DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.033
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
1964 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2004)11-1964-03

反相高效液相色谱法测定人血浆中蒽磺酸钠浓度

汤建林,应 懿,徐 颖,黄永平,周世文 (第三军医大学新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 建立蒽磺酸钠血药浓度测定的高效液相色谱法。方法 以对二甲氨基苯甲醛为内标,甲醇为血浆蛋白沉淀液,上清液经40 ℃真空干燥恒温箱挥干,100 μl流动相溶解,20 μl进样。以Water symmetry C18柱(3.9× 150 mm,5 μm)为分析柱。流动相为甲醇∶0.05 mol/L磷酸缓冲液=57∶43(pH 7.0),流速1.0 ml/min,柱温25 ℃,检测波长292.5 nm。结果 血药浓度线性范围25~6 400 ng/ml(n=9,r=0.996 6),最低检测浓度25 ng/ml(S/N>3),相对回收率90.58%~111.00%,日内和日间RSD分别为0.2%~5.4%和2.4%~6.0%。结论 所建方法简便、准确、重现性好、灵敏度高,适用于蒽磺酸钠血药浓度的实际测定。

关键词:蒽磺酸钠;高效液相色谱;血浆
中图法分类号:R446.1;R969;R975 文献标识码:A

Determination of azulene concentration in human plasma by RP-HPLC

TANG Jian-lin, YING Yi, XU Ying, HUANG Yong-ping, ZHOU Shi-wen (Department of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish HPLC method for the determination of azulene (AZU) concentration in human plasma. Methods ρ-(dimethylamino)-benzaldehyde was employed as an internal standard (IS) and methanol as a protein precipitation. AZU and IS were separated on the water symmetry C18 column with methanol at the dose of 0.05 mol/L phosphate buffer of pH 7.0 (57∶43) as the mobile phase. The flow rate was 1 ml/min and the detection wavelength was set at 292.5 nm. The column temperature was 25 ℃. Results The linear rang of calibration curve was within drug plasma concentrations of 25—6 400 ng/ml (r=0.996 6). The lower limit of quantification (S/N≥3) was 25 ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation ranged from 0.2% to 5.4% and 2.4% to 6.0%. The recovery ranged from 90.58% to 111.00%. Conclusion The established method with the advantages of simplicity, precision, high sensitivity, and high repeatability, is suitable for the detection of azulene concentration in human plasma.

Key words: azulene, high performance liquid chromatography, human plasma

蒽磺酸钠(1,4-二甲基-7-异丙基蒽-3-磺酸钠)是洋甘菊花的有效成分,又名洋甘菊蓝,具有强烈的抑制炎症作用。其机制为增加粘膜内前列腺素E_2的合成促进肉芽形成和上皮细胞新生,降低胃蛋白酶活性,通过局部直接作用抑制炎性细胞释放组胺。由蒽磺酸钠和L-谷氨酰胺组成的复方制剂—麦滋林-S在临床上用于胃、十二指肠溃疡、急性和慢性胃炎、原发性和继发性胃炎以及其它疾病并发的胃炎的治疗。在我国该药已研制成功,为比较两制剂在人体内是否生物等效,需建立测定人体血浆中蒽磺酸钠浓度的方法。目前,有关蒽磺酸钠血药浓度测定的方法国外少见报道,国内也罕有报道[1,2]。为此,根据蒽磺酸钠的特点,对其血浆样品预处理方法及测定条件进行研究,建立了人血浆中蒽磺酸钠浓度的高效液相色谱法,并应用于两制剂生物等效性的比较。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters高效液相色谱系统、包括600E泵、7725i进样器、Waters Millennium32色谱工作站、Waters SymmetryC18柱(3.9× 150 mm、5 μm, No. WAT046980)、德国Sartorins MC210 s电子天平、美国ABBOTT公司高速离心机、80-2型低速离心机(上海手术器械厂)、DZ-88恒温真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂)、Millipore超纯水系统。

作者简介:汤建林(1963—),男,湖南省浏阳市人,副研究员,主要从事药物分析,药代动力学及生物等效性方面的研究。电话:(023)68755311
通信作者:周世文,电话:(023)68755311,E-mail:yljd@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-07-09;修回日期:2004-09-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　试药

蒽磺酸钠(AZU)对照品(纯度 99.1%, 由北碚现代应用药物研究所提供), 对二甲氨基苯甲醛(上海三爱思试剂有限公司, 批号: 20000627), 磷酸二氢钾(上海试剂三厂, AR)、甲醇(色谱纯, 天津四友生物医学技术有限公司)。

1.3　试剂配制

100 μg/ml AZU 标准溶液: 精密称取蒽磺酸钠对照品 10.00 mg, 置于 100 ml 量瓶中用适量甲醇溶解并稀至刻度, 摇匀, 4 ℃冰箱保存。

内标溶液: 精密称取对二甲氨基苯甲醛 34.33 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 用适量甲醇溶解并稀至刻度, 摇匀, 4 ℃冰箱避光光保存。

0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.00): 精密称取磷酸二氢钾 6.801 2 g, 以纯水溶解, 加入 290 ml 氢氧化钠(0.1 mol/L), 用纯水稀释至 1 000 ml, 经 0.44 μl 滤膜过滤后即得 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)。

1.4　血样预处理

取血浆 200 μl, 于 1.5 ml 离心试管中, 加入内标 20 μl, 涡旋混合 3 min, 加入甲醇 330 μl, 涡旋混合 5 min, 10 900 r/min 离心 5 min, 取上清液置于另一 1.5 ml 离心试管中, 电热恒温真空干燥箱中挥干, 残渣用 100 μl 流动相涡旋混合溶解。10 900 r/min 离心 3 min, 上清液 20 μl 进样。

1.5　色谱条件

Water symmetry C18 柱 (3.9 × 150 mm, 5 μm。NO. WATO46980)。流动相: 甲醇: 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 = 57∶43 (pH 7.0), 流速 1.0 ml/min, 柱温 25 ℃。检测波长 292.5 nm。

1.6　标准曲线制备

取正常人空白血浆 200 μl 数份, 置于 1.5 ml 离心试管中, 分别加入不同浓度系列 AZU 工作液各 50 μl。使血浆 AZU 终浓度分别为 25、50、100、200、400、800、1 600、3 200、6 400 ng/ml。各加入内标液 20 μl, 按血样预处理方法操作, 上清液 20 μl 进样。

1.7　相对回收率试验

按标准曲线溶液配制方法, 分别配制 AZU 血浆终浓度 50、400、1 600、6 400 ng/ml 溶液各 5 份, 按血样预处理方法操作后进样 20 μl 作 HPLC 分析。

1.8　精密度测定

按标准曲线溶液配制方法, 分别配制 AZU 血浆终浓度 50、400、1 600、6 400 ng/ml 溶液各 1 份, 于同 1 d 不同时间测定 5 次, 考察日内变异, 于 1 周内分 5 d 测定, 考察日间变异。

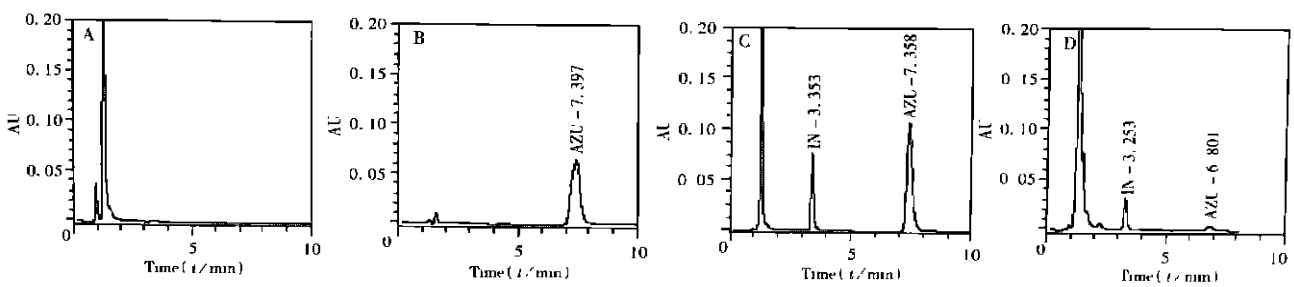
1.9　统计学方法

回收率试验结果以($\bar{x} \pm s$)%表示, 精密度测定结果以相对标准偏差(RSD)表示。

2　实验结果

2.1　色谱分离

在选定的色谱条件下, 测得 AZU 色谱图见图 1。由图 1 可见, 被测物与内标物两者峰形良好, 分离完全, 无杂质峰干扰。AZU 及内标的保留时间分别为: 7.36 min 和 3.35 min。



A: Blank plasma; B: Azulene standard and internal standard solution; C: Azulene standard and internal standard in blank plasma; D: Plasma of healthy volunteer and internal standard

图 1　AZU 色谱图

Fig 1　Chromatogram of azulene

2.2　线性范围和最低检测浓度

由标准曲线测定项下测得峰面积 AS 和内标峰面积 Ai 比 X, (X = As/Ai)对浓度 C 进行线性回归, 即得标准曲线回归方程: $C = 4.36 \times 10^{-2}X + 7.68 \times 10^{-4}$。$r = 0.996\,6$, $P < 0.05$, $n = 9$。其线性范围为 25~6 400 ng/ml, 按 3 倍信噪比, 蒽磺酸钠最低检测浓度为 25 ng/ml。

2.3　蒽磺酸钠回收率试验

试验结果见表 1。

表 1　蒽磺酸钠回收率试验结果

Tab 1　Results of recovery tests for azulene in plasma

Concentration (ng/ml)	Recovery (%)					$\bar{x} \pm s$ (%)
	1	2	3	4	5	
50	106.60	111.00	90.58	99.64	99.56	101.48±7.79
400	100.18	99.55	107.00	105.00	99.60	102.27±3.49
1 600	92.06	105.72	92.36	101.46	103.92	99.10±6.47
6 400	97.91	105.64	101.47	108.06	96.57	101.93±4.91

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 薁磺酸钠精密度试验

试验结果见表 2。

表 2 薁磺酸钠精密度试验结果

Tab 2 Results of precision tests for azulene in plasma

Concentration (ng/ml)	Intra-day		Inter-day	
	$\bar{x}\pm s$(ng/ml)	RSD(%)	$\bar{x}\pm s$(ng/ml)	RSD(%)
50	50.08±2.82	5.64	48.45±2.88	5.95
400	412.14±6.00	1.46	410.30±9.66	2.45
1 600	1 522.09±13.84	0.91	1 526.91±52.11	3.41
6 400	5 818.53±10.90	0.19	5 908.56±241.48	4.09

2.5 血药浓度测定结果

采用本法对 24 名健康受试者不同时间段血药浓度进行了测定，其药时曲线见图 2。薁磺酸钠浓度范围为 25.4～2 004.1 ng/ml，均在本试验的线性范围内。

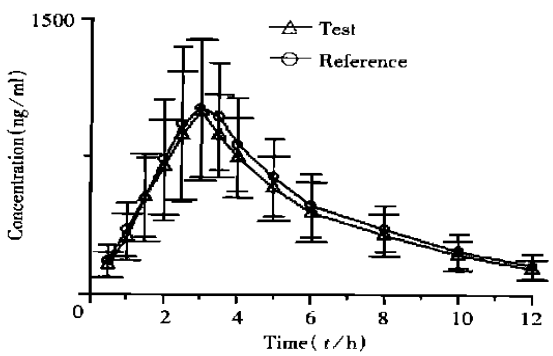


图 2 薁磺酸钠血药浓度均值-时间曲线

Fig 2 Average drug plasma concentration-time curve of azulene in 24 healthy volunteers after oral administration

3 讨论

在进行人体生物等效性试验时，我国 SFDA 人体生物等效性试验设计规范要求，必须要有 18～24 名受试者，采用交叉给药方案，每人收集至少 11 个点的血药浓度，取血时间必须达到 3～5 个消除半衰期或最高血药浓度的 1/10～1/20，这就使得等效性试验的生物样本具有以下特点：①样本量大；②浓度范围分布广；③末端血药浓度低。因此，能否建立简便、快速、灵敏、准确和线性范围广的分析方法，对提高分析效率，降低分析成本，获得可信结果十分重要。HPLC 由于具有分离检测同步进行的优势，广泛用于体液药物浓度分析。为此，结合文献[3,4]，分别以 C18 反相柱和 CN 柱为色谱固定相，甲醇磷酸盐缓冲体系为流动相，考察了薁磺酸钠标准液，内标液和空白血浆的分离特性。当采用 CN 柱时，待测物和内标物分离效果良好，但血中杂质对样品测定有干扰，提示在做制剂研究时，对薁磺酸钠的分离 CN 柱可能适合，在血药浓度测定时则不宜采用。当采用 C18 柱时，甲醇与 pH 为 7 的磷酸盐缓冲液的比从 50∶50 到 57∶43，样品、内标和空白血浆中杂质均能达到有效分离，而当达到 58∶42 时，血浆杂质开始对样品测定产生干扰。在 50∶50 时样品和内标出峰时间分别为 14.5 min 和 4.5 min，样品分析周期近 20 min，在 57∶43 时样品在 8 min 内即可出峰完毕，分析周期节省一半的时间。综合考虑，实验采用 C18 柱，甲醇与 pH 为 7 的磷酸盐缓冲液的比为 57∶43 的色谱分离条件。

样品预处理是分析方法的另一关键。试验首先采用了固相萃取法处理血浆，试验了 C18 固相萃取小柱处理血样的效果，小柱预先经 1 ml 甲醇和 1 ml 0.05 mol/L 磷酸缓冲液（pH＝7）活化，0.2 ml 血浆上样，经磷酸缓冲液洗脱，收集甲醇洗脱液进行分析，在本试验条件下，经固相萃取处理后的样品，杂质峰与样品峰部分重叠，提示萃取条件需改变，加之固相萃取成本高，并考虑薁磺酸钠水溶性较大的特点，继而采用蛋白沉淀法，分别试验了甲醇，乙腈和 10％三氯乙酸。甲醇除蛋白效果虽不如后两者，但色谱分离效果最佳，上清液经真空挥干浓缩，其最低检测浓度达 25 ng/ml，萃取回收超过 50％，可满足实测需要。文献[1]中，在加入甲醇后，还加入一定量无水硫酸钠，经试验比较，后一步可省去。

薁磺酸钠紫外光谱显示在 245 nm 和 292.5 nm 处有强吸收，经试验比较，采用 292.5 nm 波长测定，灵敏度高，血浆杂质干扰少，特别是血药中的另一主要成分谷氨酰胺对测定不干扰。试验选定 292.5 nm 为测定波长。所建方法经验证，具有特异性强、日内日间变异小、线性范围广、简便准确的特点，满足了人体生物等效性试验对分析方法学的要求。

参考文献：

[1] 沈 怡，张 丹，曾经泽，等. 呱仑酸钠血药浓度 HPLC 测定方法研究[J]. 药物分析杂志，2001，21(5)：319－323.

[2] 朱春英，董秀兰，张 佐，等. 西米替丁对麦滋淋-S 中水溶性薁在人体内药物动力学的影响[J]. 中国药学杂志，1995，30(4)：221－224.

[3] 张占辉，刘庆彬. 反相高效液相色谱法测定复方谷氨酰胺中呱仑酸钠的含量[J]. 中国医院药学杂志，2003，23(3)：152－153.

[4] 张占辉，刘庆彬，薄海静，等. 高效液相色谱法测定呱仑酸钠的含量及有关物质[J]. 药物分析杂志，2001，21(5)：339－341.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net