

· 药物分析 ·

HPLC 测定氟西汀血药浓度及其临床应用

徐学君¹, 陶庆², 徐德琴¹ (1. 武警安徽总队医院药剂科, 安徽 合肥 230061; 2. 解放军 108 医院药剂科, 上海 200336)

[摘要] 目的 建立并优化一种简单、快速、灵敏及高选择性测定氟西汀血药浓度的高效液相色谱法(HPLC),用于临床个体化给药监测。方法 血浆样品用乙腈沉淀蛋白法处理。样品分离用 Hypersil ODS2 (5 μm , 4.6 mm \times 200 mm) 色谱柱,流动相为乙腈-25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.5) (34:66),流速为 1.2 ml/min;进样量为 20 μl ,紫外检测波长 227 nm。结果 氟西汀的血浆浓度范围是 0.5 ~ 50 ng/ml, $r=0.9969$,低、中、高血浆质控样品日内 RSD 均小于 8.06%, 日间 RSD 均小于 10.46%,方法平均回收率分别为 91.7%, 97.06% 和 100.75%。结论 与已报道的氟西汀血药浓度测定方法相比,本方法血浆样品处理简单,重现性高,选择性好,更经济、污染少且能更好地保护色谱柱。

[关键词] 氟西汀;高效液相色谱法;临床应用

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)03-0222-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.03.019

Determination of fluoxetine hydrochloride in plasma by HPLC

XU Xue-jun¹, TAO Qing², XU De-qin¹ (1. Department of Pharmacy, Anhui General Hospital of the Chinese People's Armed Police Forces, Hefei 230061, China; 2. Department of Pharmacy, The 108th Hospital of PLA, Shanghai 200336, China)

[Abstract] **Objective** To establish and optimize a simple, rapid, reliable, high sensitive and high selective method for the determination of fluoxetine hydrochloride in plasma by high-performance liquid chromatographic (HPLC) so as to monitor the clinical drug use. **Methods** The plasma samples were deproteinized by acetonitrile. Separation was performed on a Hypersil ODS2 column (5 μm , 4.6 mm \times 200 mm). The mobile phase contained acetonitrile-25 mmol/L phosphate buffer (pH6.5) (34:66). The flow rate and sample volume injected were 1.2 ml/min and 20 μl , respectively. Detection wavelength was 227 nm. **Results** The calibration curve of fluoxetine hydrochloride in plasma was linear in the concentration range of 0.5 ~ 50 ng/ml and coefficient was 0.9969. The intra-assay precision did not exceed 8.06% and inter-assay precision did not exceed 10.46% for low, medium and high quality samples, respectively. The average recovery of the described method was 91.7%, 97.06% and 100.75%, respectively. **Conclusion** In comparison with previous work, the improved chromatographic method was more economical, less polluted and better protected column, besides simple preparation of plasma samples, high reproducibility, and high selectivity.

[Key words] fluoxetine; HPLC; clinical applications

氟西汀 (fluoxetine hydrochloride, FLU), 即 (±)-N-甲基-3-苯基-3-[(2,2,2-三氟-P-甲苯基)-氧代]丙胺盐酸盐,是一种选择性的 5-羟色胺重摄取抑制剂(SSRIs),由美国礼来公司研制,于 20 世纪 90 年代初上市,具有良好的振奋情绪、改善抑郁效应,目前被当作一线药物广泛应用于临床^[1,2]。与多数 SSRIs 不同,氟西汀有较长的半衰期,并呈现非线性药代动力学过程和较大的个体差异^[1]。对于 FLU 的血药浓度测定多数采用高效液相色谱-紫外检测(HPLC-UV)^[3]或荧光检测^[4]及液相色谱-质谱联用法(LC/MS)^[5-7]测定。其中前者的检测灵敏

度受到一定限制,不能满足低浓度的测定^[3,4];而 LC/MS 法对仪器设备要求较高,不适宜于普通医疗机构应用。在上述方法中,样品预处理多采用液-液萃取^[3,4,7]或固相萃取法^[5],前者操作较繁琐,后者成本较高。笔者采用蛋白沉淀预处理法和 HPLC-UV 检测建立其快速、简便的血药浓度检测方法,以便为临床个体化药物治疗进行治疗药物监测服务。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 盐酸氟西汀标准品(批号:100513-200401,纯度 98.5%),中国药品生物制品检定所产品。乙腈为德国 MERC 公司产 HPLC 纯溶剂;磷酸氢二钠(分析纯,纯度 >99.0%)由天津金汇太亚化学试剂有限公司生产;氢氧化钠(分析纯,纯度 >96.0%)由上海之臻化工有限公司生产。超

[作者简介] 徐学君(1965-),男,主任药师。Tel(0551)4637887, E-mail: xxjchn@163.com.

[通讯作者] 陶庆. E-mail: taoqing0927@yahoo.com.cn.

纯水为本院制剂室自制去离子双蒸水。

1.2 血浆样品预处理 精密量取人空白血浆 200 μl 于 1.5 ml 离心管中,精密加入 400 μl 乙腈,涡旋混合 2 min 后,14 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,0.45 μm 滤膜过滤,精密量取滤过液 350 μl ,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,精密量取流动相 100 μl 溶解完全后,24 h 内进样测定。

1.3 仪器 LC-10ATVP 泵(日本岛津公司);SPD-10Avp 检测器(日本岛津公司);N2000 工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);VXH 旋涡混合器(上海和欣科教设备有限公司);TGI20M 台式高速冷冻离心机(湖南凯达实业发展有限公司)。

1.4 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS2 (5 μm , 4.6 mm \times 200 mm);流动相:乙腈-25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH = 6.5) = 34 : 66;流速:1.2 ml/min;紫外检测波长:227 nm;柱温:室温;进样量:20 μl 。

2 结果

2.1 色谱行为 取人血浆样品按 1.2 下方法处理,按 1.4 色谱条件下进样,所得色谱图如图 1 所示。由图可见 FLU 的色谱峰保留时间约为 10.2 min,峰型对称。

2.2 线性关系考察 精密量取 FLU 对照品溶液适量,加入一定量的人空白血浆稀释成浓度为 0.5、1、2、5、10、20、50 ng/ml 系列对照血浆样品,涡旋混匀后分别按 1.2 项下方法预处理样品后,进样 20 μl ,以平均色谱峰面积($n = 3$)对 FLU 血浆浓度线性回归,得回归方程为 $C = 3.185 \times 10^{-4}A + 0.1338$,相关系数 $r = 0.9969$ 。结果表明 FLU 在 0.5 ~ 50 ng/ml 浓度范围内血浆样品浓度与峰面积线性关系良好,FLU 的最低定量限(LLOQ)为 0.5 ng/ml,RSD 为 14.53%。

2.3 特异性试验 考察 6 个不同个体空白血浆色谱图、空白血浆加氟西汀对照品色谱图,血浆内源性物质均不影响 FLU 的测定,如图 1-A、B 所示。

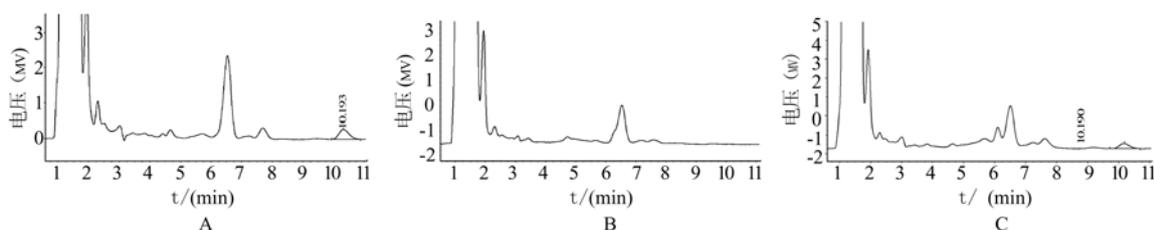


图 1 FLU 血浆样品的 HPLC 色谱图

A- FLU 标准对照血浆样品;B-空白血浆;C-受试者服药后 6 h 血浆样品

2.4 提取回收率试验 精密量取 FLU 标准品储备液适量加入到空白血浆中,分别配制低、中、高浓度约为 1、5、50 ng/ml 的标准对照血浆样品各 5 份,按 1.2 项下方法预处理后进样分析。另取相同浓度的 FLU 标准液,直接进样测定。分别记录峰面积,计算提取回收率。试验结果见表 1。

表 1 FLU 在血浆样品提取中的回收率($n = 5$)

浓度 (ng/ml)	回收率($\bar{x} \pm s, \%$)	RSD (%)
1	78.88 \pm 3.95	3.98
5	82.73 \pm 3.74	3.64
50	75.55 \pm 2.62	2.12

由上表可见,本方法的提取回收率较稳定,且基本达到了 75% 以上。

2.5 方法回收率 分别配制低、中、高 3 组浓度 FLU 标准对照血浆样品各 5 份,按 1.2 方法预处理后连续进样,将计算结果与配制浓度相比,计算方法回收率,结果见表 2。

表 2 血浆样品中 FLU 浓度测定方法回收率($n = 5$)

加入量 (ng/ml)	测定量 (ng/ml)	回收率 (%)
1	0.917 \pm 0.069	91.7
5	4.853 \pm 0.243	97.06
50	50.376 \pm 0.674	100.75

结果表明方法的回收率良好。

2.6 精密度试验 于日内不同时间配制低、中、高 3 个浓度各 5 个对照血浆样品,按 1.2 方法处理后测定,代入回归方程,得日内精密度。于第 1、2、3 天分别配制测定,代入当天回归方程,得日间精密度。结果如表 3 所示。

表 3 血浆样品中 FLU 含量测定方法精密度($n = 5$)

加入量 (ng/ml)	日内		日间	
	测定量 (ng/ml)	RSD (%)	测定量 (ng/ml)	RSD (%)
1	0.918 \pm 0.074	8.06	0.937 \pm 0.098	10.46
5	4.782 \pm 0.292	6.11	4.861 \pm 0.386	7.94
50	50.451 \pm 0.595	2.91	50.673 \pm 0.808	3.91

结果表明,方法的日内、日间精密度良好,符合体内药物浓度测定的基本要求。

2.7 稳定性试验

2.7.1 样品存放期的稳定性 取空白血浆数份,分别加入 FLU 标准溶液,使血浆中 FLU 的浓度分别为 1.0, 5.0 和 50.0 ng/ml, 放置在 -18 °C 的冰箱中,分别于第 0 天和第 30 天取样分析,考察其在存放期间的稳定性,结果见表 4。

表 4 样品在存放期间稳定性 (n=3)

浓度 (ng/ml)	第 0 天浓度	第 30 天浓度	RSD (%)
1.0	0.92 ± 0.074	0.91 ± 0.156	4.65
5.0	4.95 ± 0.157	4.93 ± 0.25	3.76
50.0	50.88 ± 0.801	50.17 ± 0.836	2.36

以上数据说明该生物样品在 -18 °C 的冰箱中至少能保存 30 d。

2.7.2 样品冻融稳定性 取空白血浆数份,分别加入 FLU 标准溶液,使血浆中 FLU 的浓度分别为 1.0, 5.0 和 50.0 ng/ml, 放置在 -18 °C 冰箱中,然后反复冻融 3 次测定其浓度,考察其冻融稳定性,结果见表 5。

表 5 样品反复冻融稳定性 (n=3)

浓度 (ng/ml)	未冻融测得浓度 (ng/ml)	冻融 3 次测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)
1.0	0.90 ± 0.077	0.89 ± 0.167	9.95
5.0	4.93 ± 0.173	4.88 ± 0.199	8.65
50.0	50.08 ± 0.767	50.33 ± 0.69	7.12

以上数据说明该生物样品在冻融 3 次后仍较稳定。

2.7.3 样品在进样器中的稳定性 取空白血浆数份,分别加入 FLU 标准溶液,使血浆中 FLU 的浓度分别为 1.0, 5.0 和 50.0 ng/ml, 血样预处理后作 HPLC 分析。然后将溶液放在进样器中 24 h 后取样测定,从而考察样品在进样器和流动相中的稳定性,结果见表 6。

表 6 样品在进样器中的稳定性 (n=3)

浓度 (ng/ml)	第 0 h 测得浓度 (ng/ml)	第 24 h 测得浓度 (ng/ml)	RSD (%)
1.0	0.90 ± 0.074	0.89 ± 0.086	3.11
5.0	4.89 ± 0.297	4.87 ± 0.293	2.35
50.0	50.24 ± 0.796	50.15 ± 0.743	2.14

以上数据说明该样品用流动相溶解后在进样器中保存 24 h 后仍较稳定,故预处理后样品液在试验

过程中保持稳定,能够满足试验方法学要求。

2.8 临床应用 患者 8 名,男性 6 名,女性 2 名,年龄 19 ~ 71 岁,平均 (42.75 ± 19.22) 岁,口服 FLU 分散片 (百优解, 20 mg/片) 20 mg 后 6 h 采取静脉血 1 ml,离心分离血浆后按 1.2 项下方法预处理,并进样测定其血浆 FLU 浓度 (图 1-C),结果见表 7。全部患者的浓度范围为 5.35 ~ 18.77 ng/ml,平均为 (12.06 ± 5.61) ng/ml。

表 7 8 名患者口服 20 mg FLU 后 6 h 的血药浓度

编号	性别	身体质量指数 (kg/m ²)	FLU 血药浓度 (ng/ml)
A	F	19.4	16.43
B	M	26.3	8.92
C	M	28.6	17.9
D	M	27.1	5.76
E	M	22.3	5.35
F	M	27.3	7.97
G	F	28.7	18.77
H	M	24.8	15.38
平均值		25.56	12.06

3 讨论

FLU 是目前临床上普遍应用的抗抑郁药物,且其临床应用近年来已有较大扩展^[2]。但是,由于该药物在体内呈非线性药代动力学,且代谢过程受 P450 酶多态性及合并用药等诸多因素的影响^[1],使个体差异较大。因此,在临床重点患者中进行其血药浓度监测具有必要性。

文献^[3,8,9]分别报道了 HPLC-UV 检测 FLU 的血药浓度检测,基本都采用了液-液萃取法处理血浆样品,但是操作相对较繁琐,方法的 LLOQ 均在 10 ng/ml 左右,不能满足更多低浓度样品的测定。文献^[6]报道采用蛋白沉淀预处理方法,简化了操作过程,笔者对其进行了优化改进,使 LLOQ 可达到 0.5 ng/ml,提高了方法的检测灵敏度,且整个操作较为简便快速,可满足于临床治疗药物监测和其它目的血药浓度测定的需要。

对 8 例患者服药后 6 h (理论达峰时间^[10]) 的血药浓度测定结果表明,本法在上述临床应用中尚未见患者合并用药的干扰,适合用于临床治疗药物监测。但测得浓度个体差异较大,如何应用本法为临床个体化用药服务,鉴于测定标本数量有限,尚待进一步积累数据考察。

【参考文献】

[1] Cheer SM, Goa KL. Fluoxetine: a review of its therapeutic potential in the treatment of depression associated with physical ill-

- ness[J]. *Drugs*, 2001, 61(1): 81.
- [2] 汪春运, 臧家平. 氟西汀的临床应用[J]. *医药导报*, 2005, 24(10): 897.
- [3] 刘伟忠, 陈清霞, 黄伟侨, 等. 高效液相色谱法同时测定人血浆中氯氮平与氟西汀的浓度[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(3): 243.
- [4] 李迎春, 姚国灿, 郭兴杰, 等. 高效液相色谱法测定大鼠脑微渗析液中氟西汀的浓度[J]. *中国药房*, 2006, 17(5): 341.
- [5] 何娟, 周志凌, 李焕德. HPLC-MS同时测定4种新型抗抑郁药物的血药浓度[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(12): 1428.
- [6] 贾晶莹, 张梦琪, 桂雨舟, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定7种抗抑郁类和5种抗精神病类药物的血药浓度[J]. *中国药物应用与监测*, 2010, 7(5): 272.
- [7] Franceschi L, Faggiani A, Furlanut M. A simple method to monitor serum concentrations of fluoxetine and its major metabolite for pharmacokinetic studies[J]. *J Pharm Biomed Anal*. 2009, 49(2): 554.
- [8] 肖红, 周群, 张石宁, 等. HPLC测定人血清中氟西汀的浓度[J]. *江苏药学与临床研究*, 2000, 8(4): 36.
- [9] 李玲, 袁波, 朱荣申, 等. 高效液相色谱法检测抑郁症患者血清中氟西汀的浓度[J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(11): 855.
- [10] 邵庆翔, 李川, 张美云, 等. 盐酸氟西汀分散片和胶囊的生物等效性研究[J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(4): 277.
- [收稿日期] 2012-02-10
[修回日期] 2012-03-27

(上接第167页)

- [9] Tarantul VZ, Nikolaev AI. Differential gene expression in B-cell non-Hodgkin's lymphoma of SIV-infected monkey[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000, 16(2): 173.
- [10] Zhu HX, Zhai BJ. Establishment and clinical significance of the gene expression map of normal peripheral blood mononuclear cells[J]. *Tianjin Med J*, 2008, 36(11): 856.
- [11] Shizhikova DK, Vinogradova TV. The NOLA2 and RPS3a genes as highly informative markers for human squamous cell lung cancer[J]. *Bioorg Khim*, 2005, 31(2): 195.
- [12] Angelastro JM, Torocsik B, Greene LA. Nerve growth factor selectively regulates expression of transcripts encoding ribosomal proteins[J]. *BMC Neuroscience*, 2002, 3(1): 3.
- [13] Zhou ZD, Lei B, Liu DG, et al. Low content of protein S29 in ribosomes of human lung cancer cell line A549; detected by two-dimensional electrophoresis[J]. *Protein Pept Lett*, 2003, 10(1): 91.
- [14] Jeremy L, Goodin, Charles L, et al. Characterization of human ribosomal S3a gene expression during adenosine 3' : 5' cyclic monophosphate induced neuroendocrine differentiation of LNCaP cells. Regulation of S3a gene expression in LNCaP[J]. *Molecular Biology Reports*, 2002, 29: 301.
- [15] Kho CJ, Wang Y, Zarbl H, et al. Effect of decreased fte-1 gene expression on protein synthesis, cell growth, and transformation[J]. *Cell Growth Differ*, 1996, 7(9): 1157.
- [16] Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(3): 179.
- [17] Ira G, Wool. Extraribosomal functions of ribosomal proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 164.
- [18] Cui K, Margaret Coutts, Joachim Stahl, et al. Novel interaction between the transcription factor CHOP(GADD153) and the ribosomal protein FTE/S3a modulates erythropoiesis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(11): 7591.
- [19] Naora H, Nishida T, Shindo Y. Constitutively enhanced nbl expression is associated with the induction of internucleosomal DNA cleavage by actinomycin D[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224(1): 258.
- [20] Russell L, Naora H. Down-regulated RPS3a/nbl expression during retinoid-induced differentiation of HL-60 cells: A close association with diminished susceptibility to actinomycin D-stimulated apoptosis[J]. *Cell Struct Funct*, 2000, 25(2): 103.
- [21] Naora H. Involvement of ribosomal proteins in regulating cell growth and apoptosis: translational modulation or recruitment for extraribosomal activity[J]. *Immunol Cell Biol*, 1999, 77(3): 197.
- [22] Naora H, Takai I, Adachi M, et al. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: Sequential co-ordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis[J]. *J Cell Biol*, 1998, 141(3): 741.
- [23] Naora H, Nishida T, Shindo Y. Antisense sequences of nbl gene induce apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60[J]. *Leukemia*, 1998, 12: 532.
- [24] Hu ZB, Minden MD, McCulloch EA, et al. Regulation of drug sensibility by ribosomal protein S3a[J]. *Blood*, 2000, 95(3): 1047.
- [25] Demao S, Shuji S, Taketoshi T, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity by Bcl-2 in association with the Ribosomal Protein S3a[J]. *Biochem*, 2002, 41(3): 929.
- [26] Elena K, Mariya Y, Krisztina S, et al. Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 binds to Epstein-Barr virus-induced Fte1/S3a protein[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 303: 47.
- [27] 缪扣荣, 徐卫, 李建勇. p53基因信号通路的新成员 miRNA[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(2): 500.
- [28] Aparicio S, Eaves CJ. p53: a new kingpin in the stem cell arena[J]. *Cell*, 2009, 138(6): 1060.
- [29] 徐恩相, 李峰. p14^{ARF}, p53蛋白与脑胶质瘤发生发展的相关性研究[J]. *实用全科医学*, 2007, 5(5): 390.
- [收稿日期] 2011-04-18
[修回日期] 2011-10-28