

# RP-HPLC-荧光法测定NM394血药浓度及回归方程的选择

邵婷玘<sup>1,2\*</sup>, 乔华<sup>1#</sup>, 廖明琪<sup>1,2</sup>, 常威<sup>1</sup>, 李丹<sup>1</sup>, 马海忠<sup>1,2</sup>, 李玲<sup>1,2</sup> (1. 兰州大学第一医院药物临床研究机构, 兰州 730000; 2. 兰州大学药学院, 兰州 730000)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)14-1292-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.14.17

**摘要** 目的:探讨反相高效液相色谱-荧光(RP-HPLC-FLD)法用于NM394血药浓度分析时,如何根据仪器响应值的变化,通过适当的线性回归方式,提高测定的准确度。方法:配制NM394标准曲线系列样品,经处理后进样分析,根据标准曲线上各点准确度的变化规律,选择适当的点,拆分数据,用双标准曲线替代加权回归标准曲线,比较两种处理方法结果的准确度。结果:根据标准曲线各点准确度的变异规律选择拆分点,用双标准曲线替代加权回归标准曲线,结果测定数据在0.02~0.08、0.125~2.5 μg/ml范围内线性关系良好,标准曲线各点测得的准确度明显优于单条标准曲线和加权回归标准曲线计算结果。结论:在NM394药物浓度分析过程中,用适当方法拆分数据并进行线性回归,测定的准确度优于单条标准曲线加权回归的结果;经推广应用,该方法同样适用于RP-HPLC-FLD法对其他药物的浓度分析。

**关键词** NM394;血药浓度;反相高效液相色谱-荧光法;回归方程;双标准曲线

## Choice of Regression Equation for Blood Concentration of NM394 Measured by RP-HPLC-FLD

SHAO Ting-ji<sup>1,2</sup>, QIAO Hua<sup>1</sup>, LIAO Ming-qi<sup>1,2</sup>, CHANG Wei<sup>1</sup>, LI Dan<sup>1</sup>, MA Hai-zhong<sup>1,2</sup>, LI Ling<sup>1,2</sup> (1. Institute of Clinical Drug, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To improve the accuracy of determination by the response characteristics of the instrument and proper linear regression equation when blood concentration of NM394 were determined by RP-HPLC-FLD. METHODS: A series of blood samples of NM394 were prepared. After sampling, a point was selected and the data of standard curve was grouped, according to the accuracy changes of standard curves. By the point, weighted regression standard curve was replaced by double-standard curve, while the accuracy of two methods was compared. RESULTS: The point of splitting was selected according to the variation regularity of the accuracy of standard curves, and weighted regression standard curve was replaced by double-standard curve. By comparison, the accuracy of the points determined by double-standard curve was better than by single or weighted standard curve. CONCLUSIONS: In the analysis process of NM394 concentration, the standard curve data is grouped and linear regression is carried out by proper method in this paper. The linear ranges of NM394 are 0.02-0.08 μg/ml and 0.125-2.5 μg/ml. The accuracy of double-standard curve is better than that of single or weighted regression standard curve. This method is also applicable for other drugs during plasma concentration analysis by RP-HPLC-FLD.

**KEY WORDS** NM394; Blood concentration; RP-HPLC-FLD; Regression equation; Double-standard curve

NM394(Ulifloxacin)是一种氟喹诺酮类抗菌药物,也是普卢利沙星(NM441)在人体内的活性代谢产物<sup>[1]</sup>。NM394对革兰阳性菌和革兰阴性菌具有广谱抗菌作用,特别是对绿脓杆菌、沙雷菌属、肠杆菌属等革兰阴性菌有强大的抗菌效果;其最低抑菌浓度(MIC)与最低杀菌浓度(MBC)大致相同,杀菌作用快速而强大;主要用于治疗呼吸系统、尿路感染及外科、妇产科、皮肤科、眼科和牙科的感染。在药动学研究中,健康志愿者空腹口服普卢利沙星200 mg,血浆中NM394  $c_{max}$ 约为1.70 μg/ml,  $t_{max}$ 为0.5~1.0 h,  $t_{1/2}$ 为7.7~8.9 h<sup>[2]</sup>。在体内NM394血浆药物浓度分析中,目前多采用反相高效液相色谱-荧光(RP-HPLC-FLD)法、液-质联用(LC-MS)法等<sup>[3-5]</sup>。由于采样量少、血药浓度低、测定血药浓度范围宽,用RP-HPLC-FLD法进

行血药浓度分析时,根据《化学药物临床药代动力学技术指导原则》,须检测至达峰浓度的1/10~1/20,标准曲线范围较宽,各浓度点往往超出线性范围,使低浓度点不能准确定量。本文根据RP-HPLC-FLD法对NM394血药浓度分析的实践,总结经验,有效地提高了NM394血药浓度分析中计算的准确度。经实践发现,本方法同样可提高其他化合物RP-HPLC-FLD分析中计算的准确度。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200 HPLC仪,包含Chem Station for LC 3D工作站、G1311A四元梯度泵、G1329A自动进样器、G1319A柱温箱、G1321A荧光检测器、Mediawax固相萃取仪(美国Agilent公司);OASIS HLB SPE萃取小柱(美国Waters公司);DT-224S电子分析天平(北京赛多利斯公司)。

### 1.2 药品与试剂

NM394对照品(扬子江药业集团有限公司,批号:

\* 硕士研究生。研究方向:临床药理学、药剂学。电话:0931-8625799。E-mail:shaotingping@163.com

# 通信作者:主任药师,副教授。研究方向:临床药理学、药剂学。电话:0931-8625799。E-mail:qhbrain@163.com

20040513,纯度:99.2%);内标:巴洛沙星(江苏豪森药业有限责任公司,批号:20040609,纯度:99.09%);乙腈、甲醇为色谱纯,三乙胺、磷酸等其他试剂均为分析纯,水为自制纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 NM394系列标准溶液的配制

准确称取NM394对照品25.2 mg(相当于NM394 25 mg),置于25 ml量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)溶解并定容至刻度,得1 mg/ml的NM394储备液,精密量取本溶液适量,用甲醇稀释得40.0、30.0、20.0、10.0、5.0、2.5、1.6、1.2、1.0、0.8、0.6、0.4 μg/ml的NM394系列标准溶液。

### 2.2 内标工作液的配制

准确称取巴洛沙星25.2 mg(相当于巴洛沙星25.0 mg),置于25 ml量瓶中,加DMF溶解并定容至刻度,得1 mg/ml巴洛沙星贮备液;精密量取贮备液适量,甲醇稀释得50 μg/ml的巴洛沙星内标溶液,置-40℃冰柜储存备用。

### 2.3 NM394血药浓度分析的色谱条件及方法特异性

色谱柱:YMC-pack ODS-A(150 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:30℃;流动相:乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾(含三乙胺0.5%,85%磷酸调pH3.0)(26:74),流速1 ml/min;检测条件:0~4.5 min;激发波长( $\lambda_{ex}$ )280 nm、发射波长( $\lambda_{em}$ )435 nm,4.5~8.0 min; $\lambda_{ex}$ 280 nm, $\lambda_{em}$ 490 nm;进样量:40 μl。各测试样品的色谱图见图1,从图可以看出,杂质对样品的分析不干扰。

### 2.4 系列标准溶液的测定及其线性关系

取1 ml离心管,分别加入“2.1”项下方法配置的NM394系

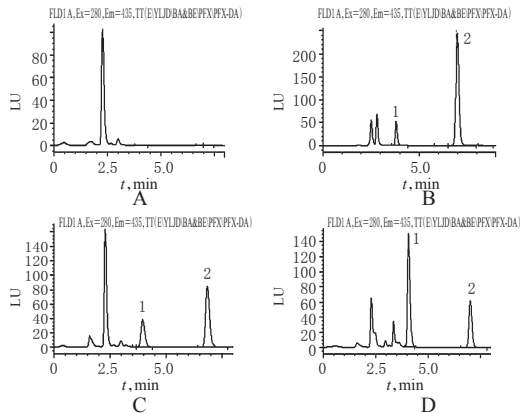


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B. NM394对照品溶液+内标溶液;C.空白血浆+NM394对照品溶液+内标溶液;D.受试者血浆;1. NM394;2.巴洛沙星

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. NM394 reference substance+internal standard; C. blank plasma + NM394 + internal standard; D. subjects plasma; 1. NM394; 2. balofloxacin

列标准溶液40 μl、50 μg/ml的巴洛沙星内标溶液40 μl,加蒸馏水20 μl、涡旋混匀,10 000 g离心5 min,进样40 μl,记录色谱。以NM394浓度(*c*)对NM394与内标峰面积比值( $R_{NM394/IS}$ )进行线性回归,得标准曲线方程: $c=18.442R_{NM394/IS}+0.3813$ ( $r=0.9992$ )。NM394标准系统溶液各配制质量浓度的准确度及相对偏差(RD)与NM394配置浓度关系见表1、图2。

表1 NM394标准系列溶液各配制质量浓度的准确度及相对偏差

Tab 1 Accuracy and relative standard deviation of every concentration point of NM394

项目	配制质量浓度, μg/ml												
	40.0	30.0	20.0	10.0	5.0	2.5	1.6	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	
$R_{NM394/IS}$	2.149 0	1.629 8	1.061 2	0.435 8	0.239 1	0.109 1	0.072 2	0.061 3	0.051 9	0.031 7	0.025 6	0.018 1	
各浓度点测定的准确度,%	100.0	101.5	99.8	84.2	95.8	95.7	107.1	126.0	133.8	120.8	142.2	178.8	
各浓度点的RD,%	0.0	1.5	-0.2	-15.8	-4.2	-4.3	7.1	26.0	33.8	20.7	42.2	78.8	

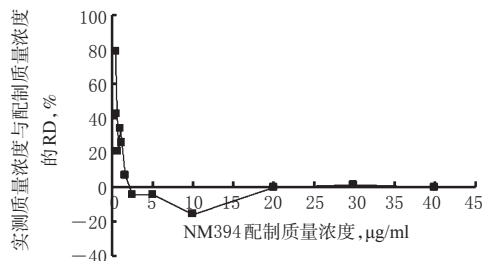


图2 实测质量浓度与配制质量浓度的相对偏差与NM394配制质量浓度关系图

Fig 2 The relationship of relative deviation between measured drug concentration and prepared drug concentration with prepared drug concentration of NM394

### 2.5 血药浓度分析中标准曲线的制备及线性关系

取1 ml离心管24只,分别加入“2.1”项下配制的NM394系列标准溶液及50 μg/ml的巴洛沙星内标溶液各40 μl,按浓度平行处理2份,加空白血浆0.8 ml,涡旋混合均匀,加三氯乙酸0.3 ml,涡旋1 min,10 000 g离心5 min。取OASIS HLB SPE萃取小柱,分别以1 ml甲醇和水活化,加上述处理过的样品,分别以5%甲醇、含2%氨水的甲醇0.5 ml洗脱,收集甲醇洗脱

液,氮气吹干,残渣加流动相100 μl复溶,进样40 μl,记录NM394及巴洛沙星色谱图,计算两者的峰面积比(*R*)对浓度萃取进行线性回归,得标准曲线方程1: $c=1.0844R-0.0115$ ( $r=0.9999$ ),线性范围:2.0~0.02 μg/ml。

### 2.6 双标准曲线截点的选择及线性关系

将“2.5”项下各浓度测得的峰面积比平均值代入标准曲线方程1,计算实测浓度,由以下公式计算实测浓度与配制浓度的RD。

$$RD = \frac{c_{\text{实测}} - c_{\text{配制}}}{c_{\text{配制}}} \times 100\%$$

以RD为纵坐标、浓度为横坐标,作图,得图3。以RD的零值为分界点,选择质量浓度0.25 μg/ml或0.125 μg/ml为截点,进行线性回归。本文以0.125 μg/ml为截点,将数据分为2组,即2.0~1.25 μg/ml及1.25~0.02 μg/ml组,分别回归,得标准曲线方程2: $c=0.9184R+0.0162$ ( $r=0.9999$ ),方程3: $c=0.9199R+0.0076$ ( $r=0.993$ )。线性范围分别为2.0~1.25 μg/ml、1.25~0.02 μg/ml。方程4为方程1的加权回归标准曲线,即: $c=0.927R+0.008$ ( $r=1.000, W=1/c, \text{DAS 2.0 拟合}$ )。

3种回归方程各点的实测质量浓度与配制质量浓度的RD见表2及图4。结果可见,NM394血药浓度在0.02~0.08 mg/

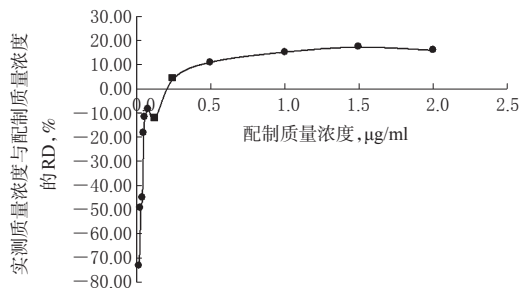


图3 方程1各浓度点的RD

Fig 3 Relative deviation of each concentration point of equation 1

表2 标准曲线线性关系及其各浓度点的RD

Tab 2 Linear relationship of standard curves and relative deviation at various concentration points

项目	配制质量浓度, $\mu\text{g/ml}$											
	2.000	1.500	1.000	0.500	0.250	0.125	0.080	0.060	0.050	0.040	0.030	0.020
峰面积比1	2.157 0	1.626 6	1.053 1	0.535 2	0.249 7	0.111 0	0.082 9	0.059 3	0.050 1	0.031 4	0.023 6	0.014 6
峰面积比2	2.138 9	1.638 2	1.092 6	0.509 6	0.251 7	0.112 1	0.073 2	0.059 7	0.046 4	0.030 5	0.025 5	0.016 5
峰面积比平均值	2.148 0	1.632 4	1.072 8	0.522 4	0.250 7	0.111 6	0.078 1	0.059 5	0.048 2	0.030 9	0.024 6	0.015 5
方程1各点的RD, %	15.9	17.2	15.2	11.0	4.1	-12.4	-8.5	-11.6	-18.5	-45.0	-49.4	-73.5
方程2及方程3各点的RD, %	-0.55	1.03	0.15	-0.81	-1.42	-5.05	-0.69	3.89	3.88	-9.94	0.77	9.29
加权回归方程各点的RD, %	-0.04	1.42	0.25	-1.55	-3.84	-10.84	0.50	5.26	5.36	-8.39	2.68	11.84

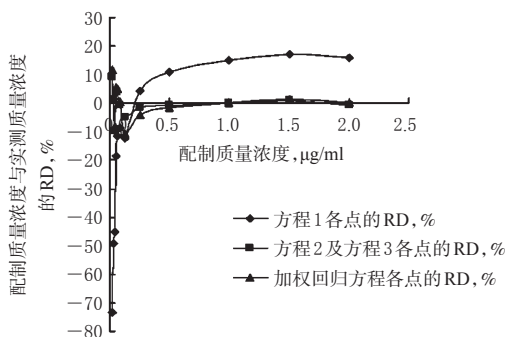


图4 方程1、方程2和方程3及加权回归曲线方程所得实测质量浓度与配制质量浓度的RD比较

Fig 4 Comparison of relative standard deviation of drug concentrations calculated by equation 1, equation 2, equation 3, and weighted regression curve equation with prepared concentration

校正方法就是对标准曲线进行加权回归。

在NM441片药动力学研究的过程中发现,用适当的方法,以双标准曲线替代单条标准曲线,其计算结果的准确度要明显优于单条标准曲线及加权回归标准曲线的计算结果。

根据药物浓度-峰面积比数据,以最小二乘法拟合的标准曲线方程,将峰面积比代入该方程计算实测质量浓度,计算实测质量浓度与配制质量浓度的RD,对浓度作图,得近似的一

ml、0.08~2.0 mg/ml 范围内与峰面积比有良好线性关系。拆分后两条标准曲线各点计算的准确度明显优于单条标准曲线计算结果,也优于加权回归标准曲线计算结果。

### 3 讨论

RP-HPLC-FLD法是普遍使用的一种药物浓度分析方法,在化学药物药理学研究的过程中,按照《化学药物临床药代动力学技术指导原则》,一般要求最低检测限要达到达峰浓度的1/10~1/20,因此,标准曲线一般要求有较宽的浓度范围。但由于机体的药物浓度较低及采样量的限制,加之不同仪器的响应特点,浓度与响应值往往只在一定范围内呈线性关系,高低浓度点常常超出仪器的响应范围而不能准确定量。常用的

条双曲线;选择系列浓度中RD最接近零的点为截点或分界点,将标准曲线系列数据分为2组,分别进行回归,得2条标准曲线方程,计算各点的实测质量浓度,其准确度明显优于单条标准曲线回归结果,也优于加权标准曲线计算结果。该方法在藁本内酯等药物浓度分析中应用显示,测试的准确度也显著提高,能够满足生物样品分析方法的要求,具有很好的推广应用价值。

### 参考文献

- [1] Takuji Y, Susumu M. Antibacterial activity of nm394, the active form of prodrug nm441, a new quinolone[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1993, 37(4): 793.
- [2] Nakashima M, Uematsu T, Kosuge K, et al. Pharmacokinetics and safety of NM441, a new quinolone, in healthy male volunteers[J]. *J Clin Pharmacol*, 1994, 34(9): 930.
- [3] 邹静,童荣生,何林,等.高效液相色谱法测定人血清中普卢利沙星活性代谢物浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(12): 1 015.
- [4] 封宇飞,李可欣,解飞,等.高效液相色谱荧光法测定人血浆中普卢利沙星活性代谢产物NM394的浓度[J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(6): 755.
- [5] 杨永革,许雪廷,邸晓辉,等.普卢利沙星片在健康人体的药代动力学研究[J]. *解放军药学报*, 2009, 25(5): 404.

(收稿日期:2012-12-13 修回日期:2012-12-30)