

毛细管电泳测定血清及结肠中地塞米松磷酸钠含量的方法学研究

郭丹¹, 陈娜娜², 李国锋¹ (1. 第一军医大学南方医院药学部; 2. 第一军医大学药物研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 建立测定血清及结肠中地塞米松磷酸钠(DSP)浓度的方法。方法 高效毛细管电泳法。毛细管 60cm × 75 μm; 运行缓冲液 100mmol · L⁻¹ 四硼酸钠(pH 9.2), 高压进样 5s, 分离电压 20kV, 温度为 25⁰C, 检测波长为 240nm。三氯乙酸沉淀蛋白后上清液直接进样, 测定血清及结肠中的浓度。结果 血清及结肠中的 DSP 能得到较好分离, 无明显干扰峰, DSP 的线性范围为 0.78 ~ 50 μg · mL⁻¹ (r = 0.9995)。血清和结肠中平均提取回收率分别为 89.51% 和 92.34%。结论 该法简便、分离度好, 灵敏度高, 可用于 DSP 的药代动力学研究。

关键词: 地塞米松磷酸钠; 血清; 结肠; 高效毛细管电泳法

中图分类号: R917.794.5

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2005)07-0629-03

Study of the determination of the content of dexamethasone sodium phosphate in serum and colon by HPCE

GUO Dan¹, CHEN Na-na², LI Guo-feng¹ (1. Pharmaceutical Department of Nanfang Hospital; 2. Institute of Pharmaceutical Sciences; the First Military Medical University, Guangdong, Guangzhou 510515)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of the content of dexamethasone sodium phosphate(DSP) in serum and colon. **METHODS** The HPCE was adopted. The best condition was achieved with a fused silica capillary tube (60cm × 75 μm), 100mmol · L⁻¹ sodium tetraborate buffer (pH 9.2), at a constant voltage of 20 kV and temperature at 25°C. The UV detection wavelength was at 240nm. The proteins were precipitated with trichloroacetic acid, the sample was directly injected to determine the content of DSP in serum and colon. **RESULTS** DSP was well separated from any other obvious interactive peaks in serum or colon sample. The method showed a good linearity for DSP in the range of 0.78 ~ 50 μg · mL⁻¹ (r = 0.9995), while the lowest limit of detection was 0.04 μg · mL⁻¹. The average recoveries were obtained as 89.51% from serum sample and 92.34% from colon sample respectively. **Conclusions** The established HPCE method for determination of DSP will be very useful in the study of pharmacokinetics of DSP.

KEY WORDS: dexamethasone sodium phosphate; serum; colon; HPCE

地塞米松磷酸钠(DSP)为长效类的糖皮质激素, 具有较强的糖代谢及抗炎等作用, 在临床上治疗自身免疫性疾病、过敏性疾病、皮肤病的基本药物。但是长期服药又会引起机体代谢紊乱, 出现严重的不良反应。因此, 建立准确、灵敏的分析方法对开展地塞米松磷酸钠的临床药学研究是非常必要的。地塞米松磷酸钠的含量测定多采用高效液相色谱法^[1,2]。高效毛细管电泳测定地塞米松磷酸钠的含量国内未见报道。本文参考国外文献^[3]的方法, 采用 HPCE 法建立了一种样品处理简单, 灵敏度高的测定血清和结肠中 DSP 的分析方法, 从而为临床用药提供参考依据。

1 仪器与试剂

高效毛细管电泳仪(Waters, 美国), 石英毛细管柱(60cm × 75 μm), Millennium32 数据处理系统; 旋涡振荡器(XW-

80A, 上海医科大学仪器厂); 离心机(ABBOT, 美国)。

地塞米松磷酸钠对照品(DSP, Sigma 公司); 四硼酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、氢氧化钠均为分析纯; Wistar 大鼠(雄性, 第一军医大学实验动物中心)。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

电泳缓冲液的配制 用超纯水配成 100mmol · L⁻¹ 四硼酸钠电泳缓冲液溶液, pH9.2。

磷酸盐缓冲液(PBS)的配制 精密称取 0.04g 磷酸二氢钠、0.28g 磷酸氢二钠和 8.5g 氯化钠溶于 1000mL 超纯水中, 配成溶解样品的 PBS 溶液。

DSP 对照品溶液贮备液的配制 用 PBS 定量, 配成 1mg · mL⁻¹ 的地塞米松磷酸钠对照品溶液。

基金项目: 本课题获国家卫生部归国世川生启动基金(批准号:055); 广东省医学科研基金(A2002371)资助

作者简介: 郭丹(1971-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 药品检验和仪器分析。Tel: 020-61641888-87215, E-mail: yxbyjs@fimmu.com

DSP 对照品工作液的配制 精密量取对照品贮备液 5mL 于 50mL 容量瓶中,加 PBS 至刻度,摇匀。(DSP 的浓度为 $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2 电泳条件 毛细管在每次使用前先用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 冲洗 2 min,后用超纯水冲洗 2 min,再用电泳缓冲液冲洗 2 min。所用溶液均经 $0.45\mu\text{m}$ 纤维树脂膜过滤。采用压力进样,进样量为 $50\text{ kPa} \cdot \text{s}^{-1} \times 5\text{ s}$,柱温 25°C ,分离电压 20kV,检测波长 240 nm。电泳缓冲液为 $100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四硼酸钠溶液(pH 9.2)。

2.3 血浆模拟样品处理 大鼠心脏取血 6mL 以上,分离血清,精密量取血清 2mL,加入三氯乙酸($200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)0.2mL 沉淀蛋白,离心($10080\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,15min),取上清液加 DSP 工作液 $50\mu\text{L}$ ($100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),旋涡混合 30min,用异丙醇-二氯甲烷(5:95)旋涡萃取 10min,共 3 次,用量分别为 4、3、3mL。合并萃取液,通风橱中水浴挥干有机溶剂。残渣中精密加入 PBS 0.5mL 溶解,转移到 0.5mL 离心管中,离心($10080\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,15min),取上清液进样 5s。另取血清平行作空白。

2.4 结肠组织模拟样品处理 从大鼠中取出结肠,用生理盐水洗净内容物后,切成细碎块后加 DSP 工作液适量 0.5mL ($100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),加缓冲液超声提取(120W,30min)共 3 次,每次 3mL,合并提取液于 15mL 离心管中,加入三氯乙酸($200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)0.2mL 沉淀蛋白,离心($10080\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,15min),上清液转移至 10mL 容量瓶中,旋涡混合 30min,加 PBS 至刻度, $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,进样 5s;另取结肠组织平行作空白。

2.5 方法的专属性考察

在上述电泳条件下,测得 DSP、空白血清、空白结肠、含 DSP 血清、含 DSP 的结肠组织的电泳图。由图可见血清中其它成分和结肠组织提取物中其它成分对药物的测定无干扰,药物与其它组分能达到较好的基线分离。本法具有较高的专属性。

2.6 线性关系考察

精密量取 DSP 对照品贮备液 5mL 于 50mL 量瓶中,用 PBS 定容至 50mL,DSP 的浓度为 $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,用 PBS 按等比稀释配制 50,25,12.5,6.25,3.12,1.56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 0.78 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DSP 溶液,按上述电泳条件,分别进样 10s。以峰面积(Y)对样品浓度 C($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)作线性回归,得标准曲线方程: $Y = 1726.8C + 489, r = 0.9995 (n = 5)$, DSP 在 50 ~ 0.78 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好,最低检测限为 0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (按信噪比为 3 倍计)。

2.7 回收率的测定

在空白血清及空白结肠中分别加入高、中、低 3 种浓度的 DSP 溶液,样品处理同“血浆模拟样品处理”和“结肠组织模拟样品处理”项下操作,测定各自峰面积,分别计算回收率,得到血清样品平均提取回收率为 89.51%;结肠组织平均提取回收率为 92.34%。

2.8 方法的精密性试验

在空白血清及空白结肠中分别加入高、中、低 3 种浓度的 DSP 溶液,样品处理同“血浆模拟样品处理”和“结肠组织模拟样品处理”项下操作,分别测定日内变异和 5 d 内的日间变异。高、中、低 3 种浓度的日内精密性(RSD)分别为:血清:2.7%,3.9%,6.1%;结肠:1.9%,3.8%,5.6%。高、中、低 3 种浓度的日间精密性(RSD)分别为:血清:1.3%,3.5%,7.1%;结肠:2.9%,4.3%,6.5%。

3 讨论

由于毛细管电泳具有分离效率高、速度快、适用范围广、所需样品量和试剂量少等优点,这为药物分析及临床体液分析开拓了美好的前景。

缓冲液值 pH 是影响 HPCE 分离的重要因素。不同的 pH 值缓冲液一定程度上改变了分离溶质的表现电荷数,使之形成不同的质荷比,从而产生两者差速电迁移结果。本实验曾比较磷酸盐(pH 5.6)、硼砂-硼酸(pH 9.0)、四硼砂钠(pH 9.2)3 种缓冲液,结果发现,采用 pH 为 9.2 的四硼砂钠缓冲液时分析时间短,峰形尖锐、对称并达到基线分离,且分析时间最短。

增加缓冲液浓度会改变毛细管内壁双电层厚度和溶液粘度,进而降低分离溶质电迁移速度,使电泳分离度有所改善。但是,缓冲液浓度过大,不可避免地会造成毛细管内焦耳热升高,反而使分离效能降低。因此,在兼顾电泳分离度与焦耳热效应的前提下,在选定四硼砂钠作缓冲液的基础上,对 3 种不同浓度的缓冲液进行比较,由峰形及分离效果发现 100 mmol/L 缓冲液,其结果优于 50 和 150mmol/L 的缓冲液。

研究表明,柱温降低分离度变好,但柱效减低,分析时间变长。综合考虑分离度和迁移行为的变化,本实验选用 25°C 柱温较合适。分离电压是毛细管电泳的一项重要参数,实验表明,增加组分的迁移速度是减少谱带展宽、提高分离效率的重要途径,增加电场强度可以达到提高速度的目的。但高场强度导致通过毛细管的电流增加,从而增大焦耳热^[4]。在 20kV 时,分离选择性最佳。

结肠样品处理中,我们比较了匀浆提取和超声提取 2 种方法,结果没有显著差异,因超声提取简便,我们采用此法。血清中样品用异丙醇-二氯甲烷(5:95)作萃取剂,获得较低的杂质干扰和较高的萃取回收率。

本研究采用三氯乙酸沉淀蛋白,上清液直接进样(结肠组织模拟样品),大大降低了处理样品的工作量,且无杂质峰干扰。其最低定量浓度为 0.78 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,最低检测限为 0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,达到了生物样品中 DSP 的测定要求,为 DSP 结肠靶向制剂体内药代动力学研究建立了可行的检测方法。但是,血样中及结肠中药物的平均提取回收率均未达到 95% 以上,有待进一步提高。

参考文献

- [1] 姜雄平,于文胜.复方脑栓通注射液中地塞米松磷酸钠的 HPLC 测定[J].中国医药工业杂志,1996,27(4):173.

[2] 贾淑杰,张蓉,刘美欣,等. RP-HPLC 法测定复方氧氟沙滴眼中地塞米松磷酸钠的含量[J]. 天津药学,2002,14(1):62.

[3] Baeyens v, Varesio E, Veuthey JL, et, al. Determianation of dexamethasone in tears by capillary electrophoresis [J]. J Chroma-

togr, 1997, 692:222.

[4] 范国荣,张正行,陈伟,等. 高效毛细管电泳分离中焦耳热现象的考察. 中国药科大学学报[J],1996,27(2):87.

收稿日期:2003-05-13