

# 反相高效液相色谱法测定血浆中沙奎那韦浓度

胡晓渝, 周惠燕, 俞松林(浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

**摘要:**目的 建立血浆中沙奎那韦浓度的 RP-HPLC 测定法。方法 以  $C_{18}$  色谱柱为固定相, 乙腈-0.01 mol · L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 7.5) = 62:38 为流动相, 紫外检测波长为 240 nm, 以盐酸维拉帕米为内标。结果 沙奎那韦在 0.6 ~ 12.5 μg · mL<sup>-1</sup> 的范围线形良好 ( $Y = 0.0547X - 0.0236, r = 0.999$ )。0.625, 3.125, 12.50 μg · mL<sup>-1</sup> 沙奎那韦的回收率分别为 110.3%, 95.8%, 100.8%。三个浓度的日内 RSD 分别为 3.3%, 1.9%, 1.4%, 日间 RSD 分别为 4.4%, 3.1%, 1.8%。结论 可用本法快速、简便、准确地测定血浆中沙奎那韦浓度。

**关键词:** 沙奎那韦; 血药浓度; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R978.7

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2007)04-0305-02

## Determination of Saquinavir in Plasma by RP-HPLC

HU Xiao-yu, ZHOU Hui-yan, YU Song-lin( Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the determination of saquinavir in plasma. **METHODS** RP-HPLC was carried out by using  $C_{18}$  column and acetonitrile-0.01 mol · L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 7.5) = 62:38 as mobile phase, the detection wavelength was 240 nm, verapamil hydrochloride was used as the internal standard. **RESULTS** A good linear range in 0.6 ~ 12.5 μg · mL<sup>-1</sup>,  $r = 0.999$  was obtained. The recovery were 95.8% - 110.3%. The RSD of inter-day were 1.4% - 3.3% and the RSD of intra-day were 1.8% - 4.4%. **CONCLUSION** This method is rapid, simple, accurate and can be used for the determination of saquinavir in plasma.

**KEY WORDS:** Saquinavir; plasma concentration; RP-HPLC

沙奎那韦 (Saquinavir) 是一种极为有效并具有选择性的爱滋病病毒 (HIV) 的蛋白酶抑制剂, 在急性感染的淋巴样干细胞中已显示出抗 HIV-1, HIV-2 及对齐多夫定产生耐药性的 HIV-1 的强大抗病毒活性, 在临床上得到了广泛的应用。而有关沙奎那韦血药浓度测定方法国内未见报道, 笔者建立了反相高效液相色谱法测定血浆中沙奎那韦浓度的方法, 并测定了其在大鼠血浆中的药物浓度。

### 1 材料与仪器

#### 1.1 药品与试剂

沙奎那韦由浙江华海药业股份有限公司提供, 盐酸维拉帕米由南京第二制药厂提供, 其他试剂均为国产分析纯或色谱纯。

#### 1.2 仪器

Agilent - 1100 系列高效液相色谱仪, G1314A 可见-紫外检测器, 安捷伦科技有限公司; 80-2 型离心沉淀器, 上海手术器械厂。

### 2 方法

#### 2.1 色谱条件

以迪马  $C_{18}$  (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 乙腈-0.01 mol (pH 7.5) 磷酸氢二钾溶液 (62:38) 为流动相, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 紫外检测波长 240 nm。

#### 2.2 标准曲线的制备

取大鼠空白血浆 80 μL, 加入沙奎那韦 (0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg · mL<sup>-1</sup>) 各 5 μL, 加入 40 μL 磷酸氢二钾溶液 (0.01 mol, pH 7.5), 加入 5 μL 盐酸维拉帕米 (0.23 mg · mL<sup>-1</sup>) 为内标, 加入内标后混匀, 最后加入 1.0 mL 乙醚, 旋涡提取 2 min, 8 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取有机层挥干, 加入 70 μL 流动相溶解残渣, 取 20 μL 进样。以沙奎那韦溶液浓度为横坐标, 沙奎那韦峰面积与维拉帕米峰面积之比为纵坐标, 做得标准曲线。

#### 2.3 精密度和回收率试验

日内精密度: 分别用空白血浆配制低、中、高三个不同浓度的样品溶液, 按“2.2”项下测定, 各浓度平行测定 5 次。日间精密度: 同日内精密度测定方法。分别配制各浓度溶液 5 份, 置冰箱保存, 连续 5 d 测定。

分别用空白血浆配制低、中、高三个不同浓度的样品溶液, 按“2.2”项下测定, 根据标准曲线计算各溶液中沙奎那韦浓度, 并与加入量比较, 得到相对回收率。分别用空白血浆配制低、中、高三个不同浓度的样品溶液, 按“2.2”项下测定, 所得峰面积之比与同量的沙奎那韦溶液直接进样后所得峰面积之比相比, 得到绝对回收率。

#### 2.4 稳定性试验

基金项目: 宁波市科技局青年基金项目 (2004A620006)

作者简介: 胡晓渝, 女, 硕士 E-mail: hu\_xiaoyu@eyou.com

**2.4.1 样品冷冻稳定性试验** 配制含沙奎那韦对照品的血浆5份,冷冻储存,分别于0,10,20,30,45 d按“2.2”项下方法操作,测定浓度,结果表明含沙奎那韦对照品的血浆冷冻放置45 d内稳定,RSD=1.2%。

**2.4.2 样品反复冻融稳定性试验** 配制含沙奎那韦对照品的血浆5 mL,即时测定,再冷冻保存,解冻测定,反复4次,分别按“2.2”项下方法操作,测定浓度,结果表明含沙奎那韦对照品的血浆反复冻融后稳定,RSD=1.4%。

**2.4.3 样品室温下放置稳定性试验** 配制含沙奎那韦对照品的血浆5 mL,在放置0,2,4,8,12 h后,分别按“2.2”项下方法操作,测定浓度,结果表明含沙奎那韦对照品的血浆在室温下放置12 h内稳定,RSD=1.0%。

**2.5 血药浓度的测定**

雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 170 ~ 230 g,颈动脉注射给予剂量为  $0.005\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的沙奎那韦。取样时间为 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 min,采血量 0.25 mL。 $5\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心后取上层血浆 80  $\mu\text{L}$ ,按照上述“2.2”项操作,测定沙奎那韦的浓度。

**3 结果**

**3.1 色谱行为**

在上述色谱条件下,沙奎那韦与盐酸维拉帕米及血浆内源性物质实现基线分离,沙奎那韦保留时间为 8.9 min,盐酸维拉帕米保留时间为 12.1 min。空白大鼠血样色谱图、注射沙奎那韦后大鼠血样色谱图和注射沙奎那韦后大鼠血样色谱图(加入盐酸维拉帕米后)分别见图 1 的 A、B、C。

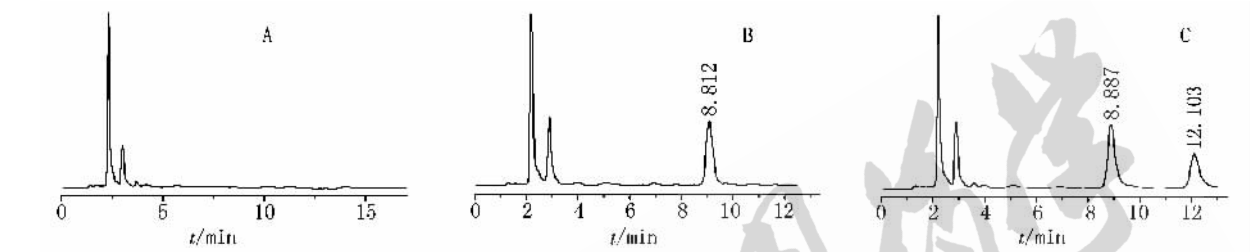


图1 大鼠血样色谱图

A. 空白大鼠血样色谱图;B. 注射沙奎那韦后大鼠血样色谱图;C. 注射沙奎那韦后大鼠血样色谱图(加入盐酸维拉帕米后)

**Fig 1** HPLC chromatogram of SD rat plasma

A. HPLC chromatogram of blank plasma; B. HPLC chromatogram of plasma with saquinavir; C. HPLC chromatogram of plasma with saquinavir and verapamil hydrochloride

**3.2 线性关系及灵敏度**

求得回归方程:  $Y = 0.0547X - 0.0236, r = 0.999 (n = 5)$ , 结果表明:沙奎那韦在  $0.6 \sim 12.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的范围内线性良好。

**3.3 精密度和回收率**

精密度和回收率结果见表1。

**表1** 精密度和回收率测定结果( $n = 5$ )

**Tab 1** Results of recovery and precision( $n = 5$ )

| Added<br>$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ | Inter-day<br>Found $\pm$ RSD | Intra-day<br>Found $\pm$ RSD | Relative<br>recovery | Absolute<br>recovery |
|---------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
| 0.625                                       | 0.690 $\pm$ 3.3              | 0.721 $\pm$ 4.4              | 110.3 $\pm$ 4.6      | 74.02 $\pm$ 6.2      |
| 3.125                                       | 2.994 $\pm$ 1.9              | 2.806 $\pm$ 3.1              | 95.82 $\pm$ 2.3      | 82.51 $\pm$ 4.3      |
| 12.50                                       | 12.60 $\pm$ 1.4              | 13.26 $\pm$ 1.8              | 100.8 $\pm$ 1.5      | 89.83 $\pm$ 3.5      |

**3.4 血药浓度**

结果见图2。

**4 讨论**

**4.1 流动相的选择**

先后采用不同比例的流动相,经实验,认为用乙腈-0.01 mol( $\text{pH} 7.5$ )磷酸氢二钾溶液(62:38)为测定含量的流动相,既可排除干扰,又能使各组分达到基线分离的效果。

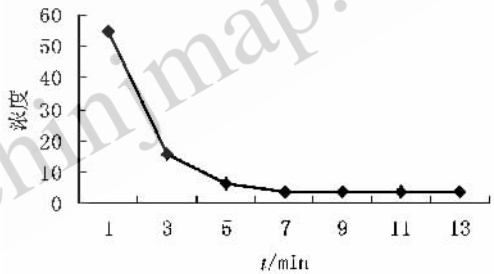


图2 沙奎那韦在大鼠血浆中的血药浓度-时间曲线图

**Fig 2** The concentration-time curves of saquinavir in rat plasma

**4.2 内标的选择**

分别选择了盐酸维拉帕米和氟伏沙明做为内标,在上述色谱条件下,沙奎那韦出峰在 8.9 min,盐酸维拉帕米出峰在 12.1 min,氟伏沙明出峰在 6.2 min。考虑到沙奎那韦可能的代谢产物以及杂质的影响,选择了盐酸维拉帕米作为内标。

**参考文献**

[1] QIAN Z L. Latest advances in studies of anti-AIDS drugs[J]. Chin New-drug J(中国新药杂志),1997,6(6):407-409.  
[2] BAO Y L. Clinical pharmacology and drug effect of saquinavir [J]. Fore Med Sci Sec Pharm,1999,26(1):17-20.

收稿日期:2006-03-30