

HPLC法测定血浆及尿液中阿普唑仑浓度

Determination of Alprazolam in Human Plasma and Urine by HPLC

李 媛, 金 岩, 段 旭

LI Yuan, JIN Yan, DUAN Xu

(中国医科大学附属盛京医院药剂科, 辽宁沈阳 110004)

(Department of Pharmacy, Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110004, China)

摘要: 采用 Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6mm×150mm, 5 μ m), 以甲醇-水 (60:40) 为流动相, 流速 1.0ml/min, 检测波长 254nm, 建立高效液相色谱法 (HPLC) 测定血浆及尿液中阿普唑仑浓度。结果表明, HPLC 法测定阿普唑仑和内标物的出峰时间是 5.1min 和 8.73min, 分离效果较好; 阿普唑仑质控 3 种浓度 (4.0 μ g/ml, 8.0 μ g/ml, 16.0 μ g/ml) 日内和日间的 RSD, 血浆样品均小于 6%, 尿样均小于 7%, 血浆回收率为 91.15%~93.69%, 尿回收率为 86.79%~90.11%, 血浆及尿样品线性范围为 2.0~64.0 μ g/ml, 相关系数为 0.9907。血浆和尿样品中阿普唑仑的最低检出限为 2.0 μ g/ml。此条件可以对中毒药物阿普唑仑进行快速检测并定量, 方法简便、准确。

关键词: 阿普唑仑 尿液 血浆 高效液相色谱法

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2008)04-0411-03

Abstract To use the HPLC determination method to detect the concentration of Alprazolam from human plasma and urine by Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6mm×150mm, 5 μ m) and methanol and water (60:40) were used as the mobile phase. Flow 1.0 ml/min, and the detection wavelength was 254nm. In the HPLC conditions, the retention times for internal standard Alprazolam and diazepam were 5.1min and 8.73min respectively. With three quality control concentrations of (4.0 μ g/ml, 8.0 μ g/ml, 16.0 μ g/ml), Plasma samples are less than 6% and urine samples are less than 7%. The accuracy and plasma or urine of the recovery rates were 91.15%~93.69% for plasma and 86.79%~90.11% for urine. The standard calibration curves of concentrations and peak area were liner in the concentration ranges of 2.0~64.0 μ g/ml, and the correlation efficiencies were 0.9907. The condition can quickly detect and quantify the alprazolam. The method is very simple and accurate.

Key words Alprazolam, urine, plasma, HPLC

阿普唑仑是苯并二氮卓类镇静催眠药, 具有抗焦虑、镇静催眠和中枢性骨骼肌松弛作用^[1]。这类药物在临床上应用广泛, 在社会上滥用问题日益严重^[2]。应用高效液相色谱分析方法测定血液或尿液中阿普唑仑浓度已有论文报道^[3-5]。但是这些报道

多是用磷酸或三乙胺、乙腈^[6]做流动相, 分离效果不够理想。以前, 中国医科大学附属盛京医院没有阿普唑仑的检测, 急诊中毒患者只是凭医生经验救治, 缺乏针对性, 不利于及时挽救患者生命。因此, 我们从临床中毒病人快速诊断实际出发, 建立了用 HPLC 法测定血浆及尿中阿普唑仑的方法。该方法操作简单、快速准确, 为医院及时救治阿普唑仑中毒患者提供了科学有效的依据。

收稿日期: 2008-01-27

作者简介: 李 媛 (1980-), 女, 药剂师, 主要从事药理学研究工作。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP1100高效液相色谱仪, LD5-2A型低速离心机, SZ-96自动纯水蒸馏器, 安定对照品(中国药品生物制品检定所出品), 硝基安定对照品(中国药品生物制品检定所出品), 阿普唑仑对照品(中国药品生物制品检定所出品), 甲醇为色谱纯, 水为自制重蒸水, 其他试剂均为分析纯

1.2 实验方法

1.2.1 阿普唑仑对照品溶液制备

精密称取阿普唑仑对照品 20mg 加入甲醇溶解, 并稀释成 0.2mg/ml 阿普唑仑对照品储备液, 于冰箱内 4℃ 保存。临用时取阿普唑仑对照品储备液, 用甲醇稀释成 16g/ml 作为标准对照品

1.2.2 内标安定对照品溶液制备

精密称取安定 20mg 加甲醇溶解至刻度得 0.2mg/ml 安定对照品储备液, 于冰箱 4℃ 保存。临用时取安定对照品储备液, 用甲醇稀释成浓度为 8g/ml 的内标对照品溶液。

1.2.3 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱 (4.6mm × 150mm, 5μm), 流动相为甲醇-水 (60:40), 流速 1ml min⁻¹, 检测波长 254nm, 柱温 30℃。

1.2.4 样品处理

取血浆样品 0.5ml, 加入内标溶液 300μl, 加 0.1mol/l NaOH 300μl, 加入乙醚 4.5ml 旋涡混合 2min, 低速离心 10min (3000r/min), 取上清液用压缩空气挥干, 用 200μl 甲醇溶解, 进样 20μl 检测

取尿液样品 0.5ml, 加入内标溶液 300μl, 加 0.1mol/l NaOH 300μl, 加入乙醚 4.5ml 旋涡混合 2min, 低速离心 10min (3000r/min), 取上清液用压缩空气挥干, 用 200μl 甲醇溶解, 吸取 20μl 进样

在上述色谱条件下, 阿普唑仑、安定保留时间分别为 5.1min 及 7.3min。色谱峰理论塔板数按安定计算不低于 4200, 安定与阿普唑仑的分离度为 6.8 (详见图 1 和图 2)。

1.2.5 标准曲线的测定

于空白血浆 (空白尿液) 中加入安定对照品溶液, 使其血浆 (尿液) 药物浓度分别为 2.0μg/ml、4.0μg/ml、8.0μg/ml、12.0μg/ml、16.0μg/ml、24.0μg/ml、32.0μg/ml, 按“1.2.4”项下的方法处理后, 测定阿普唑仑峰面积与内标峰面积。以阿普唑仑与内标峰面积比值 (Y) 对阿普唑仑血浆浓度进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.1625X + 0.0318$ ($r =$

0.9912, $n = 5$); 对阿普唑仑尿液浓度进行线性回归, 得回归方程 $Y = 0.3961X + 0.0362$ ($r = 0.9904$, $n = 5$), 血浆和尿液中, 阿普唑仑与内标峰面积比与浓度分别呈良好的线性关系。

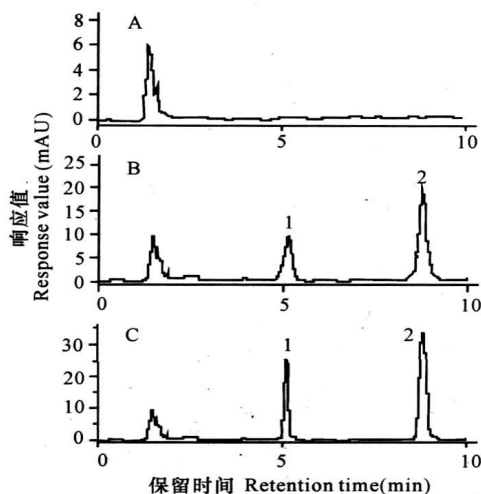


图 1 血浆样品中的阿普唑仑色谱

Fig. 1 Chromatograms of Alprazolam in the plasma sample
A. 空白血浆, B. 血浆样品, C. 空白血浆加阿普唑仑和安定; 1. 阿普唑仑, 2. 安定

A. Blank plasma, B. Plasma sample, C. Blank plasma with Alprazolam and Diazepam. 1. Alprazolam, 2. Diazepam.

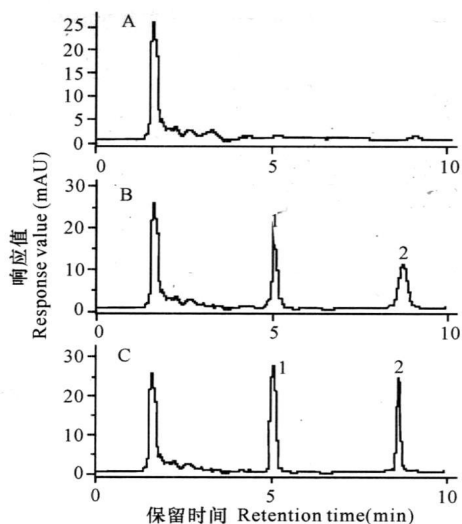


图 2 尿液样品中的阿普唑仑色谱

Fig. 2 Chromatograms of Alprazolam in the urine sample
A. 空白尿液, B. 尿液样品, C. 空白尿液加阿普唑仑和安定; 1. 阿普唑仑, 2. 安定

A. Blank urine, B. Urine sample, C. Blank urine with Alprazolam and Diazepam. 1. Alprazolam, 2. Diazepam.

1.2.6 回收率和精密度

取空白血浆和空白尿液分别与阿普唑仑标准液配成 3 个浓度样品: 4.0μg/ml、8.0μg/ml、16.0μg/ml, 每个样品 5 份, 按“1.2.4”项下处理后进样, 连续

测定 3 天计算回收率及日内精密度和日间精密度的结果见表 1 表 结果显示,阿普唑仑在血浆中的回收率为 91.15%~93.69%,日内及日间精密度的 RSD 分别为 4.92~5.97 和 3.37~6.81;阿普唑仑在尿液中的回收率为 86.79%~90.11%,日内及日间精密度的 RSD 分别为 3.09~3.87 和 3.47~4.25

表 1 阿普唑仑血浆和尿液中回收率和精密度测定结果

Table 1 Precision and recoveries of Alprazolam from human plasma and urine

| 样品 Sample | 加入浓度 Added concentration ($\mu\text{g/ml}$) | 回收率 Recovery (%) | RSD (%) | |
|--------------|--|------------------------|------------------|--------------------|
| | | | 日内 Within-day | 日间 Between-days |
| 血浆 Plasma | 4.0 | 92.83±1.21 | 5.97 | 6.81 |
| | 8.0 | 91.15±1.52 | 4.92 | 5.64 |
| | 16.0 | 93.69±2.13 | 5.68 | 3.37 |
| 尿液 Urine | 4.0 | 86.79±2.57 | 3.09 | 4.25 |
| | 8.0 | 90.11±2.89 | 3.75 | 3.47 |
| | 16.0 | 89.45±2.14 | 3.87 | 4.06 |

1.2.7 稳定性考察

配制低、中、高 3 个浓度阿普唑仑血浆样品数份,分别置室温、冰冻、冰融条件下存放不同时间后,按“1.2.5”项下操作,测定阿普唑仑浓度,考察样品放置稳定性(见表 2)。结果表明阿普唑仑在室温条件下 10 h 内稳定;在冰融条件下 15 h 内稳定,在冰冻条件下 30d 稳定,可满足测定要求

1.2.8 干扰试验

对临床常用的苯二氮卓类药物以及可能配伍的药物如氯硝安定、三唑仑、维生素 C 等进行干扰试验,考察结果(表 3)表明,阿普唑仑与其它常用的配伍用品之间均无干扰

表 2 血浆样品的稳定性试验结果

Table 2 Stability of Alprazolam in plasma sample

| 加入浓度 Added concentration ($\mu\text{g/ml}$) | 室温 Room temperature | RSD (%) | |
|---|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| | | 冰冻样品 Freezing sample | 冰融样品 Thaw sample |
| 4.0 | 3.16 | 2.25 | 3.73 |
| 8.0 | 2.59 | 2.27 | 2.62 |
| 16.0 | 2.57 | 1.90 | 2.58 |

表 3 药品之间的分离度

Table 3 The separation between the degree of drugs

| 药品 Durg | 氯硝安定 Clonopin | 三唑仑 Triazolam | 维生素 C Vitamin C |
|--------------------|------------------|------------------|--------------------|
| 阿普唑仑 Alprazolam | 2.3 | 6.5 | 4.1 |
| 安定 Diazepam | 5.8 | 3.4 | 3.9 |

2 讨论

选择流动相时,我们比较资料中提到的甲醇-磷

酸盐缓冲液系统,发现磷酸盐缓冲液系统虽然分离效果好,但是会造成色谱系统堵塞,因此,我们选定甲醇:水为流动相,以甲醇:水分别为 55:45,70:30,75:25,60:40 进行实验,结果以 60:40 为最佳,对色谱柱和泵无危害,而且能够很好地分离,峰型尖锐,保留的时间短,节省了检测时间,还有利于中毒药物快速测定

选择色谱柱时,我们对比了 Agilent Eclipse XDB-C18 和 Zircrom 反相柱,虽然 Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱的价格贵一些,但是分离效果好,比较适合用于临床急诊检测

苯二氮卓类药物的体内代谢产物主要通过尿液排出,尿液中具有较高的浓度,对于口服治疗的药物,有些代谢物在尿中浓度会达到 100ng 至几百 ng/ml,所以尿中苯二氮卓类药物的代谢物比较容易检测,而且尿液检查比血液检查更易于被患者接受,因此在某种情况下,分析尿中的代谢物往往具有重要的意义

本次实验,采用 HPLC 法后检测血浆和尿液中的阿普唑仑浓度,操作简便易行,系统性强,能快速检测中毒阿普唑仑的血药浓度,可以为医院及时救治提供科学依据,值得医院推广使用

参考文献:

- [1] 王祖诩,裴印权,金有豫.临床精神药理学[M].北京:北京医科大学与协和医科大学联合出版社,1999:8.
- [2] 刘志民.第九届亚洲多城市药物滥用流行病学研讨会情况介绍[J].中国药物依赖性杂志,1999,8(1):75.
- [3] 王刚,谷容,何庆梅,等.高效液相色谱法同时测定 4 种抗癫痫药物及 1 种代谢物的血药浓度[J].中国药理学杂志,2004,4(39):300-302.
- [4] Lamber W E, Meyer E, Xue Ping Y, et al. Screening, identification, and quantization of benzodiazepines in post mortem samples by HPLC with photodiode array detection[J]. J Anal Toxicol, 1995, 19(1): 35.
- [5] Boukhabza A, Lugnier A A, Kintz P, et al. Simultaneous HPLC analysis of the benzodiazepines nitrazepam, estazolam, flunitrazepam, and triazolam in plasma[J]. J Anal Toxicol, 1991, 15(6): 319.
- [6] 冯翠玲,刘荫棠,罗毅.血样中 13 种安眠药镇静药的 HPLC 系统分析方法[J].药学学报,1995,30(12):914-919.

(责任编辑:邓大玉)