

HPLC法和生物测定法测定鲑鱼降钙素肠溶胶囊含量的比较[△]

王雪莲^{1*},戴昱²,杜玖月¹,邱志霞²,刘琦²,陈西敬^{2#}(1.新疆科丽生物技术有限公司,乌鲁木齐 830011;2.中国药科大学药学院,南京 210009)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3134-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.20

摘要 目的:采用高效液相色谱(HPLC)法测定鲑鱼降钙素肠溶胶囊中降钙素的含量,并与生物测定法进行比较。方法:HPLC法色谱柱为依利特ODS2 C₁₈,流动相为0.4%四丁基氢氧化铵水溶液(pH 3.8)-乙腈(334:166, V/V),流速为1 ml/min,检测波长为220 nm;生物测定法参照《中国药典》相关方法进行。结果:HPLC法降钙素检测质量浓度线性范围为5~200 μg/ml($r=0.999\ 3$),辅料对主药测定无干扰,精密密度试验RSD<5%,平均回收率为96.5%,含量测定结果为99.96%;生物测定法可信限率为28.84%,虽符合要求(<45%),但含量测定结果为111.62%,估计与制剂中含吸收促进剂有关。结论:与生物测定法相比,HPLC法测定鲑鱼降钙素肠溶胶囊含量,操作简便、成本低、重复性好,结果更为可靠。

关键词 鲑鱼降钙素肠溶胶囊;降钙素;高效液相色谱法;生物测定法

Comparison of HPLC and Bioassay Method for Content Determination of Salmon Calcitonin Enteric-coated Capsules

WANG Xue-lian¹, DAI Yu², DU Jiu-yue¹, QIU Zhi-xia², LIU Qi², CHEN Xi-jing²(1.Xinjiang Keli Biotechnology Co., Ltd., Urumqi 830011, China; 2.College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To adopt HPLC method to determine the content of calcitonin in Salmon calcitonin enteric-coated capsule, and to compare with the results of biological assay. METHODS: Hypersil ODS2 C₁₈ column was used with mobile phase consisted of 0.4% tetramethylammonium hydroxide (pH 3.8)-acetonitrile (334:166, V/V) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 220 nm. The bioassay referred to related method stated in *Chinese Pharmacopoeia*. RESULTS: In HPLC assay, the linear range of calcitonin were 5-200 μg/ml ($r=0.999\ 3$) without inference from excipients. RSD of precision test was lower than 5%, and average recovery was 96.5%. Result of content determination was 99.96%. FL of biological assay was 28.84%, which was in line with the standard (<45%); but content determination result was 111.62%, which was associated with accelerant in the preparation. CONCLUSIONS: Compared with bioassay, HPLC assay for determining the content of calcitonin in Salmon calcitonin enteric-coated capsule is simple, low-cost, reproducible and reliable in results.

KEYWORDS Salmon calcitonin enteric-coated capsule; Calcitonin; HPLC; Bioassay

降钙素是一种由32个氨基酸构成的多肽,临床上常用于骨代谢疾病的治疗,特别是骨质疏松症的治疗^[1]。降钙素可以抑制钙从骨中流失,并加速尿液中钙元素的排泄^[2]。在所有种类的降钙素中,鲑鱼降钙素在临床上使用最多,因为其具有很好的降血钙作用及镇痛作用^[3]。目前,鲑鱼降钙素在临床上已有注射液和鼻喷剂2种剂型上市,但尚未有口服剂型上市。与已有剂型相比,口服剂型携带和使用更加方便,故我公司开发出了鲑鱼降钙素肠溶胶囊。为控制该制剂质量,笔者采用目前测定鲑鱼降钙素含量的2种常用方法即高效液相色谱(HPLC)法^[4]和生物测定法^[5],对其结果进行比较,以找出更适合该制剂含量测定的方法。

△ 基金项目:新疆维吾尔自治区科技支疆项目计划资助项目(No. 201291159)

* 工程师,硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:0991-3855495。E-mail: 453789859@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:生物药剂学、药动学。电话:025-86185379。E-mail: 83271286@163.com

1 材料

1.1 仪器

SPD-10A HPLC仪,包括LC-10AT VP高压泵、SPD-10A-VP紫外检测器、SCL-10A进样器(日本岛津公司);HW-2000色谱工作站(上海千谱软件有限公司);AB135-S电子天平(瑞士Mettler toledo公司);XW-80C旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);5430-R低温离心机(德国Eppendorf公司);Versa Max酶标仪(美国Molecular devices公司)。

1.2 药品与试剂

降钙素对照品(上海苏豪逸明有限公司,批号:1007005,纯度:99.2%);降钙素肠溶胶囊(新疆科丽生物技术有限公司,批号:20130601,规格:每粒300 μg);牛血清白蛋白[生兴生物技术(南京)有限公司,批号:0C260C26,蛋白含量:97%];钙试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20131126,含钙离子标准溶液、显色试剂和钙测定缓冲盐溶液等);乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,试验用水为去离子水。

1.3 动物

SD ♂ 大鼠 45 只, 体质量: 180~220 g, 动物许可证号: SCXK(沪)2008-0016, 购自上海西普尔-必凯公司。于实验条件下适应 1 周后使用, 并于实验前 12 h 禁食。

2 HPLC 法

2.1 色谱条件

色谱柱: 依利特 ODS2 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.4% 四丁基氢氧化铵水溶液(磷酸调节 pH 至 3.8)-乙腈(334:166, V/V), 流速: 1 ml/min; 以紫外检测器检测, 检测波长: 220 nm。

2.2 色谱适用性试验及辅料干扰试验

2.2.1 色谱适用性试验。称取降钙素对照品适量, 用流动相制成质量浓度为 150 μg/ml 的溶液, 进样 20 μl; 另称取降钙素对照品适量, 用流动相制成质量浓度为 50 μg/ml 的溶液, 在 75 °C 恒温水浴中放置 15 h, 进样 20 μl。结果前者在 11.378 min 处出峰(降钙素), 后者另在 3.601 min 处出峰(此峰为降钙素 C), 两峰间分离度为 6.32, 降钙素 C 峰与降钙素峰分离良好。色谱图见图 1。

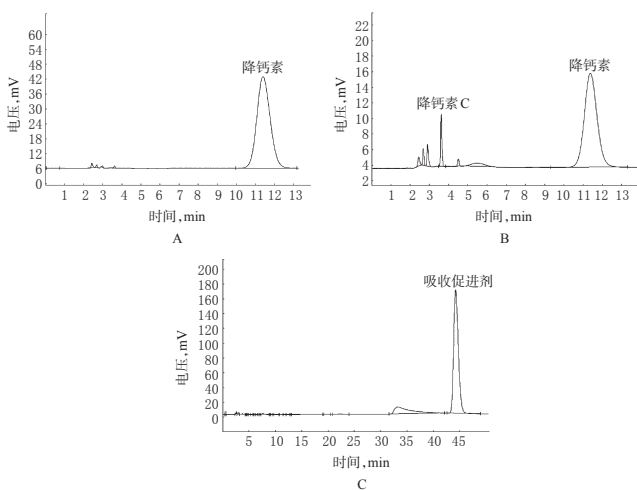


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 对照品经 75 °C 破坏 15 h 后溶液; C. 空白辅料

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. substance control destroyed at 75 °C for 15 h; C. blank excipients

2.2.2 辅料干扰试验。将空白辅料(吸收促进剂等)用流动相溶解后, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进样 20 μl。结果在 44 min 左右出峰, 其余杂峰也未出现在主峰处, 可见空白辅料对降钙素的分析无影响, 详见图 1。

2.3 标准曲线的制备

精密移取 5、10、25、50、100、200 μg/ml 的降钙素对照品溶液 20 μl, 以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $y=11\,428x+14\,968$ ($r=0.999\,3, n=3$), 表明降钙素检测质量浓度线性范围为 5~200 μg/ml。

2.4 精密度试验

精密称取降钙素对照品, 配制成低、中、高(20、50、160 μg/ml) 3 个质量浓度的溶液, 每个质量浓度进样 5 次, 每次进样 20 μl, 分别进行日内精密度以及日间精密度试验(3 d)。结果

日内精密度的 RSD 均 ≤ 3.1%, 日间精密度的 RSD 均 ≤ 4.1% ($n=5$), RSD 均 < 5%。

2.5 回收率试验

采用加样回收试验法。取 3 批胶囊样品各 20 粒, 将胶囊内容物取出, 精密称取 30 mg 的胶囊内容物 9 份, 分别精密加入相当于样品含量 80%、100%、120% 的降钙素对照品各 3 份, 加流动相 8 ml 溶解, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 进行含量测定, 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 test($n=3$)

| 加入值, μg/ml | 测定值, μg/ml | 平均值, μg/ml | 回收率 (RSD), % | 平均回收率 (RSD), % |
|------------|---------------------|------------|--------------|----------------|
| 60 | 60.41, 59.54, 59.52 | 59.82 | 99.7(0.8) | |
| 75 | 71.09, 67.15, 70.39 | 69.54 | 92.7(3.0) | 96.5(3.7) |
| 90 | 86.49, 86.45, 89.39 | 87.45 | 97.2(1.9) | |

2.6 样品含量测定结果

取同批鲑鱼降钙素肠溶胶囊样品 3 份各 20 粒, 将内容物取出后, 精密称量 30 mg, 加流动相 4 ml 溶解, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取 20 μl 进样, 记录峰面积, 用外标法计算降钙素的含量, 结果见表 2。

表 2 HPLC 法测定样品含量结果

Tab 2 Content determination of sample by HPLC

| 批号 | 样品号 | 标示量, % | 平均值, % | RSD, % |
|----------|-----|--------|--------|--------|
| | 1 | 101.20 | | |
| 20130601 | 2 | 99.47 | 99.96 | 1.08 |
| | 3 | 99.20 | | |

3 生物测定法

3.1 溶剂的制备^[5]

称取牛血清白蛋白 0.2 g, 加水 20 ml, 混匀, 置于 56 °C 水浴中保温 1 h, 取出放置于室温下, 于 -10~-20 °C 下冻存。实验前取出, 于 37 °C 水浴中将其融化。加入含有 2 g 醋酸钠的水溶液中, 加入浓盐酸约 3.5 ml, 再加水至总量近 200 ml, 用盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 至 3.5~4.5, 最后加水至 200 ml。

3.2 大鼠血钙测定法

采用眼眶取血的方法, 每次用 1.5 ml 离心管取 200 μl 的全血, 于 4 °C 冰箱静置 1 h 后, 以 4 000 r/min(离心半径为 5.5 cm) 离心 5 min。取 10 μl 的血浆与 10 μl 的去离子水在 600 μl 的离心管中涡旋混合, 然后取 10 μl 的混合液加入 96 孔板中, 加入 250 μl 的试剂(试剂为钙试剂盒自带)显色, 静置 5 min, 然后在酶标仪中测定, 波长设定为 610 nm。

3.3 钙离子标准曲线的制备

将钙离子标准液稀释为 1.2、1.0、0.625、0.25、0.125、0.062 5 mmol/L 的标准钙溶液进样测定, 以吸光度(y)为纵坐标、浓度(x)为横坐标得线性回归方程 $y=0.112\,9x+0.017\,3$ ($r=0.996$)。

3.4 剂量效应关系的确定

将降钙素对照品用“3.1”项下溶剂制成 1、5、10、20、50 mIU/ml 降钙素溶液(1 IU=0.166 μg), 然后对大鼠进行皮下注射, 大鼠给药前禁食 12 h。大鼠共分为 5 组, 每组 5 只, 每只按 0.4 ml/100 g 的剂量给药^[5]。在给药前和给药后的 30 min 分别取 200 μl 全血按大鼠血钙测定法测定, 得到各剂量(c)下的血钙比值(血钙比值=给药后血钙值/空白血钙值), 见表 3。

表3 降钙素的剂量-反应关系(n=5)

Tab 3 The dose-effect relationship of salmon calcitonin (n=5)

| c, mIU/ml | lgc | 血钙比值 |
|-----------|------|---------|
| 1 | 0.00 | 1.034 7 |
| 5 | 0.70 | 0.962 3 |
| 10 | 1.00 | 0.950 4 |
| 20 | 1.30 | 0.936 6 |
| 50 | 1.70 | 0.906 9 |

根据表3所得结果,以lgc(x)对血钙比值(y)进行线性回归,得回归方程 $y = -0.072 7x + 1.026 5$ ($r = 0.967 3, n = 5$)。可见,降钙素在1~50 mIU/ml范围内lgc与血钙比值具有线性关系,故可采用在此范围内的剂量进行生物效价测定实验。

3.5 鲑鱼降钙素肠溶胶囊生物效价测定^[9]

取大鼠20只,实验前禁食12 h,自由饮用水,按体质量随机分成4组,分别为标准溶液高、低剂量组(50、20 mIU/ml)和样品溶液高、低剂量组(50、20 mIU/ml),每组5只,进行双交叉实验,2个周期间隔3 d。按0.4 ml/100 g大鼠体质量腹部皮下注射相应剂量的标准溶液或样品溶液。注射后30 min眼眶取血。按大鼠血钙测定法进行测定,结果见表4。

表4 生物测定法测定样品的四点双交叉实验结果

Tab 4 Four-point double-cross bioassay results of sample

| 样品批号 | 组别 | 血钙比值 | | FL, % | 标示量, % |
|----------|----------|---------|---------|-------|--------|
| | | 第1周期平均值 | 第2周期平均值 | | |
| 20130601 | 标准溶液高剂量组 | 0.991 4 | 1.001 4 | 28.84 | 111.62 |
| | 标准溶液低剂量组 | 0.976 9 | 0.969 4 | | |
| | 样品溶液高剂量组 | 0.989 2 | 0.996 8 | | |
| | 样品溶液低剂量组 | 0.977 0 | 0.972 3 | | |

注:FL为可信限率

note:FL means fiducial limit

由表4结果可见,FL为28.84% < 45%,表明本实验符合《中国药典》对降钙素生物测定法的测定要求^[9],经换算后其含量相当于标示量的111.62%。

4 讨论

采用HPLC法测定鲑鱼降钙素肠溶胶囊的含量与该制剂的标示量较为接近;而采用生物测定法测定标示量结果为

111.62%,虽然符合《中国药典》对鲑鱼降钙素注射液所规定的鲑鱼降钙素效价标示量在90.0%~115.0%的要求^[9],但结果偏高,可能原因是处方中所使用的吸收促进剂对药物在体内的吸收产生了促进作用。另外,HPLC法与生物测定法相比,虽然生物测定法可以直接表明药物对人体的疗效^[6-7],但是该法在实验室需要进行动物实验,因此成本高、时间长,而且由于动物间的个体差异较大使得实验结果可信限较大、可信度低,且重现性较差。因此,生物测定法可能不适合鲑鱼降钙素肠溶胶囊内降钙素含量的测定。相反,由于HPLC法结果精密度高、重现性好、成本低,试验时间相较生物测定法明显缩短,且操作简便,所以值得推广使用。

参考文献

- [1] Sondergaard BC, Oestergaard S, Christiansen C, et al. The effect of oral calcitonin on cartilage turnover and surface erosion in an ovariectomized rat model[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(8): 2 674.
- [2] Shah RB, Siddiqui A, Shah G, et al. A validated HPLC assay for simultaneous analysis of salmon calcitonin and duck ovomucoid[J]. *Pharmazie*, 2003, 58(9): 620.
- [3] 杨惠光,唐天驷,李忠泽,等.鲑鱼降钙素治疗老年骨质疏松症的临床研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2008, 14(10): 751.
- [4] Rafferty B, Corran PH, Bristow A. Multicenter collaborative study to calibrate salmon calcitonin by bioassay and high-performance liquid chromatography: establishment of the third international standard[J]. *Bone*, 2001, 29(1): 84.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录122.
- [6] 吴伟明,陈佳丽,诸乐凯.高效液相色谱法测定鲑鱼降钙素喷鼻剂的含量[J]. *中国药业*, 2006, 15(18): 24.
- [7] 钱德明,沈根全,柯若伦.用大鼠血钙法测定降钙素生物效价的探讨[J]. *药物分析杂志*, 1994, 14(3): 30.

(收稿日期:2014-04-04 修回日期:2014-06-19)

《医疗器械注册管理办法》等五部规章发布

本刊讯 新修订的《医疗器械监督管理条例》(以下简称《条例》)已于2014年6月1日起施行。为配合《条例》的实施,在深入调研、多次论证、广泛征求各方意见的基础上,国家食品药品监督管理总局(简称“总局”)制订、修订了《医疗器械注册管理办法》《体外诊断试剂注册管理办法》《医疗器械说明书和标签管理规定》《医疗器械生产监督管理办法》《医疗器械经营监督管理办法》等五部规章。五部规章已于2014年6月27日经总局局务会议审议通过,7月30日分别以总局令4、5、6、7、8号公布,将于2014年10月1日起开始施行。

新制订、修订的五部规章贯彻了党中央、国务院关于建立最严格的覆盖全过程的食品药品监管制度、加快政府职能转变和深化行政审批制度改革的精神,坚持风险治理、全程治理、社会治理、责任治理、效能治理等理念,鼓励创新,突出企业责任,强化研制、生产、经营等环节的监管,通过对《条例》有

关规定的细化,使《条例》对医疗器械监管制度的总体设计真正“落地”。

五部规章按照医疗器械产品风险程度的高低,科学设定审批与备案制度,详细规定了产品注册(备案)以及企业生产、经营许可的条件、程序、时限,明确了企业的主体义务和责任,细化了说明书和标签的要求,强化了监管部门监督检查的手段和措施,严格了法律责任,为医疗器械注册(备案)和生产经营提供了明确指引,为加强医疗器械监管与治理提供了有力支撑。

五部规章的出台对于完善医疗器械监管法规体系、规范医疗器械市场秩序、促进医疗器械产业健康发展,保证医疗器械的安全有效、保障人体健康和生命安全具有重要意义。下一步,总局将积极开展五部规章解读和相关宣传培训工作,为规章的贯彻实施打下良好基础。