

RP-HPLC法测定康普瑞丁A4磷酸酯聚合物囊泡的含量

朱金芳^{1,2*}, 胡梦莹², 邱利焱^{2#} (1.新疆农业大学食品科学与药学院, 乌鲁木齐 830052; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2381-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.29

摘要 目的: 建立康普瑞丁A4磷酸酯(CA4P)聚合物囊泡中CA4P的含量测定方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为C₁₈, 流动相为乙腈-甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(10:40:50), 流速为1.0 ml/min, 检测波长为288 nm。结果: CA4P检测质量浓度线性范围为2.1~42 μg/ml($r=0.999\ 9$), 平均回收率为96.72% (RSD=1.61%, $n=3$), 检测限与定量限分别为0.21、0.70 μg/ml。结论: 本方法简便、准确度高, 可有效控制CA4P聚合物囊泡中CA4P的含量。

关键词 康普瑞丁A4磷酸酯; 聚合物囊泡; 反相高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Combretastatin A4 Phosphate Polymersome Vesica by RP-HPLC

ZHU Jin-fang^{1,2}, HU Meng-ying², QIU Li-yan² (1.College of Food Science and Pharmaceutical Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of combertastatin A4 phosphate (CA4P) polymersomes vesica. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-methanol-0.02 mol/L ammonium acetate (10:40:50) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 288 nm. RESULTS: The linear range of CA4P was 2.1-42 μg/ml ($r=0.999\ 9$) with an average recovery of 96.72% (RSD=1.61%, $n=3$). The limits of detection and quantification were 0.21 μg/ml and 0.70 μg/ml. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used to effectively control the content of CA4P in polymersomes vesica.

KEYWORDS Combretastatin A4 phosphate; Polymersome vesica; RP-HPLC; Content determination

从南非灌木 *Combretum caffrum* 中分离得到的康普瑞丁A4(CA4)是一种作用于秋水仙碱位点的微管蛋白结合剂, 康普瑞丁A4磷酸酯(CA4P)是CA4的水溶性的磷酸酯化前体药物, 是第1个低于最大耐受量(MTD)就可以选择性地产生抗肿瘤血管作用的小分子血管破坏药物^[1]。CA4P不仅可特异性作用于肿瘤血管系统而不影响正常组织, 快速破坏实体肿瘤血管, 阻断肿瘤血液供应, 而且具有抑制癌细胞增长及放化疗增敏的作用^[2], 该药在国外已进入III期临床研究阶段。CA4P注射剂对光和热不稳定, 在动物体内半衰期短, 在体内消除很快^[3-4]。鉴于此, 笔者将其封装于生物可降解的高分子聚合物囊泡中, 增加了药物的稳定性, 使CA4P缓慢持续释放, 延长其在体内的作用时间, 减少给药频率; 并能通过纳米囊泡的肿瘤组织增强渗透滞留作用(EPR effect)使CA4P被动靶向于肿瘤组织, 从而提高疗效、降低毒副作用。本文采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定CA4P聚合物/囊泡中CA4P的含量, 系统地考察了方法的准确度、精密性及稳定性等, 以期CA4P聚合物/囊泡的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

AL104精密电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);

* 讲师, 博士研究生。研究方向: 药物新剂型与纳米给药系统。电话: 0991-8763671。E-mail: zjf7619@126.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药物辅料及纳米给药系统。电话: 0571-88208434。E-mail: lyqiu@zju.edu.cn

1100 HPLC仪(美国Agilent公司); TU-1800PC/SPC紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

CA4P对照品(四川大学提供, 批号: 20110310, 纯度: 99.6%); CA4P聚合物/囊泡(浙江大学药学院药物制剂研究所, 批号: 20120718, 20120719, 20120720, 含量: 含CA4P 190 μg/ml); 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-0.02 mol/L 乙酸铵(10:40:50, pH为6.6), 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 288 nm; 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

对照品贮备液: 精密称取CA4P对照品适量, 用流动相配制成含CA4P 210 μg/ml的溶液, 摇匀即得。

对照品溶液: 精密量取CA4P对照品贮备液适量, 用流动相稀释成含CA4P 10.5 μg/ml的溶液, 摇匀, 用0.22 μm的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

供试品溶液: 精密量取CA4P聚合物/囊泡溶液400 μl置于5 ml棕色量瓶中, 用1 ml乙腈破坏囊泡, 使药物从囊泡中释放出来, 用流动相定容至刻度, 摇匀, 用0.22 μm的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

阴性对照溶液: 取不加CA4P的空白囊泡溶液400 μl置于5 ml棕色量瓶中, 用1 ml乙腈破坏囊泡, 用流动相定容至刻

度,摇匀,用0.22 μm的微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.3 检测波长的选择

取上述对照品溶液,在600~190 nm波长范围内进行波长扫描,确定最大吸收波长。结果显示,对照品溶液在288 nm波长处左右有最大吸收,故选定288 nm为测定波长。

2.4 系统适用性试验

在“2.1”项色谱条件下,取空白溶液(溶剂)、阴性对照溶液、对照品溶液和供试品溶液(批号:20120718)进样,结果显示,理论板数按CA4P峰计算>3 000,供试品中CA4P峰与相近峰分离清晰完全,分离度>1.5,空白和阴性对照溶液对CA4P主峰未见干扰,见图1。

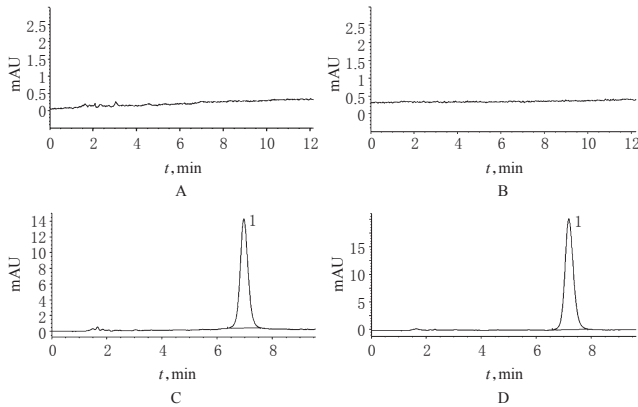


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

A. 空白; B. 阴性对照; C. 对照品; D. 供试品; 1. CA4P

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

A. blank; B. negative control; C. reference substance; D. test sample; 1. CA4P

2.5 线性关系考察

精密量取CA4P对照品贮备液(210 μg/ml)100、200、500 μl及1、2 ml,分别置于10 ml棕色量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀,用0.22 μm的微孔滤膜过滤。分别精密吸取续滤液20 μl注入色谱仪,记录色谱图。以CA4P的峰面积(y)为纵坐标、CA4P的质量浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=29.651x-9.6083$ ($r=0.9999$)。结果表明,CA4P检测质量浓度线性范围为2.1~42 μg/ml。

2.6 检测限与定量限试验

以CA4P的色谱峰信噪比为3时的质量浓度为检测限,信噪比为10时的质量浓度为定量限。取标准曲线最低质量浓度(2.10 μg/ml)对照品溶液稀释10倍后进样检测,其信噪比>3,因此检测限定为0.21 μg/ml;稀释3倍后进样检测,其信噪比>10,因此定量限定为0.70 μg/ml,结果见图2。

2.7 精密度试验

取CA4P对照品溶液,分别注入色谱仪测定5次,记录峰面积,计算其RSD=1.53%($n=5$),表明该方法精密度良好。

2.8 重复性试验

分别精密量取6份同一批号(20120718)CA4P囊泡400 μl,按供试品溶液的制备和测定法进行操作,测定CA4P含量,计算其RSD=0.85%($n=6$),表明该方法重复性较好。

2.9 加样回收率试验

分别精密量取200 μl同一批号(20120718)已知CA4P含量的CA4P囊泡9份,置于5 ml棕色量瓶中,分3组,分别加入高、中、低相应量的CA4P对照品贮备液,用1 ml乙腈破坏囊泡

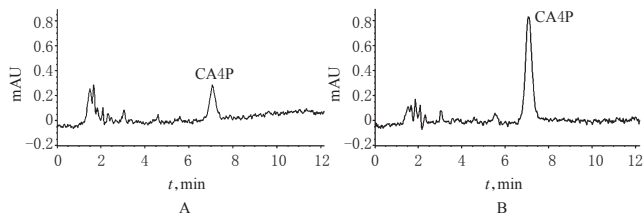


图2 检测限和定量限试验高效液相色谱图

A. 检测限试验; B. 定量限试验

Fig 2 HPLC chromatograms of detection limit and quantification limit tests

A. detection limit test; B. quantification limit test

使药物从囊泡中释放出来,用流动相定容至刻度,摇匀,用0.22 μm的微孔滤膜过滤,取续滤液,分别测定CA4P含量,计算回收率。结果平均回收率为96.72%,RSD=1.61%($n=3$),表明该方法的准确度较好,详见表1。

表1 回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery test($n=3$)

样品已知量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
37.61	30.45	67.20	97.18		
37.61	30.45	67.49	98.13		
37.61	30.45	66.45	94.72		
37.61	37.80	73.39	94.65		
37.61	37.80	74.32	97.12	96.72	1.61
37.61	37.80	75.02	98.97		
37.61	45.15	81.02	96.15		
37.61	45.15	81.90	98.10		
37.61	45.15	80.71	95.47		

2.10 稳定性试验

取供试品溶液分别于配制后0~8 h内,每2 h测定1次,结果含量的RSD=1.75%($n=5$),表明供试品溶液在配制后8 h内稳定。

2.11 样品含量测定

分别精密量取3批CA4P囊泡各3份,按供试品溶液处理方法制备供试品溶液,分别测定CA4P含量,结果见表2。

表2 3批样品中CA4P含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Content determination results of CA4P in 3 batches of samples($n=3$)

批号	CA4P含量, μg/ml	平均含量, μg/ml	RSD, %
20120718	187.85、190.74、186.87	188.49	1.07
20120719	182.71、185.26、179.84	183.99	0.98
20120720	201.19、198.87、196.47	198.84	1.19

3 讨论

经扫描,CA4P在288 nm波长左右有最大吸收,与文献^[5]基本一致,故选择288 nm为测定波长。与文献中流动相条件为磷酸二氢钾缓冲盐相比^[10],本研究使用乙酸铵缓冲盐能防止峰拖尾、改善峰形,且更有利于保护色谱柱。因CA4P对光和热不稳定^[9],在囊泡制备及含量测定过程中应注意避光操作。由于CA4P被封装于生物可降解高分子聚合物囊泡中,要测定封装在聚合物囊泡内的CA4P的量,必须将囊泡破坏使药物从囊泡中完全释放出来。因制备囊泡所用的高分子聚合物材料能溶于乙腈中,故采用乙腈破坏囊泡。经重复性试验及加样回收率试验证明,CA4P能够完全从囊泡中释放出来,方法的准确度及重复性均较好。

离子色谱法测定丙戊酸钠片的含量

宋玉琴*, 赵昌军(淄博市食品药品检验所, 山东 淄博 255086)

中图分类号 R95 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2383-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.30

摘要 目的:建立丙戊酸钠片的含量测定方法。方法:采用离子色谱-抑制电导检测法。以 Ion Pac AS19 阴离子交换色谱柱进行分离,10 mmol/L KOH 溶液为淋洗液,加水抑制模式,抑制电流为 20 mA,电导池温度为 35 ℃,柱温为 30 ℃,进样量为 25 μl。测定 3 批样品的含量并与《中国药典》标准方法(双相酸碱滴定法)比较测定结果。结果:丙戊酸钠检测质量浓度线性范围为 5.118~102.4 μg/ml($r=0.9999$),检测限和定量限分别为 93、307 ng/ml,平均回收率为 98.77% (RSD=0.80%, $n=6$)。本方法与标准方法比较结果差异无统计学意义。结论:该方法准确、灵敏、简便,可用于丙戊酸钠片的质量控制。

关键词 离子色谱;抑制电导检测;丙戊酸钠片;含量测定

Content Determination of Sodium Valproate Tablets by Ion Chromatography

SONG Yu-qin, ZHAO Chang-jun(Zibo Institute for Food and Drug Control, Shandong Zibo 255086, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of Sodium valproate tablets. METHODS: The ion chromatography-suppressed conductivity detection was adopted. The separation was performed on an Ion Pac AS19 anion exchange column eluted with 10 mmol/L potassium hydroxide solution. The suppression current was 20 mA with water suppressed pattern, the temperature of conductance cell was set at 35 ℃; the column temperature was 30 ℃, and sample size was 25 μl. The contents of 3 batches of samples were compared between by the method and by two phase acid-base titration method stated in *Chinese Pharmacopeia*. RESULTS: The linear range of sodium valproate were 5.118-102.4 μg/ml ($r=0.9999$). The limit of detection was 93 ng/ml and the limit of quantification was 307 ng/ml. The average recovery was 98.77% (RSD=0.80%, $n=6$). There was no statistical significance between the method and standard method. CONCLUSIONS: The method is accurate, sensitive and simple, which can be used for the quality control of Sodium valproate tablets.

KEYWORDS Ion chromatography; Suppressed conductivity detection; Sodium valproate tablets; Content determination

丙戊酸钠片为一线广谱抗癫痫药,主要用于单纯或复杂失神发作、肌阵挛发作、癫痫大发作的单药或合并用药治疗^[1]。由于丙戊酸钠分子结构中不具有紫外吸收基团,因此,2010年版《中国药典》(二部)仍然采用双相酸碱滴定法对其进行含量测定^[2],但该方法专属性差,而且滴定过程中使用的乙醚危险性高、毒性大、污染环境。目前文献报道的含量测定方法还有高效液相色谱法^[3]、柱前衍生高效液相色谱法^[4]、原子吸收分光光度法^[5]、气相色谱法^[6]等。由于高效液相色谱法大多采用紫外末端吸收作为检测波长,因此基线平衡需要很长时间;而衍生化法操作烦琐,容易引入杂质或干扰峰,或使样品损失;原

子吸收分光光度法仅能控制钠的含量,专属性差;气相色谱法样品前处理复杂,误差大,而且有机溶剂的使用还对环境造成一定的污染。离子色谱法作为一种环保的检测手段,适合检测能溶于水、并有一定离解度的化合物,不受被测组分是否具有光吸收特征的限制^[6]。为此,笔者首次建立离子色谱-抑制电导检测法测定丙戊酸钠片的含量。

1 材料

1.1 仪器

ICS-2100 型离子色谱仪,包括 AS 自动进样器、电导检测器、阴离子抑制器、自动淋洗液发生器、Chromeleon 中文色谱

以上结果表明,RP-HPLC 法测定聚合物囊泡中 CA4P 的含量,方法简便、准确度、精密度高、重复性、稳定性好,可有效控制聚合物囊泡中 CA4P 的含量。

参考文献

- [1] Dark GG, Hill SA, Prise VE, et al. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature[J]. *Cancer Research*, 1997, 57(10): 1829.
- [2] Prise VE, Honess DJ, Stratford MR, et al. The vascular response of tumor and normal tissues in the rat to the vascular targeting agent, combretastatin A-4-phosphate, at

- clinically relevant doses[J]. *Int J Oncol*, 2002, 21(4): 717.
- [3] 张亮,孟志云,孙文种,等.高效液相色谱法测定猕猴血浆中的风车子素 A-4 及其磷酸酯[J]. *药物分析杂志*, 2004, 24(3): 270.
- [4] 刘静,徐小平,张洁,等.绿原酸在兔体内对 CA4P 药动学的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(4): 297.
- [5] 尹佳,张亚兰,莫毅,等.CA4P 脂质体的制备工艺研究[J]. *华西药理学杂志*, 2009, 24(6): 594.
- [6] 尹华熙,吴萍,徐小平,等.抗肿瘤新药 CA4P 及其有关物质的 IR 结构解析[J]. *华西药理学杂志*, 2008, 23(5): 523.

(收稿日期:2014-02-07 修回日期:2014-04-02)

* 主管药师,硕士。研究方向:药品检验。电话:0533-5883918。
E-mail:zbdasck@163.com