

· 论著 ·

吉西他滨温敏凝胶注射剂的制备及其含量测定

韦忠明¹, 莫冬海¹, 黄启斌¹, 丁雪鹰² (1. 桂林华诺威基因药业有限公司, 广西 桂林 541004; 2. 上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200080)

[摘要] **目的** 制备吉西他滨温敏凝胶注射剂, 并建立其含量测定方法。**方法** 以聚乙二醇/聚酯嵌段共聚物(PLGA-PEG-PLGA)为载体, 制备吉西他滨温敏凝胶注射剂, 采用¹H NMR、FT-IR 对其结构进行表征, HPLC 法测定其中药物的含量。**结果** 吉西他滨温敏凝胶注射剂中, PLGA-PEG-PLGA 的质量分数为 20%, 吉西他滨含量为 40 mg/ml, 胶凝温度为 (37±0.15) °C, 在接近人体温度时黏度最大; 吉西他滨在 5~500 μg/ml 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 8$), 精密度和重复性良好, 溶液 24 h 内稳定性良好, 低、中、高浓度的吉西他滨的回收率分别为 (99.5±3.2)%、(100.4±2.4)%、(102.1±2.4)%, $n=3$ 。3 批样品中吉西他滨的平均含量分别为标示量的 (101.87±2.95)%、(99.4±2.73)%、(98.98±0.71)%, $n=3$ 。**结论** 采用 PLGA-PEG-PLGA 聚合物为载体制备的吉西他滨温敏凝胶注射剂质量可控, 是一种很有开发前景的抗胰腺癌制剂。

[关键词] 吉西他滨; 聚乙二醇/聚酯嵌段共聚物; 温敏凝胶; 含量测定

[中图分类号] R979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)01-0036-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.010

Gemcitabine hydrochloride thermosensitive gel injection preparation and contents determination

WEI Zhongming¹, MO Donghai¹, HUANG Qibin¹, DING Xueying² (1. Guilin Pavay Gene Pharmaceutical Cor. Ltd, Guilin 541004, China; 2. Department of Clinical Pharmacy, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China)

[Abstract] **Objective** To prepare gemcitabine hydrochloride thermosensitive gel injection and to establish the determination methods of its contents. **Methods** Gemcitabine hydrochloride thermosensitive gel injection was prepared using PLGA-PEG-PLGA as thermosensitive vehicle. The contents of gemcitabine hydrochloride were determined by HPLC. **Results** The formulation contained 40 mg/ml gemcitabine and 20% (wt) PLGA-PEG-PLGA with phase-transition temperature of (37±0.15) °C, showing the best viscosity around human body temperature. Gemcitabine hydrochloride presented a good linearity in the range of 5-500 μg/ml ($r=0.999\ 8$), which had good precision and reproducibility. The recovery rate of low, middle and high concentrations of gemcitabine hydrochloride were (99.5±3.2)%, (100.4±2.4)%, (102.1±2.4)%, $n=3$, respectively. The average contents of gemcitabine hydrochloride in three batches of sample were (101.87±2.95)%, (99.4±2.73)%, (98.98±0.71)%, $n=3$, respectively. **Conclusion** The quality of gemcitabine hydrochloride thermosensitive gel injection with PLGA-PEG-PLGA as matrix could be controlled. It is a promising new drug for pancreatic cancer.

[Key words] gemcitabine hydrochloride; PLGA-PEG-PLGA; thermosensitive gel; content determination

吉西他滨(gemcitabine, GEM)是一种新型的脱氧胞苷拟似物和核苷还原酶抑制剂, 其结构、性质和代谢途径与阿糖胞苷相似。虽然自 1997 年批准上市以来, 吉西他滨就成为进展期胰腺癌的主要治疗

手段, 但是实体瘤对任何化疗药物的敏感性都不佳, 临床主要治疗手段仍是在术后予以全身辅助的化学治疗^[1-4]。同时吉西他滨存在剂型单一、毒副作用大、靶向性及病人用药顺应性差等缺点。因此, 研制吉西他滨原位缓释长效注射剂对于改善胰腺癌患者的生存质量, 提高吉西他滨对胰腺癌的有效率非常必要^[5]。PLGA-PEG-PLGA 为合成高分子可注射型水凝胶材料, 结构和性能可精细调控, 重复性好, 易于加工和工业化生产, 并且其降解性可控, 具有良好的生物相容性^[6-9]。本文以 PLGA-PEG-PLGA 为载体, 制备了吉西他滨温敏凝胶注射剂并对其进行了

[基金项目] 国家自然科学基金(81472349); 上海市自然科学基金(14ZR1433300)

[作者简介] 韦忠明, 本科, 教授级高工. Tel: (0773)2196888; E-mail: weizhongming@163.com

[通讯作者] 丁雪鹰, 博士, 副主任药师. E-mail: dingxueying@126.com

表征,建立了吉西他滨含量测定的高效液相方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 电子天平(Sartorius BP 221S,德国);核磁共振波谱仪(Varian Mercury Plus NMR-300,美国);傅立叶变换红外光谱仪(Thermo Nicolet IR200,美国);电热恒温水浴锅(HH S11-2S1,贺德实验设备有限公司,上海);流变仪(Thermo Haaker C25P,美国);漩涡振荡混合器(SO-200,LABNET,美国);高效液相色谱仪(Hitachi D-2000 Elite,日本日立公司);低温高速冷冻离心机(5804R, Eppendorf 公司,德国);超声仪(Anke TGL-16G,德国)。

1.2 材料 吉西他滨注射粉针剂(泽菲,礼来公司);吉西他滨标准品(批号 10622-200401,中国食品药品检定研究院);PLGA-PEG-PLGA(自制, LA/GA=2.7:1);甲醇(色谱纯,Merck 公司,美国);乙腈(色谱纯,Merck 公司,美国);其余试剂均为分析纯,购自国药集团上海化学试剂公司。

2 方法与结果

2.1 吉西他滨温敏凝胶制备 将 PLGA-PEG-PLGA 聚合物配制成质量分数为 15%、20%、25%、30% 的水溶液,待聚合物溶解完全后加入适量的吉西他滨粉针剂配制成 40 mg/ml 的吉西他滨温敏凝胶溶液,充分振摇至溶解,于 4 °C 静置 24 h 后将含药凝胶冷冻干燥。

2.2 吉西他滨温敏凝胶结构鉴定 取“2.1”项下得到的 20% 的 PLGA-PEG-PLGA 吉西他滨温敏凝胶冻干粉,利用傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR)及核磁共振氢谱仪(¹H NMR)测试样品的结构。FT-IR 测试中样品溶解于经无水处理后的二氯甲烷中, KBr 铺膜后在红外灯下干燥,采用傅立叶变换红外光谱仪对样品进行检测;¹H NMR 探测中采用重水(D₂O)

为溶剂。根据图谱和分子量信息,分析样品的化学结构。结果表明,PLGA-PEG-PLGA 聚合物材料加入前后,PLGA-PEG-PLGA 和吉西他滨的结构均没有发生变化,结果见图 1 至图 6。

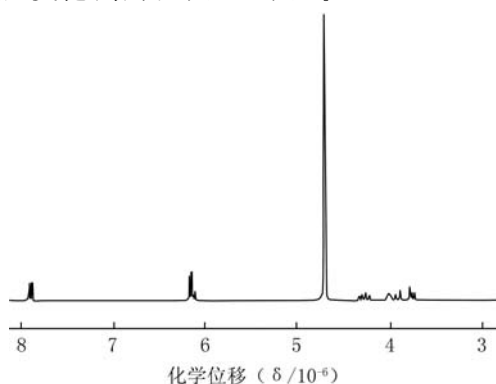


图 1 吉西他滨核磁共振图谱

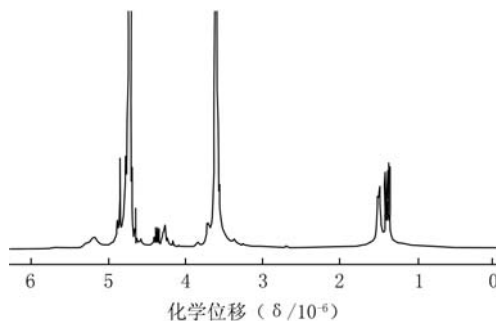


图 2 PLGA-PEG-PLGA 三嵌段共聚物核磁共振图谱

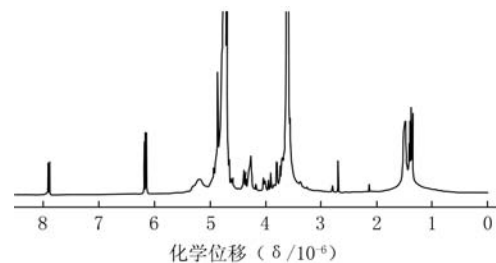


图 3 吉西他滨温敏凝胶核磁共振图谱

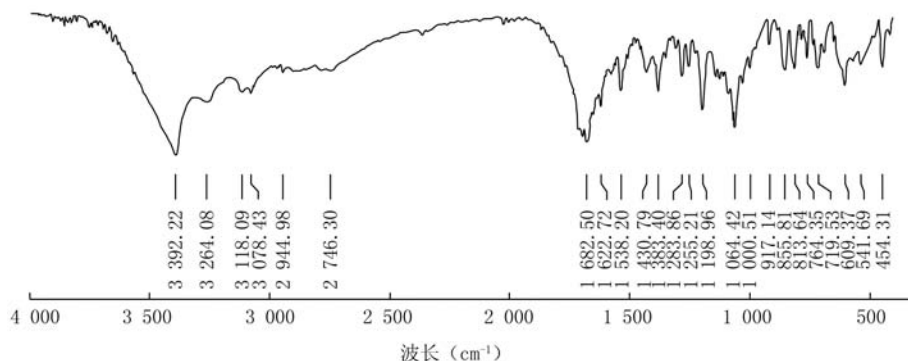


图 4 吉西他滨红外图谱

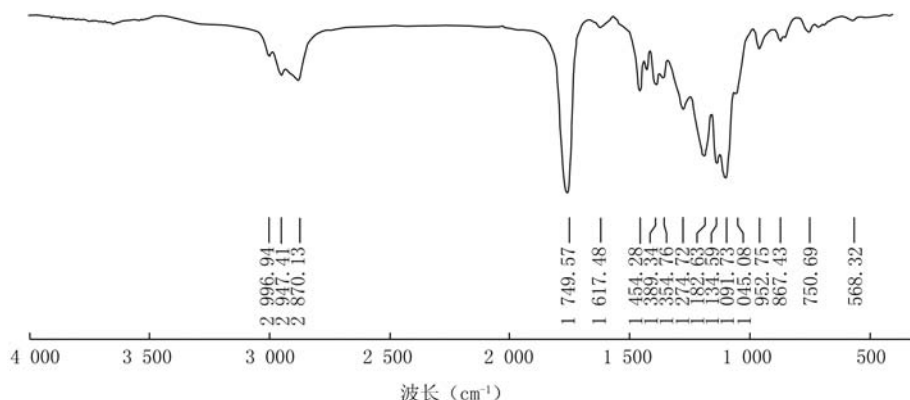


图5 PLGA-PEG-PLGA三嵌段共聚物红外图谱

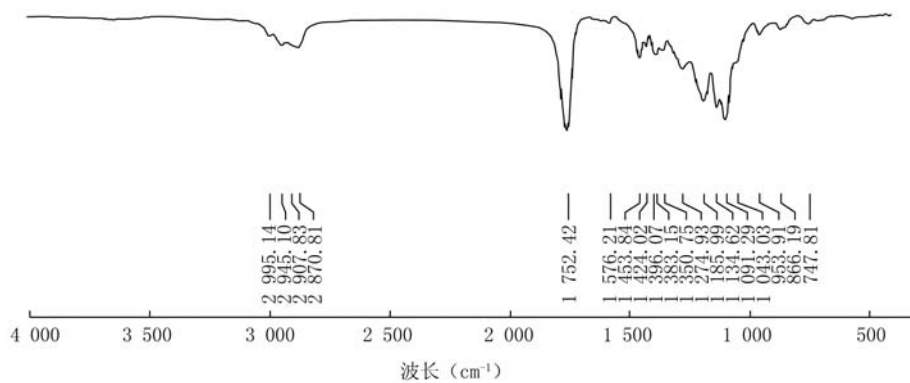


图6 吉西他滨温敏凝胶红外图谱

2.3 吉西他滨温敏凝胶胶凝温度 取“2.1”项下制备的吉西他滨温敏凝胶冻干粉各160 mg,加水4 ml溶解于10 ml玻璃试管中,将试管于4℃下静置24 h后放置水浴中,使样品溶液液面低于水浴液面,启动升温程序,水浴从20℃→60℃开始缓慢升温,升温速度为1℃/min,每升高1℃保持15 min。将试管缓慢倾斜至180℃,若30 s内未流到瓶口,认为形成凝胶,此时温度为聚合物溶液-凝胶的胶凝温度($T_{\text{sol-gel}}$);而当温度超过一定程度,凝胶迅速发生沉淀,认为此时的温度为聚合物凝胶-沉淀的相转变温度($T_{\text{gel-precipitate}}$),具体结果见图7。结果发现,加入吉西他滨后,15%、20%、25%、30%的PLGA-PEG-PLGA聚合物溶液均具有温度敏感的特性,随着聚合物质量分数升高,溶液-凝胶温度逐渐降低,凝胶-沉淀温度逐渐升高。其中,20% PLGA-PEG-PLGA聚合物溶液加入吉西他滨后,溶液-凝胶温度为 (37 ± 0.15) ℃,凝胶-沉淀温度为 (44 ± 0.25) ℃,符合人体温度的变化,并有利于吉西他滨温敏凝胶的储存,表明20% PLGA-PEG-PLGA聚合物溶液为合适的给药载体。

2.4 吉西他滨温敏凝胶黏度温度曲线 取“2.1”项

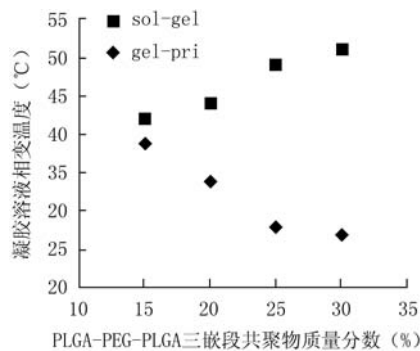


图7 吉西他滨温敏凝胶相转变曲线

下制备的20% PLGA-PEG-PLGA吉西他滨温敏凝胶冻干粉400 mg制备10 ml凝胶溶液及20% PLGA-PEG-PLGA凝胶空白溶液10 ml,将试管于4℃下静置24 h后,装入约9 ml的样品溶液于样品池中,开启恒温水浴控制程序控制样品池温度,水浴从10℃开始缓慢升温到55℃,升温速度0.5℃/min,角频率为10 rad/s,记录每升高0.5℃时的聚合物溶液动态流变参数,以温度为横坐标,动态黏度为纵坐标绘制温度-黏度曲线,结果见图8及图9。结果表明,20%的PLGA-PEG-PLGA聚合物溶液

中加入吉西他滨后,聚合物水溶液黏度虽略有升高,但与未加吉西他滨的聚合物溶液黏度变化趋势一致。

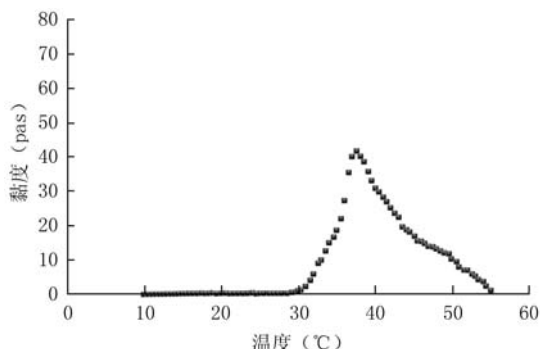


图8 20% PLGA-PEG-PLGA 吉西他滨温敏凝胶不同温度下黏度曲线

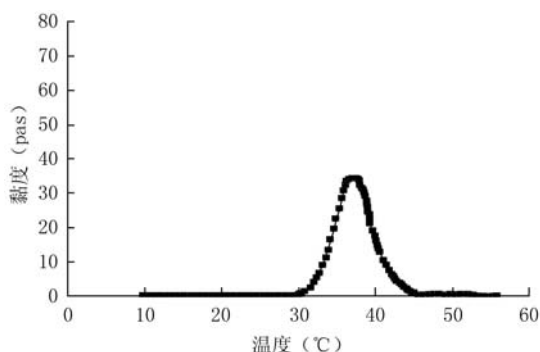


图9 20% PLGA-PEG-PLGA 三嵌段共聚物不同温度下黏度曲线

2.5 吉西他滨温敏凝胶含量测定

2.5.1 溶液的配制 ①储备液的制备:精密称取吉西他滨标准品 1 mg,加入蒸馏水溶解,定容至 10 ml,作为储备液。②样品溶液的制备:精密称取吉西他滨聚合物溶液适量(约相当于含吉西他滨 5 mg),在不断振荡中缓慢加入蒸馏水制成每 1 ml 中约含 0.05 mg 的溶液,超声 15 min,高速离心,取上清液作为供试品溶液^[10]。

2.5.2 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱: Dikma Diamonsil C₁₈ (5 μm, 250 mm×4.6 mm); 流动相: 甲醇/水 (30/70, V/V); 检测器: 日本 Shimadzu SPD-10AVP 二极管阵列检测器; 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 268 nm; 进样体积 20 μl。精密量取上述两种溶液各 20 μl, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 吉西他滨在 6.4 min 处出峰, 辅料对吉西他滨的出峰无干扰, 且峰形较好, 无拖尾, 结果见图 10 及图 11。

2.5.3 线性关系考察 分别精密量取“2.5.1”项下的吉西他滨储备液适量, 加去离子水稀释配制浓度为 5、10、20、50、100、200、500 μg/ml 的系列标准

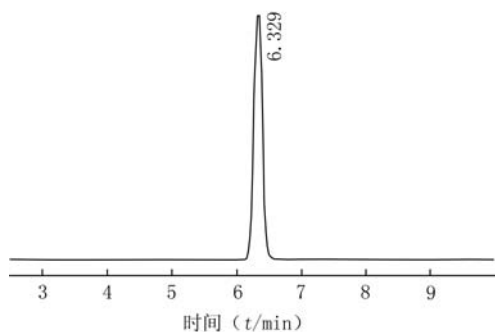


图10 吉西他滨标准品 HPLC 色谱图

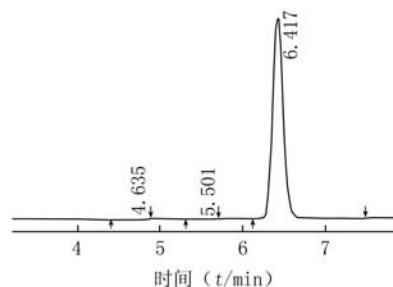


图11 吉西他滨凝胶溶液 HPLC 色谱图

溶液。分别取吉西他滨标准溶液 20 μl, 按“2.5.2”项下色谱条件依次进样, 每一浓度测定 3 次, 取峰面积平均值。以吉西他滨浓度 c (μg/ml) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标进行线性回归, 建立吉西他滨标准曲线, 得到回归方程 $A = 17.628c + 34.892$ ($r = 0.9998$), 结果表明, 吉西他滨在 5~500 μg/ml 的浓度范围内线性关系良好。

2.5.4 精密度的试验 ①日内精密度: 分别取 20 μl 高、中、低浓度的吉西他滨标准溶液, 同一天内重复测定 3 次, 得到高、中、低 3 种浓度吉西他滨标准液日内 RSD 分别为 0.019%、0.023% 及 0.031%, $n = 3$ 。②日间精密度: 分别取 20 μl 高、中、低浓度的吉西他滨标准溶液, 连续测定 3 d, 得到高、中、低 3 种浓度吉西他滨标准液日间 RSD 分别为 0.020%、0.037% 及 0.041%, $n = 3$ 。结果表明, 日内及日间精密度均良好。

2.5.5 回收率试验 按“2.1”项下的方法制备空白凝胶, 称量约 30 mg 各 3 份置于 10 ml 容量瓶, 分别加入适量吉西他滨标准品, 制成低、中、高 3 种浓度 (5、100、200 μg/ml) 的溶液。取 5 ml 溶液置于 10 ml 容量瓶, 再分别加入“2.5.1”项下的吉西他滨储备液 1 ml, 用蒸馏水稀释定容, 按“2.5.2”项下色谱条件进样测定峰面积, 计算得低、中、高 3 种浓度的吉西他滨的加样回收率分别为 (99.5±3.2)%、(100.4±2.4)%、(102.1±2.4)%, $n = 3$ 。结果表

明,该方法准确度高。

2.5.6 重复性试验 取同一批号(批号为20120821)吉西他滨温敏凝胶注射剂样品6份,按“2.5.1”项下制备样品溶液,测定峰面积,计算得到RSD为0.04%, $n=6$,表明该方法重复性良好。

2.5.7 稳定性试验 取“2.5.1”项下储备液,稀释至一定浓度,分别在0、2、4、8、12 h进行测定,按吉西他滨峰面积计算RSD=0.10%, $n=3$ 。表明吉西他滨溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.8 含量测定 取3批吉西他滨温敏凝胶注射剂样品(40 mg/ml),按“2.5.1”项下处理方法制备样品,按“2.5.2”项下色谱条件测定峰面积。根据外标法标准曲线方程计算得3批样品中吉西他滨的平均含量为标示量的(101.87±2.95)%、(99.4±2.73)%、(98.98±0.71)%, $n=3$,均在标示量的95%~105%之间,符合含量测定要求。

3 讨论

PLGA-PEG-PLGA具有温敏成胶性质,即常温下成液体,遇生理温度快速变成凝胶。以吉西他滨为模型药物,PLGA-PEG-PLGA聚合物为递药系统制备吉西他滨原位凝胶注射剂,将其于肿瘤局部注射,可延长作用时间、提高药物肿瘤内浓度,同时使药物浓集在肿瘤部位并缓慢释药、达到安全有效的治疗目的。

本实验所建立的HPLC法,专属性强,线性关系良好,回收率、精密度、重复性、溶液稳定性均符合要求,可用于吉西他滨温敏凝胶注射剂的质量控制。

【参考文献】

[1] Cascium S, Craziano F, Catalana G. Chemotherapy for ad-

vanced pancreatic cancer; It may no longer be ignored [J]. Ann Oncol, 1999, 10(1):105.

[2] Saif MW. A new developments in the treatment of pancreatic cancer[J]. Highlights from the "44th ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. May 30-June 3, 2008. JOP 2008, 9; 391-397.

[3] Tanaka M, Javle M, Dong X, *et al.* Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients locally pancreatic cancer [J]. Cancer, 2010, 116(22): 5325-5335.

[4] Vervenne W, Bennouna J, Humblet Y, *et al.* A randomized, double blind, placebo controlled multicenter phase III trial to evaluate the efficacy and safety of adding bevacizumab to erlotinib and gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(suppl): 4507.

[5] Okino H, Maeyama R, Manabe T. Trans-tissue, sustained release of gemcitabine from photo cured gelatin gel inhibits the growth of heterotopic human pancreatic tumor in nude mice[J]. Clin Cancer Res. 2003, 9 (15): 5786-5793.

[6] Rosemurgy AS, Serafini FM. New directions in systemic therapy of pancreatic cancer [J]. Cancer Control, 2000, 7 (5): 437-51.

[7] Howell SB. Clinical applications of a novel sustained-release injectable drug delivery system; DepoFoamTM technology [J]. Cancer J 2001, 7(3): 219-227.

[8] Kim YJ, Kim SW. Controlled drug delivery from injectable biodegradable triblock copolymer [M]. Washington: American Chemical Society, 2003; 300-311.

[9] Jeong B, Bae YH. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems [J]. Nature, 1997, 388 (6645): 860-862.

[10] 杨 梅,李井泉,汤致强. PLGA 吉西他滨缓释微球在荷胰腺癌裸鼠体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(4): 295-299.

[收稿日期] 2014-09-12 [修回日期] 2015-07-09

[本文编辑] 陈 静

(上接第23页)

[12] 刘世伟,孙 逊,聂 宇,等. 载基因壳聚糖纳米粒的制备及其相关性质的初步研究[J]. 华西药学杂志, 2005, 19(6): 409-411.

[13] Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, *et al.* Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers; synthesis, characterization and transfection efficiency [J]. J Control Release, 2001, 70 (3):

399-421.

[14] Goldmann K, Ensminger SM, Spriewald BM. Oral gene application using chitosan-DNA nanoparticles induces transferable tolerance [J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19 (11): 1758-1764.

[收稿日期] 2015-08-24 [修回日期] 2015-11-16

[本文编辑] 顾文华