



RP-HPLC法测定人血浆奥氮平浓度及其在健康志愿者的药代动力学研究

奥氮平(Olanzapine, OLZ)化学名为2-甲基-4-(4-甲基-1-哌嗪基)-10H-噻吩并[2, 3~6][1, 5]苯并二嗪,它是一种新型非典型抗精神病药物,对精神病患者的阳性和阴性症状均有良好的疗效,极少引起锥体外系反应,对血清催乳素水平影响较小,不会引起粒细胞缺乏[1]。国内外研究证实,在治疗剂量范围内使用,具有安全、不良反应少等特点,而且可以快速增加剂量,甚至“一步到位”[2][3]。OLZ主要以原型从肾脏排泄,这些药动学特征便于调节用药剂量,因此在临床上得到广泛应用。另有研究指出,成人每天口服5~40 mg OLZ,其血浆OLZ浓度与剂量在人体内呈线性动力学关系[4][5]。本实验参考其方法并进行优化,建立了一种用乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)作为提取溶剂的简单、快速的高效液相色谱法测定人血浆中OLZ的浓度,并用该法研究OLZ在中国健康志愿者的药代动力学。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪(Agilent 1100),包括二极管阵列紫外检测器(DAD)G1315B、G1313A自动进样器、G1311自动调配、G1316A可调柱温恒温箱和Agilent色谱化学工作站;旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);电子分析天平(瑞士SARTORIUS);高速离心机(美国MICRO1224);真空干燥箱(德国MMM-GROUP);超纯水仪(法国MILLIPORE)。

1.2 药品和试剂

OLZ片:每片5 mg,批号A111528;OLZ对照品:含量>99%;均由美国礼来公司提供。内标物 β 萘酚、提取剂乙酸乙酯及二氯甲烷(广州化学试剂厂)。甲醇(美国迪马公司)为色谱级,醋酸铵(广东台山粤侨试剂有限公司),水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 对照品和内标溶液

精密称取OLZ对照品10.0 mg,加甲醇溶解并定容至10.0 ml,置冰箱4℃保存。此为工作母液,临用时用甲醇稀释成所需浓度的OLZ对照品溶液。精密配制浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ β 萘酚甲醇溶液作为工作内标液。

1.4 受试者临床资料

男性健康志愿者10人,年龄24~30岁,平均(25.09±2.36)岁;身高166~175 cm,平均(169.45±6.93)cm;体质量58~64 kg,平均(60.27±4.06)kg。BMI=(21.14±1.00)kg/cm²。所有受试者试验前、后均进行常规体检和血液生化检查。试验前受试者心、肝、肾功能均未见异常。受试者无烟、酒等不良嗜好,受试前2周至试验结束期间停药任何药物和含咖啡因饮料。所有受试者在试验前均签署知情同意书。本试验方案经伦理委员会批准后执行。

1.5 给药与样品采集方法

受试者于试验日的前一天晚上开始禁食12 h,第2天早晨7:30空腹一次性口服受试药OLZ片20 mg,250 ml温开水送服,药服2 h后方可再饮水,4 h后统一进食低脂肪食物。分别于服药前和服药后1、2、3、4、5、

6、8、12、24、48、72、96、120、144 h取静脉血5.0 ml, 注入肝素化的试管, 6000 r/min离心10 min, 取血浆, -40 °C冰冻保存备测。整个实验在医护人员监护下进行, 并对药物产生的不良反应及时记录和处理。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 美国迪马公司的C18钻石色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.03 mol·L⁻¹醋酸铵-甲醇(35:65); 流速: 0.8 ml·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 检测波长: 257 nm; AUFs为0.01。

2.2 样品处理方法

1.0 ml含药血浆加至10 ml锥形离心管中, 精确加入内标液40 μl, 快速振荡数秒。再加入乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)4.0 ml, 密塞, 旋涡振荡2 min, 于6000 r/min离心4 min。吸取上清液放入5 ml锥形离心管内, 56 °C真空干燥至干。进样前加入100 μl甲醇快速振荡数秒溶解残渣, 吸取20 μl进样。

2.3 标准曲线的制备

取8只10 ml具塞试管, 分别加入浓度为0、125.0、250.0、500.0、1000.0、2000.0、4000.0、8000.0 μg·L⁻¹的OLZ标准工作溶液40 μl, 再加入健康志愿者空白血浆1.0 ml, 振荡数秒, 配成OLZ浓度分别为0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0、320.0 μg·L⁻¹的血浆样品, 再按“2.2”项下处理后, 测得OLZ峰面积A_i、内标峰面积A_s, 以A_i/A_s比值为横坐标, 以血浆样品所对应各点OLZ浓度(C)为纵坐标绘制标准曲线。经最小二乘法线性回归, 得到5.0~320.0 μg·L⁻¹范围的OLZ血浆浓度标准曲线。曲线方程为: C=264.03A_i/A_s-1.21(r=0.9996)。当信噪比S/n=3时, 本实验OLZ的最低检测浓度值为5.0 μg·L⁻¹。β萘酚和OLZ的保留时间分别为6.137 min和8.279 min, HPLC图谱见图1。

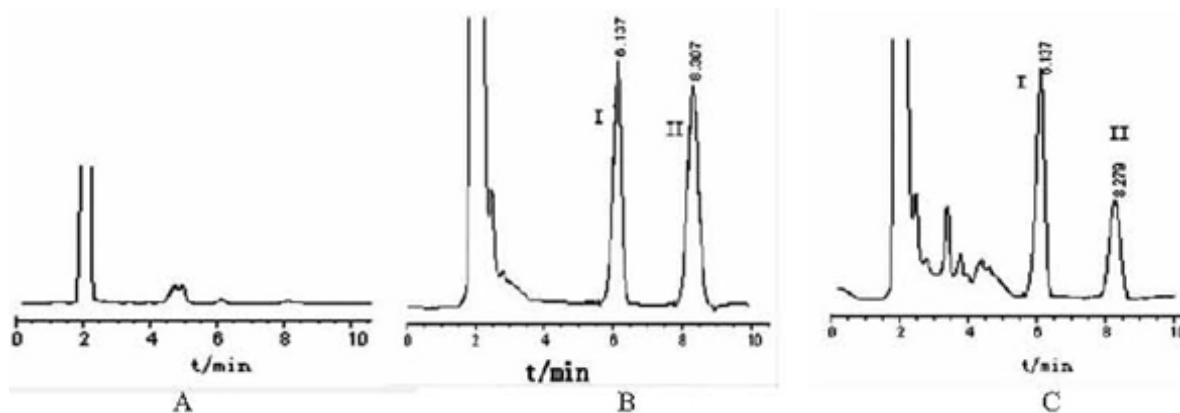


图1 OLZ的高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of OLZ

A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with OLZ and β-naphthol; C: Volunteers, I: β-naphthol; II: OLZ

2.4 定量下限

取标准曲线的最小浓度值5.0 μg·L⁻¹为本实验的定量下限[6]。

2.5 方法学的专属性

从图1可知, 在本实验条件下, OLZ和内标物的色谱峰能完全分离, 没有明显的内生杂质峰干扰, 可见此方法具有较高的专属性。

2.6 回收率及精密度实验

取OLZ低、中、高(10.0、80.0、320.0 μg·L⁻¹)3种浓度的血浆样品, 制作提取前和提取后的两组含药

血浆样品,经色谱分析,测得相对提取回收率均大于90%。同时在1 d内重复5次和2周内重复5次测定,计算日内、日间误差及相对回收率。结果(表1)表明,此方法符合生物样品分析要求。

表 1 OLZ 相对回收率与日内、日间精密度

Tab.1 Precision and recovery of olanzapine (OLZ) in human plasma (n=5)

Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Within-day			Between-day		
	Receive ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery(%)	RSD(%)	Receive ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery(%)	RSD(%)
10.0	9.82±0.26	96.4	5.39	9.79±0.21	97.9	4.37
80.0	77.7±5.33	97.6	4.16	78.7±5.14	98.4	5.38
320.0	329.4±15.5	104.3	2.58	313.8±13.2	98.1	2.23

2.7 样品稳定性实验

按标准曲线制备方法分别配制含OLZ 10.0、80.0、320.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的3组18个样品,分别在室温(25~28℃)放置4 h和-20℃冻存24 h以及-20℃冻存1、3周后进行测定,未见样品中药物降解。

2.8 样品的质量控制实验

按标准曲线制备方法分别配制含OLZ 10.0、80.0、320.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三种浓度共36个血浆样品(一式12份)置-20℃冻存储备用。为质控样品,每次检测血样时同时检测质控样品,如果相对回收率均落在85%~115%之内,即可认为检测正常,否则须检查整个操作过程及仪器原因。

2.9 结果

2.9.1 不良反应 10名受试者全部完成整个试验,服药后出现头晕2例、恶心1例、瞌睡3例,但均在4 h内自行消失,未见其他不良反应。试验结束后复查心、肝、肾功能均正常。

2.9.2 数据处理 所有数据均用均数±标准差表示。血药浓度-时间数据采用中国药理学学会编制的3P97药代动力学程序进行房室模型包拟合并计算药代动力学参数,达峰时间(T_{\max})和达峰浓度(C_{\max})采用实测值,药-时曲线下面积(AUC)采用梯形方法计算,半衰期用浓度-时间曲线末端计算($t_{1/2}=0.693/\text{ke}$)。

2.9.3 药动学参数 10名男性健康志愿者单剂量口服OLZ 20 mg后,平均血浆OLZ浓度值经3P97程序包拟合符合二室开放模型,主要药代动力学参数 C_{\max} 、 T_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-144} 、 $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ 分别为(113.7 ± 33.1) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、(5.07 ± 0.65) h、(35.44 ± 4.21) h、(2235 ± 257) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(2516 ± 301) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

OLZ血药浓度检测方法有采用LC-MS/MS检测法[7],此法成本高,不便普及。也有学者采用HPLC电化学法,但该法流动相使用缓冲液,操作繁琐[5]。本法具有操作简单、成本低、精密度和回收率高等特点,适用于药物分析和临床药代动力学研究。本实验曾分别使用乙醚、正己烷、乙酸乙酯和氯仿为提取剂,提取率都不满意。后发现用乙酸乙酯与二氯甲烷(80:20)作提取剂时,提取率最高。采用乙酸乙酯与二氯甲烷一次提取,后用甲醇定容进行紫外色谱分析,所取血浆仅1.0 ml,且进样量为20 μl 便达到实验要求,既提高了灵敏度,又减少了样品杂质,保证色谱柱能进行大量样品的连续分析。

OLZ口服吸收迅速,4~6 h达到 C_{\max} ,绝对生物利用度高达93%,食物不影响OLZ最高血药浓度。在5~40 mg剂量范围内,OLZ血药浓度与剂量呈线性关系[5]。在本实验研究中,口服20 mg OLZ片的药动学特点符合二房室模型。本实验结果与Callaghan等[8]的研究有一些差异,可能是种族原因。

参考文献:

- [1] 陆国才,袁伯俊. 新一代非典型抗精神分裂症药物奥氮平[J]. 中国新药杂志, 1999, 8(3): 161-4.
- [2] Beasley CM Jr, Tollefson GD, Tran PV. Efficacy of olanzapine: an overview of

pivotal clinical trials[J]. J Clin Psychiatry, 1997, 58(10): 7-12.

[3] 舒良, 刘平, 周沫. 奥氮平治疗精神分裂症的开放性临床验证[J]. 中华神经科杂志, 1999, 32(4): 223-5.

[4] Dusci LJ, Peter HL, Fellows LM, et al. Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 773(2): 191-7.

[5] Bergemann N, Frick A, Parzer P, Kopitz J. Olanzapine plasma concentration, average daily dose, and interaction with co-medication in schizophrenic patients[J]. Pharmacopsychiatry, 2004, 37(2): 63-8.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录XI, XB, 附录173-6.

[7] Berna M, Shugert R, Mullen J. Determination of olanzapine in human plasma and serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 1998, 33(10): 1003-8.

[8] Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak LR, et al. Olanzapine: pharmacokinetic and pharmacodynamic profile[J]. Drug Disposit, 1999, 37(3): 177-93.

[回结果列表](#)