

HPLC法测定聚乳酸-乙醇酸载药支架上雷帕霉素的载药量

罗 琴*(大理学院资产与实验室管理处,云南大理 671003)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0823-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.36

摘要 目的:建立测定聚乳酸-乙醇酸载药支架上雷帕霉素载药量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Amthyst C₁₈,流动相为乙腈-水(90:10, V/V),流速为0.8 ml/min,检测波长为277 nm,柱温为40 ℃,进样量为20 μl。结果:雷帕霉素的质量浓度在59.04~157.44 μg/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.9996$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD分别为1.2%、2.72%、0.81%;平均加样回收率为102.85%,RSD为0.91%($n=9$)。结论:本方法操作简单、准确可靠,可用于测定聚乳酸-乙醇酸载药支架上雷帕霉素的载药量。

关键词 聚乳酸-乙醇酸载药支架;雷帕霉素;高效液相色谱法;含量测定

Loaded Content Determination of Rapamycin in Poly(lactic-co-glycolic) Acid Stents by HPLC

LUO Qin(Dept. of Assets&Laboratory Management, Dali University, Yunan Dali 671003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the loaded content determination of rapamycin in poly(lactic-co-glycolic) acid stents. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Amthyst C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (90:10, V/V) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 277 nm, and column temperature was 40 ℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: The linear range of rapamycin was 59.04-157.44 μg/ml ($r=0.9996$) with an average recovery of 102.85% (RSD=0.91%, $n=9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable, and it can be used for the loaded content determination of rapamycin in rapamycin-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid stents.

KEYWORDS Poly(lactic-co-glycolic) acid stents; Rapamycin; HPLC; Content determination

组织工程支架在组织和器官修复的过程中具有重要作用。雷帕霉素是一种亲脂性三烯含氮大环内酯类抗菌药物,具有抑制血管平滑肌增殖、抑制血管内膜增生的作用,是目前用于防治冠状动脉再狭窄的药物之一,以其高效、低毒及独特的作用方式引起了医学界的关注^[1-3]。近年来,雷帕霉素涂层支架技术用于预防介入治疗后冠状动脉再狭窄的效果良好^[4-6],聚乳酸-乙醇酸[Poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA]载雷帕霉素洗脱,支架的制备方法及其临床应用已成为了研究重点^[7-10]。本试验中,笔者通过色谱条件的优化和方法学验证,建立了采用高效液相色谱(HPLC)法对PLGA载药支架上雷帕霉素的含量进行测定的方法。

1 材料

LC-10A HPLC仪,包括LC-10A泵、DGU12A在线脱气机、SPD-10A检测器、SIL-10A自动进样器、CTO-10A柱温箱、CLASS-VP5.03色谱工作站(日本岛津公司);KQ3200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

雷帕霉素对照品(北京启维益成科技有限公司,批号:20080923,纯度:99.6%);PLGA高分子材料(大理学院实验中心制备,批号:081152);PLGA载雷帕霉素支架系统(大理学院实验中心制备,批号:090305-57、090307-61、090506-73、090509-13,支架理论载药量:480 μg/支);乙腈为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

* 助理实验师,硕士。研究方向:药物质量标准。电话:0872-2219982。E-mail:luoqinfly@163.com

色谱柱:Amthyst C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(90:10, V/V);流速:0.8 ml/min;检测波长:277 nm;柱温:40 ℃;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取雷帕霉素对照品25 mg,置于25 ml量瓶中,用乙腈定容至刻度,摇匀,放入4 ℃冰箱中保存,即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取PLGA载雷帕霉素支架1个,加入乙腈4 ml,静置1 h后,超声(功率:150 W,频率:40 kHz)提取10 min,用0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 PLGA溶液的制备 精密称取PLGA高分子材料25 mg,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.2.4 乙腈空白溶剂 取乙腈4 ml,用0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 专属性考察

取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液、PLGA溶液及乙腈空白溶剂各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,PLGA对雷帕霉素测定无干扰,该试验专属性良好。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 ml,分别置于10 ml量瓶中,用乙腈定容至刻度,摇匀,制得6份系列浓度溶液,按“2.1”项下色谱条件进样20 μl。以雷帕霉素质量浓度(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 $y=77051x-1E06$ ($r=0.9996$)。结果表明,雷帕霉素质量浓度在59.04~157.44 μg/ml范围与其峰面积呈

良好的线性关系。

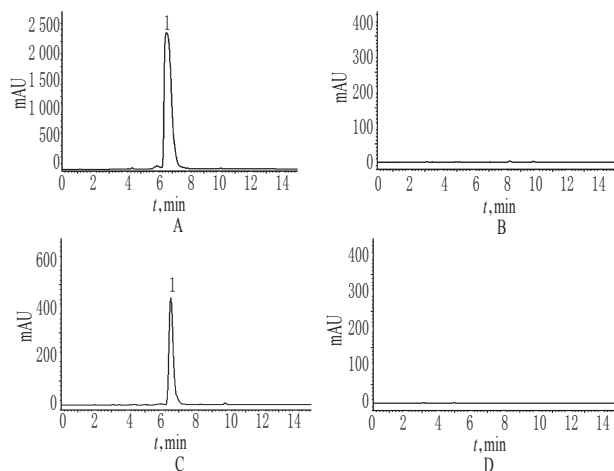


图1 高效液相色谱图

A. 对照品溶液; B. PLGA 溶液; C. 供试品溶液; D. 乙腈空白溶剂; 1. 雷帕霉素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control solution; B. PLGA solution; C. test sample solution; D. acetonitrile blank solvent; 1. rapamycin

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件重复进样6次。结果,雷帕霉素峰面积的RSD为1.2%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品(批号:090305-57)溶液适量,分别于放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时进样测定。结果,雷帕霉素峰面积的RSD为2.72%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:090305-57)5份,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20 μl。结果,雷帕霉素峰面积的RSD为0.81%,表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密量取按“2.2.2”项下方法制备的供试品溶液(批号:090305-57)500 μl,共9份,分别加入高、中、低不同量的雷帕霉素对照品溶液各3份,用乙腈定容至2 ml,用0.22 μm滤膜滤过,精密量取续滤液20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
60.150	63.960	126.570	103.85	102.85	0.91
60.150	63.960	127.040	104.58		
60.150	63.960	128.250	106.47		
60.150	71.832	133.840	102.59		
60.150	71.832	134.990	104.19		
60.150	71.832	134.090	102.94		
60.150	78.720	138.660	99.73		
60.150	78.720	139.150	100.36		
60.150	78.720	139.630	100.97		

2.9 样品含量测定

取4批样品,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按

“2.1”项下色谱条件测定,由线性方程计算样品溶液中含雷帕霉素的质量浓度,计算载药量(载药量=药物质量浓度×样品溶液体积),结果见表2。

表2 样品载药量测定结果(n=3)

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

批号	平均质量浓度, μg/ml	载药量, μg
090305-57	114.926 8	459.707 2
090307-61	120.300 3	481.201 2
090506-73	108.225 7	432.902 8
090509-13	91.064 4	364.257 6

3 讨论

本研究中的PLGA载雷帕霉素洗脱支架是采用喷涂法,将雷帕霉素与PLGA按10:90(质量比)制成的混合溶液,在氮气的环境下喷涂在基体上,制备完毕后晾干,真空干燥24 h,即得试验用PLGA载雷帕霉素洗脱支架。

在优化色谱条件时,依次对检测波长、流动相、流速、柱温进行考察。首先对雷帕霉素对照品溶液进行全波长扫描,发现在276.638 nm波长处有最大吸收,故选择277 nm作为检测波长。纯乙腈作流动相时,雷帕霉素的保留时间在5 min以内,易受到溶剂峰的影响,因此进一步考察乙腈-水比例分别为90:10(V/V)、80:20(V/V)、70:30(V/V)、65:35(V/V)作流动相时的色谱峰。结果,当以乙腈-水(90:10, V/V)为流动相时,色谱峰的理论板数、保留时间、分离度以及拖尾因子均较好,故选择乙腈-水(90:10, V/V)为流动相。流速分别为0.5、0.8、1.0、1.5 ml/min时的保留时间分别为10.549、6.571、5.237、3.424 min,可知当流速为0.8 ml/min时,保留时间适宜、分离度良好,故选择0.8 ml/min为流速。此外,本试验还依次考察了30、40、50、60 °C柱温的分离度,发现当柱温为40 °C时,色谱系统柱效较高、峰形较好、分离度较好,故选择40 °C为柱温。

在试验之初,采用1 mg/ml的雷帕霉素对照品进行测定,发现雷帕霉素在高质量浓度(1 mg/ml)时出现紫外吸收行为异常,最大吸收波长改变。一方面可能是因为浓度太大时的空间位阻效应使得共轭效应降低,从而使最大吸收波长发生移动;另一方面可能是浓度太大超过了紫外灯测量的范围,导致了吸收波形异常。

综上所述,本方法操作简单、准确可靠,可用于测定聚乳酸-乙醇酸载药支架上雷帕霉素的载药量。

参考文献

- [1] Haddadi A, Elamanchili P, Lacasanifar A, et al. Delivery of rapamycin by PLGA nanoparticles enhances its suppressive activity by dendritic cells[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84(4):885.
- [2] Schachner T, Zou Y, Oberhuber A, et al. Local application of rapamycin inhibits neointimal hyperplasia in experimental vein grafts[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(5):1 580.
- [3] 武延格,孙学峰,杨林,等.PLGA 支架讲解对血管化功能影响的体外研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 32(7):16.
- [4] Das S, Haddadi A, Veniamin S, et al. Delivery of rapamycin-loaded nanopartic down regulates ICAM-1 expression and maintains an immuno suppressive profile in human CD34⁺ progenitor-derived dendritic cells[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 85(4):983.
- [5] 陈宏林,尤庆生,孟小勇.HPLC法测定组织中雷帕霉素

高效分子排阻色谱法测定头孢曲松钠原料药中的聚合物

武少馨^{1*}, 张冬¹, 李香荷¹, 常 畅² (1. 河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2. 河北医科大学第四医院, 石家庄 050071)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0825-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.37

摘要 目的: 建立测定头孢曲松钠原料药中聚合物的方法。方法: 采用高效分子排阻色谱法。色谱柱为 TSK-GEL G2000SWXL, 流动相为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 [0.01 mol/L NaH₂PO₄ 溶液-0.01 mol/L Na₂HPO₄ 溶液 (38:62, V/V)]-乙腈 (95:5, V/V), 检测波长为 240 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μl, 流速为 0.6 ml/min。结果: 头孢曲松质量浓度在 0.56~28 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9997$); 精密度、重复性试验的 RSD ≤ 1.4%; 以头孢曲松计, 检测限为 0.2 ng, 定量限为 0.7 ng。该方法聚合物检测结果略高于 2010 年版《中国药典》方法。结论: 该方法专属性强、灵敏度高、重复性好, 可有效控制头孢曲松钠原料药中聚合物的量。

关键词 高效分子排阻色谱法; 头孢曲松钠; 聚合物

Determination of Polymers in Ceftriaxone Sodium by HPSEC

WU Shao-xin¹, ZHANG Dong¹, LI Xiang-he¹, CHANG Yang² (1. Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China, 2. Forth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of polymers in ceftriaxone sodium. METHODS: High performance size exclusion chromatography (HPSEC) was adopted. The determined was performed on TSK-GEL G 2000SWXL column with mobile phase consisted of 0.01 mol/L phosphate buffer solution [0.01 mol/L NaH₂PO₄ solution-0.01 mol/L Na₂HPO₄ solution (38:62, V/V)]-acetonitrile (95:5, V/V) at the flow rate of 0.6 ml/min. The detection wavelength was set at 240 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 10 μl. RESULTS: The linear range of ceftriaxone were 0.56-28 μg/ml ($r=0.9997$). RSD of precision and repetitive tests were ≤ 1.4%; counted by ceftriaxone, the limits of detection and quantization were 0.2 ng and 0.7 ng respectively. The quantity of polymers was little higher by new method than by the method stated in *Chinese Pharmacopeia* (2010 edition). CONCLUSIONS: The method is specific, sensitive and reproducible, and can control the quantity of polymers in ceftriaxone sodium effectively.

KEYWORDS High performance size exclusion chromatography; Ceftriaxone sodium; Polymers

头孢曲松钠为半合成的第三代头孢菌素。研究表明, β-内酰胺类抗生素引发的速发型过敏反应并非药物本身所致, 而是与药物中存在的高分子聚合物有关^[1-3]。β-内酰胺类抗生素

中的各种高分子杂质虽然结构不同, 但通常具有相似的生物学特性(如致过敏性), 故在质量控制中一般不需要对不同结构的聚合物进行逐一控制, 而只需控制其总量^[4]。头孢曲松钠

- 的含量[J]. 实用医药杂志, 2008, 25(7): 813.
- [6] Pan M, de Lezo JS, Medina A, et al. Rapamycin-eluting stents for the treatment of bifurcated coronary lesions: a randomized comparison of a simple versus complex strategy[J]. *Am Heart J*, 2004, 148(5): 857.
- [7] Kauffman KJ, Kanthameni N, Meenach SA, et al. Optimization of rapamycin-loaded acetalated dextran microparticles for immunosuppression[J]. *Int J Pharm*, 2012, 422(1/2): 356.
- [8] Pan CJ, Tang JJ, Weng YJ, et al. Preparation and charac-

- terization of rapamycin-loaded PLGA coating stent[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2007, 18(11): 2193.
- [9] Shi X, Chen G, Guo LW, et al. Periadventitial application of rapamycin-loaded nanoparticles produces sustained inhibition of vascular restenosis[J]. *PloS One*, 2014, 9(2): e89227.
- [10] Oliveira RR, Ferreira FS, Cintra ER, et al. Magnetic nanoparticles and rapamycin encapsulated into polymeric nanocarriers[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2012, 8(2): 193.

(收稿日期: 2014-03-06 修回日期: 2014-12-29)

(编辑: 陈宏)

* 主管药师。研究方向: 药物分析。电话: 0311-85212004-8047。
E-mail: wooshaoxin@126.com