

文章编号: (2011)05-0098-07

## 7-乙基-10-羟基喜树碱脂质体药物含量及包封率的测定

叶田田<sup>1</sup>, 王淑君<sup>2</sup>, 杨伯阳<sup>2</sup>, 侯巍<sup>1</sup>, 刘程宇<sup>2</sup>, 易小军<sup>2</sup>

(1. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** **目的** 建立 RP-HPLC 法测定 7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38) 的含量, 计算 SN-38 脂质体的载药量和包封率。**方法** 在色谱柱为 CenturySIL C<sub>18</sub>-BDS 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm)、检测波长 381 nm 的条件下建立了 RP-HPLC 法测定 SN-38 含量, 并用葡聚糖凝胶色谱柱法分离 SN-38 脂质体与游离 SN-38, 计算 SN-38 脂质体的载药量和包封率。**结果** 在含量测定条件下, SN-38 质量浓度在 1.68~16.80 mg·L<sup>-1</sup> 内线性关系良好 ( $r=0.9997$ ,  $n=5$ ), 脂质体中的平均药物含量达到 28.90 mg·L<sup>-1</sup>, 包封率在 80% 以上。**结论** 方法准确可靠、简单快速, 可用于 SN-38 含量测定和 SN-38 脂质体包封率的测定。

**关键词:** 药剂学; 脂质体; 反相高效液相色谱法; 7-乙基-10-羟基喜树碱; 含量测定; 包封率

**中图分类号:** R 94 **文献标志码:** A

喜树为山茱萸目珙桐科乔木植物, 是我国特有的一种高大落叶乔木, 广泛分布于长江流域及西南各省区。1966 年美国的 Monroe E.Wall 首次从喜树茎的提取物中分离出喜树碱 (camptothecin, CPT)。喜树碱是一种从中国中南、西南分布的喜树中提取得到的植物抗癌药物。1976 年, 中国化学家高怡生等合成消旋喜树碱成功。喜树碱对胃肠道和头颈部癌等有较好的疗效, 但对少数病人有尿血的不良反应。7-乙基-10-羟基喜树碱 (SN-38, 化学结构式见图 1) 是喜树碱的衍生物, 能特异性抑制 DNA 拓扑异构酶 I, 同时也是伊利替康 (CPT-11) 体内活性代谢物<sup>[1]</sup>。经体外细胞毒试验结果表明, SN-38 对多种肿瘤细胞均有抑制作用, 而且抑制效果是 CPT-11 的 1 000 倍<sup>[2]</sup>, 其生物半衰期也比托泊替康和 CPT-11 长<sup>[2]</sup>。因此, SN-38 是优于 CPT-11 而具有潜力的高效抗肿瘤药物。但是, SN-38 在水溶液中难溶<sup>[3]</sup>, 生物利用度较低, 而且在血浆和 PBS 溶液中均代谢较快或不稳定<sup>[4-6]</sup>, 限制了该药物的广泛应用。

本研究的目的是以 SN-38 为模型药物, 选用脂质体作为载药系统, 制备 SN-38 脂质体, 提高 SN-38 稳定性, 降低毒性。作者建立反相 HPLC 测定 SN-38 含量的方法, 计算 SN-38 脂质体的载药量和包封率。

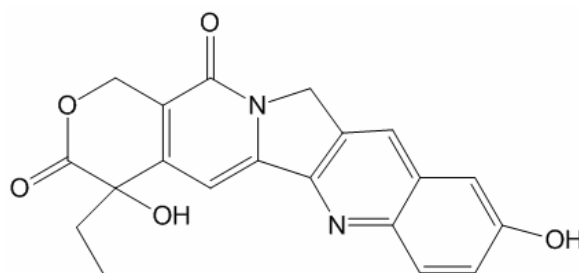


Fig .1 Structure of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38)

收稿日期: 11-01-05

作者简介: 叶田田(1985-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 硕士研究生, E-mail yetiantian\_0228@yahoo.com.cn; 王淑君(1972-), 女(汉族), 浙江舟山人, 副教授, 博士, 主要从事药物制剂研究, Tel. 024-23986360, E-mail xiaohu6408\_cn@sina.com。

## 1 仪器与材料

江申高效液相色谱仪(LC-05P液相泵、LC-10UV紫外检测器,大连江申分离科学技术公司),恒温干燥箱(天津泰斯特仪器有限公司),乳匀机(上海亚荣生化仪器厂),色谱柱为CenturySIL C<sub>18</sub>-BDS柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm, 德国Bischoff色谱技术责任公司)。

7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38, 荆门帅邦化学科技有限公司), 磷脂(LIPOID S 100, 上海利宝德生物科技有限公司代购), 胆固醇(天津博迪化工有限公司), VE(大连水产药业有限公司), 乙腈(色谱纯, 天津康科德公司), 甲醇(分析纯, 天津富宇精细化工有限公司), 其余试剂(分析纯, 市售)。

## 2 方法与结果

### 2.1 SN-38 脂质体的制备

取处方量的SN-38、磷脂、胆固醇、VE溶于适量无水乙醇中,真空旋转移除有机溶剂,于真空恒温干燥箱中放置过夜挥发残余有机溶剂,制备脂质干膜<sup>[7]</sup>。在水化温度下通N<sub>2</sub>气,用NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-磷酸缓冲盐溶液(pH=3.1)水化脂质干膜,水化完全后使用乳匀机降低粒径至200 nm,即得SN-38脂质体,以上操作均在无菌条件下进行。

### 2.2 分析方法的建立

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱: CenturySIL C<sub>18</sub>-BDS柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-磷酸缓冲盐溶液(pH=3.1, 25 mmol·L<sup>-1</sup>)-乙腈(体积比40:60); 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 紫外检测波长: 381 nm; 进样量: 20 μL。

#### 2.2.2 溶液的制备

SN-38 储备液: 配置1 g·L<sup>-1</sup> SN-38 甲醇溶液作为SN-38 储备液,避光,4℃保存。

SN-38 样品溶液: 精密吸取SN-38 储备液0.65 mL,置于25 mL棕色量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,得10.40 mg·L<sup>-1</sup>SN-38 甲醇溶液,作为SN-38 样品溶液。

空白脂质体对照溶液: 精密吸取空白脂质体1 mL,置于50 mL量瓶中,加入甲醇并定容至刻度,漩涡振荡破膜,作为空白脂质体对照溶液。

SN-38 脂质体样品溶液: 精密吸取SN-38 脂质体1 mL,置于50 mL棕色量瓶中,加入甲醇并定容至刻度,摇匀,漩涡振荡破膜,作为脂质体样品溶液。

#### 2.2.3 专属性试验

分别取空白溶剂、SN-38 样品溶液、空白脂质体对照溶液、SN-38 脂质体样品溶液各20 μL注入液相色谱仪,按“2.2.1”条色谱条件测定,记录色谱图(图2)。结果表明,在该色谱条件下,溶剂、脂质体辅料及检测用试剂不干扰SN-38测定。

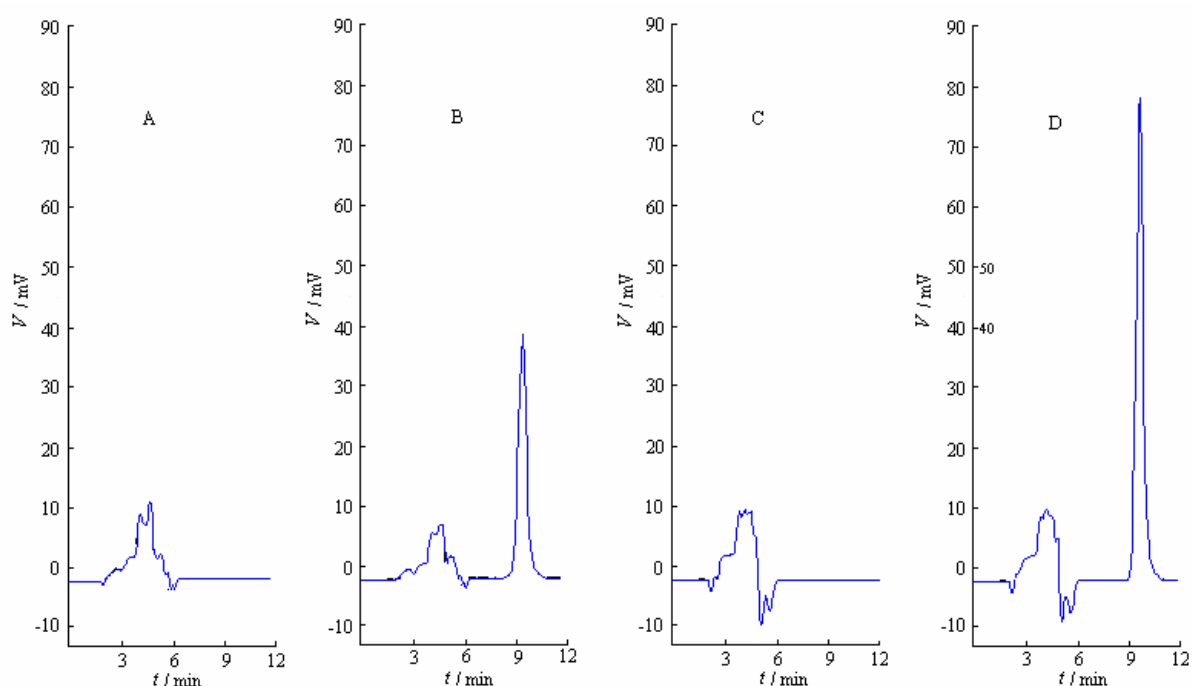


Fig. 2 HPLC chromatograms of blank solution(A), SN-38 sample solution (B), blank liposome control solution (C) and SN-38 liposome sample solution (D)

#### 2.2.4 标准曲线的制备

分别精密吸取质量浓度为  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  SN-38 储备液适量, 置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得到质量浓度分别为 1.68、4.30、8.06、12.20、16.80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  SN-38 样品溶液。分别吸取 20  $\mu\text{L}$  按“2.2.1”条色谱条件测定。以峰面积 ( $A$ ) 对质量浓度 ( $\rho$ ,  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 进行线性回归, 得标准曲线方程为:  $A=6.493\times 10^4\rho+8.280\times 10^3$ ,  $r=0.9997(n=5)$ 。线性范围为 1.68~16.80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

#### 2.2.5 回收率试验

分别精密吸取质量浓度为  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  SN-38 储备液适量, 置于 25 mL 量瓶中, 按处方比例加入空白脂质体, 用甲醇定容至刻度, 得到 SN-38 样品溶液, 按“2.2.1”条色谱条件测定。将结果代入标准曲线计算测得量, 与实际加入量相比得到样品回收率, 结果见表 1。所得到的样品平均回收率在 99.45%~100.32%内, RSD 均小于 1%, 能够满足脂质体中 SN-38 含量测定的要求。

Table 1 Results of the recovery test of SN-38 liposomes( $n=9$ )

$m_{\text{added}}/\mu\text{g}$	$m_{\text{found}}/\mu\text{g}$	Recovery/%	RSD/%
16.08	16.10	100.12	0.85
8.06	8.01	99.37	0.81
1.65	1.66	100.60	0.93

#### 2.2.6 仪器精密度试验

精密吸取“2.2.4”条下质量浓度为 8.06  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  样品溶液 20  $\mu\text{L}$ , 按“2.2.1”条色谱条件进样分析, 测定 SN-38 峰面积, 重复进样 6 次。结果其峰面积的 RSD 为 0.82% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度

良好。

### 2.2.7 溶液稳定性试验

对“2.2.2”条下的含药脂质体的破乳溶液进行稳定性考察。取含药脂质体的破乳溶液 20  $\mu\text{L}$ ，室温下分别在 0、1、2、4、6、8 h，按“2.2.1”条色谱条件进样分析，测定 SN-38 峰面积。结果其峰面积的 RSD 为 0.73%，表明 SN-38 的峰面积在 8 h 内没有明显变化，即 SN-38 破乳后脂质体溶液室温下 8 h 稳定，可以满足检测要求。

### 2.2.8 重复性试验

精密吸取同一批号的 SN-38 脂质体 6 份，按“2.3”条方法测定 SN-38 的含量。结果其 RSD 为 0.95%，表明方法重复性良好。

## 2.3 样品含量测定

精密吸取 SN-38 脂质体溶液 1 mL，置于 50 mL 棕色量瓶中，加入甲醇破乳并稀释至刻度，摇匀，漩涡振荡破膜。精密吸取上述溶液 20  $\mu\text{L}$ ，按“2.2.1”条色谱条件进样分析，记录色谱图，按方法学标准曲线计算出样品中 SN-38 的含量。测定 3 个批号 SN-38 的载药量和包封率，结果见表 2。

Table 2 SN-38 content and entrapment efficiency in different batches of SN-38 liposomes

Batch No.	$\rho(\text{SN-38}) / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$w(\text{entrapment efficiency})/\%$	RSD/%
1	29.72	86	0.86
2	28.65	85	0.96
3	28.33	89	0.83

## 2.4 包封率的测定

自制 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱 (20 cm $\times$ 1.0 cm)，流速为 1.5 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>，洗脱液为 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-磷酸缓冲溶液 (pH=3.1)、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲溶液 (pH=9.9)。

精密量取空白脂质体溶液 0.2 mL、SN-38 脂质体 1 mL，依次上样，用 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-磷酸缓冲溶液 (pH=3.1) 洗脱，接取含有乳光的洗脱液 20 mL。量取此洗脱液 3 mL 置于 25 mL 量瓶中，用甲醇破乳并定容至刻度。取 20  $\mu\text{L}$  按“2.3”条方法进样分析，测定已包封的 SN-38 量。另取 SN-38 脂质体混悬液 0.5 mL 置于 25 mL 量瓶中，用甲醇破乳并定容至刻度，取 20  $\mu\text{L}$  按“2.3”条方法进样分析，测定该脂质体溶液中 SN-38 的总质量浓度。最后用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 缓冲溶液 (pH=9.9) 洗脱游离药物，直至黄色条带洗脱完全，取 20  $\mu\text{L}$  按“2.3”条方法进样分析，测定游离药物质量浓度。绘制流出曲线 (图 3)。计算包封率，计算方法如下： $EE = (\rho_{\text{总}} - \rho_{\text{游离}}) / \rho_{\text{总}} \times 100\%$

式中  $\rho_{\text{总}}$ 、 $\rho_{\text{游离}}$  分别为脂质体溶液中 SN-38 的总质量浓度、未被包封 SN-38 的质量浓度。

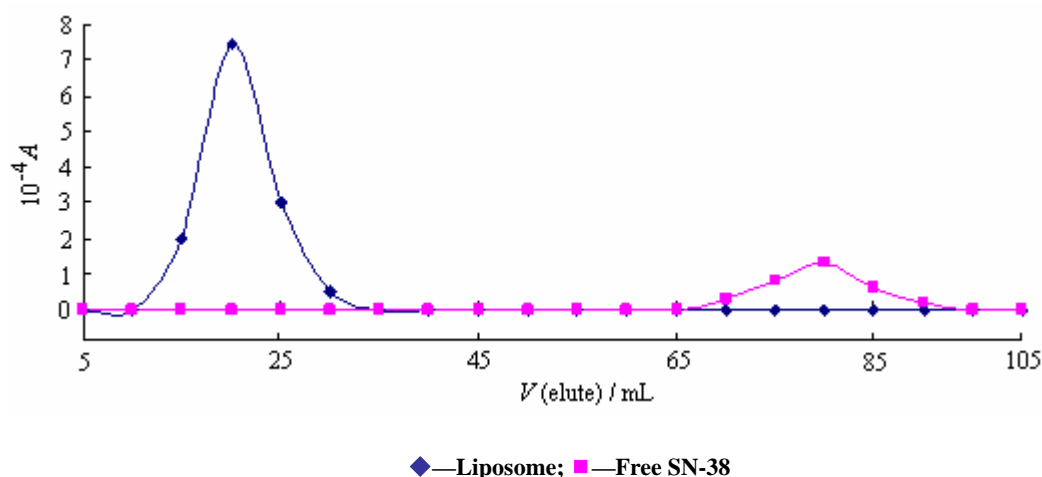


Fig. 3 The separation curve of SN-38 loaded liposomes

### 3 讨论

a. SN-38 结构中的内酯环是它的活性部位，会随 pH 变化发生可逆性的开闭环变化，在碱性溶液 (pH=10) 中开环，表现为失活形式，易溶于水，在水溶液中显黄色；在酸性溶液 (pH=3) 中闭环，几乎完全表现为活性形式，难溶于水，在水溶液中显无色。作者在考虑到该药的这种特殊性质的基础上，建立 SN-38 含量和包封率测定的测定方法。

b. 据 TONG 等报道<sup>[8]</sup>，应用 DMSO 配置 SN-38 储备液。经研究发现，在储存过程中，DMSO 配置的 SN-38 储备液日内稳定性不符合本文试验要求。经过筛选常用溶剂发现，SN-38 在甲醇中的溶解度和稳定性均良好，所以选择甲醇作为溶剂配制储备液。

c. 包封率是评价脂质体质量的一个重要指标，测定包封率时，须同时测定载药脂质体系统的总药物量和液体介质中的游离药物量，为了求得准确的结果，分离方法必须完全、简便、准确。目前常用的分离方法有：葡聚糖凝胶色谱法、超滤膜过滤法、超速离心法、微型柱离心法和透析法<sup>[9]</sup>。葡聚糖凝胶色谱法又称分子筛法，能使混合物根据分子大小不同分离，广泛用于从脂质体混悬液中分离除去未包裹药物，也可用于对脂质体大小的分组，这一技术在实验室中很有效且快速。在利用葡聚糖凝胶柱进行包封率测定的过程中，最重要的步骤是洗脱液的选择。在本研究中，采用复式流动相洗脱，先用  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -磷酸缓冲溶液 (pH=3.1) 先洗脱脂质体，此时游离的 SN-38 以较大颗粒的形式吸附在柱子顶端，在脂质体洗脱完全后，用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲溶液 (pH=9.9) 洗脱游离药物。采用此方法测定 SN-38 脂质体的包封率，重现性好。Zhang 等采用超速离心法对 SN-38 包封率进行测定，该方法快速、简便<sup>[3]</sup>，但该方法所测得的脂质体包封率可能存在较大偏差。这是由于脂质体双层膜存在一定的流动性，双层膜内外存在动态平衡，使得脂质体内部药物在超速离心过程中有部分泄露出来的可能。如果这部分药物在离心过程中分散良好，则会造成包封率偏低<sup>[10]</sup>；如果这部分药物在离心过程中聚集并随脂质体一同沉降，则会造成包封率偏高。

### 4 结论

作者建立 RP-HPLC 法测定 SN-38 脂质体的含量, 药物峰与溶剂峰得到较好分离, 辅料对测定无干扰, 采用葡聚糖凝胶色谱法成功地将脂质体与游离的 SN-38 分离, 用于测定包封率, 方法具有灵敏度高、专属性好、方便快捷的特点, 可用于产品质量的控制。

### 参考文献:

- [1] YASUYOSHI KAWATO, MASASHI ANIMIMI, YASUhide HIROTA, et al. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11[J]. *Cancer Res*, 1991, 51: 4187–4191.
- [2] TAKIMOTO C H, ARBUCK S G. An overview of topoisomerase I - targeting agents. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*[M]. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 579–646.
- [3] ALLEN J, ZHANG Tong-xuan, PARMAR M, et al. Development and characterization of a novel liposome-based formulation of SN-38[J]. *Int J Pharm*, 2004, 270 (122): 93–107.
- [4] THOMAS G B, MI Zi-hou. Ethyl substitution at the 7 position extends the half-life of 10-hydroxycamptothecin in the presence of human serum albumin [J]. *Med Chem*, 1993, 36: 2580–2582.
- [5] THOMAS G B, ALFRED E S, MISHRA A K, et al. Liposomal stabilization of camptothecin's lactone ring[J]. *Am Chem Soc*, 1992, 114: 8318–8319.
- [6] MI Zi-hou, THOMAS G B. Marked interspecies variations concerning the interactions of camptothecin with serum albumins: a frequency-domain fluorescence spectroscopic study[J]. *Biochemistry*, 1994, 33: 12540–12545.
- [7] 郑金琪. 羟基喜树碱前体脂质体的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004: 23–29.
- [8] TONG Xuan-na, ZHANG J A, AHMAD I. HPLC method for determination of SN-38 content and SN-38 entrapment efficiency in a novel liposome-based formulation LE-SN38 [J]. *J Pharma and Biomed Anal*, 2006, 41: 582–588.
- [9] 邓英杰. 脂质体技术[M]. 北京: 北京人民出版社, 2007: 10–127.
- [10] 杨涛, 金大德, 崔福德. 紫杉醇脂质体药物含量及包封率的测定[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(2): 231–234.

## Determination of the content and entrapment efficiency of SN-38 in liposomes

YE Tian-tian<sup>1</sup>, WANG Shu-jun<sup>2</sup>, YANG Bo-yang<sup>2</sup>, HOU wei<sup>1</sup>, LIU Cheng-yu<sup>2</sup>, YI Xiao-jun<sup>2</sup>  
(1. *School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*; 2. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*)

**Abstract: Objective** To establish an RP-HPLC method for the determination of 7-ethyl-10-hydroxyl-camptothecin (SN-38) content and calculate the encapsulation efficiency of SN-38 in the liposomes.

**Methods** An RP-HPLC method was established to measure SN-38 content using CenturySIL C<sub>18</sub>-BDS column (200 mm× 4.6 mm, 5 μm) and the drug content was tested at detection wavelength 381 nm. The encapsulation efficiency of SN-38 in the liposomes was determined by separating free SN-38 from drug

loaded liposomes using Sephadex column. **Results** In the established method, a linear correlation between drug concentration and peak area was established in the SN-38 concentration range of 1.68–16.80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $r=0.9997$ ,  $n=5$ ). The average drug concentration was  $28.90 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the entrapment efficiency was  $> 80\%$ . **Conclusion** The method established in this study is simple, accurate, sensitive for the determination of SN-38 content and entrapment efficiency in the liposomes.

**Key words:** Pharmaceuticals; liposome; RP-HPLC; 7-ethyl-10-hydroxylcamptothecin, content determination, entrapment efficiency

(本篇责任编辑: 赵桂芝)