

· 药物研究 ·

## 反相高效液相色谱法测定犬血浆吗啡浓度\*

袁盛华<sup>1</sup>, 潘琳<sup>2</sup>, 谢杰<sup>3</sup>, 徐鑫<sup>4</sup>, 汪晓海<sup>4</sup>, 葛卫红<sup>1</sup>

(1. 南京大学医学院附属鼓楼医院药剂科, 210008; 2. 南京大学医学院, 210008; 3. 江苏省徐州医学院临床药理学系, 221004; 4. 南京大学医学院附属鼓楼医院麻醉科, 210008)

**[摘要]** 目的 建立犬血浆吗啡浓度反相高效液相色谱测定方法。方法 犬血浆样品中加入内标对乙酰氨基酚后用乙酸乙酯在碱性条件下提取。流动相为 0.2% 三乙胺水溶液 (pH 为 6.89)-甲醇 (78:22); Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>; 紫外检测波长 215 nm。结果 吗啡线性范围为 5 ~ 2 000 ng · mL<sup>-1</sup> (r = 0.999 4); 最低检出浓度 2 ng · mL<sup>-1</sup>; 提取回收率 74.92% ~ 89.34%, 方法回收率 84.29% ~ 106.45%; 日内和日间 RSD 分别为 3.71% ~ 9.31% 和 5.14% ~ 12.38%。结论 该方法处理简单、灵敏、准确, 可用于犬血浆吗啡浓度测定。

**[关键词]** 吗啡; 色谱法, 高效液相, 反相; 犬

**[中图分类号]** R971.2; R969.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2009)09-1107-03

## Determination of Morphine Concentrations in Dog Plasma by RP-HPLC

YUAN Sheng-hua<sup>1</sup>, PAN Lin<sup>2</sup>, XIE Jie<sup>3</sup>, XU Xin<sup>1</sup>, WANG Xiao-hai<sup>1</sup>, GE Wei-hong<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, Drum Tower Hospital Affiliated with Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China; 2. Medical College of Nanjing University, Nanjing 210008, China; 3. Department of Clinical Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, Jiangsu, China; 4. Department of Anesthesiology, Drum Tower Hospital Affiliated with Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

**ABSTRACT Objective** To develop an RP-HPLC method for determining concentrations of morphine in dog plasma.

**Methods** With paracetamol as internal standard, morphine in dog plasma was extracted with ethyl acetate and then determined by RP-HPLC with the conditions as follows: Kromasil C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), a mobile phase of 0.2% triethylamine solution (pH 6.89)-methanol (78:22, V/V) with the velocity of 1 mL · min<sup>-1</sup> and the absorption wave length was 215 nm.

**Results** The sample has been quantified over a concentration range of 5 to 2 000 ng · mL<sup>-1</sup> (r = 0.999 4); the minimal detectable concentration was 2 ng · mL<sup>-1</sup>, the extraction recovery was 74.92% - 89.34%, and the method recovery was 84.29% - 106.45%. Intra-day and inter-day RSD were 3.71% - 9.31% and 5.14% - 12.38%, respectively. **Conclusion** This method is simple, sensitive and accurate for determining morphine concentrations in dog plasma.

**KEY WORDS** Morphine; RP-HPLC; Dog

吗啡 (morphine) 为阿片类生物碱, 是一类具有依赖性的麻醉药品, 临床上常用于缓解外科手术引起的短期疼痛和癌症患者的长期疼痛<sup>[1]</sup>。由于该药品的特殊性, 治疗窗口窄, 寻找合适给药途径及研究相应的药动学特点意义重大。笔者拟比较犬吸入与恒速静脉泵给予吗啡后药动学参数的差异, 建立犬血浆吗啡浓度的测定方法。目前文献专门用于犬血浆吗啡分析的方法较少, 笔者根据文献方法<sup>[2-4]</sup>进行条件优化, 建立了较为简便的犬血浆吗啡高效液相色谱 (HPLC) 定量

分析方法, 并应用于犬血浆吗啡浓度的测定。

## 1 实验方法

**1.1 仪器与试剂** Agilent 1100 高效液相色谱仪、G1314 紫外检测器, 惠普色谱工作站, Kromasil 色谱分析柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 江苏汉邦科技有限公司), 保护柱 (LabAlliance), pH S-3C 型精密酸度计 (上海雷磁仪器有限公司), 快速混匀器 (常州国华电器有限公司); Eppendorf 5417R 型低温高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), 磁极 80-2 型离心沉淀器 (上海手术器械厂), Direct-Q™5 (Millipore) 纯水系统, DAS 分析软件 1.0 版; 吗啡标准品 (中国药品生物制品检定所), 内标对乙酰氨基酚 (江苏省药品检验所), 甲醇 (色谱纯, 美国 Tedia), 其余试剂均为市售国产分析纯。

**1.2 试剂配制** 吗啡标准储备液: 精密称取吗啡标准品 5 mg, 用甲醇定容至 5 mL, 即得到浓度为 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的吗啡标准储备液, 用时以甲醇稀释成浓

**[收稿日期]** 2008-08-14

**[基金项目]** \* 南京市卫生局医学科技发展一般课题 (基金编号: YKK05106)

**[作者简介]** 袁盛华 (1981 -), 女, 硕士, 药师, 电话: 025 - 83304616 - 66669, E-mail: shingwayuan@yahoo.com.cn。

**[通讯作者]** 葛卫红, 女, 主任药师, 电话: 025 - 83304616 - 66660。

度分别为 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 ng · mL<sup>-1</sup> 的系列标准溶液; 内标溶液: 精密称取对乙酰氨基酚 5.05 mg, 用甲醇定容至 5 mL, 并稀释为 10.1 μg · mL<sup>-1</sup> 的对乙酰氨基酚标准液; 磷酸盐缓冲液 (0.2 mol · L<sup>-1</sup>) (pH = 8.6): 将 3.48 g 磷酸二氢钾溶于 100 mL 重蒸水, 用 1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调 pH 为 8.6, 于 4 °C 冰箱保存。

**1.3 色谱条件** 流动相: 0.2% 三乙胺水溶液 (磷酸调 pH = 6.89) - 甲醇 (78 : 22); Kromasil 色谱分析柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>; 紫外检测波长 215 nm; 进样量 20 μL。

**1.4 样品处理** 取血浆 0.2 mL, 加入浓度为 10.1 μg · mL<sup>-1</sup> 的内标溶液 5 μL, 混匀, 加入磷酸盐缓冲液 (pH = 8.6) 50 μL, 涡旋混合 10 s, 加入乙酸乙酯 1.2 mL, 涡旋混合 3 min, 于 4 000 g 离心 10 min, 分取上层有机相约 1.0 mL 于 40 °C 空气泵吹干, 甲醇 50 μL 振荡溶解, 14 000 g 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样分析。

**2 结果**

**2.1 标准曲线及线性范围** 在若干份空白血浆中分别加入对应浓度的吗啡标准溶液 2 μL, 配成 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1 000, 2 000 ng · mL<sup>-1</sup> 系列浓度的标准血样 (每份加入内标溶液 5 μL), 按“1.4”项下方法处理后进样, 色谱图见图 1, 吗啡与对乙酰氨基酚峰面积的比值 (Y) 与吗啡浓度 (X) 的回归方程为 Y = 1.436 8X + 0.020 1, r = 0.999 4。结果表明吗啡在 5 ~ 2 000 ng · mL<sup>-1</sup> 范围内具有良好的线性关系。本方法的最低检出浓度为 2 ng · mL<sup>-1</sup> (S/N ≥ 3)。

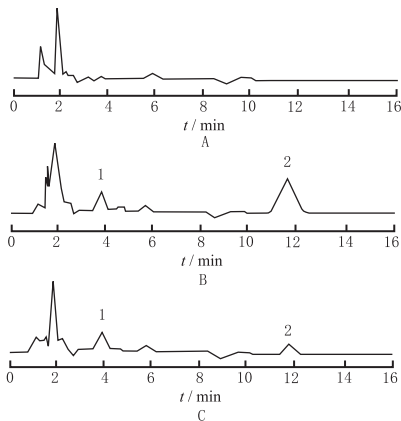


图 1 3 种样品的 HPLC 色谱图

A. 空白血浆; B. 血浆标准品; C. 血浆样品; 1. 内标: 对乙酰氨基酚, 保留时间 3.687 min; 2. 吗啡, 保留时间 11.890 min

**2.2 回收率实验** 取空白血浆, 加入对应浓度的吗啡标准溶液, 配制成 25, 100, 1 000 ng · mL<sup>-1</sup> 的标准血样, 每一种浓度做 5 份, 处理后进样, 记录吗啡及内标的峰

面积; 另配制浓度为 25, 100, 1 000 ng · mL<sup>-1</sup> 的吗啡甲醇溶液各 5 份进样, 记录吗啡的峰面积, 两者面积相比并除以浓缩倍数 (4 倍), 计算血浆中吗啡的提取回收率 (表 1)。并将测得的吗啡与内标峰面积比代入标准曲线方程中计算测得浓度, 测得浓度与实际浓度的比值为方法回收率 (表 1)。

表 1 吗啡回收率实验结果 % ,  $\bar{x} \pm s$

浓度/ (ng · mL <sup>-1</sup> )	提取回收率	方法回收率
25	74.92 ± 2.92	84.29 ± 12.43
100	89.34 ± 4.40	106.45 ± 7.79
1 000	84.11 ± 11.06	103.29 ± 6.26

**2.3 精密度实验** 取空白血浆, 在同一天不同时间或连续几天的相同时间处理并测定浓度为 25, 100, 1 000 ng · mL<sup>-1</sup> 的标准血浆样品, 计算得出日内及日间精密度 (表 2), 均符合测定要求。

表 2 精密度实验结果

已知浓度/ (ng · mL <sup>-1</sup> )	日内		日间	
	测定浓度/ (ng · mL <sup>-1</sup> )	RSD/ %	测定浓度/ (ng · mL <sup>-1</sup> )	RSD/ %
25	21.80 ± 2.00	9.31	23.00 ± 2.80	12.38
100	106.40 ± 7.80	7.29	103.80 ± 9.20	8.90
1 000	1 015.40 ± 37.70	3.71	1 026.30 ± 52.70	5.14

**2.4 稳定性实验** 配浓度为 25, 100, 1 000 ng · mL<sup>-1</sup> 吗啡标准血样各一份, 于 -20 °C 冰箱放置 0, 7, 14, 30 d, 取出在室温下融化, 按“1.4”项下方法处理, 检查冻融保存时间对样品测定的影响, 结果表明冻融保存 1 个月对样品吗啡浓度没有影响。

**3 方法应用**

犬 4 只, 雌雄各半, 体质量 (11 ± 2) kg, 由南京市鼓楼医院实验动物中心提供。禁食 12 h 后, 按照 0.66 mg · kg<sup>-1</sup> 的剂量分别通过雾化吸入及恒速静脉泵途径给予吗啡, 给药时间为 10 min, 经股静脉留置针于不同时间点采血, 分离血浆并按上述方法进行测定, 经 DAS 软件分析得到相应药动学参数。以一只犬的恒速静脉泵及雾化吸入给药为例: 分别于给药过程中每分钟及给药后 2, 5, 7, 10, 15, 20, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360 min 采血, 血浆分离并处理后进样, 测定结果均在标准曲线线性范围内。DAS 软件分析显示恒速静脉泵给予吗啡后, 其代谢动力学符合二房室模型, 主要药动学参数如下: 消除半衰期  $t_{1/2\beta}$  24.38 min,  $AUC_{0-\infty}$  17.051 μg · mL<sup>-1</sup> · min, 峰浓度  $C_{max}$  0.851 μg · mL<sup>-1</sup>, 达峰时间  $t_{max}$  6 min。而经雾化吸入给药后其药动学符合一房室模型, 主要药动学参数如下: 消除半衰期  $t_{1/2\beta}$  51.21 min,  $AUC_{0-\infty}$  10.329 μg · mL<sup>-1</sup> · min, 峰浓度  $C_{max}$

0.209  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 达峰时间  $t_{\text{max}}$  25 min。

#### 4 讨论

样品的处理方法有很多,如液-液萃取、固相萃取、沉淀蛋白直接进样等<sup>[4]</sup>。本实验选择液-液萃取方法,采用毒性较小的乙酸乙酯为提取溶剂在碱性条件下提取,效果良好。取吗啡的流动相溶液进行紫外扫描,发现吗啡在 215 nm 波长处有最大吸收,故选择 215 nm 作为检测波长,内标对乙酰氨基酚在该波长条件下出峰时间稳定,峰形较好,缺点是血浆中杂质对样品分析的干扰较大。实验中发现流动相 pH 的变化对吗啡保留时间影响很大,调整流动相 pH 精确到 6.89 时,吗啡出峰位置正好能够避开内源性杂质的干扰,达到基线分离,满足测定要求。本方法在众多吗啡血浆分析

方法的基础上进行改进,简单经济,灵敏度好,可以用于犬血浆中吗啡的分析检测。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.09.001

#### [参考文献]

- [1] 张文珠,张虹,刘霞,等. 人血浆中吗啡含量的高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报,2003,22(2):78-80.
- [2] 张惠民,冯长军,朱凤坤,等. 高效液相色谱法测定血中海洛因的代谢物[J]. 分析仪器,2000,3(1):28-30.
- [3] 曹丰,王瑛,王淑珍,等. 剖宫产手术后硬膜外注射吗啡的监测[J]. 首都医科大学学报,2000,21(1):81-82.
- [4] 陈利琴,康学军,李琦,等. 反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定人全血中吗啡血药浓度[J]. 药物分析杂志,2006,26(10):1426-1429.

## 豚鼠灌胃后胃内容物中雷公藤的检测\*

陈宗良,裘颖儿,吴立成,王宜祥,李冰岚

(浙江省金华市食品药品检验所,321000)

**[摘要]** 目的 探讨雷公藤 30% 乙醇提取物经灌胃一定时间后胃内容物中雷公藤的分析检测方法。方法 豚鼠灌胃不同浓度雷公藤提取物 30 mL · kg<sup>-1</sup> 后,取其胃内容物,进行适当的前处理,采用高效液相色谱(HPLC)法对其胃内容物进行检测。结果 HPLC 法能检测出灌胃后的雷公藤 30% 乙醇提取物的 5 个特征峰。提取物在豚鼠体内停留时间及胃内容物前处理方法对检测结果有影响。结论 建立了豚鼠灌胃后胃内容物中雷公藤的快速灵敏的分析检测方法。

**[关键词]** 雷公藤;内容物;胃;色谱法;高效液相

**[中图分类号]** R282.71;R285.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-0781(2009)09-1109-02

## Measuring Gastric Contents of *Tripterygium Wilfordii* by Intragastric Administration in Guinea Pigs

CHEN Zong-liang, QIU Ying-er, WU Li-cheng, WANG Yi-xiang, LI Bing-lan (Jinhua Institute for Food and Drug Control, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

**ABSTRACT Objective** To investigate the determination of 30% ethanol extract of *Tripterygium wilfordii* in gastric contents by intragastric administration. **Methods** Gastric contents of the guinea pigs was collected after a single oral administration of different concentrations of ethanol extract of *Tripterygium wilfordii*, then they were pre-processed and measured by HPLC.

**Results** 5 characteristic peaks of 30% ethanol extract of *Tripterygium wilfordii* were found. It was showed that the detection results were influenced by staying time in stomach and the sample pretreatment. **Conclusion** A simple and sensitive method is established for detecting gastric contents of *Tripterygium wilfordii*.

**KEY WORDS** *Tripterygium wilfordii*; Contents, gastric; HPLC

雷公藤为卫矛科(Celastraceae)植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)的根,资源分布较广。近年的研究发现雷公藤属非甾体免疫调节抗炎药,具有

抗炎、免疫调节、抗肿瘤和抗生育作用,能抑制抗体的产生,可应用于治疗类风湿性关节炎、迟发型变态反应、乙型肝炎、重症肌无力、溃疡性结肠炎、器官移植等<sup>[1]</sup>,其中以对体液的免疫抑制作用较为显著。在较大剂量、长期或不合理使用时,雷公藤可引起较广泛的毒副作用,并呈明显的剂量-效应关系,严重者可因蓄积中毒致死<sup>[2,3]</sup>。随着应用范围的不断扩大,中毒事件时有发生,笔者在本实验中旨在建立雷公藤的高效液相色谱(HPLC)检测方法,快速确定胃内容物中是否含有雷公

**[收稿日期]** 2008-08-27 **[修回日期]** 2008-12-16

**[基金项目]** \*浙江省金华市科学技术研究计划项目(基金编号:2007-03-068)

**[作者简介]** 陈宗良(1978-),男,浙江永康人,主管药师,从事中药检验与应用研究。电话:0579-82301314, E-mail: zongliangchen@163.com。