

HPLC 测定氨酚伪麻美芬片Ⅱ/氨麻苯美片中对乙酰氨基酚血药浓度

邓鸣¹,牛坤²,胡玉钦²,侯艳宁²(1.解放军第261医院药剂科,北京100094;2.白求恩国际和平医院临床药理室,石家庄050082)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定氨酚伪麻美芬片Ⅱ/氨麻苯美片中对乙酰氨基酚的血药浓度。方法 血浆样品用6%高氯酸沉淀蛋白。色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.02 mol·L⁻¹甲酸铵溶液(含甲酸0.2%)-甲醇-乙腈(91:4.5:4.5),流速为1.0 mL·min⁻¹,紫外检测波长245 nm。结果 血浆中内源性物质对样品测定无干扰。本方法线性范围为0.1~20 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 6$),最低定量浓度为0.1 μg·mL⁻¹,方法回收率为99.8%~101.5%,日内、日间RSD均小于12%。结论 本法简便、准确,适用于对乙酰氨基酚药代动力学的研究。

关键词:对乙酰氨基酚;高效液相色谱法;血药浓度

中图分类号:R917.101;R969.11

文献标识码:B

文章编号:1007-7693(2009)01-0060-04

HPLC Determination of Acetaminophen in Human Plasma

DENG Ming¹, NIU Kun², HU Yuqin², HOU Yanning²(1. Department of Pharmacy, the 261th Hospital of PLA, Beijing 100094, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of acetaminophen in the plasma of volunteers who were administrated the compound tablets of acetaminophen, pseudoephedrine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide or acetaminophen, pseudoephedrine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide. **METHODS** Proteins in plasma samples were precipitated by 6% perchloric acid. A Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ was used with the mobile phase of 0.02 mol·L⁻¹ ammonium formate solution(contained 0.2% formic acid)-methanol-acetonitrile (91:4.5:4.5) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 245 nm. **RESULTS** The endogenous substance in plasma did not interfere with the determination of the samples. The linear range was 0.1-20 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 6$), and the limit of quantitation was 0.1 μg·mL⁻¹. The method recovery was 99.8%-101.5%. Both within-day RSD and between-day RSD were less than 12%. **CONCLUSION** The method was simple and accurate. It was suitable for the pharmacokinetic study of acetaminophen.

KEY WORDS:acetaminophen; HPLC; blood drug concentration

氨酚伪麻美芬片Ⅱ/氨麻苯美片是日夜分服型抗感冒药,其中氨酚伪麻美芬片Ⅱ为日用片,处方成分为对乙酰氨基酚、盐酸伪麻黄碱及氢溴酸右美沙芬;氨麻苯美片为夜用片,除上述成分外还含有盐酸苯海拉明。该药采用日夜分开给药的方法,白天服用日片能迅速消除常见的感冒症状,且无嗜睡作用;夜晚服用夜片可增加抗过敏和镇静催眠作用,使病

人更好地休息,为白天工作储备精力。对乙酰氨基酚(acetaminophen)是临床常用的非甾体解热镇痛药,临床用于感冒、发热、头痛、关节痛、神经痛及偏头痛等。文献报道测定血浆中对乙酰氨基酚浓度的方法主要是HPLC^[1-7],但都不同程度地存在着样品处理过程复杂、分析时间长等。笔者在参考文献^[1]的基础上,建立了一种简便、灵敏、快速的HPLC-紫

外法,并将此法应用于健康志愿者口服氨酚伪麻美芬片Ⅱ/氨麻苯美片的药动学研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱系统[(G1311A 四元泵,G1329A 自动进样器,G1316A 柱温箱,G1314A 紫外检测器,A. 08. 03 Chemstation)美国安捷伦公司];BP211D 型十万分之一天平(德国 Sartorius 公司);XW-80A 旋涡混合器(上海精科实业有限公司);TGL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂);LDZ5-2 型离心机(北京医用离心机厂)。

1.2 试剂

对乙酰氨基酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 100018-200408);氨酚伪麻美芬片Ⅱ/氨麻苯美片(商品名为白加黑,东盛科技启东盖天力制药股份有限公司,规格:氨酚伪麻美芬片Ⅱ,含对乙酰氨基酚 325 mg,盐酸伪麻黄碱 30 mg 及氢溴酸右美沙芬 15 mg;氨麻苯美片,含对乙酰氨基酚 325 mg,盐酸伪麻黄碱 30 mg、氢溴酸右美沙芬 15 mg 及盐酸苯海拉明 25 mg。批号 EL011311)。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯;甲酸铵、高氯酸为分析纯;水为乐百氏纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4. 6 mm,5 μm);流动相:0.02 mol·L⁻¹甲酸铵溶液(含甲酸 0. 2%) -甲醇-乙腈(91:4. 5:4. 5),流速:1. 0 mL·min⁻¹;柱温:30℃;紫外检测波长:245 nm;进样量:20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取对乙酰氨基酚对照品 25.01 mg,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成对乙酰氨基酚浓度为 1 mg·mL⁻¹的储备液。将该储备液用甲醇稀释成 2,4,10,40,100,320,400 μg·mL⁻¹的系列溶液,备用。

2.3 血浆样品处理

取血浆样品 200 μL,加入 6% 高氯酸 150 μL,涡旋混合 1 min,16 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液 20 μL 进样分析。

2.4 方法专属性

取空白血浆 200 μL,按“2.3”项下操作,得色谱图 1-A;取空白血浆 200 μL,加入 40 μg·mL⁻¹的对照品溶液 10 μL,自“加入 6% 高氯酸 150 μL”始,按“2.3”项下操作,得色谱图 1-B;取健康受试者用药

后的血浆样品 200 μL,按“2.3”项下操作,得色谱图 1-C。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰对乙酰氨基酚的测定,对乙酰氨基酚的保留时间约为 5.5 min。

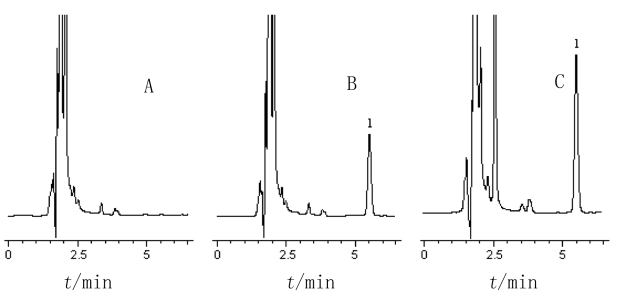


图1 对乙酰氨基酚 HPLC 色谱图
A-空白血浆;B-空白血浆加入对乙酰氨基酚(2 μg·mL⁻¹);C-受试者口服氨麻苯美片 3 h 后的血浆样品;1-对乙酰氨基酚

Fig 1 HPLC chromatograms of acetaminophen
A-blank plasma; B-blank plasma spiked with acetaminophen (2 μg·mL⁻¹); C-plasma sample 3 h collected from a volunteer after oral administration; 1-acetaminophen

2.5 标准曲线

取空白血浆 200 μL,加入对乙酰氨基酚对照品系列溶液 10 μL,配制成对乙酰氨基酚浓度为 0. 1, 0. 2, 0. 5, 2, 5, 20 μg·mL⁻¹的含药血浆样品,按“2.3”项下操作后进样分析,以对乙酰氨基酚浓度(C)为横坐标,对乙酰氨基酚的峰面积(Y)为纵坐标,采用加权(1/C²)最小二乘法进行回归,回归方程为:Y = 46.503 9C + 0.937 8,r = 0.999 6。结果表明,血浆中对乙酰氨基酚浓度在 0. 1 ~ 20 μg·mL⁻¹内线性良好。血浆中对乙酰氨基酚的最低定量浓度为 0. 1 μg·mL⁻¹。

2.6 提取回收率

配制低、中、高 3 个浓度(分别为 0. 2、2、16 μg·mL⁻¹)的血浆样品各 6 份,按“2.3”项下操作记录对乙酰氨基酚的峰面积 A;另以水代替空白血浆,余同上操作,记录对乙酰氨基酚的峰面积 A_s。用峰面积比值求算血浆中对乙酰氨基酚的提取回收率(R = A_s/A_{sd} × 100%),结果见表 1。3 个浓度血浆样品中对乙酰氨基酚的平均提取回收率为 89.0%。

表1 血浆样品中对乙酰氨基酚的提取回收率(n=6)
Tab 1 Extraction recovery of acetaminophen in human plasma (n=6)

加入量/μg·mL ⁻¹	提取回收率/%	RSD/%
0. 2	86. 2 ± 4. 5	5. 2
2	90. 2 ± 3. 4	3. 7
16	90. 6 ± 2. 0	2. 2

2.7 精密度与方法回收率

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为 0.2, 2, 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的血浆样品, 按“2.3”项处理后进样, 每个浓度 6 份, 重复 4 d 测定, 并与标准曲线同时进行, 计算测得浓度, 与理论浓度对照, 采用单因素方差分析法求得本法的精密度, 用 RSD 表示。方法回收率用测定浓度的平均值与理论浓度比值的百分数表示, 结果见表 2, 日内 RSD < 5.8%, 日间 RSD < 11.8%, 方法回收率为 99.8% ~ 101.5%, 满足生物样品分析方法的要求。

表 2 精密度和方法回收率

Tab 2 Method recovery and precision of acetaminophen in human plasma

加入量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	测得量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 RSD /%	日间 RSD /%	方法回收率 /%
0.2	0.200 ± 0.014	5.7	11.7	99.8 ± 6.8
2	2.02 ± 0.08	3.1	6.6	100.8 ± 3.8
16	16.24 ± 0.44	2.0	5.4	101.5 ± 2.7

2.8 稳定性试验

配制低、中、高 3 个浓度 (分别为 0.2, 2, 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的血浆样品, 每个浓度 2 份, 分别考察其在室温、冻融循环、-20℃保存以及处理后在室温条件下的稳定性, 以当日随行标准曲线计算血浆样品中对乙酰氨基酚的浓度, 将测定浓度的平均值与理论浓度对照, 结果相对偏差 RE < ±9.1%, 表明血浆样品在室温放置 24 h、冻融 3 次、-20℃保存 3 周以及处理后在室温放置 24 h 的条件下都是稳定的。

2.9 方法应用

A 组 20 名男性健康受试者, 年龄 (23.4 ± 0.9) 岁, 体重 (67.2 ± 5.5) kg; B 组 20 名男性健康受试者, 年龄 (23.0 ± 1.1) 岁, 体重 (68.1 ± 4.2) kg; 试验前进行病史询问和体格检查, 心电图、胸透、肝功、肾功、血常规、尿常规检查等均正常。受试者试验前 2 周及试验期间未服用其他任何药物, 禁烟酒, 试验前均自愿签署知情同意书。试验方案经白求恩国际和平医院伦理委员会批准通过。受试者于试验前 12 h 吃清淡晚餐后禁食, 试验当日清晨 8 时 A 组空腹口服氨酚伪麻美芬片 II 2 片, B 组空腹口服氨麻苯美片 2 片, 用 250 mL 温开水送服。服药 2 h 后方可饮水, 4, 10 h 后统一进餐。A 组于服药前及服药后 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 h, B 组于服药前及服药后 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36 h, 分别从肘静脉取血 2 mL, 3 000

r · min⁻¹ 离心 10 min 分离血浆, 置 -20℃下冻存备用。用本法测定健康受试者服药后血浆中对乙酰氨基酚的浓度, A 组、B 组中 24, 36 h 的血药浓度大部分已低于最低定量限, 所以数据处理时未包括服药后 24, 36 h 的采血点。20 名健康受试者口服氨酚伪麻美芬片 II/氨麻苯美片 2 片后对乙酰氨基酚的平均血药浓度-时间曲线见图 2、图 3。

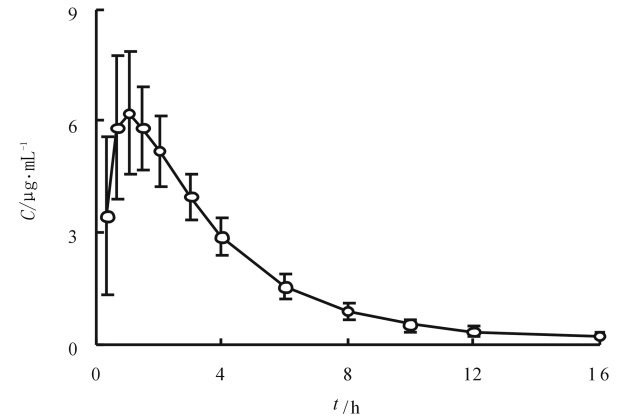


图 2 20 名健康志愿者口服氨酚伪麻美芬片 II 2 片后对乙酰氨基酚的平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of acetaminophen after oral administration of two compound tablets containing acetaminophen, pseudoephedrine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide in 20 healthy volunteers

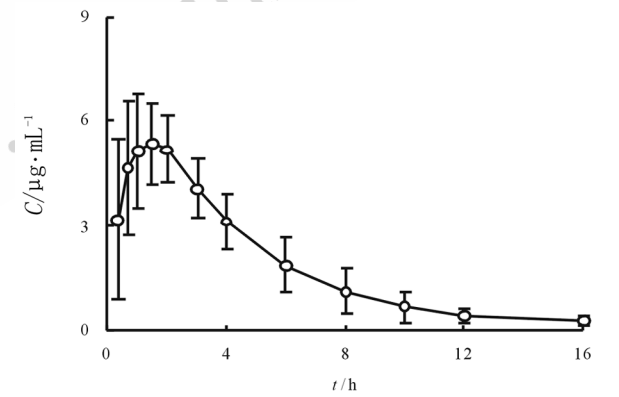


图 3 20 名健康志愿者口服氨麻苯美片 2 片后对乙酰氨基酚的平均血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time curve of acetaminophen after oral administration of two compound tablets containing acetaminophen, pseudoephedrine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride and dextromethorphan hydrobromide in 20 healthy volunteers

3 讨论

对乙酰氨基酚的测定方法研究国内已有报道^[2,3], 并且有测定复方制剂中对乙酰氨基酚的报道^[1,4-7]。但测定氨酚伪麻美芬片 II/氨麻苯美片复方制剂中对乙酰氨基酚的方法国内尚未见报道。在

测定中不仅要排除复方制剂中其他成分的干扰,还要排除体内可能的代谢物的干扰。在流动相中加入甲酸铵和甲酸可明显改善峰形,并控制 pH 在偏酸性。试验中发现受试者口服白加黑片后有一干扰峰出现,可能为一代谢物,通过调整流动相水相和有机相的比例,确定为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵溶液(含甲酸 0.2%)-甲醇-乙腈(91:4.5:4.5),在此条件下伪麻黄碱、O-去甲右美沙芬、苯海拉明及可能的代谢物均不干扰对乙酰氨基酚的测定,每一样品的测定可在 6.5 min 内完成,且此法具有良好的精密度和准确度,为复方制剂中对乙酰氨基酚的药代动力学研究提供了可靠的方法。

文献^[1-5]采用液-液萃取法提取血样中对乙酰氨基酚,操作烦琐;文献^[6-7]血样用量大,分析时间较长。本研究血浆样品仅经过高氯酸沉淀蛋白法预处理后即可进样分析,所需血浆样品量小,操作简便、快速,与文献^[1-5]相比在处理大批量血浆样品时大大减少了工作量,缩短了样品处理时间。

比较了甲醇、高氯酸、三氯醋酸等不同沉淀剂对血样处理的效果,结果表明,用高氯酸沉淀时对样品稀释度较小、干扰较少。试验中分别试用了 6% 和 10% 的高氯酸,6% 的高氯酸浓度较低,对色谱柱损害小;故选用了 6% 的高氯酸。

从本试验测定结果可见,对乙酰氨基酚在体内消除较快,24 h 时大部分受试者体内浓度已低于定量

限,16 h 时 C_t 已低于 $C_{\max}$ 的 $1/10 \sim 1/20$,表明测定到 16 h 较宜,所得血药浓度能反映制剂的体内过程。

REFERENCES

- [1] XUE H Y, LIU J F, LIU H C, et al. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in human plasma by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2005, 25(8): 708-710.
- [2] LU H. Determination of paracetamol in human plasma with HPLC [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2005, 9(7): 503-504.
- [3] WANG Y, ZHANG Z, CHEN X J, et al. HPLC determination of paracetamol in plasma and bioavailability assessment of paracetamol tablets [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2002, 11(2): 97-99.
- [4] GAO W Z, LOU J S, JIAO J J, et al. The clinical pharmacokinetics and bioequivalence of paracetamol and vitamin C compound effervescent tablet [J]. Acta Univ Med Tianjin (天津医科大学学报), 2005, 11(2): 180-183.
- [5] XIE Z, JIANG Y, REN J M, et al. Simultaneous determination of three components of saridon in human plasma by RP-HPLC [J]. China Pharmacy (中国药房), 2006, 17(18): 1395-1397.
- [6] CHEN H L, TIAN Y, ZHANG Z J, et al. Determination of paracetamol in human plasma by HPLC [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2005, 17(3): 67-69.
- [7] YANG J Y, JIANG X H, LIN S, et al. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine in plasma by RP-HPLC [J]. West China J Pharm Sci (华西药理学杂志), 2003, 18(2): 110-112.