

HPLC法同时测定人血清中氯氮平与喹硫平的浓度

梁俊*,曹银,夏清荣#,刘恺(合肥市第四人民医院药剂科,合肥 230022)

中图分类号 R969.1;R971⁺.41 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)38-3590-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.38.12

摘要 目的:建立同时测定人血清中氯氮平与喹硫平浓度的方法。方法:人血清样品经0.01 mol/L 氢氧化钠溶液碱化后,采用正戊烷萃取。以高效液相色谱(HPLC)法进样分析,色谱柱为SB-C₁₈,流动相为甲醇-水-四甲基乙二胺-冰醋酸(620:380:4.4:3.52),流速为0.8 ml/min,柱温为40 ℃,紫外检测波长为254 nm,进样量为20 μl,内标为2-氨基-5-氯-2'-氟二苯甲酮。结果:氯氮平、喹硫平血药浓度分别在10~1 200、10~700 μg/L范围内线性关系良好(r 分别为0.998 5、0.996 3),定量下限均为10 μg/L。氯氮平与喹硫平高、中、低3个浓度的提取回收率均>70%,日内、日间的RSD均<15%($n=5$)。结论:本方法灵敏度高,操作简便、快速,结果准确,可用于人血清中氯氮平和喹硫平血药浓度测定。

关键词 氯氮平;喹硫平;2-氨基-5-氯-2'-氟二苯甲酮;高效液相色谱法;血清;血药浓度

Concentration Determination of Clozapine and Quetiapine in Human Serum by HPLC

LIANG Jun, CAO Yin, XIA Qing-rong, LIU Kai (Dept. of Pharmacy, Hefei Fourth People's Hospital, Hefei 230022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of clozapine and quetiapine concentration in human serum. METHODS: After alkalinizing by 0.01 mol/L NaOH, human serum samples were extracted by *n*-pentane and analyzed by HPLC. The determination was performed on SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water-tetramethylethylenediamine-acetic acid (620:380:4.4:3.52) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was 40 ℃ and UV detection wavelength was set at 254 nm. Injection volume was 20 μl, and 2-amino-5-chloro-2'-fluoro benzophenone was used as internal standard. RESULTS: The linear range were 10-1 200 μg/L for clozapine ($r=0.998\ 5$) and 10-700 μg/L for quetiapine ($r=0.996\ 3$), respectively, the quantitative lower limit were both 10 μg/L. The extraction recoveries of clozapine and quetiapine at high, middle and low concentrations were greater than 70%. The intra-day and inter-day RSD were less than 15% ($n=5$). CONCLUSIONS: The method is sensitive, simple, rapid and accurate, and can be used for the determination of clozapine and quetiapine concentration in human serum.

KEYWORDS Quetiapine; Clozapine; 2-amino-5-chloro-2'-fluorine benzophenone; HPLC; Serum; Blood concentration

Acad Sci USA, 2003, 100(1):223.

- [3] Hernandez JP, Mota LC, Baldwin WS. Activation of CAR and PXR by dietary, environmental and occupational chemicals alters drug metabolism, intermediary metabolism, and cell proliferation[J]. *Curr Pharmacogenomics Person Med*, 2009, 7(2):81.
- [4] Staudinger JL, Ding X, Licht K. Pregnane X receptor and natural products: beyond drug-drug interactions[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(6):847.
- [5] Wada T, Gao J, Xie W. PXR and CAR in energy metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(6):273.
- [6] Sporstøl M, Tapia G, Malerød L, et al. Pregnane X receptor-agonists down-regulate hepatic ATP-binding cassette transporter A1 and scavenger receptor class B type I [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4):1 533.
- [7] Pullinger CR, Eng C, Salen G, et al. Human cholesterol

7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(1):109.

- [8] Nakamura K, Moore R, Negishi M, et al. Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(13):9 768.
- [9] Wu T, Xie C, Han J, et al. Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):37 210.
- [10] Zeng T, Li SJ, Ao W, et al. The detection of autoantibodies to ATP-binding cassette transporter A1 and its role in the pathogenesis of atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(16/17):1 342.
- [11] Zhou J, Zhai Y, Mu Y, et al. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21):15 013.

(收稿日期:2014-07-13 修回日期:2014-08-12)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0551-63616152。E-mail:liangjun_0918@126.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0551-63616022。E-mail:xiaqingrong519@hotmail.com

氯氮平(Clozapine)是一种非经典抗精神病药,对精神病阳性和阴性症状均有良好的疗效,较少引起锥体外系反应,但是易引发粒细胞缺乏症、体质量增加和血糖升高等不良反应,据报道这些不良反应与患者体内血药浓度有密切关系^[1-2]。富马酸喹硫平是一种新型非典型抗精神病药,其结构式与氯氮平相近,属苯二氮草类抗精神病药,主要作用于5-羟色胺(HT)₂、D₁、D₂及D₄受体,对精神分裂症疗效较好,无明显嗜睡、流涎、抗胆碱能作用,无锥体外系反应、粒细胞减少等不良反应^[3],在临床上得到广泛应用。目前,临床上多以喹硫平和氯氮平联合应用治疗难治性的精神分裂症患者。研究发现,有些患者服用同一剂量药物的血药浓度个体差异较大^[4],同时不良反应与环境、年龄、吸烟史和联合用药等也有很大关联^[5]。为减少不良反应及指导医师合理用药,需要对患者体内药物浓度进行监测。因此,本试验建立了同时测定人血清中氯氮平和喹硫平的高效液相色谱(HPLC)法,以满足临床需求。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括G1315B二极管阵列紫外检测器(DAD)、G1313A自动进样器、G1311自动调配器、G1316A可调柱温恒温箱和Agilent色谱化学工作站(美国Agilent公司);XW-80A型涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂);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,离心半径:14 cm);DZF-6050型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

氯氮平对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:100323-200201,含量:>99%);喹硫平对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:100815-200501,含量:>99%);内标:2-氨基-5-氯-2'-氟二苯甲酮(Adamas Reagent Co., Ltd.,批号:P04136,含量:>98%);正戊烷(Sigma公司,批号:13060317,含量:>99%);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

1.3 患者血样

血样来自于合肥市第四人民医院住院患者。患者同时服用氯氮平和喹硫平,无肝肾功能损伤,无吸烟史,达稳态后于次日清晨服药前取血。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-四甲基乙二胺-冰醋酸(620:380:4.4:3.52);流速:0.8 ml/min;柱温:40℃;紫外检测波长:254 nm;进样量:20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液:准确称取氯氮平对照品和喹硫平对照品各10.0 mg,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,置冰箱4℃保存。临用时用甲醇稀释成所需浓度的氯氮平和喹硫平对照品溶液。

2.2.2 内标溶液:准确称取内标20.0 mg,置于100 ml量瓶中,

用甲醇超声溶解并定容至刻度,置冰箱4℃保存。临用时用甲醇稀释成5 mg/L的溶液作为内标溶液。

2.3 血清样品处理

将患者血样离心(3 000 r/min)5 min,取上层血清1.0 ml置于15 ml锥形离心管中,精确加入5 mg/L内标溶液20 μl,然后加入0.01 mol/L氢氧化钠(NaOH)100 μl碱化,在涡旋混合器振荡数秒,再加入5 ml正戊烷后于涡旋混合器上振荡1 min。静置5 min后取上清液约3 ml,放入真空干燥箱中抽干,取出凉至室温,加入流动相100 μl快速振荡数秒溶解残渣,再放入离心机中离心(2 000 r/min)6 min后取20 μl进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性:在“2.1”项色谱条件下,测得空白血清、氯氮平与喹硫平对照品+空白血清及患者同服氯氮平与喹硫平药后血清样品色谱图见图1。在该色谱条件下,氯氮平、喹硫平及内标的色谱峰能够完全分离,没有明显的杂质峰干扰。结果表明本方法具有较高的专属性。氯氮平、喹硫平和内标的保留时间分别为5.648、6.874和9.997 min。

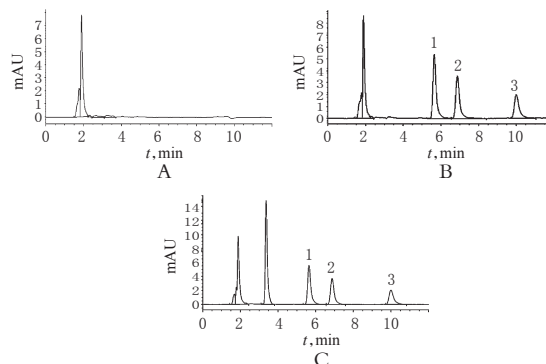


图1 高效液相色谱图

A. 空白血清; B. 空白血清+氯氮平对照品+喹硫平对照品+内标; C. 同服氯氮平与喹硫平后血清样品+内标; 1. 氯氮平; 2. 喹硫平; 3. 2-氨基-5-氯-2'-氟二苯甲酮

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank serum; B. blank serum+clozapine control+quetiapine control + internal standard; C. serum sample after administration of clozapine and quetiapine + internal standard; 1. clozapine; 2. quetiapine; 3. 2-amino-5-chloro-2'-fluorine benzophenone

2.4.2 线性范围及定量下限:在15 ml具塞锥形离心管中分别加入不同体积、相同浓度的氯氮平和喹硫平对照品溶液,再加空白血清至1.0 ml,使血清氯氮平质量浓度分别相当于0、20、50、100、200、400、600、800、1 000、1 200 μg/L,喹硫平质量浓度分别相当于0、10、50、100、200、300、400、500、600、700 μg/L,然后精确加入5 mg/L内标溶液20 μl,再按“2.3”项方法处理后,经HPLC分析。测得喹硫平与氯氮平的峰面积(y),分别与其对应质量浓度(x)进行线性回归,得喹硫平、氯氮平曲线方程为: $y=13.724x+0.023$ ($r=0.9982$)、 $y=43.758x+2.35$ ($r=0.9993$)。结果氯氮平、喹硫平血药浓度分别在10~1 200、10~700 μg/L范围内线性关系良好。血清中氯氮平与喹硫平的检测定量下限可达到10 μg/L(信噪比>10)。

2.4.3 提取回收率: 在15 ml具塞锥形离心管中分别加入不同体积、相同浓度的氯氮平和喹硫平对照品溶液,再加空白血清至1.0 ml,制成氯氮平质量浓度为低、中、高(50、400、1 000 $\mu\text{g/L}$)、喹硫平质量浓度为低、中、高(50、300、600 $\mu\text{g/L}$)梯度的血清样品,每个浓度平行做5份。按“2.4”项方法处理后,经HPLC分析,进样、测定,记录血清样品中氯氮平、喹硫平色谱峰面积为 A_x 。同时,另分别加入不同体积、相同浓度的氯氮平和喹硫平对照品溶液,用流动相稀释成氯氮平质量浓度为低、中、高(50、400、1000 $\mu\text{g/L}$)、喹硫平质量浓度为低、中、高(50、300、600 $\mu\text{g/L}$)3个浓度样品,每个浓度平行做5份,进样、分析,记录色谱峰面积 A_s 。按公式[回收率(%)= A_x 平均值/ A_s 平均值 $\times 100\%$]分别计算氯氮平、喹硫平回收率,所得氯氮平低、中、高3种浓度的提取回收率为(87.86 \pm 4.85)%、(89.61 \pm 3.01)%、(86.58 \pm 4.14)%,喹硫平低、中、高3种浓度的提取回收率为(88.86 \pm 3.65)%、(84.61 \pm 2.81)%、(87.51 \pm 3.16)%。各血清样本提取回收率均 $>70\%$ 。

2.4.4 准确度与精密性:按上述方法配制氯氮平质量浓度为50、400、1 000 $\mu\text{g/L}$ 的含药血清样品,喹硫平质量浓度为50、300、600 $\mu\text{g/L}$ 的含药血清样品,依法分析。同时在1天内重复5次和1周内重复5次测定血药浓度,考察日内、日间精密性,并与加入量对照考察其准确度。结果表明,该方法符合生物样品分析要求(见表1)。

表1 准确度与精密性试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of accuracy and precision tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

药物	加入量, $\mu\text{g/L}$	日内精密性($n=5$)			日间精密性($n=5$)		
		实测值, $\mu\text{g/L}$	RSD, %	准确度, %	实测值, $\mu\text{g/L}$	RSD, %	准确度, %
氯氮平	50	48.89	8.23	97.79	47.12	14.18	94.24
	400	390.22	4.79	97.55	384.12	7.98	96.05
	1 000	941.44	4.55	94.14	959.23	8.08	95.92
喹硫平	50	45.38	7.06	90.76	49.11	13.40	98.22
	300	275.76	7.88	91.92	290.79	9.11	96.93
	600	552.58	3.28	92.10	587.41	9.47	97.90

2.4.5 稳定性:按“2.4.3”项下方法配制氯氮平质量浓度为50、400、1 000 $\mu\text{g/L}$,喹硫平质量浓度为50、300、600 $\mu\text{g/L}$ 的含药血清样品,每组浓度平行5样本,分别考察室温放置10 h、4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置6 h、长期放置(-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱)冻存2周、反复冻融3次的稳定性,分别进行色谱分析测定。结果未见冻存样品的药物降解,RSD均 $<15\%$ 。

2.4.6 质量控制:按“2.4.3”项下方法分别配制氯氮平质量浓度为50、400、1 000 $\mu\text{g/L}$,喹硫平质量浓度为50、300、600 $\mu\text{g/L}$ 的60个含药血清样品(一式10份)置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用,此即为质控样品。每次检测血样的同时检测质控样品,如果相对回收率均在85%~115%内,即可认为仪器检测正常,否则须检查整个操作过程以及仪器原因。

2.5 临床应用

5例精神病住院患者,口服氯氮平和喹硫平片,2周后早上

服药前采血检测其血药浓度见表2。氯氮平血药浓度参考值范围为200~600 $\mu\text{g/L}$,喹硫平血药浓度参考值范围为130~450 $\mu\text{g/L}$ 。

表2 5例住院患者服药后的血药浓度

Tab 2 The serum concentration of drugs in 5 hospitalized patients after medication

患者编号	氯氮平		喹硫平	
	服药量,mg/d	实测值, $\mu\text{g/L}$	服药量,mg/d	实测值, $\mu\text{g/L}$
1	150	168.43	400	135.87
2	225	356.84	500	231.42
3	350	452.67	250	115.34
4	400	587.92	350	168.42
5	450	542.76	200	142.78

3 讨论

本试验分别采用乙酸乙酯、乙酸乙酯-二氯甲烷(80:20)作为提取剂,提取率低、难挥干,不适合大量样本的检验;选用正戊烷作为提取剂,效率高、易挥干,能够达到生物样本检测要求,故选择正戊烷作为提取剂。在内标的选择上,大量文献报道地西洋作为内标^[6-7],但地西洋属于第二类精神药品,标准品获得较难。经过相关资料的调查和试验对比,最后选择2-氨基-5-氯-2'-氟二苯甲酮标品作为内标。其与地西洋出峰位置一致,出峰效果好,萃取率高,可以替代地西洋,且购买方便、经济,具有一定的推广价值。

参考文献

- [1] 刘伟忠,陈清霞,温预关,等. HPLC法同时测定人血浆中舍曲林与氯氮平的浓度[J]. 中国药房,2012,23(6):525.
- [2] Saracino MA, Lazzara G, Prugnoli B, *et al.* Rapid assays of clozapine and its metabolites in dried blood spots by liquid chromatography and microextraction by packed sorbent procedure[J]. *J Chromatogr A*, 2011,18(16):2 153.
- [3] 于海燕,何粤红,胡冬竹,等. RP-HPLC法同时测定人体中富马酸喹硫平和氯氮平浓度[J]. 中国民族民间医药, 2013, 5(3):43.
- [4] Handley SA, Bowskill SV, Patel MX, *et al.* Plasma quetiapine in relation to prescribed dose and other factors: data from a therapeutic drug monitoring service, 2000-2011 [J]. *Ther Adv Psychopharmacol*, 2013, 3(3):129.
- [5] 楼江,王峰,李焕德. 阳离子色谱柱-HPLC法测定人血浆中氯氮平及去甲氯氮平浓度[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 44.
- [6] 彭丽,陈丽霞,王志纲. 氯氮平治疗蒙古族难治性分裂症有效血药浓度的研究[J]. 中国临床药理学杂志,2013,29(11):826.
- [7] 蒋平,刘红梅,任娟娟,等. 联合用药精神障碍患者氯氮平血药浓度监测[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(7): 759.

(收稿日期:2014-07-07 修回日期:2014-08-07)