$), 取上清液进样, 记录峰面积, 由标准曲线计算游离药物的浓度 (C_1); 另精密吸取复方脂质体 100 μL , 置 10 mL 容量瓶中, 加入 5 mL 甲醇溶解, 摇匀,

进样测定峰面积,由标准曲线计算药物总浓度(C_0)。按包封率 $= (1 - C_1 / C_0) \times 100\%$,计算得3批样品的洛莫司汀包封率分别为78.7%、75.4%和72.9%。

2.3 碘海醇的含量及包封率测定

2.3.1 色谱条件与系统适应性实验

色谱柱为 DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相为甲醇 - 水 (10 : 90),柱温25 °C,流速1.0 mL/min,检测波长244 nm,进样量为20 μL。理论塔板数以碘海醇峰计为 8 500。

2.3.2 专属性考察

分别取碘海醇对照品溶液、空白脂质体(按复方脂质体制备处方及工艺,不加入碘海醇制得)破乳溶液、复方脂质体破乳溶液进样,色谱图见图2。由图2可知,碘海醇(以峰2计,峰1为其无药

用效果的对映体)的保留时间约为10 min,洛莫司汀及辅料无明显色谱峰,不干扰测定。

2.3.3 标准曲线制备

取碘海醇对照品适量,加甲醇制成浓度为6.0、12.0、24.0、36.0、48.0、60.0 μg/mL的系列溶液,分别进样测定,以碘海醇浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归,得标准曲线方程: $A = 1.5682 \times 10^4 C - 4013.2$, $r = 0.9999$ 。结果表明在6.0 ~ 60.0 μg/mL与峰面积线性关系良好。

2.3.4 重复性实验

精密吸取同一批号的复方脂质体样品适量,共6份,按“2.1”项下方法制得碘海醇供试品溶液,进样测定,计算得碘海醇含量的RSD为1.12%。

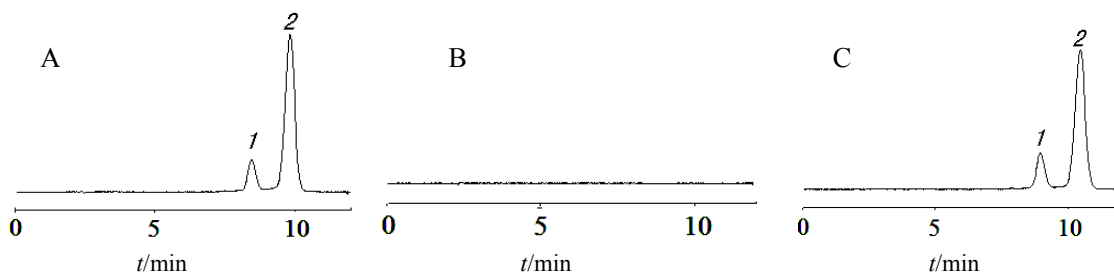


图2 碘海醇对照品溶液(A)、空白脂质体破乳溶液(B)、复方脂质体破乳溶液(C)的色谱图
Fig 2 Chromatograms of iohexol standard (A), blank liposome (B) and compound liposomes (C)

2.3.5 回收率实验

按处方比例取空白脂质体0.1 mL于100 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀。吸取1.0 mL置于3个10 mL量瓶中,共15份。分别精确加入3.2、4.0、4.8 mL碘海醇对照品储备液,用流动相定容,摇匀即得质量浓度为19.2、24.0、28.8 μg/mL的样品溶液,进样测定。另取碘海醇对照品溶液进样,记录峰面积,计算回收率分别为99.8%、99.5%和99.2%,RSD($n=5$)分别为1.43%、1.26%和0.58%。

2.3.6 鱼精蛋白凝聚法的回收率测定

配制低(80%)、中(100%)、高(120%)浓度的碘海醇水溶液各3份,分别加入空白脂质体适量使混合均匀,得脂质体混悬液。测定鱼精蛋白凝

聚法的回收率(操作同洛莫司汀的鱼精蛋白凝聚法回收率测定),结果分别为98.5%、97.4%、96.8%,RSD($n=9$)为1.42%。

2.3.7 碘海醇含量测定

分别取碘海醇对照品溶液和碘海醇供试品溶液进样,记录色谱图,按外标法以峰面积计算碘海醇含量。3批供试品中碘海醇标示含量分别为101.6%、98.9%和99.4%,RSD($n=5$)分别为2.34%、1.76%和1.25%。

2.3.8 复方脂质体中碘海醇的包封率测定

采用鱼精蛋白凝聚法分离脂质体。按“2.2.9”项下方法分离游离药物和脂质体,取上清液100 μL置25 mL量瓶中,加入流动相定容,摇匀,进样,记录峰面积,由标准曲线计算游离药物的浓度(C_1);

另精密吸取复方脂质体 100 μL 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 精密量取 100 μL 置 10 mL 量瓶中, 加入流动相定容, 摇匀, 进样测定峰面积, 由标准曲线计算药物总浓度 (C_0)。按包封率 = $(1 - C_1 / C_0 \times 1.25) \times 100\%$, 计算 3 批样品得碘海醇包封率为 68.7%、65.4%、62.9%。

3 讨论

曾尝试采用同一种色谱条件同时测定洛莫司汀和碘海醇, 但由于碘海醇易溶于水, 而洛莫司汀水溶性差, 两者的极性差别使保留时间相差很大。此外, 由于处方中洛莫司汀和碘海醇浓度差别很大 (洛莫司汀质量浓度为 1 mg/mL, 碘海醇质量浓度为 240 mg/mL), 在同一色谱条件下很难同时准确定量测定。因此, 最终选择在两种色谱条件下, 分别测定洛莫司汀和碘海醇。

脂质体预处理, 曾尝试采用葡聚糖凝胶过滤法、透析法和超速离心法。结果显示, 由于洛莫司汀难溶于水, 采用葡聚糖凝胶过滤法很难将游离的

洛莫司汀从凝胶柱上洗脱, 收集组分至 2 h, 游离的洛莫司汀仍未完全流出; 采用透析法, 在 2 h 后观察, 发现游离的洛莫司汀与脂质体仍未完全分离, 且每次试验需消耗介质 5 L 以上; 超速离心法对设备要求较高, 离心 1 h (相对离心力 20 000 $\times g$), 仍不能将样品中的脂质体完全沉淀。鱼精蛋白凝聚法是通过絮凝作用增加脂质体密度, 在较低转速下就可达到有效分离^[4]。实验证明该法简单、快速, 且分离效果好、回收率更稳定。故最终选用。

参考文献:

- [1] 上海医药工业研究院合成药研究室. 环己亚硝脒 (CCNU). 医药产品介绍[J]. 医药工业, 1975(5): 33-34.
- [2] 肖友梅, 陈惠娟, 彭秀珍. 非离子造影剂碘海醇的应用[J]. 中国临床医药研究杂志, 2003, 10(2): 44.
- [3] [英] Torchilin V P, Weissig V 编, 邓意辉, 徐晖主译. 脂质体 (第 2 版) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [4] 李红茹, 李淑芬. 脂质体中药物包封率的测定方法[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1844-1845.

《药物评价研究》第一届编委会会议通知

金秋十月, 丹桂飘香, 中华人民共和国 60 华诞之际, 恰值《药物评价研究》的主办单位之一——天津药物研究院建院 50 周年之时, 同时也是我院《中草药》杂志创刊 40 周年、《中草药》英文版——《Chinese Herbal Medicines》创刊和刘昌孝院士创建药代动力学实验室 40 周年的大日子。兹定于 10 月 22~25 日在天津举行庆典和学术活动。届时, 《药物评价研究》杂志将召开第一届编委会, 现诚邀编委与审稿专家光临指导; 同时也欢迎广大医药工作者参加学术会议。联系电话 022-23006822, 邮箱: ywpjyj@126.com, 详情请见 www.tjipr.com.

《药物评价研究》编辑部

2009 年 8 月