

# 固相萃取-HPLC法测定大鼠体内咖啡因、氨苯砜和氯唑沙宗的血药浓度及药动学研究<sup>Δ</sup>

王海波\*, 杨欣欣, 邸 学(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4770-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.06

**摘要** 目的:测定大鼠体内咖啡因、氨苯砜和氯唑沙宗的血药浓度,计算药动学参数。方法:取大鼠6只,ig咖啡因、氨苯砜和氯唑沙宗混合溶液,给药剂量分别为1.5、2、3 mg/kg,于给药前及给药后0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h取血0.2~0.3 ml;血浆样品用固相萃取法处理,采用高效液相色谱法,以N-(2-羟乙基)邻苯二甲酰亚胺为内标,测定咖啡因、氨苯砜和氯唑沙宗的血药浓度;并用DAS 2.0软件计算药动学参数。结果:咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗检测质量浓度的线性范围均为0.2~30 μg/ml(*r*分别为0.996 4、0.996 1、0.998 8),定量限均为0.2 μg/ml,低、中、高质量浓度水平的方法回收率分别为(84.8±3.6)%~(111.4±10.2)% (RSD为4.3%~9.8%)、(107.0±13.3)%~(113.5±8.1)% (RSD为7.1%~14.0%)、(104.2±10.8)%~(111.1±12.2)% (RSD为8.0%~11.0%)(*n*=3);药动学参数 $t_{max}$ 为(1.70±0.99)、(1.50±1.00)、(1.92±0.80) h,  $t_{1/2}$ 为(0.73±0.22)、(2.77±1.35)、(2.78±2.34) h,  $c_{max}$ 为(2.60±0.50)、(5.78±1.19)、(9.76±1.37) mg/L,  $AUC_{0-t}$ 为(8.43±0.79)、(20.68±1.91)、(26.71±2.45) mg·h/L(*n*=6)。结论:本法操作简便、灵敏度高、结果准确,可用于咖啡因、氨苯砜和氯唑沙宗的血药浓度测定和药动学研究。

**关键词** 固相萃取;高效液相色谱法;咖啡因;氨苯砜;氯唑沙宗;药动学参数;大鼠

## Determination of Plasma Concentration of Caffeine, Dapsone and Chlorzoxazone by Solid Phase Extraction-HPLC and Pharmacokinetic Study

WANG Hai-bo, YANG Xin-xin, DI Xue (School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine plasma concentration of caffeine, dapsone and chlorzoxazone in rats, and to calculate pharmacokinetic parameters. METHODS: 6 rats were given the mixture of caffeine, dapsone and chlorzoxazone intragastrically, 1.5, 2 and 3 mg/kg, respectively. 0.2-0.3 ml blood were collected before medication and 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h after medication. The plasma sample was treated with solid phase extraction. The plasma concentration of caffeine, dapsone and chlorzoxazone were determined by HPLC using N-(2-Hydroxyethyl) phthalimide as internal standard. The pharmacokinetic parameters were calculated using DAS 2.0 software. RESULTS: The linear ranges of caffeine, dapsone and chlorzoxazone were all 0.2-30 μg/ml (*r* were 0.996 4, 0.996 1, 0.998 8, respectively). The limit of quantitation were 0.2 μg/ml. The recoveries of low-concentration, medium-concentration and high concentration were (84.8±3.6)%-(111.4±10.2)% (RSD were 4.3%-9.8%, *n*=3), (107.0±13.3)%-(113.5±8.1)% (RSD were 7.1%-14.0%, *n*=3), (104.2±10.8)%-(111.1±12.2)% (RSD were 8.0%-11.0%, *n*=3). Pharmacokinetic parameters were as follows as  $t_{max}$  (1.70±0.99), (1.50±1.00), (1.92±0.80) h;  $t_{1/2}$  (0.73±0.22), (2.77±1.35), (2.78±2.34) h;  $c_{max}$  (2.60±0.50), (5.78±1.19), (9.76±1.37) mg/L;  $AUC_{0-t}$  (8.43±0.79), (20.68±1.91), (26.71±2.45) mg·h/L (*n*=6). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the plasma concentration determination and pharmacokinetic study of caffeine, dapsone and chlorzoxazone.

**KEYWORDS** Solid extraction; HPLC; Caffeine; Dapsone; Chlorzoxazone; Pharmacokinetic parameters; Rat

细胞色素酶P<sub>450</sub>(CYP)主要存在于肝微粒体中,在外源性化合物(包括药物和毒物)的生物代谢(转化)中起着十分重要的作用<sup>[1]</sup>。“Cocktail”探针药物法是同时给予几种经不同CYP酶代谢的药物,通过研究药物代谢产物、原型药的比例或代谢速率来衡量多种酶的代谢能力,能够简便、快速地在体测定多种酶的活性<sup>[2-3]</sup>。该方法能够为CYP酶活性变化情况研究提供

参考,在疾病对代谢酶活性影响、药物成分与CYP酶的诱导和抑制作用关系研究以及在药动学研究和临床合理用药方面都有重大意义<sup>[4-5]</sup>。其中,咖啡因代谢是检测CYP1A2活性的重要指标,同时咖啡因及其多种代谢物也常用于CYP2A6、N-乙酰转移酶和黄嘌呤氧化酶等多种药物代谢酶活性的评估<sup>[6]</sup>;氨苯砜为测定人体内CYP3A4(大鼠CYP3A1同源亚型)活性的探针药物;氯唑沙宗是测定CYP2E1活性的探针药物<sup>[7-8]</sup>。

在血浆样品制备时,多采用氯仿<sup>[9]</sup>、二氯甲烷-正丁醇<sup>[10]</sup>、乙酸乙酯溶剂萃取<sup>[11-12]</sup>以及甲醇沉淀蛋白<sup>[13]</sup>等传统的前处理方

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81102789)

\* 副教授,博士。研究方向:中药药效物质评价。电话:0411-81690139。E-mail:whb\_email@126.com

本栏目协办

北京安妮福克斯信息咨询有限公司

地址:北京市东城区宝珠寺6号C层  
电话:4000008137 邮编:100005

法,工作强度大、处理时间长。采用固相萃取技术进行血浆样品制备是近年来探索的新领域<sup>[14-15]</sup>。本研究进行了含有3种探针药物血浆样品的固相萃取处理及高效液相色谱(HPLC)法测定,并初步分析3种探针药物合用时的药动学特征,可为后续探针药物及代谢物比率的测定研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-2010AHT型HPLC仪,包括CLASS-VP 6工作站(日本Shimadzu公司);H-26F型离心机(日本Kokusan公司,离心半径10 cm);CT10小型高速离心机(日本Hitachi公司,离心半径5 cm);Bondelut C<sub>18</sub>固相萃取柱(日本Varian公司);DZ-12A型固相萃取装置(天津市思利达科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

氯唑沙宗对照品(批号:41M0035V,纯度:>98.0%)、*N*-(2-羟乙基)邻苯二甲酰亚胺对照品(内标,批号:MKBF6158V,纯度:>98.5%)和氨苯砜(批号:SZBC072XV,分析纯,纯度:>98.0%)均购自美国Sigma公司;咖啡因(上海化学试剂采购中心,批号:8S0413,分析纯,纯度:>98.0%);乙腈、甲醇为色谱纯,甲醇为分析纯,水为纯净水。

### 1.3 动物

健康Wistar大鼠,♂,体质量(200±20)g,由大连医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXY(辽)2008-000。动物实验按照伦理委员会规定进行。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 标准混合溶液 精密称取咖啡因、氨苯砜、氯唑沙宗对照品适量,分别用甲醇溶解稀释制成质量浓度为1 mg/ml的贮备液,4℃下贮存,备用。精密量取咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗贮备液适量,用甲醇稀释成质量浓度分别为2、5、10、20、50、100、200、300 μg/ml的系列标准混合溶液,4℃贮存,备用。

2.1.2 内标溶液 精密称取*N*-(2-羟乙基)邻苯二甲酰亚胺对照品适量,用甲醇溶解稀释制成质量浓度为1 mg/ml的贮备液。精密量取贮备液加甲醇稀释成质量浓度为4.5 μg/ml的溶液,4℃贮存,备用。

2.1.3 混合试药溶液 精密称取咖啡因50 mg、氯唑沙宗对照品75 mg、氨苯砜50 mg,置于同一25 ml量瓶中,加7.5 ml生理盐水溶解,再加1%聚山梨酯80定容至刻度,制备成含咖啡因0.15 mg/ml、氨苯砜0.2 mg/ml、氯唑沙宗0.3 mg/ml的混合溶液,4℃贮存,备用。

### 2.2 给药方案

取大鼠6只,给药前禁食12 h,自由饮水,ig混合试药溶液,咖啡因、氨苯砜、氯唑沙宗的给药剂量分别为1.5、2、3 mg/kg<sup>[10]</sup>,给药体积为10 ml/kg。于给药前与给药后0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h经眼眶后静脉丛取血0.2~0.3 ml,置于涂有肝素的离心管中,3 500 r/min(离心半径10 cm)离心10 min,分离血浆,于-20℃保存。1周清洗期后,进行交叉实验。

### 2.3 血浆样品处理

采用固相萃取法处理,将C<sub>18</sub>固相萃取柱加2 ml甲醇活化后,再用2 ml水预处理后待用。取内标溶液50 μl加至1.5 ml离心试管内,空气流吹干,再加入血浆样品150 μl涡旋2 min,于10 000 r/min(离心半径5 cm)离心2 min。吸取100 μl上于固相萃取柱,用1 ml水洗涤后,再用2 ml甲醇洗脱,收集洗脱液,空气流吹干。残渣加甲醇100 μl,涡旋2 min,10 000 r/min(离心半径5 cm)离心2 min,吸取15 μl上清液进样测定。

### 2.4 色谱条件

色谱柱:Agilent XDB C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相采用二元梯度系统,0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B)[梯度洗脱程序:0~20 min,9%~12%(A);20~30 min,12%~38%(A);30~35 min,38%~9%(A);35~45 min,9%~9%(A)];流速:1.0 ml/min;检测波长:281 nm;柱温:25℃;进样量:15 μl。

### 2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 取空白血浆、空白血浆+标准混合溶液和大鼠给药后3 h的血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,记录色谱。结果,咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗的保留时间分别为7.6、22.9、30.3 min,内标保留时间为18.2 min,血浆中的内源性物质不干扰测定。色谱见图1。

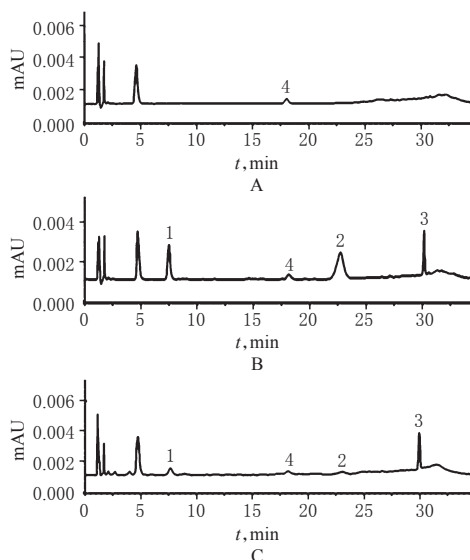


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆+内标; B.空白血浆+标准混合溶液+内标; C.血浆样品+内标; 1. 咖啡因; 2. 氨苯砜; 3. 氯唑沙宗; 4. 内标

### Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma+internal standard; B. blank plasma+standard mixed solution+internal standard; C. plasma sample+internal standard; 1. caffeine; 2. dapson; 3. chlorzoxazone; 4. internal standard

2.5.2 线性关系及定量限考察 取空白血浆135 μl,加入标准混合溶液15 μl,分别制备成质量浓度为0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30 μg/ml的标准血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样测定。以待测物峰面积与内标峰面积的比值(*y*)为纵坐标、待测物质量浓度(*x*)为横坐标,进行回归分析,得回归方程分别为咖啡因: $y=4.42x-0.292$ ( $r=0.9964$ )、氨苯砜: $y=8.64x-1.694$ ( $r=0.9961$ )、氯唑沙宗: $y=2.88x-0.248$ ( $r=0.9988$ )。其检测质量浓度的线性范围均为0.1~30 μg/ml,定量限均为0.2 μg/ml(信噪比为10)。

2.5.3 精密度与方法回收率试验 取空白血浆,按“2.5.2”项下方法制备成血浆中含咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗低、中、高3个质量浓度(0.5、2、20 μg/ml)的质控样品,按“2.3”项下方法处理后,进样测定。每一浓度进行6样本分析,考察日内精密度和方法回收率;连续测定3 d,考察日间精密度,结果见表1。

2.5.4 提取回收率试验 取空白血浆,按“2.5.2”项下方法制备成血浆中含咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗低、中、高3个质量浓度(0.5、2、20 μg/ml)的质控样品,按“2.3”项下方法处理后,进

表1 精密度和回收率试验结果

Tab 1 Results of precision and recovery tests

样品	质量浓度, μg/ml	精密RSD, % (n=3)		方法回收率, % (n=3)		提取回收率, % (n=3)	
		日内	日间	$\bar{x} \pm s$	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD
咖啡因	0.5	4.0	13.4	84.8±3.6	4.3	91.8±1.2	1.1
	2	8.3	9.6	111.4±10.2	9.2	91.2±4.7	5.2
	20	9.6	12.0	103.2±10.1	9.8	99.3±10.3	10.4
氨苯砜	0.5	9.7	13.7	107.0±13.3	12.5	91.8±9.3	10.2
	2	13.8	12.8	111.0±15.2	14.0	91.0±6.0	6.6
	20	11.5	11.3	113.5±8.1	7.1	97.4±9.6	9.9
氯唑沙宗	0.5	10.7	8.8	104.2±10.8	10.4	97.1±6.2	6.4
	2	7.7	10.1	111.1±12.2	11.0	85.9±4.8	5.6
	20	8.7	12.5	107.1±8.5	8.0	91.9±9.9	10.9

样测定,每一浓度进行3样本分析。另取空白血浆,按“2.3”项下方法操作至“收集洗脱液,空气流吹干”后,在残渣中加入100 μl相同质量浓度的标准混合溶液,涡旋1 min,离心后吸取上清液,进样测定。计算提取回收率,结果见表1。

2.5.5 稳定性试验 取空白血浆,按“2.5.2”项下方法制备成血浆中含咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗低、中、高3个质量浓度(0.5、2、20 μg/ml)的质控样品,将质控样品分别于室温(10~20℃)放置24 h、-20℃贮藏20 d以及经3次冷冻-解冻循环,每一浓度进行3样本分析,考察稳定性。结果,上述条件下质控样品的RSD均小于15%,准确度RSD在-2.2%~-6.2%,表明各条件下稳定性良好。

## 2.6 药动学参数计算

取“2.2”项下各时间点的样品血浆,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,计算血药浓度,利用DAS 2.0软件计算药动学参数,结果见表2。

表2 咖啡因、氨苯砜和氯唑沙宗在大鼠体内的药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=6$ )Tab 2 Pharmacokinetic parameters of caffeine, dapsone and chlorzoxazone in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	咖啡因	氨苯砜	氯唑沙宗
$t_{1/2}$ , h	0.73±0.22	2.77±1.35	2.78±2.34
$t_{max}$ , h	1.70±0.99	1.50±1.00	1.92±0.80
$C_{max}$ , mg/L	2.60±0.50	5.78±1.19	9.76±1.37
AUC <sub>0-12</sub> , mg·h/L	8.43±0.79	20.68±1.91	26.71±2.45

由表2可知,本方法可用于同时测定大鼠体内咖啡因、氯唑沙宗和氨苯砜的血药浓度,可用来评价某些药物对CYP1A2、CYP2E1和CYP3A4的调控作用和其他相关研究。

## 3 讨论

CYP酶活性的探针药物“Cocktail”法分析,能同时反映多种酶活性变化情况,方法简单、适用,能够实现活体动物的CYP酶活性分析。本方法可用于疾病、药物等因素影响下不同阶段实验动物酶活性的变化情况研究,具有较广的应用范围。在探针药物的给药量方面,多个研究<sup>[4,8,10-12]</sup>给予咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗3种探针药物的剂量为10~75 mg/kg(3~7倍的范围,大鼠),王丹等<sup>[13]</sup>给予的剂量为0.1~1 mg/kg(小鼠)。为探索3种探针药物在低浓度给药剂量下药动学参数的情况,本实验的给药剂量选择为1.5~3 mg/kg。

在样品处理过程中,分别进行了氯仿、乙酸乙酯提取,甲醇沉淀蛋白法与固相萃取法处理试验,以固相萃取法的回收率最高,故确定采用固相萃取法制备样品。固相萃取法利用固体吸附剂将样品中的目标化合物吸附,使目标化合物与干扰物分离,再用洗脱液洗脱达到分离和富集的目的。该方法

操作简单、快速,血浆样品杂质少,可批量处理。进行固相萃取法制样时,固相萃取柱所用填料的性能对实验结果影响较大。本实验进行了数个同类型固相萃取柱的筛选试验,最终选择所用型号。并在进行实验操作时,尽量固定上样、洗脱等操作步骤条件,保证结果准确。

本研究在流动相洗脱系统多为磷酸盐水相的研究基础上,建立了添加0.1%甲酸作为改性剂的乙腈-水分析体系,扩展了测定条件范围。

本固相萃取-HPLC测定方法操作简便、快速可靠,可用于大鼠血浆中探针药物咖啡因、氨苯砜及氯唑沙宗的测定,为后续试验研究提供支持。

## 参考文献

- [1] 李纳,施孝金.细胞色素P450酶基因多态性的研究进展及临床意义[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(10):1 193.
- [2] 候丛颂,杨志宏,孙晓波.“Cocktail”探针药物法及其在研究中药对细胞色素P450影响中的应用进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):445.
- [3] 孙冰婷,居文政,谈恒山. Cocktail法研究CYP450酶活性影响因素的探讨[J].中国医院药学杂志,2015,35(6):558.
- [4] 陈焯,袁瑾,王新宏,等.葛根苓连汤及不同配伍对肝细胞色素P450酶的影响[J].中成药,2013,35(8):1 593.
- [5] 曹秀珍,张伟,姚志红,等.甲基原藜蓂皂苷对人肝微粒体中7种CYP450酶活性的影响[J].沈阳药科大学学报,2008,25(11):914.
- [6] 陈尧,周宏灏.咖啡因体内代谢及其应用的研究进展[J].生理科学进展,2010,41(4):256.
- [7] 谢陶吟,陈荣,徐星凯.高效液相色谱法同时测定血浆中咖啡因和氯唑沙宗的浓度[J].药学与临床研究,2008,16(3):235.
- [8] 陈为烤,居文政,许黎君,等. CYP1A2、CYP2E1和CYP3A4探针间的药动学相互作用[J].中药新药与临床药理,2009,20(5):435.
- [9] 刘高峰,甄立棉,黄丽军. RP-HPLC法同时测定家兔体内氨苯砜、咖啡因和美托洛尔的含量[J].药物分析杂志,2010,30(12):2 263.
- [10] 张香凝,李想,刘高峰. RP-HPLC法同时测定大鼠血浆中4种CYP450探针药物的浓度[J].药物分析杂志,2012,32(11):1 903.
- [11] 候丛颂,杨志宏,孙晓波. LC-ESI-MS-MS法同时测定大鼠血浆中甲磺丁脲/4-羟基甲磺丁脲、氯唑沙宗及其药代动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12):144.
- [12] 胡道德,顾磊,姚慧娟,等.反相高效液相色谱法同时检测4种细胞色素P450探针药物[J].中国药学杂志,2010,45(1):71.
- [13] 王丹,刘萍霞,张振清,等. LC-MS/MS同时测定6种CYP450探针药物及快速评价小鼠CYP450同工酶活性[J].军事医学科学院院刊,2008,32(6):545.
- [14] 朱定姬,黄克建,林翠梧.固相萃取-高效液相色谱法对血液中唑吡坦及其两种羧酸代谢物的同时测定[J].分析测试学报,2010,29(1):22.
- [15] 郑仁达,洪冰.固相萃取反相高效液相色谱法测定人血浆中兰索拉唑的浓度[J].中国药房,2010,21(30):2 834.

(收稿日期:2015-03-01 修回日期:2015-07-03)

(编辑:邹雨娟)