

互为内标法测定患者血浆中氟西汀和西酞普兰的浓度

王欣晨¹ 许杜娟^{1,2,3} 夏泉^{2,3} 陈贵海⁴ 戴根苗^{2,3} (1. 安徽医科大学药学院 合肥 230032; 2. 安徽医科大学第一附属医院药剂科; 3. 国家中医药管理局中药化学三级实验室; 4. 安徽医科大学第一附属医院神经内科)

摘要 目的: 建立测定人血浆中氟西汀、西酞普兰的高效液相色谱-荧光(HPLC-FLU)法,为临床用药提供参考。方法: 氟西汀和西酞普兰互为内标,血浆样品碱化后经液-液萃取,以 Ultimate XB-C₁₈反相色谱柱进行分离,流动相为乙腈:0.02 mol·L⁻¹磷酸氢二钠溶液(35:65 pH 5.0),流速为1.0 ml·min⁻¹,柱温为30℃。荧光检测氟西汀和西酞普兰的激发波长为230 nm,发射波长为305 nm。结果: 氟西汀、西酞普兰血药浓度均在15.625~1 000 μg·L⁻¹范围内线性关系良好;平均回收率分别为100.72%和100.94%;分析方法的最低定量限均为5 μg·L⁻¹;日内、日间RSD均<3%;冻融稳定性RSD均<10%。结论: 本法快速、简便、灵敏、准确,适用于氟西汀、西酞普兰的血药浓度监测及药动学研究。

关键词 高效液相色谱-荧光法; 氟西汀; 西酞普兰; 血药浓度

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2012)10-1431-04

Determination of Fluoxetine and Citalopram in Patient Plasma Using Each Internal Standard Method by HPLC

Wang Xincheng¹, Xu Dujuan^{1,2,3}, Xia Quan^{2,3}, Chen Guihai⁴, Dai Genmiao^{2,3} (1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University; 3. Third-Grade Pharmaceutical Chemistry Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine; 4. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University)

ABSTRACT Objective: To establish an HPLC method with fluorescence detection assay for the determination of fluoxetine and citalopram in the patient plasma and provide a scientific basis for the clinical application. **Method:** Fluoxetine and citalopram were used as the internal standard for each other. The samples were alkalinized and extracted by liquid-liquid extraction. Then the samples were separated on an Ultimate XB-C₁₈ column with the mixture of acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ disodium hydrogen phosphate (35:65, pH 5.0) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 ml·min⁻¹. The column temperature was set at 30℃. Fluoxetine and citalopram were detected by fluorescence detection (Ex = 230 nm, Em = 305 nm). **Result:** Linearity was obtained from 15.625 to 1 000 μg·L⁻¹ for fluoxetine and citalopram. The LOQ was 5 μg·L⁻¹. The average recovery of fluoxetine and citalopram was 100.72% and 100.94%, respectively. Both the inter-day and intra-day RSD were less than 3%. The Freeze-thaw stability RSD was less than 10%. **Conclusion:** The method is rapid, convenient, sensitive and reliable in the drug determination, adverse reaction control and pharmacokinetic study of fluoxetine and citalopram in human plasma.

KEY WORDS HPLC-FLU; Fluoxetine; Citalopram; Plasma drug concentration

氟西汀和西酞普兰均为选择性5-羟色胺重摄取抑制药(SSRIs),其选择性抑制神经细胞对5-羟色胺的摄取,增强5-羟色胺能的神经传递,产生抗抑郁作用^[1]。相对于传统三环类及单胺氧化酶抑制药类抗抑郁药,该药无抗胆碱作用及心血管副作用,临床应用广泛。但其半衰期较长,且患者服药后由于体内肝药酶细胞色素P450基因多态性导致血药浓度差异很大,临床疗效不一。常规剂量下,强代谢患者可能没有疗效而弱代谢患者可能产生严重的药物不良反应^[2,3]。因此,为了保证疗效及减少不良反应,需要对这两种药物进行治疗药物监测(TDM)。本试验建立了互为内标的HPLC-FLU法测定人血浆中氟西汀及西酞普兰的浓度,具有快速、简便、准确的优点,适于氟西汀及西酞普兰的临床应

用及个体化治疗方案。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱系统配 Waters2475 荧光检测器(美国 Waters 公司),AB135-5 电子天平(上海梅特勒多-托利多),Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm 5 μm)色谱柱(美国 Welch 公司);XW-80A 涡旋振荡器(上海医科大学仪器厂);TGL-185 高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);EYELA MG-2200 氮吹仪(日本东京理化公司)。

1.2 试剂

氟西汀对照品(含量:99.9%)及西酞普兰对照品(含量:99.9%)(美国 Sigma-Aldrich 公司)。甲醇、乙腈、叔丁基甲醚为色谱纯,水为超纯水,其余试

通讯作者:许杜娟 Tel:(0551)2922422 E-mail:xudujuan6365@yahoo.com.cn

剂均为分析纯。健康人空白血浆由安徽医科大学第一附属医院检验科提供,氟西汀或西酞普兰血浆样品取自安徽医科大学第一附属医院神经内科门诊及住院患者。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈: 0.02 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钠溶液 (35: 65, pH 5.0); 流速: 1.0 ml · min⁻¹; 柱温: 30℃; 荧光分析条件: 荧光激发波长: 230 nm, 荧光发射波长: 350 nm; 进样量: 20 μl。Waters Empower 色谱工作站。

2.2 贮备液的配制

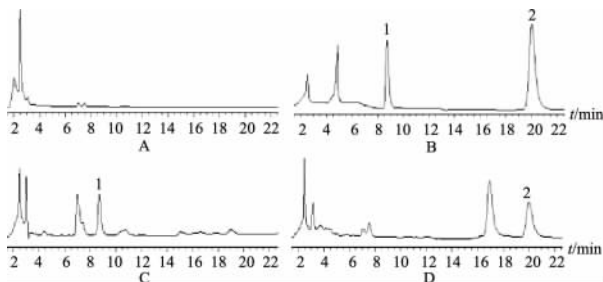
分别精密称取氟西汀对照品或西酞普兰对照品适量,用甲醇溶解并稀释,配制成浓度均为 100 μg · L⁻¹ 的贮备液,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

2.3 血浆样品的处理

氟西汀和西酞普兰互为内标。精密吸取 200 μl 患者血浆,置于 2.0 ml 具塞圆底塑料离心管中,加相应内标液 10 μl (氟西汀为内标时浓度: 125 μg · L⁻¹、西酞普兰为内标时浓度: 31.25 μg · L⁻¹) 涡旋混匀 2 min,加 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 100 μl 涡旋混匀 1 min。再加叔丁基甲醚 1 ml 涡旋混匀 2 min,6 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上层醚液置于 1.5 ml 具塞尖底塑料离心管中。重复上述步骤,将两次醚液混合,于 45℃ 氮气吹干,残渣用 100 μl 流动相复溶,6 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取 100 μl 置于进样瓶中,进样 20 μl。

2.4 色谱行为

在上述色谱条件下,西酞普兰和氟西汀的保留时间分别为 9.1 min, 20.9 min。氟西汀、西酞普兰与血浆中的其他组分色谱峰良好分离,理论塔板数 $n = 3\ 000$,分离度 $R > 1.0$ 。患者合用地西泮、氯硝西泮、阿普唑仑不干扰氟西汀和西酞普兰色谱峰。色谱图见图 1。



A. 空白血浆 B. 空白血浆 + 氟西汀 + 西酞普兰
C. 服用西酞普兰患者血浆 D. 服用氟西汀患者血浆
1. 西酞普兰 2. 氟西汀

图 1 氟西汀和西酞普兰的 HPLC 色谱图

2.5 标准曲线及线性范围

用空白血浆将氟西汀贮备液和西酞普兰贮备液配制成 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 μg · L⁻¹ 的不同浓度系列溶液,按“2.3”项下方法处理并测定,以所测定药物血浆浓度(X)为横坐标,所测药物与内标峰面积的比值(Y)为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程及线性范围。结果见表 1。取标准曲线的最低浓度值 15.625 μg · L⁻¹ 为定量下限,其中氟西汀定量下限 RSD 为 10%,西酞普兰定量下限 RSD 为 8%。当信噪比为 3 时,血浆中氟西汀和西酞普兰的最低检测限均为 5 μg · L⁻¹。

表 1 回归方程及线性范围

药物	内标 (μg · L ⁻¹)	线性方程	r	线性范围 (μg · L ⁻¹)
氟西汀	西酞普兰 (31.25)	$Y = 0.0045X - 0.0366$	0.9995	15.625 ~ 1000
西酞普兰	氟西汀 (125)	$Y = 0.0033X + 0.0112$	0.9994	15.625 ~ 1000

2.6 回收率和精密度试验结果

2.6.1 提取回收率 分别配制 31.25, 125, 500 μg · L⁻¹ 的氟西汀和西酞普兰低、中、高 3 种质量浓度的对照品血浆,按“2.3”项下方法处理血样,每一浓度平行操作 5 份,记录氟西汀和西酞普兰的峰面积 $A_{\text{样}}$,同法另取以上 3 种浓度的各对照品溶液 20 μl 进样,记录氟西汀和西酞普兰的峰面积 $A_{\text{对}}$,比较 $A_{\text{样}}/A_{\text{对}}$,计算氟西汀和西酞普兰提取回收率。结果见表 2。

2.6.2 方法回收率 分别配制 31.25, 125, 500 μg · L⁻¹ 的氟西汀和西酞普兰低、中、高 3 种质量浓度的对照品血浆,按“2.3”项下方法处理血样,每一浓度平行操作 5 份,代入回归方程计算浓度,以计算值与加入值的比值计算方法回收率,并计算日内精密度。另连续 5d 配制并测定上述浓度样品,考察方法日间精密度。结果见表 2。

结果表明,平均提取回收率均大于 76.16%,平均方法回收率均大于 99.41%,小于 102.76%。日内、日间精密度 RSD 均小于 3%,适用于血药浓度检测和药动力学研究。

2.7 血浆样品冻融稳定性

用空白血浆配制氟西汀 31.25, 125, 500 μg · L⁻¹ 和西酞普兰低、中、高 3 个质量浓度的样品,在 -40℃ 冰箱中冷冻后取出,室温融化,重复 5 次,按“2.3”项下方法处理测定氟西汀和西酞普兰的浓度。结果氟西汀低、中、高 3 个质量浓度的测得值的 RSD 分别为 4.37%、8.33% 和 7.08%,西酞普兰低、中、高 3 个质量浓度的测得值的 RSD 分别为 6.60%、7.31% 和

表2 方法回收率和精密度实验结果(n=5)

药物	加入量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	日内差异		日间差异		提取回收率(%)	方法回收率(%)
		测定量($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD(%)	测定量($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD(%)		
氟西汀	31.25	30.73 ± 0.98	2.08	31.03 ± 0.64	2.78	76.59	100.41
	125	123.38 ± 2.33	1.89	123.80 ± 1.99	1.73	79.87	101.17
	500	498.48 ± 6.04	1.21	494.24 ± 6.72	1.38	77.16	99.83
	31.25	31.18 ± 0.92	2.98	29.29 ± 0.68	2.07	78.93	102.76
西酞普兰	125	123.38 ± 2.04	1.65	120.70 ± 3.45	2.78	80.16	100.68
	500	497.01 ± 6.59	1.33	495.38 ± 6.03	1.21	76.16	99.41

3.54%。稳定性 RSD 均小于 10%，表明样品在 -40℃ 条件下稳定。

2.8 患者血药浓度检测

共收集到 10 例抑郁症患者血样，患者均按每次 20 mg，每日晨服氟西汀或西酞普兰，两药均未同时服用。抑郁症患者服药 6 周后，氟西汀和西酞普兰血药浓度均达稳态。患者当日早晨不服用氟西汀或西酞普兰，采取患者外周静脉血，应用本法测定血浆中氟西汀和西酞普兰的谷浓度。药物基因组学研究表明，由于 CYP450 酶单核苷酸多态性(SNP)的影响，可能导致抗抑郁药物在个体间代谢存在较大差异，因此患者所服药物血药浓度亦存在明显个体差异^[2]。结果见表 3。

表3 患者血样测定结果

样本序号	性别	年龄(岁)	所服药物	实测浓度($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	男	26	氟西汀	112.79
2	男	31	西酞普兰	52.27
3	女	22	氟西汀	43.68
4	男	58	氟西汀	152.19
5	女	46	西酞普兰	229.20
6	女	49	西酞普兰	103.26
7	女	30	氟西汀	70.46
8	男	56	氟西汀	168.72
9	女	42	氟西汀	99.01
10	女	55	西酞普兰	109.68

3 讨论

3.1 氟西汀及西酞普兰均为抗抑郁药，临床应用广泛。氟西汀及西酞普兰进入人体后，主要由肝药酶细胞色素 P450 酶代谢。氟西汀是 CYP2D6 的强抑制药，对 CYP3A4、CYP2C9 和 CYP2C19 亦有较强抑制^[3,5]，而西酞普兰对 CYP2C19 和 CYP2D6 存在轻度抑制^[4,6,7]。由于 CYP2D6 和 CYP2C19 代谢酶呈二态分布，有强代谢和弱代谢之分，因此在临床应用时，即使服用同一剂量药物，患者体内血药浓度水平差异仍很大，本研究测定数据证实这一点(表 3)。精神类药物治疗范围通常较窄，体内血药浓度过高可能导致不良反应，过低可能导致药物无效。另药物的相互作用、年龄、体质量、伴发疾病等也可引起

患者血药浓度的差别。因此，对这两种药物进行血药浓度监测是十分必要的。本研究共分析了 10 例患者的血浆药物浓度，其中氟西汀在 43.68 ~ 152.19 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内，西酞普兰在 52.27 ~ 229.20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内，与相关文献报道基本相符^[8,9]。

3.2 对氟西汀及西酞普兰进行全波段扫描 230 nm 波长处吸收信号最强，又因二者具有强烈的荧光吸收，故选择灵敏度高的荧光检测器进行检测。采用酸性的乙腈:磷酸氢二钠溶液(35:65)为流动相，色谱条件稳定，色谱峰分离度高，峰型对称。流动相中水相加入冰乙酸调整流动相 pH，增加仪器灵敏度，加入 0.2% 三乙胺的目的为调整峰型，避免拖尾。实验过程中曾比较乙醚、叔丁基甲醚、正己烷-异丙醇萃取氟西汀，发现叔丁基甲醚萃取率更高。对叔丁基甲醚用量(1.0 ml、1.2 ml、1.5 ml)和萃取次数(单次、双次)进行正交分析，最终以叔丁基甲醚用量 1.5 ml 双次萃取为宜。本文建立互为内标配合 HPLC-FLU 法测定血浆中氟西汀及西酞普兰的浓度，具有专属性好、灵敏度高、线性范围广、稳定性好等特点。适用于血药浓度监测及药物临床研究。

3.3 临床用药实践发现，氟西汀和西酞普兰联用概率极小，以互为内标法监测二者血药浓度，具有高效、简便、快速等优点，另可避免患者血样本身对分析过程的影响，有利于扩大临床 TDM 应用范围。

参 考 文 献

- 1 杨宝峰,苏定冯,周宏灏.药理学[M].第7版.北京:人民卫生出版社 2008. 162-163
- 2 周帆,辛华雯.药物基因组学与个体化治疗[J].中国药师, 2011,14(11):1673-1676
- 3 Scordo MG, Spina E, Dahl ML, et al. Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 genetic polymorphisms on the steady-state plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005, 97(5):296-301
- 4 Salvador F, Alberto MB, Enrique P, et al. Evaluation of the influence of sex and CYP2C19 and CYP2D6 polymorphisms in the disposition of citalopram [J]. *European Journal of Pharmacology* 2010, 626(2): 200-204

复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏的抗炎镇痛作用与毒性反应

陈鹰¹ 陈湖海¹ 徐腾² 杜蓉¹ 李佳芝¹ 朱晓雯¹ 朱以良¹ (1. 广州军区武汉总医院 武汉 430070; 2. 广州军区联勤部药品仪器检验所)

摘要 目的: 研究复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏的抗炎镇痛作用及毒性反应。方法: 采用二甲苯致炎法、醋酸扭体法和热板法观察复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏局部给药对小鼠的抗炎镇痛作用。并考察大鼠的皮肤急性毒性和家兔皮肤刺激性。结果: 复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏能显著抑制小鼠耳肿胀度、小鼠醋酸扭体反应和热板舔足反应; 大鼠皮肤给药的无明显损害作用剂量为 200 mg · kg⁻¹。家兔皮肤给药对完整皮肤组无刺激性, 对破损皮肤有轻度刺激性。结论: 复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏可用于局部疼痛炎症的治疗, 临床剂量下是安全的, 但应慎用于破损皮肤。

关键词 复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏; 抗炎作用; 镇痛作用; 急性毒性; 刺激性

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2012)10-1434-04

Anti-inflammatory and Analgesic Effects and Toxicity of Compound Diclofenac Capsaicin Cataplasms

Chen Ying¹, Chen Huhai¹, Xu Teng², Du Rong¹, Li Jiazhi¹, Zhu Xiaowen¹, Zhu Yiliang¹ (1. Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control of Guangzhou Command)

ABSTRACT Objective: To study the anti-inflammatory and analgesic effects and toxicity of compound diclofenac capsaicin cataplasms (CDCC). **Method:** The anti-inflammatory and analgesic effects of CDCC on mice were researched by dimethyl-benzen induced ear oedema model, acetic acid induced writhing model and hot plate method. The acute toxicity of CDCC was studied in rats and the irritation test was observed in rabbits. **Result:** The ear swelling degree was inhibited significantly by CDCC. The writhing reaction induced by acetic acid was inhibited and the pain threshold induced by hot plate was raised significantly in mice. The dosage with no significant toxicity in rats was 200 mg · kg⁻¹. Irritant symptoms were not significant in the integral skin, while mild irritation was shown in the damaged skin of rabbits. **Conclusion:** CDCC can be used in the treatment of local pain inflammation and the clinical dosages are safe, while attention should be paid for the use in damaged skin.

KEY WORDS Compound diclofenac capsaicin cataplasms; Anti-inflammation; Analgesic effect; Acute toxicity; Irritation

复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏为我院医院新制剂,以双氯芬酸二乙胺和辣椒碱为主药,选用卡波姆和聚丙烯酸钠为水性基质制备而成的凝胶膏剂(原称巴布膏剂),用于治疗外伤引起的疼痛及各种慢性疼痛。双氯芬酸二乙胺通过抑制前列腺素合成酶而发挥消炎镇痛作用;辣椒碱是通过影响神经肽 P 物质的释放、合成和贮藏而起镇痛和止痒作用,起效快,但无抗炎作用;两者联用将产生协同作用。为进一步证实其抗炎、止痛作用,参照有关文献^[1-4],进

行了动物实验,并对其安全性进行了初步评价,结果报道如下。

1 实验材料

1.1 仪器

AB204-N 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司生产);SZCL-4 磁力搅拌器(上海贝仑仪器设备有限公司)。

1.2 受试药物

复方双氯芬酸辣椒凝胶贴膏(自制,7.0 cm ×

通讯作者: 陈鹰 Tel: (027) 87649309 E-mail: cy9262005@yahoo.com.cn

5 刘昭前,王久辉,周宏灏. 氟西汀的药代动力学及其与 CYP450 酶的作用[J]. 中国药理学通报 2000, 16(6): 618-620

6 Carlsson B, Holmgren A, Anlner J et al. Enantioselective analysis of citalopram and escitalopram in postmortem blood together with genotyping for CYP2D6 and CYP2C19[J]. J Anal Toxicol 2009, 33(2): 65-76

7 Mrazek DA, Biernacka JM, O’Kane DJ et al. CYP2C19 variation and citalopram response[J]. Pharmacogenet Genomics 2011, 21(1): 1-9

8 He J, Zhou ZL, Li HD. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-MS/ES) [J]. Journal of Chromatography B 2005, 820(1): 33-39

9 魏世杰,文友民,党宏万,等. HPLC-荧光法同时测定人血浆中 3 种抗抑郁药的浓度[J]. 中国药房 2009, 20(26): 2026-2028 (2012-05-03 收稿 2012-07-29 修回)