

人血浆中二羟丙茶碱的测定及临床应用

杨小敏 闫卫利 刘佳 杜犀

作者单位:300150 天津市,天津中医药大学第二附属医院实验中心

通讯作者:闫卫利, E-mail: yanweili163@126.com

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.02.014

二羟丙茶碱是平滑肌松弛药,有扩张支气管和冠状动脉及利尿的作用,其平喘作用比茶碱稍弱,心脏兴奋作用仅为氨茶碱的 1/20~1/10,对心脏和神经系统的影响较小,毒性低,在临床上已逐渐代替茶碱等,常用于治疗支气管哮喘、喘息型支气管炎、阻塞性肺气肿、心源性哮喘等,尤其适用于治疗伴有心动过速的哮喘患者^[1]。尽管该药的毒副作用较其他茶碱类药物轻,但是其在人体内的代谢却仍存在着明显的个体差异,用量过大或与其他药物(如黄嘌呤类、喹诺酮类抗生素等)合用也会造成危害。其不良反应类似茶碱,剂量过大时可出现恶心、呕吐、易激动、失眠、心动过速、心律失常,甚至可发生发热、脱水、惊厥等症状,严重的甚至引起呼吸、心跳骤停。目前对二羟丙茶碱血药浓度临床监测的相关文献报道很少。因此,本文建立检测人血浆中二羟丙茶碱药物浓度的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC),对 38 例临床患者的稳态血药浓度进行监测,探讨该方法对监测血药浓度的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2011 年 12 月至 2012 年 12 月服用二羟丙茶碱的临床患者 38 例,其中男 17 例,女 21 例,平均年龄(60.2±6.3)岁;严重肝肾功能异常者除外。二羟丙茶碱的给药方式主要为静脉滴注同时口服联合给药,静脉滴注为一天一次、每次 0.5 g;口服为一天三次、每次 0.2 g。取用药前静脉血考察其稳态血药浓度谷值,用药 3 d 后,取用药后半小时静脉血观察稳态血药浓度峰值。

1.2 仪器与试剂 美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪, VWD 紫外检测器;梅特勒-托利多 XS205DU 电子天平;XW-80A 型涡旋混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司);Centrifuge 5418 型高速台式离心机(德国 eppendorf 公司);N-EVAP 型氮吹仪(美国 Organoniation 公司)。二羟丙茶碱对照品(中国药品生物制品检定所,纯度>99%,批号 100417-200501),香草醛对照品(中国药品生物制品检定所,纯度>99%,批号 100491-200704),磷酸二氢钾(天津化学试剂批发公司,分析纯,20090902),甲醇(Fisher 公司,色谱纯,102100),乙腈(Fisher 公司,色谱纯),水为实验室自制去离子水(美国 Milli-

pore 公司,18.2 MΩ);空白健康人血浆及患者血浆样本由天津中医药大学第二附属医院提供。

2 方法

2.1 溶液配制 二羟丙茶碱对照品溶液(储备液):精密称取二羟丙茶碱对照品 12.60 mg,置于 25 ml 容量瓶中,加水溶解并定容,得浓度为 504 mg/L 的二羟丙茶碱对照品储备液,再用水稀释得到所需浓度的对照品溶液,4℃冷藏备用。

香草醛内标溶液:精密称取香草醛对照品 2.35 mg,置于 5 ml 容量瓶中,加水溶解并定容,得浓度为 470 mg/L 的内标对照品储备液,精密吸取 2.5 ml,置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,得 47 mg/L 的内标溶液,4℃冷藏备用。

2.2 血浆样品的处理 将已肝素化的全血样品于 4000 r/min 离心 10 min,取上层清液 200 μl 置于 1.5 ml eppendorf 管中,加入内标工作液 40 μl,涡旋 30 s,向血浆中加入 400 μl 乙腈,涡旋振荡 5 min 使蛋白质沉淀,然后于 14 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液于 eppendorf 管中,40℃水浴加热,氮气吹干,加入 0.1 ml 流动相复溶,涡旋 30 s,超声 3 min 后 14 000 r/min 离心 10 min,取上层清液 10 μl 进样。

2.3 色谱条件 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C18 柱(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相甲醇:水(内含 20 mmol/L 磷酸二氢钾)(20:80);流速 1.0 ml/min;检测波长 273 nm;柱温 25℃;进样量 10 μl。

在上述色谱条件下,取空白血浆按“2.2”项下方法处理后进样分析,结果表明血浆内源性物质对样品测定无干扰。空白血浆、加样血浆的色谱图见图 1。二羟丙茶碱、香草醛的保留时间分别约为 6.4 min、16.0 min,峰型良好,分离完全。

2.4 线性试验 分别精密吸取浓度为 151.2 mg/L、100.8 mg/L、75.6 mg/L、50.4 mg/L、25.2 mg/L、5.04 mg/L、2.52 mg/L 二羟丙茶碱对照品溶液 40 μl 加入到 200 μl 含内标的空白血浆中,混匀,配成浓度为 30.24 mg/L、20.16 mg/L、15.12 mg/L、10.08 mg/L、5.04 mg/L、1.008 mg/L、0.504 mg/L 的系列浓度对照品血浆,按“2.2”项下方法处理后进样分析。以二羟丙茶碱与香草醛的峰面积比值 Y 为纵坐标,二羟丙茶碱浓度 C 为横坐标,进行加权(1/x²)线性回归,得回归方程如下。

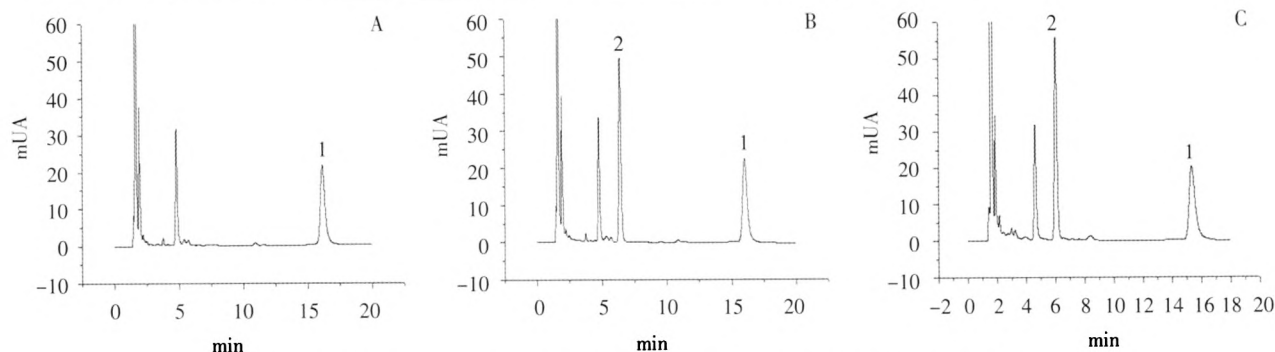


图 1 空白血浆(A)、加样血浆(B)及口服静脉联合给药患者(C)HPLC 色谱图

注:1 为内标香草醛;2 为二羟丙茶碱

$Y = 0.6229X + 0.003327, r = 0.9997 (n = 3)$ 。

2.5 精密度试验 分别精密吸取浓度为 151.2 mg/L、50.4 mg/L、5.04 mg/L 二羟丙茶碱对照品溶液 40 μ l 加入到 200 μ l 含内标的空白血浆中, 混匀, 配成浓度为 30.24 mg/L、10.08 mg/L、1.008 mg/L 的高、中、低三种浓度质控血浆, 按“2.2”项下方法处理后进样分析。分别于 1 d 内测定 6 次及连续 3 d 进行分析测定, 计算批内、批间精密度。

2.6 提取回收率试验 同上配制高、中、低浓度的质控血样, 各 3 份, 按“2.2”项下方法处理后进样测定, 以测定浓度与未经提取的相应浓度对照品溶液的峰面积比值计算得平均提取回收率。

2.7 稳定性试验 同上配制高、中、低浓度的质控血样, 各 3 份, 按“2.2”项下方法处理后, 分别在 1 h、3 h、6 h、24 h、1 w、1 个月和 3 个月测定, 另取同浓度上述质控血样于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存 24 h 后, 在 20~25 $^{\circ}$ C 室温条件下解冻, 反复冻融 3 次, 进行测定。

3 结果

3.1 血浆样品精密度及提取回收率试验 日内日间精密度良好, RSD 均小于 5%, 提取回收率在 92%~103% 范围内, 见表 1。

表 1 血浆样品精密度及提取回收率结果(%)

浓度(mg/L)	批内精密度 (n=6)	批间精密度 (n=6)	提取回收率 (n=3)
30.24	2.24	1.97	92.83 \pm 1.35
10.08	1.16	0.78	93.49 \pm 3.45
1.008	3.74	4.50	102.52 \pm 2.45

3.2 稳定性试验 质控样品经过长时间放置和反复冻融后的稳定性良好。见表 2。

3.3 患者样品二羟丙茶碱含量测定 经统计, 38 例患者稳

态血药浓度谷值为 (10.11 \pm 3.19) mg/L, 稳态血药浓度峰值为 (17.83 \pm 4.68) mg/L, 其中 4 例患者的稳态血药浓度峰值高于 20 mg/L, 5 例患者稳态血药浓度谷值低于 10 mg/L, 经过调整用药剂量后监测血药浓度, 达到临床有效浓度范围, 临床疗效良好。见表 3~表 5。

表 3 患者血药浓度结果(mg/L)

血药浓度	稳态血药浓度峰值	稳态血药浓度谷值
测得的血药浓度范围	12.86~22.51	6.29~14.20
平均血药浓度	17.83 \pm 4.68	10.11 \pm 3.19

4 讨论

本文通过方法学确证实验可以得出, 该检测方法检测血浆中二羟丙茶碱在 0.5~30.0 mg/L 浓度范围内线性关系良好, 最低定量限为 0.5 mg/L。提取回收率在 92%~103% 范围内。日内日间精密度良好, RSD 均小于 5%。血浆样品在经过常温及冷冻放置后, 其结果均在零时测定值的 \pm 5% 以内^[2], 稳定性良好。依据 SFDA《化学药物临床药代动力学研究技术指导原则》^[3]及《化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则》^[4], 该方法方法学可靠, 适合临床应用。

文献^[5]曾报道应用氯仿、异丙醇等液液萃取法提取血浆样品中的二羟丙茶碱, 本文研究采用乙腈沉淀蛋白的方法对血浆样品进行预处理, 方法简便, 回收率高且稳定。通过加样回收和实际临床样品的测定表明, 血浆内源性物质均不影响药物和内标的测定。曾有文献^[6,7]报道, 茶碱类药物的血药浓度监测采用咖啡因或苯巴比妥等物质作为内标, 笔者认为不妥, 因为此类物质都属药物成分, 服用后影响测定。本文选用香草醛作为内标, 价廉易得, 且不属于药物, 避免联合用药影响测定。

从临床患者稳态血药浓度谷值 (10.11 \pm 3.19) mg/L 和稳态血药浓度峰值 (17.83 \pm 4.68) mg/L 统计结果可以看出, 所有

表 2 血浆样品稳定性结果(n=3, %)

质控样品(mg/L)	1 h	3 h	6 h	24 h	1 w	1 个月	3 个月	冻融 3 次
1.008	99.34	99.96	102.69	100.50	99.46	104.22	100.54	102.14
10.08	99.36	100.05	102.59	97.80	98.10	104.32	101.21	98.52
30.24	98.36	101.19	103.50	99.65	103.05	101.59	98.75	102.59

表 4 峰值超出有效浓度范围的患者调整给药剂量前后血药浓度结果(mg/L)

血药浓度	患者编号							
	1#		2#		3#		4#	
	峰值	谷值	峰值	谷值	峰值	谷值	峰值	谷值
剂量调整前	20.59	13.28	21.08	12.96	20.22	14.20	22.51	13.55
剂量调整后	18.48	11.52	19.22	10.89	17.45	11.10	19.53	13.28

表 5 谷值低于有效浓度范围的患者调整给药剂量前后血药浓度结果(mg/L)

血药浓度	患者编号									
	1#		2#		3#		4#		5#	
	峰值	谷值	峰值	谷值	峰值	谷值	峰值	谷值	峰值	谷值
剂量调整前	14.96	6.88	15.38	6.29	12.86	7.48	15.44	8.56	16.03	9.21
剂量调整后	16.48	10.03	17.22	11.23	16.80	10.64	18.32	11.07	18.68	12.14

患者静脉口服联合给药达稳态后基本与文献^[5]的 10~20 mg/L 有效治疗浓度相一致,说明该给药剂量和方式能基本满足临床患者的需求。检测中发现,有 5 例患者稳态血药浓度谷值低于 10 mg/L,经过剂量调整后达到有效治疗浓度范围,疗效明显改善;4 例患者的稳态血药浓度峰值超过了 20 mg/L,其中观察到 2 例不良反应,分别为:窦性心动过速,调整剂量后症状消失;亢奋,调整剂量后得到缓解。另在观察中发现有 1 例伴有前列腺增生的男性患者虽稳态血药浓度峰值(17.52 mg/L)未超出有效治疗浓度范围,但出现尿潴留现象,这可能与茶碱类药物增加肾脏血流作用有关,从而引起尿量增加,但其前列腺增生导致排尿不畅,在给予对症治疗后得到改善。曾有文献^[8-10]报道,哮喘患者给予二羟丙茶碱治疗后出现过敏、快速型房颤等不良反应,在本文研究中未有此类情况发生。

本文通过人血浆中二羟丙茶碱测定的方法学确证,说明该方法符合生物样品的分析要求,操作简单、快速、准确、精密度好。二羟丙茶碱做为氨茶碱的替代药物,目前是临床用于治疗哮喘的常用药,由于其不良反应较氨茶碱为轻,临床常常忽略对其进行必要的药物浓度监测。我们通过初步的临床患者的稳态血药浓度测定及临床疗效、不良反应观察,认为监测二羟丙茶碱的血药浓度并结合临床及时调整用药剂

量以达到给药方案个体化还是很有必要的,尤其是对于合并其他一些疾病的患者。

5 参考文献

- 1 戴威,吴伟波.氨茶碱针与二羟丙茶碱针治疗支气管哮喘疗效比较. 海峡药学,2008,20:94-95.
- 2 李好枝.体内药物分析.第一版.北京:人民卫生出版社,2008,60.
- 3 国家食品药品监督管理局.化学药物临床药代动力学研究技术指导原则.2005.
- 4 国家食品药品监督管理局.化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则.2005.
- 5 陈秀兰,蔡乾铭,伦踪启.反相高效液相色谱法测定喘定血药浓度方法的研究.中国人民解放军军医进修学院学报,1990,01:86.
- 6 刘奕芳,沈维敏,沈杰,等.人血浆中茶碱和多索茶碱的 HPLC 法测定.中国医药工业杂志,2010,41:131-133.
- 7 林玳,郑怀宇.反相高效液相色谱法测定多索茶碱血浓度.药物研究,2010,19:15-16.
- 8 颜明.二羟丙茶碱致过敏 1 例.海军医学杂志,2004,25:117.
- 9 王泽华,陈燕,周义惠.肌肉注射二羟丙茶碱过敏反应 1 例的治疗及护理.现代医药卫生,2008,24:1394.
- 10 魏永春.常规量二羟丙茶碱致心房纤颤 1 例.中国现代医学杂志,2000,12:27.

(收稿日期:2013-03-01)

(本文编辑:陈淑莲)

(上接第 111 页)

21 Whiteley W, Jackson C, Lewis S, et al. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. PLoS Med, 2009, 6: e1000145.

22 Brunetti M, Pregno S, Schünemann H, et al. Economic evidence in decision-making process in laboratory medicine. Clin Chem Lab Med, 2011, 49: 617-621.

(收稿日期:2013-03-01)

(本文编辑:杨军)