

RP-HPLC 法测定人血清中地高辛浓度

阳 波,李湘斌

(南华大学 第一附属医院 药剂科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 建立测定人血清中地高辛浓度测定的方法。**方法** 将血清酸化,用丙醇:氯仿(1:5)萃取 2 次,吹干萃取液,残渣用流动相溶解,采用高效液相色谱法测定,色谱柱:Hypersil ODS C18 柱(250 mm×4.0 mm, 5 μm),流动相:甲醇:水(60:40),检测波长:220 nm。**结果** 地高辛浓度在 0.35~2.35 ng/mL 范围内,地高辛和内标的峰面积比与浓度呈现良好线性关系($r=0.9958$),平均回收率 103.2%~106.4%,日内和日间精密度 RSD<7.5% ($n=5$)。**结论** 该方法快速、简便、准确,适合于临床血药浓度监测。

关键词: 反相高效液相色谱法; 地高辛; 血清浓度

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

文章编号:2095-1116(2011)01-0114-03

Determination of Digoxin in Serum by RP-HPLC

YANG Bo, LI Xiang-bin

(*Department of Pharmacy, the First Hospital Attached to University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China*)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of Digoxin in serum. **Methods** The samples were acidified at first, then extracted twice by propyl alcohol- chloroform (5:1), and the extraction were blew to dry, the leavings were dissolved by the mobile phase at last. With determination by RP-HPLC, analytical column was Hypersil ODS C18 (250×4.0 mm, 5 μm), the mobile phase was consisted of methanol-water (60:40), detected at wavelength 220 nm.

Results The linear rang of Digoxin was 0.35~2.35ng/mL. The mean relative recovery arranged from 103.2% to 106.4%. The relative standard deviation of within day and between day were all less than 7.5% ($n=5$). **Conclusion** This method is found to be rapid, accurate, sensitive and more suitable for clinical TDM.

Key words: RP-HPLC; digoxin; the consistence of serum

地高辛(digoxin, DIG)是临床上治疗心衰的常用药物,其作用机制复杂、药效强、治疗剂量很接近中毒剂量,用量不足与剂量偏高的临床表现很相似,且个体差异大,所以临床需要监测其血药浓度。经过文献检索,国内报道了 FPIA、RIA、EMIT 等方法检测地高辛血药浓度^[1,2],国外文献报道了 HPLC-ISP-MS、CE、HPLC 结合免疫分析、柱前荧光衍生 RP-HPLC^[3~7]等方法,RP-HPLC 法直接测定人血清中地高辛浓度的方法尚未见报道。本文建立了一种简便、快速、准确的方法,直接测定血浆中 DIG 的浓度。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪;VWD 紫外检测器。岛津 UV-1601 紫外可见分光光度计。DIG 对照品:中国药品生物制品检定所,编号 10015-0007;甲地高辛(Metildigoxin, MD)对照品:中国药品生物制品检定所,编号 10036-9901;甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 确定检测波长 将适量的 DIG 溶于 60% 的甲醇溶液中,在 200 ~ 300 nm 的范围内进行紫外光谱扫描,结果见图 1,发现 DIG 在波长 220 nm 处有最大吸收,而 MD 在 218 nm 有最大吸收^[8],因此,以 220 nm 为检测波长。

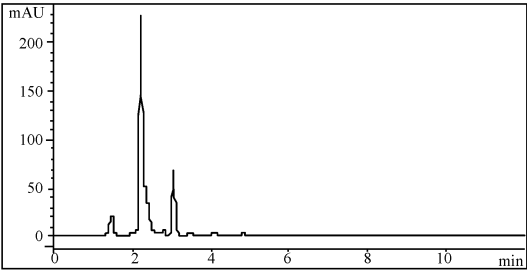


图 2 空白血浆色谱图

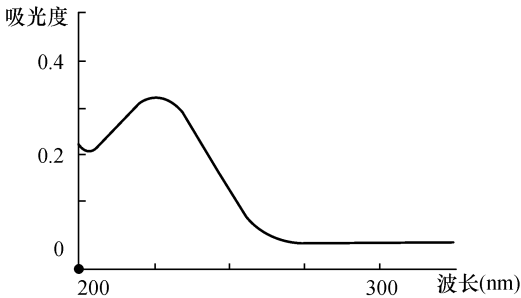


图 1 DIG 紫外光谱图

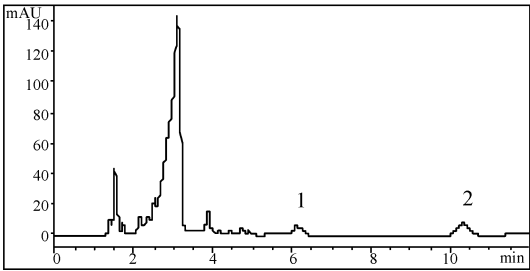


图 3 含药血浆色谱图

(1: DIG, 6.18 min; 2: 内标 MD, 10.41 min)

1.2.2 色谱条件 HYPERSIL ODS C18 柱(250 mm × 4.0 mm, 5 μm);流动相:甲醇:水(60:40);流速:1.0 mL/min,检测波长:220 nm。

1.2.3 溶液配制 标准贮备液:精密称取 DIG 适量,溶于甲醇溶液(60:40)中,配成 94 ng/mL 的浓度;内标溶液:精密称取 MD 适量,溶于甲醇溶液中,配成 48 ng/mL 的浓度;提取液:丙醇:氯仿(1:5)。

1.2.4 样品处理 取血浆 500 μL,加入内标液 10 μL,充分混合均匀,加 1 mol/L 硫酸溶液 100 μL,然后加提取液 2 mL,旋涡振荡混合 5 min,置离心机中,3 000 r/min 离心,待分层后,充分吸取下清液,移至干净试管中;样品再加提取液 2 mL,重复萃取一次,合并萃取液,置 37℃ 水浴氮气吹干,残渣用 100 μL 流动相溶解,取 20 μL 进样。

1.18、0.71、0.35 ng/mL 的系列血浆样品,按 1.2.4 项下操作,测定结果以 DIG 和内标的峰面积比为纵坐标,以 DIG 的浓度为横坐标绘制标准曲线,并以最小二乘法回归,得到血浆中 DIG 的标准曲线方程($n = 6$): $Y = 0.038 + 0.286X$, $r = 0.9958$ 。线性范围:0.35 ~ 2.35 ng/mL,最低检测限为 0.18 ng/mL ($S/N \geq 3:1$)。

2.3 回收率实验

取空白血清 2 mL,分别精密加入 DIG 贮备液 10、20、40 μL,制成浓度 0.47、0.94、1.88 ng/mL 的 DIG 血清样品,每个浓度 5 个样品,并依 2.4 项同法处理,重复测定 3 次,由标准曲线计算方法回收率,结果见表 1。

2 结 果

2.1 色谱行为

将空白血浆不加内标,按 1.2.4 项下操作,得图 2;将适量 DIG 贮备液加入空白血浆中,配成含药血浆,按 1.2.4 项下操作,得图 3;由图 2、图 3 可知,血浆提取物不干扰 DIG 及内标的测定,DIG 和内标能够完全分离,保留时间分别为 6.18、10.41 min。

2.2 线性关系及最低检测限

精密吸取 DIG 贮备液 40 μL,加入到 800 μL 血浆中,制成浓度 4.7 ng/mL 的含药血浆,将此含药血浆用空白血浆依次稀释成浓度为 2.35、1.79、1.76、

表 1 血清中地高辛回收率测定结果($n = 5$)

样品序号	加标量 (ng)	浓度 (ng/mL)	测定结果 (ng/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
1	0.94	0.47	0.50 ± 0.04	106.4 ± 8.0	7.48
2	1.88	0.94	0.98 ± 0.04	104.3 ± 4.1	5.62
3	3.76	1.88	1.94 ± 0.06	103.2 ± 3.1	2.36

2.4 精密度试验

取标准曲线下浓度为 0.35、1.76、2.35 ng/mL 的血清样品,依法测定并计算日内和日间相对标准偏差。日内差异:每个浓度样品于一日内重复测定

5次;日间差异:每个浓度样品每日测定1次,连续测定5天。结果见表2。

表2 血清中地高辛精密测定结果(n=5)

样品浓度 (ng/mL)	日内		日间	
	平均实	RSD(%)	平均实	RSD(%)
	测浓度 (ng/mL)		测浓度 (ng/mL)	
0.35	0.38±0.03	6.96	0.36±0.04	7.42
1.76	1.74±0.03	4.82	1.76±0.04	5.28
2.35	2.42±0.04	4.94	2.46±0.03	5.05

2.5 实例测定

患者,女,49岁,因换瓣术后,服用DIG 0.25 mg/天,用药3天后,出现纳差、无力,且恶心等症状,考虑DIG中毒,检测其血药浓度为2.28 ng/mL,予停药1天后,上述症状消失,恢复用药,剂量调整为0.125 mg/天,未见不良反应。

3 讨 论

国内外有较多文献报道,部分人群,如肝脏疾病、肾衰、糖尿病、孕妇、新生儿、老年人^[6,9-13]等,体内存在内源性地高辛样免疫活性因子(Digoxin-like immunoreactive factor, DLIF),使用免疫分析方法检测其DIG的血浆浓度时,临床上发现有显著干扰(0.3~1.1 ng/mL)^[7],目前,国内文献报道测定DIG的血浆浓度均为免疫测定,不能排除DLIF的干扰。

国外大量文献报道采用HPLC和TLC分离结合免疫分析、CE及HPLC-ISP-MS等方法^[9],测定DIG血浆及组织浓度,通过一定的分离手段,排除DLIF的干扰,但所需仪器较多,操作繁琐。

本法采用HPLC法测定DIG的血浆浓度,由于样品中DIG的浓度较低,测得样品峰面积较小,提高萃取效率是关键之一,通过多次实验考察,样品中添加硫酸溶液能显著提高DIG的萃取率,且通过2次萃取,萃取率能达90%以上;采用本法测定DIG,血浆内源性物质不干扰DIG的检出与测定,操作简便,快速,精密度及检测范围能满足临床要求,但由于测得的样品峰面积较小,对色谱柱的分离效率及氘灯的灵敏度要求较高,否则,基线噪音大,峰形变宽,干扰本品的测定,因此,提高样品的检测峰面积是本法有待完善之处。

参考文献:

[1] 曲静伟,董文雅,洪中立.地高辛的血清浓度监测和剂量探讨[J]. Modern Practical Medicine,2005,17(9):560-562.

[2] 聂建平,聂咏鹏.充血性心衰患者血清地高辛浓度监测[J]. 实用临床医学,2006,(3):26-27.

[3] Hafner FT, Kautz RA, Iverson BL, et al. Noncompetitive immunoassay of small analytes at the femtomolar level by affinity probe capillary electrophoresis: direct analysis of digoxin using a uniform-labeled scFv immunoreagent[J]. Anal Chem,2000,72(23):5779-5786.

[4] Tseng HH, Wu HL, Lin SJ, et al. Simultaneous determination of digoxin and digitoxin by micellar capillary electrophoresis and application to drug formulations[J]. Sep Sci,2003,26(11):1693-1697.

[5] Jerry L, Bauman, Robert J. DiDomenico, et al. A method of determining the dose of digoxin for heart failure in the modern Era[J]. Arch Intern Med, 2006, 166(22):2539-2545.

[6] Qazzaz HM, Valdes R Jr. Simultaneous isolation of endogenous digoxin-like immunoreactive factor, ouabain-like factor, and deglycosylated congeners from mammalian tissues[J]. Arch Biochem Biophys,1996,328(1):193-200.

[7] Tzou MC, Sams RA, Reuning RH. Specific and sensitive determination of digoxin and metabolites in human serum by high performance liquid chromatography with cyclodextrin solid-phase extraction and precolumn fluorescence derivatization[J]. J Pharm Biomed Anal, 1995, 13(11):1531-1540.

[8] 国家药典专业委员会. 中国药典[M]. 北京:化学工业出版社,2005. Vol II(二部):180.

[9] Arun P, Ravikumar A, Leelamma S, et al. Identification and estimation of endogenous digoxin in biological fluids and tissues by TLC and HPLC[J]. Indian J Biochem Biophys,1998,35(5):308-312.

[10] Rathore SS, Wang Y, Krumholz HM. Sex based differences in the effect of digoxin for the treatment of heart-failure[J]. N Engl J Med,2002,347(18):1403-1411.

[11] 孙焕洪,张雪晶,王进.我院325例儿童及老年人地高辛血药浓度监测结果分析[J]. 实用药物与临床,2009,12(9):430-431.

[12] 韩鸿玲,林珊,翟德佩,等.血浆内源性地高辛样因子在肾病综合征中的变化[J]. 天津医药,2006,34(10):686-687.

[13] Ferrandi M, Manunta P, Ferrari P, et al. The endogenous ouabain: molecular basis of its role in hypertension and cardiovascular complications[J]. Front Biosci,2005,10:2472-2477.

(此文编辑 蒋湘莲)