

固相萃取—反相 HPLC 法测定血浆中二氟尼柳的浓度

高立勤 邢久东 刘文英

(中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009)

摘要 采用固相萃取方法, 以大孔网格树脂小柱净化样本, 建立了快速、灵敏的反相 HPLC 法。方法在 $0.5 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好, 最低检出限 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($S/N=2$), 萃取回收率和方法回收率分别为 91.65% 及 97.25%, 日内、日间精密度均小于 10%。用此方法测定了人血浆中二氟尼柳的浓度, 并对单剂量口服给药后的药代动力学作了初步探讨。

关键词 固相萃取; 反相 HPLC; 二氟尼柳

二氟尼柳(diflunisal)是水杨酸的衍生物, 有解热镇痛作用。临床证实该药的镇痛作用比阿司匹林、布洛芬等药物强。目前, 国内未见对该药生物样本测定方法的报道。国外的分析方法主要有荧光分光光度法^[1]、薄层色谱法^[2]、气相色谱法^[3]和高效液相色谱法^[4]。本文采用固相萃取方法, 以大孔网格树脂小柱净化样本, 建立了快速、灵敏的反相 HPLC 法, 测定人血浆中二氟尼柳的浓度, 并对单剂量口服给药后的药代动力学作了初步探讨。

实验部分

1 仪器与试剂

岛津 LC-6A 高效液相色谱系列: LC-6A 泵; SPD-6A 检测器; SCL-6A 控制器; C-R4A 数据处理机。PT-系列萃取柱(河北津杨滤材厂), 二氟尼柳对照品(进口片提纯精制), 二氟尼柳片(江安制药厂), 内标: 对羟基联苯(Sigma 公司出品)。

2 色谱条件

色谱柱: Spherisorb C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$); 流动相: 甲醇—水—冰醋酸(66: 30: 4); 流速 $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 250 nm 。

3 正交设计法优选固相萃取条件

设计 3 因素 3 水平的正交分析, 以确定最佳固相萃取条件。3 个因素分别为 pH 值、洗脱溶剂和洗脱溶剂体积。按 $L_9(3^4)$ 表随机安排实验, 以二氟尼柳峰对内标峰面积比为评价指标。根据实验结果, 并综合考虑各种因素, 选择 pH 1.5 条件下, 以甲醇—冰醋酸(99: 1) 5 ml 为洗脱溶剂。

4 血浆样本的制备

用甲醇 2 ml, 水 5 ml 依次通过小柱进行活化, 再用 pH 1.5 的磷酸盐缓冲液 5 ml 通过小柱, 依次加入血浆 1 ml、内标甲醇溶液 ($2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 0.2 ml, 然后用 pH 1.5 的磷酸盐缓冲液 5 ml 冲洗, 继用甲醇—冰醋酸(99: 1) 溶液 5 ml 洗脱, 收集洗脱液, 于 60°C 水浴吹氮气挥干溶剂, 残渣以甲醇 0.5 ml 溶解, 取 $20 \mu\text{l}$ 进样分析。色谱图见图 1。

5 标准曲线的制备

取健康人空白血浆多份, 分别加入不同体积的二氟尼柳对照品溶液, 制成含二氟尼柳 $0.5, 1, 5, 10, 50, 100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的血浆, 按“4”项操作, 进样分析。以药物浓度与内标浓度之比 (C_i/C_s) 为横坐标 (X), 药物与内标峰面积之比 (A_i/A_s) 为纵坐标 (Y) 进行回归分析, 回归方程为 $Y = 5.489 \times 10^{-2} + 1.750 X$, $r = 0.9949$ ($n = 6$)。线性范围为 $0.5 \sim 100$

$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。最低检出限为 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (S/N = 2)。

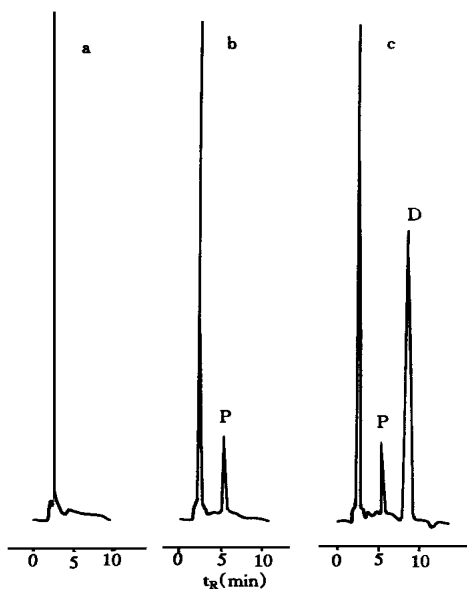


Fig 1 HPLC chromatogram of blank plasma (a), blank plasma with internal standard (b), and plasma of diflunisal 1h after a single oral dosage of 300 mg with internal standard (c). D: diflunisal ($t_R = 7.90 \text{ min}$); P: *p*-phenyphenol ($t_R = 5.28 \text{ min}$).

6 回收率试验

6.1 萃取回收率 分别配制浓度为 0.5, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的血浆, 按“4”项操作, 其中不加内标, 待挥干溶剂后, 以内标甲醇溶液 ($0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 0.5 ml 溶解残渣, 进样分析, 得药物与内标峰面积比 R' 。另配制相应浓度为 1, 20, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的对照品溶液, 其中内标浓度为 $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 进样分析, 得药物与内标的峰面积比 R , 按 R'/R 计算回收率, 结果见表 1。平均萃取回收率为 91.65%, RSD 为 6.88%。

Tab 1 Extraction recovery ($n = 5$)

Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Recovery $\pm s$ (%)	RSD (%)
0.5	90.11 \pm 8.65	9.60
10	94.23 \pm 5.29	5.61
100	90.61 \pm 4.93	5.44

6.2 方法回收率 分别配制浓度为 0.5, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的血浆, 按“4”项操作, 进样分析, 得药物与内标的峰面积比, 代入标准曲线, 计算测得药物浓度, 以测得量/添加量计算回收率, 结果见表 2。平均方法回收率为 97.25%, RSD 为 3.84%。

Tab 2 Method recovery ($n = 5$)

Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Recovery $\pm s$ (%)	RSD (%)
0.5	93.39 \pm 5.64	6.04
10	100.60 \pm 2.50	2.49
100	97.77 \pm 2.91	2.98

7 精密度试验

分别配制浓度为 0.5, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的血浆, 进行日内及日间精密度试验, 结果见表 3。

Tab 3 Precision of the method ($n = 6$)

C_{Added} ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Within day		Between day	
	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	RSD (%)
0.5	0.45 \pm 0.03	6.67	0.47 \pm 0.03	6.38
10	10.13 \pm 0.32	3.13	9.96 \pm 0.54	5.42
100	97.79 \pm 1.21	1.24	95.12 \pm 4.45	4.68

8 二氟尼柳在正常人体内的血药浓度经时曲线

健康受试者 3 名, 空腹 po 二氟尼柳片 (每片 300 mg) 一片, 服药后 2 h 方可进餐。分别于给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h 静脉取血 3.0 ml, 以肝素钠抗凝, 离心分离血浆, 按“4”项操作, 进样分析, 测得血药浓度。3 名受试者的平均血药浓度经时曲线见图 2。

血药浓度的测定结果表明, 3 名受试者血药浓度经时变化的趋势基本一致。将三者的血药浓度数据的平均值用 PKBP-NI 程序拟合, 该药物单剂量 po 后在体内呈二室模型, 动力学参数见表 4。

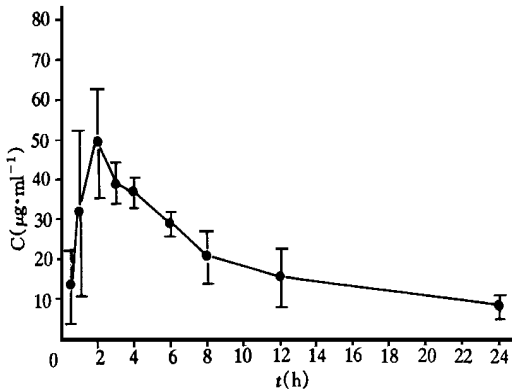


Fig 2 Concentration—time curve of diflunisal after a single oral dosage of 300 mg in three human volunteers .

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of diflunisal in human volunteers after a single oral dosage of 300 mg (PKBP-N1: two compartment method)

Parameter	Datum
A (µg·ml ⁻¹)	397.23
α (h ⁻¹)	0.50
B (µg·ml ⁻¹)	22.05
β (h ⁻¹)	0.04
k ₂₁ (h ⁻¹)	0.14
k ₁₂ (h ⁻¹)	0.26
k ₁₀ (h ⁻¹)	0.14
T _{1/2α} (h)	1.40
T _{1/2β} (h)	17.85
Vc (L·kg ⁻¹)	3227.76
AUC (µg·h·ml ⁻¹)	519.89

讨 论

生物样本中二氟尼柳的分析方法国外已有报道,但其样本处理方法多为液—液萃取^[2-4],方法较为繁琐费时,且试剂价格较贵,萃取过程中易引起乳化。也有人利用二氟尼柳与 Tb³⁺ 及 EDTA 形成复合物,直接用荧光分光光度法测定血清中的药物浓度^[1],但分光光度法专属性差,荧光方法本身影响因素较多。本文采用固相萃取方法进行样本处理,建立了 HPLC 法,方法简便,彻底避免了乳化,并有利于进一步的自动化联机操作。

实验中曾选用 C₁₈、硅胶及大孔网格树脂为填料的 PT 系列小柱分别对二氟尼柳血浆样

本进行提取,考察了不同的洗脱系统,结果显示,大孔网格树脂对二氟尼柳萃取回收率可达 91.65%,而 C₁₈ 和硅胶柱的萃取效率很低,所以选用大孔网格树脂为固相填料。

二氟尼柳为二氟苯基水杨酸,为酸性药物。实验中参考美国药典中该药物的含量测定方法^[5],选用甲醇—水—冰醋酸的色谱系统。同时,考虑血浆中存在的杂质干扰,药物与内标的分离度以及分析时间等因素,调整各种试剂的配比,选择甲醇—水—冰醋酸(66:30:4)为流动相。

血药浓度的数据显示该药物在人体内符合二房室模型,服药后 2 h 血药浓度达到峰值,与文献报道^[6]基本一致;其消除半衰期为 17.85 h,长于文献报道时间^[7],这可能是由于样本数较少,个体差异较大所致。要获得具有统计学意义的的数据,尚需加大实验样本数,作进一步研究。

参 考 文 献

- Ioannon PC, Lianidon ES, Konstantianos DG, et al. Simple, rapid and sensitive spectrofluorimetric determination of diflunisal in serum and urine based on its ternary complex with terbium and EDTA. *Anal Chim Acta*, 1995, **300**: 237
- Kincaid RL, McMullin MM, Sanders D, et al. Sensitive, selective detection and differentiation of salicylates and metabolites in urine by a simple HPTLC. *J Anal Toxicol*, 1991, **15**: 270
- Kim KR, Shim WH, Shin YJ, et al. Capillary gas chromatography of acidic non-steroidal antiinflammatory drugs as tert-butyl dimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr*, 1993, **641**: 319
- Drummer OH, Kotsos A, McIntyre IM. A class-independent drug screen in forensic toxicology using a photodiode array detector. *J Anal Toxicol*, 1993, **17**: 225
- USP 23. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1994: 509
- Nuernberg B, Peris-Antoli B, Brune K, et al. Biopharmaceutics of diflunisal: variability in oral absorption. *Acta Pharm Technol*, 1990, **36**: 166
- Dresse A, Delapierre D, Baudinet G, et al. Pharmacokinetics of diflunisal administered orally at a dosage of 500 mg twice a day for ten days. *Int Congr Symp Ser-R Soc Med (Diflunisal: New Perspective Analg)*. 1979: 21

DETERMINATION OF DIFLUNISAL IN PLASMA BY RP-HPLC AFTER SOLID LIQUID EXTRACTION

Gao Liqin(Gao LQ) , Xing Jiudong(Xing JD) and Liu Wenyong(Liu WY)

(*China Pharmaceutical University, Nanjing 210009*)

ABSTRACT A RP-HPLC method was developed with solid-liquid extraction technique. Plasma sample was extracted on a macroreticular resin cartridge with methanol-glacial acetic acid (99:1) as elution solvent. After extraction, the assay was carried out on a Spherisorb C₈ column with *p*-phenylphenol as internal standard. The mobile phase is a mixture of methanol-water-glacial acetic acid (66:30:4). UV detection was performed at 250 nm. The flow rate was 1.0 ml•min⁻¹.

A good linearity was found at the concentration range from 0.5 to 100 µg•ml⁻¹, with the lowest detection limit 0.02 µg•ml⁻¹ (S/N=2). The extraction and method recoveries were 91.65% and 97.25% respectively, while the RSD for the within-day and between-day precision were all less than 10%.

The above method was applied to determine the plasma concentration of diflunisal in three human volunteers after a single oral dosage of 300 mg. Two hours after administration, the plasma concentration of diflunisal reached maximum level. A two-compartment method was used to study the pharmacokinetic parameters. The $T_{1/2\alpha}$ and $T_{1/2\beta}$ were 1.40 h and 17.85 h, respectively.

KEY WORDS Solid-liquid extraction; RP-HPLC; Diflunisal