

HPLC法测定人血浆中胺碘酮及其代谢产物去乙基胺碘酮的浓度

沈雄荣*, 宋向明, 叶 勇, 杨水新(湖州市中心医院临床药学科, 浙江 湖州 313000)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)14-1919-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.14.14

摘要 目的: 建立测定人血浆中胺碘酮及其代谢产物去乙基胺碘酮浓度的方法。方法: 血浆采用 pH 5.4 的磷酸二氢钾缓冲液 1 ml 酸化, 以乙醚提取后进样, 采用高效液相色谱法测定, 色谱柱为 Ultimate C₁₈, 流动相为醋酸-三乙胺缓冲溶液(A)-甲醇(B) ($V_A/V_B=19:81$), 检测波长为 242 nm, 流速为 1.0 ml/min, 内标为黄体酮。结果: 胺碘酮、去乙基胺碘酮血药浓度分别在 0.2~4.0 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 5$)、0.24~4.8 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 8$) 范围内线性关系良好, 方法回收率分别为 95.63%~100.10%、93.14%~106.70% ($\text{RSD}\leq 9.7\%$)。结论: 本方法方便快捷、准确, 可操作性强, 能快速准确检测出患者的胺碘酮及去乙基胺碘酮血药浓度。
关键词 高效液相色谱法; 胺碘酮; 去乙基胺碘酮; 血药浓度

Determination of Amiodarone and Its Metabolite Desethylamiodarone in Human Plasma by HPLC

SHEN Xiongrong, SONG Xiangming, YE Yong, YANG Shuixin (Dept. of Clinical Pharmacy, Huzhou Central Hospital, Zhejiang Huzhou 313000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the concentration determination of amiodarone and its metabolite desethylamiodarone in plasma. METHODS: The plasma was acidized with pH 5.4 monobasic potassium phosphate and extracted with ethyl ether. HPLC method was adopted, and Ultimate C₁₈ column was used with mobile phase consisted of glacial acetic acid-triethylamine buffer solution(A)-methanol(B) ($V_A/V_B=19:81$) at the detection wavelength of 242 nm and flow rate of 1.0 ml/min using progesterone as internal standard. RESULTS: The linear range of amiodarone and desethylamiodarone were 0.2-4.0 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 5$) and 0.24-4.8 $\mu\text{g/ml}$ ($r=0.999\ 8$), and their recoveries were 95.63%-100.10% and 93.14%-106.70% ($\text{RSD}\leq 9.7\%$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and practical, and it can quickly and accurately determinate the blood concentration of amiodarone and desethylamiodarone.

KEYWORDS HPLC; Amiodarone; Desethylamiodarone; Blood concentration

胺碘酮(Amiodarone)又名乙胺碘呋酮、胺碘达隆,是目前市场上最为普遍的Ⅲ类抗心律失常药,且为Ⅲ类中唯一无逆频率依赖现象的药物。胺碘酮在体内经细胞色素P₄₅₀酶(CYP)3A4、CYP2C8、CYP3A4的作用使其化学结构中叔胺氮上脱去1个乙基,在肠道与肝脏中形成去乙基胺碘酮(Desethylamiodarone),两者具有高度的脂溶性,吸收后与蛋白和脂肪大量结合,主要分布于脂肪组织及脂肪丰富的器官,且前者的表观分布容积大,以三室开放模型分布^[1-2]。胺碘酮起效慢,半衰期($t_{1/2}$)为13~16 d,且具有一定的个体差异性,长期使用易产生蓄积。随着胺碘酮使用时间延长,其代谢产物去乙基胺碘酮逐渐增加,两者的浓度比可达1:1,甚至去乙基胺碘酮超过胺碘酮,两者大量的蓄积会带来不良反应;而且去乙基胺碘酮具有与母药类似的生理活性和药理作用,能以扩张冠状血管、降低心肌耗氧量的方式来达到药效作用^[2-3],故对胺碘酮及去乙基胺碘酮进行血药浓度检测,可避免药物蓄积中毒,指导胺碘酮用药。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法,以黄体酮为内标,检测患者血浆中胺碘酮及去乙基胺碘酮的血药浓度,相比于其他文献^[4-6]报道的方法,此方法更全面、更快捷、更准确,可操作性更强。

1 材料

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪,包括G1311B型四元泵、G1329B型自动进样器、G1316A型柱温箱、G4212B型DAD检测器(美国Agilent公司);GT10-2型离心机(北京时代离心机有限公司,离心半径:5.0 cm);BF-2000型氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司);XW-80A涡旋混合器(上海精密科技实业有

* 主管药师,硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:0572-2023301。E-mail:shenxiongrong@126.com

限公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸胺碘酮标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100065-201006,纯度>98%);盐酸去乙基胺碘酮标准品(加拿大Toronto Research Chemicals公司,批号:162675,纯度>98%);内标:黄体酮标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100027-201209,纯度>98%)。甲醇为色谱纯,醋酸、三乙胺为分析纯,水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:醋酸-三乙胺缓冲液(三乙胺2 ml+醋酸3 ml,加水稀释至200 ml,混合后脱气,微孔滤膜过滤,A)-甲醇(B)($V_A/V_B=19:81$);柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 ml/min;检测波长:242 nm;进样量:40 μl 。

2.2 标准溶液的配制

准确称取盐酸胺碘酮标准品20.0 mg于100 ml棕色量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得质量浓度为200 $\mu\text{g/ml}$ 的盐酸胺碘酮标准溶液;准确称取盐酸去乙基胺碘酮标准品12.0 mg于100 ml棕色量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得质量浓度为120 $\mu\text{g/ml}$ 的去乙基胺碘酮标准溶液;准确称取20 mg黄体酮标准品,用甲醇定容至100 ml量瓶中,摇匀得质量浓度为200 $\mu\text{g/ml}$ 的黄体酮标准溶液作为内标。上述3种标准溶液均贮存于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,备用。

2.3 样品预处理

取血浆0.5 ml,加入内标溶液10 μl ,再加入pH 5.4的磷酸二氢钾缓冲液1 ml酸化,涡旋30 s;后加入乙醚5 ml,用封口膜封口,涡旋振荡3 min,3 800 r/min离心5 min;小心吸取上清液4 ml,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干,甲醇100 ml复溶,取40 ml进样测定。

2.4 专属性考察

在“2.1”项色谱条件下,黄体酮、去乙基胺碘酮和胺碘酮的保留时间分别为(7.1±0.1)、(10.2±0.1)和(13.3±0.1)min。在“2.3”项试验条件下,血浆中的内源性杂质和可能与胺碘酮药物合用的头孢菌素类、地西洋类、茶碱类、万古霉素类药物对胺碘酮及去乙基胺碘酮的测定无干扰。HPLC图见图1;典型色谱见图2。

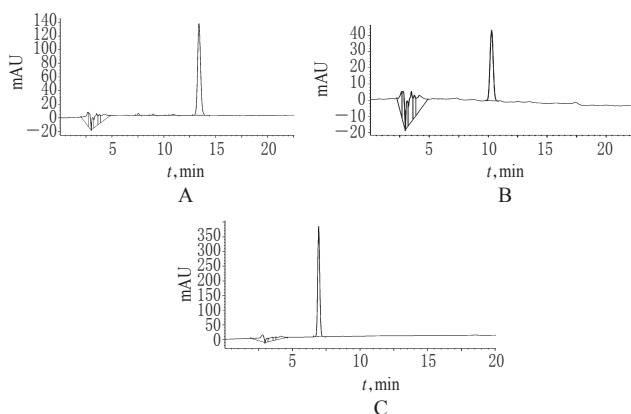


图1 高效液相色谱图

A.胺碘酮;B.去乙基胺碘酮;C.黄体酮(内标)

Fig 1 HPLC chromatograms

A.amiodarone; B.desethylamiodarone; C.progesterone (internal standard)

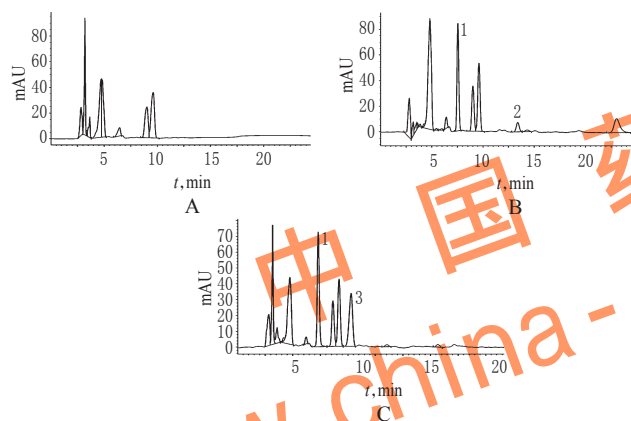


图2 典型色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+胺碘酮标准品+内标;C.空白血浆+去乙基胺碘酮标准品+内标;1.黄体酮;2.胺碘酮;3.去乙基胺碘酮

Fig 2 Representative chromatograms

A.blank plasma; B.blank plasma+amiodarone standard+ internal standard; C.blank plasma+desethylamiodarone standard+internal standard; 1.progesterone; 2.amiodarone; 3.desethylamiodarone

2.5 标准曲线的制备

取“2.2”项胺碘酮和去乙基胺碘酮标准溶液各适量,在40℃下用氮气吹干仪挥干,待药物挥干后立即加入标准血清5ml,涡旋混合3min使其均匀混合,分别配制成质量浓度为0.2、0.4、0.8、1.2、2.0、2.4、4.0 μg/ml的胺碘酮血浆和0.24、0.48、0.6、1.2、2.4、3.6、4.8 μg/ml的去乙基胺碘酮血浆。按“2.3”项方法操作,记录色谱图和峰面积,以待测浓度(c)为横坐标,以胺碘酮、去乙基胺碘酮峰面积与内标峰面积比值(y)为纵坐标,进行线性回归分析,得二者的线性回归方程分别为 $y_{胺} = 0.2277c_{胺} - 0.0001$ ($r = 0.9995$)、 $y_{去} = 0.2206c_{去} - 0.0156$ ($r = 0.9998$)。结果表明,胺碘酮、去乙基胺碘酮的血药浓度分别在0.2~4.0、0.24~4.8 μg/ml范围内呈良好线性关系

2.6 方法回收率与精密度试验

取胺碘酮标准品溶液和去乙基胺碘酮标准品溶液各适

量,按“2.5”项下方法配制成质量浓度分别为0.4、1.2、4.0 μg/ml与0.48、1.2、2.4 μg/ml梯度的混合血样,按“2.3”项下方法进行测定。试验分别于上午、中午、下午3个时间段进行,每份样品同一时间段测定3次,连续测定3d,统计3d内所有数据,计算方法回收率和日内、日间相对标准偏差(RSD)。二者的回收率、精密度结果见表1、表2。

表1 胺碘酮的回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=27$)

Tab 1 Results of recovery and precision tests of amiodarone ($\bar{x} \pm s, n=25$)

浓度, μg/ml	日内测定值, μg/ml		日内RSD, %	日间测定值, μg/ml		日间RSD, %	方法回收率, %		
0.4	0.39	0.42	0.39	3.97	0.40	0.39	0.40	0.58	100.10±4.37
1.2	1.03	1.24	1.21	9.71	1.11	1.16	1.13	3.30	95.63±8.50
4.0	3.97	3.84	3.62	4.62	4.14	3.81	3.97	5.89	97.30±7.25

表1 去乙基胺碘酮回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=27$)

Tab 1 Results of recovery and precision tests of desethylamiodarone ($\bar{x} \pm s, n=25$)

浓度, μg/ml	日内测定值, μg/ml		日内RSD, %	日间测定值, μg/ml		日间RSD, %	方法回收率, %		
0.48	0.48	0.51	0.50	2.59	0.50	0.57	0.51	7.49	106.70±8.61
1.20	1.08	1.13	1.13	2.63	1.11	1.12	1.14	1.16	93.14±4.74
2.40	2.38	2.58	2.41	4.38	2.46	2.60	2.55	2.88	104.00±6.38

2.7 方法应用

获得2名住院患者血浆,均有心率失常和心绞痛等病症,且都在服用盐酸胺碘酮片,按“2.3”项下方法处理并进样,获得色谱图及峰面积,代入标准曲线,计算血药浓度。结果,患者1的去乙基胺碘酮为0.250 μg/ml,胺碘酮为0.308 μg/ml;患者2的去乙基胺碘酮为1.200 μg/ml,胺碘酮为0.735 μg/ml。

3 讨论

笔者尝试使用他莫西芬、地西洋作内标,但在本试验条件下这两种内标出峰效果不佳,影响最后结果,故决定使用黄体酮为内标。柱温会极大地影响出峰效果,柱温在30℃下胺碘酮出峰效果不理想,血浆中的杂质峰与胺碘酮峰略微重合,造成类似于拖尾的现象。调整温度为25℃后,胺碘酮峰恰能与杂质峰基线分离,出峰时间也较理想。在流动相缓冲液的配制过程中,笔者采用三乙胺2ml+醋酸3ml加水稀释至200ml的简便方法,避免了调定和测量缓冲液pH的烦琐过程。

去乙基胺碘酮与胺碘酮的结构相似,具有与胺碘酮相似的活性及药理作用,胺碘酮用药指导不能忽略代谢产物去乙基胺碘酮在体内的浓度及其药理作用等因素影响,长期过量使用胺碘酮会造成肺炎等毒性反应^[7],有可能导致肺纤维化,故测量患者胺碘酮与去乙基胺碘酮血药浓度具有重要意义。在“2.7”项下患者血药浓度检测中,患者2的胺碘酮与去乙基胺碘酮血药浓度已经达到一定高度,可知其为长期服用盐酸胺碘酮片的患者,血药浓度已经达到稳态,经临床主治医师确认该患者已服用盐酸胺碘酮片数年。其中,代谢产物去乙基胺碘酮的血药浓度为1.200 μg/ml,而胺碘酮血药浓度为0.735 μg/ml,前者浓度高于后者,表明其长期服用盐酸胺碘酮,造成体内胺碘酮及其代谢产物去乙基胺碘酮蓄积。刘学红等^[8]认为,胺碘酮和去乙基胺碘酮两者血药浓度之和与临床疗效的相关性较好。有研究^[9]表明,去乙基胺碘酮比母体化合物具有更好的药动学、更少的不良反应及较低的预料之外的药物相互作用,研究机构正在研发去乙基胺碘酮的药物制剂用于心律失常的治疗和预防。

本次试验用高效液相色谱法成功建立了胺碘酮与去乙基胺碘酮的血药浓度检测方法,本方法可行性强,可为临床患者提供用药指导,但也存在不足之处:笔者应用乙醚作为有机提

1996—2015年我院地高辛血药浓度监测情况及其影响因素分析

刘泽辉^{1*}, 胡欣^{2#}, 张亚同², 张碧华²(1.北京大学药学院药事管理与临床药学系, 北京 100191; 2.北京医院药学部, 北京 100005)

中图分类号 R972^{·1} 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)14-1921-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.14.15

摘要 目的:分析北京医院(以下简称“我院”)地高辛血药浓度监测结果及其影响因素,为临床合理用药提供参考。方法:选择我院1996—2015年监测地高辛血药浓度的患者3 385例,采用荧光偏振免疫法测定其血药浓度,分析患者性别、年龄、给药剂量等因素对血药浓度的影响。结果:我院地高辛用药监测率从2002年的78.9%下降至2015年的37.2%,呈下降趋势。3 385次监测结果显示,地高辛平均血药浓度为(1.05±0.04)ng/ml;血药浓度在有效治疗范围(0.5~1.75 ng/ml)内的有2 391例(占70.64%);女性患者平均血药浓度[(1.06±0.04)ng/ml]略高于男性患者[(1.05±0.04)ng/ml],但差异无统计学意义($P>0.05$);患者年龄以≥70岁为主,男、女性患者年龄均与血药浓度呈正相关[相关系数(r)分别为0.923、0.958, P 均为0.000 2];患者给药剂量与血药浓度不相关($r=0.773$, $P=0.125$)。结论:我院地高辛的使用日趋合理,其血药浓度主要受患者年龄的影响。临床应结合血药浓度监测结果及患者实际的临床症状,制订合理的个体化给药方案。

关键词 地高辛;血药浓度监测;合理用药;影响因素

Analysis of Blood Concentration Monitoring of Digoxin and Its Influential Factors in Our Hospital during 1996-2015

LIU Zehui¹, HU Xin², ZHANG Yatong², ZHANG Bihua²(1.Dept. of Pharmaceutical Administration and Clinical Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2.Dept. of Pharmacy, Beijing Hospital, Beijing 100005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze blood concentration monitoring data of digoxin in Beijing Hospital (called “our hospital” for short) and its influential factors, and to provide reference for rational use of drugs in the clinic. METHODS: 3 385 patients underwent blood concentration monitoring of digoxin were selected from our hospital during 1996-2015. Blood concentration of digoxin was detected by fluorescence polarization immunoassay. The effects of patients’ gender, age, drug dose and other factors on blood concentration were analyzed. RESULTS: The rate of digoxin medication monitoring in our hospital decreased from 78.9% in 2002 to 37.2% in 2015, showing a descending tendency. Results of 3 385 times monitoring showed that average blood concentration of digoxin was (1.05±0.04)ng/ml; blood concentration of 2 391 cases were in normal range (0.5-1.75 ng/ml), accounting for 70.64%. Average blood concentration of digoxin in female patients [(1.06±0.04) ng/ml] was slightly higher than in male patients [(1.05±0.04) ng/ml], without statistical significance ($P>0.05$). Most of patients were aged ≥70 years, and patients’ age was positively correlated to blood concentration [relative coefficient (r) were 0.923 and 0.958, both $P=0.000$ 2]; drug dose was not correlated with blood concentration ($r=0.773$, $P=0.125$). CONCLUSIONS: The application of digoxin become more and more reasonable in our hospital, and its blood concentration is influenced by patients’ age. Individual therapy regimens should be formulated according to blood concentration monitoring and clinical symptom of patients.

KEYWORDS Digoxin; Blood concentration monitoring; Rational drug use; Influential factors

取液,虽然挥干速度快,但提取液中血浆内源性杂质多,有可能对样品测定产生干扰。患者血浆中胺碘酮及其代谢产物去乙基胺碘酮的含量甚微,紫外检测器灵敏度不高,其他更简单、灵敏度更高的样品处理方法和检测方法有待探索。

参考文献

- [1] 刘学红,李相喜,李冉.抗心律失常药物胺碘酮[J].中国药业,2004,13(3):79.
- [2] 郭继鸿.胺碘酮的现代观点[J].临床心电图杂志,2007,16(2):143.
- [3] 谭蓉,杨继红,孙为民.去乙基胺碘酮:容易被忽视的影响胺碘酮临床使用质量的因素[J].药品评价,2014,11(4):15.

* 硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:010-85133824。E-mail: liuzehui@bjmu.edu.cn

通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:临床药学实践及个体化药学服务。电话:010-85133824。E-mail: huxinbjyy@126.com

- [4] 林玳,吴晓薇,顾卓君.高效液相法测定胺碘酮血药浓度[J].中国医院药学杂志,2005,25(12):1 138.
- [5] 董军亚,岳继华,张继红.高效液相色谱法测定人血清中胺碘酮的浓度[J].武警医学院学报,2009,18(7):601.
- [6] 张清文,程民,董永华,等.HPLC法测定人血浆中胺碘酮浓度的临床研究[J].实用心脑血管病杂志,2010,18(11):1 607.
- [7] 刘峰,黄华萍,李羲,等.2例胺碘酮致药物性间质性肺炎随访报告[J].中华肺部疾病杂志,2015,8(1):113.
- [8] 刘学红,郭瑞臣,李丕宝,等.胺碘酮及其活性代谢物的血药浓度与临床效应相关性评价[J].中国临床药学杂志,2006,15(4):240.
- [9] 赛格德大学.去乙基胺碘酮组合物[P].中国:CN20138003 1630,2015-02-18.

(收稿日期:2015-07-02 修回日期:2015-12-05)

(编辑:李 劲)