文章编号:1000-5404(2006)06-0591-03

论著

高效液相色谱法测定人血浆中氨苄西林、丙磺舒的血药浓度的价值

赵映兰,何菊英,刘松青,戴 青 (第三军医大学西南医院药学部,重庆 400038)

提 要:目的 建立测定氨苄西林、丙磺舒血药浓度的高效液相色谱法。**方法** 色谱柱:Symmetry Shield™ RP_{18}柱(5 μm,150 mm×3.9 mm);流动相 氨苄西林:0.068 mol/L 的磷酸二氢钾溶液(pH 3.0)-乙腈(92∶8,V/V),丙磺舒:水-乙腈-1 mol/L 的磷酸二氢钾溶液-1 mol/L 冰醋酸(59.5∶39.8∶0.62∶0.08,V/V,加入 0.15% 的三乙胺调至 pH 2.76)。流速均为 1.4 ml/min;检测波长氨苄西林为 210 nm,丙磺舒为 254 nm。**结果** 氨苄西林的浓度在 1.25~40 μg/ml 范围内线性关系良好(r=0.999 9),丙磺舒的浓度在 0.625~20 μg/ml 范围内线性关系良好(r=0.999 9)。**结论** 本法操作简便,灵敏,快速,重现性好,适用于人体药动学研究。

关键词:氨苄西林;丙磺舒;血药浓度;高效液相色谱法
中图法分类号:R446.11;R969.1;R978.11 **文献标识码**:A

Determination of ampicillin and probenecid concentration in human plasma by high performance liquid chromatography

ZHAO Ying-lan, HE Ju-ying, LIU Song-qing, DAI Qing (Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop a high performance liquid chromatography (HPLC) method to determine the concentration of ampicillin and probenecid in human plasma. Methods A Symmetry ShieldTM RP18 column (5 μm, 150 mm×3.9 mm) was used. The mobile phases were 0.068 mol/L KH_2PO_4 (pH 3.0): acetonitre (92∶8, V/V) for ampicillin, H_2O: acetonitrile: 1 mol/L KH_2PO_4: 1 mol/L acetic acid (59.5∶39.8∶0.62∶0.062, V/V, 0.15% triethylamine added to reach pH 2.76) for probenecid. The detective wavelength were at 254 nm for probenecid and 210 nm for ampicillin. Results The calibration curves obtained were linear in the range of 0.625 – 20 μg/ml (r = 0.999 9) of probenecid and 1.25 – 40 μg/ml of ampicillin. Conclusion This analysis method is simple, sensitive and rapid, suitable for studying pharmacokinetics of ampicillin and probenecid.

Key words: ampicillin; probenecid; blood concentration; high performance liquid chromatography

氨苄西林/丙磺舒胶囊为复方制剂,丙磺舒可抑制氨苄西林自肾小管近端的分泌,从而使氨苄西林血药浓度提高,半衰期延长,加增加氨芳西林的临床疗效。测定氨苄西林血药浓度的方法国内外报道颇多,有紫外分光光度、荧光法[1]、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)等。但测定氨苄西林/丙磺舒复方制剂中氨苄西林及丙磺舒的血药浓度的方法国内尚少见报道。我们参照文献[2],采用 HPLC 法对口服氨苄西林/丙磺舒胶囊后氨苄西林及丙磺舒的血药浓度进行测定,结果表明此法操作简便,灵敏,特异性强,重现性好,可用于药代动力学的研究。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2690 Alliance 液相色谱仪,包括 Waters2487 双波长检测器,Millennium32 数据采集处理系统;高速离心机(美国 Abbott 公司);超纯水器(milli-Q plus, USA, Millipore 公司);微孔滤膜及过滤装置(美国 Millipore);超纯水器(Milli-Q plus, USA, Millipore 公司);微孔滤膜及过滤装置(美国 Millipore);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

试验药品为氨苄西林/丙磺舒胶囊,0.25 g/粒(含氨苄西林 0.194 5 g 和丙磺舒 0.055 5 g),由成都力思特制药有限公司生产,批号 040401;氨苄西林对照品(含量 85.6%)、丙磺舒对照品(含量 99.8%),由长春盖普药业有限公司研制,批号 04030915;磷酸二氢钾(重庆北碚化学试剂厂)、冰醋酸(上海化学试剂有限公司)均为分析纯。

作者简介:赵映兰(1979-),女,四川省巴中市人,硕士研究生,药师,主要从事药物体内代谢方面的研究。电话:(023) 60770339

收稿日期:2005-07-21;修回日期:2005-11-28

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry ShieldTMRP18 色谱柱(5 μm, 150 mm × 3.9 mm)。氨苄西林的测定,流动相:0.068 mol/L 磷酸二氢钾溶液(pH 3.0):乙腈(92∶8,v/V);检测波长:210 nm;流速:1.4 ml/min;丙磺舒测定,流动相:水∶乙腈∶1 mol/L 磷酸二氢钾溶液∶1 mol/L 冰醋酸(59.5∶39.8∶0.62∶0.08,v/V),加入 0.15% 的三乙胺调 pH 2.76;检测波长:254 nm;流速:1.4 ml/min;进样量均为 20 μl,柱温为 30 ℃。

2.2 血浆样品的处理

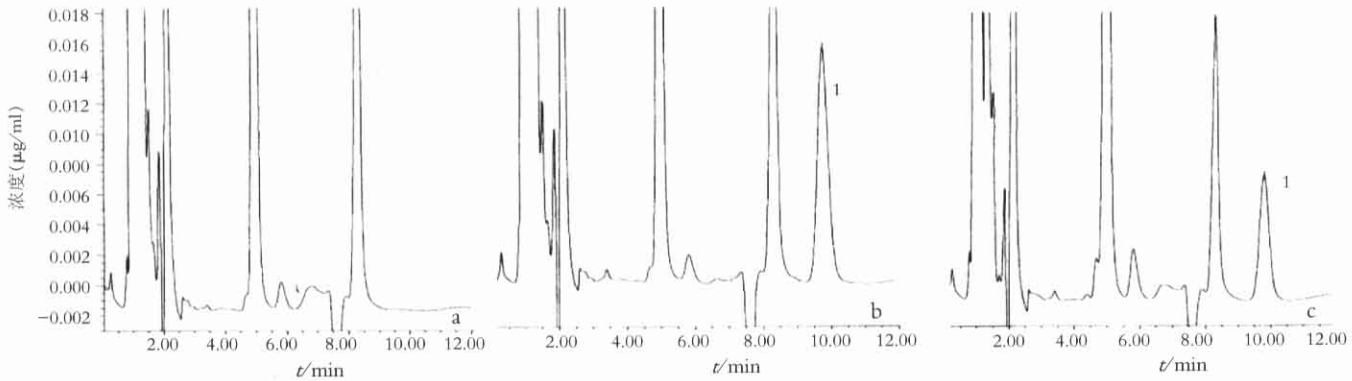
2.2.1 氨苄西林血浆样品处理[3,4] 取待测血浆 0.2 ml,加入乙腈 0.4 ml,游涡振荡 30 s 沉淀蛋白,离心(30 000 r/min, 5 min),将上清液转入另一新 1.5 ml EP 管中,加入 0.8 ml 二氯甲烷,游涡振荡 1 min,离心(13 000 r/min, 5 min),取上清液 20 μl进样测定。

2.2.2 丙磺舒血浆样品处理 取待测血浆 0.4 ml,加入乙腈 0.8 ml,游涡振荡 30 s 沉淀蛋白,离心(13 000 r/min, 5 min),取上清液20 μl进样测定。

2.2.3 色谱行为 在 2.1 色谱条件下,分别进样测定,氨苄西林、丙磺舒在各自色谱条件下分离良好,血中内源性物质不干扰样品测定,结果见图 1、2。

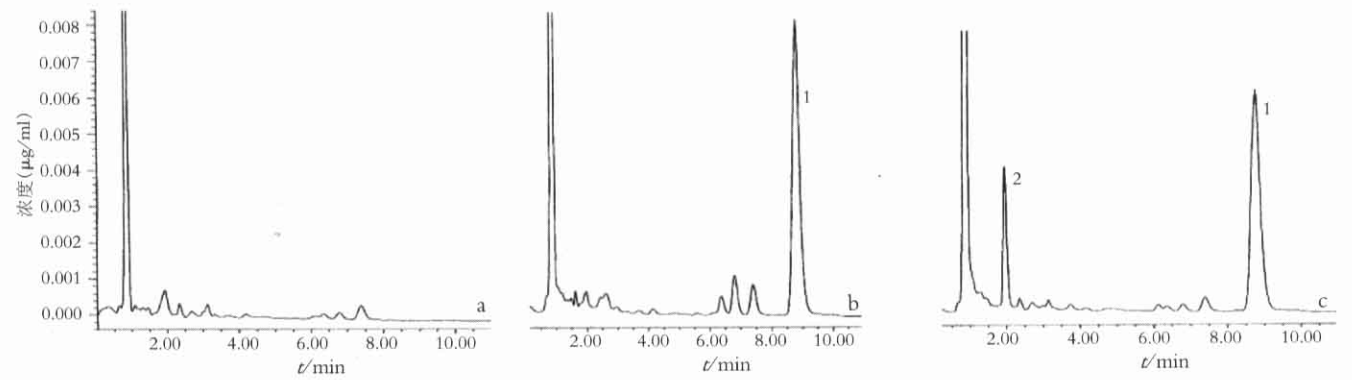
2.3 标准曲线和线性范围

2.3.1 氨苄西林标准曲线和线性范围 取空白血浆加入氨苄西林标准液(1 000 μg/ml)适量,使成为 20 μg/ml,再依次用空白血浆稀释成 10、5、2.5、1.25、0.6、0.3、0.15 μg/ml, 0.075 μg/ml 系列的浓度,按 2.2.1 项下方法处理后进样测定。以氨苄西林的浓度(C)(μg/ml)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,按最小二乘法进行线性回归,回归方程为:$A = 3.58 \times 104C + 8.06 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$),结果表明氨苄西林在 0.075 ~ 20 μg/ml 范围内线性关系良好。



a:空白血浆;b:氨苄西林对照品血浆样品;c:氨苄西林 + 丙磺舒血浆样品;1:氨苄西林

图1 氨苄西林色谱图



a:丙磺舒空白血浆;b:丙磺舒对照品血浆品; c:氨苄西林 + 丙磺舒血浆样品. 1:丙磺舒;2:氨苄西林

图2 丙磺舒色谱图

2.3.2 丙磺舒标准曲线和线性范围 取空白血浆加入丙磺舒标准甲醇液(1 000 μg/ml)适量,使成为 40 μg/ml,再依次用空白血浆稀释成 20、10、5、2.5、1.0、0.5、0.25 μg/ml 系列的浓度,按 2.2.2 方法处理后进样测定。以丙磺舒的浓度(C)(μg/ml)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标。用最小二乘法进行线性回归,回归方程为:$A = 2.52 \times 10^4C - 3.03 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$),结果表明丙磺舒在 0.25 ~ 40 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.4 方法回收率

2.4.1 氨苄西林方法回收率 取空白血浆加入氨苄西林标准液(1 000 μg/ml)适量,使成为高、中、低 3 种不同浓度(10、

2.5、0.3 μg/ml)，按 2.2.1 项下方法处理后进样测定，平均回收率分别为(101.90 ± 0.88)%、(99.44 ± 1.23)%、(104.07 ± 1.04)%。

2.4.2　丙磺舒方法回收率试验　　取空白血浆加入丙磺舒标准甲醇液(1 000 μg/ml)适量，使成分高、中、低 3 种不同浓度(40、5、0.5 μg/ml)，按 2.2.2 项下样品处理方法处理后进样测定，平均回收率分为(100.69 ± 0.18)%、(97.47 ± 0.61)%、(99.88 ± 0.98)%。

2.5　精密度

2.5.1　氨苄西林精密度试验　　取空白血资助加入氨苄西林标准液(1 000 μg/ml)适量，使用为高、中、低 3 种不同浓度(20、2.5、0.3 μg/ml)，按 2.2.1 项下方法处理后进样测定，3 种浓度样品的日内 RSD 分别为 1.0%、0.9%、0.9% (n = 5)，日间分别为 1.4%、4.1%、3.9% (n = 5)。

2.5.2　丙磺舒精密度试验　　取空白血浆加入丙磺舒标准甲醇液(1 000 μg/ml)，适量，使成为高、中、低 3 种不同浓度(40、5、0.5 μg/ml)，按 2.2.2 项下方法处理后进样测定，3 种浓度的日内 RSD 分别为 0.2%、0.2%、0.9% (n = 5)，日间 RSD(5 d)分别为 0.8%、2.9%、4.4% (n = 5)。

2.6　稳定性试验

氨苄西林质控血浆样品反复冻融可稳定 3 d，在 4 ℃冰箱可稳定 1 d，−70 ℃贮存至少稳定 1 个月。丙磺舒血浆样品反复冻融可稳定 7 d，在 4 ℃冰箱可稳定 7 d，−70 ℃贮存至少稳定 2 个月。

3　方法应用

20 例男性健康自愿者，年龄 18 ~ 23 岁，体质量(59.1 ± 4.0) kg，身高(171 ± 3.8) cm，无心、肝、肾、消化道、神经系统、精神异常及代谢异常等病史；体格检查示血压、心率、心电图、呼吸状况、肝、肾功能和血象无异常；试验前 2 周内未用过任何药物；经院伦理委员会批准并经自愿者自愿签署知情同意书。每次受试者按双交叉设计表随机服用试验药氨苄西林/丙磺舒胶囊或对照药(氨苄丙西林对照品、丙磺舒对照品)0.75 g，早晨空腹温水 200 ml 口服，服药后 2 h 方可再饮水，4 h 后进统一标准餐。1 周后交叉服用下一次药物。分别于服药前和服药后 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h取静脉血 3.0 ml，肝素抗凝，分离血浆，−70 ℃冷冻保存至测定。20 例健康受试者的药-时曲线(图 3、4)，该曲线与参考曲线吻合，表明该方法是可行的。

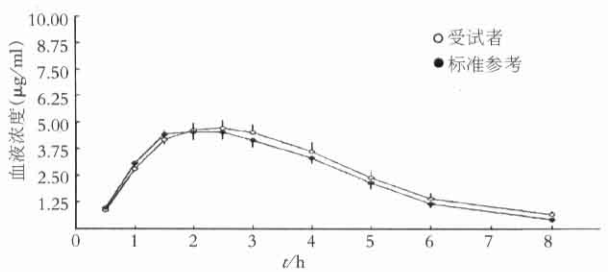


图 3　20 例健康受试者单剂量口服 750 mg 氨苄西林/丙磺舒胶囊后氨苄西林的血药浓度时间曲线

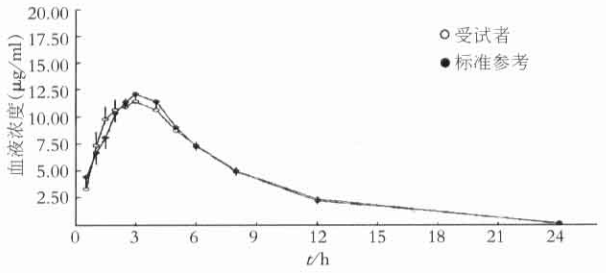


图 4　20 例健康受试者单剂量口服 750 mg 氨苄西林/丙磺舒胶囊后丙磺舒的血药浓度时间曲线

4　讨论

在测定氨苄西林的血药浓度时，比较了不同配比条件下的流动相对测定结果的影响。流动相中乙腈含量对氨苄西林的保留时间有较大影响，随乙腈含量的增大保留时间减少。在试验中，曾使用乙腈含量 5%，6%，8% 的流动相，氨苄西林的保留时间分别为 14、10、8.88 min。可见使用含乙腈量为 8% 的流动相，即能使杂质峰与主峰有良好的分离效果，又可得到满意的保留时间。

pH 值对氨苄西林和丙磺舒的保留时间有较大影响，在测定氨苄西林浓度的试验中曾使用 pH 4.0 的 0.068 mol/L 磷酸二氢钾，结果保留时间为 18 min，而使用 pH 3.0 和 0.068 mol/L 磷酸二氢钾时能得到满意的结果。在测定丙磺舒浓度的试验中曾使用 pH 4.0 的 1 mol/L 磷酸二氢钾，结果 t_R 为 25 min，而且丙磺舒色谱峰扩散、拖尾。将流动相的 pH 调整到 2.76 时，丙磺舒色谱峰变窄，且对称，拖尾现象明显改善，也得到满意的保留时间。

在测定丙磺舒含量的试验中，未在流动相中加入三乙胺时，丙磺舒与内源性物质色谱峰为离不好，峰形差；加入三乙胺后，色谱峰明显得到改善，峰形较好，保留时间合适，得到了满意的效果。

参考文献：

[1] 岳亚平，魏兴美，李　丽. HPLC-荧光检测法测定舒他西林颗粒剂中氨苄西林血药浓度[J]. 中南药学，2004，2(3)：150 − 152.

[2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 二部. 北京：化学工业出版社，2000：338.

[3] 沈建平，丁虹彬，张银娣，等. 国产舒他西林片在健康人体内的药动学及相对生物利用度[J]，中国医院药学杂志，2000，20(9)：515 − 517.

[4] 王　颖，范　青，张　宁，等. 氨苄西林/丙磺舒颗粒剂的人体药动学及相对生物利用度研究[J]. 中国药学杂志，2004，39(4)：286 − 288.

(编辑　王　红)