

高效液相色谱法测定吲哚美辛缓释微球的含量

高颖¹, 吴艺君¹, 金蓉蓉², 陆丹红², 温俊^{2*}, 李文生¹

(1. 温州医学院附属眼视光医院, 浙江温州, 325027; 2. 温州医学院药学院, 浙江温州, 325027)

摘要 建立吲哚美辛缓释微球中吲哚美辛含量的高效液相色谱方法。采用 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm 5 μm), 以 pH 3.0 的 0.1 mol/L 冰醋酸溶液-乙腈 (20:80) 为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 320 nm, 进样量 20 μL, 用外标法测得。吲哚美辛在 2.0 ~ 80.0 μg/mL 范围内线性关系良好 ($r = 0.9999$), 平均回收率为 98.70%, RSD 为 1.50%。本方法灵敏度高, 操作简单可靠。

关键词 高效液相色谱法; 吲哚美辛; 含量测定

中图分类号 O657.7⁺²

文献标志码 A

文章编号 1005-8915(2012)02-0150-03

吲哚美辛是 (Indomethacin) 非甾体类药物之一, 直接抑制环氧化酶 (Cox) 活性, 阻止前列腺素的合成和释放, 对脂氧酶也有抑制作用, 从而减少白三烯 (LT) 生成^[1]。在临床上主要应用于治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎及强直性脊椎炎等, 如今在眼科应用逐渐被重视, 能维护血-眼屏障稳定性及抗炎作用, 同时能够抑制血管内皮生长因子^[2]。但是吲哚美辛在体内半衰期短, 不能长期维持有效的治疗浓度, 故缓释制剂的研制成为了热点^[3]。国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS-10001-(HD-1373)-2003 采用紫外分光光度法测吲哚美辛含量, 但由于缓释载体是高分子材料, 对吲哚美辛的含量测定产生干扰。本文参考文献^[4] 采用高效液相色谱法测定吲哚美辛的含量, 方法简便, 准确, 重复性好且高效。

1 仪器与试剂

安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪 (美国, 安捷伦公司), 包括 G1322A 在线脱气机、G1311A 四元泵、G1315D 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱、G1329A 自动进样器, 化学工作站 (Agilent chemstation, Rev. B. 01. 03. [204]); Discovery DV 215 CD 电子分析天平 (美国, 奥豪斯公司); Christ Alpha 1-4/2-4 LD plus 冷冻干燥机 (德国, Christ 公司); T10 型高剪切分散机 (德国, IKA 公司); RE-2000 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); N4PLUS 粒度分析仪 (美国贝克曼库特公司); 乙腈 (德国 Merck 公司, 色谱纯); 冰醋酸 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 超纯水

(Millipore 超纯水仪自制); PLGA (济南岱罡生物工程有限公司, 批号 2010110311); Eudragit RS100 (赢创罗姆药用树脂部, E070708187); 吲哚美辛原料药 (中国药品生物制品检定所, 100258-200904); PVA (Sigma, 30000-70000 醇解度 81% ~ 90%); 二氯甲烷 (西陇化工股份有限公司, 分析纯)。

2 方法

2.1 吲哚美辛微球的制备

采用 O/W 乳化溶剂挥发法制备微球, PLGA 和 Eudragit RS 按 1:3 比例分别称重 62.5 mg 和 187.5 mg, 吲哚美辛按照制得的微球总质量的 20% 和 30% 称量。将称得的 PLGA/Eudragit RS 和吲哚美辛溶解于 5 mL 有机溶剂二氯甲烷中做为油相, 在高剪切分散机 (5 档 × 10 min) 搅拌状态下将油相缓慢滴加入 2% 的 PVA 水溶液 50 mL 中, 将形成的乳液转移至旋转蒸发器, 在室温真空条件下蒸发 4 h, 挥干有机溶剂, 得到的乳液离心洗涤 3 次, 最后冷冻干燥。按此工艺在不同日期制备 3 批样品, 理论载药量分别为 20% (1 号-20100425)、30% (2 号-20100425)、30% (3 号-20100525)。其中, 理论载药量 = 吲哚美辛初始投入的质量 (mg) / 微球总质量 (mg)。

2.2 激光粒度仪

取少量冻干粉末, 分散在 150 mL 超纯水中, 超声 0.5 ~ 1 h, 使其充分分散。在室温下, 利用激光粒度仪检测微球的平均粒径。样品的浓度维持在 5×10^{-4} counts/s, 激光扫描角度 90°。

* 收稿日期: 2011-08-24 修回日期: 2011-12-05

基金项目: 1. 浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划) 资助项目 (No. 2010R413051); 2. 浙江省医药卫生科学研究基金资助项目 (No. 2009A138); 3. 温州市科技局面上项目资助 (No. Y20090014); 4. 温州医学院本专科学生科研立项资助课题 (No. wyx201001007)。

作者简介: 高颖, 女, 在读硕士, 电话: 13695895875, E-mail: gaoying.1987517@163.com。

* 通讯作者: 温俊, 女, 副教授, E-mail: terwj2004@yahoo.com.cn。

2.3 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol/L 冰醋酸溶液-乙腈 (20:80); 检测波长: 320 nm; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。在此色谱条件下, 吲哚美辛的出峰时间为 2.250 min, 理论塔板数为 4 569。

3 结果

3.1 微球粒径

以 PLGA 和 Eudragit RS 100 为载体材料的载药微球, 其平均粒径为 (2 588.3 ± 1 202.2) nm, 见图 1。

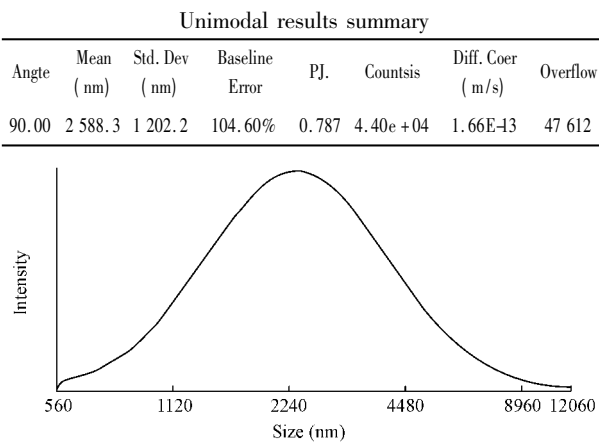


Fig 1 Particle size distributions of indomethacin PLGA/Eudragit RS 100 microspheres

3.2 对照品溶液制备

精密称取吲哚美辛对照品 4 mg, 置入加入 10 mL 容量瓶中, 加入流动相溶液定容, 超声溶解 0.5 h (功率 100%, 温度 20 °C), 再经过 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 做为对照品储存液。得到 400 μg/mL 的吲哚美辛对照品溶液。

3.3 阴性对照品溶液制备

精密称取 4mg 空白微球 (根据吲哚美辛微球投料比 20%) 置入加入 10 mL 容量瓶中, 加入流动相溶液定容, 超声溶解 0.5 h (功率 100%, 温度 20 °C)。再经过 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 作为阴性对照品储存液。

3.4 供试品溶液的制备

精密称取吲哚美辛微球 5 mg, 置 10 mL 容量瓶中加流动相定容, 超声溶解 0.5 h (功率 100%, 温度 20 °C)。再经过 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 即得供试品溶液。

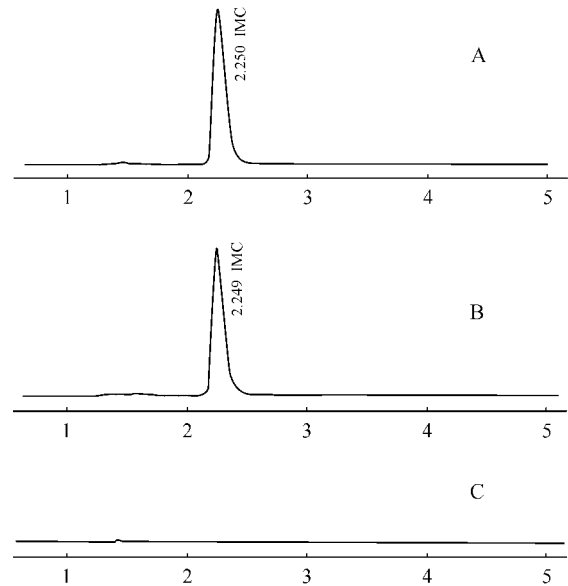
3.5 专属性考察

分别精密量取上述处理后得到的对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图谱。见图 2。

3.6 标准曲线绘制

吸取 400 μg/mL 上述对照品溶液分别进行梯度稀释至 80, 40, 20, 10, 5, 2 μg/mL。按上述色谱条件和测定方法各

进样 20 μL 进行测定。结果表明: 在 2.0 ~ 80.0 μg/mL 的浓度范围内线性关系呈良好线性。



Reference substance indomethacin (A); Sample from indomethacin-microspheres (B); Negative sample from bland microspheres without indomethacin (C)

Fig 2 The chromatograms of HPLC detective method

3.7 重复性试验

精密称取一定量同一批次的供试品 6 份, 按照上述制备供试品方法制备供试品溶液, 每份样品进样 1 次, 吲哚美辛峰面积的 RSD 为 0.92%, 说明使用该法重复性良好。

3.8 精密度试验

取对照品溶液, 按上述色谱条件和测定方法, 连续 6 次进样测定, 测定各组分的峰面积。吲哚美辛 RSD 为 0.36%。

3.9 稳定性试验

取供试品溶液, 分别于在 0, 2, 4, 6, 8 h 进样分别测定, 吲哚美辛峰面积的 RSD 为 0.49%, 说明此溶液较稳定。

3.10 回收率试验

按处方的比例配置低、中、高 3 种不同浓度的供试品, 精密称取一定量的吲哚美辛对照品及辅料, 每个浓度 3 份。放置于尖底试管中, 用流动相溶解漩涡 2 min, 经 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 再用流动相把样品稀释到一定浓度。进样 20 μL。吲哚美辛的平均回收率为 98.7%, RSD 为 1.50%。见表 1。

3.11 样品测定

精密称取吲哚美辛对照品及自制吲哚美辛缓释微球 3 个批次样品。每个批次精密称取 3 份。按上述方法, 进行梯度稀释至 20 μg/mL 用各峰面积的外标法计算各批中吲哚美辛的含量, 结果为 1 号-20100425 实测载药量为 (18.79 ± 1.00)%, 2 号-20100425 实测载药量为 (29.48 ± 2.12)%, 3 号-20100525 实测载药量为 (28.49 ± 1.48)%。

Tab 1 Recovery rate of the HPLC method ($n = 9$)

Concentration of the standard samples($\mu\text{g/mL}$)	Real concentration of the standard samples($\mu\text{g/mL}$)	Recovery rate (%)	Mean recovery rate (%)	RSD (%)
15	15.041	100.27	98.70	1.50
	15.052	100.35		
	15.043	100.29		
19	18.405	96.87		
	18.415	96.92		
	18.418	96.94		
22	21.768	98.95		
	21.765	98.93		
	21.734	98.79		

4 讨论

本品采用光电二极管阵列检测器,进行紫外扫描,吲哚美辛在 228 nm 和 320 nm 波长处有最大吸收峰,但在 320 nm 波长能在较短时间内达到良好基线,对于峰面积的准确积分提供必要条件,故选用 320 nm 波长作为检查波长。

随着流动相中乙腈的浓度的增加,吲哚美辛的保留时间明显提前。在理论塔板数符合正常检查要求下,选用了不干扰吲哚美辛出峰效果的最短出峰时间,故将流动相比例定为 0.1 mol/L⁻¹冰醋酸溶液-乙腈(20:80)。

在样品测定时 2 号样品的 RSD 值大于 2%,由于本样品是自制吲哚美辛缓释微球,将药物包裹在两组混合材料中,粒径在 3 μm 左右,首次尝试应用于眼科疾病治疗。分布在微球中的药物含量存在一定误差,也是造成 RSD 大于 2% 的原因之一。国家食品药品监督管理局(SFDA)国家药品标准 WS-40001-(HD-1373)-2003 中提到采用乙醇萃取吲哚美辛,

并用紫外分光光度法测吲哚美辛乳膏中吲哚美辛的含量。由于本研究的对象是吲哚美辛 PLGA/Eudragit RS 100 缓释微球,吲哚美辛略溶于乙醇,高分子材料不能完全溶解于乙醇中,使用乙醇萃取的方法不能完全萃取出包裹在微球内部的吲哚美辛,从而影响测量的准确度。本实验所采用的 HPLC 的方法专属性强,灵敏度高,并且可消除辅料的影响,有利于缓释制剂中药物含量的真实测定。

参 考 文 献

- [1] 杜军辉,王雨生,李蓉.眼局部应用非甾体类抗炎药的研究进展[J].临床眼科杂志 2009,17(3):284.
- [2] Wang HM,Zhang GY. Indomethacin suppresses growth of colon cancer via inhibition of angiogenesis *in vivo* [J]. *World J Gastroenterol.* 2005,11(3):340.
- [3] Heller J. Ocular delivery using poly(ortho esters) [J]. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005,57(14):2053.
- [4] 张晓璐,戴夕娣,丁建.高效液相色谱法测定复方吲哚美辛乳膏中吲哚美辛的含量[J].药物分析杂志 2007,27(8):1269.

HPLC Determination of Indomethacin Content in Indomethacin Microspheres

GAO Ying¹, WU Yi-jun¹, JING Rong-rong², LU Dan-hong², WEN Jun^{2*}, LI Wen-sheng¹

(1. Eye Hospital, School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China; 2. School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

Abstract Indomethacin microspheres were prepared by O/W solvent evaporation using PLGA and Eudragit RS 100, the mean diameters were $2\ 588.3 \pm 1\ 202.2$ nm. A HPLC method for determining indomethacin content in indomethacin microspheres was established. ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm \times 150 mm 5 μm) was used with mobile phase consisting of 0.1 mol/L glacial acetic acid (adjusted pH value to 3.0) -acetonitrile (20:80) and with a total flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$. The UV detection wavelength was 320 nm, with injection amount 20 μL . The indomethacin curve was linear in the ranges of 2.0 ~ 80.0 $\mu\text{g/mL}$ and the regression equation was $\text{Area} = 11.642 \times \text{Amt} + 0.762$, $r = 0.999\ 9$. The average recovery of indomethacin was 98.70%, and the RSD was 1.50%. The method appeared to be highly sensitive, accurate and simple. It can be used to determine indomethacin content in indomethacin microspheres.

Key words HPLC, Indomethacin, Assay