

in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.

相关基因的表达[J]. 肿瘤, 2001, 21(1): 29.

[收稿日期] 2006-07-11

[8] 张小田, 陈维刚, 黎健. p53 基因诱导膀胱癌细胞 HTB9 凋亡及

柱前衍生高效液相色谱法测定人血浆中白消安的浓度

张善堂, 方焱, 屈建, 陈象青, 沈爱宗, 孙言才 (安徽省立医院, 安徽 合肥 230001)

[摘要] 目的: 建立测定人血浆中白消安浓度的高效液相色谱法。方法: 血浆样品经衍生化处理, 以甲醇-水(74:26)为流动相, 流速 0.9 mL·min⁻¹, 选用 NovaPak C₁₈ 色谱柱(3.9 mm × 150 mm, 4 μm), 在 280 nm 波长下进行检测。结果: 白消安血浆质量浓度的线性范围为 0.050 ~ 3.20 mg·L⁻¹, 以加权最小二乘法运算得到回归方程为 $Y = 4.575X - 37.04$ ($r = 0.9993, n = 9$), 方法回收率 (100.6 ± 1.6)% (99.66% ~ 102.4%), 血浆萃取回收率 (83.6 ± 2.4)% (81.70% ~ 86.35%), 日内和日间 RSD 均小于 15%。检测限为 0.6 ng, 最低血浆检测质量浓度为 0.030 mg·L⁻¹。结论: 该方法准确、灵敏, 适用于白消安血浆浓度测定及其药动学研究。

[关键词] 白消安; 高效液相色谱法; 血药浓度

[中图分类号] R969 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2007)04-0458-04

Determination of busulfan in human plasma by HPLC with pre-column derivatization

ZHANG Shan-tang, FANG Yan, QU Jian, CHAN Xiang-qing, SHEN Ai-zong, SUN Yan-cai (Anhui Provincial Hospital, Anhui Hefei 230001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC assay for determination of busulfan concentration in human plasma. **METHODS** Plasma samples were prepared by derivatization with sodium diethyldithiocarbamate (DDTC) and extracted with ethyl acetate, the extract was dried under nitrogen and reconstituted with methanol prior to HPLC determination. Chromatography was accomplished using a NovaPak C₁₈ analytical column (4 μm, 3.9 mm × 150 mm) and mobile phase of methanol-water (74:26) at a flow rate of 0.9 mL·min⁻¹ with UV detection at 280 nm. **RESULTS** Calibration curves were linear from 0.05 to 3.20 mg·L⁻¹ ($r = 0.9993, n = 9$), the recovery of method was (100.6 ± 1.6)% (99.66% - 102.4%), and the mean extraction yield for busulfan in plasma was (83.6 ± 2.4)% (81.70% - 86.35%). The RSDs of intra- and inter-day were lower than 11.20% and 14.99%, respectively. The limit of detection was 0.030 mg·L⁻¹ (signal-to noise ratio of 6). **CONCLUSION** The method is sensitive and accurate for the determination of busulfan concentration in human plasma. It is suitable for the pharmacokinetics study of busulfan.

KEY WORDS: busulfan; HPLC; plasma drug concentration

白消安 (busulfan, Bu) 是一种双功能烷化剂, 对造血祖细胞和多能干细胞具有细胞毒作用, 通常口服小剂量 (2 ~ 8 mg·d⁻¹) 治疗慢性粒细胞白血病。随着造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 治疗恶性血液病的基础及临床研究的深入, 白消安主要用于 HSCT 前的预处理, 大剂量的白消安 (1 mg·kg⁻¹, q6 h × 4 d) 与环磷酰胺 (cyclophosphamide, Cy) 组成的 BuCy 方案是目前国际上异基因造血干细胞移植的标准预处理方案 [1-2]。国外研究表明, BuCy 方案的疗效和毒副作用与白消安血浆浓度-时间曲线下面积 (AUC) 或稳

态血药浓度有密切关系, 且白消安的药动学性质具有显著的个体差异, 因此开展白消安治疗药物监测十分必要 [3-4]。

开展白消安治疗药物监测, 首先必须建立灵敏、准确的血药浓度测定方法。目前, 国外用于白消安血药浓度分析的方法主要是色谱法, 包括气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和高效液相色谱法-质谱联用法 (LC-MS) 等 [4-6], 国内尚未见文献报道。参考国外文献, 本试验建立柱前衍生化的高效液相色谱法, 以用于测定异基因造血干细胞移植预处理患者血浆白消安浓度。

[基金项目] 2007 年安徽高校省级自然科学基金项目 (编号 KJ2007B317ZC) [作者简介] 张善堂, 男, 硕士, 副主任药师, 电话: 0551-2283378; 手机: 13515661288; E-mail: zhangshantang@163.com

1 材料

Waters 高效液相色谱仪,包括 515 泵、2487 双波长紫外检测器;AT-130 色谱柱恒温箱(天津鑫洲科技有限公司);HS 色谱数据工作站 4.0⁺(杭州英谱科技开发有限公司);U32R 台式冷冻离心机(德国 Hettich 公司);白消安(Sigma-Aldrich 公司,批号 07 K2506);二乙基二硫代氨基甲酸钠(DDTC, Sigma-Aldrich 公司,批号 112 K2606);甲醇、醋酸乙酯和乙腈均为色谱纯;亚沸二次纯化水为本实验室制备;健康人空白血浆由本院输血科提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液及衍生反应试剂的配制 精密称取白消安 10 mg,用乙腈溶解后移至 100 mL 量瓶中,加乙腈稀释至刻度,混匀,制成储备液(100 mg·L⁻¹)。以储备液配成质量浓度分别为 0.625, 1.25, 2.50, 5.00, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0, 40.0 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液。储备液及对照品溶液均置于 4℃ 冰箱中保存。衍生试剂在使用前临时配制:称取 DDTC 0.8 g,加新鲜制备的亚沸二次纯化水溶解至 10 mL,即得。

2.2 血浆样品的处理 精密吸取血浆样品 250 μL,加甲醇 500 μL,旋涡混合 15 s;加入新鲜配制的 8%DDTC 液 150 μL,旋涡混合 10 s;加入亚沸纯化水 500 μL,旋涡混合 5 s,随后立即加入醋酸乙酯 3 mL,旋涡混合 1 min;在 10℃ 下,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取醋酸乙酯层(上层),于 30℃ 水浴下氮气吹干,用 150 μL 甲醇溶解后,取 20 μL 进样。

2.3 色谱条件 色谱柱:NovaPak C₁₈ 柱(3.9 mm ×150 mm,4 μm);柱温:30℃;流动相:甲醇-水(74:26);流速:0.9 mL·min⁻¹;检测波长:280 nm。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 按前述血浆样品处理方法和色谱条件处理并检测空白血浆、加药血浆和患者用药后的血浆样品,结果表明血浆中的内源性物质和患者在预处理期间使用的其他药物如苯妥英钠、恩丹司酮、伊曲康唑、谷胱甘肽、环孢素等对白消安的检测无干扰,白消安峰峰形好,理论塔板数大于 4 000,分离度大于 5.0,保留时间约为 13.7 min。见图 1。

2.4.2 标准曲线及线性范围 取不同质量浓度的对照品溶液各 20 μL 置具塞试管中,加入空白血浆,配成分别为 0.050, 0.100, 0.200, 0.400, 0.800, 1.20, 1.60, 2.40, 3.20 mg·L⁻¹ 的含药血浆样品,按“2.2”项下操作,进样分析,记录白消安色谱峰高。以白消安血浆质量浓度为自变量、峰高为因变量,用

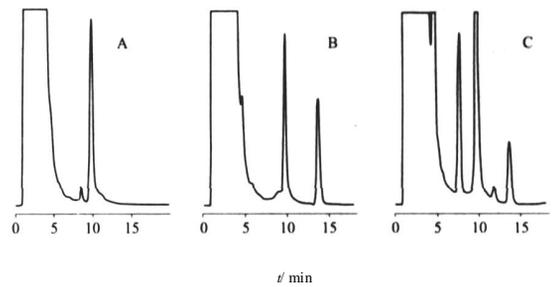


图 1 血浆中白消安色谱图

A. 空白血浆(经过衍生化处理);B. 标准血浆样品(3.20 mg·L⁻¹); C. 患者血浆样品(BUCY 预处理患者口服白消安后 1 h);1- 白消安

Fig 1 HPLC chromatograms of busulfan in plasma
A. blank plasma; B. plasma containing 3.20 mg·L⁻¹ busulfan; C. a patient plasma sample;1- busulfan

加权最小二乘法进行回归运算,求得白消安的直线回归方程即标准曲线为 $Y = 4.575 X - 37.04 (n = 9, r = 0.9993)$,表明白消安在 0.050 ~ 3.20 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度和准确度 按“2.4.2”项下方法配制含白消安 0.050, 1.20, 3.20 mg·L⁻¹ 3 种质量浓度的质控(QC)样品,每种质量浓度进行 5 样本分析,连续测定 5 d,并与标准曲线同时进行。以当日标准曲线计算 QC 样品质量浓度,对 QC 样品的测定结果进行统计分析,求得本法的精密度和准确度,结果见表 1。

表 1 方法的准确度和精密度 (n=5)

Tab 1 Accuracy and precision of busulfan determination in plasma (n=5)

标示质量浓度 / mg·L ⁻¹	测得质量浓度 / mg·L ⁻¹	准确度 / %	RSD/ %	
			日内	日间
0.050	0.051 2 ±0.001 4	102.4	11.20	14.99
1.200	1.196 ±0.014	99.67	9.81	10.82
3.200	3.189 ±0.039	99.66	8.85	12.02

2.4.4 萃取率 按“2.4.2”项下方法配制含白消安 0.050, 1.200, 3.20 mg·L⁻¹ 3 种质量浓度样品,每个质量浓度进行 5 份平行样本分析;另以亚沸二次纯化水代替空白血浆配制相应质量浓度的样品,同法进行处理分析。以每一质量浓度两种处理方法测得的峰高之比计算血浆萃取率。结果见表 2。血浆中白消安的平均萃取回收率(83.6 ±2.4) %

表 2 血浆中白消安的萃取率 (n=5)

Tab 2 Extraction yield for busulfan in plasma (n=5)

标示质量浓度 / mg·L ⁻¹	峰高/ uV		萃取率 / %
	血样	水样	
0.050	234.4 ±17.8	286.9 ±24.2	81.70
1.200	5 550.8 ±544.8	6 428.2 ±517.8	86.35
3.200	14 739.4 ±1 006.7	17 799.1 ±1 717.6	82.81

2.4.5 检测限 用空白血浆制备质量浓度分别为 0.005, 0.010, 0.020, 0.040 mg·L⁻¹ 样品,按“2.2”

项下操作分析,以空白血浆为对照,白消安的检测限为 0.6 ng (S/N = 6),最低血浆检出质量浓度为 0.030 mg L⁻¹。

2.4.6 稳定性考察 (1) 冷冻样品的稳定性: 配制质量浓度为 1.20 mg L⁻¹ 白消安血浆样品一式 5 份,放置 -20℃ 冷冻保存,分别于第 1, 2, 4, 8, 16 天解冻处理分析,测定样品浓度,各测定结果的 RSD 为 9.44%。表明 -20℃ 冷冻保存,样品比较稳定。(2) 血浆样品反复冻融的稳定性: 配制质量浓度为 1.20 mg L⁻¹ 白消安血浆样品 1.0 mL 置于具塞离心管中,放置 -20℃ 冷冻。反复冻融 3 次,每次融化后取 0.2 mL 测定白消安浓度,各测定结果的 RSD 为 9.32%。(3) 白消安衍生产物的稳定性: 配制质量浓度为 1.20 mg L⁻¹ 白消安血浆样品一式 5 份,按“2.2”项下处理至“氮气吹干”后,室温放置,于 0, 1, 3, 6, 24 h 分别用 150 μL 甲醇溶解、进样,测定样品浓度,各测定结果的 RSD 为 8.16%。表明白消安衍生产物在室温下,24 h 内基本稳定。

2.4.7 临床样本测定 1 例行异基因造血干细胞移植的患者,采用 BUCY 方案进行移植前预处理,口服白消安 1 mg · kg⁻¹, q6 h, 共 16 次。分别在口服首剂白消安前及服药后第 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 min 采集血样 1~2 mL, EDTA 抗凝,血样置于冰箱冷藏并于 6 h 内离心分离出血浆。按“2.2”项下方法处理分析血样,测得各时间点的血浆白消安质量浓度分别为 0, 0.43, 1.21, 1.49, 1.28, 1.07, 0.77, 0.65, 0.38 mg L⁻¹。另外测得第 9 次服药后 1 h 点血浆白消安质量浓度为 1.90 mg L⁻¹。

3 讨论

自 Henner 等^[7]首次报道采用 HPLC 方法测定血浆中白消安浓度以来,国外对白消安血药浓度测定方法进行了长期的研究。近年来,LC-MS 或 LC-MS-MS 方法的应用成为研究重点,有多篇相关报道^[8-10]。LC-MS 或 LC-MS-MS 方法灵敏、准确,样品不需要作衍生化处理,分析简便快速,但仪器设备价格昂贵,难以普及使用。为满足临床需求,笔者结合所在实验室的实际情况,对 HPLC 测定白消安血浆浓度的实验条件进行了较为全面的探索。

3.1 检测波长的选择 白消安的化学名为 1,4-丁二醇二甲基磺酸酯,无紫外吸收,一般要利用其与衍生试剂反应,形成具有紫外吸收或产生具有荧光的产物,然后进行 HPLC 定量检测,衍生化方法包括柱前衍生和柱后衍生,所用的衍生试剂也各不相同^[11-12]。本实验以 DDTC 为衍生试剂,采用柱前衍生的方法,使形成具有紫外吸收的衍生产物,该产物

在 250 nm 和 280 nm 处有吸收峰。为减少杂质紫外吸收的干扰,本实验采用 280 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙腈-水等为流动相时的分离效果、柱压、出峰时间等,结果在取得理想分离效果的前提下,含有乙腈的流动相柱压较低,但出峰时间较迟(相同流速);以甲醇-水(74:26)为流动相时,虽然柱压较高,但出峰时间较为理想,峰形好,无血浆杂质峰干扰,且试剂成本较低。

3.3 提取溶剂的选择 实验考察了醋酸乙酯、乙醚、异丙醇、正己烷等溶剂对血浆中白消安的萃取率,结果醋酸乙酯的萃取率最高,且毒性较低,相对安全,故选择醋酸乙酯作为提取溶剂。

另外,衍生反应受温度的影响比较明显,低于 15℃ 则反应速度很慢,高于 35℃ 则衍生产物不稳定。本实验将室内温度控制在 20~25℃,在此温度下,白消安与 DDTC 的衍生反应可以瞬间完成。

参考文献:

- [1] 朱康儿,徐扬,钟隽,等. BU-CTX2 预处理方案异基因造血干细胞移植治疗白血病 60 例[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(7): 349-352.
- [2] 郑春梅,张玲,冯四洲,等. 马利兰在造血干细胞移植预处理方案中的应用及研究进展[J]. 国外医学输血及血液学分册, 2003, 26(6): 513-516.
- [3] Hassan BM, Ljungman P, Bolme P, et al. Busulfan bioavailability[J]. Blood, 1994, 84(7): 2144-2150.
- [4] McCune JS, Gibbs JP, Slattery JT. Plasma concentration monitoring of busulfan: does it improve clinical outcome? [J]. Clin Pharmacokinet, 2000, 39(2): 155-164.
- [5] Chen TL, Grochow LB, Hurowitz LA, et al. Determination of busulfan in human plasma by gas chromatography with electron-capture detection[J]. J Chromatogr, 1988, 425: 303-309.
- [6] Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, et al. Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. Ther Drug Monit, 1997, 19: 169-174.
- [7] Henner WD, Furlong EA, Flaherty MD, et al. Measurement of busulfan in plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B, 1987, 416: 426-432.
- [8] Dos Reis EO, Vianna-Jorge R, Suarez-Kurtz G, et al. Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19: 1666-1674.
- [9] Kellogg MD, Law T, Sakamoto M, et al. Tandem mass spectrometry method for the quantification of serum busulfan [J]. Ther Drug Monit, 2005, 27(5): 625-629.
- [10] Auh M, Stachel D, Kuhlen M, et al. Quantification of busulfan in saliva and plasma in haematopoietic stem cell transplantation in children: validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45(3): 305-316.
- [11] Peris JE, Latorre JA, Castel V, et al. Determination of busul-

fan in human plasma using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection [J]. J Chromatogr B, 1999, 730:33-40.

determination of busulfan by liquid chromatography using postcolumn photolysis[J]. J Chromatogr B, 2004, 805:147-154.

[收稿日期]2006-06-10

[12] Jenke AJ, Renner U, Schuler US, et al. Improved assay for

头孢羟氨苄咀嚼片的人体生物等效性

邓鸣¹, 杨汉煜², 赵曦², 侯艳宁¹, 宋连辉¹ (1. 白求恩国际和平医院临床药理室, 河北 石家庄 050082; 2. 石药集团中奇制药技术石家庄有限公司, 河北 石家庄 050051)

[摘要] 目的:评价头孢羟氨苄咀嚼片与参比片剂在人体内生物等效性。方法:采用随机交叉试验设计, 20 名健康男性受试者分别口服单剂量受试制剂与参比制剂 500 mg, HPLC 法测定血浆中头孢羟氨苄的浓度, 用 DAS 1.0 统计软件计算药动学参数并进行生物等效性评价。结果:受试制剂与参比制剂的 C_{max} 分别为 $(19.2 \pm 2.3) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(18.4 \pm 2.7) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, t_{max} 分别为 $(0.95 \pm 0.22) \text{ h}$ 和 $(1.3 \pm 0.4) \text{ h}$, $t_{1/2}$ 分别为 $(1.78 \pm 0.14) \text{ h}$ 和 $(1.73 \pm 0.09) \text{ h}$, AUC_{0-10} 分别为 $(53.3 \pm 7.5) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(54.0 \pm 7.4) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, AUC_{0-} 分别为 $(54.4 \pm 7.9) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(55.1 \pm 7.7) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。受试制剂相对于参比制剂的生物利用度为 $(99.0 \pm 7.0) \%$ 。结论:两制剂具有生物等效性。

[关键词] 头孢羟氨苄; 高效液相色谱; 药动学; 生物等效性

[中图分类号] R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2007)04-0461-03

Bioequivalence of cefadroxil chewable tablets in healthy volunteers

DENG Ming¹, YANG Han-yu², ZHAO Xi², HOU Yan-ning¹, SONG Lian-yi¹ (1. Department of Clinical Pharmacology, Bethune International Peace Hospital, Hebei Shijiazhuang 050082, China; 2. Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co. Ltd., Hebei Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To evaluate the bioequivalence of cefadroxil chewable tablets and reference tablets in healthy volunteers. **METHODS** In a randomized crossover study, 20 healthy male volunteers were given a single oral dose of 500 mg test and reference formulations. The plasma concentration of cefadroxil was determined by an HPLC method. The pharmacokinetic parameters were calculated and the bioequivalence of two formulations were evaluated by DAS 1.0 software. **RESULTS** The main pharmacokinetic parameters of the test and the reference formulations were as follows: C_{max} were $(19.2 \pm 2.3) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(18.4 \pm 2.7) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, t_{max} were $(0.95 \pm 0.22) \text{ h}$ and $(1.3 \pm 0.4) \text{ h}$, $t_{1/2}$ were $(1.78 \pm 0.14) \text{ h}$ and $(1.73 \pm 0.09) \text{ h}$, AUC_{0-10} were $(53.3 \pm 7.5) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(54.0 \pm 7.4) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, AUC_{0-} were $(54.4 \pm 7.9) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(55.1 \pm 7.7) \text{ mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The relative bioavailability of the test tablets was $(99.0 \pm 7.0) \%$. **CONCLUSION** The two formulations are bioequivalent.

KEY WORDS: cefadroxil; HPLC; pharmacokinetics; bioequivalence

头孢羟氨苄(cefadroxil)是第一代长效半合成口服头孢类抗生素,具有口服吸收好,抗菌谱广,作用强而持久,不良反应少等特点,临床上广泛用于治疗呼吸道、泌尿道、口腔和皮肤软组织等部位的敏感菌感染。国内有关头孢羟氨苄的药动学和生物等效性研究已有报道^[1-3],主要包括普通片、胶囊剂、颗粒剂、分散片等,但咀嚼片的药动学研究尚未见报道。本试验以石药集团欧意药业有限公司生产的头孢羟氨苄片(商品名为欧意)为参比制剂,对石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司研制的头孢羟氨苄咀

嚼片进行了人体相对生物利用度研究,并作出生物等效性评价,为临床合理用药提供科学依据。

1 材料

Waters 2695 高效液相色谱系统泵(含四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱), Waters 2996 型二极管阵列检测器, Empower 软件(美国 Waters 公司);受试制剂:头孢羟氨苄咀嚼片[石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司研制,规格 125 mg/片,批号 060301];参比制剂:头孢羟氨苄片(商品名为欧意,石药集团欧意药业有限公司生产,规格 250 mg/

[作者简介] 邓鸣,女,硕士,主管药师,电话:0311-87978503, E-mail: dm322@sina.com [通讯作者] 侯艳宁,女,教授,电话:0311-87978480, E-mail: houyn@163.com