

在线二维柱切换-高效液相色谱法测定人血清中多索茶碱浓度^Δ

郑玲利^{1*},袁明勇¹,蒋婷¹,王峰²,张维¹,陈静^{1#}(1.成都医学院第一附属医院药剂科,成都 610500;2.中南大学湘雅二医院药学部,长沙 410011)

中图分类号 R974⁺.3;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1264-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.27

摘要 目的:建立测定人血清中多索茶碱浓度的方法。方法:采用在线二维柱切换-高效液相色谱法测定人血清中多索茶碱浓度,一维色谱柱为 Waters C₁₈,中间柱为 SC2,一维、二维柱流动相均为甲醇-水(70:30, V/V),检测波长为 273 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 10 μL。结果:多索茶碱在 0.5~50.00 μg/mL 质量浓度范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$),检测限为 0.01 μg/mL,定量限为 0.5 μg/mL,日内、日间精密度的 RSD 分别为 1.51%~1.89%和 1.52%~1.92% ($n=5$),准确度为 97.91%~104.19% ($n=5$),提取回收率为 91.63%~93.44% ($RSD<2.00\%$, $n=3$),基质效应 $RSD\leq 3.01\%$ ($n=6$),稳定性的 $RSD<5.00\%$ ($n=6$)。3 例患者静脉输注多索茶碱葡萄糖注射液(0.3 g/d)达稳态后,次日给药前静脉血清中多索茶碱的浓度为 3.23、3.35、3.68 μg/mL, RSD 为 2.28%、2.34%、2.14% ($n=5$)。结论:该方法简便、快速、准确,适用于临床多索茶碱的血药浓度检测。

关键词 多索茶碱;血药浓度;在线二维柱切换-高效液相色谱法

Determination of Doxofylline Concentration in Human Serum by Online Two-dimensional Column Switching-HPLC

ZHENG Lingli¹, YUAN Mingyong¹, JIANG Ting¹, WANG Feng², ZHANG Wei¹, CHEN Jing¹ (1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2.Dept. of Pharmacy, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the method for the determination of doxofylline in human serum. **METHODS:** Online two-dimensional column switching-HPLC was adopted to determine the concentration of doxofylline in human serum. First-dimensional chromatographic column was Waters C₁₈ column, and middle column was SC2. First-dimensional and second-dimensional column mobile phase were methanol-water (70:30, V/V). The detection wavelength was 273 nm, and column temperature was 40 ℃. Sample volume was 10 μL. **RESULTS:** The linear range of doxofylline were 0.5-50.00 μg/mL ($r=0.999\ 9$), and the detection limit was 0.01 μg/mL. The quantitative limit was 0.5 μg/mL. RSDs of intra-day and inter-day were 1.51%-1.89% and 1.52%-1.92% ($n=5$). The accuracy were 97.91%-104.19% ($n=5$). Extraction recoveries rate were 91.63%-93.44% ($RSD<2.00\%$, $n=3$). RSD of matrix effect were lower than or equal to 3.01% ($n=6$), and RSD of stability test was lower than 5.00% ($n=6$). After 3 patients were given intravenous injection of Doxofylline and glucose injection (0.3 g/d) up to steady state, the serum concentrations of doxofylline were 3.23, 3.35, 3.68 μg/mL before medication on the next day ($RSD=2.28\%$, 2.34%, 2.14%, $n=5$). **CONCLUSIONS:** The method is simple, rapid, accurate and suitable for the determination of plasma concentration of doxofylline.

KEYWORDS Doxofylline; Plasma concentration; Online two-dimensional column switching-HPLC

多索茶碱(Doxofylline)为甲基黄嘌呤的衍生物^[1],主要用于支气管痉挛引起的呼吸困难^[2]。作为新一代茶碱药物,该药具有疗效高、副作用小等特点,故越来越被临床所重视。但该药与茶碱一样,同样存在个体差异较大,大剂量给药时可能引起血压下降、心律不齐、阵发性痉挛等^[3],故临床需密切监测多索茶碱血药浓度,防止过量导致不良反应的发生。目前,检测血药浓度主要采用高效液相色谱(HPLC)法^[4-5],但传统的 HPLC 法存在前

处理较复杂、常使用大量有机溶剂、残留蛋白易堵塞色谱柱等问题。本研究通过对传统血药浓度检测方法进行优化和改良,建立了一种简便、快速、准确的检测方法,适用于临床多索茶碱的血药浓度检测。

1 材料

1.1 仪器

二维 HPLC(2D-HPLC)由 FLC-2801 全自动二维液相色谱耦合仪(湖南德米特仪器有限公司)和 LC-20A 色谱模块(日本岛津公司)构成;HR-200 电子分析天平(日本 AND 公司);TD24-WS 低速离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司);XW-80A 旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司);Mini-15K 微型高速离心机(杭州奥盛仪器有限公司)。

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81600388);四川省科技厅立项科研课题(No.2012JY0035)

* 副主任药师,副教授,硕士。研究方向:临床药学。电话:028-83016717。E-mail:34232098@qq.com

通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学。电话:028-83016713。E-mail:767090590@qq.com

1.2 药品与试剂

多索茶碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100345-200803,供含量测定用);甲醇为色谱纯;高氯酸、磷酸铵为分析纯,水为纯净水。

1.3 血清与全血

空白马血清(北京政博伟业生物科技有限公司,批号:160128);空白人血清和用药患者全血样品(静脉注射多索茶碱葡萄糖注射液每日0.3 g,达稳态后,次日给药前0.5~1 h采血)由中南大学湘雅二医院临床科室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

FLC-2801全自动二维液相色谱耦合仪,第一维色谱系统为岛津LC-20ATvp四元低压色谱泵,第二维色谱系统为岛津LC-20ATvp一元低压色谱泵。第一维柱系统:色谱柱为Waters C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-水(70:30, V/V),流速为1.0 mL/min。第二维柱系统:流动相为甲醇-水(70:30, V/V),不需要色谱柱,主要用于清洗中间柱;中间柱SC2(25 mm×3.5 mm,5 μm);检测波长为273 nm;柱温为40 ℃;进样量为10 μL。工作原理:(1)进样。目标经过中间柱分离杂质后进入分析柱进行分析。(2)除杂。中间柱在目标物完全离开后转至第二维柱系统进行反向冲洗,洗去残留杂质。(3)返回。中间柱洗净后返回第一维柱系统,为下一次进样做准备,流程图见图1。在线二维柱切换-HPLC条件设置-时间程序表见表1。

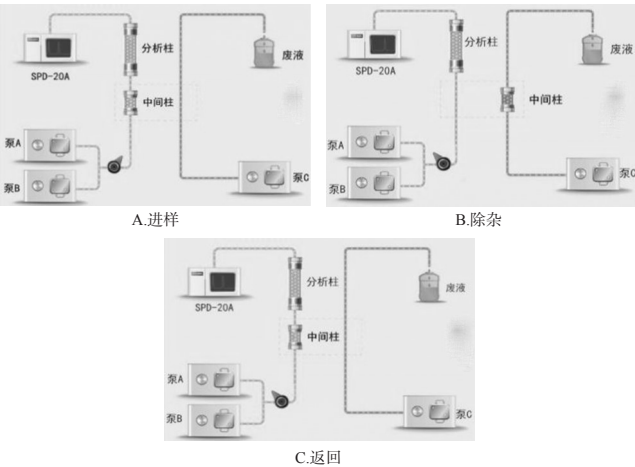


图1 工作原理图

Fig 1 Diagram of operational principle

表1 在线二维柱切换-HPLC条件设置-时间程序表
Tab 1 Condition setting-time program table of online two-dimensional column switching-HPLC

时间,min	第一维柱系统 流速,mL/min	第二维柱系统 流速,mL/min	功能
0.01~0.77	1.0	0.01	中间柱位于第一维柱系统,样品通过中间柱拦截部分杂质
0.78~2.81	1.0	1.80	中间柱切换到第二维柱系统,进行在线清洗
2.82~10.20	1.0	0.01	中间柱停止清洗,并于9.50 min从第二维柱系统回到第一维柱系统处,为下一次进样做准备

2.2 溶液的准备

2.2.1 对照品贮备液 精密称取多索茶碱对照品5 mg,用25%乙醇溶解并定容至10 mL,制备成质量浓度为500 μg/mL的对照品贮备液,置于冰箱中(4 ℃),备用。

2.2.2 对照品溶液 取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,用25%乙醇定容至10 mL,制备成高、中、低质量浓度(37.5、12.5、1.5 μg/mL)的对照品溶液,转移至密封螺口瓶中,置于冰箱中(-80 ℃)保存。

2.2.3 质控样品溶液 取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,用空白马血清定容至10 mL,制备成高、中、低质量浓度(37.5、12.5、1.5 μg/mL)的质控样品溶液,转移至密封螺口瓶中,置于冰箱中(-80 ℃)保存。

2.3 血清样品处理方法

取全血样品以离心半径6 cm、转速3 000 r/min离心5 min,精密量取待测血清样品200 μL,再置于离心管中,加入10%高氯酸600 μL,涡旋振荡1 min后,以离心半径3 cm、转速14 500 r/min离心8 min。取上清液700 μL至进样瓶,加入5.0 mol/L磷酸铵溶液70 μL调节pH至7.0,涡旋振荡15 s,进样10 μL,以外标法定量分析。

2.4 专属性考察

取空白马血清、空白人血清、空白马血清+多索茶碱对照品、用药患者全血样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱。结果显示,空白马血清、空白人血清在目标峰处无干扰,多索茶碱与杂质分离较好,保留时间为8.794 min,色谱图见图2。

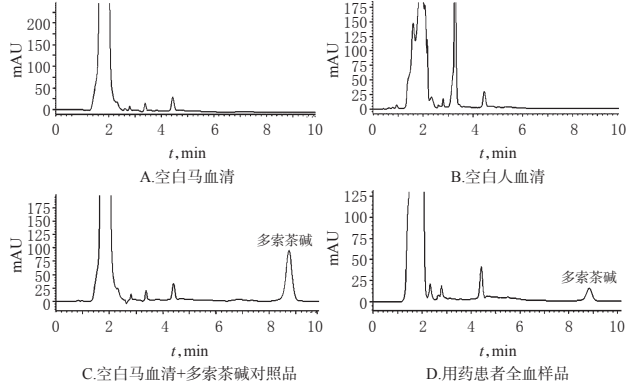


图2 HPLC图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.5 线性关系考察

取多索茶碱对照品贮备液适量,用空白马血清定容,稀释制成多索茶碱质量浓度分别为50.0、25.0、12.5、6.25、3.0、1.5、0.5 μg/mL的系列溶液,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(y)、多索茶碱质量浓度为横坐标(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=32\,015x+1\,669.85$ ($r=0.999\,9$)。结果表明,多索茶碱在0.5~50.0 μg/mL范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 检测限与定量限考察

取“2.5”项下多索茶碱标准曲线线性最低点的溶液逐倍稀释,进行分析,以信噪比为3计算检测限,以信噪

比为10计算定量限。结果显示,检测限为0.01 μg/mL,定量限为0.5 μg/mL。

2.7 准确度与精密度试验

取“2.2.3”项下高、中、低质量浓度的质控样品溶液,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,每个质量浓度同日内连续测定5次考察日内精密度,5日内每日测定1次考察日间精密度;以回归方程计算多索茶碱浓度,按公式实测浓度/理论浓度×100%计算准确度。准确度与精密度试验结果见表2。

表2 准确度与精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of accuracy and precision tests ($\bar{x} \pm s, n=5$)

理论浓度, μg/mL	日内精密度		日间精密度		准确度, %
	实测浓度, μg/mL	RSD, %	实测浓度, μg/mL	RSD, %	
37.5	37.07±0.12	1.87	37.36±0.12	1.89	97.91
12.5	12.86±0.14	1.89	12.76±0.16	1.92	102.88
1.5	1.618±0.03	1.51	1.611±0.04	1.52	104.19

2.8 提取回收率试验

取“2.2.3”项下高、中、低质量浓度的质控样品溶液和“2.2.2”项下多索茶碱对照品溶液,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,将测得的同质量浓度质控品与对照品溶液的峰面积进行比较,计算提取回收率。结果显示,高、中、低质量浓度质控样品溶液的提取回收率分别为93.44%、92.25%、91.63%,RSD分别为1.9%、1.1%、1.8%($n=3$),表明本方法的提取回收率较高且稳定。

2.9 基质效应考察

取6份不同的空白人血清和空白马血清,按“2.3”项下方法处理后,加入多索茶碱对照品溶液制备成高、低质量浓度(37.5、1.5 μg/mL)质控样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,以质控样品溶液的峰面积与相同质量浓度多索茶碱对照品溶液的峰面积的比值计算基质效应。结果显示,人血清、马血清的RSD均小于15%,且两者比较无显著差异,故本试验可用马血清替换人血清作为质控基质。基质效应考察结果见表3。

表3 基质效应考察结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Results of matrix effect ($\bar{x} \pm s, n=6$)

浓度, μg/mL	人血清		马血清	
	基质效应	RSD, %	基质效应	RSD, %
37.5	1.02±0.03	2.97	1.01±0.02	2.68
1.5	1.02±0.04	2.95	1.02±0.03	3.01

2.10 稳定性考察

取“2.2.3”项下高、中、低质量浓度的质控样品溶液,在室温放置0、2、4、8、16、24 h及冷冻保存10 d(反复冻融3次)后,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果显示,质控样品溶液峰面积的RSD均<5.00%($n=6$),表明质控样品溶液在室温放置24 h及冷冻10 d的稳定性良好。

2.11 临床样本测定

取3例用药患者的全血样品,按“2.3”项下方法处理

后,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,代入回归方程计算浓度。结果显示,3例用药患者的多索茶碱血药浓度分别为3.23、3.35、3.68 μg/mL, RSD分别为2.28%、2.34%、2.14%($n=5$),血药浓度均在本方法检测范围内,且重现性较好。

3 讨论

多索茶碱是一种新型支气管扩张药,可直接作用与支气管,促进支气管平滑肌舒张,从而达到抑制哮喘发作^[6]。但其治疗范围较窄,实际使用过程中易出现肝损害、心律失常等不良反应,需对其进行血药浓度监测。已有研究报道采用HPLC法测定多索茶碱,但均存在前处理复杂、灵敏度低、色谱柱使用寿命较短等问题^[5,7]。本方法采用高氯酸沉淀蛋白后直接进样,不但避免有机溶剂萃取造成样品的损失,而且不需要用微孔滤膜过滤,简化了样品处理过程,缩短了样本处理时间。此外,本方法提取回收率高,回收率稳定,不需要加入内标,通过外标法就能达到较好的线性关系。

本试验采用的在线二维柱切换-HPLC法,在普通HPLC分析柱前引入中间柱,中间柱除了对样品具有分离功效外,还具有强大的除杂功能。当目标物全部通过中间柱后,中间柱带着残留的杂质从第一维柱系统转移至第二维柱系统,通过流动相反向冲洗,大量的杂质从第二维柱系统中排入废液,这不仅去除了大部分杂质的干扰,提高了分析的准确性,而且大大延长了分析柱和中间柱的寿命,节约了检测成本。

本研究选择马血清作为血清基质,因为马血清与人血清作为质控基质无明显差异,而马血清更容易获得且已被卫生部质控中心采用,故试验中采用马血清配制的质控样品。与文献方法^[5,7]比较,该方法试验步骤更为简单、检测时间短、方法线性好、干扰少、准确,适用于临床多索茶碱的血药浓度检测。

参考文献

[1] 金淑萍,高永丽,李成建.多索茶碱不良反应文献概述[J].中国药物滥用防治杂志,2015,21(6):362-363.
[2] 汪永忠,李颖,高家荣,等.超高效液相色谱法测定人血清中多索茶碱浓度[J].中国临床药理学杂志,2012,21(2):109-112.
[3] 王金明,王石健,张晓芬,等. HPLC测定人血清中多索茶碱的浓度[J].中国现代应用药理学,2014,31(8):988-990.
[4] 洪冰,章小敏,叶爱菊. HPLC法监测人血清中茶碱类药物浓度[J].海峡药学,2015,27(1):227-229.
[5] 王淑梅,张志清,杨秀岭,等. RP-HPLC法测定人血清中多索茶碱的浓度[J].中国药房,2011,22(34):3209-3210.
[6] 赵红卫,王漪檬,赵宁民,等.高效液相色谱法同时测定茶碱和多索茶碱的血清药物浓度[J].中华实用诊断与治疗杂志,2014,28(11):1095-1096.
[7] 李岑,高敬林,石蕊,等. UPLC与HPLC测定人血浆中多索茶碱的比较[J].华西药理学杂志,2017,32(3):281-283.

(收稿日期:2018-01-22 修回日期:2018-03-14)
(编辑:邹丽娟)