

HPLC 法测定人血浆中多沙普仑的浓度

程佳 (沈阳药科大学 沈阳 110016) 夏东亚 郭涛 唐云彪 颜鸣 隋因 (沈阳军区总医院药剂科)

摘要 目的: 建立测定人血浆中多沙普仑浓度的 HPLC 法。方法: 血浆样品经液-液萃取处理后进行测定。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为室温; 流动相为磷酸二氢铵缓冲液(0.01 mol·L⁻¹, pH 4.5)-甲醇-乙腈(56:30:14); 流速为 1.3 ml·min⁻¹; 紫外检测波长为 214 nm; 内标为非那西丁。结果: 多沙普仑血药浓度在 0.05~5 μg·ml⁻¹ 范围内线性关系良好($r=0.999\ 0$); 提取回收率为 60.6%~64.0%; 日内 RSD 小于 6.5%, 日间 RSD 小于 13.4%。结论: 此方法操作简便, 灵敏, 准确, 适用于多沙普仑的临床药物动力学研究。

关键词 多沙普仑; 高效液相色谱法; 血药浓度

中图分类号: R917 文献标识码: A 1008-049X(2010)05-0618-02

Determination of Doxapram in Human Plasma by HPLC

Cheng Jia¹, Xia Dongya², Guo Tao², Tang Yunbiao², Yan Ming², Sui Yin² (1. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Department of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Region)

ABSTRACT Objective: To establish a RP-HPLC method for the determination of doxapram in human plasma. Method: The plasma sample was analyzed after liquid-liquid extraction. The Diamonsil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm) column was used with a mobile phase consisted of a mixture of 0.01 mol·L⁻¹ ammonium dihydrogen phosphate-methanol-acetonitrile(56:30:14). The flow rate was 1.3 ml·min⁻¹. The UV detector was set at 214 nm. The internal standard method was used to quantify doxapram. Result: The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 0.05 to 5 μg·ml⁻¹ ($r=0.999\ 0$). The extraction recoveries at different levels were between 60.6%~64.0%. The intra-day RSD were less than 6.5% and inter-day RSD were less than 13.4%. Conclusion: The method can be used for the pharmacokinetic study of doxapram.

KEY WORDS Doxapram; HPLC; Plasma concentration

多沙普仑为呼吸兴奋药, 小剂量时可刺激颈动脉窦化学感受器, 反射性地兴奋呼吸中枢; 大剂量时可直接兴奋延髓呼吸中枢、脊髓及脑干, 但对大脑皮层似无影响^[1]。该药作用强, 副作用较小, 安全范围较大, 适用于由药物引起的呼吸抑制及加速手术麻醉后的苏醒, 具有同麻醉性镇痛药合用不影响镇痛效果的特点^[2]。为开展多沙普仑在我国不同民族人群的药动学研究, 笔者建立了测定多沙普仑血浆药物浓度的 HPLC 法。

1 仪器与材料

Waters 600 高效液相色谱系统(包括 Waters 600 四元泵, 2487 型紫外检测器, N-2000 色谱工作站); YKH-2 型液体快速混合器(江西医疗器械厂); KQ3200DE 型超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司); TGL 型离心机(上海安亭科学仪器厂); AEL-160 电子分析天平(日本岛津公司)。

多沙普仑对照品(中国药品生物制品检定所, 含量: 98.5%, 批号 0068-9701); 内标非那西丁对照品(中国药品生物制品检定所, 含量: 99%); 盐酸多沙普仑注射液(江苏恩华药业股份有限公司, 规格: 5 ml/0.1 g, 批号 20090103); 甲醇、乙腈均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。空白人血浆(沈阳军区总医院输血科提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 流动相: 磷酸二氢铵缓冲液(0.01 mol·L⁻¹, pH 4.5)-甲醇-乙腈(56:30:14); 流速: 1.3 ml·min⁻¹; 紫外检测波长: 214 nm; 进样量: 20 μl。

2.2 对照品与内标溶液的配制

精密称取多沙普仑对照品 10.00 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 使成 1 mg·ml⁻¹ 的对照品溶液, -4℃ 保存备用。另精密称取非那西丁对照品 10.00 mg, 置于 10 ml 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 使成 1 mg·ml⁻¹ 的内标储备液, 用时取该储备液 1 ml, 置于 100 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 制成 10 μg·ml⁻¹ 的内标工作溶液, -4℃ 保存备用。

2.3 血浆样品预处理

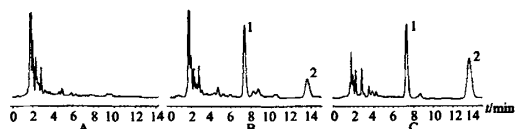
取血浆 0.5 ml, 置于具塞玻璃试管中, 加水 50 μl, 然后加入 10 μg·ml⁻¹ 的非那西丁 50 μl, 涡旋 30 s, 加入 pH 9.0 缓冲液 500 μl, 然后加入 3 ml 乙酸乙酯, 涡旋 1 min, 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。将上清液转移至另一试管, 于 40℃ 氮气流吹干, 加入 100 μl 流动相复溶, 20 μl 进样。

基金项目: 全军医学科学技术研究“十一五”计划科技攻关课题基金资助(编号: 06G023)

通讯作者: 郭涛 Tel: 024-23994860 E-mail: sy_guotao@263.net

2.4 方法专属性考察

在“2.1”项色谱条件下,多沙普仑和内标非那西丁分离良好,血中内源性杂质无干扰。非那西丁和多沙普仑的保留时间分别为7.4 min和13.6 min。色谱图见图1。



A. 空白血浆 B. 空白血浆+内标+多沙普仑对照品

C. 受试者用药后血浆+内标 1. 内标 2. 多沙普仑

图1 HPLC 色谱图

2.5 线性关系考察

取空白血浆0.5 ml,分别加入不同浓度的多沙普仑对照品溶液50 μ l,配制相当于含多沙普仑0.05,0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,5.0 μ g $\cdot$ ml⁻¹的血浆样品,按“2.3”项下“加入10 μ g $\cdot$ ml⁻¹的非那西丁50 μ l”起操作,进行HPLC分析。以多沙普仑的浓度为横坐标(X),多沙普仑与内标的峰面积比值为纵坐标(Y)。采用加权(1/C²)最小二乘法进行回归,得回归方程: $Y=1.264X-0.003$ ($n=3$), $r=0.9990$ 。结果表明,多沙普仑血药浓度在0.05~5 μ g $\cdot$ ml⁻¹范围内线性关系良好。定量下限为0.05 μ g $\cdot$ ml⁻¹。

2.6 精密度试验

取空白血浆0.5 ml,分别加入不同浓度的多沙普仑对照品溶液50 μ l,配制相当于0.1,0.5和4.0 μ g $\cdot$ ml⁻¹的质量控制(QC)样品,按“2.3”项下“加入10 μ g $\cdot$ ml⁻¹的非那西丁50 μ l”起操作,每一浓度测定5个样本,连续测定5 d,并与标准曲线同批测定,以当日的标准曲线计算QC样品的测得浓度,与配制的浓度对照,计算日内及日间精密度,结果低、中、高3种浓度的日内RSD分别为6.49%,3.73%,2.64%;日间RSD分别为8.69%,13.4%,6.50%。

2.7 提取回收率试验

配制“2.6”项下0.1,0.5和4.0 μ g $\cdot$ ml⁻¹的低、中、高3种浓度的QC样品,按“2.3”项下“加入10 μ g $\cdot$ ml⁻¹的非那西丁50 μ l”起操作,以测得的多沙普仑峰面积与相应浓度的多沙普仑溶液直接进样后的峰面积之比考察提取回收率,每一浓度测定5个样本。结果低、中、高3种浓度的多沙普仑的提取回收率分别为64.0%,60.6%和60.7%。

2.8 样品稳定性考察

取“2.6”项下0.1,0.5和4.0 μ g $\cdot$ ml⁻¹的低、中、高三种浓度的QC样品,分别考察其在室温(0、2、4、8 h)、冻融条件(反复冻融3次)和-20 $^{\circ}$ C冰冻条件(0、7、14、30 d)下保存的稳定性。结果表明,多沙普仑血浆样品在室温放置8 h,反复冻融3次和-20 $^{\circ}$ C冰冻30 d条件下是稳定的,RSD均小于10.3%。

2.9 应用

4名健康受试者(2男2女),经体检合格后,签署书面

知情同意书。试验方案经沈阳军区总医院医学伦理委员会批准。受试者试验前2周无用药史,3个月内未参加其他新药临床试验。试验当日,将50 mg盐酸多沙普仑注射液注入到100 ml生理盐水中,采用单次静脉滴注给药,滴注时间为30 min。于静脉滴注15 min及结束后0,0.08,0.25,0.5,1,2,3,4,6,8,11 h取上臂静脉血4.0 ml,置于肝素抗凝管中,离心取血浆,-20 $^{\circ}$ C冻存,待测。按“2.3”项下方法操作,进行测定。结果显示,标准曲线的定量范围能满足测定要求。平均血药浓度-时间曲线见图2。

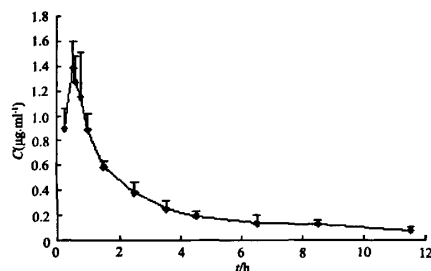


图2 4名健康受试者平均血药浓度-时间曲线

3 讨论

在波长的选择上,多沙普仑的紫外吸收光谱表明在252,258和264 nm处有最大吸收,但在这3个波长条件下,仪器响应值很低。结合文献^[3],选择末端吸收214 nm,响应值大大提高。

文献报道中,盐酸多沙普仑给药剂量和方式有1.0 mg $\cdot$ kg⁻¹肌肉注射或静脉推注^[4],本试验中于30 min恒速静脉滴注盐酸多沙普仑50 mg给药剂量较低,但经预试验证明,定量范围能满足血药浓度测定要求。

在提取方法上,曾试用甲醇、乙醚或高氯酸进行蛋白沉淀后直接进样,仪器响应值很低,不能满足测定要求。结合文献^[5],用pH 9.0缓冲液对血浆样品碱化后,用乙酸乙酯进行液-液萃取,提取回收率稳定,而且满足测定要求,可用于多沙普仑的临床药动力学研究。

参 考 文 献

- 戴林. MCDEX 药物临床信息参考[M]. 成都:四川科学技术出版社,2005. 992-993
- 张冬梅,赵梅蓝,涂继善. 多沙普仑的临床应用[J]. 宁夏医学院学报,1999, 21(3):231-232
- Azanda JV, Beharry K, Rex K, et al. High pressure liquid chromatographic microassay for simultaneous measurement of doxapram and its metabolites in premature newborn infants[J]. Journal of Chromatography, 1988, 11:2983-2991
- 王玉瑞,王玉红,邹原. 薄层扫描法检测血清中多沙普仑[J]. 中国医院药学杂志,1998,18(8):358-340
- Legati DF, Beaudry MA, Bradley JM. Simultaneous determination of doxapram and 2-ketodoxapram in plasma of neonates by gas chromatography[J]. Journal of chromatography, 1986, 378:478-481

(2009-12-07 收稿 2009-12-31 修回)

HPLC法测定人血浆中多沙普仑的浓度

作者: 程佳, 夏东亚, 郭涛, 唐云彪, 颜鸣, 隋因, Cheng Jia, Xia Dongya, Guo Tao, Tang Yunbiao, Yan Ming, Sui Yin
作者单位: 程佳, Cheng Jia (沈阳药科大学, 沈阳, 110016), 夏东亚, 郭涛, 唐云彪, 颜鸣, 隋因, Xia Dongya, Guo Tao, Tang Yunbiao, Yan Ming, Sui Yin (沈阳军区总医院药剂科)
刊名: 中国药师 
英文刊名: CHINA PHARMACIST
年, 卷(期): 2010, 13(5)
被引用次数: 1次

参考文献(5条)

1. Legatt DF; Beaudry MA; Bradly JM Simultaneous determination of doxapram and 2-ketodoxapram in plasma of neonates by gas chromatography [外文期刊] 1986
2. 王玉瑾; 王玉红; 邹原 薄层扫描法检测血清中多沙普仑 [期刊论文] - 中国医院药学杂志 1998(08)
3. Aranda JV; Beharry K; Rex K High pressure liquid chromatographic microassay for simultaneous measurement of doxapram and its metabolites in premature newborn infant 1988
4. 张冬梅; 赵梅蓝; 涂继善 多沙普仑的临床应用 [期刊论文] - 宁夏医学院学报 1999(03)
5. 戴林 MCDEX药物临床信息参考 2005

本文读者也读过(6条)

1. 颜鸣, 隋因, 郭涛, 赵庆春, Yan Ming, Sui Yin, Guo Tao, Zhao Qingchun 高效液相荧光法测定乙胺吡嗪利福异烟片中盐酸乙胺丁醇的含量 [期刊论文] - 中国药师 2010, 13(1)
2. 郭涛, 程佳, 夏东亚, 贾立辉, 颜鸣, 唐云彪, GUO Tao, CHENG Jia, XIA Dong-ya, JIA Li-hui, YAN Ming, TANG Yun-biao 盐酸多沙普仑在中国汉族健康人体内的药动学 [期刊论文] - 中国药物应用与监测 2010, 7(2)
3. 颜鸣, 郭涛, 周俭平, 隋因, YAN Ming, GUO Tao, ZHOU Jian-Ping, SUI Yin 硫酸沙丁胺醇脉冲片含量及有关物质的高效液相色谱法 [期刊论文] - 解放军药学学报 2009, 25(1)
4. 隋因, 郭涛, 颜鸣, 张景旺, 赵龙山, SUI Yin, GUO Tao, YAN Ming, ZHANG Jing-wang, ZHAO Long-shan 单剂量巴洛沙星片在健康人体的药代动力学 [期刊论文] - 中国临床药理学杂志 2008, 24(1)
5. 郭涛, 隋因, 孙沂, 李发美, 高声传, GUO Tao, SUI Yin, SUN Yi, LI Fa-mei, GAO Sheng-chuan 心舒口服液毛细管电泳指纹图谱的研究 [期刊论文] - 中草药 2006, 37(6)
6. 隋因, 郭涛, 张景旺, 唐云彪, 赵龙山, SUI Yin, GUO Tao, ZHANG Jing-wang, TANG Yun-biao, ZHAO Long-shan RP-HPLC荧光法测定人尿中巴洛沙星的含量 [期刊论文] - 沈阳药科大学学报 2007, 24(11)

引证文献(1条)

1. 夏东亚, 程佳, 郭涛, 杨长青 多沙普仑在中国朝鲜族和汉族健康人体的药代动力学 [期刊论文] - 中国临床药理学杂志 2010(12)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgys201005004.aspx