文章编号:1000-5404(2006)13-1407-02

论著

反相高效液相色谱法测定犬血清中更昔洛韦的浓度

吴 畏[1],何凤慈[2] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所药剂科,重庆 400042,[2]科研部,重庆 400038)

提 要:目的 建立血清中更昔洛韦的高效液相色谱测定方法。**方法** 采用高效液相色谱法,色谱柱:Dikma Diamonsil™ C_{18}色谱柱(5 μm,250×4.6 mm);流动相:0.015 mol/ml 磷酸二氢钾缓冲液(pH: 2.50,含乙腈0.25%);流速:1.75 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃。**结果** 血清样品在0.050 25~100.5 μg/ml范围内线性关系良好;高、中、低3种浓度血清样品的回收率分别为:(105.718±2.488)%、(99.260±1.319)%、(96.565±0.382)%;方法的日内和日间精密度分别小于1.400%、3.800%。**结论** 该方法灵敏度高,专一性强,能够满足药代动力学研究的要求。

关键词:高效液相色谱法;更昔洛韦;血药浓度
中图法分类号:R927.2; R969.1; R978.7 **文献标识码**:A

Determination of Ganciclovir concentration in dog serum by RP-HPLC

WU Wei[1], HE Feng-ci[2] ([1]Department of Pharmacy, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042; [2]Division of Scientific Research Affairs, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a method for determining Ganciclovir concentration in dog serum by RP-HPLC. Methods The serum was determined by high performance liquid chromatography. A C_{18} column (5 μm, 250×4.6 mm) was applied. The mobile phase was 15 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 2.5) containing 0.25% acetonitrile. The flow rate was 1.75 ml/min. The detector set at 254 nm. Column tempetature was 40 ℃. Results The linearity was excellent over the range of 0.050 25 – 100.5 μg/ml; The methodological recovery ranged from 96.565% to 105.718%. The within-day and between-days relative standard deviations (RSD) were less than 1.400% and 3.800% respectively. Conclusion The elaborated method is sensitive, precise and can be used in the pharmacokinetic studies.

Key words: HPLC; Ganciclovir; serum concentration

更昔洛韦(Ganciclovir)具有广谱抗疱疹病毒活性,是治疗巨细胞病毒感染的有效抗病毒药物,尤其是对艾滋病患者巨细胞病毒感染者有强大抗病毒作用[1]。有关更昔洛韦血药浓度测定方法的报道较少,本研究建立RP-HPLC法测定血清中更昔洛韦的高效液相色谱法,方法简便、快速,重现性好,灵敏度高。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ProStar高效液相色谱仪(美国Varian公司);BP110S电子天平(德国Sartorius公司);XW-80型漩涡混合器(上海医科大学仪器厂);CS-15R型低温离心机(美国Beckman公司)。

1.2 试药及试剂

乙腈为色谱纯,水为灭菌注射用水,磷酸二氢钾为分析纯;更昔洛韦标准品(中国药物生物制品检定所,批号:100380-200301)。

作者简介:吴 畏(1975-),女,重庆市人,主管药师,主要从事医院制剂及药品检验方面的研究。电话:(023)68757420

收稿日期:2005-06-13;修回日期:2006-04-05

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma Diamonsil™ C_{18}色谱柱(5 μm,250×4.6 mm);流动相:0.015 mol/ml磷酸二氢钾缓冲液(pH: 2.50,含乙腈0.25%);流速:1.75 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃。色谱过程:进样后,用流动相平等洗脱13 min,然后用80%乙腈冲洗色谱柱8 min,最后用流动相重新平衡5 min。依次进样。

2.2 对照品溶液的制备

取更昔洛韦标准品约0.100 5 g,精密称定,置于100 ml容量瓶中,蒸馏水溶解定容至刻度,摇匀,得1.005 mg/ml的更昔洛韦标准品贮备液,并用蒸馏水稀释成浓度不同的系列标准品溶液,冰箱中放置备用。

2.3 血清样品的处理与测定

精密量取血清0.6 ml,加入20% $HClO_4$ 0.6 ml,漩涡混匀后,冰浴10 min,12 000×g离心5 min,取上清液1 ml,加2 mol/L K_2HPO_4 0.25 ml,再漩涡混匀,冰浴10 min,12 000×g离心5 min,取上清液1 ml,定量进样50 μl,在上述色谱条件下分离测定,记录色谱图及更昔洛韦峰面积A,计算血清中更昔

洛韦的浓度。

2.4 方法可行性考察

在选定的色谱条件下，可测得空白血清、更昔洛韦对照品、更昔洛韦对照品＋空白血清、血清样品色谱图，由色谱图可见，在选定的条件下，血清中内源性物质对更昔洛韦的测定无干扰。

2.5 标准曲线的制备

取空白犬血清0.54 ml，分别精密加入浓度不同的更昔洛韦标准品溶液0.06 ml，使血清中更昔洛韦的浓度分别为0.050 25、0.201、1.005、2.01、5.025、10.05、20.1、50.25、100.5 μg/ml，按血清样品的处理与测定项下方法进行测定，记录色谱图及更昔洛韦峰面积A。以血清中更昔洛韦浓度C为横坐标，峰面积为纵坐标进行直线回归。结果直线回归方程为：A = 310488C − 5811.1，r = 0.999 98。

2.6 系统适应性试验

以更昔洛韦色谱峰计算，保留时间为10.929 min，理论塔板数为6184，对称因子为1.10。

2.7 样品回收率实验

分别于0.54 ml空白血清中加入高、中、低3种不同浓度的更昔洛韦标准品溶液0.06 ml，混匀，得0.201、5.025、50.25 μg/ml 3种浓度的血清样品，按血清样品的处理与测定项下方法进行测定，将更昔洛韦峰面积A代入标准曲线方程计算出血清中更昔洛韦浓度，以测得值与加入值之比计算回收率。高、中、低3种浓度血清样品的回收率分别为：(105.718 ± 2.488)%、(99.260 ± 1.319)%、(96.565 ± 0.382)%。

2.8 沉淀方法回收率

分别取浓度为0.201、5.025、50.25 μg/ml的更昔洛韦标准品溶液0.60 ml，不加血清，按2.7的处理与测定项下方法进行测定，将更昔洛韦峰面积A代入标准曲线方程计算出更昔洛韦浓度，2.7测定浓度与该测定浓度之比即为沉淀方法回收率。高、中、低3种浓度样品沉淀蛋白的方法回收率分别为：(97.446 ± 0.661)%、(95.300 ± 1.327)%、(92.993 ± 0.669)%。结果表明，用该方法沉淀蛋白，血清中更昔洛韦浓度越高，损失越多，但方法回收率均>90%，总体上损失较小，该方法的准确性较高。

2.9 精密度实验

以回收率实验的3种浓度的更昔洛韦血清样品进行精密度实验，结果见表1。由表1可见，方法的日内精密度小于1.400%，日间精密度小于3.800%，均能满足生物样品测定的要求。

表1 精密度实验结果

配制浓度(μg/ml)	日内精密度		日间精密度	
	测得浓度(μg/ml)	RSD(%)	测得浓度(μg/ml)	RSD(%)
0.201	0.221 ± 0.003	1.357	0.224 ± 0.008	3.571
5.025	5.088 ± 0.037	0.727	5.086 ± 0.043	0.845
50.25	50.692 ± 0.199	0.392	50.749 ± 0.294	0.579

2.10 血清样品稳定性考察

取已知浓度的更昔洛韦血清样品，分别置室温、冰融、冰冻条件下放置不同时间后，按血清样品的处理与测定方法项操作，记录色谱峰面积A，计算血清样品中更昔洛韦的浓度，结果表明，含药血清在冰冻条件(−24 ℃)下至少可以稳定17 d，在冰融条件(−4 ℃)及室温条件(约10 ℃)下均至少可以稳定8 h。

3 讨论

本实验在血样处理时曾试验加一倍量甲醇[2]，以及加半倍量的500 g/L硫酸锌溶液和半倍量的甲醇[3]，结果除蛋白作用均不理想。本实验的样品处理采用等体积20%高氯酸沉淀蛋白，冰浴后离心，取上清液加2 mol/L K_2HPO_4中和过量的高氯酸，生成高氯酸盐沉淀，冰浴后离心，上清液澄清透明，而且杂质峰少，色谱分离效果好。

本实验在考察流动相时先只选用了一种流动相，即：0.015 mol/ml磷酸二氢钾缓冲液(pH：2.50，含乙腈0.25%)，但该缓冲液极性太强，血清样品中未完全除尽的杂质不易被洗脱，杂质的保留时间太长且不固定，因此，虽然刚开始进样时，样品峰与部分杂质峰分离较好，但连续进样数个样品后，柱压急剧升高，柱效降低，且血清杂质峰明显干扰样品峰的测定，即使反复调整样品的测定时间(20 ~ 30 min)，两者也不能完全分离。经过一系列实验结果显示，采用两种流动相[4]，即实验开始前先用流动相A(0.015 mol/ml磷酸二氢钾缓冲液，pH：2.50，含乙腈0.25%)冲洗、平衡整个系统，进样后，用流动相A平等洗脱13 min，此时更昔洛韦的样品峰刚好完全出峰(更昔洛韦的保留时间为10.929 min)，然后立即切换为流动相B(80%乙腈)冲洗色谱柱8 min，将系统中的血清杂质清洗完全，最后用流动相A重新平衡系统5 min。即可依次连续进样，从而可避免杂质峰对样品峰的干扰。实验结果显示，用上述方法进行测定，虽然每个样品的测定共需26 min，但整个色谱系统非常稳定，柱效较高，尤其是大量生物样本连续进样时(n > 100)，仍能保持较高的灵敏度和较好的重现性。

参考文献：

[1] 李春元，陈本川. 更昔洛韦的临床应用进展[J]. 国外医药－合成药、生化药、制剂分册，1998，19(3)：172－175.

[2] 熊增慧，吴海燕，黄砚青，等. 更昔洛韦在家兔体内药动学研究[J]. 中国药学杂志，1996，31(12)：739－742.

[3] 王茂义，黄 猛，闫正华，等. RP-HPLC法测定更昔洛韦血清浓度[J]. 西安医科大学学报，1999，20(4)：571－572.

[4] PAGE T，SHERWOOD C，CONNOR J D，*et al*. Simple reversed-phase high-performance liquid chromatography quantitation of ganciclovir in human serum and urine[J]. J Chromatogr B Biomed Appl，1996，675(2)：342－346.

(编辑 薛国文)