

RAM-HPLC测定兔眼房水中丝裂霉素 C的含量

高国敬,王登旭,李艳 (山东省聊城市药品检验所,山东 聊城 252000)

摘要:目的 测定兔眼房水中缓释丝裂霉素 C的含量。方法 使用 TSP高效液相色谱仪,Anastar工作站;分析柱:RAM(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(10:90),流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长:365 nm。结果 色谱峰分离度良好,丝裂霉素在 0.001~0.005 mg·mL⁻¹内线性关系良好,平均回收率为 99.1%,102.3%,103.6%,RSD为 3.3%,2.9%,1.8%。结论 本法准确简单,精密度好,是测定兔眼房水中缓释丝裂霉素 C释放过程的适宜方法。

关键词:丝裂霉素 C;高效液相色谱法;含量测定;缓释;房水

中图分类号:R917.101;R943.41

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2008)06-0531-03

作者简介:高国敬,男,副主任中药师

Tel:(0635)8535399

E-mail:wangdengxu@sohu.com

GAO Guo-jing WANG Deng-xu LI Yan (Liaocheng Institute for Drug Control, Liaocheng 252000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To simultaneously determine the concentration of mitomycin C (MMC) in aqueous of rabbit eyes. **METHODS** A direct injection method for determination of MMC in body fluid and solution by restricted-access media (RAM)-HPLC was developed. The mobile phase consisted of methanol-water (10:90) at a flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and detection wavelength of 365 nm. **RESULTS** MMC was well separated. The assay was linear between $0.001 - 0.005 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The average recovery was 99.1%, 102.3%, 103.6%, and the RSD was 3.3%, 2.9%, 1.8%. **CONCLUSION** The assay method is simple, reliable and can be used for the determination of MMC in rabbit eyes.

KEY WORDS mitomycin C; HPLC; content determination; sustained-release; aqueous

降低眼内压是目前治疗青光眼的其中一个主要措施,而滤过性手术是目前能够取得较低眼内压的最有效的方法^[1],滤过性手术中应用丝裂霉素 C 能够显著减少滤过道瘢痕的形成,提高手术成功率^[2]。目前常用方法为在巩膜床与巩膜瓣之间或(和)巩膜瓣与球结膜之间局部应用浸有 $0.2 \sim 0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素 C 的海绵片,时间为 $3 \sim 7 \text{ min}$ 不等,然后用 0.9% 氯化钠注射液冲洗术区。但该方法存在作用时间短,局部药物浓度高,产生过度抑制等作用,会给视功能带来新的威胁^[3],并且由于术者所取海绵片大小不同,致使丝裂霉素 C 剂量相差较大,尽管用统一的药物浓度和药物持续时间,不同术者术后并发症及效果并不相同^[4]。建立一套安全有效的载体系统是青光眼治疗领域中需解决的问题之一,理想的缓释系统,对瘢痕形成的全过程进行有效干预,提高药物疗效,并且对全身及局部不良反应降到最低。近年来可生物降解高分子材料受到了高度重视,其中聚(乳酸-羟基乙酸)共聚物 (PLGA) 是 FDA 批准用于人体的安全性可降解材料,将其作为辅料做成缓释制剂植入眼内,可克服上述直接用药的缺点。为了弄清 PLGA 携带药量和药物在眼内浓度的变化情况,需建立可行的分析方法测定丝裂霉素 C 体内的浓度,由于眼科用药的体内分析取样量少(房水取样),且样品中含有蛋白质等成分,进样前需进行生物样品的前处理,给分析带来了较大的困难。近年来,出现了各种类型的 HPLC 浸透限制固定相 (Restricted-access media, RAM) 用于体液的直接进样分析,其填料外表面有足够的亲水性,避免蛋白质变性,且很少被保留;填料孔径小,使蛋白质等大分子物质由于排阻作用首先洗脱;小分子物质以反相机理在之后获得分离,特别适用于样品量少的体液直接进样分析。本试验建立了一种测定兔眼房水中 PLGA 缓释丝裂霉素 C 含量的方法,为眼科用药提供理论依据,从而提高眼科手术的成功率。

1 仪器与试剂

P200 泵、UV1000 检测器 (美国 TSP 公司), Anashtar 工作站。丝裂霉素对照品 (购自中国药品生物制品检定所,批号: 0438-9501); 分析柱为 RAM ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)^[5], 甲醇为色谱纯,水为超纯水。注射用丝裂霉素 C, 2 mg 日本协和发酵株式会社,批号 391BBI。PLGA 缓释丝裂霉素 C 由合

肥工业大学药物控释研究所提供,缓释制剂呈深灰色圆柱状,规格为 0.02 mg 直径 1 mm ,长 2 mm ,预期释药时间为 1 周,按照自拟标准检验,符合规定;空白缓释系统由 PLGA 制成,密封,灭菌,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱: RAM ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 柱前带过滤器; 流动相: 甲醇-水 (10:90), 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长: 365 nm 。进样量 $10 \mu\text{L}$, 柱温为 25°C 。

在上述色谱条件下,丝裂霉素 C 保留时间为 6.1 min , 理论板数为 2600。

2.2 标准曲线与最低检测浓度

取自多只兔眼的房水混合后,丝裂霉素 C 配成浓度为 $0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准房水溶液。在上述色谱条件下分别进样 $10 \mu\text{L}$ 以峰面积 (X) 为横坐标,以进样浓度 (Y) 值为纵坐标进行线性回归 ($n=5$), 丝裂霉素 C 在房水中回归方程为: $Y = 68291X + 7265$, $r = 0.9993$ 。结果表明,丝裂霉素 C 在 $0.001 \sim 0.005 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,最低检测限为: $0.2 \mu\text{g}$ ($S/N=3$)。

2.3 空白试验

取空白房水 1 mL ,加 1 粒空白 PLGA,振摇溶解 5 min , $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后,取上部澄清液体进样。测定结果表明空白试验无干扰,结果见图 1。

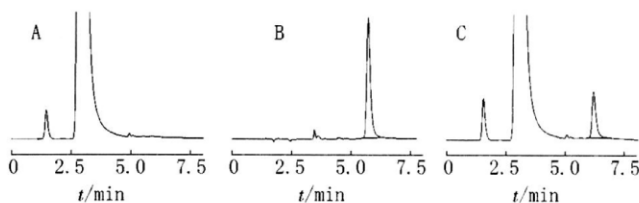


图 1 RAM-HPLC 法测定 MMC 色谱图

A-空白房水; B-丝裂霉素对照品溶液; C-样品溶液

Fig 1 Chromatograms of MMC

A- aqueous humor B- MMC standard solution C- sample solution

2.4 回收率

用兔眼房水配制高、中、低 3 种不同浓度的丝裂霉素 C 溶液各 3 份,用“2.1”进行测定,计算平均回收率为: 99.1%, 102.3%, 103.6%, RSD 分别为 3.3%, 2.9%, 1.8%。

2.5 精密度

用兔眼房水配制高、中、低 3 种不同浓度的丝裂霉素 C 溶液各 3 份,用“2.1”进行测定,考察精密度,高、中、低 3 种浓度的日内 RSD 为 2.2%, 2.5%, 2.9%; 日间 RSD 为 3.1%, 2.3%, 2.9%。

2.6 稳定性

取精密度项下中等浓度丝裂霉素 C 溶液 1 份,分别于 0, 0.5, 1, 2, 3 h 测定,丝裂霉素 C 峰面积的 RSD 为 2.7%。

2.7 样品制备与测定

取模拟青光眼滤过性手术、在巩膜床与巩膜瓣之间埋植 PLGA 缓释丝裂霉素 C 1 粒的兔子,分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d 时抽取房水 50 μL , 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后,取上部澄清液体 10 μL 进样。照外标法计算不同时间房水中药物的含量。结果丝裂霉素 C 的含量分别为 1.56, 1.25, 0.98, 0.81, 0.53, 0.20, 0.07 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 应用

笔者应用上述方法连续监控兔眼房水内缓释丝裂霉素 C, 发现在第 6 天时还可以检测到样品微量存在, 第 7 天时已经检测不到, 证明大致可以维持 6 d 的缓释期。

4 讨论

4.1 应用 RAM-HPLC 直接进样测定房水中 MMC 的含量, 该法不经样品前处理, 不但快速准确, 提高了分析度, 对眼科小样品量的试样的测定, 更具有重要意义。PLGA 作为药物

辅料已广泛应用, 用于眼科缓释药物载体未见报道, 在试验中我们成功手术埋植了丝裂霉素 C 缓释系统, 并且测定其在兔眼中有明显的缓释功效。

4.2 丝裂霉素 C 缓释系统在眼睛内产生的代谢途径还没有完全弄清楚, PLGA 在房水内的降解及其对组织的影响需进一步考察。

REFERENCES

- [1] WU L L, YIN J F. Application of Mitomycin C in refractory glaucoma filtration operation [J]. Chin J Ophthalmol (中华眼科杂志), 1996, 32(1): 32.
- [2] PALMER S S. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy [J]. Ophthalmology, 1991, 98(3): 317-321.
- [3] LIN H. Recent advances in anti-scarring for glaucoma filtration surgery [J]. Foreign Med Sci (Ophthalmol) (国外医学眼科学分册), 2004, 28(1): 25-28.
- [4] MEHEL E, WEBER M, STORK L, *et al.* A novel method for controlling the quantity of mitomycin-C applied during filtering surgery for glaucoma [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 1998, 14(6): 491-496.
- [5] MA J, XIE J W, JIA Z P, *et al.* Synthesis and evaluation of restricted access stationary phases [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1998, 35(5): 369.

收稿日期: 2007-12-03