卡巴他赛脂质体包封率的测定

柳宇红[1]，姜 宇[2]，郝贵周[2*]，刘善奎[1]
（1. 济南大学生物科学与技术学院，山东济南 250022；2. 山东新时代药业有限公司科研部，山东临沂 273400）

摘要：采用乙醇注入法制备卡巴他赛（**1**）脂质体，并建立离心 - 微孔滤膜过滤法分离脂质体和游离结晶药物，采用 HPLC 法测定脂质体中 **1** 的包封率。结果显示，在建立的色谱条件下，**1** 的专属性良好，且在 1 ～ 20 μg/ml 内线性关系良好；日内和日间精密度也均符合要求，重复性好。样品测定结果显示，3 批 **1** 脂质体的平均包封率为 99.24%，RSD 为 1.00%，可用于准确测定 **1** 脂质体的包封率。

关键词：卡巴他赛；脂质体；包封率；微孔滤膜过滤法
中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)03-0373-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.03.014

Determination of Encapsulation Efficiency of Cabazitaxel Liposomes

LIU Yuhong[1], JIANG Yu[2], HAO Guizhou[2*], LIU Shankui[1]
(*1. School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022;*
2. Scientific Research Dept. of Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400)

ABSTRACT: Cabazitaxel (**1**) liposomes were prepared by ethanol injection method, and a centrifugal-microporous membrane filtration method was established to separate liposomes and free crystalline drug, and an HPLC method was used to determine the encapsulation efficiency of **1** in liposomes. The results showed that under the established chromatographic conditions, the specificity of **1** was good, and it was linear for **1** in the range of 1 – 20 μg/ml. The intra- and inter-day precisions both met the requirements, and the repeatability was good. The measuring results showed that the average encapsulation efficiency of **1** liposomes in three batches was 99.24%, with the RSD of 1.00%, which could be used to accurately determine the encapsulation efficiency of **1** liposomes.

Key Words: cabazitaxel; liposome; encapsulation efficiency; microporous membrane filtration method

卡巴他赛（cabazitaxel，**1**）是第二代紫杉烷类药物，抗肿瘤谱广[1]，具有较低的 *P*- 糖蛋白亲和力，能够治疗耐药肿瘤[2]。脂质体是一种新型、可用于装载疏水性药物的输送系统[3—4]。将 **1** 包封于脂质体内既可改善其肿瘤靶向性，又能有效减少对正常组织的毒性，提高用药安全性和治疗效果[5]。

包封率是评价脂质体质量的重要指标之一，是脂质体制剂实现高效、低毒的关键。目前关于脂质体包封率的测定方法可分为 2 类[6—7]：①常规方法，即在包封率测定前需进行游离药物与脂质体的分离；②新型方法，不需要进行游离药物与脂质体的分离，直接分析。常规方法的主要分离手段包括色谱法（也称凝胶柱法或分子排阻色谱）、（反）透析法、离心法、超滤离心法等[7—12]。但是，由于 **1** 极难溶于水，其结晶颗粒为微米级[13—14]，而本研究制得的脂质体平均粒径为 100 nm，不适于采用凝胶柱色谱法分离[14—15]；若采用透析或反透析法分离，则因游离 **1** 的尺寸远大于脂质体而不易透过透

收稿日期：2021-05-19
基金项目：山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY011116)
作者简介：柳宇红(1995—)，女，硕士研究生，专业方向：纳米脂质体。
通信作者：郝贵周(1977—)，男，高级工程师，从事药物新剂型研究与开发。
E-mail：haoguizhouhgz@163.com

析袋扩散到透析液中，分离效果差。离心法则是根据脂质体与游离药物的比重不同，所受到的离心力不同，导致沉降速度不同，从而达到分离的目的。低速离心法无法很好地分离纳米级脂质体与游离药物；而高速离心法转速较高、耗时较长，不仅对于离心机要求较高，对样品耐受力的要求也较高。超滤离心法则较适合分离载水溶性药物的脂质体与游离药物。因此，上述方法均无法很好地分离本研究中游离难溶性药物与脂质体混悬液的分离。

结合常规方法中的超滤离心法，建立了离心 - 微孔滤膜过滤法，即首先通过离心 - 微孔滤膜过滤法将游离药物用适当孔径的微孔滤膜截留，而脂质体混悬液则在离心力的作用下被离心至滤液接收管中，随后对滤液接收管中接收到的滤液进行处理以测定除去游离药物后脂质体中包封药物的量，从而计算脂质体的包封率。高效液相色谱（HPLC）法可在有水解产物存在的条件下进行分离检测，灵敏度高、准确性好[16]。因此，本研究最终使用离心 - 微孔滤膜过滤法并结合 HPLC 法检测 **1** 脂质体的包封率（所用离心管为图 1 所示的微孔滤膜离心过滤管），以期为 **1** 制剂的优化与评价提供参考。

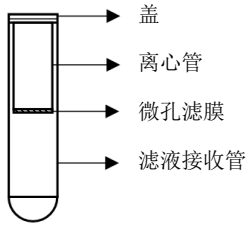


图 1　微孔滤膜离心过滤管

Fig.1　Microporous Membrane Centrifugal Filter Tube

1　仪器与试药

UltiMate3000 型高效液相色谱仪（美国 Thermo Fisher 公司）；Zetasizer Nano ZS 型 ζ 电位与纳米粒径分析仪（英国 Malvern 公司）；AE-100 型脂质体滤膜挤出器（德国 ATS 仪器设备有限公司）；200 nm 聚碳酸酯膜（美国 Whatman 公司）；0.22 μm 微孔滤膜离心过滤管（德国 Merck 公司）；0.22 μm 针头过滤器（天津市科亿隆试验设备有限公司）。

1（北京福瑞康泽医药科技有限公司，含量 99.87%，批号 201111）；大豆磷脂（德国 Lipoid 公司，含量 99%，批号 579010-119099-08）；胆固醇（日本精化株式会社，含量 >98%，批号 B80859）；蔗糖（德国 Merck 公司，含量 99%，批号 K51534792）；Tween-80 四川金山制药有限公司，药用级，批号 20180202）；生理盐水（山东科伦药业有限公司，批号 D20060503A）；乙醇、乙腈和甲醇均为色谱纯；水为注射用水（山东新时代药业有限公司）。

2　方法与结果

2.1　1 脂质体的制备

将处方量的 **1** 和原辅料溶解于无水乙醇中，配得油相；将适量蔗糖溶解于纯水中配得蔗糖溶液作为水相。随后，通过磁力搅拌将油相和水相混合，制得 **1** 脂质体初乳。然后除去初乳中的乙醇并将其浓缩，得到一定浓度的 **1** 脂质体初混悬液。采用挤出技术进行整粒，得到 **1** 脂质体混悬液。用同样的方法，制备不加 **1** 的空白脂质体。用粒径分析仪分别检测 2 种脂质体的粒径，结果显示其粒径均约 100 nm，多分散性指数（polydispersity index，PDI）约为 0.1，粒径均一。

2.2　HPLC 检测方法的建立

2.2.1　破乳剂的选择

通过考察 **1** 在常用有机溶剂中的溶解度，发现 **1** 在乙醇、甲醇、乙腈中的溶解性较好，因此，选择这 3 种有机溶剂作为备选破乳剂。具体操作如下：用移液管精密移取“**2.1**”项下系列体积的 **1** 脂质体混悬液，依次向其中加入适量甲醇、乙醇、乙腈，及其水溶液，超声破乳并定容（脂质体：破乳剂 =1 ： 5、1 ： 10、1 ： 20），观察各破乳剂的破乳效果。

试验结果显示，当破乳剂为甲醇、脂质体：破乳剂 =1 ： 10 或 1 ： 20、超声 2 min 左右时，量瓶中溶液呈现为澄清透明；而使用其他破乳剂和破乳比例，超声 10 min 以上仍可见不同程度的浑浊。因此，最终选用甲醇作为破乳剂，且脂质体：破乳剂 =1 ： 10 或 1 ： 20。

2.2.2　色谱条件

色谱柱 Ultimate® XB-C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 乙腈：纯水（80 ： 20），等度洗脱；柱温（30±5）℃；检测波长 230 nm；流速 1 ml/min；进样量 20 μl。

2.2.3 溶液配制

1 对照品贮备液：精密称量适量 **1** 置量瓶中，用甲醇超声溶解并定容，制得质量浓度为 800 μg/ml 的 **1** 对照品贮备液。

空白脂质体待测样品：取“**2.1**”项下制备好的空白脂质体 1 ml，置 10 ml 量瓶中，加入甲醇超声破乳并定容，即得空白脂质体待测样品。

1 的 Tween-80 溶液：取乙醇 1.3 ml 置 10 ml 量瓶中，用纯水稀释并定容，即得质量分数为 13% 的乙醇溶液；精密称量 **1** 30 mg 置 30 ml 的西林瓶中，向其中加入 Tween-80 0.78 ml，超声，使 **1** 充分分散于 Tween-80 中，得澄清透明的黏稠液体；向上述所得澄清透明的黏稠液体中加入 13% 乙醇溶液 2.2 ml，超声，使二者充分混匀，得到均一的透明液体；用生理盐水将所得均一的透明液体稀释至 20 ml 即得 **1** 的 Tween-80 溶液。

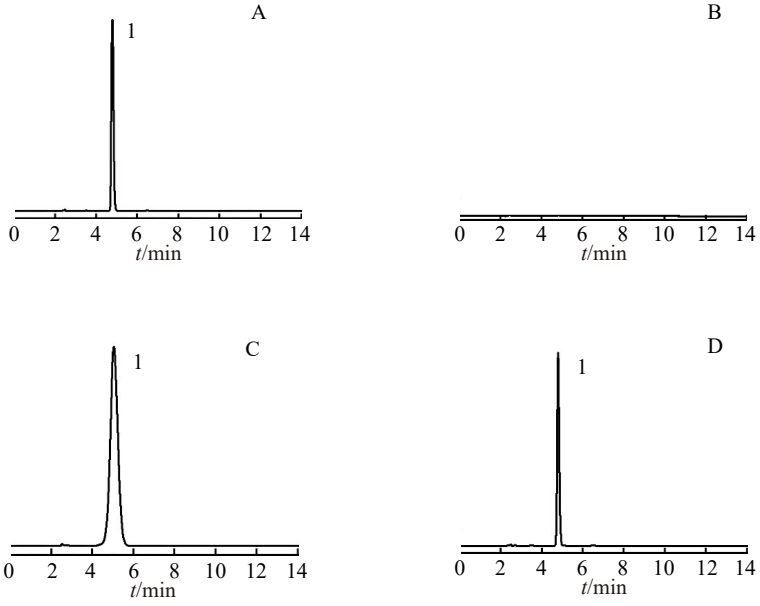
1 脂质体待测样品：取“**2.1**”项下制备好的 **1** 脂质体 1 ml 于 10 ml 量瓶中，加入甲醇超声破乳并定容，即得 **1** 脂质体待测样品。

2.2.4 专属性试验

取“**2.2.3**”项下 **1** 对照品贮备液 2.5 ml 置 10 ml 量瓶中，用甲醇稀释并定容，得质量浓度为 200 μg/ml 的溶液，将其过 0.22 μm 针头过滤器后取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，结果见图 2A。取“**2.2.3**”项下空白脂质体待测样品、**1** 的 Tween-80 溶液、**1** 脂质体待测样品各 3 ml，分别过 0.22 μm 针头过滤器后取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，结果见图 2B ～ 2D。可见在本色谱条件下，制剂辅料、破乳剂不影响 **1** 的峰形，**1** 脂质体中药物的出峰时间与 **1** 的 Tween-80 溶液及对照品出峰时间一致，且相同浓度下峰面积相近。

2.2.5 线性试验

依次精密吸取“**2.2.3**”项下 **1** 对照品贮备液 12.5、50、75、100、125、150、225、250 μl，分别置 8 个 10 ml 量瓶中，用甲醇分别稀释并定容，制得质量浓度为 1、4、6、8、10、12、18、20 μg/ml 的系列浓度线性试验溶液，分别过 0.22 μm 针头过滤器，取续滤液按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，



A：**1** 对照品贮备液，B：空白脂质体待测样品，C：**1** 的 Tween-80 溶液，D：**1** 脂质体待测样品

1－**1**

图 2 典型色谱图

Fig.2 Typical Chromatograms

并记录色谱图。以峰面积（*A*）为纵坐标、药物的质量浓度（*c*）为横坐标进行线性回归，得到标准曲线方程为 *A*=0.398 6*c*+0.147 8，R^2=0.999 7，说明 **1** 在 1 ～ 20 μg/ml 内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验

2.2.6.1 日内、日间精密度

精密吸取“**2.2.3**”项下 **1** 对照品贮备液 62.5、125、250 μl，分别置 3 个 10 ml 量瓶中，用甲醇定容，制得质量浓度依次为 5、10、20 μg/ml 的待测样品（分别代表低、中、高 3 种浓度）。将各浓度溶液过 0.22 μm 针头过滤器后取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，每天各测定 3 次，考察日内精密度；一周内选取 3 d 测定，考察日间精密度。结果显示，日内精密度试验中测得质量浓度的 RSD（*n*=3）分别为 1.11%、0.90%、1.06%；日间精密度试验中测得质量浓度的 RSD（*n*=3）分别为 1.36%、1.28%、1.15%。低、中、高浓度样品的日内和日间 RSD 均小于 2%，说明在此色谱条件下，精密度和重复性均良好。

2.2.6.2 方法精密度

取“**2.1**”项下制备的 3 批 **1** 脂质体混悬液进行试验，按“**2.2.3**”项下 **1** 脂质体待测样品的配制方法准备供试品，并分别编号为 1、2、3。将 3 个供试品用 0.22 μm 针头过滤器依次过滤后分别取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，3 个供试品各测定 6 次，记录色谱图并计算峰面积。结果显示，经计算，3 批供试品所得结果的 RSD（*n*=6）均小于 2%。

2.2.7 回收率试验

2.2.7.1 方法回收率

取“**2.1**”项下空白脂质体 1 ml，共 3 份，分别置 10 ml 量瓶中，依次精密吸取“**2.2.3**”项下 **1** 对照品贮备液 62.5、125、250 μl 于上述 3 个量瓶中，再分别用甲醇破乳并定容，制得 **1** 质量浓度依次为 5、10、20 μg/ml 的系列待测溶液。分别用 0.22 μm 针头过滤器过滤后取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图并计算峰面积，由标准曲线计算药物浓度，并计算回收率。结果显示，平均回收率（*n*=3）分别为 100.20%、100.25%、101.58%，RSD 分别为 0.87%、0.70%、0.79%，说明该方法符合含量测定要求。

2.2.7.2 游离药物回收率

依次精密吸取“**2.2.3**”项下 **1** 对照品贮备液 2、1、0.5 ml，分别置 3 个 10 ml 量瓶中，用甲醇定容，得质量浓度分别为 160、80、40 μg/ml 的高、中、低浓度的待测液。吸取 3 种不同浓度的待测液各 2 ml 于微孔滤膜离心过滤管，于室温离心（7 000×*g*）10 min，收集滤液。将离心过滤前后的溶液用甲醇稀释至一定浓度（5、10、20 μg/ml），再用 0.22 μm 针头过滤器过滤后取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图并计算峰面积，由标准曲线计算药物浓度，最终得到游离药物的平均回收率（*n*=3）为 99.34%，RSD 为 0.78%。

2.2.7.3 加样回收率

取“**2.2.7.2**”项下质量浓度依次为 160、80、40 μg/ml 的高、中、低浓度待测液各 5 ml，分别置 3 个 30 ml 西林瓶中，分别向西林瓶中加入“**2.1**”项下制得的空白脂质体溶液 8 ml，混匀备用。吸取 3 个西林瓶中的混合待测液各 4 ml 于微孔滤膜离心过滤管中，于室温离心（7 000×*g*）10 min，收集滤液。将离心过滤前后的溶液用甲醇破乳并定容，稀释至一定质量浓度（5、10、20 μg/ml），再用 0.22 μm 针头过滤器过滤后取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，记录色谱图并计算峰面积，由标准曲线计算药物浓度。结果显示，最终游离药物的平均回收率（*n*=3）为 99.67%，RSD 为 0.68%，说明离心 - 微孔滤膜分离法可用于 **1** 脂质体包封率测定之前游离药物与脂质体的分离。

2.3 离心 - 微孔滤膜过滤法的参数优化

采用正交设计法优化离心 - 微孔滤膜分离过程的参数。选择离心时间（*A*/min：5、10、15）、离心力（*B*：3 000×*g*、7 000×*g*、11 000×*g*）、离心温度（*C*/℃：4、25、30）3 个因素进行考察，以载药脂质体的包封率作为评价指标。结果显示，这 3 个因素的极差值排序为 *B*>*A*>*C*。当 *A* 为 10、15 min 或 *B* 为 7 000×*g*、11 000×*g* 时，包封率相差不大。因此，

离心 - 微孔滤膜过滤法的最优工艺确定为 $A_2B_2C_2$，即离心力为 7 000×g，离心时间为 10 min，离心温度为 25 ℃。

2.4 包封率的测定

取“**2.1**”项下制得的 **1** 脂质体混悬液（3 批）用于包封率的测定。按“**2.2.3**”项下配制 **1** 脂质体待测样品的方法准备过滤前的样品，然后将样品用 0.22 μm 针头过滤器过滤后取续滤液，按“**2.2.2**”项下色谱条件进样测定，得总浓度 c_0。另取适量 **1** 脂质体混悬液于微孔滤膜离心过滤管中，于 25 ℃条件下离心（7 000×g）10 min，除去游离的 **1**，收集滤液。将滤液按同样的方法破乳以准备待测样品，同样经 0.22 μm 针头过滤器过滤后取续滤液进样测定，得除去游离 **1** 后脂质体内包裹的 **1** 浓度 c_1。计算得 3 批 **1** 脂质体的平均包封率（n=3）为 99.24%，RSD 为 1.00%。

3 讨论

在流动相选择的过程中，本研究曾试用不同比例的甲醇：水和乙腈：水体系。最终试验结果显示，当以甲醇：水作为流动相时，干扰较严重，且出峰时间较长，而换用乙腈：水作为流动相时，出峰时间缩短，且分离效果较好，通过考察乙腈与水的不同比例，得出乙腈：水 =80 ： 20 时结果最理想，出峰时间在 5 min 左右，干扰最小。

本研究建立了离心 - 微孔滤膜过滤法测定 **1** 脂质体包封率，并通过绘制标准曲线、精密度试验、回收率试验对该测定方法进行了验证。为考察脂质体膜材对该测定方法的影响，还在建立的色谱条件下分别分析了空白脂质体、对照品溶液、**1** 的 Tween-80 溶液以及 **1** 脂质体，发现 **1** 脂质体中药物出峰时间与单方药物及对照品出峰时间一致，且相同浓度下峰面积相近，可见膜材成分对于包封率的测定并无干扰。而且 3 批 **1** 脂质体包封率的测定结果也证明所建立的方法准确可靠，为 **1** 制剂的优化与评价提供了可靠参考。

参考文献：

[1] AL-MANSOURI L, GURNEY H. Clinical concepts for cabazitaxel in the management of metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2019, **15**(6): 288-295.

[2] SUN B Y, STRAUBINGER R M, LOVELL J F. Current taxane formulations and emerging cabazitaxel delivery systems [J]. *Nano Res*, 2018, **11**(10): 5193-5218.

[3] CHENG X, GAO J, DING Y, *et al*. Multi-functional liposome: a powerful theranostic nano-platform enhancing photodynamic therapy [J]. *Adv Sci*, 2021, **8**(16): 1-31.

[4] GUIMARÃES D, CAVACO-PAULO A, NOGUEIRA E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications [J]. *Int J Pharm*, 2021, **601**: 120571.

[5] LARGE D E, ABDELMESSIH R G, FINK E A, *et al*. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2021, **176**: 113851.

[6] 李红茹, 李淑芬. 脂质体中药物包封率的测定方法[J]. 药物分析杂志, 2007, **27**(11): 1844-1848.

[7] 李唐棣, 郝丽梅, 梅兴国. 脂质体包封率的研究进展[J]. 国外医学, 2006, **33**(3): 224-227.

[8] 郑国栋, 蓝 婷, 林伊君, 等. 微柱凝胶联合高效液相色谱法同时测定双载药脂质体中阿霉素与他莫昔芬的包封率[J]. 中国医院药学杂志, 2017, **37**(2): 108-111.

[9] 赵凯燕, 张丹参. 脂质体包封率的研究进展[J]. 神经药理学报, 2016, **6**(6): 23-30.

[10] 邵红霞, 奉建芳, 龙晓英. 脂质体包封率的测定方法[J]. 中南药学, 2009, **7**(3): 212-215.

[11] 庄英华, 张中文, 韩 伟, 等. 超滤离心法测定连翘酯苷脂质体包封率[J]. 中国新药杂志, 2012, **21**(18): 2209-2211.

[12] 祝文琪, 徐卫康, 侯晓林, 等. HPLC-超滤离心法测定连翘酯苷复方脂质体包封率[J]. 中国现代应用药学, 2013, **30**(9): 1001-1004.

[13] 李琅琅, 王文喜, 牛泱平. 低速离心法测定荧光红GG脂质体包封率[J]. 浙江工业大学学报, 2009, **37**(5): 535-537.

[14] 杨 涛, 金大德, 崔福德. 紫杉醇脂质体药物含量及包封率的测定[J]. 药物分析杂志, 2008, **28**(2): 231-234.

[15] 刘 娜, 张 慧, 李志平, 等. 多西紫杉醇长循环热敏脂质体包封率测定方法的建立[J]. 国际药学研究杂志, 2013, **40**(3): 374-376.

[16] 薛玉英, 翁帼英. 阿糖腺苷脂质体含量及包封率测定[J]. 中国医药工业杂志, 1993, **24**(4): 160-164.