

反相高效液相色谱法测定血浆中两性霉素 B 浓度*

谢奇峰 唐细兰 宋湘芝 赵志新(广州 510630 中山医科大学附属第三医院)

摘要 目的:采用反相高效液相色谱法测定两性霉素 B(AMB)的血药浓度,用于该药的治疗药物监测。方法:在 ODS - Hypersil C₁₈柱上,以 0.005 mol/L EDTA - 2Na 溶液 - 甲醇(2:8v/v)为流动相,流速为 1.5 ml/min,检测波长为 380 nm,测定血中 AMB 浓度。结果:AMB 保留时间为 3.85 min,在 0.125 - 4.0 μg/ml 之间有较好的线性范围, $r=0.9998$,最低检测浓度为 0.06 μg/ml,AMB 样品日内精密度和日间精密度均小于 3.5%,平均方法回收率 99.4%。结论:本方法专一性强,回收率高,样品保留时间短,适用于临床 AMB 的治疗药物浓度监测。

关键词 两性霉素 B;高效液相色谱法;血药浓度

Determination of amphotericin B in human plasma by reversed - phase HPLC

Xie Qifeng(Xie QF), Tang Xilan(Tang XL), Song Xiangzhi(Song x2H et al(*The Third Affiliated Hospital of Sun Yatsen University of Medical Sciences, Guangzhou 510640*))

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a reversed - phase HPLC assay to monitor the plasma concentration of Amphotericin B. **METHOD:** Amphotericin B was separated on ODS - Hypersil C₁₈ column and detected at UV380 nm, using 0.005 mol/L EDTA - 2Na - methanol(2:8, v/v) as mobile phase, and the flow rate was 1.5 ml/min. **RESULTS:** The retention time of Amphotericin B was 3.87 min and the standard curve was linear over the range of 0.125 ~ 4.0 μg/ml, the correlation coefficient was 0.9998, the lowest detectable concentration was 0.06 μg/ml, the

* 广东省科委重点攻关资助项目(9737)

coefficient variation of within and between - day were less than 3.5 %, and the average recovery of the method was 99.4 % . **CONCLUSION:** The method is sensitive and specific with high recovery rate and short retention time . It is suitable to monitor the plasma drug concentration in clinical Amphotericin B therapy

KEY WORDS HPLC , amphotericin B , Plasma concentration

两性霉素 B(Amphotericin B, AMB) 是一种多烯类抗真菌抗生素, 为抗深部真菌感染药, 可引起多种肾损害, 发生率高, 剂量较大时尚可导致不可逆急性肾衰的可能^[1]。AMB 的肾毒性与其血中浓度有一定关系, 所以应监测血浆中 AMB 的浓度, 以便在治疗过程中调整其用量, 减少对肝、肾等的毒性。目前测定血浆中 AMB 浓度是采用 HPLC 法, 但文献^[2]报道的方法, AMB 的保留时间长, 峰宽, 血浆杂质峰多, 流动相采用乙腈毒性大。本研究采用反相高效液相色谱法, AMB 保留时间短、快速、简便、灵敏度高。

1 仪器与药品

1.1 仪器

美国 Spetra - physics Sp8810 高效液相色谱仪(美国光谱物理公司), Sp100 可变波长检测器及 Sp4270 积分仪, 80 - 2 离心沉淀器(上海手术器械厂), XW - 80 型旋涡器(上海医科大学仪器厂), TGL - 16G 台式高速离心机, CX - 100 超声波清洗器, - 20℃ 冰箱。

1.2 试剂及药品

AMB 标准品(中国药品生物制品厂提供), EDTA - 2Na、二甲亚砜为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 色谱条件 ODS - Hypersil C₁₈ 柱(5μm, 46mm × 250mm), 流动相为 0.005 mol/L EDTA - 2Na 溶液 - 甲醇(2:8, v/v); 流速 1.5 ml/min; 检测波长 380nm; 进样 10μl; 灵敏度 0.01 AUFS; 衰减 16。

2.1.2 标准曲线的建立 精密称取 AMB 25 mg, 以二甲亚砜为溶剂(二甲亚砜先用 0.5μm 微孔滤膜过滤), 并定容于 25 ml 容量瓶, 配成浓度为 1 mg/ml 的溶液, 再用乙腈稀释标准液浓度分别为 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 4.0 μg/ml。准确吸取空白血浆 0.4 ml, 分别加入上述不同浓度的标准液 0.4 ml, 旋涡混合 30s, 放置 5 min, 以 13000r/min 离心 5 min。取上清液, 并用 0.5μm 微孔滤膜过滤, 进样 10μl。

2.1.3 血样处理 准确吸取血浆 0.4 ml 于试管中, 加入乙腈 0.4 ml, 旋涡混合 30s 后放置 5 min, 以 13000r/min 离心 5 min, 取上清液进样, 上清液须用 0.5μm 微孔滤膜滤过, 进样 10μl。

2.2 结果

2.2.1 色谱行为 在此条件下, 空白血浆经沉淀后的色谱峰对 AMB 色谱峰无干扰, AMB 保留时间为 3.85 min, 图 1。

2.2.2 线性关系 以 AMB 浓度为 X 轴, AMB 峰面积为 Y 轴, 直线回归方程 $y = 5.9017x + 0.2944$, $r = 0.9998$ 。线性范围为 0.125 ~ 4.0 μg/ml, 最低检测浓度为 0.06 μg/ml, 图 2。

2.2.3 回收率测定 方法回收率: 空白血浆中加入 AMB 标准储备液使成 4.0, 1.0 和 0.125 μg/ml 浓度的样品, 按上述血

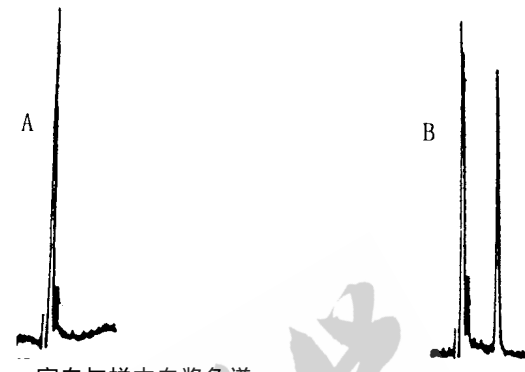


图 1 空白与样本血浆色谱
A - 空白血浆色谱; B - 样本血浆色谱; AMB 保留时间 3.85 min

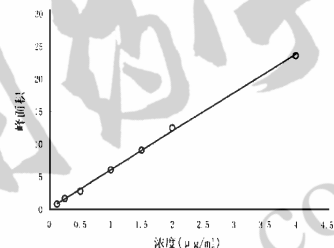


图 2 血浆中 AMB 的标准曲线
样预处理后进样, 每种浓度重复测定 5 次, 由标准曲线求出各样品的浓度与已知加入浓度相比, 计算方法回收率。绝对回收率: 配制 3 个浓度的 AMB 液(分别含 AMB 4.0, 1.0, 0.125 μg/ml), 直接进样 10μl, 其峰面积作为对照组峰面积。另取 3 份空白血浆, 加入适量标准储备液, 配成含 AMB 4.0, 1.0 和 0.125 μg/ml 的浓度, 各取 5 份, 按上述血样处理, 进样 10μl, 将所得峰面积与对照组相应浓度峰面积比较, 计算绝对回收率。每种浓度重复测定 5 次, 回收率结果见表 1。

2.2.4 精密度测定 将其 4.0, 1.0 和 0.125 μg/ml AMB 三种浓度的血样贮存于 - 20℃ 冰箱, 分别于一天内($n = 5$)和一周内($n = 5$)分散测定, 求算日内精密度和日间精密度, 结果变异系数均小于 3.5 %, 见表 1。

表 1 AMB 回收率和精密度/ $n = 5$

投药量 / μg · ml ⁻¹	方法回收率 / %	绝对回收率 / %	日内精密度 / %	日间精密度 / %
4.0	100.3 ± 2.3	97.2 ± 2.6	0.97	1.38
1.0	99.5 ± 3.1	96.6 ± 1.5	1.45	2.65
0.125	98.4 ± 3.7	91.3 ± 3.2	2.85	3.45

2.2.5 干扰试验 对 AMB 使用者可能使用的药物头孢噻肟、羟氨苄青霉素、头孢唑啉、先锋必、亚胺培南 - 西拉司丁钠、氟胞嘧啶、氟康唑的保留时间进行测定, 均无干扰。

2.2.6 我院 8 例隐球菌性脑膜炎患者 AMB 按 0.6 ~ 0.8 mg/kg/d 静脉给药时, 未加 AMB 鞘内注射, 血浓度达到 3.8 μg/ml

时,脑脊液(CSF)中仍测不到 AMB 浓度。

3 讨 论

3.1 根据上述资料表明,本方法灵敏度高,专一性强,线性范围广,重现性可靠,回收率高,适应于临床 AMB 治疗药物浓度监测。

3.2 由于 AMB 血浆蛋白结合率约为 80%,在样品处理时样品与乙腈混合物必须于室温条件下放置 5 min 左右,以保证混合物中蛋白沉淀完全,并利于 AMB 提取完全。

3.3 由于 AMB 对光、热等较敏感,故在整个实验操作中应尽量避免光,样品亦应于 - 20°C 冷藏,以保证实验结果的准确性。

3.4 流动相采用 0.005 mol/L EDTA - 2Na 溶液 - 甲醇(2:8 v/v)比例时 AMB 峰尖,并且与血浆杂质峰分离好,保留时间短。

3.5 为了避免出现不必要的杂质峰的干扰,二甲亚砆和进样时的上清液应用 0.5 μ m 微孔滤膜滤过,保证色谱峰图的美

观和易于辨认。

3.6 ABM 静脉给药未加鞘内注射时,血浓度达到较高值,CSF 仍测不到药物浓度。因 AMB 不易透过血脑屏障,即使脑膜有炎症时,CSF 中 AMB 仍不能达到有效水平,更检测不出 AMB 浓度^[3],因此对隐球菌性脑膜炎 AMB 在静脉给药的同时,须加鞘内注射。

参考文献

- 1 戴自英.实用抗菌药理学.上海:上海科学技术出版社,1994:246.
- 2 刘松青,马文秀,董慧,等.高效液相色谱法测定生物样品中两性霉素 B.中国医院药学杂志,1996,16(9):389.
- 3 徐叔云.现代实用临床药理学.北京:华夏出版社,1997:95.

收稿日期:1999 - 10 - 22