

柱前衍生化 HPLC 测定大鼠血浆中的盐酸美金刚胺

粟立, 毛惠英, 张丹*, 曹俊涵, 陈文芝

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立测定大鼠血浆中盐酸美金刚胺浓度的方法。方法 采用柱前衍生化 HPLC-UV 法, 色谱柱为 Luna C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm 5 μm), 流动相为甲醇-水-三乙胺 (70:30:0.5, 磷酸调 pH7), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 225 nm; 以盐酸金刚烷胺为内标, 采用液-液萃取法, 经衍生化后进样测定。结果 大鼠血浆中的内源性成分对美金刚胺的测定无干扰; 美金刚胺 0.14~9.20 μg·mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好 ($r = 0.9950$), 低、中、高浓度样品的平均提取回收率分别为 83.46%、80.34%、82.77%, 平均方法回收率分别为 112.01%、99.96%、99.10%, 日内 RSD 分别为 10.24%、8.97%、6.94%, 日间 RSD 分别为 12.10%、8.77%、4.60%。结论 所建方法灵敏、准确, 可为盐酸美金刚胺的体内研究提供参考。

关键词: 高效液相色谱法; 柱前衍生化; 美金刚胺; 血药浓度

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2009)06-0649-02

Determination of Memantine hydrochloride in rats' plasma by pre-column derivation-HPLC

SU Li, MAO Hui-ying, ZHANG Dan*, CAO Jun-han, CHEN Wen-zhi

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish a pre-column derivation-HPLC method for the determination of Memantine hydrochloride (MH) concentration in rats' plasma. **METHODS** The concentrations of Memantine hydrochloride in rats' plasma were measured by RP-HPLC after extraction with dichloromethane and derivated with amantadine. Separation and determination were achieved on a Luna C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm 5 μm) with the mobile phase of methanol-water-triethylamine (70:30:0.5). The UV detection wavelength was set at 225 nm. The fluid speed was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** There was no interference found during the determination. Good linear relationship of the Memantine hydrochloride was obtained between 0.14 to 9.20 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9950$). The mean method recovery were 112.01%, 99.96%, 99.10%. Extraction recovery were 83.46%, 80.34%, 82.77%. The RSD within-day were 10.24%, 8.97%, 6.94%. The between-day RSD were 12.10%, 8.77%, 4.60%, respectively. **CONCLUSION** The methods are sensitive, accurate with a wide line, and suitable for the internal study of Memantine hydrochloride.

Key words: HPLC; Pre-column derivatization; Memantine; Plasma concentration

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2009)06-0649-02

盐酸美金刚胺为金刚烷胺 3,5-二甲基的衍生物, 为非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 拮抗剂, 在治疗阿尔茨海默氏病和血管性痴呆方面具有显著疗效^[1]。测定其含量的方法有 HPLC 和比色法^[2-3], 其体内分析方法尚未见文献报道, 因此, 文中建立了简便、准确的柱前衍生化 HPLC 法测定大鼠血浆中的盐酸美金刚胺。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-10ATvp 型高效液相色谱系统 (日本岛津)。盐酸美金刚胺 (含量 99.5%, 四川大学化学学院); 盐酸金刚烷胺 (内蒙古元和药业有限公司, 批号: 070701); 甲醇为色谱纯; 其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Luna C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相为甲醇-水-三乙胺 (70:30:0.5, 磷酸调 pH7), 检测波长为 225 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹。理论板数按盐酸美金刚胺衍生物峰计应不低于 3×10^3 ; 色谱峰与相邻杂质峰的分离度应符合要求。

1.2.2 内标溶液的制备 将盐酸金刚烷胺胶囊内容物用适量甲醇溶解后过滤, 取续滤液, 用甲醇稀释至 100 mL, 即为 1 mg·mL⁻¹ 内标贮备液。置 4℃ 下保存, 临用时稀释至 10 μg·mL⁻¹ 内标溶液即可。

1.2.3 血浆样品的制备与测定 取 100 μL 大鼠血浆, 加入 10 μL 内标溶液、100 μL 2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 混匀, 加入 500 μL 二氯甲烷, 混合 10 min, 于 1.2×10^3 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取下层澄清液, 于

作者简介: 粟立, 女, 正攻读药物分析专业的硕士学位。

* 通信作者 (Correspondent author), Email: zdan321@126.com

40℃下挥干,加50 μL 苯甲酰氯丙酮液、5 μL 三乙胺,混匀后,于4℃下避光放置30 min,60℃下挥干,残渣用50 μL 流动相溶解,按“1.2.1”项的方法,取20 μL 进样测定,记录色谱图。

1.2.4 专属性考察 取空白血浆和内标+盐酸美金刚胺+空白血浆,按“1.2.1”项的方法测定(图1)。由图1可知:大鼠血浆中内源性成分及其他成分不干扰盐酸美金刚胺的测定。

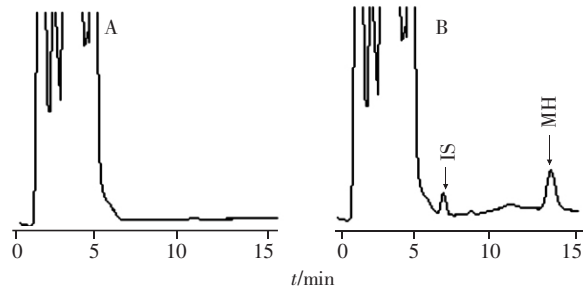


图1 空白血浆(A)、内标+盐酸美金刚胺衍生物+空白血浆(B)溶液的色谱图

Fig 1 Chromatograms of blank plasma solution (A) and blank plasma solution with the Memantine hydrochloride derivative and internal standard (B)

1.2.5 线性关系、范围及定量限 量取一定体积、不同浓度的盐酸美金刚胺溶液,于60℃的水浴中挥干后,分别加入100 μL 空白大鼠血浆,漩涡混合1 min,制成0.14、0.29、0.58、1.15、2.30、4.60、9.20 mg·L⁻¹的盐酸美金刚胺血浆标准样品溶液。按“1.2.3”项的方法处理与测定,记录内标和盐酸美金刚胺的峰面积。以待测组分与内标的峰面积比值对浓度进行线性回归,得回归方程为:Y=0.735X-0.056 (r=0.9950 n=7)。试验结果表明:盐酸美金刚胺0.14~9.20 μg·mL⁻¹与峰面积比的线性关系良好,定量限为5.75 ng。

1.2.6 精密度试验 按“1.2.5”项的方法制备0.29、1.15、4.60 mg·L⁻¹低、中、高浓度的盐酸美金刚胺的血浆对照样品,每种浓度平行制备5份,在日内不同时间测定。记录待测组分的峰面积与内标峰面积的比值,代入回归方程,计算出盐酸美金刚胺的浓度,并进行日内精密度考察。同法在7 d内不同日平行制备并测定上述样品5份,进行日间精密度考察。结果显示:低、中、高浓度样品的日内RSD分别为10.24%、8.97%、6.94%,日间的RSD分别为12.10%、8.77%、4.60%。

1.2.7 回收率试验 按“1.2.5”项的方法,制备低、中、高浓度的盐酸美金刚胺血浆对照样品,照“1.2.3”项的方法处理与测定,记录待测组分的峰面积(Y)。另取等量的低、中、高浓度的盐酸美金刚

胺溶液,加入10 μL 内标溶液,于60℃水浴中空气流挥干后,照“1.2.3”项从“加50 μL 苯甲酰氯丙酮液……”进行衍生化处理及测定,记录待测组分的峰面积(Y₀)。比较Y与Y₀,计算盐酸美金刚胺的提取回收率,每种浓度平行制备3份(表1)。按以上方法处理与测定,3种浓度平行操作3次,记录待测组分峰面积与内标峰面积的比值,代入回归方程,计算盐酸美金刚胺的浓度。以测得浓度与加入浓度的比值计算盐酸美金刚胺的方法回收率(表1)。

表1 大鼠血浆中盐酸美金刚胺的回收率

Table 1 Recovery of Memantine hydrochloride in rat's plasma

Concentration mg·L ⁻¹	Extraction recovery		Method recovery	
	$\bar{X}/\%$	RSD/%	$\bar{X}/\%$	RSD/%
0.29	83.46	4.1	112.01	4.47
1.15	80.34	2.23	99.96	2.05
4.6	82.77	11.58	99.10	3.23

1.2.8 稳定性的考察 按“1.2.5”项的方法,制备低、中、高浓度的血浆对照样品若干份,分别在室温、冻融和-20℃下避光放置,定期取样。按“1.2.3”项的方法处理与测定,考察待测组分的稳定性。血浆样品在室温下避光放置4 h、两个冻融周期、-20℃下保存30 d后,药物含量均值的RSD分别为12.30%、8.87%、8.72%,末次相对误差分别为-1.78%、-1.86%、-1.95%。结果表明:血浆样品分别经两个冻融周期和-20℃下保存30 d后,盐酸美金刚胺的浓度基本稳定。鉴于血浆样品解冻后在室温下放置4 h后含量均值的RSD较大,因此,对解冻后的血浆样品均应尽快预处理,避免药物的降解。

2 讨论

由于盐酸美金刚胺无紫外吸收,采用柱前衍生化法使其生成衍生物,增大其紫外吸收和脂溶性,再用HPLC-UV法检测。曾用2,4-二硝基氟苯为衍生化试剂,但未获得稳定的吸收峰^[2]。盐酸美金刚胺可与酰氯类发生亲核取代反应转化为芳香衍生物,故采用苯甲酰氯为衍生化试剂。试验所采用的检测波长是将衍生化产物经色谱分离后测定峰面积,再依据不同测定波长下盐酸美金刚胺峰面积的大小来选择。

参考文献:

- [1] 葛孝忠,应黄慧,陈晓,等.金刚烷类药物的研究进展[J].中国医药工业杂志,2003,34(11):583-586.
- [2] 钦晓峰,周杏琴,曹国宪,等.盐酸美金刚胺含量分析方法的研究[J].光谱实验室,2005,22(2):298-300.
- [3] 严相平,杜云.比色法测定盐酸美金刚片含量[J].江苏药学与临床研究,2006,14(1):25-26.

收稿日期:2008-11