

高效液相色谱法测定人血清中奋乃静浓度

付成效, 毕津莲, 李湘斌, 龙玉堂 (南华大学附属第一医院药剂科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定人血清中奋乃静浓度。方法: 血清样品采用二氯甲烷萃取, 采用 Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-水溶液 (68: 32) (500 mL 水中加入 2 mL 三乙胺, 醋酸调 pH 值为 3.4), 流速为 1 mL · min⁻¹, 检测波长为 258 nm, 柱温为 30 ℃, 2-氨基-2-氯-5-硝基二苯酮为内标物。结果: 奋乃静的线性范围为 27.52~ 1 032 μg · L⁻¹ (r = 0.999 7), 定量下限为 13.76 μg · L⁻¹, 日内精密度和日间精密度良好, 回收率较高。结论: 本法操作简便, 结果准确可靠, 可满足临床快速监测的需要。

[关键词] 高效液相色谱法; 奋乃静; 血清浓度
[中图分类号] R927.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5213(2011)03-0252-02

奋乃静为吩噻嗪类的哌嗪衍生物, 抗精神病作用主要与其阻断与情绪思维的中脑边缘系统及中脑-皮层通路的多巴胺受体 (DA₂) 有关^[1]。国内外研究表明, 奋乃静属高副反应发生率药物, 而且剂量越大, 血药浓度越高, 不良反应越重, 临床疗效并不提高。其药动学研究在国内鲜有报道, 因此, 本实验建立了 RP-HPLC 法测定奋乃静血药浓度的方法, 为奋乃静临床合理应用提供客观依据。

1 材料

HP1100 型高效液相色谱仪, HP1100 色谱工作站, VWD 紫外检测器。

奋乃静 (中国药品生物制品检定所, 批号 0133-9601, 含量 > 99%); 内标物 2-氨基-2-氯-5-硝基二苯酮 (中国药品生物制品检定所, 批号 1228-9701, 以下简称硝基苯酮, 含量 > 97%)。空白血清由南华大学附属第一医院血库提供; 甲醇为色谱纯, 二氯甲烷为分析纯, 水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水溶液 (500 mL 水中加入 2 mL 三乙胺, 醋酸调 pH 3.4) (68: 32); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 紫外检测波长: 258 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备 精密称取奋乃静对照品 17.2 mg 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 稀释至刻度, 得到 344 mg · L⁻¹ 的对照品贮备液。称取适量硝基苯酮置 100 mL 量瓶中, 配制 104 mg · L⁻¹ 的内标液。

2.3 血清样品处理 精密量取 1 mL 含药血清样品置具塞锥形玻璃离心管中, 加入硝基苯酮内标液 10 μL, 混匀, 随后加入 2 mL 二氯甲烷, 涡旋振荡提取 2 min, 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取下层有机相, 40 ℃ 水浴氮气吹干, 用甲醇 100 μL 复溶, 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.4 方法的专属性 将空白血清、空白血清加对照品、患者血清标本按“2.3”项下方法处理, 进样, 结果见图 1。在该色谱条件下, 血清中内源性物质对内标物和奋乃静色谱峰无干

扰, 内标物和奋乃静的保留时间分别为 8.1, 11.2 min。奋乃静有效理论塔板数大于 4 000。

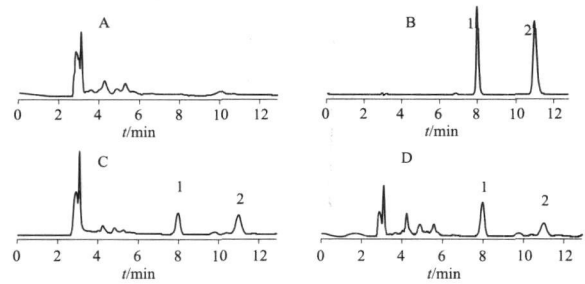


图 1 高效液相色谱图
 A. 空白血清; B. 奋乃静及内标对照品; C. 空白血清+对照品+内标;
 D. 服用奋乃静的血清样品; 1-内标; 2-奋乃静

Fig1 HPLC chromatograms
 A. chromatograms blank serum; B. perphenazine and internal standard; C. blank serum with reference substance and internal standard; D. serum samples with perphenazine; 1-internal standard; 2-perphenazine

2.5 标准曲线和线性范围 将奋乃静对照贮备液稀释成不同浓度, 取 7 支具塞锥形玻璃离心管, 分别加入不同浓度的奋乃静对照液, 与空白血清配制成 1 032, 688, 550.4, 275.2, 137.6, 55.04, 27.52 μg · L⁻¹ 的血清对照品, 分别精密量取 1 mL, 按“2.3”项下处理, 以所测定药物血清浓度 (C) 对峰面积比值 (Y) (测定药物峰面积/内标物峰面积) 进行线性回归, 得到标准曲线方程为: $Y = 1.668 \times 10^{-3} C + 0.0913$, $r = 0.9997$, $n = 7$ 。结果表明, 奋乃静血清在 27.52~ 1 032 μg · L⁻¹ 范围内线性关系良好。定量下限为 13.76 μg · L⁻¹。

2.6 回收率与精密度试验 分别配制 55.04, 275.2, 688.0 μg · L⁻¹ 的奋乃静低、中、高 3 种质量浓度的对照品血清, 精密量取 1 mL, 按“2.3”项下方法处理后, 每种质量浓度日内平行测 5 次, 隔日测定 1 次, 一共 5 次。分别计算日内、日间精密密度, 并根据同 1 d 内此低、中、高 3 种质量浓度血清样品结果计算相对回收率 (见表 1)。相对回收率 = M/A (M 为测定值, A 为实际值)。另取 55.04, 275.2, 688.0 μg · L⁻¹ 3 种质量浓度的奋乃静对照品溶液分别直接进样 5 次, 进样量为 20 μL。以此为标准, 比较相应血清样品 A₁ 与对照品峰面积 A₂, 计算奋乃静的绝对回收率, 绝对回收率 = $A_1 / (A_2 \times B) \times 100\%$ (B 为 1 mL 的血清样品经处理后得 100 μL 样品的浓集倍数)。

2.7 稳定性试验 根据本室血药浓度监测的实际情况, 将 55.04, 275.2, 688.0 μg · L⁻¹ 的低、中、高 3 种质量浓度的对照品血清, 分别于室温放置 12 h, -20 ℃ 冰箱保存 3 d, 冻融, 按“2.3”项下处理后, 考察血清样品在不同条件下的稳定性。结果表明样品在该条件下稳定, RSD 均小于 10%。

2.8 患者血清样品测定 患者, 男, 服用奋乃静散片, 送至急诊科抢救, 出现烦躁不安, 四肢震颤、发冷等中毒症状。采取血液至本室, 测得血药浓度为 273 μg · L⁻¹。建议洗胃, 静脉注射高渗葡萄糖注射液, 促进利尿, 排泄毒物。根据此结果并进行有效的治疗, 患者转危为安。

3 讨论

3.1 样品前处理 曾结合文献 [2], 使用醋酸乙酯-二氯甲烷

[作者简介] 付成效, 男, 主管药师, 电话: 0734-8279029, E-mail: paulfex@126.com

(80 20)、二氯甲烷进行处理,发现前者提取率较大,但引入内源性杂质对奋乃静出峰位置有所干扰,而且醋酸乙酯沸点较高,氮气吹干较难。考虑采用后者作为提取剂。另外,处理样

品前试用 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 100 μL 加入血清当中,发现在奋乃静出峰位置亦有干扰,本实验不考虑加入碱化试液。

表 1 奋乃静血样测定的回收率与精密度的(x±s, n=5)

Tab 1 Recovery and percision of prephenazine in human plasma(x±s, n=5)

加入量 /μg·L ⁻¹	日内差异		日间差异		相对回收率/%	绝对回收率/%
	测得量 /μg·L ⁻¹	RSD /%	测得量 /μg·L ⁻¹	RSD /%		
55.04	53.55±3.08	5.75	53.55±2.77	4.98	97.29	76.53
275.2	266.2±12.66	4.76	270.9±14.09	5.20	96.73	74.11
688.0	683.7±17.20	2.52	687.0±18.03	2.62	99.37	73.25

3.2 内标物选择 临床用药实践中,有患者同时联用了情绪稳定剂如卡马西平、苯巴比妥,精神类药如地西泮、氯氮平^[3]等,因此,这些物质不宜作为内标物的选择,参照中国药典二部氯硝西泮有关物质检查,选用硝基苯酮为内标,峰形好,保留时间适宜。上述药物在此内标物出峰位置未有干扰,避免了患者血样本本身对分析过程的影响,扩大了方法现实应用中的患者范围。

3.3 色谱流动相的选择 直接采用甲醇-水系统,出现肩峰。参照中国药典二部^[4]及文献^[5-7],试用甲醇-0.03 mol·L⁻¹ 醋酸铵液(76:24),甲醇-0.08 mol·L⁻¹ 醋酸铵液(76:24),峰形不佳,采用甲醇-水溶液(68:32)(500 mL 水中加入 2 mL 三乙胺,加入醋酸调 pH 分别为 3.1, 3.4, 3.7, 4.0),优化水溶液 pH,当 pH 3.1 时,前延峰明显, pH 3.7 及 4.0 时,峰形不佳,本实验采用 pH 3.4 的缓冲盐水溶液,峰形较好,在奋乃静出峰位置没有干扰。

本实验建立的方法具有样品前处理简单,分析仪器普及率高、简便、快速、准确、灵敏度高等优点,适用于精神科研究奋乃静以及急诊毒物分析。

参考文献:

[1] 宋振铎, 胡岱梅, 原伟, 等. 奋乃静治疗精神分裂症适宜血浓度研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(14): 2176-2178.
 [2] 朱军, 黄伟侨, 刘伟忠, 等. 反相高效液相色谱法测定人血浆奋乃静浓度[J]. 医药导报, 2007, 26(7): 733-734.
 [3] 黄洪勇, 职晓燕, 钱东丽. 互为内标法测定人体血浆中米氮平与氯氮平的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(7): 577-579.
 [4] 中国药典. 二部[S]. 2010: 454-452.
 [5] 李晓燕, 冉晓静, 吕杰. HPLC 法测定奋乃静片的含量及有关物质[J]. 中国药品标准, 2009, 10(3): 223-225.
 [6] 王晓娥. 反相高效液相色谱法测定奋乃静片的含量[J]. 中国医药导报, 2009, 6(18): 54-56.
 [7] 温预关, 施玉旋, 王广发. 反相高效液相色谱法测定人血浆中阿立哌唑的浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(1): 50-52.

[收稿日期] 2010-05-07

高效液相色谱法测定复方秋水仙碱凝胶中吲哚美辛的含量

谢腾芳¹, 运委², 赵妮¹, 曹茂堂¹ (1. 黄石市第二医院, 湖北 黄石 435002; 2. 黄石市药品检验所, 湖北 黄石 435000)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法测定复方秋水仙碱凝胶

中吲哚美辛的含量。方法: 采用 Kromasil-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 色谱柱; 流动相为 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸溶液-乙腈(30:70); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 228 nm。结果: 线性范围为 0.241~1.205 μg; 精密度的试验结果显示 RSD 为 0.3%, 重复性的试验结果显示 RSD 为 0.6%; 平均回收率 99.1% (n=9)。结论: 该方法简便、可靠、准确, 可用于该凝胶剂的质量控制。

[关键词] 复方秋水仙碱凝胶; 吲哚美辛; 高效液相色谱法
 [中图分类号] R 286.91 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5213(2011)03-0253-02

复方秋水仙碱凝胶是由秋水仙碱、吲哚美辛、月桂氮卓酮、卡波姆₄₀、冰片等组成, 主要外用于急性痛风性关节炎, 具有消除红、肿、热、痛症状之功效。由于该制剂是凝胶剂且组分多, 其主药吲哚美辛用“吲哚美辛乳膏”的含量测定方法操作, 烦琐费时, 且互有干扰^[1]。笔者尝试用文献^[1]测定吲哚美辛有关物质的方法对本制剂吲哚美辛的含量进行测定, 结果表明该方法简单、快捷、专属性强、准确度高, 并具有良好的重复性, 可用于吲哚美辛的质量控制。

1 材料

美国戴安 SUMMITP880 型高效液相色谱仪, Chromleon 色谱工作站; 吲哚美辛对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 1100258-200403); 复方秋水仙碱凝胶(本院制剂, 批号 061224, 061225, 061226); 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱: Kromasil-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸溶液-乙腈(30:70); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 228 nm; 理论塔板数按吲哚美辛峰计算为 9 253, 峰尖锐, 对称性好。吲哚美辛与相邻峰间分离度为 12.52, 在此色谱条件下基线平稳, 柱效高, 分离效果好。

2.2 供试品溶液与对照品溶液的制备 取复方秋水仙碱凝胶 3 g, 置烧杯中, 加乙醇适量, 搅拌使溶解, 转移至 100 mL 棕色量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 10 mL 置 25 mL 棕色量瓶中, 加 50% 乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即为供试品溶液。精密称取在 105℃ 干燥 5 h 的吲哚美辛对照品适量, 加乙醇制成 1 200 mg·L⁻¹ 溶液, 精密量取 10 mL, 置 100 mL 棕色量瓶中, 加水稀释至刻度摇匀即得 120 mg·L⁻¹ 对照品贮备液。

[作者简介] 谢腾芳, 女, 大专, 副主任药师, 电话: 0714-6519477, E-mail: yjk6519477@sina.com