

HPLC-UV法测定大鼠脑组织中利培酮的含量^Δ

谷福根^{1*}, 马维娜², 王毅¹, 孟根达来¹, 张艺馨², 吴春芝¹ (1. 内蒙古医科大学附属医院, 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1782-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.15

摘要 目的: 建立大鼠脑组织中利培酮含量的测定方法。方法: 取大鼠, ig 30 mg/kg 的利培酮混悬液, 30 min 后断头处死, 分离脑组织; 采用高效液相色谱-紫外法, 以盐酸小檗碱为内标, 测定大鼠脑组织中利培酮的浓度。色谱条件采用色谱柱 Wondasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.01 mol/L 醋酸铵溶液 (50:50, V/V), 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 280 nm; 柱温为室温; 进样量为 25 μl。结果: 利培酮检测质量浓度的线性范围为 0.2~27.0 μg/ml ($r=0.999\ 9$), 方法回收率为 97.28%~109.10%, 提取回收率为 94.59%~97.48% ($n=5$), 日内和日间 RSD 均小于 5% ($n=5$), 定量限为 0.5 μg/ml。大鼠脑组织中利培酮的含量为 (3.48±0.50) μg/g, RSD 为 14.7% ($n=6$)。结论: 本方法简便、快速、灵敏、准确度高, 可用于大鼠脑组织中利培酮的含量测定。

关键词 高效液相色谱-紫外法; 利培酮; 大鼠; 脑组织; 含量测定

Content Determination of Risperidone in Cerebral Tissues of Rats by HPLC-UV Method

GU Fugen¹, MA Weina², WANG Yi¹, Menggendalai¹, ZHANG Yixin², WU Chunzhi¹ (1. The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; 2. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of risperidone (RIS) in cerebral tissues of rats. METHODS: Rats were given RIS suspension 30 mg/kg, ig, and sacrificed 30 min later to separate cerebral tissue. The concentration of RIS in cerebral tissues of rats was determined by HPLC system with UV detector using berberine hydrochloride as internal standard. The chromatographic conditions were that Wondasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with mobile phase consisted of acetonitrile-0.01 mol/L ammonium acetate (50:50, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min; the detection wavelength was set at 280 nm; the column temperature was maintained at room temperature, and sample size was 25 μl. RESULTS: There was a good linear relationship of RIS concentration in cerebral tissues of rats within the range of 0.2-27.0 μg/ml ($r=0.999\ 9$). The method recovery was from 97.28% to 109.10% and extraction recovery was from 94.59% to 97.48% ($n=5$); intra-day and inter-day RSDs were both below 5% ($n=5$). The limit of quantitation was 0.5 μg/ml. The content of RIS in cerebral tissue of rats was (3.48±0.50) μg/g (RSD=14.7%, $n=6$). CONCLUSIONS: The established method is simple, rapid, sensitive and accurate for the content determination of RIS in cerebral tissues of rats.

KEYWORDS HPLC-UV; Risperidone; Rats; Cerebral tissue; Content determination

- =====
- [3] 牟英, 孟志云, 窦桂芳. 椒苯酮胺在比格犬体内的药代动力学研究[J]. 中国血液流变学杂志, 2006, 16(3): 338.
- [4] Shi A, Hu X, Li R, et al. Determination of piperphentamine and metabolites M1 and M6 in human plasma and urine by LC/MS/MS and its application in a pharmacokinetics study in Chinese healthy volunteers[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.09.031.
- [5] 中华人民共和国卫生部药政局. 新药(西药)临床前研究指导原则汇编: 药理学 毒理学[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政局, 1993: 202-203.
- [6] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 393-397.
- [7] Hayes AW, Dorato MA, Andersen ME. *The toxicological assessment of pharmaceutical and biotechnology product: principles and methods of toxicology*[M]. 4th Edition. Philadelphia: Taylor and Francis, 2001: 243-283.
- [8] 国家药品监督管理局. 化学药物长期毒性试验技术指导原则[S]. 2005-03.
- [9] 黄晓舞, 梅世昌, 李外. 银杏内酯B注射液对Beagle犬的长期毒性研究[J]. 中国药房, 2008, 19(30): 2338.
- [10] 李茹冰, 耿智毅, 孙智平, 等. 注射用盐酸椒苯酮胺稳定性考察[J]. 中国药师, 2012, 15(1): 30.
- [11] 李茹冰, 李健, 吴新荣, 等. 盐酸椒苯酮胺致畸敏感期毒性试验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(22): 5610.
- [12] 陈阳述, 李茹冰, 李健, 等. 盐酸椒苯酮胺致突变实验[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(19): 4747.
- [13] 李健, 李茹冰, 张强, 等. 盐酸椒苯酮胺对大鼠和Beagle犬的急性毒性实验研究[J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1315.

Δ 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目[No. 2015MS(LH)0801]; 内蒙古医科大学科技百万工程项目(No. YKD2014KJBW012)

* 主任药师, 博士. 研究方向: 药物新剂型. 电话: 0471-6636650. E-mail: fgczh@sina.com

(收稿日期: 2015-09-26 修回日期: 2016-04-15)
(编辑: 刘萍)

利培酮(Risperidone, RIS)是新一代非典型抗精神病药,可用于控制精神分裂症的阳性和阴性症状,具有使用剂量小、疗效确切、锥体外系副作用小等优点,现已在临床中作为一线抗精神病药广泛使用^[1-2]。目前,RIS上市剂型有普通片剂、胶囊剂等^[3-5]。该药需进入脑内才能发挥作用,然而因血脑屏障的存在,该药经po后由血循环进入脑内的药量较少,故po并非其理想给药途径。药物经鼻给药具有吸收迅速的特点,可避免肝脏首关效应直接向脑内递送药物,提高了药物的生物利用度^[6-8],因而已成为近年来部分中枢神经系统疾病治疗药物的理想给药途径,受到国内外制剂领域研究工作者的广泛关注^[7,9-11]。目前,人和动物血浆中RIS的分析测定已有报道^[3,12],但脑组织中药物的测定方法研究缺乏。因此,本文拟建立一种大鼠脑组织内RIS的含量测定方法,旨在为今后研究该药经鼻给药新剂型及其脑靶向作用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

LC-10AT 高效液相色谱仪及SPD-10A紫外-可见检测器(日本岛津公司);N2010 双通道色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);AB265-S 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Human UP 900 超纯水器(韩国Human公司);KQ2200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);3531 微量离心机(德国Abbott公司)。

1.2 药品与试剂

RIS原料药(北京高博医药化学技术开发有限公司,批号:121201,纯度:99.9%);盐酸小檗碱对照品(北京盛世康普化工技术研究院,批号:140106,纯度:≥98%);乙腈与甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

SD大鼠,♂,体质量250~300 g,购自内蒙古大学实验动物中心,许可证号:SCXK(蒙)2012-0006。

2 方法与结果

2.1 标准溶液及内标溶液的制备

精密称取RIS原料药50 mg,置于100 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为500 μg/ml的RIS贮备液。分别量取0.1、0.25、0.5、1.5、4.5、7.5、10.5、13.5 ml贮备液,置于25 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得相应质量浓度的RIS系列标准溶液。另称取盐酸小檗碱对照品7.5 mg,置于100 ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,即得质量浓度为75 μg/ml的内标溶液。上述溶液均置于4℃冰箱中保存,备用。

2.2 脑组织匀浆样品的制备与处理^[13]

用乙醚麻醉大鼠后断头,迅速开颅取出脑组织并精密称质量,以1:3(m/V)的比例加入0.9%的生理盐水,在冰水浴中采用玻璃匀浆器制备成脑组织匀浆。取脑组织匀浆200 μl,置于1.5 ml EP管中,加入内标溶液20 μl,再加入乙腈400 μl,漩涡振荡5 min,以离心半径为6 cm、转速13 000 r/min离心10 min,取上清液于另一干净EP管中,40℃水浴中以氮气吹干,残渣用200 μl甲醇溶解,取上清液进样测定。

2.3 色谱条件^[12,14]

色谱柱:Wondasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.01 mol/L醋酸铵溶液(50:50,V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:室温;进样量:25 μl。

2.4 系统适用性试验

按“2.2”项下方法进行操作,制备相应的空白脑组织匀浆、空白脑组织匀浆+对照品+内标、脑组织匀浆样品(给药后30 min)+内标,按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果显示,RIS约在6.0 min出峰,内标约在8.0 min出峰,RIS与内标分离良好,内源性物质无干扰,表明该方法的专属性良好。色谱图见图1。

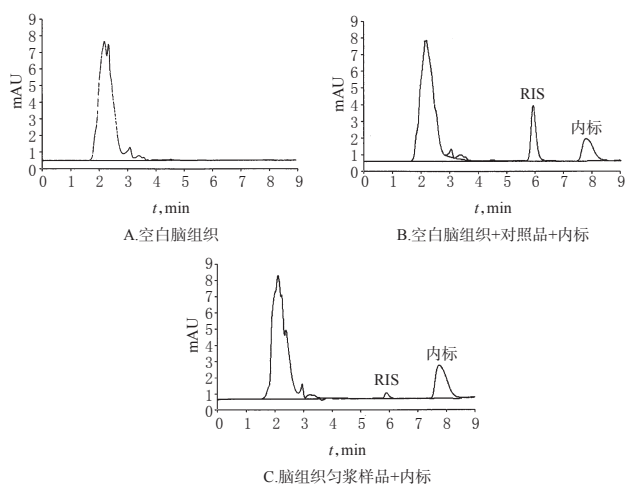


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.5 标准曲线的制备

取空白脑组织匀浆200 μl,分别加入不同质量浓度的RIS标准溶液20 μl,摇匀,即得质量浓度分别为0.2、0.5、1.0、3.0、9.0、15.0、21.0、27.0 μg/ml的RIS脑组织匀浆标准液,按“2.2”项下方法处理后,进样分析。以RIS与内标色谱峰面积的比值 $f(A_i/A_s)$ 对脑匀浆中RIS的质量浓度(c)作线性回归,得回归方程为 $f=0.057 6c+0.003 76(r=0.999 9,n=8)$ 。结果表明,RIS在质量浓度为0.2~27.0 μg/ml范围内与 f 呈良好线性关系。

2.6 精密度与回收率试验

取空白脑组织匀浆200 μl,精密加入不同质量浓度的RIS标准溶液20 μl,摇匀,即得质量浓度分别为0.5、15.0、21.0 μg/ml的RIS脑组织匀浆标准液,各5份,按“2.2”项下方法处理后,进样分析。日内重复进样5次,连续测定5 d,考察日内、日间精密度。将测得的RIS与内标峰面积比值代入RIS回归方程,计算RIS浓度,与制备浓度比较,求得该分析方法的方法回收率。将测得的RIS峰面积与相同质量浓度RIS甲醇溶液的峰面积进行比较,求得该分析方法的提取回收率。结果表明,本方法的精密度良好,方法回收率和提取回收率符合生物样品分析要求。精密度与回收率试验结果见表1。

表1 精密度与回收率试验结果($n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery tests($n=5$)

样品质量浓度, μg/ml	日内RSD, %	日间RSD, %	方法回收率, %	提取回收率, %
0.5	1.91	3.46	104.83	94.59
15.0	3.15	1.77	109.10	97.48
21.0	1.61	0.87	97.28	95.62

2.7 稳定性试验

按“2.2”项下方法分别制备质量浓度为0.5、15.0、21.0 μg/ml的RIS脑组织匀浆样品,于室温下放置24 h、-20℃下冷冻放置7 d以及经3次冷冻-解冻循环后,按“2.2”项下方法处理后,进样分析。结果,RIS脑组织匀浆样品在不同放置条件下RIS

的RSD均<10%,表明RIS脑组织匀浆样品在上述条件下均具有较好的稳定性。稳定性试验结果见表2。

表2 稳定性试验结果(n=3,%)

Tab 2 Results of stability tests(n=3,%)

样品浓度, μg/ml	不同放置条件下RSD		
	室温	冷冻	冷冻-解冻循环
0.5	5.05	6.08	5.27
15.0	4.95	5.80	1.51
21.0	4.27	1.53	2.77

2.8 检测限及定量限的测定

按“2.5”项下方法制备系列质量浓度的RIS脑组织匀浆样品,按“2.2”项下方法处理后,进样分析。当信噪比为3时测得该分析方法的检测限为0.2 μg/ml,当信噪比为10时测得定量限为0.5 μg/ml。

2.9 脑组织中药物含量测定

取SD大鼠6只,实验前禁食12 h,按剂量30 mg/kg^[12]ig以0.5%羧甲基纤维素钠溶液为溶剂配制的RIS混悬液,于给药30 min后迅速断头处死,按“2.2”项下方法处理后,进样测定,计算脑组织匀浆中RIS的浓度。结果,大鼠脑组织中RIS的平均含量为(3.48±0.50) μg/g,RSD为14.7%(n=6)。

3 讨论

由于血脑屏障的存在,血药浓度并不能预测脑组织中的药物浓度,故对于精神分裂症等中枢神经系统疾病的治疗,进行给药后脑组织内药物的分析测定以及脑组织分布的研究,对于今后研制开发鼻腔给药等脑靶向给药新制剂并阐明其靶向作用机制尤为重要^[15]。

RIS临床使用剂量小,po后在人体内的血药浓度已很低(ng/ml级),预计其透过血脑屏障进入脑组织内的药物量更小,故进行脑组织内药物的测定难度较大。为了提高分析方法的灵敏度及准确度,笔者在脑组织样品前处理过程中,一方面,将文献[16]报道的脑组织与生理盐水的质量体积比例(m/V)由原来1:10减小为1:3;同时,又将以乙腈为提取剂离心后所得上清液以氮气吹干,残渣用少量甲醇溶解后再进样,最终可大大提高进样液中药物与内标的浓度。在流动相选择过程中,曾采用文献[12]报道的流动相组成,即0.01 mol/L醋酸铵溶液与乙腈的体积比35:65,结果发现,药物及内标出峰时间较早,且内源性物质对二者均有明显的干扰;后将流动相组成比例调整为50:50时,药物及内标与内源性物质分离良好,保留时间适宜,且峰形也较好。

在建立了大鼠脑组织中RIS含量测定方法后,笔者尝试对ig给药30 min后大鼠脑组织中RIS的含量进行了测定,初步研究发现,RIS在脑组织内有一定分布。综上所述,本文所建立大鼠脑组织中RIS分析方法,具有简便、快速、灵敏、准确度高等特点,可用于大鼠脑组织中RIS的含量测定。

参考文献

[1] Takeuchi H, Fervaha G, Lee J, et al. Effectiveness of different dosing regimens of risperidone and olanzapine in schizophrenia[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2015, 25

(3):295.

[2] Takeuchi K, Sanjo K, Sakai A. Paliperidone, risperidone[J]. *Nihon Rinsho*, 2013, 71(4):654.

[3] Cabaleiro T, Ochoa D, López-Rodríguez R, et al. Effect of polymorphisms on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of risperidone in healthy volunteers[J]. *Hum Psychopharmacol*, 2014, 29(5):459.

[4] 左志辉,唐素芳,王卫.利培酮胶囊溶出度测定方法的研究[J].*天津药学*, 2013, 25(3):8.

[5] Mohammed KA, Ibrahim HK, Ghorab MM. Effervscent tablet formulation for enhanced patient compliance and the therapeutic effect of risperidone[J]. *Drug Deliv*, 2014, 15(1):1.

[6] Costantino HR, Illum L, Brandt G, et al. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects[J]. *Int J Pharm*, 2007, 337(1):1.

[7] Haschke M, Suter K, Hofmann S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nasally delivered midazolam[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2010, 69(2):607.

[8] Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, et al. Intranasal administration of carbamazepine to mice: a direct delivery pathway for brain targeting[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 60(1):32.

[9] 李颖,高永良,刘刚,等.经鼻腔给药的替莫唑胺脑靶向制剂对大鼠胶质瘤的治疗效果[J].*南方医科大学学报*, 2014, 34(5):631.

[10] 徐雄波,潘育方,黄志军,等.鼻腔给药尼莫地平纳米乳的制备及脑组织靶向性初步评价[J].*中国药学杂志*, 2012, 47(8):594.

[11] 蔚变霞.咪达唑仑滴鼻治疗小儿急性惊厥临床疗效观察[J].*实用医技杂志*, 2012, 19(3):298.

[12] 孙加琳,杜冠华.利培酮不同晶型状态对大鼠口服吸收的影响[J].*中国药学杂志*, 2011, 46(24):1919.

[13] 韩晓琳,陈晓,于善江,等.氢溴酸加兰他敏经鼻脑靶向性初步评价[J].*中国新药杂志*, 2009, 18(21):2084.

[14] 杨淑杰.利培酮和9-羟利培酮浓度测定[J].*中国社区医师:医学专业*, 2011, 13(36):214.

[15] 刘学伟,刘天宇,刘树民,等.龙胆碱在大鼠体内的药动学特征及透过血脑屏障的研究[J].*中国药房*, 2011, 22(19):1734.

[16] Mohammad F, Shadab M, Shadabul H, et al. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 47(1):6.

(收稿日期:2015-09-15 修回日期:2015-10-17)

(编辑:邹丽娟)