

文章编号: 1005-8982(2011)05-652-03

## 反相高效液相色谱法同时测定人血清中茶碱和多索茶碱的浓度

毕津莲, 付成效, 李湘斌, 李卓

(南华大学第一附属医院 药剂科, 湖南 衡阳 421001)

**摘要:**目的 建立反相高效液相色谱法同时测定人血清中茶碱和多索茶碱浓度的分析方法。方法 血清样品加入咖啡因为内标, 三氯醋酸沉淀蛋白, 采用 Ultimate XB-C18(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 流动相为甲醇: 水=30:70, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 273 nm, 柱温为 30°C。结果 茶碱在 0.97~48.40 mg/L 范围内, 线性关系良好,  $r=0.9999$ ; 多索茶碱在 1.10~54.80 mg/L 范围内, 线性关系良好,  $r=0.9998$ 。日内精密度和日间精密度良好, 茶碱、多索茶碱的低、中、高 3 种浓度方法回收率分别为 6.01%、2.25%、0.86% 和 5.71%、2.02%、1.07%。结论 该法操作简便, 结果准确可靠, 可满足临床快速监测的需要。

**关键词:** 高效液相色谱法; 茶碱; 多索茶碱; 血清浓度

中图分类号: R965

文献标识码: B

## Simultaneous determination of theophylline and doxofylline concentration in human serum by RP-HPLC method

BI Jin-lian, FU Cheng-xiao, LI Xiang-bin, LI Zhuo

(Department of Pharmacy, the First Hospital Attached to Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, P.R.China)

**Abstract:**【Objective】To develop a new method for simultaneously determining theophylline and doxofylline in human serum by RP-HPLC. 【Methods】Trichloroacetic acid was used to precipitate the serum protein and the caffeine was used as internal standard. The separation was performed on Ultimate XB-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with methanol-water (30:70) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The wavelength for detection was 273 nm. The column temperature was 30°C. 【Results】The calibration curve of theophylline had good linearity between 0.97~48.40 mg/L,  $r=0.9999$ , and the calibration curve of doxofylline had good linearity between 1.10~54.80 mg/L,  $r=0.9998$ . The intra-day precision and inter-day precision were all good. The average recovery of low, medium, high concentration of theophylline were 6.01%, 2.25%, 0.86%, and the average recovery of low, medium, high concentration of doxofylline were 5.71%, 2.02%, 1.07%. 【Conclusion】This method is accurate, rapid, and simple. It can be used as a routine method by TDM.

**Key words:** HPLC; theophylline; doxofylline; serum concentration

氨茶碱 (aminofylline) 和多索茶碱<sup>[1]</sup> (doxofylline) 均为治疗支气管哮喘合并支气管痉挛的慢性阻塞性肺部疾病的黄嘌呤衍生物。前者是茶碱与乙二胺的复合物, 成盐后水溶性提高, 在体内释放出茶碱, 主要药理作用来自茶碱。茶碱血药浓度与临床疗

效、副作用及毒性关系密切, 需进行血药浓度监测。后者松弛支气管平滑肌痉挛的作用较氨茶碱强 10~15 倍, 并具有茶碱所没有的镇咳作用。因多索茶碱无腺苷受体阻断作用, 故与茶碱相比, 较少引起中枢、胃肠道及心血管等肺外系统的不良反应。但用药

收稿日期: 2010-01-08

[通信作者] 李湘斌, E-mail: lxb\_9428@sohu.com

过量可导致严重心律不齐及阵发性痉挛等,此表现为初期中毒症状,应暂停用药,监测血药浓度。本实验室曾采用氯仿与丙醇的混合溶剂提取,操作较烦琐,且对身体毒害较大。现改用三氯醋酸沉淀蛋白质后处理样品,测定血清中茶碱和多索茶碱浓度,方法快速、简便,效果令人满意。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

HP1100 型高效液相色谱仪,HP1100 色谱工作站,VWD 紫外检测器;光学读数分析天平(型号: TG328A);XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂),TGL-16B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);甲醇为色谱纯,水为自制纯化水;茶碱(中国药品生物制品检定所提供,批号为 100121-199903),多索茶碱(中国药品生物制品检定所提供,批号为 100625-200301),咖啡因对照品(由国家麻醉品实验室提供,批号为 1215-9503)。

### 1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Ultimate XB-C18(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇:水=30:70;流速:1.0 mL/min;紫外检测波长:273 nm;柱温:30℃。

1.2.2 工作液的配制 ①对照品工作液:精密称定 12.1 mg 茶碱和 13.7 mg 多索茶碱对照品至 25 mL 容量瓶中,用 30% 甲醇溶解,并稀释至刻度,分别配成 484 mg/L 的茶碱对照品与 548 mg/L 的多索茶碱对照品贮备液。②内标工作液:称取咖啡因 12.7 mL~100 mL 容量瓶中,用 30% 甲醇溶解,并稀释至刻度,配制成 127 mg/L 的内标溶液。

### 1.2.3 血清样品处理

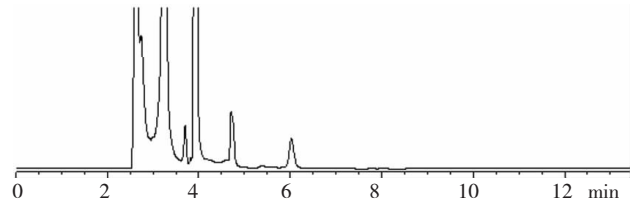
取血清样品 0.2 mL 置刻度离心管中,加入内标液 20 μL,充分摇匀,再加入 10% 三氯醋酸 0.1 mL,涡旋振荡 30 s,3 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,吸取滤液 20 μL 进样。

## 2 结果

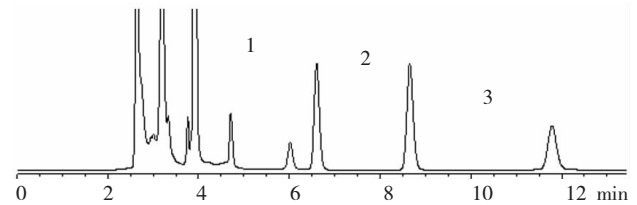
### 2.1 专属性考察

以“1.2.1”项下色谱条件,分别按“1.2.3”项下血清处理方法处理,得到空白血清、空白血清加对照品和内标、对照品和内标液、服用茶碱或多索茶碱药物的患者血清样品色谱图,见附图。

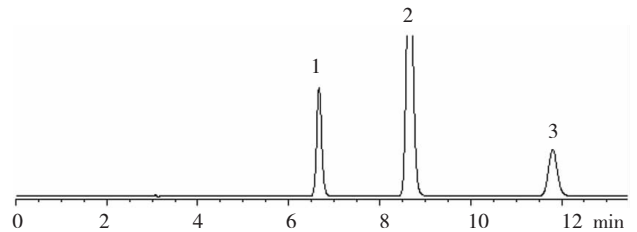
### 2.2 线性关系考察



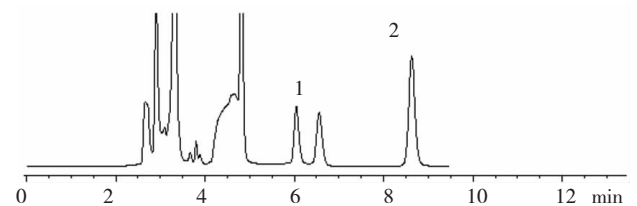
A 空白血清



B 空白血清加对照品和内标



C 对照品和内标液



D 患者血清

1:茶碱;2:咖啡因;3:多索茶碱

附图 血清中茶碱的高效液相色谱图

取 9 支刻度离心管,各加健康人血清 0.2 mL,分别加入不同系列浓度的茶碱/多索茶碱对照品液(9.68/10.96、19.36/21.92、48.40/54.8、96.80/109.60、161.30/182.70、193.60/219.20、290.40/328.80、387.20/438.40 和 484.0/548.0 mg/L)各 20 μL,混匀,配成含茶碱/多索茶碱浓度为(0.97/1.10、1.94/2.19、4.84/5.48、9.68/10.96、16.13/18.27、19.36/21.92、29.04/32.88、38.72/43.84 和 48.40/54.80 mg/L)9 份标准系列血样,按照血清样品处理项下进行处理,进样,以浓度(C)对样品和内标峰面积比(A)进行线性回归,计算标准曲线方程分别为:

茶碱: $A=0.0905C-0.0073$ , $r=0.9999$ ,线性范围为 0.97~48.40 mg/L。

多索茶碱: $A=0.0538C+0.0022$ , $r=0.9998$ ,线性范围为 1.10~54.80 mg/L。

以信噪比  $S/N=3:1$  计,茶碱、多索茶碱最低检测浓度分别为 0.48 mg/L 和 0.55 mg/L。

### 2.3 方法回收率和精密度试验

取空白血清和贮备液配制成茶碱 / 多索茶碱质量浓度为 1.94/2.19、9.68/10.96 和 29.04/32.88 mg/L 低、中、高 3 种浓度的质控样品,按照“2.3”项下血清

样品处理,进样,随标准曲线测定,于 1 d 内 5 次和连续 5 d 内分别考察其回收率和日内、日间 RSD,结果见表 1、2。

### 2.4 稳定性试验

取茶碱 / 多索茶碱质量浓度为 1.94/2.19、9.68/10.96 和 29.04/32.88 mg/L 低、中、高 3 种浓度的

表 1 茶碱方法回收率与精密度 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

质控浓度 / (mg/L)	方法回收率		日内精密度		日间精密度	
	平均实测浓度 / (mg/L)	RSD/%	平均实测浓度 / (mg/L)	RSD/%	平均实测浓度 / (mg/L)	RSD/%
1.94	1.83 ± 0.11	6.01	1.88 ± 0.11	5.85	1.96 ± 0.13	6.63
9.68	9.77 ± 0.22	2.25	9.71 ± 0.18	1.85	9.75 ± 0.29	2.97
29.04	28.91 ± 0.25	0.86	29.11 ± 0.31	1.06	29.08 ± 0.31	1.07

表 2 多索茶碱方法回收率与精密度 ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

质控浓度 / (mg/L)	方法回收率		日内精密度		日间精密度	
	平均实测浓度 / (mg/L)	RSD/%	平均实测浓度 / (mg/L)	RSD/%	平均实测浓度 / (mg/L)	RSD/%
2.19	2.10 ± 0.12	5.71	2.15 ± 0.09	4.19	2.21 ± 0.15	6.79
10.96	10.87 ± 0.22	2.02	10.98 ± 0.18	1.64	11.11 ± 0.29	2.61
32.88	32.75 ± 0.35	1.07	32.91 ± 0.65	1.98	32.93 ± 0.74	2.25

血清质控样品液,于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存,分别在 1、2 和 3 d 取出于  $37.5^{\circ}\text{C}$  水浴融化后,按照样品测定方法测定。结果其 RSD 均  $<10\%$ 。

### 2.5 样品测定

例 1,男,74 岁,临床诊断为慢性阻塞性肺疾病,氨茶碱静脉注射,0.25 g,1 次 /d,1 周后静脉抽血,测定血药浓度为 22.5 mg/L,患者有较严重的恶心,呕吐中毒症状。例 2,男,69 岁,临床诊断为慢性阻塞性肺疾病,多索茶碱,静脉注射,0.10 g,1 次 /d,1 周后静脉抽血,测定血药浓度为 5.1 mg/L。

## 3 讨论

本实验室曾采用氯仿 - 丙醇混合溶剂提取,使用氮气吹干提取液比较困难,且氯仿、丙醇对身体存在较大的毒性,另外,由于提取过程繁琐,操作一致性和稳定性相对较差。本方法样品处理只需加三氯醋酸直接沉淀蛋白,过滤后进样,操作简便。

大部分文献<sup>[2-5]</sup>报道,色谱流动相均使用盐溶液,本流动相中使用甲醇 - 水系统,减少了对仪器的损害。样品 30 min 内完成预处理,整个色谱过程在 13.5 min 内完成,耗时短,分离效果好。

国内外大部分文献<sup>[6-7]</sup>均未有明确的关于多索茶碱治疗浓度范围的报道,陈吉生等<sup>[8]</sup>研究发现,口服多索茶碱 400 mg,3 次 /d,达稳态血药浓度后,其血

药浓度基本在 5~20 mg/L 范围内。张莉等<sup>[9]</sup>根据建立的测定方法,对 20 例使用多索茶碱的患者进行研究,谷浓度为  $(2.0 \pm 0.7)$  mg/L,但仍无统一的标准。对多索茶碱的药理药效浓度进行研究,需有重大的突破。

在临床治疗上,为控制症状的急性发作,使用了多索茶碱片剂的患者有可能会同时使用茶碱注射剂,通过本方法可同时对患者体内 2 种药物的浓度进行测定,达到快速测定的目的。

### 参 考 文 献:

- [1] 贺金莲.茶碱类药物治疗哮喘作用评价[J].中国医院用药评价与分析,2008,8(3):176-177.
- [1] HE JL. Therapeutic effect of theophylline for asthma [J]. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospital of China, 2008, 8(3): 176-177. Chinese
- [2] 卢协勤,张会杰.HPLC 法测定茶碱血药浓度及其临床应用[J].湖北民族学院学报(医学版),2008,25(4):18-21.
- [2] LU XQ, ZHANG HJ. Determination of theophylline concentration in human serum by HPLC and clinical application[J]. Hubei Institute for Nationalities Medical Sciences, 2008, 25(4): 18-21. Chinese
- [3] 卢秋芹,杨水新.茶碱类药物的血药浓度监测方法与应用[J].福建医药杂志,2005,27(6):149-151.

(下转第 658 页)

干预对于患者远期再发病率有着重要意义;右心功能未完全失代偿前行 TVR 或 TVP 效果均肯定。由于本组病例数较少,对二尖瓣瓣膜置换术后远期 TI 的发生机制、外科治疗的方法仍需要进一步大样本的前瞻性研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] ANTUNES MJ, BARLOW JB. Management of tricuspid valve regurgitation[J]. *Heart*, 2007, 93: 271-276.
- [2] DREYFUS GD, CORBI PJ, CHAN KMJ, et al. Secondary tricuspid regurgitation or dilatation: which should be the criteria for surgical repair[J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 79: 127-132.
- [3] 侯晓彤,孟旭,李伟,等.左心系统瓣膜替换术后远期三尖瓣关闭不全的手术治疗效果[J].*中华医学杂志*,2005,85(47):3362-3364.
- [3] HOU XT, MENG X, LI W, et al. Effect of surgical treatment of tricuspid regurgitation late after valve replacement of left heart[J]. *National Medical Journal of China*, 2005, 85 (47): 3362-3364. Chinese
- [4] STULAK JM, SCHAFF HV, DEARANI JA, et al. Restoration of sinus rhythm by the Maze procedure halts progression of tricuspid regurgitation after mitral surgery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 86: 40-45.
- [5] PORTER A, SHAPIRA Y, WURZEL M, et al. Tricuspid regurgitation late after mitral valve replacement: clinical and echocardiographic evaluation[J]. *J Heart Valve Dis*, 1999, 1: 57-62.
- [6] SHIRAN A, SAGIE A. Tricuspid regurgitation in mitral valve disease incidence, prognostic implications, mechanism, and management[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(5): 401-408.
- [7] BIANCHI G, SOLINAS M, BEVILACQUA S, et al. Which patient undergoing mitral valve surgery should also have the tricuspid repair [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009, 9 (6): 1009-1020.
- [8] BARLOW JB. Aspects of tricuspid valve disease, heart failure and the "restriction dilatation syndrome" [J]. *Rev Port Cardiol*, 1995, 14: 991-1004.
- [9] KWON DA, PARK JS, CHANG HJ, et al. Prediction of outcome in patients undergoing surgery for severe tricuspid regurgitation following mitral valve surgery and role of tricuspid annular systolic velocity[J]. *Am J Cardiol*, 2006, 98: 659-606.
- [10] HADDAD F, HUNT SA, ROSENTHAL DN, et al. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle[J]. *Circulation*, 2008, 117: 1436-1448.
- [11] MORACA RJ, MOON MR, LAWTON JS, et al. Outcomes of tricuspid valve repair and replacement: a propensity analysis[J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87: 83-89.
- [12] MCCARTHY PM, BHUDIA SK, RAJESWARAN J, et al. Tricuspid valve repair: durability and risk factors for failure [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 127: 674-685.
- [13] CHANG BC, LIM SH, YI G, et al. Long-term clinical results of tricuspid valve replacement[J]. *Ann Thorac Surg*, 2006, 81(4): 1317-1323.

(申海菊 编辑)

(上接第 654 页)

- [3] KONG QQ, YANG SX. The application and monitoring methods of drugs concentrations of theophylline plasma [J]. *Fujian Journal of Medicine Concentrations*, 2005, 27(6): 149-151. Chinese
- [4] 阚全程,李朵璐,师秀琴.HPLC 测定慢性阻塞性肺疾病患者血清中多索茶碱浓度及其药动学研究 [J]. *药物分析杂志*,2009,29(5): 845-848.
- [4] KAN QC, LI DL, SHI XQ. Determination of serum concentrations of doxofylline and pharmacokinetic study in patients with chronic obstructive pulmonary disease by HPLC [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2009, 29(5): 845-848. Chinese
- [5] 徐彦贵,卜一珊,何振梅,等.RP-HPLC 法测定人血浆中多索茶碱浓度[J].*中国药师*,2002,5(8):467-469.
- [5] XU YG, BO YS, HE ZM. Determination of doxofylline concentration in plasma by RP-HPLC[J]. *China Pharmacist*, 2002, 5(8): 467-469. Chinese
- [6] 李丽,詹丽芬,梁再斌.多索茶碱的药理学研究概述[J].*国外医药:合成药生化药制剂分册*,2001,22(2):100-102.
- [6] LI L, ZHAN LF, LIANG ZB. Overview of pharmacology of doxofylline[J]. *Volume of Preparations in Foreign Pharmaceutical Synthetic Drugs*, 2001, 22(2): 100-102. Chinese
- [7] 顾健,张春燕,曹兆龙,等.多索茶碱片在中国人的药代动力学研究[J].*中国新药杂志*,2000,9(6):396-398.
- [7] GU J, ZHANG CY, CAO ZL. Pharmacokinetics of doxofylline tablets in chinese[J]. *New Drugs*, 2000, 9(6): 396-398. Chinese
- [8] 陈吉生,张亮.反相高效液相色谱法测定血浆中多索茶碱的浓度[J].*中国医院药学杂志*,2002,22(7):406-408.
- [8] CHEN JS, ZHANG L. RP-HPLC method for determination of doxofylline in plasma [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2002, 22(7): 406-408. Chinese
- [9] 张莉,张明香,徐兵,等.高效液相色谱法同时测定患者血清中茶碱和多索茶碱的浓度 [J]. *中国医院药学杂志*,2009,29(22): 1964-1965.
- [9] ZHANG L, ZHANG MX, XU B. RP-HPLC method for determination of doxofylline in plasma [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2009, 29(22): 1964-1965. Chinese

(申海菊 编辑)