

微柱离心-HPLC法测定两性霉素B脂质体包封率

魏瑞萍, 王秋云, 朱文川, 陈玉双

(上海新先锋药业有限公司 201203)

摘要 目的: 建立微柱离心-HPLC法测定两性霉素B脂质体包封率。方法: 采用葡聚糖凝胶(Sephadex G-50)微柱离心法分离脂质体与游离药物; 用高效液相色谱法测定脂质体中两性霉素B的含量, 计算包封率。结果: 在所选色谱条件下, 辅料不干扰测定, 两性霉素B浓度在 $1.0 \sim 50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性良好。微柱离心法能有效的将两性霉素B脂质体与游离药物分离, 加样回收率为 100.2% , RSD为 0.97% 。结论: 该方法便捷, 准确, 重现性好, 可用于测定两性霉素B脂质体的包封率。

关键词 两性霉素B脂质体; 微柱离心; 高效液相色谱法; 包封率

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0427-03

Determination of entrapment efficiency of amphotericin B liposome by mini-column centrifugation-HPLC

WEI Rui-ping WANG Qiu-yun, ZHU Wen-chuan, CHEN Yu-shuang

(Shanghai Asia Pioneer Pharmaceuticals Co., Ltd. Shanghai 201203, China)

Abstract Objective To establish a mini-column centrifugation HPLC method to determine the entrapment efficiency of amphotericin B liposome. **Methods** A mini-column centrifugation was employed to separate the drug free from the liposome. The content of amphotericin B was quantified by HPLC. **Results** Under the chromatogram condition the supplementary was applied with no influence. A calibrated linear curve of amphotericin B concentration was within $1.0 \sim 50.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.9998$). The free amphotericin B was well separated from the liposome using mini-column centrifugation. The addition of blank liposome recovery rate of amphotericin B was 100.2% with RSD of 0.97% . **Conclusion** The method was simple, accurate, reproducible and applicable for determination of entrapment efficiency of amphotericin B liposome.

Key words amphotericin B; liposome; mini-column centrifugation; HPLC; entrapment efficiency

两性霉素B(amphotericin B, AmB)是一种多烯类全身抗真菌抗生素,由nodusus链丝菌培养液中提取而得,是目前治疗新生隐球菌、曲霉菌等深部真菌感染的首选药^[1]。近年来,随着广谱抗生素、皮质激素、免疫抑制剂、细胞毒药物的应用,深部真菌感染的发病率呈上升趋势,针对两性霉素B治疗剂量下比较严重的毒副作用,将两性霉素B制成脂质体,可以明显降低毒性,提高治疗指数^[2]。

包封率(entrapment efficiency)是评价脂质体在质量的重要指标之一,《中国药典》2005年版脂质体制剂指导原则明确指出了脂质体包封率的计算方法,并规定包封率不得小于 80% ^[3]。测定包封率的关键是使脂质体与游离药物有效分离,目前常用的包封率测定方法有葡聚糖凝胶柱色谱法、透析法、超

速离心法、超滤膜过滤法、鱼精蛋白沉淀法^[4]。其中的葡聚糖凝胶柱色谱法由于操作简单常被采用,但存在洗脱时间长、洗脱体积大、药物浓度低等问题。据文献报道,对微型凝胶柱的洗脱条件进行优化,上述缺陷可以克服^[5,6]。本文采用微柱离心-HPLC

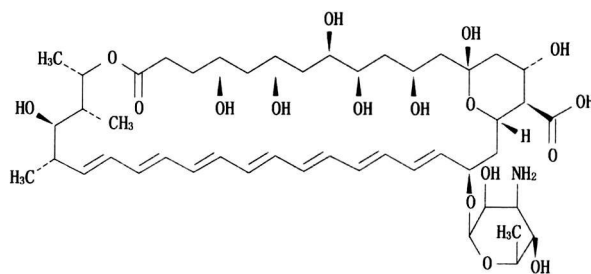


图1 AmB化学结构

Fig 1 The chemical structure of amphotericin B

法测定了 AmB 脂质体包封率, 并对微柱分离 AmB 脂质体的条件进行了优化, 结果表明该方法准确, 专属性强, 重复性好。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 1100LC 高效液相色谱仪 (G1311A 泵, G1314A 紫外检测器, 美国 Agilent 公司); SK3200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); 85~2 型磁力搅拌器 (上海志威电器有限公司); JENCO6173 pH 计 (上海任氏电器有限公司)。

1.2 试剂和药品 甲醇、乙腈 (色谱纯, Sigma-A Hrich Chemie GmbH); EDTA (分析纯, 苏州花桥化工四厂); 二甲基亚砜 (分析纯, 宜兴市达华化工有限公司); 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 (上海源聚生物科技有限公司进口分装); AmB 对照品 (上海新先锋药业有限公司, 批号 A1070401, 含量 100.9%); 注射用 AmB 脂质体 (上海新先锋药业有限公司, 批号 070106 070201, 070301); 注射用 AmB 去氧胆酸盐 (上海新先锋药业有限公司, 批号 070101, 规格 25 mg); 纯水本公司生产。

AmB 对照品储备液 精密称取 AmB 对照品 50 mg 置 50 mL 量瓶中, 用 DMSO-甲醇 (2:8) 稀释至刻度, 精密量取 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 用 DMSO-甲醇 (2:8) 稀释至刻度。

AmB 脂质体溶液 取 AmB 脂质体 1 瓶, 加水 10 mL 溶解并混匀, AmB 浓度约为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 备用。

空白脂质体溶液 取空白脂质体 1 瓶, 加水 10 mL 溶解并混匀。

葡聚糖凝胶微型柱的制备 将处理好的 Sephadex G-50 用空白脂质体饱和, 装入 2.5 mL 的注射器中, 离心 2 min ($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 制成 Sephadex G-50 的微型柱。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); VWD 可变波长紫外检测器; 检测波长 405 nm; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 流动相: 乙腈-甲醇- $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (25:50:30); 柱温 25°C ; 进样量 20 μL ; 反相洗脱。

2.2 系统适用性实验 分别量取 AmB 对照品储备液、AmB 脂质体溶液、空白脂质体溶液适量置 100 mL 量瓶中, 加 DMSO-甲醇 (2:8) 溶液稀释至刻度, 按上述色谱条件进样记录色谱图, 见图 2 理论塔板数以 AmB 计不低于 3000 辅料无干扰。

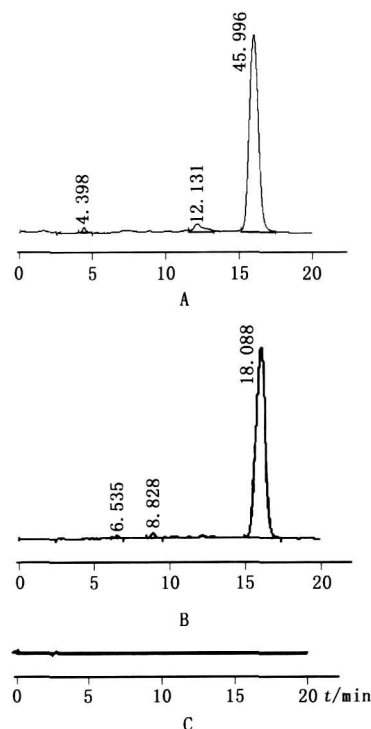


图 2 AmB 对照品 (A)、AmB 脂质体 (B) 和空白脂质体 (C) 色谱图
Fig 2 Chromatograms of amphotericin B reference substance (A), amphotericin B liposome (B) and blank liposome (C)

2.3 标准曲线的绘制 精密量取 AmB 对照品储备液适量, 用 DMSO-甲醇 (2:8) 溶液稀释成浓度为 1.0 10.0 20.0 30.0 50.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 按“2.1”项色谱条件进样, 以峰面积 A 对浓度 C 作线性回归, 回归方程为:

$$A = 130.31C + 33.76 \quad r = 0.9998$$

表明 AmB 在 $1.0 \sim 50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.4 精密度试验 精密量取 AmB 对照品储备液适量, 用 DMSO-甲醇 (2:8) 溶液稀释成浓度为 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 按“2.1”项色谱条件连续进样 5 次, 计算精密度 RSD 为 0.61%。

2.5 回收率试验 精密量取 AmB 对照品储备液适量, 加入空白脂质体溶液 1 mL, 用 DMSO-甲醇 (2:8) 溶液稀释成浓度为 $1.0 \sim 50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 每个浓度 3 份, 按“2.1”项色谱条件进样, 计算回收率 (表 1)。

表 1 AmB 回收率测定结果 ($n = 3$)

$C / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率 (recovery) / %	RSD / %
1.0	99.80	0.89
10.0	99.80	0.79
50.0	101.0	0.25

2.6 AmB脂质体中 AmB的含量测定 取 AmB脂质体 3批, 分别用 DM SO- 甲醇(2: 8)溶液稀释成浓度为 $30.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液, 按“2. 1”项色谱条件进样测定。3 批样品含量分别为 100. 2%, 100. 4%, 100. 1%; RSD 分别为 0. 76%, 0. 78%, 0. 54%。

2.7 葡聚糖凝胶 (Sephadex G- 50) 微柱离心法对脂质体和游离药物的分离

2.7.1 洗脱曲线的考察 取 AmB脂质体溶液 0. 4 mL, 缓缓加于葡聚糖凝胶微型柱顶部, 用水以 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速洗脱, 每 3 min 收集洗脱液 1 瓶, 共收集 6 瓶; 前 3 瓶收集于 50 mL 量瓶中后 3 瓶收集于 25 mL 量瓶中; 后改用 DM SO- 甲醇(2: 8)溶液洗脱, 继续收集 7 瓶洗脱液分别于 10 mL 量瓶中, 将收集的 7 瓶洗脱液用 DM SO- 甲醇(2: 8)稀释至刻度。按“2. 1”项色谱条件进样测定, 测定结果表明洗脱 15 min 后, 脂质体已完全被洗脱。

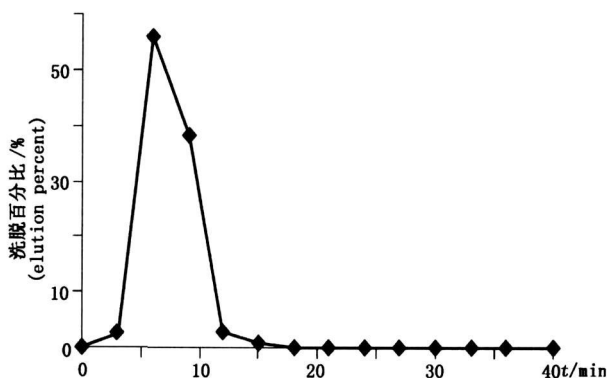


图 3 AmB 脂质体洗脱曲线

Fig 3 AmB liposome elution curve

2.7.2 微柱离心加样回收 取 AmB 去氧胆酸盐适量, 加水溶解使 AmB 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别量取 0. 2 0. 3 0. 4 mL 溶液置 Sephadex G- 50 微型柱上, 加入同体积空白脂质体溶液, 置离心机中离心 2 min ($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。每个浓度 3 份样品, 每份样品重复离心 3 次合并离心液, 用 DM SO- 甲醇(2: 8)稀释至 10 mL; 按“2. 1”项色谱条件进样, 以取相同样品量不经微柱离心直接测定为对照, 计算回收率, 低、中、高 3 种浓度的回收率分别为 99. 16%, 101. 3%, 100. 2%; RSD 为 0. 17%, 0. 51%, 0. 39%。

2.7.3 包封率测定的重现性 精密量取 AmB 脂质体溶液 0. 4 mL, 按“2. 7”项下方法测定, 验证包封率测定方法的重现性, 结果平均包封率为 98. 73%, RSD 为 1. 15%。

2.8 包封率的测定

取 AmB 脂质体样品 1 瓶, 加 10 mL 水使溶解, 涡旋使溶液均匀。精密量取该溶液 0. 4 mL 置 Sephadex G- 50 微型柱上, 离心 3 次, 合并收集离心液移入 10 mL 量瓶中, 用 DM SO- 甲醇(2: 8)溶液稀释至刻度, 按“2. 1”项色谱条件进样, 计算包封药物量。

精密量取该样品溶液 0. 4 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 DM SO- 甲醇(2: 8)溶液稀释至刻度, 按“2. 1”项色谱条件进样分析, 计算药物总量。用以下公式计算包封率, 3 批样品的包封率分别为 98. 81%, 98. 51%, 99. 05%; RSD 分别为 0. 54%, 0. 62%, 0. 64%。

$$\text{包封率 } E_n(\%) = \frac{\text{包封药物}}{\text{药物总量}} \times 100\%$$

3 讨论

由于 AmB 在二甲基亚砷中溶解, 在甲醇中极微溶, 在水中不溶, 遇光易分解, 所以 AmB 脂质体破裂采用 DM SO- 甲醇(2: 8)溶液, 对 AmB 和磷脂都有很好的溶解性, 配制好的 AmB 溶液不宜久放。在加样回收试验中, 为解决 AmB 的溶解性, 将其制备成 AmB 的去氧胆酸盐。

参考文献

- 1 LI Duan (李端). Pharmacology (药理学) 5th Ed (第五版), Beijing (北京): People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2003 393
- 2 Ismail S, Duzgunes N. Efficacies of cyclodextrin- complexed and liposome- encapsulated clarithromycin against Mycobacterium avium complex infection in human macrophage. *Int J Pharm*, 2003, 250(2): 403
- 3 ChP (中国药典). 2005. Vol II (二部) Appendix (附录) XIX E
- 4 LI Tang- li (李唐棣), HAO Li- mei (郝丽梅), MEI Xing- guo (梅兴国). Research advance of entrapment efficiency of liposome (脂质体包封率的研究进展). *Foreign Med Sci Sec Pharm* (国外医学药学分册), 2006, 33(6): 224
- 5 HONG- Hu (洪慧), LONG Xiao- ying (龙晓英), LI Li- ren (李力任), et al. Optimized separation conditions for the determination of encapsulation efficiency of liposome- encapsulated capsaicin (葡聚糖微型凝胶柱测定辣椒碱柔性脂质体包封率的条件探讨). *J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2005, 21(2): 120
- 6 TANG Pei- lian (汤佩莲), LONG Xiao- ying (龙晓英), LIN Dan (林丹), et al. Determination of encapsulation efficiency of liposome- encapsulated capsaicin using sephadex mini- column and the first order derivative spectrometry (应用葡聚糖微型凝胶柱与一阶导数光谱法测定辣椒碱柔性脂质体的包封率). *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(8): 719

(本文于 2008 年 4 月 24 日收到)