

RP-HPLC法测定人血浆中兰索拉唑肠溶片血药浓度

李娇娜¹, 李丹², 赵春杰^{2*}

(1. 辽宁中医药大学附属医院中西医结合分院, 沈阳 110101; 2. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定人血浆中兰索拉唑肠溶片的浓度。方法: 采用 Kromail C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水 (70:45) 为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 284 nm。结果: 兰索拉唑的线性范围为 2.0~300.0 ng·mL⁻¹, 最低定量限为 2.0 ng·mL⁻¹, 回归方程 $A = 2.802 \times 10^3 C - 8.224 \times 10^3$, $r = 0.9997$ (权重 $1/c^2 \times 10^6$)。结论: 该方法简便、快速、准确, 适用于临床上兰索拉唑药代动力学的研究。

关键词: 兰索拉唑; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0395-04

RP-HPLC determination of lansoprazole enterosoluble tablets in human plasma

LI Jiao-na¹, LI Dan², ZHAO Chun-jie^{2*}

(1. The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110101, China

2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective A convenient RP-HPLC method was developed for measuring the concentration of lansoprazole in human plasma. **Method** Chromatography was carried out on a Kromail C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol-water (70:45) as mobile phase, at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 284 nm. **Results** The linearity range of lansoprazole was 2.0–300.0 ng·mL⁻¹, the lowest limit of quantification was 2.0 ng·mL⁻¹, the regressive equation was $A = 2.802 \times 10^3 C - 8.224 \times 10^3$, $r = 0.9997$ (the weight factor was $1/c^2 \times 10^6$). **Conclusions** The method is shown to be convenient, accurate, rapid and suitable for determination of lansoprazole in human plasma and the studies on clinical pharmacokinetics.

Key words lansoprazole; plasma drug concentration; HPLC

兰索拉唑为 H⁺/K⁺-ATP 酶抑制剂, 即质子泵抑制剂 (PPI), 是一类新型的抑制胃酸分泌的药物。质子泵抑制剂主要用于治疗胃溃疡、十二指肠溃疡、反流性食管炎和卓-艾综合症等与胃酸分泌失调有关的疾病。这类药物与组胺 H₂-受体拮抗剂及其他抑制胃酸分泌的药物相比, 具有明显的优越性, 如选择性高、疗效好、副作用少, 与抗生素配伍的复方制剂可消除幽门螺旋杆菌 (胃溃疡致病菌) 等。本品口服后 1 h 左右可在血中检出, 达峰时间为 3.6 h, 吸收相半衰期为 1.3 h, 消除相半衰期为 2.1 h。该药从小肠吸收经门脉而广泛分布于以胃壁和小肠壁为中心的各组织中。主要在肝脏被代谢, 大多经胆汁于粪便中排泄。本研究参考有关文献^[1~6]建立

了生物样品中兰索拉唑 HPLC 法测定方法, 并测定了 18 名健康志愿受试者口服兰索拉唑肠溶片后血药浓度, 为兰索拉唑制剂药代动力学研究和生物等效性评价奠定了基础。

1 仪器与试剂

日本岛津公司 LC-10AT 泵, Kromail C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), SIL-10A 全自动进样器, SPD-10A 型紫外可见分光光度检测器 (190~600 nm), NC-2000 型色谱工作站, TGL-16G 高速台式离心机, 超声波发生器, YKH-II 型液体快速混合器 (江西医疗器械厂)。

甲醇为色谱纯 (山东省禹王实业总公司化工厂), 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸馏水。兰索拉

* 通讯作者 Tel: 13940533478; E-mail: zcjilj@sina.com

唑对照品 (100709-200501) 由中国药品生物制品检定所提供; 兰索拉唑肠溶片由成都倍特药业有限公司提供, 规格: $15 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$, 批号: 20050301。

2 色谱条件

色谱柱: Kromail C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇-水 (70:45); 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 284 nm ; 检测器灵敏度 0.01 AUFS ; $20 \mu\text{L}$ 定量环进样。

3 样品处理

3.1 对照品溶液的制备 精密称取兰索拉唑对照品 1.0 mg 置 250 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 依次取 0.1 , 0.3 , 0.5 , 1.0 , 3.0 , 6.0 , 15.0 mL 于 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释, 得浓度分别为

4.0 , 12.0 , 20.0 , 40.0 , 120.0 , 240.0 , $600.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列溶液, 摇匀, 即得。

3.2 血浆样品处理 精密吸取血浆样品 1 mL , 置具塞离心管中, 加入乙醚-二氯甲烷 (70:30) 混合液 3 mL , 涡旋 5 min , 离心 5 min ($10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 吸取上清液, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 挥干, 加甲醇 $30 \mu\text{L}$ 溶解, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样分析。

4 方法与结果

4.1 方法专属性 在 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 之间扫描兰索拉唑的甲醇溶液紫外吸收光谱, 得兰索拉唑最大吸收波长为 284 nm , 故选取检测波长为 284 nm 。在上述的色谱条件下, 兰索拉唑保留时间为 8.95 min , 与血浆中的内源性物质能得到良好分离。见图 1。

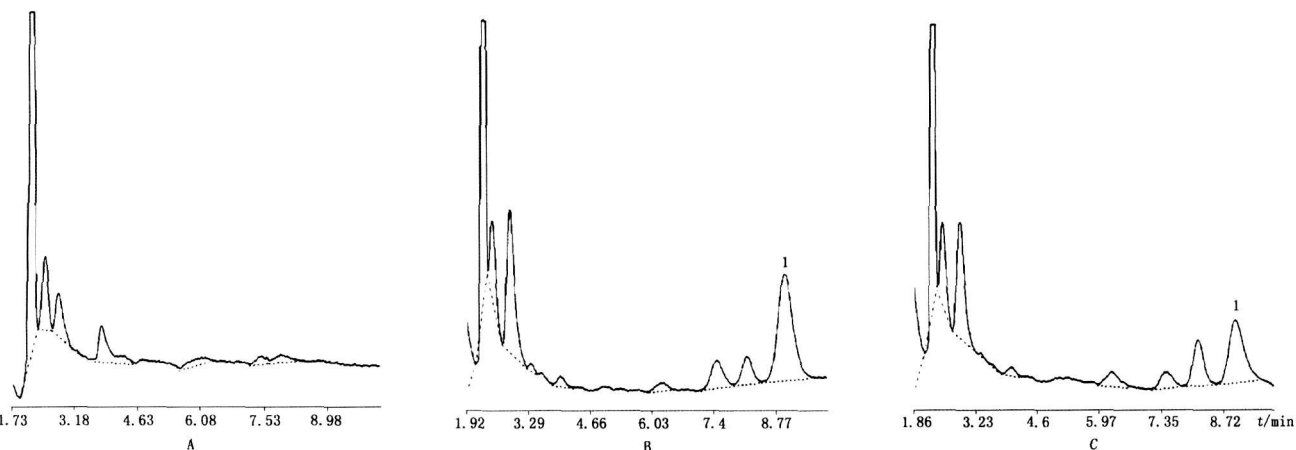


图 1 空白人血浆 (A)、空白人血浆 + 兰索拉唑对照品 (B) 和健康志愿受试者口服给药 3 h 血浆样品 (C) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank human plasma (A), blank human plasma and lansoprazole reference substance (B) and healthy volunteer plasma at 3 h after oral administration (C)

1 兰索拉唑 (lansoprazole)

4.2 血浆标准曲线的绘制 取空白血浆 1.0 mL , 7 份, 分别置具塞离心管中, 精密加入不同浓度的兰索拉唑溶液, 混匀, 配成一系列浓度为 2.0 , 6.0 , 10.0 , 20.0 , 60.0 , 120.0 , $300.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆, 按“3.2”项下方法操作, 经 HPLC 测定, 以兰索拉唑峰面积 A 为纵坐标, 浓度 C ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 按加权最小二乘法^[7] (权重 $1/c^2 \times 10^6$) 进行回归, 得血浆标准曲线为:

$$A = 2.802 \times 10^3 C - 8.224 \times 10^3 \quad r = 0.9997$$

线性范围为 $2.0 \sim 300.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量下限为 $2.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.3 回收率试验 于空白血浆中加入一定量的兰索拉唑溶液, 配制成浓度为 5.5 , 20.0 , $120.0 \text{ ng} \cdot$

mL^{-1} 的系列对照品血浆质控样本各 6 份, 按“3.2”项下方法处理并进样分析, 以实测值与理论值之比计算相对回收率 (%)。3 种浓度下样品的相对回收率分别为 96.7% , 99.8% , 99.7% ; RSD 分别为 6.5% , 4.2% , 2.9% 。

4.4 精密度试验 取空白血浆加入适量的兰索拉唑对照品溶液, 配成 5.5 , 20.0 , $120.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品血浆质控样本, 每 1 个浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d 并与标准曲线同时进行, 以当日的标准曲线计算质量控制样本的浓度, 将质控样本的结果进行方差分析求算本法的精密度, 3 种浓度下样品的日间和日内精密度分别为 8.3% , 4.5% , 4.1% 和 7.1% , 3.9% , 3.5% 。

4.5 提取回收率试验 于空白血浆中加入一定量的兰索拉唑溶液, 配制成浓度为 5.5, 20.0, 120.0 ng·mL⁻¹ 的系列对照品血浆质控样本各 6 份, 按“3.2”项下方法处理并进样分析, 以实测值与未经提取处理的相应浓度标准溶液的理论值之比计算提取回收率(%)。3种浓度下样本的提取回收率分别为 76.5%, 79.8%, 76.3%; RSD 分别为 8.9%, 2.8%, 8.8%。

4.6 稳定性试验

4.6.1 室温稳定性 于空白血浆中加入一定量的兰索拉唑对照品溶液, 配制成浓度为 5.5, 20.0, 120.0 ng·mL⁻¹ 的系列对照品血浆质控样本各 3 份, 于室温分别放置不同时间后按“3.2”项下方法处理并进样分析, 与 0 h 相比求得血浆样本的 RSD 为 2.5%。结果表明, 对照品血浆质控样本在 8 h 内可保持稳定。

4.6.2 冻融稳定性/长期稳定性 于空白血浆中加入一定量的兰索拉唑对照品溶液, 配制成浓度为 5.5, 20.0, 120.0 ng·mL⁻¹ 的系列对照品血浆质控样本各 3 份, 于 -20℃ 冷冻 24 h 取出待完全融解后, 按“3.2”项下方法处理并进样分析, 反复冻融 3 次, 与未冻融前相比求得标准血浆样本的 RSD 为 5.0%。结果表明, 对照品血浆质控样本在冻融条件下可保持稳定。同法制备上述系列对照品血浆质控样本各 3 份, 于 -20℃ 分别冷冻 0, 7, 14, 21 d 后, 取出待完全融解后按“3.2”项下方法处理并进样分析, 与 0 h 相比求得对照品血浆质控样本的 RSD 为 5.2%。结果表明, 对照品血浆质控样本在 -20℃ 条件下可保持 21 d 稳定。

4.7 血药浓度测定 18名男性健康受试者单剂量口服给药兰索拉唑肠溶片 30 mg 后, 于服药前和服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0 h 取前臂静脉血 5 mL, 并立即移至经肝素处理的离心管中, 混匀, 3000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 分离血浆, 于 -20℃ 冷冻保存直至测定。在受试者血浆样品测定过程中, 每工作日建立 1 条标准曲线, 同时配制血浆低、中、高 5.5, 20.0, 120.0 ng·mL⁻¹ 3 个浓度的样本, 每一浓度进行双样本分析, 以判断当日结果的可靠性。按“3.2”项下方法处理并进样分析, 各取样点的平均血药浓度及 SD 分别为 6.11, 12.42, 21.88, 38.89, 65.01, 117.95, 65.71, 33.62, 22.91, 13.81, 5.55 ng·mL⁻¹ 和 1.94, 3.81, 7.23, 11.36, 9.73, 45.35, 27.06, 10.31, 5.70, 3.78, 1.83, 以取样时间点为横坐标, 血药浓度为纵坐标作

图, 结果见图 2。

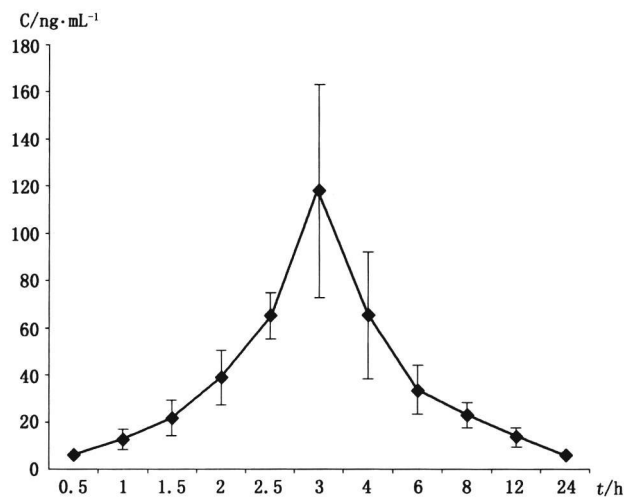


图 2 18名健康志愿者口服兰索拉唑肠溶片 30mg 后的平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 The mean plasma drug concentration - time curve of eighteen healthy volunteers after oral administration of lansoprazole enterosoluble tablets 30 mg

5 讨论

5.1 提取溶剂的选择 本试验在血浆样品的处理方法选择过程中, 分别采用了氯仿-乙醚 (30:70)、乙醚-二氯甲烷 (70:30)、乙酸乙酯-二氯甲烷 (70:30)、二氯甲烷作为提取溶剂, 通过 HPLC 分析比较, 发现以氯仿-乙醚 (30:70) 和乙醚-二氯甲烷 (70:30) 为提取溶剂, 提取效率高, 重复性好。然而, 氯仿的毒性要比二氯甲烷大得多, 综合考虑选择后者作为提取溶剂来处理样品。

5.2 流动相的选择 本试验对比了乙腈-水-三乙胺 (380:620:2) 和甲醇-水 (70:45) 2 种流动相的分离效果, 发现后者可使被测物质与血浆中的内源性物质很好地分离, 且经济适用, 适合于实验室中大批量血浆样品的处理。

5.3 方法的适用性 本研究建立的兰索拉唑血浆浓度测定方法, 具有操作简便、血浆用量少等特点, 简便、快速、准确, 可满足体内药物浓度测定, 适用于临床上兰索拉唑药代动力学的研究。

参考文献

- 1 ZHANG Q ing-yu (张庆瑜), HUANG N ai-xia (黄乃侠), LI Y i-m in (李毅敏), *et al* Pharmacokinetics of lansoprazole in peptic ulcers (兰索拉唑在消化性溃疡病人中的药代动力学研究). *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1998, 14(6): 555
- 2 Li M Y, Zhang W L, Zheng H, *et al* Determination of lansoprazole by direct injection of plasma and high performance liquid chromatography with column switching. *J Chin Pharm Sci* (中国药科学英文版), 1998

- 7(4): 197
- 3 FU Liang-qing(付良青), HUANG Feng(黄丰), WU De-zheng(吴德政), *et al* Determination of lansoprazole and its metabolites 5'-hydroxy lansoprazole and lansoprazole sulfone in human plasma by reversed-phase HPLC(反相高效液相色谱法测定兰索拉唑及其代谢产物 5'-羟基兰索拉唑和兰索拉唑磺的血药浓度). *Chin J Clin Pharmacol Ther*(中国临床药理学与治疗学), 2003, 8(1): 35
 - 4 LI Jian-chun(李见春), HU Qi-sheng(胡齐胜), GAO Shu(高晷), *et al* Bioequivalence of lansoprazole enterosoluble tablets and capsules in healthy volunteers(兰索拉唑肠溶片人体生物等效性研究). *Chin J Clin Pharmacol Ther*(中国临床药理学与治疗学), 2006, 11(5): 558
 - 5 DONG Fu-xiang(董福祥), HU Yu-rong(胡玉荣), QIAO Hai-ling(乔海灵). Determination of concentration of human plasma lansoprazole by HPLC(高效液相色谱法测定人血浆中兰索拉唑浓度). *J China Pharm*(中国药房), 2005, 16(15): 1155
 - 6 ZENG Xiao-hui(曾晓辉), SHI Lei(石磊), LUO Xin-gen(罗新根), *et al* Determination the content of lansoprazole in human plasma by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定人血浆中兰索拉唑的浓度). *China Pharm*(中国药师), 2006, 9(9): 823
 - 7 ZHONG Da-fang(钟大放). The weighted least squares method to establish the standard curve bioanalysis of a number of issues(以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1996, 16(5): 343

(本文于 2008 年 11 月 29 日修改回)

杨腊虎副主任赴荷兰进行科技期刊国际检索系统与电子刊物网络化交流

2009 年 2 月 16~2009 年 2 月 21 日, 中国药品生物制品检定所杨腊虎副主任随中国科学技术协会团组赴荷兰 ELSEVIER 出版总部进行友好访问和学术交流。此次赴荷兰科技期刊国际检索系统与电子刊物网络化交流团由中国科学技术协会组织, 中国科协学会学术部副部长杨文志为团长, 成员包括学术部张建国主任科员、中国科协学会服务中心唐赓科员、中华医学会游苏宁社长、石朝云主任、农业部规划设计研究院魏秀菊主任及中国药品生物制品检定所、中国药学会《药物分析杂志》杨腊虎主任药师。ELSEVIER 总部国际出版部高级副总裁 Paul Evans 博士热情接待了代表团全体成员, 并做了报告。ELSEVIER 物理和化学出版部 Karelnederveen 主任报告了有关期刊群的管理。该公司网络电子产品部 Jan Visser 主任介绍了电子出版物的现状与发展。

中方代表团团长杨文志代表中国科协学术部向外方做了有关中国科技期刊发展的报告, 就中方与外方合作交流、共同发展及双方共同关心的问题进行了热烈的讨论。

ELSEVIER 公司已有 400 年出版历史, 伽利略、达尔文等著名科学家都曾是 ELSEVIER 的作者。近 50 年来, 88% 的物理学奖获得者、95% 的化学奖获得者、56% 的医学奖获得者及 76% 的经济学奖获得者都通过 ELSEVIER 出版过他们的论文。ELSEVIER 拥有像《细胞》、《柳叶刀》等著名学术期刊 2200 种, 其中包括了 10% 的科技医药期刊及 23% 的科技医药期刊作者。ELSEVIER 拥有目前世界上完整的文摘引文数据库, 在 26 个国家雇有 7000 多人, 设立了 70 多个办事处, 其中 1000 人在荷兰大本营。代表团在外方的陪同下, 参观了该公司几百年来的发展史, 所有出版图书期刊历历在目, 他们有序的管理给代表团留下了深刻的印象。



中国科协代表团在外方陪同下, 参观了该公司几百年来的发展史, 所有出版图书期刊历历在目, 他们有序的管理给代表团留下了深刻的印象。

中国科协代表团在外方陪同下, 参观了该公司几百年来的发展史, 所有出版图书期刊历历在目, 他们有序的管理给代表团留下了深刻的印象。

中国科协代表团在外方陪同下, 参观了该公司几百年来的发展史, 所有出版图书期刊历历在目, 他们有序的管理给代表团留下了深刻的印象。

中国科协代表团在外方陪同下, 参观了该公司几百年来的发展史, 所有出版图书期刊历历在目, 他们有序的管理给代表团留下了深刻的印象。

中国科协代表团在外方陪同下, 参观了该公司几百年来的发展史, 所有出版图书期刊历历在目, 他们有序的管理给代表团留下了深刻的印象。

(中国药品生物制品检定所外事处供稿)