

HPLC 法同时测定人血清中氯硝西泮、硝西泮、三唑仑浓度

付成效¹ 李华文²

(1. 南华大学 第一附属医院 药剂科 湖南 衡阳 421001; 2. 祁东县人民医院 药剂科)

摘要: 目的 建立单步萃取-HPLC 法同时测定人血清中硝西泮、氯硝西泮、三唑仑浓度。方法 血清样品采用二氯甲烷单步萃取 采用 Ultimate XB-C18 色谱柱(250.0 mm×4.6 mm 5 μm) 流动相为甲醇:水:乙腈=10:56:34 流速为 1 mL/min 检测波长为 254 nm 柱温为 30℃,卡马西平为内标物。结果 硝西泮、氯硝西泮、三唑仑的线性范围分别为 32.5~650.0 μg/L($r=0.9997$)、31.5~630.0 μg/L($r=0.9999$)、74~1480 μg/L($r=0.9997$) 最低检测限分别为 8.13 μg/L、7.88 μg/L、18.5 mg/L,日内精密度和日间精密度良好,回收率较高。结论 本法操作简便,结果准确可靠。可满足临床快速监测的需要。

关键词: HPLC; 硝西泮; 氯硝西泮; 三唑仑

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 2095-1116(2011)04-0457-03

Simultaneous Determination of Nitrazepam, Clonazepam, Triazolam in Human Serum Concentration by HPLC

FU Cheng-xiao, LI Hua-wen

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To establish a single step method for the determination of the concentration of the nitrazepam (NZ), clonazepam (CZ), triazolam (TZ). **Methods** The serum sample was extracted once with Dichloromethane. The residue was dissolved and analyzed with Ultimate XB-C18 (250.0 mm×4.6 mm 5 μm), mobile phase was methanol: water: acetonitrile = 10: 56: 34, flow rate was 1.0 mL/min. The detective UV wavelength was 254 nm, the column temperature was 30℃, carbamazepine was used as internal standard. **Results** The linear relation was in the range of 32.5~650.0 μg/L ($r=0.9997$), 31.5~630.0 μg/L ($r=0.9999$) and 74~1480 μg/L ($r=0.9997$). The lowest detectable concentration in plasma was 8.13 μg/L, 7.88 μg/L, 18.5 mg/L, the intra-day precision and inter-day precision were all good, the average recovery rate was comparatively high. **Conclusion** The method is rapid, accurate and practical. It can be used as the fast method by TDM.

Key words: HPLC; carbamazepine; phenytoin; phenobarbital

苯二氮卓类药物为临床较常用的镇静催眠药,具有抗焦虑、镇静催眠和中枢性骨骼肌松弛作用。大剂量镇静催眠药可损害患者的近期记忆,引起暂时性的健忘症,也可引起患者外周神经肌肉阻断等。硝西泮(Nitrazepam, NZ)、氯硝西泮(Clonazepam, CZ)、三唑仑(Triazolam, TZ)这3种临床常用的苯二氮卓类药物,被滥用或误服的情况时有发生,也被犯

罪分子用于麻醉抢劫作案等。因此,人体中这些药物含量的检测具有重要意义。国内外采用了GC法、HPLC法等分析此类药物,但鲜见有同时分析这3种药物的方法报道^[1-5]。本文拟建立RP-HPLC方法同时分析人血清中硝西泮、氯硝西泮、三唑仑浓度,为临床药物分析提供快速、准确、可靠的检测方法。

1 仪器与试剂

HP1100 型高效液相色谱仪, HP1100 色谱工作站, VWD 紫外检测器; 光学读数分析天平(型号: TG328A); XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂), TGL-16B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为自制纯化水; 二氯甲烷(长沙市试剂厂); 硝西泮(国家麻醉品实验室, 批号: 1217-9201)、氯硝西泮(中国药品生物制品检定所提供, 批号 130858-200709)、三唑仑(中国药品生物制品检定所提供, 批号 1230-9701)、卡马西平(中国药品生物制品检定所, 批号 171222-200504)。

2 方法与结果^[6]

2.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate XB-C18(250.0 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇: 水: 乙腈 = 10: 56: 34; 流速:

1.0 mL/min; 紫外检测波长: 254 nm; 柱温: 30℃。

2.2 工作液的配制

2.2.1 药物工作液 分别精密称定硝西泮对照品 13.0 mg、氯硝西泮 12.6 mg 及三唑仑对照品 14.8 mg 至 100 mL 容量瓶中, 用 60% 甲醇溶解, 并稀释至刻度, 配成质量浓度分别为 130.0、126.0 以及 148.0 mg/L 的对照品贮备溶液。

2.2.2 内标工作液 取卡马西平对照品, 用 60% 甲醇配制成 58.0 mg/L 的内标工作液。

2.3 血清样品处理

取血清样品 0.4 mL 置刻度离心管中, 加入 58.0 mg/L 卡马西平内标液 10 μL, 充分摇匀, 加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 200 μL, 再吸取 2 mL 二氯甲烷置管中, 涡旋振荡 2 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 取下清液, N₂ 吹干, 加入 100 μL 流动相溶解, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液 20 μL 进样。

2.4 专属性考察

以“2.1”项下色谱条件, 分别按“2.3”项下血清样品处理方法处理, 得到空白血清、空白血清加对照品和内标色谱图。血清中内源性物质对其检测无干扰(图 1)。

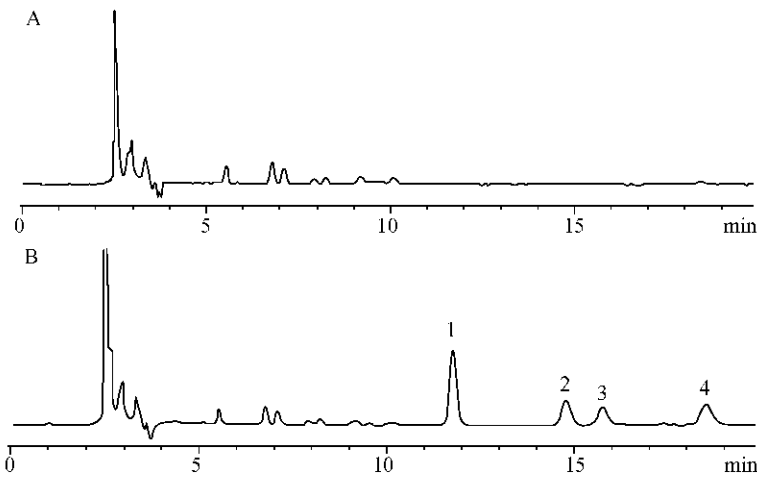


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血清; B. 空白血清加对照品与内标。 1: 内标; 2: 硝西泮; 3: 氯硝西泮; 4: 三唑仑

2.5 线性关系考察

用空白血清和储备液配制硝西泮/氯硝西泮/三唑仑浓度为 32.5/31.5/74.0、65.0/63.0/148.0、130.0/126.0/296.0、260.0/252.0/370.0、325.0/315.0/740.0 以及 650.0/630.0/1480.0 μg/L 标准系列血样, 取 6 支刻度离心管, 按照“2.3”项下血清样品处理方法处理, 测定标准曲线样本浓度, 以质量浓度 C(μg/L) 为横坐标, 目标化合物与内标物的峰

面积比 Y 为纵坐标绘制标准曲线, 并使用 Excel 软件进行线性回归计算, 获得血清标准曲线回归方程。

硝西泮: $Y = 0.001344C + 0.01172$ $r = 0.9997$ ($n = 6$)。氯硝西泮: $Y = 0.001052C + 0.006014$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。三唑仑: $Y = 0.000528C + 0.05493$ $r = 0.9997$ ($n = 6$)。

2.6 回收率实验

取空白血清和贮备液配制成硝西泮/氯硝西泮/

三唑仑低、中、高 3 种浓度的质控样品,按未知样品随标准曲线同时测定,计算每种浓度样品回收率。见表 1~3。

表 1 硝西泮的回收率与精密度($n=3$)

浓度	回收率 (%)	RSD(%)	
		日内	日间
65.0 $\mu\text{g/L}$ (低)	97.2	5.42	6.51
260.0 $\mu\text{g/L}$ (中)	98.5	3.14	4.04
650.0 $\mu\text{g/L}$ (高)	98.7	2.54	3.65

表 2 氯硝西泮的回收率与精密度($n=3$)

浓度	回收率 (%)	RSD(%)	
		日内	日间
63.0 $\mu\text{g/L}$ (低)	96.1	6.74	7.05
252.0 $\mu\text{g/L}$ (中)	99.1	5.61	4.86
630.0 $\mu\text{g/L}$ (高)	98.9	3.58	5.19

表 3 三唑仑的回收率与精密度($n=3$)

浓度	回收率 (%)	RSD(%)	
		日内	日间
148.0 $\mu\text{g/L}$ (低)	101.3	5.10	5.23
370.0 $\mu\text{g/L}$ (中)	99.4	4.09	4.56
1 480.0 $\mu\text{g/L}$ (高)	98.8	6.21	6.47

2.7 精密度实验

取硝西泮/氯硝西泮/三唑仑低、中、高 3 种浓度的质控样品,按照样品测定方法平行操作 3 次,连续 3 天。日内和日间精密度结果见表 1~3 所示。

2.8 稳定性实验

取硝西泮/氯硝西泮/三唑仑质量同上低、中、高 3 种浓度的 9 个质控样品,于 -20°C 冰箱保存,分别在第 1、2、3 天取出于 37.5°C 水浴融化后,按照样品测定方法测定。结果其 RSD 均 $<10\%$ 。

3 讨 论

HPLC 测定中曾使用甲醇—水系统流动相,发现硝西泮与氯硝西泮未能很好的分离,考虑加入乙腈调整保留时间^[7]。本文使用醇:水:乙腈 = 10:56:34 流动相,硝西泮、氯硝西泮、三唑仑与内标出峰时间更早,各峰分离度均好。

使用乙腈、三氯醋酸沉淀蛋白法处理样品,色谱图基线漂移,样品液对色谱柱污染较重,改用单步萃取法,出峰效果好。加入适量 NaOH 液碱化萃取液,有利于除去血清中内源性杂质,延长色谱柱的寿命。曾试用过乙醚进行萃取,萃取率较高,但是乙醚在使用中不稳定,容易产生过氧化物,影响测定结果需要重蒸,故采用二氯甲烷。

本试验对 3 种药物的对照品稀释液进行紫外光谱扫描,硝西泮、氯硝西泮、三唑仑的最大吸收波长分别为 260、254、220 nm,由于氯硝西泮在其它波长处吸收相对较弱,故选用 254 nm 作为检测波长。

参考文献:

- [1] 阳波. 高效液相色谱法同时测定血清中硝西泮、氯硝西泮的探讨[J]. 华夏医学, 2005, 18(1): 91-92.
- [2] 毛桂福. HPLC 法同时测定人血浆中 7 种苯二氮卓类药物的浓度[J]. 中国临床药学杂志, 2004, 13(6): 243-246.
- [3] 谢秀红, 李勇勤. 气相色谱—质谱联用法测定血液中艾司唑仑、阿普唑仑和三唑仑[J]. 华南预防医学, 2006, 32(5): 51-53.
- [4] 黄成琼, 马传学, 姜峻. 高效液相色谱法同时测定人血清中 4 种苯二氮卓类药物[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(3): 339-341.
- [5] 刘文, 邓楠, 戴迎春, 等. 反相高效液相色谱法同时测定人血清中 5 种镇静催眠药物浓度[J]. 中南药学, 2009, 7(10): 734-737.
- [6] 田冀媛. 高效液相色谱法测定莫达非尼血药浓度[J]. 南华大学学报(医学版), 2007, 35(6): 873-875.
- [7] 祝永明, 涂厉标, 李旭梅, 等. HPLC 同时测定苯巴比妥、苯妥英、卡马西平和氯硝西泮血药浓度[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(4): 336-339.

(此文编辑 朱雯霞)