

高效液相色谱法测定咪达唑仑在小鼠体内的分布

丁连发 洪燕敏 井连平 董伟林* (天津医科大学 天津 300070)

摘要:目的 采用 HPLC 测定咪达唑仑在小鼠体内的分布情况。方法 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 甲醇-水(含 0.1% 二乙胺, 0.05% 磷酸溶液, 60:40) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 225 nm。以三唑仑为内标物, 按内标法定量。结果 咪达唑仑在 5 ~ 400 ng · mL⁻¹ 内线性关系良好($r = 0.9993$), 咪达唑仑最低检测质量浓度为 2.5 ng · mL⁻¹, 平均回收率为(96.95 ± 1.8)%, 日内及日间的 RSD 均小于 2%。结论 本方法具有快速、简便、灵敏、准确、经济等特点, 适用于测定咪达唑仑在小鼠体内的分布, 为该药物的临床检测提供依据。

关键词: 咪达唑仑; 高效液相色谱法; 血药浓度分布

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)24-1943-03

Determination of Midazolam in Mouse Plasma Serum Concentration Distribution by Reversed-Phase HPLC

DING Lian-fa, HONG Yan-min, JING Lian-ping, DONG Wei-lin* (Tianjin Medical University, Tianjing 300070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Determination by HPLC of midazolam in mouse distribution, and the method was applied to detect midazolam in mouse distribution. **METHODS** The analytical column was packed with Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) the mobile phase was methanol-water 60:40, containing 0.1% diethyl amine, 0.05% phosphoric acid, the flow rate was 1 mL · min⁻¹, and detection wave length was set at 225 nm, with the triazolam as the internal standard, according to the internal standard to quantitate.

RESULTS The linear ranges were 5 - 400 ng · mL⁻¹ for midazolam in human plasma. The correlation coefficients were 0.9993. The midazolam low limit of detection was 2.5 ng · mL⁻¹. The method recoveries were (96.95 ± 1.8)%. Within-day and between-day RSD were less than 2%. **CONCLUSION** The method is rapid, simple, sensitive, accurate and economic, and applied to provide basis for clinical testing for midazolam in mouse distribution.

KEY WORDS: midazolam; HPLC; serum concentration distribution

咪达唑仑又名咪唑安定,是一种短效的水溶性苯二氮 \square 类镇静催眠药,具有稳定性高、起效快、毒性低等优点。小剂量手术局麻时常作为镇静催眠药,较高剂量则用于全身麻醉的诱导剂,已广泛应用于临床麻醉中。近年来临床实践证明,咪达唑仑持续静脉滴注对控制儿童癫痫持续状态有确切疗效,持续静脉滴注可使其浓度维持在一个稳定的范围,防止惊厥复发及血药浓度波动对中枢神经系统的不良影响,但长时间静脉滴注可使其血浆半衰期显著延长。当使用高剂量咪达唑仑作诱导麻醉时,药效学方面存在较大的个体差异^[1-3],因此,研究血浆中咪达唑仑浓度测定方法具有十分重要的意义。对于血浆咪达唑仑浓度测定文献^[4-9]多有报道。本实验从临床毒物检测角度研究建立高效液相色谱法测定咪达唑仑在小鼠体内的分布浓度,通过对小鼠体

内不同剂量给药和检测给药后不同时间药物的分布情况,取得了大量科学数据。为该药的研究建立了简便、准确的科学分析方法。

1 实验方法

1.1 仪器

美国科美特高效液相色谱仪(包括:6000LDI 精密恒流泵,6000PVW 紫外/可见检测器,Rheodyne7725i 型进样阀,Anastar 色谱工作站);Kromasil C₁₈柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm,天津市琛航科学仪器有限公司);BFX5-320 型台式离心机(河北省安新县白洋离心机厂);MSB010.CX2.5 型台式高速离心机(Sanyo 公司);三环牌 YKH-1 型液体快速混合器(江西医疗器械厂);PB153-S 型电子分析天平(瑞典梅特勒-托利多);C-9860A 超声波清洗器(天津市科贝尔光电技术有限责任公司);HGC-

作者简介:丁连发,男,讲师 研究方向:法医毒物 * 通讯作者:董伟林,男,高级实验师 研究方向:药物监测 Tel/Fax:(022) 23522636 E-mail: dongwl119@163.com

12A 氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司); Milli-pore-Q 超纯水装置; 20~200 μL 微量加样器(上海大龙医疗有限公司); 100 μL 微量进样器(上海高鹤工贸有限公司)。

1.2 药品和试剂

马来酸咪达唑仑对照品(中国药品生物制品检定所,批号:171250-200401),咪达唑仑片(15 mg,江苏恩华药业集团有限公司,批号:20100101),三唑仑对照品(内标,中国药品生物制品检定所,批号:171250-200602),甲醇为色谱纯;超纯水;空白血浆(天津市血液中心);生物样品为新鲜的、经低温速冻的小鼠的血浆和组织(天津医科大学司法医学鉴定中心)。其余试剂均为市售分析纯。

1.3 血浆及组织中咪达唑仑的 HPLC 测定法建立

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(含 0.1% 二乙胺, 0.05% 磷酸溶液 60:40), 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 紫外检测波长 225 nm。以三唑仑为内标物,按内标法定量。

1.3.2 血浆中咪达唑仑标准工作曲线制备 取空白血浆 0.5 mL,精密加入不同量的咪达唑仑对照品储备液,使其质量浓度分别为 0, 5, 10, 50, 100, 200 和 400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,加 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 0.1 mL 和内标三唑仑 0.2 mL (250 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲醇配制),混匀后加入异丙醇-乙酸乙酯(2:8) 混合液 1.0 mL,涡旋振荡 2 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 2 min。重复提取 2 次,取上清液置 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温氮吹仪,用 N_2 吹干。残留物用流动相 200 μL 复溶,涡旋振荡 2 min, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,高速离心 2 min,进样量为 20 μL 。用内标法峰面积比值进行定量分析,在上述色谱条件下咪达唑仑与内标具有良好的分离度,其他组分无干扰。血浆中咪达唑仑工作曲线回归方程: $Y = 0.0118X + 0.0233$ $r = 0.9993$ ($n = 3$)。

1.3.3 各脏器组织的标准曲线制备 分别精密称取空白小鼠肝、脑等脏器组织 0.2 g,加入咪达唑仑标准储备液适量,制备组织匀浆,使其成为含有咪达唑仑 0, 5, 10, 50, 100, 200 和 400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的组织匀浆供试液,按“1.3.2”项下操作,利用内标法峰面积比值进行线性回归,得各脏器组织中咪达唑仑回归方程,肝组织中咪达唑仑工作曲线回归方程: $Y = 0.0119X + 0.0119$ $r = 0.9995$ ($n = 3$); 脑组织中咪达唑仑工作曲线回归方程: $Y = 0.0118X + 0.0209$ $r = 0.9995$ ($n = 3$)。

1.3.4 血浆样品及组织样品的提取与分离 取血

浆样品及组织样品,按“1.3.2”项下操作,用内标法峰面积比值进行定量计算其浓度。见图 1。

1.3.5 回收率实验 取空白血浆 0.5 mL,精密加入不同量的咪达唑仑对照品储备液,使其质量浓度分别为 10, 50, 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试样品,按“1.3.2”项下操作。计算方法回收率。与相同浓度对照品系列溶液获得的色谱峰面积之比,考察样品的提取回收率。

1.3.6 精密度实验 取空白血浆 0.5 mL,精密加入不同量的咪达唑仑对照品储备液,使其质量浓度分别为 10, 50 和 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,按“1.3.2”项下操作,分别于 1 d 内连续测定 5 次及 3 d 内每天测定 1 次,利用内标法峰面积比值代入同一条工作曲线,求得实测浓度,计算日内和日间精密度。

2 结果

2.1 回收率实验

方法回收率结果见表 1。

2.2 精密度实验

测定结果其日内精密度 RSD 为 2.1% ($n = 3$); 日间精密度 RSD 为 3.3% ($n = 3$)。

2.3 样品测定

取昆明小鼠体重(25 \pm 5) g 雄性 18 只,按给药量及给药后取样时间及部位不同分为 3 组,每组 6 只。第一组小鼠称重后,按每克体重计算给药量(5~10 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),用 2 mL 温开水灌服,于给药后 0.083, 0.166, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 h 于尾静

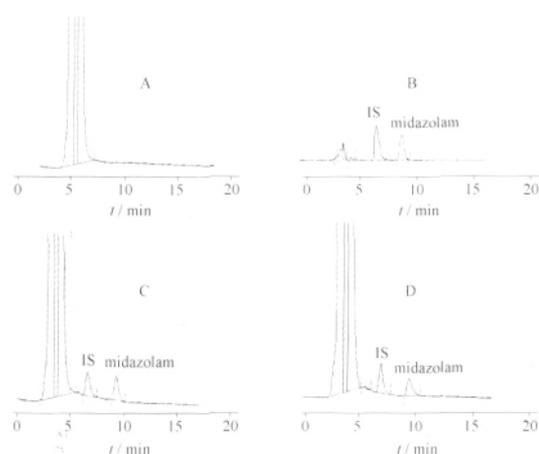


图 1 空白血浆(A)、对照品(B)、血浆样品(C)和组织样品(D)色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of blank plasma (A), midazolam standard (B), blank plasma samples, midazolam with internal standard (C), tissue samples midazolam with internal standard (D)

脉取血放入肝素处理的试管中,置-40℃冰箱中保存待分析。第二组小鼠称重后,按每克体重计算给药中毒致死量(210~240 μg·g⁻¹),用2 mL温开水灌服。给药后待出现中毒症状时,分别取血及各实验所需脏器,处理后,置-40℃冰箱中保存待分析。第三组小鼠做为空白组将所取的血液及各脏器供空白实验用。

各脏器组织匀浆,经提取后,进样进行色谱分析。咪达唑仑在小鼠体内的分布见表2,3。

3 讨论

3.1 本实验曾试采用4%三氯醋酸甲醇溶液沉淀蛋白法对血浆样品进行预处理,但由于测定的回收率较低,本实验采用萃取方式进行。在萃取溶剂的选择上,曾采用三氯甲烷作萃取溶剂进行提取,由于

提取溶剂比重大于血浆,有机溶剂在血浆层下,实验操作时有机层不易被吸取出。另外,用三氯甲烷提取时容易发生乳化现象,影响药物成分的提取率。经改进采用异丙醇-乙酸乙酯(2:8)混合液做萃取剂进行提取,血浆中的杂质干扰小,提取回收率高。

3.2 在血浆样品提取中加入0.1 mol·L⁻¹的盐酸,pH值为3.5,是为了考虑药物在血浆中的蛋白结合率,在0.1 mol·L⁻¹的盐酸0.1 mL作用下使得蛋白结合的药物充分分离出来,以提高提取收率。

3.3 在流动相的摸索过程中,笔者先后选用了不同配比的甲醇-乙腈-水作为流动相,以期得到咪达唑仑和内标及其他成分的最佳分离条件,但在该流动相下咪达唑仑和内标分离不理想,根据文献以甲醇-水,配以适量二乙胺和磷酸作为流动相,发现甲醇-水(含0.1%二乙胺,0.05%磷酸溶液,60:40),咪达唑仑峰和内标峰完全分离,且干扰峰较少。

本实验建立的高效液相色谱法测定血浆及组织中咪达唑仑的方法,提取方法简便,方法线性良好,重现性理想,为临床进一步研究其血药浓度与药效学之间的关系、探索合理有效的给药剂量及药动学的研究、提高该药治疗状态的安全性、减少不良反应的发生有重要意义。

表1 咪达唑仑的方法回收率实验结果. n=3 $\bar{x} \pm s$

Tab.1 Results of methods recovery test of midazolam. n=3, $\bar{x} \pm s$

Concentration /ng·mL ⁻¹	Plasma /ng·mL ⁻¹	Liver tissue /ng·g ⁻¹	Brain tissue /ng·g ⁻¹	RSD /%
10	0.165 7	0.158 7	0.155 5	1.8 ± 0.49
50	0.588 4	0.582 5	0.589 3	1.25 ± 0.34
200	2.432 3	2.397 3	2.392 1	0.33 ± 0.12
Average recovery /%	96.98	96.46	97.41	<2.0

表2 咪达唑仑在小鼠血浆中的浓度-时间数据. ng·mL⁻¹

Tab.2 Plasma concentrations of midazolam. ng·mL⁻¹

Blood taken time/h	1	2	3	4	5	6
0.083	5.78	5.66	5.73	5.58	5.67	5.74
0.166	12.53	12.82	12.49	12.18	12.65	12.52
0.5	24.86	25.69	25.53	24.62	25.94	24.78
0.75	35.35	33.16	35.02	34.17	35.83	35.61
1	48.71	49.35	39.89	48.26	48.87	49.39
1.5	47.56	46.42	50.03	46.05	45.53	47.12
2	26.98	27.67	30.11	28.36	31.39	30.06
3	13.64	11.32	14.46	13.14	17.37	16.72

表3 咪达唑仑在小鼠脏器组织中的浓度. ng·mL⁻¹

Tab.3 Concentrations of midazolam in visceral organs. ng·mL⁻¹

Tissue samples	Liver tissue	Brain tissue
1	338.69	102.90
2	327.78	105.17
3	319.18	95.29
4	347.68	113.92
5	337.79	100.17
6	329.13	97.29

REFERENCES

- [1] LIU X J. *Practical Pharmacy Guide*(实用药物指南) [M]. Beijing: People's Military Surgeon Press, 2000: 120.
- [2] Drug evaluation center of SFDA. Drug clinical information reference[S]. 2004, 6(6): 268.
- [3] ZENG M, ZOU L P. Midazolam is use in the Refractory Status Epilepticus [J]. *Pediatr Emerg Med*(小儿急救医学), 2004, 11(2): 123.
- [4] CAI M H, WANG S J, HANG Y N. Determination of midazolam in plasma with RP-HPLC [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2002, 13(3): 157.
- [5] TIAN Z S. Determination of 1'-hydroxymidazolam and midazolam in human plasma with HPLC [J]. *Her Med*(医药导报), 2006, 25(5): 405.
- [6] LU X T, JIANG Y L, ZHANG S G. Determination of midazolam in children's plasma by solid-phase extraction-HPLC [J]. *J China Pharmacy*(中国药房), 2007, 18(17): 1326-1328.
- [7] MAO G F, GUO T, XIA D Y. Determination of midazolam in human plasma with RP-HPLC [J]. *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2008, 8(4): 297-299.
- [8] ZHAO L, YAN K L, ZHANG Q G. Determination of midazolam in human plasma by reversed-phase HPLC [J]. *Chin J Mod Drug Appl*(中国现代药物应用), 2009, 3(5): 7-9.
- [9] HU L H, XU L, WANG X L. Determination of midazolam in human plasma with HPLC [J]. *Eval Anal Druguse Hosp China*(中国医院用药评价与分析), 2009, 9(7): 522-523.

(收稿日期: 2011-01-20)