

- using real-time polymerase chain reaction assays in dried blood spots[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(5): 575-581.
- [8] Pass RF. Dried blood spots and universal newborn screening for congenital cytomegalovirus infection[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(5): 582.
- [9] Brytting M, Wahlberg J, Lundeberg J, et al. Variations in the cytomegalovirus major immediate-early gene found by direct genomic sequencing[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 955-960.
- [10] Jiwa N, Van Gemert G, Raap A, et al. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction[J]. Transplantation, 1989, 48(1): 72.
- [11] Gohring K, Dietz K, Hartleif S, et al. Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards[J]. J Clin Virol, 2010, 48(4): 278-281.
- [12] 陈智平, 蔡豪斌, 何雨, 等. 人巨细胞病毒在广西不同人群中的感染情况及其与肾脏疾病关系的初步研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(3): 196-198.
- [13] Binda S, Mammoliti A, Primache V, et al. Pp65 antigenemia, plasma real-time PCR and DBS test in symptomatic and asymptomatic cytomegalovirus congenitally infected newborns[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 24.
- [14] 邹广发. AGCU 免提取 STR 荧光检测试剂盒的验证[J]. 刑事技术, 2010, 12(3): 23-25.
- [15] Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, et al. Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 943-946.

(收稿日期: 2011-12-03)

## • 检验技术与方法 •

# HPLC 法测定人血中阿莫西林的方法学研究

肖正华, 刘 明, 郭嘉伟, 曹文轩, 管 潇, 张 莉, 张惠静

(第三军医大学药物分析与分析化学教研室, 重庆 400038)

**摘 要:**目的 建立一种实用的 HPLC 法用于人血中阿莫西林含量测定。方法 采用含 1% 磷酸的甲醇溶液沉淀蛋白, 高效液相色谱法测定。以替硝唑为内标, 色谱柱为 Waters XBridge C18, 150 mm×4.6 mm, waters 保护柱; 流动相为: 甲醇: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾 (pH2.3)=16: 84, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30℃, 检测波长为 225 nm。结果 血浆内源性物质对样品测定没有干扰。阿莫西林的线性范围为 0.25~32.0 μg/mL ( $r=0.9999$ )。阿莫西林以及替硝唑各浓度点的稳定性实验的 RSD 均小于 15%。结论 该方法样品处理简便, 结果准确, 灵敏度较高, 可用于人血浆中阿莫西林含量的测定以及阿莫西林药代动力学研究。

**关键词:** 阿莫西林; 色谱法, 高压液相; 血浆; 药代动力学

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.16.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)16-1992-02

阿莫西林 (amoxicillin, Am) 为  $\beta$  内酰胺类抗菌药物, 对革兰阳性菌和阴性菌都有高效杀菌作用。近年来, 对阿莫西林制剂、血样中含量测定的方法屡有报道<sup>[1-5]</sup>, 人血中阿莫西林的含量测定多采用 HPLC 法, 运用阿莫西林具有酸碱两性的特点, 在 HPLC 测定中, 酸碱两性流动相都曾有人采用<sup>[4]</sup>。但随着抗菌药物的应用泛滥, 人体中残留的各种抗菌药物严重影响血浆中阿莫西林的含量测定, 以前可用的测定方法很难再用。本实验拟建立一种实用的准确、简便、快速的 HPLC 法, 用于测定血浆中阿莫西林的药浓度, 为阿莫西林药代动力学研究提供有益的参考。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器** LC-20AB 高效液相色谱仪, SPD-M20A 紫外检测器, CTO-10AS 柱温箱皆为日本岛津公司生产; Simplicity 纯水仪 (密理博); HC-254 高速离心机 (科大创新); XS-205 分析天平 (梅特勒, 德国)。

**1.2 试药** 阿莫西林对照品, 批号 130409-201011, 中国药品生物制品检定所; 替硝唑对照品, 批号 100336-200703, 中国药品生物制品检定所; 甲醇, 色谱纯, MERCK 公司 (德国); 磷酸、磷酸二氢钾皆为分析纯, 成都科龙化工试剂厂; 水为密理博超纯水。

## 1.3 方法

**1.3.1 色谱条件** 色谱柱: Waters XBridge C18, 4.6 mm×150 mm, waters 保护柱; 流动相为: 甲醇: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾 (pH2.3)=16: 84, 流速为 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 进样

量: 20 μL; 检测波长为 225 nm。

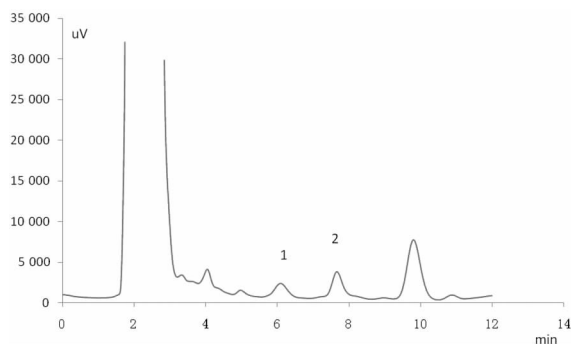
**1.3.2 标准溶液的配制** 精密称取阿莫西林对照品适量, 用 5% 甲醇溶液溶解, 配制 1 280 μg/mL 标准溶液, 再用 5% 甲醇倍比稀释成 320、160、80、40、20、10、5、2.5 μg/mL 系列标准溶液。精密称取替硝唑对照品适量, 用 5% 甲醇溶液溶解, 配制 800 μg/mL 标准溶液, 再稀释成 80 μg/mL 标准溶液备用。

**1.3.3 血浆样品的处理** 精密量取血浆样品 450 μL 于 1.5 mL 离心管中, 再加入阿莫西林标准溶液和 80 μg/mL 替硝唑标准溶液各 50 μL, 旋涡混匀, 再加入 450 μL 含 1% 磷酸的甲醇溶液, 旋涡振荡 1 min, 18 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 20 μL 进样。用内标法计算阿莫西林的含量。

## 2 结 果

**2.1 专属性** 在上述色谱条件下, 测得空白人血浆、阿莫西林+内标+血浆等色谱图, 见图 1。由图 1 可见血浆中杂质不干扰阿莫西林和内标的测定。阿莫西林保留时间约为 6.23 min; 内标替硝唑的保留时间约为 7.69 min。

**2.2 标准曲线** 将 1.3.2 所配阿莫西林系列标准溶液各取 50 μL, 与 450 μL 空白血浆混合, 即得 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 μg/mL 的阿莫西林系列标准血浆样品, 每个浓度平行 3 份, 按“1.3.3”项下处理, 测定。得标准曲线  $Y=0.1958X-0.02253$ , 0.25~32.0 μg/mL 范围内线性关系良好 ( $r=0.9999$ )。



阿莫西林(4.0  $\mu\text{g/mL}$ ) + 替硝唑(8.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 血浆样品; 1: 阿莫西林( $t_R=6.23$  min); 2: 替硝唑( $t_R=7.69$  min)。

图 1 阿莫西林血浆样品色谱图

**2.3 精密度实验** 配制低、中、高 3 个浓度(0.5、4.0、16.0  $\mu\text{g/mL}$ , 下同)的阿莫西林血浆溶液各 6 份, 按“1.3.3”项下处理, 在一个工作日内分别测定。考察日内精密度, 其 RSD 分别为 12.58%、3.98% 和 1.84%。并考察日间精密度, 其 RSD 分别为 9.44%、4.10% 和 7.57%。

**2.4 回收率实验** 配制低、中、高 3 个浓度的阿莫西林血浆溶液各 6 份, 按“1.3.3”项下处理, 测定阿莫西林含量以及阿莫西林和替硝唑峰面积, 计算其方法回收率分别为 93.53%、101.81% 和 104.95%。配制 0.25、2.0、8.0  $\mu\text{g/mL}$  阿莫西林标准溶液以及 4.0  $\mu\text{g/mL}$  替硝唑标准溶液, 每个浓度平行 6 份, 测定其峰面积, 计算平均值, 以对应血浆药物浓度峰面积值除以标准溶液峰面积平均值计算得提取回收率。得低、中、高浓度阿莫西林和替硝唑的提取回收率分别为 79.78%、89.32%、90.77% 和 95.33%。

**2.5 标准溶液室温放置稳定性实验** 配制低、中、高 3 个浓度的阿莫西林和 8.0  $\mu\text{g/mL}$  的替硝唑标准溶液于室温放置 0、2、4、6、24 h 后进行测定, 每个浓度平行 3 份。计算各浓度试样的峰面积的平均值得 RSD 分别为 4.90%、4.50%、4.41% 和 3.88%。

**2.6 血浆样品室温放置稳定性实验** 配制低、中、高 3 个浓度的阿莫西林血浆溶液各 15 份, 于室温放置 0、2、4、6、24 h 后按“1.3.3”项下处理, 测定, 每个浓度平行 3 份。计算 RSD 分别为 10.32%、8.16% 和 10.01%。

**2.7 血浆样品处理后室温放置稳定性实验** 配制低、中、高 3 个浓度的阿莫西林血浆溶液各 3 份, 按“1.3.3”项下处理, 于室温放置 0、2、4、6、24、48 h 后进样测定。发现 24 h 后, 峰形变差, 估计阿莫西林有分解现象, 建议血浆样品处理后需在 6 h 内测定完毕。计算 6 h 内的 RSD 分别为 13.66%、8.55% 和 10.35%。

**2.8 血浆样品-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存稳定性实验** 配制低、中、高 3 个浓度的阿莫西林血浆溶液各 21 份, -80  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存, 于 1、3、5、7、14、21、30 d 后取出按“1.3.3”项下处理测定, 每个浓度平行 3 份。21 d 后浓度下降为标示量的 80% 以下, 可知, 血浆样品在 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱至少能保存 14 d, 计算 RSD 分别为 12.03%、10.20% 和 6.13%。

**2.9 冻融实验** 配制低、中、高 3 个浓度的阿莫西林血浆溶液各 12 份, -80  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱保存, 于 0、24、48、72 h 后全部取出解冻, 各浓度溶液各取 3 份按“1.3.3”项下处理, 测定(剩余血样复冻)。考察冻融 1、2、3 次稳定性, 其 RSD 分别为 3.96%、3.62% 和 1.83%。血样反复冻融 3 次对样品没有影响。

### 3 讨论

在阿莫西林的结构中既有氨基又有羧基, 因此其具有两性化合物的性质。对阿莫西林的检测方法早期曾有微生物效价测定法、碘量法、电位滴定法、旋光法、分光光度法、流动注射化学发光法等报道。阿莫西林结构中含有氨基苄基, 具有特征的紫外吸收, 目前各国药典均已应用高效液相色谱法对其进行鉴别、杂质检查、含量测定等质量控制。因此, 近年来对阿莫西林的测定用得最多的还是 HPLC 法<sup>[2-8]</sup>。

随着抗菌药物的应用泛滥, 人体中残留的各种抗菌药物严重影响人血浆中阿莫西林的含量测定, 以前好用的测定方法现在不一定能用。本实验曾采用乙腈沉淀法、冷冻甲醇沉淀法、高氯酸沉淀法、固相萃取法等方法<sup>[9-11]</sup>来处理血样, 缓冲液也曾选用了 3.0、4.0、5.0、6.8、7.2 等 pH 值, 也曾应用了多种色谱柱进行分离, 但始终有干扰存在, 均得不到理想的结果, 最后选用了 Waters 的 XBridge C18(pH 耐受 1~12) 杂化柱, 缓冲液 pH 值低至 2.3 才得到理想的分离。在血样的处理方面, 我们在甲醇中加入一定量的磷酸使呈酸性, 一方面使处理后的试样与流动相的 pH 值尽量相近, 另一方面磷酸的加入对峰形的改善非常明显。预柱的使用对色谱柱的保护作用也很明显, 但由于流动相比比例偏大, 也不可忽视色谱柱的降低。

本实验运用 HPLC 法测定人血浆中阿莫西林含量, 其方法研究严格按照国家新药申报指导原则的要求进行, 不但考察了阿莫西林的日内、日间精密度和提取回收率, 还考察了其在各种情况下的稳定性。结果表明, 本方法样品处理简便, 结果准确, 灵敏度较高, 可用于人血浆中阿莫西林含量的测定以及阿莫西林药代动力学研究。

### 参考文献

- [1] Li W. Concentration determination of amoxicillin granules by HPLC[J]. Anhui Med Pharm, 2002, 6(1): 60-61.
- [2] 叶淑华, 赵菲. HPLC 测定人血浆中阿莫西林含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(3): 239-240.
- [3] 朱正飞, 尚启平, 李见春. RP-HPLC 法测定人血清中阿莫西林浓度及应用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2008, 8(10): 753-755.
- [4] 侯芳, 张朴, 刘燕, 等. 阿莫西林/克拉维酸钾片在健康人体的药代动力学与药效学[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(1): 40-43.
- [5] 夏伦祝, 谢林, 刘晓东. 阿莫西林胶囊的人体药代动力学及相对生物利用度研究[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(4): 377-379.
- [6] 张梦军, 张惠静, 管潇, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中双氯西林和阿莫西林的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 228-231.
- [7] 杨伶俐, 徐帆, 刘红艳. 高效液相色谱法测定人血浆中阿莫西林含量[J]. 中国药师, 2008, 11(8): 930-932.
- [8] 黄英, 邹远高, 梁茂植, 等. 柱切换 HPLC 法同时测定人血浆中阿莫西林和克拉维酸浓度[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(5): 279-281.
- [9] 孟玲, 王永庆, 张静, 等. 阿莫西林颗粒剂人体生物利用度及生物等效性研究[J]. 药学与临床研究, 2008, 16(1): 29-31.
- [10] 谭力, 周继红, 罗楠, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中阿莫西林浓度及药代动力[J]. 药学学报, 1997, 32(7): 558-560.
- [11] Krauwinkel WJ, Volkers Kamermans NJ, van Zijtred J. Determination of amoxicillin in human plasma by high performance liquid chromatography and solid phase extraction[J]. J Chromatogr, 1993, 617(2): 334-338.

(收稿日期: 2011-12-11)