

HPLC测定人体血浆中盐酸格拉司琼

任进民¹,李艳荣²,蒋晔^{1,2},丁翔宇²,郝福²(1.河北医科大学第二医院药剂科,石家庄 050000;2.河北医科大学药学院,石家庄 050017)

摘要:目的 建立 RP-HPLC 荧光光谱法测定人血浆中盐酸格拉司琼的含量。方法 以 20 名健康男性志愿者为研究对象,采用交叉给药方案,分别单剂量口服 2 mg 的试验制剂和参比制剂。采取液-液萃取法处理血浆样品,色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.5% 三乙胺水溶液 (pH 4.0) (46:54),激发和发射波长分别为 305 nm 和 360 nm,流速为 1.0 mL·min⁻¹。结果 盐酸格拉司琼在 0.078 ~ 20.08 ng·mL⁻¹ 线性关系良好 (r = 0.999 4),最低检测限为 1.95 × 10⁻² ng·mL⁻¹,日内 RSD < 1.9%,日间 RSD < 3.3%,平均提取回收率为 85.7%,平均方法回收率为 100.0%。结论 该方法快速、准确,适用于盐酸格拉司琼的临床药动学研究和血药浓度监测。

关键词:盐酸格拉司琼;高效液相色谱

中图分类号:R969.11;R917.101 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2008)04-0323-03

Determination of Granisetron Hydrochloride in Human Plasma by HPLC

REN Jin-m in¹, LI Yan-rong², JIANG Ye^{1,2}, DING Xiang-yu², HAO Fu² (1. Department of Pharmacy, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Institute of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE A simple RP-HPLC method with fluorescence detection was established for the determination of granisetron hydrochloride in human plasma. **METHODS** Twenty healthy volunteers were given a single oral dose of granisetron hydrochloride dispersible tablet or tablet (control) in a randomized crossover study. The samples were extracted by liquid-liquid extraction. A Diamonsil C₁₈ column was used with the mobile phase of methanol-0.5% triethylamine (pH 4.0) (46:54) and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The excitation and emission wavelengths of fluorescence detection were 305 nm and 360 nm, respectively. **RESULTS** The calibration curve was linear in the concentration range of 0.078 ~ 20.08 ng·mL⁻¹ and the detective limit of concentration was 1.95 × 10⁻² ng·mL⁻¹. The intra-day RSD and inter-day RSD were less than 1.9% and 3.3%, respectively. The average extraction recovery was 85.7%. The average recovery of the method was 100.0%. **CONCLUSION** The method is sensitive and accurate for the determination of granisetron hydrochloride in human plasma.

KEY WORDS: granisetron hydrochloride; HPLC

盐酸格拉司琼 (granisetron hydrochloride) 是一种高选择性的 5-HT₃ 受体拮抗剂,通过拮抗中枢化学感受区及外周神经末梢的 5-HT₃ 受体,抑制由放疗、化疗引起肠嗜铬细胞释放的 5-HT₃ 受体,而激活中枢或神经系统的 5-HT₃ 受体而致恶心、呕吐^[1]。盐酸格拉司琼的血药浓度分析多采用以氰基键合固定相 HPLC^[2-5],测定方法较为复杂。笔者以普通的 C₁₈ 色谱柱、荧光检测器建立了快速简单的人血浆中盐酸格拉司琼浓度的测定方法,适于临床血药浓度的监测及药动学研究。

1 材料与与方法

1.1 药物与试剂

对照品:盐酸格拉司琼(中国药品生物制品检定所,批号:100558-200301,供含量测定用);试验制剂:盐酸格拉司琼片(石家庄制药集团中诺药业有限公司,批号:060401)规格:1 mg·片⁻¹;参比制剂:枢星(盐酸格拉司琼片,宁波市天衡制药有限公司,批号:050501,含量:100.6%)规格:1 mg·片⁻¹,甲醇为色谱纯,甲苯、三乙胺、磷酸均为分析纯,水为重蒸水。

1.2 仪器与色谱条件

SP8810 高效液相色谱仪(美国光谱物理),waters 474 荧光检测器,CT22 色谱信号采集器(南京千谱软件公司)。色谱柱 Diamonsil(钻石) C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)(迪马公司),流动相:甲醇-0.5% 三乙胺水溶液(用磷酸调 pH 值 4.0) (46:54),检测波长 λ_{ex} 305 nm, λ_{em} 360 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 20 μL。

1.3 对照品溶液的配制

精密称取适量的盐酸格拉司琼,配制成浓度为 2.008 μg·mL⁻¹ 的贮备液,精密吸取贮备液 1 mL 置 10 mL 量瓶中用流动相稀释至刻度,作为 1 号工作液 (200.8 ng·mL⁻¹),取 1 号工作液 5 mL 至 10 mL 量瓶中用流动相稀释至刻度,得 2 号工作液,依次采用对半稀释得 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 号工作液。

1.4 血浆预处理

取血浆样品 0.5 mL 置 10 mL 离心管中,加入 0.5 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液 100 μL,混匀后,加入 3 mL 甲苯,漩涡 3 min,离心 (3 000 r·min⁻¹) 15 min,取上层有机层至离

心管中,在 50 ℃条件下缓 N₂吹干,加 100 μL 流动相复溶,漩涡 1 min,离心 (3 000 r·min⁻¹) 3 min,进样 20 μL。

2 结果

2.1 色谱行为

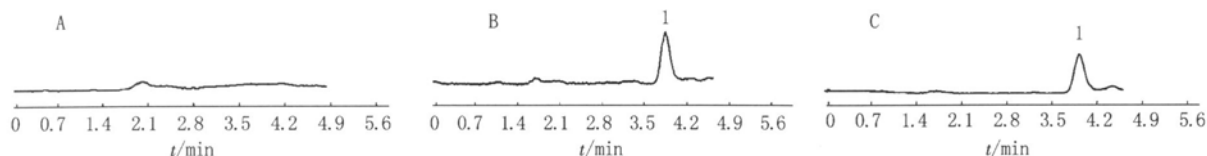


图 1 格拉司琼的 HPLC 色谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆加入对照品; C - 健康志愿者服药 12 h 后血浆; 1 - 格拉司琼

Fig 1 HPLC chromatograms of granisetron

A - blank plasma; B - blank plasma spiked with control; C - plasma after drug administration 12 h; 1 - granisetron

2.2 线性关系

取空白血浆 9 份各 0.5 mL,分别加入 1~9 号工作液 50 μL,制成血药浓度分别为 0.078, 0.157, 0.314, 0.628, 1.255, 2.51, 5.02, 10.04, 20.08 ng·mL⁻¹ 的系列血浆样品,按“1.4”项下方法处理,进样 20 μL。以盐酸格拉司琼的面积 A 对其浓度 C 进行九点加权回归,回归方程为: $A = 4.397 \times 10^3 C + 40.58$, $r = 0.9994$ 。结果表明盐酸格拉司琼在 0.078~20.08 ng·mL⁻¹ 内线性关系良好。最低检测限 (LLOQ) 按 S/N > 3 计为 1.95×10^{-2} ng·mL⁻¹。

2.3 精密度的试验

取空白血浆 0.5 mL,加入 50 μL 的盐酸格拉司琼标准液,配制相当于血药浓度为 10.04, 2.51, 0.314 ng·mL⁻¹ 的样品溶液,每个浓度制备 5 份,测得日内精密度。在不同天连续制备并测定 4 个分析批,测得日间精密度。结果见表 1。表 1 盐酸格拉司琼精密度测定结果 (n = 5)

Tab 1 Results of precision test (n = 5)

血药浓度 / ng·mL ⁻¹	日内 RSD / %	日间 RSD / %
0.314	1.7	2.2
2.51	1.8	2.0
10.04	1.3	3.2

2.4 提取回收率试验

取空白血浆 0.5 mL,加入盐酸格拉司琼的 2, 4, 7 号标准液,配制相当于血药浓度约为 10.04, 2.51, 0.314 ng·mL⁻¹ 的标准血浆,每个浓度配制 5 份,按“1.4”项下操作,取上清液进样 20 μL,记录峰面积,另取盐酸格拉司琼的标准液进样 20 μL,记录峰面积,作为对照,计算盐酸格拉司琼的提取回收率。高、中、低三个浓度样品的提取回收率分别为: 83.8%, 86.0%, 87.4%, RSD 分别为: 1.3%, 1.8%, 1.5%。

2.5 样品稳定性试验

配制高、低 (10.04, 0.314 ng·mL⁻¹) 2 个浓度的盐酸格拉司琼血浆样品各 6 份,室温放置,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 按“2.3”项下方法操作,进样 20 μL,考察其稳定性, RSD 值分别为 1.0% 和 1.2%,结果表明样品室温放置 12 h 对测定结果无影响。冻融 0, 1, 2 次的稳定性 RSD 分别为 2.6% 和 1.0%。在冻存条件下的稳定性试验,配制高、低 2 个浓度的

在上述色谱条件下,空白血浆、空白血浆加入标准品及受试者服药 2 h 后的色谱图见图 1,从图中可知,格拉司琼的峰形良好,杂质峰和内源性物质基本无干扰,其保留时间约为 3.85 min。

盐酸格拉司琼血浆样品各 6 份,分别置于 -20 ℃ 条件下冻存,分别于 1, 2, 3, 5, 7, 14 d 取高、低浓度的须将样品各 1 份,按“2.3”项下方法处理,进样 20 μL,考察其稳定性, RSD 值分别为 3.2% 和 2.9%,表明样品中盐酸格拉司琼在 2 周内浓度无明显变化。

2.6 质量控制

配制高、中、低 3 个浓度 (10.04, 2.51, 0.314 ng·mL⁻¹) 的盐酸格拉司琼质控样品 (QC) 在每批血样测定时随行测定 3 个浓度的质控样品,质控样品测定量不少于样本总量的 5%,结果表明,所有质控样品测定结果的偏差均小于 5% (n = 30),符合测定要求。

2.7 血样测定

采用本法测定了 20 名健康男性受试者交叉服用 2 mg 的盐酸格拉司琼片剂和参比制剂后的血浆样品,以当日的标准曲线计算各时间点样本中盐酸格拉司琼的浓度,同时测定质控样本 (高、中、低 3 个浓度,共 30 个样本) 以保证结果的可靠性。20 名受试者口服盐酸格拉司琼片剂和参比制剂后的平均药时曲线见图 2。

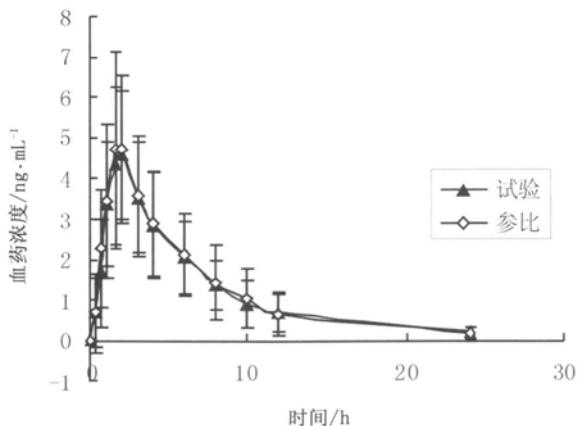


图 2 20 名健康受试者单剂量口服盐酸格拉司琼片 2 mg 的平均药时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of granisetron after single oral dose of 2 mg in 20 healthy volunteers

3 讨论

盐酸格拉司琼的血药浓度分析,文献^[2-5]均采用了氟基

柱,本试验通过对色谱柱的筛选结果表明盐酸格拉司琼和血浆中的干扰组分在氰基柱和 C_{18} 色谱柱均能较好分离,但氰基柱适用的 pH 范围较窄,而 C_{18} 色谱柱分离效能高、使用寿命长、适用的 pH 范围广,且较为常用,故本试验选择了普通 C_{18} 色谱柱为分析柱。以甲醇-0.5%三乙胺溶液为流动相能很好的分离盐酸格拉司琼与内源性物质,且峰形良好,理论塔板数高。

文献^[5]采用了 2 次乙酸乙酯提取血浆中的盐酸格拉司琼,操作繁琐费时,且易乳化,不易分层,分析时杂质较多。本试验以甲苯为提取溶剂,仅需提取 1 次提取回收率即可达 85%以上,且没有明显的杂质干扰,提高了测定的准确性。本提取方法特异性强,重复性好,回收率高,测得值准确可靠,符合研究盐酸格拉司琼在人体内药动学的要求。

REFERENCES

[1] LEE C R, PLOSKER L, Mc Tavashi D, *et al.* A review of its

Pharmacodynamic and Pharmacokinetic properties, and therapeutic potential as an antiemetic [J]. *Drugs*, 1993, 46(5): 925-943.

[2] DIDIER C, FRANCOISE B, LUCIEN A, *et al.* Evaluation of the bioequivalence of tablet and capsule formulations granisetron in patients undergoing cytotoxic chemotherapy for malignant disease [J]. *J Pharm Sci*, 1993, 82(12): 1281-1284.

[3] FREDERIC P, FRANCOISE B, PASCAL M, *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of granisetron in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 1996, 675: 99-105.

[4] ZHANG J B, ZHONG H, GU Z L. Pharmacokinetics and relative bioavailability of granisetron hydrochloride tablets in healthy volunteers [J]. *Chin J Clin Pharm (中国临床药理学杂志)*, 2000, 9(6): 355-357.

[5] XIONG Y Q, FU Y J, FU J. Evaluation of bioequivalence of granisetron HCl dispersible tablet [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2000, 9(7): 468-470.

收稿日期: 2007-06-13