

- [6] LIU L, LI N, GAO C K. Study on diffusion kinetics of tetramethylpyrazine phosphate through free coating film of controlled porosity osmotic pump tablets and formulation optimization [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2011, 46(17): 1134-1139.
- [7] ZHAO X L, LI Q, GONG X F, et al. The delivery mechanism of micro-porous osmotic pump tablets [J]. Acta Pharm Sin(药

学学报), 2007, 42(2): 226-230.

- [8] ZHAO X Y, ZHANG Z R, REN K, et al. Preparation, identification and thermodynamic stability of capsaicin-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion compound [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(4): 394-397.

收稿日期: 2013-04-18

葡聚糖凝胶微柱-HPLC 测定奥沙利铂脂质体包封率

刘阳¹, 陶胜尧², 郭伟英^{1*} (1. 辽宁医学院药学院, 辽宁 锦州 121001; 2. 东方中科生命科学有限责任公司, 沈阳 110209)

摘要: 目的 对奥沙利铂脂质体进行质量评价, 建立奥沙利铂脂质体包封率的测定方法。方法 采用凝胶微柱离心法分离游离药物与脂质体, 以 HPLC 测定奥沙利铂的药物含量, 计算脂质体的包封率。结果 奥沙利铂浓度在 $0.02 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r=0.9999$)。3 批次奥沙利铂脂质体的包封率分别为 56.6%, 57.5%, 60.0%。结论 该方法简便、迅速, 可准确测定奥沙利铂脂质体的包封率。

关键词: 奥沙利铂; 脂质体; 高效液相色谱法; 包封率; 微柱离心法

中图分类号: R944.9

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)01-0074-04

Determination of Entrapment Efficiency of Oxaliplatin Liposomes by Sephadex Microcolumn Combined with HPLC

LIU Yang¹, TAO Shengyao², GUO Weiying^{1*} (1. College of Pharmacy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China; 2. East CAS Life Science Co., Ltd., Shenyang 110209, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the quality of oxaliplatin liposomes, and to establish a method to determine the entrapment efficiency of oxaliplatin liposomes. **METHODS** The gel microcolumn centrifugation method was employed to separate the free drug from the oxaliplatin liposomes. The content of oxaliplatin was determined by HPLC to calculate the entrapment efficiency. **RESULTS** A calibrated linear curve of oxaliplatin concentration was within $0.02 \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r=0.9999$). The results showed that the average entrapment efficiencies of three batches of oxaliplatin liposomes were 56.6%, 57.5% and 60.0%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple and rapid, and it can be used to determine the entrapment efficiency of oxaliplatin liposomes accurately.

KEY WORDS: oxaliplatin; liposome; HPLC; entrapment efficiency; gel microcolumn centrifugation

奥沙利铂(oxaliplatin, Ox)是继顺铂和卡铂之后的第 3 代铂类抗癌药, 其分子量为 397.29。与前两代铂类药物相比, Ox 在体内及体外的抗肿瘤作用效果好, 且用药安全^[1-2]。它对结直肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌等实体瘤有明显的抑制作用^[3]。Ox 具有特异的心脏和神经系统毒性, 且注射入体内后在肿瘤组织蓄积很少, 很难达到治疗浓度。脂质体是一种具有类生物膜双分子层结构的药物载体, 具有低毒、细胞亲和性和靶向性等特点。本实验以 Ox 为模型药物, 将 Ox 制成脂质体以提高靶向性, 降低其不良反应。包封率是评价脂质

体质量好坏的重要的指标之一^[4], 也是脂质体能否发挥高效、低毒特点的关键^[5]。选择合适的方法来测定脂质体的包封率很重要, 测定包封率的关键是将脂质体与游离药物有效分离。目前常用的分离脂质体与游离药物的方法有离心超滤法、超速离心法、透析法、葡聚糖凝胶柱层析法等^[6]。超滤法测定较快速, 但其所用的离心超滤管不可重复利用, 成本较高; 透析法虽设备简单, 但需不断更换透析介质, 耗时长; 超速离心法在分离时转速较高, 对温度控制严格, 故对离心机的要求较高; 葡聚糖凝胶柱色谱法使用填料较多, 成本提

作者简介: 刘阳, 女, 硕士生 Tel: 13188120567 E-mail: lyang0908@163.com
13941627032 E-mail: wyinguo@163.com

*通信作者: 郭伟英, 男, 硕士, 教授 Tel:

高,且较耗时。据文献^[7]报道,应用葡聚糖凝胶微柱分离、高效液相色谱法(HPLC)来测定脂质体封装率,可以克服上述缺陷。凝胶微柱离心法是结合了葡聚糖凝胶柱以及离心分离方法的优点,利用反分子筛作用,脂质体的直径较大,不能进入葡聚糖凝胶的网眼中,而游离药物由于直径小可进入葡聚糖凝胶的网眼中,因此在洗脱中,脂质体首先被洗脱,在离心力作用下快速将脂质体与游离药物分离,对样品稀释程度小,且葡聚糖凝胶的用量较少。Ox 的分子量小,与脂质体的分子量相差悬殊,故可用此法来进行分离。本实验用 SephadexG-50 微柱离心法快速分离脂质体和游离药物,并对离心力和离心时间进行反复摸索,筛选出分离的最佳条件,再用 HPLC 测定脂质体中 Ox 含量,计算脂质体的封装率。

1 仪器与试剂

RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);L-2000Elite 型高效液相色谱仪(日立高新技术集团);UV-2550 型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司);JEM-1010 透射电镜(日本电子株式会社),LD4-2A 低速离心机(北京医用离心机厂)。

Ox 原料药(山东铂源药业有限公司,含量>99.5%,批号:1208020X);大豆磷脂(上海金伴药业有限公司,批号:20110408);胆固醇(天津东方试剂厂);葡聚糖凝胶 SephadexG-50(上海化学试剂厂);甲醇(色谱纯)、氯仿(分析纯)。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备

精密称取适量的磷脂和胆固醇溶于 20 mL 的氯仿中,然后称取适量的 Ox 原料药溶于磷酸盐缓冲液(PBS 缓冲液)中。在探头超声下,将溶有 Ox 的 PBS 缓冲液缓缓滴加到氯仿中,形成均一稳定的 W/O 型乳液。在 40 °C 下减压旋转蒸发除去氯仿,至瓶壁出现胶状物后继续减压蒸发得到脂质

体溶液。接着将脂质体溶液在-20 °C 条件下冷冻 1 h 后融化 20 min,反复 3 次,过 0.45 μm 滤膜过滤即得。通过透射电镜,观察制备的 Ox 脂质体的形态及分布,可知制备的脂质体成圆形或类圆形,分布较均一,结果见图 1。

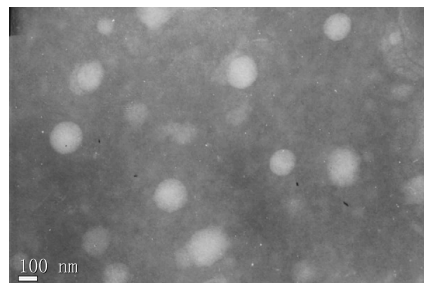


图 1 脂质体透射电镜图

Fig 1 The transmission electron microscopy picture of oxaliplatin liposomes

2.2 溶液的配制

空白脂质体破乳液(I 液):精密量取空白脂质体溶液 0.2 mL,置于 10 mL 量瓶中,用流动相破乳并定容至刻度,摇匀,即得。

Ox 对照品溶液(II 液):精密称取 25 mg Ox,置于 25 mL 量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀,即得。

脂质体破乳液(III 液):精密量取 Ox 脂质体溶液 0.2 mL,置于 10 mL 量瓶中,用流动相破乳并定容至刻度,摇匀,即得。

2.3 分析方法的建立

2.3.1 色谱条件的选择 色谱条件:色谱柱 HypersilBDS C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(5:95);检测波长 250 nm;柱温 25 °C;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL。

2.3.2 专属性的考察 取 I 液、II 液、III 液各 20 μL,按“2.3.1”项下色谱条件进行液相色谱分析,可知杂质峰与主成分峰分离良好,脂质体的辅料对药物的测定无影响,结果见图 2。

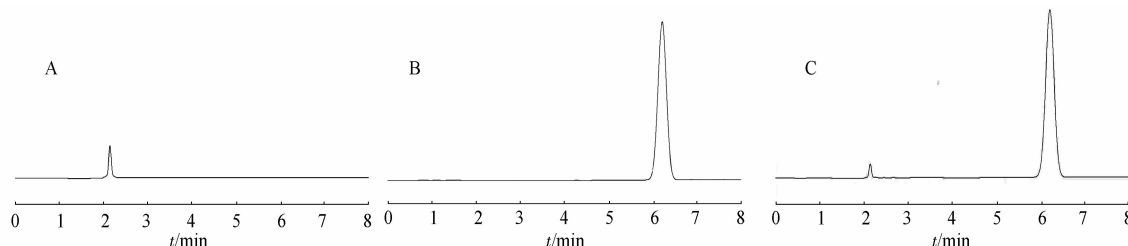


图 2 HPLC 色谱图

A-空白脂质体;B-奥沙利铂对照液;C-奥沙利铂脂质体

Fig 2 HPLC chromatograms

A-blank liposome; B-oxaliplatin control; C-oxaliplatin liposome

2.3.3 线性关系的考察 分别精密吸取不同体积的Ⅱ液,置于10 mL的量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀,分别配制成浓度为0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg·mL⁻¹系列标准液。按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程: $A=2\ 845\ 666.357\ 4C+10\ 467.935\ 4$, $r=0.999\ 9$ 。表明Ox浓度在0.02~1 mg·mL⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验 取“2.3.3”项下浓度为0.05, 0.5, 1 mg·mL⁻¹的Ox溶液,按“2.3.1”项下的色谱条件,分别于1 d内连续进样6次,连续测定5 d,计算日内精密度RSD分别为1.16%, 0.86%, 1.03% ($n=6$),日间精密度RSD分别为1.85%, 1.68%, 1.63% ($n=5$), RSD均<2%,表明精密度良好。

2.3.5 回收率测定 精密量取0.1 mL空白脂质体溶液于10 mL量瓶中,共3份,每份中加入不同体积的1 mg·mL⁻¹ Ox标准液,用流动相稀释并定容至刻度,配制成低、中、高浓度(0.05, 0.5, 1 mg·mL⁻¹)的溶液,每个浓度各3份,按“2.3.1”项下色谱条件进行液相色谱分析,计算回收率分别为99.7%, 99.9%, 100.2%, RSD分别为0.88%, 1.10%, 0.80% ($n=3$)。

2.4 脂质体与游离药物的分离

2.4.1 微型凝胶柱的制备 将Sephadex G-50浸泡在蒸馏水中,100 ℃煮沸1 h,充分溶胀后冷却^[8],装入2.5 mL的去掉内塞的注射器中(底部放入2张略小于其内径的圆形滤纸),排除气泡后,以水平平衡2~3个柱体积,将微柱在500 r·min⁻¹离心2 min除去多余水,得微柱(柱高约1.8 cm),备用。

2.4.2 微型凝胶柱对空白脂质体的吸附 取空白脂质体0.1 mL缓缓加入到微柱的顶端,500 r·min⁻¹离心1 min使空白脂质体进入微柱,继续加入0.2 mL的蒸馏水于微柱的顶端,1 000 r·min⁻¹离心2 min,收集洗脱液,连续重复操作3次。合并收集液于10 mL量瓶中,用流动相稀释并定容至刻度。于500 nm处测定吸光度(A_n);另取0.1 mL空白脂质体于10 mL量瓶中,用流动相稀释并定容至刻度,于500 nm处测定吸光度(A_0);按照 $A_n/A_0 \times 100\%$ 计算微柱对空白脂质体的平均回收率为99.3%, RSD为0.53% ($n=3$)。表明此微柱几乎可以将空白脂质体全部洗脱下来。

2.4.3 微柱对游离药物的吸附 精密称取Ox原

料药3份,以缓冲液定容,配制成浓度分别为0.02, 0.3, 1 mg·mL⁻¹的溶液。精密吸取各浓度的溶液0.1 mL,缓缓加入微柱顶端,按“2.4.2”项下条件离心洗脱,合并收集的洗脱液置于10 mL量瓶中,用流动相定容至刻度。按“2.3.1”项下色谱条件分别进样测定,记录峰面积为 A_1 。精密量取各浓度的溶液0.1 mL于10 mL量瓶中用流动相稀释定容至刻度,按“2.3.1”项下色谱条件测定峰面积为 A_0 。由于过柱后的峰面积太小,故用峰面积来计算微柱对游离药物的吸附率 $[(A_0-A_1)/A_0 \times 100\%]$ ^[9-10]。结果3种不同浓度药物的吸附率分别为98.8%, 97.9%, 99.0%, RSD分别为0.93%, 1.53%, 1.32% ($n=3$)。说明在洗脱范围内微柱几乎可以将游离药物完全吸附。

2.4.4 微柱对空白脂质体和游离药物混合的物理吸附 精密取0.1 mL的空白脂质体3份置于10 mL量瓶中,分别加入适量的Ox原料药,并用缓冲液定容至刻度,制成浓度分别为0.05, 0.5, 1 mg·mL⁻¹的物理混合样液。按“2.3.1”项下色谱条件进行测定。分别取3个不同浓度的物理混合样液0.1 mL加入到微柱的顶端,按“2.4.2”项下离心条件来分离游离药物与脂质体,重复以上操作,收集每次的洗脱液,收集的洗脱液用流动相破乳后定容至10 mL,按“2.3.1”项下色谱条件进行HPLC测定,根据HPLC测定的峰面积与收集管数绘制洗脱曲线^[11-12],1~6管洗脱液为空白脂质体混悬液,7~14管洗脱液为游离Ox溶液, Sephadex G-50微型凝胶柱可较好地将脂质体与游离Ox药物分离,结果见图3。

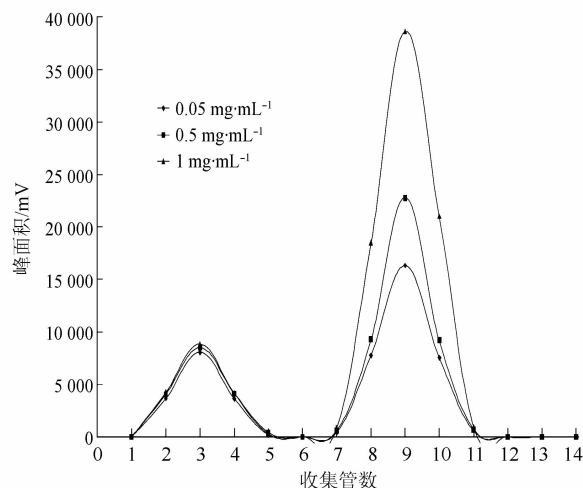


图3 凝胶微柱对空白脂质体与Ox物理混合物的分离
Fig 3 Separation of minicolumn of Sephadex-G-50 on blank liposome and oxaliplatin

2.5 脂质体包封率的测定

精密量取 3 份不同批次的 Ox 脂质体各 0.1 mL, 上样于微柱的顶端, 按“2.4.2”项下方法分离游离药物和脂质体, 最终将收集液用流动相稀释定容至 10 mL 量瓶中, 按“2.3.1”项下色谱条件测定包封于脂质体中的药物浓度 C_1 。再量取 Ox 脂质体溶液 0.1 mL 于 10 mL 的量瓶中, 加流动相破乳并定容至刻度, 按“2.3.1”项下的色谱条件测定总药物的浓度 C_0 , 计算包封率: $EE\% = C_1/C_0 \times 100\%$ 。最终测得脂质体的包封率分别为 56.6%, 57.5%, 60.0%, RSD 分别为 1.28%, 1.04%, 1.42%($n=3$)。

3 讨论

Ox 为水溶性药物, 水溶性药物脂质体多采用逆向蒸发法制备^[13], 有文献^[14]报道, 采用逆相蒸发结合冻融法制得脂质体, 可以明显提高脂质体的包封率。本试验采用逆向蒸发结合冻融法来制备, Ox 脂质体的包封率比未经冻融制备的包封率有明显提高, 包封率由 $15.3\% \pm 0.2\%$ 提高到 $58.0\% \pm 1.7\%$ 。

本试验分别以蒸馏水和不同 pH 的 PBS 缓冲液为洗脱液进行洗脱分离, 结果用蒸馏水作洗脱液便可将脂质体与游离药物很好的分离, 使用起来方便快捷。脂质体膜具有流动性, 用蒸馏水进行洗脱时, 脂质体膜两侧的渗透压变化并不足以引起膜的破裂, 而影响脂质体的包封率。故最终选用蒸馏水作为洗脱液。本试验未采用生理盐水作为洗脱液, 是因为 Ox 与生理盐水有配伍禁忌, Ox 在生理盐水中会部分转化为顺铂和左旋异构体, 对药物活性有影响。

离心的转速和离心时间对 SephadexG-50 微柱的分离效果有很大的影响。转速过高或离心的时间过长会使凝胶溶胀过程中吸收的水分离出来, 导致柱子中出现大量气泡甚至柱子断裂; 转速过低或离心时间过短会减少脂质体的洗脱体积, 从而导致脂质体和游离药物分离效果不好。经过反复的试验操作, 最终确定先采用 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 使脂质体进入微柱中, 而不被洗脱下来, 再用 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min 离出洗脱液为最佳的分离条件。

REFERENCES

- [1] STATHOPOULOS G P, BOULIKAS T, KOURVETATIS A, et al. Liposomal oxaliplatin in the treatment of advanced cancer: a phase I study [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(2B): 1489-1493.
- [2] JIN X P. Comparison on the clinical curative effect and adverse reactions of the domestic vs imported oxaliplatin [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2012, 32(8): 621-623.
- [3] YU B L, MA Y P, LIU Q Z, et al. Review of anticancer platinum drugs [J]. *Nat Sci J Hainan Univ*(海南大学学报: 自然科学版), 2005, 23(1): 72-80.
- [4] LIU Y, GUO W Y. Optimization of oxaliplatin liposome formulation by box-behnken experimental design [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(11): 1196-1202.
- [5] ZHENG N, ZHANG L D. A general situation in studies of quality control for liposomes [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2004, 13(12): 1282-1286.
- [6] WEI R P, WANG Q Y, ZHU W C, et al. Determination of entrapment efficiency of amphotericin B liposome by mini-column centrifugation-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(3): 427-429.
- [7] HONG H, LONG X Y, LI L R, et al. Optimized separation conditions for the determination of encapsulation efficiency of liposome-encapsulated capsaicin [J]. *Acad J Guangdong Med Pharm*(广东药学院学报), 2005, 21(2): 120-123.
- [8] WANG P, LIN H, ZHU B. Methods about swelling recovery and preservation of sephadex in gel filtration chromatography [J]. *Exp Technol Manage*(试验技术与管理), 2006, 23(2): 24-25.
- [9] LIU L P, JIN Y, LI Y. Determination of entrapment efficiency of clotrimazole liposome with Sephadex G-50 gel minicolumn centrifugation-HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(11): 1813-1814.
- [10] CUI T, GUO W Y. Determination of entrapment efficiency of capecitabine liposomes by microcolumn centrifugation-HPLC [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2012, 43(8): 682-684.
- [11] CHEN Z H, LIU P Y, WEI Y C. Determination of entrapment efficiency of doxorubicin magnetic thermo sensitive liposomes by mini-column centrifugation-reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Pharm J Chin PLA*(解放军药科学报), 2010, 26(6): 496-499.
- [12] ZHANG Y, ZOU H, CHEN J M. Determination of entrapment efficiency of teniposide liposomes by SephadexG-50 gel minicolumn centrifugation-HPLC [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2009, 18(16): 1572-1576.
- [13] YANG M Y, LI Y M, MEI X G. Determination of entrapment efficiency of oxaliplatin liposome and its release profile *in vitro* [J]. *Bull Acad Mil Med Sci*(军事医学科学院院刊), 2007, 31(5): 448-450.
- [14] ZHANG Q, DENG Y J. The preparation of 5-FU liposome by a freezethawing method and the study on its stability [J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2000, 17(2): 87-89.

收稿日期: 2013-04-21