

RP-HPLC 法测犬体内盐酸阿比多尔血药浓度

孟 华, 孙建国, 王广基^{*}, 姜希凌, 李 昊

(中国药科大学药代研究中心, 南京 210009)

【摘 要】 目的: 建立 RP-HPLC 法测定犬血浆中阿比多尔浓度。方法: 血浆样品加入内标安定, 经饱和碳酸钠碱化处理并用乙醚提取后浓缩进样; 流动相为甲醇-水相(72:28), 水相为 5 mmol/L 十二烷基硫酸钠, 加入 1.32% 三乙胺, 用磷酸调 pH 值为 3.0; 色谱柱为汉邦科技 Lichrospher C₈(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm ID.), 检测波长为 318 nm, 流速为 1.0 ml/min。测定了犬口服单剂量阿比多尔片 100 mg 后的血药浓度-时间过程。结果: 标准曲线线性范围为 10~5 000 ng/ml($r=0.9994$); 25, 250, 1 000, 5 000 ng/ml 平均绝对回收率分别为 92.1%, 94.1%, 104.3%, 112.7%; 25, 250, 1 000, 5 000 ng/ml 日内精密度分别为 8.0%, 8.0%, 8.1%, 1.6%; 25, 250, 1 000, 5 000 ng/ml 日间精密度分别为 16.5%, 7.2%, 8.0%, 1.3%; 该方法符合生物样品分析要求。结论: 本法的样品处理过程简便, 重现性好, 适合大批量样品的测定, 用于阿比多尔犬体内血药浓度测定取得良好结果。

【关键词】 阿比多尔; 药代动力学; 反相高效液相色谱法; 含量测定

【中图分类号】 R917; R969.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)01-0057-03

阿比多尔化学名为 6-溴-4-二甲氨基甲基-5-羟基-1-甲基-2-苯硫基甲基-吡啶-3-羧酸乙酯盐酸盐-水合物, 由全俄化学制药研究所研究开发, 1992 年首先在俄罗斯上市, 为非处方药。阿比多尔通过活化巨噬细胞吞噬细胞功能产生作用, 同时引起细胞免疫和体液免疫, 还可以诱导干扰素的生成, 是一种高效治疗和预防 A 型和 B 型流感及其它急性呼吸道感染的药物。目前所用的阿比多尔 RP-HPLC 方法灵敏度不够, 内标需要自己合成, 因此本文的目的就是建立一种高灵敏度、专属性强的 RP-HPLC 方法, 用于测定犬口服单剂量阿比多尔后的血药浓度, 为该药的进一步研究提供了依据。

1 仪器与试剂

HP1050 高效液相色谱仪, VWD 紫外检测器, HPLC 2D Chemstation (Rev: A. 02. 04), Sorvall 高速离心沉淀器, XW-80A 旋涡混合器。阿比多尔对照品(江苏吴中公司, 纯度为 99.8%), 阿比多尔片剂(江苏吴中公司, 每片含阿比多尔 100 mg, 批号 20021011), 安定(江苏省药物检验所提供, 纯度 99.9%)。甲醇为色谱纯(美国 Tedia 公司), 十二烷基硫酸钠, 三乙胺, 磷酸, 无水碳酸钠, 乙醚等均为国产分析纯。

2 方 法

2.1 色谱条件

流动相为甲醇-水相(72:28), 水相为 5 mmol/L 十二烷基硫酸钠, 加入 1.32% 三乙胺, 用磷酸调 pH 值为 3.0; 色谱柱为汉邦科技 Lichrospher C₈(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm ID.), 检测波长为 318 nm, 流速为 1.0 ml/min。

2.2 血浆样品的处理

于试管中加入血浆 1.0 ml, 内标安定标准溶液 20 μ l (50 μ g/ml), 混匀, 再加入饱和碳酸钠 0.5 ml, 混匀; 然后加入 5 ml 乙醚, 振荡 2 min, 于 3 000 r/min 离心 10 min。取上层有机相 4 ml 于另一试管中, 50 $^{\circ}$ C 水浴氮气流吹干。用 100 μ l 甲醇溶解残渣, 于 18 000 r/min 离心 10 min, 精密吸取 20 μ l 上清液进样分析。

3 结 果

3.1 专属性试验

采用空白血浆提取后进样的色谱图与标准品色谱图进行比较, 空白血浆在样品和内标出峰的保留时间内无内源性杂质干扰, 基线平稳。在本实验条件下, 阿比多尔和安定有较大的色谱峰, 血浆中杂质峰

及阿比多尔的代谢物不干扰样品和内标的测定。阿比多尔的保留时间为 9.3 min，内标的保留时间为 7.3

min，在本色谱条件下犬服药后阿比多尔出现一个代谢物峰，保留时间为 4.6 min。色谱图见图 1。

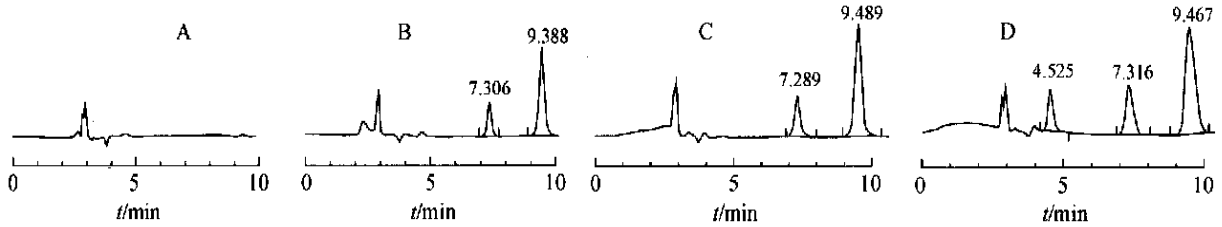


Fig 1 HPLC chromatograms of blank plasma(A), blank plasma spiked with arbidol and diazepam(B), arbidol and internal standard diazepam in methanol(C), plasma sample of 4 h after administration arbidol tablet(D).

3.2 线性试验

于试管中精密加入不同量的阿比多尔标准液和内标安定标准溶液 20 μl (50 μg/ml)，再加入 1.0 ml 空白血浆，使成浓度为 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 2 000, 5 000 ng/ml 的系列，按“2.2”项下操作，每种浓度做 5 份样品，记录峰面积。以样品和内标的峰面积比(f)对血药浓度(c)作回归计算，得回归方程为 $Y=0.0032X-0.0778$ ， $r=0.9994$ ，本法线性范围为 10 ~ 5 000 ng/ml，最低检测浓度为 10 ng/ml。

3.3 回收率试验

分别精密加入阿比多尔标准液 25, 250, 1000, 5000 ng 及内标安定标准溶液 20 μl (50 μg/ml)，吹干后，用甲醇 100 μl 溶解，取 20 μl 直接进样，记录样品的峰面积(As)。另于试管中精密加入不同量的阿比多尔标准液适量，加入 1.0 ml 空白血浆，配成阿比多尔 25, 250, 1 000, 5 000 ng/ml 的标准溶液，按“2.2”项下操作，每种浓度做 5 份样品，记录样品的峰面积(Ax)。血浆中阿比多尔的绝对提取回收率(R%)按下式计算。 $R\%=(Ax/As)\times(5/4)\times100\%$ ，得回收率(n=5) 分别为 92.1%，94.1%，104.3%，112.7%。

3.4 精密度试验

于试管中精密加入不同量的阿比多尔标准液适量和内标安定标准溶液 20 μl (50 μg/ml)，加入 1.0 ml 空白血浆，配成阿比多尔 25, 250, 1 000, 5 000 ng/ml 的标准溶液，按“2.2”项下处理样品，每种浓度做 5 份样品，记录峰面积。测定日内变异和 5 天内的日间变异。得日内精密度(n=5)分别为 8.0%，8.0%，8.8%，1.6%；日间精密度(n=5) 分别为 16.5%，7.2%，8.0%，1.3%。

3.5 冻融试验

于试管中精密加入不同量的阿比多尔标准液，氮气流吹干，分别加入 1.0 ml 空白血浆，振荡混匀，使成 25, 250, 1 000, 5 000 ng/ml 的浓度，放置-20℃冰箱冷藏 1 周，然后 37℃水浴融解，按“2.2”项下处理样品，测定血浆中药物浓度，结果分别为 29.06 ± 3.38 ， 210.97 ± 6.12 ， 927.59 ± 59.04 ， 5717.49 ± 72.73 ng/ml。

4 药代动力学参数的测定

4.1 给药方案及血样采集

犬，3 只，铁道医学院动物中心饲养。实验前 2 周及实验期间未服用其它任何药物。实验期间统一饮食。口服阿比多尔片剂(每片含阿比多尔 100 mg)各 1 片。于给药前 0.25 h，给药后 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 采静脉血 3 ml，立即置于肝素抗凝管中，4 000 r/min，离心 5 min，取血浆 1 ml 供血样分析。

4.2 血药浓度测定

口服阿比多尔片剂(每片含阿比多尔 100 mg) 各 1 片后平均血药浓度-时间曲线见图 2、图 3。

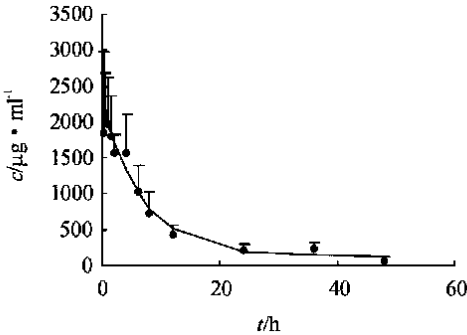


Fig 2 The observed and simulated concentration-time curve of arbidol in dog after oral treated with 100 mg arbidol (n=3).

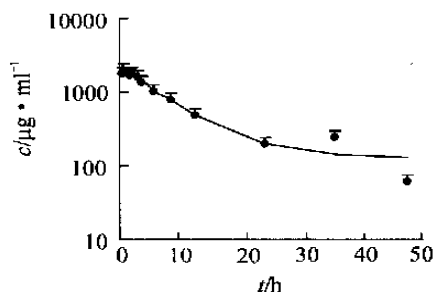


Fig 3. The logarithm concentration-time curve.

5 讨论

本实验流动相中加入离子对试剂, 样品和内标得到良好分离; 用三乙胺改善样品和内标峰形; 用磷酸控制 pH 值, 使得样品和内标出峰重现性好; 用安定做内标, 与样品分离良好; 乙醚提取血浆样品, 不易乳化, 转移有机相后, 水浴挥干快; 另外检

测波长为 318 nm, 有效避免血浆内源性杂质干扰样品和内标的出峰。因此, 本实验方法灵敏、准确、重现性好, 血样预处理操作简便易行, 具有良好的实用性。

【参考文献】

- [1] Rainer M, Peter M, Monika F, *et al* Sensitive hplc determination of arbidol, a new antiviral compound, in human plasma[J]. *J Chromatogr A*, 1998, **810**: 63-69
- [2] Sheinker YN. Report on the studies of the metabolism of arbidol[J]. *Moscow*, 1991.
- [3] Miller L, Bergeron R. Preparative liquid chromatographic isolation of unknown impurities in arbidol and SI-5[J]. *J Chromatogr A*, 1994, **658**: 489-496.
- [4] Shah VP, Mid hakk, *et al*. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies[J]. *Pharm Res*, 1992, **9**(4): 588-592.

Determination of Arbidol in Dog Plasma by RP-HPLC

MENG Hua, SUN Jian-Guo, WANG Guang-Ji, JIANG Xi-Ling, LI Hao

(Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 AIM: A simple RP-HPLC method was established for the determination of arbidol in dog plasma. **METHOD:** The alkalized arbidol was extracted from dog plasma by diethyl ether, evaporated to dryness and redissolved with 100ul methanol for the determination. The RP-HPLC method was performed on a Lichrospher C₈ column (5 μm, 250 mm×4.6 mm ID.) with mobile phase of methanol-5 mmol/L sodium lauryl sulfate (72:28), the water phase contains 1.32% triethylamine and the pH was adjusted to 3.0 by phosphoric acid at flow rate of 1.0 ml/min. Arbidol is detected by UV absorbance at 318 nm. Diazepam used as an internal standard. **RESULT:** The standard curve is linear over the concentration range of 10~5 000 ng/ml ($r=0.9994$) and the limit of detection was 10 ng/ml. The recoveries of arbidol from dog plasma were more than 90% and the RSD of intra-day and inter-day was less than 20%. The plasma concentration of three dog after an oral dose of 100 mg arbidol tablet was detected. **CONCLUSION:** The method established is simple, accuracy, sensitive and applicable for pharmacokinetic study of arbidol.

【KEY WORDS】 Arbidol; Pharmacokinetic; RP-HPLC; Determination of content