

## 参考文献

- [1] Lyng RD, Scalf R, Monteith D. Metabolic activation in the fetal mouse salivary gland culture system with rat hepatocytes, rat S-9, and human S-9 Teratog Carcinog Mutagen, 1991; 11(1):31
- [2] Van Aerts LA, Hahne SJ, Oostendorp AG, et al. Sex difference in aroclor 1254 induction of rat hepatocytes; consequences for in vitro embryotoxicity and mutagenicity of cyclophosphamide. Toxicology In Vitro, 1993; 7(6):769
- [3] Zhao J, Krafft N, Terlouw GD, et al. A model combining the whole embryo culture with human liver S-9 fraction for human teratogenic prediction. Toxicology In Vitro, 1993; 7(6):827
- [4] Van Aerts L, Piersma AH, Verhoef A, et al. Bioactivation of cyclophosphamide in an in vitro postimplantation rat-embryo/hepatocytes co-culture, using maternal hepatocytes in suspension. Reprod Toxicol, 1991; 5(3):270
- [5] Ozolins TR, Oglesby LA, Wiley MJ, et al. In vitro murine embryotoxicity of cyclophosphamide in embryos co-cultured with maternal hepatocytes; development and application of a murine embryo-hepatocyte co-culture model. Toxicology, 1995; 102(3):259
- [6] Cumberland PF, Richold M, Parsons JF, et al. Intravitelline injection of cultured rat embryos; an improved method for the identification of cytotoxic and non-cytotoxic teratogens. Toxicology in Vitro, 1992; 6(6):503
- [7] Cumberland PF, Richold M, Parsons J, et al. Intravitelline injection of rodent conceptuses; an improved in vitro developmental toxicity screen. Toxicology In Vitro, 1994; 8(4):731
- [8] Combes RD, Innes D. Preliminary studies on the use of the in vitro rat micromass assay - results with some model teratogens. Toxicologist, 1990; 10(1):125
- [9] Uphill PF, Wilkins SR, Allen JA. In vitro micromass teratogen test; results from a blind trial of 25 compounds. Toxicology In Vitro, 1990; 4(4-5):623
- [10] Newall DR, Beedles KE. The stem-cell test; an in vitro assay for teratogenic potential. Results of a blind trial with 25 compounds. Toxicology In Vitro, 1996; 10(2):229
- [11] Newall DR, Beedles KE. The stem-cell test - a novel in vitro assay for teratogenic potential. Toxicology In Vitro, 1994; 8(4):697
- [12] Elstein KH, Zucker RM, Shuey DL, et al. Utility of the murine erythroleukemic cell (MELC) in assessing mechanisms of action of DNA-active developmental toxicants; application to 5-fluorouracil. Teratology, 1993; 48(1):75
- [13] Shah RM, Izadnegahdar MF, Hehn BM, et al. In vivo/in vitro studies on the effects of cyclophosphamide on growth and differentiation of hamster palate. Anticancer Drugs, 1996; 7(2):204
- [14] New DA. Whole embryo culture, teratogenesis, and the estimation of teratologic risk, Teratology, 1990; 42(6):635
- [15] Kola I. The preimplantation mouse embryo; its use in the study of birth defects. Teratology, 1990; 42(3):326
- [16] Nakaura S, Tanaka S, Usami M, et al. In vitro teratogenicity testing using the rat embryo culture system; (4) Comparative study of embryotoxicity of cyclophosphamide in vitro and in vivo. Teratology, 1990; 42(6):46A
- [17] Piersma AH, Van Aerts L, Verhoef A, et al. Biotransformation in post-implantation rat embryo culture using maternal hepatocytes in suspension coculture. Teratology, 1990; 41(5):585
- [18] Shiota K, Uwabe C, Yamamoto M, et al. Teratogenic drugs inhibit the differentiation of fetal rat limb buds grafted in athymic(nude)mice. Reprod Toxicol, 1990; 4(2):95

## HPLC 法测定人血清中氨氯地平浓度

袁荣刚 王晓波 邢山岗 靳姝杰

(解放军第 210 医院临床药理室 大连 116021)

**摘要** 本文建立了快速、简便测定人血清中氨氯地平的 HPLC 法,分析柱为 ODS-5S(150×4.0mm)不锈钢柱,流动相为甲醇:0.03M 磷酸二氢钾缓冲液(9:1)的混合液。流速为 1.0ml/min,以硝苯地平为内标物,检测波长为 366nm,蛋白沉淀剂选用 15%高氯酸。氨氯地平测定的线性范围为 4~12 $\mu\text{g/ml}$ , $r=0.9992$ ,最低检测限为 4ng。日内平均相对回收率为 10.24±5.40%,日间平均相对回收率为 99.87±6.23%。本方法专一性好,放置 24h 对含量测定无影响。

**关键词** HPLC; 氨氯地平; 血药浓度

## Determination of amlodipine in serum by HPLC

Xi Ronggang, Wang Xiaobo, Xing Shanmin, Jin Zhujie

(The PLA No.210 Hospital, Dalian 116021)

**ABSTRACT** A rapid specific and sensitive HPLC method for the determination of amlodipine in serum was developed, using a stainless steel column (ods - 5s, 150 × 4.0mm) with nifedipine as internal standard. The mobile phase was a mixture of methanol - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer(0.03mol/L), flow rate 1ml/min. Wavelength of the detector was set at 366nm. The linear correlation was observed within the range of 4 - 12μg/ml( $r = 0.9992$ ) and detect limitation at 4ng. The mean recoveries of the method were 100.24 ± 5.40% (intra - day) and 99.87 ± 6.23% (inter - day).

**KEY WORDS** amlodipine, HPLC, the determination of content

氨氯地平(Amlodipine, 商品名:络活喜, novrase)为第三代钙拮抗剂<sup>[1]</sup>。具有降压作用时间长,血压波动小的特点,同时该药以代谢产物清除,故肾功能不全对其药代动力学无明显影响。因其长效安全,服用方便,不良反应少等优点,近年来临床应用日益增多。

### 一、仪器与试剂

(一)仪器 Bio - Rad500 型 HPLC 系统(USA), Bio - Rad500 系统控制器(USA), Bio - Rad1706 紫外可变波长检测器(JAPAN), Bio - Rad 不锈钢微保护柱 ODS - 5S(4.6 × 30mm), Bio - Rad 不锈钢柱(150 × 4.0), 7125 型进样阀(USA), 金长城 486 计算机, 江申色谱工作站。

(二)试剂 苯磺酸氨氯地平标准品(辉瑞制药有限公司提供, OE150 - 020CS - 09)纯度 100.0%; 硝苯地平(上海第十七药厂 910812)含量 101.74%; 甲醇、高氯酸、磷酸二氢钾均为分析纯。

### 二、方法与结果

(一)色谱条件 流动相甲醇:0.03M 磷酸二氢钾(9:1), 流速 1.0ml/min。检测波长选择:国内外文献报道<sup>[2]</sup>氨氯地平大多于紫外 350 ~ 372nm 检测, 经 UV 扫描(300 ~ 450nm), 发现氨氯地平的吸收峰在 366nm 处, 内标物硝苯地平的吸收峰在 254nm 处, 根据本实验方法, 在处理空白血浆

时最优化条件选择及兼顾药物的最大吸收波长, 我们选择 366nm 作为测定波长。进样量为 20μl, 测定药物及内标物峰面积比定量。保留时间氨氯地平为 10.186 ± 0.034min, 硝苯地平为 3.314 ± 0.016min。

(二)标准溶液制备 精密称取苯磺酸氨氯地平及硝苯地平至容量瓶中, 各加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 使之成为含量为氨氯地平 500μg/ml, 硝苯地平 500μg/ml 的工作液, -20℃下 1wk 内使用。

(三)血清预处理 取正常人血清 500μl 置离心管内, 加内标液 100μl 及标准品液 100μl, 用 300μl 15% 高氯酸作沉淀剂, 血清与沉淀剂之比为 5:3(V/V)旋涡混和 1min, 以 4000r/min 离心 3min, 取上清液 20μl, 直接进样, 结果见图 1。

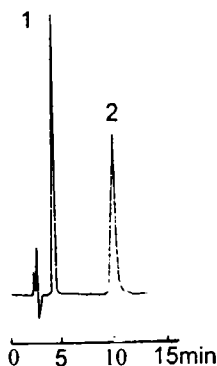


图 1 氨氯地平与内标色谱图

1. 内标物 2. 氨氯地平

(四)标准曲线的建立 取血清 500 $\mu$ l 共 6 份,依次加入氨氯地平工作液,并各加入内标液 100 $\mu$ l,蛋白沉淀剂 300 $\mu$ l,使血清中氨氯地平浓度梯度范围为 4 ~ 12 $\mu$ g/ml,内标物浓度为 5 $\mu$ g/ml,以药物浓度与面积比进行线性回归,所得回归方程为:

$Y = -2.952X + 2.111$  相关系数  $r = 0.9992$  氨氯地平的最低检测限为 4ng,最低检测浓度为 0.2 $\mu$ g/ml。

(五)回收率和精密度测定 分别取正常人血清配制 6, 8, 10 $\mu$ g/ml 三组浓度,平行测定 5 份,代入标准曲线计算日内,日间回收率,相对标准差。日内平均回收率为 100.24  $\pm$  5.40%, RSD% 为 1.7%; 日间平均回收率

表 2 药物在 -20 $^{\circ}$ C 及 4 $^{\circ}$ C 条件下测定值

药物浓度 ( $\mu$ g/ml)	7d				14d			
	-20 $^{\circ}$ C		4 $^{\circ}$ C		-20 $^{\circ}$ C		4 $^{\circ}$ C	
	实测浓度	回收率	实测浓度	回收率	实测浓度	回收率	实测浓度	回收率
6	5.89	98.16%	5.60	93.33%	3.86	64.33%	3.20	53.33%
8	7.92	99.00%	7.65	95.63%	6.85	85.63%	6.23	77.87%
10	9.96	99.60%	9.56	95.60%	8.86	88.63%	6.48	64.80%

为 99.87  $\pm$  6.23%, RSD% 为 2.6%。

(六)方法专一性实验 收集临床上可能会与氨氯地平同用的一些药物,在本方法下的保留时间见表 1。保留时间均与氨氯地平相差较大,不会干扰氨氯地平的测定。

表 1 一些药物的保留时间(Rt)

药 物	保留时间	药 物	保留时间
消 心 痛	16.165min	心 得 安	12.241min
阿替洛尔	3.073min	倍他乐克	13.053min
开 博 通	>20min	心 律 平	11.996min

(七)药物在血清中稳定性实验 将预先配制好的各浓度血清样品分别置于 -20 $^{\circ}$ C 及 4 $^{\circ}$ C 条件下,放置 1 ~ 2wk 后测定,结果见表 2。

本色谱法测定要求。

3. 氨氯地平样品在室温下 24h 稳定, 25 $^{\circ}$ C, 48h 内分解 < 10%。将血清样品分别置于 -20 $^{\circ}$ C 及 4 $^{\circ}$ C 条件下保存 1 ~ 2wk, 测得氨氯地平在 -20 $^{\circ}$ C 条件下 1wk 内回收率在 98% 以上,而在 4 $^{\circ}$ C 时则下降较多。2wk 后 -20 $^{\circ}$ C 下回收率降至 64% ~ 88% , 4 $^{\circ}$ C 时可下降至 60% 左右。这一实验提示,氨氯地平血清样品应置于 -20 $^{\circ}$ C 条件下 1wk 内测定完成较好。本方法为临床络活喜血药浓度监测提供了依据。

参考文献

[1]史晏海,凌华伟. 新型钙离子拮抗剂氨氯地平. 中国新药杂志,1995;(4)5:9  
 [2]陆佩荣,毕秀玲,谢玉芝. 络活喜片含量均匀测定方法的改进. 药物分析杂志,1995;15(4):42

三、讨论

1. 本文在选择流动相的过程中,曾对 8 种流动相进行了实验,涉及试剂有甲醇,乙醇,水,0.03M 磷酸二氢钾缓冲液,冰醋酸,四氢呋喃,异丙醇等,最后选择的甲醇:0.03M 磷酸二氢钾溶液(9:1)最佳,对样品中组分具有良好的分离度,且噪音低,并且能消除一些杂质的干扰。在选择内标物的过程中,对茶碱,非那西丁,苯巴比妥等 6 种药物进行了考查,其中硝苯地平保留时间较合适 (< 15min),与杂质峰药物峰无干扰。

2. 本实验曾采用 10% 三氯醋酸液直接沉淀法,与血清比例为 1:2,后选用乙腈作沉淀剂与血清比例 1:1,但药物检出灵敏度受影响且杂质峰较多,最终选择 15% 高氯酸与血清比例 5:3,杂质干扰较少,蛋白沉淀达到