

RP-HPLC 测定成骨生长肽鼻喷剂含量

张望刚, 叶小弟, 陈爱瑛, 郑高利*, 陈国神 (浙江省医学科学院药物研究所, 杭州 310013)

摘要: 目的 建立反相高效液相色谱法测定成骨生长肽鼻喷剂含量的方法。方法 Kromsoil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 A(含 0.1% 三氟乙酸)和蒸馏水 B(含 0.1% 三氟乙酸)(采用梯度洗脱, 比例为 0~25 min 时 A 从 20%~30%); 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 210 nm。结果 反相高效液相色谱法测定成骨生长肽的线性范围为 0.05~1.0 mg·mL⁻¹ (n=3), 线性方程为 $Y=14\,294X+90.2$, $r=0.999\,8$; 最低检测限为 6 μg·mL⁻¹; 日内、日间精密度高 (RSD<2.5%); 方法回收率为 (100.6 ± 1.6)%。结论 本方法专属性强, 重复性好, 回收率高, 可用于该制剂的含量控制。

关键词: 成骨生长肽; 鼻喷剂; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.4 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2009)06-0489-03

Determination the Content of Osteogenic Growth Peptide Nasal Spray by RP-HPLC

ZHANG Wanggang, YE Xiaodi, CHEN Aiyong, ZHENG Gaoli*, CHEN Guoshen (*Institute of Medica Materia, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China*)

ABSTRACT; OBJECTIVE To establish a RP-HPLC method for determination of osteogenic growth peptide(OGP) nasal spray. **METHODS** The Kromsoil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, the acetonitrile-water with 0.1% trifluoroacetate as mobile phase (gradient elution 0-25 min, acetonitrile: 20%-30%), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 35 °C, the detection wavelength was 210 nm. **RESULTS** The linear ranges of OGP was at 0.05-1.0 mg·mL⁻¹, the linear equation was $Y=14\,294X+90.2$, the correlation coefficient was 0.999 8, the least detective limit was 6 μg·mL⁻¹, the recovery of the method was (100.6 ± 1.6)% and the intra-day and inter-day RSD were less than 2.5%. **CONCLUSION** The method is reliable, accurate and sensitive. The results show that method can be used to control quality of products.

KEY WORDS: osteogenic growth peptide; nasal spray; HPLC; determination

成骨生长肽(osteogenic growth peptide, OGP)是以色列希伯莱大学 Itai Bab 教授等人于 1988 年从人和动物体内发现的一种能促进骨细胞生长的 14 个氨基酸组成的多肽, 其序列号为: Ala-Leu-Lys-Arg-Glu-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly^[1]。在体外, OGP 能够促进成骨细胞、成纤维细胞和人骨髓基质细胞增殖, 促进成骨细胞、人及兔的骨髓基质细胞碱性磷酸酶活性; 在体内, OGP 能促进大鼠骨形成和提高骨小梁质量^[2]。目前, 国内有两家公司正在进行 OGP 注射剂的研究, 而在国外, 意大利用于骨纤维化的 OGP 注射剂已经进入 I 期临床研究。作为骨质疏松症治疗药物, 需要长期, 频繁

用药, 从临床角度考虑, 静脉、肌肉或皮下注射均不方便且有疼痛感, 顺应性差, 难以在临床普遍推广。为此, 笔者研制了 OGP 鼻腔给药制剂, 以克服注射给药带来的诸多缺点。本试验建立了反相高效液相色谱法测定 OGP 鼻腔给药制剂中 OGP 含量的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统(安捷伦科技有限公司), 电子天平(感量 0.1 mg, METTLER), 超声波仪(SB3200)OGP 对照品(浙江省药品检验所标定, 含量>99.6%); OGP 原料(上海新生源, 含量 98.3%); OGP 鼻喷剂(自制, 0.2 mg·mL⁻¹); 乙腈

作者简介: 张望刚, 男, 助理研究员 Tel: 0571 (88215623) 研究员 Tel: 0571 (88215620) E-mail: gaoli-z@163.com

E-mail: zhangwgnian@126.com *通信作者: 郑高利, 男, 博士,

(TEDIA)、三氟乙酸(国药集团化学试剂有限公司)、水(重蒸水); 吐温-80(浙江省龙游县化工试剂厂); 羟丙基 β 环糊精(陕西德立化工有限公司); 杆菌肽(AMRESCO); 邻苯二甲酸氢钾(上海化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromsoil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: A 乙腈(0.1% 三氟乙酸)、水 B(0.1% 三

氟乙酸), 按 0~25 min 时 A 从 20%~30% 的比例梯度洗脱; 检测波长: 210 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μ L; 理论板数不低于 16 000。

2.2 专属性考察

分别配制处方量的成骨生长肽及其辅料吐温-80、羟丙基 β 环糊精、杆菌肽水溶液, 按“2.1”项下方法进样测定, 结果显示, 辅料峰对主峰无干扰, 结果见图 1。

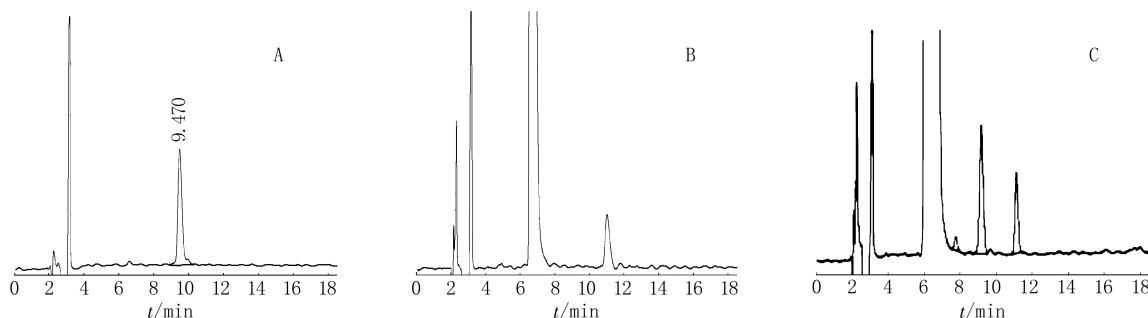


图 1 成骨生长肽水溶液(A)、不含成骨生长肽的空白溶液(B)、样品(C)的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of OGP (A), blank solution without containing OGP(B) and sample(C)

2.3 线性及范围

2.3.1 对照品贮备液配制 取成骨生长肽对照品 10 mg, 精密称定, 用水溶解并定容至 10 mL, 得 1.0 mg·mL⁻¹ 的贮备液, 放于 4 °C 冰箱中备用。

2.3.2 供试品溶液的准备 本实验中供试品溶液均用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后直接测定。

2.3.3 标准曲线的制备 取一定量 1.0 mg·mL⁻¹ 的对照品贮备液, 稀释成浓度为 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 mg·mL⁻¹ 的对照溶液, 按“2.1”项下方法进行分析, 以成骨生长肽的吸收峰面积(Y)对成骨生长肽浓度(X)回归, 得标准曲线 $Y=14\ 294 X+90.2$, $r=0.999\ 8$, 表明在 0.05~1.0 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好。以 S/N 为 3 计, 检测限为 6 μ g·mL⁻¹。

2.4 精密度试验

配制低、中、高(0.10, 0.40, 0.80 mg·mL⁻¹)3 个浓度各 5 份, 按“2.1”项下方法进行测定, 分别计算日内和日间精密度, 平均日内 RSD 为 1.3%(n=5), 平均日间 RSD 为 1.1%(n=5)。

2.5 加样回收率试验

按处方比例配制 0.05 mg·mL⁻¹ OGP 溶液 100 mL, 加入到 9 个 10 mL 量瓶中, 再分别在各量瓶中精密加入一定量 OGP 对照品, 使成高、中、低 3 个浓度, 按“2.1”项下方法进行测定, 结果见表 1。

2.6 溶液的稳定性

取 OGP 鼻喷剂, 按“2.1”项下方法测定, 于 12 h 内, 进样 5 次。峰面积 RSD 为 1.6%。

表 1 成骨生长肽鼻喷剂含量测定回收率试验(n=9)

Tab 1 Recovery of OGP nasal spray(n=9)

加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.52	0.53	101.92		
0.59	0.57	99.61		
0.55	0.54	98.18		
1.52	1.55	101.97		
1.56	1.60	102.56	100.6	1.6
1.51	1.54	101.99		
2.58	2.59	100.39		
2.53	2.53	100.00		
2.61	2.58	98.85		

2.7 重复性试验

取 5 份 OGP 鼻喷剂, 按“2.1”项下方法进样测定, 结果显示, 样品中 OGP 的平均含量为标示量的 99.6%, RSD 为 1.9%。

2.8 3 批样品含量测定结果

制备 3 批 OGP 鼻喷剂样品, 按“2.1”项下方法进样测定, 结果见表 2。

表 2 3 批样品的含量测定结果(n=3)

Tab 2 Results of three group sample determination (n=3)

批号	OGP 含量/%	平均值/%
071201	99.1±0.8	
071202	99.4±1.0	99.4
071203	99.8±1.0	

3 讨论

RP-HPLC 在选择检测波长时,经紫外-可见光分光光度计扫描, OGP 的最大吸收波长为 194.5 nm, 而在 200 nm 以下, 由于流动相乙腈会吸收产生干扰, 并且基线极不容易稳定, 经过初步预试验, 最后选择了 210 nm 作为最佳测定波长。

本实验流动相中加入了 0.1% 三氟乙酸, 改善了主峰峰形, 克服了拖尾问题。

采用本实验所建立的方法可以快速、准确地测

定成骨生长肽鼻腔给药制剂的含量。

REFERENCES

- [1] BAB I, GAZIT D, MUHLRAD A, et al. Regenerating bone marrow produces a potent growth promoting activity to osteogenic cells [J]. *Endocrinology*, 1988, 123(1): 345-352.
- [2] FEI Q M, CUI D F, CHEN T Y, et al. Synthetic osteogenic growth peptide stimulates osteoblast osteogenic activity and enhances fracture healing in rabbits [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*(生物化学与生物物理学学报), 2001, 33(4): 415-420.

收稿日期: 2008-08-01