

反相高效液相色谱荧光检测法测定 新型咀嚼胶片剂中右美沙芬的血浆浓度^①

刘娟 谭群友^a 熊华蓉 徐美玲 赵春景^b 张景^{京力}^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 重庆市渝中区长江支路 10 号 400042)

^b(重庆医科大学附属第二医院 重庆市渝中区临江路 74 号 400010)

摘要 建立反相高效液相色谱荧光检测法测定口服新型咀嚼胶片剂后血浆中右美沙芬浓度的方法。采用 Hanbon C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm) 色谱柱, 以乙腈-水-磷酸-三乙胺 (35 : 65 : 0.14 : 0.10, V/V/V/V) 为流动相, 在流速 0.6mL · min⁻¹, 进样量 50μL, 柱温 30℃, 荧光激发波长(E_x) 和发射波长(E_m) 分别为 280nm 和 320nm 条件下, 测定咀嚼胶片剂中右美沙芬的免血药浓度。药物与杂质分离效果良好、线性范围为 1—1000ng · mL⁻¹, 相关系数为 0.9996。方法回收率和提取回收率分别为 110.0% 和 83.9%。当 S/N = 3 时, 右美沙芬最低检出浓度可达 1ng · mL⁻¹。本方法准确、灵敏, 可满足血药浓度检测和研究药代动力学行为的需要。

关键词 右美沙芬; 反相高效液相色谱; 荧光检测法; 新型咀嚼胶片剂

中图分类号: O657.7[·]2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)03-1007-05

1 引言

咀嚼胶片剂不同于常规咀嚼片, 是以水不溶性胶基为释药载体制备的特殊口服速释给药系统, 特别适用于有吞咽困难的病人, 老、幼患者^[1]。咀嚼胶片剂具有以下特点^[2]: 服用方便, 口感好, 不良反应少, 起效快, 消除口干, 可发挥局部或全身作用; 有助于疾病的恢复, 可减少青少年中耳炎的发生率, 作为新型的药物治疗系统为企业创造巨大利润, 增强竞争优势。近年来国外对咀嚼胶片剂的研究逐渐增多, 并已有 Nicortte[®], Fluorette[®], Travvell[®]等^[3]产品上市。但国内仅见少量文献^[4]提及该类制剂, 几乎无研究报道。我们以常用止咳药右美沙芬 (Dextromethorphan, DH) 为模型药物, 制备了右美沙芬咀嚼胶片剂 (Dextromethorphan chewing gum preparation, DHCGP), 本研究拟建立其体内药物分析方法, 为进一步考察其体内药物释放行为奠定基础。

高效液相色谱-质谱联用法^[5]可用于检测生物样品中 DH 含量, 该法灵敏度较高, 能够检测出生物样品中的痕量 DH, 但其仪器复杂昂贵, 实验成本高, 不适用于临床研究中大量样品的分析。而高效液相色谱-荧光法^[6]具有灵敏度高、取样量少、方法快速等优点, 在低浓度药物分析领域中占重要的地位。故本研究采用高效液相色谱分离、荧光检测口服给予新型咀嚼胶片剂后, 测定血浆样品中的 DH 浓度, 研究表明, 高效液相色谱-荧光法可实现生物样品中 DH 的快速准确分离检测。

① 教育部博士点基金资助项目 (20095503120008); 重庆市教育委员会资助项目 (首批高等学校优秀人才资助, KJ090308)

② 联系人, 电话: (023) 68485161; 手机: (0) 13308300303; (0) 15178713403; E-mail: zjqrac01@163.com; 地址: 重庆市渝中区大黄路 6 号竞地花园 22 栋 501 室, 400042。

作者简介: 张景^{京力} (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。

刘娟 (1982—), 女, 重庆市人, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型与新技术研究工作。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂及样品

1100 型高效液相色谱仪(美国惠普 Agilent 公司); 高效液相色谱柱 Hanbon C₁₈ 柱(4.6mm×250mm, 5 μ m, 江苏汉邦科技有限公司); AB204-E 型分析电子天秤(瑞士 Mettler Toledo 仪器公司); 710011 ET 单道可调量程微量移液器(芬兰 Dragon 公司); CX-250 型超声波清洗器(北京医疗设备二厂); GL-88B 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); KA-1000 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

溴化右美沙芬(批号 S-3071107, 肇庆市定康药业有限公司上海分公司); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。实验用水为超纯水, 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^[6]

色谱仪: 高效液相色谱仪: 美国惠普 Agilent 1100 型; 色谱柱: Hanbon C₁₈ 柱(4.6mm×250mm, 5 μ m); 保护柱: 大连依利特公司“佳杰”C₁₈(4.0mm×3.0mm), 流动相: 乙腈-水-磷酸-三乙胺(35:65:0.14:0.10, V/V/V/V); 流速: 0.6mL·min⁻¹; 进样量: 50 μ L; 检测波长: 荧光检测激发波长(E_s)为 280nm, 发射波长(E_m)为 320nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

2.2.2 标准贮备液的配制

准确称取 DH 25.0mg, 在烧杯中用超纯水溶解后转移至 250mL 容量瓶中, 并用超纯水稀释至刻度, 取该溶液 0.5mL 于 50mL 容量瓶中, 用超纯水稀释至刻度, 配制成 1 μ g·mL⁻¹的贮备液, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。将配制的 DH 标准贮备液用色谱级水稀释得 1、5、10、25、50、100、500ng·mL⁻¹ 和 1000ng·mL⁻¹ 系列标准溶液, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

2.2.3 系列标准溶液的配制

取空白血浆 200 μ L, 依次加入“2.2.2”项下 DH 系列标准溶液 100 μ L, 配制成相当于血浆浓度为 1、5、10、25、50、100、500、1000ng·mL⁻¹ 的血浆样品, 每一浓度为 3 个样本, 按“2.2.5 项”方法操作, 进样 50 μ L。

2.2.4 血浆样品预处理

取兔全血 5mL, 置于含 480 μ L 肝素的 EP 管中, 以 12000r/min 离心 10min, 分离上清液即为血浆, 置于冰箱-20 $^{\circ}$ C 保存, 备用。

2.2.5 血浆样品的制备

取 200 μ L 血浆, 加入甲醇溶液 800 μ L, 涡旋 5min, 12000r/min 离心 10min, 取上清液, 室温减压挥干, 加流动相 100 μ L 复溶, 再经涡旋 1min, 12000r/min, 离心 10min, 取上清液 50 μ L 进样, 用外标法直接测定其含量。

2.2.6 给药方案及样品采集^[7-9]

选体重(2.0 \pm 0.5)kg 的兔子 6 只口服给予 DHCGP, 剂量 30mg·kg⁻¹, 服药前禁食 12h, 于给药后 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2、3、4、5、6、8、10、12h 于兔耳缘静脉取血, 装入装有 120 μ L 肝素的 1.5mL EP 管中, 3000r/min, 离心 10min, 分离得到血浆样品, 置-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 待测。

3 结果与讨论

3.1 方法专属性

取标准药物、空白血浆、药物+空白血浆及含药血浆样品各 $200\mu\text{L}$, 处理后进样分析, HPLC 图谱见图 1。由图可见, DH 的保留时间约 9.6min , 血浆中其他物质对 DH 的测定基本无干扰, 血浆样品中 DH 与血浆杂质峰分离效果较好。

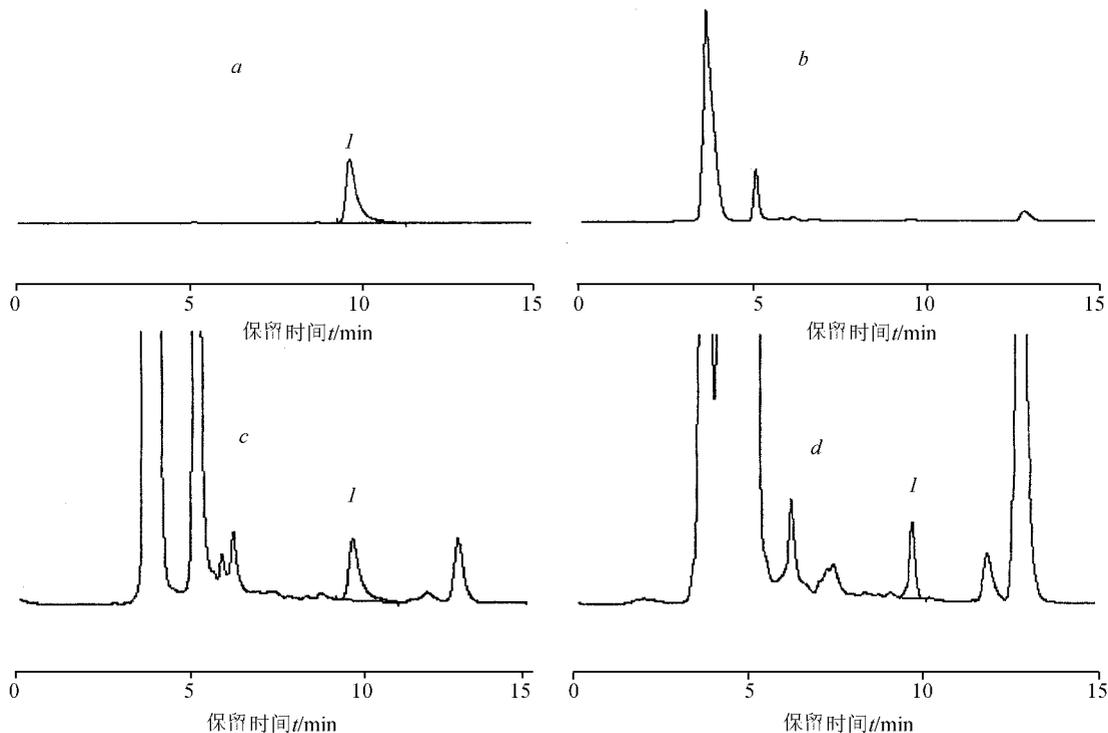


图 1 右美沙芬标准溶液(a)、空白血浆(b)、药物加空白血浆(c)和血浆样品(d)的色谱图
1——右美沙芬。

3.2 线性范围和最低检出限

取空白血浆 $200\mu\text{L}$, 依次加入所配制的 DH 系列标准溶液 $100\mu\text{L}$, 配制成相当于血浆浓度为 1 、 5 、 10 、 25 、 50 、 100 、 500 、 $1000\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品, 每一浓度为 3 个样本, 按“2.2.5 项”方法操作, 进样 $50\mu\text{L}$ 。以 DH 浓度 (C) 对峰面积 (A) 进行线性回归, 求得直线回归方程为: $A = 0.1435C - 0.1519$ ($r = 0.9996$, $n = 3$)。表明 DH 在 1 — $1000\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内浓度与峰面积线性关系良好。DH 的最低检出浓度按照信噪比为 $3(S/N = 3)$ 时的浓度计算, 为 $1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3 精密度和方法回收率

取“2.2.2 项”所配制的低 ($10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 ($50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 ($500\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 3 个浓度水平的空白血浆加标准 DH 样品, 按“2.2.5 项”方法操作, 进样 $50\mu\text{L}$ 。每一个浓度制备 5 个样品, 经预处理后, 按血药浓度测定方法一天内连续测定 5 次得日内精密度; 并于每日测定 1 次连续测定 5 天计算日间精密度。取测定日内精密度的结果代入回归方程, 计算测得量, 以测得量与加入量之比, 计算相对回收率(又称方法回收率)的平均值为 110.0% 。结果见表 1。

表 1 血浆中右美沙芬的日内精密度、日间精密度及方法回收率 (n=5)

理论浓度 (ng · mL ⁻¹)	日内精密度		日间精密度		方法回收率 (%)	平均方法回收率 (%)
	实测浓度 (ng · mL ⁻¹)	RSD (%)	实测浓度 (ng · mL ⁻¹)	RSD (%)		
10	10.7 ± 0.9	8.6	9.6 ± 1.0	10.8	107.0 ± 9.0	
50	55.0 ± 2.2	4.0	55.3 ± 5.3	9.7	110.0 ± 4.4	110.0
500	564.3 ± 9.9	1.8	547.4 ± 13.3	2.4	112.9 ± 2.0	

3.4 提取回收率

取“2.2.2项”所配制的低(10ng · mL⁻¹)、中(50ng · mL⁻¹)、高(500ng · mL⁻¹)3个浓度水平的空白血浆加标准DH样品,按“2.2.5项”下方法操作处理样品进样测定A_x,每种浓度平行制备5份。另取相应浓度的标准液直接进样测定A_s,以A_x与A_s之比,计算绝对回收率(又称提取回收率)的平均值为83.9%。结果见表2。

表 2 血浆中右美沙芬的提取回收率 (n=5)

加入量 (ng · mL ⁻¹)	实测量 (ng · mL ⁻¹)	绝对回收率 (%)	平均绝对回收率 (%)	RSD (%)
10	8.2 ± 0.13	82.0 ± 1.3		9.4
50	37.6 ± 0.31	75.2 ± 0.62	83.9	4.0
500	473.2 ± 1.4	94.6 ± 0.3		1.8

3.5 稳定性实验

配制低(10ng · mL⁻¹)、中(50ng · mL⁻¹)和高浓度(500ng · mL⁻¹)的血浆样品9份,室温下放置24h处理,测得低、中和高浓度的血药溶液RSD分别为5.0%、2.7%和2.3%(n=3)。样品-20℃冷冻下放置30d,测得低、中和高浓度的血药溶液RSD分别为5.9%、2.0%和1.2%。

3.6 样品的测定

将处理好的DH血浆样品,按上述的色谱条件进行测定得到血药浓度-时间曲线,见图2。

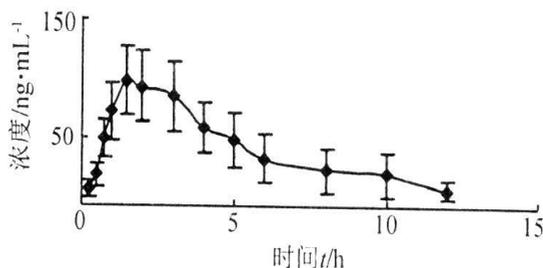
3.7 讨论

3.7.1 提取条件的选择

文献报道可用液液萃取法从血浆中提取出DH^[10,11]进行分析,但该法操作繁琐,故本实验采用甲醇直接沉淀蛋白法处理血浆样品。处理过程中两次高速离心,第一次是为了除去沉淀的蛋白,第二次是为了除去少量复溶的杂质。二次离心后,得到澄清样品。

3.7.2 色谱条件的选择

本实验考察了流动相中有机相与水相比比例对DH出峰时间、色谱分离的影响。实验发现,当乙腈比例恒定为35%时,DH的色谱峰能与附近杂质峰达到基线分离,并且出峰时间较短;增大乙腈比例,DH的色谱峰与杂质峰不能完全分离;减小乙腈比例,则出峰时间延长,峰形变宽,都不利于定性和定量分析。流动相中加入磷酸的作用是调pH值,而加入三乙胺的作用是防止脱尾。

图 2 右美沙芬咀嚼剂
血药浓度-时间曲线

3.7.3 药动学特点

本文制备的右美沙芬咀嚼胶片剂,经兔口服后,相对于普通片剂 $AUC_{(0-\infty)}$ 稍高,但没有显著性差异, C_{max} 降低, T_{max} 显著延长,说明右美沙芬咀嚼胶片剂可持续平稳释药,避免了药物峰谷现象的出现,降低了药物的毒性。因此,本实验建立的反相高效液相色谱荧光检测法测定兔血浆中右美沙芬的方法准确、灵敏,可满足血药浓度监测和药代动力学参数测定的需要。研究右美沙芬咀嚼胶片剂的体内药代动力学行为,可为临床提供一种新型递药系统奠定基础,具有重要的价值和意义。

参考文献

- [1] Chaudhary S A, Shahiwala A F. M edicated Chew ing Gum—a Potential Drug Delivery System[J]. *Expert Op in Drug Deliv*, 2010, **7** (7): 871—885.
- [2] 黄胜炎. 咀嚼胶释药系统[J]. 上海医药, 2006, **27**(2): 68—72.
- [3] Biradar S S, Bhagavti S T, Hukkeri V I *et al.* Chew ing Gum as A Drug Delivery System[J]. *J. Pharmaceutics*, 2005, **17**(2): 112—114.
- [4] 袁成, 于燕莉, 张卫星等. 高效液相色谱法用于褪黑素香口胶的含量测定[J]. 中国生化药物杂志, 2005, **26**(4): 232—234.
- [5] Liang X R, Li Y H, Barfield M *et al.* Study of Dried Blood Spots Technique for the Determination of Dextromethorphan and its Metabolite Dextrorphan in Human Whole Blood by LC-MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, **877**(2): 799—806.
- [6] Hendrickson H P, Gurley B J, Wessinger W D. Determination of Dextromethorphan and its Metabolites in Rat Serum by Liquid-Liquid Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection[J]. *Journal of Ournal of Chromatography B—Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2003, **788**(2): 261—268.
- [7] 杨晓燕, 田晓娟, 刘泽源. 氢溴酸右美沙芬片人体药代动力学及生物等效性研究[J]. 四川医学, 2009, **30**(8): 1282—1284.
- [8] Suski M, Bujak -Gizycka B. Evaluation of Morphine Metabolism in Presence of Amantadine and Dextromethorphan in Human Serum by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (LC/MS) Method[J]. *Folia Med Cracov*, 2008, **49** (3—4): 111—121.
- [9] Eichhold T H, Mccauley-Myers D L, Khambe D A *et al.* Simultaneous Determination of Dextromethorphan, Dextrorphan, and Guaifenesin in Human Plasma Using Semi-Automated Liquid/Liquid Extraction and Gradient Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, **43**(2): 586—600.
- [10] Bolden R D, Hoke S H, Eichhold T H *et al.* Semi-Automated Liquid-Liquid Back-Extraction in a 96-Well Format to Decrease Sample Preparation Time for the Determination of Dextromethorphan and Dextrorphan in Human Plasma[J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, **772**(1): 1—10.
- [11] 梁发华, 何瑞兴. 高效液相色谱法测定人血中氢溴酸右美沙芬浓度[J]. 中国实用医药, 2008, **3**(34): 46—48.

Determination of Serous Dextromethorphan from New Chewing Gum Tablet by RP-HPLC with Fluorescence Detection

LIU Juan TAN Qun-You^a XIONG Hua-Rong

XU Mei-Ling ZHAO Chun-Jing^b ZHANG Jing-Qing

(Medicine Engineering Research Center in University, Chongqing Key Laboratory of Biochemical & Molecular Pharmacology,

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

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

^b(Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, P. R. China)

Abstract An method for the determination of dextromethorphan (DH) concentration after taking new chewing gum tablet in plasma was developed by reversed phase high performance liquid chromatography. Hanbon C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm) chromatographic column was used with acetonitrile-water-phosphatic acid-triethylamine (35 : 65 : 0.14 : 0.10, V/V/V/V) as the mobile phase at a flow rate of 0.6mL · min⁻¹ and injection volumn of 50μL. The concentration of rabbit plasma dextromethorphan from chewing gum tablet was detected under fluorescence exciting wavelength (E_x) and emission wavelength (E_m) at 280nm and 320nm, respectively. The column temperature was 30°C. The drug separated well with impurities, and the linear range of DH was 1—1000ng · mL⁻¹ with correlation coefficient of 0.9996. The lower limit of quantification ($S/N=3$) was 1ng · mL⁻¹. The method recovery and extraction recovery were 109.9%, 83.7%, respectively. The method is accurate, sensitive, and meets the need for detection DH concentration in rabbit plasma and for estimation of pharmacokinetic parameters.

Key words Dextromethorphan; Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography;

Fluorescence Detection; New Chewing Gum Tablet