

HPLC 测定多柔比星壳寡糖硬脂酸胶团中药物的含量

应晓英, 杜永忠, 沈洁, 袁弘 (浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要:目的 采用高效液相色谱法测定壳寡糖硬脂酸嫁接物胶团 (CSO-SA) 中的多柔比星 (DOX) 的含量。方法 采用 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.01 mol·L⁻¹ 的十二烷基硫酸钠溶液-乙腈-甲醇 (50:50:6) 为流动相, 内含 0.6% (v/v) 的磷酸, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 25 °C。结果 多柔比星在 0.4~8 μg·mL⁻¹ 时, 浓度与峰面积呈良好的线性关系, $Y = 52.926X - 3.761$ ($r = 0.9999$, $n = 3$), 定量限为 (0.05 ± 0.014) μg·mL⁻¹ ($S/N > 10$, $n = 3$)。高、中、低三个浓度的日内 RSD 为 1.82、0.86、0.65%, 日间 RSD 为 1.73、0.88、0.75%, 平均加样回收率为 99.38 ± 1.22%。结论 本测定方法操作简便, 结果准确。

关键词:多柔比星; 高效液相色谱法; 壳寡糖硬脂酸嫁接物胶团

中图分类号: R917.4; R927.2

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0388-03

HPLC Determination of Doxorubicin Concentration in Chitosan Oligosaccharide-stearic Acid Micelles

YING Xiaoying, DU Yongzhong, SHEN Jie, YUAN Hong (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE An HPLC analysis method was established for the determination of doxorubicin (DOX) concentration in chitosan oligosaccharide-stearic acid (CSO-SA) micelles. **METHODS** The segregation and determination of samples were performed on a Shim pack VP-ODS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a mobile phase consisting of 0.01 mol·L⁻¹ sodium dodecyl sulfate-methanol-acetonitrile (50:50:6) containing 0.6% phosphoric acid at a flow-rate of 1.0 mL·min⁻¹, UV detector was set at 254 nm and column temperature was 25 °C. **RESULTS** There was good linear relationship within the range of 0.4~8 μg·mL⁻¹ of DOX, $Y = 52.926X - 3.761$ ($r = 0.9999$, $n = 3$). The quantification limit was (0.05 ± 0.014) μg·mL⁻¹ ($S/N > 10$, $n = 3$). The RSDs of within-day were 1.82、0.86、0.65%, and the RSDs of between-day were 1.73%、0.88%、0.75%, respectively. The average recovery was (99.38 ± 1.22)%. **CONCLUSION** The HPLC methods are simple and accurate for the doxorubicin concentration in micellar delivery system.

KEY WORDS: doxorubicin; HPLC; chitosan oligosaccharide-stearic acid micelles

多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是目前临床上应用广泛而有效的抗肿瘤药物之一, 可用于治疗肉瘤、膀胱癌、乳腺癌、前列腺癌等。但因该药物对人体有心脏毒性、骨髓抑制^[1-2]等严重不良反应, 限制了其在肿瘤治疗中的应用。聚合物胶团是近几年正在发展的一类新型的纳米载体, 具有亲水性外壳及疏水性内核, 其内核可为难溶性药物、多肽和蛋白类药物及基因提供储库, 亲水性外壳则可进行理化性质修饰, 达到体内靶向分布^[3]、逃避单核细胞的吞噬、提高生物膜转运等作用。由化学嫁接得到的两亲型壳寡糖硬脂酸聚合物 (CSO-SA), 在水性介质中

可自发形成胶团^[4], 将多柔比星包裹于该胶团中, 以期提高药物的靶向作用, 降低不良反应。多柔比星的含量测定方法主要有紫外分光光度法^[5]、荧光分光光度法^[6]、高效液相色谱法^[7]等等。本研究建立了 HPLC 测定多柔比星壳寡糖硬脂酸胶团 (DOX-CSO-SA) 中 DOX 的含量, 以配合 DOX-CSO-SA 的体内外研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (安捷伦公司); Beckman 64R 高速离心机 (Beckman 公司); FA1104 电子天平 (上海天平仪器厂)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672552); 863 科技计划项目 (2007AA03z318); 浙江省教育厅科研基金资助项目 (20061326)

作者简介: 应晓英, 女, 硕士 Tel: (0571)88208433 E-mail: yingxiaoying@zju.edu.cn

DOX-CSO-SA (自制, 批号为080103、080104、080107、080110、080111); DOX对照品(浙江海正药业股份有限公司, 含量99.6%, 批号C060507); 甲醇和乙腈为色谱纯, 实验用水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: shim-pack VP-ODS C₁₈柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01 mol·L⁻¹的十二烷基硫酸钠溶液-乙腈-甲醇(50:50:6), 内含0.6%的磷酸; 流速1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 室温(25 °C); 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取DOX对照品10.00 mg, 置10 mL量瓶中, 加流动相溶解, 使成1 mg·mL⁻¹的储备液。精密吸取该贮备液1 mL, 置100 mL量瓶中, 加流动相稀释, 使成工作液(10 μg·mL⁻¹), 置4 °C冷藏备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取DOX-CSO-SA冻干品适量(相当于DOX 50 μg), 置25 mL量瓶, 加入流动相适量, 超声提取15 min, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。10 000 r·min⁻¹离心10 min, 取上清液20 μL注入液相色谱仪进样测定。

2.2.3 空白溶液 取不含DOX的空白胶团, 按“2.2.2”项下方法配制, 依法测定。

2.3 方法学考察

2.3.1 方法专属性考察 按上述色谱条件, 将对照品溶液、供试品溶液、空白溶液分别进样, 结果DOX和相邻的杂峰达到了基线分离, 空白胶团对DOX的测定无干扰。空白溶液、对照品溶液、供试品溶液的HPLC图见图1。

2.3.2 线性关系 精密吸取对照品储备液0.4、0.8、1、2、4、8 mL, 分别至10 mL量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积Y为纵坐标, 浓度X(μg·mL⁻¹)为横坐标进行线性回归, 得回归方程为: $Y=52.926X-3.761$ ($r=0.9999$, $n=3$), 结果表明DOX在0.4~8 μg·mL⁻¹内线性关系良好。定量限为(0.05±0.014) μg·mL⁻¹ ($S/N>10$, $n=3$)。

2.3.3 精密度考察 按“2.2.2”项下方法配制浓度为0.4、2、4 μg·mL⁻¹的样品溶液各5份, 在上述色谱条件下, 分别测定峰面积, 计算日内、日间精密度, 结果见表1。

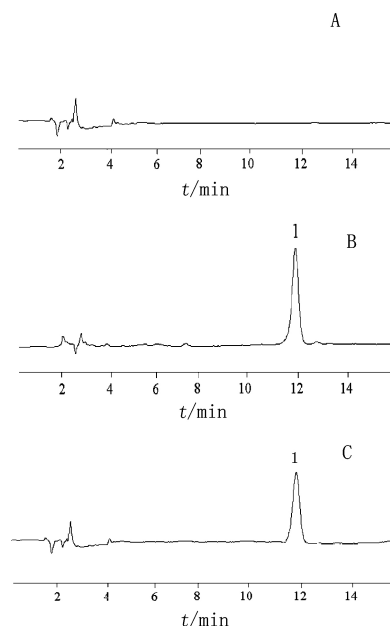


图1 空白(A)、对照品(B)和供试品(C)的色谱图
1-多柔比星

Fig 1 HPLC chromatograms of blank sample (A) and doxorubicin reference substance (B) and sample (C) 1-doxorubicin

表1 精密试验结果 (n=5)

Tab 1 Results of precision test (n=5)

	加入量/μg·mL ⁻¹	测得量/μg·mL ⁻¹	RSD/%
日内	0.4	0.38±0.01	1.82
	2	2.01±0.01	0.86
	4	3.96±0.02	0.65
日间	0.4	0.39±0.01	1.73
	2	1.98±0.02	0.88
	4	4.04±0.01	0.75

结果高、中、低3个浓度峰面积的日内和日间RSD均小于2%, 符合样品测定的要求。

2.3.4 重复性试验 按供试品测定方法, 对同一批供试品进行6次平行实验测定DOX的含量, RSD为0.50%, 结果表明此法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取DOX浓度为2 μg·mL⁻¹供试品溶液, 分别于配制后0、1、2、4、12和24 h依次进样, 结果DOX峰面积RSD为1.18%, 表明DOX溶液在24 h内基本稳定。

2.3.6 加样回收率试验 称取已知含量的冻干品约1.4 mg, 精密称定, 精确加入对照品储备液(10 μg·mL⁻¹) 2.0、2.5、3.0 mL, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 计算回收率, 结果见表2。

表2 加样回收率试验结果 (n=9)

Tab 2 Results of recovery test (n=9)

取样量/mg	对照品加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1.42	20.04	44.88	101.50		
1.46	20.04	45.23	99.34		
1.50	20.04	45.85	97.38		
1.48	25.05	50.65	100.12		
1.40	25.05	49.75	98.80	99.38	1.22
1.43	25.05	50.03	99.14		
1.41	30.06	54.75	98.13		
1.42	30.06	55.01	100.25		
1.45	30.06	55.12	99.78		

2.3.7 供试品的含量测定 精密吸取供试品溶液及对照品溶液各20 μL 进样,测定峰面积,外标法计算含量,胶团中DOX的平均含量为1.75%,RSD为1.38% (n=5)。

表3 5批样品含量测定结果 (n=5)

Tab 3 Content of DOX in the samples (n=5)

批号	多柔比星含量/%	平均含量/%	RSD/%
080103	1.72		
080104	1.75		
080107	1.78	1.75	1.38
080110	1.73		
080111	1.76		

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

用3根不同品牌填料的色谱柱shim-pack VP-ODS C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、Hypersil C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)、Kromasil C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm),考察供试品中DOX峰柱效及其与相邻色谱峰的分离度的情况,结果使用shim-pack VP-ODS C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)色谱柱,DOX理论板数达10 000以上,与相邻色谱峰的分离度大于2.0,故选择shim-pack VP-ODS C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行试验。

本试验参考了中国药典与相关文献^[8],文献法流动相为乙腈-0.025 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠-三乙胺(30:70:0.1),用85%磷酸调pH值为3.2,测定结果显示DOX的分离度较药典法差,因此确定流动相与中国药典一致。

3.2 样品处理方法的考察

本试验供试品溶液制备时曾采用流动相、水、50%甲醇、甲醇作为提取溶剂,测定结果显示以水、50%甲醇、甲醇为提取溶剂时,提取回收率分别为84.4%、91%、80.8%,均较流动相提取得到的回收率低,故选用流动相作为提取溶剂。

供试品溶液制备时,曾对不同超声时间(5, 10, 15, 20 min)进行了考察,测定结果显示超声5 min和10 min的多柔比星含量较低,而超声15 min与20 min的测定结果相对较高,分别为99.13%和99.78%,并无显著差异。证明超声处理15 min,DOX已基本提取完全,因此确定超声提取时间为15 min。

3.3 小结

本实验建立的HPLC,结果误差小,重复性好,操作简便快速,可以作为DOX-CSO-SA含量测定的一种良好的分析方法。

REFERENCES

- [1] PAHUNBO C, ALBONICI L, BEI R, et al. HMBA induces cell death and potentiates doxorubicin toxicity in malignant mesothelioma cells [J].Cancer Chemother Pharmacol, 2004, 54(5):398-406.
- [2] YILMAZ S,ATESSAHIN A,SAHNA E,et al. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity [J].Toxicology, 2006,218 (2-3):164-171.
- [3] LIU J B,ZENG F Q, ALLEN C.In vivo fate of unimers and micelles of a poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) copolymer in mice following intravenous DOXinistration [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2007,65(3): 309-319.
- [4] YE Y Q, HU F Q, YUAN H. Preparation and characterization of stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide polymeric micelles[J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39(6): 467-471.
- [5] YAN J D, XIN H, ZHENG Y J. Examine the DOX level in the serum and the tissue by fluorescence spectrophotometry [J].Chin J Lab Diagn (中国实验诊断学), 2007,11(5):596-597.
- [6] ZHAO R L, XIE Y, DING H. Doxorubicin content determination of doxorubicin poly(lactic acid) microspheres by UV [J]. J Shanxi Med Univ (山西医科大学学报), 2003, 34(2):166-167.
- [7] TONG S S, YU J N,XU X M,et al.Determination of the Concentration of Doxorubicin in the Serum of Mice by High-performance Liquid Chromatography[J]. Acad J Jiangsu Univ: Med Ed (江苏大学学报:医学版), 2002,12(6):563-565.
- [8] WANG H, ZHENG L, LIANG A J, et al. Preparation of small particle size of doxorubicin hydrochloride albumin microspheres and determination of doxorubicin content by HPLC [J]. Pharm J Chin PLA (解放军药学报), 2002, 18(3):140-142.

收稿日期: 2008-05-20