

· 技术与方法 ·

HPLC-UV 检测法及其在比格犬血浆非布司他浓度检测中的应用*

龙波¹, 苏媛淇^{2△}

(1. 重庆市肿瘤研究所普内科, 重庆 400302; 2. 重庆医药高等专科学校药理学教研室, 重庆 400030)

摘要:目的 建立测定比格犬血浆非布司他浓度的高效液相色谱紫外(HPLC-UV)检测法。方法 采用冰醋酸和乙腈对 500 μL 比格犬血浆进行蛋白沉淀, 离心后取上清液 20 μL 进样分析。采用反相 C18 液相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)进行检测; 流动相为甲醇-水(90:10, V/V), 流速 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 314 nm。结果 非布司他色谱峰的保留时间为 4.50 min, 标准曲线在 0.27~16.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 平均相关系数(r)=0.999 5 \pm 0.002 0。日内和日间的精密程度均不超过 7.0%; 准确度分别为 96.7%~104.2%、97.7%~105.4%。结论 HPLC-UV 检测法简单、准确、可靠, 可用于非布司他药代动力学研究。

关键词: 色谱法; 液相; 分光光度法; 紫外线; 药代动力学; 非布司他

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)01-0049-02

HPLC-UV and its application in detection of plasma concentration of febuxostat in Beagle*

Long Bo¹, Su Yuanqi^{2△}

(1. Department of General Internal Medicine, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 4000302, China;

2. Department of Pharmacology, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography-ultraviolet(HPLC-UV) assay for detecting plasma concentration of febuxostat in Beagle. **Methods** 500 μL Beagle plasma sample was subjected to protein precipitation using glacial acetic acid and acetonitrile, and analysis was performed on 20 μL supernatant after centrifugation. Reversed-phase C18 HPLC column (250.0 mm \times 4.6 mm, 5 μm) was applied with mobile phase consisted of methanol-water (90:10, V/V) at a flow rate of 1.0 mL/min, the UV detection wavelength was set at 314 nm. **Results** Retention time of febuxostat chromatographic peak was 4.50 min. The standard curve was linear over the concentration range of 0.27–16.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with average correlation coefficient of 0.999 5 \pm 0.002 0. The relative standard deviations of intra- and inter-day assay variations were less than 7.0%, and the accuracy were 96.7%–104.2%, 97.7%–105.4%, respectively. **Conclusion** HPLC-UV assay is simple, accurate and reliable, which can be applied to investigate the pharmacokinetics of febuxostat.

Key words: chromatography; liquid; spectrophotometry; ultraviolet; pharmacokinetics; febuxostat

非布司他是一种新型的高选择性黄嘌呤氧化酶抑制剂, 化学结构见图 1, 是近 40 年来美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的第 1 个用于治疗高尿酸血症的痛风药物^[1-3]。痛风为常见的炎性关节疾病。血浆高尿酸水平引起尿酸盐结晶并沉积, 严重者可导致痛风性关节炎, 尿酸盐结晶和(或)痛风性肾实质病变。非布司他为黄嘌呤氧化酶抑制剂, 能抑制次黄嘌呤转化为黄嘌呤以及黄嘌呤转化为尿酸, 用于治疗伴痛风的高尿酸血症^[4]。作者采用比格犬作为非布司他经口给药的药代动力学研究模型, 建立了简单、灵敏度高的分析方法进行检测。最近研究显示, 在非布司他的生物样品测定中, 人们已开发出几种定量分析方法, 包括高效液相色谱检测法、高效液相荧光检测法及高效液相质谱检测法^[5-6]。然而, 高效液相荧光检测法需要放射性标记, 在普通实验室的制剂过程中不易实现; 高效液相紫外检测法用于尿液和粪便样品的检测, 只给出了有限的分析验证过程; 新近建立的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法不能直接用于生物样品的测定。虽然 Khosravan 等^[7]报道了一种灵敏的高效液相荧光法用于血浆非布司他检测的方法, 但该研究中所采用的荧光检测器在实验室中并不普及, 且在人体药代动力学/药效动力学(pharmacokinetics/pharmacodynamics, PK/PD)研究中, 分析方法阐述简单, 未对该法进行详细说明。考虑到非布司他给药后在犬血浆中浓度较高, 作者建立了简

单、快速的 HPLC-紫外(HPLC-ultraviolet, HPLC-UV)检测法, 采用了蛋白沉淀对血浆样品进行进一步处理, 并对这一方法在选择性、灵敏度、线性、准确度、精密度和样品稳定性方面进行了验证。本方法成功用于犬给药后的非布司他药代动力学研究。

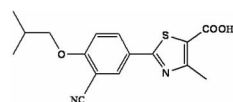


图 1 非布司他的化学结构

1 材料与方

1.1 药品和试剂 非布司他标准品(99.8%)及其片剂(规格 120 mg, 批号 20110403)由重庆市医药高等专科学校制备; 色谱级甲醇和乙腈购自美国 Fisher Scientific 公司, 冰醋酸为分析纯, 实验用水均为自制双蒸水。

1.2 仪器和色谱条件 Agilent 1100 HPLC 仪配紫外检测器。色谱柱为反相 C18 液相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 采用匹配保护柱, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为甲醇-水(90:10, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 314 nm。

1.3 标准校正曲线和质控样品的制备 采用乙腈制备非布司他贮备液, 浓度为 45.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 贮备液密封保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。采用乙腈稀释贮备液, 并制备校正曲线所需的次级稀释液, 空白犬血浆加样后的校正曲线浓度点分别为 0.27、0.45、0.91、

1.81、3.63、5.44、7.25、12.69、16.32 $\mu\text{g/mL}$ 。采用相同方法制备低浓度(0.45 $\mu\text{g/mL}$)、中浓度(3.63 $\mu\text{g/mL}$)、高浓度(7.25 $\mu\text{g/mL}$)的质控样品。

1.4 血浆样品的处理 将 500 μL 犬血浆样品(标准曲线样品、质控样品和药物动力学血浆样品)与 1 500 μL 乙腈和 50 μL 冰醋酸混合,涡流振荡 3 min,然后在室温下离心 10 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min)。取上清液 1 000 μL 转移到进样瓶中,进样体积为 20 μL 。为确定在非布司他色谱峰保留时间处是否有干扰,采用相同的方法处理空白血浆样品。

1.5 方法验证

1.5.1 校准标准曲线的线性 在浓度 0.27~16.32 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,以非布司他峰面积为 Y 轴,非布司他血浆浓度为 X 轴,用加权(权重系数: $W=1/X^2$)进行线性回归,获得斜率、截距和相关系数。

1.5.2 准确度和精密度 采用质控样品进行准确度和精密度的计算,精密度以相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示。按上述浓度制备质控样品,将已知浓度的质控样品进行定量分析,每天进样 6 次,用于日内精密度的计算,连续 6 d 按相同方法操作以确定日间精密度,采用标准曲线计算的浓度与已知浓度比较,以获得准确度。

1.5.3 提取回收率 以浓度 0.45、3.63、7.25 $\mu\text{g/mL}$ 制备加样血浆样品,以上述方法进行定量。通过提取后样品与未经提取的标准溶液样品的峰面积比较,计算回收率(即沉淀效率)。

1.5.4 稳定性 将非布司他标准贮备液在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下放置 2 周,与新配溶液的浓度进行比较以获得贮备液稳定性。分别在浓度 0.45、3.63、7.25 $\mu\text{g/mL}$ 下考察血浆冻融稳定性、血浆长期稳定性、血浆短期室温稳定性及提取样品稳定性。通过复融、复冻(-40 $^{\circ}\text{C}$ 至室温)考察冻融稳定性。将标准质控样品放置 1 个月后进行平行比较,以考察血浆样品的长期稳定性。将冷冻的血浆样品在处理前于室温下放置 6 h 以考察血浆样品短期稳定性。将处理后的血浆样品提取液在室温下放置 24 h 以考察提取后样品稳定性。可接受的稳定性标准为:与新配样品的偏差在 $\pm 15\%$ 内。

1.6 方法的应用 建立的 HPLC-UV 法已成功用于非布司他片剂的比格犬药动学研究。10 只雄性比格犬,体质量 9~10 kg,购自重庆中药研究院实验动物中心。禁食一夜(12 h)后,单次给予 A 晶型或 H 晶型的非布司他片剂(120 mg)。在经口给药后 8 h 内禁食,自由饮水。于给药前(0.00 h)和给药后 0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、3.50、4.00、5.00、6.00、7.00、9.00 h 自前肢静脉采集抗凝血样 1.5 mL。全血离心 10 min(离心半径 8 cm,12 000 r/min),血浆冷冻保存于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 待测。

2 结果

2.1 特异性、线性和灵敏度 特异性图谱见图 2。在上述色谱条件下,非布司他色谱峰的保留时间为 4.50 min,犬血浆中的内源性化合物对目标化合物并不发生干扰。重复 5 次建立犬血浆加样标准校正曲线,在 0.27~16.32 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。标准曲线方程为: $Y = (-0.260 \pm 0.003 \ 0) + (0.021 \ 3 \pm 0.005 \ 0)X$,平均相关系数 $r = 0.999 \ 5 \pm 0.002 \ 0$ 。非布司他在犬血浆中的最低定量限确定为 0.27 $\mu\text{g/mL}$,为标准曲线的最低浓度点,准确度为 85%~115%。最低检测限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$,其信噪比为 3。

2.2 准确度和精密度 日内和日间血浆非布司他质控浓度的精密度及准确度见表 1,精密度均不超过 7.0%;日内和日间血浆非布司他质控浓度的准确度分别为 96.7%~104.2%、97.7%~105.4%。上述结果表明本方法精密度和准确度良好。

2.3 提取回收率 血浆样本质控浓度分别为 0.45、3.63、7.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,测得其准确度分别为 103.6%、101% 和 98.8%,数据表明采用蛋白沉淀法适合对非布司他犬血浆样品的处理。

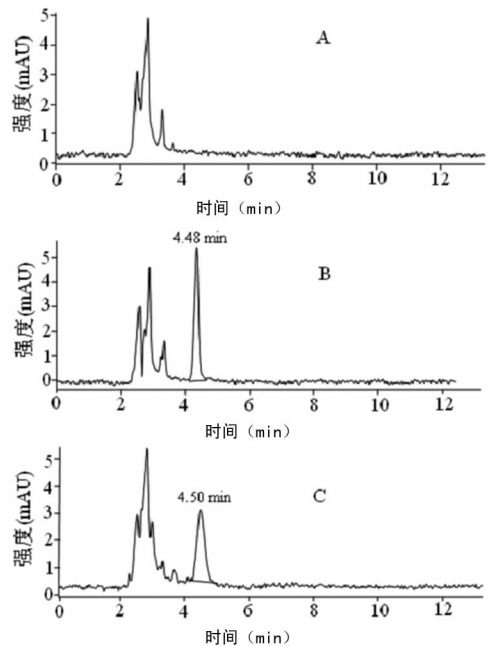


图 2 非布司他色谱图
A:空白血浆样品;B:非布司他血浆加样(2.06 $\mu\text{g/mL}$);C:犬经口给予 120 mg 非布司他片剂后 45 min 的血浆样品。

表 1 日内、日间血浆非布司他质控浓度的精密度与准确度($n=6$)

质控浓度($\mu\text{g/mL}$)	实测值($\mu\text{g/mL}$),	精密度(%)	准确度(%)
日内			
0.45	0.47 \pm 0.027	5.7	104.2
3.63	3.51 \pm 0.146	4.2	96.7
7.25	7.49 \pm 0.233	3.1	103.3
日间			
0.45	0.44 \pm 0.031	7.0	97.7
3.63	3.80 \pm 0.174	4.6	104.6
7.25	7.64 \pm 0.240	3.1	105.4

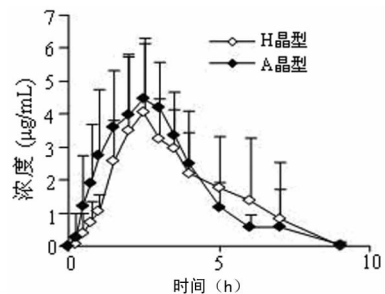


图 3 比格犬经口给予非布司他(A晶型、H晶型)后的平均药时曲线

2.4 稳定性 在本实验条件下非布司他贮备液稳定,其准确度与新配溶液相当。此外,在不同的贮存条件下对非布司他犬血浆样品的稳定性进行了考察,所有受试的非布司他犬血浆样品与相应平均值的偏差均在 2.4%~5.8%之间。血浆冻融过程不会对样品产生影响。质控样品在 -40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下至少可以保存 1 个月。在室温下冷冻血浆样品放置 6 h(下转第 53 页)

- disease[J]. *Crit Rev Toxicol*, 1993, 23(1): 21-48.
- [6] Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000, 3(5): 373-384.
- [7] Burney S, Niles JC, Dedon PC, et al. DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxyxynitrite[J]. *Chem Res Toxicol*, 1999, 12(6): 513-520.
- [8] Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, et al. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(4): 2127-2136.
- [9] Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents[J]. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(4): 2137-2145.
- [10] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009, 27(2): 120-139.
- [11] Van PY, Hamilton GJ, Kremenevskiy IV, et al. Lyophilized plasma reconstituted with ascorbic acid suppresses inflammation and oxidative DNA damage[J]. *J Trauma*, 2011, 71(1): 20-24.
- [12] Karihtala P, Kauppila S, Puistola U, et al. Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in breast carcinogenesis [J]. *Histopathology*, 2011, 58(6): 854-862.
- [13] Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, et al. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(1): 166-172.
- [14] Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45. 1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model[J]. *Lab Invest*, 1997, 76(3): 365-374.
- [15] Shimoi K, Kasai H, Yokota N, et al. Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002, 11(8): 767-770.

(收稿日期: 2012-09-09 修回日期: 2012-10-15)

(上接第 50 页)

后不会对定量产生影响。提取后样品在室温 24 h 内稳定。上述研究表明含非布司他的血浆样品在普通实验室条件下稳定,并不会出现明显的化合物丢失。

2.5 方法的应用 上述方法对非布司他犬血浆的定量结果良好,并成功用于非布司他片剂经口给药的比格犬药动学研究。10 只比格犬非布司他 A 晶型和 H 晶型片剂给药后的药时曲线见图 3。

3 讨论

在本研究对色谱条件进行了筛选以获得最佳的灵敏度和非布司他色谱峰形。非布司他具有 2 个明显紫外吸收波长,分别为 216 nm 和 314 nm,虽然 216 nm 的响应值较大,但在此波长条件下,处理后血浆样品的内源性物质会有明显干扰,为兼顾本方法的特异性和灵敏度,选择 314 nm 作为目前使用的波长。作者对不同的流动相比比例进行了筛选,最后选择甲醇和水(90:10, V/V)作为洗脱系统以获得最佳分离和色谱峰型。

本研究采用不同蛋白沉淀溶剂(如甲醇、乙腈、甲酸和冰醋酸)以确定非布司他血浆样品的前处理过程,结果表明采用乙腈与冰醋酸对非布司他进行蛋白沉淀的效果最佳。

本实验对目标化合物的定量未使用内标内标化合物进行校正,尽管如此,方法学验证的结果表明本研究建立的体内药物分析方法重现性好、准确可靠,这可能得益于简单的样品前处理方法。此外,在待测样品进样前、后,分别采用了标准曲线样品对仪器响应的稳定性进行了考察。本方法可以作为非布司他动物血浆样品测定的参考,具有特异性高、准确和重现性好的优点。此外,在本方法的基础上,如果配备荧光检测器^[8],可建立更为灵敏的、用于人体的药效动力学生物分析方法。

参考文献:

- [1] Ernst ME, Fravel MA. Febuxostat: a selective xanthine-

oxidase/xanthine-dehydrogenase inhibitor for the management of hyperuricemia in adults with gout[J]. *Clin Ther*, 2009, 31(11): 2503-2518.

- [2] 伍小云,胡艾希. 非布索坦(febugostat) [J]. *中国药物化学杂志*, 2009, 19(4): 319-320.
- [3] Pascual E, Sivera F, Yasothan U, et al. Febuxostat[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(3): 191-192.
- [4] 韩莹,朱翊,傅得兴. 非布司他治疗高尿酸血症伴痛风的药理与临床评价[J]. *中国新药与临床杂志*, 2010, 8(29): 635-638.
- [5] Grabowski BA, Khosravan R, Vernillet L, et al. Metabolism and excretion of [¹⁴C] febugostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase, in healthy male subjects[J]. *J Clin Pharmacol*, 2011, 51(2): 189-201.
- [6] 张聪,王绍杰,麻荣丽,等. HPLC 法测定非布司他的含量及有关物质[J]. *沈阳药科大学学报*, 2010, 27(8): 648-651.
- [7] Khosravan R, Kukulka MJ, Wu JT, et al. The effect of age and gender on pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of febugostat, a novel nonpurine selective inhibitor of xanthine oxidase[J]. *J Clin Pharmacol*, 2008, 48(9): 1014-1024.
- [8] 张文丽,程航,阳国平. 高效液相-荧光法测定人血浆中非布司他的浓度及其人体药动学研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(10): 1148-1152.

(收稿日期: 2012-07-08 修回日期: 2012-09-22)