

反相高效液相色谱法测定犬血清及组织中的维拉帕米

孙 昕^{1,2}, 尹情生², 陈殿良², 董学军², 周丽春², 张 慧², 范平生³

(1. 安徽医科大学第一附属医院实验中心, 安徽 合肥 230022; 2. 合肥工业大学控释药物研究室, 安徽 合肥 230009; 3. 安徽省立医院分院肿瘤内科, 安徽 合肥 230056)

摘要 :建立了动物血清、肝组织中维拉帕米(verapamil, VRPM)药物浓度的测定方法。应用反相高效液相色谱法, 以安定为内标, 采用峰高内标法计算结果。流动相为醋酸盐缓冲液-甲醇-三乙胺(体积比为 40:60:1)混合溶液, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 228 nm。VRPM 在犬血清和肝组织中最低检测限分别为 50 $\mu\text{g/L}$ 和 50 ng/g。犬血清和肝组织匀浆中的 VRPM 质量浓度为 0.1 ~ 10.0 mg/L 及 0.25 ~ 10.0 $\mu\text{g/g}$ 时, 该浓度与响应值线性关系良好($r > 0.999$)。犬血清和肝组织匀浆中的 VRPM 回收率分别为 91.60% ~ 98.68% 和 90.80% ~ 97.09%。该方法精密度高, 简单快捷。

关键词 :高效液相色谱法; 维拉帕米; 血清; 肝组织; 犬

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2004)03-0255-03

Determination of Verapamil in Dog Serum and Tissues by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

SUN Xin^{1,2}, YIN Qingsheng², CHEN Dianliang², DONG Xuejun², ZHOU Lichun², ZHANG Hui², FAN Pingsheng³

(1. Experimentation Center, First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 2. Sustained-Release Drug Laboratory of Hefei University of Technology, Hefei 230009, China; 3. Department of Oncology, Branch Hospital of Anhui Provincial Hospital, Hefei 230056, China)

Abstract : A method for determination of verapamil (VRPM) concentrations in dog serum and tissues was established. The study was carried out on a high performance liquid chromatograph with a reversed-phase C_{18} column, a mobile phase of acetate-methanol-triethylamine (40:60:1, v/v) at 1.0 mL/min, and UV detection at 228 nm. Diazepam was used as the internal standard. The detection limits of VRPM concentrations in serum and tissues were determined to be 50 $\mu\text{g/L}$ and 50 ng/g, respectively. Good linearities were observed for VRPM in serum and in liver tissue ($r > 0.999$). The precision of the method was good and the recoveries of VRPM were higher than 90.80%. This method is rapid, accurate and convenient for determination of VRPM concentrations in serum and tissues.

Key words : high performance liquid chromatography; verapamil; serum; liver tissue; dog

维拉帕米是一种钙通道拮抗剂, 广泛用于治疗高血压、心律失常及心绞痛^[1]。近年来, 随着对其药理作用研究的进一步深入, 其应用领域不断扩大。肿瘤细胞对化疗药物的多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是肿瘤化疗失败的主要原因之一, 而维拉帕米是逆转多药耐药性的逆转剂, 能增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[2], 因此该药物在抗肿瘤治疗中也得到越来越多的应用。但维拉帕米体内血清浓度仅为 1 ~ 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 就可能对心血管系统产生毒副作用, 因而其用量以及在临床中的应用

受到了一定的限制^[3]。为了探讨维拉帕米对化疗药物的增敏作用, 经犬肝动脉灌注后, 以高效液相色谱法^[4,5]测定犬血清和肝组织中的药物浓度, 以期为临床有效、安全和合理的用药提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters 515 泵; P200 II 紫外可变波长检测器、Echrom98 色谱数据处理工作站(大连依利特分析仪器有限公司)。

乙醚、二氯甲烷均为分析纯试剂(上海化学试剂公司);甲醇(色谱纯);盐酸维拉帕米、安定(内标)对照品分别由上海禾丰药业公司和上海旭东海普药业公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters symtry- C_{18} 柱(300 mm × 4.6 mm i. d. 5 μ m,Waters公司);预柱: C_{18} 柱(25 mm × 6 mm i. d. ,大连依利特分析仪器有限公司);流动相:醋酸盐缓冲液-甲醇-三乙胺(体积比为40:60:1);流速:1.0 mL/min;柱温:室温;检测波长:228 nm。

1.2.2 对照品溶液和内标液的配制

精密称取盐酸维拉帕米对照品 10.0 mg,以无水乙醇配制成 0.1 g/L的对照品储备液,置于冰箱中保存。取该储备液适量,用流动相稀释成不同浓度的对照品工作液,精密称取安定对照品 10.0 mg,以无水乙醇配制成 0.1 g/L的内标液。

1.2.3 醋酸盐缓冲液的配制

取醋酸钠(无水)1.36 g,加水适量,振摇使其溶解,加冰醋酸 33 mL,加水稀释至1 000 mL,摇匀,即得醋酸盐缓冲液。

1.2.4 生物样品的前处理

(1)血清:取待测犬血清 0.50 mL,加超纯水 50 μ L、NaOH 溶液(1.20 mol/L)1 滴、5% 偏重硫酸钠 1 滴,混匀后加入乙醚-二氯甲烷(体积比为 10:8)溶液 5 mL,旋涡混合提取 5 min,离心(2 500 r/min)30 min,取上层有机相于另一 10 mL 离心试管中。重复提取一次。合并两次提取液,于 35 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹干,残渣用 100 μ L 流动相溶解,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过后,取 20 μ L 滤液进样分析。

(2)肝组织:精密称取切碎后的犬肝组织 0.5 g,加入水 50 μ L,用 2.00 mL 生理盐水制成匀浆,离心后取清液 0.50 mL。除了不加 50 μ L 水外,其后处理步骤同血清样品的前处理。

2 结果与讨论

2.1 维拉帕米的色谱行为

取空白犬血清 0.50 mL,加入维拉帕米对照品溶液 50 μ L(125 mg/L)(相当于 6.25 μ g 维拉帕米)和内标液 20 μ L,其后处理步骤同犬血清样品的前处理。按“1.2.1”节色谱条件进行色谱分析,结果见图 1。

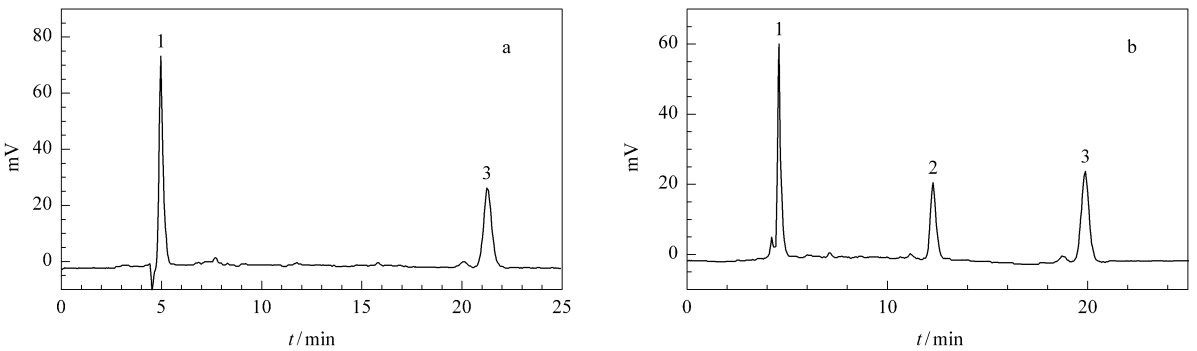


图 1 空白血样(a)与加标(125 mg/L)血样(b)的色谱图

Fig.1 Chromatograms of blank dog serum (a) and dog serum sample spiked with verapamil (125 mg/L)(b)
1. impurity ; 2. verapamil ; 3. internal standard.

取空白犬肝组织约 0.5 g,加入水 50 μ L,用 2.00 mL 生理盐水制成匀浆,加入维拉帕米对照品溶液 50 μ L(125 mg/L)和内标液 20 μ L,其后步骤同犬肝组织样品的前处理。按“1.2.1”节色谱条件进行色谱分析,结果见图 2。

2.2 线性关系和灵敏度

分别精密吸取质量浓度为 0.1,0.25,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 mg/L 的维拉帕米对照品工作液各 50 μ L 于离心管中,加内标液 20 μ L、空白犬血清 0.50 mL 或肝组织匀浆离心后的上清液 0.50 mL,制成不同浓度的标准生物样品,按“1.2.4”节生物样品的

前处理方法处理样品,取上清液 20 μ L 进样。以对照品峰高与内标物峰高比(Y)对对照品的质量浓度(X)进行线性回归,血清和肝组织匀浆中的维拉帕米质量浓度分别为 0.1 ~ 10.0 mg/L 及 0.25 ~ 10.0 μ g/g 时呈线性关系,回归方程分别为 $Y = 1.5925X + 0.0402$, $r = 0.9994$; $Y = 1.5497X - 0.0261$, $r = 0.9990$ 。

以信噪比等于 5 计,犬血清和肝组织匀浆中维拉帕米的最低检测限分别为 50 μ g/L 和 50 ng/g。

2.3 方法的精密度和回收率

分别取空白犬血清 0.50 mL 或空白肝组织匀

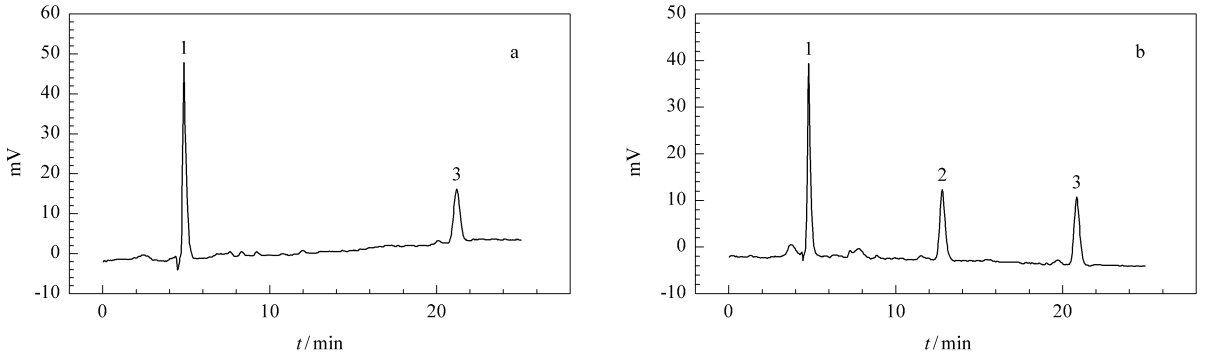


图 2 空白犬肝组织(a)与加标(125 mg/L)犬肝组织(b)的色谱图

Fig.2 Chromatograms of blank dog liver tissue(a) and dog liver tissue sample spiked with verapamil(125 mg/L)(b)
1. impurity ; 2. verapamil ; 3. internal standard.

浆离心后的上清液 0.50 mL,加 20 μL 内标液及不同浓度的对照品溶液制备成高、中、低 3 种浓度的测试样品,按“ 1. 2. 4 ”节生物样品的前处理方法处理

样品,以不同的时间(日内 2, 4, 8, 24 h),(日间 : 1, 2, 3, 4, 5 d ; 冰箱保存) 取上清液 20 μL 进样测定。日内和日间精密度、加标回收率结果见表 1。

表 1 精密度和回收率测定结果(n = 3)

Table 1 Results of precision and recovery tests (n = 3)

Sample	Added ¹⁾	Inter-day			Intra-day		
		found ¹⁾ (mean ± SD)	recovery/%	RSD/%	found ¹⁾ (mean ± SD)	recovery/%	RSD/%
Serum	0.250	0.231 ± 0.019	92.27	8.27	0.229 ± 0.018	91.60	7.86
	2.500	2.462 ± 0.191	98.48	7.75	2.367 ± 0.112	94.68	4.73
	6.250	6.168 ± 0.132	98.68	2.14	6.057 ± 0.200	96.91	3.30
Liver	0.250	0.230 ± 0.015	91.87	6.57	0.227 ± 0.182	90.80	8.01
	2.500	2.374 ± 0.109	94.96	4.59	2.375 ± 0.142	95.00	5.98
	6.250	6.068 ± 0.158	97.09	2.60	5.910 ± 0.386	94.56	6.53

1) mg/L for serum ; μg/g for liver tissue.

2.4 样品测定

按实验条件,测定生物样品中维拉帕米的浓度,结果见表 2。

表 2 犬血清和犬肝组织中维拉帕米的测定结果

Table 2 Determination results of verapamil in dog serum and liver tissue

Sample	t/min	Result ¹⁾
Serum	5	9.70
	10	5.80
	15	3.20
	20	1.50
	25	0.60
	30	0.20
Liver	5	105.20
	15	67.60

1) mg/L for serum ; μg/g for liver tissue.

由表 2 可看出,随着灌注药物后时间的延长,犬血清及肝组织中维拉帕米浓度逐渐下降。实验结果

表明,本法适用于生物样品中的维拉帕米药物浓度的测定及其药代动力学的研究。

参考文献:

- [1] Chen Xinqian , Jin Youyu. New Edited Pharmacy. 14th ed. Beijing : People 's Medical Publishing House (陈新谦, 金有豫. 新编药理学. 第 14 版. 北京 : 人民卫生出版社), 1997. 243
- [2] Liu Wenzhe. Foreign Medical Science Cancer Section (刘文哲. 国外医学肿瘤学分册), 1997, 24(5) : 262
- [3] Fan Pingsheng , Hu Bing , Sun Xin. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics (范平生, 胡冰, 孙昕. 中国临床药理学与治疗学), 2001, 6(3) : 222
- [4] Wang Wei. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (王卫. 药物分析杂志), 2000, 20(2) : 113
- [5] Yang Jian , Jia Jingying , Zhang Hui , Yu Chen. Chinese Journal of Clinical Pharmacy (杨坚, 贾晶莹, 张慧, 余琛. 中国临床药理学杂志), 2001, 10(2) : 99