

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00549

反相高效液相色谱法测定新西兰兔血浆中壬苯醇醚-9的浓度及其药代动力学研究

崔俐俊, 闻俊, 周婷婷, 汪硕闻, 范国荣*

第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海市药物代谢产物研究重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的:**建立兔血浆中壬苯醇醚-9(NP-9)的反相高效液相色谱(RP-HPLC)方法,研究 NP-9 栓剂在健康雌性新西兰兔体内的药代动力学。**方法:**6只健康雌性新西兰兔(体质量 2.0~2.2 kg)单剂量(64 mg/只)阴道给药 NP-9 栓剂;取血浆经预处理后采用 Diamonsil™ ODS 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇-水(95:5)作为流动相,流速 1.0 ml/min,荧光检测的激发波长 226 nm,发射波长 300 nm,柱温 30℃,测定 NP-9 经时血药浓度,计算药代动力学参数。**结果:**NP-9 在 0.05~5.00 μg/ml 范围内线性关系良好,日内、日间精密度均小于 10%,低、中、高 3 种浓度(0.10、0.50、2.00 μg/ml)的方法回收率分别为(101.67±8.12)%、(100.84±5.42)%、(100.29±3.81)%。主要药代动力学参数为: $t_{1/2}$ (3.75±0.87) h, t_{max} (3.2±0.4) h, C_{max} (2.75±0.32) μg/ml, AUC_{0-12} (12.72±2.14) μg·h·ml⁻¹, $AUC_{0-∞}$ (15.05±2.84) μg·h·ml⁻¹, 平均滞留时间(6.85±1.13) h。**结论:**本方法简便、灵敏、专属性好,可用于 NP-9 栓剂在健康雌性新西兰兔体内的药代动力学研究。

[关键词] 壬苯醇醚-9;血药浓度;药代动力学;反相高效液相色谱法

[中图分类号] R 969.11

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2009)05-0549-04

RP-HPLC in determination of plasma nonoxynol-9 level in New Zealand rabbit and its application in pharmacokinetic study

CUI Li-jun, WEN Jun, ZHOU Ting-ting, WANG Shuo-wen, FAN Guo-rong*

Department of Pharmaceutical Analysis, Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a RP-HPLC method for determining the plasma concentration of nonoxynol-9 and to apply the method in studying the pharmacokinetics of nonoxynol-9 in healthy female rabbits. **Methods:** A single dose of nonoxynol-9 (64 mg to each animal) was given to 6 healthy female rabbits (weighing 2.0-2.2 kg) *via* vagina. The plasma samples were collected and the concentrations of nonoxynol-9 were determined by RP-HPLC method using Diamonsil™ ODS column (200 mm×4.6 mm, 5 μm) and mobile phase of methanol-water (95:5) at a flow rate of 1.0 ml/min. The excitation and emission wavelengths were 226 nm and 300 nm, respectively. The column temperature was 30℃. The pharmacokinetic parameters were calculated. **Results:** The calibration curve of nonoxynol-9 showed good linearity over the range of 0.05-5.00 μg/ml; both the intra- and inter-day precisions were lower than 10%. The recovery rates at three concentrations (0.10, 0.50, and 2.00 μg/ml) were (101.67±8.12)%, (100.84±5.42)%, and (100.29±3.81)%, respectively. The main pharmacokinetic parameters of nonoxynol-9 were as following: $t_{1/2}$ (3.75±0.87) h, t_{max} (3.2±0.4) h, C_{max} (2.75±0.32) μg/ml, AUC_{0-12} (12.72±2.14) μg·h·ml⁻¹, $AUC_{0-∞}$ (15.05±2.84) μg·h·ml⁻¹, and MRT (6.85±1.13) h. **Conclusion:** The established method is convenient, sensitive and specific, and can be used for determination of plasma nonoxynol-9 concentration and for its pharmacokinetic studies in rabbits.

[KEY WORDS] nonoxynol-9; plasma concentration; pharmacokinetics; RP-HPLC

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5): 549-552]

壬苯醇醚-9(NP-9)是属于聚氧乙烯烷基苯酚醚类的非离子表面活性剂,其结构通式为 $C_9H_{19}-C_6H_6-(CH_2CH_2O)_nOH$ 。随 n 不同,其水溶性不同,当 $n=8\sim 9$ 时,其水溶液的表面张力较低,润湿性、乳化性

[收稿日期] 2008-10-17

[接受日期] 2009-02-24

[作者简介] 崔俐俊,硕士生. E-mail: cuilijun620@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871260, E-mail: guorfan@yahoo.com.cn

能均好。药理研究表明,NP-9的长链烷化基团能穿透精子的蛋白膜层,进而与精子的细胞膜相互作用,增加细胞膜的通透性,降低精子脂膜的表面张力,从而改变精子渗透压,使细胞内成分外渗,导致精子制动或被杀死^[1-2]。自20世纪80年代起,NP-9就已被作为外用杀精子剂使用,1987年《美国药典》将其收载为法定药物。目前,NP-9杀精子剂应用的主要剂型有片剂、膜剂、栓剂等。有关NP-9的制备、临床应用、药理和药效研究报道较多^[3-8]。早期研究认为NP-9能灭活引起淋病、衣原体感染和其他性传播感染及HIV感染的微生物,从而降低某些性病及HIV的感染率。但进一步研究表明,含NP-9的杀精子剂不但不能预防HIV感染,相反,它可能增高经常应用这些药物的妇女的HIV感染危险性^[9-10]。因此,有必要对其进行体内外质量控制,以达到合理用药的目的。对于NP-9在制剂中的含量控制,多采用HPLC法^[11-12],而有关其体内测定方法及局部用药药代动力学研究国内未见报道。国外虽做过相关研究^[13-14],但定量分析方法的灵敏度低,很难满足体内低浓度药物检测的需要。本研究建立了灵敏度高、专属性强的血浆样品中NP-9反相高效液相色谱(RP-HPLC)定量分析方法,以健康雌性新西兰兔为对象,研究动物体内NP-9栓剂的药代动力学特征,为临床试验及合理用药提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 Shimadzu-10A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),包括 LC-10AD 高压泵, DGU-12A 在线脱气机, SIL-10AD 自动进样器, CTO-10AS 柱温箱, RF-10A 荧光检测器, SCL-10Avp 控制器, CLASS-VP 工作站。XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), TGL-16G 台式高速离心机和 80-2B 台式离心机(上海安亭科学仪器厂), SK7200H 超声

仪(上海科导超声仪器有限公司), HA-202M 电子天平(日本 A & D 公司), Hi-tech 超纯水系统(Hi-tech 设备有限公司,电阻率 18.2 MΩ·cm)。

1.2 药品与试剂 NP-9 化学对照品、NP-9 栓剂(每枚栓剂含 64 mg NP-9)由上海明月光生物科技发展有限公司提供。甲醇为加拿大 Calecon 公司生产的色谱纯试剂,枸橼酸为国药集团化学试剂上海有限公司生产的分析纯试剂,水为自制去离子水(电阻率 18.2 MΩ·cm)。

2 方法和结果

2.1 色谱分离条件 色谱柱: DiamonsilTM ODS 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm, 迪马公司), 柱温 30℃; 流动相: 甲醇-水(95:5), 流速 1.0 ml/min; 荧光检测: 激发波长 226 nm, 发射波长 300 nm; 进样量 20 μl; 分析时间 7 min。

2.2 血浆样品处理 取兔血浆 200 μl 置于 10 ml 玻璃离心管中, 加入 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 3.0) 1 ml, 涡旋 30 s, 加入 5 ml 乙醚涡旋 3 min, 于 2 000×g 离心 10 min, 取上清液 4 ml 于氮气流下 40℃ 水浴吹干, 流动相 100 μl 复溶残留物后进样 20 μl, 峰面积外标法定量分析。

2.3 方法学评价

2.3.1 方法的专属性 分别取 6 只受试新西兰兔空白血浆 200 μl 按血浆样品处理项下操作, 得色谱图, 如图 1A。将一定浓度的 NP-9 对照溶液加入空白血浆中, 依同法操作, 得色谱图, 如图 1B; 在本实验建立的血浆样品色谱分离条件下, NP-9 的保留时间约为 5.4 min, 相应的理论塔板数大于 4 000。取受试兔阴道给药后的血浆样品, 以同法操作, 得色谱图, 如图 1C。结果表明, 空白血浆中的内源性物质不干扰 NP-9 的测定。

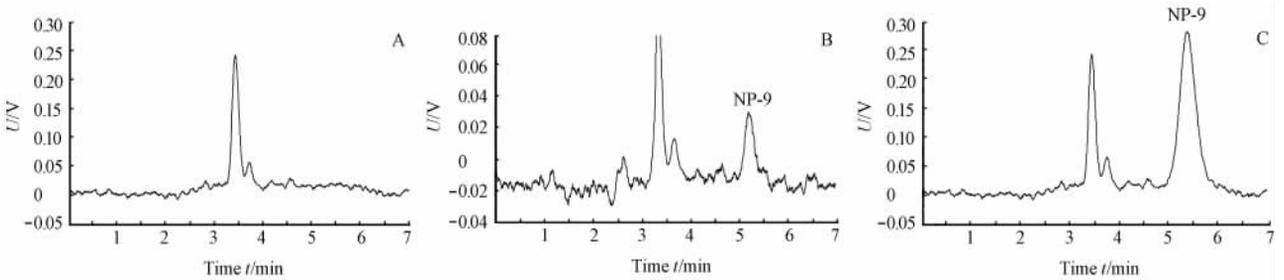


图 1 新西兰兔血浆中 NP-9 的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of nonoxynol-9 in plasma samples of New Zealand rabbits

A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with 0.05 μg/ml NP-9; C: Plasma sample collected from a New Zealand rabbit 1.5 h after administration

2.3.2 标准曲线和最低定量浓度 取空白兔血浆, 加入相应量的 NP-9 标准储备液, 配制成含 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NP-9 的标准血浆样品系列。按血浆样品处理方法操作, 以 NP-9 标准血浆样品的峰面积(Y)对相应的浓度(C , $\mu\text{g}/\text{ml}$)进行加权($1/X$)线性回归。血浆标准曲线方程为 $Y=2\ 146\ 900\ C+361\ 507$, $r^2=0.999\ 8$, 线性范围 0.05~5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

取空白血浆 200 μl , 配制成相当于 NP-9 血浆浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品。对该样品进行 5 样本分析, 并根据当日标准曲线计算浓度, 求得日内精密度的 7.3%, 准确度为 $(95.9 \pm 3.6)\%$ 。该结果表明, RP-HPLC 法测定兔血浆中 NP-9 的最低定量限为 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($S/N > 3$)。

2.3.3 精密度与准确度考察 配制浓度分别为 0.10、0.50、2.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NP-9 标准血浆质控 (QC) 样品, 按照血浆样品处理方法操作, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 每天为 1 个批次。根据当日标准曲线计算 QC 样品的测得浓度, 从而考察方法的精密度与准确度, 结果见表 1。试验数据表明, 生物样本的分析方法符合有关的规范要求。

2.3.4 提取回收率 配制浓度分别为 0.10、0.50、2.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NP-9 标准血浆 QC 样品, 按照血浆

样品处理方法操作, 进样分析, 记录峰面积 A_1 。另取相应浓度的 NP-9 对照品溶液直接进样, 记录峰面积 A_0 , 计算提取回收率。结果分别为 $(82.4 \pm 7.7)\%$ 、 $(84.6 \pm 4.4)\%$ 、 $(83.4 \pm 5.2)\%$ ($n=5$)。

表 1 精密度和准确度考察

Tab 1 Precision and accuracy test

| QC sample | Concentration $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ | | Accuracy (%) | RSD(%) |
|-----------|--|-------------------|-----------------|--------|
| | Added | Found | | |
| Intra-day | | | | |
| LQC | 0.10 | 0.105 \pm 0.006 | 103.1 \pm 6.4 | 6.2 |
| MQC | 0.50 | 0.470 \pm 0.001 | 93.0 \pm 2.0 | 2.2 |
| HQC | 2.00 | 2.010 \pm 0.070 | 98.4 \pm 3.5 | 3.6 |
| Inter-day | | | | |
| LQC | 0.10 | 0.108 \pm 0.009 | 101.7 \pm 8.1 | 8.1 |
| MQC | 0.50 | 0.530 \pm 0.029 | 100.8 \pm 5.4 | 5.4 |
| HQC | 2.00 | 2.130 \pm 0.080 | 100.3 \pm 3.8 | 3.8 |

2.3.5 稳定性试验 配制浓度分别为 0.10、0.50、2.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 NP-9 标准血浆 QC 样品, 每个浓度各 3 份。按照血浆样品处理方法操作, 考察 QC 样品在避光、密封和低温下 (-20°C) 保存 30 d, 室温下放置 2 h, 冻融循环 3 次以及经处理后自动进样器内放置 8 h 后的稳定性; 测定均值与加入值之比及标准偏差。结果见表 2。

表 2 兔血浆中 NP-9 的样品稳定性

Tab 2 Stability of nonoxynol-9 in rabbit plasma

 $(n=3, \bar{x} \pm s, \%)$

| QC sample $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$ | Stability condition | | | |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Long-term stability ^a | Short-term stability ^b | Freeze-thaw stability ^c | Autosampler stability ^d |
| 0.10 | 104.5 \pm 6.4 | 98.7 \pm 5.2 | 99.4 \pm 4.8 | 105.1 \pm 4.6 |
| 0.50 | 97.5 \pm 4.3 | 99.7 \pm 5.4 | 102.3 \pm 3.4 | 97.8 \pm 5.2 |
| 2.00 | 101.7 \pm 5.6 | 97.5 \pm 4.7 | 103.4 \pm 3.9 | 102.6 \pm 4.5 |

^a Stored at -20°C for 1 month; ^b Exposed at ambient temperature (25°C) for 2 h; ^c After three freeze-thaw cycles; ^d Kept at ambient temperature (25°C) in the autosampler for 8 h

2.4 药代动力学研究

2.4.1 实验方案 选择 6 只成年、健康雌性新西兰兔, 体质量 2.0~2.2 kg, 由第二军医大学实验动物中心提供, 实验动物使用许可证号: SYXK(沪)2007-0003。受试兔禁食过夜 (禁食 14 h) 后, 于早上 8:00 直接阴道给药 NP-9 栓剂 (每枚栓剂含 64 mg NP-9)。给药后 4 h 统一进食。分别于给药前及给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 和 12 h 采血 2 ml 置肝素化试管中, 离心, 分取 1 ml 血浆于 -20°C 冰箱保存待测。按照血浆样品处理项下步骤操作, 测定血

浆中 NP-9 的浓度。

2.4.2 药代动力学参数计算 采用非房室模型法 (统计矩法) 分析, $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t_n} + C_n/\lambda$ 。公式中 t_n 和 C_n 分别为最后取血时间和血浆药物浓度, λ 为药时曲线末端相消除速率常数。平均血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药代动力学参数为 C_{\max} (2.75 ± 0.32) $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, t_{\max} (3.20 ± 0.40) h, $t_{1/2}$ (3.75 ± 0.87) h, MRT (6.85 ± 1.13) h, AUC_{0-12} (12.72 ± 2.14) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$, $AUC_{0-\infty}$ (15.05 ± 2.84) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

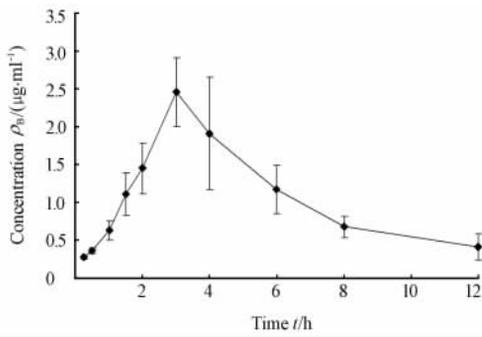


图2 新西兰兔单剂量阴道给药 NP-9 (64 mg) 后体内平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve in New Zealand rabbits after vaginal administration of 64 mg nonoxynol-9

$n=6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

NP-9 可通过皮肤或黏膜吸收进入体循环,对于其在体内的动态变化规律鲜有研究,且有报道指出,长期使用 NP-9 者的阴道菌群中乳杆菌可能被清除^[15],这将提高使用者对泌尿生殖器官感染的敏感性,故有必要对 NP-9 的体内药代动力学进行研究。

Minami 等^[14]应用反相高效液相色谱-荧光法及气相色谱-质谱法研究了 NP-9 在雌兔体内的吸收与代谢过程,但是反相高效液相色谱-荧光法($\lambda_{ex}=275$ nm, $\lambda_{em}=575$ nm)定量检测灵敏度低(最低定量限 0.2 µg/ml),雌兔个体给药 100 mg 后仅提供 6 h 的体内 NP-9 的血药浓度变化。本实验中采用方便、实用的反相高效液相色谱法,通过预实验扫描样品的荧光图谱发现,最大激发波长为 226 nm,在此激发波长下,最大发射波长为 300 nm;在文献报道的 575 nm 处也有荧光发射,但强度明显小于 300 nm 处。故本实验选择荧光检测 $\lambda_{ex}=226$ nm, $\lambda_{em}=300$ nm,以乙醚提取血浆样品,甲醇-水(95:5, V/V)简单流动相洗脱,测定新西兰兔阴道给药 NP-9 栓剂 64 mg 后 12 h 的血浆药物浓度。该方法流动相组成及样品制备过程简单,测定灵敏度高(最低定量限 0.05 µg/ml)、精密度好、重现性好、专属性强,药物与血浆杂质具有较高的分离度,能满足体内低浓度药物检测及药代动力学的需要。

本研究采用非房室模型法分析了 NP-9 栓剂在健康雌性新西兰兔体内的药代动力学过程,阴道给药 64 mg NP-9 栓剂后, NP-9 在受试兔体内达峰时间为(3.20 ± 0.40) h,达峰浓度为(2.75 ± 0.32) µg/ml,半衰期为(3.75 ± 0.87) h。由于取血时间点

和考察时间范围不同,所以半衰期、AUC 与相关文献^[14]不具有可比性,而达峰浓度与达峰时间测定值更大,可能是药物制剂的差异导致动物吸收不同。阴道给药后, NP-9 可经黏膜吸收入血,且峰浓度较高,平均滞留时间较长(约为 6.85 h)。作为外用避孕药使用时,其安全性不容忽视,尤其是长期使用对机体的毒副作用需要进一步评价。

[参考文献]

- [1] Halpern V, Rountree W, Raymond E G, Law M. The effects of spermicides containing nonoxynol-9 on cervical cytology[J]. *Contraception*, 2008, 77: 191-194.
- [2] 张文红, 朱伟杰. 杀精子剂壬苯醇醚-9 的研究现状[J]. *中国男科学杂志*, 2001, 15: 276-278.
- [3] Feldblum P J, Weir S S. The protective effect of nonoxynol-9 against HIV infection[J]. *Am J Public Health*, 1994, 84: 1032-1034.
- [4] Harrison C, Chantler E. The effect of nonoxynol-9 and chlorhexidine on HIV and sperm *in vitro* [J]. *Int J STD AIDS*, 1998, 9: 92-97.
- [5] 曹杰, 李卫东. 复方壬苯醇醚体外杀菌效果观察[J]. *中华男科学杂志*, 2005, 9: 661-663.
- [6] Raymond E G, Chen P L, Condon S, Luoto J, Barnhart K T. Acceptability of five nonoxynol-9 spermicides[J]. *Contraception*, 2005, 71: 438-442.
- [7] 张颖, 陈坚, 侯庆昌, 邵长风. 复方壬苯醇醚-9 栓对家兔抗生育作用和阴道刺激性实验研究[J]. *中国计划生育杂志*, 2006, 14: 287-288.
- [8] Mauck C K, Allen S, Baker J M, Barr S P, Abercrombie T, Archer D F. An evaluation of the amount of nonoxynol-9 remaining in the vagina up to 4 h after insertion of a vaginal contraceptive film (VCF) containing 70 mg nonoxynol-9[J]. *Contraception*, 1997, 56: 103-110.
- [9] 菲琳. 壬苯醇醚-9 预防 HIV 感染无效[J]. *国外医学情报*, 2002, 23: 2-3.
- [10] 文仪. 壬苯醇醚-9 可增加 HIV 感染的风险[J]. *国外医学情报*, 2003, 24: 43-44.
- [11] 张颖, 邵长风, 陈坚. HPLC 法测定复方壬苯醇醚-9 避孕栓主药含量[J]. *天津药学*, 2004, 16: 16-17.
- [12] 黎霜, 饶伟文. HPLC 法测定双保险避孕套中的壬苯醇醚含量[J]. *中国药师*, 2004, 7: 688-690.
- [13] McPherson J L, Nichols J H, Barditch-Crovo P, Hanzeh F M. Determination of the spermicide nonoxynol-9 in vaginal lavage by high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 677: 204-208.
- [14] Minami Y, Iida K, Tajima H. Absorption of a vaginal contraceptive, nonoxynol (polyoxyethylene nonylphenyl ether) and its metabolism to nonylphenol in female rabbits[J]. *Yakuquaku Zasshi*, 2000, 120: 298-303.
- [15] Watts D H, Rabe L, Krohn M A, Aura J, Hillier S L. The effect of three nonoxynol-9 preparations on vaginal flora and epithelium[J]. *J Infect Dis*, 1999, 180: 426-437.