

◇ 药物分析 ◇

高效液相色谱法测定人血清中地西洋血药浓度及临床监测

曹银,梁俊,夏清荣,单锋,柳杨,王金亮,戴彪
(合肥市第四人民医院药剂科,安徽合肥 230022)

摘要:目的 建立人血清中地西洋浓度测定的高效液相色谱法(HPLC),并用该法测定临床病人静脉滴注地西洋后的血药浓度。方法 人血清样品采用正戊烷萃取进行分析。色谱柱:SB-C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水-四甲基乙二胺-冰醋酸(670:330:2.2:1.76),柱温:40℃,流速:0.8 mL·min⁻¹,检测波长:254 nm,进样量:20 μL。以氯氮平作为内标物。结果 地西洋在10~1 200 μg·L⁻¹浓度范围内,峰面积与其浓度呈良好的线性关系($r=0.998\ 47$),定量下限为10 μg·L⁻¹。地西洋的高、中、低3种浓度相对平均回收率>95%,提取回收率均>70%,日内、日间的RSD均<15%($n=5$)。地西洋稳定性考察RSD均<15%($n=5$)。地西洋线性方程: $Y=2\ 205.2X+1\ 876.1$ ($r=0.998\ 47$)。临床20例病人分别滴注地西洋20 mg,1 d 2次,前5 d早晨治疗前采血均检测出地西洋血药浓度。结论 该方法灵敏度高,操作简便、快速、准确,可用于人血清中地西洋血药浓度监测,并为临床病人个体化给药提供参考。

关键词:地西洋;氯氮平;高效液相色谱法;人血清;血药浓度

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.012

Concentration determination of diazepam in human serum by HPLC and clinical application

CAO Yin, LIANG Jun, XIA Qingrong, SHAN Feng, LIU Yang, WANG Jinliang, DAI Biao
(Department of Pharmacy, Hefei Fourth People's Hospital, Hefei, Anhui 230022, China)

Abstract: Objective To establish a HPLC method for determination of diazepam concentration in human serum and determination of the plasma concentration in clinical patients after intramuscular injection of diazepam. **Methods** Human serum samples were extracted by 5 mL n-pentane and analyzed. Column: SB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm); Mobile phase: methanol-water-tetramethylethylenediamine-acetic acid (670:330:2.2:1.76); The column temperature was 40℃; Flow rate: 0.8 mL·min⁻¹; and the detection wavelength was 254 nm; Injection volume was 20 μL. Clozapine was used as internal standard. **Results** The calibration curves were linear in the range of 10-1 200 μg·L⁻¹ for diazepam ($r=0.998\ 47$). The lower limit of quantification was 10 μg·L⁻¹. The average recoveries of diazepam at high, middle and low concentration over 95%, the extraction recovery over 70%. The intra-day and inter-day RSD were less than 15% ($n=5$). The diazepam stability of RSD were less than 15% ($n=5$). The calibration curve of good linearity, $r=0.998\ 47$. The regression equation of paroxetine was $Y=2\ 205.2X+1\ 876.1$. After 20 patients were clinical intramuscular injection of diazepam 20 mg bid, before five days the morning treatment for determination of diazepam concentration in human serum. **Conclusions** The method is sensitive, simple, rapid, accurate and can be used for determination of diazepam concentration in human serum and can provide reference for clinical patient individualized.

Key words: Diazepam; Clozapine; HPLC; Human serum; Plasma concentration

地西洋是苯二氮草类长效药物,作用于引起乙醇戒断症状的多个受体,对乙醇戒断症状疗效较好^[1]。目前每年大约有18%~25%饮酒病人有乙醇戒断综合征,轻症者表现为震颤、乏力、出汗,重症者出现震颤谵妄^[2-5]。震颤谵妄是慢性乙醇中毒病人在戒断过程中出现的一种十分严重且威胁生命的合并症,死亡率可高达5%~20%^[6]。目前临

床上主要采用5%葡萄糖注射液中加入适量地西洋注射液缓慢静脉滴注治疗乙醇戒断综合征,获得满意效果。然而静滴的输液瓶和输液器材质多数为聚氯乙烯(PVC),文献[7]报道PVC可对一些药物产生吸附作用。本课题组前期已在实验室阶段证实PVC材质的输液瓶和输液器对于地西洋药物有吸附作用,从而影响整个滴注过程中地西洋药物的浓度^[8]。但是关于地西洋吸附现象对临床病人血清中药物浓度的影响程度尚未报道。因此,本课题组进一步用高效液相色谱法(HPLC)建立人血清中地

西药药物浓度检测的方法,并对临床地西洋滴注后病人血药浓度检测,以期为临床合理用药和监测手段提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪[Agilent1260,包括二极管阵列紫外检测器(DAD)、G1313A自动进样器、G1316A可调柱温恒温箱、G1311C四元泵和Agilent色谱化学工作站];XH-B型旋涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司);DHG-9070A电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司);KLO4A型高速离心机(湖南凯达科学仪器公司);KH5200B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);DK-8D型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司)。

1.2 药品与试剂 地西洋对照品(中国药品生物制品检定所,批号:GD025-130223,含量>99%);内标:氯氮平对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100323-200201,含量>99%);正戊烷(sigma公司,批号:13060317);四甲基乙二胺(色谱纯,Sigma公司,批号:BCBL5612V);冰醋酸(色谱纯,天津市光复精细化工研究所,批号:140306);甲醇(色谱纯,美国TEDIA公司,批号:WXBB4298V);实验用水为二次重蒸水。

1.3 血样 来自于合肥市第四人民医院戒酒病区住院病人,诊断为乙醇戒断综合征。病人静脉滴注20 mg地西洋药物,1 d 2次,于用药后12 h清晨用药前取血。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:SB-C₁₈色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-四甲基乙二胺-冰醋酸(670:330:2.2:1.76);流速:0.8 mL · min⁻¹;柱温:40 °C;检测波长:254 nm;进样量:20 μL;灵敏度 AUFS为0.01。

2.2 对照品溶液的配制 取地西洋标准品10.0 mg,精密称定,置于10 mL容量瓶中,用甲醇超声溶解并定容至10.0 mL,置冰箱4 °C保存。临用用甲醇稀释成10 mg · L⁻¹浓度的地西洋对照品溶液。

2.3 内标溶液的配制 取氯氮平标准品20.0 mg,精密称定,置于100 mL容量瓶中,用甲醇超声溶解并定容至100.0 mL,置冰箱4 °C保存。临用用甲醇稀释成10 mg · L⁻¹作为内标溶液。

2.4 样品处理方法 取含地西洋血清样品1.0 mL加至15 mL锥形离心管中,精确加入10 mg · L⁻¹内标液10 μL,以0.01 mol · L⁻¹氢氧化钠100 μL碱化,快速震荡数秒,加入5 mL正戊烷,密塞,震荡1

min,吸取上清液约3 mL,70 °C水浴锅中挥干,残留物以100 μL流动相复溶,2 000 r · min⁻¹离心6 min,取上清液20 μL进样。

3 结果

3.1 专属性 在“2.1”项色谱条件下,空白血清、地西洋对照品+空白血清+内标物和病人服用地西洋药后血清样品+内标物,按“2.4”项处理后,经HPLC法测定。由图1可知,地西洋与内标物的色谱峰能够完全分离,血清中内源性物质不干扰地西洋和内标物的检测。可见本方法具有较高的专属性,地西洋和内标物的保留时间分别为6.420 min和4.598 min。

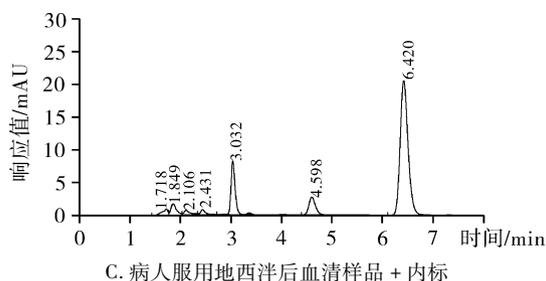
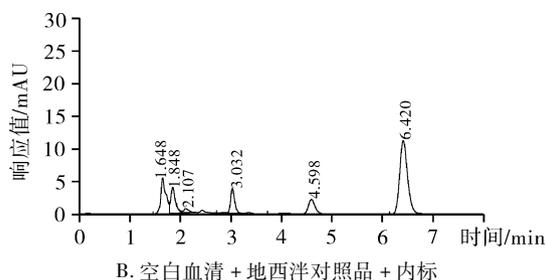
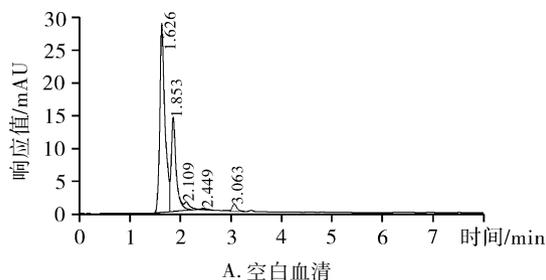


图1 HPLC专属色谱图

3.2 标准曲线制备 在9个15 mL具塞锥形离心管中分别加入不同体积、相同浓度(10 mg · L⁻¹)的地西洋对照品溶液,再加空白血清至1.0 mL,使血清地西洋浓度分别相当于10.0、50.0、100.0、200.0、400.0、600.0、800.0、1 000.0、1 200.0 μg · L⁻¹,然后精确加入10 mg · L⁻¹内标液10 μL,再按“2.4”项后面处理方法处理后,经HPLC分析。以地西洋血药浓度(X)对相应峰面积(Y)进行线性回归,得标准曲线方程 $Y = 2\ 205.2X + 1\ 876.1$ ($r = 0.998\ 47$)。结果得到地西洋质量浓度的线性范围

表1 地西洋的回收率与日内、日间精密度的比较/ $(\bar{x} \pm s, n = 5)$

加入量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	日内精密度		日间精密度		相对回收率		提取回收率	
	实测均值/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	实测均值/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
50.0	50.4	7.64	50.6	9.34	100.40	7.32	74.53	7.95
400.0	398.5	6.87	399.1	7.65	98.94	8.54	81.29	7.69
1000.0	997.6	5.46	998.3	6.43	97.49	6.98	76.89	6.34

为 $10 \sim 1\ 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当信噪比: $S/N > 10$ 时,血清中地西洋检测定量下限可达到 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 提取回收率与精密度 按“标准曲线制备”方法取地西洋浓度为 50.0 、 400.0 、 $1\ 000.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含药血清样品,按“2.4”项后面处理方法处理后,经色谱分析,以峰面积比较,计算回收率。1 d 内不同时间测定 5 次及 5 d 内每天进样 1 次,日内、日间相对标准偏差均 $< 10\%$, 计算结果见表 1。

3.4 稳定性 按“3.2”项下方法配制地西洋浓度为 50.0 、 400.0 、 $1\ 000.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含药血清样品 3 份,每种浓度平行 5 份样本,分别在室温放置 0、12、24 h 和 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存 1、7、21 d 以及反复冻融 3 次后处理样品分别进行色谱分析测定,分别考察室温、冻存、冻融稳定性,结果表明 3 种药物室温、冻存、冻融稳定性良好(均 $\text{RSD} < 15\%$)。

3.5 质量控制 按“3.2”项下方法分别配制地西洋浓度为 50.0 、 400.0 、 $1\ 000.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 30 个含药血清样品(一式 10 份)置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用,为质控样品。每次检测血样前检测质控样品,如果质控样品相对回收率均在 $85\% \sim 115\%$ 范围内,即可认为仪器检测过程正常,工作人员操作正常,否则需检查整个操作过程以及仪器原因。

3.6 临床应用 10 例乙醇戒断综合征住院病人,地西洋注射液(规格: $10 \text{ mg}: 2 \text{ mL}$,上海旭东海普药业有限公司,批号: AH131106) 100 mL 塑料瓶葡萄糖注射液(安徽丰原药业有限公司,批号: 14050365)中滴注,并检测地西洋浓度。地西洋具体用量为 20 mg , 1 d 2 次,从用药后第 1 天至第 5 天早晨治疗前采血检测其血药浓度(谷浓度),结果见表 2。地西洋血药浓度参考值范围为 $20 \sim 1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

本实验在考察人血清样品萃取剂时,分别采用二氯甲烷、乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)、乙酸乙酯、正戊烷作为萃取剂,4 种试剂提取率均比较高。但是乙酸乙酯、乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)需要在真空干燥箱中抽干试剂,抽干耗时过长,二氯甲烷萃取时,出现下层是澄清液,上层为血样残渣,取样不方便,同时挥干较慢,不适合样本量大的实验

表2 10 例乙醇戒断综合征住院病人血药浓度

编号	用药量/ $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$	血药浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
1	40	76.83	270.79	513.30	598.15	774.00
2	40	146.56	390.12	594.38	698.17	871.23
3	40	229.05	426.88	444.31	501.76	552.67
4	40	263.07	365.50	471.84	450.85	438.02
5	40	447.63	538.83	893.07	918.51	1 104.83
6	40	190.36	318.29	429.57	397.16	500.19
7	40	50.05	149.07	351.73	371.63	415.06
8	40	238.42	273.77	426.07	293.99	344.19
9	40	98.14	383.86	573.20	964.92	970.06
10	40	49.48	228.93	252.65	446.40	480.05

操作。正戊烷在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中 2 min 即可挥干,挥干时间短,提取效率高,操作简单,分析速度快,因此实验最终选择正戊烷作为提取试剂。关于在血清样本检测方法上,国内外大量文献[9-12]报道用液质联用技术或 HPLC 测定地西洋血药浓度。同时本课题组前期实验已经建立了地西洋有关药物的 HPLC 测定方法^[8],故地西洋血清药物浓度同样用 HPLC 法进行检测。然后在内标物的选择上,本实验选择了氯氮平作为内标物,出峰效果好,萃取率高,与地西洋分离较好,无干扰,且本实验室也检测氯氮平血药浓度,取内标试剂方便,因此本实验选用氯氮平作为内标物。

由表 2 血药浓度数值可知,病人每天在同一剂量地西洋注射液滴注后,从第 1 天到第 5 天分别检测血清中地西洋药物浓度,数据基本上处于慢慢递增直至达到稳态血药浓度。从数据可以看出血药浓度存在个体差异,高于 $1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 易出现不良反应(如心电图和肝功能等改变),临床应及时干预处理。至于病人血药浓度所表现出来的差异对临床病人疗效和不良反应将是我们下一步研究重点。

本研究通过建立了地西洋血药浓度检测的高效液相色谱法,进一步研究临床滴注地西洋后的稳

高效液相色谱法测定血浆中伏立康唑的浓度

苏涌, 杨春兰, 黄燕, 夏泉, 许杜娟

(安徽医科大学第一附属医院药剂科、国家中医药管理局中药化学三级实验室, 安徽 合肥 230022)

摘要:目的 建立适用于病人血浆中伏立康唑浓度测定的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈:水 (36:64); 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长为 254 nm; 柱温为 30 °C; 内标为艾司唑仑。结果 伏立康唑及内标艾司唑仑的色谱峰分离良好, 伏立康唑在 0.06 ~ 20 mg · L⁻¹ 范围内线性关系良好, $r = 0.9999$ 。日内及日间 RSD 在 1.49% ~ 2.91% 之间, 绝对回收率在 87.07% ~ 96.82% 之间。检测 15 例使用伏立康唑的病人血浆药物浓度, 其均值 (4.99 ± 4.77) mg · L⁻¹。结论 该方法专属性强、灵敏度高, 适合伏立康唑的血浆浓度测定。

关键词: 伏立康唑; 治疗药物监测; 高效液相色谱法

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.013

Determination of plasma concentration of voriconazole by HPLC

SU Yong, YANG Chunlan, HUANG Yan, XIA Quan, XU Dujuan

(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Third-Grade Pharmaceutical Chemistry Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230022, China)

Abstract: Objective To develop a HPLC method for the determination of voriconazole in Plasma. **Methods** Hypersil ODS2 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The mobile phase was consisted of acetonitrile-water (36:64). The column temperature was 30 °C and the detective wave length was 254 nm. Estazolam was selected as internal standard. **Results** A linearity of voriconazole concentration curve was between 0.06-20 mg · L⁻¹, $r = 0.9999$. The intra-day and inter-day RSDs were between 1.49% - 2.91%, absolute recovery rates of voriconazole were between 87.07% - 96.82%. By detecting plasma voriconazole concentration in 15 patients, the average plasma drug concentration was (4.99 ± 4.77) mg · L⁻¹. **Conclusion** This method was sensitive and specific, which is suitable for clinical therapeutic drug monitoring (TDM).

Key words: Voriconazole; TDM; HPLC

通信作者: 许杜娟, 女, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 临床药学, 肿瘤药理学, E-mail: xudujuan6365@163.com

态血药浓度情况, 为该药的后期临床疗效研究提供参考依据和监测手段。

参考文献

- [1] 周波, 王国民, 高晓峰, 等. 奥沙西洋与地西洋治疗酒精戒断性震颤谵妄的临床对照研究[J]. 中国医刊, 2012, 47(1): 44-46.
- [2] DUBY JJ, BERRY AJ, GHAYYEM P, et al. Alcohol withdrawal syndrome in critically ill patients: protocolized versus nonprotocolized management[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2014, 77(6): 938-943.
- [3] 张龚, 魏红艳, 张培文. 地西洋联合小剂量奥氮平治疗酒依赖 126 例临床观察[J]. 中国药物依赖性杂志, 2013, 22(5): 359-362.
- [4] 高晓奇, 冯芳, 刘艳江, 等. 地西洋联合小剂量阿立哌唑治疗酒依赖患者的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(16): 1-2.
- [5] 程宇, 余成民, 李宁佳, 等. 地西洋合并心理干预治疗酒依赖伴抑郁 35 例疗效评价[J]. 中国药业, 2015, 24(13): 8-10.
- [6] 庞良俊, 尹良爽, 朱春燕, 等. 酒精所致震颤谵妄患者血液相关指标的对照研究[J]. 临床精神医学杂志, 2012, 22(5): 330-332.
- [7] 王华生, 刘新明. PVC 输液器与热塑性弹性体 (TPE) 输液器对药物的吸附研究[J]. 中国医疗器械信息, 2013, 19(10): 42-43.
- [8] 夏清荣, 梁俊, 曹银. 塑料输液瓶和输液器对地西洋的吸附性考察[J]. 中国药房, 2015, 26(18): 2564-2566.
- [9] SABIA R, CIOGLI A, PIERINI M, et al. Dynamic high performance liquid chromatography on chiral stationary phases. Low temperature separation of the interconverting enantiomers of diazepam, flunitrazepam, prazepam and tetrazepam [J]. J Chromatogr A, 2014, 1363: 144-149.
- [10] 郭志磊, 范捷, 于洋. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定人血浆中地西洋、咪达唑仑及其代谢产物的浓度和临床应用[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(10): 825-829.
- [11] 徐亚飞, 董瑞华, 曲恒燕, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定肝微粒体孵育体系中地西洋及其代谢产物的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(12): 1180-1183.
- [12] 陈德志, 陈巧辉, 陈翠萌, 等. 反相高效液相色谱法同时测定 3 种抗癫痫药物的血药浓度[J]. 中国药业, 2014, 23(1): 7-8.

(收稿日期: 2016-07-30, 修回日期: 2016-08-17)