

• 临床研究 •

反相高效液相色谱法检测阿立哌唑血药浓度

汪旭强, 宋保利, 杨 娜, 周志强, 薛斌丽

(天水市第三人民医院检验科, 甘肃天水 741000)

摘 要:目的 建立反相高效液相色谱法检测抗精神病药阿立哌唑的血药浓度。方法 采用 Agilent 1260 型高效液相色谱仪及其配套 Agilent HC-C18 分析柱, 以 254 nm 检测波长测定阿立哌唑浓度, 建立标准曲线, 并进行专属性试验、精密密度试验及回收试验, 评价高效液相色谱法检测阿立哌唑血药浓度的性能。结果 高效液相色谱法检测阿立哌唑的批内精密密度 (RSD) 为 4.6%~7.1%、批间 RSD 为 4.1%~8.9%; 回收率为 94.7%~97.4%; 最低检测限为 8.5 ng/mL。线性方程: $Y=4.4801X+43.716$ ($r^2=0.9996$), 线性范围为 25~1 000 ng/mL。结论 该检测方法快速、准确, 适合临床药物治疗时血药浓度的监测。

关键词:阿立哌唑; 高效液相色谱法; 血药浓度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.049

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)10-1431-02

阿立哌唑对精神分裂症的阳性和阴性症状均有治疗作用, 同时由于其锥体外系不良反应 (EPS) 少、抗胆碱作用轻、对体质量和心电图校正后 QT (QTc) 间期无明显影响, 因此成为了抗精神分裂症的一线治疗药物^[1]。笔者建立高效液相色谱法 (HPLC) 检测阿立哌唑血药浓度, 旨在用较简便的测定方法为临床用药提供依据, 以利于个体化用药。

1 材料与方法

1.1 标本来源 所有血液标本均来自天水市第三人民医院服用阿立哌唑的精神分裂症患者。

1.2 仪器与试剂 Agilent 1260 型高效液相色谱仪及其配套 Chemstation B 02 版本工作站 (美国安捷伦公司); XW-80A 漩涡混合器、AS5150B 超声清洗仪、MTN-2800W 氮吹仪及 AP01P 真空泵, 均为天津奥特赛恩斯仪器有限公司生产; FA1004 型电子分析天平 (上海越平科学仪器有限公司); -40℃超低温冰箱 (中科美菱低温科技有限公司); 25、50 μL 微量进样器、500 μL 移液枪均为上海安亭微量进样器厂生产; UPT-II-5T 优普超纯水机 (成都超纯有限科技公司)。阿立哌唑对照品 (中国药品生物制品检定所), 内标奋乃静 (美国药典参考标准品), 甲醇 (HPLC/色谱纯)、乙醚 (HPLC/色谱纯)、乙腈 (HPLC/色谱纯) 均为美国天地试剂公司生产, 四甲基乙二胺 (分析纯)、氢氧化钠 (分析纯)、乙酸 (分析纯)、磷酸氢二铵 (分析纯) 均为国药集团化学试剂有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱采用 Agilent HC-C18 柱 (5 μm, 4.6 mm×250 mm, 批号 USJAB01832), 流动相为甲醇 300 mL: 60 mmol/L 磷酸氢二铵 280 mL: 四甲基乙二胺 2 mL: 乙酸 3 mL: 乙腈 480 mL, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温为 40℃, 进样体积为 30 μL。

1.3.2 标准液的制备 精密称取阿立哌唑对照品 2 mg, 用 90% 甲醇以超声仪助溶并定容至 10.0 mL, 得到 200 ng/μL 阿立哌唑标准品储备液, 由储备液配制 0.625、1.25、2.5、5.0、12.5、25.0 ng/μL 浓度的系列标准应用液; 精密称取奋乃静内标 2 mg, 用 90% 甲醇溶解并定容至 10.0 mL, 得到 200 ng/μL 的内标储备液, 再由内标储备液配制 10 ng/μL 的内标应用液, 所有配制液均密封置于 -40℃ 冰箱中储存备用。

1.3.3 样品处理 取血清 0.5 mL, 加内标应用液 20 μL, 加入 2 mol/L 的氢氧化钠溶液 200 μL, 加入乙醚 5 mL, 涡旋混合 1

min, 静置 30 min, -40℃ 冷冻 60 min, 取上清液于尖底离心管, 在 35℃ 水浴中氮气流吹干, 100 μL 流动相复溶, 取 30 μL 进样分析。

1.3.4 标准曲线的建立 于 6 支抽提管中分别加入空白血清 0.5 mL, 将系列浓度的阿立哌唑标准应用液分别取出 20 μL 加入各抽提管, 各管再加入内标应用液 20 μL, 得到阿立哌唑浓度为 25、50、100、200、500、1 000 ng/mL 的标准曲线, 再依样品处理程序进行操作; 以峰面积 (Y) 对应其浓度 (X) 建立标准曲线。

1.3.5 专属性试验 通过测定阿立哌唑标准品、空白血清、含阿立哌唑的血清样品, 确认阿立哌唑的专属色谱图。

1.3.6 精密密度试验 以空白血清为基础加入标准应用液, 配制理论浓度为 200、500、1 000 ng/mL 的样品, 按样品的处理方法操作后, 进行色谱分析, 依据标准曲线计算浓度, 检测批内精密密度 (RSD)、批间 RSD ($n=5$)。

1.3.7 回收试验 以空白血清为基础加入标准应用液, 配制理论浓度为 200、500、1 000 ng/mL 的样品, 按样品的处理方法操作后, 进行色谱分析, 依据标准曲线计算浓度, 检测回收率 ($n=5$)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以百分率表示, 组间比较采用卡方检验; 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 标准曲线图及线性 阿立哌唑标准曲线回归方程: $Y=4.4801X+43.716$ ($r^2=0.9996$), 截距 a 与 0 差异无统计学意义 ($t=0.0416$, $P>0.05$), 阿立哌唑血药浓度在 25~1 000 ng/mL 范围内与峰面积之间有良好的线性关系; 基于噪音标准偏差和校正曲线斜率之比方法所得的最低检测限为 8.5 ng。阿立哌唑血清浓度标准曲线, 见图 1。

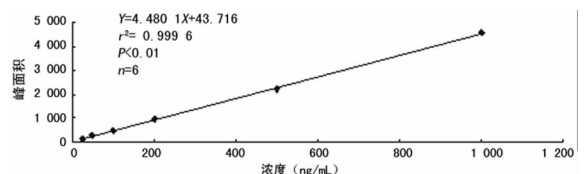
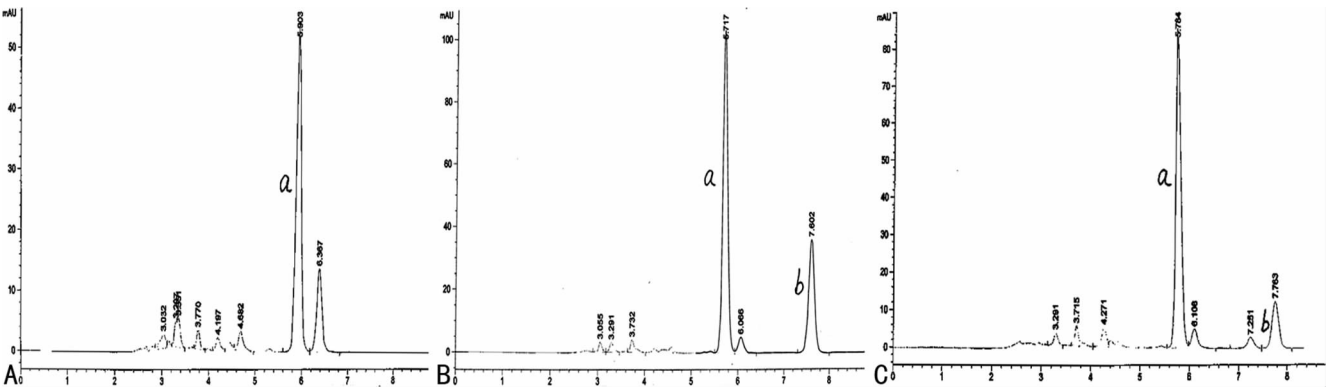


图 1 阿立哌唑血清浓度测量的标准曲线

2.2 专属性试验图谱 阿立哌唑的保留时间约为 7.6 min。

阿立哌唑血清浓度测量的专属性试验图谱,见图 2。



A:空白血清色谱图;B:阿立哌唑标准品色谱图;C:阿立哌唑血清样品色谱图;a 峰:内标;b 峰:阿立哌唑。

图 2 阿立哌唑血清浓度测量的专属性实验图谱

2.3 精密度试验结果 HPLC 检测阿立哌唑血清的批内 RSD 为 4.6%~7.1%,批间 RSD 为 4.1%~8.9%。见表 1。

表 1 HPLC 检测阿立哌唑血清浓度的精密度			
项目	样品浓度 (ng/mL)	检测浓度 ($\bar{x} \pm s$)	RSD (n=5)
批内实验	200	197.3±14.1	7.1
	500	508.4±28.5	5.6
	1 000	978.7±45.6	4.6
批间实验	200	208.5±18.6	8.9
	500	491.4±20.1	4.1
	1 000	984.8±50.2	5.1

2.4 回收试验结果 200、500、1 000 ng/mL 样品的回收率分别为 95.6%、94.7%和 97.4%。见表 2。

表 2 HPLC 检测阿立哌唑血清浓度的回收率(n=5)			
样品浓度(ng/mL)	检测浓度($\bar{x} \pm s$)	回收率(%)	RSD(%)
200	191.2±11.7	95.6	6.1
500	473.6±25.8	94.7	5.4
1 000	974.3±49.3	97.4	5.1

3 讨 论

在 HPLC 用于阿立哌唑血清浓度检测的方法建立初期,始终得不到稳定的标准品色谱图。在反复的试验过程中,阿立哌唑的系列标准液应用色谱图峰面积与对应浓度不成比例,如标准液浓度为 50 ng/mL 时其峰面积为 80,100 ng/mL 时其峰面积为 100,500 ng/mL 时其峰面积为 130,1 000 ng/mL 时其峰面积为 120,两者无线性关系,且各浓度的峰面积大小基本一致,均在(100±30)左右。针对以上情况,在研究性试验时,将系列标准应用液不做萃取处理直接检测,得到的色谱图峰面积与各浓度间存在线性关系($Y = 6.350\ 1X + 41.252, r = 0.952\ 3$)。通过反复试验与分析,笔者怀疑萃取所用的乙醚可能存在问题。经过与供货商的沟通发现,该乙醚添加了一定量

的过氧化氢(H₂O₂),是适用于环境监测的色谱纯级试剂,而阿立哌唑对 H₂O₂ 较敏感,很容易被氧化变性,所以该乙醚不适用于阿立哌唑药物浓度分析。改用专门用于药物浓度分析的新乙醚后,本试验建立了 $r^2 = 0.999\ 6$ 的回归方程。因此,在实际工作中需要做好乙醚的防氧化工作,把乙醚分装入棕色小玻璃瓶避光,每次操作打开 1 瓶,使其尽可能地少与空气接触,保持乙醚的新鲜;此外,操作时在 120 mL 乙醚中加入 0.1 mol/L 维生素 C 5 mL,以消除乙醚中的过氧化物^[2],使对过氧化物敏感的阿立哌唑保持稳定的萃取率。

刘伟忠等^[3]与何国琪等^[4]研究报道,HPLC 测定阿立哌唑的出峰时间分别为 9.3 min 和 18.5 min,而本方法的出峰时间为 7.6 min 左右,适用于临床快速检测。另外,药物浓度分析的质量控制中,实验方法性能的方法学评价与检验医学方法学性能的评价略有不同^[5],本文主要根据药物分析的方法学性能评价进行相关实验探讨。该方法的精密度、回收率均符合要求^[5]。

综上所述,本研究建立的 HPLC 检测阿立哌唑血药浓度的方法快速、准确,能应用于临床诊疗活动,可为患者个体化用药提供科学的参考依据。

参考文献

[1] 左笑丛,刘世坤,朱运贵,等.阿立哌唑的血药浓度与其治疗精神分裂症疗效的相关性分析[J].中国新药与临床杂志,2006,25(8):601-605.

[2] 李文标,翟屹民,王传跃.高效液相色谱电化学检测法测定血清奥氮平浓度[J].药物分析杂志,2000,20(5):304-307.

[3] 刘伟忠,黄伟侨,刘文宪,等.RP-HPLC 测定人血浆中阿立哌唑的浓度[J].现代食品与药品杂志,2006,16(4):17-19.

[4] 何国琪,陈华良.高效液相色谱法测定人血浆中阿立哌唑浓度[J].中国药物与临床,2007,7(7):543-545.

[5] 何俊,潘桂湘,高秀梅.生物药物分析方法的质量控制[J].天津中医药大学学报,2007,26(3):158-159.

(收稿日期:2015-03-02)