

# HPLC法测定盐酸表阿霉素-索拉非尼PLGA栓塞微球的载药量和包封产率<sup>Δ</sup>

刘斌斌<sup>1\*</sup>, 简晖<sup>1,2</sup>, 黄珊珊<sup>1</sup>, 刘微<sup>2</sup>, 朱益雷<sup>1</sup>, 罗晓健<sup>1,2</sup>, 李翔<sup>1,2#</sup>(1.江西中医药大学药学院, 南昌 330006; 2.中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-2967-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.24

**摘要** 目的:建立测定盐酸表阿霉素-索拉非尼聚乳酸-羟基乙酸聚合物(PLGA)栓塞微球载药量和包封产率的方法。方法:采用高效液相色谱法测定该制剂中盐酸表阿霉素和索拉非尼的含量,再通过公式计算载药量和包封产率。色谱柱为Phenomenex Luna 5u C<sub>8</sub>(2) 100A,流动相为甲醇-[水(含0.05%三氟乙酸和0.14%十二烷基硫酸钠)](75:25, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为252 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μL。结果:盐酸表阿霉素和索拉非尼检测质量浓度线性范围分别为2.020~101.00 μg/mL ( $r=0.999\ 8$ ), 2.048~102.40 μg/mL ( $r=0.999\ 7$ );定量限分别为3.297 0、2.546 8 μg/mL;检测限分别为0.989 1、0.764 1 μg/mL;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;回收率分别为96.41%~101.80% (RSD=1.64%,  $n=9$ )、99.46%~101.45% (RSD=0.70%,  $n=9$ )。3批样品中两种成分的载药量≥1.17%,包封产率≥58%。结论:该方法操作简单、结果准确,可用于测定盐酸表阿霉素-索拉非尼PLGA栓塞微球的载药量和包封产率。

**关键词** 盐酸表阿霉素;索拉非尼;聚乳酸-羟基乙酸聚合物;栓塞微球;高效液相色谱法;载药量;包封产率

## Determination of Drug Loading and Encapsulation Efficiency of Epirubicin Hydrochloride-sorafenib PLGA Embolic Microspheres by HPLC

LIU Binbin<sup>1</sup>, JIAN Hui<sup>1,2</sup>, HUANG Shanshan<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, ZHU Yilei<sup>1</sup>, LUO Xiaojian<sup>1,2</sup>, LI Xiang<sup>1,2</sup>(1.College of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China; 2.National Pharmaceutical Engineering Center for TCM Solid Preparation, Nanchang 330006, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To establish a method for the determination of drug loading and encapsulation efficiency of Epirubicin hydrochloride-sorafenib-loaded Poly(lactic Acid-glycolic Acid) Polymer (PLGA) embolic microspheres. **METHODS:** HPLC method was adopted to determine the contents of epirubicin hydrochloride and sorafenib in the preparation, and then drug loading and encapsulation efficiency were calculated by formula. The determination was performed on Phenomenex Luna 5u C<sub>8</sub>(2) 100A column with mobile phase consisted of methanol-water (containing 0.05% trifluoroacetic acid and 0.14% dium dodecyl sulfate) (75:25, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 252 nm, and the column temperature was maintained at 25 ℃. The injection volume was 10 μL. **RESULTS:** The linear ranges were 2.020-101.00 μg/mL for epirubicin hydrochloride ( $r=0.999\ 8$ ) and 2.048-102.40 μg/mL for sorafenib ( $r=0.999\ 7$ ), respectively. The limits of quantification were 3.297 0, 2.546 8 μg/mL, respectively. The detection limits were 0.989 1, 0.764 1 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 2.0%. The recoveries were 96.41%-101.80% (RSD=1.64%,  $n=9$ ), 99.46%-101.45% (RSD=0.70%,  $n=9$ ), respectively. Drug loading of two components in 3 batches of samples were no lower than 1.17%, encapsulation efficiency no lower than 58%. **CONCLUSIONS:** The method is simple, accurate, can be used to determine drug loading and encapsulation efficiency of Epirubicin hydrochloride-sorafenib PLGA embolic microspheres.

**KEYWORDS** Epirubicin hydrochloride; Sorafenib; PLGA; Embolic microspheres; HPLC; Drug loading; Encapsulation efficiency

原发性肝癌(Primary hepatocellular carcinoma, PHC)是最常见的恶性肿瘤之一,在我国的发病率和致死率均占全球总发病率和致死率的一半以上<sup>[1]</sup>。载药栓

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603054);江西省卫生计生委中医药科研课题(No.2016A008);江西省博士后科研项目(No.2016KY08)

\* 硕士研究生。研究方向:新药及药物新剂型。电话:0791-87119661。E-mail:liubiny@163.com

# 通信作者:副教授,博士。研究方向:新药及药物新剂型。E-mail:sterlinghawk@163.com

塞微球是一种用于治疗原发性肝癌中、晚期患者的新型药物递送系统,其联合了肝动脉栓塞和局部化疗两种治疗技术优势,越来越受到国内外研究者的关注<sup>[2-3]</sup>。目前,栓塞微球的研究多停留在载单个抗肿瘤药物阶段,本课题组通过水包油包水(W/O/W)复乳溶剂挥发法制备了盐酸表阿霉素-索拉非尼聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)栓塞微球[在载单个抗癌药物(盐酸表阿霉素)基础上,同时负载了索拉非尼]。索拉非尼是第一个系统应用于晚期肝癌治疗并被证实有效的多靶点、多酶抑

制剂<sup>[4-5]</sup>,还具有抑制肿瘤细胞增殖和血管新生的作用,可增强肝癌肝动脉栓塞治疗效果,减少肝癌的复发与转移<sup>[6-7]</sup>;并采用高效液相色谱法(HPLC)测定该制剂中盐酸表阿霉素和索拉非尼的含量,再通过公式计算载药量和包封率,以期为其质量控制和工艺评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括四元泵、自动进样器、二级管阵列检测器(DAD)、色谱工作站(美国Agilent公司);ZNCL-G型磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);A25-Digital型高剪切分散乳化机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司);KQ-5200型超声波清洗机(巩义市予华仪器有限责任公司,功率:200 W,频率:40 kHz);AB204-S型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Milli-Q型纯水处理系统(美国Millipore公司)。

### 1.2 药品与试剂

盐酸表阿霉素原料药(上海灏云化工科技有限公司,批号:20151115);索拉非尼原料药(台州市鸿耀化工有限公司,批号:20160331);盐酸表阿霉素对照品(德国Lipoid公司,批号:97040H00114,纯度:99.3%);索拉非尼对照品(德国Bayer公司,批号:PY637215,纯度:99.5%);PLGA(山东省医疗器械研究所,乳酸:羟基乙酸=50:50,摩尔比,相对分子质量4万)<sup>[8]</sup>;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 栓塞微球的制备

分别精密称取20 mg盐酸表阿霉素和索拉非尼原料药,将盐酸表阿霉素原料药溶于0.75 mL水中作为内水相,索拉非尼原料药用二甲基亚砜0.5 mL溶解后加入到10 mL含10%PLGA的二氯甲烷溶液中作为有机相;在剪切速度为10 000 r/min条件下,将内水相逐渐注入有机相中形成初乳,继续剪切60 s;随后将初乳缓慢注入外水相(含2%氯化钠和1%聚乙烯醇的水溶液)中,在冰浴中用磁力搅拌器(400 r/min)持续搅拌0.5 h,将冰浴的冰水换为常温水,再将磁力搅拌器设置为30 ℃继续搅拌(400 r/min)4 h,经反复滤过、洗涤后干燥即得载药栓塞微球(批号:20160910、20160911、20160912)。同法制备不含药的空白微球。

### 2.2 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna 5u C<sub>8</sub>(2)100A(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-[水(含0.05%三氟乙酸和0.14%十二烷基硫酸钠)](75:25,V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:252 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μL。

### 2.3 溶液的制备

2.3.1 混合对照品溶液 取盐酸表阿霉素对照品25.25 mg、索拉非尼对照品25.60 mg,精密称定,置于同一25 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得混

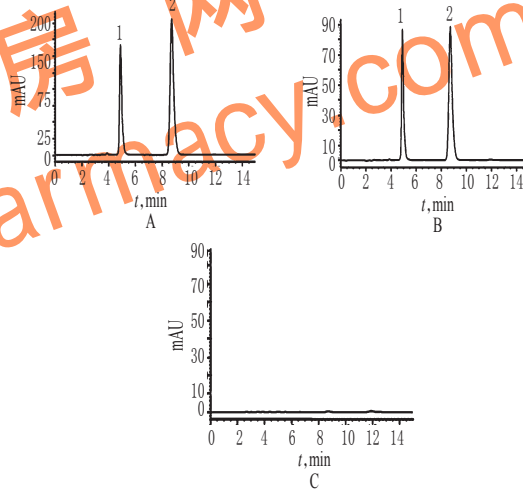
合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液1 mL,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得含盐酸表阿霉素质量浓度为0.101 0 mg/mL、索拉非尼质量浓度为0.102 4 mg/mL的混合对照品溶液,于4 ℃冰箱内保存备用。

2.3.2 供试品溶液 取样品约40 mg(含盐酸表阿霉素和索拉非尼各约0.5 mg),精密称定,置于10 mL棕色量瓶中,加二氯甲烷0.5 mL,超声处理10 min,放至室温,加适量甲醇轻微震荡混匀后,定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3.3 阴性对照溶液 取空白微球样品约40 mg,再按“2.3.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.4 系统适用性试验

精密量取“2.3”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以盐酸表阿霉素和索拉非尼色谱峰均>3 000,保留时间分别为4.89、8.71 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.盐酸表阿霉素;2.索拉非尼  
A.mixed control;B.test sample;C.negative control;1. epirubicin hydrochloride;2. sorafenib

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.5 线性关系考察

精密量取“2.3.1”项下混合对照品溶液0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL,分别置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液即得系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液各适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以盐酸表阿霉素和索拉非尼质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得盐酸表阿霉素回归方程为 $y=20.467x-9.1866$ ( $r=0.9998$ ),索拉非尼回归方程为 $y=38.390x-6.6884$ ( $r=0.9997$ )。结果表明,盐酸表阿霉素和索拉非尼检测质量浓度线性范围分别为2.020~101.00、2.048~102.40 μg/mL。

## 2.6 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,盐酸表阿霉素和索拉非尼的LOQ分别为3.297 0、2.546 8 μg/mL,LOD分别为0.989 1、0.764 1 μg/mL。

## 2.7 精密度试验

取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸表阿霉素和索拉非尼峰面积的RSD分别为0.08%、0.14%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.8 稳定性试验

精密吸取“2.3.2”项下供试品溶液(批号:20160911)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h时按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸表阿霉素和索拉非尼峰面积的RSD分别为0.27%、0.80%( $n=7$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

## 2.9 重复性试验

取样品(批号:20160910)6份,每份约40 mg,精密称定,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸表阿霉素和索拉非尼峰面积的RSD分别为1.14%、1.22%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.10 回收率试验

取空白微球样品(批号:20160913)适量,共9份,分别置于10 mL棕色量瓶中,各加入低、中、高质量的盐酸表阿霉素和索拉非尼对照品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

## 2.11 样品含量、载药量和包封产率测定

取“2.1”项下3批样品各适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算盐酸表阿霉素和索拉非尼的含量,再根据载药量(载药量=微球中药物的含量/微球的总质量×100%)和包封产率(包封产率=微球中药物的含量/系统中总投药量×100%)的公式计算样品的载药量和包封产率,结果见表2。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

将供试品溶液在190~400 nm波长范围内扫描,结果盐酸表阿霉素在234、252、288 nm波长处有最大吸收,索拉非尼在205、255 nm波长处有最大吸收<sup>[9-10]</sup>。由于供试品溶液中含甲醇,其在205 nm波长处会形成末端吸收,易造成干扰;综合峰形等因素最终确定检测波长为252 nm。

### 3.2 流动相的选择

本课题组考察了不同比例的甲醇-水(含0.05%三氟

表1 回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $n=9$ )

待测成分	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %			
盐酸表阿霉素	0.404 0	0.389 5	96.41	98.93	1.64			
	0.404 0	0.404 0	100.00					
	0.404 0	0.394 5	97.65					
	0.505 0	0.493 3	97.68					
	0.505 0	0.497 5	98.51					
	0.505 0	0.500 0	99.01					
	0.606 0	0.608 2	100.36					
	0.606 0	0.599 8	98.98					
	0.606 0	0.616 9	101.80					
	索拉非尼	0.409 6	0.407 6			99.51	100.31	0.70
		0.409 6	0.407 4			99.46		
		0.409 6	0.412 2			100.63		
0.512 0		0.512 6	100.12					
0.512 0		0.513 4	100.27					
0.512 0		0.518 3	101.23					
0.614 4		0.612 8	99.74					
0.614 4		0.623 3	101.45					
0.614 4		0.616 6	100.36					

表2 样品含量、载药量和包封产率测定结果( $n=3$ )

Tab 2 Results of content, drug loading and entrapment efficiency determination( $n=3$ )

样品批号	盐酸表阿霉素			索拉非尼		
	含量, mg	载药量, %	包封产率, %	含量, mg	载药量, %	包封产率, %
20160910	11.62	1.17	58.00	13.17	1.35	65.85
20160911	12.05	1.21	60.35	13.33	1.29	66.64
20160912	12.22	1.24	61.02	13.01	1.30	65.12

乙酸)、乙腈-水(含0.05%三氟乙酸)、甲醇-乙腈(含0.05%三氟乙酸)为流动相系统。结果,甲醇-水(含0.05%三氟乙酸,80:20, V/V)为流动相时相比其他两种流动相系统,基线更稳定、且各成分分离较好,但是盐酸表阿霉素峰保留时间少于2 min,容易与溶剂峰形成干扰;在水中添加十二烷基硫酸钠并调整流动相比比例,所得的色谱中盐酸表阿霉素峰的保留时间延长至4.89 min,避免了溶剂峰的干扰。因此,最终确定流动相为甲醇-[水(含0.05%三氟乙酸和0.14%十二烷基硫酸钠)](75:25, V/V)。

### 3.3 提取方法的考察

微球中药物的含量测定需先将药物从微球中提取出来,处理方法主要有酶解法<sup>[11]</sup>、研磨法<sup>[12]</sup>和溶解提取法<sup>[13]</sup>等。对于聚乳酸类微球,一般采用溶解提取法,即采用对载体溶解度更大的二氯甲烷、乙腈、丙酮等溶剂使微球溶解将药物提取出来再进行测定。本试验中,选用二氯甲烷破坏PLGA载体骨架使药物充分释放后,直接加甲醇将药物稀释、定容,避免了由传统液-液萃取法所导致的操作烦琐且提取率不高的缺点。

综上所述,本方法操作简单、结果准确,可用于测定盐酸表阿霉素-索拉非尼PLGA栓塞微球的载药量和包封产率。

### 参考文献

# HPLC法同时测定黄芪药材中10种黄酮类成分的含量<sup>Δ</sup>

张妍<sup>1,2\*</sup>,董琳<sup>1</sup>,雍婧姣<sup>1</sup>,毛福英<sup>1</sup>,尹蕾<sup>1</sup>,付雪艳<sup>1#</sup>(1.宁夏医科大学宁夏回药现代化工程技术研究中心,银川 750001;2.宁夏医科大学宁夏回医药现代化省部共建教育部重点实验室,银川 750001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-2970-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.25

**摘要** 目的:建立同时测定黄芪药材中10种黄酮类成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent SB-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.3%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μL。结果:毛蕊异黄酮-7-O-葡萄糖苷、异槲皮苷、染料木苷、刺芒柄花苷、毛蕊异黄酮、槲皮素、染料木素、山柰酚、异鼠李素和芒柄花素检测进样量线性范围分别为0.030 29~1.514 5 μg( $r=0.999\ 4$ )、0.015 00~0.7 500 μg( $r=0.999\ 5$ )、0.007 39~0.369 5 μg( $r=0.999\ 1$ )、0.120 11~6.005 5 μg( $r=0.999\ 8$ )、0.038 36~1.918 μg( $r=0.999\ 9$ )、0.029 89~1.494 5 μg( $r=0.999\ 5$ )、0.007 04~0.352 μg( $r=0.999\ 4$ )、0.016 83~0.841 5 μg( $r=0.999\ 5$ )、0.004 54~0.227 μg( $r=0.999\ 9$ )、0.013 36~0.668 μg( $r=0.999\ 9$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为99.55%~100.45%(RSD=0.36%, $n=6$ )、99.34%~101.00%(RSD=0.59%, $n=6$ )、98.05%~100.36%(RSD=1.27%, $n=6$ )、99.73%~100.13%(RSD=0.18%, $n=6$ )、99.70%~100.30%(RSD=0.22%, $n=6$ )、99.67%~103.27%(RSD=1.37%, $n=6$ )、98.13%~104.41%(RSD=2.37%, $n=6$ )、96.35%~100.06%(RSD=1.46%, $n=6$ )、99.47%~101.13%(RSD=0.60%, $n=6$ )、99.70%~100.06%(RSD=0.15%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于黄芪药材中10种黄酮类成分含量的同时测定。

**关键词** 黄芪;黄酮类成分;含量测定;高效液相色谱法

## Simultaneous Determination of 10 Flavonoids in *Astragalus membranaceus* by HPLC

ZHANG Yan<sup>1,2</sup>, DONG Lin<sup>1</sup>, YONG Jingjiao<sup>1</sup>, MAO Fuying<sup>1</sup>, YIN Lei<sup>1</sup>, FU Xueyan<sup>1</sup>(1.Ningxia Research Center for Modern Engineering and Technology of Hui Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China; 2.Ningxia Key Lab of Hui Medicine Modernization, Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750001, China)

- [1] Murat S, Mine T, Sugihara F, *et al*. Interventional treatment for unrespectable hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(37):13453-13456.
- [2] Takayasu K. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma over three decades: current progress and perspective[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(4):247-255.
- [3] 蒋明,马华兵,杨瑞梅,等.肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌200例分析[J].当代医学,2012,18(27):70-71.
- [4] Lencioni R. Management of hepatocellular carcinoma with transarterial chemoembolization in the era of systemic targeted therapy[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2012, 83(2):216-224.
- [5] 吴燕,张福成,吴诚,等.盐酸表阿霉素长循环热敏脂质体大鼠药代动力学考察[J].药学学报,2010,45(3):365-370.
- [6] 张洪,张福明,闫士君.索拉非尼固体脂质纳米粒冻干粉制备及体外释药特性研[J].中国药学杂志,2013,48(3):196-202
- [7] 叶社房,侯振清,周志敏,等.植入型表阿霉素缓释药膜的制备及体内抑瘤活性[J].中国生物医学工程学报,2008,27(4):586-590.
- [8] 张丽梅,冯瀚洲,朱春燕.粉经均一的利福布丁聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的制备及体外评价[J].中国药学杂志,2013,48(12):985-989.
- [9] 张洪,张福明,闫士君.高效液相色谱法与紫外光谱法测定索拉非尼原料药含量的比较[J].中国药业,2012,21(16):43-45
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:994-995.
- [11] 张志荣.肝靶向米托蒽醌白蛋白微球的研究[J].药学学报,1997,32(1):72-78.
- [12] 伍善广,杨帆,潘育方,等.HPLC法测定红霉素明胶微球的含量[J].广东药学院学报,2008,24(5):487-489.
- [13] 谢黎崖,吴永良,朱佩娟,等.载羟基喜树碱聚乳酸微球的制备与体外释药研究[J].中国新药杂志,2012,21(21):2557-2561.

<sup>Δ</sup> 基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(No.NZ14060)

\* 助理实验员,硕士。研究方向:药品质量标准提高。E-mail: bloom77@163.com

# 通信作者:教授,博士。研究方向:中药提取分离与结构鉴定。E-mail: fuxueyan1215@163.com

(收稿日期:2017-02-07 修回日期:2017-04-19)

(编辑:刘柳)