

高效液相色谱法测定扑炎痛在人血浆中活性代谢物及生物利用度研究

陈俊 屠锡德 高杰¹

(中国药科大学药剂学教研室,南京 210009; ¹江苏省医药工业研究所,南京 210042)

摘要 采用高效液相色谱法测定人血浆中扑炎痛活性代谢物水杨酸及扑热息痛含量,以比较两种不同制剂的生物利用度。血浆中药物分别用乙醚和乙酸乙酯两步提取; YWG C₁₈为固定相,甲醇-pH 2.1 磷酸盐缓冲液(60:50)为流动相,测定波长为 238 nm; 水杨酸和扑热息痛的检测范围分别为 1.0~200.0 μg/ml, 1.0~25.0 μg/ml, 平均回收率分别为 97.57±6.15%, 97.43±4.39%。用本法测定了 8 名健康志愿者分别服用市售扑炎痛片剂 A(500 mg/片)及自制片剂 B(400 mg/片)后的血药浓度,结果表明 A、B 的水杨酸血药峰浓度分别为 113.05, 131.78 μg/ml; 达峰时间分别为 2.5, 2.0 h; B 对 A 的相对生物利用度为 125.59%。

关键词 水杨酸; 扑热息痛; 扑炎痛; HPLC; 生物利用度

扑炎痛又名苯乐来(benorylate)为阿斯匹林与扑热息痛以酯键结合的亲脂性化合物,是一非甾体类抗风湿解热镇痛药;该药疗效类似于阿斯匹林,又能避免其游离羧基对胃肠道的刺激性,具有较好的适应性;该药为一难溶性化合物,在整个胃肠道内不水解,当其缓慢吸收进入人血液后才水解生成水杨酸和扑热息痛而产生疗效^[1~3]。有关国产扑炎痛制剂的体内血药浓度测定及生物利用度研究尚未见报道,我们参考文献[4~6],采用HPLC 法测定该药在人体血浆中代谢物浓度,进行制剂的生物利用度研究。

1 实验部分

1.1 药品与仪器

水杨酸标准品(原联邦德国进口);扑热息痛标准品(中国药科大学提供);对二甲氨基苯甲醛(分析纯,上海试剂三厂);扑炎痛片剂 A(500 mg/片,成都制药二厂提供);扑炎痛片剂 B(400 mg/片,自制)。

岛津 LC-6A 高效液相色谱仪; SPD-6AV

紫外检测器; 岛津 C-R3A 记录仪; YWG C₁₈ 色谱柱: 200 mm×5 mm i. d. 10 μm。

1.2 方法和结果

1.2.1 色谱条件 流动相为甲醇-pH 2.1 磷酸盐缓冲液(60:50);检测波长 238 nm;流速 1 ml/min; 内标物对二甲氨基苯甲醛; AUFS 0.02。

精密称取扑炎痛(SAPA)、水杨酸(SA)、扑热息痛(PA)、乙酰水杨酸(ASA)、对二甲氨基苯甲醛(SI)适量,以甲醇为溶媒配成溶液(浓度比为 PA : ASA : SA : SI : SAPA = 1 : 1 : 1 : 0.004 : 1)。取空白血浆 1 ml 加该溶液,余按“样品处理”项下进行。在上述色谱条件下进样测定,色谱图见图 1-a, 1-b, 图 1-c 为服用扑炎痛片剂后人血浆样品色谱图。由图可知该色谱条件能很好地分离原药 SAPA、中间代谢物 ASA、活性物 SA、PA 及内标物, 分析峰无任何干扰。

1.2.2 样品处理 精密取血浆 1.0 ml 加内标 0.2 μg、饱和硫酸铵溶液 2.0 ml 及乙醚 6.0 ml 振摇混合, 离心(3000 r/min), 收集有

收稿日期 1994-06-24

机层液 5.0 ml, 在剩余水相加入 1 mol/L HCl 0.6 ml 及乙酸乙酯 6.0 ml, 振摇离心, 收集有机层液 5.0 ml 与前提取液合并。N₂ 吹干, 残留物溶于甲醇 200 μl 中, 进样 10 μl。

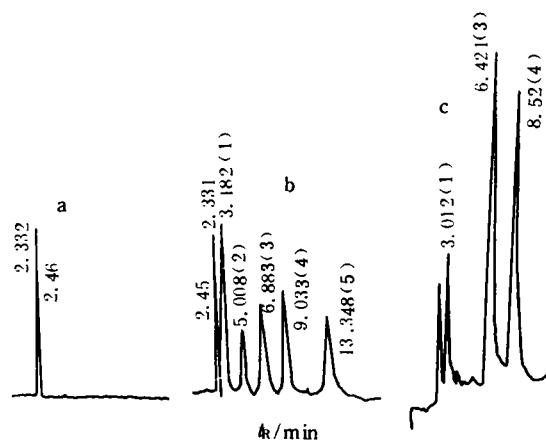


Fig 1. Chromatograph of (a) blank plasma, (b) human plasma containing paracetamol(1), acetylsalicylic acid(2), salicylic acid(3), internal standard(4) and benorylate(5), and (c) human plasma after taking benorylate tablets

1.2.3 标准曲线制备 精密称取水杨酸、扑热息痛标准品适量, 甲醇溶解, 加空白血浆分别精密配成 1.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0, 200.0 μg/ml (SA) 及 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 μg/ml (PA) 等血浆浓度。余按“样品处理”项下进行, 测定 SA、PA 及内标峰面积, 以药物和内标峰面积比 Y (五次进样所得的平均值) 与浓度 C 线性回归得标准曲线方程分别为: SA: $Y = 0.01104 + 0.0011C$ $r = 0.9998$ (1.0 ~ 200.0 μg/ml); PA: $Y = 0.00225 + 0.0321C$ $r = 0.9997$ (1.0 ~ 25.0 μg/ml)。

1.2.4 回收率与重现性 取空白血浆 1.0 ml, 加入不同浓度的 SA、PA 甲醇溶液, 余按“样品处理”项下进行, 测定 SA、PA 分别与内标峰面积的比值, 代入标准曲线方程计算浓度, 求各浓度的回收率。见表 1。在上述色谱条件下分别进行日间及日内重现性试验, 结果见表 2。

1.2.5 血药浓度测定 8 名健康受试者单剂量交叉口服制剂 A(服用量 500 mg × 9 =

Tab 1. Recovery of SA and PA in human plasma, n=5

	Added, μg/ml	Found, μg/ml	%	RSD, %
SA	1.00	0.86	86.00	10.00
	5.00	4.85	97.00	7.20
	10.00	9.50	95.00	5.00
	20.00	20.82	104.00	3.70
	50.00	49.58	99.00	3.90
	100.00	103.30	103.00	3.90
	200.00	198.90	99.00	8.10
Mean		97.57	5.99	
RSD, %		6.15		
PA	1.00	0.99	99.00	5.40
	2.50	2.41	96.00	2.10
	5.00	4.94	99.00	1.70
	10.00	8.92	89.00	2.20
	15.00	15.45	103.00	2.00
	20.00	19.54	98.00	2.90
	25.00	24.50	98.00	3.80
Mean		97.43	2.87	
RSD, %		4.39		

Tab 2. Reproducibility of SA and PA in human plasma, n=5

Added, μg/ml	Within-day		Day-to-day		
	s	RSD, %	s	RSD, %	
SA	5.00	0.14	2.88	0.34	6.96
	50.00	2.41	4.60	2.42	4.93
PA	2.50	0.16	6.15	0.05	2.00
	10.00	0.72	6.70	0.81	8.00

4.5 g) 及制剂 B(服用量 400 mg × 9 = 3.6 g), 受试者隔夜空腹服药。隔一定时间静脉采血 3 ml, 离心分离, 取血浆 1.0 ml, -25 ℃ 保存待测, 余按“样品处理”项下进行, 测得两种制剂的血药浓度。浓度-时间曲线见图 2。制剂 A、B 的水杨酸血药峰浓度 (C_{max}) 分别为 113.05, 131.78 μg/ml; 达峰时间 (T_p) A 为 2.5 h, B 为 2.0 h; 两种制剂的扑热息痛血药浓度相差不明显。

1.2.6 生物利用度 用梯形面积法计算 8 名受试者实测 SA 血药浓度-时间曲线下面积 AUC 值。制剂 A、B 的 AUC 值分别为 1498.34 和 1505.38 μg · h/ml, $AUC_B/AUC_A = 125.59\%$ 。

上述结果表明水杨酸血药浓度制剂 B 的达峰时间比 A 提前 0.5 h; 最大血药浓度峰值亦高于 A; B 对 A 的相对生物利用度为 125.59%, 说明制剂 B 在吸收速度与程度上均优于对照制剂 A。

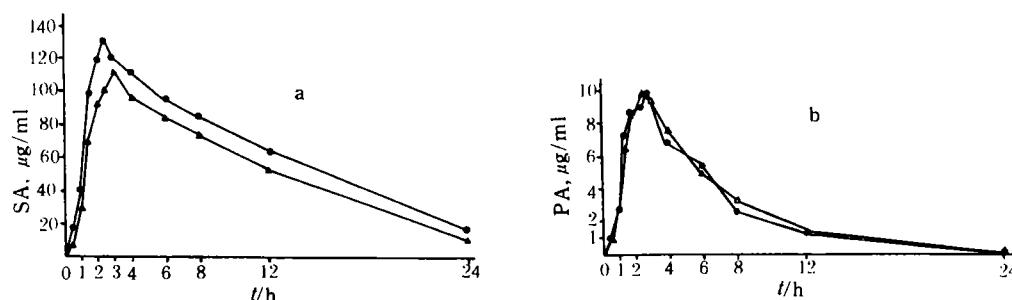


Fig 2. Mean plasma concentration of (a)salicylic acid(SA) and (b)paracetamol(PA)-time curves after oral administration of tablet A ($-\Delta-$, 4.5 g) and tablet B($-\bullet-$, 3.6 g) in 8 human subjects

参考文献

- 1 Bath P. Synthesis, production and packaging of a new antirheumatic. *Manufacturing Chemist*, 1972, **43**: 35
- 2 Robertson A, Glynn JP, Watson AK. The absorption and metabolism in man of 4-acetamidophenyl-2-acetoxybenzoate (benorylate). *Xenobiotica*, 1972, **2**: 332
- 3 Liss E, Robertson A. The distribution and elimination of radioactivity in the rat/after administration of ^{14}C -4-acetamidophenyl-2-acetoxybenzoate. *Arzneimittel-Forsch*, 1975, **11**: 1972
- 4 Marzo A, Quardo G, Treffner E, et al. High-pressure liq-
- uid chromatographic evaluation of cyclic paracetamol-acetyl-salicylate and its active metabolites with results of a comparative pharmacokinetic investigation in the rat. *Arzneimittel-Forsch/Drug Res*, 1990, **40**: 813
- 5 Cailleux A, Cailleux P, Allain P. Dosage du benorylate et de ses metabolites dans le sang par chromatographie en phase liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *Therapie*, 1979, **34**: 73
- 6 Cailleux P, Cailleux A, Allain P, et al. Etude des taux plasmatiques du benorylate et de ses metabolites chez l'homme après administration unique et répétée. *Therapie*, 1979, **34**: 81

Evaluation of Benorylate and Its Active Metabolites by HPLC and Comparative Bioavailability Investigation in Human Plasma

Chen Jun, Tu Xide, Gao Jie

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract An analytical method of HPLC was developed which detected benorylate and its active metabolites in order to compare the bioavailability in human plasma. Extraction from plasma was carried out in two steps with ether and acetate. The separation was performed on the YWG C₁₈ column with mobile phase of methanol-pH2.1 phosphate buffer(60 : 50) at 238 nm of detection wavelength. The lowest limit was 50 ng for paracetamol and salicylic acid. The mean recoveries in plasma were 97.57 ± 6.15%, 97.43 ± 4.39% for SA and PA respectively. The plasma concentration of 8 healthy volunteers after taking benorylate tablet A(500 mg × 9) and B(400 mg × 9) was detected. The results showed that the maximum plasma concentration of SA was 113.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ from tablet A and 131.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ from B; the top time was 2.5 and 2.0 h for A and B respectively. The relative bioavailability of B to A was 125.59%.

Key words benorylate; salicylic acid; paracetamol; HPLC; bioavailability