

RP-HPLC 法测定紫杉醇脂质体的药物包封率*

游杨杨¹, 索绪斌^{1**}, 岳静静¹, 徐兴¹, 张涵²

(1. 广东药科大学中药学院, 广州 510006; 2. 广州市茗川生物科技有限公司, 广州 510006)

摘要 目的: 建立紫杉醇脂质体药物包封率的测定方法。**方法:** 采用葡聚糖凝胶 G-50 柱色谱法分离紫杉醇脂质体和游离药物, 用 RP-HPLC 法检测紫杉醇的量, 计算脂质体中紫杉醇的包封率; 色谱条件: 采用 Platisil-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-水 (含 0.1% 三乙胺和 0.67% 冰乙酸) (80:20) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 227 nm, 柱温为室温。**结果:** 紫杉醇与辅料及溶剂的色谱峰分离良好, 峰形很好; 紫杉醇线性范围 0.5~50 μg · mL⁻¹ ($r=0.9993$), 加样回收率范围为 99.66%~100.8%, 包封率范围为 90.29%~91.65%。**结论:** 本方法能快速检测紫杉醇脂质体中紫杉醇含量及包封率。

关键词: 红豆杉; 二萜生物碱类化合物; 紫杉醇; 脂质体; 药物载体; 包封率测定; 葡聚糖凝胶 G-50; 反相高效液相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 03-0535-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.25

Determination of entrapment efficiency of liposomal paclitaxel by RP-HPLC*

YOU Yang-yang¹, SUO Xu-bin^{1**}, YUE Jing-jing¹, XU Xing¹, ZHANG Han²

(1. College of Chinese Herbal Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Guangzhou Mingchuan Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: This study establishes the determination method of entrapment efficiency of paclitaxel liposome. **Methods:** The liposomal paclitaxel were separated well from free paclitaxel by the Sephadex G-50 chromatography and was detected with RP-HPLC method. A Platisil-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) analytical column was used at room temperature, and the mobile phase was composed of methanol-water (containing 0.1% triethylamine and 0.67% glacial acetic acid) (80:20) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was 227 nm. **Results:** Paclitaxel peak was well separated with liposome excipients peak and solvent peak with a good peak shape. The linear range of paclitaxel was 0.5~50 μg · mL⁻¹ ($r=0.9993$), the average recovery was 99.66%~100.84% and the entrapment efficiency of the liposomal paclitaxel was 90.29%~91.65%. **Conclusion:** The method can quickly detect the encapsulation efficiency of liposomal paclitaxel.

* 国家自然科学基金 (81303288); 国家科技创新基金 (国科发计 [2013] 583 号); 广东省教育厅创新强校特色创新项目 (粤教科函 [2015] 3 号)

** 通信作者 Tel: (020) 39352337; E-mail: suoxubin04@163.com

第一作者 Tel: (020) 39352337; E-mail: shiny192you@163.com

Keywords: *Taxus chinensis*; diterpenoid alkaloid; paclitaxel; liposome; drug carrier; encapsulation efficiency; Sephadex G-50; RP-HPLC

紫杉醇 (paclitaxel, PTX)^[1]是从红豆杉树皮中提取分离的一种二萜生物碱类化合物,对许多类型的肿瘤细胞具有细胞毒作用^[2]。脂质体作为抗肿瘤药物载体,因其制作简单,对机体无毒,能显著降低药物毒副作用及容易实现肿瘤靶向等优点而备受关注。近年来国内外对紫杉醇脂质体已进行了很多的研究^[3-6],并且国内已有上市的注射用紫杉醇脂质体。包封率是评价脂质体制剂质量好坏的最重要的指标,也是脂质体能否发挥较普通制剂高效、低毒特点的关键^[7]。因此,准确快速地测定紫杉醇脂质体的包封率具有重要的意义。中国药典 2015 年版二部^[8]载有紫杉醇原料药的 HPLC 测定方法,以甲醇-水-乙腈 (23:41:36) 为流动相;注射用紫杉醇脂质体的质量标准采用国家食品药品监督管理局标准 WS-718 (X-529)-2002^[9],以甲醇-水 (3:1) 为流动相进行含量和包封率的检测;其他一些研究者有的采用不同比例的乙腈-水或者甲醇-水为流动相^[10-13],有的采用不同比例的甲醇-水-乙腈为流动相^[14];这些方法在本实验研究中均出现主峰严重拖尾及保留时间过长的现象。为了克服该现象,曾对 HPLC 色谱条件进行了大量的尝试和探索,获得的 HPLC 条件能够很好地使主成分峰与辅料峰及溶剂峰完全分开,并且保留时间缩短,能够快速准确地测定紫杉醇脂质体的包封率。

1 仪器与试剂

SCL-10AVP 型高效液相色谱仪 (岛津公司); Platisil-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶; 迪马科技有限公司); BSA124S 电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); JJ500 型分析天平 (常德双杰测试仪器有限公司); pHs-3C 型精密 pH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); 759 紫外可见分光光度计 (上海菁华科技有限公司) KQ5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

紫杉醇原料药 (海南紫杉园制药有限公司, 批号 141001, 纯度 >99.0%); 紫杉醇对照品 (中国食品药品检定研究院); 卵磷脂 (批号 121001, 上海金伴药业有限公司); 胆固醇 (批号 100918, 上海蓝季科技发展有限公司); Sephadex G-50 (Pharmacia 公司,

100~300 μm); 甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体制备

取 10 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.40), 加热至 50 °C。精密称取紫杉醇原料药 5 mg, 大豆磷脂 400 mg, 胆固醇 26.7 mg, α-生育酚 12 mg, 溶于少量 (约 1 mL) 无水乙醇中, 超声 (功率 40 W, 频率 200 kHz) 8~10 min 至完全溶解, 磁力搅拌下注入上述磷酸盐缓冲液中, 减压除去无水乙醇后, 水浴超声 5 min, 取出, 用 0.45 μm 的微孔滤膜挤出过滤, 得到粒径均匀的紫杉醇脂质体, 于 4 °C 中保存备用。

空白脂质体的制备除不加紫杉醇原料药外, 其余步骤同脂质体制备。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Platisil-ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (含 0.1% 三乙胺和 0.67% 冰乙酸) (80:20); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 227 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

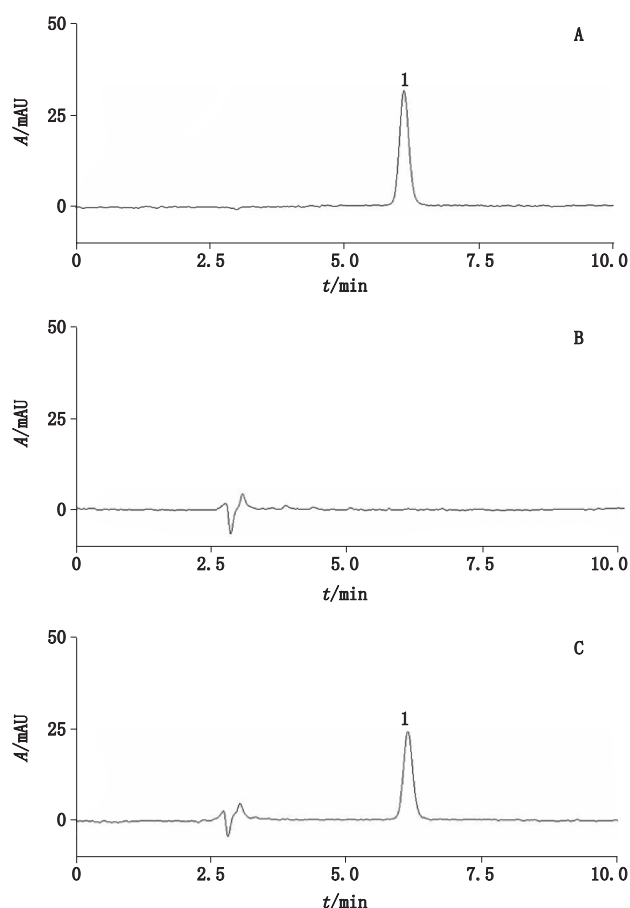
2.2.2 溶液制备

2.2.2.1 对照品溶液 精密称取紫杉醇对照品 5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得对照品储备液 (紫杉醇质量浓度为 100 μg · mL⁻¹); 精密量取该储备液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液 (紫杉醇质量浓度为 20 μg · mL⁻¹)。

2.2.2.2 供试品溶液 精密量取紫杉醇脂质体 0.4 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 超声 (功率 40 W, 频率 200 kHz) 约 1 min 使脂质体完全破解, 由乳白色的变成无色, 过滤, 取续滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.2.3 方法学考察

2.2.3.1 专属性试验 取“2.2.2”项下的紫杉醇对照品溶液和供试品溶液, 按上述色谱条件注入液相色谱仪; 另取处方量辅料, 置 10 mL 量瓶中, 按拟订方法制备空白对照溶液, 注入液相色谱仪, 分别记录高效液相色谱图 (见图 1), 考察系统适用性。结果表明, 在该色谱条件下, 辅料对紫杉醇的测定无干扰。



1. 紫杉醇 (paclitaxel)
A. 对照品溶液 (reference substance solution) B. 空白对照溶液 (blank control solution) C. 供试品溶液 (test sample solution)

图1 高效液相色谱图
Fig.1 HPLC chromatograms

2.2.3.2 线性关系考察 精密移取“2.2.2.1”项下对照品储备液 0.05、0.1、0.3、0.5、1、2、3、5 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释并定容至刻度, 摇匀, 分别按上述色谱条件进样测定色谱峰面积; 以峰面积 (A) 为纵坐标, 质量浓度 (C) 为横坐标进行线性回归, 得回归方程:

$$A = 18\ 766C + 8\ 883.2 \quad r = 0.999\ 3 \quad (n = 8)$$

结果表明, 紫杉醇质量浓度在 $0.5 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

2.2.3.3 精密度试验 精密移取“2.2.2.1”项下对照品储备液适量, 分别配制质量浓度为 3、15、30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。日内测定 6 次, 并连续测定 5 d, 计算日内、日间精密度。结果见表 1。由结果可知, 精密度均符合要求。

表 1 紫杉醇的方法精密度试验考察

Tab. 1 Precision of the method for determination of PTX

| 质量浓度 (ρ) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | RSD/% | |
|---|----------------|----------------|
| | 日间 (inter-day) | 日内 (intra-day) |
| 3.0 | 2.56 | 3.42 |
| 15.0 | 2.09 | 2.79 |
| 30.0 | 1.28 | 1.72 |

2.2.3.4 稳定性试验 分别取“2.2.2”项下对照品溶液和供试品溶液, 分别于放置 0、2、4、8、10 h 时进样测定, 记录峰面积; 结果对照品溶液和供试品溶液峰面积的 RSD 分别为 0.25% 和 1.41%, 表明对照品溶液和供试品溶液均在 10 h 内稳定性良好, 能满足测定需要。

2.2.3.5 加样回收率试验 精密量取空白脂质体 0.4 mL 共 9 份, 置 10 mL 量瓶中, 分别加入质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 紫杉醇对照品储备液 1.6、2.0、2.4 mL 各 3 份, 用流动相稀释并定容至刻度, 摇匀, 超声 (功率 40 W, 频率 200 kHz) 约 1 min, 挤过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 即得供试溶液。分别取 20 μL 注入液相色谱, 将峰面积代入标准曲线计算测定紫杉醇质量浓度, 与实际紫杉醇质量浓度相比得到样品加样回收率, 所得到的平均加样回收率在 98%~102% 内, RSD 均小于 2%, 能够满足脂质体中紫杉醇含量测定要求。结果见表 2。

2.3 葡聚糖凝胶 G-50 柱对脂质体和游离药物的分离

2.3.1 葡聚糖凝胶 G-50 柱的制备

精密称取葡聚糖凝胶 G-50 3.0 g, 用 10 倍煮沸的蒸馏水溶胀 4~6 h, 超声 (功率 40 W, 频率 200 kHz) 脱气 20 min, 即得葡聚糖凝胶 G-50 悬浮液。装柱, 柱内径 1.0 cm, 柱高 20 cm, 需缓慢、均匀、连续地加入已经脱气的葡聚糖凝胶 G-50 悬浮液, 使其均匀的沉积, 直至所需要的高度 (约 16~17 cm), 以蒸馏水封柱保存备用。

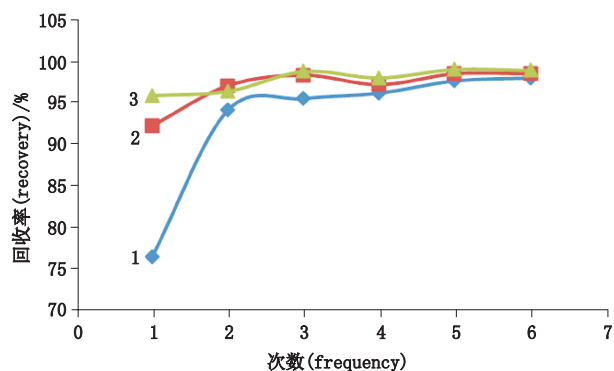
2.3.2 葡聚糖凝胶 G-50 对空白脂质体的吸附

精密量取空白脂质体 0.5、1.0、2.0 mL, 分别直接加于葡聚糖凝胶 G-50 柱顶端, 用 pH 7.40 的磷酸盐缓冲溶液约 20 mL 洗脱于 10 mL 量瓶中并定容, 于 450 nm 处测吸光度; 分别连续连续上样操作 7 次, 第 7 次洗脱液测定数据与第 6 次一致, 所以选择前 6 次的测定数据; 另空白脂质体 0.5、1.0、2.0 mL 各取 1 份, 直接置于 10 mL 量瓶中, 用上述磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 于 450 nm 处测吸光度。计算前 6 次操作的回收率。结果见图 2。

表 2 紫杉醇脂质体的回收率试验结果

Tab. 2 Results of recovery test of PTX liposomes

| 编号 (No.) | 加入量 (added)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 测得量 (found)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) | 回收率 (recovery)/% | 平均回收率 (average recovery)/% | RSD/ % |
|-------------|---|---|---------------------|-------------------------------|-----------|
| 1 | 16.00 | 15.96 | 99.76 | 99.66 | 1.5 |
| 2 | | 16.18 | 101.1 | | |
| 3 | | 15.70 | 98.11 | | |
| 4 | 20.00 | 19.85 | 99.25 | 100.2 | 1.9 |
| 5 | | 20.23 | 101.2 | | |
| 6 | | 20.01 | 100.0 | | |
| 7 | 24.00 | 24.41 | 101.7 | 100.8 | 1.4 |
| 8 | | 24.24 | 101.0 | | |
| 9 | | 23.94 | 99.77 | | |



1. 0.5 mL 2. 1.0 mL 3. 2.0 mL

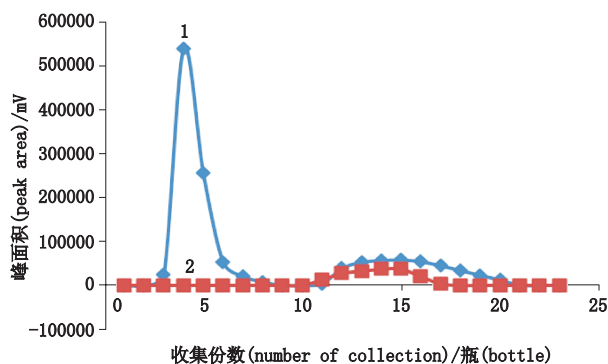
图 2 葡聚糖凝胶 G-50 对空白脂质体的吸附

Fig. 2 Adsorption of Sep G-50 on blank liposomes

由图 2 可知, 0.5 mL 空白脂质体洗脱 3 次, 1.0 mL 和 2.0 mL 的空白脂质体分别洗脱 2 次凝胶柱可以达到吸附饱和, 且 2.0 mL 空白脂质体第 1 次回收即可达到 95% 以上。本实验操作中, 均用 0.5 mL 空白脂质体以饱和凝胶柱洗脱 3 次。

2.3.3 脂质体分离洗脱曲线

取紫杉醇对照品 1.8 mg, 用无水乙醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中作为游离药物储备液。精密移取空白脂质体 0.5 mL, 上葡聚糖凝胶柱, 用 pH 7.40 的磷酸盐缓冲溶液约 15 mL 以 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速洗脱, 连续洗脱 3 次, 对凝胶柱进行空白脂质体预饱和。然后分别精密移取紫杉醇脂质体 0.2 mL 和游离药物储备液 0.1 mL 上柱, 以 pH=7.40 的磷酸盐缓冲液洗脱, 收集流份, 每管收集 1 mL, 测定紫杉醇峰面积; 以峰面积为纵坐标, 收集份数为横坐标, 绘制紫杉醇脂质体、游离药物 PBS 缓冲液洗脱曲线, 结果见图 3。



1. 紫杉醇脂质体洗脱 (paclitaxel liposome elution)

2. 游离药物洗脱 (free drug elution)

图 3 紫杉醇脂质体样品及游离药物洗脱曲线

Fig. 3 The elution curves of paclitaxel liposome and free drug samples

根据洗脱曲线可知, 前 10 mL 洗脱液为脂质体包封药物, 后 10 mL 洗脱液为游离药物, 脂质体包封药物和游离药物通过葡聚糖凝胶柱 G-50 得到很好的分离。

2.3.4 脂质体包封率的测定 精密量取 0.2 mL 的脂质体用 pH 7.40 磷酸盐缓冲溶液稀释于 10 mL 量瓶中, 定容, 混匀后, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜, 按上述色谱条件进样, 测峰面积, 代入标准曲线, 计算紫杉醇总量 C_b ; 精密量取脂质体 0.2 mL 加于空白脂质体预饱和的凝胶柱顶端, 用 pH=7.40 的磷酸盐缓冲溶液洗脱, 收集第 3~10 mL 的洗脱液, 用 pH=7.40 磷酸盐缓冲溶液稀释于 10 mL 量瓶中, 定容, 混匀后, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜, 按上述色谱条件进样, 测峰面积, 代入标准曲线, 计算包入脂质体中紫杉醇的量 C_a , 按 $C_a/C_b \times 100\%$ 计算包封率。结果见表 3。

表 3 紫杉醇脂质体包封率

Tab. 3 The entrapment efficiency of paclitaxel liposome

| 批号 (batch No.) | $C_d/\mu\text{g}$ | $C_l/\mu\text{g}$ | 包封率 (entrapment efficiency)/% | RSD/% |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|-------|
| 1 | 183.46 | 200.18 | 91.65 | |
| 2 | 185.42 | 203.17 | 91.26 | 0.78 |
| 3 | 203.61 | 225.50 | 90.29 | |

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

在流动相的选择中,试用不同比例的乙腈-水、甲醇-水-乙腈、甲醇-水为流动相,发现保留时间比较长,峰形也不好,最后摸索出甲醇-水(含 0.1% 三乙胺和 0.67% 冰乙酸)(80:20)为流动相,紫杉醇的出峰时间为 6.165 min,且辅料对紫杉醇的峰值无干扰。

3.2 紫杉醇脂质体的药物包封率测定方法的选择

紫杉醇在波长 227 nm 处有最大吸收,而辅料大豆磷脂在此波长处也有紫外吸收。如直接用紫外分光光度法测定紫杉醇脂质体中紫杉醇的量,由于脂质体在溶液中是微粒体系,会吸收部分紫外光线,干扰药物的吸收,另外即使将含药的脂质体完成溶解于甲醇中成透明溶液,也会因为大豆磷脂的存在干扰药物的测定。因此,作者采用葡聚糖凝胶 G-50/HPLC 法测定紫杉醇脂质体的包封率,使测定结果更加准确。

3.3 含药脂质体与游离药物洗脱分界点的界定

脂质体包封率测定的关键是:(1)减少葡聚糖凝胶 G-50 柱对含药脂质体的吸附;(2)含药脂质体与游离药物完全分开。为了解决这 2 个问题,采取空白脂质体预饱和的方法,减少凝胶柱对含药脂质体的吸附,而且该结果在葡聚糖凝胶 G-50 柱对空白脂质体的吸附试验中得到了验证;采用 10 mL 为分界点收集脂质体部分,游离药物与脂质体在葡聚糖凝胶 G-50 柱上的洗脱曲线显示,前 10 mL 是含药脂质体,后 10 mL 是游离药物,以 10 mL 为分界点,游离药物对含药脂质体无干扰。

参考文献

[1] 史清文. 天然药物化学史话:紫杉醇[J]. 中草药, 2011, 42(10): 1878
SHI QW. Historical story on natural medicinal chemistry of taxol[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2011, 42(10): 1878

[2] 陈卫东, 刘晓东. 抗肿瘤药紫杉醇脂质体的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2005, 5(10): 776
CHEN WD, LIU XD. Research progress of paclitaxel liposome with

antitumor drug[J]. Chin Remed Clin, 2005, 5(10): 776

[3] ZHANG JA, ANYARAMBHATLA G, MA L. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 59(1): 177

[4] CROSASSO P, CERUT IM, BRUSA P, et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel containing liposomes[J]. J Control Release, 2000, 63(1-2): 19

[5] 阎家麒, 王悦, 王九一. 紫杉醇隐形脂质体的制备及在小鼠体内的组织分布[J]. 药学报, 2000, 35(9): 706
YAN JQ, WANG Y, WANG JY. Preparation of paclitaxel stealth liposomes and its tissue distribution in mice[J]. Acta Pharm Sin, 2000, 35(9): 706

[6] 王薇, 许鑫, 胡戴, 等. 紫杉醇脂质体的制备及表征[J]. 中国药业, 2013, 22(22): 63
WANG W, XU X, HU D, et al. Preparation and characterization of paclitaxel liposome[J]. China Pharm, 2013, 22(22): 63

[7] 郑宁, 张立德. 脂质体质量控制方法的研究概况[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(12): 1282
ZHENG N, ZHANG LD. A general situation in studies of quality control for liposomes[J]. Chin J New Drugs, 2004, 13(12): 1282

[8] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 1368
ChP 2015. Vol II[S]. 2015: 1368

[9] WS-718(X-529)-2002 国家食品药品监督管理局标准[S]. 2002
WS-718(X-529)-2002 The State Food and Drug Administration Standards[S]. 2002

[10] 张一鸣, 刘靖新, 周颖琳, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定紫杉醇脂质体的包封率[J]. 分析科学学报, 2014, 30(5): 705
ZHANG YM, LIU JX, ZHOU YL, et al. Measurement of entrapment efficiency in liposome by solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography[J]. J Anal Sci, 2014, 30(5): 705

[11] 康艳敏, 吴燕, 杨长青, 等. 紫杉醇脂质体的制备及质量考察[J]. 中国药房, 2008, 19(28): 2208
KANG YM, WU Y, YANG CQ, et al. Preparation and quality study of paclitaxel liposome[J]. China Pharm, 2008, 19(28): 2208

[12] 谭燕, 周建平, 全新勇, 等. 紫杉醇脂质体大鼠体内药理学考察[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(2): 1
TAN Y, ZHOU JP, TONG XY, et al. Study on pharmacokinetics of paclitaxel liposome in rats[J]. Jiangsu Pharm Clin Res, 2006, 14(2): 1

[13] 周蔚, 周彩存, 孟淑燕, 等. 靶向肺癌的紫杉醇长循环脂质体抑瘤作用研究[J]. 肿瘤, 2011, 31(3): 203
ZHOU W, ZHOU CC, MENG SY, et al. The anti-tumor effects of lung cancer-targeting long-circulating paclitaxel-containing liposomes[J]. Tumor, 2011, 31(3): 203

[14] 周卫, 翁帼英, 陈文忠, 等. 紫杉醇脂质体在大鼠体内的组织分布[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(18): 1402
ZHOU W, WENG GY, CHEN WZ, et al. Tissue distribution of paclitaxel liposome in rats[J]. Chin Pharm J, 2005, 40(18): 1402

(本文于 2016 年 3 月 23 日收到)