

反相高效液相色谱法测定人血浆中氯氮平浓度

马武翔¹, 杨颖琳² (1. 浙江省绍兴市第七人民医院药剂科, 绍兴市 312000; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 杭州市 310003)

中图分类号 R97 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2003)06-0351-02

摘要 目的: 以反相高效液相色谱法测定人血浆中氯氮平的浓度。方法: 血浆样品经碱化后用乙醚萃取, 醚层用 100 μ l 0.1 mol/ml KH_2PO_4 反萃取, 40 μ l 进样。色谱柱为 Dikma Diamonsil C_{18} 柱, 保护柱为 Waters Nova-Pak C_{18} 柱, 流动相为 0.5% 三乙胺溶液-乙腈 (74:26, V/V), 流速为 1 ml/min, 检测波长为 215 nm。结果: 测定方法在 0.1~20 μ g/ml 范围内线性关系良好, 萃取回收率在 80.3%~84.8% 之间; 日内、日间精密度在 3.5%~8.3% 之间, 最低检测浓度为 50 ng/ml。结论: 本测定方法快速、灵敏、准确, 适用于临床治疗药物浓度监测。

关键词 反相高效液相色谱法; 血药浓度; 氯氮平

Determination of the Levels of Clozapine in Human Plasma by RP-HPLC

MA Wuxiang (Dept. of Pharmacy, The Seventh People's Hospital of Shaoxing, Shaoxing 312000)

YANG Yinglin (The First Affiliated Hospital, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310003)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a simple, sensitive and rapid RP-HPLC with ultraviolet detector method for the determination of clozapine in human plasma. METHODS: The plasma samples (1 ml) were extracted with 5 ml ether after alkalization with 0.5 mol/ml NaOH (50 μ l). The organic phase was back-extracted with 100 μ l of 0.1 mol/ml KH_2PO_4 (adjusted pH to 2.2 with H_3PO_4). The separation column was Dikma Diamonsil C_{18} column and the protection column was Waters Nova-Pak C_{18} column. The mobile phase consisted of 0.5% triethylamine-acetonitrile (74:26, v/v) with flow rate of 1 ml/min. The detecting wavelength was 215 nm. RESULTS: A linearity was obtained in the range of 100~2 000 ng/ml ($r = 0.999$), the lowest detectable concentration in plasma was 50 ng/ml. The extraction recovery was between 80.3% and 84.8%. The relative standard deviations of intra-day and inter-day assay were within 3.5%~8.3%. CONCLUSION: The established method was shown to be sensitive, accurate and simple for the determination of clozapine levels in human plasma. It was suitable for the pharmacokinetic and TDM study of clozapine.

KEY WORDS RP-HPLC; plasma drug level; clozapine

氯氮平 (clozapine), 8-氯-11-(4-甲基-1-哌嗪基)-5H-二苯并[b,e][1,4]二氮杂䓬, 为第 1 代非典型抗精神病药物, 是目前国内治疗精神分裂症的常用药物之一^[1]。氯氮平治疗精神分裂症临床疗效较好, 且很少产生锥体外系反应, 但存在粒细胞减少的不良反应, 国外已不以该药作为此类病症的首选药物^[2]。由于氯氮平血药浓度的个体差异较大, 故临床需做血药浓度监测。

为满足临床开展氯氮平血药浓度监测和科研需要, 笔者参考文献^[3-7]建立了血浆氯氮平浓度反相高效液相色谱测定方法。

1 仪器与试剂

2690 溶剂管理系统、Millennium32 色谱工作站、二极管阵列检测器 (Waters 公司); AG204 Deltrange 电子分析天平 (Mettler Toledo 公司); Milli-Q 纯水仪 (Millipore 公司); XW-80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); LDZ5-2 低速自动平衡离心机 (北京医用离心机厂)。

氯氮平对照品 (纯度: 99.9%, 批号: 020417, 上海九福制药厂); 乙腈 (HPLC 级, 批号: 20011128, 上海陆都化学试剂厂); 乙醚、氢氧化钠、磷酸、三乙胺均为国产市售分析纯; 纯水取自 Millipore 公司 Milli-Q 纯水仪。

2 色谱条件

Waters 公司 Nova-Pak C_{18} 保护柱, Dikma 公司 Diamonsil (钻石) C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 200 mm, 5 μ m); 流动相为 0.5% 三乙胺溶液 (磷酸调 pH 至 3.0)-乙腈 (74:26, V/V), 流速为 1 ml/min, 检测波长为 215 nm, 柱温为 25 $^{\circ}$ C, 进样量为 40 μ l。

3 实验方法

3.1 对照品溶液的配制

精密称取氯氮平对照品 1.30 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 130 μ g/ml 浓度的对照品储备液, 以此储备液为母液配制系列浓度的对照品溶液。

3.2 血浆样品的处理

—20 $^{\circ}$ C 冷冻保存的血浆在暗处自然熔融, 混匀后取 1 ml, 加入 100 μ l 甲醇, 加 0.5 mol/ml NaOH 溶液 50 μ l, 旋涡混匀 30 s, 5 ml 乙醚萃取 15 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 吸取上层有机层置于 10 ml 尖底试管中, 加 0.1 mol/ml KH_2PO_4 (磷酸调 pH 至 2.2) 100 μ l, 振摇 10 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃去有机层, 酸层 40 μ l 进样。

4 结果

4.1 色谱行为

氯氮平保留时间为 9.715 min, 血浆中内源性物质对其检测无干扰, 详见图 1。

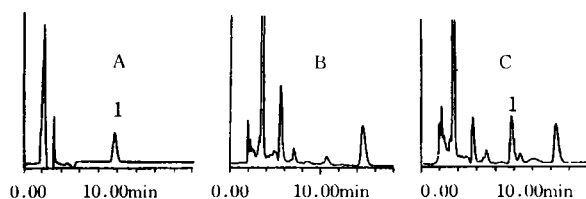


图1 高效液相色谱图

A. 氯氮平对照品; B. 空白血浆; C. 血浆样品; 1. 氯氮平

Fig 1 HPLC chromatogram

A. reference substance of clozapine; B. blank plasma; C. plasma sample; 1. clozapine

4.2 标准曲线的制备

精密量取“3.1”项下制备的系列浓度的对照品溶液 100 μ l, 加空白血浆 1ml, 使血浆中对照品浓度分别为 0.1、0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 μ g/ml, 按“3.2”项下方法操作。以对照品氯氮平峰面积(X)对血浆中对照品氯氮平浓度(Y)进行线性回归, 得回归方程 $Y = 1\,520\,607.7X + 76\,405.2$, $r = 0.999$ 。

可见, 本法在 0.1~2 μ g/ml 范围内线性关系良好, 其最低检测限(S/N = 3)可达 7 ng/ml。

4.3 萃取回收率

按“3.2”项下处理含对照品血浆, 经萃取后进样, 所得峰面积与对照品直接进样所得峰面积进行比较, 以评价本法的萃取回收率。结果, 低、中、高 3 种浓度(0.1、0.5、2.0 μ g/ml)的萃取回收率精密度分别为(84.8 \pm 5.1) %、(81.3 \pm 4.2) %、(80.3 \pm 2.8) % (n = 5)。

4.4 加样回收率与精密度试验

分别量取不同浓度的对照品溶液 100 μ l, 加入 1ml 空白血浆中, 使血浆中对照品浓度分别为 0.1、0.5、2.0 μ g/ml, 按“3.2”项下方法操作, 日内测定 6 次, 隔日测定 6 次。结果, 低、中、高 3 种浓度(0.1、0.5、2.0 μ g/ml)对照品血浆的回收率分别为(104.2 \pm 7.9) %、(98.6 \pm 2.2) %、(100.5 \pm 3.7) %; 日内精密度分别为 6.9 %、1.3 %、7.2 %; 日间精密度分别为 8.9 %、8.2 %、5.1 %。

5 讨论

本文采用 0.5 % 三乙胺水溶液(磷酸调 pH 至 3.0)和乙腈作为流动相。实验中发现, 溶液的 pH 变化对氯氮平的出峰时间有很大影响, 随 pH 的升高出峰时间延长; 加入 0.5 % 的三乙

胺可明显改善氯氮平的峰形; 乙腈作为有机相, 可显著改善分离效果, 且出峰快、柱压低、有机相比比例低。经对比, 在 215nm 波长处进行检测, 可显著提高检测灵敏度。

实验中采用乙醚萃取后, 用 100 μ l 0.1mol/ml KH_2PO_4 (磷酸调 pH 至 2.2)反萃取, 取酸层 40 μ l 进样, 免去了吹干、复溶等过程, 缩短了分析时间, 而且减少了分析过程中内源性杂质的干扰, 提高了精密度, 操作简便。

本方法测定血浆中氯氮平浓度, 与文献报道相比干扰少、灵敏度高、操作简单、结果准确, 可满足临床进行血药浓度监测和药效学研究的要求。

参考文献

- [1] 陈新谦, 金有豫主编. 新编药理学[M]. 第 14 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 178.
- [2] Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, et al. Clozapine - induced agranulocytosis incidence and risk factors in the united states[J]. *New Engl J Med*, 1993, 329: 161.
- [3] Llerena A, Berecz R, Norberto MJ, et al. Determination of clozapine and its N - desmethyl metabolite by high - performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001, 755(1~2): 349.
- [4] Renwick AC, Renwick AG, Flanagan RJ, et al. Monitoring of clozapine and norclozapine plasma concentration - time curves in acute overdose[J]. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2000, 38(3): 325.
- [5] Avenoso A, Facciola G, Campo GM, et al. Determination of clozapine, desmethylclozapine and clozapine N - oxide in human plasma by reversed - phase high - performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 714(2): 299.
- [6] 翟屹民, 李文标, 王传跃, 等. RP - HPLC 法测定全血、血浆和红细胞中氯氮平及 2 种主要代谢物 [J]. *新药分析与检验*, 2002, 11(2): 141.
- [7] 余自成. 氯氮平血药浓度快速测定方法的研究[J]. *药物分析杂志*, 1998, 18(6): 388.

(收稿日期: 2002-09-28 修回日期: 2002-11-14)

卫生部对发热门诊提出强制性要求

本刊讯 在全国各级各类医院普遍建立专门的发热门诊, 是防控“非典”疫情的一项重大措施。为确保各地发热门诊的安全, 卫生部连续就发热门诊问题下发了多个通知, 对医疗机构建立发热门诊提出了一系列强制性要求。

卫生部要求, 医院在建立发热门诊和隔离留观室时, 要与其他门诊和病区相隔离, 保持良好通风, 禁用中央空调, 防止人流、物流交叉。发热门诊和隔离留观室、隔离病区的出入口要设置显著标识, 防止人员误入。对发热病人就诊和留观病人要进行有效管理和引导。发热门诊内要区分清洁区、半污染区、污染区, 合理配置人流、物流。非典型肺炎疑似病人与确诊病人应分

别收入不同的病房, 疑似病人应收入单间隔离治疗。在新颁布的《传染性非典型肺炎医院感染控制指导原则(试行)》中, 卫生部还要求, 发热门诊(急)诊要独立设区, 与其他门诊、急诊区相隔离, 有明显标识。诊室消毒期间, 应当有备用诊室。同时, 近距离内有隔离卫生间。有条件的, 可以指定专门的检验室和放射检查室。

卫生部还特别针对孕产妇及儿童保健门诊问题, 对各地发热门诊提出了专门要求, 即各地在设置发热门诊时, 要远离针对正常人群或亚健康人群提供服务的各类保健门诊, 尤其是孕产期保健门诊、儿童保健门诊, 并进行严格隔离。