

滤膜法测定多西紫杉醇脂质体的包封率

柯学,王长江,严菲(中国药科大学 药物制剂教研室,南京 210009)

摘要:目的 建立多西紫杉醇脂质体包封率测定方法。方法 多西紫杉醇的含量测定采用 HPLC,色谱柱为 Lichrospher-RP C₁₈柱(150 mm×6.0 mm,5 μm),流相为乙腈-水(60:40),流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 231 nm,柱温为 35℃。利用 0.22 μm 微孔滤膜分离脂质体与游离药物,考察滤膜法测定脂质体包封率的可行性。结果 该色谱条件下,多西紫杉醇得到良好分离,辅料不干扰药物的测定,各指标均符合测定要求。0.22 μm 微孔滤膜截留作用明显,能有效分离游离药物与载药脂质体。结论 滤膜法简便、快捷,非常适用于多西紫杉醇脂质体的包封率测定。

关键词:滤膜法;高效液相色谱法;多西紫杉醇;脂质体;包封率

中图分类号:R943.3 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)04-0314-03

Filtration by Microspore Film for Determination of the Entrapment Efficiency of Docetaxel Liposomes

KE Xue, WANG Chang-jiang, YAN Fei (Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of the entrapment efficiency of docetaxel liposomes. **METHODS** HPLC was established for the assay of docetaxel. Lichrospher-RP C₁₈ column (150 mm×6.0 mm, 5 μm) was used, with acetonitrile-water (60:40) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 231 nm, and the column temperature was 35℃. The 0.22 μm microspore film was used for the separation of docetaxel liposomes and free docetaxel, the feasibility of the method was evaluated. **RESULTS** Docetaxel could be separated well, the adjuvants did not interfere the determination of docetaxel, and all the concerning indexes according to the requests under such HPLC condition. The free docetaxel was obviously blocked by 0.22 μm microspore film; the method was effective for the separation of docetaxel liposome and free docetaxel. **CONCLUSION** The method is very suitable for determination of the entrapment efficiency of docetaxel liposomes. **KEY WORDS:** filtration by microspore film; HPLC; docetaxel; liposomes; entrapment efficiency

多西紫杉醇(docetaxel)又名多西他赛^[1],是一种紫杉烷类抗癌药物,临床主要用于乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、软组织肉瘤、头颈癌、胃癌、卵巢癌和前列腺癌等,其单独和联合用药均有显著疗效。

目前多西紫杉醇上市剂型为注射液,商品名为泰索帝(Taxotere),但其现有制剂存在一些缺点,主要表现为药物自身的不良反应和吐温-80的溶血作用。临床使用时为消除不良反应,需同时使用皮质激素和 H₁、H₂受体拮抗剂(如口服地塞米松和 H₂受体拮抗剂西咪替丁、苯海拉明)^[2]。为降低制剂的不良反应,近年来研究了许多新剂型,如脂质体、前体药物、乳剂、微囊、环糊精包合物、磁微球、聚合物胶束、脂肪乳剂和微滴等。

其中脂质体作为多西紫杉醇的药物载体得到了广泛的关注。脂质体不仅降低药物本身的不良反应,而且延长作用时间,提高临床疗效。包封率是评价脂质体质量的重要指标,也是其发挥疗效的关键。作者采用薄膜分散法制备了多西紫杉醇脂质体,并建立了滤膜法以测定多西紫杉醇脂质体的包封率,为多西紫杉醇脂质体的质量评价提供依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津);N-2000 双通道色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限责任公司);BSI 24S(北京赛多利斯仪器系统有限公司);BS21S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);0.22 μm 微孔滤膜(上海新亚净化器件厂)。多西紫杉醇(齐鲁制药厂,含量大于 99%),大豆磷脂(德国 Degussa 公司),胆固醇(中国惠兴生化制剂有限公司),色谱纯乙腈(江苏汉邦科技有限公司),色谱纯甲醇(江苏汉邦科技有限公司),其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 多西紫杉醇脂质体的制备

精密称量大豆磷脂、胆固醇和药物适量置于 100 mL 茄形瓶中,加入一定量的二氯甲烷,超声溶解。30℃水浴减压除去二氯甲烷,在茄形瓶壁形成均匀透明的薄膜后,置真空干燥器中数小时,进一步去除残留的有机溶剂。加入适量 PBS(pH 7.4)水溶液洗膜,在 37℃水浴中水合 2 h,得乳白色混悬液,再经探头超声,即得含量约为 1.0 mg·mL⁻¹多西紫杉醇脂质体混悬液。

2.2 方法与结果

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Lichrospher-RP C₁₈柱 (150 mm × 6.0 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈-水 (60:40), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 231 nm, 柱温: 35 °C, 进样量: 20 μL。

2.2.2 HPLC 色谱行为 精密称量多西紫杉醇约 2.0 mg 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解并用流动相稀释, 得到浓度约为 20 μg·mL⁻¹ 多西紫杉醇溶液。按“2.1”项下制备不加药的空白脂质体。分别量取多西紫杉醇溶液、空白脂质体破乳溶液和多西紫杉醇脂质体破乳溶液 (脂质体用甲醇破乳, 用流动相稀释) 各 20 μL 进样分析, 得到色谱图 1。由图 1 可见, 杂质峰与药物峰分离良好, 辅料和试剂对药物测定无干扰。

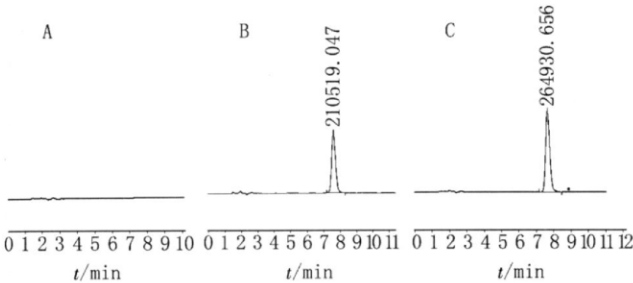


图 1 空白脂质体 (A), 多西紫杉醇溶液 (B) 和多西紫杉醇脂质体 (C) 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank liposome (A), docetaxel (B) and liposomal docetaxel (C)

2.2.3 标准曲线 精密称取多西紫杉醇适量, 用甲醇配制成质量浓度为 500 μg·mL⁻¹ 的储备液。精密量取储备液适量, 用流动相稀释成质量浓度为 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0, 100.0 μg·mL⁻¹ 的溶液, 分别进样 20 μL, 以峰面积 A 对质量浓度 ρ 作线性回归, 回归方程为 $A = 2.031 \times 10^4 \rho + 3.462 \times 10^2$ ($r = 0.9999$), 表明多西紫杉醇在 1.0~100.0 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.2.4 精密度实验 精密量取多西紫杉醇储备液适量, 用流动相稀释至质量浓度为 1.0, 50.0, 100.0 μg·mL⁻¹ 的溶液, 于 1 d 和 1 周内重复进样 5 次, 进样体积为 20 μL, 计算日内精密度和日间精密度。精密度用 RSD 表示, 见表 1 所示。

表 1 HPLC 法测定多西紫杉醇的日间、日内精密度实验结果 (n = 5)

理论值 /μg·mL ⁻¹	日内精密度		日间精密度	
	平均值	RSD	平均值	RSD
	/μg·mL ⁻¹	%	/μg·mL ⁻¹	%
1.0	1.01	0.46	1.03	1.02
50.0	50.01	0.72	50.03	1.24
100.0	100.00	0.32	100.01	0.98

2.2.5 回收率实验 分别精密移取多西紫杉醇储备液 (500 μg·mL⁻¹) 0.1, 1.0, 2.0 mL 加入到 0.5 mL 空白脂质体溶液中, 用甲醇破乳, 流动相稀释定容, 得到质量浓度为 5.0, 50.0, 100.0 μg·mL⁻¹ 样品溶液, 分别进样 20 μL, 测定峰面积, 代入标准曲线得到实际测定浓度, 计算回收率及 RSD, 见表 2。

表 2 回收率实验 (n = 5)

Tab 2 Results of recovery experiments (n = 5)

加入量 /μg·mL ⁻¹	测得值 /μg·mL ⁻¹	回收率 /%	RSD /%
5.0	4.92	98.4	1.21
50.0	50.61	101.2	1.03
100.0	99.05	99.0	0.84

2.3 滤膜法^[3]测定多西紫杉醇脂质体包封率

2.3.1 滤膜法分离效果的考察 按“2.1”项下制备多西紫杉醇脂质体水合液, 然后分为二份, 第一份加入处方量的多西紫杉醇, 第二份不加。两者经探头超声处理后定容至相同体积, 混匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 精密吸取续滤液适量, 破乳后经 HPLC 测定其中药物的含量。结果显示, 前者的含量为 (968.0 ± 9.1) μg·mL⁻¹ (n = 3), 后者的含量为 (937.6 ± 7.6) μg·mL⁻¹ (n = 3), 游离药物的加样回收率仅为 3.24% (< 5%)。上述结果说明增加的游离药物基本被 0.22 μm 滤膜截留, 从而证明滤膜法能有效分离脂质体和游离药物。

2.3.2 多西紫杉醇在水合介质中的溶解度 按处方比例将多西紫杉醇、大豆磷脂等加入 pH 7.4 磷酸缓冲盐溶液中, 按“2.1”项下方法进行探头超声, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液测定溶解度。重复测定 3 次, 取平均值。经测定, 多西紫杉醇在 pH 7.4 磷酸缓冲盐溶液中的溶解度为 (10.98 ± 0.32) μg·mL⁻¹ (n = 3), 可见多西紫杉醇在 pH 7.4 磷酸缓冲盐溶液中的溶解度较低, 约为多西紫杉醇制剂浓度的 1%。

2.3.3 滤膜法测定脂质体包封率 取已混匀的多西紫杉醇脂质体混悬液, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 精密吸取续滤液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇破乳并用乙腈-水 (60:40) 定容至刻度, 摇匀, HPLC 测定浓度, 记为 C; 另精密吸取已混匀的多西紫杉醇脂质体混悬液 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇破乳并用乙腈-水 (60:40) 定容至刻度, 摇匀, HPLC 测定浓度, 记为 C₁。按下式计算包封率, 测定结果见表 3。

包封率 (%) = $\frac{C \times 100 - \text{多西紫杉醇在水合介质中的溶解度}}{C_1 \times 100} \times 100\%$

表 3 多西紫杉醇脂质体包封率测定结果 (n = 5)

Tab 3 Entrapment efficiency of docetaxel liposome (n = 5)

序号	EE/%	EE _{mean} /%	RSD/%
1	88.93		
2	91.10		
3	87.69	90.02	2.43
4	93.26		
5	89.11		

3 讨论

3.1 脂质体包封率测定方法主要有凝胶过滤法、透析法、反透析法、超高速冷冻离心法、鱼精蛋白沉淀法、滤膜法等^[4-5]。笔者曾尝试使用葡聚糖凝胶 G-50 柱分离脂质体和游离药物, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液进行洗脱, 但游离药物回收率仅为 50% 左右; 后改用 5% 乙醇液的洗脱, 药物回收率也仅有 65% 左右。原因可能是上述介质洗脱能力不强, 游离药物吸附在凝胶柱上。透析法是目前文献报道的多西紫杉醇脂质

体包封率的一种测定方法^[2],但在本实验室操作过程中,发现该法仍然存在游离药物回收率低的问题。而反渗析法则存在时间长和脂质体量较大等问题。上述方法均不适合测定多西紫杉醇脂质体的包封率。

3.2 滤膜法中采用 0.22 μm 的微孔滤膜,一方面是由于制成的多西紫杉醇脂质体粒径在 100~150 nm 之间,且混悬液黏度较小,能顺利通过滤膜;另一方面是考虑微孔滤膜的孔径越小对游离药物的截留作用越好,有利于包封率测定的准确性。

3.3 采用薄膜分散——超声法制备的脂质体混悬液,其中的药物以三种形式存在:脂质体中包封的药物;游离的未被包封的药物;溶解在水合介质中的药物。对于脂溶性强的药物,未被包封的游离药物绝大多数均以微晶状态存在,理论上应被 0.22 μm 的微孔滤膜所截留,但在脂质体的制备过程中,采用了探针超声等步骤,可能使混悬药物的粒径明显减少,从而使之有通过滤膜的可能,因此本实验中通过加药测回收率的方法对此进行考察。结果表明,滤膜法可有效截留未包封的游离药物,基本不影响脂质体包封率的测定。

3.4 多西紫杉醇本身在水合介质中有一定的溶解度,同时在脂质体处方中还存在磷脂等成分,操作过程中使用探针超声等步骤,这些均可能增加其在介质中的溶解度,从而影响包封率的测定结果。因此为减少包封率的测定误差,本实验考察了在处方比例条件及操作条件下,多西紫杉醇在 pH 7.4 磷酸盐溶液中的溶解度。结果表明,药物在水合介质中的溶解度仅为多西紫杉醇制剂浓度的 1% 左右。对包封率的影响大约有 2%~3%,为得到更准确的结果,在计算包封率时仍

然将其考虑在内。

3.5 本实验采用滤膜法测定多西紫杉醇脂质体的包封率,在方法学中充分考虑了影响包封率测定的各种因素,最终建立了包封率的计算公式。滤膜法和常规的凝胶过滤、透析、超高速冷冻离心等方法相比,具有简便、快捷、准确、经济等特点,非常适宜于脂溶性药物脂质体的包封率测定。但通过检索文献,发现目前脂质体包封率的测定方法仍以凝胶过滤法及透析法为主,而以滤膜法测定脂质体包封率的文章很少,因此今后值得进一步推广。

REFERENCES

- [1] WU Y L, HU X CH. The clinical applications of Taxotere [J]. World Clin Drugs(世界临床药物), 2003, 24(6): 347-350.
- [2] IMMORDINO M L, BRUSA P, ARPICCO S, *et al*. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel [J]. J Controlled Release, 2003, 91(4): 417-429.
- [3] GUO J X, PING Q N, HUANG L S. Preparation of flexile ciclosporin nanoliposome and its deformability [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 1999, 30(3): 187-191.
- [4] LU B. New Drug techniques and new dosage forms of drugs(药物新剂型与新技术) [M]. 2nd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005, 134-135.
- [5] SUN W T, HUANG G H, YE J S, *et al*. Determination of Encapsulation Efficiencies of Liposomes and Nanoliposomes by Protamine Aggregation Method [J]. Chin Pharm J(中国药杂志), 2006, 41(22): 1716-1720.

收稿日期: 2007-11-30