

HPLC法检测人血浆中喷昔洛韦浓度及其药代动力学研究

戴青, 夏培元, 陈勇川, 向荣凤, 刘松青

(第三军医大学西南医院药剂科, 国家药品临床研究基地, 重庆 400038)

摘要 目的: 建立测定人体血浆中喷昔洛韦高效液相色谱法, 并测定健康志愿者口服泛昔洛韦片 12 h 内血药浓度。方法: 采用 6% 高氯酸直接沉淀提取血浆, 色谱柱为 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 0.4% 磷酸-甲醇 (95:5) 为流动相, 流速 0.8 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 荧光检测波长为 λ_{ex} = 270 nm, λ_{em} = 375 nm。结果: 喷昔洛韦本法线性范围为 0.05~5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ (r = 0.9999, n = 7); 最低定量限 0.05 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$; 低、中、高 3 种浓度的平均回收率分别为 (97.80 $\pm$ 2.28)%, (96.60 $\pm$ 0.37)%, (96.58 $\pm$ 0.38)%; 日内、日间精密密度 RSD 均 < 4%。结论: 本检测方法简便、快速、经济、准确, 可用于测定人血浆中喷昔洛韦的浓度。

关键词: 喷昔洛韦; 高效液相色谱法; 血浆

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2009)12-2007-03

HPLC determination of penciclovir in human plasma and its pharmacokinetic study

DAIQING XIA Pei-yuan, CHEN Yong-chuan, XIANG Rong-feng, LIU Song-qing

(Department of Pharmacy, Southwest Hospital, The Third Military Medicine University, Base of Clinical Trial, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the determination of penciclovir in human plasma and to determine the concentration of penciclovir in human plasma after oral of famciclovir tablets into healthy volunteers within 12 hours. **Methods** The penciclovir was extracted from plasma by 6% perchloric acid. Chromatographic separation has been achieved on C_{18} column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) with 0.4% phosphoric acid-methanol (95:5) as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL $\cdot$ min $^{-1}$. The fluorescence detection at λ_{ex} = 270 nm and λ_{em} = 375 nm. **Results** The linear range was 0.05–5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ (r = 0.9999, n = 7). The minimum ration limit was 0.05 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$. The average recoveries of low, middle and high concentration were (97.80 $\pm$ 2.28)%, (96.60 $\pm$ 0.37)% and (96.58 $\pm$ 0.38)%, RSDs of inter and intra-day precisions were less than 4%. **Conclusion** The method is simple, rapid, economic and accurate for determination of penciclovir in human plasma.

Key words penciclovir; HPLC; plasma

喷昔洛韦 (penciclovir) 是泛昔洛韦 (famciclovir) 在体内的主要活性代谢产物, 而泛昔洛韦是一种开环核苷类新型高效、低毒抗病毒类药物, 口服后在体内迅速去乙酰化及氧化而被代谢成具有活性的前者, 其对 I 型单纯疱疹病毒 (HSV-1), II 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 以及水痘带状疱疹病毒 (VZV) 有抑制作用。在感染上述病毒的细胞中, 病毒胸苷激酶将喷昔洛韦磷酸化成单磷酸喷昔洛韦, 后者再由细胞激酶将其转化为三磷酸喷昔洛韦。体外试验研究显示, 三磷酸喷昔洛韦通过与三磷酸鸟苷竞争, 抑制 HSV-2 多聚酶的活性, 从而选择性抑制疱疹病

毒 DNA 的合成和复制。目前该药已广泛用于临床治疗带状疱疹和原发性生殖器疱疹。国内外有关采用荧光法检测喷昔洛韦血药浓度的方法甚少, 本文采用 HPLC 方法测定人血浆中喷昔洛韦的含量, 本法简便、快速, 灵敏度高, 适用于喷昔洛韦药物动力学的研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2690 Alliance 液相色谱仪, 包括 Waters 474 荧光检测器, Millennium^{3.2} 数据采集处理系统; 高速离心机 (美国 Abbott 公司); 超纯水器 (Milli-Q plus USA, Millipore 公司); KQ-400KDE

型高功率数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); VORTEX GENIUS 3 圆周振荡器(德国 IKA)。

1.2 试剂与药品 泛昔洛韦片(地奥集团成都药业股份有限公司, $125 \text{ mg} \cdot \text{片}^{-1}$, 批号: 070401); 喷昔洛韦对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100769-200401); 甲醇为色谱纯; 高氯酸为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: KROMASIL C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 0.4% 磷酸-甲醇 (95:5); 流速: $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 荧光检测波长为 $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 375 \text{ nm}$; 进样量: 10 μL 。

2.2 对照品溶液的配制 精密称取喷昔洛韦对照品 10.00 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 混匀, 备用。

2.3 血样处理 取待测血浆 0.2 mL, 再加入 6% 高氯酸 0.2 mL, 振荡混匀 1 min, 离心 5 min ($13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液 10 μL 进样测定。

2.4 方法的专属性 由图 1 可见, 在试验条件下, 喷昔洛韦与血浆中内源性杂质分离良好, 喷昔洛韦的保留时间约为 4.605 min。

2.5 标准曲线的绘制 空白血浆中加入喷昔洛韦对照品溶液适量, 再依次用空白血浆稀释成 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列的浓度, 按“2.3”项下方法处理后上液相色谱仪测定, 记录色谱图, 将喷昔洛韦峰面积 A 对浓度 C 进行线性回归, 得回归方程:

$$A = 7.19 \times 10^2 C + 6.64 \times 10^5 \quad r = 0.9999 (n = 7)$$

线性范围: 0.05 ~ 5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 本试验最低定量限为 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.6 精密度和方法回收率试验 空白血浆中加入喷昔洛韦对照溶液适量, 使成为低、中、高 3 种浓度 (0.1, 0.5, 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.3”项下方法处理后进样, 各浓度日内重复测定 5 次, 并连续测定 5 d 计算日内、日间的精密度; 另外取空白血浆加入喷昔洛韦对照溶液适量, 使成为低、中、高 3 种浓度 (0.1, 0.5, 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 按“2.3”项下方法处理后进样并计算方法回收率, 结果见表 1。

2.7 稳定性考察 空白血浆中加入喷昔洛韦对照溶液适量, 使成为低、中、高 3 种浓度 (0.1, 0.5, 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 分别在 -65 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱冻存 16 d 室温放置 4 h 对照品血浆反复冻融 3 次、对照品血浆经处理后在室温 (10 $^{\circ}\text{C}$) 放置 24 h 其浓度没有明显变化, RSD 分别小于 3.0%、3.0%、2.0%、2.4%, 表明

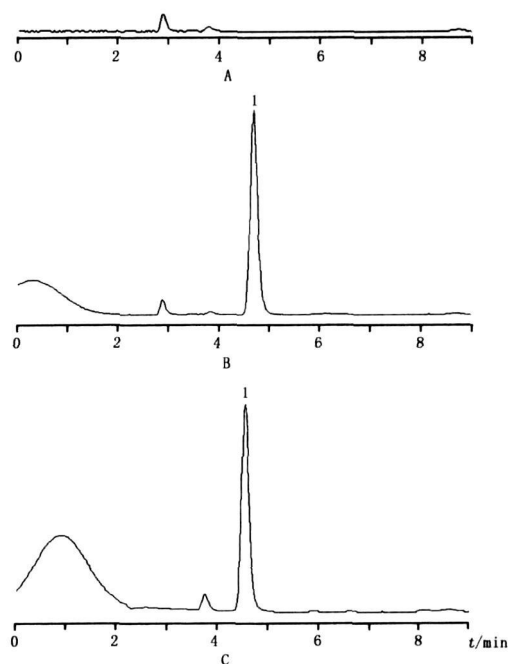


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 空白血浆 + 喷昔洛韦 (blank plasma + penciclovir) ($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) C. 受试者服药后 1 h 血浆样品 (human plasma samples of the volunteer at 1 h after oral administration with drugs)
1 喷昔洛韦 (penciclovir)

在本试验条件下喷昔洛韦血浆稳定性能够满足研

表 1 精密度和回收率试验结果 ($n = 5$)

Tab 1 Test results of precision and recovery

$C / \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内 (intra-day)		日间 (inter-day)		回收率 (recovery) / %	
	$\bar{X} \pm S$	RSD	$\bar{X} \pm S$	RSD	$\bar{X} \pm S$	RSD
	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	%	%	%
0.1	0.100 $\pm$ 0.002	2.0	0.100 $\pm$ 0.003	3.0	97.80 $\pm$ 2.28	2.3
0.5	0.489 $\pm$ 0.005	1.0	0.506 $\pm$ 0.016	3.2	96.60 $\pm$ 0.37	0.39
2	1.929 $\pm$ 0.003	0.16	2.020 $\pm$ 0.072	3.6	96.58 $\pm$ 0.38	0.39

究需要。

2.8 血样测定 经伦理委员会批准, 20 名健康志愿者签署知情同意后各自服用试验药泛昔洛韦片 500 mg 从服药前 (0 h) 及服药后 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h 抽取前臂静脉血 3.0 mL, 收集于肝素化试管中, 在 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min 后, 分离血浆, -65 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻贮存, 分析时按“2.3”项下方法处理后进样测定。喷昔洛韦血药浓度均值-时间曲线。20 名志愿者单剂量口服泛昔洛韦片后, 血药浓度均值-时间曲线见图 2。主要药动学参数见表 2。

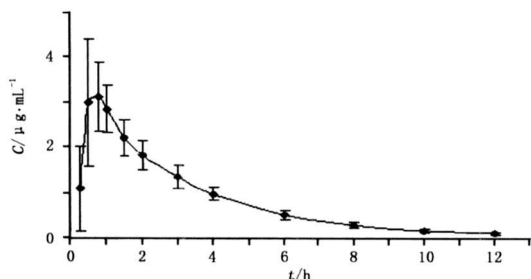


图 2 口服泛昔洛韦 500 mg 后血药浓度 - 时间曲线

Fig 2 Concentration - time curve after oral administration of 500 mg famciclovir

表 2 主要药动学参数测定结果 (n = 20)

Tab 2 Results of main pharmacokinetic parameters

参数 (parameters)	$\bar{x} \pm s$
$t_{1/2}/h$	2.405 ± 0.379
t_{max}/h	0.700 ± 0.264
$C_{max}/\mu g \cdot mL^{-1}$	3.497 ± 0.982
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$	10.469 ± 1.661
$AUC_{0-t}/\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$	10.153 ± 1.655

3 讨论

喷昔洛韦作为泛昔洛韦的主要活性代谢产物, 通过对其体内过程的分析, 以此来研究泛昔洛韦在体内的吸收、代谢情况。20 名健康志愿者单剂量口服试验药泛昔洛韦片 500 mg 与国内文献报道^[4]相比较, 除所用剂型不同外, 二者主要药动学参数较接近。

用 HPLC 法测定喷昔洛韦血浆药物浓度, 国内常用紫外检测法, 而本文采用荧光法检测, 灵敏度高, 特异性强, 杂质干扰少。本试验条件下, 在喷昔洛韦色谱峰后有一血浆的内源性杂质峰, 其荧光吸

收较强, 保留时间也长, 因此样品的分析时间要设置得当, 避免连续进样时干扰喷昔洛韦的测定。

文献报道采用高氯酸^[5]作为流动相组成成分, 其酸性很强, 对色谱柱的影响较大, 而本研究改为 0.4% 磷酸作为流动相组成成分, 样品前处理也简单, 这样测定喷昔洛韦血药浓度就快速、简便, 最低定量限仅为 $0.05 \mu g \cdot mL^{-1}$, 日内、日间精密密度均小于 4%, 符合体内血药浓度分析要求。

参考文献

- HU Hai-tang(胡海棠), TAN Zhi-gang(谭志刚), WANG Xiao-dan(王晓丹), *et al* Pharmacokinetics profile of famciclovir sustained release capsules in healthy volunteers(泛昔洛韦缓释胶囊的人体药代动力学研究及其特征分析). *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2008, 13(6): 679
- ZHANG Xiu-hua(张秀华), HU Guo-xin(胡国新), YANG Dai-zheng(杨代正). Determination of penciclovir in human plasma by HPLC (HPLC 法检测人血浆中喷昔洛韦浓度). *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志), 2008, 17(2): 116
- DENG Ming(邓鸣), WANG Jin(王金), HOU Yan-ning(侯艳宁). Determination of penciclovir in human plasma by HPLC (高效液相色谱法测定人血浆中喷昔洛韦浓度). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2007, 27(3): 346
- ZHANG Ting-ting(张婷婷), LI Tong-ling(李铜铃), SUN Jian(孙健), *et al* Bioequivalence of famciclovir dispersible tablets in human body (泛昔洛韦分散片在人体内的生物等效性). *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2006, 21(3): 260
- LI Ke-xin(李可欣), ZHANG Jing-jing(张京晶), HU Xin(胡欣), *et al* Study on bioequivalence of famciclovir capsules in human (泛昔洛韦胶囊人体生物等效性研究). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2000, 35(7): 463

(本文于 2009 年 1 月 22 日收到)