

· 药物分析与检验 ·

毛细管气相色谱法测定人尿中右美沙芬及其代谢物*

吴永江 马明铭 曾 苏 周 翔(杭州 310031 浙江大学湖滨校区药学院药物分析教研室)

摘要 目的:为研究细胞色素 P450 同工酶 CYP2D6 在人群中的代谢多态性,本文建立了人尿中右美沙芬(DM)及其 O-去甲基代谢物 3-羟基-N-甲基-吗喃(DT)的气相色谱分析方法。方法:尿样经提取后,以 HP-1 毛细管柱作为分离柱,FID 为检测器,正二十二烷为内标进行气相色谱分析。结果:在此实验条件下,右美沙芬、内标物和代谢物的保留时间分别为 8.5、9.9 和 11.2min;尿样中 DM 在 0.10~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、DT 在 0.20~20.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性关系良好,回收率分别 95.7%~104.4%(DM)和 93.3%~98.3%(DT);样品测定的 RSD 分别为 2.5%和 3.1%。结论:该法简便可靠,能满足 CYP2D6 代谢多态性研究的要求。

关键词 右美沙芬;气相色谱法

Determination of dextromethorphan and its metabolite in urine by capillary GC

Wu Yongjiang(Wu YJ), Ma Mingming(Ma MM), Zeng Su(Zeng S), *et al* (Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmaceutical Science, Hubin Campus of Zhejiang University, Hangzhou 310031)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a capillary gas chromatography method for the determination of dextromethorphan(DM) and its metabolite Dextrorphan(DT) to study the metabolic polymorphism of CYP2D6 in Chinese. **METHODS:** Urine samples were extracted, and analysed on HP-1 capillary column. Docosane was chosen as the internal standard(IS). The detector used was FID. **RESULTS:** Under the optimal GC conditions, the retention times of DM, IS and DT were 8.5, 9.9 and 11.2 min, respectively. The assay was linear at the range of 0.1~1.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (DM) and 0.20~20.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (DT). The absolute recoveries from urine were 95.7%~104.4% (DM) and 93.3%~98.3% (DT), respectively. The RSD of the assay was 2.54% for DM and 3.14% for DT. **CONCLUSION:** The results showed that the GC method developed was simple, rapid and reliable, and was suitable for study of the metabolic polymorphism of CYP2D6. **KEY WORDS** dextromethorphan, gas chromatography

右美沙芬(Dextromethorphan, DM)为常用的镇咳药,毒性较小,在人体内经细胞色素 P450 同工酶 CYP2D6 催化氧化代谢生成 3-羟基-N-甲基-吗喃(Dextrorphan, DT)。所以,DM 常作为 CYP2D6 活性测定的化学探针^[1]。国内外对体液中 DM 和 DT 的测定大多采用 HPLC 法^[2,3],本文建立了毛细管气相色谱测定人尿中 DM 及其代谢物 DT 的较为简便、准确的方法,可用于人群代谢分型的研究,也为临床给药个体化提供方法依据。

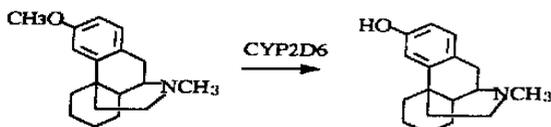


图 1 DM 和 DT 的化学结构

1 仪器与试剂

岛津 GC-15A 气相色谱仪,CR-4A 色谱数据处理机。

右美沙芬(DM)、3-羟基-N-甲基-吗喃(DT)购自 Hoffmann-La Roche (Switzerland) 试剂公司,正二十二烷、无水乙醇、乙醚、异丙醇、乙酸乙酯、盐酸、碳酸氢钠、碳酸钾均为分析纯试剂,L-半胱氨酸为生化试剂。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

HP-1 毛细管柱,0.22mm \times 25m;柱温:190 $^{\circ}\text{C}$;进样口温度:260 $^{\circ}\text{C}$;氢火焰检测器(FID),检测器温度:260 $^{\circ}\text{C}$;载气: N_2 ;分流比 50:1;燃气: H_2 ,50ml/min;助燃

* 浙江省自然科学基金第 396486 号

气:空气,500 ml/min;进样量:2 μ l。

在上述实验条件下,尿样中 DM 和 DT 分离良好。见图 2。

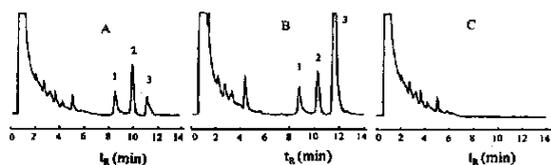


图 2 色谱图

A-标准样品;B-尿样;C-空白尿样;1-DM;2-IS;3-DT

2.2 样品处理方法

受试者在取空白尿后,口服右美沙芬 30 mg,收集 0~8h 的尿样分别量取总体积后,取 15~20 ml 于试管中,用封口胶封好,置冰箱保存。

取尿样 2.5 ml(若尿样中 DM 或 DT 浓度较低,可酌情增加取样体积),加入 L-半胱氨酸 50 mg、浓盐酸 0.30 ml,在 100 $^{\circ}$ C 加热 30 min,冷却后加入乙醚 2 ml,振荡、离心,弃去上层乙醚层,尿液中加入 12 mol/L NaOH 溶液 0.35 ml 中和,再加入固体缓冲液(NaHCO_3 - K_2CO_3 = 3:2) 1 g,溶解后加入提取液(乙醚-异丙醇 = 9:1) 2 ml 振荡、离心,将提取液分离到另一干净离心管中,再加入提取液 2 ml 提取,离心,将提取液合并到同一离心管中。提取液吹干后,加入 25 μ g/ml 正二十二烷内标溶液 50 μ l 定容。

2.3 线性关系

表 1 尿中 DM 和 DT 的回收率

| DM | | | | | DT | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|
| 加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 回收率/% | 平均值/% | RSD/% | 加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 回收率/% | 平均值/% | RSD/% |
| 0.20 | 0.1984 | 99.20 | | | 0.40 | 0.3710 | 92.76 | | |
| 0.20 | 0.1842 | 92.10 | 96.7 | 4.2 | 0.40 | 0.3622 | 90.55 | 93.3 | 3.3 |
| 0.20 | 0.1978 | 98.90 | | | 0.40 | 0.3864 | 96.59 | | |
| 0.80 | 0.7524 | 94.05 | | | 8.00 | 7.726 | 96.58 | | |
| 0.80 | 0.7473 | 93.41 | 95.7 | 3.6 | 8.00 | 7.848 | 98.10 | 98.3 | 1.8 |
| 0.80 | 0.7968 | 99.60 | | | 8.00 | 8.008 | 100.1 | | |
| 1.60 | 1.696 | 106.0 | | | 20.00 | 18.95 | 94.75 | | |
| 1.60 | 1.688 | 105.5 | 104.4 | 2.2 | 20.00 | 19.14 | 95.70 | 93.6 | 3.0 |
| 1.60 | 1.629 | 101.8 | | | 20.00 | 18.08 | 90.40 | | |

2.5 样品测定

取受试者尿样 2.5 ml(若尿样中 DM 或 DT 浓度太低,则适当增加取样体积),按上述方法测定,结果见表 2。

2.6 方法精密度

取同一受试者尿样重复测定 5 次,结果其中 DM 浓度平均值为 0.4910 μ g/ml, RSD 为 2.5%;DT 浓度平均

精密称取右美沙芬氢溴酸盐 0.0052g(相当于右美沙芬 0.0040g),置于 100 ml 量瓶中,用乙醇溶解定容,即为 40 μ g/ml DM 标准液。

精密称取 3-羟基-N-甲基-吗喃酒石酸盐 0.0063g(相当于 3-羟基-N-甲基-吗喃 0.0040g),置于 100 ml 量瓶中,用乙醇溶解并定容,即为 40 μ g/ml DT 标准液。

精密量取一定量 DM 和 DT 标准溶液,吹干后加入空白尿 2.5 ml,配制含 DM 为 0.10,0.20,0.30,0.40,0.60,1.00,1.20,1.60 和 2.00 μ g/ml 和 DT 为 0.20,0.40,0.80,1.20,1.60,2.00,2.40,3.20,4.00,8.00,12.0,16.0 和 20.0 μ g/ml 的标准尿样溶液,按尿样处理方法操作,进样 2 μ l。

以 DM(或 DT) 色谱峰面积与内标峰面积之比(Y)为纵坐标,DM(或 DT)浓度(X)为横坐标进行线性回归,求得 DM 的线性方程为: $Y = 0.01667X - 0.1023$, $r = 0.998$;DT 的线性方程为: $Y = 0.01559X - 0.4860$, $r = 0.997$ 。结果表明,在 DM 浓度 0.10~2.00 μ g/ml、DT 浓度 0.20~20.00 μ g/ml 范围内线性关系良好。

2.4 回收率

精密量取一定量 DM 或 DT 标准溶液,挥干后加入空白尿 2.5 ml,配制成 DM 浓度为 0.20,0.80 和 1.60 μ g/ml,DT 浓度为 0.40,8.00 和 20.00 μ g/ml 的标准尿样溶液,依上法进行气相色谱分析,将测得量与加入量比较,求得回收率,结果见表 1。

值为 2.624 μ g/ml, RSD 为 3.1%。

3 讨论

DM 和 DT 的测定常用 HPLC 法,采用 GC 法时通常先用硅烷化试剂对 DT 进行衍生化,然后进行 GC 分析。我们曾经采用文献方法^[3]以 MBTFA 和 MSTFA 为硅烷化试剂进行测定,结果发现色谱峰极复杂,分离度低,测定重复性差。将硅烷化试样进行 GC-MS 分析时,除

表 2 样品测定结果

| 受试者编号 | DM 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ | DT 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ |
|-------|---|---|
| 1 | 0.6043 | 2.848 |
| 2 | 0.4584 | 1.542 |
| 3 | 0.2817 | 1.477 |
| 4 | 0.2136 | 1.029 |
| 5 | 0.1364 | 2.023 |
| 6 | 0.3955 | 2.956 |
| 7 | 0.0530 | 2.860 |
| 8 | 0.1945 | 0.3189 |
| 9 | 0.1210 | 0.1284 |
| 10 | 0.2174 | 4.906 |

检测到 DT 的硅烷化产物外,还发现存在 DT 的色谱峰,这表明硅烷化不完全,更说明 DT 无需衍生化可直接进行 GC 分析。所以在本文中不再采用硅烷化方法,尿样经提取分离后直接进行 GC 分析,使样品预处理大为简便,也使色谱图大为简化。

在本实验条件下,DM 内标物和 DT 的保留时间分

别为 8.5,9.9 和 11.2 min,相互之间达到基线分离;尿样中 DM 浓度在 0.10 ~ 1.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、DT 浓度在 0.20 ~ 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内线性关系良好,回收率分别为 95.7% ~ 104.4% 和 93.3% ~ 98.3%;样品测定的 RSD 分别为 2.5% 和 3.1%。

本方法已应用于中国人群中 CYP2D6 代谢多态性的研究。

参考文献

- 1 Cai WM, Chen B, Liu YX. Deteromethorphan metabolic phenotyping in a Chinese population. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1997, 18(5): 441.
- 2 Schmid B, Bircher J, Preisig R, *et al.* Polymorphic dextromethorphan metabolism: Co-segregation of oxidative O-de methylation with debrisoquine hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther*, 1985, 38: 618.
- 3 徐友宣,申利,张长久,等.人尿中美沙芬及其代谢产物的气-质联用分析. *药学学报*, 1993, 28(2): 156.

收稿日期:1999 - 03 - 18