

HPLC 法同时测定人血浆中的伪麻黄碱和氯苯那敏

葛庆华*, 周 臻, 支晓瑾, 王 浩

(药物制剂国家工程研究中心, 上海 200437)

摘要: 目的 建立同时测定血浆中盐酸伪麻黄碱、马来酸氯苯那敏的方法。方法 采用反相 HPLC 法, 以右美沙芬为内标, 血浆中的被测药物经甲基叔丁基醚提取、1.5% 盐酸溶液反萃后同时测定。色谱柱: C_{18} (250 mm \times 4.6 mm ID, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水-三乙胺(46:54:0.2, 内含 10 mmol \cdot L⁻¹ 十二烷基硫酸钠, 60 mmol \cdot L⁻¹ 磷酸二氢钠, 以磷酸调 pH 为 2.6); 检测波长: 200 nm。结果 伪麻黄碱、氯苯那敏的线性范围分别为 1.5 ~ 0.01 mg \cdot L⁻¹ 和 75.0 ~ 0.5 μ g \cdot L⁻¹, 检测限分别为 10.0 和 0.5 μ g \cdot L⁻¹; 日内、日间 RSD 小于 12.4%, 方法平均回收率为 97.3% ~ 109.4%。结论 该法简便、快速, 重现性好, 灵敏度高, 可用于盐酸伪麻黄碱、马来酸氯苯那敏复方制剂的临床药代动力学研究。

关键词: 盐酸伪麻黄碱; 马来酸氯苯那敏; 高效液相色谱法; 人血浆

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)04 - 0281 - 04

Simultaneous determination of pseudoephedrine and chlorpheniramine in human plasma by HPLC-UV detection method

GE Qing-hua*, ZHOU Zhen, ZHI Xiao-jin, WANG Hao

(National Pharmaceutical Engineering Research Center, Shanghai 200437, China)

Abstract: **Aim** To establish a sensitive and specific method to simultaneous determination of pseudoephedrine and chlorpheniramine in human plasma. **Methods** Pseudoephedrine and chlorpheniramine were extracted from alkaline plasma with *t*-butyl methyl ether as the base form, and were back-extracted into 1.5% hydrochloride solution. The two drugs were simultaneous determined by RP-HPLC with ultraviolet detection at 200 nm, using dextromethorphan as internal standard. A C_{18} column (250 mm \times 46 mm ID) and a mobile phase containing acetonitrile-water-triethylamine (46:54:0.2, containing 10 mmol \cdot L⁻¹ sodium dodecyl sulfate (SDS) and 60 mmol \cdot L⁻¹ NaH_2PO_4 , adjusted pH to 2.6 with H_3PO_4) were used. **Results** The limit of quantification was 10.0 and 0.5 μ g \cdot L⁻¹, the linear range was 1.5 - 0.01 mg \cdot L⁻¹ and 75 - 0.5 μ g \cdot L⁻¹, for pseudoephedrine and chlorpheniramine, respectively. The within-day and between-day RSD were less than 12.4%, and the average recovery was between 97.3% - 109.4%. **Conclusion** The method was sensitive, specific, simple, and suitable for drug level monitoring in clinical pharmacokinetic study.

Key words: pseudoephedrine; chlorpheniramine; HPLC; human plasma

盐酸伪麻黄碱(pseudoephedrine hydrochloride)与马来酸氯苯那敏(chlorpheniramine maleate)配伍组成的复方制剂,临床上用于缓解普通感冒及流行性感冒的早期临床症状,如喷嚏、流涕、鼻塞等。盐酸伪

麻黄碱、马来酸氯苯那敏单方使用的药动学研究均有文献^[1-6]报道,但作为复方制剂同时使用的药动学研究国内外未见报道。由于该处方中马来酸氯苯那敏含量低,仅 4 mg,又与剂量比其高数十倍的伪麻黄碱一起使用,使血药浓度测定难度加大。本文在文献基础上建立 HPLC 法同时测定血浆中盐酸伪麻黄碱与马来酸氯苯那敏,并用于复方盐酸伪麻黄碱缓释胶囊的药动学研究。

收稿日期: 2003-05-19.

* 通讯作者 Tel: 86 - 21 - 65612448, Fax: 86 - 21 - 65612448,

E-mail: geqinghua@sina.com

材料与amp;方法

高效液相色谱仪: Shimadzu LC-10ADVP 泵, SPD-10A 检测器, SIL-10AVP 自动进样器, CTO-10AVP 柱温箱及 CLASS-VP6.1 色谱工作站; XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); 80-2 型台式低速离心机及 TGL-16B 型台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

乙腈为 HPLC 级(上海方可唯奇生物化学技术有限公司), 甲基叔丁基醚为美国 Sigma-Aldrich 公司, 十二烷基硫酸钠为日本 Nacalai Tesque 公司, 其余试剂均为分析纯; 盐酸伪麻黄碱、马来酸氯苯那敏、氢溴酸右美沙芬对照品均为药物制剂国家工程研究中心提供, 纯度分别为 99.5%, 98.5% 和 100.2%; 新康泰克(复方盐酸伪麻黄碱缓释胶囊)为中美天津史克制药有限公司提供(批号: 02020041, 每粒含盐酸伪麻黄碱 90 mg, 马来酸氯苯那敏 4 mg)。

伪麻黄碱储备液为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 氯苯那敏储备液为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 伪麻黄碱对照品溶液为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 氯苯那敏对照品溶液为 $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 右美沙芬(内标)溶液为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

色谱条件

流动相: 乙腈-水-三乙胺(46: 54: 0.2, 内含 10

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 十二烷基硫酸钠, $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠, 以磷酸调 pH 为 2.6); 柱温: $58 \text{ }^\circ\text{C}$; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 200 nm ; 进样量: $30 \text{ } \mu\text{L}$; 色谱柱: Inertsil C_{18} ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm ID}, 5 \text{ } \mu\text{m}$); 预柱: LC-18 可换芯 2 cm (SPELCO 公司); 自动进样器样品室温度: $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

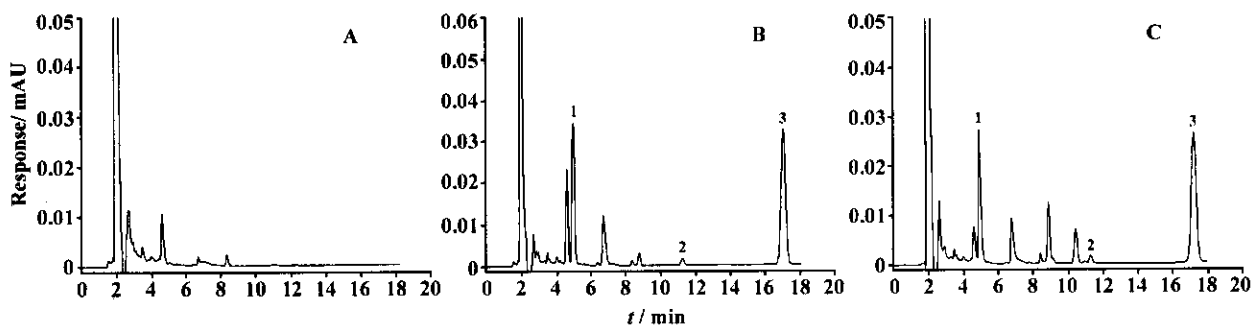
血样前处理

精密吸取血浆 1.5 mL , 加入内标溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 饱和碳酸钠溶液 $250 \text{ } \mu\text{L}$, 旋涡混匀, 加入甲基叔丁基醚 3 mL 萃取 2 次, 每次 5 min ; 离心 10 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 后取有机相, 合并置另一含 1.5% 盐酸溶液 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 的离心管中, 反提 1 min , 离心 5 min ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取水相进样测定。

结果

1 色谱行为和专属性试验

取受试者空白血浆按血样前处理项下操作, 色谱图见图 1A, 空白血浆外加伪麻黄碱、氯苯那敏的色谱图见图 1B, 受试者口服受试制剂后的色谱图见图 1C, 由图可见在选择的条件下, 分离效果良好, 伪麻黄碱、氯苯那敏和内标右美沙芬的保留时间约为 5, 11 和 17 min, 内源性物质不干扰。



A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with $200.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ pseudoephedrine, $10.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ chlorpheniramine and internal standard (dextromethorphan); C: Plasma sample from a volunteer 12 h after oral administration of 180/8 mg dose of sustained release pseudoephedrine and chlorpheniramine. 1: Pseudoephedrine ($t_{\text{R}} 4.9 \text{ min}$); 2: Chlorpheniramine ($t_{\text{R}} 11.4 \text{ min}$); 3: Internal standard ($t_{\text{R}} 17.2 \text{ min}$)

Figure 1 Chromatograms of pseudoephedrine and chlorpheniramine in human plasma

2 线性范围和灵敏度

取空白血浆加入伪麻黄碱、氯苯那敏储备液适量, 配制成含伪麻黄碱 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和氯苯那敏 $75.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血浆溶液; 再取该血浆溶液以空白血浆逐级稀释成含伪麻黄碱 $1000, 500.0, 200.0, 100.0$ 和 $10.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯苯那敏 $50.0, 25.0, 10.0, 5.0$ 和 $0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血样, 按前述方法处理后进样, 以样品浓度

(C) 对样品峰高与内标峰高之比 R 进行加权最小二乘法计算标准曲线, 权重因子为 $1/C^2$, 得伪麻黄碱、氯苯那敏的回归方程分别为: $R = -0.009378 + 0.002282C$ ($r = 0.9998, n = 3$), $R = 0.0009455 + 0.002104C$ ($r = 0.9998, n = 3$), 结果表明伪麻黄碱在 $1.5 \sim 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯苯那敏在 $75.0 \sim 0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。血浆中伪麻黄碱、氯苯那敏的定量

限(LOQ)分别为 10.0 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 精密度与准确度试验

取含伪麻黄碱 1.5, 0.2, 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和氯苯那敏 75.0, 10.0, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆溶液, 在试验期间的同一天及不同天, 按前述方法处理后进样测定, 计算方法的日内、日间精密度, 结果见表 1, 表明本法的精密度符合要求。

Table 1 Precision for the analysis of pseudoephedrine and chlorpheniramine in human plasma ($n = 5$)

Drug	Added/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Within-day		Between-day	
		Found/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ %	Found/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ %
Pseudoephedrine	1 500	1 641	3.7	1 534	2.2
	200.0	204.3	4.6	194.0	2.4
	10.00	10.72	8.2	10.20	3.2
Chlorpheniramine	75.00	80.00	9.5	76.30	5.6
	10.00	10.47	4.2	10.25	7.0
	0.500	0.686	12.4	0.521	5.2

4 提取回收率试验

取含伪麻黄碱 1.5, 0.2, 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和氯苯那敏 75.0, 10.0, 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆溶液, 按前述方法提取后进样测定, 与未经提取的对照品溶液比较, 计算伪麻黄碱、氯苯那敏的提取回收率分别为 63.9%, 68.6%, 71.5% 和 60.3%, 76.1%, 114.8%, 符合要求。

5 样品的稳定性

将含伪麻黄碱 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和氯苯那敏 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品按上法处理后 5 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 分别于 0, 8 和 24 h 进样测定, 结果表明样品至少可稳定 24 h。

6 人体药代动力学研究

18 名男性健康受试者, 年龄 (21 ± 1) 岁, 身高 (175 ± 6) cm, 体重 (68 ± 7) kg。试验前经伦理委员会同意, 并签署知情同意书。服药前隔夜禁食 10 h 以上, 于次日早晨空腹服用 2 粒新康泰克, 用 250 mL 温开水送服, 服药后 2 h 后方可饮水, 4 h 后进统一标准餐。分别于给药前 30 min 内和给药后 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24 和 48 h 抽血 7 mL。血样置含肝素离心管中, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 血浆转移至塑料管中置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存至测定。采用本法测定的 18 名受试者的药-时曲线见图 2。

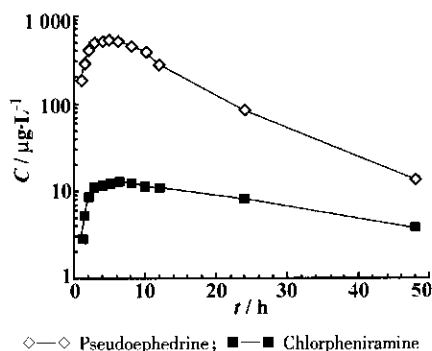


Figure 2 Mean plasma concentration-time curve of pseudoephedrine and chlorpheniramine after oral administration of 180/8 mg dose of sustained release pseudoephedrine and chlorpheniramine for 18 healthy volunteers

讨论

血浆中伪麻黄碱与氯苯那敏同时测定的难点之一是氯苯那敏血药浓度极低。据文献^[1]报道, 单剂量 *po* 氯苯那敏 8 mg, C_{\max} 约 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。文献报道 HPLC 法灵敏度不够, 文献^[3]采用 LC-MS 法, 需要血浆 1 mL 浓缩 10 倍后进样 75 μL , 方可达到 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的检测灵敏度。国内则未见报道。本研究一方面选择氯苯那敏的最强吸收 200 nm 处进行测定, 另一方面用萃取法提高血浆浓度 15 倍以提高灵敏度。但两方法都会同时增加血浆杂质干扰的问题, 尤其是在紫外截止波长附近进行血药浓度测定, 背景吸收很强。经反复试验, 发现在血浆处理过程中增加饱和碳酸钠的用量和采用反提技术可大大减少血浆的背景吸收及干扰峰的数目。研究结果显示本法的血浆色谱图较“干净”。另外, 反提还可以避免伪麻黄碱在挥干过程中的部分升华。在 200 nm 处进行测定, 对试剂的纯度、仪器的性能要求较高。经试验比较, 普通的 Shimadzu SPD-10A 检测器较 Shimadzu SPD-M10AVP 二极管阵列检测器灵敏度高 5 倍左右; 离子对试剂必需使用 HPLC 级。本法氯苯那敏的定量限为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 已满足本研究给药剂量下药代动力学研究的要求。若采用本文的血样提取方法, 结合先进的 LC-MS 技术, 灵敏度可提高至 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上, 可满足氯苯那敏小剂量 (1~2 mg) 给药的药代动力学研究要求。

同时测定血浆中两组分的另一难点是两药物的极性差别大。在常规的色谱条件下, 使用 C_{18} 柱, 氯苯那敏在 10 min 左右出峰, 伪麻黄碱几乎在死时间处就出峰, 不能与血浆杂峰有效分离; 若伪麻黄碱保留适当, 氯苯那敏则会因保留太强、峰形展宽而损失

灵敏度;梯度洗脱在短波长处易引起基线漂移而不适用。为了增加色谱体系对伪麻黄碱的保留,试验了不同浓度的数种离子对试剂。己烷、庚烷磺酸盐碳链短、疏水性弱,即使浓度增加至 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,效果仍不明显;当十二烷基硫酸钠的浓度增加到 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,血浆杂峰、伪麻黄碱、氯苯那敏峰能在适宜的时间内得以有效分离。另一方面,增加离子对试剂后,流动相的乙腈比例提高,有利于洗脱血浆样品中的弱极性杂峰。

在通常情况下样品以流动相为进样介质,溶剂峰小、色谱峰对称、柱效高。但本研究因为种种原因样品需以反提的水溶液进样。这使伪麻黄碱峰出现严重的拖尾、分叉现象。在流动相中增加磷酸盐,可以改善进样溶剂对伪麻黄碱峰形的影响。推测可能是伪麻黄碱为含氮生物碱,离子强度的增加可降低质子化碱在残余硅羟基柱填料上的吸附,减少色谱峰的拖尾。

本研究选择与被测 2 组分提取特性相似的右美沙芬为内标,大大抵消了实验过程中的误差。试验结果显示,除氯苯那敏低浓度的日内差在 12% 左右,其他均小于 10%,有很高的精密度。本试验的色谱体系稳定,以每天测试 70 ~ 80 个样品的速度连续进样数天,无柱压升高、柱效下降现象,约 1 300 个样品测试后柱效未见下降。不足的是内标的保留时间稍长,如能选择到在 12 min 左右出峰的合适内标物质,则可进一步缩短分析时间,提高检测效率。

本研究伪麻黄碱的剂量是氯苯那敏的 20 多倍。为排除伪麻黄碱代谢产物对氯苯那敏血药浓度测定的影响,在方法研究过程中,还测定了家兔口服盐酸伪麻黄碱原料后的血浆样品,与空白血浆比较,在 9 和 10 min 附近有未知峰,与氯苯那敏峰分离良好。

本文首次采用 HPLC-UV 法同时测定血浆中的伪麻黄碱与氯苯那敏,方法专属性好、灵敏度高、样品处理简单、且无需特殊仪器,试验成本低。可用于复方盐酸伪麻黄碱药物动力学的研究。对于氯苯那敏单方制剂的药动力学的研究,也可借鉴本法。

致谢:盛民立教授及上海中山医院李雪宁、陆英老师对本研究的临床工作予以指导与帮助。

References:

- [1] Kotzan JA, Vallner JJ, Stewart JT, *et al.* Bioavailability of regular and controlled-release chlorpheniramine products [J]. *J Pharm Sci*, 1982, **71**(8):919 - 923.
- [2] Brendel E, Meineke I, Henne EM, *et al.* Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of pseudoephedrine in plasma and urine [J]. *J Chromatogr*, 1988, **426**:406 - 411.
- [3] Friedl KM, Young AE, Yasuda SU, *et al.* The enantioselective determination of chlorpheniramine and its major metabolites in human plasma using chiral chromatography on a β -cyclodextrin chiral stationary phase and mass spectrometric detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, **27**:479 - 488.
- [4] Macek J, Ptaek P, Klima J. Rapid determination of pseudoephedrine in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, **766**(2):289 - 294.
- [5] Guo P, Li Z, Li T, *et al.* Direct injection of plasma to determine pseudoephedrine by high performance liquid chromatography with column switching [J]. *Biomed Chromatogr*, 1999, **13**(1):61 - 64.
- [6] Chen ZL, Zhang L, Wang M, *et al.* Simultaneous determination of chlorpheniramine, paracetamol and pseudoephedrine hydrochloride in composite tablets by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr (色谱)*, 2001, **19**(3):236 - 238.