

★ 论著 ★

RP-HPLC 法测定酒石酸茛菪诺啉脂质体中药物含量及包封率*

袁松¹, 孙会敏¹, 涂家生², 丁丽霞^{1**}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要 目的: 建立酒石酸茛菪诺啉脂质体中药物含量及包封率测定方法。方法: 采用逆向蒸发法制备脂质体, 葡聚糖凝胶柱层析法分离脂质体和游离药物, 以磷酸盐缓冲液为洗脱介质。采用反相高效液相色谱法测定脂质体中酒石酸茛菪诺啉的含量。结果: 酒石酸茛菪诺啉含量测定方法的回收率为 99.5%, 在 $5 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9998$); 柱层析法分离游离药物的柱回收率为 101.0%, 加样回收率为 97.9%。样品的平均包封率为 40.3%。结论: 酒石酸茛菪诺啉脂质体中药物含量及包封率测定方法准确、灵敏, 可用于测定酒石酸茛菪诺啉脂质体的包封率。

关键词: 异喹诺啉衍生物; 酒石酸茛菪诺啉; 脂质体; 包封率; 葡聚糖凝胶柱层析法; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)07-1205-04

RP-HPLC determination of content and entrapment efficiency of indoquinoline tartrate liposomes*

YUAN Song¹, SUN Hui-min¹, TU Jia-sheng², DING Li-xia^{1**}

(1. National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Objective: To establish an RP-HPLC method for the determination of content and entrapment efficiency of tartrate indoquinoline liposomes. **Methods:** The content of tartrate indoquinoline was determined by RP-HPLC. Entrapment efficiency was determined after the separation of the untrapped drug by Sephadex-G50 chromatography. **Results:** A good linear relationship was found between peak area and the concentration of tartrate indoquinoline in the range of $5 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9998$), the sample recovery was around of 99.5%. The recovery of Sephadex-G50 chromatography was 101.0% and the recovery of tartrate indoquinoline was 97.9%. The average entrapment efficiency of tartrate indoquinoline liposome was 40.3%. **Conclusion:** This method is accurate, sensitive and applicable for determination of content and entrapment efficiency of tartrate indoquinoline liposome.

Key words: tartrate indoquinoline; liposome; entrapment efficiency; Sephadex-G50 chromatography; HPLC

酒石酸茛菪诺啉 (tartrate indoquinoline) 是对 κ 阿片受体具有很高亲和性和选择性的新型四氢异喹诺啉衍生物, 在小鼠热板镇痛实验研究中显示出了较强的镇痛活性, 本品作为酒石酸茛菪诺啉注射剂, 为中枢性镇痛剂, 以静脉注射的给药方式, 药物起效迅速。本研究拟将该药物制备成脂质体以提高药物的靶向性。在研究中我们以凝胶柱层析法对载药脂质体和游离药物进行了有效分离, 采用

RP-HPLC 法测定药物含量, 建立了酒石酸茛菪诺啉脂质体包封率的分析方法, 该法简单快速, 准确性高。

1 仪器与试剂

仪器: UV-2550 型紫外分光光度计 (SHIMADZU 公司), Waters 2695-2996 液相色谱仪 (Waters 公司), S40K 型酸度计 (METTLER TOLEDO 公司), XS205 型电子天平 (METTLER TOLEDO 公司),

* 十一五国家科技支撑项目: 我国当前急需建立和提高的药品监督检验项目技术研究 (项目编号: 2008BAI55B00)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095783; E-mail: dinglx@nicpbp.org.cn

N-1001型旋转蒸发仪(EYELA 公司), SB-2000 型电热恒温水浴锅(EYELA 公司), BI-90PULA 型纳米粒度分析仪(BROOKHAVEN 公司)。

试药: 酒石酸茛菪诺啉(中国药科大学提供), 注射用蛋黄卵磷脂(上海艾韦特有限公司 批号: EL9001), 胆固醇(天津市化学试剂有限公司 批号: 20091214), Sephadex-G50(Medium 瑞典 Sigma 公司), 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 酒石酸茛菪诺啉含量测定方法的建立

2.1 色谱条件 色谱柱: CAPCELL-RAK C₁₈ (3.0 mm × 10 mm, 3 μm); 流动相: 51.4 mmol · L⁻¹ 醋酸铵溶液(冰醋酸调 pH 至 4.10) - 甲醇(3:2) 作为流动相; 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 37 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 系统适用性 取空白脂质体 0.5 mL, 于 10 mL 量瓶中, 加入 0.5 mL 四氢呋喃破乳后, 加甲醇定容至刻度, 即得空白脂质体破乳液; 取酒石酸茛菪诺啉脂质体 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 以 0.5 mL 四氢呋喃破乳后, 加甲醇定容至刻度, 即得酒石酸茛菪诺啉脂质体破乳液; 取酒石酸茛菪诺啉 5 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 即得酒石酸茛菪诺啉溶液。

取空白脂质体破乳液、酒石酸茛菪诺啉脂质体破乳液、酒石酸茛菪诺啉溶液各 20 μL 进样分析。色谱图见图 1。在该色谱条件下, 酒石酸茛菪诺啉的保留时间约为 9.4 min。理论塔板数为 2012, 与相邻色谱峰的分离度为 3.46。杂质峰和药物峰分离良好, 辅料和试剂对药物测定无干扰。

2.3 线性范围 精密称取酒石酸茛菪诺啉 50.0 mg, 用甲醇溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 得浓度为 500 μg · mL⁻¹ 酒石酸茛菪诺啉甲醇溶液作为储备液备用。精密移取储备液, 以甲醇为溶剂配制浓度为 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μg · mL⁻¹ 系列酒石酸茛菪诺啉溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样 20 μL 检测。以峰面积(A)对质量浓度(C) 进行线性回归, 得标准曲线:

$$A = 2 \times 10^4 643 C - 8 \times 10^4 137 \quad r = 0.9998 \quad (n = 7)$$

结果表明在 5 ~ 200 μg · mL⁻¹ 浓度范围之内, 峰面积对浓度呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 精密量取酒石酸茛菪诺啉储备液 1.0, 2.0, 3.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 50, 100, 150 μg · mL⁻¹ 的酒石酸茛菪诺啉溶液, 分别精密吸取 20 μL 连续

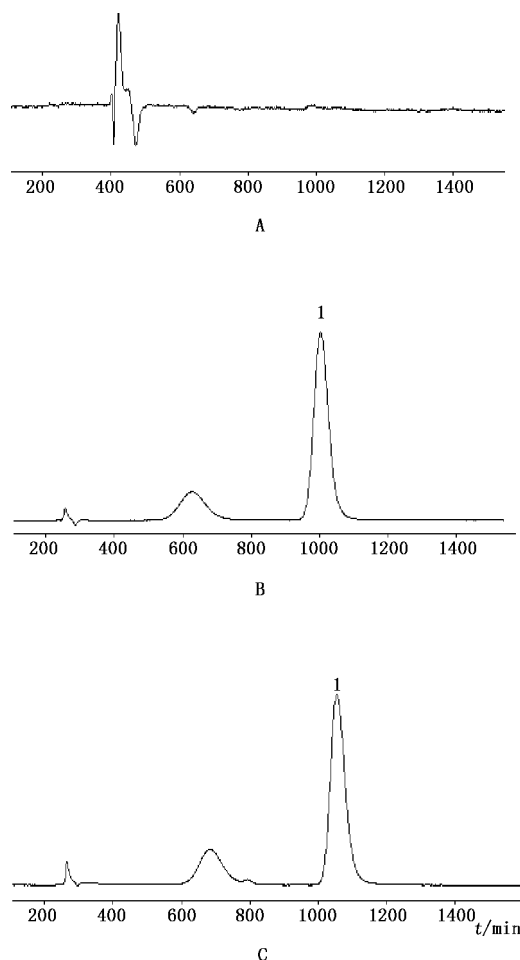


图1 空白脂质体(A)、酒石酸茛菪诺啉(B)、酒石酸茛菪诺啉脂质体(C)高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank liposome(A), tartrate indoquinoline(B) and tartrate indoquinoline liposome(C)

1. 酒石酸茛菪诺啉(tartrate indoquinoline)

进样 6 次, 记录色谱峰峰面积, 结果低、中、高浓度峰面积的 RSD($n = 6$) 分别为 0.87%, 0.46%, 0.10%, 说明日内精密度良好; 精密吸取上述低、中、高浓度酒石酸茛菪诺啉溶液 20 μL 分别于第 1, 2, 3 d 进样, 根据峰面积计算日间精密度, 结果低、中、高浓度溶液峰面积的 RSD($n = 6$) 分别为 0.66%, 1.2%, 1.2%, 说明日间精密度良好。

2.5 加样回收率试验 精密量取空白脂质体混悬液 0.5 mL 置 5 mL 量瓶中, 分别精密加入酒石酸茛菪诺啉储备液 0.8, 1.0, 1.2 mL, 加入适量四氢呋喃破乳后, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 每个浓度配制 3 份, 分别进样 20 μL, 测定峰面积, 代入标准曲线换算成实际测定浓度, 计算回收率(回收率 = 测定浓度 / 配制浓度), 结果见表 1, 平均回收率为 99.5% ($n = 9$)。

表1 加样回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 The recovery of the tartrate indoquinoline sample in the blank liposome

加入量 (added) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	检测量 (found) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
80.00	79.01	98.8	0.2
100.00	97.53	97.5	0.2
120.00	121.40	101.1	0.1

3 酒石酸茛菪诺啉脂质体制备^[4]

按比例称取卵磷脂与胆固醇置于圆底烧瓶中,加入适量三氯甲烷使其溶解后,通过旋转蒸发除去有机溶剂,将得到的脂质薄膜重新溶于乙醚中,同时加入一定体积的酒石酸茛菪诺啉水溶液,进行超声处理后得到 W/O 型乳剂,将 W/O 型乳剂置于旋转蒸发仪中,于 37 ℃ 下减压蒸发,除去有机溶剂,得到白色稠厚胶状物,加入少量水后,再继续蒸发除去残留的有机溶剂,同时旋转使瓶壁上的凝胶脱落,最后得乳白色的酒石酸茛菪诺啉脂质体混悬液,依次过 0.8 μm 、0.45 μm 的微孔滤膜各 3 次即得酒石酸茛菪诺啉脂质体。用激光粒度仪测定所制备脂质体的平均粒径在 200 nm 左右。

4 酒石酸茛菪诺啉脂质体包封率的测定

4.1 葡聚糖凝胶柱层析条件 称取 Sephadex - G50 10 g,用蒸馏水充分溶胀 24 h 后,装于内径 1.5 cm 的玻璃柱中,柱床高 15 cm;以 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液为洗脱液;流速为 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;室温下洗脱。

4.2 洗脱曲线的绘制 精密移取酒石酸茛菪诺啉脂质体和酒石酸茛菪诺啉甲醇溶液的混合液 0.5 mL,上 Sephadex - G50 凝胶柱,以磷酸盐缓冲液(pH 6.5)为洗脱液进行洗脱,分段收集,每 2 mL 收集 1 份,共收集 100 mL,每管加四氢呋喃 0.5 mL 后,用甲醇定容至 5 mL,按“2.1”项下条件测定药物含量,以峰面积为纵坐标,洗脱液累计洗脱体积为横坐标绘制洗脱曲线(见图 2,从洗脱曲线可以看出,酒石酸茛菪诺啉脂质体从 10 mL 处开始流出,在 20 mL 处已全部洗脱,而未包封的游离酒石酸茛菪诺啉在第 40 mL 处开始流出,到 70 mL 处已全部洗脱。脂质体和游离药物能得到很好的分离,中间间隔约 20 mL,可以确保分离效果。

4.3 柱回收率考察 配制低、中、高 3 种浓度的酒石酸茛菪诺啉溶液,分别精密移取 0.5 mL 上柱,按“4.1”项下条件进行洗脱,收集游离药物组分后,稀

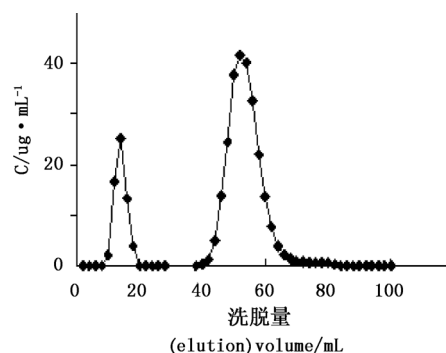


图2 酒石酸茛菪诺啉脂质体和游离药物洗脱曲线

Fig 2 The elution curve of Tartrate Indoquinoline liposome and free drugs

释定容后按“2.1”项下色谱条件检测药物含量,计算酒石酸茛菪诺啉药物的柱回收率,结果见表 2,平均回收率为 101.0% ($n=3$),结果表明 Sephadex - G50 对酒石酸茛菪诺啉没有吸附作用,酒石酸茛菪诺啉可被洗脱液完全洗脱下来。

表2 酒石酸茛菪诺啉柱回收率

Tab 2 The column recovery of tartrate indoquinoline

加入量 (added) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	测定量 (found) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%
1.620	1.642	101.4	101.0 $\pm$ 1.0
1.980	2.013	101.6	
2.400	2.397	99.86	

4.4 酒石酸茛菪诺啉溶液加样回收率的考察

配制低、中、高 3 种浓度的酒石酸茛菪诺啉溶液,分别加入空白脂质体,混匀,得标准混合液,精密移取 0.5 mL 上柱,按“4.1”项下条件进行洗脱,收集游离药物组分后,稀释定容,按“2.1”项下色谱条件检测药物含量,计算酒石酸茛菪诺啉药物的柱回收率,结果见表 3,其平均值为 97.9% ($n=3$),结果表明,脂质等辅料的加入不影响酒石酸茛菪诺啉的洗脱,所以用凝胶柱层析法可以有效分离游离药物和脂质体。

表3 酒石酸茛菪诺啉柱加样回收率

Tab 3 The recovery of tartrate indoquinoline in blank liposome

加入量 (added) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	测定量 (found) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%
1.272	1.314	96.8	97.9 $\pm$ 1.6
1.564	1.610	97.1	
1.913	1.918	99.6	

4.5 酒石酸茛菪诺啉脂质体包封率测定 精密量取酒石酸茛菪诺啉脂质体 0.5 mL, 上预先处理好的 Sephadex - G50 凝胶柱, 用 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度室温下洗脱, 收集 40 ~ 70 mL 游离药物流出液, 用甲醇将游离药物流出液稀释定容至 50 mL, 取 20 μL 进样分析, 计算游离药物含量 ($W_{\text{游}}$); 另取 0.5 mL 酒石酸茛菪诺啉脂质体, 加入适量的四氢呋喃破乳后, 用甲醇定容稀释至 50 mL, 取 20 μL 进样分析, 计算脂质体混悬液中的药物总量 ($W_{\text{总}}$)。包封率计算方法为: $\text{包封率} = (1 - W_{\text{游}}/W_{\text{总}}) \times 100\%$ 。不同批次酒石酸茛菪诺啉脂质体包封率检测结果见表 4。

表 4 酒石酸茛菪诺啉柱脂质体包封率测定结果 ($n=3$)

Tab 4 The entrapment efficiency of tartrate indoquinoline liposome among three batches

批号 (batch)	包封率 (entrapment efficiency) / %	RSD / %
101013 - 1	39.30	1.40
101013 - 2	38.93	0.93
101013 - 3	42.70	1.27

5 讨论

5.1 测定方法的选择^[2] 取酒石酸茛菪诺啉甲醇溶液、空白脂质体在 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描, 结果酒石酸茛菪诺啉甲醇溶液在 206 nm 处有最大吸收, 但脂质体中的卵磷脂和胆固醇在该波长下也有吸收, 若采用紫外分光光度法测定脂质体中药物含量, 辅料将干扰测定, 因此考虑采用专属性较高的高效液相色谱法。

5.2 破乳剂的选择 在试验中分别以 10% Triton X - 100^[3]、甲醇、四氢呋喃、乙腈作为破乳剂破坏脂质体, 实验结果表明, 以相同体积的以上破乳剂加入到脂质体混悬液中, 磷脂析出, 过滤后, 经 10% Triton X - 100、甲醇、乙腈破坏的脂质体仍有乳光, 以四氢呋喃为乳化剂, 无基质析出。所以最终选择四氢呋喃作为乳化剂。

5.3 脂质体中游离药物的分离 本实验采用葡聚糖凝胶柱层析法对酒石酸茛菪诺啉脂质体和游离药物进行分离, 中国药典 2010 年版规定^[4,5], 含药脂

质体与游离药物的分离可以使用凝胶柱层析法、高速离心法、微柱离心法以及透析法等^[6~8], 透析法操作简单, 但消耗时间较长; 作者曾尝试以高速离心法对游离药物进行分离, 在 $20000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 得到的上层液依旧为乳白色混悬液, 说明并未将游离药物和脂质体完全分离。采用葡聚糖凝胶柱层析法, 由洗脱曲线可以看出脂质体和游离药物得到了很好的分离, 简便快速, 通过药物的柱回收率及加样回收率可以看出葡聚糖凝胶对酒石酸茛菪诺啉没有吸附, 该法能够准确测定游离药物的含量。

参考文献

- 1 Torchilin VP, Weissig V. Liposomes: A Practical Approach (脂质体). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2007
- 2 ZHU Kun (朱琨), LIU Xiao-hong (刘晓红). The methods of separation and determination entrapment efficiency of liposomes (脂质体分离和包封率测定). J Jiangsu Inst Educat (江苏教育学院学报), 2009, 26(2): 33
- 3 CHEN Chao (陈超), DENG Ying-jie (邓英杰). Determination of entrapment efficiency of irinotecan liposomes (盐酸伊立替康脂质体包封率的测定). China Med Her (中国医药导报), 2009, 6(36): 68
- 4 ChP (中国药典). 2005. Vol II (二部): Appendix (附录) XIX E
- 5 LI Hong - ru (李红茹), LI Shu - fen (李淑芬). The measurement methods of the entrapment efficiency of drugs in liposomes (脂质体中药物包封率的测定方法). Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27(11): 1844
- 6 ZHANG Gui - fang (张桂芳), ZHU Jia - bi (朱家璧), HU Jian (胡建), et al. RP - HPLC determination of content and entrapment efficiency of nimodipine nanoliposome (HPLC 法测定尼莫地平纳米脂质体药物含量及包封率). Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2002, 22(3): 231
- 7 LIU Li - ping (刘丽萍), JIN Yang (金阳), LI Yi (李毅). Determination of entrapment efficiency of clotrimazole liposome with Sephadex G - 50 gel minicolumn centrifugation - HPLC (微柱凝胶离心分离 - HPLC 法测定克霉唑脂质体的包封率). Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27(11): 1812
- 8 ZHANG Zi - qiang (张自强), XU Mei (许玫), YAO Jing (姚静), et al. Studies on entrapment efficiency of irinotecan liposomes by ultrafiltration method (超滤法测定伊立替康脂质体包封率的研究). Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2008, 28(12): 2081

(本文于 2011 年 2 月 4 日收到)