

nm 为检测波长。

本实验曾分别使用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸及三氯甲烷对上样血清进行洗涤, 均能排除血清中杂质的干扰, 但三氯甲烷毒性较大, 且甲疏咪唑属于酸性物质, 因此, 本实验最后确定使用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸为萃取洗涤液。

本实验使用固相萃取小柱, 根据甲疏咪唑易溶于甲醇的性质, 以具有挥发性的甲醇作为提取溶剂, 提取液于 70°C 水浴氮气流吹干, 可以富集样品中微量的甲疏咪唑, 使检测结果准确、可靠。

笔者经摸索试验发现, 在提取过程中小柱干涸, 不影响药物的回收率; 在试验中小柱经活化后重复使用 3 次, 测定结果的重现性相当好, 可节约试验的成本。

曾有文献报道^[3] Graves 患者口服甲疏咪唑后血浆药物浓度可达 $26.77 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。本实验所检测到的 6 例患者服药后 3 h 的甲疏咪唑平均血药浓度为 $(1.28 \pm 0.82) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与国内其他报道^[1] 相近。因此, 本实验所拟定的标准曲线范围能满足临床用药监测的需要。

参考文献:

- [1] 嵇扬, 李国秀, 祝汇江, 等. 应用高效液相色谱法分析血清中甲疏咪唑的浓度[J]. 药物分析杂志, 1990, 10(1): 48.
- [2] 赵维娟, 杨永革, 张梅, 等. 甲疏咪唑乳膏透皮吸收的体内药动学[J]. 中国医院药学杂志, 1999, 19(12): 714.
- [3] 孙怀玉, 朱晨, 崔小平. HPLC 法比较不同给药方式对 Grave 病的疗效[J]. 山东医科大学学报, 2000, 38(2): 218.
- [4] Tatsuhara T, Tabuchi F, Unate M, et al. Determination of thianrazole in serum by high performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. J Chromatogr, 1985, 339: 149.
- [5] 石志红, 何建涛. 中药活性成分分析中的现代样品预处理技术[J]. 大学化学, 2004, 19(6): 22.
- [6] 中国药典. 二部[S]. 2005: 129.

[收稿日期] 2006-09-16

高效液相色谱法测定盐酸曲马多的血药浓度

张冕, 王锦军 (荆楚理工学院药学院, 湖北 荆门 448000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定人血浆中盐酸曲马多浓度的方法。方法: 采用 ZORBA×SB C₁₈ 色谱柱, 流动相为磷酸盐缓冲液($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 3.7)-乙腈(81:19), 检测波长 217 nm。血样处理采用冷冻的二次液-液萃取法。结果: 血浆中盐酸曲马多的最低检测浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 $15 \sim 800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 线性方程为 $Y = 0.0036X - 0.0174$, $r = 0.9992$ ($n = 5$)。结论: 该方法结果准确, 灵敏度高, 重现性好, 可用于临床血药浓度的监测。

[关键词] 盐酸曲马多; 高效液相色谱法; 血药浓度; 紫外检测
[中图分类号] R969.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2007)11-1629-02

盐酸曲马多(tramadol hydrochloride, TMD) 是非麻醉性中枢镇痛药, 通过激动阿片受体和抑制单胺类神经递质的再摄取产生镇痛作用。临床现已广泛用于术后以及其它各种

原因引起的急、慢性中重度疼痛的治疗^[1,2]。TMD 临床上亦用于小儿手术及术后疼痛的治疗, 其给药剂量低于成人剂量。该品常见的不良反应有眩晕、恶心、思睡等, 剂量过大可抑制呼吸, 亦有成瘾的报道^[3], 因此有必要建立能快速测定 TMD 血药浓度的方法。由于 TMD 的紫外吸收较弱, 国内外关于其血药浓度的测定多采用气相色谱、HPLC-荧光法测定, HPLC-UV 法常用于测定高浓度 TMD 或其尿中代谢物^[4,6]。本实验建立了以非那西丁为内标, 测定血浆中低浓度 TMD 的高效液相色谱分析法, 该方法灵敏度高、分离效果好、重现性好, 适合 TMD 体内药物浓度的分析。

1 材料

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); WH-1 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂); YXJ 1 型台式离心机(深圳天南海北实业有限公司); Milli-Q 纯水制备仪(美国 Millipore 公司); 盐酸曲马多对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 20040814, 含量 99.99%); 非那西丁对照品(湖北省药品检验所, 批号 20050709, 含量 99.98%); 甲醇、乙腈为色谱纯; 其他试剂为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: ZORBA×SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 3.7)-乙腈(81:19); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: 50 μL ; 紫外检测波长: 217 nm; 灵敏度: 0.01 AUFS。

2.2 标准液及内标液的配制 精密称取盐酸曲马多标准品 10 mg 于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 使成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸曲马多标准储备液。另精密称取非那西丁标准品 1.0 mg 于 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 使成质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的非那西丁标准储备液作内标液, 冷藏备用。

2.3 血样处理方法 取受试者血浆 2 mL 置于 10 mL 具塞离心管中, 加入内标液 15 μL 和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 0.2 mL, 旋涡混合 2 min 后加入无水乙醚 3 mL, 旋涡混合 5 min, 离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 10 min 使之分层, 置 20°C 冰箱冷冻 2 h; 将上层有机相转移至另一离心管中, 精密加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸 0.2 mL 反提, 旋涡混合 5 min, 离心($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 5 min 后, 取下层水相 50 μL 进样分析^[4,5]。记录色谱图及峰高, 色谱图见图 1。在上述色谱条件下, TMD、内标物与血浆中内源性杂质峰分离良好, TMD 和内标物的保留时间分别为 7.22 min 和 10.09 min。理论塔板数按曲马多峰计算不低于 1500。

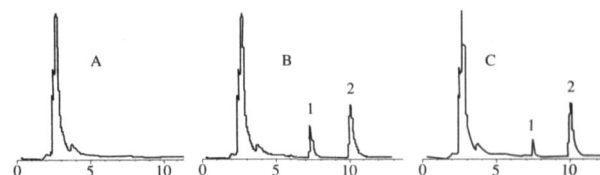


图 1 盐酸曲马多的色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆中加入 $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸曲马多和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标; C. 血浆样品; 1 盐酸曲马多; 2 内标

Fig 1 Chromatograms of the assay

A. blank plasma; B. blank plasma with $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ tramadol hydrochloride and $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ internal standard; C. sample;

1- tramadol hydrochloride; 2- internal standard

2.4 标准曲线的制备 取空白血浆 2 mL, 加入 TMD 标准溶液适量, 使质量浓度分别为 15, 25, 100, 400, 800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 按“2.3”项下方法将血样处理后进行分析。以 TMD 浓度为 X 轴, TMD 与内标物峰高之比为 Y 轴作相关分析, 二者呈线性关系。回归方程为 $Y = 0.0036X - 0.0174$, $r = 0.9992$ ($n = 5$), 线性范围为 15~ 800 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。血浆中 TMD 的最低检测浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$)。

2.5 回收率试验 取空白血浆 2 mL, 加入 TMD 标准溶液适量, 分别配制成低、中、高 3 个浓度的血浆样品, 分别为 25, 200, 600 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 按“2.3”项下方法进行处理后重复测定 5 次, 计算方法回收率, 结果见表 1。

表 1 盐酸曲马多的方法回收率

Tab 1 Recovery of tramadol hydrochloride in plasma ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

理论浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	实测浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率/%
25	25.1 $\pm$ 0.4	100.4 $\pm$ 1.6
200	203.8 $\pm$ 3.9	101.9 $\pm$ 1.9
600	581.6 $\pm$ 11.7	96.9 $\pm$ 2.0

2.6 精密度试验 将低、中、高 3 个浓度的盐酸曲马多血浆样品各 5 份, 每个浓度 1 d 内进行 5 次测定计算日内精密度, 每个浓度连续测定 5 d, 每天测定 1 次计算日间精密度, 结果见表 2。

表 2 盐酸曲马多的精密度

Tab 2 Precision of tramadol hydrochloride in plasma ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$)

理论浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	日内		日间	
	实测浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	实测浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
25	25.2 $\pm$ 0.3	1.2	24.8 $\pm$ 0.4	1.6
200	201.7 $\pm$ 4.1	2.0	199.1 $\pm$ 4.7	2.4
600	579.6 $\pm$ 13.2	2.3	566.4 $\pm$ 16.5	2.9

2.7 样品稳定性试验 将含药血浆放置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 分别于 0, 5, 10, 15 d 取出, 按“2.3”项下方法操作, 低、中、高 3 组浓度经测定分别为 24.96, 24.89, 25.17, 25.09 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 202.91, 200.67, 201.12, 198.59 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 599.71, 601.50, 600.93, 598.87 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 浓度的波动经统计学处理无统计学意义, 由此可见样品放置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 15 d 内稳定。

3 讨论

本实验参考 2005 年版中国药典(二部)^[7] 及相关文献, 对色谱条件进行了优化。检测波长为 217 nm, TMD 在该处紫外吸收较强且检测灵敏度高干扰少。有机相采用了透光性更好、对 TMD 洗脱能力更强的乙腈, 又由于曲马多在酸性条件下成盐, 所以流动相的 pH 对其色谱行为影响较大, 经过试验最终确定流动相为磷酸盐缓冲液(0.02 mol $\cdot \text{L}^{-1}$, pH 3.7)-乙腈(81:19)。内标物根据参考文献^[4,8] 及预实验结果, 最终选用了非那西丁作为内标, 其峰形良好, 保留时间合适, 实验结果更为稳定。

血样处理采用二次液-液反萃法, 样品得到了较好的净化和富集。血浆样品的碱化是影响药物回收率的关键因素, 只有保持血浆足够的碱性才能完全中和盐酸曲马多中的盐酸, 使 TMD 能充分溶解于有机相, 从而达到药物的有效提取。第二次反萃取时溶液应具有足够的酸性才能使盐酸曲

马多有效转移至水相并富集。第一次提取完成后采用低温冷冻技术, 可使血浆杂质及水溶性成分冷冻, 从而可 100% 转移到有机相, 可提高药物提取率进而提高检测限。

参考文献:

[1] Dayer P, Collart L, Desmeules J. The pharmacology of tramadol [J]. Drug Res, 1998, 48: 436-445.

[2] Gibson T. Pharmacokinetics, efficacy, and safety of analgesia with a focus of tramadol HCl [J]. Am J Med, 1996, 101(Suppl 1A): 1A473-1A538.

[3] 陈新谦, 金有豫. 新编药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 145.

[4] 张哲峰, 刘铁钢, 支丽娟, 等. HPLC 荧光检测法同时测定盐酸曲马多及其代谢物 M₁ 血药浓度[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(6): 378-381.

[5] 屈凌波, 冯书惠, 吴拥军, 等. 高效液相色谱法测定血浆中盐酸曲马多[J]. 四川大学学报(医学版), 2003, 34(3): 574-575.

[6] Nobils M, Pastera J, Anzenbacher P. High performance liquid chromatographic determination of tramadol in human plasma [J]. J Chromatogr, 1996, 681: 1177-1182.

[7] 中国药典. 二部[S]. 2005: 492.

[8] 段更利, 高敏洁, 郑璐侠, 等. 高效液相色谱法测定盐酸曲马多的临床稳态血药浓度[J]. 中国临床药杂志, 2000, 9(6): 363-366.

[收稿日期] 2007-04-10

山楂化滞丸微生物限度检查方法的验证

刘伟¹, 蒋平², 李自民², 蒋捷² (1. 湖北省直属机关医院, 湖北 武汉 430060; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 对山楂化滞丸微生物限度检查的方法进行验证。方法: 按照中国药典 2005 年版一部附录提供的微生物限度检查法的要求进行验证实验。结果: 山楂化滞丸对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的回收率均高于 70%。结论: 山楂化滞丸微生物限度检查的方法符合中国药典的要求。

[关键词] 山楂化滞丸微生物限度检查法; 方法学; 验证
[中图分类号] R927.2 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5213(2007)11-1630-03

山楂化滞丸收载于中国药典 2005 年版一部, 是由山楂、麦芽、六神曲、槟榔、莱菔子、牵牛子 6 味药加工制成的大蜜丸, 具有消食导滞的功效, 常用于治疗饮食不节所致的食积、腕腹胀满、纳少饱胀、大便秘结等疾病。其微生物限度检查一直采用常规方法检验, 根据中国药典^[1] 检查法要求, 应对原用的常规方法进行验证。

1 材料

日本 YAMATO 生化培养箱 (IC412C/IC612C/IC812C); 实验所用菌种(成都市药品检验所); 山楂化滞丸(山西天陆达药业有限公司, 规格: 9 g/丸, 批号 060501,

[作者简介] 刘伟, 男, 主管药师, 电话: 027-87234240, E-mail: weidaxingxiang@163.com