

HPLC 法测定兔血浆中茜草双酯的药物浓度

陈 莉, 肖若蕾

[摘要] 目的 建立兔血浆中茜草双酯的血药浓度测定方法。方法 采用 HPLC 法: Eurospher100-5 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为磷酸 (0.05 mol/L, 二乙胺调 pH 值至 5) - 乙腈 (30:70); 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 264 nm。结果 茜草双酯在 0.084 ~ 20.08 μg/ml 浓度范围内线性关系良好; 低、中、高浓度的平均回收率分别为: 86.9%、89.3%、94.2%。结论 该法简便、灵敏、可靠, 可用于茜草双酯血药浓度检测。

[关键词] 茜草双酯; HPLC; 血药浓度; 含量测定

[中图分类号] R927.2; R969.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2012)01-049-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.13

Determination of Rubidate in Rabbit Plasma by Reversed Phase HPLC

CHEN Li, XIAO Ru-lei

School of Pharmacy, Xianning University, Xianning 437100, China

[Abstract] **Objective** To establish a method to determine the content of rubidate in rabbit plasma by HPLC. **Methods** HPLC was used to determine the content of rubidate in rabbit plasma. The separation was performed on Eurospher100-5 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with phosphate (0.05 mol/L) : acetonitrile (30:70) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min and the wavelength was UV 264 nm. **Results** The linear response ranged from 0.084 to 20.08 μg/ml. The average recovery of low, medium and high concentrations was 86.9%, 89.3% and 94.2%, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive, reliable, which can be used for determination of rubidate in rabbits plasma and its pharmacokinetic study.

[Key words] rubidate; HPLC; blood-drug concentration; determination

茜草双酯 (rubidate) 是根据茜草中所含升高外周白细胞的有效成分和结构人工合成的萘酚化合物^[1]。具有明显的升高外周白细胞的作用, 能促进骨髓造血干细胞增殖, 对化疗药物所致白细胞减少有一定的治疗效果。已报道的茜草双酯含量测定方法有比色法^[2]、紫外分光光度法^[3]、氧化还原滴定法^[3]、荧光法^[4]、HPLC 法^[5]等。本文建立了 HPLC 法测定兔血浆中茜草双酯浓度方法, 具有专属性好, 简便、灵敏、结果准确可靠等特点, 为茜草双酯的体内药代动力学研究提供方法学依据。

1 材料

1.1 试药 茜草双酯原料药 (含量: 100.2%, 山东东方明药业股份有限公司, 批号: 051105), 茜草双酯标准品 (中国药品生物制品检定所), 乙腈为色谱纯, 其它为分析纯, 重蒸水 (自制)。

作者简介: 陈 莉, 学士, 讲师。研究方向: 药物质量控制及体内药物分析。Tel: (0715) 8272135; E-mail: chenli8284@163.com

作者单位: 437100 湖北咸宁, 咸宁学院药学院

1.2 仪器 N3000 高效液相色谱仪, UV3000 紫外检测器, C₁₈ 预柱 (10 mm × 4.6 mm, 5 μm) (均为北京创新通恒); Eurospher100-5 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 德国洛尔); SARTORIUS AG BP211D 分析天平 (北京赛多利斯); WH-3 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂); LD4-2A 低速离心机 (北京医用离心机厂); TGL-16G 台式高速离心机 (河南兄弟仪器设备有限公司)。

1.3 动物 日本大耳白兔, ♀ ♂ 不限, 体质量 2.0 ~ 2.5 kg (湖北省实验动物研究中心提供, 动物合格证号: SCXK (鄂) 2008-0005)。饲养环境: 温度: 18 ~ 22℃, 湿度: 50% ~ 60%, 光照 12 h, 笼具尺寸为 750 mm × 850 mm × 60 mm, 每兔一笼。

2 方法与结果

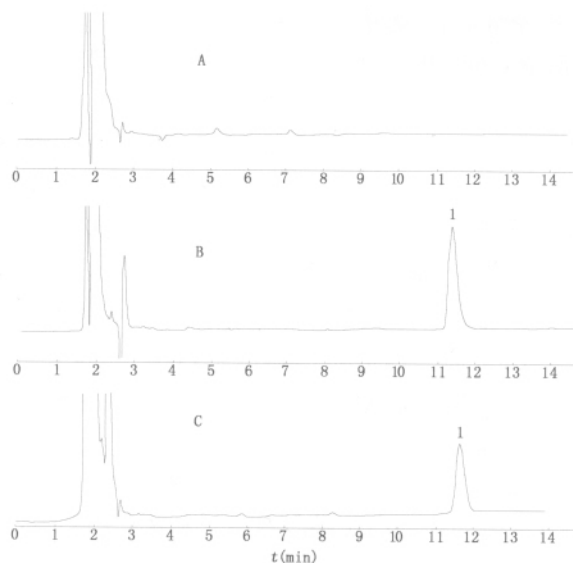
2.1 给药方法 健康家兔, 空腹 12 h 后, 将茜草双酯原料药灌胃 (200 mg/kg), 给药后自由进水, 于给药后 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 h 分别由兔耳缘静脉取血 2 ml, 置 5 ml 肝素抗凝管中, 3000 r/min 离心

10 min, 上清液即为血浆备用。空腹血浆为空白血浆。

2.2 溶液的制备 (1) 对照品溶液 精密称定茜草双酯对照品 15.06 mg, 置 25 ml 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 0.6024 mg/ml 的贮备液。分别精密量取茜草双酯贮备液适量, 用无水乙醇依次稀释成 602.4、301.2、150.6、75.30、25.10、5.020、2.510 $\mu\text{g/ml}$ 的系列标准溶液。(2) 血液样品的制备与处理 取 2.1 项下的空白血浆、血浆样品各 0.2 ml, 加入 0.4 ml 的乙腈作为蛋白沉淀剂, 置 1.5 ml Eppendorf 管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液分别为空白血浆和血浆样品, 直接进样。

2.3 色谱条件 Eurospher100-5 C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm 5 μm); 流动相: 磷酸 (0.05 mol/L, 二乙胺调 pH 值至 5) - 乙腈 (30:70); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 264 nm; 进样量: 20 μl ; 柱温: 室温。

2.4 系统性试验 取血浆样品、随行对照品、空白血浆各 20 μl 进样, 在 2.3 色谱条件下茜草双酯峰形较好, 理论塔板数按茜草双酯峰计为 7023, 且与杂质及内源性物质有良好的分离, 色谱图见图 1。



A: 空白血浆; B: 空白血浆 + 对照品; C: 血浆样品; 1: 茜草双酯

图 1 兔血浆中茜草双酯 HPLC 图

2.5 线性关系考察 取兔空白血浆 0.18 ml, 分别加入 2.1 (1) 项下配制的系列标准溶液 20 μl , 按 2.1 (2) 项下方法操作, 以茜草双酯峰面积 (A) 对茜草双酯血浆样品浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程为:

$$A = 2339.7 C + 3617.8, r = 0.9997$$

结果表明, 血浆中茜草双酯在 0.084 ~ 20.08

$\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好。

2.6 精密度与回收率试验 分别配制含茜草双酯浓度为 0.8367、5.020、20.08 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆样品, 各 5 份, 按 2.3 项下色谱条件, 测定回收率、精密度。结果见表 1。

表 1 茜草双酯回收率与精密度试验结果 (n = 5)

实际浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	测得浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	RSD (%)
20.08	18.45 $\pm$ 1.35	94.2	6.0
5.02	4.48 $\pm$ 0.42	89.3	7.1
0.84	0.74 $\pm$ 0.04	86.9	3.7

2.7 稳定性试验 取空白血样配制含茜草双酯标准溶液高、中、低 3 种浓度的血样各 3 份, 室温下分别放置 0.5、1.0、1.5 h, 按照 2.3 项下的色谱条件测定。结果表明, 在 1.5 h 内, 茜草双酯高、中、低 3 个浓度血浆样品稳定, RSD 分别为 9.4%、8.6%、7.5%。

2.8 血药浓度测定 健康家兔 3 只, 按 2.1 项下方法给药、取血, 并测定。测得家兔血浆中茜草双酯血药浓度, 见表 2。

表 2 茜草双酯的血药浓度测定结果

序号	血药浓度 ($\mu\text{g/ml}$)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9 (h)
1	2.87	6.21	9.69	17.36	25.19	23.81	17.93	10.04	3.43
2	2.68	7.44	13.79	20.54	18.62	15.29	12.29	8.23	2.24
3	3.21	6.76	10.35	15.38	24.32	22.16	15.71	8.66	3.19

由测定结果可以看出, 该曲线为单峰。茜草双酯在 4 ~ 5 h 左右血药浓度达最高峰, 达峰浓度 C_{max} 为 (21.91 $\pm$ 3.29) $\mu\text{g/ml}$ 。

3 讨论

本试验比较了各种流动相对分离效果的影响, 结果采用流动相为磷酸 (0.05 mol/L, 二乙胺调 pH 值至 5) - 乙腈 (30:70); 流速为 1.0 ml/min 时, 色谱峰峰型、分离度均较好, 拖尾因子小, 且分析时间较适宜。

茜草双酯在紫外光谱区有 3 个吸收峰, 分别为 220、264、363 nm, 考虑吸收峰强度及测定干扰情况, 选择 264 nm 作为紫外检测器测定波长^[6]。

考虑到茜草双酯易氧化和水解的特点, 且不易溶于水而易溶于乙醇溶液中, 本试验选择无水乙醇做溶剂配制标准系列溶液, 同时采用避光操作, 所测

试样处理后即测。

[参考文献]

- [1] 肖若蕾, 陈莉. 茜草双酯的 β -环糊精包合物[J]. 解放军药学报, 2007, 23(4): 286-289
- [2] 谭才宏, 蔡金龙. 茜草双酯片含量的比色测定法[J]. 镇江医学院学报, 1996, 6(1): 79-80
- [3] 中国药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. WS1-

XG-2002

- [4] 陈莉, 肖若蕾, 张玉霖, 等. 荧光法测定茜草双酯固体分散体中茜草双酯的含量[J]. 中国药师, 2009, 12(2): 185-187
- [5] 陈莉, 肖若蕾, 张玉霖, 等. 高效液相色谱法测定茜草双酯固体分散体中茜草双酯的含量[J]. 解放军药学报, 2009, 25(2): 174-176

(收稿日期: 2011-07-15; 修回日期: 2011-08-05)

(本文编辑 梁爱君)

(上接 48 页)

平行制得 3 批(批号: 080417、080506、080507), 经检查含量及溶出度均符合规定, 该工艺稳定可靠, 重复性好。

市售氯沙坦钾片(科素亚)及自制氯沙坦钾片(批号: 080417、080506、080507) 3 批样品的溶出曲线见图 2。

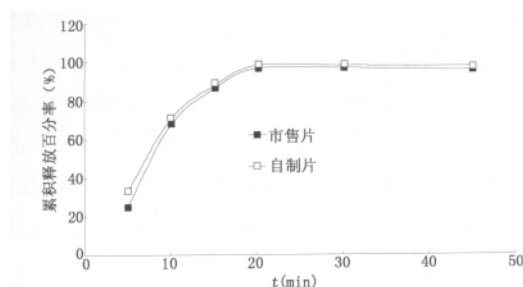


图 2 自制片与市售片溶出曲线比较($n = 6$)

由图 2 可见, 自制片与市售片的样品溶出曲线基本一致, 由测定结果可以看出 3 批样品的溶出度均大于标示量的 95%, 符合要求。

3 讨论

因氯沙坦钾遇水后形成黏稠溶液, 干燥后形成薄壳, 硬度增加, 故黏合剂的加入量对其崩解情况及溶出情况影响很大。

因本实验使用 50% 乙醇溶液作为黏合剂, 当室温高于 25℃ 时, 制粒过程中乙醇挥发很快, 加入黏合剂后需快速拌匀并过筛制粒, 若放置时间过长, 则制粒效果变差。

氯沙坦钾原料药易吸潮, 颗粒烘干后应立即压

片, 否则颗粒在潮湿环境下易吸潮, 难以压片。此时再次烘干颗粒, 压得片剂的崩解时限较首次干燥颗粒压得片剂延长。同理, 其素片极易吸潮, 吸湿后硬度增加, 崩解时限延长, 素片包衣前需妥善保存于干燥避光处, 防止变质。

本文用防潮型包衣材料进行包衣, 得到的氯沙坦钾片不易吸潮, 解决了因吸湿造成的片面麻点、片剂硬度增加、崩解时限延长等问题。

对于薄膜衣片要求控制一个较为适宜的压片压力。随着硬度的增加, 崩解时间延长, 若压片压力太小, 在包衣过程中易破碎。本实验主要考察压力对崩解时限及脆碎度的影响, 结果确定压片压力为 30 ~ 40 N 时效果最佳。

[参考文献]

- [1] 梁慧, 陈还珍, 刘锦秀, 等. 氯沙坦钾对糖尿病肾病大鼠主动脉内皮舒张功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(4): 451-453
- [2] 段继豪, 瞿亚东, 万会丽. 氯沙坦钾联合依那普利治疗原发性高血压的疗效及对肾功能的保护作用[J]. 右江医学, 2009, 37(6): 669-670
- [3] 陈凡, 颜宇波, 杨天伦, 等. 氯沙坦和曲尼司特抗高血压大鼠心肌纤维化的对比观察[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(7): 1001-1005
- [4] 卢小容, 周进辉. 氯沙坦钾/氢氯噻嗪复方片治疗中度原发性高血压的疗效及其对左室重构的影响[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17(11): 948-949
- [5] 国家药品标准 WS1-(X-144)-2003Z[S]. 2003. 37-149

(收稿日期: 2010-12-16; 修回日期: 2011-03-15)

(本文编辑 梁爱君)