

两种测定盐酸伊立替康脂质体注射液中蔗糖八硫酸酯定量法的比较

王慧嘉¹, 王远见^{1,2}, 梁晨², 蔡倩³, 徐洪胜⁴, 李清^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 玻思韬控释药业有限公司, 广东 广州 510530;
3. 辽源市食品药品监督管理局, 吉林 辽源 136200; 4. 浙江莎普爱思药业股份有限公司, 浙江 嘉兴 314200)

摘要: 采用高效液相色谱-示差折光检测器 (HPLC-RID) 和高压离子色谱-电导检测器 (HPIC-CD) 对盐酸伊立替康脂质体注射液中蔗糖八硫酸酯进行含量测定并比较, 为脂质体制剂提供科学有效的分析方法。HPLC-RID法: 采用 Kromasil 100-5-NH₂ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.8 mol·L⁻¹ 硫酸铵溶液 (pH 3.5)-乙腈 (83:17) 为流动相, 柱温 30 °C, 检测器温度 30 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。HPIC-CD法: 采用 Dionex InPac™ AS11-HC 阴离子交换柱 (250 mm×4 mm, 9 μm), 流速 1.5 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测器温度 35 °C, 淋洗液 30 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液。结果表明 HPLC-RID 法和 HPIC-CD 法的专属性、检测限、定量限、线性、精密度、准确度、稳定性以及耐用性验证均符合要求。两种方法均可准确测定盐酸伊立替康脂质体注射液中蔗糖八硫酸酯的含量, 经过独立样本 *T*-检验表明两种方法测得结果无显著性差异。与 HPLC-RID 法相比, HPIC-CD 法具有专属性强、灵敏度高、分析速度快、操作简便、成本低、环保等优点。

关键词: 高压离子色谱-电导检测法; 高效液相色谱-示差折光检测法; 蔗糖八硫酸酯; 盐酸伊立替康; 脂质体
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)03-0501-05

Comparison of two methods for the determination of sucrose octasulfate concentration in irinotecan hydrochloride liposomes

WANG Hui-jia¹, WANG Yuan-jian^{1,2}, LIANG Chen², CAI Qian³, XU Hong-sheng⁴, LI Qing^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Bostal Drug Delivery Co., Ltd., Guangzhou 510530, China; 3. Liaoyuan Food and Drug Administration, Liaoyuan 136200, China; 4. Zhejiang Shapuaisi Pharmaceutical Co., Ltd., Jiaxing 314200, China)

Abstract: HPLC-RID and HPIC-CD methods were established for the determination of sucrose octasulfate content in irinotecan hydrochloride liposomes for injection. HPLC-RID: This method was performed on a Kromasil 100-5-NH₂ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of 0.8 mol·L⁻¹ ammonium sulfate buffer (pH 3.5)-acetonitrile (83:17). The flow rate, column temperature and detector temperature were maintained at 1 mL·min⁻¹, 30 °C and 30 °C respectively. HPIC-CD: This method was performed on an anion exchange column Dionex InPac™ AS11-HC (250 mm×4 mm, 9 μm) with an eluent of 30 mmol·L⁻¹ sodium hydroxide solution. The flow rate was 1.5 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C and the detector temperature was 35 °C. The HPLC-RID method and HPIC-CD method were validated with respects to specificity, limit of detection, limit of quantitation, linearity, precision, accuracy, stability and robustness and met the validation requirements. There were no significant differences between the HPIC-CD and HPLC-RID methods according to *T*-test analysis, both of which were applicable for the measurement of sucrose octasulfate concentration in irinotecan hydrochloride liposomes for injection. However, the HPLC-CD was better at the following aspects: higher detection sensitivity, simpler sample pretreatment, lower time and money spent, better environmental protection.

收稿日期: 2019-08-31; 修回日期: 2019-11-30.

*通讯作者 Tel: 86-24-43520589, E-mail: lqyxm@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0638

Key words: HPIC-CD; HPLC-RID; sucrose octasulfate; irinotecan hydrochloride; liposome

蔗糖八硫酸酯是以 $C_{12}H_{14}O_{35}S_8-R_8$ 为结构的一组化合物(图1),其中R可代表K、Na、Al等元素,该化合物早期应用在治疗溃疡为主的药物中。2015年随着盐酸伊立替康脂质体在美国上市^[1],蔗糖八硫酸酯作为新型辅料引起药界同仁的关注。本文采用蔗糖八硫酸酯三乙胺(triethylammonium sucrose octasulfate, TEA₈SOS)梯度法制备盐酸伊立替康脂质体注射液,可提高盐酸伊立替康疗效和缓释作用,降低不良反应,增加靶向性和生物利用度。在仿制药物的开发中,蔗糖八硫酸酯的定量测定作为关键参数用于工艺和生产中的质量控制。例如,蔗糖八硫酸酯三乙胺形成的pH梯度影响脂质体的包封率^[2]。此外,采用蔗糖八硫酸酯作为新型非活性辅料时,应关注其带来的不良影响和体内活性,以及类似生长因子的生理活性^[3],鉴于蔗糖八硫酸酯的含量测定对脂质体注射液的制备和评价起到关键作用,因此有必要对其进行分析和质量控制。

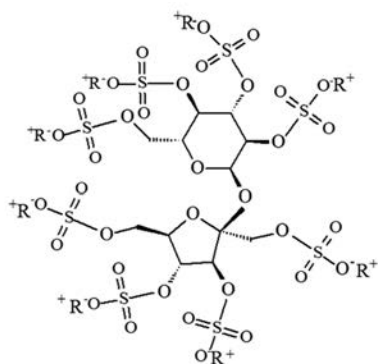


Figure 1 The structure of sucrose octasulfate

国内外文献对蔗糖八硫酸酯的研究报道较少,根据美国药典^[4]、欧洲药典^[5]、日本药典^[6]收载以及Wang^[7]、Sun等^[8]相关文献报道,均采用HPLC-RID法测定蔗糖铝片中蔗糖八硫酸酯的含量,重现上述方法后并不理想,因此优化前处理方法和色谱条件。优化后HPLC-RID法前处理较为复杂且耗时长,为寻找简单快速的分析方法应用于脂质体制剂,本文同时建立离子色谱的分析方法。离子色谱是分析离子的一种液相色谱方法,以离子交换机制为主^[9]。经发展,高压离子色谱可降低工作量,提高分析效率^[10],应用的范围从分析水中常见阴阳离子与有机酸,到分析极性有机化合物以及生物样品中的糖(单糖、寡糖)、氨基酸、肽、蛋白质等更加广阔的领域^[11]。根据蔗糖八硫酸酯以离子形式存在于脂质体中等特点^[12],同时采用HPIC-CD法

对其进行定量测定。结果表明两种方法均可用于测定盐酸伊立替康脂质体中蔗糖八硫酸酯的含量,但HPIC-CD法灵敏度更高,操作更为简便。

材料与amp;方法

仪器 岛津LC-20A高效液相色谱仪(配备LC-20AD二元泵、SIL-20AD自动进样器、CBM-20A控制器、CTO-20AC柱温箱、RID-20A视差折光检测器及LabSolutions工作站Version 6.72 SP2), Thermo Dionex ICS-5000+SP离子色谱仪[配有带抑制器(AERS, 4 mm)的电导检测器, Chromeleon 7.2.8工作站], FE28 pH计(瑞士Mettler Toledo公司), CPA225D电子天平(德国Sartorius公司), IQ7000超纯水系统(美国Millipore公司), XTM0061多管涡旋混匀仪、MD200-2氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

试剂与样品 蔗糖八硫酸酯钠对照品(批号: 20190320, 含量以99.80%计)购自上海赢瑞生物医药科技有限公司, 盐酸伊立替康脂质体注射液样品(批号: No.01、No.02、No.03)由玻思韬控释药业有限公司自制, 乙腈(色谱纯)购自上海星可高纯溶剂有限公司, 硫酸铵(分析纯)、Triton X-100(分析纯)均购自MACKLIN公司, 磷酸(分析纯)购自天津市大茂化学试剂厂, 氢氧化钠溶液(质量分数为50%)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 纯化水由玻思韬控释药业有限公司自制。

色谱条件

HPLC-RID法分析条件 采用Kromasil 100-5-NH₂柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以0.8 mol·L⁻¹硫酸铵溶液(用磷酸调节pH值至3.5)-乙腈(83:17)为流动相, 柱温30℃, 检测器为示差折光检测器, 温度30℃, 流速1.0 mL·min⁻¹, 进样量100 μL。

HPIC-CD法分析条件 采用Dionex InPac™ AS11-HC阴离子交换柱(250 mm×4 mm, 9 μm), 淋洗液30 mmol·L⁻¹氢氧化钠溶液, 柱温30℃, 检测器为电导检测器(抑制器AERS, 4 mm), 温度35℃, 流速1.5 mL·min⁻¹, 进样量25 μL。

对照溶液的制备

对照品溶液 I 的制备 精密称取蔗糖八硫酸酯钠对照品100 mg, 置10 mL量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照储备液 I。精密量取对照品储备液 I 适量, 流动相稀释摇匀后, 精密量取上述溶液1 mL加95%甲醇溶液5 mL, 经氮气流下挥干溶剂, 加流动

相溶解并稀释制成每 1 mL 中含 0.26 mg 的蔗糖八硫酸酯钠溶液, 涡旋 5 min, 即得, 作为 HPLC-RID 法对照溶液。

对照品溶液 II 的制备 精密称取蔗糖八硫酸酯钠对照品 100 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加超纯水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照储备液 II。精密量取对照品储备液 II 适量, 加超纯水溶解并稀释制成每 1 mL 中含 0.26 mg 的蔗糖八硫酸酯钠溶液, 摇匀即得, 作为 HPIC-CD 法对照溶液。

供试品溶液的制备

供试品溶液 I 的制备 精密量取盐酸伊立替康脂质体注射液 0.1 mL, 加 95% 甲醇溶液 5 mL 破乳, 振摇, 经氮气流下挥干溶剂, 加流动相 1 mL 复溶, 涡旋 5 min, 滤过, 取续滤液即得, 作为 HPLC-RID 法供试品溶液。

供试品溶液 II 的制备 精密量取盐酸伊立替康脂质体注射液 0.1 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加 1% Triton X-100 溶液破乳, 并稀释至刻度, 振摇, 滤过, 取续滤液即得, 作为 HPIC-CD 法供试品溶液。

分析方法

专属性 分别取空白溶剂、对照品溶液和供试品溶液, 按“HPLC-RID 法分析条件”和“HPIC-CD 法分析条件”考察专属性, 记录色谱图。

仪器精密度 精密量取对照溶液 I 和 II, 按“HPLC-RID 法分析条件”和“HPIC-CD 法分析条件”连续进样 6 次, 记录色谱图。

检测限和定量限 取对照储备液 I 和 II 适量逐级稀释, 以信噪比 10:1 作为定量限、3:1 作为检测限进行

测定。

线性与范围 取对照储备液 I 和 II, 分别制备线性溶液, 稀释浓度范围为 0.121 5、0.151 8、0.455 5、0.759 2、1.215 mg·mL⁻¹ 和 0.003 807、0.038 07、0.053 30、0.076 14、0.152 3 mg·mL⁻¹。按“HPLC-RID 法分析条件”和“HPIC-CD 法分析条件”进样分析。

回收率 取已知含量的盐酸伊立替康脂质体注射液 9 份, 每份精密量取 0.1 mL, 分别按已知含量的 80%、100% 和 120% 3 个水平加入对照品, 按“供试品溶液的制备”项下制备低、中、高 3 种不同浓度的供试品溶液, 每一种浓度平行制备 3 份, 按“HPLC-RID 法分析条件”和“HPIC-CD 法分析条件”进样测定, 计算回收率。

重复性 取同一批盐酸伊立替康脂质体注射液, 分别平行配制 6 份供试品溶液 I 和 II, 按“HPLC-RID 法分析条件”和“HPIC-CD 法分析条件”进样分析。

稳定性 精密量取同一批盐酸伊立替康脂质体注射液 0.1 mL, 制备供试品溶液 I 和 II, 分别按“HPLC-RID 法分析条件”和“HPIC-CD 法分析条件”在 0、4、8、12 和 24 h 进样分析。

耐用性 分别考察流速变化 ±0.2 mL·min⁻¹, 柱温变化 ±5 °C, 流动相比比例变化 ±5% 对蔗糖八硫酸酯含量测定的影响。

结果

1 方法学考察

1.1 专属性 通过空白溶剂、对照品溶液和供试品溶液的色谱图 (图 2) 考察专属性, 实验结果表明两种方

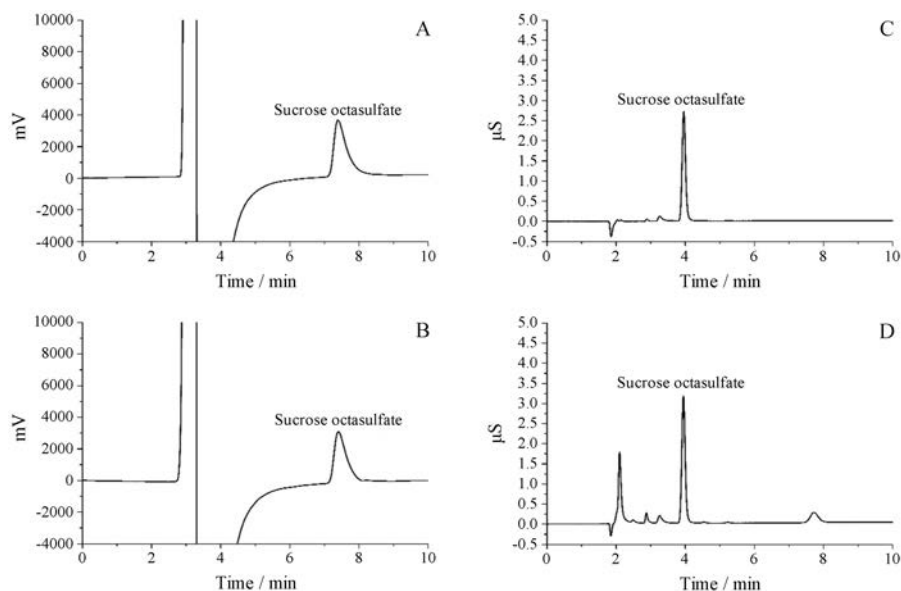


Figure 2 The HPLC-RID chromatographs of standard solution I (A), sample solution I (B) and the HPIC-CD chromatographs of standard solution II (C), sample solution II (D)

Table 1 Sucrose octasulfate in irinotecan hydrochloride liposome injection about linear, LOD and LOQ by two methods

Testing method	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Linear range/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	Regressive equation	<i>r</i>
HPLC-RID	12.15	4.050	0.121 5–1.215	$y = 3.000 \times 10^5 x - 1.095 \times 10^4$	0.999 8
HPIC-CD	0.380 7	0.126 9	0.003 807–0.152 3	$y = 7.615x - 0.044 41$	0.999 1

法的溶剂和样品基质均对蔗糖八硫酸酯的测定无干扰,专属性良好。

1.2 仪器精密度 HPLC-RID法和HPIC-CD法测得蔗糖八硫酸酯含量的RSD ($n = 6$)分别为0.70%和0.69%,结果表明仪器精密度良好。

1.3 检测限和定量限 结果表明两种方法灵敏度良好,HPIC-CD法灵敏度高于HPLC-RID法,结果见表1。

1.4 线性与范围 以质量浓度 x ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,以峰面积 y 为纵坐标绘制标准曲线,回归方程及相关系数见表1。结果表明两种方法在各自线性范围内线性关系良好。

1.5 重复性 HPLC-RID法和HPIC-CD法测得蔗糖八硫酸酯的含量分别为 2.653 ± 0.013 、 2.649 ± 0.032 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,RSD ($n = 6$)均小于5.0%,结果表明方法重复性良好。

1.6 准确度 HPLC-RID法和HPIC-CD法测得蔗糖八硫酸酯的平均回收率 ($n = 9$)分别为 $99.2 \pm 3.3\%$ 、 $99.0 \pm 2.7\%$,RSD ($n = 9$)均小于5.0%,方法准确度良好。

1.7 稳定性 HPLC-RID法和HPIC-CD法测得蔗糖八硫酸酯含量的RSD分别为1.67%、2.01%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

1.8 耐用性 HPLC-RID法和HPIC-CD法在不同条件下测得蔗糖八硫酸酯含量的RSD ($n = 6$)分别为1.56%和1.94%,结果表明两种方法耐用性良好。

2 统计学分析

从同一批盐酸伊立替康脂质体注射液中随机取样,分别按照上述两种方法各制备8份供试品溶液并测定其含量。利用SPSS Statistical 17.0版软件对两种方法的测定结果进行统计学分析。Shapiro-Wilk检验两组数据的 P 值分别为0.137和0.421,均大于0.05,表明数据呈正态分布。两组数据相互独立,因此采用独立样本 t 检验对其进行分析,置信区间设定为95%。经 F 检验, P 值为0.225大于0.05,由此可知两总体方差无显著性差异。 t 检验得到的 t 统计量为-1.27,对应的双尾概率 P 值为0.225,大于显著性水平($\alpha = 0.05$),表明两组数据差异无统计学意义。判断两种方法测定盐酸伊立替康脂质体注射液中蔗糖八硫酸酯的含量无显著性差异,统计分析结果见表2。

3 样品含量测定

取3批盐酸伊立替康脂质体注射液分别制备供试品溶液并测定其含量。HPLC-RID法和HPIC-CD法测

Table 2 Results of test of normality and statistical analysis ($n = 8$)

Method	Shapiro-Wilk		Homogeneity test of variance		t test	
	Statistics	P value	F	P value	t	P value
HPLC-RID	0.866	0.137	1.613	0.225	-1.27	0.225
HPIC-CD	0.919	0.421				

得3批盐酸伊立替康脂质体中蔗糖八硫酸酯的含量分别为 2.630 ± 0.029 、 2.718 ± 0.043 、 2.593 ± 0.054 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 2.675 ± 0.069 、 2.768 ± 0.088 、 2.538 ± 0.074 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。两种方法同批测得值相互比较,其差异均小于5.0%。

讨论

HPLC-RID法: USP 42版以 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸铵为流动相,使用氨基柱测定蔗糖八硫酸酯的含量,要求蔗糖八硫酸酯拖尾因子在4以内,理论塔板数大于400。但重现上述方法后并不理想,原因如下:脂质体中蔗糖八硫酸酯的检测先经过破乳剂破乳,破乳剂使蔗糖八硫酸酯从脂质体内部释放出来的同时造成其浓度被稀释,较难达到示差折光检测器的定量限,且破乳剂的峰展宽严重影响蔗糖八硫酸酯出峰。针对上述问题,本文优化了相关前处理方法与分析条件,最终采用高浓度有机试剂破乳,氮气流下将溶剂挥干,少量流动相复溶,过滤得到供试品溶液,此过程既减少蔗糖八硫酸酯稀释倍数又避免脂质体基质的干扰。优化色谱条件后蔗糖八硫酸酯的拖尾因子在1.00~1.50之间,理论塔板数大于3 000。

HPIC-CD法:为开发简单快速的分析方法,根据蔗糖八硫酸酯的结构与性质,建立HPIC-CD法。现有文献报道未见采用HPIC-CD法测定蔗糖八硫酸酯含量,HPIC-CD法提供了与HPLC-RID法不同的前处理方式和检测方式,根据离子色谱的检测原理避免了样品基质干扰,可直接进样分析,极大缩短了前处理时间、操作简便,且分析过程未使用有机试剂,环保。通过对破乳剂、淋洗液种类和浓度以及色谱条件的考察,最终选取1% Triton X-100为破乳剂,30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液为淋洗液等度洗脱。优化色谱条件,蔗糖八硫酸酯的保留时间约为4 min,拖尾因子在0.95~1.10之间,理论塔板数大于5 000。

作者通过优化前处理和色谱条件重现HPLC-RID法,同时建立了HPIC-CD法测定盐酸伊立替康脂质体

中蔗糖八硫酸酯含量。两种方法均采用外标法以峰面积计算含量, 利用SPSS软件对两种方法测得的结果进行统计学分析, 结果表明两种检测方法没有显著性差异。与HPLC-RID法相比, HPIC-CD法优势在于极大缩短了前处理时间, 提高分析速度、避免脂质体基质干扰、灵敏度高、成本低、环保。采用HPIC-CD法不仅为蔗糖八硫酸酯的含量测定提供新的思路, 也为盐酸伊立替康脂质体注射液质量标准和质量控制的完善提供依据。

References

- [1] Wu G, Zhou YJ, Wei YL, et al. Comparative study on the release behaviors of irinotecan loaded liposomes with two active loading methods [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2018, 38: 1686-1689.
- [2] Daryl CD, Charles ON, Guo ZX, et al. Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 3271-3277.
- [3] Yeh BK, Eliseenkova AV, Plotnikov AN, et al. Structural basis for activation of fibroblast growth factor signaling by sucrose octasulfate [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 7184-7192.
- [4] The United States Pharmacopeial Commission. The United States Pharmacopeia 42-National Formulary 37 [S]. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019: 4089.
- [5] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 9.4 [S]. Strasbourg: European Directorate for the Quality Control of Medicines, 2018: 5447.
- [6] Japanese Pharmacopoeia Commission. Japanese Pharmacopoeia 17 [S]. Tokyo: The Minister of Health, Labour and Welfare, 2016: 1609-1610.
- [7] Wang F. Content determination of sucrose octasulfate in sucralfate tables by HPLC [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2012, 26: 623-625.
- [8] Sun H, Fu CY, Jiang LG, et al. Determination of sucralfate by HPLC [J]. *Drug Stand China* (中国药品标准), 2011, 12: 417-418.
- [9] He XQ. The principle of ion chromatography and its application in water quality analysis [J]. *Life Sci Instrument* (生命科学仪器), 2010, 8: 62-65.
- [10] Li WH, Gao LH, Li RY, et al. Rapid determination of three disinfection by-products in drinking water by high pressure ion chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2019, 47: 640-641.
- [11] Xie T, Wu KY. Principle of ion chromatography, composition and application [J]. *Sci Technol Inf* (科技信息), 2010, 23: 943.
- [12] Huang WW, Li Z, Huang XF, et al. Preparation of vinorelbine bitartrate liposomes by triethylammonium sucrose octasulfate gradient method [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2010, 19: 1903-1906.