

经验交流

氯氮平、去甲氯氮平及奥氮平的 高效液相色谱电化学检测特性的研究

李文标, 翟屹民, 王传跃, 秦英绂, 翁永振

(北京安定医院临床精神药理实验室, 北京 100088)

摘要 采用高效液相色谱安培电化学检测法, 考察了氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平在不同 pH 值流动相下的色谱分离情况及其色谱峰高与检测电压的关系。结果表明, 氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平的保留时间均随流动相 pH 值的升高而延长, 在 pH 值为 4.56 和 5.56 的流动相中, 均可实现基线分离。3 种化合物的色谱峰高与检测电压之间呈典型的“S”型曲线, pH 值升高时该曲线均左移。氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平的检测电压必须大于产生最大氧化电流的最低电压才能得到稳定的检测电流。这种典型的“S”型伏安曲线对于化合物的定量和定性检测具有重要意义。

关键词 高效液相色谱法; 电化学检测器; 安培法; 氯氮平; 去甲氯氮平; 奥氮平

中图分类号: O658. R9 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2000)06-0550-04

1 前言

氯氮平(clozapine, CLZ)是临床上常用的非典型抗精神病药, N-去甲氯氮平(N-desmethyl clozapine, NCLZ)是其体内主要的活性代谢产物。对这两种化合物的测定常采用高效液相色谱紫外检测法^[1~3], 最低检测质量浓度在 10 $\mu\text{g/L}$ 左右。采用高效液相色谱电化学检测法(HPLC-ECD)可将检测灵敏度提高几十倍。Schulz 等^[4]采用 HPLC-ECD 法测定了青少年病人服用 CLZ 后的血清中 CLZ 和 NCLZ 浓度, 最低检测质量浓度达到 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。奥氮平(olanzapine, OLZ)是在 CLZ 的基础上新近开发上市的新型非典型抗精神病药, 具有与 CLZ 相似的化学结构和药理作用, 但克服了 CLZ 易引起粒细胞缺乏症的缺点^[5]。OLZ 的临床用量小, 治疗剂量下血药的质量浓度在几 $\mu\text{g/L}$ 到几十 $\mu\text{g/L}$ 的范围内^[6]。紫外检测法不能完全满足对其测定的要求。目前国内尚无采用 HPLC-ECD 法测定这 3 种化合物的报道, 国外已发表的几篇文章^[4, 6]也未对它们的电化学检测特性进行详细的阐述。因此, 我们对 CLZ, NCLZ 和 OLZ 采用 HPLC-ECD 法检测的特性进行了研究, 其结果对于建立这 3 种化合物的定量和定性测定方法, 开展药代动力学和治疗药物监测等方面的研究具有指导意义, 并可为其他药物采用 HPLC-ECD 法进行测定提供参考。

2 材料和方法

2.1 试剂

氯氮平标准品(上海黄河制药厂)、去甲氯氮平标准品(美国 Sigma 公司)和奥氮平标准品(美国礼来公司), 纯度(质量分数)均大于 99.9%。甲醇为市售色谱纯试剂, KH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 均为市售分析纯试剂。蒸馏水为自制重蒸水。

标准储备液及标准混合应用液的制备: 准确称取氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平各 5 mg, 分别加 200 μL 0.2 mol/L 的盐酸溶解, 以 2 mL 甲醇稀释, 置于 50 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 得 100 mg/L 的储备液, 置于 -10°C 冰箱内保存。以甲醇为溶剂配制质量浓度为 160 $\mu\text{g/L}$ 的氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平标准混合应用液, 于 4°C 冰箱内储存备用。

KH_2PO_4 (Na_2HPO_4) 溶液及缓冲液的配制: 称取 KH_2PO_4 6.80 g($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 17.9 g), 用重蒸水溶解, 于 500 mL 容量瓶中定容, 得 0.1 mol/L 的 KH_2PO_4 (Na_2HPO_4) 溶液。向 0.1 mol/L 的 KH_2PO_4 溶液中加入不同比例的 0.1 mol/L Na_2HPO_4 溶液, 得不同 pH 值的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液。

2.2 仪器

日立 L-6200 型高效液相色谱泵, 美国 BIO-RAD 1640 型电化学检测器, 日立 D-2500 型色谱积

分仪 7125 型手动进样阀, 进样体积为 20 μL 。色谱柱为 Inertsil ODS-3 柱(4.6 mm i. d. \times 250 mm, 5 μm)。

2.3 色谱条件

流动相为甲醇-0.1 mol/L 的 KH_2PO_4 溶液或不同 pH 值的 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液的混合液(体积比为 60:40), 流速 1.2 mL/min。检测器灵敏度 20 nA/V, 基线 0.15 V。纸速 0.25 cm/min, 衰减值为 8。

2.4 方法

在以上色谱条件下, 选用不同 pH 值的流动相, 改变电化学检测器电压, 取 160 $\mu\text{g/L}$ 的 CLZ, NCLZ 和 OLZ 甲醇混合溶液 50 μL 反复多次进样, 考察 3 种被测化合物的分离情况及保留时间与流动相 pH 值改变的关系、色谱峰高与检测电压变化的关系及流动相 pH 值改变对此关系的影响。

3 结果

3.1 氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平的色谱分离及流动相 pH 值的影响

图 1 为 CLZ, NCLZ 和 OLZ 在其他色谱条件不变的情况下, 采用两种不同 pH 值流动相时的色谱图。图 1 表明 pH 值为 4.56 和 5.56 的流动相均可实现对 3 种化合物的基线分离; 3 种化合物的保留时间均随 pH 值的升高而延长。

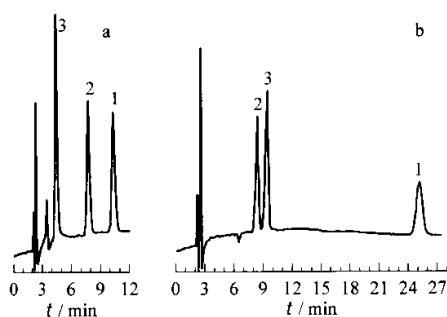


图 1 氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平的色谱分离图

Fig.1 Chromatograms of clozapine, N-desmethyl clozapine and olanzapine

a. pH 4.56; b. pH 5.56.

1. 氯氮平(clozapine); 2. 去甲氯氮平(N-desmethyl clozapine); 3. 奥氮平(olanzapine)。

3.2 氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平的色谱峰高与检测电压的关系及流动相 pH 值的影响

图 2 为采用两种不同 pH 值流动相的条件下 3

种化合物色谱峰高与电化学检测器检测电压的关系图。图 2 表明 3 种化合物色谱峰高与检测电压均呈现典型的“S”型关系曲线。当 pH 值为 4.56 时, 引起 3 种被测化合物 CLZ, NCLZ 和 OLZ 发生电解的最低检测电压分别约为 0.43 V, 0.43 V 和 0.22 V; 产生最大电解电流的最低检测电压分别约为 0.60 V, 0.60 V 和 0.35 V。当 pH 值为 5.56 时, 3 种化合物发生电解的最低检测电压分别约为 0.36 V, 0.36 V 和 0.16 V; 产生最大电解电流的最低检测电压分别约为 0.48 V, 0.48 V 和 0.30 V。图 2-a 和图 2-b 相比, 图 2-b 中 3 种化合物的伏安曲线均明显左移。

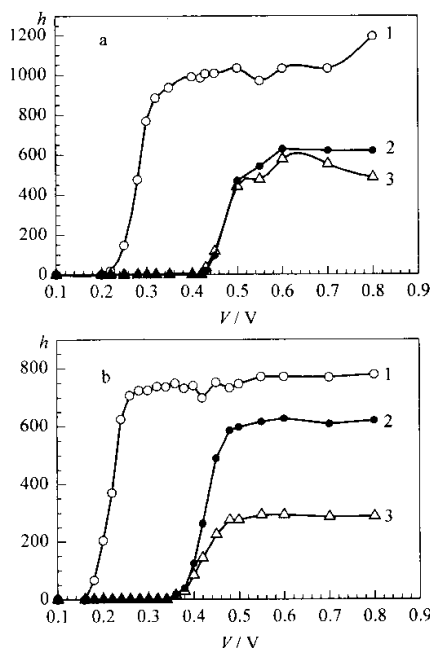


图 2 氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平的色谱峰高与检测电压的关系

Fig.2 Relationship between peak heights and detection voltages of clozapine, N-desmethyl clozapine and olanzapine

a. pH 4.56; b. pH 5.56.

1. 奥氮平(olanzapine); 2. 去甲氯氮平(N-desmethyl clozapine); 3. 氯氮平(clozapine)。

3.3 检测电压的选择

图 3 为选用 pH 值为 4.56 的 0.1 mol/L KH_2PO_4 与甲醇构成的溶液为流动相, 检测电压定为 0.55 V, 在其他色谱条件不变的条件下反复多次注入同一份 CLZ, NCLZ 和 OLZ 的甲醇溶液时色谱峰高与进样时间的关系。在此图中, OLZ 的峰高保持稳定, 而 NCLZ 和 CLZ 的峰高却随进样时间延长

而降低。说明检测电压须大于产生最大检测电流所需电压,才能得到稳定的检测电流。

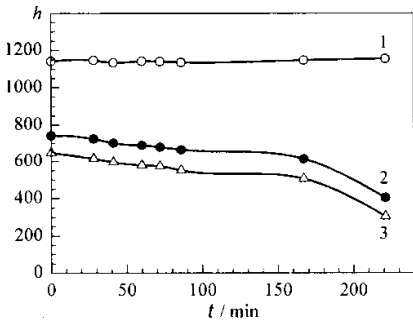


图 3 氯氮平、去甲氯氮平和奥氮平的色谱峰高随时间的变化

Fig.3 Changes of the peak heights of clozapine, N-desmethyl clozapine and olanzapine with time

检测电压为 0.55 V, 流动相 pH 值为 4.56 的条件下重复进样 (repeated injections at detection voltage 0.55 V and mobile phase pH 4.56)

1. 奥氮平 (olanzapine); 2. 去甲氯氮平 (N-desmethyl clozapine); 3. 氯氮平 (clozapine)

CLZ 和 NCLZ 的峰高却随进样时间不断下降 (见图 3)。由图 2-a 可知, 0.55 V 的检测电压已经明显高于 OLZ 产生最大氧化电流所需要的最低电压, 正处于 CLZ 和 NCLZ 的初始氧化电压和产生最大氧化电流所需的最低电压之间。BIO-RAD 1640 型电化学检测器的检测方法为伏安流动法, 流动相中微量的电化学活性物质会污染电化学检测器电极的表面, 使实际的检测电压不断降低, CLZ 和 NCLZ 的电解电流就会随之明显下降。但由于这一电压已明显高于 OLZ 发生最大氧化所需最低电压, 故其电解电流可保持稳定, 不会因检测电压的微小变化而改变。

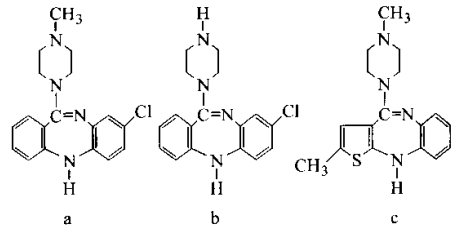


图 4 氯氮平 (a) 去甲氯氮平 (b) 和奥氮平 (c) 的化学结构式

Fig.4 Chemical structures of clozapine (a), N-desmethyl clozapine (b) and olanzapine (c)

4 讨论

美国 BIO-RAD 公司生产的 1640 型电化学检测器属于安培检测器, 其工作电极为玻璃碳电极, 参比电极为 Ag-AgCl 电极。工作原理是被测化合物通过检测池时, 在一定的施加电压下可发生氧化或还原反应, 产生氧化电流 (正电流) 或还原电流 (负电流), 该电流的大小与介质中被测化合物的浓度成正比。检测池工作电极与参比电极间电压的大小和被测化合物的电化学特性是决定能否发生电化学反应的主要因素。一定条件下, 若典型的被测化合物通过检测池的量恒定不变, 则施加电压与检测到的电流之间呈典型的“S”型关系曲线, 称为伏安曲线^[7]。

CLZ, NCLZ 和 OLZ 具有相似的主体化学结构 (见图 4) 在 CLZ 和 NCLZ 的分子中是两个苯环, 在 OLZ 的分子中是一个苯环与一个噻吩环。它们之间通过 -N=C- 形成一个大的共轭体系, 电子云密度均很高, 是良好的电子供体^[8], 在一定的施加电压下, 可发生氧化反应, 在电极上形成电流。本研究发现, CLZ, NCLZ 和 OLZ 的伏安曲线呈典型的“S”型关系曲线。而且我们在实验中还发现, 采用 pH 值为 4.56 的 0.1 mol/L 磷酸盐溶液所配流动相, 选择 0.55 V 的检测电压, 同一份 CLZ, NCLZ 和 OLZ 的甲醇液重复多次进样, OLZ 的峰高保持稳定不变, 而

CLZ, NCLZ 和 OLZ 均属弱碱性药物, 若介质的 pH 值升高, 其解离度下降, 极性降低, 因此在反相键合相色谱中的保留时间延长 (见图 1)。在较高 pH 值的介质中, 电子云更加密集地集中于共轭体系, 在一定电压下更易失去电子而被氧化, 所以在较高 pH 值的流动相下, 3 种化合物的伏安曲线均向左移 (见图 2-b)。

本研究表明, CLZ, NCLZ 和 OLZ 的伏安曲线均呈典型的“S”型, 并且随流动相 pH 值的升高左移, 其适宜的检测电压均应大于在一定 pH 值下使其发生最大氧化的最低电压, 而且其特定的伏安曲线可用于定性分析。

参考文献:

[1] ZHAI Yi-min, QIN Ying-fu, LI Wen-biao, et al (翟屹民, 秦英侠, 李文标, 等). Chinese Journal of Hospital Pharmacy (中国医院药学杂志), 1997, 17 (Appl) (增刊): 10-12

[2] YIN Jin-long, GU Niu-fan, LIN Zhi-guang, et al (殷金龙, 顾牛范, 林治光, 等). Archive of Psychiatry (上海精神医学), 1990, 2 (1): 24-26

[3] Avenoso A, Facciola G, Campo G M, et al. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 714 (2): 299-

308

- [4] Schulz E , Fleischaker C , Remschmidt H. *Pharmacopsychiatry* , 1995 , 28 (1) : 20-25
- [5] SHU Liang , LIU Ping (舒 良 , 刘 平). *Chinese Journal of Psychiatry* (中华精神科杂志) , 1999 , 32 (2) : 123
- [6] Aravagiri M , Ames D , Wirshing W C , et al. *Therapeutic Drug Monitoring* , 1997 , 19 : 307-313
- [7] ZOU Han-fa , ZHANG Yu-kui , LU Pei-zhang , LU Pei-chang (邹汉法 , 张玉奎 , 卢佩章). *High performance liquid chromatography* (高效液相色谱法). Beijing : Science Press (北京 科学出版社) , 1998 . 342-347
- [8] XU Bian-zhen , ZHAO Feng-lin , TONG Shen-yang (徐变珍 , 赵凤林 , 童沈阳). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis* (药物分析杂志) , 1998 , 18 (3) : 156-159

Study of the Detection Characteristics of Clozapine , *N*-Desmethyl Clozapine and Olanzapine with High Performance Liquid Chromatograph-Electrochemical Detector

LI Wen-biao , ZHAI Yi-min , WANG Chuan-yue , QIN Ying-fu , WENG Yong-zhen
(*Laboratory of Clinical Psychopharmacology , Beijing Anding Hospital , Beijing 100088 , China*)

Abstract : In order to analyze clozapine , *N*-desmethyl clozapine and olanzapine , their detection characteristics with high performance liquid chromatograph-electrochemical detector (HPLC-ECD) were investigated . The separation was performed on an ODS-3 column with the mobile phase of methanol and 0.1 mol/L phosphate buffer (60 : 40 , *V/V*). The retention times of clozapine , *N*-desmethyl clozapine and olanzapine were all prolonged with higher pH of the mobile phase . These three compounds could be separated on the baseline at pH 4.56 and 5.56 . The relationships of peak heights and detection voltages shown typical " S " shaped curves , and these curves shifted to the left with higher pH . To get stable detection current , the detection voltages for clozapine , *N*-desmethyl clozapine and olanzapine must be higher than 0.60 V , 0.60 V and 0.35 V at pH 4.56 , and 0.48 V , 0.48 V and 0.30 V at pH 5.56 , respectively . The typical " S " shaped ampere-volt curves were very important for the selection of suitable voltage for quantitative detection , and could be used for the qualitative detection of these three compounds .

Key words : high performance liquid chromatography ; electrochemical detector ; ampere detection ; clozapine ; *N*-desmethyl clozapine ; olanzapine