

表 2 醋酸地塞米松回收率试验结果 ($n=5$)

投入量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
151.0	153.2	101.46		
166.1	163.3	98.31		
181.2	178.6	98.57	99.18	1.32
196.3	193.3	98.47		
211.4	209.5	99.11		

2.7 样品测定 樟脑:精密吸取样品液 7mL,置 25 mL 容量瓶中,加乙醇稀释至刻度,摇匀。以乙醇为空白,于(305 \pm 1)nm 的波长处,用一阶导数光谱法测定 D 值,代入回归方程,即可计算出浓度。醋酸地塞米松:精密吸取样品液 0.6mL,置干燥具塞试管中,精密加乙醇 9.4mL 与氯化三苯四氮唑试液 1mL,摇匀,再精密加氢氧化四甲基铵试液 1mL,摇匀,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的暗处放置 40~50min,以乙醇为空白,于(485 \pm 1)nm 波长处测定吸收度 A 值,代入回归方程,即可计算出浓度。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

批号	樟脑 ¹ (mg/mL)	占标示量 (%)	醋酸地塞米松 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	占标示量 (%)
040531	2.69	96.07	176.89	98.27
040810	2.84	101.43	193.77	107.65
041117	2.76	98.57	186.37	103.54

3 结语

3.1 据文献^[3]记载,凡 C17 上具有 α, β -不饱和内酯结构-丁烯酸内酯的化合物,均能与碱和芳香硝基化合物生成在 480~495nm 之间具有紫红色特征最大吸收的络负离子。在本实验中,醋酸地塞米松反应液于 485nm 处有最大吸收。从图 2 中我们可以看到,樟脑仅在 305nm 处有最大峰零振幅,其他成分对其没有干扰,故选择 305nm 为樟脑的测定波长。

3.2 目前,国内还未见对复方醋酸地塞米松搽剂含量测定的研究报道。

通过以上实验表明,我们选择的含量测定方法准确易行,灵敏度高,值得推广。本实验中樟脑和醋酸地塞米松的含量是否可用 HPLC、GC 等方法测定,有待以后进一步探讨。

参考文献

- [1] 中国药学会上海分会. 上海市医院制剂手册 [M]. 第 3 版. 上海:上海科学技术出版社,1995:119.
- [2] 中国药典 2000 年版[S]. 二部. 2000:1020.
- [3] 马剑文,韩永平,沈克温主编. 现代药品检验学[M]. 北京:人民军医出版社,1997:560.

收稿日期:2005-02-18

反相高效液相色谱法测定人肝微粒体中帕洛诺司琼的含量

陈长水¹, 杨先启² (1. 宁波市中心血站; 2. 宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315040)

摘要 目的:为了研究帕洛诺司琼的体外代谢,建立人肝微粒体中帕洛诺司琼的反相高效液相色谱测定法。方法:帕洛诺司琼与人肝微粒体共孵育之后,以 Nova-park C₁₈ (5 μm , 200 \times 4.6mm) 柱为分析柱,甲醇-0.01mol/L 磷酸二氢钾缓冲盐(80:20, v/v) 为流动相,流速 1.0mL/min,紫外检测波长为 240nm。结果:帕洛诺司琼在 5~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 范围内线性关系良好($r=0.9998$)。检测限为 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ($S/N\geq 3$),定量限为 1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ($RSD=4.81\%$, $n=3$)。方法回收率为 96.0%~103.0%,日内、日间 RSD 分别 <7.0% 和 <10% ($n=5$)。结论:此法简便,准确,可用于研究帕洛诺司琼的体外代谢。

关键词 帕洛诺司琼;反相高效液相色谱法;药物代谢;人肝微粒体

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2005)03-0169-03

Determination of palonosetron metabolism in human hepatic microsome by RP-HPLC

CHEN Chang-shui¹, YANG Xian-qi² (1. Ningbo blood center; 2. Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315040, China)

ABSTRACT Objective: To establish a RP-HPLC method for determinate palonosetron in human hepatic microsomes. **Methods:** Palonosetron in human hepatic microsomal incubates was assayed on a Nova-park C₁₈ (5 μm , 200 \times 4.6mm) column with a mobile phase of

作者简介:陈长水(1969-),男,主管药师. Tel: (0574)87848243

methanol-0.01 mol/L KH_2PO_4 (80 : 20, v/v) at a flow-rate of 1.0 mL/min. A UV-VIS detector was operated at 240nm. **Results:** The assay was linear from 5 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ for palonosetron ($r=0.9998$). The limit of detection was 0.2 $\mu\text{mol/L}$ (signal to noise ratio ≥ 3) and the limit of quantification was 1.0 $\mu\text{mol/L}$ ($RSD=4.88\%$, $n=3$). The method afforded recoveries of 96.0% ~ 103.0% ($n=5$), and inter-day and intra-day variation coefficient were $<7\%$ and 10% ($n=5$). **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be used to study the metabolism of palonosetron in human hepatic microsomes.

KEY WORDS palonosetron; RP-HPLC; metabolism; microsomes

帕洛诺司琼 (palonosetron) 对 5-HT₃ 受体有选择性拮抗作用, 可阻断呕吐反射中枢外周神经元的突触前 5-HT₃ 受体的兴奋, 并且直接影响中枢神经系统内 5-HT₃ 受体转递的迷走神经传入后区的作用, 阻断肠道中迷走神经末梢, 阻止信号传递到 5-HT₃ 受体触发区, 减少呕吐和恶心的发生率, 临床上用于控制化疗法诱发的恶心和呕吐^[1]。许多研究资料表明一些药物既是酶的底物又是酶的诱导剂或抑制剂, 联合用药过程中, 这些药物可能因药酶的诱导或抑制作用发生药物相互作用, 结果导致药物失活或产生毒副作用^[2,3]。药物的体外代谢和相互作用研究结果对临床给药有一定的指导意义, 但是目前还没有文献报道帕洛诺司琼的分析方法。为此, 本文建立了人肝微粒体中帕洛诺司琼的 RP-HPLC 测定法, 并对帕洛诺司琼在体外的代谢进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试药 岛津 LC-10A 系列高效液相色谱仪, 包括 LC-10AT 双泵, SPD-10AV 荧光检测器, CTO-10A 柱温箱。帕洛诺司琼 (深圳海王药业有限公司), 枸橼酸、枸橼酸脱氢酶、氧化还原型辅酶 II (NADP/NADPH, Sigma 公司), 其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

NADPH 再生系统的配制: 枸橼酸 28.5mg, 枸橼

酸脱氢酶 5.5mg, 0.15 mol/L MgCl_2 1.0mL, 加 0.1 mol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液到 10.0mL。

1.2 色谱条件 色谱柱: Nova-park C_{18} (20cm \times 4.6mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.01mol/L 磷酸二氢钾缓冲盐 (80 : 20, v/v); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 240nm; 进样量: 20 μL 。

1.3 测定方法 取人肝微粒体适量, 加入新鲜配制并预先通氧气 1min 的 NADPH 再生系统, 稀释至蛋白质浓度约为 1.0mg/mL 的混悬液, 再加入 10mmol/L 的帕洛诺司琼甲醇溶液 5 μL (终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$), 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 预孵育 5min, 加入 NADP/NADPH 的 1% NaHCO_3 溶液 5 μL (终浓度 NADP 为 130mg/mL, NADPH 为 40mg/mL) 起反应。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一定时间后分别加入 0.8mL 冰冷乙腈终止反应, 并沉淀蛋白质, 10 000g 离心 10min, 取上清液 20 μL 进样。

2 实验结果

2.1 色谱条件的选择 考虑到帕洛诺司琼为弱碱性药物, 我们分别以 pH 值 3.0 和 7.5 的磷酸二钾溶液两种缓冲液进行实验。比较两种条件下各图谱所得色谱参数, 综合考虑结果, 选择甲醇-0.01mol/L 磷酸二氢钾缓冲盐 (80 : 20, v/v) 为流动相。该条件下帕洛诺司琼保留 16min 左右, 柱效和对称因子都较好, 见图 1B。

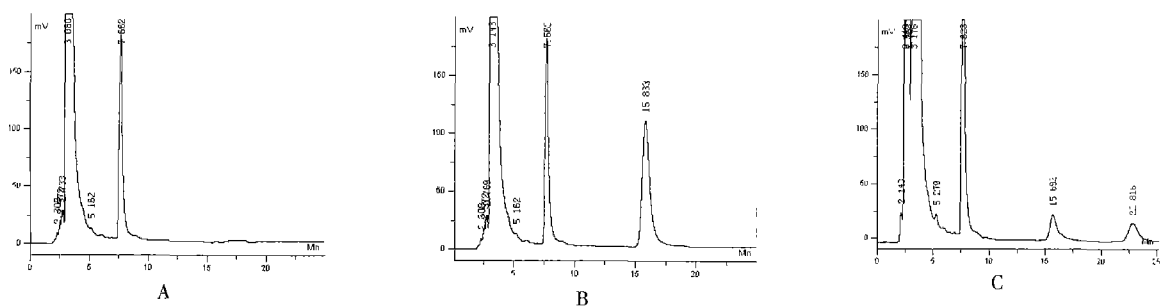


图 1 微粒体孵育液中帕洛诺司琼的色谱图

A-空白孵育液; B-帕洛诺司琼 (未启动反应); C-孵育液。22.8min 处为代谢产物。

通过紫外波长扫描, 发现帕洛诺司琼在 240nm 有最大吸收, 故测定波长选择为 240nm。

2.2 标准曲线的制备 取不同浓度帕洛诺司琼甲醇溶液, 加到人肝微粒体孵育液中, 使孵育液中帕洛

诺司琼的终浓度分别为 5、10、20、40、80、100 μmol/L,按“测定方法”项下方法操作。测定帕洛诺司琼峰面积(A)和其对应浓度(C)进行线性回归,得标准曲线 $A = 25\ 758C - 7\ 486.8$, $r = 0.999\ 8$ 。结果表明,5 ~ 100 μmol/L 范围内线性关系良好。

采用逐步稀释法测得帕洛诺司琼最低检测限为 0.2 μmol/L ($S/N \geq 3$),定量限为 1.0 μmol/L ($RSD = 4.81\%$, $n = 3$)。

2.3 方法的专属性 取空白微粒体照帕洛诺司琼的体外孵育试验项下方法操作。在帕洛诺司琼出峰处未见色谱峰(见图 1A),表明微粒体中内源性杂质不干扰测定,本法可专属测定帕洛诺司琼。

2.4 方法回收率 于失活的孵育液中,精密加入不同量的帕洛诺司琼标准品,使孵育浓度为 5、40、100 μmol/L,按“标准曲线项下”方法进行处理,计算方法回收率,结果见表 1。

表 1 帕洛诺司琼回收率结果 ($n = 5$)

加入量 (μmol/L)	测得量 ($\bar{x} \pm s$)	回收率 (%)
5	4.8 ± 0.1	96.0
40	41.2 ± 0.2	103.0
100	99.6 ± 1.3	99.6

2.5 方法的精密度 选取低、中、高 3 种浓度,按标准曲线方法处理,在 1d 内分别测定 5 份样品,计算日内精密度;每天各测定一份样品,连测 5d,计算日间精密度。结果见表 2。

表 2 精密度结果

加入量 (μmol/L)	RSD (%)	
	日内	日间
5	3.6	4.98
40	6.8	8.03
100	1.3	4.38

帕洛诺司琼适量,按测定方法项下的方法对其进行时间依赖性代谢研究,孵育时间为 5、10、20min。孵育 20min 后,帕洛诺司琼浓度由最初的 40.0 μmol/L 下降到 19.8 μmol/L,见图 2,说明帕洛诺司琼经人肝微粒体代谢强烈。

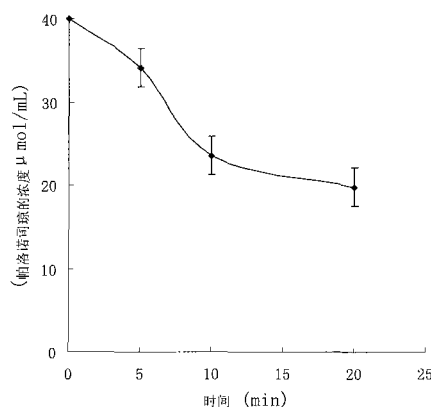


图 2 帕洛诺司琼在人肝微粒体中的代谢

3 讨论

以液相色谱法测定帕洛诺司琼的方法没有文献报道,本实验建立了人肝微粒体中帕洛诺司琼反相高效液相色谱测定法,此方法简单、快速、灵敏,能用于帕洛诺司琼体外代谢分析研究。

参考文献:

- [1] Constenla M. 5-HT₃ Receptor antagonists for prevention of late acute-onset emesis[J]. *Ann Pharmacother*, 2004, 38(10):1683.
- [2] Kim RB, Wandel C, Leake B, et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein[J]. *Pharm Res*, 1999, 16: 408.
- [3] Thummel KE, Wilkinson GR. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A[J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1998, 38:389.

收稿日期:2005-01-11

2.6 帕洛诺司琼在人肝微粒体中的代谢反应 取

《中华现代外科学杂志》免费查阅、全文上网

《中华现代外科学杂志》从 2004 年起被中华首席医学网(www.shouxi.net)全文收录,国内外读者可以在首席医学网上免费查阅、下载《中华现代外科学杂志》全文。中华首席医学网同时收录中外各类医学期刊近百种,可免费查阅基础医学、临床医学、护理、医院管理、公共卫生等医学论文资料。欢迎登陆首席医学网查阅《中华现代外科学杂志》,欢迎投稿!

联系电话:010-62245829

网址: <http://www.shouxi.net/journal>

投稿邮箱:北京 100035-55 信箱

电子邮件: waikexue@sohu.com