

反相离子对高效液相色谱法测定人血浆中阿昔洛韦浓度及药代动力学

赵飞浪 罗楠 袁倚盛

(南京军区南京总医院检验科仪器分析室, 210002)

摘要 建立了用反相离子对高效液相色谱法测定人血浆中阿昔洛韦浓度的方法。色谱柱采用 Alltech C₁₈ 分析柱, 以 0.04 mol/L 氯化钠-甲醇-IPR-B7 离子对色谱试剂混合液(100:15:0.6, v/v) 为流动相。检测波长为 254 nm, 肾上腺素为内标。血浆样品经高氯酸沉淀蛋白后直接进样测定。阿昔洛韦浓度在 40~1600 ng/ml 范围内线性良好, $r=0.9992$ 。测定含阿昔洛韦 160 ng/ml 的血浆样品, 其日内($n=7$) 及日间的 RSD 分别为 4.7% 和 3.0%。平均回收率为 $98.2 \pm 5.3\%$ 。测定了 10 名健康志愿者单次口服阿昔洛韦片剂 400 mg 后不同时间的血药浓度并计算了有关的药代动力学参数。

关键词 阿昔洛韦; 反相离子对高效液相色谱; 药代动力学

阿昔洛韦(acyclovir) 又名无环鸟苷, 是一种新型的抗病毒药, 临床上主要用于治疗水痘、单纯疱疹病毒引起的皮肤和粘膜感染。尚用于治疗乙型肝炎^[1,2]。因其血药浓度很低, 且又为水溶性, 测定较困难。国内外已有文献报道采用反相高效液相色谱法^[3,4] 测定人血浆中的阿昔洛韦浓度。但大多采用外标法, 且需较复杂的样品前处理, 测定速度也较慢。本文采用反相离子对高效液相色谱法测定人血浆中的阿昔洛韦浓度, 以肾上腺素为内标, 高氯酸沉淀蛋白后直接进样, 6 min 即可完成一个样品的测定, 且结果准确, 灵敏度高。通过对 10 名健康志愿者单次口服阿昔洛韦片剂后的药代动力学研究显示, 所求得的药动学参数和血药浓度均与文献基本相符^[5]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

450 型高压平流泵和 UV-200 型紫外分光检测器(南京分析仪器厂); 3066 型记录仪

(岛津)。阿昔洛韦片(湖北省医药工业研究所科益药厂); 批号 950405。庚磺酸钠: IPRB7 离子对色谱试剂(天津市化学试剂二厂)。其他试剂均为分析纯级, 水为二次蒸馏水。

阿昔洛韦对照液: 精确称取经 105℃ 烘干至恒重的阿昔洛韦(广东汕头金石制药总厂提供) 40.0 mg, 溶于甲醇 200.0 ml 作为贮备液; 再用甲醇稀释至 20 µg/ml 作为供试液。均保存在 4℃ 冰箱。

内标贮备液: 精确称取肾上腺素(FLUKA, 瑞士) 50.0 mg, 溶于 0.1 mol/L 盐酸 50.0 ml, 包以黑纸 4℃ 冰箱保存。

蛋白沉淀液: 取内标贮备液 0.75 ml, 用 3.5 mol/L 高氯酸稀释至 10.0 ml(当天用)。

1.2 色谱条件

色谱柱: 4.6 mm × 250 mm Alltech C₁₈, 5 µm (淮阴精细化工研究所); 流动相: 0.04 mol/L 氯化钠-甲醇-IPR-B7 离子对色谱试剂(100:15:0.6, v/v); 使用前以 0.45 µm 溶剂过滤器减压过滤; 流量: 1.0 ml/min, 进样 20 µl; 检测波长: 254 nm; 灵敏度: 0.01

收稿日期 1996 08 18

AUFS。

1.3 样品处理

取血浆样品 0.5 ml 于 1 ml 塑料离心管内,加入蛋白沉淀液 0.2 ml(含内标 15 μg),振荡后离心 10 min(15000 r/min),取上清液进样测定。

2 实验结果

2.1 色谱行为

在选定的色谱条件下,测定对照品及血浆样品的色谱图(图 1),在 6 min 内即可完成一次分析过程,且阿昔洛韦及内标与血浆中的杂质分离良好。

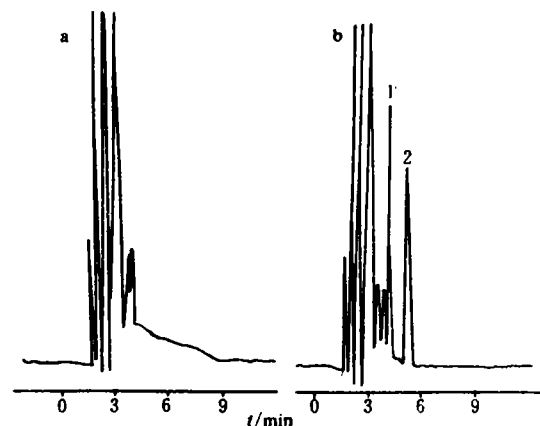


Fig 1. Chromatograms of acyclovir in (a) blank plasma; (b) a plasma sample. Peak 1. acyclovir, $t_R = 4.22$ min; Peak 2. internal standard, $t_R = 5.35$ min

2.2 标准曲线及检测限

于空白血浆中加入阿昔洛韦对照品溶液,使其浓度分别为 40, 80, 160, 320, 640, 1000, 1600 ng/ml,按前述方法处理,色谱分离,计算样品峰高(H)与内标峰高(H_i)的比值(H/H_i),此值与样品浓度(C , ng/ml)的回归方程为 $C = 917.3H/H_i + 8.3$, $r = 0.9992$ 。最低检测浓度 20 ng/ml($S/N \geq 2$)。

2.3 重现性试验

配制含阿昔洛韦 160, 640, 1600 ng/ml 三个浓度的血浆样品各 7 份,同日处理进行

测定,计算日内误差;后共 7 天测定算出日间误差。结果,以上三个浓度的日内 RSD ($n = 7$)分别为 4.7%, 2.5% 和 8.5%;日间 RSD ($n = 7$)分别为 3.0%, 8.3% 和 3.6%。

2.4 方法的回收率

分别于空白血浆 0.5 ml 中加入阿昔洛韦对照品,使其浓度为 160, 640, 1600 ng/ml,按前述方法处理测定后,分别与同浓度对照品及内标溶液直接进样的峰高进行比较,具回收率分别为 $98.8 \pm 5.7\%$, $98.2 \pm 5.3\%$ 和 $100.7 \pm 5.3\%$ ($n = 7$);内标的回收率为 $98.3 \pm 2.2\%$ ($n = 7$)。

2.5 正常人口服阿昔洛韦后的药代动力学

选健康男性志愿者 10 名,年龄 24.3 ± 1.2 岁;体重 62.7 ± 4.9 kg,均经体检证明肝、心和肾功能正常,试验前一周末服任何药物。受试时禁烟、禁酒并统一伙食。晨起空腹 1 次口服阿昔洛韦片剂 400 mg (4×100 mg),分别于服药前及服药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 h 各取血 2 ml (肝素抗凝)。离心 15 min (2500 r/min),分离血浆后按样品处理项下处理测定。结果用 PKBP-N1 药代动力学程序对 10 名受试者药时数据分别进行处理,其药-时曲线符合一房室开放模型(图 2),药代动力学参数见表 1。

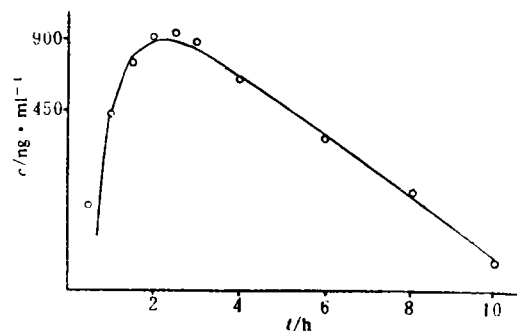


Fig 2. Plasma concentration-time curve of acyclovir after a single oral dose 400 mg ($n = 10$)

3 讨论

3.1 色谱条件选择

Tab 1. Pharmacokinetic parameters of acyclovir after a single oral dose 400 mg ($n=10$)

Parameters	Values	SD
K_a, h^{-1}	1.04	0.39
K, h^{-1}	0.31	0.04
$T_{0.5}, h$	2.2	0.3
V_c/F	308.6	137.9
$C_{max}, ng/ml$	854.2	226.5
T_p, h	2.3	0.3
$AUC_{0-\infty}, h \cdot ng/ml$	4785	1362

文献报道流动相大多采用 4% 甲醇体系^[3,4,6], 此时阿昔洛韦保留时间长, 且 pH 对阿昔洛韦的 K' 值影响不大, 保留时间只靠甲醇含量单向调节, 峰形相对也较差, 影响检测速度和灵敏度。在流动相中加入适量的 IPR-B7 离子对色谱试剂后即成为离子对色谱^[7], 同时阿昔洛韦有较强的离子效应, 故此时阿昔洛韦的保留时间对离子强度有很高的敏感性。此时加大甲醇含量和离子强度均能使阿昔洛韦出峰时间提前, 这样保留时间可进行双向选择, 易实现快速分离的目的。同时, 采用离子对色谱可使阿昔洛韦的色谱峰明显变窄而使峰高增加, 间接地提高了检测的灵敏度。实验显示: 流动相中氯化钠、离子对试剂和甲醇含量三者的比例对阿昔洛韦及内标的峰形影响极大。采用本方法的流动相时, 阿昔洛韦能与内标及血浆中的内源性杂

质之间较好的分离, 且分析速度快, 峰形也很窄。

3.2 提取条件的选择

采用液-液萃取和液-固萃取均难有理想的回收率^[3], 采用硫酸铝和氢氧化钡沉淀蛋白的方法报道较多^[3,4], 此法操作烦琐, 且样品最终的稀释度较大而影响测定的灵敏度。本文采用较高浓度的高氯酸去蛋白, 可减少用量而降低样品的稀释度。另外内标肾上腺素虽为内源性物质, 但人血浆中的含量极低, 正常人在 1 ng/ml 以下, 异常病人也不超过 10 ng/ml, 故不会因此而带来误差。

参考文献

- 1 梅旭辉, 张 宪. 阿昔洛韦的临床应用. 医药导报, 1993, 12(1): 45
- 2 陈新谦, 金有豫主编. 新编药理学: 第十三版. 北京: 人民卫生出版社, 1992. 122
- 3 Land G, Bye A. Simple high-performance liquid chromatographic method for the analysis of 9-(2-hydroxyethoxy-methyl)guanine (acyclovir) in human plasma and urine. *J Chromatogr, Biomed Appl*, 1981, 224(1): 51
- 4 张 弛, 董善年. 反相高效液相色谱法测定人血浆中阿昔洛韦浓度. 药事学报, 1993, 28(8): 629
- 5 柳晓泉, 邹巧根, 杨建国等. 国产阿昔洛韦片的相对生物利用度. 中国药理学杂志, 1995, 30(1): 35
- 6 金克宁, 陈仲有. 阿昔洛韦在乙肝患者体内的药代动力学. 中国药理学杂志, 1995, 30(7): 419
- 7 邹汉法, 张玉奎, 卢佩章. 离子对高效液相色谱法. 郑州: 河南科学技术出版社, 1994. 5

Determination of Acyclovir in Human Plasma by Ion-Pair RP-HPLC and Its Pharmacokinetics Study

Zhao Feilang, Luo Nan, Yuan Yisheng

General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002

Abstract A simple, rapid and accurate ion-pair RP-HPLC method was developed for the determination of acyclovir in human plasma. The analytical column was packed with Alltech- C_{18} . The mobile phase was 0.04 mol/L sodium chloride-methanol-IPR-B7 agent (100 : 15 : 0.6, v/v). The plasma sample was injected directly into the HPLC system after precipitating the proteins with perchloric acid. The compounds were quantitated using an ultraviolet detector operated at 254 nm which allowed the determination of 40~1600 ng/ml of acyclovir with reproducibility. The limit of detection was 20 ng/ml. Intra-day and inter-day RSD for assaying the plasma sample containing 160 ng/ml concentration of acyclovir was 4.7% ($n=7$) and 3.0% ($n=7$), respectively. The mean recovery was 98.2%. The pharmacokinetics of acyclovir in ten healthy volunteers after oral administration of 400 mg was studied.

Key words Acyclovir; Ion-pair NP-HPLC; Pharmacokinetics