

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.19.010

高效液相色谱法测定血清中胺碘酮浓度*

吴静华,林志燕,黄晓会[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院,上海 200092)

摘要:目的 建立快速测定血清中胺碘酮浓度的高效液相色谱法。方法 采用乙腈沉淀蛋白法对样本进行前处理,采用外标法定量,色谱柱为 Agilent XDB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),采用二极管阵列检测器,流动相为醋酸盐缓冲液(pH 5.8)-甲醇-乙腈(15:55:30, V/V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 242 nm,柱温为 30 ℃。结果 胺碘酮质量浓度在 0.275~17.600 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好,回归方程为 $Y = 19.3X - 4.9234$ ($r = 0.9998, n = 7$);低、中、高质量浓度(0.55, 2.20, 8.80 μg/mL)的加样回收率分别为 90.91%, 91.82%, 93.52%, RSD 分别为 2.00%, 1.05%, 1.06% ($n = 5$);日内精密度的 RSD 均小于 2.10% ($n = 5$),日间精密度的 RSD 均小于 4.60% ($n = 5$)。结论 该方法准确度高、精密度高、操作较简便,可用于胺碘酮的血药浓度监测。

关键词: 高效液相色谱法;胺碘酮;血药浓度

中图分类号: R917; R972^{+.2}

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)19-0056-03

Determination of Amiodarone in Serum by HPLC

WU Jinghua, LIN Zhiyan, HUANG Xiaohui

(Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China 200092)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for rapid determination of amiodarone in serum. **Methods** The samples were pretreated with acetonitrile for protein precipitation, and the external standard method was adopted for quantitative determination. The chromatographic column was Agilent XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), and a diode array detector was adopted. The mobile phase was acetate buffer (pH 5.8)-methanol-acetonitrile (15:55:30, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 242 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results** The linear range of amiodarone was 0.275-17.600 μg/mL with a regression equation of $Y = 19.3X - 4.9234$ ($r = 0.9998, n = 7$). The recovery rates of low-, medium- and high-mass concentration (0.55, 2.20, 8.80 μg/mL) of amiodarone were 90.91%, 91.82% and 93.52% with RSDs of 2.00%, 1.05%, and 1.06% ($n = 5$). The RSD of intra-day precision test was lower than 2.10% ($n = 5$), and the RSD of inter-day precision test was lower than 4.60% ($n = 5$). **Conclusion** This method is accurate, precise and simple, which can be used to monitor the blood concentration of amiodarone.

Key words: HPLC; amiodarone; blood concentration

胺碘酮属广谱抗心律失常药,20世纪70年代末开始在国内临床使用,主要用于治疗室上性及室性心律失常的第三类抗心律失常,生物半衰期可达50 d,治疗范围较窄^[1],三室分布,个体差异较大,且为高度亲脂性化合物,起效较慢,需长期服用,但长期用药有蓄积中毒风险,故需监测血药浓度^[2-3],并结合患者的临床指标进行个体化给药治疗。目前,采用高效液相色谱法与薄层色谱法监测胺碘酮血药浓度,而薄层色谱法的定量限较高(均大于2.5 mg/L^[4-5]),高效液相色谱法可达到更低的检测限(0.275 mg/L)。已有研究中,大部分高效液相色谱法样本前处理采用液液萃取后再吹干,步骤烦琐且耗时较长^[6-8]。也有研究采用荧光光谱法进行检测^[9],但应用较少,不利于推广。本研究中采用蛋白

沉淀法对样本进行前处理,并采用高效液相色谱二极管阵列检测器快速测定血清中胺碘酮的浓度,采用外标法定量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);5424R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Milli-Q型纯水仪(美国Millipore公司);Vortex KB3型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);MSE125P-100-DU型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 mg)。

1.2 试剂

胺碘酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100065-201006,纯度为100%);甲醇、乙腈(色谱纯,

*基金项目:中国药理学会基金项目[CTDM(XM)-2018-02-002-038]。

第一作者:吴静华,女,大学本科,主管药师,研究方向为个体化用药监测,(电话)021-25077184(电子信箱)wujinghua@xinhuaumed.com.cn。

[△]通信作者:黄晓会,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药理学与个体化药物治疗,(电话)021-25077182(电子信箱)huangdi456@126.com。

美国Fisher公司);三乙胺及乙酸均为分析纯,水为纯化水;血清样本为我院提供的健康人群血样。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:醋酸盐缓冲液(pH 5.8)-甲醇-乙腈(15:55:30, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:242 nm;柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.2 样本前处理

取血清样本200 μL,置1.5 mL EP管中,加入乙腈400 μL,涡旋振荡1 min,以13 000 r/min的速率离心10 min,取上清液20 μL进样分析。

2.3 溶液制备

标准贮备液:精密称取胺碘酮对照品8.80 mg,用乙腈溶解,定容至100 mL容量瓶中,配制成质量浓度为88 μg/mL的标准贮备液,-80℃贮存备用。

基质加标溶液:取空白血清900 μL,加入质量浓度为88 μg/mL的标准贮备液100 μL,配制成质量浓度为8.8 μg/mL的基质加标溶液。

醋酸盐缓冲液:取1 000 mL纯化水,置流动相瓶中,加入1 mL三乙胺和1 mL乙酸,超声10 min,即得。

质控血清样本溶液:精密量取空白血清800 μL,加入质量浓度为88 μg/mL的胺碘酮标准贮备液200 μL,用空白血清稀释成质量浓度分别为17.600, 8.800, 4.400, 2.200, 1.100, 0.550, 0.275 μg/mL的系列血清样本,同时稀释得低、中、高质量浓度分别为0.55, 2.20, 8.80 μg/mL的质控血清样本溶液。

2.4 方法学考察

专属性试验:分别取空白血清适量,加标准贮备液,即得胺碘酮标准品溶液,按2.2项下方法处理血清样本,按2.1项下色谱条件进样分析。结果显示,胺碘酮与血清中内源性物质分离完全,对测定结果无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:取2.3项下质控血清样本溶液适

量,以胺碘酮峰面积(Y)为纵坐标、血清样本质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 19.3X - 4.9234$, $r = 0.9998$ ($n = 7$)。结果表明,血清样本的质量浓度在0.275~17.600 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.3项下质量浓度分别为0.55, 2.20, 8.80 μg/mL的质控血清样本溶液各5份,于1 d内按2.2项下方法进行样本前处理后进样分析,考察日内精密度;连续3 d按2.2项下方法进行样本前处理后进样分析,考察日间精密度。结果日内精密度试验的RSD分别为1.25%, 1.96%, 2.06% ($n = 5$), 日间精密度试验的RSD分别为3.68%, 3.99%, 4.59% ($n = 5$), 表明方法精密度良好。

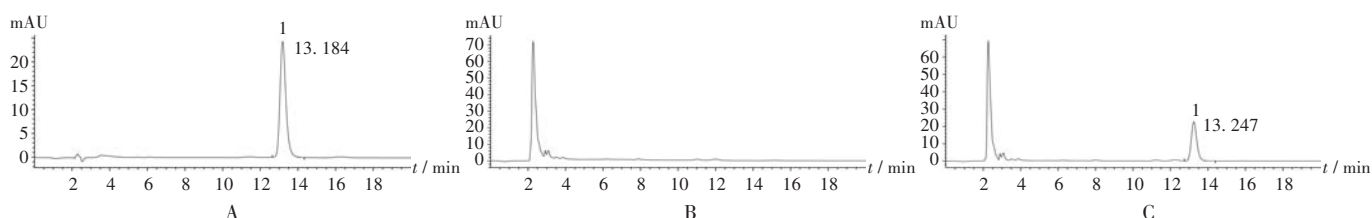
稳定性试验:分别取2.3项下质量浓度为0.55, 2.20, 8.80 μg/mL的质控血清样品溶液各3份,按2.2项下方法进行样本前处理,将上清液在室温下分别放置4, 24, 48 h后,按2.1项下色谱条件重复进样测定,计算变异系数(CV);将配置好的血清质控标本置-4℃冰箱分装保存,每隔1周复测1次,低、中、高质量浓度水平分别平行测3组,计算CV。结果显示,胺碘酮的血清样品在上述情况下稳定性良好,测定CV<10%。

加样回收试验:取空白血清,加标准贮备液,配制成质量浓度分别为0.55, 2.20, 8.80 μg/mL的血清样本,平行5份,按2.2项下方法进行样本前处理,按2.1项下色谱条件进样分析,计算加样回收率。结果见表1。

3 讨论

3.1 流动相选择

首先选取了甲醇-磷酸盐缓冲液(90:10, V/V)作为流动相,以1 L水加1 mL三乙胺和470 μL磷酸制备磷酸盐缓冲液,色谱峰出现裂缝;后又调整流动相为甲醇-磷酸盐缓冲液(95:5, V/V),结果色谱峰峰宽较宽,不符合检测要求。参考文献[10-11],调整流动相为乙腈-甲醇-0.01 mol/L醋酸铵溶液(30:55:15, V/V/V),流速为1 mL/min,保留时间为45 min,检测时间太长。



1. 胺碘酮
A. 胺碘酮标准品溶液 B. 空白血清 C. 基质加标溶液

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. Amiodarone

A. Amiodarone standard solution B. Blank serum C. Blank serum adding standard stock solution of amiodarone

Fig.1 HPLC chromatograms of the specificity test

表1 空白血清中胺碘酮加样回收试验结果($n=5$)
Tab.1 Results of the recovery test of amiodarone in the blank serum ($n=5$)

加入量($\mu\text{g/mL}$)	测得量($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.55	0.51	92.73	90.91	2.00
0.55	0.49	89.09		
0.55	0.51	92.73		
0.55	0.50	90.91		
0.55	0.49	89.09		
2.20	2.04	92.73	91.82	1.05
2.20	1.99	90.45		
2.20	2.01	91.36		
2.20	2.04	92.73		
2.20	2.02	91.82		
8.80	8.17	92.84	93.52	1.06
8.80	8.37	95.11		
8.80	8.26	93.86		
8.80	8.18	92.95		
8.80	8.17	92.84		

又进行缓冲盐的调整,将保留时间缩短,最终确定缓冲液为醋酸盐缓冲液($\text{pH } 5.8$) - 甲醇 - 乙腈($15:55:30$, $V/V/V$)。

3.2 样本前处理方法选择

查阅文献,选择了前处理试剂,采用同一标准样本进行处理:1)200 μL 样本 + 200 μL 酸化剂 + 200 μL 甲醇;2)200 μL 样本 + 200 μL 酸化剂 + 200 μL 乙腈;3)200 μL 样本 + 400 μL 甲醇;4)200 μL 样本 + 400 μL 乙腈。结果显示,4种方案均无干扰成分干扰目标峰,方案4)回收率更高,操作简单、准确,检测限更低^[7-8],灵敏度均可达到血药浓度检测的标准,故选择2.2项下方法对样本进行处理。

3.3 检测波长选择

本研究中通过高效液相色谱仪的光谱扫描,首先确定最大吸收波长范围。发现242 nm波长处吸收较大,通过验证,242 nm波长处的响应值高,且杂质干扰较少,故检测波长选择242 nm。

3.4 临床应用

采用本方法对本院10名服用胺碘酮的患者进行血药浓度监测,其中2例为儿童,8例为大于60岁的老年患者,其中3例老年患者为定期监测,测得药物谷浓度为 $(0.68 \pm 0.12) \mu\text{g/mL}$ 。证明胺碘酮对多种难治性心律失常有较好疗效,负荷剂量的大小决定起效时间,需要快速控制的严重室性心律失常患者使用较大负荷剂量时,应进行血药浓度监测,及时进行个体化给药方案调整,以保证用药的安全性及有效性。有研究报道,胺碘酮达效质量浓度范围95%为0.5~2.0 $\mu\text{g/mL}$,建议

以0.5~2.0 $\mu\text{g/mL}$ 为有效血药浓度^[12]。血药浓度大于2.5 $\mu\text{g/mL}$ 与神经系统和胃肠道不良反应的增加有关^[13-14]。胺碘酮的中毒浓度在3.0 $\mu\text{g/mL}$ 以上^[15]。由于胺碘酮半衰期长,且易蓄积,需密切监测其血药浓度变化,以进行个体化给药,防止致命性心律失常发生。目前,对浓度靶值及毒性阈值缺乏权威的有力证据,本研究中收集的样本过少,后期将收集更多数据,结合临床效果,分析有效的血药浓度范围。

参考文献

[1] LATINI R, TOGNONI G, KATES RE, et al. Clinical pharmacokinetics of amiodarone [J]. Clin Pharmacokinet, 1984, 9(2): 136 - 156.

[2] 吴莱文. 治疗药物监测[M]. 北京:人民卫生出版社,1989: 267 - 273.

[3] 汪芳, 李一石, 黄一玲, 等. 健康人连续口服不同剂量胺碘酮的血药浓度的临床研究[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(2): 190 - 193.

[4] 李惠芬, 刘冬, 李优鑫, 等. 人血清中胺碘酮的质控方法研究[J]. 药品评价, 2006, 3(1): 57 - 59.

[5] 王锦秋, 段宗明, 林长征, 等. 高效薄层色谱法测定人血清中盐酸胺碘酮[J]. 中国药业, 2001, 10(10): 39 - 40.

[6] 刘学红, 郭瑞臣, 黄明慧. 高效液相色谱法测定血中胺碘酮及其活性代谢物浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 22(1): 17 - 19.

[7] 罗会盛, 张宏文. 反相高效液相色谱法测定血浆中胺碘酮的含量[J]. 药学进展, 2002, 26(3): 166 - 167.

[8] 张婷, 吴江, 彭伟, 等. HPLC法测定小剂量胺碘酮及去乙基胺碘酮血药浓度[J]. 药学与临床研究, 2009, 17(4): 347 - 349.

[9] 昌征, 昌震, 阮荔阳. 酸诱导-浊点萃取-荧光淬灭法测定盐酸胺碘酮[J]. 分析实验室, 2017, 36(11): 1281 - 1284.

[10] 林玳, 吴晓薇, 顾卓君. 高效液相色谱法测定胺碘酮血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(12): 1138 - 1139.

[11] 季国春, 沈晓英, 朱淑贤, 等. 高效液相色谱法测定人血清中胺碘酮浓度[J]. 中国药房, 2007, 18(5): 352 - 353.

[12] 钱肇美, 陶萍, 刘庆红, 等. 不同负荷量胺碘酮对室性心律失常的疗效与血药浓度的关系[J]. 中国循环杂志, 1988, 3(3): 148 - 150.

[13] HAFFAJEE CI, LOVE JC, ALPERT JS, et al, Sloan KC: Efficacy and safety or long term amiodarone in treatment of cardiac arrhythmia: Dosage experience [J]. Am Heart J, 1983, 106(4 Pt 2): 935 - 943.

[14] GREENBERG ML, LERMAN BB, SHIPE JR, et al. Relationship between amiodarone and desethylamiodarone plasma concentrations and electrophysiologic effects, efficacy and toxicity [J]. J Am Coll Cardiol, 1987, 9(5): 1148 - 1155.

[15] 宋钟娟, 奚菁颖, 黄荣飞, 等. 不同剂量胺碘酮治疗老年人心房颤动的临床疗效及安全性[J]. 中国药师, 2003, 6(8): 506 - 507.

(收稿日期: 2021 - 11 - 24; 修回日期: 2022 - 03 - 24)