RP – HPLC 测定人血液和尿液中的倍他米松

盛 欣[1,2],廖林川[1*],颜有仪[1],杨 林[1],刘晓敏[1],詹兰芬[1],王智慧[2]
(1. 四川大学华西基础医学与法医学院,四川 成都 610041; 2. 四川大学华西药学院,四川 成都 610041)

摘要: **目的** 采用 HPLC 法测定人血液和尿液中的倍他米松。**方法** 以乙酸乙酯为萃取剂、泼尼松为内标。用 Welchrom C_{18} 柱,甲醇 – 水(60∶40)为流动相,检测波长 240 nm。**结果** 倍他米松在血液和尿液中的线性范围为 0.1 ~ 20 μg·mL^{-1}(r^2 > 0.999);检测限均为 0.02 μg·mL^{-1};平均方法回收率为 91% ~ 104%;日内、日间 *RSD* ≤ 4.6%;萃取回收率 ≥ 86.3%。**结论** 所建方法准确、灵敏、简便,适用于血液、尿液中倍他米松的分析。

关键词: 倍他米松;高效液相色谱法;血液;尿液
中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1006 – 0103(2011)02 – 0179 – 03

Determination of Betamethasone in the blood and urine by RP – HPLC

SHENG Xin[1,2], LIAO Lin – chuan[1*], YAN You – yi[1], YANG Lin[1], LIU Xiao – min[1], ZHAN Lan – fen[1], WANG Zhi – hui[2]
(1. *West China Preclinical and Forensic Medical College, Sichuan University, Chengdu, Sichuan*, 610041 *P. R. China*; 2. *West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan*, 610041 *P. R. China*)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish an HPLC method for determination of Betamethasone in the blood and urine of human. **METHODS** Ethyl acetate was uesed as the solvent for liquid – liquid extraction and prednisone was used as the internal standard. Separation was achieved on Welchrom C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column using $CH_3OH – H_2O$ (60∶40) as mobile phase. The detection wavelength was at 240 nm. **RESULTS** The linear limits of Betamethasone both ranged from 0.1 to 20 μg·mL^{-1}(r^2 > 0.999) in the blood and urine. The both limits of detection were 0.02 μg·mL^{-1}. The mean recovery of this method ranged from 91% to 104%. The intra and inter day precision of Betamethasone were no more than 4.6% and the mean extraction recovery was no less than 86.3%. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, sensitive and suitable for determination of Betamethasone in the blood and urine.

Key words: Betamethasone; RP – HPLC; Blood; Urine
CLC number: R917 **Document code:** A **Article ID:** 1006 – 0103(2011)02 – 0179 – 03

倍他米松为肾上腺皮质激素类药物,临床上用于治疗活动性风湿病、类风湿性关节炎、红斑狼疮、严重支气管哮喘、严重皮炎[1-2]等。在剂量过大或治疗时间过长时可致代谢紊乱,产生各种不良反应[3-4]。倍他米松的含量测定方法有 UV、GC、GC/MS、HPLC、LC/MS[5-9]等。UV 法方便快捷,但灵敏度、选择性均不高,只适用于医院制剂常规分析。GC、GC/MS 法需要经硅烷化试剂衍生化,操作繁琐费时。HPLC 法是目前比较常用的倍他米松制剂的含量测定方法,但鲜见以此法检测生物样品中倍他米松的报道。LC/ MS 法灵敏度高,专属性强,但仪器较为昂贵,因此,采用 RP – HPLC 法测定人血液和尿液中倍他米松的含量,方法准确、灵敏、简便,可用于药物安全性评价及法医毒(药)物分析检案的鉴定。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

1100 高效液相色谱系统(美国安捷伦);UV – 260 可见 – 紫外分光光度计(日本岛津)。倍他米松(天津天药药业股份有限公司,批号:BE040315);泼尼松对照品(中国药品生物制品检定所,批号:199 – 9401);乙酸乙酯、甲醇为色谱纯;水为超纯水(电阻 > 18 MΩ);其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 溶液的制备与样品的前处理 精密称取 50.0 mg 倍他米松对照品,用甲醇定容至 50 mL,得 1.0 mg·mL^{-1}的对照品贮备液。精密称取 3.0 mg 泼尼松内标,用甲醇定容至 100 mL,得 30.0 μg·mL^{-1}的内标溶液。所配溶液 4 ℃下贮存。取 1 mL 人血液或尿液,添加 100 μL 内标溶液,加入 1 mL 饱

作者简介:盛欣(1986—),女,重庆忠县,正攻读药物分析专业的硕士学位。
* 通信作者(Correspondent author),Email: linchuanliao@163.com

和氯化钠溶液，漩涡混合2 min，加入5 mL萃取溶剂乙酸乙酯，漩涡振摇提取5 min，于3×10^3 r·min^{-1}离心10 min，取上层有机层，于60 ℃水浴中通空气流挥干。残留物用100 μL甲醇溶解，于1.2×10^4 r·min^{-1}高速离心10 min，取上清液进样分析。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为Diamonsil C_{18}柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，预柱为同样填料的短柱(8 mm×4 mm)，流动相为甲醇-水(60∶40)，流速为1 mL·min^{-1}，柱温25 ℃，检测波长240 nm，同时收集190～360 nm的紫外吸收光谱，进样量为20 μL。

1.2.3 系统适用性试验 在"1.2.2"项色谱条件下，取倍他米松与内标对照品的混合溶液重复进样6次，倍他米松与内标的分离度>1.5；相对标准偏差小于2%；理论板数>1.4×10^4。

1.2.4 专属性试验 同法处理空白血、空白尿、血样中加入内标和尿样中加入内标，结果显示：血液和尿液中的内源性组分不干扰测定，倍他米松和内标的t_R分别约为14.5、7.9 min。其色谱图见图1。

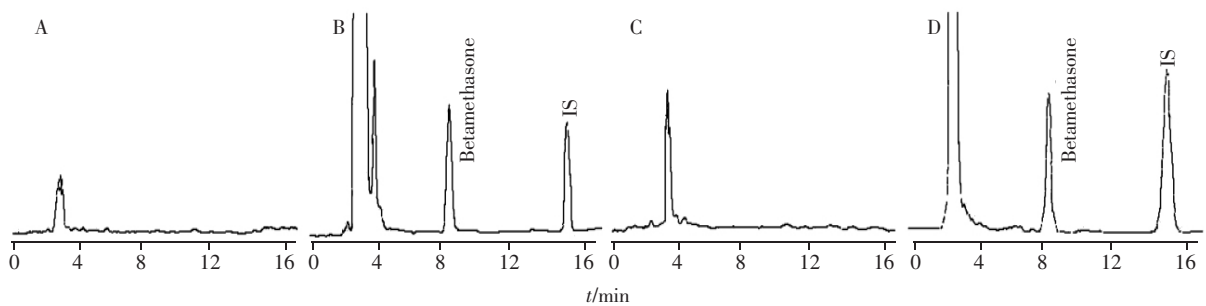

图1 空白血液(A)、血样加内标液(B)、空白尿液(C)、尿样加内标液(D)的色谱图

Fig 1 Chromatograms of blank blood (A), blank blood spiked with Betamethasone and IS (B), blank urine(C), blank urine spiked with Betamethasone and IS(D)

1.2.5 标准曲线的绘制 准确吸取1.0 mL空白血液或尿液数份，加入100 μL内标溶液，再加入50 μL不同浓度的倍他米松对照品溶液(对照品贮备液稀释所得)，制成含倍他米松浓度分别为20.0、10.0、5.0、2.0、1.0、0.4、0.1 μg·mL^{-1}的血液样品和尿液样品。按"1.2.1"项方法处理后，进样，记录峰面积。以倍他米松与内标峰面积的比值对样品中相应药物浓度作图，用最小二乘法进行回归运算，求得倍他米松的回归方程。在所测浓度范围内，倍他米松在血液和尿液中的线性关系均良好($r^2\geq0.999$)。结果见表1。

表1 血液和尿液中倍他米松的线性范围及检测限

Table 1 Linear range and detection limit of Betamethasone in blood and urine

Samples	Linear range/μg·mL^{-1}	Regression equation	r^2
Blood	0.10－20.00	$Y=0.3262X-0.0161$	0.9994
Urine	0.10－20.00	$Y=0.3395X+0.0246$	0.9991

1.2.6 检测限 取不同浓度的倍他米松对照品溶液(对照品贮备液稀释所得)，加入空白血液和尿液中，配制成浓度在标准曲线末端逐渐降低的系列生物样品。按"1.2.1"项进行前处理后进样，记录峰面积。以S/N≥3计，获得血液和尿液中倍他米松的检测限均为0.02 μg·mL^{-1}。

1.2.7 准确度与精密度试验 准确吸取1.0 mL空白血液和尿液数份，加入100 μL内标溶液，再分别添加50 μL不同浓度的倍他米松对照品溶液，制成高、中、低浓度的血液及尿液添加样品。每个浓度点平行添加6份，涡旋混匀后按"1.2.1"项方法操作，记录相应的峰面积。按照所建立的标准曲线进行处理和分析，得到倍他米松在血液和尿液中的方法回收率。于同日和不同日分别配制高、中、低浓度的血样及尿液添加样品，每个浓度点平行添加6份，按照所建立的方法以及标准工作曲线进行处理和分析，得到倍他米松在血液和尿液中的日内精密度和日间精密度(表2)。

表2 血液和尿液中他米松的回收率及精密度($n=6$)

Table 2 Accuracy and precision of betamethasone in blood and urine($n=6$)

Samples	C/μg·mL^{-1}	Recovery/%	Intra-day precision/%	Inter-day precision/%
Blood	0.4	98.8	4.1	4.6
	2.0	93.3	1.6	3.3
	10.0	101.1	2.1	2.7
Urine	0.4	95.1	1.7	2.4
	2.0	99.1	2.7	3.7
	10.0	101.6	2.2	3.4

1.2.8 萃取回收率试验 分别配制高、中、低浓度的血液和尿液添加样品，每个浓度点平行添加6份，按"1.2.1"项方法操作，记录相应的峰面积；另取同样高、中、低浓度的对照品溶液进样分析，记录相应的峰面积，分别计算相应浓度下添加血样、尿样与对照品的峰面积之比，得到倍他米松在血液和尿液中的平均萃取回收率均高于86.3%。

1.2.9　稳定性　将配制好的高、中、低浓度血液和尿液添加样品,分别于样品处理前、后室温下放置 1、2、4、12、24 h 后,按照所建立的方法以及标准工作曲线进行处理和分析,得到倍他米松在血液和尿液中浓度的相对误差小于 12%,基本稳定。

2　讨论

泼尼松与倍他米松均属于人工合成的肾上腺糖皮质激素,两者的化学结构相似(均具有甾核母体),酸碱性、溶解性相近,紫外光谱图也类似,其最大吸收波长均在 240 nm 处。作者选定的色谱条件下,泼尼松能够与待测组分达到理想的分离,且响应值相近似,故选择泼尼松作为内标物。倍他米松在乙酸乙酯、乙醚等有机溶剂中溶解度较高,因此,研究考察了乙酸乙酯、乙醚和氯仿溶剂的提取效果,结果显示:氯仿和乙酸乙酯对倍他米松的提取率均较高,以氯仿作为提取溶剂时,氯仿位于水相下层,不便于分离,且毒性较大,不宜采用;以乙酸乙酯作为提取溶剂时,样品中的杂质较少,萃取回收率较高且稳定,且毒性较小,因此,选择乙酸乙酯作为萃取溶剂。于样品中加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液可沉淀蛋白和防止乳化。在流动相的选择方面,结合相关文献[6-7],考察了甲醇 – KH_2PO_4(20、15、10 mmol·L^{-1})溶液系统,结果显示:以甲醇 – KH_2PO_4 溶液作为流动相时,血液中内源性杂质会干扰测定;采用甲醇 – 水系统(80∶20、75∶25、70∶30、60∶40)时的色谱行为,结果表明:以甲醇 – 水(60∶40)作为流动相时,倍他米松与内标完全分离且色谱峰的对称因子接近 1,内源性杂质不干扰测定,保留时间也比较合适,故选择甲醇 – 水(60∶40)为流动相。

文献[9]采用 LC – MS 法对倍他米松在健康人体内的代谢动力学规律进行了考察,结果显示:人血浆中的倍他米松峰浓度约为 20 ng·mL^{-1}。文中方法的检测限为 20 ng·mL^{-1},但测定的是全血中的药物浓度,且法医毒物分析案件大多是由药物过量摄入引起的,其全血药物浓度远远高于正常血药浓度,故所建方法能基本满足法医毒物分析鉴定的需要。文中建立的血液和尿液中倍他米松的 HPLC 分析方法简便、灵敏。经过方法学验证,其准确度、精密度和萃取回收率都达到了生物分析的要求,能满足药物安全性评价与法医毒物分析实际应用的需要。

参考文献:

[1] Jens M, Jensen MD, Stephan P, *et al*. Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(5): 1124 – 1133.

[2] Laurence F, Nathalie K, Wenhui H, *et al*. Effects of betamethasone on inflammation and emphysema induced by cadmium nebulisation in rats [J]. Eur J Pharmaco, 2009, 606: 210 – 214.

[3] 申国庆,龚春燕. 复方倍他米松注射液引起 2 例休克样过敏反应 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(1): 88.

[4] 余自成,张芳华,刘侃,等. HPLC 同时测定新复霜中氯霉素和倍他米松的含量 [J]. 华西药学杂志, 2005, 20(1): 75 – 76.

[5] 崔晓亮,邵兵,涂晓明. 动物园性食品中糖皮质激素残留检测技术进展 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(9): 1492 – 1496.

[6] Qiang F, Minshan S, Dwight C, *et al*. Development and validation of a stability – indicating RP – HPLC method for assay of betamethasone and estimation of its related compounds [J]. J Pharmace and Biomed Analy, 2010, 51: 617 – 625.

[7] 翁小红,朱晟,邢卫. 高效液相色谱法测定复方倍他米松注射液中 2 组分的含量 [J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(12): 13 – 14.

[8] Li C, Wu YL, Yang T, *et al*. Rapid simultaneous determination of dexamethasone and betamethasone in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution [J]. J Chromatography A, 2010, 1217: 411 – 414.

[9] Zou JJ, Dai L, Ding L, *et al*. Determination of betamethasone and betamethasone 17 – monopropionate in human plasma by liquid chromatography – positive/negative electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Chromatography B, 2008, 873: 159 – 164.

收稿日期:2010 – 07 – 13