

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00310

反相高效液相色谱法测定人尿中右美沙芬及去甲右美沙芬的含量

张虹, 方昱*, 李英

同济大学附属同济医院临床药理室, 上海 200065

[摘要] **目的** 建立反相高效液相色谱法测定人尿中右美沙芬及其代谢产物去甲右美沙芬浓度的方法。**方法** 以非那西丁为内标, 尿样经水解, 碱化后用正己烷-正丁醇(9:1)萃取, 采用 Diamonsil™ C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分析。色谱条件: 流动相为乙腈(A)-1%三乙胺(磷酸调节 pH=2.2, B), 梯度洗脱, 0~15 min, 20%~35% A, 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 280 nm, 柱温 40℃。**结果** 右美沙芬在 0.05~2.0 μg/ml 范围内线性良好($r=0.9999, n=5$), 检测限为 0.04 μg/ml; 去甲右美沙芬尿样浓度在 0.5~20.0 μg/ml 范围内线性良好($r=0.9999, n=5$), 检测限为 0.4 μg/ml。两者日内、日间精密度 RSD 均<10%, 低、中、高浓度的提取回收率在 94%~108%之间。**结论** 此方法简便准确、重复性好, 适用于 CYP2D6 表型分析以及右美沙芬与其代谢产物的人体药代动力学研究。

[关键词] 右美沙芬; 去甲右美沙芬; 细胞色素 P450; CYP2D6; 高压液相色谱法

[中图分类号] R 974.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0310-03

RP-HPLC in determination of dextromethorphan and dextrorphan in human urine: phenotype analysis of CYP2D6

ZHANG Hong, FANG Yu*, LI Ying

Department of Clinical Pharmacology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

[Abstract] **Objective** To establish a RP-HPLC method for determination of the concentrations of dextromethorphan and its metabolites dextrorphan in human urine. **Methods** Phenacetine was used as internal standard, and the urine sample was hydrolyzed by enzyme, alkalinized and extracted with hexane-butanol(9:1). The separation was carried out on Diamonsil™ C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-1% triethylamine buffer solution (pH adjusted to 2.2 with H₃PO₄). Gradient elution was done for 0-15 min(20%-35% A). The flow rate was 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 280 nm and the column temperature was 40℃. **Results** The linear ranges of dextromethorphan and dextrorphan were 0.05-2.0 μg/ml ($r=0.9999, n=5$) and 0.5-20.0 μg/ml ($r=0.9999, n=5$), respectively, and their lowest detecting concentrations were 0.04 μg/ml and 0.4 μg/ml, respectively. The intra-day and inter-day precision were both less than 10%. The low, middle and high extraction recoveries were between 94%-108%. **Conclusion** Our method is accurate and sensitive, and is suitable for the CYP2D6 phenotype analysis and pharmacokinetic studies of dextromethorphan and its metabolites in human.

[Key words] dextromethorphan; dextrorphan; cytochrome P-450; CYP2D6; high pressure liquid chromatography

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3): 310-312]

细胞色素 P450 酶(CYP)2D6 是最具有多态性的酶, 有表型和基因型之分, 酶活性由表型决定。人类的 CYP2D6 基因簇存在于第 22 号染色体的长臂上, 基因突变可以引起酶活性及数量的差异, 从而造成人类对药物的显著个体差异^[1]。右美沙芬(dextromethorphan, DM)为中枢性镇咳药, 能抑制延髓咳嗽中枢而起镇咳作用。其镇咳作用与可待因相当, 但没有镇痛作用, 无成瘾性, 且治疗剂量不抑制呼吸, 临床广泛用于治疗各种原因所致干咳^[2]。DM 在人体内主要经 CYP2D6 代谢, 生成活性代谢产物去甲右美沙芬(dextrorphan, DX)并进一步与葡萄糖

醛酸结合, 故已被用于 CYP2D6 的多态性研究, 依据受试者尿中 DM 与 DX 的浓度比值来进行表型分析, 可将人群分为超强代谢者(ultrarapid metabolizer, UM), 强代谢者(extensive metabolizer, EM)和弱代谢者(poor metabolizer, PM)^[3-4], 而对代谢人群的充分了解对于临床个体化合理用药及有效避免药物之间的相互作用具有重要的意义。对于 DM 及 DX 的测定方法已有柱切换法、气相色谱法、薄层色谱法、高效液相色谱法等^[5-10], 但文献中 HPLC 多用荧光或质谱检测器, 且均为外标法, 而临床上普及的 HPLC 多以 DAD 为检测器, 且内标法更适用于临

[收稿日期] 2009-07-07 **[接受日期]** 2010-01-04

[作者简介] 张虹, 博士, 主任药师。E-mail: Hongzh97@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-66111245, E-mail: fangyu0907@sina.com

床血药浓度的准确测定。本文建立反相高效液相色谱内标法(紫外检测器)测定尿样中DM和DX的浓度,该法简便准确,适用于CYP2D6表型分析以及DM与其代谢产物的人体药代动力学研究。

1 仪器和试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪(德国);G1311A 四元泵、G13179A 脱气机、G1329A ALS 系统进样器、G1315B DAD 检测器、G1316 柱温箱及化学工作站软件(2004年版);LC-18 固相萃取小柱购自上海安谱科学仪器有限公司;N-EVAP111 氮吹仪(美国);XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂);80-2 台式低速离心机(上海医疗器械集团有限公司手术器械厂);BS210S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);PHSJ-4A pH 计(上海雷磁仪器厂); -80°C 低温冰箱(中科美菱低温科技有限责任公司)。

氢溴酸右美沙芬对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 125K1076);去甲右美沙芬对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 41208257);非那西丁对照品(中国药品生物制品检定所,批号 095-8904); β -葡萄糖醛酸酶(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号 106K37801);乙腈(色谱纯),磷酸、三乙胺、醋酸钠、氢氧化钠均为市售分析纯;纯水为自制重蒸馏水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱:DiamonsilTM C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相:A 为乙腈,B 为 1% 三乙胺(磷酸调节 pH=2.2),梯度洗脱:0~15 min,20%~35%;流速:1.0 ml/min;紫外检测波长:280 nm;柱温: 40°C ;进样量:20 μl 。

2.2 标准溶液的配制

2.2.1 标准溶液的配制 分别精密称取 DM 和 DX 对照品 2.0 mg,置 10 ml 棕色容量瓶中,加流动相溶解并定容,各配成浓度为 200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 储备液(于 4°C 下避光保存)。精密量取各储备液适量用流动相分别稀释成一定范围的标准溶液,DM 浓度范围为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,DX 浓度范围为 5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.2.2 内标溶液的配制 精密称取非那西丁对照品 2.0 mg,置 10 ml 棕色容量瓶中,加流动相溶解并定容,配制成 200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 储备液(于 4°C 下避光保存)。再吸取适量用流动相稀释成 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的内标溶液。

2.3 尿样处理 取尿样 1.0 ml,加入 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液 1.0 ml(pH=5,含 β -葡萄糖醛酸酶

2 500 U),混匀, 37°C 水解 16 h。水解后加内标 50 μl 混匀,加 3 mol/L NaOH 溶液 100 μl 碱化后,用正己烷-正丁醇(9:1)2.5 ml,漩涡提取 90 s,超声 30 s,离心(16 099 $\times g$)5 min,吸取上清液置另一离心管内,下层水相再加正己烷-正丁醇(90:10)2.5 ml 提取一次,合并两次提取液, 40°C 水浴中氮气流下吹干,残渣用 50 μl 流动相溶解,溶解液再离心 5 min(1 145 $\times g$)后取上清液待进样。进样量为 20 μl 。在此色谱条件下,DM、DX 和非那西丁分离良好,对照品、空白尿样、空白尿样加内标及尿样色谱图见图 1,空白尿样对 DM、DX 和非那西丁均无干扰。

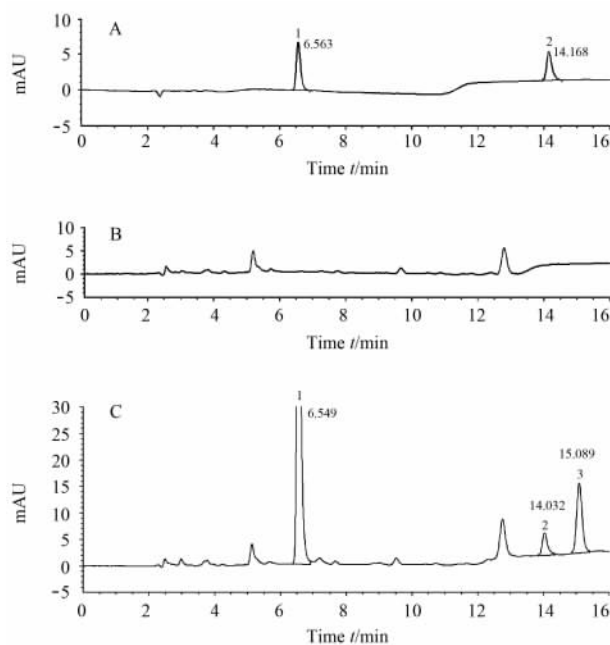


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram

A: Standard, DM+DX(each 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$); B: Internal standard, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; C: Blank sample; D: Sample DM(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + DX(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 1: Dextrophan(DX); 2: Dextromethorphan(DM); 3: Phenacetine(internal standard)

2.4 标准曲线的制备 精密吸取 2.2 项下各浓度标准溶液 100 μl ,分别加到含有空白尿液中,配成尿样中含 DM 浓度为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 DX 浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品 1.0 ml,样品按 2.3 项下操作。以测得样品与内标峰面积比对浓度进行线性回归,得标准曲线方程。DM: $D_{\text{DM}}/D_{\text{内}} = 0.330 C_{\text{DM}} - 0.003$ ($r=0.9999, n=5$);DX: $D_{\text{DX}}/D_{\text{内}} = 0.382 C_{\text{DX}} + 0.004$, ($r=0.9999, n=5$),结果表明 DM 在 0.05~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、DX 尿样浓度在 0.5~20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内呈良好的线性关系。DM 和 DX 最低检测浓度分别为 0.04 和 0.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.5 回收率试验 精密吸取 2.2 项下 DM 和 DX

标准溶液适量,分别加到 1.0 ml 空白尿中,配成 DM 浓度为 0.08、0.4、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 DX 浓度为 0.8、4.0、1.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的加样标本,每个浓度各制备 5 份,按 2.3 项下操作,测定 DM 和 DX 的浓度,以实测浓度与加入浓度之比乘以 100% 计算回收率。结果见表 1。

表 1 精密度和回收率测定结果

Tab 1 Results of precision and recovery rate

Sample	Concentration $\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$	Recovery rate(%)	RSD(%)	
			(n=5)	
			Intra-day	Inter-day
DM	0.08	94.57±3.60	3.81	5.93
	0.40	98.46±7.95	8.07	5.59
	1.50	96.11±3.03	3.16	4.81
DX	0.8	107.29±2.34	2.18	5.21
	4.0	106.25±3.82	3.59	5.24
	15.0	104.08±2.77	2.66	3.66

DM;Dextromethorphan;DX;Dextrorphan

2.6 精密度测定 日内精密度:以低、中、高 3 个浓度各 5 个样品每 2 h 测定 1 次。日间精密度:以低、中、高 3 个浓度各 5 个样品分别测定 3 d,结果见表 1。

2.7 稳定性考察 制备 DM 和 DX 低、中、高 3 种浓度尿样质控样品各 5 份,分别在室温下放置 4 h,样本测定后室温放置 24 h 后复测、-70℃ 冻融 1 次、2 次及冷冻(-70℃)1 个星期、2 个星期、1 个月的条件下,考察其稳定性。结果各条件下各浓度的回收率在 93.49%~108.94%,RSD<8%,表明样品在上述实验条件下稳定。

2.8 样本测定结果 受试者于服药前日晚餐后禁食,早晨排空小便,每人口服氢溴酸右美沙芬 30 mg,受试期间统一饮食,禁烟、酒、茶,收集 0~8 h 内全部尿样分别量取总体积后取 10~15 ml 于试管中,封口置-70℃ 低温冰箱保存。取 5 个受试者尿样各 1.0 ml,按样本处理方法测定,结果见表 2。

表 2 健康受试者样本测定结果

Tab 2 DM and DX concentrations in urine samples of healthy subjects

[n=3, $\bar{x}\pm s, \rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$]

No.	Concentration	
	Dextromethorphan	Dextrorphan
1	0.182±0.025	3.906±0.104
2	0.398±0.034	5.933±0.027
3	0.276±0.017	1.587±0.014
4	0.359±0.029	0.764±0.093
5	0.447±0.044	1.342±0.081

3 讨论

实验初期用磷酸缓冲液时发现 DM、DX 拖尾严

重,对此进行了反复摸索。考察了流动相组成配比及 pH 值对色谱峰峰形、保留时间及分离度影响,结果以乙睛-1%三乙胺(磷酸调节 pH=2.2)作为流动相,用梯度洗脱的方法消除了拖尾现象,同时与杂质峰分离较好。

内标的选择:本实验考察了多种物质作为内标的可能性,最终选定非那西丁,保留时间(15.089 min)合适,且能和 DM 及 DX 分离完全。

临床上诸多药物经 CYP2D6 代谢,如心血管系统药物(α 、 β 受体阻断剂、 β 受体阻断药、抗心律失常药、抗高血压药、抗心绞痛药)、呼吸系统药(止咳平喘药)、中枢性镇咳药、抗精神病药、抗抑郁药、降糖药、抗肿瘤药、止吐药等,因此,CYP2D6 遗传多态性对临床个体化给药具有深远的意义。在 CYP2D6 酶表型分析中的探针药中,DM 因其不良反应小、较为安全等优点,亦越来越多地作为 CYP2D6 多态性的表型研究的探针药。本文建立的反相高效液相色谱内标法(紫外检测器)测定尿样中 DM 和 DX 的浓度,简便准确,适用于 CYP2D6 酶表型活性的分析以及 DM 与其代谢产物的人体药代动力学研究。

[参考文献]

- [1] 季闽春,王永铭. 细胞色素 P450 2D6 的多态性研究[J]. 中国临床药理学杂志,2000,16:225-227.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:临床用药须知[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:435.
- [3] 徐田雪,杨信怡,赵 昆,张喜川,游雪甫. 药物代谢酶细胞色素 P450 2D6 的遗传多态性研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2009,34:385-391.
- [4] 贾晋生,李 芹,王 睿. 细胞色素 P450 2D6 氧化酶研究的表型分析及探针药物[J]. 中国新药杂志,2006,15:948-951.
- [5] Achari R G, Ederma H M, Chin D, Oles S R. Determination of dextromethorphan hydrobromide in biological fluids by liquid chromatography by using semi-microbore columns[J]. J Pharm Sci,1984,73:1821-1822.
- [6] East D, Dye D. Determination of Dextromethorphan Hydrobromide and metabolites in human plasma and urine by HPLC with fluorescence detection[J]. J Chromatogr,1995,338:99-112.
- [7] Daali Y, Cherkaoui S, Doffey-Lazeyras F, Dayer P, Desmeules J A. Development and validation of a chemical hydrolysis method for dextromethorphan and dextrophan determination in urine samples; application to the assessment of CYP2D6 activity in fibromyalgia patients[J]. J Chromatogr,2008,861:56-63.
- [8] 李国昌,洪成林,陈 文,陈 勇. 反相高效液相色谱法测定尿中右美沙芬及去甲右美沙芬的含量与 CYP2D6 表型分析[J]. 中国药学杂志,2003,38:862-864.
- [9] 黄丽军,于卫江,刘 艳,朱大岭. 临床前大鼠药物代谢酶 CYP2D6 亚型 HPLC 技术研究[J]. 药物分析杂志,2007,27:1055-1058.
- [10] 林凌云,劳万生,孟 珺,何光明. HPLC 法测定人尿中右美沙芬及去甲右美沙芬的含量及 CYP2D6 表型区分研究[J]. 中国药房,2008,19:1785-1786.

[本文编辑] 尹 茶