

HPLC法测定人血浆中氟罗沙星的浓度^Δ

吴干斌^{1*}, 张 军¹, 周建华¹, 李晓天^{2#}(1. 郑州大学第二附属医院西药学部临床药理学室, 郑州 450014; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450001)

中图分类号 R969.1; R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)34-3201-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.34.12

摘要 目的: 建立测定人血浆中氟罗沙星浓度的方法。方法: 血浆样品以甲醇处理后, 采用高效液相色谱法进行测定, 色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB C₁₈, 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(内含0.1%三乙胺, 磷酸调pH至2.5)(20:80, V/V), 流速为1.0 ml/min, 进样量为20 μl, 柱温为35℃, 检测器激发波长为290 nm, 发射波长为458 nm。结果: 氟罗沙星血药浓度在50~2 000 ng/ml范围内线性关系良好, 平均方法回收率为87.9%~90.3%, 日内、日间RSD均<11%。结论: HPLC法可用于人血浆中氟罗沙星的浓度测定。

关键词 氟罗沙星; 血浆; 高效液相色谱法; 血药浓度; 药动学

Determination of Fleroxacin Concentration in Human Plasma by HPLC

WU Gan-bin¹, ZHANG Jun¹, ZHOU Jian-hua¹, LI Xiao-tian²(1. Dept. of Clinical Pharmacy, Western Medicine Division, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China; 2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of fleroxacin concentration in human plasma. METHODS: HPLC method was adopted to determine the plasma concentration of fleroxacin after treated with methanol. Zorbax Eclipse XDB C₁₈ column was used with mobile phase consisted of acetonitrile-phosphoric acid buffer (containing 0.1% triethylamine, pH adjusted to 2.5 using phosphoric acid (20:80, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The sampling size was 20 μl, and the column temperature was 35 °C. The excitation wavelength of detector was set at 290 nm, and emission wavelength was set at 458 nm. RESULTS: The linear range of fleroxacin were 50-2 000 ng/ml. The average recoveries were 87.9%-90.3%, and RSD of intra-day and inter-day were all lower than 11%. CONCLUSIONS: The method can be used to determine the concentration of fleroxacin in human plasma.

KEY WORDS Fleroxacin; Plasma; HPLC; Plasma concentration; Pharmacokinetics

表2 3种基因型受试者单剂量口服比索洛尔主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters of bisoprolol in 3 different genotypes of healthy volunteers after oral administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)

基因型	$t_{1/2}, h$	t_{max}, h	$c_{max}, \mu g/L$	$AUC_{0-32h}, \mu g \cdot h/L$
CC	8.25 ± 1.80	2.44 ± 0.32	41.69 ± 11.22	394.38 ± 104.70
CT	7.70 ± 1.18	2.31 ± 0.37	37.69 ± 6.53	380.04 ± 84.04
TT	8.19 ± 1.86	2.38 ± 0.44	43.14 ± 5.85	414.08 ± 104.40

3组受试者口服比索洛尔后的药-时曲线经3p97软件分析, 符合一级动力学和一房室模型。表2中3种基因型 $t_{1/2}$ 、 c_{max} 、 AUC_{0-32h} 两两之间进行 t 检验, CC与CT比较的 P 值分别为0.49、0.39、0.77, CC与TT比较的 P 值分别为0.95、0.75、0.71, CT与TT比较的 P 值分别为0.54、0.10、0.48。3种基因型数据比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 讨论

本研究通过选取不同CYP2D6*10基因型的健康志愿者进

Δ 基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(No.092102310275); 郑州市科技局科研项目(No.CZSYJJ13007)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 临床药理学。电话: 0371-63974693。

E-mail: wganbin521@sina.com

通信作者: 副教授, 硕士研究生导师, 博士后。研究方向: 药动学。

E-mail: lixt@zzu.edu.cn

行比索洛尔的药动学试验, 以探讨在中国人群中比索洛尔是否与其同类药物美托洛尔一样受CYP2D6*10不同基因型的影响。由图2可见, 不同基因型的受试者药-时曲线基本无差异; 由表2可见, 3种基因型在 $t_{1/2}$ 、 c_{max} 、 AUC_{0-32h} 基本无差异($P>0.05$), 即CYP2D6*10基因多态性对比索洛尔的代谢无影响。此结果与文献^[1]报道相符。因此在临床使用比索洛尔时, 可以不必考虑CYP2D6*10基因多态性对其代谢的影响。

参考文献

- [1] 韩璐, 刘洁. CYP2D6基因多态性及对药物代谢的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(1): 105.
- [2] 李芹, 王睿, 郭雅, 等. 中国人CYP2D6基因多态性对美托洛尔药代动力学的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(7): 796.
- [3] Horikiri Y, Suzuki T, Mizobe M. Pharmacokinetics and metabolism of bisoprolol enantiomers in humans[J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87(3): 289.
- [4] Nozawa T, Taguchi M, Tahara K, et al. Influence of CYP2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and beta-adrenergic inhibition during long-term treatment: a comparison with bisoprolol[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, 46(5): 713.

(收稿日期: 2013-05-15 修回日期: 2013-06-16)

氟罗沙星是新一代喹诺酮类药物,用于治疗慢性复杂性尿路感染、单纯性尿路感染、淋病、软下疳、皮肤软组织感染、呼吸道感染、化脓性关节炎、胃肠道感染、骨髓炎等疾病均疗效良好^[1-4]。笔者参考历年文献中的氟罗沙星在生物样品的分析方法,并根据氟罗沙星的化学性质,建立人血浆中氟罗沙星的测定方法,并对色谱条件、样品预处理方法等进行了优化。

1 材料

1.1 仪器

1200 高效液相色谱仪,包括 G1322A 型在线真空脱气机、G1311A 型四元输液泵、G1313A 型自动进样器、G1316A 型柱温箱及 G1315A 型荧光检测器(美国 Agilent 公司);PHS-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)

1.2 药品与试剂

氟罗沙星(中国食品药品检定研究院,批号:130458-200902,纯度:99.6%);甲醇、乙腈为色谱纯,三乙胺为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-磷酸盐缓冲液(内含 0.1% 三乙胺,磷酸调 pH 至 2.5)(20:80, V/V);流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl;柱温:35 ℃;检测器激发波长:290 nm,发射波长:458 nm。

2.2 血浆样品预处理

取人血浆样品 250 μl 中,加入甲醇 500 μl,涡旋混匀 1 min,低温冷冻离心机离心(13 000 r/min) 6 min,取上清液即得。

2.3 方法的专属性

取人空白血浆 250 μl,按“2.2”项下操作,进样 20 μl,得色谱图 1A;将一定浓度的氟罗沙星标准溶液(500 ng/ml)加入空白血浆中,制得氟罗沙星浓度为 50 ng/ml 的血浆样品(LLOQ),进样分析,得色谱图 1B;同法操作,将一定浓度的氟罗沙星标准溶液(5 000 ng/ml)加入空白血浆中,制得氟罗沙星浓度为 500 ng/ml 的血浆样品,进样分析,得色谱图 1C,氟罗沙星的保留时间为 5.58 min;取给药后的人血浆样品,按“2.2”项下操作,得色谱图 1D。结果表明,人血浆中的内源性物质不干扰氟罗沙星的测定。

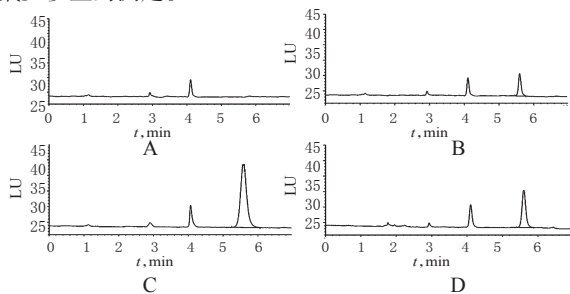


图 1 高效液相色谱图

A. 人空白血浆; B. 人空白血浆+500 ng/ml 氟罗沙星标准溶液; C. 人空白血浆+5 000 ng/ml 氟罗沙星标准溶液; D. 志愿者给药后血浆药品

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+500 ng/ml fleroxacin standard solution; C. blank plasma+5 000 ng/ml fleroxacin standard solution; D. plasma sample of healthy volunteers after medication

2.4 线性关系和定量下限考察

取人空白血浆 250 μl,加入氟罗沙星标准系列溶液 25 μl,配制成相当于氟罗沙星血药浓度分别为 50、100、200、500、1 000、2 000 ng/ml 的血浆样品,按“2.2”项下操作,进样 20 μl,记录色

谱图。以待测物浓度(X)为横坐标、待测物的峰面积(Y)为纵坐标,采用加权($W=1/X$)最小二乘法进行线性回归,求得回归方程为 $Y=0.664X+0.321$ ($r=0.9999$)。结果表明,氟罗沙星血药浓度在 50~2 000 ng/ml 范围内线性关系良好。

2.5 精密度与回收率试验

取人空白血浆共 250 μl,按“2.2”项下方法分别配制低、中、高 3 种浓度(氟罗沙星的血药浓度分别为 100、500、1 500 ng/ml)的质控(QC)样品,每种浓度均进行 6 个样本的分析并连续测定 3 d。根据当日的标准曲线,计算 QC 样品的测得浓度,再根据结果求算精密度和回收率。试验结果表明,此分析方法符合有关国际规范的要求^[4],所得数据见表 1。

表 1 回收率及精密度试验结果($n=18$)

配制浓度,ng/ml	精密度		方法回收率,%
	日内 RSD,%	日间 RSD,%	
100	9.7	9.1	90.3±6.3
500	11.3	9.1	87.9±5.5
1 500	10.2	10.1	88.6±4.7

2.6 样品稳定性

考察氟罗沙星血浆样品室温避光放置 2 h、血浆样品-20 ℃冷冻放置 1 周、血浆样品经历了 3 次冻融循环以及血浆样品经处理后在样品盘 4 ℃避光放置 24 h 的稳定性。

稳定性考察时,取人空白血浆 250 μl,配制氟罗沙星低、中、高 3 种浓度(氟罗沙星的血药浓度分别为 100、500、1 500 ng/ml)的血浆样品,每种浓度进行 6 个样本的分析,采用高效液相色谱荧光检测法测定。结果表明,氟罗沙星血浆样品室温避光放置 2 h 稳定[相对误差(RE)在-5.3%~-3.5%之间],血浆样品-20 ℃冷冻放置 1 周稳定(RE在-7.7%~-5.3%之间),血浆样品经历了 3 次冻融循环稳定(RE在-4.3%~3.2%之间),血浆样品经液-液萃取处理后在样品盘中 4 ℃放置 24 h 稳定(RE在-2.9%~3.7%之间)。

3 讨论

对于氟罗沙星检测波长的选择,笔者参考了国家食品药品监督管理局颁布的氟罗沙星葡萄糖注射液标准^[4],并且进行了试验验证。用试验中所用的流动相将氟罗沙星对照品配成溶液,通过紫外分光光度扫描,确认了其最大吸收波长^[5]。

由于氟罗沙星的结构式比较复杂,并且体内代谢产物也比较复杂,因此对血浆中氟罗沙星含量测定的影响因素比较多。而笔者通过采用 HPLC 法对血浆中的氟罗沙星含量进行测定,采用的流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(内含 0.1% 三乙胺,磷酸调 pH 至 2.5)(20:80, V/V),从而获得了分离度高、保留时间短、峰形较好、体内杂质无干扰,同时回收率高、线性良好、精密度高的分析方法。依据该方法可以更好地对血浆中的氟罗沙星浓度进行测定,值得推广和应用。

参考文献

- [1] 何慧丽,鲁燕侠,严莲珍.喹诺酮类抗菌药物的临床应用[J].中华医院感染学杂志,2007,17(6):725.
- [2] 许建成,周琪,刘韶晖,等.我院连续 5 年临床常见病原菌对喹诺酮类药物的耐药变迁[J].中国药房,2009,20(5):3 471.
- [3] Zeng H, Deng Y, Wu JT. Fast analysis using monolithic columns coupled with high-flow on-line extraction and electrospray mass spectrometric detection for the direct and si-

LC-MS/MS法测定人血浆中伪麻黄碱、可待因和愈创木酚甘油醚的浓度^Δ

杨汉煜^{1*}, 牛桂珍², 胡玉钦³, 赵曦¹, 高娜¹[1. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 石家庄 050035; 2. 石药集团中诺药业(石家庄)有限公司, 石家庄 050000; 3. 白求恩国际和平医院临床药理室, 石家庄 050051]

中图分类号 R969.1; R974*.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)34-3203-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.34.13

摘要 目的: 建立同时测定人血浆中伪麻黄碱、可待因和愈创木酚甘油醚浓度的方法。方法: 采用液-质联用(LC-MS/MS)法, 取血浆样品 0.5 ml 经固相萃取后, 以甲醇-2 mmol/L 醋酸铵(0.5% 甲酸溶液)(35:65, V/V)为流动相, *O*-去甲基右美沙芬为内标, 经 C₁₈ 柱分离; 采用双质谱(MS/MS)检测器, 电喷雾离子源(ESI), 以正离子多反应监测(MRM)方式进行定量分析, 用于监测的离子为 *m/z* 166.4→*m/z* 115.2(伪麻黄碱)、*m/z* 300.5→*m/z* 215.2(可待因)、*m/z* 199.3→*m/z* 125.2(愈创木酚甘油醚)、*m/z* 258.2→*m/z* 157.1(内标)。结果: 伪麻黄碱、可待因、愈创木酚甘油醚血药浓度分别在 1.0~1 000.0 ng/ml($r=0.999\ 1$)、0.5~500.0 ng/ml($r=0.999\ 6$)、5.0~5 000.0 ng/ml($r=0.999\ 7$) 范围内线性关系良好; 定量下限分别为 1.0、0.5、5.0 ng/ml; 提取回收率分别在 64.6%~69.1%、68.3%~72.8%、72.5%~75.5% 之间, 日内、日间 RSD 均 < 8.0%。结论: 本方法专属性强、灵敏、准确, 适用于伪麻黄碱、可待因、愈创木酚甘油醚的临床药动学研究。

关键词 伪麻黄碱; 可待因; 愈创木酚甘油醚; 液-质联用法; 药动学

Determination of Pseudoephedrine, Codeine and Guaifenesin Concentrations in Human Plasma by LC-MS/MS

YANG Han-yu¹, NIU Gui-zhen², HU Yu-qin³, ZHAO Xi¹, GAO Na¹ (1. Shijiazhuang Pharmaceutical Group Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China; 2. Shijiazhuang Pharmaceutical Group Novo Pharmaceutical (Shijiazhuang) Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China; 3. Dept. of Clinical Pharmacology, Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of pseudoephedrine, codeine and guaifenesin concentration in human plasma. METHODS: LC-MS/MS method was adopted. Pseudoephedrine, codeine, guaifenesin were solid-extracted from 0.5 ml plasma sample using *O*-desmethyl dextromethorphan as internal standard (IS). The samples were separated on C₁₈ column with mobile phase composed of methanol-2 mmol/L ammonium acetate (0.5% formic acid, 35:65, V/V). MS/MS detector and Electrospray ionization source (ESI) were applied and operated in positive ion MRM. Multiple reaction monitoring with mass transitions *m/z* 166.4→*m/z* 115.2, *m/z* 300.5→*m/z* 215.2, *m/z* 199.3→*m/z* 125.2 and *m/z* 258.2→*m/z* 157.1 were used for pseudoephedrine, codeine, guaifenesin and IS, respectively. RESULTS: The linear ranges were 1.0-1000.0 ng/ml ($r=0.999\ 1$) for pseudoephedrine, 0.5-500.0 ng/ml ($r=0.999\ 6$) for codeine and 5.0-5000.0 ng/ml ($r=0.999\ 7$) for guaifenesin. The lowest limits of quantification were 1.0 ng/ml, 0.5 ng/ml and 5.0 ng/ml; the extraction recoveries were between 64.6%-69.1%, 68.3%-72.8% and 72.5%-75.5%, respectively. RSDs of intra-day and inter-day were all less than 8.0%. CONCLUSIONS: The method is specific, sensitive and accurate, and suitable for clinical pharmacokinetics study of pseudoephedrine, codeine and guaifenesin.

KEY WORDS Pseudoephedrine; Codeine; Guaifenesin; LC-MS/MS; Pharmacokinetics

愈创木酚伪麻待因口服溶液是一种新型复方制剂, 其主要成分为盐酸伪麻黄碱、磷酸可待因和愈创木酚甘油醚。临床主要适用于缓解无痰干咳或少痰的剧烈、频繁咳嗽, 并可减轻鼻塞等症状。伪麻黄碱、可待因、愈创木酚甘油醚血药浓度测定方法国内外已有文献报道^[1-5]。但目前国内外均采用液-液萃取进行样品预处理后, 通过高效液相色谱(HPLC)法或液-质联

用(LC-MS/MS)法对 3 种组分分别进行测定, 所采用方法均较复杂、烦琐、干扰大且检测灵敏度低, 不适用于同时含有伪麻黄碱、可待因和愈创木酚甘油醚的生物样品的测定。笔者建立了同时测定血浆样品中伪麻黄碱、可待因、愈创木酚甘油醚 3 种组分的专属、灵敏、快速的 LC-MS/MS 法和简便的血浆样品预处理方法, 并将其应用于临床药动学样品的分析。

multaneous quantitation of multiple components in plasma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,

Δ 基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(No.2011ZX09401-306)

* 高级工程师。研究方向: 药理学试验。电话: 0311-67808866。E-mail: sjzhangqi@163.com

2003, 788(2): 331.

[4] 国家食品药品监督管理局. WS1-(X-058)-2002Z 氟罗沙星葡萄糖注射液[S]. 2002-01-01.

[5] 朱平. 高效液相色谱法测定氟罗沙星葡萄糖注射液中氟罗沙星的含量[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(2): 152.

(收稿日期: 2013-04-22 修回日期: 2013-06-28)