

LC-MS/MS 法测定人血浆中布洛芬对映体浓度及其药动学研究

黄 明, 张全英*, 宗顺麟

(苏州大学附属第二医院临床药理实验室, 江苏 苏州 215004)

摘要: 采用 LC-MS/MS 法测定人血浆中 *S*-(+)-布洛芬 (*S*-IBP) 和 *R*-(-)-布洛芬 (*R*-IBP) 的浓度, 并应用于健康受试者体内药物动力学研究。以萘普生为内标, 采用 Daicel 公司 Chiralpak AD-3R (4.6 mm × 150 mm, 3.0 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.01% 甲酸水溶液 (40 : 60), 流速为 750 μL·min⁻¹, 每个样品的分析时间为 23.0 min, 样品经电喷雾离子源负离子化后, 通过三重四极杆串联质谱仪, 在多反应监测模式下测定 *S*-IBP 和 *R*-IBP (*m/z* 205.1→161.0) 和内标萘普生 (*m/z* 229.1→185.0) 的浓度。血浆样品前处理采用甲醇沉淀蛋白。*S*-IBP 和 *R*-IBP 的血浆浓度在 0.05~30.00 μg·mL⁻¹ 内线性良好, 定量下限为 0.05 μg·mL⁻¹。*S*-IBP 批内、批间精密度 (RSD) 均在 2.2%~4.2% 以内, 相对偏差 (RE) 在-12.0%~13.0% 以内。*R*-IBP 批内、批间精密度 (RSD) 均在 2.0%~8.2% 以内, 相对偏差 (RE) 在-11.5%~10.6% 以内。*S*-IBP 和 *R*-IBP 血浆样品室温 (25 °C) 放置 6 h, 反复冻融 (-30 °C) 3 次及冰冻 (-30 °C) 保存 47 天的情况下均稳定。该分析方法简便、特异性高、灵敏度高, 可用于受试者空腹口服布洛芬缓释胶囊 300 mg 后血浆样品中布洛芬对映体 *S*-IBP 和 *R*-IBP 的药动学研究。

关键词: 布洛芬; 手性对映体; 高效液相-串联质谱; 药动学

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 10-1587-05

Determination of ibuprofen enantiomers in human plasma by LC-MS/MS in pharmacokinetics study

HUANG Ming, ZHANG Quan-ying*, ZONG Shun-lin

(Clinical Pharmacology Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China)

Abstract: The study aims to establish an LC-MS/MS method for the determination of *S*-(+)-ibuprofen (*S*-IBP) and *R*-(-)-ibuprofen (*R*-IBP), which may be used subsequently to investigate the pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in healthy Chinese volunteers. Naproxen was used as an internal standard. The separation was achieved on a Chiralpak AD-3R column (4.6 mm × 150 mm, 3.0 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile/0.01% formic acid aqueous solution (40 : 60) at a flow rate of 750 μL·min⁻¹ within 23.0 min. Naproxen and the internal standard were measured by a triple-quadrupole mass spectrometer in negative electron electronic spray ion (ESI) mode using multiple reaction monitoring (MRM). The extracted ions monitored following MRM transitions were *m/z* 205.1→161.0 for ibuprofen enantiomers and *m/z* 229.1→185.0 for the internal standard naproxen. Plasma samples were pretreated through methanol precipitation. The calibration curve of *S*-IBP and *R*-IBP in human plasma was linear over the concentration rang of (0.05–30.00) μg·mL⁻¹. The lower limit of quantitation was 0.05 μg·mL⁻¹. The intra- and inter-run precisions of *S*-IBP at three quality control levels were within 2.2%–4.2%, the relative deviation of the assay was within -12.0%–13.0%. The intra- and inter-run precisions of *R*-IBP at three quality control levels were within 2.0%–8.2%, the relative

deviation of the assay was within -11.5% – 10.6% . The plasma samples were stable at room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 6 h, at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 47 days and during three freeze-thaw cycles. The method was proved to be convenient, accurate and sensitive, and suitable for the pharmacokinetics study of ibuprofen enantiomers in healthy Chinese volunteers after a single oral dose of 300 mg ibuprofen extended-release capsule.

Key words: ibuprofen; chiral enantiomer; LC-MS/MS; pharmacokinetics

布洛芬 (ibuprofen, IBP) 为非甾体抗炎药, 主要通过抑制前列腺素或其他炎症介质合成而发挥抗炎、解热、镇痛作用。目前, 布洛芬主要以消旋体给药, 其左右旋体在体内的药理活性存在显著的差异, 其中右旋布洛芬 (*S*-IBP) 在抑制前列腺素生成上优于左旋布洛芬 (*R*-IBP)。布洛芬以消旋体给药后, 部分左旋布洛芬可通过形成辅酶 A 硫脂单向地转化为右旋布洛芬^[1, 2], 所以有必要研究布洛芬对映体各自的药动学参数。

目前, 国内外血浆中布洛芬对映体浓度的测定方法主要包括 LC-UV 法^[3–6]和 LC-MS/MS^[7–10]。血浆样品前处理方法有: ① 液液萃取法^[3, 4, 7–10]: 样品经提取、吹干、复溶等步骤后测定, 操作繁琐。② 固相萃取法^[5, 9]: SPE 柱成本相对较高。③ 蛋白沉淀法^[6]: 此方法应用犬血浆样品测定。

本研究首次采用甲醇沉淀蛋白前处理方法, 使用液质联用仪测定人血浆中布洛芬对映体浓度, *S*-IBP 和 *R*-IBP 定量下限均为 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 并将此方法应用于布洛芬缓释胶囊中国健康受试者人体药动学研究。

材料与方法

仪器 液质联用仪: API4000 三重串联四极杆质谱仪, AB Sciex 公司; Agilent1200 液相色谱仪, Agilent 公司; 数据处理系统为 Analyst 1.4.2, AB Sciex 公司。分析天平: XS 105DU 型 ($\text{Max}_2=41\text{ g}$, $d_2=0.01\text{ mg}$), Mettler Toledo 公司。

对照品和试剂 *S*-IBP 对照品 (批号 101203-201201, 中国食品药品检定研究院, 含量为 99.9%)。 *R*-IBP 对照品 (批号 1175-070A2, TLC Pharmachem, 含量为 99.6%)。萘普生对照品 (批号 100198-201205, 中国食品药品检定研究院, 含量为 99.6%); 乙腈和甲醇 (HPLC 级, Merck KGaA); 甲酸 (AR 级, 上海凌峰化学试剂有限公司); 水 (灭菌注射用水, 石家庄四药有限公司)。空白血浆来自健康志愿者。

试验药物 布洛芬缓释胶囊 (中美天津史克制药有限公司生产、商品名芬必得[®], 产品批号 13030887, 含量 99.3%, 规格 300 mg/粒)。

色谱条件 色谱柱为 Daicel 公司 Chiralpak AD-3R ($4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $3.0\text{ }\mu\text{m}$), 保护柱为 Chiralpak AD-3R ($4.0\text{ mm}\times 10\text{ mm}$, $3.0\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为乙腈– 0.01% 甲酸水溶液 ($40:60$); 流速 $750\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 分析时间 23.0 min, $0\sim 8.0\text{ min}$ A 通道 (排废), $8.0\sim 23.0\text{ min}$ B 通道 (质谱系统); 进样量 $20\text{ }\mu\text{L}$; 柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 负离子电离模式; 雾化气 50 psi (1 psi $\approx 6.9\text{ kPa}$); 加热辅助气 50 psi, 离子源温度 $550\text{ }^{\circ}\text{C}$; 采用多反应监测 (MRM); *S*-IBP 和 *R*-IBP 监测离子对均为 $m/z\ 205.1\rightarrow 161.0$, 去簇电压 (DP) 为 -60 V , 射入电压 (EP) 为 -10 V , 碰撞能量 (CE) 为 -11 V , 碰撞室的射出电压 (CXP) 为 -6 V ; 内标萘普生监测离子对为 $m/z\ 229.1\rightarrow 185.0$, 去簇电压 (DP) 为 -40 V , 射入电压 (EP) 为 -10 V , 碰撞能量 (CE) 为 -9 V , 碰撞室的射出电压 (CXP) 为 -6 V 。

储备液和工作液配制 *S*-IBP 和 *R*-IBP 标准曲线储备液和工作液: 称量 *S*-IBP 和 *R*-IBP 各 10.00 mg 于 10 mL 量瓶用甲醇定容, 混匀得 $1.000\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ *S*-IBP 和 *R*-IBP 标准曲线储备液, 用甲醇稀释至浓度为 1.000、3.000、10.00、30.00、100.0、300.0 和 600.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准曲线系列工作液。将 $1.000\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ *S*-IBP 和 *R*-IBP 储备液, 用甲醇稀释至浓度为 2.400、48.00 和 480.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控系列工作液。内标萘普生储备液及工作液: 称取萘普生对照品 10.00 mg 于 10 mL 量瓶用甲醇定容, 混匀得 $1.000\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标储备液, 并用甲醇稀释 $5.000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标萘普生工作液。

标准曲线和质控血浆样品制备和处理 取空白血浆 200 μL 置 1.5 mL 离心管中, 加入 *S*-IBP 和 *R*-IBP 标准曲线或质控工作液 10 μL 和内标萘普生工作液 50 μL , 混匀后加入甲醇 600 μL 沉淀血浆蛋白, 涡旋 1 min, 于 $23\ 755\times\text{g}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。离心后取上清液 400 μL 置进样瓶中, 加入水相 400 μL , 涡旋混匀后, 置于自动进样器中进样测定 *S*-IBP 和 *R*-IBP 浓度。

方法学验证

特异性实验 分别取 *S*-IBP 和 *R*-IBP 对照溶液、萘普生对照溶液、空白血浆按“标准曲线和质控血浆

样品制备和处理”项方法处理样品;空白血浆 200 μL 和 *S*-IBP 和 *R*-IBP 对照品溶液 (均 30.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 10 μL 混匀后按“标准曲线和质控血浆样品制备和处理”项方法操作样品;受试者口服布洛芬缓释胶囊 300 mg 后 2.0 h 的血浆按“受试者血浆样品处理”项方法操作样品,进样检测。

标准曲线和定量下限 取空白血浆 200 μL , 分别加入 *S*-IBP 和 *R*-IBP 标准曲线系列工作液 10 μL , 制备血浆中 *S*-IBP 和 *R*-IBP 浓度均为 0.05000、0.1500、0.5000、1.500、5.000、15.00 和 30.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准曲线系列血浆样品,按“标准曲线和质控血浆样品制备和处理”项方法处理,进样检测,以 *S*-IBP 或 *R*-IBP 浓度为横坐标,*S*-IBP 或 *R*-IBP 峰面积与内标萘普生峰面积的比值为纵坐标,权重系数为 $1/C^2$,进行线性回归。

精密度与准确度 取空白血浆 200 μL , 分别加入 *S*-IBP 和 *R*-IBP 质控系列工作液 10 μL (2.400、48.00 和 480.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 制备血浆中 *S*-IBP 和 *R*-IBP 浓度分别均为 0.1200、2.400 和 24.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控系列血浆样品,每个浓度 6 样品,按“标准曲线和质控血浆样品制备和处理”项方法处理,测定 3 批,根据每批随行标准曲线,计算样品的实测浓度,用 Excel 软件中单因素方差分析计算 *S*-IBP 和 *R*-IBP 批间和批内精密度,同时计算相对偏差。

提取回收率 按精密度与准确度实验方法制备含 *S*-IBP 和 *R*-IBP 分别为 0.120 0、2.400 和 24.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆样品,每个浓度 6 个样品,按“标准曲线和质控血浆样品制备和处理”项方法处理,以其进样测定得到的峰面积除以空白血浆经蛋白沉淀后直接加入低、中、高 *S*-IBP 和 *R*-IBP 质控系列工作液及内标萘普生工作液后检测得到的峰面积,计算血浆中 *S*-IBP、*R*-IBP 和内标萘普生的提取回收率。

基质效应 取 6 个不同来源的空白血浆 200 μL 至 1.5 mL 离心管中,分别加入甲醇 600 μL , 涡旋 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (23 755 \times g) 10 min, 取上清液 700 μL 作血浆基质;另取纯化水 200 μL 至 1.5 mL 离心管中,同法处理得到对照基质。分别取对照基质和血浆基质 700 μL , 加入 *S*-IBP 和 *R*-IBP 质控系列工作液 10 μL 和内标萘普生工作液 50 μL 混匀,吸取该溶液 400 μL 至进样瓶中,加入水相 400 μL , 混匀。上述样品每个浓度 6 份并按“色谱条件”和“质谱条件”项检测,获得 *S*-IBP、*R*-IBP 和内标萘普生峰面积,以每一浓度样品两种基质的峰面积比值计算基质效应。

受试者血浆样品处理 取受试者血浆样品 200 μL

置 1.5 mL 离心管中,加入甲醇 10 μL 和内标萘普生工作液 50 μL , 混匀后加入甲醇 600 μL 沉淀血浆蛋白,涡旋 1 min, 于 23 755 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min。离心后取上清液 400 μL 置进样瓶中,加入水相 400 μL , 涡旋混匀后,置于自动进样器中进样测定 *S*-IBP 和 *R*-IBP 浓度。

人体药动力学研究方案 临床试验方案经苏州大学附属第二医院伦理委员会批准。12 名男性健康受试者均签署知情同意书,年龄在 (23 \pm 3) 岁,试验开始两周前至试验期间未服用其他任何药物,体重指数均在 19~24 内,心电图正常,肝、肾功能正常,均符合受试者入选标准。12 名受试者空腹口服布洛芬缓释胶囊 (芬必得[®], 300 mg/粒) 1 粒,250 mL 温开水送服,于服药前和服药后 0.50、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、10、12、15 和 24 h 由肘静脉取血 4 mL。所有血液样品置肝素化采血管中,离心 (2 304 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min), 分离上层血浆,于 -30 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,待测。

结果

1 方法学验证

1.1 特异性 结果显示, *S*-IBP 和 *R*-IBP 的保留时间分别为 16.60 和 15.02 min, 内标萘普生的保留时间为 11.75 min, 内源性物质不干扰 *S*-IBP 和 *R*-IBP 和内标萘普生的测定,见图 1。

1.2 标准曲线和定量下限 *S*-IBP 回归方程为 $f = 0.526 \times C + 0.005 83$ ($r = 0.999 7$)。 *R*-IBP 回归方程为 $f = 0.501 \times C + 0.005 41$ ($r = 0.998 3$)。结果表明, *S*-IBP 和 *R*-IBP 在 0.05~30.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系均较好,定量下限 LLOQ 均为 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3 精密度与准确度 结果显示, *S*-IBP 和 *R*-IBP 低、中、高三浓度质控样品批间和批内 RSD 均小于 15%, RE 均在 $\pm 15\%$ 范围内。

1.4 提取回收率 结果显示,血浆中 *S*-IBP 低、中、高三浓度的提取回收率分别为 96.7% \pm 4.6% ($n=6$)、104.1% \pm 1.9% ($n=6$) 和 103.3% \pm 4.7% ($n=6$); 血浆中 *R*-IBP 低、中、高三浓度的提取回收率分别为 100.3% \pm 4.4% ($n=6$)、97.5% \pm 2.6% ($n=6$) 和 99.7% \pm 2.0% ($n=6$); 内标萘普生的提取回收率为 101.3% \pm 2.8% ($n=18$)。

1.5 基质效应 结果显示,血浆中 *S*-IBP 低、中、高三浓度的基质效应分别为 100.8% \pm 2.2% ($n=6$)、100.6% \pm 1.9% ($n=6$) 和 96.3% \pm 3.5% ($n=6$); 血浆中

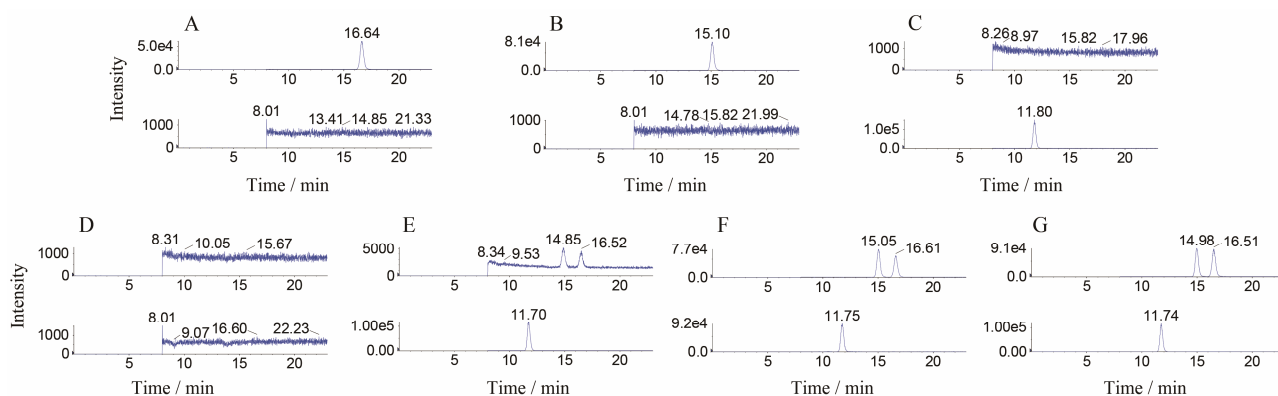


Figure 1 LC-MS/MS Chromatograms of *S*-IBP (*S*(+)-ibuprofen) and *R*-IBP (*R*(-)-ibuprofen). A: Standard solution of *S*-IBP (1.500 µg·mL⁻¹); B: Standard solution of *R*-IBP (1.500 µg·mL⁻¹); C: Standard solution of naproxen (1.250 µg·mL⁻¹); D: Blank plasma; E: Spiked plasma sample obtained by the addition of 10 µL standard solution of *S*-IBP and *R*-IBP (1.000 µg·mL⁻¹) to 200 µL blank plasma; F: Spiked plasma sample obtained by the addition of 10 µL standard solution of *S*-IBP and *R*-IBP (30.00 µg·mL⁻¹) to 200 µL blank plasma; G: Plasma obtained from a volunteer at 2.0 h after orally administration ibuprofen extended-release capsule

S-IBP 低、中、高三个浓度的基质效应分别为 101.5% ± 4.1% (*n* = 6)、97.4% ± 3.6% (*n* = 6) 和 96.7% ± 2.7% (*n* = 6); 内标萘普生的基质效应为 98.4% ± 3.4% (*n* = 18)。

1.6 稳定性 结果显示, *S*-IBP 和 *R*-IBP 血浆样品室温放置 (25 °C) 6 h、-30 °C 冰冻 47 天和反复冻融 3 次情况下均稳定; 待测样品自动进样器放置 (4 °C) 48 h, 血浆蛋白沉淀离心后上清液样品室温放置 (25 °C) 6 h。 *S*-IBP 和 *R*-IBP 储备液在室温放置 24 h 和在冷藏 (2~8 °C) 26 天情况下稳定; 内标萘普生储备液在室温放置 24 h 和在冷藏 (2~8 °C) 26 天情况下稳定。

2 人体药动学应用

12 名受试者空腹口服布洛芬后 *S*-IBP 和 *R*-IBP 的平均血药浓度-时间曲线见图 2, 主要药动学参数见表 1。

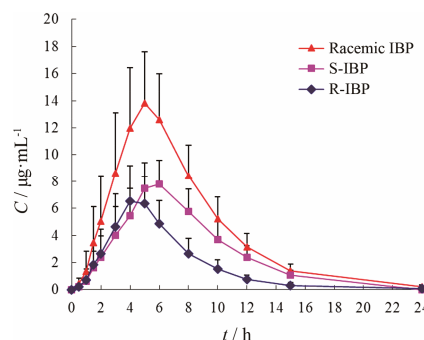


Figure 2 Mean plasma concentration–time curves of ibuprofen enantiomers after a single oral dose of 300 mg ibuprofen extended-release capsule in 12 healthy male volunteers. *n* = 12, $\bar{x} \pm s$

讨论

本研究建立的 LC-MS/MS 测定人血浆中布洛芬对映体浓度, 定量下限为 0.05 µg·mL⁻¹, 低于文献^[3, 5-10]报道, Shi 等^[4]采用液液萃取法, 操作繁琐。本方法可满足布洛芬缓释胶囊的药动学研究大量样品测定。

手性拆分是药物分析的热点, 也是定量测定手性药物的前提。Xiang 等^[3]采用大赛璐多糖衍生物正相手性柱, Chiralcel OJ-H, 流动性为正己烷-异丙醇-三氟醋酸, 不适合 LC-MS/MS。本文采用大赛璐多糖衍生物反相手性柱 Chiralpak AD-3R, 硅胶表面涂敷有直链淀粉-三 (3,5-二甲苯基氨基甲酸酯), 与正相柱 Chiralpak AD-H 比较, 反相柱涂敷的手性聚合物与正相柱相同, 但是所用的硅胶不同。反相柱使用水/

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of ibuprofen (IBP) enantiomers after a single oral dose of 300 mg IBP extended-release capsule. *n* = 12, $\bar{x} \pm s$. NA: Not applicable

Parameter	300 mg			300 mg (Literature ^[3])		
	Racemic IBP	<i>S</i> -IBP	<i>R</i> -IBP	Racemic IBP	<i>S</i> -IBP	<i>R</i> -IBP
AUC _{0-24 h} / µg·h·mL ⁻¹	104.3 ± 21.3	63.60 ± 12.20	40.73 ± 13.05	111.26 ± 13.90	66.39 ± 11.21	44.89 ± 5.85
AUC _{0-∞} / µg·h·mL ⁻¹	105.3 ± 21.2	64.14 ± 12.20	41.04 ± 12.99	NA	NA	NA
C _{max} / µg·mL ⁻¹	14.62 ± 3.49	8.239 ± 1.593	7.042 ± 2.274	13.94 ± 2.23	8.15 ± 1.58	5.98 ± 1.04
t _{max} / h	5.33 ± 1.07	5.67 ± 0.89	4.58 ± 0.67	5.25 ± 1.07	5.25 ± 1.07	4.44 ± 0.32
t _{1/2} / h	2.90 ± 0.86	2.75 ± 0.61	2.78 ± 1.62	3.45 ± 2.11	3.97 ± 2.11	3.34 ± 0.84
CL/F / L·h ⁻¹	2.959 ± 0.607	2.435 ± 0.561	4.015 ± 1.296	3.00 ± 0.42	2.65 ± 0.52	3.72 ± 0.82

有机溶剂流动相, 适合分析水溶性样品 (比如生物活性样品), 可应用于 LC-MS/MS 中。

本研究对色谱和质谱条件进行了优化考察, 初期尝试使用 Daicel 公司官网推荐的色谱条件: 乙腈-pH 2.0 甲酸水溶液 (50/50), 结果显示: *S*-IBP 和 *R*-IBP 仪器响应低, 考虑负离子监测模式下, 流动性 pH 低, 不利于负离子的形成, 故减小甲酸水溶液中甲酸的比例。最终选择乙腈-0.01% 甲酸水溶液 (40 : 60) 为流动相, *S*-IBP 和 *R*-IBP 的响应较高且保留时间适中。

血浆样品沉淀蛋白, 离心后, 取上清液 400 μ L, 并加入水相 400 μ L, 是为了将进样样品中水的比例提高至近似流动相的比例, 防止发生二次化学平衡现象, 改善峰形。

12 例受试者口服布洛芬缓释胶囊 300 mg 后, 血浆中 *S*-IBP 和 *R*-IBP 主要药动力学参数 AUC、 C_{\max} 、 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 和 CL/F 与文献^[3]基本一致。布洛芬消旋体、*S*-IBP 和 *R*-IBP 之间除 AUC、 C_{\max} 和 CL/F 外, 其他主要药动力学参数均无统计学差异。*S*-IBP 的 AUC_{0-24h} 均数是布洛芬消旋体的 61.0%, 是 *R*-IBP 的 156.2%; *S*-IBP 的 C_{\max} 均数是布洛芬消旋体的 56.4%, 是 *R*-IBP 的 C_{\max} 的 117.0%。*R*-IBP 的清除较 *S*-IBP 快。

References

- [1] Bookstaver PB, Miller AD, Rudisill CN, et al. Intravenous ibuprofen: the first injectable product for the treatment of pain and fever [J]. *J Pain Res*, 2010, 25: 67-79.
- [2] Cattaneo D, Clementi E. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen arginine [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2010, 5: 239-245.
- [3] Xiang J, Yu Q, Liang MZ, et al. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in healthy volunteers [J]. *J Sichuan Univ (Med Sci Edi)* (四川大学学报 医学版), 2010, 41: 176-178.
- [4] Shi XB, Shan L, Guo B, et al. Determination of ibuprofen enantiomers in plasma by HPLC-chiral stationary phase [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2013, 30: 316-318.
- [5] Ali I, Hussain I, Saleem K, et al. Chiral enantiomeric resolution of ibuprofen and flurbiprofen in human plasma by SPE-chiral HPLC methods [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2012, 15: 509-514.
- [6] Wang HY, Kong AY, Yang B, et al. Plasma ibuprofen enantiomers and their pharmacokinetics in Beagle dogs determined by HPLC [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2015, 50: 1607-1612.
- [7] Nakov N, Bogdanovska L, Acevska J, et al. High-throughput HPLC-MS/MS method for quantification of ibuprofen enantiomers in human plasma: focus on investigation of metabolite interference [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54: 1820-1826.
- [8] Chen TT, Li Q, Lu JM, et al. Determination of ibuprofen enantiomers in human plasma by HPLC-MS/MS: validation and application in neonates [J]. *Bioanalysis*, 2016, 8: 1237-1250.
- [9] Nakov N, Petkovska R, Ugrinova L, et al. Critical development by design of a rugged HPLC-MS/MS method for direct determination of ibuprofen enantiomers in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 992: 67-75.
- [10] Zhao XH, Xia YY, Huang YR, et al. Validation of a LC-MS/MS method for quantification of ibuprofen enantiomers in Beagle dog plasma [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2015, 31: 570-575.