

反相离子对高效液相色谱法 测定血浆中的溴新斯的明^①

熊华蓉 谭群友^a 李艺 胡霓霓 张景劼^②

(重庆医科大学药物高校工程研究中心和生物化学与分子药理学重点实验室 重庆市渝中区医学院路 1 号 400016)

^a(第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科中心 重庆市渝中区长江支路 10 号 400042)

摘要 建立了血浆中溴新斯的明的反相离子对高效液相色谱测定方法。血浆样品加沉淀剂苦味酸氢氧化钠溶液, 旋涡离心, 经四丁基氯化铵萃取后取上清液进样测定。色谱柱为 lichrospher C₁₈ (4.6mm×250mm, 5 μ m); 流动相为庚烷磺酸钠溶液(0.01mol/L, 磷酸二氢钠 0.013mol/L, 用磷酸调节 pH 3.0): 乙腈= 77: 23, V/V; 紫外检测波长 260nm; 流速 1.0mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。血浆中溴新斯的明的检出限为 0.005mg/L, 定量下限为 0.01mg/L。血浆中溴新斯的明的线性范围为 0.05—10.0mg/L, $r=0.9991$ 。本方法准确、专属性强, 适用于血浆中溴新斯的明的浓度测定。

关键词 反相离子对高效液相色谱法; 溴新斯的明; 血浆样品

中图分类号: O657.7² 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2011)03-0982-05

1 引言

溴新斯的明(Neostigmine bromide)具有可逆性胆碱酯酶抑制作用, 存在于胆碱能神经末梢, 可以兴奋平滑肌、骨骼肌, 临床用于治疗重症肌无力, 手术后腹部胀气和尿潴留, 还可以治疗视神经萎缩, 青少年假性近视等。

目前国内外关于注射剂和滴眼剂中溴新斯的明的含量测定已有文献报道^[1-3], 但有关其血浆中含量检测方法的研究非常少。本文用苦味酸沉淀血浆, 四丁基氯化铵萃取溴新斯的明, 并以庚烷磺酸钠作为离子对试剂, 采用反相离子对高效液相色谱-紫外检测法对血浆中溴新斯的明进行分析。本方法能很好地将溴新斯的明从血浆样品中提取出来, 并能很好地将药物与血浆中的内源性物质分离, 方法准确, 专属性强, 重现性好, 可以实现体内药物定量检测。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂及样品

LC-2010A HT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); TGL-16B 高速台式离心机(江苏省金坛市大地自动化仪器厂); pHS-3C 型 pH 测定仪(上海精科仪器有限公司); AB204-E 电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司); 单道可调量程微量移液器(芬兰 Dragon 公司); XW-80A Vortex 旋涡

① 教育部博士点基金资助项目(20095503120008); 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5092); 第三军医大学临床科研和科研创新基金(2007XG062, 2007XG60)

② 联系人, 电话: (023)68485161; 手机: (0)13308300303; E-mail: zjqrae01@163.com

作者简介: 张景劼(1973—), 女, 重庆市人, 教授, 博士, 主要从事药物新剂型与新技术研究工作。

熊华蓉(1985—), 女, 四川省遂宁市人, 在读硕士, 主要从事药物新剂型与新技术研究工作。

混合器(上海精科实业有限公司)。

溴新斯的明对照品(纯度 99.6%, 武汉远城科技发展有限公司); 溴吡斯的明(纯度 99.6%, 武汉远城科技发展有限公司); 甲醇、乙腈、庚烷磺酸钠为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。实验用水为超纯水由 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件^[4]

色谱柱: lichrospher C₁₈(4.6mm × 250mm, 5μm); 流动相: 庚烷磺酸钠溶液(0.01mol/L, 磷酸二氢钠 0.013mol/L, 用磷酸调节 pH 3.0) : 乙腈 = 77 : 23, V/V; 内标溶液: 溴吡斯的明(640μg/mL); 检测波长: 260nm; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30°C; 进样量: 20μL。

2.2.2 对照品溶液的配制

准确称取溴新斯的明标准品 20mg, 用超纯水溶解制备成含 200 mg/L 溴新斯的明的标准品贮备液, 于 4°C 冰箱中保存。临用时, 准确吸取贮备液适量, 用超纯水稀释至所需浓度, 即为溴新斯的明对照品溶液。

2.2.3 血浆样品预处理

准确吸取 200μL 血浆样品, 加入 20μL 内标溶液(640μg/mL), 再加入 0.1mol/L 苦味酸氢氧化钠溶液(pH 7.0) 100μL、0.1mol · L⁻¹磷酸二氢钠溶液 80μL、水饱和二氯甲烷 2.4mL, 涡旋 5min, 3000r/min 离心 10min, 有机相移至 15mL 离心管中, 加入 0.1mol/L 四丁基氯化铵溶液 200μL, 旋涡混合 30s, 3000r/min 离心 2min 取上层水相挥干后加入 100μL 流动相复溶, 涡旋 1min, 准确吸取上清液 20μL 进样分析。

3 结果与讨论

3.1 实验方法的选择

3.1.1 沉淀剂的选择

溴新斯的明的结构如图 1, 为离子化合物, 易溶于水, 故采用液-液萃取方式将其自血浆中萃取出来。实验中首先考察了仅用有机溶剂作为沉淀剂对血浆样品提取的影响, 共考察了 3 种有机沉淀剂: 甲醇, 乙腈和 V(乙腈) : V(甲醇) = 1 : 1 混合溶液, 沉淀剂的用量均为血浆体积的 2 倍。结果表明, 溴新斯的明受杂质干扰严重, 无法定量测定。参考文献[5], 采用 0.1mol/L 苦味酸氢氧化钠溶液(pH 7.0) 沉淀蛋白, 用水饱和二氯甲烷萃取药物, 再用 0.1mol/L 四丁基氯化铵溶液复萃取。因其为铵盐, 呈弱碱性, 易溶于稀酸, 故采用在酸性条件下沉淀蛋白, 液-液萃取蛋白的方法进行血浆样品预处理。溴新斯的明与血浆中的杂质得到了很好的分离, 可以定量测定。

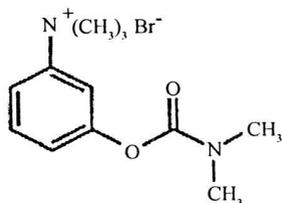


图 1 溴新斯的明的分子结构(C₁₂H₁₉BrN₂O₂, 303.20)

3.1.2 波长与流动相的选择

准确称取溴新斯的明标准品 20mg, 加水配制成浓度约 200mg/L 的溶液, 以水为空白, 按紫外分光光度法^[6] (中国药典 2005 版二部附录 IVA) 在 200—400nm 范围内进行紫外扫描, 溴新斯的明的最大吸收波长 260nm。因此采用紫外分光光度法选择 260nm 波长为检测波长测定溴新斯的明的含量, 光谱见图 2。溴新斯的明的极性较强, 在常规的反相柱上保留很弱, 因此本法加入庚烷磺酸钠作为离子对试剂, 使溴新斯的明与其形成中性的分子态物质, 进而增强溴新斯的明在柱子上的保留能力, 使药物峰能够与血浆中的内源性杂质较好分离, 并且药物峰的峰型也可以得到改善。以庚烷磺酸钠为离子对试剂, 采用反相离子对高效液相色谱对其血浆样品进行分离, 预实验检测结果较好。在此基础上, 进一步考察了流动相中庚烷磺酸钠溶液和乙腈的比例对溴新斯的明分析的影响。发现两者体积比为 77:23 时, 药物和内标分离度好。而流动相的 pH 对溴新斯的明分析也有影响, 当流动相 pH 为 4.0 时, 出峰时间延后且拖尾严重, 随着 pH 降低, 至 3.0 时药物和内标峰形均较尖锐。因此, 实验最终选择庚烷磺酸钠溶液 (pH 3.0): 乙腈= 77:23, V/V 为流动相。

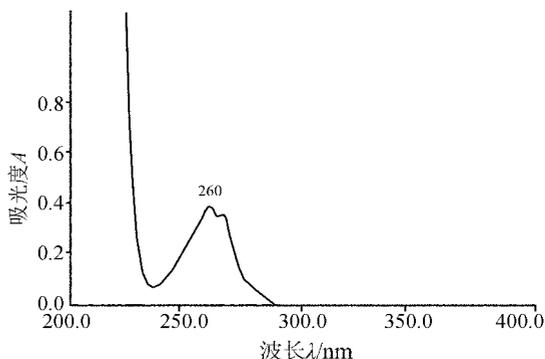


图 2 溴新斯的明的紫外扫描光谱

3.2 方法专属性考察

在“2.2.1”的色谱条件下, 测定空白血浆, 空白血浆加溴吡斯的明, 及血浆样品的色谱图。由图 3 可见, 溴新斯的明与内标和血浆中其他内源性杂质峰分离良好, 溴新斯的明峰保留时间约为 8.0min, 内标溴吡斯的明的保留时间约为 5.3min。

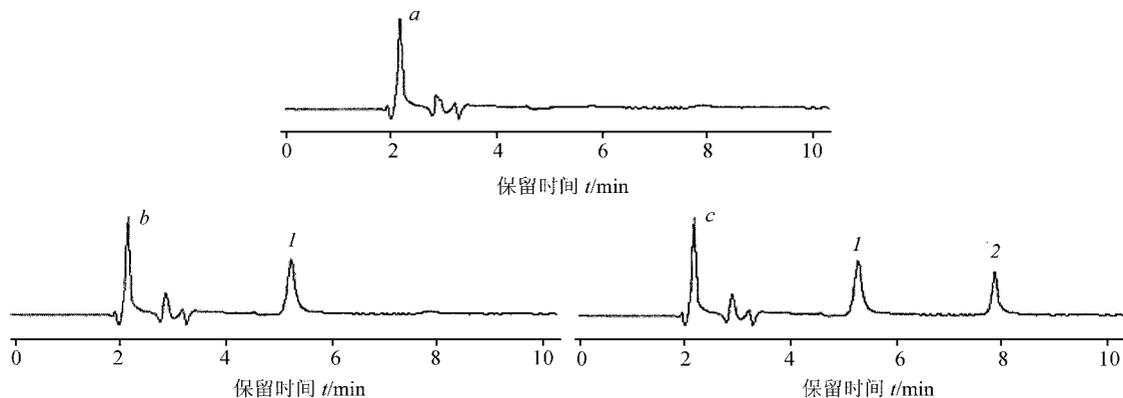


图 3 血浆中溴新斯的明及内标溴吡斯的明的色谱图

a——空白血浆; *b*——空白血浆+ 溴吡斯的明; *c*——血浆样品。

1——溴吡斯的明; *2*——溴新斯的明。

3.3 线性范围与检出限

准确吸取 200 μ L 空白血浆, 分别加入内标溶液 20 μ L, 准确量取溴新斯的明储备液适量, 配成血浆中药物质量浓度分别为 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0mg/L 的系列标准血浆样品。按

“2.2.3”血浆样品预处理的方法操作, 吸取 20 μ L 上清液进样分析, 记录峰面积。以溴新斯的明的质量浓度 *C* 为横坐标, 溴新斯的明的峰面积与内标溴吡斯的明的峰面积比值 *R* 为纵坐标, 进行线性

回归,得校准曲线方程 $R = 0.0295C + 0.0811$, $r = 0.9991$ 。结果表明,溴新斯的明在 $0.05\text{—}10.0\text{mg/L}$ 浓度范围内线性关系良好。

该色谱条件下,溴新斯的明的检出限按照信噪比为 $3(S/N = 3)$ 时的浓度计算,为 0.005mg/L ,定量下限按照信噪比为 $10(S/N = 10)$ 时,为 0.01mg/L 。

3.4 回收率与精密度

配制含药低、中、高 3 种不同浓度 ($0.1, 2.5, 10.0\text{mg/L}$) 的血浆样品,按“2.2.3”血浆样品处理方法操作,取 $20\mu\text{L}$ 上清液进样。每个浓度制 5 份,处理后的样品置于 -20°C 冰箱中保存,于一日内不同时间点进样测定,得到日内精密度;每个浓度每日进样一次,连续进样 5d,计算日间精密度。进样测定峰面积并代入回归方程,计算溴新斯的明的浓度,以测得值与加入值之比计算相对回收率。结果见表 1。

表 1 溴新斯的明在血浆中的日内、日间精密度与相对回收率 (n=5)

理论浓度	日内精密度		日间精密度		方法回收率 (%)
	实测浓度 (mg/L)	RSD (%)	实测浓度 (mg/L)	RSD (%)	
0.1	0.090 ± 0.008	8.9	0.088 ± 0.008	9.5	91.52 ± 3.1
2.5	2.44 ± 0.085	3.5	2.37 ± 0.194	8.2	97.44 ± 1.2
10.0	9.73 ± 0.156	1.6	9.69 ± 0.116	1.2	97.26 ± 2.0

3.5 样品稳定性考察

将含溴新斯的明质量浓度为 10.0mg/L 的血浆样品, -20°C 和反复冻融条件下(每次冰冻 2h,取出后于 $20^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下放置 0.5h) 存放不同时间后,按“2.2.3”血浆样品预处理方法操作,测定溴新斯的明含量,以考察血浆样品放置的稳定性,结果见表 2。

表 2 含溴新斯的明血浆样品的稳定性 (n=5)

存放条件	时间	测得值 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	存放条件	次数 n	测得值 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
室温	0h	9.82 ± 0.163	1.7	冻融实验	1	9.86 ± 0.197	2.0
	6h	9.62 ± 0.284	3.0		2	9.69 ± 0.248	2.6
	12h	9.54 ± 0.448	4.7		3	9.53 ± 0.435	4.6
	0d	9.73 ± 0.156	1.6				
-20°C	5d	9.65 ± 0.196	2.0				
	10d	9.46 ± 0.378	4.0				

4 结论

实验结果表明,用苦味酸作沉淀剂,四丁基氯化铵为萃取剂,庚烷磺酸钠作为离子对试剂,采用反相离子对高效液相色谱-紫外检测法测定血浆中溴新斯的明的含量,检测波长 260nm ,能够保证药物有较高的灵敏度,方法简便、快捷、线性关系良好、重现性好、专属性好、准确度高,能够满足对血浆中溴新斯的明的含量测定要求。

参考文献

- [1] 岳昌林,毛黎静,郭忠. RP-HPLC 测定注射用甲硫酸新斯的明含量的方法学研究[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(10): 1264—1265.
- [2] 林晨,宋晓燕. RP-HPLC 法测定甲硫酸新斯的明注射液的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(6): 51—53.
- [3] 唐琦文,江峰,蒋国胜. 高效液相色谱法测定复方新斯的明滴眼液中甲硫酸新斯的明的含量[J]. 中国药师, 2006, 9(10): 942—943.

- [4] Varin F, Couture J, Gao H. Determination of Neostigmine in Human Plasma and Cerebrospinal Fluid by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection[J]. *Journal of Chromatography B*, 1999, **723**(1-2): 319-323.
- [5] De Ruyter M G, Cronnelly R. Reversed-Phase, Ion-Pair Liquid Chromatography of Quaternary Ammonium Compounds: Determination of Pyridostigmine, Neostigmine and Edrophonium in Biological Fluids[J]. *J. Chromatogr.*, 1980, **183**(2): 193-201.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 附录 22.

Determination of Neostigmine Bromid in Plasma by Reversed Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography

XIONG Hua-Rong TAN Qun-You^a LI Yi HU Ni-Ni ZHANG Jing-Qing

(*Medicine Engineering Research Center, Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology,*

Chongqing Medical University, Chongqing 400016, P. R. China)

a(Daping Hospital & Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China)

Abstract Neostigmine bromide in plasma was precipitated with picric acid sodium hydroxide solution before vortex, and was extracted with tetrabutylammonium chloride. After centrifuging, the supernatant was determined by reversed phase ion-pair HPLC with a lichrospher C₁₈ column (4.6mm × 250mm, 5 μm), and 77% 0.01mol/L heptane-1-sulfonic acid sodium salt solution (pH was adjusted to 3.0) and 23% acetonitrile as mobile phase. The detection wavelength was 260nm, flow rate was 1.0mL/min and the column temperature was 30°C. The detection limit of neostigmine bromide was 0.005mg/mL, the quantitation limit of neostigmine bromide in plasma was 0.01mg/L. The linear range of the neostigmine bromide plasma was 0.05—10.0mg/L, with $r = 0.9991$. The method is rapid, accurate for determination of neostigmine bromide in plasma.

Key words Reversed Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography; Neostigmine Bromide; Plasma Sample

如何上网查阅核心期刊发表的论文

(你的论文在发表之后两个月左右,上网才能检索到)

1. 在浏览器的地址栏上输入“核心期刊”。当出现菜单后,点击“核心期刊目录”,再点击“中文核心期刊要目总览(2008版)”,即可查阅各学科的“核心期刊”。若要查阅《光谱实验室》,请查第4编:自然科学,再查06/07—化学/晶体学,第21号即是。

也可以在浏览器的地址栏上输入 www.google.cn 或 www.baidu.com,再输入“核心期刊”后,点击“中文核心期刊要目总览(2008版)”,即可查阅各学科的“核心期刊”。

2. 上中国期刊网,点击“核心期刊导航”。

1) 在浏览器上输入 www.cnki.net 然后回车,进入中国知网(即中国期刊网)首页。

2) 找到“学术文献总库特色导航”,点击“期刊大全(9268种)”,进入“中国学术文献网络出版总库”。

3) 点击左侧“核心期刊导航”,首页出现后,找到“第四编自然科学(351种期刊)”,即可查阅自然科学各学科的“核心期刊”。若要查阅《光谱实验室》,请点击“化学/晶体学类”,出现期刊的“图形方式”(即期刊的封面)后,在第1页的第3排左起第2图即为《光谱实验室》。点击《光谱实验室》即可查阅有关内容。