

微柱离心 - HPLC法测定六甲蜜胺脂质体包封率*

高晓非¹, 邓英杰^{1**}, 曹金娜¹, 王秀敏²

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 厦门大学医学院药理学系, 厦门 361005)

摘要 目的:对六甲蜜胺脂质体进行质量评价,建立六甲蜜胺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;利用流动相:甲醇-乙腈-水(50:35:15);柱温:30℃;流速:0.8 mL·min⁻¹;紫外检测波长:228 nm的HPLC条件测定六甲蜜胺的含量,最终计算得包封率。结果:微柱离心法能够将100%的空白脂质体和小于3.5%的游离药物洗脱下来,游离药物与脂质体可被分离,游离药物基本上被截留于微柱中。在本法选择的色谱条件下,六甲蜜胺得到良好的分离,辅料不干扰测定,六甲蜜胺在2.0~40.0 mg·L⁻¹内线性关系良好($r=0.9996$),日内和日间RSD均<2.0%($n=5$),加样回收率在97.9%~98.5%之间(RSD<2.0%, $n=5$)。用该方法测得3份六甲蜜胺脂质体的包封率在82.49%~86.56%之间(RSD均<2.0%, $n=3$)。结论:本方法可用于测定六甲蜜胺脂质体包封率。

关键词:微柱离心;高效液相色谱法;六甲蜜胺;脂质体;包封率

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2009)02-0247-03

Minicolumn centrifugation - HPLC determination of entrapment efficiency for liposomal formulation of altretam ine*

GAO Xiao - fei¹, DENG Ying - jie^{1**}, CAO Jin - na¹, WANG Xiu - min²

(1. Shenyang Pharmaceutical University Pharmacy College, Shenyang 110016, China;

2. Xiamen University Medical College Pharmacy Department, Xiamen 361005, China)

Abstract Objective: To establish a method for determining the entrapment efficiency and estimating the quality control of altretam ine liposomes **Methods:** The minicolumn was employed to separate the free drug from the liposomes. The content of altretam ine was quantified by HPLC. The mobile phase consisted of methanol - acetonitrile - water(50:35:15) was pumped through the system at a rate of 0.8 mL·min⁻¹ at 30℃. The UV - detector was set at 228 nm. **Results:** The liposomes were well separated using minicolumn centrifugation by which free altretam ine could be absorbed. A calibrated linear curve of altretam ine concentration was within 2.0 - 40.0 mg·L⁻¹ ($r=0.9996$), and within - day and between - days RSD were all less than 2.0% ($n=5$), the recovery rate of altretam ine with blank liposomes was in a range of 97.9% - 98.5% with RSD of 1.4% or below ($n=5$). The entrapment efficiency of three batches of altretam ine liposomes was in a range of 82.49% - 86.56%, with RSD <2.0% ($n=3$) by minicolumn centrifugation - HPLC. **Conclusion:** The minicolumn centrifugation - HPLC may be used for the determination of entrapment efficiency of altretam ine liposomes

Key words: minicolumn centrifugation; HPLC; altretam ine liposomes; entrapment efficiency

六甲蜜胺 (altretam ine, hexamethylmelamine, HMM)是需要代谢活化的细胞毒类抗肿瘤药物^[1],其代谢中间产物可作为烷化剂而产生抗肿瘤作用,但其与传统的烷化剂并没有产生交叉耐药。近年来的临床研究发现,六甲蜜胺对卵巢癌、肺癌、乳腺癌、恶性淋巴瘤有肯定的疗效,特别是在对晚期卵巢

癌的研究中^[2],发现六甲蜜胺有较好的临床应用价值^[1-4]。六甲蜜胺为脂溶性药物,水溶性很差,临床多用口服给药,但其生物利用度低^[5,6],且有胃肠反应,血液毒性,神经毒性等毒副作用。脂质体是近年来研究比较广泛的一种给药载体^[7],将六甲蜜胺包封于脂质体中,可以保护药物稳定性,又可降低毒副

* 国家自然科学基金 (30672555) 资助

** 通讯作者 Tel: (024) 23986311; Fax: (024) 23917603; E - mail: dengyingjie45@yahoo.com.cn

作用,增加药物缓释作用,增强与细胞的亲和性,从而提高生物利用度。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (Waters Model 510 泵和 SPD - 10A VP 紫外检测器, N2000 色谱工作站), UV - 9100 紫外分光光度仪 (北京瑞利分析仪器公司), 葡聚糖凝胶 G - 50 (Pharmacia), 混合纤维素滤膜 (上海市新亚净化器总厂), 六甲蜜胺原料药 (纯度 99.5%, 江苏清江药业有限公司, 批号 060118), 大豆磷脂 (上海太伟药业), 胆固醇 (天津博迪化工有限公司), 六甲蜜胺脂质体及空白脂质体 (自制), 甲醇和乙腈 (色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司), 其他试剂均为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱: Kromasil ODS 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Lubex); 流动相: 甲醇 - 乙腈 - 水 (50 : 35 : 15); 柱温: 30 °C; 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 紫外检测波长: 228 nm; 进样量: 20 μL。

3 六甲蜜胺脂质体制备

精密称取六甲蜜胺 20 mg, 大豆磷脂 200 mg, 胆固醇 20 mg, 用 2 mL 无水乙醇溶解, 匀速注入到 10 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中, 40 °C 下以 40 r · min⁻¹ 搅拌并减压蒸发除去乙醇, 即得六甲蜜胺脂质体粗品。在压力 0.5 MPa、室温条件下通过 0.22 μm 微孔滤膜挤出, 即得六甲蜜胺脂质体。空白脂质体制备除了不加入六甲蜜胺其他同上。

4 专属性试验

精密量取空白脂质体及六甲蜜胺脂质体各 0.1 mL, 以流动相稀释定容至 10 mL 量瓶中, 分别进样分析, 结果见图 1 - A、C。精密称取六甲蜜胺原料药 10.0 mg, 用流动相配制浓度为 200 mg · L⁻¹ 的六甲蜜胺储备液, 精密量取储备液 0.5 mL, 用流动相稀释至 10 mg · L⁻¹, 进样分析, 结果见图 1 - B。

5 线性关系考察

分别精密量取对照品储备液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 以流动相定容, 按照上述色谱条件进样检测。每份溶液进样 3 次, 记录色谱图和峰面积, 绘制标准曲线, 以六甲蜜胺质量浓度 (C) 对峰面积 (A) 做线性回归, 六甲蜜胺质量浓度在 2.0 ~ 40.0 mg · L⁻¹ 内呈良好线性关系, 回归方程为:

$$C = 2.086 \times 10^{-6} A - 0.4771 \quad r = 0.9996$$

6 精密度试验

分别精密量取六甲蜜胺储备液 0.1, 1.0, 2.0

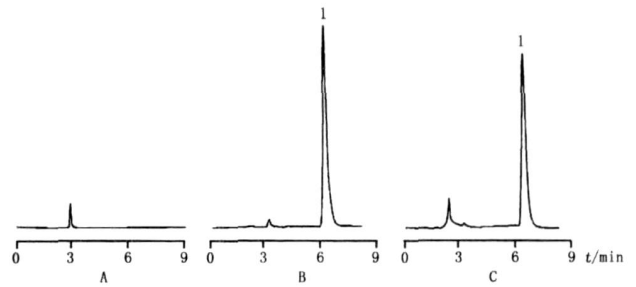


图 1 空白脂质体 (A)、六甲蜜胺对照液 (B) 和六甲蜜胺脂质体 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank liposome (A), altretamine control (B) and altretamine liposome (C)

1. 六甲蜜胺 (altretamine)

mL 于 10 mL 量瓶中, 以流动相定容, 进样测定, 一日内早、午、晚各测定 5 次, 并连续 5 日上午测定, 计算日内精密度和日间精密度。结果表明在该色谱条件下, RSD < 5%, 精密度良好。见表 1。

表 1 HPLC 测定六甲蜜胺的日内日间精密度
Tab 1 Within - day and between - day precisions and accuracies of HPLC determination for altretamine

| added /mg · L ⁻¹ | 日内 (within - day), n = 15 | | 日间 (between - day), n = 5 | |
|--------------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | found /mg · L ⁻¹ | RSD /% | found /mg · L ⁻¹ | RSD /% |
| 2 | 1.92 | 1.8 | 1.91 | 1.9 |
| 20 | 19.84 | 0.77 | 19.95 | 0.83 |
| 40 | 39.25 | 0.68 | 39.52 | 0.75 |

7 加样回收率试验

精密量取空白脂质体 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中, 依次准确加入六甲蜜胺储备液 0.1, 1, 2 mL, 以流动相定容, 每种浓度溶液制备 5 份, 分别测定, 计算回收率, 结果低、中、高浓度回收率 (n = 5) 分别为 98.5%, 98.4%, 97.9%; RSD 分别为 1.4%, 0.84%, 1.2%。

8 葡聚糖凝胶 G - 50 微柱对空白脂质体的吸附作用^[8,9]

5 mL 针管 (除去助推器) 中均匀填满用生理盐水溶胀完全的葡聚糖凝胶 G - 50, 再用生理盐水冲洗 2 ~ 3 个柱床体积, 1000 r · min⁻¹ 离心 1 min 除去多余水分, 得自制微型葡聚糖凝胶柱 (简称微柱)。取空白脂质体 0.5 mL, 上样于自制微柱中, 1000 r · min⁻¹ 离心 2 min, 收集离心液, 再补加生理盐水 0.5 mL, 1000 r · min⁻¹ 离心 2 min, 将离心液合并, 用生理盐水定容至 10 mL, 于 500 nm 处测定上柱前后空白脂质体的吸收度值, 考察葡聚糖凝胶 G - 50 对空白脂质体的吸附情况^[8,9], 结果 3 次测定, 上柱后与上柱前空白脂质体的吸收度比值分别为

101.0%, 98.77%, 101.3%; 平均值为 $(100.4 \pm 1.382)\%$ 。表明葡聚糖凝胶 G-50 对空白脂质体基本无吸附作用。

9 葡聚糖凝胶 G-50 微柱对六甲蜜胺的吸附作用

称取六甲蜜胺 20 mg (为制剂中浓度的 20 倍) 加入 0.5 mL 空白脂质体中^[8,9], 上样于自制的微型柱中, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 再补加一定量的生理盐水, 再次离心, 合并滤液, 精密吸取滤液 0.5 mL, 流动相定容至 10 mL, 进样测定未被柱子吸附的游离药。3 次测定, 上样后游离药物与上样前加入的药物质量之比分别为 3.022%, 2.571%, 3.051%; 平均值为 $(2.881 \pm 0.269)\%$ 。由此可知葡聚糖凝胶 G-50 可以将游离药物基本吸附截留。

10 包封率的测定

取六甲蜜胺脂质体 0.5 mL 上样于自制葡聚糖凝胶 G-50 微型柱中, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 补加生理盐水 0.5 mL, 再次离心, 合并滤液。精密量取该滤液 0.2 mL, 用流动相稀释定容至 10 mL 进样分析, 计算被包封药物含量 m_{in} ; 精密量取未过柱的六甲蜜胺脂质体 0.1 mL, 用流动相稀释定容至 10 mL 进样分析, 计算脂质体中药物总含量 m_{tot} , 并计算包封率 $= m_{in} / m_{tot} \times 100\%$ 。结果包封率在 82.49% ~ 86.56% 之间, RSD 均 $< 2.0\%$ ($n = 3$)。

11 讨论

测定包封率的方法虽然很多, 但是适用于脂溶性药物的方法却不多。用凝胶过滤法测定包封率时, 脂质体被稀释的倍数较大 (100 ~ 200 倍), 且不易确定稀释倍数, 给下一步的测定带来不便。超滤法一般适合于水溶性药物, 脂溶性药物会被吸附在超滤膜上, 影响包封率测定结果。国内外报道过的微柱离心法^[8,9], 利用强脂溶性游离药物可以被葡聚糖凝胶 G-50 牢牢吸附, 而两亲性的脂质体, 可以在微型柱离心过程中随生理盐水流出的特点, 最终将游离药物与脂质体分离。本文利用这种方法结合 HPLC 建立了测定六甲蜜胺脂质体包封率的方法, 该方法精密度和回收率均符合要求。

六甲蜜胺对热不稳定, 易氧化去甲基成五甲蜜胺, 含量下降, 实验过程中应尽量避高温。由于六甲蜜胺几乎不溶于水, 在将脂质体破坏后测定药物浓度时, 本文没有采用传统的加入 Triton-X 100 溶液破坏方法, 而是直接用流动相稀释。由于流动相是甲醇、乙腈和水的混合液, 可以直接破坏脂质体结构, 同时使六甲蜜胺溶解。

配制 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的六甲蜜胺甲醇溶液, 以甲醇

为空白对照, 在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行紫外扫描^[10,11], 结果表明六甲蜜胺在 228 nm 处有最大吸收波长, 故本文选择 228 nm 作为检测波长。

曾对流动相甲醇-水 (90:10)、甲醇-水 (80:20)、乙腈-水 (80:20)、乙腈-水 (70:30)、乙腈-水 (60:10)、甲醇-乙腈-水 (50:35:15) 进行了考察。结果采用流动相甲醇-水时基线不够平稳, 乙腈-水 (70:10) 出峰时间适宜且基线平稳, 但是考虑到成本问题, 因此考虑选择甲醇和乙腈以及水混合的流动相。

参考文献

- 1 Lee CR, Faulds D. Altretamine: A review of its pharmacodynamic properties, and therapeutic potential in cancer chemotherapy. *Drugs*, 1995, 49 (6): 932
- 2 Wharton JT. Hexamethylmelamine (altretamine) activity as a single agent in previously untreated advanced ovarian cancer. *Cancer Treat Rev*, 1991, 18 (Suppl A): 15
- 3 WANG Jian-dong (王建东). The prospect of altretamine for treating ovarian cancer (六甲蜜胺治疗卵巢癌的研究进展). *Foreign Med Sci (Cancer Sect)* (国外医学肿瘤学分册), 2001, 28 (5): 387
- 4 Miller J, McGovern M, Ames M. Effect of a hepatic activation system on the antiproliferative activity of hexamethylmelamine against human tumor cell lines. *Cancer Chem Pharm*, 1985, 15: 49
- 5 Runhaar EA, Neijt JP, Holthuis JMM, et al. The bioavailability of three altretamine formulations. *Pharm Weekbl Sci*, 1989, 11: 218
- 6 Klippert PM, Hulshoff A, Mingers M - JJ, et al. Low oral metabolism of hexamethylmelamine in the rat due to simultaneous hepatic and intestinal metabolism. *Cancer Res*, 1983, 43: 3160
- 7 Gregoriadis G. *Liposome Technology*. Second Edition. London England: CRC Press, Inc., 1992: 123
- 8 ZHU Mei-fang (朱梅芳), JIN Peng (金鹏). Ultraviolet spectrophotometry for detecting the content of altretamine tablets (紫外分光光度法测定六甲蜜胺片的含量). *Jiangsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2002, 10 (2): 16
- 9 WANG Rui-qin (王瑞芹), HU Xiang-qing (胡向青), LU Jiang (刘江). Investigation of dissolution rate of altretamine tablets (六甲蜜胺片的溶出速度考察). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2005, 25 (4): 380
- 10 WANG Xiu-min (王秀敏), DENG Ying-jie (邓英杰), HAO Yan-li (郝艳丽), et al. Determination of entrapment efficiency of elemene liposome by minicolumn centrifugation-gas chromatography (微柱离心-气相色谱法测定榄香烯脂质体包封率). *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2004, 21 (6): 16
- 11 Fry DW, White C, Goldman DJ. Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal Biochem*, 1978, 90: 809

(本文于 2007 年 11 月 26 日收到)