

文章编号: (2005) 03-0162-04

## RP-HPLC 法测定拉米夫定棕榈酸酯脂质体药物含量及包封率

胡会国, 金圣煊, 王艳芝, 邓意辉, 毕殿洲

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:** **目的** 建立拉米夫定前体药物拉米夫定棕榈酸酯脂质体含量及包封率的测定方法。**方法** 反相高效液相色谱法 (RP-HPLC), 采用Diamonsil™ ODS C<sub>18</sub> (4.6 mm×200 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-水(体积比为95:5), 流速为1 mL·min<sup>-1</sup>, 紫外检测波长为270 nm。采用超速离心法分离拉米夫定棕榈酸酯脂质体中的游离药物。**结果** 在本色谱条件下辅料和试剂对药物测定无干扰, 拉米夫定棕榈酸酯在 $3.42 \times 10^{-6} \sim 8.55 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内线性关系良好 ( $r=0.9999$ ), 平均回收率为100.7% ( $n=9$ ), 精密度的日内RSD及日间RSD均小于2% ( $n=5$ )。**结论** 该方法准确可靠、简单快速, 可用于拉米夫定棕榈酸酯脂质体含量及包封率的测定。

**关键词:** 药剂学; 包封率; 反相高效液相色谱法; 拉米夫定棕榈酸酯; 药物脂质体

**中图分类号:** R94      **文献标识码:** A

拉米夫定 (lamivudine, 3TC) 是格兰素公司首先开发, 于 1999 年在中国注册上市, 商品名 EpiVir, 属于核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTIs)。3TC 在细胞内转化为活性三磷酸衍生物以后, 成为 HIV-1 逆转录酶底物的竞争性抑制剂, 发挥抑制 HIV-1 逆转录酶 (RT) 的作用, 阻碍病毒 DNA 合成<sup>[1, 2]</sup>。

由于拉米夫定是一个两亲性药物, 存在包封率低、贮存过程中易泄漏等缺点, 从而限制其进一步开发和应用。鉴于此, 作者合成了酯化前体药物拉米夫定棕榈酸酯 (lamivudinyl palmitate, LAP), 并制备了脂质体, 使包封率达到 90% 以上, 同时消除生产、贮存、使用过程中药物泄漏问题。为了控制所制脂质体的质量, 作者建立了 RP-HPLC 法, 测定 LAP 脂质体的含量及包封率。该法灵敏度高、专属性好、方便快捷, 为制剂的质量评价、质量控制提供了依据。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪、Agilent 自动进样器、Agilent 1100 系列紫外可变波长检测器、Agilent 色谱工作站, 日本 Hitachi GS-120 型超速离心机。甲醇为色谱纯, 水为自制重蒸水。LAP 对照品 (自制, 经 HPLC 面积归一化法测定含量为 99.06%), LAP 脂质体 (自制, 批号: 20040618、20040619、20040620)。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil™ ODS C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(体积比为 95:5);

收稿日期: 2005-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371694)

作者简介: 胡会国 (1977-), 男 (汉族), 江苏苏州人, 在读硕士, Tel. 024-23986360; 邓意辉(1964-), 男 (汉族), 湖南花垣人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事药物脂质体制剂的研究, Tel. 024-23986316, E-mail dds-666@163.com。

柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 270 nm; 进样量: 20 μL。外标法。

## 2.2 检测波长的选择

取 LAP 对照品适量, 用甲醇制成  $3.42 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 的溶液, 以甲醇为空白, 在 200~400 nm 波长内进行扫描。结果 LAP 溶液在 270 nm 处有最大吸收, 故选择 270 nm 作为检测波长。

## 2.3 色谱行为

取空白脂质体破乳溶液、LAP 对照品溶液和 LAP 脂质体破乳溶液各 20 μL 进样分析, 得色谱图 1。结果表明在此色谱条件下, 辅料和试剂对药物测定无干扰, LAP 峰的保留时间约为 7.8 min。

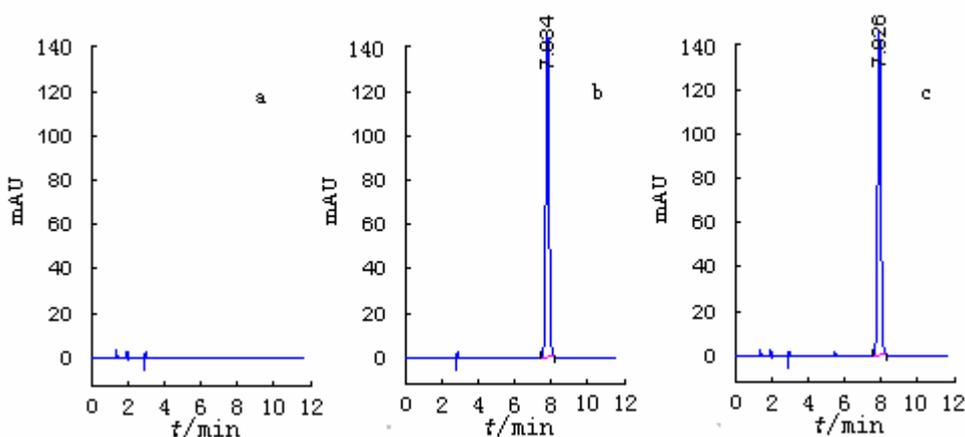


Fig.1 The chromatograms of blank liposomes(a), LAP solution(b) and LAP liposomes(c)

## 2.4 线性关系

精密称取 LAP 对照品 20.00 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 水浴超声处理, 使主药溶解, 摇匀放冷至室温, 加甲醇至刻度, 摇匀。精密吸取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 标号为 1~5 号。另取第 5 号溶液 1.0、2.5 mL 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 标号为 6、7 号。吸取上述 7 种溶液各 20 μL 测定 2 次, 记录色谱图。取平均峰面积  $A$  对浓度  $c$ (mol·L<sup>-1</sup>) 回归得:  $A = 1.0735 \times 10^7 c + 4.6378$ ,  $r = 0.9999$ , 线性范围为  $3.42 \times 10^{-6} \sim 8.55 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup>。

## 2.5 精密度

依法配制 LAP 对照品溶液  $8.55 \times 10^{-6}$ 、 $3.42 \times 10^{-5}$ 、 $6.84 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 低、中、高 3 种浓度, 于 2、4、6、8、10 h 测定 3 次, 计算日内精密度, 日内 RSD 分别为 0.63%、0.79% 和 0.41%; 于 1、2、3、4、5 d 测定 3 次, 计算日间精密度, 日间 RSD 分别为 0.95%、0.79% 和 0.87%。

## 2.6 回收率

精密称取 LAP 对照品 20.00 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 0.25、1.0、2.0 mL 分别置于 25 mL 量瓶中, 加入处方量的空白脂质体, 用甲醇稀释至刻度, 配成约为  $8.55 \times 10^{-6}$ 、 $3.42 \times 10^{-5}$ 、 $6.84 \times 10^{-5}$  mol·L<sup>-1</sup> 低、中、高 3 种浓度水平的样品溶液, 分别进样 20 μL, 测定峰面积, 代入标准曲线方程换算成实际浓度, 计算回收率, 每个浓度做 3 份, 得平均回收

率为 100.7%，RSD 为 0.98%。

## 2.7 检测限和定量限

将 LAP 对照品溶液稀释成不同浓度进行 HPLC 分析，测得其检测限（信号  $S$  和噪音  $N$  的比值  $S/N=3$ ）为 2.0 ng，定量限（信号  $S$  和噪音  $N$  的比值  $S/N=10$ ）为 8.0 ng。

## 2.8 样品测定

精密吸取 LAP 脂质体 0.25 mL（含 LAP 约 1 mg）于 50 mL 量瓶中，加流动相溶解，并稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液，进样 20  $\mu\text{L}$ ，测定峰面积；另取 LAP 对照品储备液适量，用流动相制成  $4.27 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 LAP 溶液，同法测定，按外标法计算出供试品中 LAP 的含量。3 批制剂中 LAP 的含量分别相当于标示含量的 98.9%、99.4%、100.7%。

## 2.9 包封率的测定

量取 LAP 脂质体混悬液 1.0 mL，置于离心管中，在超速离心机上以  $30\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  于  $4\text{ }^\circ\text{C}$  下超速离心 1 h。在此条件下，脂质体保持混悬状态，而游离的 LAP 则沉淀出来，并且聚集在离心管的底部，达到与脂质体分离的目的。按“2.8”条方法，测定离心前后脂质体中的药物浓度，按下式计算包封率：

$$\text{包封率} = c_{\text{包}} / c_{\text{总}} \times 100\%$$

其中  $c_{\text{包}}$  为离心后脂质体中 LAP 的浓度， $c_{\text{总}}$  为离心前脂质体中 LAP 的浓度。结果 3 批样品的包封率分别为 90.4%、90.1%、91.3%。

## 3 讨论

作者首次建立了 LAP 脂质体含量和包封率测定的 RP-HPLC 方法。LAP 为脂溶性药物，在水中不溶，已经测定在正辛醇-水体系中的油水分配系数  $\log P > 5$ 。以甲醇-水为流动相（体积比为 95：5），保留时间适宜，辅料和试剂对 LAP 的测定无干扰。LAP 在  $3.42 \times 10^{-6} \sim 8.55 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内线性关系良好，回收率高，能准确快速地进行含量测定。

包封率是脂质体制剂的一个重要指标，《中国药典》2000 年版规定包封率不得小于 80%，这对于一些包封率低的药物来说，是一个严峻的挑战。将药物进行亲脂性衍生化是提高包封率和制剂贮存稳定性的一个有效方法<sup>[3]</sup>。

常用于分离脂质体制剂中游离药物的方法有：凝胶柱色谱法、离心法和透析法等。作者曾试用透析法、葡聚糖凝胶（ $G_{50}$ ）柱过滤法、微柱离心法和大孔树脂吸附法，但由于 LAP 不溶于水，均无法完全分离游离药物。最后用低温超速离心法，利用药物与脂质体在分散介质中的密度差，选择合适的转速和离心时间，可有效分离游离药物，获得较为准确的包封率数据，利于脂质体的处方筛选和质量评价。将两亲性的 3TC 制成亲脂性的前药 LAP 后，药物的包封率由原来的 7.6%（自测）提高到 90% 以上，说明以亲脂性前药包裹于脂质体双分子层中，确实是解决一些低包封率药物制剂问题的一个有效方法。

**参考文献:**

- [1] Stephen K, Gareth JV, Patrick G, *et al.* Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions *in vitro*[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1997, 54(5): 589 - 595.
- [2] Jonathan AV, Nick C, Helen JJ, *et al.* (-)-2'-Deoxy-3'-thiacytidine is a potent, highly selective inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 replication *in vitro*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, 36(4): 733 - 739.
- [3] Gulati M, Grover M, Singh S, *et al.* Lipophilic drug derivatives in liposomes[J]. *Int J Pharm*, 1998, 165: 129 - 168.

## **RP-HPLC determination of the content and entrapment efficiency of lamivudinyl palmitate liposomes**

HU Hui-guo, JIN Sheng-xuan, WANG Yan-zhi, DENG Yi-hui, BI Dian-zhou  
(*School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*)

**Abstract: Objective** To establish a RP-HPLC method for content and entrapment efficiency determination of lamivudinyl palmitate liposomes. **Method** The separation was performed with a Diamonsil™ ODS C<sub>18</sub> (4.6 mm×200 mm, 5 μm) using methanol-water (V : V=95 : 5) as the mobile phase. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup>. It was detected at 270 nm. **Result** The calibration curve was linear within the range of  $3.42 \times 10^{-6} \sim 8.55 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r=0.9999$ ), the intra-day RSD and inter-day RSD were less than 2%, and the average recovery was 100.7% ( $n=9$ ). **Conclusion** This method is simple, accurate, sensitive and applicable for determination of content and entrapment efficiency of lamivudinyl palmitate liposomes.

**Key words:** pharmaceuticals; entrapment efficiency; RP-HPLC; lamivudinyl palmitate; drug liposome

(本篇责任编辑: 赵桂芝)