

高效液相色谱法测定人血浆中伪麻黄碱浓度

朱红旗¹, 董宏伟^{2*}, 魏中战¹, 孔祥锋¹

(1. 邹城市人民医院, 山东 邹城 273500; 2. 山东天然药物工程技术研发中心, 山东 烟台 264003)

[摘要] 目的: 建立测定人血浆中伪麻黄碱浓度的方法。方法: 血浆样品经混合碱液碱化、甲基叔丁基醚萃取、0.5% 盐酸溶液酸化反提处理后, 采用反相 HPLC 法测定。色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C; 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(0.3% 三乙胺和 1% 十二烷基硫酸钠)-乙腈(62:38), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长 210 nm。结果: 伪麻黄碱在(0.015~1.60) mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好, 回归方程为: $Y = 4.63 \times 10^3 X + 3.76$ ($r = 0.9998$), 该方法平均回收率为 101.7%, 日内 RSD 为 3.4%~4.2%, 日间 RSD 为 6.4%~9.6%。结论: 该法简便、灵敏、快速、稳定性好, 可用于临床血药浓度检测及药代动力学研究。

[关键词] 伪麻黄碱; 血药浓度; 反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)12-0004-02

盐酸伪麻黄碱是麻黄碱的差向异构体, 可选择性收缩上呼吸道血管, 消除鼻粘膜水肿, 是感冒用药复方制剂中的常用成分, 盐酸伪麻黄碱也是目前国家食品药品监督管理局进行 I 期临床试验研究实验室认证验收时要求进行血浆浓度复核的 6 种药品之一。关于盐酸伪麻黄碱的血药浓度测定方法, 国内报道的有液相色谱-质谱法(LC-MS)^[1]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[2]、高效液相色谱法(HPLC)^[3]等。LC-MS 或 GC-MS 方法灵敏度高、专属性强, 但对仪器设备的要求较高, 且需要对伪麻黄碱进行衍生化, 一般单位难以做到。本文在综合国内外文献方法的基础上, 建立了适用于伪麻黄碱血药浓度监测及药代动力学研究的反相高效液相色谱法来检测人血浆中的浓度。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 日本岛津高效液相色谱系统, 包括 LC-6A 泵、SPD-6A 可变波长紫外检测器、SCL-6A 系统控制器、柱温箱和 G-R6A 积分仪; HS 色谱数据工作站 4.0+, 杭州英谱科技开发有限公司; 上海飞鸽台式冷冻离心机; pH-S2 型精密度酸度计, 上海雷磁仪器厂; XW280A 旋涡混合器, 上海医科大学仪器厂。

1.2 试剂 盐酸伪麻黄碱, 含量 99.5%, 合肥市合源医药科技有限公司提供; 甲基叔丁基醚(HPLC 级), 美国 Tedia 公司产品; 乙腈为色谱纯; 磷酸二氢

钾、三乙胺、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸等均为分析纯; 实验用水为亚沸双蒸馏水; 健康人空白血浆由本院输血科提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C; 流动相: 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(0.3% 三乙胺和 1% 十二烷基硫酸钠)-乙腈(62:38), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 紫外检测波长 210 nm; 灵敏度: 0.02AUFS。

2.2 标准溶液的配制 精密称取盐酸伪麻黄碱 10 mg, 溶于 25 mL 容量瓶中, 用双蒸馏水稀释至刻度, 混匀, 作为储备液(400 mg·L⁻¹)。以此储备液为基础, 依次稀释, 制得浓度为: 80.0, 40.0, 20.0, 10.0, 5.0, 2.50, 1.25, 0.75 mg·L⁻¹ 的系列标准溶液。

2.3 血浆样品的处理 精密量取血浆 0.5 mL, 置 10 mL 具塞离心管中, 加混合碱液(1 000 mL 水溶液中含 10 g 氢氧化钠和 40 g 碳酸钠) 0.5 mL, 旋涡混合 1 min, 然后加入甲基叔丁基醚 3 mL, 旋涡混合 2 min, 于 4 000 rpm 下离心 10 min, 将上层有机相移至另一具塞离心管中。重复提取 1 次。合并两次有机相提取液并加入 0.5% 盐酸溶液 100 μL, 旋涡混合 2 min, 于 3 500 rpm 下离心 10 min, 氮气吹干有机相, 取 20 μL 进样。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法的专属性 在上述色谱条件下空白血浆和血浆样品的色谱图显示血浆中无杂峰干扰, 伪

[收稿日期] 2006-12-21

[通讯作者] * 董宏伟, Tel: 13964913157

麻黄碱的保留时间为 10.7 min。

2.4.2 标准曲线及线性范围 取不同浓度的标准溶液各 10 μL 置具塞试管中,加入 490 μL 空白血浆混合,使成含盐酸伪麻黄碱浓度分别为 0.015, 0.025, 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800, 1.60 mg·L⁻¹ 的标准血浆样品,按“2.3”项下操作,进样分析,记录各样本中盐酸伪麻黄碱的峰高,以伪麻黄碱血浆浓度为自变量,样品峰高为因变量,用加权最小二乘法进行回归运算,求得盐酸伪麻黄碱的直线回归方程即标准曲线为: $Y = 4.63 \times 10^3 X + 3.76$ ($n = 8, r = 0.9998$)。可见,在血浆浓度(0.015~1.60) mg·L⁻¹ 范围内,盐酸伪麻黄碱的线性良好。

2.4.3 精密度 用空白血浆制备 0.025, 0.200, 1.60 mg·L⁻¹ 高、中、低 3 个浓度的盐酸伪麻黄碱质控样品各 5 份,按“2.3”项下操作,得日内峰高 RSD,同法每天测定高、中、低 3 个浓度的盐酸伪麻黄碱质控样品各 1 份,连续测定 5 d,得日间峰高 RSD。结果见表 1。

表 1 盐酸伪麻黄碱精密度试验 ($n = 5$)

盐酸伪麻黄碱浓度 (mg·L ⁻¹)	日内	日间
	峰高%	峰高%
0.025	3.4	6.4
0.200	4.2	6.7
1.60	4.2	9.6

2.4.4 回收率 用空白血浆制备浓度分别为 0.025, 0.200, 1.60 mg·L⁻¹ 的随行质控样品,按“2.3”项下操作,与标准曲线制备同时进行测定,由当天的标准曲线求出各样品的浓度,将求得的浓度与已知浓度相比,计算样品的方法回收率,结果见表 2。

表 2 血浆样品中盐酸伪麻黄碱的相对回收率 ($n = 5$)

标示浓度(mg·L ⁻¹)	回收率%	RSD%
0.025	108.0	3.7
0.200	97.0	3.6
1.60	100.3	4.8

2.4.5 检测限 用空白血浆制备浓度分别为 0.005, 0.010, 0.025 mg·L⁻¹ 的样品,按“2.3”项下操作测定,以空白血浆为对照,按信噪比 $S/N = 3$ 测得本方法中盐酸伪麻黄碱的最低检测限为 1.0 ng,最低定量检测血浆浓度为 10 μg·L⁻¹。

2.4.6 稳定性 用空白血浆制备浓度为 0.025, 0.200, 1.60 mg·L⁻¹ 的样品,于 -18℃~ -20℃ 冷冻,分别于第 2 d、第 3 d、第 4 d、第 5 d、第 6 d 融溶后,进行血样处理测定, RSD 为 10.76%。

3 讨论

盐酸伪麻黄碱的血药浓度一般为 ng 级,用 HPLC 法测定时,必须对样本进行浓缩。我们在实验

过程中比较了两种血样处理方法: (1) 单步萃取法^[4]。碱化血样,用有机溶剂萃取,分离有机相,氮气吹干后,用流动相复溶,进样; (2) 双步萃取法。碱化血样,用有机溶剂萃取,分离有机相,再用酸液反提,弃取有机相,取水相进样。结果发现方法(1)处理后,伪麻黄碱的绝对回收率较低(50%左右)。因此,采用(2)双步萃取法处理血样。在血样处理过程中,不同的有机溶剂对伪麻黄碱的提取效率有显著影响,通过对乙醚、乙醚-正己烷(1:1)和甲基叔丁醚三种提取溶剂的实验研究表明,对伪麻黄碱的提取效率依次为甲基叔丁醚>乙醚-正己烷(1:1)>乙醚,故本文选择甲基叔丁醚作为萃取有机溶剂。考虑到伪麻黄碱的成盐形式,本文采用盐酸溶液作为酸性提取液。结果发现随着盐酸浓度的升高,伪麻黄碱的绝对回收率逐渐升高,使用 0.5% 盐酸溶液,伪麻黄碱的绝对回收率达到 91% 左右,而使用 1.5% 盐酸溶液,伪麻黄碱的绝对回收接近 100%。但使用 1.5% 的盐酸溶液对进样器的腐蚀大,对柱的伤害也较大。因此,本文采用 0.5% 的盐酸溶液作为酸性提取液。

伪麻黄碱紫外吸收波长短,且极性大,在反相柱上不易保留,伪麻黄碱很快被洗脱,出峰时间早,易受血浆杂峰的干扰。为了增加色谱体系对其的保留,在流动相中加入十二烷基硫酸钠离子对试剂,当其浓度为 30 mmol·L⁻¹ 时,伪麻黄碱在适宜的时间出峰,且能与血浆杂峰有效的分离。另一方面,增加离子对试剂后,可以提高流动相中乙睛的比例,有利于洗脱血浆样品中的弱极性杂峰。磷酸缓冲盐在流动相中起缓冲的作用,使 pH 值比较稳定。可能是基线平稳,噪音低的原因。流动相中三乙胺主要起了改善峰形的作用。

[参考文献]

[1] 杨汉煜,陈笑艳,徐海燕,等.液相色谱-串联质谱法测定人血浆中的伪麻黄碱浓度[J].沈阳药科大学学报,2001,18(2):116-119.

[2] 贺丰,罗佳波,陈飞虎.GC-MS 法研究麻黄汤中麻黄碱、伪麻黄碱的人体内过程[J].中药新药与临床药理,2004,15(5):336-338.

[3] 葛庆华,周臻,支晓瑾,等.HPLC 法同时测定人血浆中的伪麻黄碱和氯苯那敏[J].药学学报,2004,39(4):281-284.

[4] 钟明康,施孝金,张静华,等.盐酸伪麻黄碱缓释片在健康志愿者中的药动学[J].中国医院药学杂志,2001,21(7):395-397.