

HPLC 法测定大鼠血浆中甲硝唑的浓度

赵春梅¹⁾, 杨和金¹⁾, 苏梅¹⁾, 蔡曼玲²⁾, 徐红花¹⁾, 毛勇¹⁾

(1) 云南省药物研究所, 云南昆明 650111; 2) 昆明市第一人民医院, 云南昆明 650011)

[摘要] **目的** 建立大鼠血浆中甲硝唑浓度测定的 HPLC 法. **方法** 选用 Agilent Zorbax Eclipse XDB - C18 色谱柱, 流动相为甲醇 - 乙腈 - 水 - 冰乙酸 (10:10:80:0.1), 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 317 nm, 柱温 25 °C, 以替硝唑作内标物. **结果** 甲硝唑的线性范围为 1 ~ 1 000 mg/L, 呈良好的线性关系 ($r = 0.9969$), 在低、中、高 3 个质量浓度的准确度分别为 99.69%、96.35%、101.2%. RSD 分别为 0.3%、6.92%、8.66%, 其日内、日间精密度 $\leq 15\%$. **结论** 可用于甲硝唑在大鼠体内的药物动力学研究.

[关键词] 甲硝唑; 大鼠; 血浆; 药物动力学; 高效液相色谱

[中图分类号] R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 05 - 0040 - 03

Determination of Metronidazole in Rat Plasma by High-performance Liquid Chromatography

ZHAO Chun - mei¹⁾, YANG He - jin¹⁾, SU Mei¹⁾, CAI Man - ling²⁾, XU Hong - hua¹⁾, MAO Yong¹⁾

(1) Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming Yunnan 650111; 2) The First People's Hospital of Kunming, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To develop a method for determination of metronidazole and tinidazole in rat plasma.

Methods A Agilent Zorbax Eclipse XDB - C18 column was used at column temperature of 25 °C, and the mobile phase contained methanol-acetonitrile-water-acetic-acid (10:10:80:0.1, V:V), with tinidazole as the internal standard. The analyte was determined by UV at 317 nm. **Results** Metronidazole show good relation at range of 1 ~ 1 000 mg/L ($r = 0.9969$), the accuracy of metronidazole were 99.69%, 96.35%, 101.2%. RSD were 0.3%, 6.92%, 8.66%. The precision RSD was less than 15%. **Conclusions** The method has been proved to be a simple and sensitive method with good precision and accuracy. It is suitable for studying pharmacokinetics of metronidazole in rats

[Key words] Metronidazole; Rat; Plasma; Pharmacokinetics; HPLC

甲硝唑 (Metronidazole) 为抗滴虫药与抗厌氧菌药^[1], 广泛应用于治疗毛滴虫感染、阿米巴病和其他原虫感染, 对幽门螺旋杆菌亦有抗菌作用; 对厌氧菌具有选择性抗菌活性, 是临床用于治疗 and 预防厌氧菌感染的基本药物^[2]. 因此, 建立甲硝唑的血药浓度的分析方法具有重要的实际意义. 目前, 有关甲硝唑的血药浓度的测定已有文献报道, 但在所报道的方法中, 存在分离效果不理想^[3-9]、线性范围窄^[3-6]、操作复杂^[3-9]、费用高^[9]等问题. 笔者建立了测定大鼠血浆甲硝唑浓度的高效液相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC),

进行了全面的分析方法学确证, 符合当前生物样品分析的要求^[10], 具有简单、方便、实用、准确的特点.

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

高效液相色谱仪: Agilent1100 高效液相色谱仪由 G1311A 四元梯度泵、G1379A 在线脱气机、G1316A 柱温箱、G1314AVWD 检测器、7725i 手动进样阀及 Agilent1100 色谱工作站组成 (HP 公司,

[基金项目] 云南省院省校科技合作计划基金资助项目 (2005YX08)

[作者简介] 赵春梅 (1973~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 工程师, 主要从事药理、药代动力学研究工作.

美国).

甲硝唑 (Metronidazole)、替硝唑 (Tinidazole) 对照品由中国药品生物制品检定所提供. 甲硝唑注射液 (规格为 100 mL: 0.5 g, 昆明南疆制药有限公司, 批号: 200502128) 为市售.

乙腈和甲醇均为色谱纯, 冰乙酸等试剂均为分析纯; 实验用水为 Millipore 制备超纯水, 所有试剂溶液使用前均经 0.45 μm 微孔滤膜过滤; 空白血浆为 SD 大鼠全血经肝素抗凝, 离心, 分离所得.

1.2 对照品溶液的制备

精密称取甲硝唑标准品 10 mg, 以甲醇配成浓度为 1 mg/mL 的储备液, 再用甲醇稀释成 1、2、10、40、100、400 和 1 000 mg/L 的系列标准溶液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.3 实验动物

SD 大鼠, 6 只, 雌雄各半, 体重 240~260 g, 昆明医科大学实验动物中心提供, 合格证号: 滇实动证第 2005018 号.

1.4 血浆样品采集

6 只 SD 大鼠禁食 12 h 后, 取空白血样, 以 25 mg/kg 的剂量尾静脉注射甲硝唑注射液, 于药后 0.08 h、0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、15 h、24 h 眼眶后静脉丛采血约 0.4 mL 至肝素离心管中, 离心后分别取上层血浆, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.5 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 卡套柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm). 流动相: 甲醇-乙腈-水-冰乙酸 (10: 10: 80: 0.1), 流速: 1.0 mL/min, 紫外检测波长: 317 nm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$.

1.6 血浆样品处理

取 SD 大鼠血浆 0.1 mL, 依次加入甲醇 20 μL , 内标溶液 (80 mg/L 替硝唑甲醇溶液) 20 μL , 涡流混合 40 s, 加入乙腈 0.1 mL, 涡流混合 40 s, 离心 20 min (4 000 r/min), 取上清液进样 20 μL .

2 结果

2.1 方法的选择性

取 6 只大鼠的空白血浆各 0.1 mL, 分别按“血浆样品处理”项下操作 (不加内标), 得色谱图 (见图 1A); 将一定浓度的甲硝唑标准溶液及内标加入空白血浆, 同法操作, 得色谱图 (见图 1B), 待测物与内标物的保留时间分别为 4.2 min 和 7.4 min; 取大鼠 iv 后所收集的血浆样品, 同法操作, 得色谱图 (见图 1C).

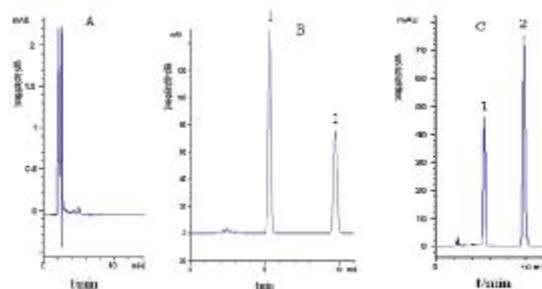


图 1 大鼠血浆样品中甲硝唑测定的高效液相色谱图

Fig. 1 Chromatograms of metronidazole and internal standard in SD rat plasma

A: 空白血浆; B: 空白血浆 + 甲硝唑 + 替硝唑; C: 25 mg/kg 甲硝唑注射液静脉给药 5 min 血浆样品; (1) 甲硝唑; (2) 替硝唑.

2.2 标准曲线与线性范围

取空白血浆 0.1 mL, 加入标准系列溶液 20 μL , 配制成相当于甲硝唑血浆质量浓度为 1、2、10、40、100、400 和 1 000 mg/L 的样品, 按“血浆样品处理”项下操作, 每一质量浓度进行 3 样本分析, 进样 20 μL , 记录色谱图. 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权 ($W=1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线. 典型的回归方程为 $Y=3.944 \times 10^{-3}x + 4.218 \times 10^{-4}$, $r=0.9969$. 根据标准曲线, 甲硝唑的线性范围为 1~1 000 mg/L, 定量下限为 1 mg/L.

2.3 准确度与精密度

取空白血浆 0.1 mL, 按“血浆样品处理”项下操作配制低、中、高 3 个质量浓度 (甲硝唑质量浓度分别为 2、100、1 000 mg/L) 的质量控制 (QC) 样品分析, 每一质量浓度进行 6 样本分析, 测定 3 d, 根据当日的标准曲线, 计算 QC 样品的质量浓度, 求得本法的准确度与精密度, 见表 1.

表 1 大鼠血浆样品中甲硝唑测定的准确度与精密度

Tab. 1 Accuracy and precision of the HPLC method to determine metronidazole in rat plasma

参 数	加样浓度 (mg/L)		
	2.00	100.00	1 000.00
样本数	18	18	18
浓度均值	1.99	96.35	1 012.00
RSD	0.30	6.92	8.66
准确度	99.69	96.35	101.20
日间精密度	4.34	7.19	8.56
日内精密度	10.28	10.71	9.82

2.4 提取回收率

取空白血浆 0.1 mL, 按“血浆样品处理”项下操作制备低、中、高 3 个质量浓度 (甲硝唑为 2、100、1 000 mg/L) 的样品, 每个质量浓度进行 6 样本分析。另取空白血浆 0.1 mL, 按“血浆样品处理”项下操作, 获得的上清液中加入相应质量浓度的标准溶液 20 μ L, 涡流混匀, 取 20 μ L 进样, 获得相应峰面积比 (3 次测定的平均值)。以每一质量浓度 2 种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。经测定, 本法在低、中、高 3 个质量浓度的提取回收率分别为 105.24%、104.58%、91.92%。

笔者初步考察了甲硝唑在不同保存条件下的稳定性。其血浆样品在冷冻-融化循环 3 次实验中无明显降解 (标准偏差在 10%之内); -20 $^{\circ}$ C 下, 甲硝唑在血浆中至少可保存 7 d; 室温条件下可稳定存在 6 h。

上述结果表明, 本法简便、精密度、准确度符合生物样品分析的有关要求^[10], 可用于甲硝唑在大鼠体内的药物动力学研究。

2.5 药物动力学研究

按样品处理方法分析服药后大鼠血浆, 以当日标准曲线计算各时间点的血药浓度, 同时分析低、中、高质量浓度 (双样本) 的质控样品 (QC), 以 QC 样品的相对偏差 < 15% 作为当日分析数据可接受的标准^[10]。其均值的药-时曲线见图 2。将血药浓度的观测值用 DAS2.0 药代动力学程序进行拟合, 根据 *F* 检验和 AIC 值判定甲硝唑注射液在大鼠体内的药-时过程符合一室开放模型。

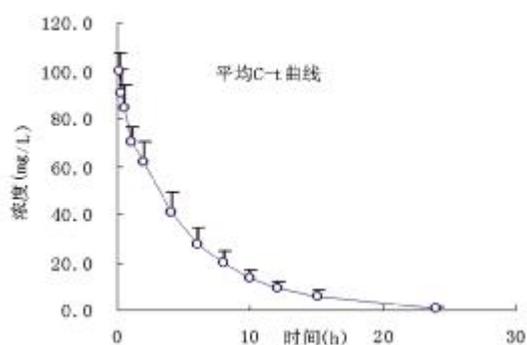


图 2 6 只大鼠以 25 mg/kg 剂量静脉注射甲硝唑注射液血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 The average curves of plasma concentration of metronidazole versus time after an injection of 25 mg/kg - 1 in 6 SD rats

主要药物动力学参数如下: $t_{1/2}$ 为 (3.42 \pm 0.55) h, C_{max} 为 (101.09 \pm 7.15) mg/L, T_{max} 为 (0.14 \pm 0.09) h, V_d 为 (0.27 \pm 0.03) L/kg, CL 为 (0.06 \pm 0.01) L/(kg·h), $AUC_{0-\infty}$ 为 (457.35 \pm 75.97) mg/(h·L)。

3 讨论

用甲醇-水作流动相, 在大鼠血浆样品中甲硝唑与替硝唑不能获得很好的分离, 改用甲醇-乙腈-水作流动相, 并加入冰乙酸使分离效果和峰型得到较大改善, 试验了不同比例的甲醇和乙腈分离大鼠血浆样品中的甲硝唑与替硝唑; 当乙腈和甲醇的体积比为 10:10 时可使样品中的甲硝唑与内标达到完全分离且分析时间较短, 因此试验选用甲醇-乙腈-水-冰乙酸 (10:10:80:0.1) 该流动相。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 二部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 123.
- [2] 江丽, 杭太俊. 甲硝唑结肠定位肠溶片在健康人体的药代动力学和生物等效性[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(5): 340-344.
- [3] 彭金香, 尹显贵. 高效液相色谱法同时测定甲硝唑、头孢呋辛血药浓度[J]. 天津医药, 2004, 32(5): 303-304.
- [4] 郭跃龙, 梁素娥. HPLC法测定人血浆中甲硝唑浓度及其药动力学研究[J]. 江苏药学与临床研究, 2004, 12(1): 4-5.
- [5] 顾宜, 蒋永培. 替硝唑和甲硝唑的人体药理学对比研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(5): 323-325.
- [6] 高允生, 朱玉云. 反相高效液相色谱法测定血清中的甲硝唑及其代谢产物[J]. 中国医院药学杂志, 1996, 16(12): 52-54.
- [7] JESSA M J, BARRET D A, SHAW P N, et al. Rapid and selective high-performance liquid chromatographic method for the determination of metronidazole and its active metabolite in human plasma, saliva and gastric juice[J]. J Chrom atogr, 1996, 67: 374-379.
- [8] 韩丽萍, 孙桂华, 张延军. 替硝唑和甲硝唑在胆病患者血浆和胆汁中浓度测定[J]. 解放军药理学学报, 2005, 21(2): 148-150.
- [9] 何小兵, 王基平, 陈西敬, 等. Determination of Tinidazole in Human Plasma by RP-HPLC [J]. 中国药科大学学报, 1997, 28(4): 246-248.
- [10] 国家食品药品监督管理局. 化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 1-21.

(2012-03-14 收稿)