

项下色谱条件, 进样测定 6 批翅茎白粉藤药材中白黎芦醇的含量, 结果见表 2。

表 2 6 批翅茎白粉藤药材中白黎芦醇测量结果(n=2)
Tab 2 Determination of resveratrol in *Cissus hexangularis* from six different regions(n=2)

样品批号	产地	平均含量/%
20101018	金秀	0.022
20101119	防城	0.026
20101128	金秀	0.030
20101208	武鸣	0.034
20101223	龙州	0.018
20110219	马山	0.011

3 讨论

翅茎白粉藤化学成分未见报道, 但同科同属植物翼茎白粉藤中含有岩白菜素^[4], 笔者对翅茎白粉藤中岩白菜素的含量测定方法进行初步探索, 结果只有 1 个批号含有万分之一的岩白菜素, 其余未检测到, 因此, 采用岩白菜素作为翅茎白粉藤药材的质量控制标准指标不合适。另据报道^[5], 翅茎白粉藤同科同属植物红背丝绸(即毛叶白粉藤)根含有白黎芦醇, 白黎芦醇具有抗内皮素-1 和蛇毒、抗过敏、抗肿瘤、抗肝损伤^[6]等作用。经过预实验, 多批翅茎白粉藤药材中含有白黎芦醇, 因此, 翅茎白粉藤中指标成分白黎芦醇的含量测定方法, 可作为控制本品质量标准的指标之一。

系统耐用性试验表明, 白黎芦醇对照品溶液紫外扫描在 305.6 nm 处有最大吸收, 故确定检测波长为 306 nm; 根据试验探索, 流动相以乙腈-水 (25 : 75)较为适合, 乙腈比例过高则白黎芦醇分离度<1.5, 乙腈比例过低则出峰时间延迟; 柱温及流速无明显影响; 对比 3 根不同品牌 C₁₈ 填料色谱柱,

均符合要求。

采用超声处理 30 min、加热回流 1 h、索氏提取 2 h 进行提取方法考察, 三者结果相差不大, 但超声提取更简便、快捷, 故采用超声提取法; 采用甲醇、50%甲醇、水作提取溶剂进行考察, 采用水提取所得的含量最低, 50%甲醇次之, 采用甲醇所得的含量较高, 故采用甲醇作为提取溶剂; 以超声提取 15, 30, 45 min 进行提取时间考察, 超声提取 15 min, 测得结果较低, 超声提取 30, 45 min, 两者无明显差别, 故超声提取时间定为 30 min。

从实验结果看, 本方法精密度高, 准确度、重复性都比较好, 并且操作简便、快捷, 为翅茎白粉藤药材的质量评价提供了良好的依据。

REFERENCES

[1] DAI B, LI Z D, QIU C C, et al. The investigate research of traditional YAO herb "HU NIU ZUAN FENG" [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族民间医药杂志), 1998, 31(2): 28-34.

[2] ZHANG T T, HUANG Q W, DENG J M, et al. Determination of resveratrol from Jingangteng soft capsule by RP-HPLC [J]. Her Med(医药导报), 2010, 29(1): 88-89.

[3] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 194-195.

[4] PAN B Q, PU Q L. The research of chemical composition in *Cissus pteroclada* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1981, 12(6): 45.

[5] YANG L C, FANG X H. Isolation of resveratrol and its antagonistic effects on endothelin-1 [J]. West China J Pharm Sci(华西药理学杂志), 2000, 15(2): 81-84.

[6] LUO J H, YANG Y B. Protective effects of resveratrol on alcohol-induced hepatic injury through nitric oxide pathway in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(9): 772-777.

收稿日期: 2011-12-09

HPLC 测定人血浆中非索非那定浓度

叶蓁, 周权* (浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009)

摘要: 目的 建立一种快速简便的高效液相色谱法测定人血浆中非索非那定的浓度, 以适合于大样本的血浆样品测定需要。方法 以乙腈沉淀法处理 200 μL 血浆样品, 高速离心后上清液用纯氮气吹干, 复溶后进样分析。分析柱: Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液-乙腈(63 : 37); 流速: 1 mL·min⁻¹; 荧光检测器(激发波长为 230 nm, 发射波长为 290 nm); 以苯海拉明为内标, 用内标法定量, 进行方法学确证试验, 并用于 4

基金项目: 浙江省中医药管理局科技计划(2007CB173); 国家自然科学基金(30873122)

作者简介: 叶蓁, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)87783665 E-mail: yezhen0908@126.com *通讯作者: 周权, 男, 博士, 主任药师, 硕导 Tel: (0571)87784615 E-mail: zhouquan142602@zju.edu.cn

名健康志愿者单剂量口服 120 mg 非索非那定片剂的药动学研究。结果 内源性杂质和代谢物不干扰非索非那定出峰。在 20~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性良好($r=0.999\ 3$, $n=6$), 定量限为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。高、中、低质控样品的日内、日间 RSD 均 $<10\%$, 方法学回收率为 105.9%, 提取回收率为 94.6%。平均 C_{max} , t_{max} 和 AUC_{0-t} 分别为 733 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 2.5 h 和 3 954 $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, 这些参数与国外文献报道基本一致。结论 本测定方法稳定、操作简便、快速、准确、灵敏, 可用于非索非那定药动学研究。关键词: 非索非那定; 高效液相色谱法; 药动学

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)08-0736-04

Assay of Fexofenadine Concentrations in Human Plasma by HPLC with Fluorescence Detector

YE Zhen, ZHOU Quan* (Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC for determination of fexofenadine(FEX) concentrations in human plasma. **METHODS** Plasma samples(200 μL) were deproteinized by precipitation with acetonitrile, centrifuged and the supernatant was reconstituted and injected into HPLC. Separation was achieved on Waters Symmetry C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) with a mixture of 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium acetate-acetonitrile(63 : 37) as mobile phase. The flow rate was 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. The fluorescence detector was set at excitation wavelength of 230 nm and emission wavelength of 290 nm. Diphenhydramine was used as internal standard. The assay was validated and applied to pharmacokinetic study of FEX in 4 healthy volunteers following a single oral dose of 120 mg FEX tablet. **RESULTS** Endogenous chemicals and metabolite did not interfere with FEX. The calibration curves were linear in the range of 20~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.999\ 3$, $n=6$), with a limit of quantitation of 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The within- and between-day RSDs of quality-control samples at high-, medium- and low-concentrations were less than 10%. The average method recovery was 105.9%. The average absolute recovery was 94.6%. Major mean pharmacokinetic parameters included C_{max} (733 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), t_{max} (2.5 h), AUC_{0-t} (3 954 $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$) and the data were similar with documented data abroad. **CONCLUSION** The assay is stable, simple, rapid, accurate, sensitive and applicable for determining plasma concentrations of FEX in its pharmacokinetic studies.

KEY WORDS: fexofenadine; HPLC; pharmacokinetics

非索非那定(Fexofenadine, FEX)是特非那定的活性代谢物, 它没有心脏毒性和镇静不良反应, 代谢性相互作用风险极低, 因此, 临床优势明显^[1]。FEX 的血药浓度测定方法国外已有报道, 包括 HPLC-MS-MS^[2-3]和 HPLC-荧光检测法^[4]。文献报道的 FEX 人血浆样品处理方法为有机溶剂提取方法或固相萃取法, 所需血浆体积较大, 样品处理比较繁琐或成本较高。本研究首次报道用乙腈直接沉淀血浆蛋白, 高速离心后取上清液吹干, 90% 甲醇溶液复溶后直接进样, 采用 HPLC 荧光检测法测定 FEX 的血药浓度。方法准确、灵敏、快速简便, 可用于 FEX 的药动学研究。

1 仪器与试剂

Waters 2690 高效液相色谱仪、Waters 477 荧光检测器、Empower®色谱处理软件、ABBOTT 离心机、XW-80A 旋涡混合器。FEX 对照品(浙江省食品药品检验所, 批号: 20080301, 含量: 99.1%), 非索非那定片剂(莱多菲®, 浙江万马药业, 规格: 60 mg, 批号: 090102); 内标苯海拉明(中国药品生物制品检定所, 批号: 0066-9705, 含量: 99.0%)。

醋酸铵为进口分析纯; 乙腈和甲醇均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

预柱: Waters C_{18} ODS(3.9 mm $\times$ 20 mm)。分析柱: Waters Symmetry C_{18} ODS(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)。流动相: 0.1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵溶液-乙腈(63 : 37)。流速: 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。荧光激发波长: 230 nm, 发射波长: 290 nm。柱温为室温。进样量为 50 μL 。

2.2 标准溶液的配制

精密称取 FEX 对照品 10.2 mg, 置 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 使成 1.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液。精密吸取该贮备液 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇摇匀并稀释至刻度, 使成工作溶液(102 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

精密称取苯海拉明对照品 5.4 mg, 置 5 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 使成 1.08 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液。精密吸取该贮备液 1 mL 至 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇摇匀并稀释至刻度, 使成工作溶液(108 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。临用前取

200 μL , 加甲醇 2.5 mL, 稀释至 8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 血浆样品处理

精密吸取血浆样品 200 μL , 置 1.5 mL Effendorf 离心管中, 加入 20 μL 苯海拉明内标溶液(8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 涡旋混匀 6 s 后, 再加入乙腈 600 μL , 涡旋混匀 6 s, 10 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液用纯氮气吹干, 残渣用 200 μL 90%甲醇复溶后直接注入色谱

系统。

2.4 方法专属性考察

取 6 份不同的健康人空白血浆, 按“2.3”项下方法处理, 记录色谱图, 发现内源性成分不干扰 FEX 出峰。FEX 的出峰时间为 5 min, 药物峰形尖锐、对称。内标保留时间为 7.4 min。整个色谱分析过程为 8.5 min。色谱图见图 1。

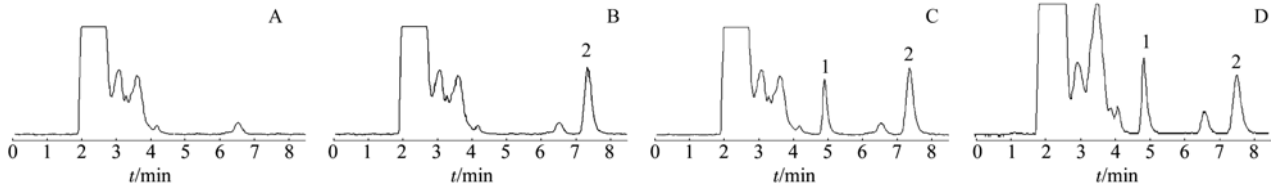


图 1 非索非那定人血浆色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆中加入内标苯海拉明 160 ng; C-500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 非索非那定标准血浆中加入内标苯海拉明 160 ng; D-受试者单剂量口服 120 mg 非索非那定片剂 2 h 后血浆样品; 1-非索非那定; 2-内标

Fig 1 Chromatograms of fexofenadine and internal standard diphenhydramine

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with internal standard diphenhydramine 160 ng; C-standard sample of fexofenadine (500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) spiked with diphenhydramine 160 ng; D-healthy volunteer plasma sample 2.0 h after an oral dose of 120 mg fexofenadine tablet; 1-fexofenadine; 2-internal standard

2.5 标准曲线的制备

用空白血浆将 FEX 稀释成相当于血药浓度为 20, 50, 100, 250, 500, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列质量浓度标准血浆, 按“2.3”项下方法操作, 以 FEX 与内标的峰面积比值(Y)对质量浓度 $\rho(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ 进行线性回归, 得标准曲线回归方程为 $Y=0.0016\rho-0.0013$ ($r=0.9993$, $n=6$)。线性范围为 20~1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最低定量限(LLOQ)为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (RSD<18%, $n=5$)。

2.6 准确度试验和精密度试验

用空白血浆将 FEX 稀释成相当于血药浓度为 40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 种质控血浆, 按“2.3”项下方法处理后分析, 考察 FEX 的日内(每日测定 5 次)、日间精密度(测定 5 d, 每天 1 次)和方法回收率, 结果见表 1。

表 1 非索非那定的精密度和准确度($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Precision and recovery of the assay($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

加入浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	准确度/ %	日内		日间	
		测得值/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ %	测得值/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ %
40	105.5	42.2 $\pm$ 3.5	8.3	40.9 $\pm$ 1.3	3.2
200	108.4	216.8 $\pm$ 7.3	3.4	199.6 $\pm$ 13.6	6.8
800	103.9	831.2 $\pm$ 16.3	2.0	787.1 $\pm$ 42.8	5.4

2.7 提取回收率试验

测定 40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 种质量浓度的 FEX 质控血浆各 5 份的峰面积。用流动相稀释制备 40,

200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ FEX 溶液。各种质量浓度的 FEX 质控血浆分别取 200 μL , 加 600 μL 乙腈, 涡旋混合后用氮气吹干, 用 200 μL 90%甲醇溶液复溶吹干残渣后直接进样分析, 记录峰面积。相应浓度的峰面积之比即为提取回收率。40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 种质控血样的提取回收率分别为(94.0 $\pm$ 4.11)%, (93.3 $\pm$ 3.36)%, (96.4 $\pm$ 3.75)%, RSD 分别为 4.4%, 3.6%, 3.9%。

2.8 稳定性试验

2.8.1 血浆样品光照试验 取 40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质控血浆各 3 份, 即时测定; 于日光灯下充分暴露 2 h 后测定结果, 40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质控血浆的平均峰面积分别下降 3.8%, 6.3%和 5.8%, 经 t 检验, 差异无统计学意义($P>0.05$), 提示血浆样品 2 h 内对光稳定。

2.8.2 处理后血浆样品 取 40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质控血浆各 3 份, 经“2.3”项下处理后, 室温放置, 在 0, 12 h 测定, 结果各浓度的回收率为 92.6%~93.7%, 表明在 12 h 内稳定。

2.8.3 冻融循环 取 40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质控血浆即时测定, 再冷冻保存 24 h 后, 在 20~25 $^{\circ}\text{C}$ 室温条件下解冻后测定, 连续考察 3 次冻融循环。结果各浓度的回收率为 90.34~99.86%。表明对照品经过冻融后的稳定性良好。

2.8.4 长期稳定性 取 40, 200, 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 质控

血浆即时测定, 于 -20°C 冷冻保存 20 d 后再次测定, 各浓度的回收率为 93.5%~104.29%。表明 FEX 冷冻保存于 -20°C 在 20 d 内稳定性良好。

2.9 方法应用

4 名男性健康志愿者试验前签署知情同意书, 进行一般体检(包括血压、心率等)、血尿常规、生化及心电图等试验室检查。实验当天口服非索非那定片剂(莱多菲®)2 片(相当于非索非那定 120 mg), 服药后 4 h 统一进食低脂肪饮食。于服药前和服药后 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h 取上臂静脉血, 每次 2 mL, 用乙二胺四乙酸二钾抗凝, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心分离出血浆, 于 -20°C 冷冻储存, 用于血药浓度测定。每个分析批制备新的标准曲线, 并随行测定 40, 200, $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个质量浓度的质控样品。测定 FEX 血药浓度后所得的平均血药浓度-时间曲线见图 2。经软件 DAS 2.1.1(中国药科大学药代中心)处理, 得到主要药动学参数。 $C_{\max}$ 为 $(733\pm150)\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $t_{\max}$ 为 $(2.5\pm0.0)\text{h}$, AUC_{0-t} 为 $(3\,954\pm738)\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与 Uno^[4]报道的 $C_{\max}$ [(610 ± 222) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=10$], $t_{\max}$ ($2.1\pm0.9\text{h}$, $n=10$)和 AUC_{0-t} [($3\,808\pm1\,266$) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=10$]相比较, 经 t 检验分析, 发现 $C_{\max}$, $t_{\max}$ 和 AUC_{0-t} 的差异无统计学意义($P>0.05$)。

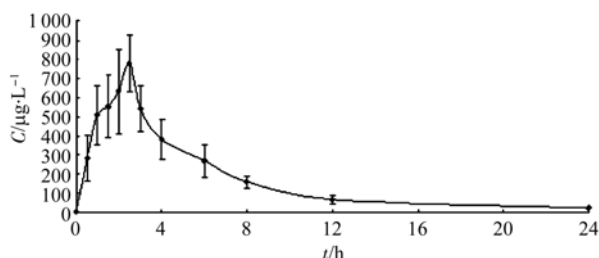


图 2 4 名健康志愿者口服莱多菲®(相当于非索非那定 120 mg)后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 Average concentration-time curves after oral administration of 120 mg fexofenadine tablet in 4 healthy volunteers

3 讨论

文献报道测定 FEX 所用的 HPLC 样品预处理方法包括有机溶剂提取法和固相萃取法。前者有操作繁琐的缺点, 后者虽然较为简便, 但成本较高, 而且血浆样品需要 1 mL, 分离需要用到梯度洗脱方法。本实验建立的方法中, 采用直接沉淀

法预处理 200 μL 血浆样本, 应用 HPLC 荧光检测器检测, LLOQ 即可达到 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本法的优点在于血浆取样量少、预处理简便快速以及不受固相萃取的限制, 可以适合于药动学研究大量生物样本的需要。

方法建立中曾尝试用 Waters Symmetry C_{18} ODS($4.6\text{ mm}\times150\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)短柱进行样品分离, 但其所得待测峰的峰型和响应值不如 Waters Symmetry C_{18} ODS($4.6\text{ mm}\times250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)长柱所得的好, 因此选择后者进行样品分离。曾比较过 0.5% KH_2PO_4 和 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液对于分离条件的影响, 由于在 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铵缓冲液中待测峰的峰型和响应更好, 所以选择其作为缓冲液。方法建立中曾尝试用地西洋、西替利嗪和苯海拉明作为内标候选物, 结果发现以苯海拉明最优。比较了荧光检测器不同的激发波长和发射波长下的荧光响应值, 确定最佳激发波长和发射波长分别为 230 nm 和 290 nm。在血浆样品处理的探索过程中, 还曾尝试用甲醇、10%高氯酸溶液、丙酮作为沉淀剂沉淀蛋白。结果表明, 甲醇和丙酮沉淀蛋白并不完全, 色谱峰上杂质峰多, 会干扰目标峰和内标峰; 而 10%高氯酸沉淀血浆蛋白虽然完全, 色谱峰杂质少, 但是目标峰也不出峰, 这可能由于 10%高氯酸酸性过强, 破坏了非索非那定的结构所致。

REFERENCES

- [1] HU G Y, PENG J Q, YU H. Study on formulation and process of Fexofenadine HCl and pseudoephedrine HCl extended-release tablets [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2011, 28(9): 846-849.
- [2] NIROGI R V, KANDIKERE V N, SHUKLA M, et al. Quantification of fexofenadine in human plasma by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry using mosapride as internal standard [J]. J Biomed Chromatogr, 2007, 21(2): 209-216.
- [3] YAMANE N, TOZUKA Z, SUGIYAMA Y, et al. Microdose clinical trial: quantitative determination of fexofenadine in human plasma using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2007, 858(1/2): 118-128.
- [4] UNO T, YASUI-FURUKORI N, TAKAHATA T, et al. Liquid chromatographic determination of fexofenadine in human plasma with fluorescence detection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 35(4): 937-942.

收稿日期: 2011-12-01