

硫酸长春新碱空白脂质体的稳定性研究

赵妍¹, 邓意辉², 孟胜男¹, 王欣¹ (1. 中国医科大学药学院药剂教研室, 沈阳 110001; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要:目的 考察三瓶装硫酸长春新碱脂质体中空白脂质体的物理、化学稳定性。方法 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)测定空白脂质体中氢化大豆磷脂(HSPC)的含量;采用粒度仪测定脂质体粒径;用阳离子树脂分离脂质体与游离药物,测定包封率。结果 在4℃下,空白脂质体的理化性质未见明显变化,稳定性较好。结论 硫酸长春新碱脂质体适合制成三瓶装制剂,有利于提高药物稳定性。

关键词:硫酸长春新碱;脂质体;高效液相色谱-蒸发光散射检测器;氢化大豆磷脂;pH梯度法

中图分类号:R916.696 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)06-0477-03

Stability Study on Vincristine Sulfate-Blank Liposomes

ZHAO Yan¹, DENG Yi-hui², MENG Sheng-nan¹, WANG Xin¹ (1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the physical and chemical stability of vincristine sulfate-blank liposomes. **METHODS** HPLC-ELSD was applied to determine the content of HSPC, and particle size equipment was applied to determine the particle diameter. We used cation exchange resin to separate the free vincristine sulfate from the liposomes. **RESULTS** At 4℃, the stability of the blank liposomes are very well. **CONCLUSION** It is appropriate to make a 3-bottled package for vincristine sulfate liposome, and which improves its stability.

KEY WORDS: vincristine; liposome; HPLC-ELSD; hydrogenated soya phosphatidylcholine; pH gradients method

硫酸长春新碱(vincristine, VCR)是一种重要的抗肿瘤药物,对白血病、淋巴瘤均有显著抗肿瘤活性。在前期实验中,采用主动载药法制备的硫酸长春新碱脂质体虽然具有较高包封率,但药物在脂质体中降解快,且渗漏率高。因此,本实验设计了包封率高、稳定性好的三瓶装硫酸长春新碱脂质体。三瓶装硫酸长春新碱脂质体包括:硫酸长春新碱溶液、空白脂质体、外水相pH调节剂,其中空白脂质体的稳定性对制剂质量至关重要。空白脂质体中磷脂的含量和稳定性是控制质量的重要因素,笔者对其作重点考察;同时考察了空白脂质体粒径、pH值对质量的影响。

1 实验材料

1.1 试药

硫酸长春新碱(广州环叶制药有限公司);硫酸长春新碱对照品(中国药品生物制品检定所);氢化大豆卵磷脂(HSPC,德国);胆固醇(Chol,药用,温州市瓯海食品生化厂);氢化大豆卵磷脂对照品(德国Lipoid公司惠赠);阳离子交换树脂(上海树脂厂);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

P230高效液相色谱仪(大连依利特);SEDEX 75蒸发光

散射检测器(Dikma法国);FC204分析天平(上海精科仪器厂);PHS-25型pH计(上海精科雷磁);DF-101磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂);PSS.NICOMP™380粒度测定仪(Santa Barbara California USA);M-110L型微射流仪(美国microfluids公司)。

2 方法与结果

2.1 pH梯度法制备硫酸长春新碱脂质体及包封率的测定^[2]

2.1.1 空白脂质体制备 将HSPC、Chol按2:1混和,加适量无水乙醇于65℃加热溶解,挥除乙醇,加枸橼酸缓冲液(300 mmol·L⁻¹; pH 4.30),于65℃水化30 min,用微射流仪循环数次,依次通过0.8, 0.45 μm微孔滤膜整粒,得空白脂质体。

2.1.2 硫酸长春新碱脂质体制备 取空白脂质体0.2 mL,硫酸长春新碱溶液(1 mg·mL⁻¹)1.0 mL及Na₂HPO₄溶液(375 mmol·L⁻¹, pH 9.00)0.8 mL混和,使外水相pH 7.30,于60℃孵化10 min,得硫酸长春新碱脂质体。

2.1.3 硫酸长春新碱脂质体包封率的测定 取硫酸长春新碱脂质体0.3 mL两份,一份加5 mL量瓶中,去离子水定容,精密量取1.5 mL于5 mL量瓶中用甲醇定容、过滤;另一份

加于阳离子交换树脂柱顶端,去离子水洗涤离子交换柱,收集 5 mL 流出液,精密量取 1.5 mL 于 5 mL 量瓶中用甲醇定容、过滤。采用高效液相色谱仪测定硫酸长春新碱峰面积,计算脂质体封装率: $E\% = A_{\text{过柱}} / A_{\text{未过柱}} \times 100\%$, $A_{\text{过柱}}$: 脂质体封装的硫酸长春新碱; $A_{\text{未过柱}}$: 总硫酸长春新碱。

HPLC 条件: 色谱柱: Kromasil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-二乙胺 (70:30:0.5) (磷酸调 pH 7.0); 柱温: 35 °C; 流速: 1.2 mL · min⁻¹; 紫外检测波长: 298 nm。

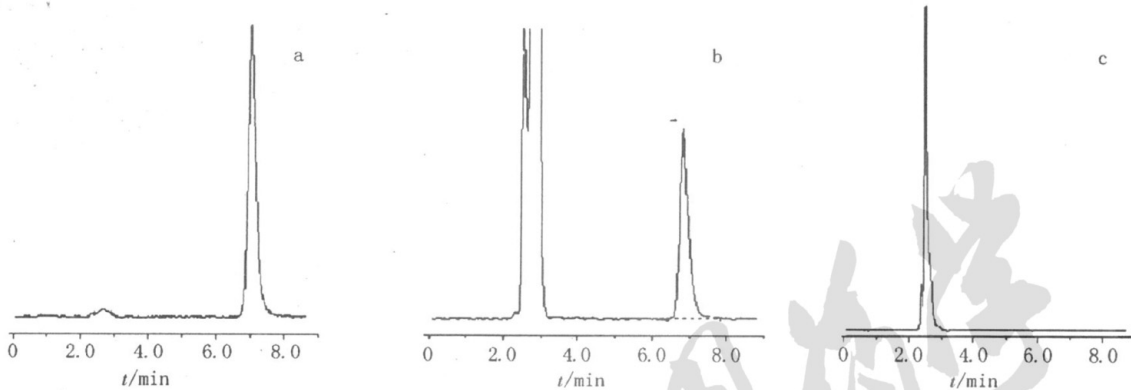


图 1 HSPC 的 HPLC 图
a HSPC 对照品; b 空白脂质体中 HSPC; c 胆固醇

Fig 1 HPLC chromatograms of HSPC
a standard of HSPC; b HSPC of blank liposomes; c Cholesterol

由 HPLC-ELSD 色谱图可以看出,空白脂质体中的胆固醇不干扰 HSPC 含量测定, HSPC 色谱峰保留时间约为 7 min。

2.2.3 标准曲线制备 取 25 mg HSPC 对照品,用无水乙醇溶解并制成溶液 (1 mg · mL⁻¹); 分别取 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 mL 于 10 mL 量瓶中,用无水乙醇定容,过滤后分别取 20 μL 进样测定峰面积 A,以 logA 对 logn 作图得标准曲线方程为 $\log A = 1.43 \log n - 1.76$, $r = 0.9995$ 。

2.2.4 回收率测定 取空白脂质体 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇定容、过滤,测定 HSPC 含量;另取 0.05 mL 空白脂质体三份,分别加入 1, 1.25, 1.5 mL HSPC 对照品溶液 (2 mg · mL⁻¹),用 HPLC-ELSD 测定峰面积 A,带入“2.2.3”标准曲线计算含量 m,实验结果见表 1。

表 1 HSPC 回收率考察 (n = 3)

含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	RSD /%
2 150	2 000	4 097 ±36	97.6	1.0
2 150	2 500	4 620 ±37	98.6	1.5
2 150	3 000	5 135 ±45	99.3	1.5

2.3 空白脂质体稳定性考察

取空白脂质体溶液,置 4 °C、40 °C 和 4 500 ±500 k 条件下,分别于第 0, 5, 10 天取样观察脂质体外观,测定 pH 值、粒径、HSPC 含量,制备硫酸长春新碱脂质体并测定封装率,实验结果见表 2。

2.2 HSPC 含量测定

2.2.1 色谱条件的选择 检测器: 蒸发光散射检测器 (ELSD); 色谱柱: Kromasil Si (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-异丙醇-冰醋酸 (90:8:2) (三乙胺调 pH 5.0), 脱气; 柱温: 40 °C; 流速: 1 mL · min⁻¹; 进样量: 20 μL。

2.2.2 色谱行为 取制备好的空白脂质体 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇定容、过滤,得空白脂质体破乳溶液。取 HSPC 对照品溶液、空白脂质体破乳溶液和 150 μg · mL⁻¹ 胆固醇溶液,在上述色谱条件下进样,实验结果见图 1。

表 2 影响因素试验对脂质体稳定性影响 (n = 3)

Tab 2 The influence of different condition on blank liposomes (n = 3)

温度 /°C	时间 /d	HSPC 含量 /%	脂质体 粒径 /nm	pH 值	外观	封装率 /%
4	0	100	70.6 ±39.7	4.24	乳白色	90.3
	5	99.8	71.4 ±40.1	4.24	乳白色	89.8
	10	99.2	72.8 ±42.1	4.24	乳白色	89.0
40	5	98.3	79.0 ±41.8	4.25	乳白色	87.5
	10	97.7	93.1 ±42.9	4.24	乳白色	84.8
光照	5	98.9	78.8 ±42.1	4.25	乳白色	88.8
	10	97.1	80.7 ±47.1	4.25	乳白色	85.1

结果表明,空白脂质体在 4 °C 下,各项指标均未发生明显变化; 40 °C 或光照 10 d 脂质体外观和 pH 值未发生明显改变, HSPC 含量和药物封装率略有下降, 脂质体粒径略有增大。

3 讨论

3.1 在硫酸长春新碱脂质体研究的前期工作中发现,以 pH 梯度法制备硫酸长春新碱脂质体虽然具有较高封装率和较好的物理稳定性,但药物化学稳定性差。将硫酸长春新碱脂质体置 40 °C 或 4 500 k 下进行影响因素实验,结果发现, 40 °C 放置 10 d 硫酸长春新碱降解 4.18%, 封装率下降为 59.75%; 4 500 k 光照 10 d 药物降解 63.52%, 封装率仅为 8.38%。由实验结果推测,溶液中的缓冲盐或脂质成分产生的自由基会明显加速药物降解,使稳定性下降; 具体影响因

素有待于进一步研究。

3.2 三瓶装硫酸长春新碱脂质体是将硫酸长春新碱、脂质体及缓冲液分别包装,使用前将药物载入脂质体,可大大提高硫酸长春新碱脂质体稳定性。目前,加拿大 INEX公司研发的硫酸长春新碱脂质体就是三瓶装硫酸长春新碱脂质体。该制剂克服了上述缺点,得到较高包封率和较好的稳定性,在美国和加拿大的部分地区已经进入了 II /III期临床评价阶段。

3.3 Boman等^[3]以 DSPC/Chol为脂质体膜成分,制备硫酸长春新碱脂质体。DSPC是一种合成的饱和磷脂,性质稳定、价格昂贵;本实验中采用的 HSPC为 SPC(大豆磷脂)氢化产物,稳定性高且价格合理,目前在中国市场比较常用。实验采用 HSPC为脂质体膜材,同样取得了较高的包封率和较好的稳定性。

3.4 HSPC最大紫外吸收波长为 210 nm,常规的紫外检测器在此波长灵敏度低,同时需要色谱纯乙腈作为流动相成分,成本高、毒性大。蒸发光散射检测器(ELSD)是一种新型的质量型检测器,本实验采用 HPLC-ELSD相结合测定 HSPC含量,有效消除末端吸收的干扰,含量测定更准确。

3.5 以往对磷脂含量测定常采用氯仿作为流动相组成成分^[4-5],存在着毒性大的缺点。本试验以甲醇-异丙醇-冰醋酸

为流动相,即减少了毒性,又得到适宜的保留时间。

REFERENCES

- [1] LAYTON D, TROUET A. A comparison of the therapeutic effect of free and liposomally encapsulated vincristine in leukemia mice [J]. *Eur J Cancer*, 1980, 16(7): 945-950.
- [2] ZHAO Y, YU B, DENG Y H, *et al*. Preparation of liposomes entrapped vincristine sulfate by active loading and determination of its entrapment efficiency [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40(20): 1559-1562.
- [3] BOMAN N L, MAYER L D, CULLIS P R. Optimization of the retention properties of vincristine in liposomal systems [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1152(2): 253-258.
- [4] XIA HT, LIU YF, XIU HY, *et al*. Analysis of Soybean Phospholipids Molecular Species by HPLC Using Evaporative Light Scattering Detector [J]. *Chin J Appl Chem* (应用化学), 2003, 20(3): 246-249.
- [5] ZHOU H, XIA HT, LIAN GX, *et al*. Determination of phosphatidylcholine by high performance liquid chromatography in the soybean mixed phospholipid [J]. *J Qiqihar Univ* (齐齐哈尔大学学报), 2002, 18(4): 33-34.

收稿日期: 2006-12-07