

HPLC 荧光法检测转铁蛋白修饰的阿霉素脂质体在小鼠体内的含量

王永禄¹, 李学明^{1,2*}, 顾立¹, 徐元龙¹, 平其能² (1.南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009; 2.中国药科大学药学院, 南京 210009)

摘要:目的 建立转铁蛋白修饰的阿霉素脂质体在小鼠体内组织浓度的测定方法。方法 选择乙腈-5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(30:70)为流动相; 色谱柱: DIKMA Diamonsil C₁₈ 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 激发波长为 480 nm, 发射波长为 550 nm; 柱温: 30 ℃。结果 本实验所用方法线性关系良好, 且具有专一性强、准确性、灵敏度高的优点, 符合生物样本分析的要求。结论 可用本法快速、简便、准确地测定小鼠组织样品中转铁蛋白修饰的阿霉素脂质体的含量。

关键词:转铁蛋白; 阿霉素脂质体; 反相高效液相色谱

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2006177)

作者简介: 王永禄, 男, 博士生, 讲师 Tel: (025)58133722 E-mail: WL_761107@163.com *通信作者: 李学明, 男, 博士, 副教授
Tel: (025)83587343 E-mail: xuemingli@njut.edu.cn

Determination of Doxorubicin Liposomes Modified with Transferrin in PCR Mice by HPLC With Fluorescence Detector

WANG Yonglu¹, LI Xueming^{1,2*}, GU Li¹, XU Yuanlong¹, PING Qineng² (1. College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a sensitive and specific method for the determination of doxorubicin liposomes modified with transferrin in PCR mice by HPLC with fluorescence detector. **METHODS** RP-HPLC with fluorescence detector was used. ADIKMA Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of acetonitrile-5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (30 : 70). The detection wavelength was E_x 480 nm, E_m 550 nm and the temperature was at 30 °C. The flow velocity was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** The calibration curve showed a good linearity. The result of the extraction recovery, the intra-day and inter-day RSD of doxorubicin were all analytical for the determination. **CONCLUSION** The method is sensitive, fast, precise and reliable to operate, and is suitable for the analysis of doxorubicin liposomes modified with transferrin in PCR mice.

KEY WORDS: transferrin; doxorubicin liposomes; RP-HPLC

阿霉素(doxorubicin, DOX)是一种抗瘤谱广、活性强的抗癌药物,广泛用于乳腺癌、结肠癌、肝癌、白血病等癌症的治疗。但阿霉素具有较明显的不良反应,特别是其心脏不良反应严重限制了阿霉素的临床应用。转铁蛋白修饰的阿霉素脂质体可以明显降低阿霉素在心脏组织的浓度,从而降低阿霉素的的心脏毒性^[1]。为进一步研究转铁蛋白修饰的阿霉素脂质体的组织分布特性,笔者在相关文献报道^[2-5]的基础上,建立了反相高效液相色谱荧光法,测定了转铁蛋白修饰的阿霉素脂质体在ICR小鼠心、肝、脾、肺、肾组织内的药物浓度。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 LC-10ATvp (日本岛津公司); RF-10AXL 荧光检测器(日本岛津公司); Sartorius 分析天平(德国赛多利斯股份公司); Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 盐酸阿霉素注射液(深圳万乐药业公司); 转铁蛋白修饰的阿霉素脂质体(Tf-SL-DOX, 自制); 盐酸柔红霉素 (DNM, 批号:130559-200501, 纯度: 98.1%, 中国生物制品检验鉴定所); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: DIKMA Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 检测波长: 激发波长为 480 nm, 发射波长为 550 nm; 流动相: 乙腈-5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液(30:70); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C。

2.2 对照品溶液和内标溶液的配制

2.2.1 盐酸阿霉素溶液的配制 取盐酸阿霉素 10 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取该液 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 100 μg·mL⁻¹ 储备液。分别精吸取取储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 得到浓度分别为 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg·mL⁻¹ 的盐酸阿霉素 (DOX) 溶液。

2.2.2 柔红霉素内标溶液的配制 取柔红霉素 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 200 μg·mL⁻¹ 储备液。精密吸取储备液 0.25 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 得到 5.0 μg·mL⁻¹ 的柔红霉素溶液。

2.3 组织样品的处理方法

分别取 ICR 小鼠[♀ ♂ 各半, 体重 18~22 g, 由中国药科大学动物室提供, 实验动物合格证号: SCXK(苏)2002-0018]心、肝、脾、肺、肾组织, 精密称定, 置塑料试管中, 精密加入内标盐酸柔红霉素(流动相为溶剂, 5 μg·mL⁻¹)60 μL, 再加入 1.44 mL 流动相后高速分散匀浆, 4 °C 下 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液 20 μL 注入高效液相色谱仪中, 按 2.1 项下色谱条件分析。

2.4 方法的专属性研究

分别取 ICR 小鼠空白组织, 精密称定, 按“2.3”项下制备空白组织匀浆样品, 取上清液 20 μL, 注入液相色谱仪, 考察空白组织对药物含量测定的影

响, 结果见图 1。实验结果显示, 阿霉素及内标柔红霉素的平均出峰时间分别为 4.64 min 和 10.48 min, 分离度及峰形均良好。

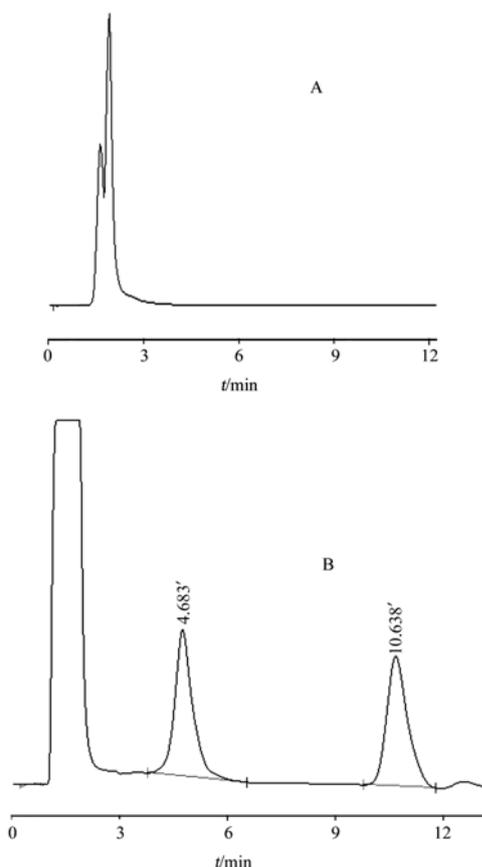


图 1 阿霉素($t_R=4.64$ min)与盐酸柔红霉素($t_R=10.48$ min)的 HPLC 色谱图

A-空白肝组织样品; B-给药后肝组织样品

Fig 1 HPLC chromatogram of doxorubicin and daunorubicin
A-blank liver tissue sample; B-liver tissue sample after administration

表 2 阿霉素组织样品日内和日间差异($n=5$)

Tab 2 Accuracy of tissue samples of doxorubicin ($n=5$)

样品	样品浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	日内差异		日间差异	
		测出量($\bar{x} \pm s$)	RSD/%	测出量($\bar{x} \pm s$)	RSD/%
心	0.60	0.617 \pm 0.015	2.4	0.622 \pm 0.032	5.1
	3.00	3.051 \pm 0.132	4.3	3.151 \pm 0.166	5.3
	12.00	12.101 \pm 0.315	2.6	11.881 \pm 0.489	4.1
肝	0.60	0.601 \pm 0.022	3.7	0.619 \pm 0.010	1.6
	3.00	2.953 \pm 0.162	6.2	3.059 \pm 0.081	2.6
	12.00	11.812 \pm 0.375	3.1	12.034 \pm 0.758	6.3
脾	0.60	0.611 \pm 0.030	4.9	0.609 \pm 0.026	4.3
	3.00	2.988 \pm 0.162	5.4	3.101 \pm 0.155	5.0
	12.00	11.068 \pm 0.467	3.9	12.181 \pm 0.554	4.5
肺	0.60	0.614 \pm 0.016	2.6	0.612 \pm 0.032	5.2
	3.00	3.117 \pm 0.115	3.7	3.121 \pm 0.180	5.8
	12.00	12.124 \pm 0.375	3.1	11.898 \pm 0.572	4.8
肾	0.60	0.607 \pm 0.019	3.2	0.609 \pm 0.027	4.4
	3.00	3.151 \pm 0.166	5.3	3.154 \pm 0.162	5.1
	12.00	12.091 \pm 0.432	3.6	11.965 \pm 0.502	4.2

2.5 标准曲线的制备

分别取 ICR 小鼠心、肝、脾、肺、肾空白组织各 0.1 g, 精密称定, 置塑料试管中, 精密加入不同量的阿霉素及等量盐酸柔红霉素溶液为内标, 使组织中阿霉素浓度分别为 0.6, 1.2, 3.0, 6.0, 12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。按“2.3”项下的方法操作, 记录色谱峰。以阿霉素峰面积与盐酸柔红霉素峰面积的比值为纵坐标, 阿霉素在组织中的浓度为横坐标, 进行线性回归, 所得阿霉素在各组织中的回归方程如表 1 所示, 结果表明阿霉素在 0.6~12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 内线性关系均良好。

表 1 DOX 在各组织中的线性回归结果

Tab 1 Linearity results of DOX concentration in tissues

组织	浓度范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	回归方程	r
心	0.6~12.0	$Y=0.1125X+0.0225$	0.9987
肝	0.6~12.0	$Y=0.1387X+0.0145$	0.9990
脾	0.6~12.0	$Y=0.0604X+0.0097$	0.9994
肺	0.6~12.0	$Y=0.1140X-0.0120$	0.9994
肾	0.6~12.0	$Y=0.1170X-0.0360$	0.9995

2.6 精密度试验

分别取 ICR 小鼠心、肝、脾、肺、肾空白组织各 0.1 g, 精密称定, 置塑料试管中, 精密加入一定量的阿霉素及等量内标, 配制浓度为 12.0, 3.0, 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的组织样品, 按“2.3”项下方法操作, 平行测定 5 次, 同日测定并连续测定 5 d, 计算日内及日间精密度, 结果见表 2。实验结果表明, 3 种浓度的阿霉素组织样品日内 RSD 和日间 RSD 均小于 10%, 能够满足生物样品测定的要求。

2.7 回收率试验

2.7.1 提取回收率试验 精密吸取不同浓度的 DOX 溶液, 配制高($12.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、中($3.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、低($0.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) 3 种不同浓度的 DOX 溶液, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样, 记录峰面积 A_1 ; 另取 ICR 小鼠心、肝、脾、肺、肾空白组织各 0.1 g , 精密称定, 置塑料试管中, 精密加入一定量的阿霉素及等量内标, 配制浓度为 $12.0, 3.0, 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的组织样品, 按“2.3”项下方法操作, 记录样品峰的峰面积 A_2 , 以 A_2/A_1 之比计算提取回收率。

2.7.2 方法回收率试验 分别取 ICR 小鼠心、肝、脾、肺、肾空白组织各 0.1 g , 精密称定, 置塑料试管中, 精密加入一定量的阿霉素及等量内标, 配制浓度为 $12.0, 3.0, 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的组织样品, 按“2.3”项下方法操作, 根据标准曲线计算各组织中阿霉素的浓度, 并与加入量比较, 得到方法回收率。高、中、低 3 种不同浓度的阿霉素组织样品的回收率结果见表 3。实验结果表明, 各组织样品方法回收率为 $97.2\% \sim 100.6\%$, 能够满足生物样品测定的要求。

表 3 阿霉素组织样品回收率 ($n=3$)

样品	样品浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	绝对回收率/%	RSD/%	方法回收率/%	RSD/%
心	0.6	93.1	4.6	97.2	3.9
	3.0	61.3	3.5	97.9	4.7
	12.0	66.7	4.6	98.4	3.1
肝	0.6	70.6	4.2	100.6	3.4
	3.0	72.4	6.8	97.7	4.6
	12.0	73.2	4.8	100.4	2.8
脾	0.6	28.5	6.4	99.5	3.3
	3.0	22.4	5.5	99.1	3.5
	12.0	16.1	4.1	99.3	2.7
肺	0.6	58.8	5.2	100.1	4.3
	3.0	44.7	4.9	100.4	2.9
	12.0	50.7	4.3	99.6	3.1
肾	0.6	39.2	3.7	98.8	3.7
	3.0	48.8	5.1	99.7	3.4
	12.0	54.6	6.3	97.8	2.8

2.8 检测限

取空白组织 0.1 g , 精密称定, 加入不同浓度的 DOX 溶液, 配制不同浓度的组织样品液, 按“2.3”项下方法操作, 测得各浓度样品的峰高与噪音(基线峰高), 取信噪比为 3 对最低检测限进行测定。实验结果测得阿霉素最低组织检测限量为 $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.9 ICR 小鼠组织中药物浓度测定

将 42 只 ICR 小鼠随机平均分成 6 组, 尾静脉注射 Tf-SL-DOX, 剂量为 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 分别于给药后

1, 3, 5, 12, 24, 48, 96 h 时间点, 摘眼球取血后, 颈椎脱臼处死, 取小鼠心、肝、脾、肺、肾组织, 生理盐水洗净, 吸湿后称重, 按“2.3”项下方法操作, 测定阿霉素在各组织中的浓度, 结果见图 2。

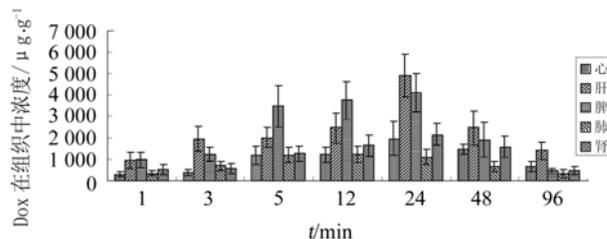


图 2 尾静脉注射 Tf-SL-DOX 后不同组织中的药物浓度

Fig 2 Drug levels in various tissues after iv injection of Tf-SL-DOX into mice

3 讨论

阿霉素在 $\text{pH } 3.0 \sim 6.0$ 介质中比较稳定, 为保证阿霉素在色谱柱中的稳定性, 流动相须加醋酸调节 pH 值。如醋酸浓度过低, 阿霉素经过色谱柱时易分解, 而醋酸浓度过高, 则阿霉素峰形变宽。本试验通过摸索, 选用冰醋酸调节 pH 至 3.5, 在此条件下, 阿霉素较为稳定且峰形良好。

笔者曾参照相关文献, 采用紫外检测器测定 ICR 小鼠组织中阿霉素浓度, 结果发现, 该方法所需组织样品量过大, 组织样品中干扰峰较多, 方法灵敏度较差, 经比较发现采用荧光检测器更适于测定阿霉素脂质体在小鼠组织内的含量。

REFERENCES

- [1] XIONG X B, HUANG Y, LU W L, et al. Enhanced intracellular delivery and improved antitumor efficacy of doxorubicin by sterically stabilized liposomes modified with a synthetic RGD mimetic [J]. *J Controlled Release*, 2005, 107(2): 262-275.
- [2] LIANG Y J, WU X P, SHI Zhi, et al. Determining doxorubicin concentration in nude mice xenograft by fluorescence spectrometry [J]. *Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志)*, 2005, 21(4): 296-298.
- [3] ARNOLD R D, SLACK J E, STRAUBINGER R M. Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2004, 808(2): 141-152.
- [4] CEDRON L A, SAYALERO M L, LANAO J M. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 721(2): 271-278.
- [5] GALLO J M, HUNG C T, GUPTA P K, et al. Evaluation of drug delivery following the administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat [J]. *J Pharm Sci*, 1989, 78(3): 190-193.

收稿日期: 2008-09-26