

高效液相色谱法测定人乳汁中羟氯喹浓度

刘容吉¹, 张乐嘉², 付强¹, 梅丹¹, 杜小莉^{1*}

(1 中国医学科学院北京协和医院药剂科, 北京 100730; 2 中国医学科学院北京协和医院儿科, 北京 100730)

【摘要】 目的: 建立人乳汁中羟氯喹浓度的 HPLC 测定方法。方法: 取乳汁样本 200 μL , 以氯喹为内标, 在 0.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 碱性条件下以甲基叔丁基醚液液提取, 氮气吹干后用 50 μL 流动相复溶, 取 20 μL 进样。Shimadzu Shim-pack CLC-ODS 柱 (150 \times 6 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 流动相为 45 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磷酸二氢钾水溶液: 乙腈=87:13 (H_3PO_4 调节流动相 pH 至 3.0), 流速为 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 荧光检测激发波长和发射波长分别为 337 nm 和 371 nm。结果: 标准曲线在 200~2000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好 ($r=0.999\ 9$), 低、中、高浓度质控样本 (400、800、1 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的批内、批间变异 (RSD) 分别为 1.07%~2.93% ($n=5$) 和 1.82%~3.91% ($n=5$), 方法学和提取回收率分别为 90.84%~91.90% ($n=10$) 和 67.04%~69.61% ($n=3$), 内标的提取回收率为 67.70% \pm 3.94% ($n=3$)。结论: 本方法灵敏度高, 准确性好, 简便快捷, 适用于人乳汁中羟氯喹浓度的测定。

【关键词】 羟氯喹; 乳汁; 药物浓度; 高效液相色谱

【中图分类号】 R969.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2016)02-0023-04

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2016.02.006

Determination of Hydroxychloroquine in Human Breast milk by HPLC

LIU Rong-ji¹, ZHANG Le-jia², FU Qiang¹, MEI Dan¹, DU Xiao-li^{1*}

(1 Department of Pharmacy, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China; 2 Department of Pediatrics, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China)

【Abstract】 Objective: To develop a high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of hydroxychloroquine in human breast milk. **Methods:** Chloroquine was used as the internal standard. 200mL breast milk sample were extracted with methyl-tert-butyl ether (MTBE) in an alkaline condition after adding 0.45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH solution, followed by drying with nitrogen and re-dissolving with 50 μL mobile phase. The separation was carried out on a Shimadzu Shim-pack CLC-ODS column(150 \times 6 mm, 5 μm) at 40 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase consisted of acetonitrile-45 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ KH_2PO_4 buffer solution (13:87) (pH adjusted to 3.0 by H_3PO_4). The flow rate was 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and the injection volume was 20 μL . Fluorescence detection was performed at excitation and emission wavelengths of 337nm and 371nm, respectively. **Results:** The calibration curve of hydroxychloroquine was linear in the range of 200-2 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$). The intra-run and inter-run RSDs were 1.07%-2.93% ($n=5$) and 1.82%-3.91% ($n=5$) for the three check samples (400, 800, 1500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) respectively. The accuracy was 90.84%-91.90% ($n=10$). The extraction recoveries were 67.04%-69.61% and 67.70% \pm 3.94% for hydroxychloroquine and IS, respectively ($n=3$). **Conclusion:** The method is simple, sensitive, and accurate, and it can be used for the measurement of hydroxychloroquine concentration in human breast milk.

【Keywords】 hydroxychloroquine; breast milk; concentration; HPLC

羟氯喹 (hydroxychloroquine, HCQ) 是一种 4-氨基喹啉化合物, 通过抗炎、调节免疫系统和影响细胞因子释放等机制发挥治疗作用, 是治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等疾病的重要药物,

患者需要长期服用。对于生育期女性患者, 临床为保证治疗的连续性, 通常要求她们在哺乳期间继续服药。由于羟氯喹不良反应较严重, 它对接受母乳喂养的婴儿的安全性如何深受关注。但目前相关资

[收稿日期] 2015-12-06

[基金项目] 北京药学会 2014 年临床药学基金项目

[作者简介] 刘容吉, 女, 药师; 研究方向: 医院药学; Tel: (010)69156537; E-mail: xiaojizi1224@163.com

[通讯作者]* 杜小莉, 女, 主任药师; 研究方向: 医院药学; Tel: (010)69156537; E-mail: duxiaolipumch@163.com

料非常有限,且相互矛盾。美国儿科协会认为羟氯喹对婴儿影响很小,且临床研究中未发现视觉、神经发育等不良反应,因此服用羟氯喹期间通常可以哺乳^[1-4]。而国家食品药品监督管理局(CFDA)批准的药品(纷乐®及赛能®)说明书中则明确指出哺乳期妇女应慎用羟氯喹,因为在母乳中可分泌有少量的羟氯喹,并且已知婴儿对4-氨基喹啉的毒性作用非常敏感。因此,了解羟氯喹的乳汁分泌情况对于保证哺乳期婴儿的安全具有重要参考价值。

目前,有关羟氯喹乳汁浓度测定方法的研究非常有限,国外有3篇涉及羟氯喹乳汁浓度的研究报告,其中仅1篇文献详细介绍了其测定方法^[3,5-6]。本试验旨在建立羟氯喹乳汁药物浓度的测定方法,为开展羟氯喹哺乳期用药的安全性研究提供支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-10AD 泵(Shimadzu, 日本), RF-10A XL 荧光检测器(Shimadzu, 日本), DGU-3A 脱气机(Shimadzu, 日本), C-R7A plus 色谱数据处理机(Shimadzu, 日本), CTO-10ASVP 柱温箱(Shimadzu 公司, 日本); Ping-Pong 74580 卧式振荡器(Block Scientific, 德国); Mikro 12-24 离心机(Hettich, 德国); Vortex-Mixer 液体快速混合器(Upwards Biosystems LTD., 中国台湾)。

1.2 药品与试剂

羟氯喹对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100582-200401, 含量 99.3%), 氯喹对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100421-200401, 含量 98.9%), 磷酸二氢钾为分析纯, 乙腈、甲基叔丁基醚为色谱纯, 实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shimadzu Shim-pack CLC-ODS 柱(150×6 mm, 5 μm); 流动相: 45 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液: 乙腈=87:13, H₃PO₄ 调节流动相 pH 至 3.0; 激发波长: 337 nm, 发射波长: 371 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 40℃; 进样量: 20 μL。

2.2 乳汁标准曲线及质控样本配制

羟氯喹标准曲线储备液及工作液: 称取羟氯喹

对照品 5 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 以蒸馏水溶解并定容, 混匀得到 100 μg·mL⁻¹ 的羟氯喹标准曲线储备液。量取储备液适量, 用蒸馏水稀释, 得质量浓度为 20、40 μg·mL⁻¹ 标准曲线工作液。分别取不同浓度的工作液适量至 10 mL 容量瓶中, 空白乳汁加至刻度, 摇匀得到质量浓度为 200、600、1 000、1 200、1 600、2 000 ng·mL⁻¹ 的乳汁标准曲线样本, 分装后冻存于 -60℃。

羟氯喹质控样本: 以配制乳汁标准曲线样本相同方法, 另行配制羟氯喹乳汁质控样本, 质量浓度分别为 400、800、1 500 ng·mL⁻¹, 分装后冻存于 -60℃。内标储备液: 称取氯喹对照品 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解后定容, 混匀得到 100 μg·mL⁻¹ 的内标储备液, 分装后冻存于 -60℃。

2.3 乳汁样本处理

取待测乳汁样本 200 μL 于 1.5 mL 离心管中, 依次加入 10 μL 内标储备液、40 μL 0.45 mmol·L⁻¹ NaOH 溶液和 1.0 mL 甲基叔丁基醚, 400 次·min⁻¹ 振荡 5 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 移取上清液至另一 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 氮气吹干, 随后用 50 μL 流动相复溶残渣, 涡旋 30 s, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 移取上清液至另一 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 取 20 μL 进样。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 分别取羟氯喹和内标标准溶液、空白乳汁、空白乳汁加羟氯喹和氯喹对照品、受试者服药后的乳汁样本, 按“2.3”项下处理样本, 色谱图见图 1。羟氯喹和内标出峰位置背景干净,

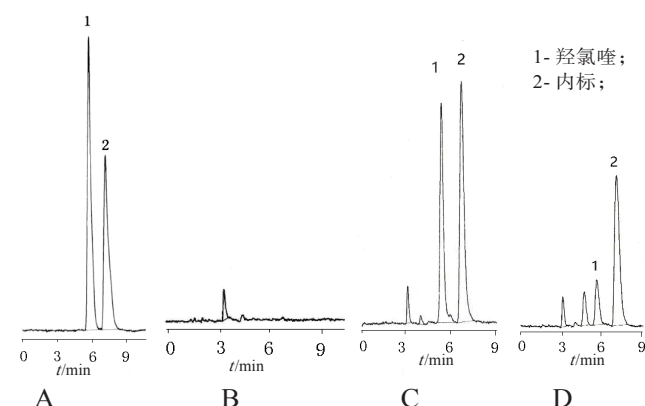


图 1 羟氯喹色谱图

A- 羟氯喹 + 内标对照品; B- 空白乳汁; C- 空白乳汁 + 羟氯喹 + 内标对照品; D- 受试者乳汁 + 内标对照品

均无杂峰干扰,羟氯喹与内标峰形尖锐对称,与各杂峰分离良好。

2.4.2 线性考察 取乳汁标准曲线样本,按“2.3”项下方法操作,以羟氯喹浓度 C 为横坐标,羟氯喹与内标的峰高比 (PHR) 为纵坐标绘制标准曲线,得到羟氯喹乳汁标准曲线回归方程为 $Y=0.016\ 4+0.000\ 656\rho$ ($r=0.999\ 9$),斜率变异系数 CV 为 3.27% ($n=3$),在 200~2 000 ng•mL⁻¹ 范围内线性良好。最低定量限为 200 ng•mL⁻¹,方法学回收率为 99.47%±6.32% (RSD=6.35%, $n=5$)。

2.4.3 方法学精密度 取高、中、低 3 个质量浓度的乳汁质控样本 ($n=5$),按“2.3”项下方法操作。根据标准曲线计算质控样本的浓度,计算批内、批间精密度,结果见表 1。

2.4.4 方法学准确度 取高、中、低 3 个质量浓度的乳汁质控样本 ($n=10$),按“2.3”项下方法操作,将峰高比带入标准曲线方程计算测定浓度,并与理论浓度进行对比,计算相对回收率,结果见表 2。

2.4.5 提取回收率 取高、中、低 3 个质量浓度的乳汁质控样本 ($n=3$),按“2.3”项下方法操作;另配制相同浓度的羟氯喹及内标对照品溶液 ($n=3$),直接进样。将两组峰高比进行比较,计算提取回收率,结果见表 3。

2.4.6 室温放置稳定性 取高、中、低 3 个质量浓度

表 1 羟氯喹乳汁样本批内、批间精密度. $n=5, \bar{x} \pm s$

理论值 /ng•mL ⁻¹	批内		批间	
	/ng•mL ⁻¹	RSD%	/ng•mL ⁻¹	RSD%
400	345.56 ± 10.12	2.93	363.38 ± 14.21	3.91
800	716.07 ± 13.11	1.83	729.06 ± 13.25	1.82
1 500	1 373.64 ± 14.75	1.07	1 378.56 ± 25.45	1.85

表 2 羟氯喹乳汁样本方法学回收率. $n=10, \bar{x} \pm s$

理论值 /ng•mL ⁻¹	实测值 /ng•mL ⁻¹	回收率 /%
400	363.38 ± 17.02	90.84 ± 4.26
800	729.06 ± 13.81	91.13 ± 1.73
1 500	1 378.56 ± 27.56	91.90 ± 1.84

表 3 羟氯喹及内标乳汁样本提取回收率. $n=3, \bar{x} \pm s$

浓度 /ng·mL ⁻¹		提取前峰高	提取后峰高	提取回收率 /%
HCQ	400	1 344.67 ± 113.39	896.67 ± 19.09	67.04 ± 6.47
	800	2 546.33 ± 207.02	1 750.67 ± 67.55	69.01 ± 5.45
	1 500	4 841.67 ± 468.39	3 350.33 ± 182.53	69.61 ± 7.34
IS	50 000	5 307.67 ± 334.43	3 584.67 ± 25.54	67.70 ± 3.94

的乳汁质控样本,分别于室温放置 1 h 或 6 h 后按“2.3”项下进行处理 ($n=3$),测定羟氯喹浓度。结果显示,3 个质量浓度质控样本室温放置 6 h 后与放置 1 h 的浓度比值 (C_{6h}/C_{1h}) 分别为 98.71%、99.54% 和 99.84%。说明羟氯喹乳汁样本室温放置 6 h 稳定。本试验所有冻存样本均在室温放置 2 h 内进行提取处理。

2.4.7 复溶液室温放置稳定性 取高、中、低 3 个质量浓度的乳汁质控样本 ($n=3$),按“2.3”项下进行处理,复溶后,分别立即进样或于室温放置 4 h 后进样,测定羟氯喹浓度。结果显示,3 个质量浓度质控样本复溶液室温放置 4 h 与立即进样的浓度比值 (C_{4h}/C_{0h}) 分别为 98.86%、98.81% 和 99.42%,表明羟氯喹乳汁样本复溶液室温放置 4 h 稳定。本研究所有样本复溶液均在室温放置 2 h 内完成进样。

2.4.8 反复冻融稳定性 取高、中、低 3 个质量浓度的乳汁质控样本,分别在室温融化后直接按“2.3”项下进行处理进样或反复冻融 3 次后按“2.3”项下进行处理进样 ($n=3$),测定羟氯喹浓度。结果显示,3 个质量浓度质控样本反复冻融 3 次与冻融 1 次的浓度比值 (C_{tri}/C_{once}) 分别为 101%、100.26% 和 102.31%,表明 3 次冻融后的稳定性良好。本试验样本均在第一次融化后测定。

2.4.9 患者乳汁浓度测定结果 采集了 1 名长期服用羟氯喹 (>1 年) 的哺乳期患者 (给药方案为每次 0.1 g, 每日 2 次) 服药前 (0 h)、服药后 2 h、4 h、6 h、8 h 及 12 h 的乳汁,采用本研究建立的 HPLC 方法,测定羟氯喹乳汁浓度,结果见图 2。

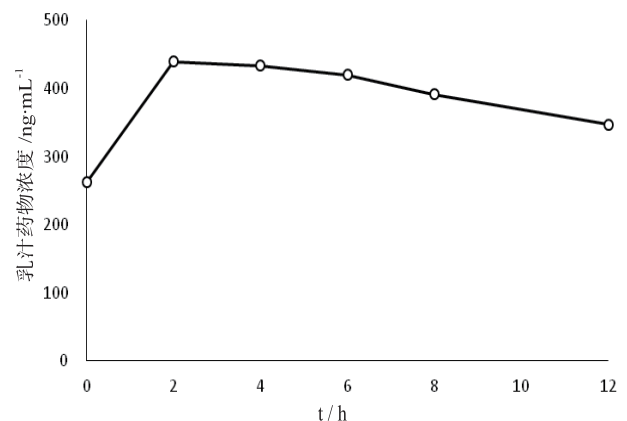


图 2 长期服用羟氯喹的哺乳期患者的乳汁药物浓度 - 时间曲线

3 讨论

本研究参考国内外已发表的羟氯喹 HPLC 测定方法^[3,5-11],对提取剂、流动相离子强度及荧光检测的吸收波长和发射波长进行了考察。

文献 [5] 中采用二氯甲烷对乳汁样本进行液液提取。本试验比较了不同提取剂如甲基叔丁基醚、正己烷、氯仿及二氯甲烷等对提取率的影响,结果显示采用甲基叔丁基醚提取后,色谱图背景干净,羟氯喹及内标提取回收率较高。本研究还考察了流动相中 $45\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 磷酸二氢钾水溶液与乙腈的比例分别为 87:13、85:15 及 88:12 时的出峰时间及干扰峰情况,结果显示二者比例为 87:13 时,出峰时间较合适且不受杂峰干扰。对荧光检测激发波长在 368~374 nm 之间、发射波长在 329~345 nm 之间的出峰情况进行的考察表明,最大吸收波长和发射波长分别为 337 nm 及 371 nm。

4 结论

本试验所建立的人乳汁中羟氯喹的 HPLC 测定方法灵敏度高、重现性好、操作简便快速,能够满足临床对羟氯喹乳汁浓度测定的需要,为其哺乳期用药安全性研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. Transfer of drugs and other chemicals into human milk[J]. Pediatrics, 2001, 108(3): 776-789.
- [2] Motta M, Tincani A, Faden D, et al. Follow-up of infants exposed to hydroxychloroquine given to mothers during pregnancy and lactation[J]. J Perinatol, 2005, 25(2): 86-89.
- [3] Costedoat-Chalumeau N, Amoura Z, Aymard G, et al. Evidence of transplacental passage of hydroxychloroquine in humans[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(4): 1123-1124.
- [4] Temprano K K, Bandlamudi R, Moore T L. Antirheumatic drugs in pregnancy and lactation[J]. Semin Arthritis Rheum, 2005, 35(2): 112-121.
- [5] Nation R L, Hackett L P, Dusci L J, et al. Excretion of hydroxychloroquine in human milk[J]. Br J Clin Pharmacol, 1984, 17(3): 368-369.
- [6] Ostensen M, Brown N D, Chiang P K, et al. Hydroxychloroquine in human breast milk[J]. Eur J Clin Pharmacol, 1985, 28(3): 357.
- [7] Munster T, Gibbs J P, Shen D, et al. Hydroxychloroquine concentration-response relationships in patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(6): 1460-1469.
- [8] Lim H S, Im J S, Cho J Y, et al. Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and its clinical implications in chemoprophylaxis against malaria caused by Plasmodium vivax[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(4): 1468-1475.
- [9] Tett S E, Cutler D J, Brown K F. High-performance liquid chromatographic assay for hydroxychloroquine and metabolites in blood and plasma, using a stationary phase of poly(styrene divinylbenzene) and a mobile phase at pH 11, with fluorimetric detection[J]. J Chromatogr, 1985, 344: 241-248.
- [10] 易琼,熊丹,蔡莉,等. RP-HPLC 法测定硫酸羟氯喹的含量及有关物质 [A]. 中国药学会天津杯第八届全国药物分析优秀论文评选交流会 [C]. 武汉 :2007, 334-336.
- [11] 王玉,秦斌,张廷兰. 反相离子对高效液相色谱法测定硫酸羟氯喹片的含量 [J]. 中国新药杂志, 2002, 11(4): 297-299.

数字用法

以《中华人民共和国国家标准 (GB/T15835 - 2011) 出版物上数字用法的规定》为准。

公历世纪年代年月日和时刻 用阿拉伯数字,年份不能简写,如 1990 年不能写成 90 年。

阿拉伯数字的使用规则 ①多位的阿拉伯数字不能拆开转行;②计量和计数单位前的数字必须用阿拉伯数字;③小数点前或后若超过 4 位数(含 4 位),应从小数点起向左或向右每 3 位空半格;④纯小数须写出小数点前用以定位的 0;⑤数值的增加可用倍数表示,减少只能用分数或 % 表示,例如增加 2 倍,减少 $1/5$ 或减少 20%。

参与与偏差范围 ①数值范围:二至十写成 2 ~ 10; $5 \times 10^6 \sim 9 \times 10^6$ 可写成 $(5 \sim 9) \times 10^6$,但不能写成 $5 \sim 9 \times 10^6$;②百分数范围:10% ~ 15% 不能写成 10 ~ 15%, $(20 \pm 5)\%$ 不能写成 $20 \pm 5\%$;③具有相同单位的量值范围:3.5 ~ 5.4 mA 不必写成 3.5 mA ~ 5.4 mA;④偏差范围:如 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不能写成 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

——摘自本刊 2016 年投稿须知