

苹果酸舒尼替尼脂质体药物含量及包封率的测定

张艳晶¹ 杨强¹, 马艳铃¹ 张小飞² 邓意辉^{1*}

(1. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 2. 陕西中医学院, 西安 712000)

摘要 目的: 建立苹果酸舒尼替尼脂质体含量及包封率的测定方法。方法: 采用可见分光光度法测定苹果酸舒尼替尼的含量。阳离子交换树脂法分离游离药物, 分光光度法测定脂质体中苹果酸舒尼替尼的包封率。结果: 苹果酸舒尼替尼在 430 nm 处有最大吸收 $4.0 \sim 15.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9998$, $n = 7$); 苹果酸舒尼替尼脂质体的平均包封率为 91.89%。结论: 所用方法简便、准确, 可用于苹果酸舒尼替尼脂质体的含量及包封率测定。

关键词: 苹果酸舒尼替尼; 脂质体; 可见分光光度法; 阳离子交换树脂; 游离药物; 含量; 包封率

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)07-1209-04

Determination of content and entrapment efficiency of sunitinib malate liposome

ZHANG Yan-jing¹, YANG Qiang¹, MA Yan-ling¹,
ZHANG Xiao-fei², DENG Yi-hui^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712000, China)

Abstract Objective: To develop a method for the determination of content and entrapment efficiency of sunitinib malate (SU) loaded liposome. **Methods:** The determination of SU was performed by VIS; The entrapment efficiency of SU liposomes was determined by VIS after separation of free SU from liposome with ion exchange ions. **Results:** The solution of SU was absorbed max at 430 nm wavelength. The linear range of SU was $4.0 - 15.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9998$, $n = 7$). The average entrapment efficiency of SU liposomes was 91.89%. **Conclusion:** The method is accurate and can be used to determine the content and entrapment efficiency of SU loaded liposome.

Key words: sunitinib malate; liposomes; VIS; ion exchange resin; free drug; assay; entrapment efficiency

苹果酸舒尼替尼 (sunitinib malate, SU; 商品名: Sutent, 索坦) 是一种口服小分子多靶点酪氨酸激酶受体抑制剂, 通过抑制血管内皮生长因子受体和血小板衍生生长因子受体等酪氨酸激酶受体, 阻断肿瘤生长所需的血液和营养物质供给, 同时还能够直接杀死肿瘤细胞^[1]。美国食品药品监督管理局 (FDA)、欧洲药品评价局 (EMA) 和中国国家食品药品监督管理局 (SFDA) 已分别于 2006 年 1 月、2007 年 1 月和 2008 年 5 月批准其上市, 用于不能手术的转移性肾细胞癌和伊马替尼治疗失败或不能耐受的胃肠道间质瘤的治疗^[2]。近来有文献报道 SU 与低剂量的多西紫杉醇合用时, 不仅显著提高多西紫杉醇治疗前列腺癌的效果且使耐受性增强^[3]。SU 有心毒性及间质性肺炎等副作

用^[4], 将其包封于脂质体中, 以期降低其毒副作用, 从而提高药物的疗效。目前国内外尚无 SU 脂质体制剂的相关报道, 为了控制制剂质量, 本文建立了用可见分光光度法测定脂质体中 SU 含量及包封率的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 BS124s 电子分析天平 (德国赛多利斯公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市英峪予华仪器厂); JY92-2D 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝科学仪器研究所); Anke TDL80-2B 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); 756MC 型可见紫外分光光度计 (上海第三分析仪器厂)。

1.2 试剂 苹果酸舒尼替尼 (武汉日升科技发展有限公司, HPLC 纯度 $\geq 98\%$); 苹果酸舒尼替尼对

* 通讯作者 Tel/Fax: (024) 23986316; E-mail: dds-666@163.com

照品(精制, HPLC 纯度 $\geq 99\%$); 无水乙醇(色谱醇, 江苏汉邦科技公司); 氢化大豆卵磷脂(HSPC, 德国 Lucas meyer 公司); 胆固醇(CH 药用级, 南京新百药业有限公司); 聚乙二醇单甲醚₂₀₀₀-胆固醇琥珀酸酯(methoxypolyethylene glycol₂₀₀₀-cholesteryl hemisuccinate, mPEG-CHS, 自制); 硫酸铵(分析纯, 沈阳试剂厂); 异丙醇(分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 盐酸(分析纯, 沈阳经济技术开发区试剂厂); 732 阳离子交换树脂(国药集团化学试剂有限公司); 717 阴离子交换树脂(国药集团化学试剂有限公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备 将氢化大豆卵磷脂(HSPC)、胆固醇(CH)、mPEG-CHS 按 3:1:1 (*w/w*) 的比例混合, 65 °C 下, 用适量乙醇溶解, 得脂质相。将预热至相同温度的 200 mmol·L⁻¹ 硫酸铵溶液注入脂质相, 搅拌 30 min, 制得脂质体初品。以超声波细胞粉碎机处理所得脂质体(200 W × 2 min, 400 W × 6 min, 工作 1 s, 间歇 1 s), 并依次通过 0.8, 0.45, 0.22 μm 的微孔滤膜, 即得空白脂质体。采用阴阳混合树脂柱除盐建立离子梯度^[5]后, 与药物溶液(药脂比, 1:4 *w/w*) 混匀, 于 60 °C 孵育 20 min, 得 SU 脂质体。按此法制备 3 批脂质体, 批号分别为 20100512, 20100515, 20100517。

2.2 溶液的配制

2.2.1 样品溶液 精密量取 SU 脂质体混悬液 0.1 mL(相当于 SU 0.12 mg) 置于 10 mL 量瓶中, 用 90% 异丙醇(含 0.75 mol·L⁻¹ HCl) 破乳液稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 12 μg·mL⁻¹ 的脂质体样品溶液。

2.2.2 空白溶液 精密量取空白脂质体混悬液 0.1 mL(按 SU 脂质体处方和工艺不加主药制备而得) 于 10 mL 量瓶中, 余下操作同“2.2.1”摇匀, 即得空白脂质体溶液。

2.2.3 对照品溶液 精密称取 SU 对照品 100 mg 于 50 mL 量瓶中, 用 90% 异丙醇(含 0.75 mol·L⁻¹ HCl) 稀释至刻度, 摇匀, 得 2.0 mg·mL⁻¹ 对照品储备液。精密量取 0.6 mL 储备液置于 100 mL 量瓶中, 余下操作同“2.2.1”项下方法, 摇匀, 得到浓度为 12 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 测定波长的选择 分别取“2.2”项下的空白溶液、对照品溶液和样品溶液进行紫外扫描(200~700 nm), 发现对照品溶液和样品溶液在 430 nm 处有最大吸收峰, 而空白溶液在此波长下没有吸收, 脂

质体辅料不干扰 SU 测定, 故确定检测波长为 430 nm^[6]。

2.4 线性关系考察 分别精密量取 SU 对照品储备液(2.0 mg·mL⁻¹) 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 90% 异丙醇(含 0.75 mol·L⁻¹ HCl) 稀释至刻度, 浓度分别为 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.5 mg·mL⁻¹, 摇匀。分别精密量取 0.1 mL 置 10 mL 量瓶中, 余下操作同“2.2.1”项, 摇匀。以 90% 异丙醇(含 0.75 mol·L⁻¹ HCl) 为空白对照, 用紫外可见分光光度计在 430 nm 处测定吸光度。以吸光度 *A* 对 SU 浓度 *C* (μg·mL⁻¹) 进行回归, 得回归方程为:

$$A = 5.41 \times 10^{-2} C + 5.7 \times 10^{-3} \quad r = 0.9998$$

结果表明 SU 浓度在 4.0 ~ 15.0 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.5 精密度和稳定性考察 取线性范围内的 3 个浓度(4.0, 8.0, 12.0 μg·mL⁻¹) 的对照品溶液, 每个浓度制备 3 份, 于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 h 进行测定, 考察日内、日间精密度以及溶液中 SU 的稳定性。结果: SU 的日内精密度 RSD(*n* = 6) 小于 0.67%, 日间精密度 RSD(*n* = 6) 小于 0.69%, SU 溶液在 60 h 内稳定。

2.6 重复性考察 取 SU 脂质体(批号为 20100512) 按“2.2.1”项下方法平行制备 5 份样品溶液, 测定吸光度, 计算 SU 的含量分别为 11.5, 11.7, 11.8, 11.3, 11.6 μg·mL⁻¹, RSD(*n* = 5) 为 1.3%, 方法重复性良好。

2.7 加样回收率考察 按处方量配比的 80%, 100%, 120% 配制已知含量的药物溶液各 3 份, 加入相应处方量配比的辅料, 依法操作, 测定吸光度, 按上文所得的标准曲线方程求得药物总量, 计算回收率, 结果见表 1。平均回收率(*n* = 9) 为 98.6%。

表 1 苹果酸舒尼替尼脂质体加样回收率试验结果(*n* = 3)

Tab 1 Results of recovery test of SU liposomes

加入量 (added) /mg	测得量 (found) /mg	平均回收率 (average recovery) /%	RSD/%
1.20	1.18	98.6	1.1
1.00	0.989	98.9	0.94
0.80	0.787	98.4	0.91

2.8 脂质体中 SU 含量测定 分别精密量取 3 批自制 SU 脂质体按“2.2.1”项下方法制备样品溶液, 在 430 nm 处测定吸光度。另取 SU 对照品溶液, 同法测定。计算 3 批样品 SU 的含量, 结果见表 2。

表2 3批样品SU的含量(n=3)

Tab 2 Contents of SU in liposomes of three batches

批号 (Lot No) .	含量 (content) / %	RSD / %
20100512	99.9	
20100515	99.6	0.3
20100517	100.2	

表3 阳离子交换树脂柱对物理混合物中SU的吸附(n=3)

Tab 3 The adsorption values of SU with blank liposomes through cation exchange resin

C/mg · mL ⁻¹	A _{before}	A _{after}	R/ %
0.4	0.223	0.002	0.90
0.5	0.278	0.002	0.72
0.6	0.333	0.002	0.60

2.9 SU 脂质体包封率的测定

2.9.1 阳离子交换树脂对空白脂质体的吸附 取2份空白脂质体 200 μL。1份用蒸馏水稀释定容至 2.0 mL,摇匀,于 450 nm 处测定吸光度(记为 A_{before})。另一份置于阳离子交换树脂柱顶端表面中央 2000 r · min⁻¹离心 4 min,再于柱顶端加入蒸馏水 400 μL 2000 r · min⁻¹离心 4 min,重复 4 次,于 450 nm 处测定吸光度(记为 A_{after})。回收率根据公式 $R = \sum A_{after} / A_{before} \times 100\%$ 计算,得 R 为 99.7%,可以认为经 4 次洗脱后阳离子交换树脂柱对空白脂质体没有吸附。

2.9.2 阳离子交换树脂对水溶液中 SU 的吸附 精密移取 2.0 mg · mL⁻¹ SU 溶液 0.1 mL 置于 10 mL 量瓶中,以 90% 异丙醇(含 0.75 mol · L⁻¹ HCl) 稀释至刻度,摇匀,于 430 nm 处测定,记做 A_{before}。另移取 2.0 mg · mL⁻¹ SU 溶液 0.1 mL 置于阳离子交换树脂柱顶端表面中央,2000 r · min⁻¹离心 4 min,余下操作同“2.9.1”项,收集洗脱液于 10 mL 量瓶中,以 90% 异丙醇(含 0.75 mol · L⁻¹ HCl) 稀释至刻度,摇匀。于 430 nm 处测 A 值(A_{after})。按 $R = A_{after} / A_{before} \times 100\%$ 计算,得 R 为 0%。1 mL 阳离子交换树脂可完全吸附 0.1 mL 浓度为 2.0 mg · mL⁻¹ 的 SU 溶液。

2.9.3 对物理混合物中 SU 的吸附 精密移取 2.0 mg · mL⁻¹ SU 溶液 0.4, 0.5, 0.6 mL 至 2.0 mL 量瓶内,分别加入空白脂质体 1.0 mL,蒸馏水稀释至刻度,混匀,配制成 SU 浓度分别为 0.4, 0.5, 0.6 mg · mL⁻¹ 的空白脂质体-SU 物理混合物。精密移取 0.1 mL 置于阳离子交换树脂柱顶端表面中央,按“2.9.1”项下方法洗脱,转移洗脱液至 10 mL 量瓶中,以 90% 异丙醇(含 0.75 mol · L⁻¹ HCl) 稀释至刻度,摇匀。于 430 nm 处测定吸光度,结果见表 3。由表 3 可见,SU 与空白脂质体的物理混合物中,SU 吸附率大于 99%。

2.9.4 SU 脂质体包封率的测定 精密移取 0.1 mL SU 脂质体于 10 mL 量瓶中,加入蒸馏水 1.6 mL,以 90% 异丙醇(含 0.75 mol · L⁻¹ HCl) 破

乳溶媒稀释至刻度,摇匀,430 nm 波长下测定吸光度 A₀(药物总吸收度)。另精密移取 SU 脂质体 0.1 mL,置于阳离子交换树脂柱顶端表面中央,2000 r · min⁻¹离心 4 min,余下操作同“2.9.1”项。收集洗脱液于 10 mL 量瓶中,以 90% 异丙醇(含 0.75 mol · L⁻¹ HCl) 稀释至刻度,摇匀,430 nm 处测定吸光度 A₁(包封药物吸收度)。按下列公式计算包封率:

$$E = A_1 / A_0 \times 100\%$$

试验测得 3 批脂质体样品的包封率分别为 92.02%, 91.23%, 92.42%; 平均包封率为 91.89%, RSD 为 0.5%

3 讨论

测定包封率之前需对游离药物与脂质体进行分离^[7],常规采用的方法有葡聚糖凝胶过滤法、透析法、离心法等,但存在分析耗时长、用量大等缺点。结合苹果酸舒尼替尼分子结构的特点,利用阳离子交换树脂可有效地分离游离药物与脂质体,使得操作更为简便快捷。

文献报道^[8,9]以液液萃取,LC-MS/MS 测定苹果酸舒尼替尼及其代谢物的含量,也可使用 UV-VIS 检测器的 HPLC 法对人血浆中舒尼替尼含量进行测定^[6],最近尚有采用 UPLC-MS/MS^[10]测定人血浆中舒尼替尼及其代谢物的含量,所有这些方法均存在操作烦琐,对仪器要求较高等问题。本文所建立的可见分光光度法操作简便,稳定可靠,对仪器要求相对较低,适合常规样品分析,更有利于在实际工作中的推广应用。

参考文献

- 1 Deeks ED, Keating GM. Sunitinib. *Drug* 2006 66(17): 2255
- 2 WU Jing(吴晶), QIN Shu-kui(秦叔逵). Progression in the study of clinical pharmacoeconomics of sunitinib for metastatic renal cell carcinoma(苹果酸舒尼替尼治疗转移性肾细胞癌的临床药物经济学研究进展). *Chin Clin Oncol*(临床肿瘤学杂志), 2009, 14(09): 769
- 3 Cumashi A, Tinari N, Rossi C, et al. Sunitinib malate(SU-11248)

alone or in combination with low - dose docetaxel inhibits the growth of DU - 145 prostate cancer xenografts. *Cancer Lett* 2008 270: 229

4 Sylvie Negrier ,Alain Ravaud. Optimisation of sunitinib therapy in metastatic renal cell carcinoma: adverse - event management. *Eur J Cancer Suppl* 2007 5(7) : 12

5 ZHANG Ling(张玲) ,HUANG Wei - wei(黄微威) ,DENG Yi - hui(邓意辉) *et al.* Comparison of two methods for determination of entrapment efficiency of vinorelbine bitartrate liposome(重酒石酸长春瑞滨脂质体包封率测定方法比较) . *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报) 2010 27(02) : 105

6 Blanchet B ,Saboureux C ,Benichou AS *et al.* Development and validation of an HPLC - UV - visible method for sunitinib quantification in human plasma. *Clin Chim Acta* 2009 404(2) : 134

7 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

8 Baratte S ,Sarati S ,Frigerio E *et al.* Quantitation of SU11248 ,an oral multi - target tyrosine kinase inhibitor ,and its metabolite in monkey tissues by liquid chromatograph with tandem mass spectrometry following semi - automated liquid - liquid extraction. *J Chromatogr A* , 2004 ,1024(1 - 2) : 87

9 Minkin P ,Zhao M ,Chen Z *et al.* Quantification of sunitinib in human plasma by high - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2008 874(1 - 2) : 84

10 De Bruijn P ,Sleijfer S ,Lam MH *, et al.* Bioanalytical method for the quantification of sunitinib and its n - desethyl metabolite SU12662 in human plasma by ultra performance liquid chromatography/tandem triple - quadrupole mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 2010 , 51(4) : 93

(本文于 2010 年 7 月 9 日收到)

欢迎订阅 2012 年《药物分析杂志》

《药物分析杂志》是由中国科学技术协会主管 ,中国药学会主办 ,中国食品药品检定研究院(原中国药品生物制品检定所) 药物分析杂志编辑部编辑出版的学术性期刊。主要栏目有研究论文、交流、综述等。报道化学药物、中药与天然药物、抗生素、蛋白质、多肽类药物、生物技术药物等的分析、质量标准研究、临床药物分析、药物分析基础理论与实践以及新方法、新技术的应用 ,并及时报道国家重大研究课题的最新成果。

本刊获 2006 年、2007 年、2008 年中国科协精品科技期刊工程项目 C 类资助 ,获 2009 年中国科协精品科技期刊示范项目证书 2010 年、2011 年再度获得中国科协精品科技期刊工程 C 类项目资助。

本刊为我国自然科学核心期刊、中文核心期刊、全国统计源期刊 ,被国内外主要检索系统收录。

本刊坚持质量第一、面向广大读者 ,以其独具的深度与广度展示我国药物分析的现状与发展。

本刊为月刊 ,大 16 开本 ,国内外公开发行。每期定价 30 元 ,全年定价 360 元 ,国内邮发代号: 2 - 237 国外读者请同中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱) 联系。欢迎广大读者到当地邮局订阅 ,并欢迎有关专业人员集体订购 ,价格从优。

本刊已将创刊以来的文章制成光盘 ,需要者请与本刊联系。

希望为本刊推广发行者 ,价格另议。

地址: 北京市天坛西里 2 号(100050) 联系人: 刘小帅

电话: (010) 67058427 - 8 传真: (010) 67012819 - 4

编辑部网址: www. ywfxzz. cn 浏览网址: www. nicpbp. org. cn

E - mail: ywfx@ nicpbp. org. cn

《药物分析杂志》编辑部