

高效液相色谱法测定人血浆中间氯苯哌嗪的浓度

严贵亮 段建荣 (张家口市沙岭子医院药剂科 河北张家口 075000)

摘要 目的: 建立测定人血浆中间氯苯哌嗪浓度的高效液相色谱法。**方法:** 以 Diamonsil C₁₈ 反相柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 流动相为 0.085 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液-乙腈-甲醇 (82:8:10); 流速 1 ml·min⁻¹; 柱温 40 °C; 检测波长 250 nm。以乙酸乙酯为提取剂。结果: 间氯苯哌嗪线性范围为 0.033 6 ~ 3.360 0 μg·ml⁻¹。间氯苯哌嗪低、中、高 (0.077 2, 0.252 0, 2.240 0 μg·ml⁻¹) 3 种浓度平均回收率分别为 96.9%, 101.9% 和 97.2%; 日内、日间 RSD 均 < 7% (n = 5)。结论: 该方法灵敏、准确、简单、快速, 可用于临床血药浓度监测和药动力学研究。

关键词 间氯苯哌嗪; 曲唑酮; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R969.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-049X(2011)05-0628-03

Determination of m-Chlorophenylpiperazine in Human Plasma by HPLC

Yan Guiliang, Duan Jianrong (Pharmacy of Zhangjiakou Shalingzi Hospital, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method for determining m-chlorophenylpiperazine in human plasma by HPLC. **Method:** The drug in plasma was analyzed in a RP-HPLC system with C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.085 mol·L⁻¹ phosphate buffer-acetonitrile-methanol (82:8:10) with the flow rate of 1 ml·min⁻¹. The detection wavelength was at 250 nm. Ethyl acetate was used as the extracting solvent. **Result:** The average recovery for low, medium and high concentration of m-chlorophenylpiperazine (0.077 2, 0.252 0 and 2.240 0 μg·ml⁻¹) was 96.9%, 101.9% and 97.2%, respectively. The intra-day and inter-day variations (RSD) were less than 7% (n = 5). The calibration curve of m-chlorophenylpiperazine showed good linearity over the range of 0.033 6-3.360 0 μg·ml⁻¹. The regression equation was the following: $Y = 156.33X - 6.54$ ($r = 0.9991$). **Conclusion:** The method is sensitive, accurate, simple and quick, which can be used for the clinical drug monitoring and pharmacokinetic studies. **KEY WORDS** m-chlorophenylpiperazine; Trazodone; Plasma concentration; HPLC

曲唑酮片 (trazodone tablets), 由意大利 Angelini 公司研制, 现已在临床上广泛使用。临床主要用于治疗抑郁症和伴随抑郁症状的焦虑以及药物依赖者戒断后的情绪障碍^[1-3]。此外, 曲唑酮还有改善性功能障碍, 治疗阳痿的作用^[4]。间氯苯哌嗪是曲唑酮的活性代谢产物^[5], 通过激活血清素-2C 受体产生抗焦虑作用^[6]。但间氯苯哌嗪有导致偏头痛作用^[7]。因此有必要对其血药浓度进行检测。国外文献^[8]报道以含异戊醇的庚烷提取血样中的间氯苯哌嗪后, 以高效液相色谱法测定间氯苯哌嗪的方法, 但该方法操作较为复杂, 成本较高。本实验建立了一种简单、快速测定人血浆中间氯苯哌嗪浓度的高效液相色谱法。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent), 包括 G1322A 在线脱气机、G1315B 二极管阵列紫外检测器 (DAD)、G1313A 自动进样器、G1311 自动调配、G1316A 可调柱温恒温箱和 Agilent 色谱化学工

作站; 电子分析天平 (瑞士 SARTORIUS); 高速离心机 (美国 MICRO1224); 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); N-EVAP 氮吹仪 (美国 Organomation 公司)。

1.2 药品与试剂

间氯苯哌嗪对照品 (张家港华茂精细化学有限公司, 批号 20100410, 含量 > 98.5%), 甲醇、乙腈为色谱级 (天津大茂化学试剂厂), 水为超纯水, 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 标准溶液配制

精密称取间氯苯哌嗪 16.8 mg 加甲醇溶解并定容至 500.0 ml, 得浓度为 33.6 μg·ml⁻¹ 的标准储备液, 置冰箱 4 °C 保存。临用时用甲醇稀释成所需浓度的间氯苯哌嗪对照品溶液。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamond C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm; 美国迪马公司); 流动相: 0.085 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液-乙腈-甲醇 (82:8:10); 流速: 1 ml·min⁻¹; 柱

基金项目: 张家口市科学技术研究与发展计划项目 (编号: 1021061D)

通讯作者: 严贵亮 Tel: 13831398563 E-mail: Tom123609@sohu.com

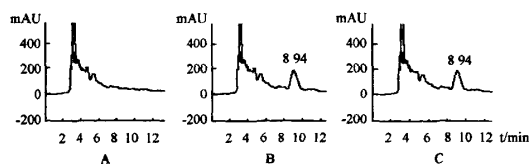
温:40℃;检测波长:250 nm。

2.2 血浆样品处理

取血浆样品2 ml,置50 ml具塞锥形离心管中,加入 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸液1 ml,混匀后,加入乙酸乙酯16 ml,震荡2 min,离心3 min($3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)。取有机层12 ml移入另一具塞离心管中,残余物加8 ml乙酸乙酯,依上法提取后,取有机层8 ml,合并提取液,于40℃水浴,氮气吹干。残渣用甲醇100 μl 溶解,离心3 min($3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),取上清液20 μl 进样。

2.3 方法专属性试验

在本试验条件下,空白血浆、间氯苯哌嗪标准品血浆以及含药血浆样品,以选定色谱条件,经高效液相色谱分析法测定,间氯苯哌嗪的保留时间为8.94 min。色谱图中没有明显的内生杂质峰干扰,可见本方法具有较高的专属性。见图1。



A. 空白血浆 B. 空白血浆+间氯苯哌嗪对照品 C. 含药血浆

图1 间氯苯哌嗪的高效液相色谱图

2.4 标准曲线的制备

取空白血浆1 ml(6份),加入间氯苯哌嗪标准储备液($33.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)使间氯苯哌嗪浓度分别为3.360, 1.680, 1.260, 0.630, 0.168, 0.0336 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。按“2.2”项下操作,以样品峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,进行线性回归处理。回归方程: $Y=156.33X-6.54$, $r=0.9991$,表明间氯苯哌嗪在0.0336~3.360 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.5 检测限

取空白血浆样品溶液,加入适量对照品溶液,稀释后进样分析,测得间氯苯哌嗪的检测限为:0.0028 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2.6 精密度试验

取空白血浆3份,加入适量的间氯苯哌嗪对照品溶液,分别配成低、中、高(0.0772, 0.2520, 2.2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)3个浓度的间氯苯哌嗪血浆,按照“2.2”项下操作,在1 d内重复5次和1周内重复5次测定其浓度,结果见表1。

表1 精密度试验($n=5$)

浓度($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	日内RSD(%)	日间RSD(%)
0.0772	6.1	6.8
0.2520	4.4	5.1
2.2400	3.2	3.3

2.7 回收率试验

取空白血浆3份,加入适量的间氯苯哌嗪对照品溶液,分别配成低、中、高(0.0772, 0.2520, 2.2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)3个浓度的间氯苯哌嗪血浆,按照“2.2”项下操作,计算3个浓度的回收率,结果见表2。

表2 回收率试验($n=3$)

浓度($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.0772	96.9	6.6
0.2520	101.9	3.3
2.2400	97.2	2.7

2.8 绝对回收率试验

取空白血浆三份,加入适量的间氯苯哌嗪对照品溶液,分别配成低、中、高(0.0772, 0.2520, 2.2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)3个浓度的间氯苯哌嗪血浆,按照“血浆样品处理”项下操作,测定峰面积,与流动相配制的相同浓度对照品溶液所测峰面积相比较,计算3个浓度的绝对回收率,结果见表3。

表3 绝对回收率试验($n=3$)

浓度($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	平均绝对回收率(%)	RSD(%)
0.0772	78.8	7.9
0.2520	76.7	4.7
2.2400	75.2	4.1

2.9 样品稳定性试验

按“标准曲线的制备”方法分别配制低、中、高浓度(0.0772, 0.2520, 2.2400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)的样品,分别在室温(25~28℃)放置4 h和-20℃冻存24 h,以及-20℃冻存1,3周后分别进行色谱测定,未见冻存样品的药物降解,统计结果显示RSD均小于10%。

2.10 给药方案与样品采集

经过医学伦理委员会同意,18例健康志愿者参与试验,其中男女各9例,男性平均身高(1.68 ± 0.07) m、体质量(58.24 ± 7.33) kg,女性平均身高(1.54 ± 0.03) m、体质量(45.89 ± 6.24) kg,受试者均签订知情同意书。试验中志愿者停用其他抗抑郁药物,口服间氯苯哌嗪50 mg,分别于给药前5 min

和给药后 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 360, 720 min 自肘静脉采血 5 ml, 样品收集后立即离心(0℃), 分离血浆, 样品于 -20℃ 以下贮存。按样品处理项下操作, 测得间氯苯哌嗪浓度与时间曲线见图 2。其消除符合一级动力学过程, 半衰期为 4.8 h。

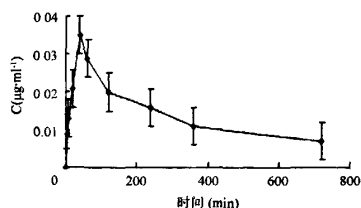


图2 18名健康受试者单剂量口服间氯苯哌嗪 50 mg 后的血药浓度-时间曲线

3 讨论

文献^[8]所用色谱条件为 0.085 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液-乙腈-甲醇(76:14:10), 研究中发现, 在此条件下, 间氯苯哌嗪保留时间较短, 导致间氯苯哌嗪不能与血浆中的其他物质较好的分离, 从而对测定产生干扰作用。因此, 对流动相进行调整, 增大缓冲溶液的比例, 降低其洗脱能力, 从色谱图可以看出, 间氯苯哌嗪有较强的色谱峰和较好的分离度, 血浆中杂质不干扰样品测定, 实现较好的分离。同时, 本文改进了血浆样品中间氯苯哌嗪的提取方法, 降低了成本, 简化了操作。

本研究采用 HPLC 法测定人血浆中间氯苯哌嗪

的浓度, 试验回收率和分离效果均比较理想, 该法操作简单、成本低廉、易于控制、回收率及精密度高, 适用于间氯苯哌嗪的含量测定, 结果可靠, 适合人体内血药浓度监测和药物动力学的研究。

参 考 文 献

- James SP, Mendelson WB. The use of trazodone as a hypnotic; a critical review[J]. *J Clin Psychiatry*, 2004, 65(6): 752-755
- Odagaki Y, Toyoshima R, Yamauchi T. Trazodone and its active metabolite m-chlorophenyl piperazine as partial agonists at 5-HT_{1A} receptors assessed by [³⁵S] GTPγS binding[J]. *J Psychopharmacol*, 2005, 19(3): 235-241
- Gorman JM. Treating generalized anxiety disorder[J]. *J Clin Psychiatry*, 2003, 64(Suppl 2): 24-29
- 翁史曼, 顾牛范. 曲唑酮治疗勃起功能障碍[J]. *中国新药与临床医学杂志*, 1999, 18(3): 177-178
- Ghaziuddin N, Welch K, Greden J. Central Serotonergic Effects of m-Chlorophenylpiperazine (mCPP) among Normal Control Adolescents[J]. *Neuro Psychopharmacology*, 2003, 28: 133-139
- Di Giovanni G, Di Matteo V, La Grutta V, et al. m-Chlorophenylpiperazine excites non-dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area by activating serotonin-2C receptor[J]. *Neuroscience*, 2001, 103(1): 111-116
- Leone M, Attanasio A, Croci D, et al. The serotonergic agent m-chlorophenylpiperazine induces migraine attacks: A controlled study[J]. *Neurology*, 2000, 55(1): 136-139
- Vatassery GT, Holden LA, Hazel DK, et al. Determination of trazodone and its metabolite 1-m-chlorophenyl-piperazine, in human plasma and red blood cell samples by HPLC[J]. *Clin Biochem*, 1997, 30(2): 149-153

(2010-11-05 收稿 2011-02-20 修回)

《现代药物与临床》杂志 2011 年征订启事

《现代药物与临床》杂志(CN12-1407/R, ISSN 1674-5515)是国家级医药科技期刊, 2009 年 1 月由《国外医药·植物药分册》更名为《现代药物与临床》, 并被 CNKI 中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库等收载。《现代药物与临床》内容涵盖药物的基础研究与临床研究各学科, 设“专论与综述”、“实验研究”、“临床研究”、“未来药物”、“药事管理”、“知识产权”、“药物经济学”和“市场信息”等栏目。“专论与综述”栏目除报道植物药研究的最新进展外, 诚征有关药物与临床研究前沿的前瞻性文章。《现代药物与临床》为双月刊, 国内外公开发行, 由 64 页扩版为 80 页, 每期定价仍为 15 元, 全年 90 元。该刊自办发行, 请直接与编辑部联系订阅。

该刊网上在线投稿、审稿、查询系统正式开通, 欢迎投稿、欢迎订阅! 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国或www.tiprpress.com>, 在页面左侧有“作者登录”链接, 第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿; 作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。欢迎广大作者踊跃投稿, 欢迎广大读者订阅。编辑部地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号(300193), 电话与传真: (022)23006823, 网址: www.中草药杂志社.中国, 邮箱: dc@tiprpress.com, www.tiprpress.com。开户银行: 兴业银行天津南开支行 账号: 44114010010081504, 户名: 天津中草药杂志社。

高效液相色谱法测定人血浆中间氯苯哌嗪的浓度

作者: [严贵亮](#), [段建荣](#), [Yan Guiliang](#), [Duan Jianrong](#)
作者单位: [张家口市沙岭子医院药剂科, 河北张家口, 075000](#)
刊名: [中国药师](#) **ISTIC**
英文刊名: [CHINA PHARMACIST](#)
年, 卷(期): 2011, 14(5)

参考文献(8条)

1. [Vatassery GT;Holden LA;Hazel DK](#) [Determination of trazodone and its metabolite 1-m-chlorophehyl-piperazine, in human plasma and red blood cell samples by HPLC](#) 1997(02)
2. [Leone M;Attanasio A;Crocì D](#) [The serotonergic agent m-chloro-phenylpiperazine induces migraine attacks:A controlled study](#) 2000(01)
3. [Di Giovanni G;Di Matteo V;La Grutta V](#) [m-Chlorophenylpiperazine excites non-dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and ventral tegmental area by activating serotonin-2C recept](#) 2001(01)
4. [Ghaziuddin N;Welch K;Greden J](#) [Central Serotonergic Effects of mChlorophenylpiperazine \(mCPP\) among Normal Control Adolescents](#)[外文期刊] 2003
5. [翁史曼;顾牛范](#) [曲唑酮治疗勃起功能障碍](#) 1999(03)
6. [Gorman JM](#) [Treating generalized anxiety disorder](#) 2003(Supp12)
7. [Odagaki Y;Toyeshima R;Yamauchi T](#) [Trazodone and its active metabolite m-chlorophenyl piperazine as partial agonists at 5-HT1 Areceptors assessed by\[35S\] GTPgammaS binding](#) 2005(03)
8. [James SP;Mendelson WB](#) [The use of trazodone as a hypnotic:a critical review](#) 2004(06)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgys201105009.aspx