

柱切换 HPLC 法测定血浆中氢溴酸右美沙芬的代谢物去甲右美沙芬

刘荔荔 王卓* 冯向庭* 高申**

(第二军医大学药学院药物分析教研室,上海 200433; **上海长海医院临床药理研究室,上海 200433)

提要 应用柱切换 HPLC 法建立了氢溴酸右美沙芬的主要代谢产物去甲右美沙芬的血浆浓度测定方法。去甲右美沙芬的葡萄糖醛酸结合物,经 β -葡萄糖醛酸苷酶水解后,即可取血浆直接进行 HPLC 分析。预处理柱为 30 mm \times 5 mm ID,内装 μ Bondapak C₁₈, 37~50 μ m;分析柱为 150 mm \times 5 mm ID,内装 YWG-C₁₈, 10 μ m。预处理流动相为 0.2% 的乙酸溶液,流速 3 ml/min;分析流动相为乙腈-水-乙酸-三乙胺-二氯甲烷(17:82:1:0.05:0.025)的混合溶液,流速 1 ml/min;荧光检测波长分别为 λ_{ex} =290 nm 和 λ_{em} =315 nm。血浆浓度测定的线性范围为 20~640 ng/ml,血浆中最低检测浓度为 4 ng/ml,方法的平均回收率为 103.8%,日内及日间变异均小于 10%。

关键词 氢溴酸右美沙芬;去甲右美沙芬;柱切换;HPLC;血药浓度

氢溴酸右美沙芬(dextromethorphan·HBr,下称 DM)是一种中枢性镇咳药,无成瘾性,临床主要用于感冒及各种原因所致的咳嗽。DM 体内代谢迅速广泛,母体药物浓度较低,因灵敏度不够,药代动力学研究难以进行,常通过测定其主要活性代谢物去甲右美沙芬(dextrorphan,下称 DP)的血浓度来进行研究^(1,2)。有关 DP 的血药浓度测定方法国内尚未见报道,国外主要应用 RIA,GC,GLC 以及 HPLC 等方法进行。这些方法均需对血浆样本进行预处理,包括用有机溶剂萃取、蒸干以及再溶解等步骤,操作复杂,费时费力,应用不便。本文应用柱切换技术,建立了 DP 血药浓度的 HPLC 测定法,血浆样本不需预处理,可直接进样分析,具有快速、简便、灵敏的优点,尤适合于临床药代动力学研究。

材料与 方法

仪器与试药

仪器 Perkin-Elmer 系列 3 型高压恒流泵;国产 YSB-2 型平流泵、501K 型切换阀和进样阀各一个(中国科学院上海分院科学仪器厂);Hitachi F1000 荧光检测器;CDMC-1CX 型色谱数据处理机(上海市计算技术研究所)。

试药 DP 对照品,上海医药工业研究院提供; β -葡萄糖醛酸甙酶,上海东风生化试剂厂产品,300 U/mg;乙腈(中国科学院上海脑研究所)和甲醇(上海吴泾化工厂)均为 HPLC 级;水为去离子多效蒸馏水;其余均为国产分析纯化学试剂。

本文于 1992 年 9 月 9 日收到。

* 第二军医大学药学院 88 级毕业生

色谱条件

分析柱 150 mm × 5 mm ID, 内装 YWG-C₁₈, 5 μm; 预处理柱 30 mm × 5 mm ID, 内装 μBondapak C₁₈, 37~50 μm, 干法装柱。分析流动相为乙腈—水—乙酸—三乙胺—二氯甲烷(17:82:1:0.05:0.025)的混合溶液, 流速 1 ml/min; 预处理流动相为含 0.2% 乙酸的水溶液, 流速 3 ml/min; 另以甲醇作为清洗流动相, 流速 3 ml/min。荧光检测波长为 λ_{ex}=290 nm 和 λ_{em}=315 nm, 灵敏度 5 AUFS, 纸速度 4 mm/min, 室温操作。

柱切换操作

柱切换系统流路图见图 1。样品先进入预处理柱, 经预处理流动相冲洗, 待血浆中杂质基本冲洗干净后, 转动切换阀, 使预处理柱和分析柱成串联状态, 分析流动相即可将保留在预处理柱中的 DP 洗脱入分析柱进行分离测定。然后切换阀再转回致使分析柱和预处理柱断开, 分别用甲醇清洗预柱和用预处理流动相平衡后, 即可等待下次进样。柱切换操作时间表见表 1。

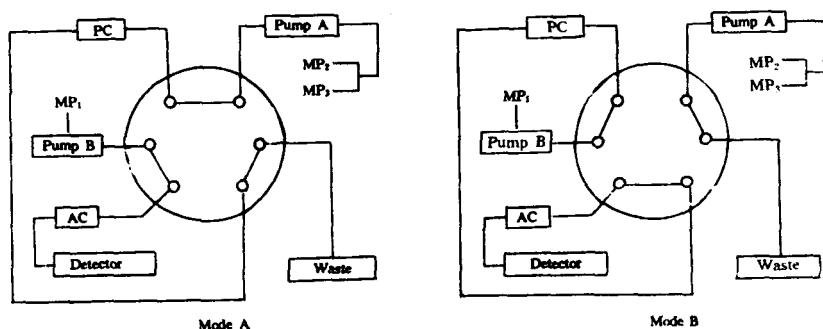


Fig 1 Flow scheme of column-switching system for analysing dextroproprphan in plasma. MP₁=analytical mobile phase; MP₂=pretreating mobile phase; MP₃=methanol.

Tab 1 Time schedule of column switching (MP₁=analytical mobile phase; MP₂=pretreating mobile phase; MP₃=methanol)

Time (min)	Valve mode	Analytical column	Pretreating column
0.0~3.0	A	MP ₁	MP ₂
3.0~4.5	B	MP ₁	MP ₁
4.5~6.5	A	MP ₁	MP ₃
6.5~8.5	A	MP ₁	MP ₂
8.5~	A	MP ₁	Stop

样品测定

取待测血浆 0.25 ml, 加入 β-葡萄糖醛酸苷酶溶液 200 μl (15 U/μl) 后, 用蒸馏水稀释至 800 μl, 混匀后放置 37 ± 1 °C 恒温水浴中水解 12 h, 取出后离心 5 min (4000 r/min)。取上清液 500 μl 直接进样, 色谱图见图 2, DP 的保留时间约为 7.5 min。

结 果

血浆测定标准曲线及检测限

配制系列 DP 标准溶液,使浓度分别为0,20,40,80,160,320,640 ng/ml,按前述方法测定,以 DP 的峰高(H)对相应的标准浓度(C)进行线性回归分析,得回归方程为:

$C = 0.02718H - 23.23$, $r = 0.9987$,最低检测浓度为4 ng/ml(S/N=3)。

精密度与回收率

配制系列标准溶液,同上操作,测定方法的回收率,平均为103.8%;另在日内和日间重复操作测定(n=5),观察方法的精密度,结果见表2。

Tab 2 Precision of the method for determination of dextrorphan in plasma (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Added (ng/ml)	Measured (ng/ml)	RSD (%)
Within day		
40.98	43.43 ± 1.9	4.4
81.97	81.94 ± 2.7	3.3
163.94	164.25 ± 4.6	2.8
Between day		
40.98	45.07 ± 5.2	4.7
81.97	81.90 ± 7.8	7.9
163.94	166.78 ± 2.7	2.7

正常人的药代动力学实验

选择健康志愿者8例,均为男性。口服 DM 30 mg 后,于不同时间取静脉血,用本法测定 DP 的血药浓度,其平均血药浓度时间曲线见图3。

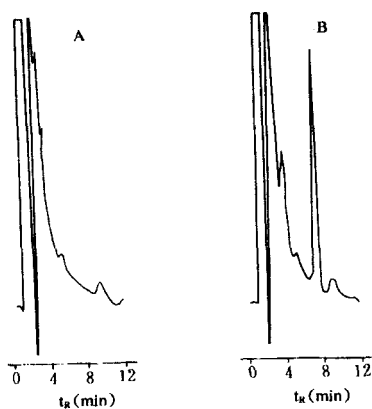


Fig 2 Chromatograms of dextrorphan of blank plasma (A) and volunteer plasma (B) collected at 1 h post-dose.

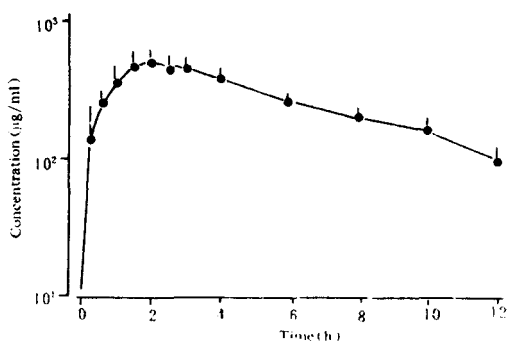


Fig 3 Mean plasma concentration of dextrorphan (DP) in 8 volunteers after po 30 mg of DP solution ($\bar{x} \pm s$).

讨 论

DP 为 DM 在体内的主要活性代谢物,在血浆中主要以葡萄糖醛酸结合物的形式存在⁽²⁾,需经酶水解后才能测定。因而本文将血浆样本先用 β -葡萄糖醛酸苷酶在 37℃ 下进行水解。并研究了不同水解时间对测定的影响。结果表明,水解时间控制在 12 h 为宜,太短会因水解不完全而影响样品测定的准确性;12 h 后测定色谱峰基本无变化,表明水解已完全。

文献所报道的 DP 血浓度测定方法^(3~7),其前处理均比较复杂,需用有机溶剂进行多次萃取,再经蒸干重组后进样,对方法回收率及灵敏度均有一定影响。本文应用柱切换技术在线净化和浓缩样本,集样品前处理和分离测定于一体,具有简便快速和准确的优点。测定 1 个样本仅需 15 min。而文献方法约需数小时不等。

由于 DP 结构上含有羟基,色谱过程中可能与键合相填料中的残余硅醇基形成氢键结合,导致色谱峰拖尾。二氯甲烷可防止氢键形成,加强洗脱能力。因而在流动相中加入一定量二氯甲烷,可有效地防止色谱峰的拖尾。

当样品经预处理柱净化浓缩后切换,DP 即被洗脱入分析柱。同时一些在预处理柱中保留的杂质也被洗脱入分析柱,这些杂质尽管不干扰 DP 的测定,但其色谱峰的保留时间较长,影响第二次进样。由于 DP 在预处理柱中已有初步分离,故及时断开两柱的联接可避免保留杂质进入分析柱。本文经反复摸索,在分析流动相冲洗预处理柱约 1.5 min 时及时切换,可基本消除杂质。

参 考 文 献

1. Ramachander G, et al. Determination in plasma and evaluation of bioavailability of dextromethorphan hydrobromide in humans. *J Pharm Sci* 1977;66:1047.
2. Pfaff G, et al. Inter-individual variation in the metabolism of dextromethorphan. *Int J Pharm* 1988;14:173.
3. Dixon R, et al. Dextromethorphan; radioimmunoassay and pharmacokinetics in the dog. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1978;22:243.
4. Barnhart JW, et al. Determination of dextromethorphan in serum by gas chromatography. *J Chromatogr* 1979;163:390.
5. Woodworth JR, et al. The polymorphic metabolism of dextromethorphan *J Clin Pharmacol* 1987;27:139.
6. East T, et al. Determination of dextromethorphan and metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1985;338:99.
7. Park YH, et al. Quantitative determination of dextromethorphan and three metabolites in urine by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 1984;73:24.

COLUMN SWITCHING HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF DEXTROPHAN, AN ACTIVE METABOLITE OF DEXTROMETHORPHAN, IN PLASMA

LL Liu, Z Wang, XT Feng and S Gao*

(College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433;

* Department of Clinical Pharmacology, Changhai Hospital, Shanghai 200433)

ABSTRACT An HPLC method for the determination of dextrophan, an active metabolite of dextromethorphan, in plasma was established using column switching technique. The column switching system was equipped with a per-column of 30 mm×5 mm ID, packed with μ Bondapak C₁₈, 37~50 μ m, and an analytical column of 150 mm×5 mm ID, packed with YWG-C₁₈, 5 μ m. A 0.2% acetic acid solution was used as the pretreating mobile phase to wash out impurities from the per-column. The analytical mobile phase consisted of acetonitrile—water—acetic acid—triethylamine—dichloromethane (17:82:1:0.05:0.025). The plasma samples were directly injected into the HPLC system after enzymatic hydrolysis of dextrophan glucuronide ester conjugate to free form with β -glucuronidase. The dextrophan was monitored with a fluorescence detector at 290 nm (excitation) and 315 nm (emission). The method was linear within the plasma concentration range of 20~640 ng/ml ($r=0.9987$), and the detection limit was 4 ng/ml. The mean recoveries of the method averaged 103.8%. The relative standard deviations of the assay were less than 10% for both within-day and between-days.

Key words Dextromethorphan; Dextrophan; Column switching; HPLC; Plasma drug concentration