

• 药物分析与检验 •

高效液相色谱法测定格拉司琼血药浓度

任斌,黎曙霞,卢秉忠,邓斌,唐蕾(中山大学附属第一医院药学部,广东 广州 510080)

摘要:目的 建立格拉司琼血药浓度的高效液相色谱测定方法。方法 以甲醇-0.05mol·L⁻¹醋酸钠缓冲液(pH6.0,含0.25%三乙胺)(97:3)为流动相,激发波长为305nm,发射波长365nm,血浆样品采用乙酸乙酯提取后进样。结果 格拉司琼在0.1~7.5 μg·L⁻¹浓度范围内线性关系良好,平均回收率(99.5±8.7)%,日内RSD≤8.0%,日间RSD≤9.7%。结论 该方法简便,准确,可用于格拉司琼临床药动学研究。

关键词:格拉司琼;高效液相色谱法;血药浓度

Measurement of granisetron in plasma by high performance liquid chromatography

REN Bin, LI Shu-xia, LU Bing-zhong, DENG Bin, TANG Lei(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a HPLC method to measure the plasma concentration of granisetron. **METHOD** Mobile phase was a mixture of methanol and 0.05mol·L⁻¹ sodium acetate buffer (pH6.0) contained 0.25% (v/v) triethylamine (97:3). A fluorescence detector of 305nm for excitation and 365nm for emission was used. Ethyl acetate was used for liquid-liquid extraction. **RESULTS** The assay procedure was shown to produce linear calibration curves over the range 0.1 μg·L⁻¹ to 7.5 μg·L⁻¹. Within the range, the recovery rate was (99.5±8.7)%. The coefficients of variation within a day and between days did not exceed 8.0%, 9.7%, respectively. **CONCLUSION** This method is found to be easy, convenient and precise for clinical pharmacokinetics study of granisetron.

KEY WORDS: Granisetron; HPLC; Plasma concentration

格拉司琼(Granisetron)是一种强效高选择性外周和中枢神经系统 5-HT₃ 受体拮抗剂,通过对上端小肠腹部向心神经纤维和孤束核或呕吐化学感受区的 5-HT₃ 受体的阻断作用,抑制抗肿瘤药物和放疗引起的恶心和呕吐。本实验建立了格拉司琼的血药浓度测定方法,用于格拉司琼临床药动学研究。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱系统(600 低压梯度泵,717 自动进样器,474 荧光检测器,Mellenium³² 色谱工作站);XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);KS 型康氏振荡器(广州市富城仪器厂);LXJ-II 离心沉淀机(上海医用分析仪器厂);高速离心机(美国雅培公司 TDx 仪附件)。

盐酸格拉司琼对照品(浙江海正药业股份有限公司提供,批号:981008,纯度:99.5%),甲醇(色谱纯,Fisher Chemicals,USA),其余试剂为分析纯。

2 色谱条件

色谱柱为 Hypersil CN 柱(150mm×4.6mm,5 μm);柱温 40℃。流动相为甲醇-0.05mol·L⁻¹醋酸钠缓冲液(pH=6.0,含0.25%三乙胺)=97:3;流速 1mL·min⁻¹。检测波长为:λ_{ex}=305nm,λ_{em}=365nm。

3 试验方法

3.1 标准溶液配制

精密称取盐酸格拉司琼对照品适量,置于 50mL 容量瓶中,用蒸馏水溶解并定容,得格拉司琼储备液(200mg·L⁻¹);将格拉司琼储备液以水稀释,配制浓度分别为 2,4,10,20,40,100,150 μg·L⁻¹ 的格拉司琼标准液。

3.2 血浆样品的处理与测定

吸取血浆 1mL,加入 0.1mol·L⁻¹ NaOH 溶液 100 μL,旋涡混合。加入乙酸乙酯 3mL,水平振荡 10min,离心 2500r·min⁻¹×10min,分离乙酸乙酯层,N₂ 吹干。残渣加入 0.05mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH=6.0)100 μL,旋涡混合 1min,离心 10500r·min⁻¹×10min。吸取 50 μL 进样。记录色谱图,以样品峰面积 A_s 代入标准曲线计算血药浓度。

3.3 标准曲线

精密量取空白血浆 1mL,置 10 mL 具塞离心管中,分别加入不同浓度的格拉司琼标准溶液 50 μL,混匀,使血药浓度分别为 0.1,0.2,0.5,1,2,5,7.5 μg·L⁻¹。按血浆样品的处理与测定方法操作,以不同浓度格拉司琼系列溶液的 A_s 为纵坐标,格拉司琼浓度 C 为横坐标进行直线回归。

3.4 回收率及精密度

分别于 1mL 空白血浆中加入低、中、高 3 种浓度的格拉司琼标准溶液 50 μL,混匀,使血药浓度分别为 0.2,2,7.5 μg

• L⁻¹,按血浆样品的处理与测定方法操作,以标准曲线方程计算出格拉丝琼血药浓度,以测得值与加入值之比计算回收率,以1d内测得的格拉丝琼浓度计算日内精密密度,以一周内5次测定的格拉丝琼浓度计算日间精密密度。

4 结果

4.1 色谱行为

在上述色谱条件下,格拉丝琼与血浆杂质分离良好,其保留时间为5.45 min。色谱图见图1。

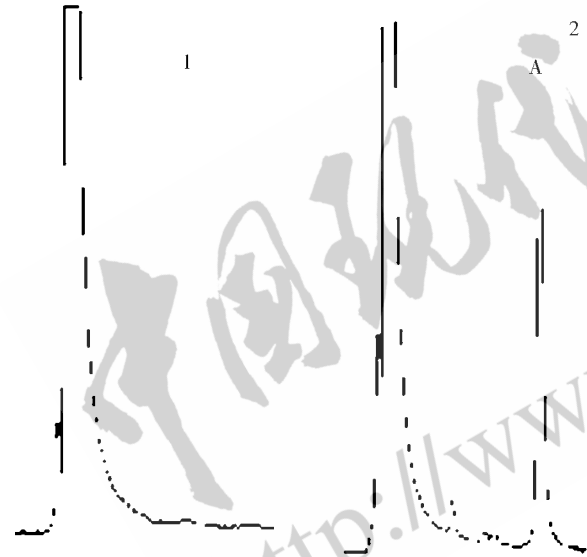


图1 格拉丝琼色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of Granisetron

1. 空白血浆;2. 血浆样品;A. 格拉丝琼

1. blank plasma; 2. plasma sample; A. Granisetron

4.2 线性范围

在0.1~7.5 μg • L⁻¹浓度范围内,格拉丝琼峰面积 As

与浓度 C 有良好的线性关系,标准曲线方程为: As = 1 569 724. 412C + 2 107. 726(r=0. 999 7)。以信噪比 S/N= 3 : 1 计,格拉丝琼最低检测浓度为 0. 1μg • L⁻¹。

4.3 回收率及精密密度

高、中、低三种浓度回收率见表。日内 RSD≤8. 0%, 日间 RSD≤9. 7%。结果见表1。

表1 格拉丝琼回收率与精密密度试验(n=5)

Tab 1 Recovery and precision of Granisetron (n=5)

浓度 (μg • L ⁻¹)	实测值 (μg • L ⁻¹)	回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
0. 2	0. 21±0. 02	104. 4±7. 7	7. 4	9. 7
2	1. 95±0. 16	97. 3±7. 8	8. 0	7. 2
7. 5	7. 73±0. 48	103. 1±6. 4	6. 2	5. 9

5 讨论

5.1 格拉丝琼分子结构中有含氮基团,在 C18 色谱柱上保留较强,易造成拖尾。本实验采用 CN 柱,并在流动相中加入三乙胺,可消除格拉丝琼色谱峰拖尾现象,使峰形对称。

5.2 文献报道^[1]格拉丝琼提取采用甲苯为提取溶剂,由于甲苯毒性较大,本试验中改以乙酸乙酯提取,其毒性较小,提取回收率高,血浆提取物杂质干扰少,格拉丝琼最低检测浓度可达 0. 1μg • L⁻¹,取得了较好的效果。

参考文献

[1] Frederic P, Francoise B, Pascal M, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of granisetron in human plasma[J]. J. Chromatogr. B, 1996,675:99.
[2] Shinobu K, Tomoyuki S, Hideki O, *et al.* Simultaneous determination of granisetron and 7-hydroxygranisetron in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J. Chromatogr. B, 1994,660:205.

收稿日期:2003-05-30