

文章编号: 1006-2858(2010)07-0559-04

RP-HPLC 法测定人血浆中氟吡汀的浓度

刘龙兴¹, 夏东亚², 郭涛²

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立以 HPLC 法测定人血浆中马来酸氟吡汀的浓度的方法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱, 流动相: 5 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二钠缓冲溶液-乙腈 (体积比为 55:45), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 荧光检测激发波长: 323 nm, 发射波长: 370 nm。结果 氟吡汀血药质量浓度在 10.0~1500.0 μg·L⁻¹ 内线性关系良好 ($r=0.999$), 定量下限为 10 μg·L⁻¹, 方法回收率平均为 105.36%, 提取回收率平均为 90.74%, 日内、日间 RSD 均小于 10%。结论 本方法适用于人血浆中氟吡汀的药代动力学研究。
关键词: 氟吡汀; 高效液相色谱法; 血药浓度
中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

马来酸氟吡汀 (flupirtine maleate) 为选择性神经元钾通道开放剂, 是一种作用于中枢神经系统的非阿片类镇痛药, 有镇痛、肌松作用和对疼痛迁延化的影响, 不产生依赖性和耐受性^[1], 临床上适用于急性轻、中度疼痛。测定马来酸氟吡汀血药浓度的方法有薄层色谱法^[2-3]、HPLC 荧光检测法^[4-5]、LC-MS^[6]等, 本文作者为开展氟吡汀的药代动力学研究, 建立了测定氟吡汀血药浓度的 RP-HPLC 法。作者选择研究马来酸氟吡汀的药动学过程, 为以后多民族健康受试者口服马来酸氟吡汀后体内血药浓度的变化规律及其药物动力学提供参考依据, 国内未查到有关马来酸氟吡汀液相方法学和药动学的报道, 通过本实验, 进一步验证了其 HPLC 的方法学和药动学, 为全军及地方普及其方法学和药动学作为基础。

1 仪器与试剂

Waters HPLC 系统 (包括 Waters600 四元梯度泵、717 自动进样器、Waters2475 可见荧光检测器, 美国 Waters 公司), Empower 色谱工作站 (美国 Waters 公司), AUW120D 电子分析天平 (日本 Shimadzu 公司), PB-10 Sartorius 普及型 pH 计 (德国 Sartorius 公司), YKH- 型液体快速混合器 (江西医疗仪器厂), LG10-2.4A (北京医用离心机

厂)。

马来酸氟吡汀 (纯度质量分数为 99.0%, 批号为 20080401, 武汉鑫华远科技发展有限公司), 唑吡坦对照品 (纯度质量分数为 99.0%, 批号为 100367-200501, 中国药品生物检定所), 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 磷酸氢二钠、磷酸等均为分析纯试剂, 重蒸馏水 (沈阳军区总医院药剂科自制), 空白人血浆 (由沈阳军区总医院输血科提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamosil C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 5 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二钠缓冲溶液-乙腈 (体积比为 55:45), 用 1 mol·L⁻¹ 磷酸调 pH 值至 6.70, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 荧光检测激发波长: 323 nm, 发射波长: 370 nm, 柱温: 室温。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品和内标溶液

精密称取马来酸氟吡汀对照品 (相当于氟吡汀 5 mg) 7.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释至刻度, 配成质量浓度均为 500 mg·L⁻¹ 的贮备液, 置 4℃ 冰箱避光保存备用。精密称取唑吡坦对照品 5 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解

收稿日期: 2009-07-09

基金项目: 全军医学科学技术研究“十一五”计划科技攻关课题基金资助项目 (编号: 06G023)

作者简介: 刘龙兴 (1981-), 男 (汉族), 辽宁辽阳人, 硕士, 主要从事临床药学研究, E-mail 1981_longxing@163.com; 郭涛 (1947-), 男 (汉族), 福建福安人, 主任药师, 研究方向为药物动力学, Tel 024-23994860, E-mail sy_guotao@263.net

定容,配制成 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的唑吡坦内标贮备液,置 4 冰箱中保存,临用前精密量取适量配制成 $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标溶液。

2.2.2 磷酸氢二钠溶液

称取磷酸氢二钠 0.355 g ,加水适量超声溶解,加水至 500 mL ,即得 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠溶液。

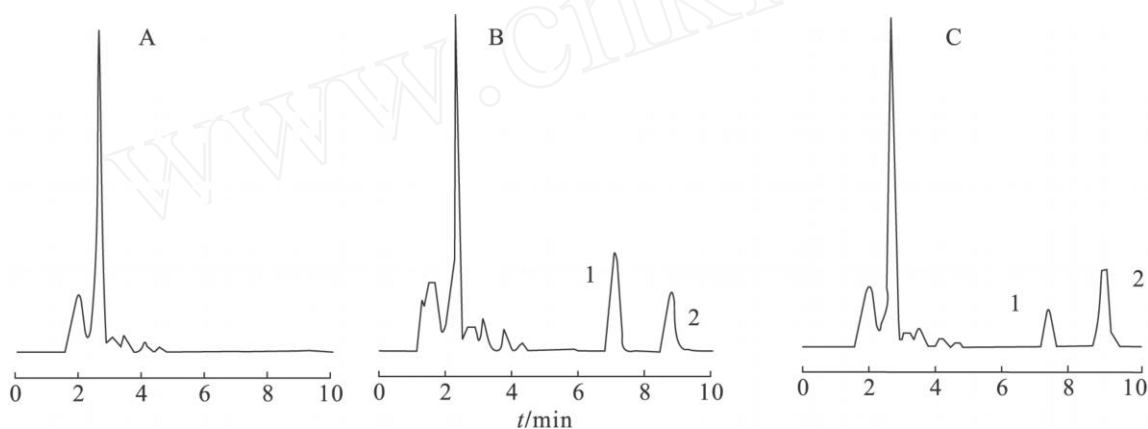
2.3 血浆样品处理

取血浆 0.5 mL ,加 $500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的内标溶液 50

μL ,乙腈 1 mL ,涡旋混合 1 min , $10,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min (离心半径 6.8 cm),取上清液 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 进样。

2.4 专属性试验

在“2.1 色谱条件下,空白血浆、空白血浆加对照品与内标,血浆样品加内标的色谱图见图 1,结果表明氟吡汀和内标与血浆内源性杂质分离良好。



1—Zolpidem; 2—Flupirtine; A—Blank plasma; B—Blank plasma + flupirtine + zolpidem; C—Plasma sample after oral administration

Fig 1 Chromatograms of flupirtine

2.5 线性关系的考察

取空白血浆 0.5 mL ,加马来酸氟吡汀对照品系列溶液,配制成相当于血药质量浓度为 $10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000$ 和 $1500 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列质量浓度标准血浆样品,按“2.3 条操作,进样测定。以血浆样品中氟吡汀质量浓度 (X) 为横坐标,氟吡汀与内标的峰面积比值 (Y) 为纵坐标,用加权 ($W = 1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算,求得直线回归方程: $Y = 0.008X - 0.028$, ($r = 0.999$)。氟吡汀的定量下限为 $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (RSD 为

12.79% , $n = 5$)。

2.6 精密度和回收率试验

取空白血浆 0.5 mL ,制备氟吡汀血浆质量浓度分别为 $20, 200, 1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的低、中、高 3 个浓度的质控血浆样品,按“2.3 条操作,每一质量浓度测定 5 个样本,连续测定 3 d,计算方法的回收率和精密度。与相同浓度对照品未经提取获得的色谱峰面积之比,考察样品的提取回收率,结果见表 1。内标唑吡坦溶液经同样方法测定,提取回收率为 82.12% 。结果见表 1。

Table 1 Recovery rate, with-day and between-day of flupirtine ($n = 5$)

added / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Extract recovery / %	Method recovery / %	RSD / %	
			With-day	Between-day
20.0	92.36 \pm 0.13	99.64 \pm 5.16	5.26	4.62
200.0	90.04 \pm 0.05	106.37 \pm 4.60	5.01	4.29
1000.0	89.83 \pm 0.08	110.07 \pm 7.72	5.68	6.24

2.7 样品稳定性考察

取“2.6 条低、中、高血浆质量浓度分别为 $20, 200$ 和 $1000 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控样品,分别在室温、 -20 冰冻 20 d 和冻融条件下存放。以 0 h 测得值为 100% ,室温条件下放置 4 h 后,测得的含

量分别为 (96.38 ± 0.18)%、(99.53 ± 0.65)%、(99.78 ± 13.13)%,室温条件下放置 12 h 后,测得的含量分别为 (98.31 ± 0.91)%、(95.45 ± 4.33)%、(96.22 ± 7.16)%, -20 冰冻 20 d 条件下取样,测得的含量质量分数分别为 (104.60

± 0.90)%、 (102.65 ± 6.76) %、 (98.75 ± 13.65) %、 -20 冰冻 24 h,在室温下解冻,反复冻融 3 次,测得的含量质量分数为 (102.700 ± 0.013) %、 (99.250 ± 0.029) %、 (100.340 ± 0.019) %。实验结果表明,氟吡汀的血浆样品在室温放置、 -20 冰冻 20 d 和反复冻融 3 次的条件下是稳定的。

2.8 应用

3 名男性健康受试者,年龄 (22.3 ± 0.6) 岁,体质量 (67.0 ± 5.2) kg,受试者空腹口服氟吡汀胶囊 100 mg,用 200 mL 温开水送服。于服药前(0 h)和服药后 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、12、24、36 h 由前臂静脉取血 4 mL 置涂肝素的离心管中,离心后的血浆样品,冷冻保藏备用。本实验中,作者经沈阳军区总医院医学伦理委员会通过,试验前向受试者说明试验目的、药物特性、临床应用范围及可能出现的不良反应,然后由本人签署知情同意书。按“2.3 条操作,测定氟吡汀的血药浓度。3 名健康受试者口服 100 mg 马来酸氟吡汀后的平均药-时曲线见图 2。

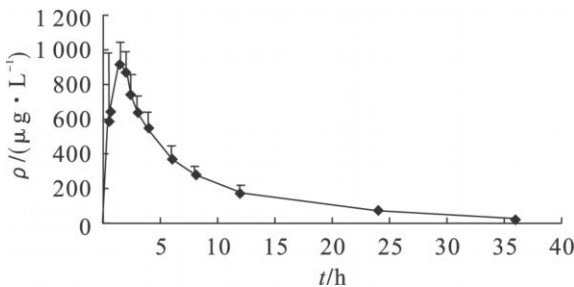


Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of flupirtine after a single oral dose of 100 mg flupirtine tablet in 3 healthy volunteers

3 讨论

a. 国外文献报道测定氟吡汀血药浓度的方法有 HPLC 法和液质联用法等。国内有关氟吡汀血药浓度测定方法较少。作者考察过甲醇-水、乙腈-水、甲醇-缓冲盐、乙腈-缓冲盐作为流动相。通过考察流动相的比例、pH 值及流速,最终确定测定氟吡汀血药浓度的流动相为 5 mmol·L⁻¹ 磷

酸氢二钠缓冲溶液-乙腈(体积比为 55:45)并用 1 mol·L⁻¹ 磷酸将 pH 值调至 6.7,流速:1.0 mL·min⁻¹;此条件下氟吡汀、内标与内源性杂质完全分离。

b. 参考国外文献血样处理方法有蛋白沉淀法^[4-5]、液液萃取方法^[6]。在本色谱条件下考察过蛋白沉淀法和液液萃取方法。文献中乙腈沉淀蛋白后,取上清液吹干复溶,缺点为吹干时间过长,操作繁琐。液液萃取方法提取回收率低,内源性杂质干扰多。作者最终尝试直接乙腈沉淀蛋白后取上清液进样,结果表明内源性杂质干扰少,各成分间分离良好,故最终选择乙腈蛋白沉淀方法。

参考文献:

- [1] FR I EDEL H A, FIITDN A. Flupirtine A review of its pharmacological properties, and therapeutic efficacy in pain states[J]. Drug, 1993, 45: 548 - 561.
- [2] HLAV KA P, N I EBOCH G Untersuchungen zur pharmakokinetik und biotransformation des analgetikums flupirtin beim menschen[J]. Arzneim-Forsch, 1982, 35: 67 - 74.
- [3] OBERMEIER K, N I EBOCH G, TH IEMER K Untersuchungen zur pharmakokinetik und biotransformation des analgetikums flupirtin bei ratte and hund [J]. Arzneim-Forsch, 1985, 35: 60 - 67.
- [4] NARANG P K, TOURVILLE J F, CHATTERJID C., et al Quantitation of flupirtine and its active acetylated metabolite by reversed-phase high-performance liquid chromatography using fluorometric detection [J]. Chromatography, 1984, 305: 135 - 143.
- [5] N I EBOCH G, BORBEHO, HUMMEL T, et al Dose-proportional plasma levels of the analgesic flupirtine maleate in man [J]. Arzneim-Forsch, 1992, 42: 1343 - 1345.
- [6] CHEN Xiao-yan, ZHONG Da-fang, XU Hai-yan, et al Simultaneous determination of flupirtine and its major active metabolite in human plasma by chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of chromatography B, 2001, 755: 195 - 202.

Determination of the concentration of flupirtine in human plasma by RP-HPLC

LIU Long-xing¹, XIA Dong-ya², GUO Tao²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Department of Pharmacy, The General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of flupirtine in human plasma. **Methods** The separation was carried on a Diamonsil C₁₈ column with the mobile phase consisted of 5 mmol·L⁻¹ phosphate buffer-acetonitrile (55:45); the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the excitation and emission wavelengths were set at 323 and 370 nm, respectively. **Results** The linear range of flupirtine was 10.0-1 500.0 μg·L⁻¹ (r=0.999), with the lower quantity limit of 10.0 μg·L⁻¹. The average method recovery was 105.36% and the average extraction recovery was 90.74%. The inter-day RSD and intra-day RSD were both less than 10%. **Conclusions** The method is simple, sensitive, rapid and accurate, and can be used for the pharmacokinetic study of flupirtine.

Key words: flupirtine; HPLC; drug plasma concentration

(上接第 547 页)

- [8] AL-KHALIL S, ALKOFALIA, EL-EISAWID, et al. Transitorine, a new quinoline alkaloid from *Ephedra transitoria* [J]. *J Nat Prod*, 1998, 61(2): 262 - 263
- [9] 许文东, 林厚文, 邱峰, 等. 蛇莓黄酮苷类化学成分研究 [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(13): 981 - 983
- [10] 陈龙, 杜力军, 丁怡, 等. 罗布麻花化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(17): 1340 - 1342
- [11] 王瑞, 俞贵新, 朱恩圆, 等. 川赤芍化学成分研究

[J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(9): 661 - 663

- [12] 李宁, 李铄, 冯志国, 等. 刀豆的化学成分 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24(11): 676 - 678
- [13] 杨晓燕, 陈发奎, 吴立军, 等. 石菖蒲水煎液化学成分的研究 [J]. *中草药*, 1998, 29(11): 730 - 731
- [14] 张荣林, 孙晓翠, 李文欣, 等. 杠板归化学成分的分
离与鉴定 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(2):
105 - 107.

Chemical constituents from the flowers of *Castanea mollissima* Blume

GAO Lim ei, WU Li-jun, HUANG Jian, SUN Bo-hang, GAO Hui-yuan

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To isolate the chemical constituents and elucidate their structures from the flowers of *Castanea mollissima* Blume. **Methods** The compounds were isolated by column chromatography on silica gel, Sephadex LH-20 and so on, together with recrystallization methods. NMR spectral analysis and co-TLC were employed for the structural identification. **Results** Eleven compounds were obtained and elucidated as: 2,3,23-trihydroxy-olean-12-en-28-acid (1), 4-quinolinone-carboxylic-2-acid n-butyl ester (2), quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (3), kaempferol (4), quercetin (5), kaempferol-3-O-[6-O-(E)-p-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside (6), kaempferol-3-O-[2,6-di-O-(E)-p-coumaroyl]-β-D-glucopyranoside (7), gallic acid (8), protocatechuic acid (9), 5-hydroxymethylfurfuraldehyde (10), quercetin-3-O-β-D-glucuronide 6-methyl ester (11), respectively. **Conclusions** Compounds 1, 2 and 11 are isolated from *Castanea* genus for the first time, and compound 3 is obtained from this plant for the first time.

Key words: *Castanea mollissima* Blume; chemical constituent; structural elucidation