

高效液相色谱法测定离子导入后兔眼房水中哌仑西平浓度

胡弢¹, 吴伟^{1*}, 阙俐¹, 戴怡康², 褚仁远² (1. 复旦大学药学院药剂教研室, 上海 200032; 2. 复旦大学附属耳鼻喉科医院, 上海 200031)

摘要:目的 HPLC法测定兔眼房水中哌仑西平的浓度, 离子导入法促进哌仑西平的吸收。方法 氨基键合硅胶为固定相, 流动相为甲醇/0.014 mol·L⁻¹三乙胺 (pH = 5.0) = 70/30, 检测波长为 280 nm, 丙咪嗪为内标。结果 哌仑西平浓度在 0.2 ~ 10 μg·mL⁻¹浓度内线性良好 ($r = 0.9990$), 日内 RSD 为 1.20%, 日间 RSD 为 1.52%, 低、中、高浓度回收率分别为 (97.92 ± 2.83)%、(99.19 ± 2.64)%、(101.3 ± 0.94)%, 定量限为 0.20 μg·mL⁻¹, 检测限为 0.10 μg·mL⁻¹。离子导入能明显提高哌仑西平的透过率, pH 值对哌仑西平的离子导入有极显著影响。黏度、浓度、电极种类和电流强度对其影响均不是很明显。结论 所建立的 HPLC 法测定兔眼房水中哌仑西平的含量方法准确可靠。

关键词: 哌仑西平; 离子导入; 高效液相; 房水

中图分类号: R945.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)05-0398-03

Determination of pirenzepine in the aqueous humor of rabbits after iontophoresis by HPLC

HU Tao¹, WU Wei^{1*}, QUE Li¹, DAI Yi-kang², CHU Ren-yuan² (1. Department of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Eye & ENT Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC method to determine the concentrations of pirenzepine in the aqueous humor of rabbits. To investigate the efficiency of pirenzepine permeation enhanced by iontophoresis. **METHODS** The concentrations of pirenzepine were determined by HPLC using an Inertsil CN-3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was a mixture of 70% methanol and 30% 0.014 mol·L⁻¹ triethylamine adjusted to a pH of 5. The detection wavelength was at 280 nm. Imipramine was the internal standard. **RESULTS** The linear calibration curve was obtained over the range of 0.2 μg·mL⁻¹ to 10 μg·mL⁻¹ of pirenzepine in aqueous humor ($r = 0.999$). The within-day and between-day coefficient of variation were 1.2% and 1.5%, respectively. The recoveries of spiked low, medium and high concentrations of pirenzepine in aqueous humor were 97.9%, 99.2% and 101.3%, respectively. The limit of quantification was 0.20 μg·mL⁻¹, and the limit of detection was 0.10 μg·mL⁻¹. Iontophoresis could improve the penetration of pirenzepine across rabbit cornea obviously. pH of the eye drops had the influence on iontophoretic penetration, while viscosity, strength of current and electrode type had no obvious effects. **CONCLUSION** This method is simple, rapid, accurate and reproducible, and has been applied to determine iontophoretically transmitted pirenzepine in aqueous humor of rabbits.

基金项目: 上海市科委基金项目 (编号: 034319243)

作者简介: 胡弢, 男, 硕士研究生

通讯作者: 吴伟, 男, 副教授, 硕士生导师, E-mail: wuwei@shmu.edu.cn, 联系电话: 021-54237833

KEY WORDS: pirenzepine; iontophoresis; HPLC; aqueous humor

哌仑西平 (pirenzepine) 为选择性的 M₁受体阻滞剂,具有选择性的抗胆碱作用,长期以来一直用于治疗消化系统疾病。近年研究发现哌仑西平对预防近视的发生、发展有明显的效果^[1]。在恒河猴、小鸡和其他哺乳动物实验模型的研究中表明,哌仑西平可以阻止实验性近视的发生,其作用与阿托品相当,但没有阿托品选择性差带来的不良反应^[2]。随着对哌仑西平抑制近视作用的深入了解,人们开始着手将其应用于临床,研究其用药途径及合适剂型,但由于盐酸哌仑西平是水溶性药物,脂溶性差,难以穿透角膜吸收,单滴眼房水中浓度较低。我们运用离子导入的方法促进其在眼部的吸收,并且建立高效液相色谱法测定药物在房水中的浓度。

1 仪器、试剂、动物

哌仑西平 (pirenzepine, 江苏盐城制药厂); 丙咪嗪 (imipramine, Sigma公司); 甲醇 (色谱纯, TEDIA); 水 (三蒸水); 羟丙甲纤维素 (上海卡尔康包衣技术有限公司); 其他试剂均为分析纯; 新西兰兔 (上海申旺实验动物养殖厂)。

LC-10ATvp 高效液相色谱系统 (SHIMADZU); SPD-10Avp 紫外检测器 (SHIMADZU); 7525i 进样阀 (RHEODYNE); AT-230型柱温箱 (天津); HS2000 (通用版) 色谱工作

站 (杭州英谱科技发展有限公司); 色谱柱: Inertsil CN-3 不锈钢柱, 250mm × 4.6mm, 5μm (GC Sciences Co., Japan); DL-ZII 型直流电感仪 (广东省汕头市医用设备厂); 金属电极, 硅橡胶电极 (自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

流动相: 甲醇-0.014 mol·L⁻¹三乙胺 (pH = 5.0) = 70:30; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40℃; 检测波长: 280nm; 进样量: 20μL, 内标物: 丙咪嗪。

2.2 房水样品处理

取房水 0.1 mL, 加入 0.1 mL 浓度为 10μg·mL⁻¹的内标甲醇溶液, 再加入 0.1 mL 的甲醇, 漩涡混合 2 min, 使蛋白沉淀完全, 8000 r·min⁻¹ 高速离心 10 min, 取上清液进样 20μL。

2.3 方法专属性

将空白房水的色谱图与房水中加入哌仑西平和内标, 实测样品得到的色谱图比较, 证明血浆中的内源物质不干扰测定, 见图 1。哌仑西平的保留时间约为 4.8 min, 内标丙咪嗪的保留时间为 11.0 min。

2.4 标准曲线

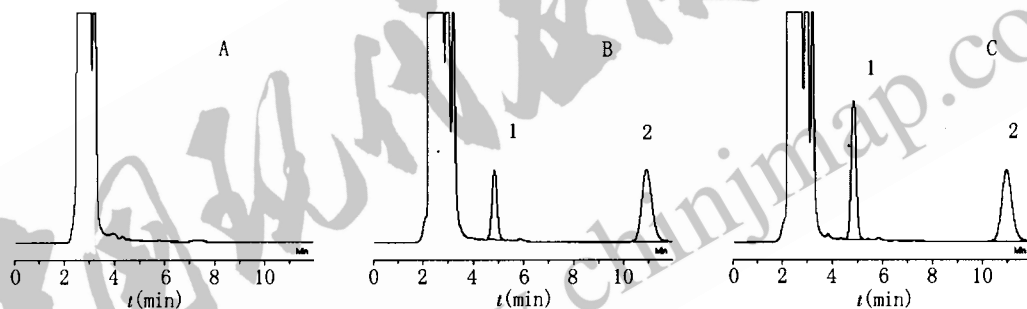


图 1 样品的色谱图

Fig 1 Chromatograms of aqueous humor extracts.

A-空白房水; B-空白房水+内标+标样; C-实测样品; 1-哌仑西平; 2-内标

A-blank; B-spiked with pirenzepine and I.S.; C-sample after iontophoretic permeation; 1-pirenzepine; 2-internal standard

精密称取盐酸哌仑西平对照品适量, 用甲醇溶解并稀释成 10.0 μg·mL⁻¹ 的储备液。再取储备液 0.2, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 同法定容。分别取 0.1 mL 房水 6 份, 分别加入 0.1 mL 的上述哌仑西平溶液和 0.1 mL 内标, 漩涡混合, 下同“2.2”操作。根据哌仑西平和丙咪嗪的峰面积计算峰面积比 Y, 以 Y 对哌仑西平浓度 C 进行线性回归, 得标准曲线方程 Y = -0.0225 + 0.1297C (r = 0.9990)。

2.5 精密度

将含药房水按浓度混合得低、中、高三种浓度的含药房水, 每种分别取样 3 次, 每次取样 0.1 mL, 下同“2.2”操作, 取上清液进样 20μL。日内试验 3 个浓度的样品在同一天内进样, 日内 RSD 为 1.20%; 日间试验, 每天重新配制 3 个浓度的供试样品, 在 1 周内分别进样测定, 日间 RSD 为 1.52%。

2.6 加样回收率

配置浓度为 0.50, 1.00, 1.50 μg·mL⁻¹ 的低、中、高三种

浓度的样品。取 0.1 mL 已知药浓度的房水样品, 分别加入 0.1 mL 上述三种浓度的溶液, 再加入 0.1 mL 的内标溶液, 下同“2.2”操作, 取上清液进样 20μL, 每组三次, 测定药物浓度, 结果见表 1。

表 1 哌仑西平房水中加样回收实验结果 (n = 9)

Tab 1 Recovery of pirenzepine in aqueous humor (n = 9)

房水中原含药物浓度 (P) (μg·mL ⁻¹)	加入药物量 (A) (μg·mL ⁻¹)	回收率 (R) (%)
1.60	0.50	97.9 ± 2.9
1.60	1.00	99.2 ± 2.7
1.60	1.50	101.2 ± 0.9

2.7 定量限和检测限

配置浓度为 0.50, 0.30, 0.20, 0.10, 0.06 μg·mL⁻¹ 的样品。取空白房水 0.1 mL, 加入 0.1 mL 五种浓度的样品, 下同“2.2”操作, 取上清液进样 20μL, 每种浓度样品制备三份, 计

算 RSD和 $E(E = \frac{|C_{测} - C_{标}|}{C_{标}} \times 100\%)$,当房水中药物浓度为 $0.20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,三次测定得 $RSD \leq 20\%$ 和 $E \leq 20\%$,而当药物浓度再降低到 $0.10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,则达不到此要求,因此确定最低定量浓度为 $0.20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

取空白血清 0.1mL 按“2.2”处理 $20\mu\text{L}$ 进样,记录药物峰前后的一段空白样品基线(基线记录的长度为哌仑西平峰宽的20倍),由此可得空白样品背景色谱图。取峰波动中间值为平均噪音水平线,再以偏离平均噪音水平线的最大噪音峰高的一半为空白房水的噪音值 N ,进样三次得平均噪音值 \bar{N} 。取空白房水取空白房水 0.1mL ,加入 0.1mL 五种浓度的样品,下同“2.2”操作,取上清液进样 $20\mu\text{L}$ 进样。每种浓度进样三次求出峰高的平均值 \bar{S} ,计算 \bar{S}/\bar{N} 值,当药物浓度为 $0.10\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,三次测定 $\bar{S}/\bar{N} \geq 3$,而当药浓度为 $0.06\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,不能达到此要求,所以确定检测限浓度为 $0.10\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.8 离子导入促进哌仑西平的吸收

精密称取盐酸哌仑西平、羟丙甲纤维素(HPMC)以及其他添加剂,加水溶解并配制成为适宜的浓度,pH值通过加入氢氧化钠溶液调节,滴眼液的粘度通过调节增稠剂羟丙甲纤维素的浓度来控制。

健康新西兰兔32只,雌雄不拘,体重 $2.5 \sim 3.5\text{kg}$,按表2进行分组,分别考察比较电流强度、pH值、药物浓度、滴眼剂黏度、电极类型对离子导入效率的影响,并与滴眼剂不加离子导入的吸收效率进行比较。

将兔固定,剪去单只眼脸外兔毛,以及脸颊对侧兔毛,另侧眼作为对照,将兔眼拉成杯状,滴入2滴约 $60\mu\text{L}$ 的滴眼液。于皮肤外涂敷导电液,将直流电感应仪的正极端固定在眼脸外,负极端固定在脸颊对侧,打开电源开关,调节电流强度,进行离子导入,计 20min 。

离子导入后,立即处死动物,剥离眼球,并马上用蒸馏水将眼外药液洗除,防止药物进一步向眼内渗透,用5号针头抽取房水,冷冻保存。测定房水中哌仑西平含量时,于冰箱中取出冷冻的房水,待融化后,取房水 0.1mL ,照含量测定样品的方法进行处理。结果见表2。

3 讨论

曾经试验 ODS 色谱柱,但发现在多种流动相条件下,内标丙咪嗪均保留时间较长;改用氰基键合硅胶为固定相,结果表明哌仑西平和丙咪嗪均峰形良好,保留时间适当。据文献报道,在测定血浆中哌仑西平的浓度时, Babhair^[3]曾经使用配比为乙腈-甲醇-5%乙酸 = 70:40:15的流动相。Meineke等^[4]采用了配比为乙腈-0.014 mol·L⁻¹三乙胺(pH=10.5) = 60:40的流动相。而将这两种方法用于房水中哌仑西平浓度测定时,发现药物与房水中杂质分离效果不佳,通过考察哌仑西平和丙咪嗪的出峰情况,并结合专属性实验,最后采用甲醇-0.014 mol·L⁻¹三乙胺(pH=5.0) = 70:30的配比,在此条件下药物与内标的保留时间合适,峰形良好,与杂质的分离度大于4.0。在样品处理方面,曾经使用三氯乙酸沉淀

表2 不同离子导入条件下房水中哌仑西平的浓度

Table 2 The concentrations of pirenzepine in the aqueous humor of rabbits

	电流强度 (mA)	pH	哌仑西平 浓度(%)	HPMC 浓度(%)	电极类型*	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	0.3	3.5	5	2	A	1.17 ± 0.68
2	0.5	3.5	5	2	A	1.14 ± 0.65
3	0.3	4.8	5	2	A	0.98 ± 0.45
4	0.3	5.8	5	2	A	1.04 ± 0.32
5	0.3	1.8	10	2	A	5.11 ± 2.09
6	0.3	3.5	10	2	A	1.16 ± 0.65
7	0.3	3.5	5	5	A	1.31 ± 0.27
8	0.3	3.5	5	2	B	0.80 ± 0.81
9	0	3.5	5	2	A	0.18 ± 0.19

注: * 电极类型: A:金属; B:硅橡胶

Note: * The type of electrode, A: metal, B: silicone rubber

蛋白,结果发现所得处理后的样品杂质很多,干扰测定;改用甲醇后发现甲醇沉淀效果好且不会带进很多杂质,有利于测定。

通过对离子导入后哌仑西平房水中浓度的分析可知离子导入能够明显增加哌仑西平的角膜透过率,pH是影响哌仑西平吸收的最主要因素,而改变浓度、黏度、电流强度和电极种类对其影响均不是很明显,分析原因如下。

哌仑西平是以简单扩散透过角膜的,随着浓度的提高在一定范围内其透过率会增加,但有一定限度。当浓度和电流强度增加到一定值时,这种通透力会达到饱和,再增加也不会有很明显的效果。实验中增加黏度未引起房水内哌仑西平浓度相应的改变,是因为在进行电场促进哌仑西平眼内透入时,一定范围内滴眼剂黏度的变化对透过产生的影响被离子导入的效果所掩盖了。低电流强度和高电流强度对哌仑西平的促透作用相当,究其原因可能是眼部电场促透电流强度的可变范围不大,并且经过一段不长的持续时间往往不一定能体现出其中的差异。同时,我们也发现使用金属电极和硅橡胶电极的促透作用相当,这样在临床应用中,我们可以使用较舒适安全的硅橡胶电极,避免使用金属电极。

参考文献

- [1] Cottrill CL, Annes R, Brew J, et al. Pirenzepine reduces retinal acetylcholine and dopamine levels [J]. Proc Aust Neurosci Soc, 1999, 10: 55.
- [2] Cottrill CL, McBrien NA, Annes R, et al. Prevention of form deprivation myopia with pirenzepine: a study of delivery and distribution [J]. Ophthal Physiol Opt, 1999, 4: 327.
- [3] Babhair SA. Determination of pirenzepine in dosage forms and in biological fluids [J]. J Liq Chrom, 1984, 7(12): 2401.
- [4] Meineke L, Witsch D and Brendel E. Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of pirenzepine in Plasma [J]. J Chrom, 1986, 375: 369.

收稿日期: 2004-04-14