

HPLC 手性固定相法测定患者血浆中布洛芬对映体的浓度

施宪宝¹, 单丽娜^{1*}, 郭斌¹, 周盾¹, 王桂军¹, 冯玉军² (1. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121001; 2. 秦皇岛市妇幼保健院药剂科, 河北 秦皇岛 066000)

摘要: 目的 建立用高效液相色谱法测定血浆中布洛芬对映体浓度的方法。方法 用正己烷-异丙醇混合液(100:5)提取血浆样品中布洛芬, 在 Chirobiotic V(250 mm×4.6 mm, 5 μm)柱上, 以甲醇-冰醋酸-三乙胺(100:0.04:0.02)为流动相进行分离, 于 226 nm 波长处检测, 内标为吲哚美辛。结果 R-布洛芬、S-布洛芬和内标没有干扰, 分离度良好。R-布洛芬和 S-布洛芬血药浓度在 0.01~5 mg·L⁻¹ 内线性关系良好。两个对映体相对回收率分别为 99.1%~102.2% 和 99.3%~102.4%, 绝对回收率分别为 66.8~72.9 和 66.3~71.4, 日内 RSD 分别为 4.2%~5.4% 和 3.6%~5.1%, 日间 RSD 分别为 5.9%~7.3% 和 6.2%~7.9%。结论 该方法准确、快速、简便、灵敏度高、重复性好, 可同时测量血浆中 R-布洛芬和 S-布洛芬的药物浓度, 并可用于药动力学参数的研究及患者血药浓度监测。

关键词: 高效液相色谱法; 布洛芬; 手性固定相; 对映体

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0316-03

Determination of Ibuprofen Enantiomers in Plasma by HPLC-Chiral Stationary Phase

SHI Xianbao¹, SHAN Lina^{1*}, GUO Bin¹, ZHOU Dun¹, WANG Guijun¹, FENG Yujun² (1. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China; 2. Maternal and Child Care Center of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of plasma levels of enantiomers of ibuprofen. **METHODS** Ibuprofen was extracted from samples with Hexane-isopropanol(100:5). HPLC was performed on Chirobiotic column with methanol-acetic acid-triethylamine(100:0.04:0.02) as mobile phase. Detection wavelength was 226 nm. Indomethacin was used as the internal standard. **RESULTS** Under this chromatographic condition, R-ibuprofen, S-ibuprofen and indomethacin had no interference within each other. The calibration curve was linear in the range of 0.01~5 mg·L⁻¹ for R-ibuprofen and S-ibuprofen. The relative recoveries of R-ibuprofen and S-ibuprofen were 99.1%~102.2% and 99.3%~102.4% respectively. The absolute recoveries of R-ibuprofen and S-ibuprofen were 66.8~72.9 and 66.3~71.4 respectively; RSD range of intraday were 4.2%~5.4% and 3.6%~5.1%. RSD ranges of interday were 5.9%~7.3% and 6.2%~7.9% respectively. **CONCLUSION** This method is accurate, rapid, with high sensitivity and good repeatability. It is applicable for the determination and pharmacokinetic study of the enantiomers of ibuprofen in plasma.

KEY WORDS: HPLC; ibuprofen; chiral stationary phase; enantiomers

布洛芬为非甾体抗炎药(NSAIDs)。其通过抑制环氧化酶来抑制前列腺素的生成, 从而起到解热、镇痛、抗炎的药理作用^[1-2]。目前, 布洛芬是消旋体给药, 其左右旋体在体内的药理活性存在显著的差异, 其中 S-布洛芬(S-IBP)作为优对映体在抑制前列腺素生成上优于 R-布洛芬(R-IBP)。布洛芬以消旋体给药后, 部分 R-布洛芬可以通过形成辅酶 A 硫脂单向地转化为 S-布洛芬^[3]。鉴于此, 笔者建立了测定血浆中布洛芬对映体浓度的 HPLC, 采用 CHIROBIOTIC 色谱柱, 并对方法的灵敏度、准确度、专一性进行了评价, 认为该方

法简便、快捷、准确性好、灵敏度高、专一性强, 可为布洛芬药动力学参数的测定及患者血药浓度监测提供依据。

1 材料

1.1 仪器

HPLC 仪系列, 包括 LC-20A 泵、SPD-20A 可见紫外检测器(日本岛津公司); DC-12 氮吹仪(上海安谱科学仪器有限公司)。

1.2 试药

布洛芬缓释胶囊(珠海联邦制药股份有限, 批号: 100221); S-布洛芬对照品(Sigma 公司, 批号:

作者简介: 施宪宝, 男, 博士, 主管药师 Tel: (0416)4197503
主治医师 Tel: (0416)4197503 E-mail: shanlina123@163.com

E-mail: shixianbao@yahoo.com.cn *通信作者: 单丽娜, 女, 硕士,

375160, 纯度: 99%); 布洛芬对照品(Sigma 公司, 批号: 14883, 纯度: 98%); 吲哚美辛对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100258-200904, 纯度: 98%); 甲醇、三乙胺、冰醋酸均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: CHIROBIOTIC 手性柱(Astec 公司, 250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-冰醋酸-三乙胺(100:0.04:0.02); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 226 nm; 柱温: 室温。

2.2 贮备液的配制

2.2.1 布洛芬贮备液 准确称取布洛芬对照品 0.5 g, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 即得浓度为 50 g·L⁻¹ 布洛芬贮备液。

2.2.2 S-布洛芬贮备液 准确称取 S-布洛芬对照品 0.8 g, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 即得浓度为 80 g·L⁻¹ S-布洛芬贮备液。

2.2.3 吲哚美辛贮备液 准确称取吲哚美辛对照品 90 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 即得浓度为 9 g·L⁻¹ 吲哚美辛贮备液。

以上贮备液根据情况再用甲醇稀释成所需浓度的工作液。

2.3 给药方法

本研究收集了服用布洛芬缓释胶囊的 8 例患者的血样, 每人每次口服 1 粒(300 mg·粒⁻¹)、每日 2 次连续服用 5 d, 早晨服药前采集血样 5 mL 置肝素抗凝试管, 立即离心分离血浆置-30℃冰箱储存待测。

2.4 样品处理

取血浆 1 mL, 加入 10 μL 的吲哚美辛(9 mg·L⁻¹)工作液, 加入 1 mol·L⁻¹ 的盐酸 0.1 mL, 混合, 加入正己烷/异丙醇(100:5)5 mL, 混合提取 1 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上层有机相 4 mL 于一尖底试管中, 在 37℃水浴锅中用轻微 N₂ 吹干, 残渣用 40 μL 流动相溶解, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 进样 20 μL。

2.5 方法的专一性

在本实验条件下, 血浆中杂质不干扰样品峰, 各组分之间的分离度符合要求。保留时间分别为 9.13, 9.69, 11.62 min, 见图 1。

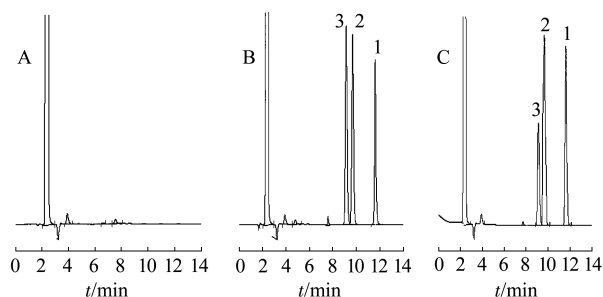


图1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+吲哚美辛+布洛芬; C-患者服药后的血浆; 1-吲哚美辛; 2-S-布洛芬; 3-R-布洛芬

Fig 1 HPLC chromatogram

A-blank plasma; B-blank sample spiked with indomethacin and ibuprofen; C-plasma sample yielded after medication; 1-indomethacin; 2-S-ibuprofen; 3-R-ibuprofen

2.6 标准曲线的绘制

分别在 1 mL 健康人空白血浆中加入适量布洛芬工作液, 使布洛芬每个对映体的血浆浓度分别为 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 5 mg·L⁻¹, 同时各样品中加入 9 mg·L⁻¹ 吲哚美辛 10 μL 作内标, 按“2.4”项下方法提取后测定, 以 R-布洛芬和 S-布洛芬同内标的峰面积比为纵坐标, 以每个对映体的浓度为横坐标作图, 通过最小二乘法得出直线回归方程。

R-布洛芬的直线方程: $Y=0.001\ 874X-0.003\ 51$, $r=0.999\ 5$; S-布洛芬的直线方程: $Y=0.002\ 385X+0.004\ 39$, $r=0.999\ 2$ 。R-布洛芬和 S-布洛芬血药浓度分别在 0.01~5 mg·L⁻¹ 内线性关系良好。

2.7 回收率及精密度试验

在 1 mL 血浆中加入布洛芬, 分别配制低(R-布洛芬和 S-布洛芬为 0.01 mg·L⁻¹)、中(R-布洛芬和 S-布洛芬为 0.1 mg·L⁻¹)、高(R-布洛芬和 S-布洛芬为 5 mg·L⁻¹)3 种浓度的血浆各 5 份, 按“2.3”项下方法操作, 于同一天内测定以上血样中 R-布洛芬和 S-布洛芬的浓度, 求得该方法的日内精密度, 另将测定值除以理论值即为本测定方法的相对回收率, 血浆测定的峰面积除以相同浓度化学样品直接进样的峰面积比值即为样品的绝对回收率。同法配制布洛芬低、中、高的样品各 5 份, 置冰箱冷冻, 自配制之日起, 每日取出 1 份测定 2 个对映体的浓度, 计算每种浓度样品的 RSD 值, 求得日间精密度。精密度及回收率试验结果见表 1。

表 1 精密度及回收率试验结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery test($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

浓度/ mg·L ⁻¹	日内 RSD/%		日间 RSD/%		相对回收率/%		绝对回收率/%	
	R-布洛芬	S-布洛芬	R-布洛芬	S-布洛芬	R-布洛芬	S-布洛芬	R-布洛芬	S-布洛芬
0.01	4.7	4.3	7.3	7.9	102.2±3.2	102.4±2.7	72.9±2.4	71.4±3.8
0.1	4.2	3.6	5.9	6.2	100.6±4.6	100.8±4.1	67.4±3.7	67.2±4.1
5	5.4	5.1	7.1	7.4	99.1±3.1	99.3±4.3	66.8±3.5	66.3±3.4

2.8 生物样品的稳定性试验

在空白血浆中加入适当布洛芬工作液, 配制布洛芬每个对映体的浓度分别为 0.1 mg·L⁻¹ 的血浆样品 50 mL, 然后各取 4 mL 分装于 5 mL 的具塞离心管中, 分别置室温、冰冻条件下存放不同时间, 反复冻融 3 次, 再测试其含量, 考察样品放置稳定性及冻融稳定性。结果表明, 布洛芬血浆样品在室温条件下至少能稳定 24 h, 在冰冻条件下至少能稳定 30 d; 反复冻融 3 次并不影响血药浓度的测定。

2.9 患者血样测定结果

本研究对 8 例患者的血样进行了测定, R-布洛芬的浓度为(2.1±0.07)mg·L⁻¹, S-布洛芬的浓度为(4.7±0.09)mg·L⁻¹。

3 讨论

1994 年 Armstrong 等首次使用糖肽类(macrocylic glycopeptides)抗生素作为手性固定相, 将糖肽类抗生素(如万古霉素)键合在 5 μm 的硅胶上。万古霉素结构中具有 3 个篮状结构, 由 18 个手性中心和 5 个苯环组成, 这些结构上的特点可使柱子具有复杂的手性环境, 包括手性的氢键结合部位、肽键结合部位和碳水化合物结合部位, 可与被分离物质发生静电作用、包合作用、偶极叠加作用、π-π电荷转移作用、形成氢键和立体排斥等作用。

CHIROBIOTIC V 手性柱可以采取正相、反相和新极性有机相(new polar organic phase)3 种分离模式。新极性有机相常用甲醇作为有机相, 三乙胺-乙酸作为缓冲液。色谱柱适用的 pH 范围为 4~7, 其对胺类、中性酰胺、脂类有很好的立体选择性, 目前用 CHIROBIOTIC V 手性柱已经拆分了多种物质^[4-5]。

本实验根据 Chirobiotic V 手性色谱柱使用指南, 所建立的用 HPLC 手性固定相检测患者血浆中布洛芬对映体的方法简便易行。采用内标法及用正己烷/异丙醇(100:5)一步萃取法获得了满意的测试效果。为了获得更好的测试条件, 使布洛

芬对映体与内标没有干扰和具有较好的分离度, 笔者在对检测波长、流动相组成、流速、药物提取方法等方面进行多次实验, 结果显示, 在 226 nm 波长下, 流速为 1 mL·min⁻¹, 流动相为甲醇-冰醋酸-三乙胺(100:0.04:0.02)时, 各组分分离度好, 峰形清晰, 且保留时间合适, 达到有效、快速检测的目的。

目前, 国内外关于布洛芬消旋体血药浓度测定比较多^[6-8], 而关于布洛芬对映体血药浓度的测定比较少。本研究在综合国内、外文献的基础上, 首次采用 Chirobiotic 手性柱对血浆中的布洛芬进行拆分, 测定血浆中布洛芬对映体浓度, 本法只应用一步萃取过程, 操作简单, 回收率高。结果表明, 采用上述方法, 具有样品出峰较快、重复性好、专一性强、灵敏度高的特点, 适合布洛芬对映体的血药浓度监测及其对映体的药动力学研究。

REFERENCES

[1] BOOKSTAVER P B, MILLER A D, RUDISILL C N, et al. Intravenous ibuprofen: the first injectable product for the treatment of pain and fever [J]. J Pain Res, 2010, 25(3): 67-79.

[2] ZHU L, HAN S, AO G Z, et al. Preparation of ibuprofen-resacetophenone conjugate and its stability evaluation [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(5): 455-457.

[3] CATTANEO D, CLEMENTI E. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen arginine [J]. Curr Clin Pharmacol, 2010, 5(4): 239-245.

[4] HASHEM H, TRUNDELBERG C, ATTEF O, et al. Effect of chromatographic conditions on liquid chromatographic chiral separation of terbutaline and salbutamol on Chirobiotic V column [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(38): 6727-6731.

[5] POGGI J C, SILVA F G, COELHO E B, et al. Analysis of carvedilol enantiomers in human plasma using chiral stationary phase column and liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Chirality, 2012, 24(3): 209-214.

[6] ZHAO X, SUN P H, ZHOU Y, et al. Determination of ibuprofen in human serum by HPLC [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2004, 20(4): 295-298.

[7] PAYAN M, LOPEZ M A. HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) [J]. Anal Chim Acta, 2009, 653(2): 184-190.

[8] ALI N W, HEGAZY M A, ABDELKAWY M, et al. Simultaneous determination of methocarbamol and ibuprofen or diclofenac potassium using mean centering of the ratio spectra method [J]. Acta Pharm, 2012, 62(2): 191-200.

收稿日期: 2012-05-21