

高效液相色谱法测定人血浆中两性霉素 B 浓度

邓斌,任斌,黎曙霞,陈孝,黄碧莹(中山大学附属第一医院药学部,广州 510080)

摘要:目的 测定人血浆中两性霉素 B 浓度。方法 色谱柱为 Supelcosil LC-18-DB(4.5 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 0.025 mol/L 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na)-乙腈(50:50), 柱温:25℃, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 405 nm。结果 人血浆中两性霉素 B 浓度在 0.05 ~ 4.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 回归方程为: $C = 5.04 \times 10^{-6} A + 0.07$ ($r = 0.9994$)。高、中、低 3 个浓度平均回收率为 (98.4 ± 6.9)%; 日内 RSD ≤ 3.5%, 日间 RSD ≤ 7.6%。结论 本法灵敏、快速、重现性好, 分析时间短, 可用于临床药代动力学研究及血药浓度监测。

关键词:两性霉素 B; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.01; R969.11

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2003)06-0481-02

Determination of amphotericin B in human plasma by HPLC

DENG Bin, REN Bin, LI Shu-xia, CHEN Xiao, HUANG Bi-ying (Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhongshan University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine amphotericin B concentration in human plasma. **METHOD** The determination was performed by HPLC with the Supelcosil LC-18-DB column(4.5 mm × 250 mm, 5 μm) under 25 °C, the mobile phase was 0.025 mol/L EDTA-Na₂:acetonitrile(50:50), the UV detector was set at 405 nm. **RESULTS** Over the concentration range of 0.05 ~ 4.0 μg/mL, the linear regression equation was $C = 5.04 \times 10^{-6} A + 0.07$ ($r = 0.9994$). The average recovery of amphotericin B was (98.4 ± 6.9)%. The intra and inter-day RSD were less than 3.5%, 7.6%, respectively. **CONCLUSION** The method is accurate and can be used for studying the pharmacokinetics of amphotericin B and therapeutic drug monitoring.

KEY WORDS: amphotericin B; blood drug concentration; HPLC

两性霉素 B (AmB) 是由链霉菌 *Streptomyces nodosus* 的培养液中提炼制得的多烯类抗真菌抗生素, 是现今治疗深部真菌病的首选药物。但其毒性较大^[1], 为减少其对肝、肾等的毒性, 应当监测血浆中 AmB 的浓度, 以便调整其用量。本实验建立了一种快速、准确的高效液相色谱法, 可用于两性

霉素 B 的血药浓度监测。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (600 型低压梯度泵, 717 型自动进样器, 486 型紫外检测器, Millennium³² 色谱工作站); XW-

80A旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);高速离心机(美国雅培公司 TDx 仪附件)。

两性霉素 B 标准品(美国 Sigma 公司,含量 80%);乙腈为色谱纯;EDTA-2Na 为分析纯。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱:Supelcosil LC-18-DB(4.5 mm × 250 mm, 5 μm);柱温:25 °C;流动相:0.025 mol/L EDTA-2Na:乙腈(50:50);流速:1.0 mL/min;紫外检测波长为 405 nm。在此条件下,两性霉素 B 峰型良好,其保留时间为 5.7 min。色谱图见图 1。

2.2 标准溶液的制备

精密称取 AmB 标准品 12.5 mg, 加少量二甲亚砜(DMSO)溶解,用 DMSO:甲醇溶液(1:1)配制成含 AmB 1 mg/mL 的储备液,再用甲醇:乙腈(1:3)稀释成 0.025, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 μg/mL 的系列标准溶液。

2.3 标准曲线制作

取各浓度的标准溶液 0.8 mL, 加入 0.4 mL 空白血浆旋涡混匀 2 min, AmB 血药浓度分别相当于 0.05, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 μg/mL, 10 800 r/min 离心 15 min, 取上清液 100 μL 进样, 以浓度(C)为纵坐标, AmB 的峰面积 A 为横坐标制作标准曲线。血浆中 AmB 浓度在 0.05 ~ 4.0 μg/mL 范围内 A 与 C 呈良好的线性关系, 回归方程为: $C = 5.04 \times 10^{-6} A + 0.07$ ($r = 0.9994$)。取信噪比(S/N) ≥ 3, 本方法的最低检测血药浓度为 0.025 μg/mL。

2.4 精密度与回收率

按照标准曲线制作方法, 分别于 0.4 mL 空白血浆中加入低、中、高 3 种浓度的 AmB 标准溶液 0.8 mL, 混匀, 使血药浓度分别为 0.0625, 0.5, 2.0 μg/mL, 按血浆样品的处理与测定方法操作, 以 1 d 内测得的 AmB 浓度计算日内精密度, 以 1 周内 5 次测定的 AmB 浓度计算日间精密度, 3 种浓度的日内 RSD ≤ 3.5%, 日间 RSD ≤ 7.6%。结果见表 1。

表 1 回收率及精密度(n=5)

加入量 (μg·mL ⁻¹)	实测值 (μg·mL ⁻¹)	回收率 (%)	日内 RSD (%)	日间 RSD (%)
0.0625	0.06 ± 0.01	91.3 ± 3.6	3.5	7.6
0.5	0.51 ± 0.01	101.9 ± 1.8	1.2	3.2
2.0	2.04 ± 0.02	102.0 ± 0.9	1.0	2.3

3 讨论

3.1 AmB 储备液和标准溶液应贮存在 -15 °C 以下, 严格避光。仅采取冷藏保存措施, 则 AmB 在一个月后峰面积降低达 50% 以上。

3.2 有文献报道^[3]在血浆与蛋白沉淀剂旋涡混匀后于暗处放置 5 min, 血浆蛋白可沉淀得更完全。本实验做了两组对照试验, 一组放置 5 min, 一组按原法操作, 结果表明两组结果峰型、峰面积接近, 故省去这一步。本法血浆蛋白沉淀步骤简单, 样品处理及色谱分离时间短, 回收率高, 精密度好, 可用于 AmB 血药浓度的快速测定。

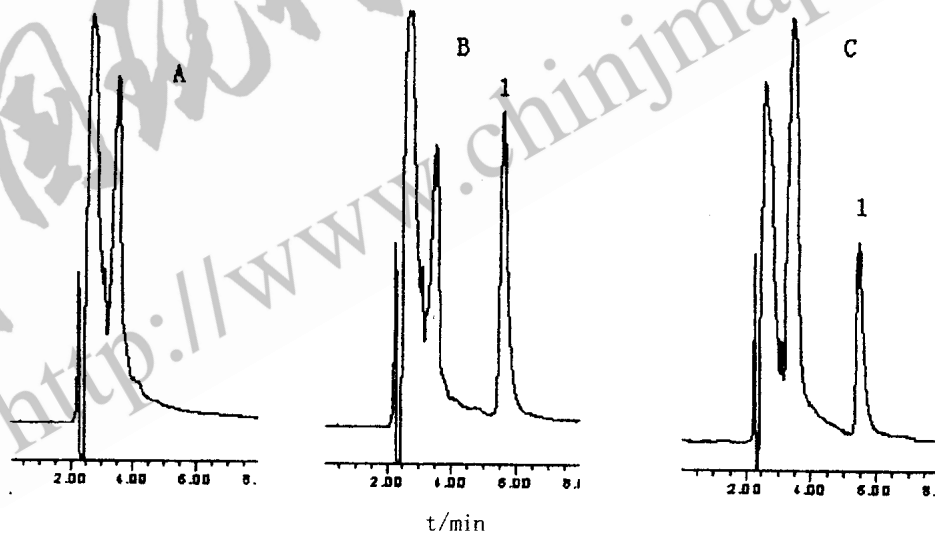


图 1 AmB 的 HPLC 色谱图

Fig 1 The HPLC chromatograms of AmB in human plasma.

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + AmB; C. 血浆样品; 1. AmB

A. blank plasma; B. blank plasma + AmB; C. plasma sample; 1. AmB

参考文献

- [1] 江明性. 药理学[M]. 第三版. 北京:人民卫生出版社, 1995: 347.
- [2] 赵荣生, 严宝霞. 高效液相色谱法测定两性霉素 B 在家兔体内的血药浓度及药动学[J], 中国医院药学杂志, 2001, 21(2): 69.

- [3] 刘松青, 马文秀, 董慧等. 高效液相色谱法测定生物样品中两性霉素 B[J], 中国医院药学杂志 1996, 16(9): 389.

收稿日期: 2002-05-31