

RP-HPLC测定人血浆中的阿昔洛韦

钟 珍¹, 刘雪梅²

(1. 广西药科学学校药剂教研室, 广西南宁 530023; 2. 广西中医学院, 广西南宁 530001)

摘要: 目的 采用 RP-HPLC法测定人血浆中的阿昔洛韦。方法 Lichrospher C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 10 mmol L⁻¹ 磷酸二氢钠缓冲液 (3: 97 磷酸调 pH 3.4); 流速 1.0 mL min⁻¹; 检测波长 254 nm; 柱温 40℃。结果 阿昔洛韦在 0.05~ 5.00 μg mL⁻¹ 线性良好 ($r = 0.9994$), 最低检测浓度为 50.00 ng mL⁻¹, 方法回收率 93.33% ~ 104.96%, 日内、日间 RSD 分别为 1.46% ~ 3.83% 和 2.32% ~ 6.37%。结论 所建方法简便、快速、灵敏、准确、干扰少, 适用于阿昔洛韦血药浓度的测定。

关键词: 阿昔洛韦; 反相高效液相色谱法; 人血浆; 血药浓度

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1006- 0103(2008)02- 0205- 02

Determination of Acyclovir in human plasma by RP-HPLC

ZHONG Zhen¹, LU Xue-mei²

(1. Department of Pharmaceutics, Guangxi Pharmacy School, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China)

Abstract **OBJECTIVE** To establish an RP-HPLC method for determination of Acyclovir in human plasma. **METHODS** The samples were separated on a Lichrospher C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using the mobile phase consisted of acetonitrile - 10 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄ (adjusted to pH 3.4 with H₃PO₄) (3: 97), with the flow rate was 1.0 mL min⁻¹. The detection wavelength was set at 254 nm with the temperature of column at 40℃. **RESULTS** The linear range of Acyclovir concentration was 0.05 - 5.00 μg mL⁻¹ ($r = 0.9994$), the lowest detectable limit was 50 ng mL⁻¹. The average recovery was 93.33% - 104.96% with within-day and between-day RSD of 1.46% - 3.83% and 2.32% - 6.37%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, sensitive, accurate and suitable for the determination of acyclovir in human plasma.

Key words Acyclovir; RP-HPLC; Human plasma

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006- 0103(2008)02- 0205- 02

阿昔洛韦 (Acyclovir) 即 9- (2- 羟乙氧甲基) 鸟嘌呤, 是开环核苷类抗病毒药物^[1], 具有高度选择性和较低毒性, 主要用于治疗单纯疱疹病毒感染、水痘、带状疱疹病毒感染、尖锐湿疣、慢性病毒性乙型肝炎、急性视网膜坏死等^[2]。现参照相关文献^[3- 6], 采用 HPLC 测定人血浆中的阿昔洛韦, 用于药物动力学和生物利用度的研究。

1 实验部分

1.1 仪器与材料

1100 高效液相色谱仪包括 ChemStation 色谱工作站 (美国 Agilent); 高速冷冻离心机 (德国 Hettich)。阿昔洛韦对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量为 99.60%); 喷昔洛韦内标 (丽珠集团常州康丽制药有限公司, 含量为 99.00%); 乙腈和甲醇为色谱纯; 磷酸二氢钠、磷酸和高氯酸为分析纯; 水为重蒸馏水。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 10 mmol L⁻¹ 磷酸二氢钠缓冲液 (3: 97, 磷酸调 pH 3.40); 流速 1.0 mL min⁻¹; 检测波长 254 nm; 柱温 40℃。

1.2.2 溶液的配制 精密称取 25 mg 阿昔洛韦对照品, 置 25 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并用蒸馏水定容, 制成 1.0 mg mL⁻¹ 的对照品贮备液, 4℃ 保存。使用时用蒸馏水稀释至所需浓度的对照品溶液。精密称取喷昔洛韦内标 10 mg 置 10 mL 棕色量瓶中, 用适量甲醇溶解并用蒸馏水定容, 制成 1.00 mg mL⁻¹ 内标贮备液, 4℃ 保存。使用时用蒸馏水稀释成 15 ng mL⁻¹ 的内标溶液。

1.2.3 血浆样品的处理 精密吸取血浆样品 200 μL 置 2 mL 离心管中, 精密加入 20 μL 内标溶液, 漩涡混匀 30 s, 加 100 μL 20% HClO₄, 漩涡 30 s, 1.4 ×

作者简介: 钟珍 (1974-), 女, 广西南宁, 讲师, 从事药剂学的研究工作。

* 通讯作者 (Correspondent author), E-mail: opqstzab@163.com

10^4 r min^{-1} 离心 5 min, 取上清液 $20 \mu\text{l}$ 进样分析, 测得空白血浆及空白血浆添加阿昔洛韦和内标的色谱图 (图 1)。阿昔洛韦和内标喷昔洛韦保留时间分别为 7.084 min, 以阿昔洛韦峰计算, 理论板数大于 1.5×10^4 。空白血浆的内源性物质不干扰色谱分析。

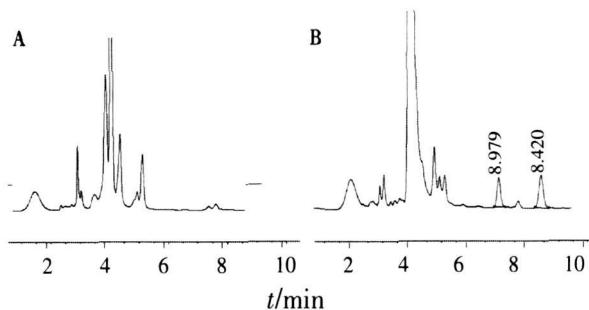


图 1 空白血浆 (A)、空白血浆 + 阿昔洛韦对照品 + 内标 (B) 的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank plasma solution (A) and spiked with acyclovir and pencyclovir (B)

1.2.4 标准曲线 取空白血浆, 加入含阿昔洛韦系列标准溶液, 配成 $50, 100, 300, 500, 1 \times 10^3, 2 \times 10^3, 3 \times 10^3, 5 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$ 的血浆, 按“1.2.3”项下方法处理。以血浆中阿昔洛韦的浓度 (C) 为横坐标, 以阿昔洛韦与内标的峰面积比为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归计算, 直线回归方程为: $Y = 7.28 \times 10^{-4}C + 6.17 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9994$)。结果表明, 阿昔洛韦 $50 \sim 5 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$ 线性良好, 最低定量浓度为 50.00 ng mL^{-1} 。

1.2.5 回收试验 取“1.2.4”项下 $0.1, 1.0, 3.0 \text{ mg mL}^{-1}$ 的样品, 按“1.2.3”项下方法操作, 将峰面积分别与未经提取直接进样同浓度标准溶液的峰面积相比, 考察方法的回收率。以提取后的实测与理论浓度相比, 计算相对回收率 (表 1)。

表 1 血浆中阿昔洛韦回收率的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Results of recovery test of acyclovir in human plasma ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Added / mg mL^{-1}	Measured / ng mL^{-1}	Relative recovery / %	Absolute recovery / %
0.10	93.33	93.33 ± 6.45	93.76 ± 4.26
1.00	965.12	96.51 ± 1.41	93.99 ± 1.22
3.00	3148.95	104.96 ± 1.77	98.26 ± 0.76

1.2.6 精密度试验 取“1.2.4”项下浓度为 $0.1, 1.0, 3.0 \text{ mg mL}^{-1}$ 的血浆, 分别在同一天内测定 5 次和每天 1 次, 连续测定 5 d 结果日内 RSD 分别为 3.83%、1.46%、1.68%, 日间 RSD 分别为 6.13%、2.32%、6.37%。结果表明, 该方法精密度符合药动力学和生物利用度试验要求。

1.2.7 稳定性试验 取“1.2.4”项下 $0.1, 1.0, 3.0 \text{ mg mL}^{-1}$ 的血浆样品, 置 -20°C 冰箱保存, 考察其在冷冻及反复冻-融条件下的稳定性。结果显示, 血浆样品在冷冻条件下至少可保存 14 d 反复冻融两次无明显分解。

2 讨论

用 HPLC 测定血浆中阿昔洛韦的浓度, 文献多采用甲醇-水体系^[3]或乙腈-水体系^[4]为流动相, 因前者所得色谱峰宽矮, 因此, 选用后者为流动相。实验中曾用 4%、5% 乙腈水溶液, 但阿昔洛韦和内标的保留时间很短, 血浆中杂质干扰严重, 即使加入 2% 三乙胺、冰醋酸调节 pH, 保留时间和杂质峰的干扰仍无明显改善。后采用乙腈- 10 mmol L^{-1} 磷酸二氢钠缓冲液 (3:97, pH 3.40) 为流动相, 保留时间分别为 7.1、8.8 min, 血浆杂质不干扰测定, 且流动相不需添加离子对试剂, 因而能延长分析柱的使用寿命。

阿昔洛韦具有较高的水溶性, 血浆预处理大多采用蛋白沉淀或固相萃取^[3], 实验选用了 20% 高氯酸沉淀蛋白后直接进样, 操作较固相萃取更简便, 且沉淀蛋白能力强, 用量少, 避免了血浆的多倍稀释, 使分析方法具有较高的灵敏度和准确度。

伐昔洛韦是阿昔洛韦的前体药物, 口服后在体内迅速完全转化为阿昔洛韦^[7], 体内研究均以阿昔洛韦血药浓度为指标, 因此, 文中方法也适用于伐昔洛韦的药物动力学及生物利用度的研究。

参考文献:

- [1] 李源. 国内阿昔洛韦剂型的开发和临床应用 [J]. 中国药业, 2006, 15(1): 72-73
- [2] 邓晓莉, 林涛. 阿昔洛韦临床应用时应注意的问题 [J]. 海峡药学, 2003, 15(6): 84-85.
- [3] 黄建明, 段更利, 陈钧, 等. 阿昔洛韦研制片的人体相对生物利用度研究 [J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(12): 859-861.
- [4] 梁茂植, 曾西北. RP-HPLC 法测定人血浆中阿昔洛韦的方法改进 [J]. 2000, 15(5): 379-380
- [5] 施孝金, 张莉莉, 李东, 等. 盐酸万乃洛韦人血浆浓度的 HPLC-荧光法测定及其药动力学 [J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(3): 128-131
- [6] 张洁, 李铜铃, 孙健, 等. 盐酸伐昔洛韦泡腾片在人体内的生物等效性 [J]. 华西药 学 杂 志, 2006, 21(6): 544-546
- [7] 朱世斌, 朱瑛. 新一代广谱抗病毒药-盐酸伐昔洛韦 [J]. 中国药师, 2000, 3(3): 189-190

收稿日期: 2007-07