

人血浆中盐酸氨溴索的 HPLC 测定及其在药动学研究中的应用

张磊¹, 胡晓², 张丽芳²

(1 九江学院医学院, 九江 332000; 2 南昌大学医学院临床药理研究所, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 建立人血浆中盐酸氨溴索浓度 HPLC 测定法。方法: 采用液-液萃取高效液相色谱紫外检测法, 以盐酸尼卡地平为内标, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (45:27:28), 流速为 1 mL·min⁻¹, 检测波长 245 nm。结果: 盐酸氨溴索血浆浓度测定方法线性范围为 10~480 ng·mL⁻¹, $r=0.9999$, 定量下限为 10 ng·mL⁻¹, 方法回收率 >94%。日内和日间 RSD <5%。结论: 本试验所建立起来的人血浆中盐酸氨溴索浓度测定法灵敏、准确、可靠, 适用于盐酸氨溴索的人体药动学研究。

[关键词] 盐酸氨溴索; 血药浓度; 高效液相色谱; 药动学

[中图分类号] R927.2; R969.1; R974.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2008)05-0409-03

Determination of ambroxol hydrochloride concentrations in plasma by HPLC and its application to pharmacokinetic studies

ZHANG Lei¹, HU Xiao², ZHANG Li-fang²

(1 Medical College of Jiujiang University, Jiujiang 332000, China; 2 Institute of Clinical Pharmacology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of concentration of ambroxol hydrochloride in human plasma. **Methods:** Ambroxol hydrochloride in human plasma (with nicardipine hydrochloride as internal standard) was detected at 245 nm after liquid-liquid extraction. The separation was performed on a C₁₈ reversed-phase column with a mobile phase of methanol-acetonitrile-0.01 mol·L⁻¹ phosphate buffer (45:27:28). **Results:** The calibration curve of ambroxol hydrochloride was obtained in the range of 10~480 ng·mL⁻¹ with good linearity ($r=0.9999$). The recoveries of methodology were more than 94%. The inter-day and intra-day RSD were less than 5%. **Conclusion:** This method has good sensitivity and precision and is suitable for pharmacokinetic studies of ambroxol hydrochloride in humans.

[Key words] ambroxol hydrochloride; plasma concentration of drug; HPLC; pharmacokinetics

盐酸氨溴索 (ambroxol hydrochloride) 是祛痰药溴己新在体内的代谢产物, 具有粘痰溶解作用, 可使痰中粘多糖纤维分化裂解, 稀化痰液, 并能抑制支气管黏膜酸性糖蛋白的合成而降低痰粘度, 便于咳出, 适用于痰液粘稠不易咳出者^[1]。盐酸氨溴索血药浓度的测定有同位素标记法、HPLC 紫外或电化学检测法、毛细管气相色谱法等多种方法的报道, 其中 HPLC 紫外检测法居多, 本试验在参考有关文献^[2~5]的基础上对人血浆中样品的处理及合适内标的选择进行了摸索, 对 HPLC 色谱条件进行了优化, 建立了一种灵敏准确、操作简便的人血浆中盐酸氨溴索的液-液萃取 HPLC 紫外检测法, 适用于盐酸氨溴索人体药动学研究。

材 料

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司); LXJ-B 型低速大容量多管离心机 (上海安亭科学仪器厂); XW-80A 旋涡混合器 (上海医大仪器厂); Sartorius 电子天平 (德国赛多利斯公司); 台湾艾柯实验室专用超纯水 8 机; DK-S 电热恒温水浴锅 (上海山连实验设备有限公司)。

盐酸氨溴索口腔崩解片 (30 mg/片, 批号: 060825), 盐酸氨溴索对照品 (批号: 060508, HPLC 法测定含量为 99.3%) 及盐酸尼卡地平对照品 (批号: 060423, HPLC 法测定含量为 99.8%) 均由宜昌长江药业有限公司提供; 盐酸氨溴索片 (30 mg/片, 批号:

684021)由上海勃林格殷格翰药业有限公司研制。甲醇、乙腈和正己烷(均为色谱纯,山东禹王实业有限公司);正庚烷(分析纯,天津福晨化学试剂厂);试验用水为符合美国 F900实验室标准的超纯化水。

方法与结果

色谱条件

色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, 迪马公司);流动相: 甲醇-乙腈-0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) (45:27:28);流速: 1.0 mL·min⁻¹;检测波长: 245 nm;柱温: 20℃。

标准溶液配制

精密称取盐酸氨溴索对照品和盐酸尼卡地平对照品适量,分别用甲醇溶解并定容,各制得 1.069 和 1.616 mg·mL⁻¹ 的对照品贮备液,再分别稀释得 50 μ g·mL⁻¹ 的盐酸氨溴索对照品溶液和 20 μ g·mL⁻¹ 的

盐酸尼卡地平对照品溶液。

血浆样本处理与测定

取血浆 0.78 mL,精密加入 20 μ L 内标 (200 ng·mL⁻¹ 盐酸尼卡地平)及 200 μ L 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液,漩涡混匀 30 s,加入正己烷和正庚烷混合液 (1:1) 4.0 mL (含 5% 异丙醇),漩涡振荡 1.0 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10.0 min,取上层有机相 3.0 mL 至另一离心管中,加入 200 μ L 0.01 mol·L⁻¹ 的盐酸,漩涡混匀 1.0 min, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10.0 min,弃有机相,吸取酸层 30 μ L 自动进样,进行 HPLC 分析。

色谱行为

在上述色谱条件下,获得给药前空白血浆、空白血浆加盐酸氨溴索对照品及受试者服用盐酸氨溴索后的血浆样品色谱图,见图 1,可见盐酸氨溴索保留时间约为 7.4 min,内标保留时间约为 14.0 min,各峰分离良好,无杂峰干扰测定。

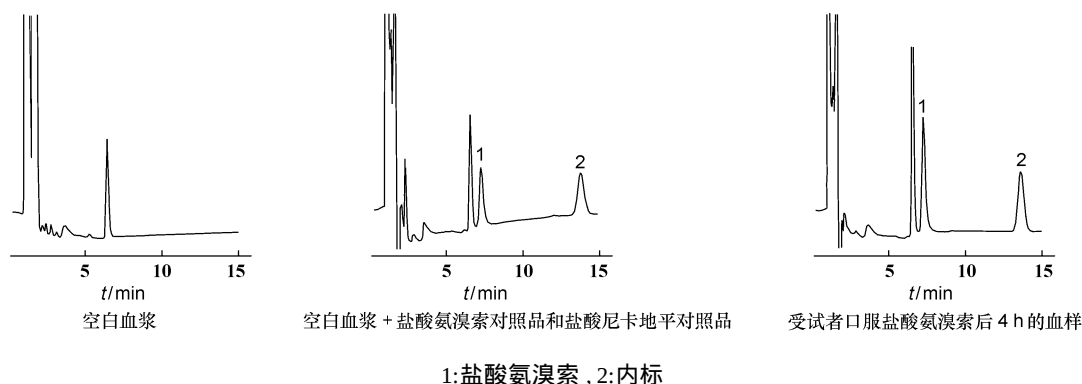


图 1 血浆样品分析色谱图

标准曲线的制备

配制含盐酸氨溴索标准品 10, 20, 40, 80, 160, 240, 480 ng·mL⁻¹ 系列血样,分别按血浆样本处理方法处理后进样。记录样品和内标峰面积,利用样品浓度对样品与内标的峰面积比作直线回归,得盐酸氨溴索标准曲线及其回归方程为: $A_s/A_i = 0.0046C - 0.0099$, $r=0.9999$, $n=5$ 。结果表明,盐酸氨溴索血浆浓度测定方法的线性范围为 10~480 ng·mL⁻¹,最低定量浓度为 10 ng·mL⁻¹ (以 $S/N > 4$ 计)。

回收率试验

6.1 绝对回收率测定 精密配制含盐酸氨溴索标准品 20, 80, 240 ng·mL⁻¹ 的系列血样,各浓度均为 5 份。按“血浆样本处理”方法操作,另配制相应浓度的标准溶液,不经萃取直接以等量进样,分别测其峰面积,两组峰面积进行比较,计算血浆中盐酸氨溴索

的绝对回收率。低、中、高 3 个浓度萃取回收率见表 1。

6.2 相对回收率测定 精密配制浓度为 20, 80, 240 ng·mL⁻¹ 盐酸氨溴索标准血样各 5 份,按“血浆样本处理”方法操作进样,共 3 批次以标准曲线方程计算其检出量与加入量的比值,得其相对回收率,结果见表 1。

表 1 人血浆中盐酸氨溴索的回收率 $n=5, \bar{x} \pm s$

浓度 / ng·mL ⁻¹	绝对回收率 / %	相对标准偏差 / %	相对回收率 / %	相对标准偏差 / %
20	66.6 $\pm$ 3.5	5.2	94.2 $\pm$ 3.9	4.1
80	86.9 $\pm$ 4.0	4.6	99.7 $\pm$ 1.2	1.2
240	85.3 $\pm$ 1.7	2.0	99.9 $\pm$ 0.6	0.6

精密度与准确度试验

在标准曲线范围内,选择高、中、低 (240, 80, 20

$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 3个浓度的盐酸氨溴索标准血样,按“血浆样品处理”方法操作,每一浓度制备并测定 5个样品,3 d连续制备并测定 3个分析批,根据标准曲线,计算样品的测得浓度,结果见表 2。低、中、高 3个浓度日内及日间变异 RSD均 $<5\%$ 。

表 2 HPLC法测定人血浆中盐酸氨溴索的
准确度与精密度 $\bar{x} \pm s$

加入量 / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度 / %	日内 RSD / %	日间 RSD / %
20	96.9 $\pm$ 5.1	4.1	4.6
80	100.6 $\pm$ 1.0	1.2	1.3
240	99.8 $\pm$ 0.1	0.6	0.9

稳定性考察

配制 $80\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸氨溴索标准血样,考察其血浆样品经液液萃取处理后室温放置 24 h的稳定性,血浆样品室温放置 2 h的稳定性,血浆样品 - 20 分别放置 20 d及 40 d的稳定性,血浆样品经历 3次冻融(冷冻-解冻循环)的稳定性。血浆样品按“血浆样品的处理”项下操作,结果表明经上述处理盐酸氨溴索的浓度无明显变化, RSD $<5\%$ 。

方法应用

选择 18例经体检合格的健康男性志愿者,单剂量口服 90 mg 供试制剂盐酸氨溴索口腔崩解片或参比制剂腔片,分别于服药前(0 h)及服药后 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0, 24.0 h采集上肢静脉血 4 mL 至肝素化试管中, $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分离出血浆置 - 20 冷冻保存待测。40 d内测定。用本法测定血浆盐酸氨溴索浓度,计算所得口服盐酸氨溴索口腔崩解片或参比制剂腔片后的主要药动学参数见表 3。

表 3 18例健康志愿者单剂量口服盐酸
氨溴索的主要药动学参数

药动学参数	受试制剂	参比制剂
$T_{\max}/\text{h}$	1.3 $\pm$ 0.6	1.5 $\pm$ 0.9
$t_{1/2}(\text{ke})/\text{h}$	6.7 $\pm$ 1.8	6.9 $\pm$ 1.6
$C_{\max}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	195.2 $\pm$ 57.2	177.8 $\pm$ 50.3
MRT/h	9.3 $\pm$ 2.2	9.7 $\pm$ 2.0
$\text{AUC}_{0-24}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	1186.5 $\pm$ 321.4	1215.6 $\pm$ 368.9
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	1375.1 $\pm$ 388.4	1371.2 $\pm$ 419.5

讨 论

单剂量口服盐酸氨溴索后血浆中药物浓度较低,因而要求所建立的分析方法具有较高的灵敏度。

本试验在文献^[2~5]的基础上对人血浆中样品的处理及 HPLC色谱条件进行了摸索。采用高效液相紫外检测结合液液萃取法,比较了多种溶剂对血样中盐酸氨溴索的提取效果。结果在碱化血浆的基础上,用正己烷和正庚烷混合液(1:1)提取,提取液再经 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸反提,萃取回收率高且非常稳定,血浆中无杂质干扰盐酸氨溴索色谱峰,而采用文献报道乙酸乙酯、乙醚、叔丁基甲醚及单用正己烷提取,在盐酸氨溴索色谱峰处均有部分干扰。在内标的选择上,本实验尝试用硝苯地平、尼莫地平、地尔硫卓及尼卡地平等作内标,其中尼莫地平稳定性差容易分解;硝苯地平和地尔硫卓虽然在上述萃取条件下可被稳定地萃取,却无法和血浆中杂峰分离或干扰盐酸氨溴索色谱峰,而尼卡地平既可和氨溴索同时被稳定萃取,又在所确立的甲醇-乙腈- $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(45:27:28)的流动相条件下,各峰分离良好,无杂峰干扰测定。采用本方法测定血浆中盐酸氨溴索的浓度在 $10\sim 480\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好($r=0.9999$),精密度和准确性均符合生物样本分析的要求。

本研究建立的 LTP血清样品 HPLC分析方法简便,呈现了很好的重现性和准确性。通过 18名健康志愿者盐酸氨溴索人体药动学和生物等效性研究,结果与文献^[3,4]报道基本一致。

【作者简介】 张磊(1970-),男,硕士研究生。联系电话:(0791) 6360654, E-mail: jzhanglei@163.com。

【通讯作者】 胡晓(1963-),女,副教授,硕士生导师,主要从事临床药理学教学与研究。联系电话:(0791) 6360654, E-mail: huxiao1185@126.com.cn。

[参 考 文 献]

- [1] 朱科明,李申,杨波,等.沐舒坦对呼吸系统的保护作用机制[J].国外医学·麻醉与复苏分册,2001,22(1):49-51.
- [2] 范国荣,林梅,安登魁.单剂量口服盐酸氨溴索缓释胶囊的人体生物等效性[J].中国医院药学杂志,2001,21(1):9-12.
- [3] 戈升荣,安富荣,袁静,等.国产与进口盐酸氨溴索片的人体生物等效性研究[J].上海第二医科大学学报,2002,22(1):26-28.
- [4] 李珍,徐学君,沈意翔,等.国产盐酸氨溴索片在健康人体内的生物等效性评价[J].临床药学,1999,34(8):541-543.
- [5] 文爱东,杨志福,周敏,等.盐酸氨溴索分散片人体药动学[J].中国新药杂志,2007,16(3):247-250.

编辑:周卓 接受日期:2007-10-23