

RP-HPLC法测定人体血浆中雷贝拉唑钠的含量

陈虹,丁雪鹰,高静,高申(第二军医大学药学院药剂教研室,上海 200433)

摘要 目的:建立测定人体血浆中雷贝拉唑钠浓度的高效液相色谱法。方法:色谱条件:Dikma Diamonsil C₁₈分析柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm), 0.1 mol/L 醋酸铵缓冲液(0.1 mol/L NaOH调 pH 7.81)-乙腈(72:28)为流动相,检测波长 284 nm,流速 1.5 mL/min。血浆样品经乙酸乙酯萃取一次,40 °C 氮气挥干后进样。结果:雷贝拉唑钠血药浓度的线性范围为 5~1600 ng/mL ($r=0.9999$),提取回收率 78.45%~89.56%,方法回收率 95.16%~97.52%,日内、日间 RSD 分别为 6.52%和 8.23%。结论:该方法灵敏、准确、专一、简便,适于雷贝拉唑钠肠溶片的人体药动力学和生物等效性研究。

关键词 雷贝拉唑钠;血药浓度;反相高效液相色谱法

中图分类号:R94;R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)02-0115-04

Determination of rabeprazole sodium in human plasma by RP-HPLC

CHEN Hong, DING Xue-ying, GAO Jing, GAO Shen (Department of Pharmaceutics, Pharmacy College, Secondary Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To develop a RP-HPLC method for determination of the rabeprazole sodium in human plasma. **Methods:** The chromatographic separation was carried out on Dikma Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm ×250 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1 mol/L ammonium acetate buffer (pH adjusted to 7.81 with sodium hydroxide solution) - acetonitrile (72:28) and the flow rate was 1.5 mL/min with UV detection (284 nm). After extraction once from plasma with ethyl acetate, RPZ was evaporated to dryness at 40 °C under a nitrogen stream. **Results:** The linear range was 5~1600 ng/mL, $r=0.9991$. The extraction recovery of rabeprazole was 78.45%~89.56%, recovery of the method was within 95.16%~97.52%, and within-day and between-day RSD 6.25% and 8.23%, respectively. **Conclusion:** The method is sensitive, specific and reproducible for the determination of rabeprazole sodium concentration in human plasma. It is very suitable for pharmacokinetics study of rabeprazole.

KEY WORDS rabeprazole sodium; plasma concentration; RP-HPLC

雷贝拉唑钠(rabeprazole sodium, RPZ)是继奥美拉唑、兰索拉唑后的新一代质子泵抑制剂。临床主要用于治疗胃溃疡、十二指肠溃疡、吻合口溃疡、反流性食管炎、卓艾(Zollinger-Ellison)综合征,其首日作用强于奥美拉唑^[1],在 pH 值 =5.1 的环境中起效时间为 72 min,优于其他 pKa <4 的质子泵抑制药的起效时间 10 倍以上^[2],且疗效稳定、个体差异小。目前,国内外已有相关文献报道使用高效液相色谱法^[4-7]和柱切换高效液相色谱法^[3]测定雷贝拉唑钠的血药浓度,但方法比较繁琐,需要多步提取,且保留时间较长。笔者建立了人体血浆中 RPZ 的 RP-HPLC 测定方法,灵敏、准确、专一、简便,适用于临床 RPZ 血药浓度检测及其药代动力学和生物等效性研究。

1 仪器与试剂

作者简介:陈虹(1980-),女,硕士研究生。Tel: (021)81870392。

HITACHI 高效液相色谱仪系统:由 L-2455 二极管阵列检测器, L-2200 全自动进样器, HITACHI L2000 高效液相色谱化学工作站组成,美国 HITACHI 公司生产;VXH 旋涡混合器(上海和欣科教设备有限公司);TGL20M 台式高速冷冻离心机(湖南凯达实业发展有限公司)。雷贝拉唑钠对照品(含量 99.1%)、雷贝拉唑钠肠溶片(10 mg/片,批号 070707)均由上海医药(集团)有限公司信谊制药总厂提供;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯;试验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 紫外检测波长的选择 据文献报道^[3-8],雷贝拉唑钠在 288 nm 附近有较强吸收。在 220 nm~400 nm 内对雷贝拉唑钠进行全波长扫描,结果显示其在 284 nm 处有最大吸收,如图 1 所示,故选择此处波长为测定波长。

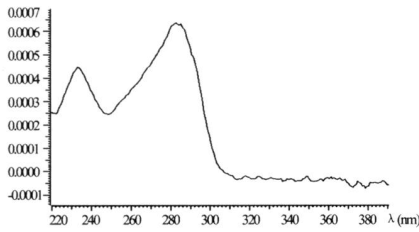


图 1 雷贝拉唑钠紫外扫描图谱

2.1.2 色谱条件 色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ (250 ×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% NH₄AC 缓冲液 (pH = 7.5): 乙腈 = 72: 28; 柱温为室温; 流速为 1.5 mL/min; 检测器为 UV 检测器; 检测波长为 284 nm。在此色谱条件下, 可见色谱图峰形对称, 主峰的保留时间为 13.60 min, 且峰形尖锐, 血浆中的内源性杂质不干扰雷贝拉唑钠的测定, 该法具有较高的专属性, 其典型谱图见图 2。

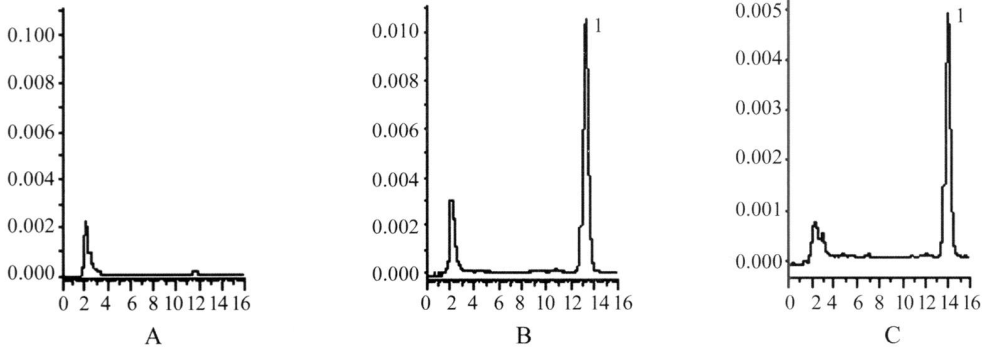


图 2 HPLC分析典型图

A 空白血浆色谱图; B 空白血浆 + 标准品色谱图 (1 000 ng/mL); C 受试者服药后 2.5 h 血浆样色谱图; 1 雷贝拉唑钠

2.2 标准品溶液的配制 精密称取雷贝拉唑钠对照品 10 mg, 用 10 mL 甲醇溶解, 再用重组液定容至 50 mL, 作为标准品贮备液。另精密量取适量贮备液, 以重组溶液 (0.1 mol/L NaOH: 乙腈 = 75: 25) 定容至 5 mL, 分别得浓度为: 100、200、1 000、2 000、10 000、20 000、32 000 ng/mL 的标准品溶液, 置冰箱 4℃ 冷藏保存备用。

2.3 血浆样品预处理 取血浆 950 μL, 置 10 mL 试管内, 精密加入标准溶液 50 μL, 漩涡混旋 1 min, 加入 200 μL 0.1 mol/L NH₄AC 缓冲盐溶液 (0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 10.45), 漩涡混旋 1 min, 加入乙酸乙酯 4 mL, 漩涡混旋 2 min 后高速离心 (10 000 r/min) 5 min, 取上清液置 10 mL 离心管中, 40℃ 水浴氮气挥干。残留物用 100 μL 重组溶液溶解, 进样 20 μL 作 RP-HPLC 分析。

2.4 标准曲线的建立 取健康人空白血浆 950 μL 若干份, 分别加入雷贝拉唑钠标准溶液 50 μL 使其浓度分别为 5、10、50、100、500、1 000、1 600 ng/mL, 按“血样预处理”项下处理后作 RP-HPLC 分析。以样品峰面积 (Y) 对药物浓度 (C, ng/mL) 进行回归处理, 在 5~1 600 ng/mL 范围内其线性良好, 回归方程为 $Y = 96.032X - 481.48$ ($r = 0.9991, n = 3$), 以信噪比 $S/N = 2$ 计, RPZ 的最低检测限为 2.5 ng/mL。结果见图 3。

2.5 回收率及精密度试验

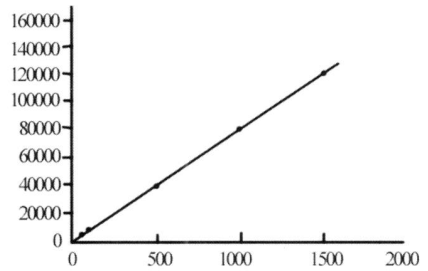


图 3 人体血浆中雷贝拉唑钠的标准曲线

2.5.1 提取回收率试验 配制低、中、高 3 种浓度 (10、100、1 000 ng/mL) 的雷贝拉唑钠血浆各 3 份, 按“血样预处理”方法处理后作 RP-HPLC 分析, 所得峰面积与相应浓度的雷贝拉唑钠标准溶液直接进样所得峰面积进行比较, 计算提取回收率。

方法回收率: 配制低、中、高 3 种浓度 (10、100、1 000 ng/mL) 的雷贝拉唑钠血浆各 3 份, 按“血样预处理”方法处理后作 RP-HPLC 分析, 所得峰面积代入血浆标准曲线, 将计算所得浓度与已知血样浓度比较, 计算方法回收率。结果见表 1。

表 1 雷贝拉唑钠的回收率 (n = 3)

浓度 (ng/mL)	提取回收率 (%)	提取回收率 RSD (%)	方法回收率 (%)	方法回收率 RSD (%)
10	89.56	8.19	96.21	5.89
100	82.14	4.98	95.16	4.52
1 000	78.45	4.80	97.52	3.21

2.5.2 精密度试验: 配制低、中、高 3 种浓度 (10、100、1 000 ng/mL) 的雷贝拉唑钠标准血浆, 按“血样预处理”方法处理后进样, 同一天内作 RP-HPLC 分析, 平行操作 5 次, 计算日内精密度; 连续 3 d 每天配制上述 3 种浓度的血浆样品各 5 份, 作 RP-HPLC 分析, 计算日间精密度。结果见表 2。

表 2 雷贝拉唑钠的日内及日间精密度 (n=5)

浓度 (ng/mL)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
10	8.47	8.89
100	5.65	8.56
1 000	5.44	7.24

2.6 样品稳定性考察

2.6.1 样品放置稳定性考察 取已知浓度 (10、100、1 000 ng/mL) 雷贝拉唑钠血浆样品数份, 在 -18℃ 下放置 1 个月, 按“血浆样品预处理”项下方法操作, RP-HPLC 测定浓度, 考察冷冻放置后的稳定性, 结果见表 3, 样品 RSD 为 4.36%。

表 3 雷贝拉唑钠血浆样品放置稳定性考察 (n=5)

浓度 (ng/mL)	第 0 个月测得浓度	第 1 个月测得浓度
10	9.76	9.37
100	97.23	96.41
1 000	998.12	987.35

以上数据说明血浆样品在 -18℃ 放置 1 个月仍较稳定。

2.6.2 样品冻融稳定性考察: 取已知浓度 (10、100、1 000 ng/mL) 雷贝拉唑钠血浆样品数份, 按血浆样品预处理与 RP-HPLC 测定方法操作, 即时测定其含量, 另反复冻融 3 次后测定其浓度 (每次消融时间约为 30 min), 考察其冻融稳定性, 结果见表 4, 样品 RSD 为 6.46%。

表 4 雷贝拉唑钠血浆样品反复冻融稳定性考察 (n=5)

浓度 (ng/mL)	未冻融测得浓度 (ng/mL)	第 3 次冻融测得浓度 (ng/mL)
10	9.95	9.89
100	99.21	93.62
1 000	1 001.08	999.04

以上数据说明血浆样品在反复冻融 3 次后仍较稳定。

2.6.3 样品重组后的稳定性考察: 取已知浓度 (10、100、1 000 ng/mL) 雷贝拉唑钠血浆样品数份, 按血浆样品预处理与 RP-HPLC 测定方法操作, 测定雷贝拉唑钠含量, 将重组后的样品在室温放置 12 h 后, 重新测定, 考察其稳定性, 结果见表 5, 样品 RSD 为 4.21%。

表 5 雷贝拉唑钠血浆样品在重组液中的稳定性考察

浓度 (ng/mL)	第 0 h 测得浓度	第 12 h 测得浓度
10	9.94	9.88
100	99.34	97.87
1 000	998.29	986.34

以上数据说明血浆样品用重组液重组后在室温下保存 12 h 后仍较稳定。

2.7 方法学应用 20 名男性健康志愿者空腹单剂量雷贝拉唑钠肠溶片 40 mg, 于给药前和给药后 0、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5、6、7、8、9、10、12 h 抽取静脉血 3 mL 置肝素化离心试管中, 分离出血浆, 于 -18℃ 冷藏保存待测, 按“血样预处理”项下方法处理后作 RP-HPLC 分析。结果表明, 本方法灵敏、准确、专一、简便, 适于雷贝拉唑钠肠溶片的人体药动学和生物等效性研究。

3 讨论

3.1 流动相的选择 参考文献^[5,6,8], 本文分别考察了以乙腈-甲醇-醋酸铵缓冲液、乙腈-水、乙腈-醋酸铵缓冲液为流动相对雷贝拉唑钠的定量分析。结果表明: 乙腈-甲醇-醋酸铵缓冲液、乙腈-水为流动相时峰形较差, 且主峰与血浆中杂质峰不能较好分离, 因此选择了乙腈-醋酸铵缓冲液为流动相, 考察了其配比和缓冲液的浓度。结果显示乙腈-醋酸铵缓冲液配比为 70:30 时, 主峰与血浆中杂质峰分离不好; 配比为 75:25 时虽分离度较好, 但保留时间过长; 配比为 72:28 时主峰可与杂质峰完全分离, 且保留时间适宜; 当缓冲液的浓度为 0.01 mol/L、0.05 mol/L 时主峰峰形较差, 杂质干扰严重; 当缓冲液浓度为 0.1 mol/L 时, 主峰峰形尖锐, 保留时间适宜, 与血浆中杂质峰分离较好。综合考虑保留时间、峰形、分离度等因素, 最终选择 0.1 mol/L 的醋酸铵缓冲液与乙腈配比为 72:28 的流动相, 在此配比下, 主峰出峰时间较理想, 无血浆杂质峰干扰。

3.2 碱性环境的维持 RPZ 在酸性环境和光照及高温条件下易降解, 但在碱性环境下相对稳定, 因此采用重组溶液配制 RPZ 标准溶液, 使用 pH=7.81 的流动相, 在血浆样品中加入 0.1 mol/L 醋酸铵溶液 (pH=10.45) 200 μL, 用重组溶液溶解氮气挥干的残渣, 尽最大限度的维持碱性环境, 保持其稳定性。

3.3 本试验按文献^[5,8], 分别考察了在预处理时未加入 0.1 mol/L 醋酸铵溶液、加入 0.1 mol/L 醋酸铵溶液 (pH=7.8) 和加入 0.1 mol/L 醋酸铵溶液 (pH=10.45) 的血浆样品, 结果前二者的样品图谱中杂

(下转第 121 页)

所以综合判断,取辛酸甘油三酯与聚氧乙烯(35)蓖麻油之间的百分比为70/30组的处方乳化效果较好,表面活性剂的用量较少,该处方对药物有较好的溶解能力,试验结果较为理想。

3 讨论

本制剂选用辛酸甘油三酯与聚氧乙烯(35)蓖麻油为阿德福韦酯自乳化制剂处方里的油和表面活性剂,是由于自乳化制剂里所选的油辛酸甘油三酯能以较少的用量溶解处方量的药物,即使在低温贮藏条件下,也不会有药物析出,容易被处方中的乳化剂乳化;所选用的聚氧乙烯(35)蓖麻油为非离子型表面活性剂,这是因为它的HLB值(12~14)较高,聚氧乙烯(35)蓖麻油的强亲水性是立即形成O/W乳滴和自乳液在水环境中扩散所必需的,它能使自乳化过程更快,其本身也能溶解相对大量的疏水性药物阿德福韦酯,具有较强的乳化能力,从而有效增加油相中药物同胃肠道的接触面积。

阿德福韦酯自乳化制剂处方里未加助表面活性剂,因为使此制剂的生物利用度在体内达到最大程度的提高,故将其制备为胶囊剂;而其助表面活性剂使用长链醇、乙二醇、丙二醇、聚甘油等衍生物,可使囊材软化或溶解,导致药物外渗。因此阿德福韦酯自乳化制剂处方里不能加助表面活性剂。

自乳化速率是评价混合物自发形成稳定微乳或分散相粒径均一精细乳滴能力的一个指标。在研究中,自乳化的时间虽不能正式测定但可以通过目测观察。如用37℃恒温的溶出介质以不同比例稀释SEDDS,轻微搅拌后以肉眼观察分散完全的时间。

根据实验结果,初步确定阿德福韦酯自乳化制剂最佳的配方比例为辛酸甘油三酯(70%),聚氧乙烯(35)蓖麻油(30%);该研究为以后的该制剂在体内考察提供了有益的研究基础。

参考文献:

- [1] Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs[J]. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(3): 173.
- [2] Chae GS, Lee JS, Kim SH. Enhancement of the stability of BCNU using self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) and *in vitro* antitumor activity of self-emulsified BCNU-loaded PLGA water [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301(1/2): 6.
- [3] Ma EL, Ma H, Liu Z, *et al* In vitro and in vivo evaluation of a novel oral insulin formulation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006(10): 1382.
- [4] Hong JY, Kim JK, Song YK, *et al* A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption [J]. *J Control Release* 2006, 110(2): 332.
- [5] You J, Cui FD, Han X, *et al* Study of the preparation of sustained-release microspheres containing zedoary turmeric oil by the emulsion solvent-diffusion method and evaluation of the self-emulsification and bioavailability of the oil [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 48(1): 35.
- [6] Serratori M, Newton M, Booth S, *et al* Controlled drug release from Pellets containing water-insoluble drugs dissolved in a self-emulsifying system [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 65(1): 94.
- [7] 杨根生,严琴英,王文喜,等.紫杉醇口服自乳化给药系统的处方研究[J]. *浙江工业大学学报* 2008, 36(1): 5.
- [8] 全丹,高缘.头孢泊肟酯自乳化制剂的研究[J]. *海峡药学* 2007, 19(3): 24.

收稿日期: 2008-09-22

(上接第 117页)

质峰较多、主峰和杂质峰无法较好分离,且提取回收率较低,仅为68%;加入0.1 mol/L醋酸铵溶液(pH=10.45)的血浆样品图谱中杂质峰减少,主峰和杂质峰分离较好,提取回收率增至86%。

3.4 萃取液的选择 据文献^[4]报道,乙酸乙酯提取率优于乙醚、正己烷、异丙醇、正己烷、二氯甲烷、异丙醇(300:150:1.5)。本试验又考察了使用乙酸乙酯和二氯甲烷做萃取液时样品的提取回收率。结果表明,乙酸乙酯回收率最高,且毒性较小。

参考文献:

- [1] Williams MP, Pounder RE. Review article: the pharmacology of rabeprazole[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999, 13(Supp B): S3.
- [2] Ishizaki T, Horai Y. Review article: cytochrome P450 and the metabolism of proton pump inhibitor: emphasis on rabeprazole

[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999, 13(Supp B): 27.

- [3] Takakuwa S, Chiku S, Nakata H, *et al* Enantioselective high-performance liquid chromatographic assay for determination of the enantiomers of a new anti-ulcer agent, E3810, in Beagle dog plasma and rat plasma[J]. *J Chromatogr B*, 1995, 673: 113.
- [4] 扈本茎,周瑾,程建峰,等.高效液相色谱法测定血浆中雷贝拉唑钠的浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2005, 25(1): 42.
- [5] 郭利民,钟世华.高效液相色谱法测定雷贝拉唑钠血药浓度[J]. *药物研究*, 2008, 5(3): 29.
- [6] 胡玉荣,孙健,阿有梅,等.雷贝拉唑钠血药浓度的HPLC测定[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(12): 1463.
- [7] Ramakrishna NV, Vishwottam KN, Wishu S, *et al* High-performance liquid chromatography method for the quantification of rabeprazole in human plasma using solid-phase extraction [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 816: 209.
- [8] 陈钧,江文明,颜庭晶,等.反相高效液相色谱法测定人血浆中雷贝拉唑钠浓度[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(4): 394.

收稿日期: 2009-01-08