

HPLC测定人血浆中阿莫西林含量

叶淑华¹, 赵菲² (1. 浙江省杭州市拱墅区人民医院, 杭州 310011; 2. 杭州市药品检验所, 杭州 310014)

摘要:目的 建立 HPLC测定人血浆中阿莫西林含量的方法。方法 血浆经 6%三氯乙酸沉淀蛋白后进行 HPLC分析, 色谱柱为 Dikma Diamonsil™ C₁₈, 5 μm, 150 mm × 4.6 mm, 流动相为 0.01 mol·L⁻¹的 KH₂PO₄-甲醇(84:16), NaOH调 pH = 6.90, 柱温为 30℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 紫外检测波长为 228 nm。结果 血浆内源性物质对样品测定没有干扰。阿莫西林在血浆中的线性范围为 0.50 ~ 40 μg·mL⁻¹, 血浆中回收率 >85%。阿莫西林的日内、日间 RSD <10%。结论 该方法简便、灵敏、准确, 可用于人血浆中阿莫西林含量的测定以及临床药学研究。

关键词:阿莫西林; 高效液相色谱法; 血药浓度

中图分类号: R917.101; R978.11 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)03-0239-02

Determination of Amoxicillin in Human Plasma by HPLC

YE Shu-hua¹, ZHAO Fei² (1. The People's Hospital of Gongshu District in Hangzhou of Zhejiang Province, Hangzhou 310011, China; 2. Hangzhou Institute for Drug Control, Zhejiang Province, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for the determination of amoxicillin in human plasma. **METHODS** Plasma samples were prepared by protein precipitation with 6% trichloroacetic acid. The analytes were separated on a Dikma Diamonsil™ C₁₈, 5 μm, 150 mm × 4.6 mm ID, the mobile phase consisted of 0.01 mol·L⁻¹ phosphate buffer (pH = 6.90)-methanol (84:16) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ at 30℃ and the detection wavelength was 228 nm. **RESULTS** The calibration curve of amoxicillin in human plasma was linear in the range of 0.50 ~ 40 μg·mL⁻¹ with no interference of endogenous substances in plasma. Intra- and inter-assay coefficients did not exceed 10%. **CONCLUSION** The method established in the paper can be used to determine the concentration of amoxicillin in human plasma. The method can also be applied to the clinical pharmaceutical research *in vivo*.

KEY WORDS: Amoxicillin; HPLC; concentration in plasma

阿莫西林(amoxicillin, Am)为β内酰胺类抗生素,对革兰阳性菌和阴性菌都有高效杀菌作用,对大多数病人耐受性良好。近年来,阿莫西林制剂中含量测定的方法较为常见^[1],但血浆样品中阿莫西林含量测定的方法则少有报道。本实验建立了一种精确、简便、快速的HPLC法,测定血浆中阿莫西林的含量,为阿莫西林药动学研究提供有益的参考。

1 仪器、药品和试剂

LC-10AT VP(SHIMADZU), SPD-10A VP(SHIMADZU UV-Vis DETECTOR), Anastar色谱工作站(天津奥特赛思仪器有限公司), H-1旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂), TGL-16G高速离心机(上海医用分析仪器厂)。阿莫西林标准品(中国药品生物制品检定所,批号:130409-200208,含量86.2%);空白血浆(健康受试者);三氯乙酸,优级纯(南京化学试剂厂);甲醇,色谱纯(德国,Merck);其余试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Dikma Diamonsil™ C₁₈, 5 μm, 150 mm × 4.6 mm, 流动相为 0.01 mol·L⁻¹的 KH₂PO₄-甲醇(84:16),

NaOH调 pH = 6.90, 柱温为 30℃, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 紫外检测波长为 228 nm。

2.2 血浆样品处理与测定

精密量取含药血浆 0.5 mL置 2 mL塑料离心管中,加入 0.5 mL 6%三氯乙酸液,混旋提取 1 min, 15 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液 20 μL进样,记录色谱图,外标法计算血浆中阿莫西林的含量。

2.3 标准贮备液配制

精密称取相当于阿莫西林约 50 mg,用 0.01 mol·L⁻¹的 KH₂PO₄溶液(称取磷酸二氢钾 1.36 g,加水溶解至 1 000 mL,用 1.0 mol·L⁻¹ NaOH调 pH = 6.5)溶解,并定容至 50 mL,阿莫西林的含量为 1.000 mg·mL⁻¹,分装于 1 mL塑料离心管中并保存于 -20℃,每次测定时解冻并稀释之所需浓度的工作液。

3 实验结果

3.1 专属性

按选“2.1”的色谱条件,测得的空白血浆、空白血浆加阿莫西林对照品溶液的色谱图。由图可见,血浆中杂质不影响

阿莫西林的分离测定,内源性物质峰与样品峰分离良好。

3.2 最低检测限

对照品血浆按“2.2”项下处理后进样 20 μ L,得阿莫西林最低检测限为 0.50 μ g \cdot mL⁻¹。

3.3 标准曲线

精密量取阿莫西林对照品贮备液适量,用 0.01 mol \cdot L⁻¹的 KH₂PO₄溶液稀释成系列浓度的对照品工作液,各取 20 μ L加入 0.5 mL空白血浆中,得到浓度为 40, 20, 15, 10, 5, 1, 0.50 μ g \cdot mL⁻¹的含药血浆。按“2.2”项下方法操作,以阿莫西林峰面积(A)作为纵坐标,血浆中阿莫西林浓度(C)为横坐标,进行线性回归。用最小二乘法计算得到的标准曲线方程为: $A = 10.212C - 321.226$, $r = 0.9999$ 。结果表明,血浆中阿莫西林浓度在 0.50 ~ 40 μ g \cdot mL⁻¹内,浓度(C)与峰面积(A)比有良好的线性关系。

3.4 方法回收率

表 2 空白血浆中阿莫西林日内、日间的方法回收率 ($n = 5$)

Tab 2 Precision of amoxicillin in human blank plasma ($n = 5$)

浓度 / μ g \cdot mL ⁻¹	日内测得值 / μ g \cdot mL ⁻¹						RSD / %	浓度 / μ g \cdot mL ⁻¹	日间测得值 / μ g \cdot mL ⁻¹						RSD / %
0.5	0.51	0.49	0.51	0.47	0.52	3.80	0.5	0.51	0.53	0.45	0.47	0.51	6.87		
10.0	10.16	10.06	10.33	9.89	10.26	1.73	10.0	10.16	9.38	10.27	9.83	10.33	3.94		
30.0	28.97	30.75	30.23	29.06	30.27	2.66	30.0	28.97	29.35	31.07	30.32	30.79	3.02		

3.6 提取回收率

测定 30, 10, 0.50 μ g \cdot mL⁻¹质控血浆各 5 份,按“2.2”项下方法操作,其峰面积与未经提取的相同量对照品(流动相液)的峰面积比较。30, 10, 0.50 μ g \cdot mL⁻¹的 3 种质控血浆的提取回收率 ($n = 5$)分别为 (89.2 \pm 2.4)%, (87.6 \pm 4.6)% 和 (80.2 \pm 3.1)%, RSD 分别为 5.85%, 5.61%, 6.56%。

3.7 稳定性试验

3.7.1 样品室温下放置稳定性试验 配制含阿莫西林对照品的血浆 5 mL,在放置 0, 2, 4, 6, 8 h 后,按“2.2”项下方法操作,测定浓度,结果表明含阿莫西林对照品的血浆在室温下放置 8 h 内稳定, RSD = 2.73%。

3.7.2 样品冷冻稳定性试验 配制含阿莫西林对照品的血浆 5 份,冷冻储存,分别于 0, 1, 2, 5, 10 d,按“2.2”项下方法操作,测定浓度,结果表明含阿莫西林对照品的血浆冷冻放置 10 d 内稳定, RSD = 4.2%。

4 讨论

4.1 由于阿莫西林有两性化合物的性质,与生物样品中的极性物质性质相近,因此生物样品的预处理与色谱分离十分困难。Krauwinkel W J^[3]等用固相萃取法,但操作繁琐。潘家祜等^[2]曾用 70%高氯酸直接沉淀蛋白处理,方法简便,原理是利用一定浓度的酸破坏阿莫西林中的内酰胺环,生成中间

0.5 mL空白血浆中分别加入 20 μ L不同浓度的对照品工作液,得到浓度为 30, 10, 0.50 μ g \cdot mL⁻¹的含药血浆,按“2.2”项下方法操作,测定回收率。结果见表 1。

表 1 空白血浆中阿莫西林的方法回收率 ($n = 5$)

Tab 1 Recovery of amoxicillin in human blank plasma ($n = 5$)

已知浓度 / μ g \cdot mL ⁻¹	测得浓度 / μ g \cdot mL ⁻¹						方法回收率 / %
0.5	0.51	0.49	0.51	0.47	0.52	100.14 \pm 3.80	
10.0	10.16	10.06	10.33	9.89	10.26	101.40 \pm 1.75	
30.0	28.97	30.75	30.23	29.06	30.27	99.52 \pm 2.64	

3.5 精密度

分别于 0.5 mL空白血浆中加入 20 μ L不同浓度的对照品工作液得到浓度为 30, 10, 0.50 μ g \cdot mL⁻¹的含药血浆,“2.2”项下方法操作,测定日内(1 d内测定 5 次)与日间精密度(测定 5 d,每天 1 次)结果见表 2。

产物青霉素酸,通过测定青霉素酸确定阿莫西林的含量。但由于样品中有高浓度的高氯酸,使得进样液的 pH = 0,若以这样的酸度进样,不仅影响柱效,还会损坏柱子。因此经过实验进行适当的调整,采用 6%的 TAC 沉淀蛋白的方法,色谱分析快速简便。

4.2 青霉素类抗生素在水溶液中不稳定,尤其是羟苄青霉素的钠盐,在水溶液中,特别是在 pH 偏碱或偏酸的情况下极易降解,而在弱酸 (pH = 6.0 ~ 7.0) 情况下却较为稳定,因而标准贮备液用 pH = 6.5 磷酸盐缓冲液溶解。

REFERENCES

- [1] LI W. Concentration determination of amoxicillin granules by HPLC[J]. Anhui Med Pharm (安徽医药), 2002, 6 (1): 60-61.
- [2] PAN J G, ZHANG H W, DAI X H, et al. Relative bioavailability of amoxicillin tablet in human[J]. Chin J Clin Pharm (中国临床药理学杂志), 1999, 8 (4): 224-226.
- [3] KRAUWINKEL W J, VOKERS-KAMERMANS N J, VAN Z J. Determination of amoxicillin in human plasma by high-performance liquid chromatography and solid phase extraction [J]. J Chromatogr, 1993, 617 (2): 334-338.

收稿日期: 2007-05-23