

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱: Shim-pack VP-ODS(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流动相: 乙腈-0.3% 磷酸(15:85, 用三乙胺调 pH 2.5); 紫外检测波长 302 nm; 流速 0.8 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL; 灵敏度: 1.00 AUFS。

2.2 标准溶液的配制 精密称取 0.022 61 g MTX, 用配制的流动相配成质量浓度分别为 226.1, 9.04 mg·L⁻¹ 的溶液为外标物。

2.3 血清样品处理 患者连续使用 MTX, 每周 1 次; 同时口服 6-巯基嘌呤, qd。第二次注射 MTX 结束 24, 48, 72 h 后, 仍继续服用 6-巯基嘌呤, 抽取静脉血液约 5 mL, 处理后取血清备用。精密吸取 0.4 mL 待测血清加入 10 mL 尖底塑料离心管中, 加入 10% 三氯醋酸溶液 0.4 mL, 漩涡振荡 1 min, 高速离心(4 000 r·min⁻¹) 5 min, 小心取上层溶液 20 μL 进样。

2.4 标准血清溶液的制备 精密吸取空白血清 0.4 mL, 置 10 mL 尖底塑料离心管中, 分别加入 MTX 标准溶液(226.1 mg·L⁻¹, 20 μL; 9.044 mg·L⁻¹, 10 μL) 分别配制成高、低标准, 按 2.3 项下方法处理进样。

3 结果

3.1 色谱行为 由色谱图可知, 在与高、低浓度对照品色谱峰保留时间($t = 2.376$ min) 相应的位置上, 样品溶液具有相同保留时间的色谱峰出现。低浓度样品溶液的色谱中出现比较明显的峰, 与样品溶液的色谱相似, 用以计算样品中 MTX 的浓度。高、低浓度对照品血清溶液以及样品血清溶液的色谱图见图 1。

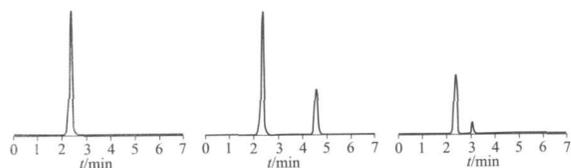


图 1 甲氨蝶呤的高效液相色谱图

A. 高浓度对照品血清; B. 低浓度对照品血清; C. 样品血清

Fig 1 The HPLC chromatogram of MTX

A. serum of high concentration reference substance; B. serum of low concentration reference substance; C. serum of sample

3.2 标准曲线及检测限 取 0.8 mL 的空白血清分别配制 MTX 质量浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 20.0, 40.0, 60.0, 100.0 mg·L⁻¹ 的系列样品, 按 2.3 项下对样品进行处理后进样 20 μL, 以 MTX 浓度为横坐标, 2 次测得的 MTX 峰面积平均值为纵坐标求得直线回归方程为: $Y = 0.2 + 30174X$, $r = 0.9994$ 。在 0.1~100.0 mg·L⁻¹ 范围内线性关系良好, 最低检测限为 50 μg·L⁻¹ (S/N = 3)。

3.3 加样回收率与精密度试验 分别取空白血清 0.4 mL, 精密加入 MTX 标准溶液适量, 使其血药浓度为低、中、高 3 种浓度 MTX 标准血样各 4 份, 按 2.3 项下对样品处理方法处理进样, 计算日内 RSD, 每日测定, 连续 4 d, 计算日间 RSD, 结果见表 1。

3.4 样品稳定性试验 按 3.2 项下方法分别配置低、中、高浓度(0.25, 12.50, 100.00 mg·L⁻¹) 的 3 组 18 个样品(双样), 分别在室温(25~28 °C) 放置 4 h, -20 °C 冻存 24 h, 1 周和 3 周后分别进行色谱测定, 未见封存样品的药物降解。

表 1 MTX 血药浓度的回收率及其精密度

Tab 1 The recovery and precision of MTX serum concentration

加入量 /mg·L ⁻¹	加入样品量(n=5)			精密度(n=4)	
	实测量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	RSD /%	日内 RSD /%	日间 RSD /%
0.25	0.26	104.0	2.13	2.27	2.82
12.50	12.79	102.3	1.57	1.74	1.43
100.00	102.46	102.5	1.72	1.76	2.68

3.5 样品的质量控制 按 3.2 项下方法分别配置低、中、高质量浓度(0.25, 12.50, 100.00 mg·L⁻¹) 36 个血浆样品(一式 12 份) 置 -20 °C 冻存备用, 即为质量控制样品。每次检测血样时同时检测质量控制样品, 如果相对回收率均在 85%~115% 内, 即可认为仪器检测正常, 否则须检查整个操作过程以及仪器原因。

2.6 临床应用 患者, 男, 17 岁, 急性淋巴细胞白血病, 静脉注射 MTX 30 mg, 每周 1 次, 同时口服 6-巯基嘌呤片 100 mg, qd。本法测定患者第 2 次注射 MTX 结束 28 h 后血药浓度为 9.68 μmol·L⁻¹, 结果在中毒浓度以下(注射 MTX 24 h 后中毒浓度为 >10 μmol·L⁻¹)。据患者用药后情况, 建议该患者下次使用甲氨蝶呤仍维持原剂量。

4 讨论

MTX 是预防急性淋巴细胞白血病的主要手段之一, 但全身应用 MTX 剂量过大时对多种器官系统也造成严重损害, 因而控制 MTX 血药浓度的高低和持续时间很重要。MTX 的测定方法较多, 有些方法无法区分 MTX 原药及其代谢产物, 结果影响 MTX 的测定。因此, 国外多采用具有较高特异性和灵敏度的高效液相色谱法同时测定 MTX 及其代谢产物 7-OH MTX, 具有操作简便、出峰较快、所需样品少等特点^[1]。本实验经紫外分光光度仪在 250~450 nm 范围内扫描, MTX 的最强吸收峰在 302 nm, 因此本法选择 302 nm 为检测波长。本实验中 MTX 与其代谢峰完全分离, 色谱分离理想, 标准曲线线性关系良好, 精密、准确、特异性强、回收率高, 对 MTX 进行个体化治疗具有重要意义。

参考文献:

- [1] 高仲阳, 徐彦贵. 治疗药物监测技术[M]. 北京: 化学工业出版社生物·医药出版分社, 2007: 5-108.
- [2] 吴莱文. 治疗药物监测[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 360.
- [3] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 16 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 732-733.

[收稿日期] 2010-07-01

高效液相色谱法测定奥硝唑脂质体凝胶的含量

李锐 (钟祥市人民医院, 湖北 钟祥 431900)

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱法测定奥硝唑脂质体凝胶中奥硝唑的含量。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Shim-pack CLG-TMS(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(30:70); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 315 nm; 柱温 30 °C; 流速 1 mL·min⁻¹。结果: 奥硝唑在 20.4~100.2 mg·

L^{-1} 浓度范围内线性关系良好, 平均回收率 99.60%, RSD 1.8%。结论: 该方法适用于测定奥硝唑脂质体凝胶的含量。

[关键词] 奥硝唑; 脂质体凝胶; 高效液相色谱法

[中图分类号] R917 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5213 (2011) 11-0952-02

奥硝唑(ornidazole, ONZ)是继甲硝唑和替硝唑之后的第 3 代硝咪唑类衍生物, 具有较强的抗厌氧菌、抗滴虫以及抗阿米巴原虫作用^[1], 目前应用于临床的主要有片剂、胶囊剂和注射剂等。脂质体是一种优良的局部给药载体, 其结构类似于细胞膜脂质双分子层的结构, 使其具备比较优良的生物相容性, 形成贮库能持久发挥药物的局部疗效, 奥硝唑脂质体凝胶能在阴道黏膜内分布均匀, 缓慢释放, 疗效持久。为满足临床需要, 将奥硝唑制成奥硝唑脂质体凝胶治疗阴道炎。奥硝唑的含量测定方法有紫外分光光度法和 HPLC 法^[2,3], 为消除空白凝胶基质的干扰, 本实验采用 HPLC 法测定奥硝唑脂质体凝胶的含量, 现报道如下。

1 材料

戴安 P680 高效液相色谱仪(美国); 乙腈为色谱纯; 甲醇为色谱纯; 奥硝唑对照品(含量 99.48%, 西安博华制药有限公司, 批号 091009); 奥硝唑脂质体凝胶(本院自制, 含量 5%), 其他试剂均为分析纯。

2 方法及结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Shim-pack CLC-TMS(6.0 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(30:70); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 315 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL; 理论塔板数以奥硝唑计算应不低于 2 000。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取干燥至恒重的奥硝唑对照品 10.02 mg 于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀得 100.2 mg · L⁻¹ 奥硝唑储备液, 精密量取 5.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 得 50.1 mg · L⁻¹ 对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取奥硝唑脂质体凝胶剂 1 g, 精密称定, 加入饱和氯化钠溶液 5 mL, 搅拌, 使卡波姆盐析完全, 加甲醇 70 mL, 超声 10 min, 使奥硝唑溶解完全, 用甲醇稀释至 100 mL。将上述溶液 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 精密吸取上清液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容。用 0.8 μm 微孔滤膜过滤, 取 20 μL 进样分析。色谱图如图 1。

2.4 回收率试验 取空白凝胶基质 1.0 g, 加入奥硝唑适量, 精密称定, 加入饱和氯化钠溶液 5 mL, 搅拌, 使卡波姆盐析完全, 加甲醇 70 mL, 超声 10 min, 使奥硝唑溶解完全, 用甲醇稀释至 100 mL。将上述溶液 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 精密吸取上清液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容。用 0.8 μm 微孔滤膜过滤, 取 20 μL 进样分析。记录峰面积, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 奥硝唑脂质体凝胶回收率结果(n=3)

Tab 1 The result of recovery test (n=3)

加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
40.12	39.84	99.30		
40.25	39.68	98.58		
50.33	50.54	100.42	99.60	1.8
50.29	49.74	98.91		
60.51	61.13	101.02		
61.28	60.89	99.36		

2.5 精密度试验 取奥硝唑对照品溶液 4.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 连续进样 6 次, 测定峰面积, RSD 为 0.8%。表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取奥硝唑对照品溶液 2.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 进样测定峰面积, RSD 为 1.9%。

2.7 重复性试验 取奥硝唑脂质体凝胶样品(批号 20100524), 按样品测定方法处理 6 份, 测定峰面积, 计算含量, RSD 为 1.3%。

2.8 样品含量测定 分别取 4 个批号的奥硝唑脂质体凝胶样品 1 g(约含奥硝唑 50 mg), 按 2.2.2 项方法配制, 取供试品溶液和对照品溶液分别进样 20 μL 分析。记录峰面积, 外标法计算样品含量, 结果见表 2。

表 2 奥硝唑脂质体凝胶样品含量

Tab 2 Content of ornidazole in gels

批号	相当于标示量的百分含量/%
20100524	98.8
20100610	99.7
20100611	100.3
20100708	102.6

3 讨论

3.1 流动相的选择 试验分别考察了甲醇-冰醋酸混合溶液、甲醇-三乙胺混合溶液、乙腈-水、甲醇-水混合溶液体系为流动相对奥硝唑分离测定的影响。结果表明, 以甲醇-水(30:70)溶液为流动相时, 峰形和分离效果良好, 保留时间适宜, 避免了奥硝唑药品中其他干扰物质产生的重叠或拖尾现象。

3.2 对脂质体的处理 实验过程中考察了饱和氯化钠对凝胶的沉淀效果, 先沉淀后超声提取使得理论板数、分离效果较好, 其准确度好, 精密度高, 重复性强, 符合中国药典规定的测定方法的各项指标要求。

参考文献:

[1] 罗新, 李爱斌, 徐顺先, 等. 奥硝唑治疗滴虫性阴道炎的临床应用[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(11): 682-683.
 [2] 徐传新, 易村健, 戴助, 等. 奥硝唑栓的研制及临床应用[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(6): 349-350.
 [3] 陈庆伟, 阮宝强. 高效液相色谱法测定奥硝唑胶囊中奥硝唑的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(4), 55.

[收稿日期] 2010-10-23

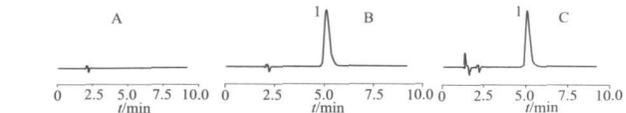


图 1 高效液相色谱图

A. 空白基质; B. 对照品; C. 样品; I: 奥硝唑

Fig 1 HPLC chromatograms of ornidazole

A. blank; B. control; C. sample; I: ornidazole

2.3 标准曲线的制备 精密量取奥硝唑对照品贮备液 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度进样, 记录峰面积。以奥硝唑浓度(C)对峰面积(A)进行线性回归, 回归方程为: $A = 3.729C + 0.2009$, $r = 0.9999$, 奥硝唑在 20.4~100.2 mg · L⁻¹ 范围内其浓度与峰面积线性关系良好。