

中空纤维离心超滤-HPLC法测定盐酸伊立替康脂质体的包封率^Δ

孙 婷^{1*}, 刘 彦², 王晓晖², 律 涛², 蒋 晔^{2#}(1.河北医科大学第四医院临床药理研究部, 石家庄 050011; 2.河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)16-2220-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.16.13

摘要 目的:建立测定盐酸伊立替康脂质体包封率的方法。方法:采用改进的中空纤维离心超滤法(HFCF-UF)分离脂质体和游离药物;采用高效液相色谱法测定脂质体中盐酸伊立替康的含量,色谱柱为Diamonsil C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(称取磷酸二氢钾6.8 g溶于800 mL水中,加入三乙胺10 mL,以磷酸调pH至4.0,加水定容至1 000 mL)(55:5:45, V/V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。结果:盐酸伊立替康检测质量浓度线性范围为2.55~40.8 μg/mL($r=0.999 2$);定量限为0.64 μg/mL;中间精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;超滤提取回收率为96.9%~100.2%(RSD=1.0%, $n=9$),空白加样回收率为95.5%~100.5%(RSD=1.7%, $n=9$)。包封率的平均值为94.85%(RSD=1.1%, $n=3$)。结论:该方法操作简便、准确,精密度、稳定性、重复性好,适用于盐酸伊立替康脂质体包封率的测定。

关键词 中空纤维离心超滤法;高效液相色谱法;包封率;伊立替康

Determination of Entrapped Efficiency of Irinotecan Hydrochloride Liposomes by Hollow Fiber Centrifugal Ultrafiltration-HPLC

SUN Ting¹, LIU Yan², WANG Xiaohui², LYU Tao², JIANG Ye² (1. Dept. of Clinical Pharmacology, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for determining entrapped efficiency of Irinotecan hydrochloride liposomes. METHODS: The improved hollow fiber centrifugal ultrafiltration (HFCF-UF) method was employed to separate the liposomal drug and the free drug. The content of irinotecan hydrochloride was determined by HPLC. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-phosphate buffer solution (monobasic potassium phosphate 6.8 g dissolved in 800 mL water, triethylamine 10 mL, pH adjusted to 4.0 with phosphoric acid, adding water to 1 000 mL) (55:5:45, V/V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear range of irinotecan hydrochloride were 2.55-40.80 μg/mL ($r=0.999 2$). The limit of quantitation was 0.64 μg/mL. RSDs of intermediate precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recovery rates of ultrafiltration were 96.9%-100.2% (RSD=1.0%, $n=9$), and the blank adding recovery rates ranged 95.5%-100.5% (RSD=1.7%, $n=9$). The average of entrapped efficiency was 94.85% (RSD=1.1%, $n=3$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, precise, stable, reproducible and durable. It can be used for the determination of entrapped efficiency of Irinotecan hydrochloride liposomes.

KEYWORDS Hollow fiber centrifugal ultrafiltration; HPLC; Entrapped efficiency; Irinotecan

盐酸伊立替康是一种半合成的喜树碱类衍生物,具有较好的水溶性,临床所用剂型多为注射剂,主要用于治疗晚期大肠癌、食管癌、小细胞肺癌等,但其缺点明显(如半衰期短),并且可引发迟发性腹泻、骨髓抑制等不良反应^[1]。为克服其缺点,延长其在体内的滞留时间,同时增强其靶向性,减少不良反应,国内外学者研究并制备了盐酸伊立替康脂质体。

^Δ 基金项目:河北省医学科学研究重点课题(No.冀卫办科教[2017]3号-20170715)

* 主管药师,硕士。研究方向:药品的质量研究与控制。电话:0311-86095532。E-mail:343872441@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:药品的质量研究与控制。电话:0311-86266025。E-mail:jiangye@hebm.edu.cn

在脂质体制剂的制备工艺中,包封率指标至关重要,关系到药物增效减毒目的能否达成^[2-3]。包封率测定的关键是分离脂质体与游离药物,目前常用方法有透析法^[4-5]、凝胶色谱法^[6-7]、固相微萃取法^[8]、离心超滤法^[9-11]等。但上述方法均存在一定的不足,如样品稀释倍数大、脂质体易渗漏、游离药物质量浓度增加、回收率低等^[9,12-13]。本研究采用改进的中空纤维离心超滤(HFCF-UF)-高效液相色谱法(HPLC)对盐酸伊立替康脂质体的包封率进行测定,操作简单、快速,且避免了浓度差极化及脂质体渗漏问题,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括紫外-可见分光检测器等(美国Agilent公司);XSE型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);PHS-25型pH计(上海精科科学仪器有限公司);Centrifuge 5424型高速离心机(德国Eppendorf公司);CQ-200B-ST型超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);聚砜(PSU)中空纤维膜材(壁厚:150 μm,内径:1 000 μm,截留分子量:10 000)均购自天津北奥膜工程技术有限公司;玻璃离心管(天津鼎杰生物科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸依立替康脂质体(河北医科大学药学院自制);盐酸伊立替康对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100767-201303,纯度:98%);氢化大豆卵磷脂(上海宝曼生物科技有限公司,批号:160105);胆固醇(武汉德美凯生物科技有限公司,批号:160408);聚乙二醇单甲醚(分子量:2 000)胆固醇琥珀酸酯(河北医科大学药学院实验室自制);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 盐酸伊立替康脂质体和空白脂质体的制备

将氢化大豆卵磷脂、胆固醇、聚乙二醇单甲醚胆固醇琥珀酸酯按质量比3:1:1混合,加入10%乙醇溶液,于65℃水浴中搅拌溶解;加入0.2 mol/L乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)溶液5 mL,于65℃水浴中搅拌20 min,超声(功率:200 W,维持2 min,功率:400 W,维持6 min;频率:40 kHz)处理8 min,经微孔滤膜滤过,取续滤液,即得空白脂质体混悬液。取上述空白脂质体混悬液0.3 mL,上样于3 mL的阴阳混合离子交换树脂柱(湿法装柱,阴离子树脂与阳离子树脂体积比2:1),洗剂洗脱后以2 000 r/min离心4 min,得具有跨膜离子梯度的空白脂质体混悬液。取已建立跨膜离子梯度的空白脂质体混悬液0.1 mL,加入3.0 mg/mL盐酸伊立替康溶液0.3 mL,于60℃保温10 min,得质量浓度为2.25 mg/mL的盐酸伊立替康脂质体^[4]。另取已建立跨膜离子梯度的空白脂质体混悬液0.2 mL,于60℃保温10 min,得空白脂质体。

2.2 色谱条件

色谱柱:Diamondsil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-乙腈-磷酸盐缓冲液(称取磷酸二氢钾6.8 g溶于800 mL水中,加入三乙胺10 mL,以磷酸调pH至4.0,加水定容至1 000 mL)(55:5:45,V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取盐酸伊立替康对照品10.02 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,得质

量浓度为1.02 mg/mL的对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液1 mL,置于50 mL量瓶中,加水定容,得质量浓度为20.4 μg/mL的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 (1)供试品溶液 I。精密量取“2.1”项下盐酸伊立替康脂质体1.0 mL,置于10 mL量瓶中,加水定容,得供试品溶液 I。(2)供试品溶液 II。精密量取“2.1”项下盐酸伊立替康脂质体0.2 mL,置于5 mL量瓶中,加甲醇定容,得质量浓度为90.0 μg/mL的供试品溶液 II;精密量取上述供试品溶液 II 1.0 mL,置于10 mL量瓶中,加水定容,得供试品溶液 III。

2.3.3 阴性对照溶液 取“2.1”项下空白脂质体适量,按“2.3.2”项下供试品溶液 I 制备方法制备阴性对照溶液。

2.4 超滤液的制备

将PSU中空纤维剪成长度为17 cm的小段,超声(功率:400 W,频率:40 kHz)处理15 min,晾干,备用。将经处理的中空纤维置于吐温20溶液(1 mg/mL)中浸泡24 h进行改性,晾干,备用。取1段已完成改性的中空纤维置于离心管中,分别加入“2.3”项下供试品溶液 I、III和阴性对照溶液0.2 mL(如图1所示),4 500 r/min离心15 min,取出中空纤维,一端注入空气另一端流出超滤液,即得供试品 I、III、阴性对照超滤液。

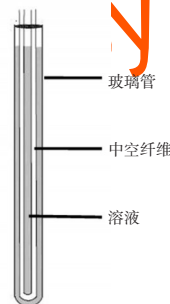


图1 HFCE-UF离心管装置的示意图

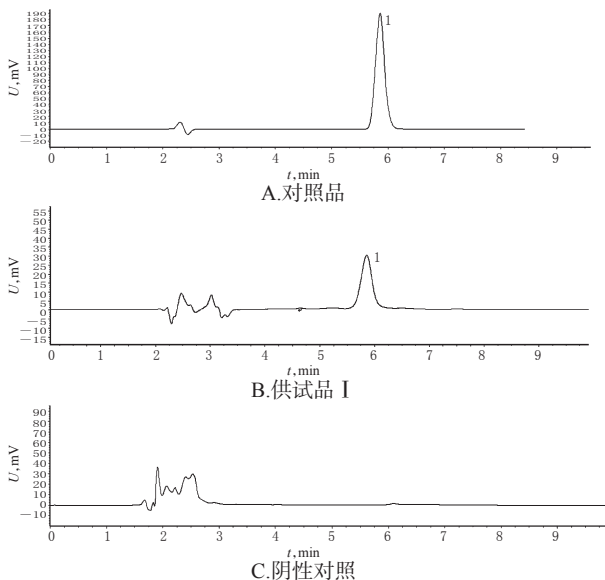
Fig 1 Schematic diagram of HFCE-UF device centrifuge tube

2.5 系统适用性试验

取“2.3.1”项下对照品溶液、“2.4”项下供试品 I 超滤液和阴性对照超滤液各适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2。结果,理论板数按伊立替康峰计应不低于3 000;基线分离良好,分离度>1.5。

2.6 线性关系考察

精密量取“2.3.1”项下对照品贮备液1 mL,置于10 mL量瓶中,加水定容,得质量浓度为102.0 μg/mL的对照品溶液 I。精密量取上述对照品溶液 I 适量,分别置于10 mL量瓶中,加水定容,制成盐酸伊立替康质量浓度分别为2.55、5.1、10.2、20.4、40.8 μg/mL的系列对照品溶液。分别精密量取上述系列对照品溶液20 μL,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以盐酸伊立



注:1.伊立替康

Note:1. irinotecan

图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

替康质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y=1.25 \times 10^4 x - 1.54 \times 10^4$ ($r=0.9992$)。结果表明,盐酸伊立替康检测质量浓度线性范围为 $2.55 \sim 40.8 \mu\text{g/mL}$ 。

2.7 定量限考察

分别精密量取“2.3.1”项下对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.2”项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1计算定量限。结果,盐酸伊立替康定量限为 $0.64 \mu\text{g/mL}$ 。

2.8 中间精密度试验

由2名分析员在不同日期精密量取“2.1”项下盐酸伊立替康脂质体适量,共5份,按“2.3.2”项下供试品溶液I制备方法制备供试品溶液,进而按“2.4”项下方法制备超滤液,再按“2.2”项下色谱条件在不同仪器上进样测定,记录峰面积。结果,盐酸伊立替康峰面积的RSD为1.8% ($n=5$),表明本方法中间精密度良好。

2.9 稳定性试验

取“2.3.2”项下供试品溶液I适量,按“2.4”项下方法制备超滤液,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸伊立替康峰面积的RSD为0.9% ($n=5$),表明供试品超滤液在室温下放置8 h内基本稳定。

2.10 重复性试验

精密称取“2.1”项下盐酸伊立替康脂质体适量,共6份,按“2.3.2”项下供试品溶液I制备方法制备供试品溶液,进而按“2.4”项下方法制备超滤液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,盐酸伊立替康峰面积的RSD为1.2% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.11 回收率试验

2.11.1 超滤提取回收率试验 取对照品适量,共9份,分别制备低、中、高质量浓度的对照品溶液,进而按“2.4”项下方法制备超滤液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算超滤提取回收率,结果见表1。

表1 超滤提取回收率试验结果($n=9$)

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

对照品溶液质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	超滤液质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	超滤提取回收率, %	平均超滤提取回收率, %	RSD, %
5.1	4.99	97.8	98.2	1.0
	5.03	98.6		
	5.11	100.2		
10.2	10.03	98.3		
	9.97	97.7		
	10.06	98.6		
20.4	20.07	98.4		
	19.83	97.2		
	19.77	96.9		

2.11.2 空白加样回收率试验 取“2.1”项下已知含量盐酸伊立替康脂质体适量,共9份,分别加入“2.1”项下空白脂质体0.2 mL,按“2.3.2”项下供试品溶液I制备方法制备供试品溶液,进而按“2.4”项下方法制备超滤液,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2。

表2 空白加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 2 Results of blank adding recovery tests ($n=9$)

取样量, μg	样品含量, μg	测得量, μg	空白加样回收率, %	平均空白加样回收率, %	RSD, %
10.2	5.1	4.89	95.9	98.2	1.7
	5.1	4.87	95.5		
	5.1	4.97	97.5		
20.4	10.2	10.25	100.5		
	10.2	10.11	99.1		
	10.2	10.01	98.1		
40.8	20.4	20.25	99.3		
	20.4	20.04	98.2		
	20.4	20.32	99.6		

2.12 包封率测定

取“2.1”项下盐酸伊立替康脂质体各适量,分别按“2.3.2”项下供试品溶液III制备方法制备供试品溶液,进而按“2.4”项下方法制备超滤液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算游离药物含量,按下列公式计算盐酸伊立替康脂质体包封率:包封率=(药物的总质量-游离药物的质量)/药物的总质量 $\times 100\%$ 。结果,盐酸伊立替康脂质体包封率的平均值为94.85%,RSD为1.1% ($n=3$)。

3 讨论

3.1 不同膜材的非特异性吸附考察及膜材改性研究

非特异性吸附是膜分离技术中的常见问题,该问题的存在使得超滤液的质量浓度低于样品溶液的真实质

量浓度,由此造成结果偏差^[13]。本试验以5.1、10.2、20.4 μg/mL 3个质量浓度的盐酸伊立替康对照品溶液分别考察了PSU、PP、PVDF、PAN 4种不同膜材的非特异性吸附情况,结果表明,仅PSU膜材对盐酸伊立替康的回收率大于50%,但仍未达到试验要求(90%~110%)。因此,本试验尝试采用表面活性剂对中空纤维膜材进行改性,分别考察了吐温20、吐温80、十二烷基磺酸钠对PSU膜材的中空纤维改性的效果。原理为残留在中空纤维膜材表面的表面活性剂可占据一定的吸附位点从而降低其对待测物的非特异性吸附。结果表明,经吐温20改性的PSU中空纤维制备的超滤液提取回收率均大于96%,符合试验要求。

与以往研究中所用的HFCE-UF法^[13-14]相比,本试验对中空纤维的非特异性吸附问题进行了改进,并成功解决了PSU中空纤维对盐酸伊立替康的吸附问题,使得该方法可以很好地适用于盐酸伊立替康脂质体包封率的测定,并为HFCE-UF法的推广应用提供了借鉴。

3.2 离心转速的优化

离心超滤法的滤过速度主要取决于离心力,在一定时间内,离心力若太小则所得超滤液量较小,不利于进样分析^[13]。因此,本试验考察了离心时间为15 min,离心转速分别为2 500、4 500、6 500 r/min时所得超滤液量。结果表明,离心转速分别为4 500、6 500 r/min时,收集到的超滤液量基本一致,因此,选择4 500 r/min为试验离心转速。

综上所述,本试验建立了改进的HFCE-UF法分离盐酸伊立替康脂质体中的游离药物,并以HPLC法测定其游离药物含量,进而计算包封率,操作简便、准确,精密度、稳定性、重复性好。

参考文献

[1] 王丽娟. 抗肿瘤药伊立替康的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2004, 31(1): 7-11.

[2] JAY PJ, NEERA JK. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG) 3-PLA co-polymers: factors affecting size and in vitro evaluation[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 40(5): 456-465.

[3] WU PC, TSAI YH, LIAO CC, et al. The characterization and biodistribution of cefoxitin-loaded liposomes[J]. *Int J*

Pharm, 2004, 271(1/2): 31-39.

[4] 黄君勤,孔俐文. 盐酸吉西他滨脂质体的制备及含量和包封率的测定学性质[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(1): 30-32.

[5] 戎丽娜,张敏,徐云龙,等. 顺磁性脂质体包封率测定方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1435-1439.

[6] 李文静,杨志强,王杏林. 两种硫酸长春新碱脂质体包封率测定方法的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 71-75.

[7] 王婷婷,李小翠,刘文双,等. 顺铂脂质体包封率测定方法的研究[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2016, 38(4): 288-293.

[8] DESHPANDE NM, GANGRADE MG, KEKARE MB, et al. Determination of free and liposomal amphotericin B in human plasma by liquid chromatography-mass spectroscopy with solid phase extraction and protein precipitation techniques[J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878(3/4): 315-326.

[9] 张自强,许玫,姚静,等. 超滤法测定伊立替康脂质体包封率的研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 2081-2084.

[10] 赵利刚,杨清敏,杨光丽,等. 酒石酸长春瑞滨长循环脂质体的包封率测定及药效研究[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(6): 508-512.

[11] 陈颖帅,李翔,张婧,等. 硫酸长春新碱脂质体含量测定及3种包封率测定方法的比较[J]. 中国药房, 2014, 25(37): 3504-3507.

[12] YANG F, WANG HY, LIU M, et al. Determination of free and total vincristine in human plasma after intravenous administration of vincristine sulfate liposome injection using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1275(2): 61-69.

[13] 许萌,陈丹,蒋晔. 中空纤维离心超滤-HPLC法测定注射用两性霉素B脂质体的包封率[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(9): 692-696.

[14] 豆妮娜,冉丛聪,杜朝晖,等. 中空纤维离心超滤-HPLC法测定酮洛芬凝胶剂[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(1): 71-73.

(收稿日期:2018-02-05 修回日期:2018-03-20)

(编辑:张静)