

奥氮平血药浓度的测定及其人体药代动力学

季慧芳, 谢林*, 王建, 张宇, 后媛媛, 刘晓东

(中国药科大学药代研究中心, 南京 210009)

摘要 目的 建立测定人血浆中奥氮平浓度的 HPLC-UV 方法, 研究健康受试者口服奥氮平片后的药代动力学。方法 以阿米替林为内标, 血浆样品加维生素 C 抗氧化, 经碱化后用乙醚-环己烷进行萃取。以 0.01 mol/L 磷酸铵 (pH 4.0)-甲醇-乙腈 (55:22.5:22.5) 为流动相, 采用 Hypersil silica 柱进行分离, 紫外 270 nm 处进行测定。结果 方法的专属性较好; 低、中、高浓度 (1.19, 9.50, 38.00 ng/ml) 的平均提取回收率分别为 81.97, 93.47 和 96.72。该法在 1.19~38.00 ng/ml 浓度范围内呈线性关系, 最低检测浓度为 1.19 ng/ml, 日内、日间 RSD 分别小于 9% 和 12%。用此法测定了 20 名健康受试者单剂量 po 奥氮平片后的血药浓度经时变化过程。结论 该法灵敏度高, 重现性好, 操作简便, 适用于临床药代动力学研究和血药浓度监测。

关键词 奥氮平; HPLC-UV; 药代动力学

中图分类号: R969.1.1, R971+.4 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-5048(2002)05-0397-04

奥氮平 (olanzapine) 是一种新一代的抗精神病药, 可用于治疗精神分裂症, 与经典的抗精神病药相比, 无明显的锥体外系副作用^[1-3]。由于奥氮平的血药浓度较低, 为进行药代动力学研究, 指导临床合理用药, 必须建立灵敏且操作简便的血药浓度的测定方法。目前, 国内未见有该药物测定方法的报道。文献报道^[4]奥氮平体内测定方法有 HPLC-ED 和 LC-MS, 这些方法对仪器条件和样品提取要求很高。本文对文献方法^[3]进行改进, 并将其成功运用到临床药代动力学的研究。

1 材料与方法

1.1 仪器

日本岛津公司 LC-10AT 高效液相色谱仪, SPD-10A UV-VIS 检测器, SCL-10A 系统控制器, CTO-10A 柱温箱, C-R7Ae 色谱数据处理仪, SCL-10ADvp 自动进样器。

1.2 药品与试剂

奥氮平对照品, 江苏省连云港豪森制药有限公司提供; 阿米替林 (内标), 常州第四制药厂提供。再普乐 (每片含奥氮平 10mg, 英国 Eli Lilly Co Ltd); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 购自江苏汉邦科技有限公司;

其余试剂均为市售分析纯。空白人血浆由南京市中心血站提供。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Hypersil silica 柱, 300 mm × 4.6 mm ID, 粒径 5 μm (大连依利特科学仪器有限公司); 紫外检测波长 270 nm, 量程为 0.01 AUFS; 流动相由 0.01 mol/L 磷酸铵 (内含 0.41% 三乙胺, 用 8.5% 磷酸调 pH 至 4.0)、甲醇和乙腈 (55:22.5:22.5 v/v/v) 组成; 流速为 1.0 ml/min; 柱温为 30 °C。

1.4 血浆样品的处理

取血浆 1.0 ml, 加内标 10 μl (50 μg/ml 阿米替林), 再加 0.5 mol/L 醋酸铵-氨水缓冲液 (pH 9.9) 和 5 ml 乙醚-环己烷 (1:1 v/v) 混合液, 振荡 2 min, 3500 r/min, 离心 5 min, 取上清液 4 ml, 置 40 °C 恒温水浴, 用氮气流吹干。残留物用 200 μl 流动相溶解, 取 20 μl 进样, 用峰面积进行定量分析。

1.5 药代动力学研究方案

受试者: 20 名健康男性志愿者, 年龄 20.03 ± 0.83 岁, 体重 65.05 ± 6.57 kg。受试者试验前两周至试验期间未服用任何其他药物。在充分了解本试验的目的及该产品的药理与不良反应后, 经自愿签署“自愿受试者知情同意书”后成为本试验的志愿

受试者,经全面体检,肝、肾功能及心电图检查均正常。试验期间统一饮食,研究方案经医学伦理委员会批准。

1.6 实验方案

受试者于清晨7:00单剂量空腹服药10 mg,用200 ml 温开水送服。服药后2 h 内禁止饮水,3 h 内禁食,受试期间禁烟、酒、茶。于服药后0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,8.0,12.0,24.0,48.0,72.0,96.0和120.0h 于肘静脉采血5 ml 置肝素化试管(内含25 mg Vit c)中,离心,分取血浆,-70℃冰箱保存至分析。

1.7 数据处理

用微量法求算相应的药代动力学参数,峰时间(T_{max})和峰浓度(C_{max})为实测值。

2 结果

2.1 方法的专属性

在本文的色谱条件下,奥氮平和内标(阿米替林)有较大的色谱峰和很好的分离度,血浆杂质不干扰样品与内标的测定,基线噪音小,奥氮平和内标保留时间分别为5.6 min 和6.9 min。色谱图见 Fig 1。

2.2 标准工作曲线和最低检测浓度

取空白血浆1.0 ml,加20 μ l 25%维生素 C(Vit C),加不同量的标准品,使其浓度分别为0,1.19,2.38,4.75,9.50,19.00和38.00 ng/ml,按“血浆样

品处理”项下操作,记录样品和内标峰面积,利用样品浓度 C 对样品与内标峰面积比 R 作直线回归,得回归方程 $C=23.5183R+0.1347$, $r=0.9997$ ($P<0.01$, $n=5$)。根据标准曲线,本法的线性范围为1.19~38.00 ng/ml,最低检测浓度为1.19 ng/ml。

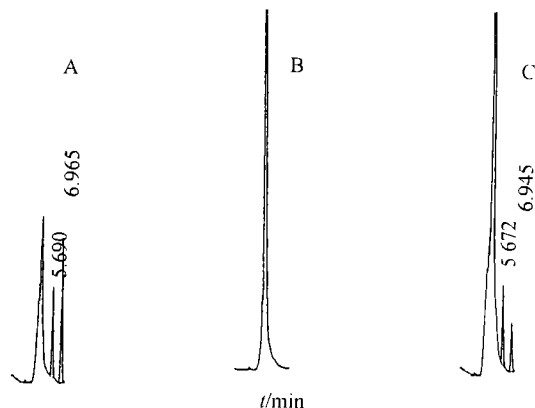


Fig 1. Chromatogram of (A) standard, (B) a drug-free control serum extract and (C) a serum extract from a subject 1 h after an oral of olanzapine(5.6 min Amitriptyline, 6.9 min Olanzapine)

2.3 精密度与质控样本

精密度:取空白血浆1.0 ml,加20 μ l 25% Vit C 和内标后,加入不同量的标准品,使其浓度分别为1.19, 9.50 和38.00 ng/ml,按“血浆样品处理”项下操作,记录样品与内标峰面积比值,代入同一条工作曲线,求得实测浓度,以此作为精密度指标。测得日内变异和连续5 d 的日间变异,结果见表1。

Tab 1. Precision for the analysis of olanzapine in human plasma($n=5$)

Added(ng/ml)	intra-day			inter-day		
	1.19	9.50	38.00	1.19	9.50	38.00
Found	1.16 \pm 0.10	9.60 \pm 0.79	37.07 \pm 0.94	1.13 \pm 0.13	9.71 \pm 0.42	38.15 \pm 1.20
RSD %	8.40	8.25	2.55	11.73	4.35	3.13

质控样本:为了检验方法的可靠性,由课题负责人配制2种浓度(I:4.75 ng/ml; II:19.00 ng/ml)的含药血浆,对血样分析者采用单盲法进行方法学的质量控制(QC),每种浓度重复6次,以随行标准工作曲线计算 QC 样品的浓度。实验数据表明,测定血浆中奥氮平的方法是可靠的。结果见表2。

2.4 提取回收率及样品稳定性考察(冻融试验)

取空白血浆1.0 ml,加20 μ l 25% Vit C 和内标后,加入不同浓度的标准品,使其浓度分别为2.38, 9.50 和38.00 ng/ml,按“血浆样品处理”项下操作,以提取后的色谱峰面积与未经提取直接进样

Tab 2. Accuracy for the analysis of olanzapine in human plasma($n=6$)

Added (ng/ml)	Determined (ng/ml)	RSD (%)
4.75	4.71 \pm 0.19	4.03
19.00	18.42 \pm 0.42	2.28

获得的色谱峰面积之比,考察样品的提取回收率,每一浓度进行5份样本分析。实验结果表明,低、中、高三种浓度下样品的提取回收率分别为 81.93 \pm 9.24, 93.47 \pm 4.32, 96.72 \pm 3.25 ng/ml。

本研究考察了样品的稳定性。含药血浆样品

(含0.5% Vit C)在-70℃冰箱中放置一周,用37℃恒温水浴解冻,提取并测定血药浓度。冻融试验结果表明,在含Vit C的血浆样品中,冷冻前后药物浓度基本不变,结果见表3。

Tab 3. Stability for the analysis of olanzapine in human plasma (n=6)

Added (ng/ml)	Determined (ng/ml)	RSD (%)
2.38	2.21±0.10	4.52
19.00	18.60±0.40	2.15

2.5 药代动力学研究

20名健康男性志愿受试者,单剂量口服10 mg (1片)奥氮平后,奥氮平的平均血药浓度-时间曲线见图2,用矩量法计算的药动学参数见表4。

Tab 4. Pharmacokinetic parameters of olanzapine in 20 healthy volunteers after po 10 mg

Subjects	$T_{1/2K}$ h	T_{max} h	C_{max} ng/ml	MRT h	Cl/F l/h	AUC_{0-86} ng/h·ml ⁻¹
A	32.76	6.0	14.85	47.03	16.6	520.70
B	39.12	8.0	13.08	56.68	16.0	521.00
C	31.30	6.0	18.63	47.12	11.6	738.62
D	32.45	4.0	15.03	49.39	14.2	592.48
E	29.88	3.0	13.45	42.95	16.8	533.97
F	33.46	4.0	13.15	46.23	18.4	486.47
G	33.51	6.0	12.91	51.44	16.5	506.26
H	30.73	3.0	21.09	43.04	17.7	500.50
I	27.15	6.0	16.23	41.16	16.9	531.04
J	33.22	3.0	12.97	47.72	17.3	500.93
K	29.60	6.0	13.33	43.71	20.0	461.34
L	36.20	3.0	12.99	55.82	19.5	411.50
M	26.37	8.0	15.03	40.07	17.8	512.06
N	31.13	5.0	14.68	46.80	16.7	524.21
O	29.69	6.0	13.64	43.98	19.3	459.26
P	28.70	2.0	12.59	39.95	25.6	390.98
Q	33.19	6.0	14.44	52.49	16.6	496.70
R	37.87	5.0	15.44	51.01	18.4	465.80
S	29.63	4.0	12.77	42.56	18.1	496.98
T	32.58	4.0	13.40	46.60	19.0	459.10
X	31.93	4.9	14.49	46.79	17.7	505.50
s	3.25	1.7	2.14	4.85	2.7	70.55

3 讨论

国内对奥氮平血药浓度及药代动力学的研究尚未见报道。奥氮平临床推荐起始剂量仅为每日10 mg,血药浓度很低, C_{max} 约为11 ng/ml^[5]。为了进行奥氮平的临床药代动力学研究,需要建立一种灵敏度高的测定方法,国外用HPLC-ECD和GC-MS方法^[4]测定奥氮平的血药浓度,最低检测限可达0.25

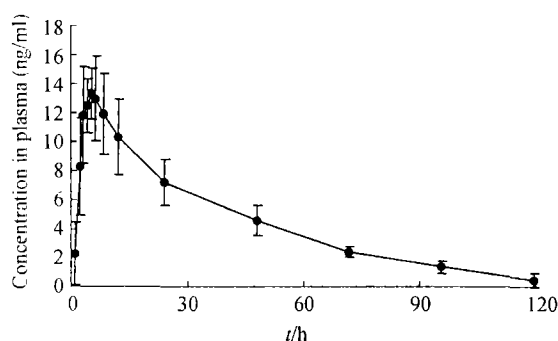


Fig 2. Mean concentrations (s) of olanzapine in 20 healthy volunteers plasma after po 10 mg

ng/ml,但提取方法繁琐,仪器条件要求较高,一般实验室不易采用。为此,我们改用硅胶色谱柱作为分离柱,磷酸铵、甲醇和乙腈体系作为流动相,选用阿米替林作为内标,血浆样品经缓冲溶液碱化后,用乙醚-环己烷作为提取溶剂,使得该方法更简便、更经济、更实用。

奥氮平血浆样品冷冻贮存及提取过程中的氧化降解是一个值得重视的问题。文献报道^[3],未加抗氧剂的血清样品提取回收率降低16%,在4℃的条件下贮存1周或2周,其回收率进一步下降13%和45%;未加抗氧剂的血清样品在室温保存24 h回收率降低40%。本文作者在全血样品中加入0.5% Vit C,然后再分离血浆,冷藏贮存直至提取分析。从稳定性试验考察结果可以看出,加入0.5% Vit C后,血浆样品在冷冻前后及提取过程中未见药物浓度发生变化。

本文研究了20名健康志愿者单剂量空腹 po 奥氮平片10 mg后血药浓度的经时过程,并计算相应的药代动力学参数。其结果为: $T_{1/2K}$ 31.93 h, T_{max} 4.9 h, C_{max} 14.99 ng/ml。本文研究结果与文献报道^[5]一致。这更进一步说明本文建立的测定人体中奥氮平血药浓度的方法是可靠的。

参考文献

- [1] Meltzer HY, Fibiger HC. Olanzapine: a new typical antipsychotic drug. *Neuropsychopharmacology*, 1996, 14: 83-85.
- [2] Fulton B, Goa KL. Olanzapine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of schizophrenia and related psychoses. *Drugs*, 1997, 53(2): 281-298.
- [3] Olesen OV, Linnet K. Determination of olanzapine in serum by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection considering the easy oxidability of the compound and the presence of other psychotropic drugs. *J Chromatogr B*, 1998, 714: 309-315.

[4] Catlow JT, Barton RD, Clemens M, *et al.* Analysis of olanzapine in human plasma Utilizing reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B*, 1995, **668**:85-90.

[5] Bergstrom RF, Callaghan JT, Cerimele BJ, *et al.* Pharmacokinetic of olanzapine in elderly and young. *Pharm Res*, 1995, 12 suppl: s358.

Determination of Olanzapine in Plasma by HPLC and Its Pharmacokinetics in Men

JI Hui-Fang, XIE Lin, WANG Jian, ZHANG Yu, HOU Yuan-Yuan, LIU Xiao-Dong

Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

ABSTRACT **AIM** To develop a sensitive HPLC-UV method for determination of olanzapine in human plasma and to study pharmacokinetics of olanzapine in men. **METHODS** After a single-step liquid-liquid extraction, the compound was separated on a normal-phase silica gel column using 0.01 mol/L $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (pH 4.0)-methanol-acetonitrile (55:22.5:22.5) mobile phase and measured by UV absorption at 270 nm. The addition of 0.5% ascorbic acid to plasma protected olanzapine against oxidation during storage. The pharmacokinetics of olanzapine in 20 healthy subjects was studied after oral administration of 10mg. **RESULTS** The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 1.19~38.00 ng/ml and the minimum detection concentration was 1.19 ng/ml. The average recoveries of olanzapine from plasma were larger than 90% and RSD% of intra-day and inter-day was smaller than 12%. After oral administration of 10 mg olanzapine tablet in 20 men, the main pharmacokinetic parameters were estimated as follows: $T_{1/2K}$ 31.93 ± 3.25 h, T_{max} 4.9 ± 1.7 h, C_{max} 14.49 ± 2.14 ng/ml. **CONCLUSION** The method is accurate, sensitive and suitable for clinical study of olanzapine.

KEY WORDS Olanzapine; HPLC-UV; Pharmacokinetics

欢迎订阅《中国药科大学学报》(2002特刊)

《中国药科大学学报》是由教育部主管、中国药科大学主办的药学综合性刊物,为中国自然科学核心期刊,多年来该刊坚持以高学术品味示人,在药学界享有较高声誉。《中国药科大学学报》(2002特刊)以“中国制药工业药理学学会20周年学术会议论文集”的形式,收录了由中国药理学学会制药工业委员会于2002年10月在成都举办的“中国制药工业发展论坛”的全部16篇专家报告及1百余篇交流论文。专家报告特邀科技部、国家药品监督管理局、国家知识产权局、国家中医药管理局等机构的政府官员解读最新国家产业政策、分析新药审评思路、提供科研项目申报技术指导,和中国药科大学、北京大学、上海医药工业研究院的教授学者介绍学科前沿技术、跟踪科研新成果。特刊延续了本刊前瞻性、权威性、创新性、实用性的一贯特色,重点突出学术性与实用性。

《中国药科大学学报》(2002特刊)为大16开本,350页,定价80元(含邮费),可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:南京市童家巷24号 邮编:210009 电话:025-3271566 传真:025-3271279 E-mail:cpuxuebao@sohu.com