

# RP-HPLC 法测定人血浆中氟康唑的浓度<sup>△</sup>

孙文嘉<sup>1,2</sup>, 夏东亚<sup>1</sup>, 郭涛<sup>1#</sup> (1. 沈阳军区总医院药剂科, 沈阳市 110016; 2. 大连医科大学药学院, 大连市 116027)

中图分类号 R969.1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2007)26-2028-03

**摘要** 目的: 建立以反相高效液相色谱法测定人血浆中氟康唑浓度的方法。方法: 血浆样品经液-液萃取处理后进行测定, 其中色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>, 流动相为甲醇-0.07% 三乙胺水溶液(50:50), 流速为 1 mL·min<sup>-1</sup>, 紫外检测波长 210nm, 柱温为室温, 内标为非那西汀。结果: 氟康唑检测浓度在 0.15~10.0 mg·L<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好( $r=0.9992$ ), 定量下限为 0.15 mg·L<sup>-1</sup>; 日内 RSD 为 3.37%~7.48%, 日间 RSD 为 7.03%~12.50%; 平均方法回收率为 103.64% (RSD=5.04%), 平均提取回收率为 83.81% (RSD=5.77%)。结论: 本方法灵敏、准确、快速、重现性好, 适用于血浆中氟康唑浓度的测定。

**关键词** 反相高效液相色谱法; 氟康唑; 血药浓度

## Determination of Fluconazole in Human Plasma by RP-HPLC

SUN Wenjia, XIA Dongya, GUO Tao (Dept. of Pharmacy, The General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China)

SUN Wenjia (College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish RP-HPLC method for the determination of fluconazole in human plasma. METHOD: After liquid-liquid extraction, the plasma sample was analyzed on Diamonsil C<sub>18</sub> column with column temperature set at room temperature. The mobile phase consisted of methanol-0.07% aqueous solution of triethylamine (50:50) with a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>. The UV detection wavelength was set at 210nm, and phenacetin was used as the internal standard. RESULTS: The linear range of fluconazole was 0.15~10.0 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.9992$ ), with lower quantification limit at 0.15 mg·L<sup>-1</sup>. The intra-day RSD was between 3.37% and 7.48% and the inter-day RSD was between 7.03% and 12.05%; the method recovery was 103.64% (RSD=5.04%), and the average extraction recovery was between 83.81% (RSD=5.77%). CONCLUSION: This method was sensitive, accurate, rapid and reproducible, and suitable for the content determination of fluconazole in plasma.

**KEY WORDS** RP-HPLC; Fluconazole; Blood concentration

氟康唑(Fluconazole)为新型三唑类抗真菌药,有广谱抗真菌作用,能选择性地抑制真菌的甾醇合成。临床可用于治疗全身性念珠菌病、隐球菌病、黏膜念珠菌病、急性或复发性阴道念珠菌病和皮肤真菌病等,且具有吸收快、嗜汗腺性、体内分布广、半衰期长、药品不良反应少等特点<sup>[1]</sup>。为开展氟康唑在我国不同民族人群的药动学研究,笔者建立了测定氟康唑血药浓度的反相高效液相色谱法<sup>[2]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 仪器

600 高效液相色谱系统,包括 2487 紫外检测器(美国 Waters 公司); N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所); YKH-2 型液体快速混合器(江西医疗器械厂); KQ3200DE 型超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司); LXJ

II 型离心沉淀机(上海医疗器械三厂); TGL 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

### 1.2 试剂

氟康唑对照品(江苏扬子江药业集团公司,批号:20060622,含量:100.1%);内标:非那西汀标准品(中国药品生物制品检定所,含量:99%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为市售分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub>(200mm×4.6mm, 5μm); 流动相: 甲醇-0.07% 三乙胺水溶液(用磷酸调节 pH 值至 6.2)=50:50; 流速: 1 mL·min<sup>-1</sup>; 紫外检测波长: 210nm; 柱温: 室温。在此色谱条件下,氟康唑、内标与血浆组分分离良好,保留时间分别为 5.27、9.49min。色谱详见图 1。

### 2.2 对照品与内标溶液的配制

准确称取氟康唑对照品 10.0mg,用甲醇溶解并定容至 50mL,配成 200mg·L<sup>-1</sup> 对照品溶液。另准确称取非那西汀标准品 10.0mg,用甲醇溶解并定容至 50mL,配成 200mg·L<sup>-1</sup>

<sup>△</sup> 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(06G023)

硕士研究生。研究方向: 临床药学。电话: 024-23051435, E-mail: sunwj9@163.com

# 通讯作者: 主任药师, 博士研究生导师。研究方向: 临床药学。电话: 024-23994860, E-mail: syguotao@263.net

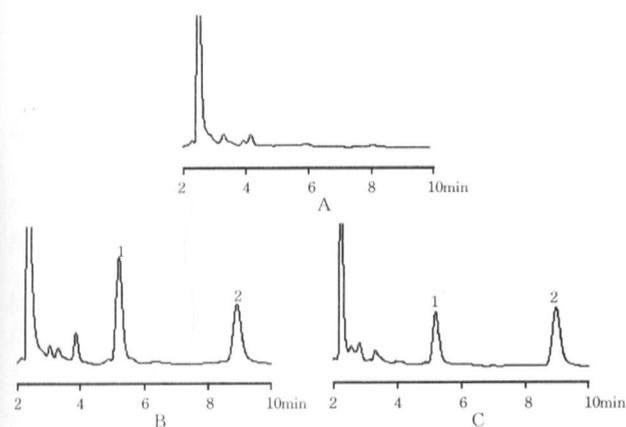


图1 高效液相色谱

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 氟康唑对照品 + 内标; C. 服药后血浆; 1. 氟康唑; 2. 非那西丁

Fig 1 HPLC

A. blank plasma; B. blank plasma + control substance of fluconazole + internal standard; C. plasma sample after drug administration; 1. fluconazole; 2. phenacetin

内标溶液, 置于 4℃ 冰箱中保存, 使用时用甲醇稀释至所需浓度。

### 2.3 血浆样品的预处理

取血浆 0.5 mL, 置于 10 mL 具塞试管中, 加入  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  非那西丁 50  $\mu\text{L}$ , 涡旋 10 s, 再加入  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 500  $\mu\text{L}$ , 涡旋 30 s, 静置 5 min, 加入乙酸乙酯 5 mL, 涡旋 1 min,  $2400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取有机层 4.5 mL, 于 40℃ 水浴上氮气流吹干, 以 150  $\mu\text{L}$  流动相溶解残渣, 并转移至 1.5 mL 离心管中,  $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清 20  $\mu\text{L}$  进样分析。

### 2.4 线性关系及定量下限考察

取空白血浆, 分别加氟康唑对照品溶液, 使血药浓度相当于 0.15、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 按“2.3”项下方法进行测定, 以氟康唑浓度 ( $C$ ) 为纵坐标, 氟康唑与内标的峰面积比值 ( $A_s/A_i$ ) 为横坐标, 按  $1/C$  权重进行线性回归, 得回归方程  $C = 1.6420 A_s/A_i + 0.0692$  ( $r = 0.9992$ )。结果表明, 氟康唑检测浓度在 0.15~10.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内线性关系良好。定量下限为 0.15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 能满足 3 种消除半衰期时血浆样品中的氟康唑浓度的测定, 其  $\text{RSD} = 9.54\%$  ( $n = 5$ )。

### 2.5 精密度试验

取空白血浆, 分别加氟康唑对照品溶液, 制成血药浓度相当于低、中、高 (0.25、1.0、8.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 种浓度的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下方法操作, 于同日内测定 5 次, 计算日内  $\text{RSD}$ , 结果 3 种浓度的日内  $\text{RSD}$  分别为 7.48%、4.26%、3.37%; 另将上述样品连续测定 5 d, 计算日间  $\text{RSD}$ , 结果 3 种浓度的日间  $\text{RSD}$  分别为 7.81%、12.50%、7.03%。

### 2.6 回收率试验

2.6.1 方法回收率: 取空白血浆, 分别加氟康唑对照品溶液, 制成血药浓度相当于低、中、高 (0.25、1.0、8.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 个浓度的血浆样品各 5 份, 按“2.3”项下方法操作, 计算氟康唑的浓度, 以测得量与加入量的比值计算方法回收率。结果详见表 1。

2.6.2 提取回收率: 取空白血浆, 分别加氟康唑对照品溶液, 制成血药浓度相当于低、中、高 (0.25、1.0、8.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 种浓

表 1 回收率试验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Tab 1 Results of recovery test ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

加入量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	方法回收率			提取回收率			
	测得量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	方法回收率 /%	$\bar{x}$ /%	RSD /%	提取回收率 /%	$\bar{x}$ /%	RSD /%
0.25	$0.24 \pm 0.018$	$96.02 \pm 8.03$			$84.47 \pm 7.82$		
1	$1.09 \pm 0.047$	$109.66 \pm 5.12$	103.64	5.04	$84.09 \pm 3.83$	83.81	5.77
8	$8.42 \pm 0.280$	$105.25 \pm 3.80$			$82.86 \pm 2.90$		

度的血浆样品各 5 份。按“2.3”项下方法操作, 测得氟康唑峰面积为  $A_1$ , 另用流动相配制成相同浓度的氟康唑溶液直接进样, 测得氟康唑峰面积为  $A_2$ , 按公式: 提取回收率 =  $A_1/A_2 \times 100\%$  计算提取回收率。结果详见表 1。

### 2.7 样品稳定性试验

取空白血浆, 分别加氟康唑对照品溶液, 制成血药浓度相当于低、中、高 (0.25、1.0、8.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 种浓度的血浆样品各 3 份。在室温条件下放置, 分别于 0、2、6、12 h 时取样, 按“2.3”项下方法操作, 计算氟康唑的浓度。结果提示, 样品在室温下放置 12 h 内稳定 (偏离度为 -4.6% ~ -0.08%)。

取空白血浆, 分别加氟康唑对照品溶液, 制成血药浓度相当于低、中、高 (0.25、1.0、8.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 种浓度的血浆样品各 3 份。在 -20℃ 冰冻后取出, 室温融化, 重复操作 3 次, 按“2.3”项下方法操作, 计算氟康唑的浓度。结果, 样品在 3 次冻融过程中稳定 (偏离度 < 5.0%)。

取空白血浆, 分别加氟康唑对照品溶液, 制成血药浓度相当于低、中、高 (0.25、1.0、8.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 种浓度的血浆样品各 3 份。在 -20℃ 冰冻放置, 分别于 0、10、20、30 d 时取样, 按“2.3”项下方法操作, 计算氟康唑的浓度。结果, 样品在冰冻条件下放置 30 d 稳定 (偏离度 < 5.0%)。

### 2.8 应用

3 名受试者均为健康男性志愿者, 年龄 21~24 a, 体重 50~70 kg。受试者于试验前一日晚 7:00 开始禁食, 试验当日 7:30 空腹服药, 药物的服药量为 200 mg, 于服药前 0 h 和服药后 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、8.0、12、24、48、72、96 h 时由前臂静脉取血 4 mL, 置于涂肝素的离心管中, 再取静置离心后的血浆样品, -20℃ 冷冻保藏, 备用。按“2.3”项下方法操作, 测定氟康唑的血药浓度。3 名健康受试者口服 200 mg 氟康唑后的平均药-时曲线详见图 2。

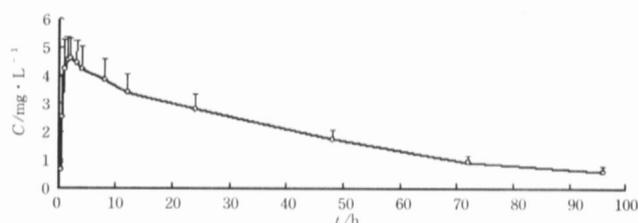


图 2 3 名健康受试者口服 200 mg 氟康唑后的平均药-时曲线

Fig 2 Mean concentration-time curve of fluconazole in 3 healthy male volunteers after oral administration of 200 mg fluconazole

## 3 讨论

在波长的选择上, 氟康唑的紫外吸收光谱表明在 261、265 nm 波长处有 2 个最大吸收峰, 但在试验中发现, 氟康唑在

# 2种盐酸左氧氟沙星胶囊的人体生物等效性研究

高淑丽<sup>1</sup>, 刘丽华<sup>1</sup>, 王川平<sup>2</sup>, 殷立新<sup>2</sup>, 王淑梅<sup>2</sup>, 孙倩<sup>2</sup> (1. 石家庄市第四医院, 石家庄市 050011; 2. 河北医科大学第二医院药剂科, 石家庄市 050000)

中图分类号 R969.1 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2007)26-2030-03

**摘要** 目的: 研究2种盐酸左氧氟沙星胶囊的人体生物等效性。方法: 22名健康男性志愿者, 采用单剂量、随机、自身交叉对照试验设计, 分别空腹口服盐酸左氧氟沙星胶囊受试制剂和参比制剂各200mg后, 用反相高效液相色谱-荧光检测法检测血清中左氧氟沙星经-时过程的血药浓度, 计算其药动学参数和相对生物利用度。结果: 受试制剂与参比制剂的 $C_{max}$ 分别为(2840.7±371.6)、(2810.5±440.0) ng·mL<sup>-1</sup>,  $t_{1/2\beta}$ 分别为(7.26±1.21)、(7.28±1.58) h,  $t_{max}$ 分别为(1.13±0.44)、(1.09±0.34) h,  $AUC_{0-24}$ 分别为(20908.9±3178.2)、(20398.0±2576.4) ng·h·mL<sup>-1</sup>,  $AUC_{0-\infty}$ 分别为(23173.6±3600.4)、(22492.4±2649.0) ng·h·mL<sup>-1</sup>。受试制剂的相对生物利用度为(103.1±14.1)%。结论: 2种盐酸左氧氟沙星胶囊具有生物等效性。

**关键词** 盐酸左氧氟沙星胶囊; 相对生物利用度; 生物等效性; 高效液相色谱-荧光检测法; 药动学

## Studies on the Bioequivalence of 2 Kinds of Levofloxacin Hydrochloride Capsules in Healthy Male Volunteers

GAO Shuli, LIU Lihua (The 4th Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China)

WANG Chuanping, YIN Lixin, WANG Shumei, SUN Qian (Dept. of Pharmacy, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the bioequivalence of 2 kinds of levofloxacin hydrochloride capsules in healthy male volunteers were studied. METHODS: In a randomized two-period cross-over study, a single oral dose of 200mg levofloxacin capsule (test and reference preparation) were given to 22 healthy male volunteers. The serum concentrations of levofloxacin were determined by RP-HPLC-fluorescence method. The pharmacokinetic parameters of the two preparations and the relative bioavailability of levofloxacin were calculated with statistical analysis. RESULTS: The pharmacokinetic parameters of the test and control preparation were as follows:  $C_{max}$  were (2840.7±371.6) and (2810.5±440.0) ng·mL<sup>-1</sup>,  $t_{1/2\beta}$  were (7.26±1.21) and (7.28±1.58) h,  $t_{max}$  were (1.13±0.44) and (1.09±0.34) h,  $AUC_{0-24}$  were (20908.9±3178.2) and (20398.0±2576.4) ng·h·mL<sup>-1</sup>,  $AUC_{0-\infty}$  were (23173.6±3600.4) and (22492.4±2649.0) ng·h·mL<sup>-1</sup>. The relative bioavailability of levofloxacin in test were (103.1±14.1)%. CONCLUSION: The two preparations were bioequivalent.

**KEY WORDS** Levofloxacin hydrochloride capsules; Relative bioavailability; Bioequivalent; RP-HPLC-fluorescence; Pharmacokinetics

这2个波长下, 响应值很低。后结合文献<sup>[3]</sup>, 采用末端吸收210nm, 响应值大大提高。

在流动相的选择上, 采用0.07%三乙胺水溶液(磷酸调节pH值至6.2)-甲醇(50:50)作为流动相<sup>[4]</sup>, 配制方法简单, 避免了文献中使用较高浓度磷酸盐<sup>[3]</sup>对色谱柱的损害, 且氟康唑与内标峰形良好, 柱效较高, 并能与血浆内源性杂质完全分离。

在样品的提取上, 因氟康唑显弱碱性, 参考相关文献<sup>[5]</sup>用1mol·L<sup>-1</sup>的氢氧化钠对血浆样品进行碱化后, 用低毒的乙酸乙酯作为萃取溶剂进行液-液萃取。未选用提取回收率较高但毒性较大的二氯甲烷<sup>[5]</sup>作为萃取溶剂。

方法学验证结果表明, 本方法灵敏、准确、快速、重现性好, 适用于血浆中氟康唑的浓度的测定及临床药动学的研究。

### 参考文献

副主任药师。研究方向: 医院药学。电话: 0311-85281881

- [1] 吴菊芳, 张婴元, 周柱, 等. 口服氟康唑和酮康唑治疗深部真菌感染220例的随机对照研究[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(4): 253.
- [2] 岗艳云, 伍斌, 许向阳, 等. 人体内氟康唑的药代动力学及其生物利用度[J]. 中国临床药理学杂志, 1999, 15(1): 29.
- [3] 杜智敏, 孙考祥, 张波. 氟康唑胶囊人体生物利用度及药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(6): 451.
- [4] 付桂英, 郭晓华, 赵颖. 注射用氟康唑的制备工艺及稳定性研究[J]. 中国药房, 2005, 16(11): 823.
- [5] Porta V, Chang KH, Storpirtis S. Evaluation of the bioequivalence of capsules containing 150 mg of fluconazole[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 288(1): 81.

(收稿日期: 2007-01-19 修回日期: 2007-06-15)