

高效液相色谱法测定人血浆中盐酸氨溴索的浓度

宋晓楠¹, 王晓波¹, 袁荣刚¹, 马文辉², 闫冬³ (1. 解放军第210医院, 辽宁大连116013; 2. 上海衡山药业有限公司, 上海200233; 3. 沈阳亿灵医药科技有限公司, 辽宁沈阳110179)

[摘要] 目的 建立 HPLC 测定人血浆中盐酸氨溴索含量的方法。方法 选用 Diamonsil-C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-四氢呋喃(700 : 320 : 25, v/v/v), 流速: 1.2 ml/min, 检测波长: 242 nm, 柱温: 室温。结果 该方法低、中、高3种浓度的提取回收率为 88.2% ~ 104.8%, 日内、日间相对标准差为 2.7% ~ 5.3% (n=6), 在 10.2 ~ 610.8 ng/ml 范围内线性关系良好。结论 本法简便、灵敏、专属性强, 能满足含量测定及体内药代动力学研究的需要。

[关键词] 盐酸氨溴索; 高效液相色谱; 血药浓度

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0029-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.007

Determination of ambroxol hydrochloride in human plasma by HPLC

SONG Xiao-nan¹, WANG Xiao-bo¹, XI Rong-gang¹, MA Wen-hui², YAN Dong³ (1. No. 210 Hospital of PLA, Dalian 116013, China; 2. Shanghai Hengshan Medicine Industry Co. Ltd, Shanghai 200233, China; 3. E-LIVING Pharmaceutical Co. Ltd, Shenyang 110179, China)

[Abstract] **Objective** To develop a fast reverse-phase high-performance liquid chromatography assay method for the determination of ambroxol hydrochloride. **Methods** A Diamonsil-C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase consisted of methanol-0.01 mol/L PBS (pH 7.0)-THF (700 : 320 : 25, v/v/v). Detection wavelength was 242 nm. **Results** A good linear relationship was obtained in the concentration range of 10.2 ~ 610.8 ng/ml. The average recovery of this method was 88.2% ~ 104.8%. The RSD of within-day and between-day were all less than 15%. **Conclusion** The method was simple, rapid and accurate. The result showed that the method was suitable for the determination of ambroxol hydrochloride.

[Key words] Ambroxol hydrochloride; HPLC; Plasma concentration

氨溴索为溴己新的活性代谢产物, 能促进肺表面活性物质的分泌及气道液体分泌, 促进黏痰溶解, 显著降低痰黏度, 增强支气管黏膜纤毛运动, 促进痰液排除, 改善通气功能和呼吸困难状况, 主要用于急、慢性呼吸道疾病引起的痰液黏稠、咳痰困难等。本研究参考相关文献, 建立了测定盐酸氨溴索血药浓度的高效液相色谱方法。采用该方法以上海勃林格殷格翰药业有限公司生产的盐酸氨溴索片(商品名: 沐舒坦®)为参比制剂, 研究上海衡山药业有限公司生产的盐酸氨溴索片的人体生物等效性^[1]。

1 材料

1.1 仪器 LC-10ATVP 型高效液相色谱, 包括 SPD-10AVP 紫外检测器, 色谱工作站(日本岛津公司); TDZ4 台式自动平衡离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司); XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司); FA1004 电子天平(上海恒

平科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 受试制剂: 盐酸氨溴索片(上海衡山药业有限公司, 规格: 每片 30 mg, 批号: 080301); 参比制剂: 盐酸氨溴索片(上海勃林格殷格翰药业有限公司, 规格: 每片 30 mg, 批号: 784079); 盐酸氨溴索对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100599-200502, 纯度: 99.4%); 内标: 酮康唑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100294-199801); 甲醇、四氢呋喃为色谱纯, 磷酸等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品处理 精密量取血浆 500 μl 置于离心管中, 加入内标溶液(2.042 0 μg/ml) 100 μl, 甲醇-水(1 : 1, v/v) 100 μl, 再分别加入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 10.0) 0.5 ml 和乙醚 4.0 ml, 封口后振荡 1 min, 涡旋混合 60 s, 离心 6 min(3 500 rpm), 醚层转至另一离心管中, 加入 0.01 mol/L 盐酸 200 μl, 涡旋混匀 60 s, 离心 6 min(3 500 r/min), 弃去醚层, 酸层取 50 μl 进样分析^[2]。

[作者简介] 宋晓楠(1980-), 男, 主管药师。Tel: (0411)85847091, E-mail: shunshiyu@yahoo.com.cn.

2.2 试验条件 色谱柱: Diamonsil-C₁₈柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)-四氢呋喃(700:320:25, v/v/v); 流速: 1.2 ml/min; 柱温: 室温; 进样量: 50 μl; 检测波长: 242 nm。

2.3 盐酸氨溴索对照品溶液的配制 精密称取盐酸氨溴索对照品 10.18 mg, 置 100 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 101.8 μg/ml 的盐酸氨溴索储备液。

2.4 内标溶液的配制 精密称取酮康唑对照品 10.21 mg, 置 100 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 10.21 mg/ml 的内标储备液; 精密量取 1.0 ml 内标储备液置 50 ml 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 2.042 0 μg/ml 的内标溶液。以上均需避光操作。

2.5 专属性试验 在“2.2”项分析测试条件下, 血浆中氨溴索和内标酮康唑的保留时间分别为 9.9 min 和 11.7 min, 血浆中内源性物质不干扰盐酸氨溴索和内标物酮康唑的测定。色谱见图 1。

2.6 线性范围及定量下限 精密量取空白血浆 500 μl, 分别精密加入盐酸氨溴索系列标准溶液 100 μl, 配制成血浆中盐酸氨溴索浓度为 10.2、20.4、50.9、152.7、305.4、509.0、610.8 ng/ml 的血浆样品, 按“2.1”项下同法操作, 并进行色谱分析。以盐酸氨溴索与内标的峰面积比对盐酸氨溴索浓度进行线性回归, 结果表明, 盐酸氨溴索在 10.2 ~ 610.8 ng/ml 范围内与待测物和内标物峰面积之比线性关系良好, 定量下限为 10.2 ng/ml。用加权($W = 1/X^2$)最小二乘法进行回归运算^[3], 得回归方程为: $Y = 0.002 03 \times X + 0.000 82, r = 0.998 5$ 。

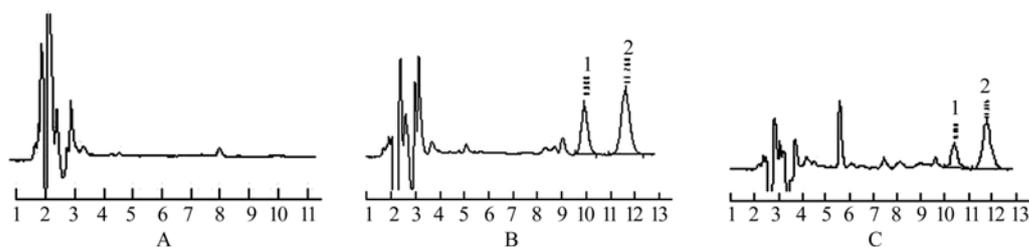


图1 血浆中盐酸氨溴索的 HPLC 色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加盐酸氨溴索对照品和酮康唑对照品; C-血浆样品; 1-盐酸氨溴索; 2-酮康唑

2.7 精密度与准确度 精密量取空白血浆 500 μl, 分别精密加入不同浓度的盐酸氨溴索标准溶液 100 μl, 配制成血浆中盐酸氨溴索浓度为 20.4、152.7 和 509.0 ng/ml 的血浆样品(每个浓度 6 份样本分析), 按“2.1”项下同法操作, 连续测定 3 批(与标准曲线同时进行), 计算血浆样品的浓度, 求得方法的准确度与精密度。日内精密度 RSD 分别为 2.7%, 5.3%, 2.0%; 日间精密度 RSD 分别为 5.1%, 4.4%, 1.2%。

2.8 提取回收率 精密量取空白血浆 500 μl, 分别精密加入不同浓度的盐酸氨溴索标准溶液 100 μl, 配制成血浆中盐酸氨溴索浓度为 20.4、152.7 和 509.0 ng/ml 的血浆样品(每个浓度 3 份样本分析), 按“血浆样品处理方法”项下同法试验, 获得相应色谱峰面积; 另取对应浓度的盐酸氨溴索标准溶液各 100 μl, 加入酮康唑内标溶液 100 μl, 配制成与血浆样品处理后浓度一致的体外样品, 取 50 μl 进样分析, 获得相应色谱峰面积(3 次测定的平均值)。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。详见表 1。

表1 血浆样品方法学回收率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

加入量(ng/ml)	测得值(ng/ml)	回收率(%)	RSD(%)
20.4	18.6 ± 0.6	91.3 ± 3.1	4.4
152.7	142.2 ± 4.1	93.1 ± 2.7	6.2
509.0	527.3 ± 6.1	103.6 ± 1.2	8.3

2.9 稳定性考察 用空白血浆配制血浆标准样品各 3 份, 按“2.1”项方法及“2.2”项条件进行处理和分析, 考察血浆样品预处理后室温放置 24 h、3 次冻融循环的稳定性, -70 °C 14 d 冷冻条件下及储备液的稳定性, 平均 RSD 值均 < 10%。结果表明, 血浆标准样品及储备液在上述条件下稳定性良好。

2.10 应用 20 例健康男性自愿者, 年龄(23.3 ± 1.9)岁, 体重(61.8 ± 5.5)kg, 身高(1.71 ± 0.05)m。试验前, 所有志愿者经血压、心电图、胸透、血常规、尿常规、肝肾功能检查正常, 充分了解试验内容后均自愿签署知情同意书。受试者随机分为 2 组, 禁食 10 h 后, 于次日晨空腹口服参比制剂或受试制剂 90 mg。给药前采血 1 次, 给药后的 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、

12.0、24.0 h 取静脉血 5 ml,置肝素化试管中,离心,分离血浆^[4]。按“2.1”项下方法操作,测定血浆中盐酸氨溴索的浓度,平均药时曲线见图 2,主要药代动力学参数见表 2。

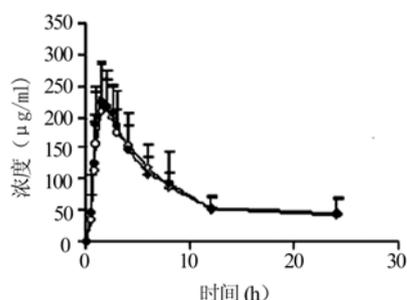


图 2 口服两种制剂的平均药-时曲线
—◇—试验制剂;—◆—参比制剂

表 2 单剂量口服两种片剂的药代动力学参数

参数	受试制剂	参比制剂	90% 置信区间
$t_{1/2}$ (h)	6.33 ± 1.61	6.57 ± 2.24	
C_{max} (ng/ml)	242.6 ± 46.7	236.3 ± 57.4	97.1% ~ 111.8%
t_{max} (h)	2.04 ± 1.50	2.00 ± 0.90	
AUC_{0-t} (ngoh/ml)	1 951 ± 533	1 986 ± 505	91.2% ~ 104.9%
$AUC_{0-\infty}$ (ngoh/ml)	2 122 ± 527	2 199 ± 634	90.2% ~ 105.1%

3 讨论

盐酸氨溴索体内浓度低,本测定采用液-液萃取的方法用乙醚提取血浆样品,再用 0.01 mol/L 盐酸反提回水相,可以减少人血浆内源性杂质的干扰。因样品吸附作用很强,在试验中易造成峰拖尾,出峰时间长,故于流动相中加入四氢呋喃以改善峰形,减少出峰时间。本方法灵敏,专属性强,能满足盐酸氨溴索的含量测定及体内药代动力学研究的需要。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知:化学药和生物制品卷[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:242.
- [2] Nobilis M, Pastera J, Svoboda D, et al. High-performance liquid chromatography determination of ambroxol in human plasma[J]. J Chromatogr, 1992, 581: 251.
- [3] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(5): 343.
- [4] 戈升荣, 安富荣, 曹惠明, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中盐酸氨溴索浓度[J]. 中国药房, 2004, 15(1): 37.

[收稿日期] 2011-10-26

[修回日期] 2011-12-25

(上接第 28 页)

5 结论

综上所述,TPC 对慢性酒精大鼠肝脏具有显著的保护作用,其肝脏保护作用可能与其抗氧化应激,抑制炎症细胞因子 TNF- α 表达和含量有关。

【参考文献】

- [1] 庄辉. ALD 的流行病学[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11: 698.
- [2] 全国酒精性肝病调查协作组. 全国酒精性肝病的多中心调查分析[J]. 中华消化杂志, 2007; 27: 231.
- [3] 中国药典[M]. 2005 版 1 部. 2005: 364.
- [4] Chen ML, Tsai SH, Ip SP, et al. Long-term treatment with a "Yang-Invigorating" Chinese herbal formula, WuZi-YanZong-Wan, reduces mortality and liver oxidative damage in chronic alcohol-intoxicated rats[J]. Rejuv Res, 2010, 13: 459.
- [5] Chen ML, Ip SP, Tsai SH, et al. Biochemical mechanism of Wu-Zi-Yan-Zong-Wan, a traditional Chinese herbal formula, against alcohol-induced oxidative damage in CYP2E1 cDNA-transfected HepG2 (E47) cells[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128: 116.
- [6] Ronis MJ, Hakkak R, Korourian S, et al. Alcoholic liver disease

in rats fed ethanol as part of oral or intragastric low-carbohydrate liquid diets[J]. Exp Biol Med 2004; 229: 351.

- [7] Albano E. New concepts in the pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2008; 2: 749.
- [8] Artele GE. Oxidants and antioxidants in chronic alcoholic liver disease[J]. Gastroenterology, 2003, 124: 778.
- [9] Hanck C, Rossol S, Bocker U, et al. Presence of plasma endotoxin is correlated with tumour necrosis factor receptor levels and disease activity in alcoholic cirrhosis[J]. Alcohol Alcoholism, 1998, 33: 606.
- [10] Tilg H, Wilmer A, Vogel W, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases[J]. Gastroenterology, 1992, 103: 264.
- [11] Tilg H, Jalan R, Kaser A, et al. Anti-tumour necrosis factor- α monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis[J]. J Hepatol, 2003, 38: 419.
- [12] Menon K, Stadheim L, Kamath P, et al. Safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99: 255.
- [13] Spahr L, Rubbia-Brandt L, Frossard J, et al. Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study[J]. J Hepatol, 2002, 37: 448.

[收稿日期] 2011-08-11

[修回日期] 2011-10-14