

HPLC法同时测定人血浆中咪达唑仑和阿曲库铵的浓度

阎克里, 赵丽, 朱秀卿, 白玉

(山西省肿瘤医院药物检测室, 太原 030001)

摘要 目的: 建立人体血浆中同时测定咪达唑仑和阿曲库铵 HPLC测定法。方法: 采用 HPLC法, 色谱柱为 Hypersil C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (60:40) (含 0.1% 二乙胺, 0.05% 磷酸溶液), 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为室温, 检测波长 225 nm。结果: 咪达唑仑在 0.25~4 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系 ($r=0.9997$), 阿曲库铵在 6.00~96.00 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系 ($r=0.9998$), 咪达唑仑和阿曲库铵最低检测浓度分别为 50, 1.5 μg·mL⁻¹, 方法回收率在 96.8%~100.0%, 萃取回收率在 87.7%~93.0%。日内、日间 RSD ($n=3$) 均小于 5.9%。结论: 本方法简便、准确、可靠, 可用于人体血浆中同时测定咪达唑仑和阿曲库铵的浓度。

关键词: 咪达唑仑; 阿曲库铵; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)08-1348-04

HPLC determination of midazolam and atracurium in human plasma

YAN Ke-li, ZHAO Li, ZHU Xu-qing, BAI Yu

(Department of Drug Detection, Shanxi Provincial Tumor Hospital, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for the determination of midazolam and atracurium in human plasma. **Method** The analytical column was packed with Hypersil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-water (60:40), (containing 0.1% diethylamine, 0.05% phosphoric acid) at the flow rate of 1 mL·min⁻¹, and detection wavelength was set at 225 nm. **Results** The linear ranges were 0.25~4 μg·mL⁻¹ for midazolam in human plasma and 6.00~96.00 μg·mL⁻¹ for atracurium. The correlation coefficients were 0.9997 and 0.9998. The midazolam low limit of detection was 50 ng·mL⁻¹. The atracurium low limit of detection was 1.5 μg·mL⁻¹. The method recoveries were 96.8%~100.0%. The extraction recoveries were 87.7%~93.0%. Within-day and between-day RSD ($n=3$) were less than 5.9%. **Conclusion** The method is simple, reliable and sensitive for determination of midazolam and atracurium in human plasma simultaneously.

Key words midazolam; atracurium; HPLC

咪达唑仑是短效的水溶性苯二氮类药物, 具有稳定性高、起效快、毒性低等优点。小剂量手术局麻时常作为镇静催眠药, 较高剂量则用于全身麻醉的诱导剂, 已广泛应用于临床麻醉中^[1]。在临床应用时, 当使用高剂量咪达唑仑作诱导麻醉时, 在药效学方面存在较大的个体差异^[2]。阿曲库铵为中等时效的非去极化型肌松药, 主要用于各种手术麻醉时维持骨骼肌的松弛或控制呼吸, 尤其适用于插管或腹部手术时肌肉松弛的维持。由于阿曲库铵起效快, 作用时间短, 其代谢和神经肌肉阻断作用的终止不依赖体内药物代谢酶及肝脏和肾脏对该药物的代谢和排泄, 不因病人肝肾功能的损害而改变本药的

作用时间, 老年人的作用时间和成人相似, 因而得到国内各大医院的广泛使用^[3-4]。对于血浆咪达唑仑浓度测定文献多有报道^[5-8], 有关阿曲库铵人血浆浓度的测定国内未见研究, 只有制剂含量的测定研究^[9-10], 而同时测定人血浆中阿曲库铵、咪达唑仑 2 种药物的浓度, 国内外未见研究报道。

本文建立了高效液相色谱法同时测定血浆中阿曲库铵、咪达唑仑 2 种药物的浓度, 并对用药病人进行了体内用药测定, 表明了该方法在临床监测应用的可行性。

1 仪器与试剂

日本日立 L-2130 高效液相色谱仪; 日本日立

L-2420紫外检测器;大连依利特 Echrom 98型色谱工作站;分析天平(上海良平精密仪器有限公司, Max100 g D=0.0001 g);ZH-1自动漩涡混合器。咪达唑仑(纯度大于 99.5%)购于浙江省三门县康宁化工有限公司,阿曲库铵(纯度大于 99.8%)购于上海恒瑞医药有限公司;化学试剂乙腈、甲醇为色谱纯(天津四友化工厂生产);水为纯蒸水。

2 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水 (60:40) (0.1% 二乙胺, 0.05% 磷酸溶液, pH 5);流速: 1.0 mL · min⁻¹;柱温: 室温;检测波长为 225 nm。

3 对照品溶液配制

取对照品咪达唑仑 5 mg 阿曲库铵 10 mg 精密称定,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶液至刻度,制成含 0.5 mg · mL⁻¹咪达唑仑、1 mg · mL⁻¹阿曲库铵的溶液,加 50% 甲醇溶液制成系列对照品溶液。

4 血浆样品的处理

取静脉血 2 mL,加入抗凝管中,3000 r · min⁻¹离心 10 min,精密取血浆 1 mL,加入 2 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 0.3 mL,混匀,加入氯仿-乙醚 (3:7) 4 mL,萃取提取 2 min,3000 r · min⁻¹离心 10 min,移取上清液,于水浴 30 °C 用轻柔氮气流吹干,残渣加流动相 1 mL 充分溶解,取 10 μL 进 HPLC 检测。

5 方法专属性试验

分别取空白血浆 1 mL、含药血浆溶液 1 mL (含咪达唑仑 1 μg · mL⁻¹、阿曲库铵 24 μg · mL⁻¹),含芬太尼和普鲁卡因的空白血浆溶液各 1 mL,以及手术病人咪达唑仑 0.4 mg · kg⁻¹、阿曲库铵 0.6 mg · kg⁻¹ 静脉点滴给药 10 min 后,采集病人动脉血 2 mL,加入抗凝管中,按“4”项下方法操作,记录色谱图(见图 1)。含药血浆及病人血浆中阿曲库铵和咪达唑仑保留时间分别为 10.80 min 和 14.87 min 左右,色谱峰峰形良好,血浆内源性物质及与咪达唑仑和阿曲库铵同时给药的芬太尼和普鲁卡因不干扰样品测定,无杂质峰干扰,本方法具有较高的专属性。

6 线性关系及最低检测限试验

取空白血浆 0.9 mL,置 10 mL 离心管中,分别加入经咪达唑仑、阿曲库铵对照品溶液配制的含咪达唑仑、阿曲库铵对照品系列溶液 100 μL,配制成咪达唑仑浓度为 0.25 0.50 1.00 2.00 4.00 μg · mL⁻¹,阿曲库铵浓度为 6.00 12.00 24.00 48.00 96.00 μg · mL⁻¹对照品血浆,按“4”项下方法处理,取 10 μL 进样,以咪达唑仑、阿曲库铵血浆浓度 X 为

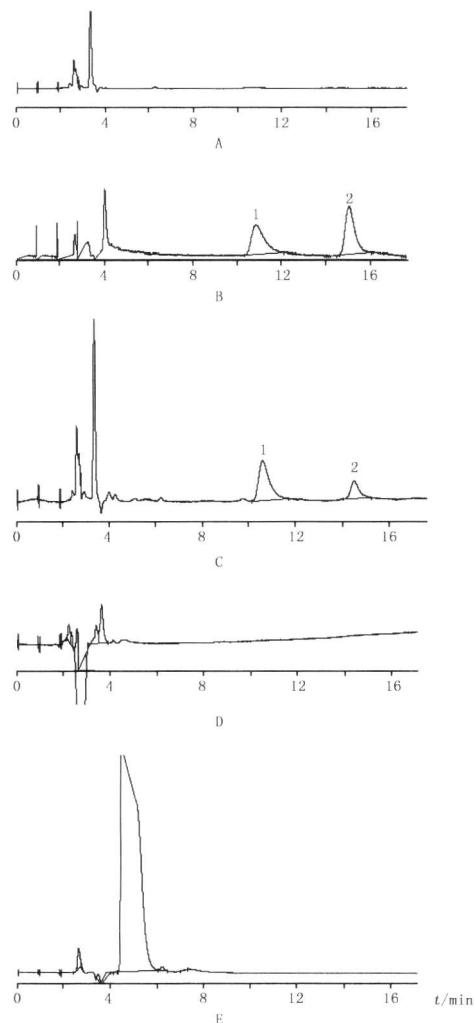


图 1 人血浆中咪达唑仑、阿曲库铵 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of midazolam and atracurium in human plasma

A 空白血浆 (blank plasma) B 空白血浆加咪达唑仑 (1 μg · mL⁻¹)、阿曲库铵 (20 μg · mL⁻¹) (blank plasma with midazolam and atracurium) C 手术病人咪达唑仑 (0.15 ~ 0.2 mg · kg⁻¹)、阿曲库铵 (0.6 ~ 0.8 mg · kg⁻¹) 静脉点滴给药 10 min 后血浆 (patient plasma sample 10 min after infusing midazolam 0.15 ~ 0.2 mg · kg⁻¹ and atracurium 0.6 ~ 0.8 mg · kg⁻¹) D 空白血浆加芬太尼 (blank plasma with fentanyl) E 空白血浆加普鲁卡因 (blank plasma with procaine)

1. 阿曲库铵 (atracurium, 10.8 min) 2. 咪达唑仑 (midazolam, 14.87 min)

横坐标,测定的峰面积 Y 为纵坐标,作直线回归处理,得咪达唑仑和阿曲库铵回归方程分别为:

$$Y = 64.606X \quad r = 0.9997$$

$$Y = 2.297X \quad r = 0.9998$$

咪达唑仑在 0.25 ~ 4.00 μg · mL⁻¹、阿曲库铵在 6.00 ~ 96.00 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。咪达唑仑和阿曲库铵最低检测浓度分别为 50 ng ·

mL^{-1} 和 $1.00\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($SN=3$)。

7 稳定性试验

取空白血浆 0.9 mL, 置 10 mL 离心管中, 分别加入经咪达唑仑、阿曲库铵对照品溶液配制的含咪达唑仑、阿曲库铵对照品系列溶液 100 μL , 制成含咪达唑仑分别为 0.25 1.00 4.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阿曲库铵分别为 6.00 24.00 96.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的对照品血浆, 每个浓度制备 3 份, 样品置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 分别于第 5 10 15 d 取出血浆样品按“4”项下方法处理, 进行测定, 测定结果表明, 各浓度的 RSD 均小于 3.8%, 说明血浆中的咪达唑仑、阿曲库铵在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 至少可以稳定 15 d

8 回收率试验

取空白血浆 0.9 mL, 置 10 mL 离心管中, 分别加入经咪达唑仑、阿曲库铵对照品溶液配制的含咪达唑仑、阿曲库铵对照品系列溶液 100 μL , 制成含咪达唑仑 3 种浓度分别为 0.25 1.00 4.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阿曲库铵 3 种浓度分别为 6.00 24.00 96.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品血浆, 每个浓度各 5 份, 按“4”项下方法处理, 测定色谱峰面积, 用回归方程计算检出量, 并与加入量比较, 计算方法回收率 ($n=5$)。

将空白血浆 0.9 mL 换成流动相, 同法配制上述 3 种浓度的咪达唑仑、阿曲库铵溶液, 每个浓度各 5 份, 加入咪达唑仑、阿曲库铵对照品溶液配制的含咪达唑仑、阿曲库铵对照品系列溶液 100 μL , 制成含咪达唑仑 3 种浓度分别为 0.25 1.00 4.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阿曲库铵 3 种浓度分别为 6.00 24.00 96.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品, 取 10 μL 直接进样, 将同浓度血浆样品和流动相制备的样品峰面积进行比较, 计算提取回收率, 结果见表 1。

表 1 血浆中咪达唑仑、阿曲库铵回收率试验结果 ($n=5$)

Tab 1 Method recoveries and extraction recoveries of m idazolm and atracurium					
组分 (component)	$C/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	方法回收率 (method recoveries) %	RSD %	提取回收率 (extraction recoveries) %	RSD %
咪达唑仑 (m idazolm)	0.25	96.8	2.1	92.1	4.0
	1	100.1	3.5	91.6	4.4
	4	99.0	3.7	93.0	2.6
阿曲库铵 (atracurium)	6	97.7	5.2	89.6	6.9
	24	101.0	4.1	87.7	2.6
	96	97.7	3.9	92.1	3.4

9 精密度试验

取空白血浆 0.9 mL, 加入咪达唑仑、阿曲库铵对照品溶液配制的含咪达唑仑、阿曲库铵系列对照

品溶液 0.1 mL, 制成含咪达唑仑 3 种浓度分别为 0.25 1.00 4.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阿曲库铵 3 种浓度分别为 6.00 24.00 96.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品血浆, 每个浓度各 3 份, 按“4”项下方法处理, 同一浓度的血浆样品分别于 1 d 内连续测定 5 次, 5 d 内每天测定 1 次, 测定色谱峰面积并计算浓度, 计算日内和日间精密度, 结果见表 2。

表 2 血浆中咪达唑仑、阿曲库铵精密度试验结果 ($n=3$)

Tab 2 Precision results of m idazolm and atracurium in human plasma			
组分 (component)	$C/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD %	
		日内 (intra-day)	日间 (inter-day)
咪达唑仑 (m idazolm)	0.25	2.8	3.6
	1	3.8	2.4
	4	1.9	2.5
阿曲库铵 (atracurium)	6	3.1	5.9
	24	4.6	3.7
	96	3.6	4.3

10 方法应用

8 名手术患者, 年龄 (55 ± 10) 岁, 体重 (62 ± 12) kg 行诱导麻醉, 给药剂量为咪达唑仑 0.15~0.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、阿曲库铵 0.6~0.8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、芬太尼 2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 静脉点滴给药, 静脉点滴给药开始计时, 按如下时间 (1 5 10 15 20 25 30 45 60 90 min) 采集病人动脉血 2 mL, 加入抗凝管中, 按“4”项下处理, 测定血药浓度, 绘制血药浓度—时间曲线, 结果见图 2。

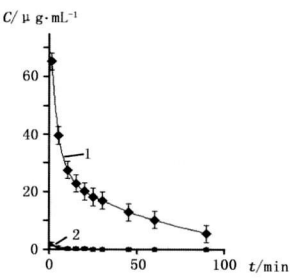


图 2 病人静脉给与咪达唑仑、阿曲库铵、芬太尼后, 咪达唑仑和阿曲库铵的血药浓度—时间曲线

Fig 2 M idazolm and atracurium concentration—time curve in human plasma after patients infusing m idazolm, atracurium and fentanyl
1 阿曲库铵 (atracurium) 2 咪达唑仑 (m idazolm)

11 讨论

曾尝试采用沉淀蛋白法对血浆样品进行预处理, 但由于测定的回收率较低, 改用萃取方式进行。在萃取溶剂的选择上, 曾采用氯仿作萃取溶剂进行提取, 由于提取溶剂较血浆重, 有机溶剂在血浆层

下,操作时有机层不易被吸取出。另外,用氯仿提取时容易发生乳化现象,影响2种药物的提取率。经改进,使用二氯甲烷-乙醚(3:7)混合液作萃取溶剂,其乳化现象大大减少,且有机层位于上层,便于吸取。如果只采用乙醚提取,同样可得到相近的提取率,但乙醚容易挥发,对人体有害,使方法的稳定性降低。因此本文采用二氯甲烷-乙醚(3:7)混合溶液作萃取剂进行提取。

对血浆进行萃取处理时,比较了1次萃取和2次萃取的实验结果,从结果看出,2次萃取并不能显著提高2种药物提取率,故本文仅萃取提取了1次,明显缩短了样品预处理时间,且回收率可以满足试验的要求。

另外,在萃取试验中,比较了碱化血浆溶液与不碱化血浆溶液的萃取率,并对碱化溶液的用量进行了试验考察,试验结果表明,使用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液0.3 mL碱化血浆溶液,可使萃取率得到较大的提高。然而 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液用量的增加,并不能提高提取率,反而导致萃取率的降低。故本实验采取 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 溶液0.3 mL碱化血浆溶液萃取法进行。

由于手术病人是咪达唑仑、阿曲库铵、芬太尼、普鲁卡因4种药物几乎同时给药,病人体内血浆中同时存在着这4种药物,为此我们在本文色谱条件下,进行了体外血浆中芬太尼、普鲁卡因对照品的干扰试验研究,试验结果表明,芬太尼、普鲁卡因在此色谱条件下无干扰。

应用本文建立的测定方法对8名病人使用咪达唑仑、阿曲库铵后进行了血药浓度测定,结果表明,本测定方法可以很好地满足咪达唑仑、阿曲库铵临床药浓检测的需求,为临床个体化用药的进一步研究打下基础。

参考文献

- 1 Dundee JW, Halliday NJ, Harper KW, *et al.* Midazolam: a review of its pharmacological properties and therapeutic use *Drugs*, 1984 28: 519
- 2 LIU Xi-jun(刘锡钧). The Guide of Practical Drug(实用药物指南). Beijing(北京): People's Military Medical Press(人民军医出版社), 2000: 120
- 3 State Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation(国家食品药品监督管理局药物评价中心). Clinical Drug Reference(药物临床信息参考). Sichuan Province(四川): Sichuan Province Science and Technology Press(四川科学技术出版社), 2004: 66
- 4 Carthy BJ, Hill GT. Some aspects of the analysis and stability of atracurium besilate *Anal Proc(London)*, 1983 20: 177
- 5 CAI Mei-hua(蔡美华), WANG Shan-juan(王珊娟), HANG Yan-nan(杭燕南), *et al.* RP-HPLC determination of midazolam in plasma(反相高效液相色谱法测定血浆中咪达唑仑浓度). *China Pharm* (中国药房), 2002 13(3): 157
- 6 TIAN Zhi-song(田志松). HPLC determination of midazolam and 1,2-hydroxy b midazolam in human plasma(高效液相色谱法同时测定人血浆1,2-羟基咪达唑仑与咪达唑仑含量). *Herald Med* (医药导报), 2006 25(5): 405
- 7 XI Qing-yin(奚菁颖), SONG Zhong-juan(宋钟娟), CHENG Yan(陈焰), *et al.* HPLC determination of midazolam in plasma(高效液相色谱法测定血浆中咪达唑仑浓度). *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志), 2002 11(4): 221
- 8 SUN Hai-ying(孙海莺), SUN Zhong-shi(孙忠实). RP-HPLC determination of midazolam in plasma(高效液相色谱法测定血浆内咪达唑仑浓度). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1996 16(4): 222
- 9 LIU Chun-sheng(刘春胜), WANG Yun-pin(王云萍), ZHOU Tong-hui(周同惠). HPLC determination of atracurium besilate(阿曲库铵苯磺酸盐的高效液相色谱分析). *Acta Pharm Sin*(药理学学报), 1994 29(1): 68
- 10 HAN Jun(韩俊), ZEN Huan-jun(曾焕俊), FANG Zheng-wen(方镇文). HPLC determination of atracurium besilate isomers and its related impurities in atracurium injection(HPLC测定卡肌宁注射液阿曲库铵苯磺酸盐异构体及相关杂质). *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 1996 31(10): 775

(本文于2008年12月15日修改回)