

高效液相色谱-质谱联用法测定人血浆中奥昔布宁的浓度

马仁玲¹, 周红华¹, 严玲³, 濮社班², 盛龙生¹ (1. 中国药科大学分析测试中心, 江苏 南京 210009; 2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210009; 3. 杭州市中医院药剂科, 浙江 杭州 310006)

摘要:目的 建立一种用高效液相色谱-电喷雾离子化质谱联用技术测定奥昔布宁血药浓度的方法。方法 以 0.01 mol/L 乙酸铵水溶液-甲醇(15:85)为流动相, 盐酸非洛普为内标, 血浆样品经用环己烷萃取后上样, 经 C₁₈ 柱分离后, 以质谱为检测器, 采用选择性离子检测(SIM)测定人体血浆中奥昔布宁的浓度。结果 线性范围 0.2~50 ng/mL ($r=0.9948$), 平均相对回收率在 90%~110% 之间, 日内和日间精密度的 RSD 均小于 10%, 奥昔布宁的定量限为 0.2 ng/mL, 提取回收率大于 90%。结论 该方法快速、准确、灵敏, 可用于奥昔布宁的药代动力学研究。

关键词: 高效液相色谱-质谱联用; 奥昔布宁; 药代动力学

中图分类号: R917.03; R969.11

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2003)06-0479-03

Determination of oxybutynin in human plasma by HPLC-MS

MA Ren-ling¹, ZHOU Hong-hua¹, PU She-ban², SHENG Long-sheng¹ (1. Center of Instrumental Analysis China Pharmaceutical University, Nanjin 210009, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a HPLC-ESI-MS method for determination of oxybutynin in human plasma. **METHOD** The mobile phase was composed of 0.01 mol/L ammonium acetate/water: methanol(15:85), phenoprolamine hydrochloride was used as internal standard. Plasma samples were extracted with cyclohexane and separated by C₁₈ column. The single quadrapole MS was used as detector. SIM was used for determination of oxybutynin in human plasma. **RESULTS** Standard curve was linear in the range of 0.2 to 50 ng/mL ($r=0.9948$), the relative recovery was between 90%~110%. RSD of intra-day and inter-day assays were all less than 10%. The limit of detection was 0.2 ng/mL. The extraction recovery was more than 90%. **CONCLUSION** The method developed is stable and reliable for determination of oxybutynin in human plasma as well as for pharmacokinetic studies.

KEY WORDS: HPLC-MS; oxybutynin; pharmacokinetics

奥昔布宁(oxybutynin)是一种用于治疗尿失禁、解痉的抗胆碱类药物^[1]。奥昔布宁血药浓度的测定笔者在国内尚未见文献报道。因奥昔布宁在人体血浆中的浓度较低,用 HPLC 法测定,紫外检测灵敏度不够。国外有文献报道用 GC-MS 来测定奥昔布宁的血药浓度^[2],但血样处理用两次有机溶剂提取,过程繁琐。本实验采用高效液相色谱-电喷雾离子化质谱(HPLC-ESI-MS)联用技术,以质谱为检测器,采用选择性离子检测(SIM)测定人体血浆中奥昔布宁的浓度,提高了检测灵敏度。用此法测定了 20 名健康志愿者口服两种奥昔布宁制剂后的血药浓度,对两者的药动学进行了比较,为临床用药提供了依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 LC/MSD 液相色谱/质谱联用仪;具二元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、恒温柱箱、电喷雾(ESI)接口、MSD 检测器、Agilent 化学工作站。

受试制剂:奥昔布宁口服液(批号 020301, 1 mg/mL, 珠海联邦制药有限公司);参比制剂:奥昔布宁片剂(批号 011201, 5 mg/片, 湖南株洲制药厂市售产品);奥昔布宁标准

品(珠海联邦制药股份有限公司);内标:盐酸非洛普(DDPH, 中国药科大学有机教研室合成);甲醇:色谱纯(美国 Tedia 公司);试剂均为分析纯;水为重蒸水。

1.2 液相色谱与质谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈ 柱, 4.6 mm × 250 mm, 5 μm 粒径。流动相:0.01 mol/L 醋酸铵水溶液:甲醇(15:85)。柱温:35℃。流速:1 mL/min。质谱检测参数:电喷雾离子化, 正离子方式检测, 选择性离子检测(SIM):奥昔布宁 m/z 358.3 [M+H]⁺;盐酸非洛普 m/z 344.1 [M+H]⁺。电喷雾参数:喷雾电压为 4000 V;传输/裂解电压为 100 V;干燥气(N₂)流速 10 L/min;辅助雾化气(N₂)压力 279.5 kPa;干燥气温度 350℃。

1.3 样品制备

对照品溶液的配制:精密称取奥昔布宁对照品适量,以甲醇溶解配制成约 500 μg/mL 的对照品贮备液,以水稀释成各种浓度的奥昔布宁对照品溶液;精密称取内标适量,加甲醇溶解配制成约 200 μg/mL 的内标贮备液,以水经过几步稀释得浓度约为 200 ng/mL 的溶液作为内标溶液。

血浆样品的处理:取 10 mL 尖底玻璃离心管,加入待测血浆

1 mL,加入内标溶液 25 μ L,加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液0.1 mL,加环己烷 5 mL,涡旋 3 min,3500r/min 离心 10 min,取上层清液约 4 mL 于另一离心管中,N₂ 气吹干(40℃水浴),加入流动相 100 μ L,涡旋 60s,溶解残渣。16000 r/min 离心 10 min,取 30 μ L 上层清液注入 HPLC-ESI-MS 系统,记录分析结果。

2 方法学研究

2.1 方法的专属性

在本实验条件下,血浆中杂质不干扰样品的测定。奥昔布宁和内标溶液的保留时间分别为 7.8 min 和 4.0 min,见图 1,从图中可见本法具有较高的专属性。

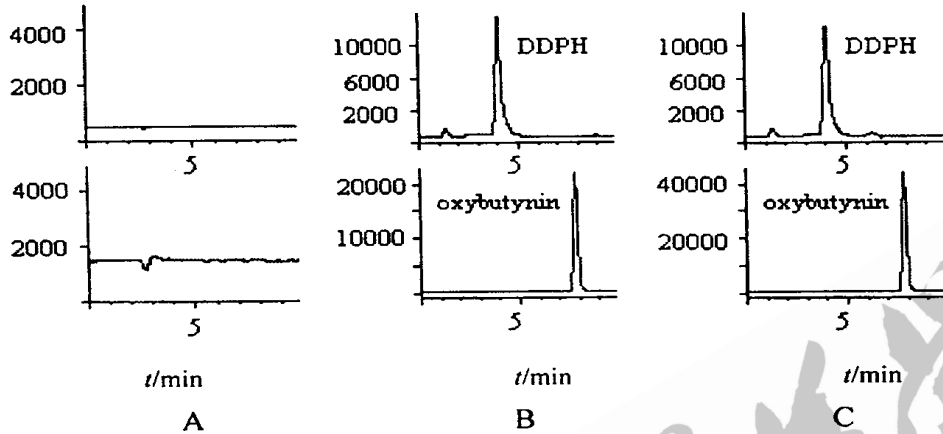


图 1 HPLC-MS 色谱图

Fig 1 HPLC-MS chromatograms

A:空白血浆;B:空白血浆加奥昔布宁和内标;C:志愿者口服奥昔布宁后的血浆样品

A:blank plasma;B:oxybutynin and DDPH in blank plasma;B:plasma sample after oral administration of oxybutynin

2.2 血浆中奥昔布宁标准曲线的制备

精密取奥昔布宁对照品溶液适量置于离心管中,各加入空白血浆 1 mL 和内标溶液 25 μ L,制成浓度约为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL 的血浆样品。按“血浆样品处理”项下操作,每种浓度做 5 份样品,记录峰面积。以奥昔布宁的标准浓度为横坐标,奥昔布宁与内标的峰面积比值(A_s/A_{is})为纵坐标,按 $1/y^2$ 权重进行线性回归,绘制标准曲线图。结果表明,奥昔布宁在 0.2 ~ 50 ng/mL 浓度范围内,线性关系良好。回归方程为 $Y = 0.2290X + 0.0093$,相关系数 $r = 0.9948$ 。奥昔布宁的定量限为 0.2 ng/mL ($S/N = 10$)。

2.3 精密度

按“标准曲线制备”项下操作配制奥昔布宁浓度分别为 0.2、5.0 和 20.0 ng/mL 的血浆样品,加入内标溶液 25 μ L,按“血浆样品处理”项下操作,用 HPLC-ESI-MS 测定,计算奥昔布宁与内标的峰面积比值。测定日内精密度和 5 d 内的日间精密度,结果见表 1。

表 1 奥昔布宁日内与日间精密度 ($n = 5$)

浓度 (ng/mL)	日内		日间	
	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
0.2	0.21 $\pm$ 0.01	5.69	0.22 $\pm$ 0.02	8.41
5.0	4.65 $\pm$ 0.11	2.37	4.80 $\pm$ 0.15	3.20
20.0	21.4 $\pm$ 0.37	1.72	21.9 $\pm$ 0.25	1.12

2.4 相对回收率

按“标准曲线制备”项下操作配制奥昔布宁浓度分别为 0.2、5.0 和 20.0 ng/mL 的血浆样品,加入内标溶液 25 μ L,按“血浆样品处理”项下操作,用 HPLC-ESI-MS 分析,计算奥昔

布宁浓度测得值与真实值的比值,结果见表 2。

表 2 奥昔布宁相对回收率 ($n = 5$)

浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
0.2	103.5 $\pm$ 5.91	5.67
5.0	92.86 $\pm$ 2.19	2.37
20.0	107.1 $\pm$ 1.85	1.72

2.5 提取回收率

按标准曲线项下操作,用水代替血浆,配制含奥昔布宁低、中、高三个浓度的样品,每一个浓度做 5 份,计算奥昔布宁的提取回收率,结果见表 3。

表 3 奥昔布宁提取回收率 ($n = 5$)

浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
0.2	96.86 $\pm$ 3.09	3.58
5.0	98.00 $\pm$ 1.16	1.18
20.0	98.79 $\pm$ 1.20	1.21

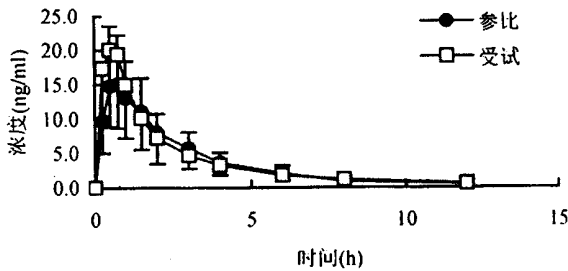


图 2 20 名健康志愿者口服奥昔布宁口服液与片剂后平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of oxybutynin in 20 volunteers after oral administration of two preparations

3 方法应用

20 名健康男性受试者,按双交叉设计试验方法服药,即将 20 名健康志愿者随机分为两组,10 名志愿者服用奥昔布宁口服液,每人 5 mg(相当于 5 mL),另 10 名志愿者服用参比片剂 5 mg,均用温开水 200 mL 吞服。服药后 0,0.25,0.5,0.75,1,1.5,2,3,4,6,8,12 h 各取静脉血 3 mL,血样置肝素抗凝管内,经离心后分离血浆,置 -20℃ 保存备用,一星期后交叉重复上述试验。

20 名健康志愿者口服奥昔布宁口服液和片剂 5 mg 后,其给药后的血药浓度-时间曲线见图 2。将所得血药浓度-时间数据用 Bapp2.0 程序计算药物的主要药动学参数,再取均值($\bar{x} \pm s$),结果见表 4。

表 4 奥昔布宁口服液和参比片剂的主要药代动力学参数

Tab 4 Main pharmacokinetic parameters of oxybutynin in plasma after oral administration

参数	口服液	片剂
$T_{1/2}/h$	3.54 ± 0.96	2.97 ± 1.07
T_{max}/h	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	26.85 ± 11.87	18.33 ± 7.88
$AUC_{0-12}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	48.25 ± 19.42	45.56 ± 16.35
$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	51.51 ± 20.61	48.40 ± 18.61

参考文献

- [1] Yarker YE, Goa KL, Fitton A. Oxybutynin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in detrusor instability[J]. Drugs Aging, 1995, 6(3): 243.
- [2] Patrick KS, Markowitz JS, Jarvi EJ, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of plasma oxybutynin using a deuterated internal standard[J]. J of Chromatography (Biomolecular Application), 1989, 487: 91.

收稿日期:2003-01-27