

高效液相色谱荧光检测法测定人血浆中多沙唑啉的浓度

阮邹荣, 袁虹, 孙凌

(浙江大学医学院附属第二医院临床药理室, 杭州 310009)

摘要 目的: 建立人血浆中多沙唑啉浓度的高效液相色谱-荧光检测方法。方法: 以特拉唑啉为内标。血浆样品经碱化后用乙醚萃取。采用 Supelcosil ABZ+ PLUS C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 20 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液-乙腈 (67:33) 为流动相, 流速为 1.20 mL·min⁻¹, 荧光检测波长为 λ_{ex} = 335 nm, λ_{em} = 390 nm, 进样量为 50 μL。结果: 在 1.0~50.0 μg·L⁻¹ 浓度范围内, 测定方法具有良好的线性关系, 线性方程为: $A = 0.1639C - 0.0253$ ($r = 0.9998$), 准确度和精密度符合生物样品分析要求, 最低定量浓度为 1.0 μg·L⁻¹。结论: 本测定方法具灵敏度高、准确和快速的优点, 可用于甲磺酸多沙唑啉人体药代动力学和生物等效性研究。

关键词: 多沙唑啉; 血药浓度; 高效液相色谱法; 荧光检测

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0229-04

HPLC determination of doxazosin in human plasma with fluorescence detection

RUAN Zou-rong YUAN Hong SUN Ling

(Division of Clinical Pharmacology, Second Affiliated Hospital School of Medicine Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

Abstract Objective To establish a simple, sensitive and rapid RP-HPLC with fluorescence detection method for determination of doxazosin in human plasma. **Methods** Terazosin was used as the internal standard. The plasma samples were extracted with ether. The solvent was evaporated to dryness at 40 °C in water bath. The Supelcosil ABZ + PLUS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used analytical column. The mobile phase consisted of 20 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogenphosphate solution-acetonitrile (67:33) with a flow rate of 1.20 mL·min⁻¹. The fluorescence detector were set at λ_{ex} = 335 nm, λ_{em} = 390 nm. The injection volume was 50 μL. **Results** A good linear relationship was obtained between the peak area ratio of doxazosin/terazosin and the concentration of doxazosin over the range of 1.0 to 50.0 μg·L⁻¹. The linear equation was $A = 0.1639C - 0.0253$ ($r = 0.9998$). The limit of quantitative concentration was 1.0 μg·L⁻¹. **Conclusion** The method is sensitive, accurate and simple for the determination of doxazosin in human plasma. It is suitable for the pharmacokinetic and bioequivalence studies of doxazosin in human.

Key words doxazosin; plasma drug concentration; HPLC; fluorescence detection

甲磺酸多沙唑啉 (doxazosin mesilate) 为喹唑啉衍生物, 具高度选择性 (α₁-肾上腺素能受体拮抗作用, 其降压作用与哌唑啉相似, 但持续时间较长, 能维持 24 h 以上, 每日只需给药 1 次; 具有调节血脂的作用, 可降低血总胆固醇和低密度脂蛋白, 提高高密度脂蛋白; 能抑制去甲肾上腺素所致的前列腺组织痉挛, 从而可以改善前列腺肥大患者的尿流动力学及临床症状。临床上主要用于轻中度原发性高

血压和良性前列腺增生的治疗。本品与其他 α₁-肾上腺素能受体阻滞药相比, 不良反应发生率低、程度轻, 具有良好的耐受性^[1-3]。多沙唑啉血药浓度的测定方法国内报道的为 HPLC-紫外检测法^[3], 但其检测的灵敏度低, 不适用于人体药动力学研究; 国外文献报道的有 RP-HPLC 荧光测定法^[4-6], 但方法样品处理烦琐, 操作复杂, 费时且灵敏度低。为开展甲磺酸多沙唑啉在我国人体的药代动力学研究及其制剂的生物利用度试验, 本文建立了一种灵敏、准

确、简便快速测定血浆中多沙唑嗪含量的 RP-HPLC 荧光检测法, 并将此法应用于健康志愿者口服甲磺酸多沙唑嗪片剂的药代动力学研究。

1 仪器与试剂

美国 Beckman HPLC 仪 (125 型泵, 7725 i 型进样阀); 日本 Shimadzu RF-535 型荧光检测器; Beckman Gold system 色谱数据处理系统, HP 5-166 计算机; XW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); 80-2 离心机 (上海手术器械厂); PHS-9V 型酸度计 (杭州华光无线电厂); 电热恒温水浴锅 (江苏省医疗器械厂); 可调微量吸液器 (SOCOREX, Switzerland)。

多沙唑嗪对照品 (纯度: 99.2%, 批号: 970502, 上海中华制药厂提供), 内标特拉唑嗪对照品 (纯度: 99.7%, 批号: 970807) 由中国科学院上海生理研究所提供。甲醇和乙腈 (HPLC 级, 美国 Fisher 公司); 乙醚、磷酸二氢钾、磷酸和氢氧化钠均为国产市售分析纯试剂; 自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Supelcosil ABZ+ PLUS C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (Supelco Inc, U. S. A.); 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 3.50) - 乙腈 (67:33), 流速为 1.20 mL·min⁻¹, 荧光检测波长 λ_{ex} 为 335 nm, λ_m 为 390 nm, 进样量为 50 μL。

2.2 溶液的配制 精密称取多沙唑嗪对照品 10 mg 用甲醇溶解在 100 mL 量瓶中, 配制成 0.1 g·L⁻¹ 的对照品储备液, 用甲醇稀释成各种浓度的多沙唑嗪对照品溶液; 精密称取内标特拉唑嗪 10 mg 用甲醇溶解在 100 mL 量瓶配制成 0.1 g·L⁻¹ 的内标储备液, 用甲醇稀释得浓度为 50 μg·L⁻¹ 的溶液作为内标溶液。

2.3 样品预处理

血浆 0.50 mL, 加内标溶液 0.10 mL (50 μg·L⁻¹), 加 2.00 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 0.10 mL, 混匀, 加乙醚 5.00 mL, 振摇 2 min, 离心 (4000 r·min⁻¹) 5 min, 吸取上层有机相 4.50 mL 于 10 mL 尖底离心管中, 40 °C 水浴中蒸干后, 加入 100 μL 流动相溶解, 取 50 μL 进样。

在本文的色谱条件下, 多沙唑嗪和内标与血浆中的杂质分离较好, 保留时间 (t_R) 分别为 2.4 5.5 min, 血浆中的杂质及代谢产物均不干扰分析测定, 空白血浆、多沙唑嗪加入空白血浆和血浆样品的色谱图见图 1。

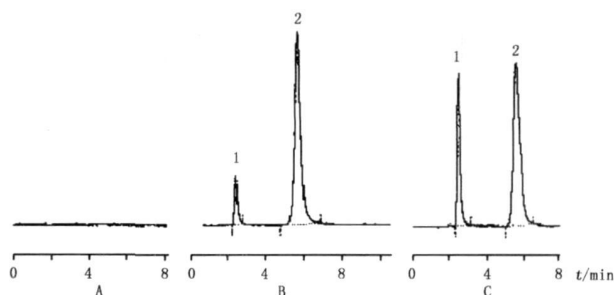


图 1 人血浆中多沙唑嗪色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of doxazosin in human plasma

A. 空白血浆 (blank human plasma) B. 20 μg·L⁻¹ 多沙唑嗪和 5 μg·L⁻¹ 内标在空白血浆中 (20 μg·L⁻¹ doxazosin and 5 μg·L⁻¹ internal standard in blank plasma) C. 受试者口服 2 mg 甲磺酸多沙唑嗪片剂后 1 h 的血浆样品 (plasma sample of volunteer 1 h after oral administration of 2 mg doxazosin tablets)

1 内标 (internal standard) 2 多沙唑嗪 (doxazosin)

2.4 标准曲线与线性范围 用空白血浆配制多沙唑嗪浓度为 1.0 2.0 5.0 10.0 20.0 50.0 μg·L⁻¹ 的对照品血浆, 按“2.3”项下方法操作, 在上述色谱条件下测定多沙唑嗪的峰面积。以浓度 C (μg·L⁻¹) 为横坐标, 多沙唑嗪与内标的峰面积比值 A 为纵坐标, 线性回归后, 回归方程为:

$$A = 0.1639C - 0.0253 \quad r = 0.9998 (n = 4)$$

表明在 1.0~50.0 μg·L⁻¹ 浓度范围线性关系良好。血浆中多沙唑嗪的最低检测浓度为 0.5 μg·L⁻¹ (以信噪比 ≥3 计), 最低定量浓度为 1.0 μg·L⁻¹。

2.5 回收率和精密度试验 在多沙唑嗪浓度为 1.0~50.0 μg·L⁻¹ 范围内, 方法回收率为 90.0%~105.0%。以 1.0, 10.0, 50.0 μg·L⁻¹ 3 种浓度进行日内测定和日间测定, 结果见表 1。对多沙唑嗪浓度为 1.0 10.0 50.0 μg·L⁻¹ 的对照品血浆按上述测定方法测定 3 次, 平均峰面积与多沙唑嗪储备液用流动相稀释成相同浓度直接进样的峰面积比较, 求得多沙唑嗪的萃取回收率分别为 88.2%, 90.0%, 86.5%。

2.6 稳定性试验 取空白血浆精密加入多沙唑嗪储备液, 用甲醇制成浓度为 1.0 10.0 50.0 μg·L⁻¹ 的对照品血浆, 置 -20 °C 条件存放, 于第 7, 14, 30 d 冻融后, 按“2.3”项下方法操作进行测定, 计算多沙唑嗪的浓度, 并与第 1 d 的测定值比较, 结果测定值偏差均小于 10%, 表明样品在 -20 °C 条件存放稳定性较好。

表 1 HPLC法测定血浆中多沙唑嗪的方法回收率和精密度 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Tab 1 The recovery and precision of doxazosin in plasma by HPLC method

加入值 (added) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	日内 (within-day)			日间 (between-day)		
	测定值 (measured) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 (recovery) %	RSD %	测定值 (measured) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回收率 (recovery) %	RSD %
1.00	1.09 \pm 0.03	109.0	5.6	1.14 \pm 0.13	114.0	12.6
10.00	9.79 \pm 0.58	97.9	6.9	9.44 \pm 0.72	94.4	8.7
50.00	48.37 \pm 1.92	96.7	5.8	47.13 \pm 2.90	94.3	7.3

2.7 方法应用

12名男性健康志愿者禁食 12 h后空腹口服甲磺酸多沙唑嗪片剂 1片 (2 mg), 于服药前和服药后 0.5Q 1.0 1.5 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 12.0 24.0 48.0 72.0 h 取上臂静脉血每次 3.0 mL, 用 EDTA 钾抗凝, 静止后离心分离出血浆, 用本法测定服药后血浆中多沙唑嗪浓度。12名健康志愿者空腹口服多沙唑嗪片剂 2 mg后的平均血药浓度 - 时间曲线见图 2。

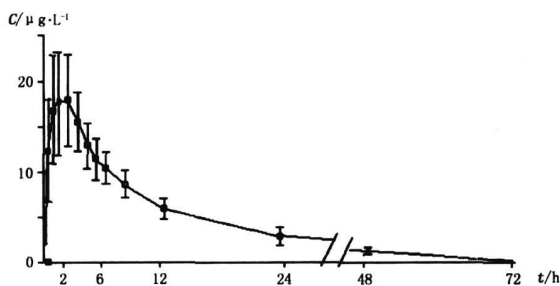


图 2 12名健康志愿者口服 2 mg甲磺酸多沙唑嗪片剂后的血药浓度 - 时间曲线

Fig 2 Mean drug plasma concentration-time curve of doxazosin in 12 healthy volunteers after oral administration of 2 mg doxazosin mesilate tablets

12名中国健康人单剂量口服多沙唑嗪片剂 2 mg的药时曲线符合线性一级动力学二室模型, 从图 2中可知, 12名健康志愿者的血药浓度经时变化趋势基本相似, 口服后吸收较慢, 达峰浓度时间为 2 h左右, 消除半衰期较长, 由此表明多沙唑嗪在中国人中药理作用起效较慢, 维持作用时间较长。

3 讨论

本文采用了 ABZ + PIUS ODS C₁₈ 色谱柱, 20 mmol·L⁻¹磷酸钾二氢缓冲液 (pH 3.50) - 乙腈 (67:33) 作为流动相, 多沙唑嗪和同是啞啞啞衍生物的内标特拉唑嗪分离完全, 峰形好, 进样后分析时间短, 在 8 min内就可完成测定。国外文献报道^[5]用甲醇和戊烷磺酸钠作为流动相, 但色谱峰拖尾严重, 加入四丁基氢氧化铵后峰形改善。实验中我们发现, 用甲醇、戊烷磺酸钠和四丁基氢氧化铵作为流动

相, 对柱效影响很大, 降低色谱柱使用寿命, 用 20 mmol·L⁻¹的磷酸二氢钾缓冲液和乙腈用作流动相, 不必添加四丁基氢氧化铵就可得到较好的峰形和色谱图。有机相采用乙腈与甲醇相比分离好、用量比例低、出峰快, 且柱压较低。

国外文献^[4-6]多采用二氯甲烷和混合溶剂提取, 且一般分 2次提取, 操作烦琐、复杂, 回收率低和重复性差。本实验分别采用二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷与乙醚混合溶剂等有机溶剂在碱性条件下提取血浆中的多沙唑嗪和内标, 经考察, 以乙醚为最好, 因乙醚 1次提取基本完全, 低毒价廉, 无乳化现象, 血浆中内源性杂质提取较少, 挥干时温度低且较快, 操作简便。

本文多沙唑嗪在酸性 (pH 3.5) 流动相溶液中进行荧光光谱扫描, 选择荧光检测波长为 λ_{ex} 为 335 nm, λ_{em} 为 390 nm。与国外文献报道^[5]的 $\lambda_{ex} = 254$ nm, $\lambda_{em} = 360$ nm 相比, 血浆中杂质干扰小, 检测灵敏度高。

本文建立的测定血浆中多沙唑嗪的 RP-HPLC 荧光检测法与国外文献报道的测定方法^[4-6]相比, 具有样品用量少、灵敏度高、准确性和精密度好、操作简单等特点, 可满足多沙唑嗪人体的药代动力学和制剂的生物利用度研究。

参考文献

- Fulton B W, agstaff A J, Sorkin EM. Doxazosin: an update of its clinical pharmacology and therapeutic applications in hypertension and benign prostatic hyperplasia *Drugs* 1995; 49(2): 295
- Goldschmidt DR, Plosker GL. Doxazosin: gastro intestinal therapeutic system: a review of its use in benign prostatic hyperplasia *Drugs* 2005; 65(14): 2037
- CHEN Zhi-qiong(陈志琼), YU Yu(余瑜), LI Long-jiang(李龙江). Determination of doxazosin in plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography(反相高效液相色谱法测定血浆中多沙唑嗪). *J Southwest China Normal Univ* (西南师范大学学报), 2005, 30(6): 1066
- Andersen M, Dahstrand C, Hoyer K. Double-blind trial of the efficacy and tolerability of doxazosin in the gastro intestinal therapeutic sys-

- tem, doxazosin standard, and placebo in patients with benign prostatic hyperplasia *Eur Urol*, 2000, 38(4): 400
- 5 Conrad KA, Fagan TC, Mackie MJ *et al* Doxazosin in patients with hypertension *Eur J Clin Pharmacol* 1988, 35(1): 21
- 6 Rubin PC, Brunton JM, Meredith PA. Determination of the vasodilator UK 33274 by HPLC using fluorescence detection *J Chromatogr*, 1980, 221(2): 193
- 7 Cowlishaw MG, Shamam JR. Doxazosin determination by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection *J Chromatogr*, 1985, 344(2): 403
- 8 Fouda HG, Twomey TM, Schneider RP. Liquid chromatographic analysis of doxazosin in human serum with manual and robotic sample preparation. *J Chromatogr Sci*, 1988, 26(11): 570

(本文于 2009 年 1 月 15 日修改回)

热分析在药物及药用材料中的应用学术研讨会会议通知

随着现代科学仪器的发展,热分析在药物及药用材料领域中的应用越来越广泛,中国药典、日本药局方、美国药典、英国药典 2009 年版均收录了热分析方法。在化学药物、生化药物、抗生素、中药化学、药物包装材料、药物质量评价、新药研究中处方筛选及有关制剂的质量分析等方面,热分析法都起着非常重要的作用。为此,药物分析杂志编委会定于 2009 年第四季度在苏州召开全国药物分析及药用材料热分析法学术研讨会。此次会议由江苏省热分析专业委员会协办,会上拟请有关专家作专题报告,并开展有关专题讨论。现将会议征文及有关事宜通知如下:

一、征文内容

热分析法在药物研究中的应用;热分析法在药物检验中的应用;热分析法在化学药物、生化药物、抗生素、中药化学及对照品、标准品中的应用;在药物制剂、药用辅料及药物包装材料中的应用;热分析仪器最新进展。

二、论文撰稿要求

1. 论文应是未公开发表的。综述文章一般不超过 5000 字;研究论文一般不超过 3000 字;每篇文章需附 800 字摘要。投稿时请发 E-mail 至本刊信箱。
2. 论文格式请按药物分析杂志 2009 年第一期稿约要求书写;稿件可打印在 A4 上。
3. 每篇稿件需附单位介绍信及 50 元稿件处理费。
4. 征文截止日期 2009 年 8 月 30 日(以邮戳为准)。
5. 论文将在 2009 年药物分析论坛上进行交流,经专家审定后在本刊发表,并酌收版面费。

三、投稿方式及联系人

1. 邮寄:邮编 100050,地址:北京天坛西里 2 号中国药品生物制品检定所内药物分析杂志编辑部
2. 网址:<http://www.ywfxzz.cn>
3. E-mail: ywfxzz@126.com; ywfx@nicpbp.org.cn
4. 电话:(010)67095201;传真:(010)67012819;联系人:刘小帅
5. 来稿应注明“会议征文”字样,以便与其他投稿区别,谢谢合作

药物分析杂志编辑部

2009 年 2 月 1 日