

多索茶碱及其片剂的高效液相色谱分析

刘春胜 何秀峰 王云萍 谷士杰 周同惠

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所,北京 100050)

多索茶碱(doxofylline)是用于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新一代黄嘌呤衍生物,其药理作用与氨茶碱(aminophylline)相仿,但起效更快,且无其它类型甲基黄嘌呤所显示的对神经系统、胃肠道、心、肾等的毒副作用^[1,2]。其常用制剂为多索茶碱片剂。

对多索茶碱类似物如茶碱和二羟丙茶碱(dyphylline)等 HPLC 分析或药代动力学测定的文献较多^[3~9]。多索茶碱药代动力学的高效液相色谱测定近几年也有报道^[2,10,11]。检查多索茶碱及其片剂中的有关物质和进行含量测定的方法尚未见报道。本文采用反相 C₁₈柱高效液相色谱法,乙腈—磷酸盐缓冲液(pH 5.4)(15:85)为流动相,在 274 nm 波长检测分析了多索茶碱中的茶碱等有关物质,并以咖啡因因为内标,测定了原料药和片剂中多索茶碱的含量。

实 验 部 分

仪器及试剂

Waters 510 HPLC 泵(Millipore, 美国)。Rheodyne 7125 进样阀(美国)。SPD-2A 紫外检测器;C-R3A 积分记录仪(Shimadzu, 日本)。乙腈,HPLC 级(浙江黄岩化工实验厂);乙酸钠(AR,北京化工厂);冰乙酸(AR,中国医药公司北京采购供应站分装)。多索茶碱对照品,多索茶碱原料药,多索茶碱片,茶碱对照品(中国医学科学院药物研究所);进口多索茶碱片(ABC 公司,意大利)。咖啡因(Sigma, 美国)。

色谱条件

色谱柱: YWG C₁₈柱(10 μm, 4.6 mm×250 mm)(自装)。流动相: 0.02 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH 5.4)—乙腈(85:15),现用现配。流速: 1.0 ml·min⁻¹。柱温: 室温。检测波长: 274 nm。检测器灵敏度: 0.02 AUFS(有关物质检查);0.08 AUFS(含量测定)。进样 5 μl。

溶液配制

精密称取多索茶碱对照品、多索茶碱原料药、咖啡因(内标)各 10 mg,分别用流动相稀释成 1.00 mg·ml⁻¹的储备液。

根据处方可知,多索茶碱片标示量为 100 mg/片,取 20 片称重,计算平均片重,研细混匀,精密称取相当于一片重(平均片重)的细粉,置于 100 ml 量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度,密闭超声溶解 15 min,过滤,滤液作为多索茶碱片储备液(1.00 mg·ml⁻¹)。进口多索茶碱片的标示量为 400 mg/片,同法制备进口多索茶碱片储备液(1.00 mg·ml⁻¹)。

精密称取茶碱对照品 10.0 mg,以流动相溶解并稀释至 100 ml,作为对照品储备溶液(0.100 mg·ml⁻¹)。

结果与讨论

多索茶碱系由茶碱与溴代乙二醇乙缩醛缩合而成,经乙醇重结晶。考虑到茶碱与多索茶碱的溶解度相近,其有关物质主要为茶碱。分解产物及其它未知杂质也作为有关物质检查。多索茶碱及多索茶碱片标示量的百分含量均以内标法测定,按色谱内标物的要求,选择咖啡因作内标。

流动相与检测波长的选择

多索茶碱水溶液的 pH 值在 6~7 之间,可选用含酸性缓冲液的流动相,如磷酸盐缓冲液(pH 5.4)、乙酸盐缓冲液(pH 4.0)等与乙腈或甲醇配比,考察多索茶碱(D)与茶碱(T)及咖啡因(C)的色谱分离度、峰形、保留时间等。结果表明,由于甲醇对多索茶碱的溶解度较小,以甲醇配制的流动相使多索茶碱的保留时间大大延长,且峰形扩散,并使 T 和 C 的保留时间缩短,分离度下降,故甲醇不适用。pH 值为 4.0 或 5.4 的缓冲液与乙腈配制的流动相均可使 D, T, C 基线分离且保留时间均小于 10 min。但缓冲液 pH 为 4.0 时, T 峰与溶剂峰分离度小,峰形略有拖尾;故选择磷酸盐缓冲液(pH 5.4)—乙腈(85:15)作为流动相。多索茶碱与有关物质茶碱及内标物咖啡因的 HPLC 分离图见图 1。

本实验所用流动相含酸性缓冲液,由多索茶碱在酸性介质中的紫外吸收光谱可知,多索茶碱在 274 nm 波长处有特征吸收峰,其 $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ 约为 340;即使在中性或碱性介质中,该吸收峰的强度不变;同时由于有关物质茶碱在 274 nm 处也有特征吸收,故选用 274 nm 作为检测波长。

有关物质检查

茶碱标准曲线及检测限测定 以流动相配制 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的茶碱标准溶液,在上述色谱条件下进样分析,记录色谱图,计算得色谱峰面积 A 对茶碱浓度 C 的回归方程为: $A = 4876C + 301$; $r = 0.999$ 。可知在 0.2~5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度范围,茶碱的色谱响应值为线性。当茶碱浓度为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,进样 6 μl 时,茶碱色谱峰高为噪音的 2 倍,则茶碱的最小检测量为 0.6 ng。

样品分析 分析测定上述原料药及片剂储备溶液,3 批原料及 3 批制剂的有关物质归一化结果见表 1。由表 1 结果知茶碱是多索茶碱及多索茶碱片中的主要有关物质。

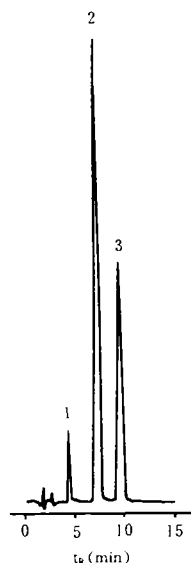


Fig 1 Separation of doxofylline and caffeine (internal standard) on YWG C_{18} column by RP-HPLC. Mobile phase: acetonitrile-phosphate buffer ($0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.4) (15:85); flow rate: $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; UV detector: 274 nm, 0.08 AUFS; injection volume: 5 μl . 1. Theophylline; 2. Caffeine; 3. Doxofylline.

Tab 1 Normalization content of doxofylline and its related substances in doxofylline and doxofylline tablet by HPLC

Compound	t_R (min)	Content (%) ($n=3$)					
		Doxo 1	Doxo 2	Doxo 3	Doxo T1	Doxo T2	Doxo T3
Theophylline	4.43	0.03	0.06	0.05	0.04	—	0.01
Doxofylline	9.01	99.97	99.94	99.95	99.96	100.00	99.99

Note: (1) Doxo 1, 2, 3 indicate different batches of doxofylline products. Doxo T1, T2, T3 indicate different batches of doxofylline tablet products. (2) UV-detector, 0.02 AUFS.

含量测定

标准曲线和检测限 分别取上述多索茶碱对照品储备溶液($1.00 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) 0.2, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.8 ml, 各置 10 ml 量瓶中, 加 1.0 ml 内标溶液, 用流动相稀释至刻度, 取 5 μl 进样作 HPLC 分析, 得多索茶碱与内标峰面积的比值(简称面积比, Y), 将面积比对多索茶碱和内标的浓度比值(简称浓度比, X)作图可知, 在上述浓度范围内浓度比与面积比成线性关系, 回归方程为: $Y = 0.6523 X + 0.0044$; $r = 0.9999$. 当多索茶碱溶液浓度为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 进样 10 μl 时, 信噪比约为 2, 则多索茶碱的最小检出量为 1 ng.

相对校正因子的测定 取 1.00 ml 多索茶碱对照品储备液和 1.00 ml 内标溶液, 加流动相稀释至 10.0 ml, 作为标准溶液; 另取 1.00 ml 多索茶碱原料药或多索茶碱片的储备液和 1.00 ml 内标溶液, 加流动相稀释至 10.0 ml 作为待测溶液. 依法进样分析标准溶液, 记录峰面积, 计算得相对校正因子为 1.421, 相对标准偏差 RSD 为 0.3% ($n=10$).

样品分析 依法分析待测溶液, 记录峰面积, 按内标法计算 3 批原料药的百分含量和 3 批片剂标示量的百分含量, 见表 2.

Tab 2 Percent content of doxofylline in doxofylline and doxofylline tablet determined by HPLC internal standard method

Item	Doxo 1	Doxo 2	Doxo 3	Doxo T1	Doxo T2	Doxo T3
Content (%)	98.82	99.09	99.48	98.64	98.26	98.76
RSD (%) ($n=5$)	0.4	0.5	0.3	0.2	0.1	0.3

Note: (1) Doxo 1, 2, 3 indicate different batches of doxofylline products. Doxo T1, T2, T3 indicate different batches of doxofylline tablet products. (2) UV-detector, 0.08 AUFS.

片剂加样回收率测定 取 20 片多索茶碱片, 研细混匀, 精密称取相当于一片重的样品, 测定含量. 再取同样量样品, 置 100 ml 量瓶中, 再加入 20 mg (精密称定) 对照品, 测定含量. 根据含量差值与加入量之比计算回收率. 测得平均回收率为 99.2%, RSD 为 0.5% ($n=5$).

稳定性考察

按上述 HPLC 法对多索茶碱原料药及片剂进行稳定性试验, 考察有关物质和多索茶碱含量的变化. 结果表明, 在 40°C , 60°C 及 80°C 分别加热 10 d, 室温光照 10 d, 室温露置 10 d, 加速试验 (40°C , RH 75%, 92.5%) 3 个月及室温避光存放 2 年等试验条件下, 原料药和片剂的外观、有关物质 (0.01%~0.07%) 及含量 (98%~102%) 均无明显改变, 未见分解产物.

结 论

多索茶碱和有关物质茶碱系黄嘌呤衍生物,在本实验条件下有良好的色谱分辨率,其最小检出量分别为 1 ng 和 0.6 ng。以咖啡因为内标测定多索茶碱含量,选择性和重现性好、灵敏度高、分析速度快。本方法既满足了质量分析的要求,又可应用于临床血药浓度的监测和片剂溶出度的测定。

关键词 多索茶碱;茶碱;高效液相色谱法

参 考 文 献

- 1 Bucca C, Rolla G, Fonzo D *et al.* Acute clinical pharmacological findings in obstructive pneumopathy following 2-(7'-theophyllinemethyl)-1,3-dioxolane (doxofylline). *Int J Clin Pharmacol Res*, 1982,11: 101
- 2 Cravanzola C, Reboani M, Grosa G *et al.* Doxofylline in rat brain in relation to locomotor activity. *Drug Metab Dispos*, 1989,17: 437
- 3 Simons KJ, Simons FER, Bierman CW. Bioavailability of a sustained release dyphylline formulation. *J Clin Pharmacol*, 1977,17: 237
- 4 Paterson N. High-performance liquid chromatographic method for the determination of dyprophylline in human serum. *J Chromatogr*, 1982,232: 450
- 5 Kester MB, Saccar CL, Mansmann Jr HC. Microassay for the simultaneous determination of theophylline and dyphylline in serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1987,416: 91
- 6 Broussard LA. Theophylline determination by high-pressure liquid chromatography. *Clin Chem*, 1981,27: 1931
- 7 Butrimovitz GP, Raisys VA. An improved micromethod for theophylline determination by reverse-phase liquid chromatography. *Clin Chem*, 1979,25: 1461
- 8 Kawakatsu K, Nishimura K, Kawai M *et al.* Separation and determination of theophylline from paraxanthine in human serum by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 1989,7: 965
- 9 刘志欣,杜增辉,牛秀华. 茶碱有关物质的检测与考察. 药物分析杂志, 1994,14(6): 36
- 10 Lagana A, Bizzarri M, Marino A *et al.* Solid phase extraction and high performance liquid chromatographic determination of doxofylline in plasma. *Biomed Chromatogr*, 1989,4: 205
- 11 Tagllaro F, Dorizzi R, Frigerlo A *et al.* Non-extraction HPLC method for simultaneous measurement of dyphylline and doxofylline in serum. *Clin Chem*, 1990,36: 113

QUANTITATIVE ANALYSIS OF DOXOFYLLINE AND ITS TABLETS BY RP-HPLC

CS Liu, XF He, YP Wang, SJ Gu and TH Zhou

*(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences
and Peking Union Medical College, Beijing 100050)*

ABSTRACT A sensitive and selective RP-HPLC method for the determination of doxofylline (D) and its related compounds has been developed. Chromatography was carried out on a YWG C₁₈ column, and acetonitrile—phosphate buffer (0.02 mol · L⁻¹, pH 5.4) in the ratio of 15 : 85 was used as the mobile phase. Absorbance at 274 nm was monitored. Theophylline (T) and other impurities were directly determined by the peak area, whereas D was quantitated by an internal standard method, caffeine was used as the internal standard. The detection limits of D and T were 1 ng and 0.6 ng, respectively.

Key word Doxofylline; Theophylline; HPLC