

地塞米松磷酸钠诱导后雌性大鼠血浆中氨苯砜含量的测定

夏宗玲,陈荣,王明丽

【摘要】 目的 建立测定经地塞米松磷酸钠诱导后雌性大鼠血浆中细胞色素 P450 3A4(CYP3A4) 探针药物氨苯砜浓度的方法。方法 采用高效液相色谱法,色谱柱为 Ultimate-XB C18 (250 mm × 4.6mm i. d. , 4μm) 流动相为乙腈-水(25:75) 流速为 1.0ml/min 紫外检测波长为 258nm 柱温为 30℃ ,进样量为 30μl。结果 氨苯砜血药浓度在 1.024 ~ 10.24mg/L 范围内线性关系良好($r = 0.9935$) ,方法回收率为 97.53% ~ 99.52% ,日内、日间相对标准偏差(RSD) 分别为 1.2% ~ 2.3%、2.8% ~ 4.9%。结论 本方法快速、准确、灵敏度高、专属性强,适用于大鼠血浆中氨苯砜浓度的测定。

【关键词】 高效液相色谱法;氨苯砜;地塞米松磷酸钠;细胞色素 P450 3A4;大鼠

【中图分类号】 R 977.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674 - 3296(2012) 10B - 0001 - 03

Determination of Dapsone in the plasma of female rats induced by Dexamethasone sodium phosphate XIA Zong-ling , CHEN Rong ,WANG Ming-li. Department of Pharmacy ,The Third Affiliated Hospital of Suzhou University ,Changzhou ,Suzhou 213000 ,China

【Abstract】 Objective To establish the method for determination of dapsone concentration which is the probe drug of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) in the serum. **Methods** Using high performance liquid chromatography(HPLC) ,the chromatographic column was the Ultimate-XB C18 (250mm × 4.6mm id 4μm) ,the mobile phase was acetonitrile-water (25:75) ,the flow rate was 1.0ml/min ,the UV detection wavelength was 258 nm ,the column temperature was 30℃ ,the injection volume was 30μl. **Results** The plasma concentration of dapsone in the range of 1.024 ~ 10.24mg/L showed a good linear relationship ($r = 0.9935$) . Method recoveries were 97.53% ~ 99.52% ,intra-day and inter-days RSD were 1.2 ~ 2.3% ,2.8 ~ 4.9% . **Conclusion** This method was rapid ,accurate ,high sensitivity ,strong specificity ,and suitable for determination of dapsone concentrations in serum.

【Key words】 High performance liquid chromatography; Dapsone; Dexamethasone sodium phosphate; CYP3A4; Rats

细胞色素 P450 3A4(CYP3A4) 是药物 I 相代谢酶中重要的药物代谢酶,约占人体肝脏药物 I 相代谢酶含量的 30% ,也是肠道的主要药物代谢酶。据报道,目前所知市场上 50% 的药物均通过 CYP3A4 参与体内代谢^[1]。在研究 CYP3A4 参与的代谢性药物相互作用及酶活性时,常选用其经典底物,如奎酮^[2]、咪达唑仑^[3]、红霉素^[4]、氨苯砜等^[5]。

氨苯砜为砜类抑菌剂,化学结构见图 1,其对麻风杆菌有较强的抑菌作用,大剂量时显示杀菌作用。本品口服后吸收迅速而完全,蛋白结合率为 50% ~ 90% ,吸收后广泛分布于全身组织和体液中,以肝、肾浓度为高。口服后数分钟即可在血液中测得本品,达峰时间为 2 ~ 6h,有时为 4 ~ 8h;本品存在肝胆循环,所以排泄缓慢,消除半衰期为 10 ~ 50h(平均为 28h) ,且不良反应少。

本实验考虑到购买便利、服用后不影响大鼠体内环境、不良反应少及测定方法简便易行等方面,选择氨苯砜作为研究 CYP3A4 相关药物相互作用的探针底物。通过文献检索,笔者

还发现氨苯砜常用于以动物为模型的与 CYP3A4 酶有关的药物代谢动力学研究^[5,6]。本文旨在建立大鼠血浆中氨苯砜含量测定的高效液相色谱法(HPLC) ,为与 CYP3A4 酶相关的药物代谢性相互作用研究提供方法学基础。

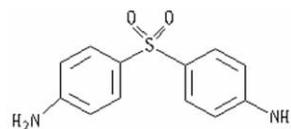


图 1 氨苯砜化学结构图

1 药品、试剂、仪器设备及实验动物

1.1 药品与试剂 氨苯砜标准品(批号: 100114-199101) ,中国药品生物制品检定所; 苯巴比妥(鲁米那) 标准品(批号: 171222-200605) 中国药品生物制品检定所; 地塞米松磷酸钠(批号: 200901003) ,扬州制药有限公司; 甲醇、乙腈(HPLC 级) ,Merck KGaA 公司; 乙醚(AR 级,批号: 20091218) ,国药集团化学试剂有限公司; 肝素钠(批号: 100627) ,常州千红生化制药股份有限公司; 乙醇(批号: 20090215) ,无锡市杏达化工厂; 超纯水(Thermo 超纯水系统制备) 美国 Thermo 公司。

1.2 仪器设备 Waters 高效液相色谱系统(包括 2996 紫外检测器、1525 二元梯度泵、717 自动进样器、Empower 色谱工作站) ; 塞多利斯电子分析天平,塞多利斯科学仪器(北京) 有限公司,精密度 1×10^{-5} g; Effendorf Centrifuge 5417R 高速台式离

基金项目: 常州市科技局指导性项目,常州四药临床药理学基金资助(No: CS20109010)

作者单位: 213003 江苏省常州市,苏州大学附属第三医院药剂科

通讯作者: 王明丽

心机,德国 EFFENDORF; 低温冰箱,日本 SANYO; -70℃液氮冰箱,日本 SANYO; 旋涡混合器,上海医科大学仪器厂; DC-12 氮吹仪,上海安普仪器有限公司。

1.3 实验动物 SD 大鼠,雌性,体质量为(250±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

2 实验方法

2.1 溶液配制

2.1.1 氨苯砜储备液及工作液的配制

2.1.1.1 氨苯砜储备液:精密称取 2.56mg 氨苯砜对照品于 25ml 容量瓶中,用甲醇溶解稀释至刻度,得 0.1024mg/ml 氨苯砜甲醇液,作储备液用。

2.1.1.2 氨苯砜工作液:各精密吸取 2.5ml 氨苯砜储备液至 25ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,使工作液中氨苯砜的浓度为 10.24μg/ml(氨苯砜)将此母液进行稀释,得到一系列浓度的标准液,供作标准曲线用。其中氨苯砜的系列浓度依次为 1.024、2.048、4.096、6.144、8.192、10.240μg/ml。另外,再对此母液用甲醇进行稀释,得到低、中、高 3 个浓度的质控标准液,质控标准液浓度依次为:1.536、5.120 和 9.216μg/ml。

2.1.2 苯巴比妥(内标)工作液的配制:精密称取 10.05mg 苯巴比妥对照品于 10ml 容量瓶中,用甲醇稀释定容至刻度,得 1.005mg/ml 苯巴比妥甲醇液,作工作液用。

2.2 大鼠血浆 取经 80mg·kg⁻¹·d⁻¹地塞米松连续诱导 3d 后的雌性 SD 大鼠,于大鼠股动脉取血,置于已肝素化的试管中,于 13000r/min 高速离心 10min,取上清即为可用血浆,分装后储存于 -20℃冰箱中备用。

2.3 色谱条件 色谱柱:Ultimate-XB C18(250mm×4.6mm i.d. 4μm);流动相:乙腈-水(25:75,V/V);流速:1.0ml/min;紫外检测波长:258nm;柱温:30℃;进样:30μl。

2.4 样品预处理

2.4.1 血浆样品处理:取氨苯砜溶液(10mg/L)10μl 于圆底管中,37℃水浴氮气吹干,加入诱导后大鼠血清 100μl,内标溶液(1000mg/L)10μl 和乙醚 2ml,涡旋混合振荡 3min 后,4500r/min 离心 10min,取上清液于尖底试管中,37℃水浴氮气吹干,残渣用 80μl 流动相溶液溶解,进样 30μl。

2.4.2 血浆标准曲线制备:分别取氨苯砜对照品溶液(10mg/L)10、20、40、60、80、100μl,加入诱导后大鼠血清 100μl,内标溶液(1000mg/L)10μl,使其对照品溶液浓度分别为 1.024、2.048、4.096、6.144、8.192、10.240μg/ml,按照“血浆样品处理”项下方法处理。

2.4.3 血浆质控样品制备:分别取氨苯砜对照品溶液(10mg/L)15、50、90μl,加入诱导后大鼠血清 100μl,内标溶液(1000mg/L)10μl,配制成低、中、高 3 种不同浓度的氨苯砜(1.536、5.120 和 9.216mg/L)血清样品各 5 份,按照“血浆样品处理”项下方法处理。

3 实验结果

3.1 HPLC 方法的专属性 采用上述建立的色谱条件,氨苯砜、苯巴比妥能够达到较好的基线分离,见图 2,诱导后大鼠空白血浆的色谱图中,在氨苯砜、苯巴比妥出峰的位置没有明显的干扰峰出现。

3.2 线性范围 以氨苯砜的浓度(C)为横坐标,氨苯砜与内标物苯巴比妥的峰面积比(R)为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,得 r = 0.2667C - 0.1062 (r = 0.9935)。氨苯砜在

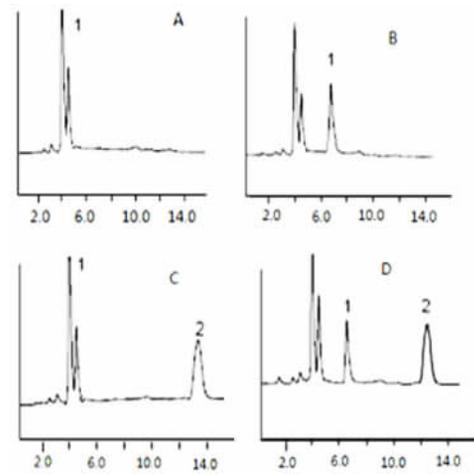


图 2 氨苯砜的 HPLC 图

注: A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 氨苯砜; C. 空白血浆 + 苯巴比妥; D. 空白血浆 + 氨苯砜 + 苯巴比妥。1. 氨苯砜; 2. 苯巴比妥)

1.024~10.24μg/ml 范围内呈良好的线性关系。测得最低检测限(LOD)为 0.89ng(S/N=3),定量限(LOQ)为 0.76μg/ml [相对标准偏差(RSD) < 5% n = 5]。

3.3 回收率与精密度试验 分别测定氨苯砜质控样品的方法回收率和精密度,得氨苯砜在高、中、低 3 个质控样品浓度分别为 1.536、5.120 和 9.216mg/L 时,其平均提取回收率为 (99.73 ± 1.36)% (n = 5),平均方法回收率为 (98.82 ± 1.12)% (n = 5)。每个浓度平均测定 5 份,以获得日内精密度,连续测定 5d,获得日间精密度。结果见表 1、2。

表 1 大鼠血浆中氨苯砜的精密度和准确度 (n = 5)

Table with 3 columns: 加标浓度 (μg·mg⁻¹·L⁻¹), 日内 RSD(%), 日间 RSD(%). Rows show data for 1.536, 5.120, and 9.216 μg/ml.

表 2 大鼠血浆中氨苯砜的回收率 (n = 5)

Table with 5 columns: 加标浓度 (μg·mg⁻¹·L⁻¹), 实测浓度 (μg·mg⁻¹·L⁻¹), 方法回收率(%), 相对回收率(%), 提取回收率(%). Rows show data for 1.536, 5.120, and 9.216 μg/ml.

3.4 氨苯砜样品的稳定性 分别取一定量的氨苯砜溶液,加入到诱导后的大鼠空白血浆中,使得氨苯砜的最终浓度为 1.536、5.120、9.216mg/L,室温分别放置 0、2、4、12、24h,进样分析与 0h 比较。结果显示 24h 内氨苯砜在生物样品溶液中稳定,其 RSD < 5%。

分别取一定量的氨苯砜溶液,加入到诱导后的大鼠空白血浆中,使得氨苯砜的最终浓度为 1.536、5.120、9.216mg/L,并于 -20℃下反复冻融 4 次后,进样分析,与未冻融样品比较。结果显示,反复冻融 4 次氨苯砜在生物样品溶液中稳定,其 RSD < 5%。

4 讨论

4.1 测定条件的选择 由于氨苯砜脂溶性好,易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂,故笔者选用反相高效液相色谱法测定其在大鼠血浆中的含量。在筛选流动相条件时,笔者做了很多尝试,最终选择了乙腈:水(25:75),氨苯砜和内标物峰形和出峰时间均较好,且能够完全分离。由于地塞米松磷酸钠最大吸收波长为 242nm^[7],为防止血浆中地塞米松磷酸钠在测定时存在干扰,笔者测定了在这一流动相比例下,地塞米松磷酸钠对照品的出

峰时间,并在同样的运行时间内测定地塞米松磷酸钠诱导后的空白血浆样品,并未出现干扰峰,这说明浓度 $80\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的地塞米松磷酸钠诱导并不影响氨苯砜血药浓度的测定。

4.2 内标的选择 在内标物选择上遵循以下原则:内标物纯度高,性质稳定,不会分解变质;内标物的保留时间与目标物接近,最好是同系物或结构相似的物质;内标物必需和样品中的其他所有物质的峰能够完全分开。根据以上原则及前期实验经验,笔者选择苯巴比妥为内标,其峰形与出峰时间均较好。

4.3 血浆样品萃取条件选择 血浆样品萃取分离,笔者选择了经济、方便的液-液萃取法。由于氨苯砜的脂溶性大于水溶性,故选择了脂溶性好的有机溶剂作为萃取剂,分别尝试了二氯甲烷、乙醚和乙酸乙酯,结果表明乙醚对药物的提取回收率较高、稳定性好,是比较理想的提取溶剂。同时,实验中发现氨苯砜溶液与内标溶液加入血浆样品后,蛋白沉淀较明显,回收率较低。考虑到配制 2 种溶液时使用了甲醇,后采用先将氨苯砜溶液于水浴下氮气吹干去甲醇,再用血浆样品溶解,结果表明回收效果比较满意。

参考文献

- 1 黄菲,夏春华,熊玉卿. 细胞色素 P450 3A5 基因多态性及其对药物代谢影响的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(7): 545-548.
- 2 夏宗玲,许建平,邹素兰. 探针药物法测定 CYP450 3A 的活性[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(2): 142-144.
- 3 朱冰,欧阳冬生,程泽能,等. 单点采血反映口服 CYP3A 探针咪达唑仑的代谢清除率[J]. 中国药理学报:英文版, 2001, 22(7): 634.
- 4 Robert J. Riley, D. Howbrook. In vitro analysis of the activity of the major human hepatic CYP enzyme (CYP3A4) using [N-methyl- ^{14}C]-erythromycin[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1997, 38(4): 189-193.
- 5 陈为烤,居文政,许黎君,等. CYP1A2、CYP2E1 和 CYP3A4 探针间的药理学相互作用[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 435.
- 6 扈金萍,闫淑莲,徐艳霞,等. 反相高效液相色谱法同时检测 3 种探针药物[J]. 色谱, 2002, 20(6): 540-542.
- 7 钱方,黄伟,吴洪,等. HPLC 法测定复方地塞米松乳膏中地塞米松的含量[J]. 药学服务与研究, 2002, 2(4): 253-254.

(收稿日期: 2012-08-16)

• 用药经验 •

米索前列醇用于绝经后取环的分析

杨俊红, 马文巧, 杨淑芳, 李秀娟, 高利彩, 张立敬, 赵金荣, 李金凤

【关键词】 米索前列醇; 宫内节育器; 绝经妇女

【中图分类号】 R 978.1⁺9 【文献标识码】 B 【文章编号】 1674-3296(2012)10B-0003-01

目前宫内节育器是我国大多数妇女采用的避孕措施,绝经后的妇女因卵巢功能衰退,生殖器官萎缩,宫颈萎缩变硬,绝经后取器困难也成为一种常见问题。为减轻患者痛苦,提高取器成功率,根据米索前列醇放置阴道后软化宫颈效果好,不良反应小,应用于就诊于我院的 80 例绝经后妇女取器者,获得满意效果。现分析如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组患者 80 例,年龄 45~65 岁,放置节育器时间为 16~30 年,绝经时间 2~8 年,孕次为 1~10 次,均为金属圆环。患者均为无米索前列醇的应用禁忌证。

1.2 方法 术前常规行妇科检查,妇科 B 型超声检查节育器的位置,完善相关检查后取器前 2~3h 阴道后穹窿放置米索前列醇 0.4mg,按正规操作将节育器取出。

1.3 宫颈软化的标准 软化:宫颈口松弛,6 号扩张器可无阻力的自由出入子宫颈内口;部分软化:宫口无松弛,但探针可无阻力的自由出入子宫颈内口。

2 结果

80 例绝经后妇女取器前,应用米索前列醇软化宫颈后,其中 76 例宫颈口松弛,宫内节育器顺利取出,4 例宫颈口部分软化,加上节育器嵌顿,取出困难,用取环钩勾住慢慢牵拉和轻轻转动,将宫内节育器的丝拉成直线取出。

3 讨论

绝经后取宫内节育器的难度比绝经前难度大,有一大部分

绝经后妇女害怕取节育器而终身未取节育器,也有一部分人不知道绝经后应尽快把节育器取出,所以节育器放置时间长达 30 年,有的绝经 7~8 年才取节育器,使原本难度就大的手术难上加难。为了宫内节育器顺利取出,减轻患者的痛苦,避免节育器取出时造成机械性损伤,现有多种软化宫颈的方法,但存在手术操作复杂,增加手术时间和增加感染机会等问题。米索前列醇对宫颈的软化是由于刺激了宫颈的胶原纤维组织,释放多种弹性纤维蛋白酶,从而降解宫颈的胶原纤维,软化宫颈使宫颈富有弹性,顺应性高,易于扩张,便于操作。采用术前 2~3h 阴道放置米索前列醇,避免了术前侵袭性操作给患者带来的痛苦和对宫颈黏膜及子宫内膜的损伤感染。米索前列醇生效快,半衰期短,阴道给药,阴道黏膜吸收好,直接作用于靶器官,作用时间长,而且一次性用药方法简便有效,局部用药减少了胃肠道反应等不良反应的发生率。应用米索前列醇的患者除有少量阴道血性分泌物和轻微的下腹坠胀外无其他不良反应发生。因此,笔者认为米索前列醇在绝经后妇女取节育器的应用是一种比较理想、经济、安全、容易接受的方法,值得临床广泛应用。

另外,广大医务工作者应高度重视妇女的取宫内节育器问题,在工作中做好宣传教育工作,督促患者定期检查,节育器到期应及时更换,提醒进入围绝经期的患者及时实施取节育器手术。

(收稿日期: 2012-08-11)

作者单位: 050041 石家庄市,中国人民解放军第 260 医院妇产科