

RP-HPLC法同时测定自制复方雷帕霉素栓剂中雷帕霉素和他克莫司的含量^Δ

叶丛丛^{1*},傅红兴^{2#},周伟忠³,吴岚岚³,廖丽²,黄斌炯²(1.温州市人民医院,浙江温州 325000;2.温州医科大学药学院,浙江温州 325035;3.义乌市中医医院药剂科,浙江义乌 322000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)03-0388-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.03.32

摘要 目的:建立同时测定自制复方雷帕霉素栓剂中雷帕霉素和他克莫司含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclips XDB-C₁₈,流动相为乙腈-3.3%磷酸溶液(65:35,V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为50 ℃,进样量为20 μl。结果:雷帕霉素和他克莫司质量浓度在8.0~400.0 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤1.18%;平均回收率分别为101.28%、97.99%,RSD分别为2.99%、1.94%($n=3$)。结论:该方法操作简便、准确,专属性强、重复性好,可用于自制复方雷帕霉素栓剂中雷帕霉素和他克莫司含量的测定。

关键词 雷帕霉素;他克莫司;栓剂;含量测定;反相高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Rapamycin and Tacrolimus in Self-made Compound Rapamycin Suppository by RP-HPLC

YE Cong-cong¹,FU Hong-xing²,ZHOU Wei-zhong³,WU Lan-lan³,LIAO Li²,HUANG Bin-jiong²(1.Wenzhou People's Hospital, Zhejiang Wenzhou 325000, China;2.School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Zhejiang Wenzhou 325035,China;3.Dept. of Pharmacy, Yiwu Hospital of TCM, Zhejiang Yiwu 322000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of rapamycin and tacrolimus in self-made Compound rapamycin suppository. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclips XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-3.3% phosphoric acid (65:35, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was 50 ℃. Sample size was 20 μl. RESULTS: The linear range of rapamycin and tacrolimus were 8.0-400.0 μg/ml ($r=0.9999$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were ≤1.18%. The average recoveries of rapamycin and tacrolimus were 101.28% (RSD=2.99%, $n=3$) and 97.99% (RSD=1.94%, $n=3$) separately. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, specific and reproducible, and can be used for the content determination of rapamycin and tacrolimus in self-made Compound rapamycin suppository.

KEYWORDS Rapamycin; Tacrolimus; Suppository; Content determination; RP-HPLC

(12:88, V/V)为流动相,检测波长为210 nm),苦杏仁苷峰与另一未知峰难以分离;而采用本试验的色谱条件,苦杏仁苷峰与另一未知峰能达到基线分离,峰形可得到明显改善^[1,7-9]。

笔者还比较了超声和回流两种提取方式对苦杏仁苷含量的影响,结果发现回流提取效率更高,因此本研究选用了回流提取的方式。此外,笔者还考察了水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、乙醇、30%乙醇、稀乙醇、70%乙醇和乙醇等9种溶剂对苦杏仁苷的提取效率,结果发现稀乙醇提取效果最好、苦杏仁苷的含量最高,因此最终选择稀乙醇为提取溶剂。

综上所述,该方法操作简单、灵敏、专属性强、重复性好,可作为郁李仁配方颗粒的质量控制方法。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年

Δ 基金项目:义乌市科研计划项目(No.13-3-28)

* 主管药师。研究方向:药学分析。电话:0577-86699575

通信作者:讲师,硕士。研究方向:药物新剂型和新制剂的开发。电话:0577-86699575

版.北京:中国医药科技出版社,2010:209.

- [2] 邢国秀,李楠,杨美燕,等.天然苦杏仁苷的研究进展[J].中成药,2003,25(12):1007.
- [3] 元艺兰,郁李仁的药理作用与临床应用[J].现代医药卫生,2007,23(13):1987.
- [4] 夏其乐,王涛,陆胜民,等.苦杏仁苷的分析、提取纯化及药理作用研究进展[J].食品科学,2013,34(21):403.
- [5] 钱平,刘志辉,钱芳,等.桃仁定性鉴别与含量测定研究[J].中国药事,2010,24(4):351.
- [6] 袁丹,胡爽,杜慧琴,等.橘红丸中苦杏仁苷的定性、定量分析方法的研究[J].中国药理学杂志,2002,37(11):857.
- [7] 钱平,贾云,刘志辉,等.高效液相色谱法测定郁李仁中苦杏仁苷的含量[J].中国中医药信息杂志,2009,16(12):50.
- [8] 王艳平,田杰,张宁惠.小儿清热止咳合剂的标准研究[J].中国药房,2006,17(2):138.

(收稿日期:2014-07-30 修回日期:2014-10-04)

(编辑:孙冰)

器官移植患者常需服用免疫抑制剂以抵抗移植物的排斥反应,常用药物有雷帕霉素和他克莫司等。雷帕霉素和他克莫司均具有减少免疫抑制剂用量、提高疗效和降低不良反应等特点^[1-4],但存在腹部器官移植术后易引起食欲不振、进食困难等不利于口服给药的情况。为此,本院自制了含有雷帕霉素和他克莫司的复方雷帕霉素栓剂。该药可避免口服给药,药物吸收后可致全身作用^[5],适用于腹部器官移植术后患者或大型动物的抗移植排斥治疗。为有效控制该药的质量,笔者建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定复方雷帕霉素栓剂中雷帕霉素和他克莫司含量的方法,以为更好地控制产品质量提供参考。

1 材料

1100 Series HPLC 仪,包括 G1314A VWD 可变波长紫外检测器、G1311A 四元梯度泵、Agilent Chemstation 工作站、手动进样器(美国 Agilent 公司);TU-1901 紫外分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司);BS300 S-WEI 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);数显恒温水浴锅(上海梅香仪器有限公司)。

雷帕霉素原料药(广州亿邦医药科技有限公司,批号:P130825,纯度:98.0%);他克莫司原料药(湖北盛天恒创生物科技有限公司,批号:1309892,纯度:98.0%);雷帕霉素对照品(大连美仑生物技术有限公司,批号:20130605,纯度:99.0%);他克莫司对照品(上海惠诚生物科技有限公司,批号:20130726,纯度:99.5%);复方雷帕霉素栓剂(温州医科大学药学院药剂教研室自制,批号:20131211、20131213、20131215,规格:每粒栓剂含雷帕霉素和他克莫司均为 5 mg);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6-8]

色谱柱:Agilent Eclips XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-3.3%磷酸溶液(65:35, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:50 °C;检测波长:210 nm;进样量:20 μl;时间:20 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取雷帕霉素、他克莫司对照品 1.0 mg,置同一 10 ml 量瓶中,加入乙腈溶解,定容至 10 ml,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品粉末 0.146 2 g(相当于 1/5 药栓的质量),加入乙腈溶解,定容至 10 ml,即得供试品溶液。

2.2.3 空白对照溶液 称取不含主成分的空白栓剂样品粉末 0.145 0 g(相当于 1/5 药栓的质量),加入乙腈溶解,定容至 10 ml,即得空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下供试品溶液、对照品溶液、空白对照溶液各 20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。结果,他克莫司、雷帕霉素均有较好的分离,色谱峰保留时间分别约为 15.5、18.2 min,分离度为 2.01,理论板数分别为 2 358、3 618。

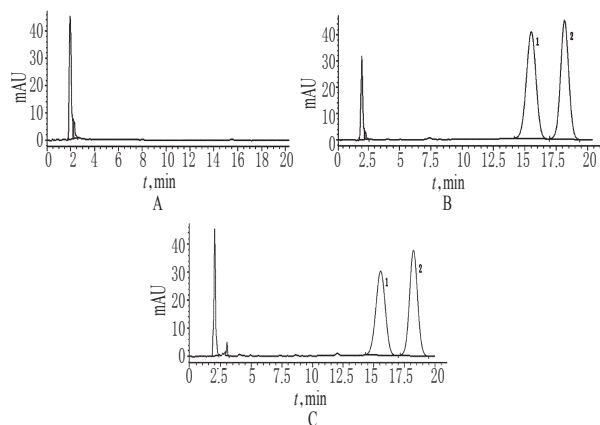


图 1 高效液相色谱图

A.空白对照;B.对照品溶液;C.供试品溶液;1.他克莫司;2.雷帕霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.blank control; B.standard solution; C.test sample solution; 1.tacrolimus; 2.rapamyojin

2.4 线性关系考察

精密称取雷帕霉素、他克莫司对照品 10.0 mg,分别置于 25 ml 干燥棕色量瓶中,加乙腈溶解并定容,制成质量浓度为 400.0 μg/ml 的对照品贮备液。精密量取贮备液 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 ml,置于 10 ml 干燥棕色量瓶中,加入乙腈稀释至质量浓度分别为 8.0、20.0、40.0、80.0、200.0 μg/ml 的系列溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程分别为 $y=0.0616x+0.5503$ ($r=0.9999$), $y=0.0615x+0.3639$ ($r=0.9999$)。结果表明,雷帕霉素、他克莫司质量浓度在 8.0~400.0 μg/ml 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

取“2.4”项下质量浓度为 8.0、40.0、200.0 μg/ml 的雷帕霉素和他克莫司溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,重复 6 次。结果,雷帕霉素、他克莫司峰面积的 RSD 分别为 0.52%、0.90%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.4”项下质量浓度为 80 μg/ml 的雷帕霉素和他克莫司溶液,分别于放置 1、2、4、8、12、16、24 h 时进样测定。结果,雷帕霉素、他克莫司峰面积的 RSD 分别为 0.56%、0.84%,表明 24 h 内对照品溶液稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:20131213)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,雷帕霉素、他克莫司峰面积的 RSD 分别为 1.18%、0.60%,表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验

分别精密称取样品(批号:20131213)适量,共 9 份,加乙腈溶解并定容至 25 ml,制备成相当于样品溶液质量浓度 80%、100%、120% 的溶液,各 3 份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱峰,按外标法计算回收率,结果见表 1。

表1 回收率试验结果(n=3)

Tab 1 Results of recovery tests(n=3)

待测成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
雷帕霉素	0.542 4	0.561 9	103.61	101.28	2.99
	0.551 3	0.568 5	103.12		
	0.5317	0.518 4	97.50		
	1.081 2	1.125 2	104.07		
	1.075 9	1.135 9	105.58		
	1.084 1	1.114 1	102.77		
	1.630 8	1.6218	99.45		
	1.621 1	1.587 5	97.93		
	1.610 5	1.570 5	97.52		
	1.610 5	1.570 5	97.52		
他克莫司	0.531 3	0.512 1	96.39	97.99	1.94
	0.520 8	0.518 3	99.52		
	0.510 5	0.498 5	97.65		
	1.030 2	0.990 2	96.12		
	1.041 9	0.990 5	95.07		
	1.049 2	1.048 9	99.97		
	1.601 8	1.555 1	97.08		
	1.521 1	1.541 9	101.37		
	1.560 5	1.541 5	98.78		

2.9 样品含量测定

取3批样品,切碎后精密称取栓剂粉末(含雷帕霉素和他克莫司各约0.5 mg),置于50 ml干燥量瓶中,加入乙腈溶解,定容,按“2.1”项下色谱条件进样测定,按外标法以峰面积计算含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of content determination of samples(n=3)

批号	雷帕霉素,mg	标示量的百分含量,%	他克莫司,mg	标示量的百分含量,%
20131211	5.08	101.6	5.26	105.2
20131213	4.89	97.8	4.84	96.8
20131215	5.21	104.2	5.13	102.6

3 讨论

通过对雷帕霉素和他克莫司对照品溶液进行紫外扫描(波长200~400 nm),结果显示,雷帕霉素在278 nm波长处有最大吸收,在210 nm波长处也有较好吸收;他克莫司在210 nm波长处有较好吸收,但在278 nm波长处几乎无吸收。故选择210 nm作为本研究的检测波长。

根据文献报道^[9]和本试验前期研究结果^[10],以HPLC法测定他克莫司含量为基础进行适当调整,发现以乙腈-3.3%磷酸溶液作为流动相时,提高3.3%磷酸溶液的比例,雷帕霉素和他克莫司的出峰时间会逐渐延迟,但分离度逐渐增加;同时提高

柱温,雷帕霉素和他克莫司的分离度较好,可减少拖尾现象。故选择乙腈-3.3%磷酸溶液(65:35, V/V)为本研究的流动相、50 ℃为本研究的柱温。

综上所述,该方法操作简便、准确、专属性强、重复性好,可用于自制复方雷帕霉素栓剂中雷帕霉素和他克莫司含量的测定。

参考文献

- [1] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(23):1 773.
- [2] Asrani SK, Wiesner RH, Trotter JF, et al. De novo sirolimus and reduced-dose tacrolimus versus standard-dose tacrolimus after liver transplantation: the 2000-2003 phase II prospective randomized trial[J]. *Am J Transplant*, 2014, 14(2):356.
- [3] Ceberio I, Devlin SM, Sauter C, et al. Sirolimus, tacrolimus and low-dose methotrexate based GVHD prophylaxis after non-ablative or reduced intensity conditioning in related and unrelated donor allo-HCT[J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 6:1.
- [4] 陆莉,林志彬.一种新型的免疫抑制剂:雷帕霉素[J]. *中国药理学杂志*, 2001, 36(9):643.
- [5] 崔福德.药理学[M]. 7版.北京:人民卫生出版社, 2011: 298-305.
- [6] 许明哲,尹利辉,胡昌勤.HPLC法测定他克莫司软膏剂含量及含量均匀度[J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(12): 748.
- [7] 王英.HPLC法测定他克莫司片的含量[J]. *海峡药学*, 2007, 6(19):49.
- [8] 魏静,徐国旭,龚铠,等.雷帕霉素眼膏的制备及其含量测定[J]. *中国现代医药杂志*, 2010, 12(6):11.
- [9] 王瑞华.他克莫司固体脂质纳米粒制备及理化性质研究[D].广州:南方医科大学, 2012.
- [10] 朱雁林,傅红兴,周伟忠,等.雷帕霉素栓剂的制备及质量评价[J]. *温州医学院学报*, 2014, 44(2):148.

(收稿日期:2014-07-20 修回日期:2014-08-27)

(编辑:陈宏)

崔丽副主任出席北京医院第一次党员代表大会

本刊讯 2014年12月17日,中共北京医院第一次代表大会在北京医院报告厅召开。国家卫生计生委党组成员、副主任、直属机关党委书记崔丽同志出席会议并讲话。

崔丽同志在讲话中充分肯定了北京医院党委认真学习贯彻党的各项方针政策,按照委党组的决策部署,团结带领全体党员干部职工,以业务带党建,以党建促业务,在南联盟使馆事件、非典、汶川地震的医疗救治工作中,在北京奥运会、国庆60周年庆典、北京APEC会议等重要活动的医疗保障中,特别是中央干部保健工作中所发挥的基层党组织战斗堡垒作用和党员

的先锋模范作用。对进一步做好医院的党建工作,提出了殷切希望:加强理论学习,坚定政治方向;夯实基础,加强服务型党组织建设;落实从严治党要求,全面落实主体责任;切实加强领导班子自身建设。

大会审议通过了北京医院党委工作报告、纪委工作报告以及关于党费收缴、使用和管理情况的报告。选举产生了中共北京医院第一届委员会、中共北京医院第一届纪律检查委员会。

直属机关党委相关负责同志参加了会议。