

[文章编号] 1007-7669(2009)03-0217-03

齐多夫定硬脂酸酯脂质体中药物含量的测定

王秀敏¹, 李 静¹, 王利娟¹, 刘彦彦^{1,2}

(1. 厦门大学医学院 药学系, 福建 厦门 361005; 2. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[关键词] 齐多夫定; 色谱法, 高压液相; 脂质体; 齐多夫定硬脂酸酯

[摘要] 目的 建立齐多夫定硬脂酸酯脂质体中药物含量测定的方法。方法 采用 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (95 : 5, V : V), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 265 nm, 柱温为室温。结果 在此色谱条件下齐多夫定硬脂酸酯与辅料及溶剂峰分离度符合要求, 在 5.060 ~ 30.36 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r = 0.999\ 9$, $n = 5$), 此方法回收率在 101.3% ~ 102.0%, 日内及日间 RSD 均小于 2.2% ($n = 5$), 脂质体的包封率为 88% ~ 92%。结论 此方法准确可靠、简单快速, 可用于齐多夫定硬脂酸酯脂质体的药物含量及包封率的测定。

[中图分类号] R917 [文献标志码] A

Determination of zidovudine stearate content in its liposomes

WANG Xiu-min¹, LI Jing¹, WANG Li-juan¹, LIU Yan-yan^{1,2}

(1. Department of Pharmaceutical Science, Medical College, Xiamen University, Xiamen FUJIAN 361005, China; 2. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Haerbin HEILONGJIANG 150040, China)

[KEY WORDS] zidovudine; chromatography, high pressure liquid; liposomes; zidovudine stearate

[ABSTRACT] AIM To establish a HPLC method for the determination of zidovudine stearate content in liposomes. METHODS The separation was performed with a Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) at room temperature, and the mobile phase consisted of methanol-water (95 : 5, V : V), with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. Zidovudine stearate was detected at 265 nm. RESULTS The zidovudine stearate had a good linear relation over the range of 5.060 - 30.36 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$, $n = 5$). The average recovery was 101.3% - 102.0%. The RSD of inter-day and intra-day were all less than 2.2% ($n = 5$). Entrapment efficiency of zidovudine stearate liposome is 88% - 92%. CONCLUSION The method is simple, accurate, sensitive, and applicable for the determination of zidovudine stearate in liposomes and entrapment efficiency of AZTS liposome.

齐多夫定 (zidovudine, AZT, 又名叠氮胸苷) 是美国 FDA 批准的第一个抗艾滋病的逆转录酶抑制药, 也是第一个被批准用于治疗儿童艾滋病的

药物。AZT 疗效确切, 为抗艾滋病的首选药之一^[1]。但长期使用中发现, 该药物不良反应较大, 有较强的骨髓抑制作用^[2], 因此进行 AZT 靶向给药

[收稿日期] 2008-09-02 [接受日期] 2008-12-26

[基金项目] 福建省科技厅重大专项前期研究项目 (2005YZ1025)

[作者简介] 王秀敏 (1974—), 女, 黑龙江人, 理学博士, 硕士研究生导师, 主要从事药剂学研究。Phn: 86-592-218-8681; E-mail: wangxm@xmu.edu.cn.

新剂型的研究非常必要。脂质体作为一种新的药物靶向载体, 具有被动靶向性, 可以优先被单核巨噬细胞系统摄取。国内外研究发现 HIV 在人体内较多地集中于单核巨噬细胞系统^[3,4], 进而尝试将脂质体作为 AZT 的载体。

如果将 AZT 制成脂溶性更高的前药, 则能大大提高脂质体对药物的包封率。作者将 AZT 制成其前药齐多夫定硬脂酸酯 (zidovudine stearate, AZTS), 在体内广泛存在的酯酶的作用下, 将 AZTS 转化为 AZT 发挥抗艾滋病的药效。脂质体包封率的提高也使其进入临床成为可能。至今, 脂质体中 AZTS 的高效液相测定方法国内外均未见文献报道, 为了控制 AZTS 在制剂中的含量, 本研究建立了 AZTS 的分析方法^[5,6], 并对 AZTS 的含量及脂质体的包封率进行了测定。

仪器 LC-20AD 液相色谱仪 (日本岛津公司), SPD-M20A 二极管阵列检测器 (日本岛津公司), 色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 大连依利特公司), UV-2800 型紫外分光光度计 (日本日立公司)。

药物与试剂 AZT (原料药, 厦门迈克制药有限公司, 批号 060811, 纯度 99%); AZTS 原料药 (自制, 经质谱检测含量 99% 以上); AZTS 脂质体 (自制, 规格为 10 mL: 40 mg, 3 批的批号分别为 071012, 071015, 071018); 葡聚糖凝胶 Sephadex-G75 (瑞典, 批号 291670); 甲醇 (色谱纯, 上海国药试剂有限公司), 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

色谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水 (95:5, V:V), 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 265 nm, 进样量: 20 μL, 柱温: 室温。外标法定量。

结果

1 **检测波长的选择** AZTS 在 265 nm 下有最大吸收, 故检测波长为 265 nm。见图 1。

2 **专属性试验** 精密称取空白脂质体破乳溶液、AZTS 对照品溶液和 AZTS 脂质体破乳溶液各 20 μL 进样分析, 药物峰形良好。在此色谱条件下, 辅料对 AZTS 的测定无干扰。见图 2。

3 **标准曲线** 精密称取 AZTS 25.3 mg 置于 50 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 506.0 mg·L⁻¹ 对照品储备液。再精密吸取对照品储备液适量, 用流动相定容至刻度, 摇匀, 得浓度分别为 5.060、7.590、10.12、15.18、20.24、

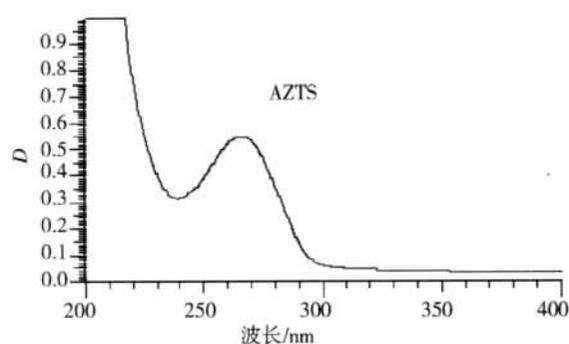


图 1 AZTS 甲醇溶液的紫外吸收光谱图

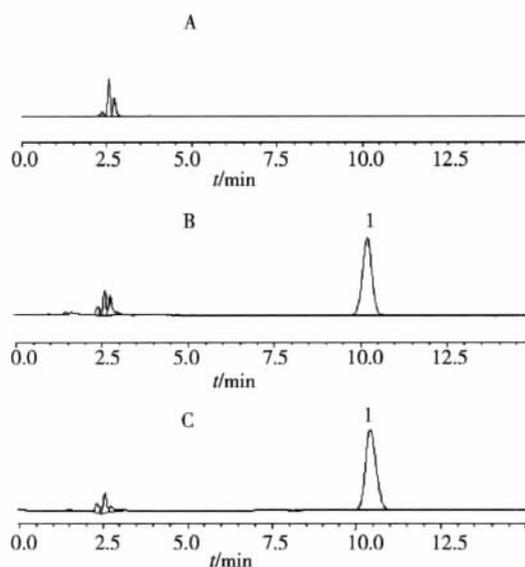


图 2 AZTS 典型 HPLC 色谱图 A: 空白脂质体; B: AZTS 原料药; C: AZTS 脂质体; 1: AZTS

25.30 和 30.36 mg·L⁻¹ 的系列溶液。分别进样 20 μL, 以 AZTS 的质量浓度 (ρ) 为横坐标, 相应的峰面积 (A) 为纵坐标, 进行线性回归, 得方程 $A = 18\,448\rho - 1\,825.6$, $r = 0.999\,9$, AZTS 在 5.060 ~ 30.36 mg·L⁻¹ 范围内具有良好的线性关系。

4 **检测限和定量限** 将 AZTS 溶液稀释成不同浓度进行 HPLC 分析, 以信号噪声比 (S/N) 为指标, 检测限为 0.4 ng, 定量限为 1.2 ng。

5 **稳定性试验** 精密配制 5.060、15.18、30.36 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液 (低、中、高 3 种浓度), 于 2、4、6、8、10 h 进样测定峰面积, 峰面积的 RSD 值分别为 1.20%、0.41%、0.60%。结果表明, 供试品溶液在配制后 10 h 内稳定。

6 **精密度试验** 精密配制低、中、高 3 种浓度 (5.060、15.18、30.36 mg·L⁻¹) 的对照品溶液各 5 份, 连续进样测定, 峰面积的 RSD 分别为 1.4%、0.3%、0.7%。每日配制低、中、高 3 种浓度的对照品溶液各 5 份, 同样操作连续 5 d, 峰面积的

RSD 分别为 2.2%、1.1%、0.8%。

7 回收率试验 取对照品储备液 0.1、0.3、0.6 mL 于 10 mL 容量瓶中, 按处方配比 (脂药比为 10 : 1) 精密加入空白脂质体 (磷脂含量 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 用流动相稀释至刻度。配制成含 AZTS 低 ($5.060 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、中 ($15.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 ($30.36 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 种浓度的溶液, 各 3 份。分别进样 $20 \mu\text{L}$, 计算回收率。低、中、高 3 种浓度的回收率 ($n = 3$) 分别为 (102 ± 4)%、(101.5 ± 2.6)%、(101.3 ± 1.8)%。

8 样品含量测定 精密量取 AZTS 脂质体溶液 0.04 mL (相当于 AZTS 约 0.16 mg), 置于 10 mL 容量瓶中, 用流动相 8 mL 破乳, 涡旋 1 min, 用流动相定容至刻度, 摇匀。进样 $20 \mu\text{L}$, 测定峰面积, 代入标准曲线方程计算含药量, 并与投药量相比, 计算百分含量。样品含量测定 3 批样品, 每批测定 5 次。测定结果见表 1。

表 1 脂质体中 AZTS 含量测定结果 $n = 5, \%$

批号	AZTS百分含量	RSD
071012	100.3 ± 1.3	1.3
071015	102.6 ± 1.5	1.5
071018	100.4 ± 1.3	1.3

9 脂质体包封率的测定 精密吸取 0.2 mL 的 AZTS 脂质体混悬液上葡聚糖凝胶 Sephadex-G75 柱, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液洗脱至白色混浊液全部流出, 收集白色流出液约 5 mL。用流动相破乳, 涡旋 1 min, 并用流动相定容至 50 mL 容量瓶中, $20 \mu\text{L}$ 进样分析, 得被包封药物的浓度 ($\rho_{\text{包}}$)。另取 0.2 mL 不过柱的含药脂质体, 用流动相破乳, 涡旋 1 min, 用流动相定容至相同体积, 进样分析, 得脂质体混悬液中药物的总浓度 ($\rho_{\text{总}}$)。按包封率 = $\rho_{\text{包}} / \rho_{\text{总}} \times 100\%$ 计算包封率, 其包封率测定结果见表 2。

表 2 AZTS 脂质体包封率测定结果 $n = 3, \%$

批号	包封率	RSD
071012	88 ± 3	3.9
071015	89.5 ± 2.8	3.1
071018	92 ± 3	3.2

讨论 1992 年 PHILLIPS 等^[7]给艾滋病模型小鼠分别尾静脉注射游离的 AZT 和脂质体包封的 AZT, 发现脂质体包封的 AZT 主要分布在肝、脾等巨噬

细胞丰富的器官, 骨髓内极少。AZT 经脂质体包封后显著地降低了对造血器官的毒性, 无骨髓抑制现象 (而游离 AZT 有明显的骨髓抑制现象), 且增强了艾滋病模型小鼠的抗病毒活力。但由于 AZT 为两亲性物质, 制成脂质体后包封率低, 限制了其临床应用。因此, 本研究尝试通过合成 AZT 的酯类, 解决其包封率低的问题。

由于 AZTS 为脂溶性药物, 将脂质体破坏后测定药物浓度时, 本研究没有采用常规的加入 triton X-100 溶液破坏的方法, 而是直接用流动相破坏。由于流动相为甲醇-水 (95 : 5, V : V), 可以直接破坏脂质体结构, 同时使 AZTS 溶解。这样既不会产生 triton X-100 的干扰, 又使实验操作方便、快捷。

在 RP-HPLC 法测定 AZTS 的含量时, 曾尝试过多个品牌的色谱柱, Diamonsil ODS、Kromasil ODS、Hypersil BDS C₁₈ 等, 通过比较柱效、柱压等因素, 最终采用 Hypersil BDS C₁₈ 柱, 原因可能是 AZTS 有较弱的碱性, 而 Hypersil BDS 柱适于碱性药物的分离。

[参考文献]

- [1] 李明慧, 陈笑艳, 张逸凡, 等. 测定人血浆中齐多夫定的液相色谱-串联质谱法及生物等效性的应用[J]. 中国新药与临床杂志, 2006, 25(2): 114-118.
- [2] 张娜, 彭敦仁. 抗人类免疫缺陷病毒药物的不良反应[J]. 药物流行病学杂志, 2000, 9(1): 20-22.
- [3] LAMBOT O, TAOUFIK Y, de GOËR MG, *et al.* Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2000, 23(2): 114-119.
- [4] SCHRAGER LK, D'SOUZA MP. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy[J]. JAMA, 1998, 280(1): 67-71.
- [5] 刘蕾, 纪立伟, 解飞, 等. HPLC 测定健康人体内齐多夫定的浓度及药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(2): 147-149.
- [6] 李喆, 邓英杰, 王秀敏, 等. HPLC 法测定辅酶 Q10 脂质体包封率[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 149-151.
- [7] PHILLIPS NC, TSOUKAS C. Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome[J]. Blood, 1992, 79(5): 1137-1143.