

表 3 正交试验结果

Tab 3 Results of orthogonal experiments

试验号	因素			吸附率 (y ₁ %)	解吸率 (y ₂ %)	综合评分 (y ₁ +2y ₂)
	A	B	C			
1	1(1.0 g·mL ⁻¹)	1(3.0)	1(1 BV·h ⁻¹)	54.6	51.6	157.8
2	1	2(4.0)	2(2 BV·h ⁻¹)	45.9	49.6	145.1
3	1	3(5.0)	3(3 BV·h ⁻¹)	23.4	31.2	85.8
4	2(1.5 g·mL ⁻¹)	1	2	50.6	46.9	144.4
5	2	2	3	40.1	37.4	114.9
6	2	3	1	25.8	34.3	94.4
7	3(2.5 g·mL ⁻¹)	1	3	32.9	41.4	115.7
8	3	2	1	35.2	38.6	112.4
9	3	3	2	32.7	25.4	83.5
I	129.6	139.3	121.5			
II	117.9	124.1	124.3			
III	103.9	87.9	105.4			
R	25.7	51.4	18.9			

表 4 方差分析表

Tab 4 Analysis of variance on orthogonal experiments

方差来源	自由度	离均差平方和	均方	F	P
A	2	993.5	496.8	25.9	<0.05
B	2	4184.8	2092.4	109.2	<0.01
C	2	621.9	311.0	16.2	
误差	2	38.3	19.15		

根有机酸组分的吸附率(y₁%)、解吸率(y₂%)分别为(52.9±9.2),(56.3±14.7)(n=3)。

通过验证试验,表明所优化的 D101 型树脂分离纯化板蓝根有机酸组分的工艺参数稳定、可行。

3 讨论

本实验采用酸性乙醇提取板蓝根药材,以丁香酸为指标,对非极性的 HPD100、D101,极性的 NKA-9 和弱极性的 AB-8 等型号大孔树脂的吸附性能加以考察。结果表明,D101 型树脂对板蓝根中有机酸组分的吸附与解吸性能较好,通过优选树脂洗脱液,并进一步采用正交试验优化影响树脂吸附的因素以确定其合理工艺流程,所应用的优化工艺参数效果良好,符合规模化生产要求。

由于大孔吸附树脂对目标物质的纯化效果主要受树脂结构、吸附或洗脱条件以及待分离物质结构等因素的制约^[9],故务必结合 HPLC 等定量分析手段考察有效部位化学成分(群)的变化,从

而科学指导工艺研究;在此基础上,可以逐步增加考察指标或采用 HPLC 特征图谱研究方法对其进行扩大化比较研究,综合遴选优化树脂,拓展研究的适用范围。

参考文献:

[1] 方建国,刘云海,王文清,等. 板蓝根清热解毒实质研究[J]. 中草药,2008,39(3):1-4.

[2] 雷黎明,潘清平. 板蓝根化学、药理、质量及提取方法的研究进展[J]. 时珍国医国药,2007,18(10):2578-2580.

[3] 方建国,万进,汤杰,等. 板蓝根防治病毒感染性疾病的研究概况[J]. 中国中药杂志,2009,34(24):1743-1745.

[4] Fang JG,Liu YH,Wang WQ,et al. The anti-endotoxic effect of o-aminobenzoic acid from *Radix Isatidis*[J]. Acta Pharmacologica Sinica,2005,26 (5):593-597.

[5] 孙东东,何立巍,李祥,等. 板蓝根化学成分研究[J]. 中国药房,2007,18(3):172-173.

[6] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等. 微量热法研究板蓝根中四种有机酸对微生物生长代谢的影响[J]. 生物工程学报,2008,24(4):646-650.

[7] 左丽,李建北,徐景,等. 板蓝根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(8):688-691.

[8] 王文清,张飞,方建国,等. 反相高效液相色谱法测定板蓝根中丁香酸与丁香酸的含量[J]. 医药导报,2006,25(5):456-457.

[9] 房信胜,谭晓梅. 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的定性定量分析[J]. 中国中药杂志,2005,30(17):1331-1334.

[收稿日期]2010-09-20

超快速液相色谱-质谱联用法测定人血浆中双氯芬酸钠的浓度

李冬艳¹,丁水平¹,陈小梅¹,钱振宇²,毋丹²,郑恒¹ (1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部,湖北 武汉 430030;2. 华中科技大学同济医学院药学院,湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的:建立测定人血浆中双氯芬酸钠含量的超快速液相色谱-质谱联用(UFLC-MS/MS)方法。方法:血浆样品经乙腈沉淀蛋白后,以乙腈-2 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液(45:55)为流动相,用 Ultimate C₁₈(5 μm,2.1 mm×150 mm)色谱柱,通过

[作者简介] 李冬艳,女,硕士,电话:18657179828,E-mail:lidongyan2005@yahoo. cn [通讯作者] 郑恒,男,副主任药师,博士,电话:027-83662498,E-mail:pencontainer@yahoo. com. cn

电喷雾离子化三重四级杆串联质谱,经多反应监测模式检测,监测的离子对为 m/z 295.9 $\rightarrow$ m/z 251.8(双氯芬酸钠), m/z 250.8 $\rightarrow$ m/z 207.9(苯妥英钠,内标)。结果:双氯芬酸钠在1.955~195.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好,最低检测浓度为1.955 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。方法回收率($n=5$)分别为73.92%,80.98%,86.28%,日内和日间精密度 RSD 均小于 10%。结论:该法操作简单,灵敏度高,准确,重现性好,适用于该药的临床药代动力学研究。

[关键词] 双氯芬酸钠;UFLC-MS/MS;血浆

[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)18-1507-04

Determining the content of diclofenac sodium in human plasma by UFLC-MS/MS

LI Dong-yan¹, DING Shui-ping¹, CHEN Xiao-mei¹, QIAN Zhen-yu², WU Dan², ZHENG Heng¹ (1. Department of Pharmaceutics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei wuhan 430030, China; 2. Pharmaceutical college, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei wuhan 430030, China)

ABSTRACT;OBJECTIVE To establish an UFLC/MS/MS method for the determination of diclofenac sodium in human plasma. **METHODS** The plasma was deproteinated by acetonitrile. The separation was performed on an Ultimate C18 (5 mm, 2.1 mm $\times$ 150 mm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile-water (45:55 v/v) containing 2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ammonium acetate, was used as the gradient elution. Detection was performed on a tandem mass spectrometry with electrospray ionization source in positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transition of m/z 295.9 $\rightarrow$ m/z 251.8 (diclofenac sodium) and m/z 250.8 $\rightarrow$ m/z 207.9 (phenytoin sodium) was used to quantify diclofenac sodium and internal standard respectively. **RESULTS** The linear range was 1.955—195.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the limit of determination was 1.955 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The method recoveries were 73.92%, 80.98%, 86.28% respectively and the RSD of intra-day and inter-day was less than 10%. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, accurate and reproducible. It is applicable for pharmacokinetic study of diclofenac sodium.

KEY WORDS: diclofenac sodium; UFLC-MS/MS; human plasma

双氯芬酸钠(Diclofenac sodium)为苯乙酸类衍生物,化学名称为 2-[(2,6-二氯苯基)氨基]苯乙酸钠,属非甾体类抗炎药,具有抗炎、镇痛、解热作用。目前临床上主要用于治疗风湿性关节炎,骨关节炎,关节周围病变以及创伤引起的肌腱、韧带、肌肉及关节损伤^[1]。有关双氯芬酸钠血药浓度的测定方法,国内外已有相关文献报道,但是这些方法多存在检测时间较长或样品处理方法繁琐等缺点^[1-6];为此,本文建立了一种样品处理方法简单、分析时间短、灵敏度高的双氯芬酸钠超快速液相色谱-质谱联用(UFLC-MS/MS)测定方法,以满足该药的临床药动力学研究的需要。

1 材料

API 4000 LC/MS/MS System, 配备电喷雾离子化源(ESI)(美国 Applied Biosystem 公司); Agilent 1200 液相色谱系统,包括 G1311A 型四元输液泵, G1313A 型自动进样器, G1316A 型柱温箱和 G1379A 型脱气机(美国 Agilent 公司)。

双氯芬酸钠对照品(铁岭天德制药,纯度:99%,批号 20090517);内标苯妥英钠对照品(苏州第五制药有限公司,纯度:99%,批号 20090423);受试药品用双氯芬酸钠栓(A 药,规格:12.5 mg/粒,批号

090512,湖北东信药业有限公司);对照药品双氯芬酸钠栓(润安可, R 药,规格:12.5 mg/粒,批号 090402,湖北四环制药有限公司)。保存条件:遮光、密封、阴凉干燥处保存。乙腈、甲醇均为色谱纯;乙酸铵为分析纯;实验用水为娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Ultimate C₁₈ (5 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm) 色谱柱, 美国 Welch materials 公司; 预柱: C₁₈ 保护柱 (4 mm $\times$ 3.0 mm I. D.), 美国 Phenomenex 公司; 流动相: 乙腈-2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液 (45:55), 流速: 0.3 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量: 10 μL , 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源(ESI); 喷雾电压(IS) -4500 V; DP 电压为 -60 V; 碰撞诱导解离(CE) 电压为 -16 V; EP 电压为 -6 V; CXP 电压为 -5.8 V; 气帘气(CUR) 为 25; 碰撞气(CAD) 为 6; 加热温度为 450 $^{\circ}\text{C}$; GAS1 为 60; GAS2 为 60。检测方式: 负离子检测; 扫描方式: 多反应监测(MRM) 方式, 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 295.9 $\rightarrow$ m/z 251.8(双氯芬酸钠), m/z 250.8 $\rightarrow$ m/z 207.9(苯妥英钠, 内标)。

2.2 受试者选择 20 名男性受试者, 年龄(23.2±2.17)岁, 体重指数 19~24 kg·m⁻²。试验前接受全面体检, 其血、尿常规、肝、肾功能、血压、心率、心电图等均为正常。3 个月内未参加其他药物试验, 2 周内未服用任何药物。试验前受试者自愿签署书面知情同意书。按照国家食品药品监督管理局 GCP 指导原则设计试验方案, 并获得华中科技大学同济医学院医学伦理委员会批准。

2.3 样品收集与溶液配制

2.3.1 受试者血样采集 采用两制剂, 两周期, 随机自身对照交叉试验设计, 20 名受试者随机分为 2 组, 每组 10 人, 于试验前一日晚餐后开始禁食。试验当日晨间受试者排空大便, 空腹以直肠用药。用时将栓剂取出, 以少量温水湿润后, 轻轻塞入肛门 2 cm 处。给药 2 h 后方可饮水, 4 h 后统一进低脂清淡饮食。受试者于给药前(0 h), 给药后 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h。采集上肢静脉血 4 mL, 置于肝素抗凝管中, 3 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取血浆, -80 °C 保存备用。试验分成两周期进行, 清洗期为 7 d。

2.3.2 对照品溶液的配制 取双氯芬酸钠对照品适量, 精密称定, 以甲醇为溶剂溶解, 定量配制成 19.55, 48.875, 122.1875, 244.375, 488.75, 977.5, 1955 μg·L⁻¹ 的双氯芬酸钠标准溶液, 及浓度为 48.875, 244.375, 1564 μg·L⁻¹ 的质控标准溶液, 于 -20 °C 冰箱保存待用。

2.3.3 内标溶液的配制 取苯妥英钠适量, 精密称定, 以甲醇为溶剂溶解, 定量配制成 1.74 μg·mL⁻¹ 溶液, 作为内标工作液。于 -20 °C 冰箱保存待用。

2.3.4 血浆样品处理 精密吸取血浆样品 0.2 mL, 置 1.5 mL 的 Ep 管中, 精密加入内标溶液 20 μL, 涡旋混匀后, 加乙腈 500 μL, 涡旋 1 min, 于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取 200 μL 上清液于进样瓶中, 取上清液 10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线的制备 取空白血浆 0.18 mL, 加入不同浓度的双氯芬酸钠标准溶液 20 μL, 配制成相当于双氯芬酸钠血浆浓度为 1.955, 4.8875, 12.21875, 24.4375, 48.875, 97.75, 195.5 μg·L⁻¹ 的样品, 按“2.3.4 项”自“精密加入内标溶液 20 μL”起同样操作, 记录色谱图; 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值(Y)为纵坐标, 用加权(W=1/x²)最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线。

2.4.2 回收率和精密度 取双氯芬酸钠对照品, 按

“2.4.1”项下方法, 配制 4.8875, 24.4375, 156.4 μg·L⁻¹ 低、中、高 3 个浓度的血浆样品, 按照前述血浆样品处理方法进行处理, 并进行测定。计算双氯芬酸钠的方法学回收率; 每天进行 5 样本测定作为日内精密度; 连续测定 3 d, 求得不同浓度样品的日间精密度。

2.4.3 稳定性试验 按“2.4.1 项下”测定方法配制成为双氯芬酸钠浓度为 4.8875, 24.4375, 156.4 μg·L⁻¹ 的低、中、高 3 个浓度的各 12 份血浆样本。3 份样品配制好于室温下放置 8 h 后按“2.3.4”项下操作分析; 3 份样品处理好后于进样器中放置 8 h 进样分析; 3 份样品配制好后反复冻融 3 次后按“2.3.4”项下操作分析; 3 份样品于配制好后放入 -80 °C 冰箱中冷冻保存 1 个月后取出室温融化, 按“2.3.4”项下操作分析, 考察血浆样本中双氯芬酸钠的稳定性。

3 结果

3.1 方法学评价

3.1.1 专属性 在上述的实验条件下, 血浆中内源性物质及其他药物不干扰双氯芬酸钠的测定。双氯芬酸钠和苯妥英钠峰形良好, 保留时间分别为 2.3, 3.0 min, 结果见图 1。

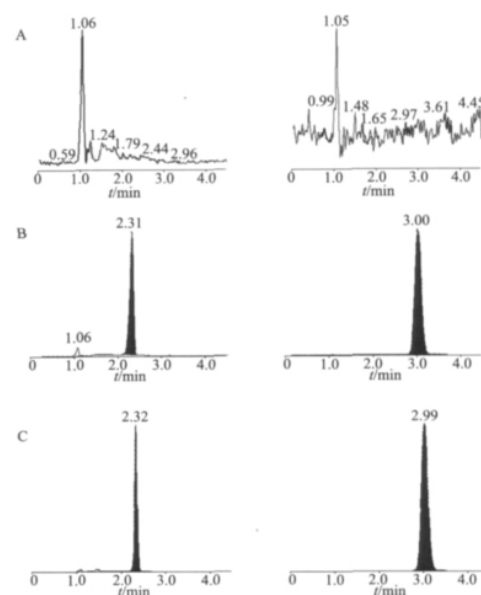


图 1 血浆中双氯芬酸钠(左)和苯妥英钠(右)的 MRM 色谱图
A. 空白血浆; B. 空白血浆+双氯芬酸钠+苯妥英钠; C. 直肠用双氯芬酸钠栓 45 min 后血浆样品色谱图

Fig 1 Chromatograms of diclofenac sodium(left) and phenytoin sodium (right) in human plasma

A. blank plasma; B. blank plasma + diclofenac sodium + phenytoin sodium; C. plasma sample of 45 min after rectal administration

3.1.2 标准曲线 结果表明, 双氯芬酸钠浓度在

1.955~195.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 色谱响应符合线性关系, 其标准曲线方程 ($n=5$) 为: $Y=(0.014\ 34\pm 0.000\ 747) X+(-0.001\ 96\pm 0.001\ 951)$, $r=(0.998\ 1\pm 0.001\ 332)$, 血浆中双氯芬酸钠的定量下限为 $1.955\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.1.3 回收率和精密度 双氯芬酸钠血浆样品的方法学回收率在 65.01%~92.68%, 日内精密度 < 10%, 日间精密度 < 8%, 符合生物样本测定的要求, 结果见表 1。

表 1 血浆中双氯芬酸钠测定方法的精密度及相对回收率
Tab 1 The recovery rate and precision of the method for determination of diclofenac sodium in human plasma

加样质量浓度 /mg·L ⁻¹	检出质量浓度 /mg·L ⁻¹	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%	相对回收率 /%
4.8875	4.81±0.15	4.96	3.14	102.6±5.8
24.4375	25.01±0.14	7.85	0.55	103.0±8.8
156.4	158.9±1.2	5.76	0.79	102.2±6.5

3.1.4 稳定性 按上述“2.4.3”项中各项操作分析, 血浆样品中的双氯芬酸钠均保持稳定。表明样品在储存及检测过程中稳定性良好, 可以满足试验的需要。

3.2 药动学研究 用本方法测定血浆中双氯芬酸钠的浓度, 其受试者直肠给予双氯芬酸钠栓受试药品(A 药)和对照药品(R 药)后平均血药浓度-时间曲线图见图 2, 其主要药动学参数采用 DAS 2.0 软件进行计算, 结果见表 2。本法中血浆内源性杂质和其他药物不干扰双氯芬酸钠的测定, 符合生物样本的测定要求, 可用于双氯芬酸钠血药浓度的测定和临床药动学研究。

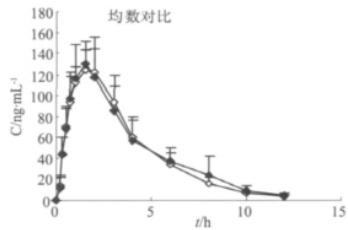


图 2 健康受试者直肠给予双氯芬酸钠平均血药浓度-时间曲线图
—◇—对照药; —◆—受试药品
Fig 2 The mean plasma concentration-time curves of diclofenac sodium after rectal administration in healthy volunteers
—◇—reference preparation; —◆—test preparation

4 讨论

据国内外文献^[1-4]报道, 双氯芬酸钠血药浓度的测定主要采用 HPLC 法, HPLC 法灵敏度低, 据文献^[2]报道定量下限为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 难以达到药动学研

表 2 20 名受试者给予 2 种制剂后的主要药动学参数 ($n=20$)

Tab 2 The main pharmacokinetic parameters of 20 subjects after taking diclofenac sodium ($n=20$)

制 剂	A 药	R 药
$t_{1/2}/\text{h}$	2.1 ± 0.5	2.0 ± 0.6
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	145.8 ± 22.9	143.9 ± 18.9
T_{max}/h	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.6
$\text{AUC}_{(0-6)}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	559.8 ± 117.6	542.7 ± 88.4
$\text{AUC}_{(0-\infty)}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	579.2 ± 127.6	554.8 ± 80.2

究所需的检测限, 文献报道的液质联用法^[5-6]均用于测定中成药或中药制剂中的双氯芬酸钠成分的浓度, 尚未用于药动学研究。本实验采用 UFLC-MS/MS 方法用于人体血浆中双氯芬酸钠浓度的测定, 其定量下限为 $1.955\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 灵敏度较高, 用沉淀蛋白法处理样品, 操作简单, 分析时间短。

在方法学考察过程中, 我们曾用乙腈-水, 甲醇-水作为流动相, 双氯芬酸钠和内标的分离效果均不好, 且保留时间很长, 后改用乙腈-水 (含 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵) 作为流动相, 峰形较好, 分离效果也好。血浆样品处理方法, 据文献^[1]报道, 多采用溶剂提取法, 样品处理繁琐, 耗时长且杂峰干扰多。本方法采用乙腈直接沉淀除去蛋白, 其处理方法比提取法简单, 快捷, 回收率高, 重复性好。文献报道样品分析时间为 $15\ \text{min}$ ^[1], 本方法分析时间仅用 $4.5\ \text{min}$, 节约了样品分析时间, 适合大量样本分析的需要。

本法操作简单, 灵敏度高, 准确, 重现性好。在进行药动学研究时, 无双氯芬酸钠代谢物和血浆中内源性杂质的干扰, 适用于双氯芬酸钠血药浓度的测定。

参考文献:

[1] 胡爱萍, 胡国新, 邱相君, 等. 国产双氯芬酸钠缓释栓的人体药代动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(4): 451-454.
[2] 缪海均, 范国荣, 刘皋林. 高效液相色谱法测定人血浆中双氯芬酸钠的浓度[J]. 中国药房, 2003, 14(12): 736-737.
[3] 万波, 晏菊姣, 范颖, 等. 双氯芬酸钠缓释栓相对生物利用度研究[J]. 医药导报, 2004, 23(4): 218-219.
[4] 郭涛, 郑春丽, 李慧颖. 双氯芬酸钠微丸人体药动学[J]. 中国临床药理学杂志, 2003, 12(5): 274-277.
[5] 李欣荣, 陈安珍, 杨钊. UPLC-MS/MS 检测消肿止痛类中成药中违禁添加的双氯芬酸钠和氨基比林[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7): 1294-1297.
[6] 刘福艳, 蒋俊, 谢元超, 等. 液相色谱-质谱联用法检测中药制剂中掺入的双氯芬酸钠和醋酸泼尼松[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(12): 1231.

[收稿日期] 2010-11-04