

HPLC 测定人血清中多索茶碱的浓度

王小明^{1,2}, 王石健², 张晓芬², 杨赛成², 王彬辉² (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.台州市立医院药剂科, 浙江 台州 318000)

摘要: 目的 建立高效液相色谱测定多索茶碱血药浓度的方法。方法 用乙醚提取血样, 以卡马西平为内标进行检测。色谱柱采用 Waters C₁₈(3.9 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(35:65), 流速为 0.6 mL·min⁻¹, 检测波长为 273 nm, 柱温为 30 ℃。结果 多索茶碱血清浓度在 0.7~28 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 线性方程为 $Y=0.3549X+0.0039$ ($r=0.9997$), 方法回收率为 100.4%, 日内、日间 RSD 分别为 1.10%~3.87% 和 2.11%~4.86% ($n=5$)。结论 该方法快速、简便、准确、安全, 可用于临床多索茶碱血药浓度的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 多索茶碱; 血药浓度

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)08-0988-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.020

Determination of Doxofylline in Human Serum by HPLC

WANG Jinming^{1,2}, WANG Shijian², ZHANG Xiaofen², YANG Saicheng², WANG Binhui² (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Department of Pharmacy, Municipal Hospital of Taizhou, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of doxofylline in human serum. **METHODS** Ethyl ether was used as the exacted solvent, with carbamazepine as the internal standard. The column was Waters-C₁₈ (3.9 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-water(35:65) and the flow rate was 0.6 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 273 nm. The column temperature was kept at 30 ℃. **RESULTS** It showed a good linear range of 0.7–28 μg·mL⁻¹ for doxofylline, the linear regression equation was $Y=0.3549X+0.0039$ ($r=0.9997$). The methodological recovery was 100.4%, the intra-day RSD and the inter-day RSD were 1.10%–3.87% and 2.11%–4.86% ($n=5$). **CONCLUSION** The method is proved to be rapid, simple, accurate and safe. It is suitable for determination of concentration of doxofylline in clinic.

KEY WORDS: HPLC; doxofylline; serum drug concentration

多索茶碱具有较强的平喘作用, 安全性明显高于茶碱及氨茶碱, 是替代茶碱类药物的新一代甲基嘌呤衍生物^[1], 该药个体差异较大, 要视个体病情变化选择最佳剂量和用药方法, 大剂量给药还可引起血压下降、严重心律不齐及阵发性痉挛等, 必要时需检测血药浓度。目前检测血药浓度多数采用高效液相色谱法, 样品处理方法主要有沉淀蛋白法^[2-4]和有机溶剂(如二氯甲烷^[5-6]、三氯甲烷^[7-8]与异丙醇的混合溶剂)提取法。但是沉淀蛋白法常出现因沉淀蛋白不完全而造成色谱柱堵塞的问题, 而二氯甲烷、三氯甲烷和异丙醇等有机溶剂又对人体毒害较大。为解决以上问题, 笔者参照有关文献^[9-10], 对多索茶碱血清药物浓度的检测方法进行改进, 建立了一种快速、简便、准确、安全的测定方法。

1 材料

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪(包括 515 高压泵和 2487 紫外检测器, 美国 Waters 公司); HS2000 色谱工作站(杭州英谱公司); AG204 DeltaRange 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); XW-80A 型旋涡混合器(原上海医科大学仪器厂); HH-W600 电热恒温水箱(金坛市国旺实验仪器厂); 超声波清洗器(北京医疗设备一厂); TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂); 1810D 自动双重纯水蒸馏器(上海申生科技有限公司)。

1.2 试药

多索茶碱对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100625-200301, 供含量测定用); 卡马西平对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100142-199503, 供含量测定用); 甲醇(美国 TEDIA 公司,

基金项目: 台州学院基金项目(2012PY45)

作者简介: 王小明, 男, 硕士, 副主任药师

Tel: (0576)88858266

E-mail: wjm6688@163.com

色谱纯); 乙醚为分析纯; 双蒸水; 空白血清由台州市立医院血库提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters C₁₈ 柱(3.9 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(35:65); 流速: 0.6 mL·min⁻¹; 检测波长: 273 nm; 柱温: 30 ℃。

2.2 对照品溶液配制

精密称取多索茶碱和卡马西平对照品各 10 mg 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 配成 1 000 μg·mL⁻¹ 的标准贮备液, 4 ℃冷藏备用。

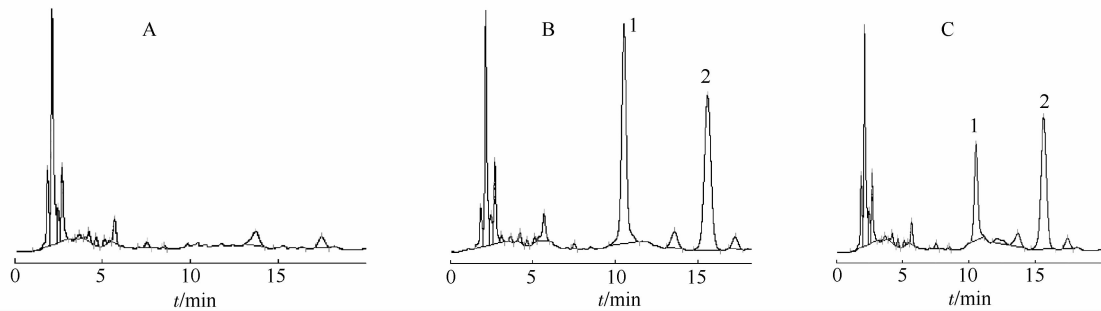


图1 HPLC 色谱图

A-空白血清; B-空白血清+多索茶碱和内标对照品; C-血清样品; 1-多索茶碱; 2-卡马西平。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank serum; B-reference of doxofylline and internal standard in the blank serum; C-serum sample; 1-doxofylline; 2-carbamazepine.

2.5 标准曲线制备

精密量取多索茶碱对照品溶液适量, 用空白血清稀释成多索茶碱浓度分别为 28.0, 14.0, 7.0, 5.6, 2.8, 1.4, 0.7 μg·mL⁻¹ 的系列浓度混合血清标样, 按“2.3”项下方法处理进样, 记录色谱, 以多索茶碱与内标峰面积比值(Y)对多索茶碱浓度(X)进行线性回归, 计算得回归方程为 $Y=0.354\ 9X+0.003\ 9$, $r=0.999\ 7$ ($n=7$), 结果表明多索茶碱在 0.7~28 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.6 最低检测限和最低定量限

取多索茶碱对照品贮备液, 配置系列低浓度对照品溶液, 按血清样品处理操作后, 每份测定 3 次。在此色谱条件下, 最低检测限为 0.09 μg·mL⁻¹($S/N=3$), 最低定量限为 0.7 μg·mL⁻¹($n=3$, $RSD=4.76\%$)。

2.7 方法回收率与精密度试验

配制浓度为 1.4, 5.6, 14.0 μg·mL⁻¹ 的多索茶碱对照品血清, 按“2.3”项下方法处理进样($n=5$), 以多索茶碱与内标峰面积的比值代入标准曲线求得各质量浓度测定值, 与加入量比较计算方法回

2.3 血清样品处理方法

精密量取待测人血清样品 200 μL 于 10 mL 离心管中, 加内标物卡马西平的对照品溶液 20 μL (20 μg·mL⁻¹), 加乙醚 2 mL, 涡旋混合 2 min, 再经 3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取乙醚层移至另一离心管中, 于 45 ℃水浴下氮气吹干, 残渣用 200 μL 流动相复溶, 进样 20 μL。

2.4 专属性考察

按“2.1”项下色谱条件, 血清中无明显干扰峰, 多索茶碱与内标物、杂质分离良好, 保留时间为 10.5 min, 卡马西平峰的保留时间为 15.6 min, 理论板数>4 500, 色谱图见图 1。

收率, 平均回收率为 100.4%。另分别配制上述 3 种浓度的对照品血清, 同法处理后进样, 于同日内测定 5 次及连续 5 d 每日测定 1 次, 计算日内及日间精密度, 结果 RSD 均<5%, 见表 1。

表1 回收率及精密度试验结果($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Results of recovery and precision test($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

理论浓度/ μg·mL ⁻¹	回收率/ %	日内		日间	
		实测浓度/ μg·mL ⁻¹	RSD/%	实测浓度/ μg·mL ⁻¹	RSD/%
1.4	102.86	1.45±0.06	3.87	1.44±0.07	4.86
5.6	98.57	5.53±0.14	2.51	5.48±0.21	3.87
14.0	99.86	13.98±0.15	1.10	13.89±0.29	2.11

2.8 提取回收率

配制浓度为 1.4, 5.6, 14.0 μg·mL⁻¹ 的多索茶碱血清对照品, 按“2.3”项下方法处理进样($n=5$), 以多索茶碱及内标与相同药物浓度条件下纯溶剂样品对照样本进样后得到的峰面积进行比较, 计算提取回收率, 测得低、中、高浓度的绝对回收率分别为(82.41±2.34)%, (86.65±3.12)%和(85.54±2.98)%。

2.9 系统耐受性实验

分别考察流动相比比例变化 $\pm 5\%$ 、柱温变化 $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、流速相对值变化 $\pm 20\%$ 时主峰的拖尾因子(结果均 <2.0)、主峰与杂质峰分离情况(结果分离度均 >2)；测定各条件下的含量数据($n=6$)，结果RSD均 $<2.0\%$ 。

2.10 稳定性考察

配制浓度为 $5.6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的多索茶碱对照品血清，在室温放置0, 2, 4, 8 h时及冷冻保存10 d后(反复冻融3次)按上述方法测定，结果RSD均 $<5\%$ ，表明室温放置8 h及冷冻10 d对多索茶碱测定结果无明显影响。

2.11 样品测定

应用本法对临床静脉滴注多索茶碱注射液 $0.3\text{ g}+0.9\%$ 氯化钠注射液100 mL的12例患者进行血药浓度监测，采血时间为静滴完后5 min，平均血药浓度为 $5.72\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，与文献[9]报道相似，无中毒病例。

3 讨论

高效液相色谱法测定多索茶碱血药浓度已有报道，本实验与以往报道的文献相比较，在流动相的选择、生物样品处理方法、内标选择、线性范围选择等方面进行了优化改进，使该方法更适合用于临床血药浓度监测。

3.1 流动相的选择

流动相一般选择甲醇-水^[2-4]、甲醇-磷酸盐缓冲液^[11]、乙腈-磷酸盐缓冲液^[5,12]、乙腈-水^[10]等，选用甲醇-水(35:65)为流动相优点：①配比简单；②多索茶碱峰与内标峰分离完全、峰形对称；③甲醇价格较乙腈低，可以大大降低检测成本。

3.2 生物样品处理方法

生物样品的前处理方法一般有蛋白沉淀和有机溶剂提取，也有文献报道^[13]血浆直接过滤后进柱，但各有优缺点：蛋白沉淀法常因沉淀不完全导致堵柱，而直接过滤后血浆中杂质多易产生干扰。笔者曾选用三氯甲烷萃取，但三氯甲烷很容易发生乳化现象，而且人吸入或经皮肤吸收会引起急性中毒，后来改用乙醚作提取液，既避免了乳化现象，又简便易得、益于环保，而且乙醚对人体健康危害小。在血清样品处理中曾用5 mL乙醚进行提取，而血样只有200 μL ，加入5 mL乙醚有机溶剂用量偏大，过多的有机溶剂挥干将会比较费时；经对有机溶剂用量进行优化后，发现采用

2 mL乙醚进行提取可以取得同样的效果。

3.3 内标选择

文献报道采用咖啡因^[5-8]或茶碱^[4]等作为内标进行定量测定，因有些食物含咖啡因，部分患者因饮食或服用含咖啡因的药物易造成内源性干扰，茶碱为多索茶碱的微量代谢物，对实验结果也造成干扰。本试验选用与多索茶碱合用几率很小的卡马西平作为内标，结果样品、内标与血清杂质分离良好；有效地避免了咖啡因作内标时，因其在很多饮料及常用药中存在而对测定结果造成的影响。而卡马西平是临床常测的药物，可建立互为内标同时测定人血浆中多索茶碱和卡马西平浓度的方法，同时测定服用多索茶碱或卡马西平患者的血药浓度，能在一定程度上减少血样监测的工作量。

3.4 线性范围选择

目前多索茶碱的血药浓度范围并无明确的标准，说明书显示：多索茶碱在 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内治疗有效， $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上浓度为中毒浓度。采用建立的方法对临床12例患者进行血药浓度监测，虽未发现中毒病例，但有文献^[14]报道，1例74岁男性患者，临床诊断为慢性阻塞性肺疾病，氨茶碱静脉注射， 0.25 g ， $1\text{ 次}\cdot\text{d}^{-1}$ ，1周后静脉抽血，测定血药浓度为 $22.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，患者有较严重的恶心、呕吐中毒症状。文献^[9,15-16]线性范围选择在 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以下，未包含多索茶碱的中毒浓度，当血药浓度 $>10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时检测结果往往不准确。本试验考察了多索茶碱在 $0.7\sim 28\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内的线性关系，结果显示线性关系良好，涵盖了多索茶碱的有效治疗范围和中毒浓度，可以满足临床血药浓度监测的要求。

本实验采用的测定方法与其他文献相比较，实验步骤更为简化，方法线性好，重复性理想，干扰因素少，适用于临床多索茶碱的血药浓度测定及药动学研究。

REFERENCES

- [1] YANG H Y. The clinical observation of doxofylline injection for 70 case of bronchial asthma and COPD [J]. J Shenyang Med Coll(沈阳医学院学报), 2008, 10(4): 226-227.
- [2] ZHANG C L, GAO J, XU Y J, et al. Determination of doxofylline and its metabolite theophylline in rat plasma by HPLC [J]. China Pharma(中国药师), 2011, 14(9): 1301-1303.
- [3] MA J Q, WANG N, WANG L, et al. Content determination of theophyllinum and doxofylline in human serum by RP-HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(18): 1665-1667.

- [4] ZHU J P, LIN X L, CHEN C M, et al. Determination of theophylline and doxofylline in human serum by HPLC [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2011, 23(6): 243-245.
- [5] LI D L, KAN Q C, LIU L. Effects of levofloxacin on pharmacokinetics of doxofylline in healthy volunteers [J]. Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志), 2008, 27(9): 680-684.
- [6] YUAN Y D, ZHAO F, WANG S M. Effect of levofloxacin on blood concentration of doxofylline in acute exacerbation of COPD patients [J]. China Pharm (中国药房), 2012, 23(34): 3206-3209.
- [7] ZHAO S F, KAN Q C. Effects of prulifloxacin on pharmacokinetics of doxofylline in healthy volunteers [J]. China Pharm (中国药房), 2013, 24(18): 1668-1670.
- [8] ZHANG L, ZHANG M X, XU B, et al. Simultaneous determination of the concentration of theophylline and doxofylline in human serum by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2009, 29(22): 1964-1965.
- [9] ZHANG J, YAO Q, ZHOU Q, et al. Simultaneous determination of the concentration of theophylline and doxofylline in human plasma by RP-HPLC [J]. China Pharmacy (中国药房), 2010, 21(42): 3974-3975.
- [10] LIN D, ZHENG H Y. Determination of doxofylline concentration in serum by RP-HPLC [J]. China Pharm (中国药业), 2010, 19(21): 15-16.
- [11] REVATHI R, ETHIRAJ T, THENMOZHI P, et al. High performance liquid chromatographic method development for simultaneous analysis of doxofylline and montelukast sodium in a combined form [J]. Pharm Methods. 2011, 2(4): 223-228.
- [12] LI F, KAN Q C, NIE H J. Effects of pazufloxacin mesilate on pharmacokinetics of doxofylline at steady state in rabbits [J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci) (郑州大学学报: 医学版), 2010, 45(2): 222-225.
- [13] TAGLIARO F, DORIZZI R, FRIGERIO A, et al. Non-extraction HPLC method for simultaneous measurement of dyphylline and doxofylline in serum [J]. Clin Chem, 1990, 36(1): 113-115.
- [14] BI J L, FU C X, LI X B, et al. Simultaneous determination of theophylline and doxofylline concentration in human serum by RP-HPLC method [J]. China J Mod Med (中国现代医学杂志), 2011, 21(5): 652-658.
- [15] WANG S M, ZHANG Z Q, YANG X L, et al. Determination of the concentration of doxofylline in human serum by RP-HPLC [J]. China Pharm (中国药房), 2011, 22(34): 3209-3210.
- [16] KAN Q C, LI D L, SHI X Q. HPLC determination of doxofylline and pharmacokinetic study in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2009, 29(5): 845-848.

收稿日期: 2013-08-16

近红外光谱法测定姜黄素-葡甲胺共晶的含量

杨培培¹, 丛晓东^{1*}, 蔡宝昌^{1,2} (1. 浙江中医药大学, 杭州 310053; 2. 南京中医药大学, 江苏省中药炮制重点实验室, 南京 210049)

摘要: 目的 利用近红外光谱法测定姜黄素-葡甲胺共晶的含量。方法 纯化共晶后, 建立紫外分光光度法含量测定的标准曲线, 初步估算共晶含量; 再进行近红外光谱扫描, 用偏最小二乘法建立含量测定模型, 并对建立的模型进行验证。结果 建立的姜黄素-葡甲胺共晶校正模型的相关系数(R)、校正均方差(RMSEC)分别为 0.999 86, 0.466。结论 建立了一种简便、快速、无损的共晶含量测定方法。

关键词: 近红外光谱; 姜黄素-葡甲胺共晶; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)08-0991-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.021

Determination of Curcumin-meglumine Cocrystal by Near-infrared Spectroscopy Rapidly

YANG Peipei¹, CONG Xiaodong^{1*}, CAI Baochang^{1,2} (1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210049, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the concentration of curcumin-meglumine cocrystal by near infrared spectrum. **METHODS** After purification, standard curve of ultraviolet spectrophotometry was built to evaluate its concentration preliminarily. NIR spectrum was gotten, partial least square method was used to build the determination model, and validate the model. **RESULTS** The correlation coefficients(R), the root-mean-square error of calibration(RMSEC) of the calibration model for gardenia extract of counter-current gardenoside were 0.999 86 and 0.466. **CONCLUSION** The established method is simple, rapid and non-destructive for the determination of the concentration of cocrystal.

KEY WORDS: near infrared spectrum; curcumin-meglumine cocrystal; content determination

基金项目: 黄氏山茱萸治疗糖尿病肾病配伍增效物质基础及机理研究(81274056)

作者简介: 杨培培, 女, 硕士 Tel: 15168343631 E-mail: peipeiyangky@126.com *通信作者: 丛晓东, 硕士, 副教授 Tel: 15158023754 E-mail: yppfriend123@163.com