

气相色谱-碱焰离子化检测眩晕啉的血药浓度

周建平 小木曾太郎¹

(中国药科大学药剂学研究室, 南京 210009; ¹ 日本近畿大学药学部)

摘要 建立了气相色谱-碱焰离子化检测大鼠血浆中眩晕啉浓度。本法在 0.05~0.70 $\mu\text{g/ml}$ 血浓范围内线性相关($r=0.9999$), 平均回收率为 95.76%, 重现性好($CV<5\%$), 适合眩晕啉血药浓度测定及其动力学研究。

关键词 眩晕啉; 气相色谱; 碱焰离子化检测器; 血药浓度

眩晕啉(betahistine, BH)为一种血管扩张药物, 临床用于美尼尔氏综合症及其他运动性眩晕^[1]。由于其 UV 吸收值较小, 且具有一定极性, 用 HPLC 法分离, 测定效果较差, Douglas 等人曾采用气相色谱(GC)-氢离子火焰检测器测定了血清中的 BH, 但回收率仅 45%, 且线性范围在 0.6~6.0 $\mu\text{g/ml}$ 之内^[2], 难以满足 BH 血浓测定的要求, 本文选择了 GC-碱焰离子化检测器(亦称氮磷检测器), 专属性测定含氮的 BH。采用合适的血样处理过程及 GC 条件, 建立了 BH 血药浓度的测定方法。

1 实验部分

1.1 仪器与药品

GC 主机(263-50 型), 氮磷检测器及 D-2500 型数据处理仪(HITACH 公司), 2,4,6-三甲基苯胺(Sigma 公司), 眩晕啉(Adrich 化学公司), 浓氨水、乙醇、氯仿等试剂均为分析纯, 眩晕啉软膏剂(自制)。

1.2 气相色谱条件

色谱柱: 填充 80/100 目碱处理 Unisole 10T 气相担体的 1 m \times 3 mm 玻璃管; 柱温: 145 $^{\circ}\text{C}$; 进样口及测定室温度均为 225 $^{\circ}\text{C}$; 热丝电流 1.7A; 气体流速: 氮气(载气)为 30 ml/min, 氢气 3 ml/min, 空气 100 ml/min; 灵

敏度: Atten = 1, Range = 10; 记录纸速 2.5 mm/min。

1.3 血样处理

取 0.2 ml 全血(肝素钠抗凝), 1500 r/min 离心 15 min(5 $^{\circ}\text{C}$), 精密吸取血浆 0.1 ml, 加 0.1 ml 10%(V/V)的氨水, 混合 5 min, 精密加入 2.5 ml CHCl_3 , 在 5 $^{\circ}\text{C}$ 下振摇, 提取 10 min, 离心 10 min(3000 r/min), 精密移取 CHCl_3 层 2.0 ml, 置 5 ml 离心管中, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸干, 定量加入 30 μl 含 2.0 nl/ml 的 2,4,6-三甲基苯胺乙醇液溶解, 取 15 μl 乙醇液进样测定。

1.4 标准曲线制作

精密称取 BH 适量, 加乙醇配制成 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.50, 0.7 $\mu\text{g/ml}$ 的标准液, 分别精密加入 5 ml 离心管中各 0.1 ml, 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸干, 加入 0.1 ml 空白血浆溶解, 以下按血样处理项下操作, 测定 BH 及内标物峰面积之比($A_{\text{BH}}/A_{\text{IS}}$), 求 $A_{\text{BH}}/A_{\text{IS}}$ 与浓度之间的相关性。

1.5 回收率测定

在各浓度点取二份标准液, 减压蒸干后, 分别加 0.1 ml 空白血浆和蒸馏水, 以下按血样处理项下操作。

$$\text{回收率}(\%) = C_{\text{血浆}}/C_{\text{水}} \times 100\%$$

1.6 精密度试验

在 0.2 和 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 二个水平进行, 日间差在 1 wk 内完成, 日内差在 12 h 内完成。

1.7 BH 软膏剂大鼠血浓测定

取含 3% BH 软膏剂 0.4 g, 均匀涂布在大鼠腹部 (0.7854 cm^2), 在设定时间内颈静脉采血 0.2 ml, 肝素钠抗凝, 以下按血样处理项下操作。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件选择

空白血样和 0.05 $\mu\text{g/ml}$ BH 血样气相色谱图(图 1)表明: 在本实验条件下, 空白血样经处理后, 无干扰物存在, BH 和内标物分离情况良好, 分离度 $R = 2(t_{R,1} - t_{R,2}) / (W_{b,1} + W_{b,2}) \geq 1.56 > 1.5^{[3]}$ 。

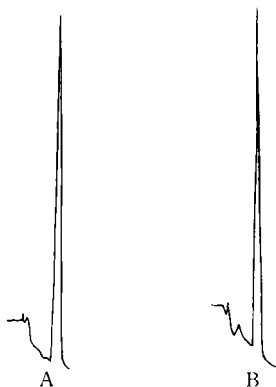


Fig 1. A. Chromatogram of 2,4,6-trimethylaniline; B. Chromatogram of 2,4,6-trimethylaniline and BH

采用本色谱条件可使进样周期控制在 7 min 之内, 且峰形较好, 若提高氢气流速, 虽然可提高分析灵敏度, 但检测器寿命则相应缩短。

2,4,6-三甲基苯胺比二甲基苯胺和苯胺具有较合适的保留时间(t_R), 但由于其易随 CHCl_3 挥发, 故必须在最后加入。由于氮磷检测器灵敏度下降较快, 且响应不易稳定^[4], 故采用外标法误差较大。为了使仪器响应相对稳定, He 和 H_2 必须采用高纯度色谱用气。

2.2 标准曲线

按标准曲线制备项下操作, 结果(表 1)表明: 本法在 0.05~0.7 $\mu\text{g/ml}$ BH 范围内线性相关($r=0.9999$), 可以定量测定, 但在低浓度时(0.05 $\mu\text{g/ml}$), 误差较大($CV=19.9\%$)。

Tab 1. Relationship between relative peak area and BH concentration in rat plasma ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$)

$C, \mu\text{g/ml}$	$A_{BH}/A_{IS}, \times 10^3$
0.05	15.63 ± 3.33
0.10	40.16 ± 3.12
0.20	95.31 ± 2.75
0.30	156.4 ± 4.92
0.50	262.0 ± 10.6
0.70	375.2 ± 17.6
Linear Eq.	$A_{BH}/A_{IS} = 0.5548C - 0.0136, r = 0.9999$

Tab 2. Recovery of BH from rat plasma ($n=3$)

$C, \mu\text{g/ml}$	$A_{BH}/A_{IS}, \times 10^3$		Recovery, %
	Plasma	Water	
0.05	15.63	14.32	109.1
0.10	40.16	40.08	100.2
0.20	95.31	102.3	93.17
0.30	156.4	160.7	97.32
0.50	262.0	277.1	94.55
0.70	375.2	400.9	93.57

2.3 回收率测定

血浆回收率数据(表 2)表明: 当 BH 浓度小于 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 时, 测定值比实际值稍大, 且 SD 较大, 这是由于低浓度峰形较差, 误差所致, 除去 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 浓度点, 平均回收率 95.26% ($CV=3.09\%$)。

2.4 精密度测定

结果(表 3)表明本法较稳定, 重现性好($CV=5\%$)。

Tab 3. Precision ($n=5$)

$C, \mu\text{g/ml}$	Within-day		Day-to-day	
	$\bar{x} \pm SD, \mu\text{g/ml}$	$CV, \%$	$\bar{x} \pm SD, \mu\text{g/ml}$	$CV, \%$
0.20	0.202 ± 0.00683	3.38	0.205 ± 0.00927	4.52
0.50	0.507 ± 0.0174	3.43	0.509 ± 0.0244	4.79

2.5 BH 软膏剂的血浓测定

从血浓-时间曲线可知: 该 BH 软膏剂透皮效果较好, 至少能保持 36 h 的 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上的大鼠血浓, 12 h 至 36 h 之间血浓较平稳, 基本达到了制备 TTS 的目的, 血浓数据符合二室模型。

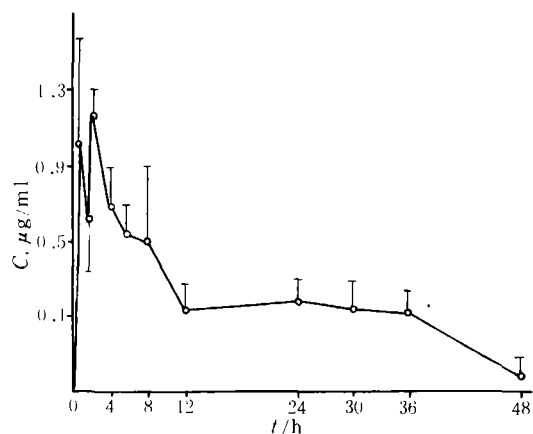


Fig 2. *In vivo* the profile of concentration of BH in plasma versus time after administration of BH ointment ($n=4$)

本文采用的血浆提取方法简单,能有效

地分离血浆中干扰杂质,保证了测定结果的准确性;氮磷检测器比氢离子火焰检测器测定 BH 更具有专属性,且检测限更低;外加内标法降低了 GC-氮磷检测过程中效应不稳定因素,使实验数据更为可靠。本法操作简便、快速,回收率高(95.76%),重现好($CV < 5\%$),是测定 BH 血浓及研究其动力学的有效方法。

参考文献

- 1 The Merck Index. Tenth Edition. 168
- 2 Douglas JF, Hohing TL. GLC determination of betahistine in serum. *Experientia*, 1978, 34:499
- 3 安登魁. 药物分析. 济南:济南出版社,1992. 300
- 4 安登魁. 药物分析. 济南:济南出版社,1992. 341

Determination of Betahistine in Plasma with GC-Alkal Flame Ionization Detector

Zhou Jianping, Taro Ogiso¹

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, ¹Department of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Japan

A method of GC with alkal flame ionization detector was developed for determining betahistine concentration in plasma. The instrument settings were: column temperature, 145°C; injection port and detector block temperature, 225°C; bead current, 1.7A; sensitivity, Atten=1 and Range=10; recorder rate, 2.5 mm/min. Gas flow rates were: Helium (carrier gas), 30 ml/min; Hydrogen, 3 ml/min; Air, 100 ml/min. The average recovery of betahistine in plasma was 95.76%. The coefficient of variation was less than 5.0%. The method is simple, rapid, sensitive and repetitive, its linear range being 0.05~0.7 µg/ml ($r=0.9999$). The method can be used for betahistine assay and kinetics study.

Key words Betahistine; GC; Alkal flame ionization detector; Plasma concentration