

# 大鼠血浆中利托那韦的 HPLC 法测定 及其药动学研究<sup>①</sup>

赵燕娜 蔡畅 张勤秀 韩军

(聊城大学 生物制药研究院, 山东 聊城 252059)

**摘要** 目的:建立了测定大鼠血浆中利托那韦的高效液相色谱法,并用于利托那韦在大鼠体内的药动学研究. 方法:大鼠血浆样品经乙腈沉淀蛋白后,采用高效液相色谱法测定血浆中利托那韦的含量. 选用 Agilent Zorbax XDB-C18 色谱柱,以乙腈-0.1%磷酸水溶液(55:45)为流动相,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 35°C,检测波长 254 nm. 结果:该方法下大鼠血浆中利托那韦在 0.05-5 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度范围内线性关系良好;高、中、低浓度下日内和日间 RSD 值均小于 5%;提取回收率在 85%-125%之间;稳定性良好. 大鼠灌胃给予利托那韦混悬液(8 mg·kg<sup>-1</sup>)后,血浆中利托那韦的药动学参数分别为:C<sub>max</sub> 120.30±9.00 ng·mL<sup>-1</sup>, T<sub>max</sub> 1±0.35 h, T<sub>1/2</sub> 0.41±0.14 h, AUC<sub>0-∞</sub> 624.30±39.88 h·(ng·mL<sup>-1</sup>), AUC<sub>0-1</sub> 789.80±19.73 h·(ng·mL<sup>-1</sup>). 结论 该方法简单、快速、经济、重复性良好,适用于利托那韦大鼠体内药代动力学的研究.

**关键词** 利托那韦;高效液相色谱;大鼠血浆;药动学

**中图分类号** R94

**文献标识码** A

利托那韦(ritonavir, RTV)是人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)和人免疫缺陷病毒-2(HIV-2)天冬氨酸蛋白酶的口咽抑制剂<sup>[1,2]</sup>,其分子式为 C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>,化学名为(2S,3S,5S)-5-(N-(N-(N-甲基-N-(2'-异丙基-4'-噻唑)甲基)氨基)羰基)缬氨酰基)氨基)-2-(N-(5'-噻唑)甲氧基羰基)氨基)-1,6-二苯基-3-羟基己烷,化学结构式如图 1 所示. 天冬氨酸蛋白酶是 HIV 颗粒成熟的关键酶,利托那韦能抑制该蛋白酶的活性,阻断 HIV 病毒的复制,从而阻止 HIV 病毒在体内的蔓延. 由于利托那韦是 CYP3A 肝药酶的有效抑制剂,能抑制 CYP3A 介导的生物转化<sup>[3]</sup>,因此临床上可单独使用,或联用其他抗逆转录病毒的药物,如洛匹那韦<sup>[4]</sup>、地瑞拉韦<sup>[5]</sup>、阿扎那韦<sup>[6]</sup>等,用于艾滋病病人的治疗<sup>[7]</sup>.

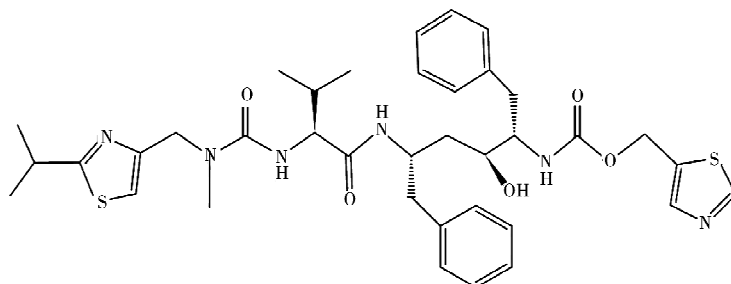


图 1 利托那韦分子结构

迄今为止,在国内已经被批准上市的利托那韦制剂包括利托那韦软胶囊、片剂、利托那韦/洛匹那韦

① 收稿日期:2018-03-07

基金项目:国家科技重大专项(2017ZX09201-003);山东省自然科学基金项目(ZR2017BH065);山东省高等学校科技计划(J17KA234);山东省抗体制药协同创新中心开放课题(CIC-AD1831);聊城大学博士启动基金项目(318051633)资助

通讯作者:韩军,男,汉族,博士,教授,研究方向:药物新剂型,E-mail:junhanmail@163.com.

复方片、复方溶液、复方软胶囊和利托那韦溶液,除美吉斯制药(厦门)有限公司及南京星银药业有限公司开发的利托那韦溶液外,其余亦均为雅培公司产品<sup>[6]</sup>。除此之外,上海迪赛诺化学制药有限公司的利托那韦仿制药正在审评中。

生物药剂学分类系统(BCS系统)将利托那韦归于BCS-IV类药物,即低溶解性-低渗透性药物。这类药物水中几乎不溶,且不易跨过小肠上皮细胞膜<sup>[9]</sup>,因此药物剂型的开发难度较大。近年来吸引了诸多研究人员致力于将增加溶解度的新技术应用于利托那韦制剂,例如开发基于脂类物质的药物递送系统<sup>[10]</sup>、纳米混悬剂<sup>[11]</sup>、纳米粒<sup>[12]</sup>以及固体分散体<sup>[13]</sup>等。

为深入研究利托那韦制剂,进一步开发利托那韦新药,使其更好的应用于临床,需建立利托那韦动物体内药动学的研究方法,而准确测定血浆中利托那韦浓度是药动学研究的基础。对血浆样品中利托那韦浓度的测定以质谱法或液相-质谱联用居多<sup>[14,15]</sup>,其血样处理方法繁琐,成本较高。本研究采用HPLC法测定大鼠血浆中的利托那韦,经方法学验证和实际应用,本法专属性强、方便快捷,适用于利托那韦在大鼠体内的药动学研究。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

KQ3200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DGG-9030AD型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);Mettler Toledo AL204电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);Milli-Q Advantage A10超纯水机(美国Millipore公司);Vortex-Genie2 G560E涡旋振荡仪(美国Scientific Industries公司);Centrifuge 5804R冷冻离心机(德国Eppendorf公司);HP 8453紫外可见阵列二极管分光光度计(美国HP公司);Ultimate 3000 Series高效液相色谱仪(Dionex);Agilent Zorbax XDB-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,Agilent,美国)。

### 1.2 试剂

利托那韦对照品(批号DBH105-4-B15A-101205,上海迪赛诺制药);乙腈(批号A3889,Fisher,色谱纯);其他试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

雌性SD大鼠(180-200 g,SPF级,济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物许可证号:SCXK鲁20140007)。大鼠培养于恒温鼠柜中,室温(25±0.2)℃,无对流风,12 h光照,12 h黑暗。食用常规实验室饲料,自由饮水。

## 2 方法

### 2.1 HPLC 色谱条件

Ultimate 3000 Series高效液相色谱仪(Dionex);Agilent Zorbax XDB-C18色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,Agilent,美国);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(55:45);流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>;检测波长254 nm;温度35℃;进样量50 μL。

### 2.2 对照品溶液的配制

精密称取利托那韦对照品10 mg,置于100 mL容量瓶中,用乙腈溶解并定容,得100 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液。精密量取该储备液,分别配制质量浓度为100、50、20、10、2、1 μg·mL<sup>-1</sup>的系列浓度利托那韦对照品溶液,于4℃保存待用。

### 2.3 大鼠血样处理

大鼠眼球后静脉丛取血至含有肝素钠的离心管中,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,分离血浆,精密吸取大鼠血浆200 μL,加入1 mL乙腈沉淀蛋白,涡旋振荡器上混合90 s后10 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液加至含氯化钠50 mg左右的EP管中静置10 min,待溶液分层后取上清,40℃条件下,氮吹至溶液挥干,重新加入100 μL乙腈复溶,涡旋振荡器上混合60 s,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min后取上清50 μL进样测定。另选乙酸乙酯及甲醇,分别处理血样后HPLC检测,以筛选沉淀蛋白及萃取药物的最佳溶剂。

## 2.4 专属性试验

取大鼠空白血浆 190  $\mu\text{L}$ , 加入“2.2”项下不同浓度利托那韦对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀。按“2.3”项下血样处理方法处理, “2.1”项下液相色谱条件进样测定, 记录色谱图。另取大鼠空白血浆 200  $\mu\text{L}$ , 相同方法处理后进样测定, 记录色谱图。

## 2.5 线性标曲的建立

分别精密吸取“2.2”项下系列浓度的利托那韦对照品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 加至 190  $\mu\text{L}$  大鼠空白血浆中, 涡旋混匀, 每个浓度制备 5 个平行样品。含药血浆样品按照“2.3”项下血样处理方法处理, “2.1”项下液相色谱条件进样测定, 以峰面积  $A$  为纵坐标, 浓度  $C$  为横坐标, 进行线性回归。

## 2.6 精密度试验

按照“2.4”项下方法分别配制低、中、高浓度(0.05、0.5 和 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 下同)的含药血浆标准液, 按照“2.3”项下方法处理后进样分析, 记录峰面积, 代入标准曲线方程计算浓度。处理后样品 4 $^{\circ}\text{C}$  避光密封保存, 1 d 内测定 5 次, 连续 5 d 测定, 计算日内、日间 RSD。

## 2.7 回收率试验

取大鼠空白血浆, 按照“2.4”项下方法分别配制低、中、高浓度的含药血浆样品各 5 份, 按照“2.3”项下方法处理后 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取 50  $\mu\text{L}$  进样测定, 记录色谱峰面积  $A_1$ 。另配制相应浓度的对照品溶液(与处理后的血样浓度相同)各 5 份, 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后取 50  $\mu\text{L}$  进样测定, 记录其色谱峰面积  $A_2$ 。根据公式: 回收率(%) =  $(A_1/A_2) \times 100\%$ , 计算低、中、高浓度下的回收率。

## 2.8 稳定性试验

取大鼠空白血浆, 按照“2.4”项下方法分别配制低、中、高浓度的含药血浆, 分别在 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下放置 24 h、-20 $^{\circ}\text{C}$  保存 7 d 及反复冻融 3 次后, 按照“2.3”项下方法处理后进样分析, 记录峰面积, 代入标准曲线方程计算浓度。与即时含测所得血浆中的药物浓度进行对比, 计算不同条件处理的 RSD 值。

## 2.9 药动学试验

2.9.1 溶液的配制。精密称取利托那韦对照品 20 mg, 置 25 mL 容量瓶中, 用生理盐水混悬超声后定容, 配成 0.8  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的利托那韦混悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存待用, 临用前重新超声混悬。

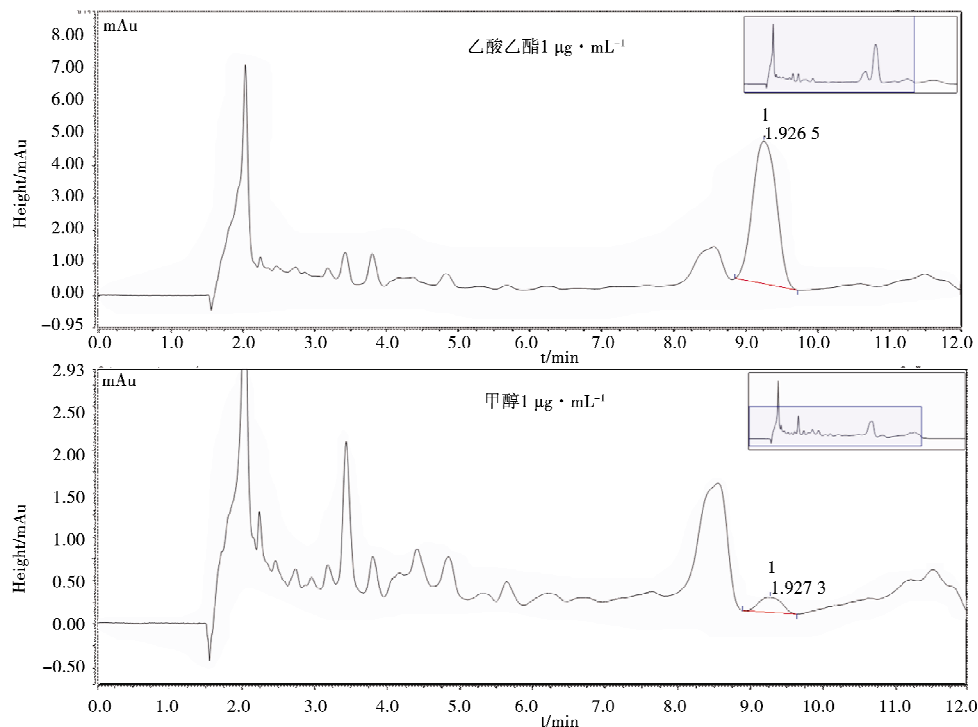


图2 乙酸乙酯及甲醇处理血浆样品 HPLC 图谱(1:利托那韦出峰位置)

2.9.2 给药方案。健康雌性 SD 大鼠 6 只, 给药前禁食 12 h, 自由饮水。以 10  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量灌胃给予利托那韦混悬液 2 mL, 给药后自由饮食和饮水, 于给药后的 5 min、15 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、

6 h、8 h 和 12 h 经大鼠眼球后静脉丛取血 0.5 mL, 置含有肝素钠的离心管中,  $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 分离血浆,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待测.

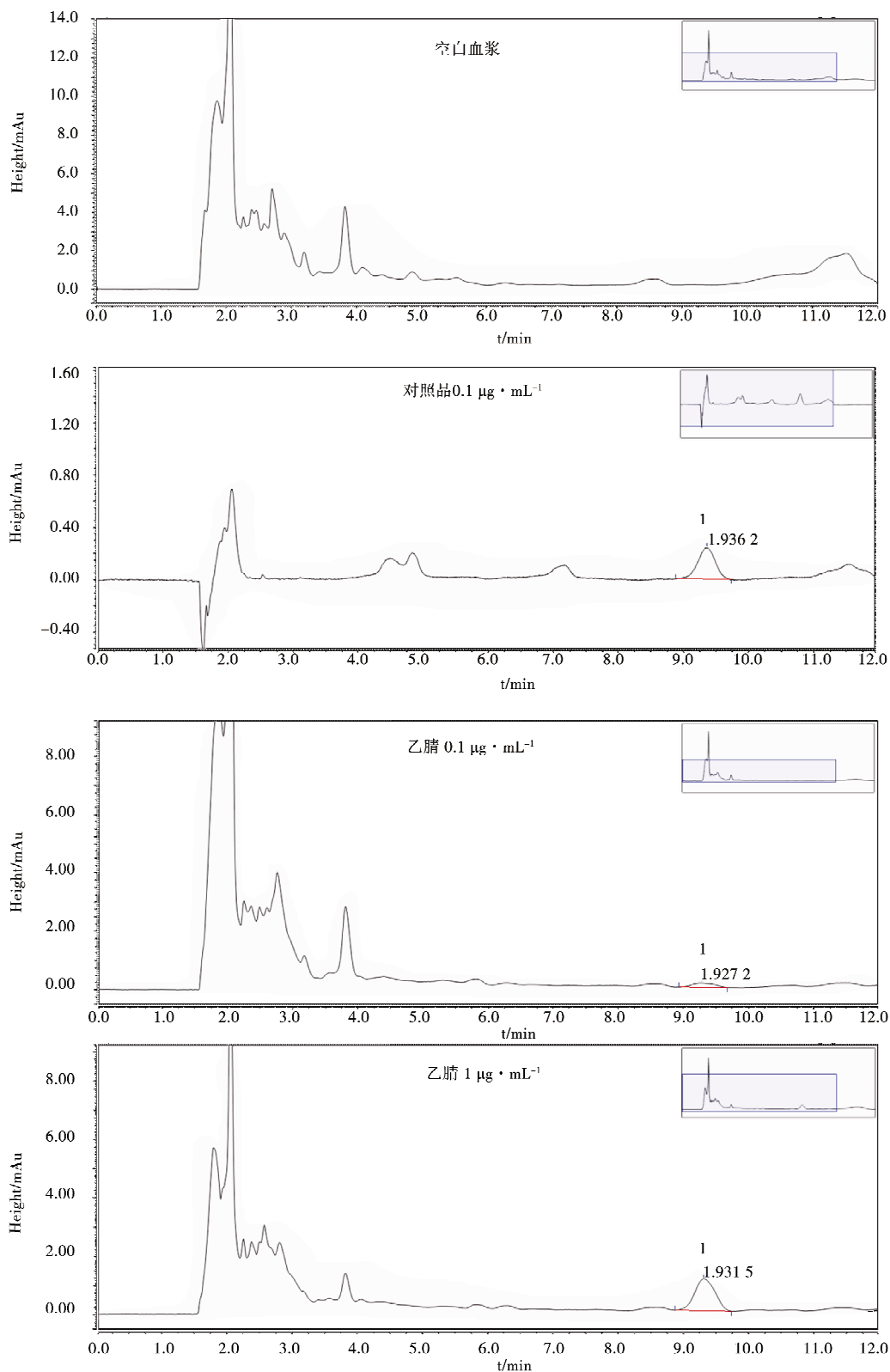


图3 乙腈处理血浆样品 HPLC 图谱(1:利托那韦出峰位置)

2.9.3 血样测定和数据处理. 取上述血样自然解冻, 按“2.3”项下方法处理后进样, 记录色谱图. 根据峰面积计算各时间点的血药浓度, 绘制药-时曲线, 将血药浓度结果用 PKSolver 药动力学软件处理, 计算药动学参数.

### 3 实验结果

#### 3.1 专属性试验

大鼠血浆样品专属性试验结果见图 2-图 4。由图 2 可知,选用甲醇及乙酸乙酯处理血浆样品时,血浆中内源性物质杂质峰与利托那韦药物峰分离度并不好,极易干扰利托那韦的含测。且选用甲醇处理血浆样品时,利托那韦在不同浓度下线性关系较差;选用乙酸乙酯处理血浆样品时,低浓度下利托那韦峰面积数值异常,较其他两种溶剂处理的结果呈现 2-3 倍的增加。因此接下来选用乙腈进行血浆样品的处理。从图 3 可以看出,选用乙腈为蛋白沉淀剂及药物萃取剂,在上述血浆处理方法及色谱条件下,利托那韦峰形良好,保留时间约 9.2 min,分离度符合要求,且大鼠血浆中内源性物质不干扰药物含测,方法专属性良好。单剂量灌胃利托那韦混悬液后,在上述血浆处理方法及色谱条件下,大鼠血浆中内源性物质仍不干扰利托那韦的测定(见图 4),证实这一方法满足药动学试验的含测要求。

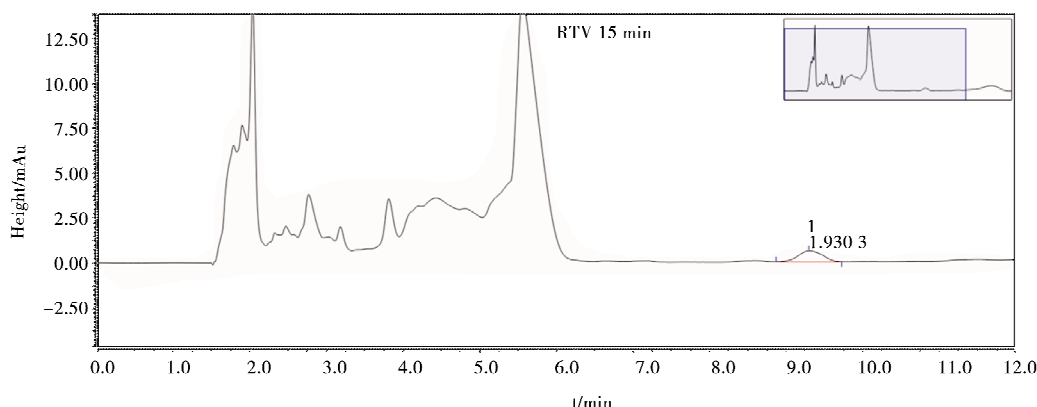


图 4 单剂量灌胃利托那韦混悬液血浆样品 HPLC 图谱(1:利托那韦出峰位置)

#### 3.2 线性标曲的建立

经计算,得标准曲线方程  $A=0.572 \times C-0.0454$ (见图 5),线性范围为  $0.05-5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $r=0.9991$ ,表明在  $0.05-5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内,标曲线性关系良好。最低检测限(LOD)为  $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,信噪比(S/N)=3;定量限(LOQ)为  $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,信噪比(S/N)=10。

#### 3.3 精密度、回收率及稳定性试验

精密度、回收率及稳定性试验结果见表 1。首先,从表 1 精密度数据可以看出,不同浓度下,日内、日间 RSD 值均小于 5%,可见本方法有较好的准确性,可作为生物样本测定方法应用。其次,表 1 回收率数据显示,不同浓度下利托那韦回收率均在 85%-125% 范围内,可见本方法回收率良好,符合生物样本测定方法的要求。最后,表 1 中稳定性数据表明,不同条件放置处理后,血浆样品含测的 RSD 值均小于 5%,即含药血浆样品在不同条件下稳定性良好,满足药动学实验的含测要求。

表 1 精密度、回收率与稳定性( $n=5$ )

利托那韦浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	精密度/%		回收率/%	稳定性/%		
	日内 RSD	日间 RSD		4℃放置 RSD	-20℃放置 RSD	反复冻融 RSD
0.05	1.14	3.76	116.51±2.20	4.81	3.61	3.78
0.5	0.18	4.11	99.07±1.21	2.05	1.05	1.30
5	0.36	1.59	90.65±3.17	0.23	3.44	2.20

#### 3.4 药动学试验

利托那韦混悬液大鼠体内药-时曲线结果见图 6。从图 6 可以看出,大鼠灌胃给药后 0-12 h 的血浆药物浓度均可通过该方法进行测定,说明本方法适用于测定大鼠血浆中利托那韦的浓度。利托那韦大鼠体内药动学数据经 PKSolver 药动学软件处理,药动学参数结果见表 2。表 2 数据显示,利托那韦混悬液灌胃

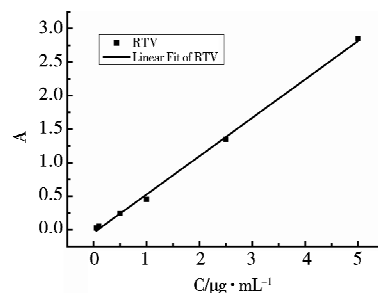


图 5 利托那韦血浆样品标准曲线

剂量在 10 mg/kg 时,血药浓度在  $1 \pm 0.35$  h 达到峰值,达峰浓度  $C_{max}$  约为  $120.30 \pm 9.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,药时曲线下面积  $AUC_{0-\infty}$  及  $AUC_{0-1}$  分别为  $624.30 \pm 39.88$  及  $789.80 \pm 19.73 \text{ h} \cdot (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ ,药物半衰期为  $0.41 \pm 0.14 \text{ h}$ .

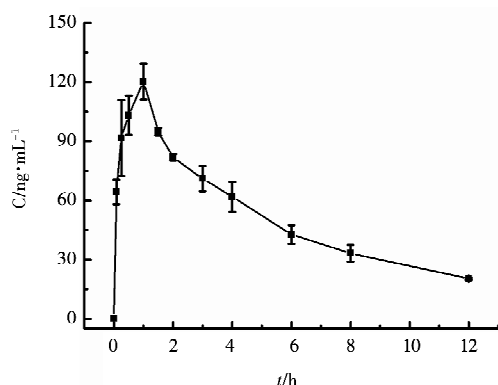


图 6 单剂量灌胃利托那韦混悬液( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )后大鼠体内的药-时曲线( $n=6$ )

表 2 单剂量灌胃利托那韦混悬液( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )后大鼠体内的药动学参数( $n=6$ )

药动学参数	结果
$C_{max}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	$120.30 \pm 9.00$
$T_{max}/\text{h}$	$1.00 \pm 0.35$
Half-life/h	$0.41 \pm 0.14$
$AUC_{(0-t)}/\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$624.30 \pm 39.88$
$AUC_{(0-\infty)}/\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$789.80 \pm 19.73$

## 4 讨论

选择检测波长时,参考文献<sup>[16]</sup>,用紫外可见分光光度计对利托那韦对照品溶液在 190-400 nm 范围进行光谱扫描,发现利托那韦在 254 nm 处有较强吸收峰,与文献报道一致<sup>[17,18]</sup>,故本实验选择 254 nm 为检测波长.

在实验过程中,分别选用乙腈、乙酸乙酯和甲醇沉淀蛋白并萃取药物,结果显示以乙腈沉淀蛋白处理后,血样中内源性物质基本不干扰利托那韦的检测.水与乙腈可以互溶,混溶物氮吹时需要更长的时间,且会引入水溶性杂质.在水中加入过量氯化钠后,饱和氯化钠水溶液就会与乙腈分层,从而达到分离除杂的效果,也减少了氮吹过程的时间成本<sup>[19,20]</sup>.

另外,本实验还考察了乙腈比例(40%、45%、55%和 60%)对利托那韦色谱峰峰形及分离度的影响.结果表明,为达到较好的分离效果,同时考虑到分析时间和流动相成本,需采用 55% 的乙腈比例,在此条件下,内源性物质与利托那韦在色谱图中可完全分开,保留时间 9.2 min 左右,尽可能的缩短了分析时间,节省了流动相成本.

血浆中利托那韦的 HPLC 检测,国内外均已有报道,但其提取方法较为繁琐,多采用固相萃取、内标法或液质联用进行分析.偶见 HPLC 法直接测定<sup>[21-23]</sup>,其主要针对人血浆中利托那韦的含测,定量限较高,并不适于大鼠血浆样品的测定.本文所采用的方法,不仅提取过程简单,其定量限低至  $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,符合大鼠血浆样品含测的要求.

## 5 结论

本研究建立了用反向高效液相色谱测定大鼠血浆中利托那韦的方法,该方法快速、灵敏、准确、可靠,专属性、精密度、回收率及稳定性均符合相应的检测要求.对利托那韦大鼠体内药动学研究的结果表明,本方法能够满足利托那韦大鼠体内药动学参数的监测,为利托那韦制剂血浆药物浓度与药物疗效及毒副作用的相关性研究奠定了方法学基础.

## 参 考 文 献

- [1] Günthard H F, Saag M S, Benson C A, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel[J]. JAMA, 2016, 316(2):191-210.
- [2] Freise K J, Hu B, Salem A H. Impact of ritonavir dose and schedule on CYP3A inhibition and venetoclax clinical pharmacokinetics [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2018, 74(2):1-9.
- [3] Tanaka T, Nakazawa H, Kuriyama N, et al. Farnesyltransferase inhibitors prevent HIV protease inhibitor (lopinavir/ritonavir)-induced lipodystrophy and metabolic syndrome in mice[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2):1314-1320.

- [4] Meynard J L, Moinot L, Landman R, et al. Week 96 efficacy of lopinavir/ritonavir monotherapy in virologically suppressed patients with HIV; a randomized non-inferiority trial (ANRS 140 DREAM)[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(6):1672-1676.
- [5] Gutierrezvalencia A, Trujillorodriguez M, Fernandezmagdaleno T, et al. Darunavir/cobicistat showing similar effectiveness as darunavir/ritonavir monotherapy despite lower trough concentrations[J]. *J Int AIDS Soc*, 2018, 21(2): e25072.
- [6] Imaz A, Niubó J, Amara A, et al. Cerebrospinal fluid drug concentrations and viral suppression in HIV-1-infected patients receiving ritonavir-boosted atazanavir plus lamivudine dual antiretroviral therapy (Spanish HIV/AIDS Research Network, PreEC/RIS 39)[J]. *J Neurovirol*, 2018, 39:1-7.
- [7] Pinto J A, Capparelli E V, Warshaw M, et al. A Phase II/III Trial of Lopinavir/Ritonavir Dosed According to the Who Pediatric Weight Band Dosing Guidelines[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2018, 37:29-35.
- [8] 娄宁. 抗艾滋病药物遭遇专利战[J]. *河南科技*, 2017(16):34-36.
- [9] 慈小燕, 武卫党, 李亚卓, 等. 不同 BCS 分类药物的肠道渗透性研究[J]. *中国新药杂志*, 2018(1): 63-68.
- [10] Cerpnjak K, Zvonar A, Gašperlin M, et al. Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs[J]. *Acta Pharm*, 2013, 63(4):427-445.
- [11] Karakucuk A, Celebi N, Teksin Z S. Preparation of ritonavir nanosuspensions by microfluidization using polymeric stabilizers: I. A Design of Experiment approach[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, 95:111-121.
- [12] Martin P, Giardiello M, McDonald T O, et al. Augmented Inhibition of CYP3A4 in Human Primary Hepatocytes by Ritonavir Solid Drug Nanoparticles[J]. *Mol Pharm*, 2015, 12(10):3556-3568.
- [13] Dhore P W, Dave V S, Saoji S D, et al. Enhancement of the aqueous solubility and permeability of a poorly water soluble drug ritonavir via lyophilized milk-based solid dispersions[J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 22(1):90-102.
- [14] 时美慧, 李俭, 甘慧, 等. 快速测定人血浆中洛匹那韦/利托那韦浓度的 LC-MS/MS 方法建立[J]. *国际药学研究杂志*, 2016, 43(1): 162-166.
- [15] Ariaudo A, Favata F, Nicolò A D, et al. A UHPLC-MS/MS method for the quantification of direct antiviral agents simeprevir, dactatasvir, ledipasvir, sofosbuvir/GS-331007, dasabuvir, ombitasvir and paritaprevir, together with ritonavir, in human plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 125:369-375.
- [16] 蔡畅, 赵燕娜, 刘敏. 不同药载比的紫杉醇白蛋白纳米粒的制备及释药性能研究[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2017, 30(2):50-55.
- [17] Salunke J M, Singh S, Malwad S V, et al. A validated RP HPLC method for simultaneous estimation of lopinavir and ritonavir in combined dosage form[J]. *Der Pharmacia Lettre*, 2017, 3(1):49-51.
- [18] Patil P M. Quality by design (QBD) approach to develop hplc method for ritonavir; application to hydrolytic, thermal, oxidative and photolytic degradation kinetics (Funded Work)[J]. *International Journal of Pharma & Bio Sciences*, 2017, 8(2):258-269.
- [19] 郝春影, 郭一飞, 赵燕娜, 等. 大鼠血浆中甘草次酸的 HPLC 法测定及其药动学[J]. *中国医药工业杂志*, 2014, 45(3):258-260.
- [20] Han M, Yu X, Guo Y, et al. Honokiol nanosuspensions; preparation, increased oral bioavailability and dramatically enhanced biodistribution in the cardio-cerebro-vascular system[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 116(2):114-120.
- [21] 胡玉荣, 刘晓艳, 阿有梅, 等. 反相高效液相色谱法测定利托那韦血浆药物浓度[J]. *药物分析杂志*, 2006(10):1434-1436.
- [22] 乔海灵, 胡玉荣, 柴淑贞, 等. 利托那韦口服液在健康人体的药代动力学和生物等效性[J]. *中国临床药理学杂志*, 2006, 22(5):332-335.
- [23] 寇惠娟, 叶敏, 付强, 等. 高效液相色谱法同时测定人血浆中洛匹那韦和利托那韦浓度[J]. *中国科学:生命科学*, 2012(4):326-332.

## Determination of Ritonavir in Rat Plasma by HPLC and Its Pharmacokinetics

ZHAO Yan-na CAI Chang ZHANG Qin-xiu HAN Jun

(Institute of BioPharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract** Objective A HPLC method was established for the determination of ritonavir in rat plasma and its pharmacokinetics in rats was investigated. Method The protein of plasma samples was removed by acetonitrile. An Agilent Zorbax XDB-C18 column was used with the mobile phase of acetonitrile:0.1% phosphoric acid (55 : 45), the flow rate of 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the column temperature of 35°C at the detection wavelength of 254 nm for the HPLC method. Result The calibration curve was linear in the concentration range of 0.05 - 5 μg · mL<sup>-1</sup>, with the intra- and inter-day RSDs less than 5%, extraction recoveries of 85%-125% and excellent stability. After oral administration of 10 mg · kg<sup>-1</sup> ritonavir suspensions to rats, the main pharmacokinetic parameters were analyzed as follows: C<sub>max</sub> 120.30 ± 9.00 ng · mL<sup>-1</sup>, T<sub>max</sub> 1 ± 0.35 h, T<sub>1/2</sub> 0.41 ± 0.14 h, AUC<sub>0-∞</sub> 624.30 ± 39.88 h · (ng · mL<sup>-1</sup>), AUC<sub>0-t</sub> 789.80 ± 19.73 h · (ng · mL<sup>-1</sup>). Conclusion The method is simple, rapid, economical and reproducible for the determination of ritonavir in rat plasma and is suitable for the pharmacokinetics study in rat.

**Key words** ritonavir; HPLC; rat plasma; pharmacokinetics