

HPLC 测定兔眼房水中两性霉素 B 的含量

李小梅^① 郑咏池 王洪贵 任强

(都江堰人民医院 四川省都江堰市二环路 611830)

摘要 建立兔眼房水中两性霉素 B 含量测定的高效液相色谱方法, 研究两性霉素 B 脂质体药膜的缓释作用。采用 Hypersil C₁₈(4.6mm × 150mm, 5μm) 色谱柱, 以甲醇: EDTA-2Na(5mmol/L) = 80:20 (V/V) 为流动相, 流速: 1mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 405nm; 进样量: 20μL。结果表明两性霉素 B 在 22.3—2450ng/mL 范围内线性关系良好($r = 0.9996$), 房水中两性霉素 B 的平均提取回收率大于 95%, 日内 RSD 为 1.05%。检出限为 4ng/mL。该法简便、准确、可靠, 适合两性霉素 B 的含量测定。

关键词 高效液相色谱法; 两性霉素 B; 兔眼房水

中图分类号: O657.7⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2011)01-0340-04

1 引言

两性霉素 B 是大环内酯类高效广谱的抗真菌药物, 是临床治疗深部真菌感染的首选药。传统的两性霉素制剂的肾毒性较大, 但其缓释剂型有缓释、减少毒副作用及并发症发生的优点, 且疗效与传统的制剂相当或更好, 这极大地促进了两性霉素在临床中的应用^[1,2]。两性霉素 B (Amphotericin B, AmB) 对治疗真菌性眼内炎可能具有独特的优越性^[3]。本研究建立了精密的 HPLC 测定兔眼房水中两性霉素 B 的含量, 研究两性霉素 B 脂质体药膜的缓释作用, 为治疗真菌性角膜炎提供良好的移植材料和方法。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

SY-8100 高效液相色谱仪(北京北分瑞利公司); TGL-16 高速台式离心机(上海医用分析仪器厂); KQ2200B 超声仪器(昆山市超声仪器有限公司); SK-1 快速混匀器(江苏国华仪器); DW-25W 198 冰箱(青岛市海尔公司)。

两性霉素 B 对照品(美国 Sigma 公司); 两性霉素 B 脂质体(上海新先锋药业有限公司, 批号: 080802); 两性霉素 B 脂质体药膜(自制); 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司); 二甲基亚砜(DMSO, 纯度 ≥ 99.5%, 德国默克公司); 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na) 等其他试剂均为分析纯。

① 联系人, 手机: (0) 13678155067; E-mail: lixiaom ei5240@163.com

作者简介: 李小梅(1984—), 女, 四川省都江堰市人, 药师, 硕士, 主要从事临床药理学工作。

收稿日期: 2010-08-11; 接受日期: 2010-09-02

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱 (4.6mm × 150mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇 : EDTA-2Na (5mmol/L) = 80 : 20 (V/V); 流速: 1.0mL/min; 柱温: 室温 25 $^{\circ}$ C; 紫外检测波长: 405nm; 进样体积: 20 μ L。色谱图见图 1。

2.2.2 对照品储备液配制

准确称取 0.0127g 两性霉素 B 对照品, 加 1mL 二甲基亚砷溶解后, 置于 10mL 棕色容量瓶中, 加 1mL 二甲基亚砷溶解后, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀得浓度为 1.27mg/mL 的储备液, 置于冰箱中 -20 $^{\circ}$ C 避光冷藏保存备用。准确吸取对照品储备液 400 μ L, 置于 25mL 棕色容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 20.32 μ g/mL 的两性霉素 B 对照品溶液。

2.2.3 样品的收集

取 3 只健康新西兰大白兔, 单只眼的眼角膜表面进行药膜移植, 手术后 1、2、3、4、5d 同一时间点抽取房水 0.1mL, 置于 -40 $^{\circ}$ C 避光保存, 待测。

2.2.4 样品的预处理

取兔眼房水 100 μ L 于 1.5mL 离心管中, 按与样品 1 : 1 (V/V) 比例加入乙腈, 涡旋混匀 1min, 13000r/min 离心 15min, 取上清液供高效液相色谱法分析, 记录峰面积, 定量。

3 结果与讨论

3.1 方法专属性实验

在选定的色谱条件下, 空白药膜与空白房水中的杂质不干扰测定, 峰形良好, 保留时间约为 4.9min (图 1)。

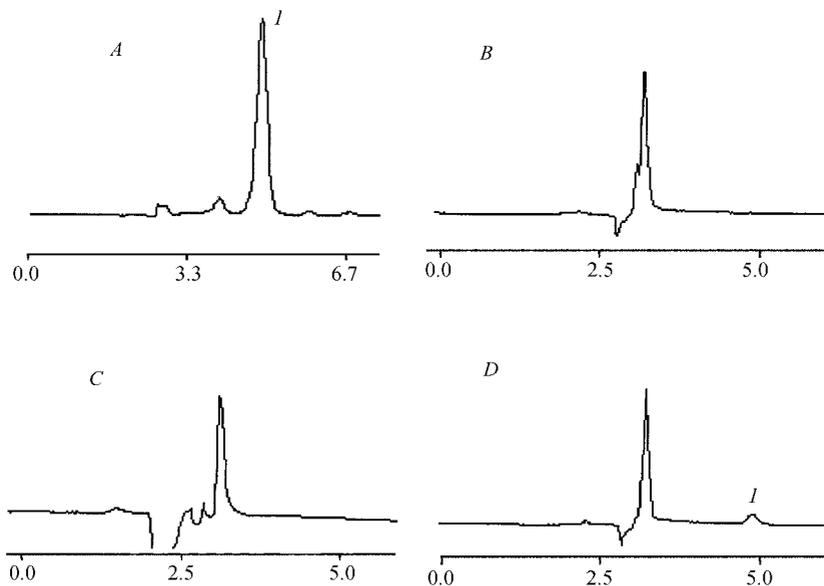


图 1 两性霉素 B 色谱图

峰 I——两性霉素 B。

A——两性霉素 B 对照品; B——空白房水; C——空白药膜; D——房水中的两性霉素 B。

3.2 校准曲线的制备

取两性霉素 B 对照品储备液适量, 分别稀释配制成浓度为 22.3, 55.8, 127, 254, 635, 1270, 2540 ng/mL 的两性霉素 B 溶液, 取 20 μ L 进样, 按上述色谱条件测其峰面积, 以峰面积(y) 对浓度(x) 作线性回归, 得线性回归方程: $y = 94.989x + 1040.9$, $r = 0.9996$ 。

检出限: 取对照品溶液 20 μ L 进样, 当信噪比为 3 时, 测得两性霉素 B 的检出限为 4 ng/mL。

3.3 精密度与回收率实验

3.3.1 精密度实验

取“3.2”项下浓度为 22.3, 127, 1270 ng/mL 的两性霉素 B 对照品溶液, 分别于同一天内进样 5 次, 根据校准曲线计算含量, 结果 RSD 值分别为 1.04%、1.20%、0.92%, 平均 RSD 为 1.05%, 表明该方法精密度良好。

3.3.2 回收率实验

取空白房水, 分别加入两性霉素 B 对照品溶液适量, 配成浓度为 55.8, 127, 2540 ng/mL 的房水两性霉素 B 对照品样品各 3 份, 按照“2.2.4”项下处理后, 进样 20 μ L 进行 HPLC 分析, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 房水中两性霉素 B 回收率结果

加入量(ng/mL)	测得量(ng/mL)	回收率(%)	平均回收率(%)
55.8	55.1	98.7	97.6
	54.0	96.8	
	54.3	97.3	
	125	98.4	
127	126	99.2	99.5
	128	100.8	
	2499	98.4	
	2540	99.6	
2540	2531	99.6	98.6
	2486	97.9	

3.4 样品测定

按照“2.2.4”项下方法处理兔眼房水样品, 进样 20 μ L, 进行 HPLC 分析, 测得结果见表 2。

表 2 样品的测定结果

时间(d)	第 1 只(ng/mL)	第 2 只(ng/mL)	第 3 只(ng/mL)	平均值(ng/mL)
1	113.3	112.6	113.5	113.1
2	61.5	60.3	61.7	61.2
3	44.8	43.7	45.6	44.7
4	31.3	30.6	32.2	31.4
5	28.5	27.6	28.8	28.3

4 结论

本实验建立的以甲醇:EDTA-2Na(5 mmol/L) = 80:20(V/V) 为流动相的 HPLC 测定方法, 空白房水和空白药膜都不干扰测定, 且回收率良好。出峰时间快, 峰形和精密度良好, 测定效果较好, 结果稳定, 适用于两性霉素 B 的房水含量的快速分析测定。

从本实验样品测定结果可以看出两性霉素 B 脂质体药膜用于兔眼房水具有良好的缓释作用, 可为治疗真菌性角膜炎提供良好的移植材料和方法。

参考文献

- [1] Manzouri B, Vafidis G C, Wyse R K *et al*. Pharmacotherapy of Fungal Eye Infections[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2001, **2**(11): 1849—1857.
- [2] Sunaric M G, Pournaras C J. Current Approach to Postoperative Endophthalmitis[J]. *Br. J. Ophthalmol*, 1997, **81**(11): 1006—1015.
- [3] 林黎. 眼部给药新剂型的研究简况[J]. 前 卫医药杂志, 2001, **18**(6): 480—482.

Determination of Amphotericin B in Aqueous Humor of Rabbits by HPLC

LI Xiao-Mei ZHENG Yong-Chi WANG Hong-Gui REN Qiang

(People's Hospital of Dujiangyan, Dujiangyan, Sichuan 611830, P. R. China)

Abstract The method for the determination of amphotericin B (AmB) in aqueous humor of rabbits was established by HPLC to study sustained release of liposome emulsion of AmB, with Hypersil C₁₈ (4.6mm × 150mm, 5μm) column and methanol : EDTA-2Na (5mmol/L) = 80 : 20 (V/V) as mobile phase. The flow rate and detection wavelength were 1.0mL/min, 405nm, respectively, with sample volume for determination of 20μL. The results showed that AmB had a good linear in the range of 22.3—2450ng/mL ($r = 0.9996$). The average recovery was above 95% with RSD of 1.05% in a day. The detection limit was 4ng/mL. This method is simple, rapid, accurate and selective for the determination of AmB.

Key words HPLC; Amphotericin B; Aqueous Humor of Rabbits

本刊编辑部再次忠告: 请作者勿将联系地址省略! 尽管你单位的名称和你的姓名大名鼎鼎, 但并非人人皆知

某作者只告诉了本编辑部他所在单位的所在城市, 未告知街道名称和门牌号数。确实, 他单位是该城市鼎鼎有名的大单位, 所以编辑部发给他的信每次都能收到, 但是后来给他寄样刊时, 印刷品却被退回了, 邮局在上盖了个戳: 地址不详, 退! 可见, 虽然你单位大名鼎鼎, 但还并不是邮局人人皆知。“退”! 这还是一个好运。因为“退”! 毕竟你还遇上一个邮局负责任的人, 他还要花费人力物力来“退”! 也好让邮件寄出者清楚“退”的缘故。若碰上一个不负责任的, 将邮件丢进了垃圾箱, 你到哪儿去叫苦呢! 有的作者联系地址只写上他单位的大名, 好像他在本单位也是大名鼎鼎, 本单位人人皆知的, 但情况往往并非如此。这种邮件, 单位的收发室, 也通常予以退回, 甚至丢进垃圾箱。所以, 请各位作者勿将你单位的地址(县、区、街道名称, 门牌号)和你自己的地址(院、部、系、室、组)省略, 举手之劳, 何乐不为? 邮件丢失才是一件大事, 请勿因小失大。

以上意见也是邮局对我们的要求。

若作者对我们的再次忠告和邮局的要求置之不理(甚至还同我们辩论), 本刊不得不停发邮件, 直到作者补齐详细地址后恢复。因此而延误出版的责任, 只好由您自己负责。

《光谱实验室》编辑部