

是核受体超家族成员,有 α 、 β 、 γ 3 种亚型,其中 PPAR α 与糖脂代谢密切相关,能够调节脂质代谢、脂肪细胞分化和胰岛素敏感性^[8],马来酸罗格列酮是高选择性 PPAR α 激动药。本实验中,给药组 Tanis mRNA 表达显著降低,且与 FINS、IR、IL-6 水平下降呈正相关。Tanis 表达降低可能增加葡萄糖摄取、增加糖原合成和肝糖原含量、减少糖异生,改善胰岛素抵抗,但马来酸罗格列酮引起 Tanis mRNA 表达降低的机制目前尚不明确。越来越多的资料表明,马来酸罗格列酮除对胰岛素抵抗有关的一些代谢异常具有改善作用外,对非传统的心血管危险因素也有改善作用,该药可有效改变已知是大血管病变危险因素的替代指标,这些指标改变包括血压降低、微量清蛋白尿水平降低、血脂成分的改善、脂肪分布的改变、PAI-1 和 CRP 水平降低等。Mohanty 等^[9]的研究证明,对肥胖的糖尿病和非糖尿病患者给予罗格列酮治疗 6 周,4 mg·d⁻¹,可使单核细胞内的促炎症转录因子 NF- κ B 的含量受到快速持续抑制,单核细胞产生的反应性氧(ROS)也减少,单核细胞趋化蛋白(MCP)-1、CRP、TNF- α 、SAA 血浆浓度降低。本实验中给药组大鼠血浆 IL-6 水平及 Tanis mRNA 表达降低,进一步提示噻唑烷二酮类药物可能通过有效的抗炎作用以及其他多种机制预防和阻止糖尿病大血管病变的发生和进展,并对心血管疾病具有防治作用,较之其他降血糖药,马来酸罗格列酮具有独特的优势。

[参考文献]

[1] Garg R, Tripathy D, Dandona P, et al. Insulin resistance as a

proinflammatory state: mechanisms, mediators, and therapeutic interventions [J]. *Curr Drug Targets*, 2003, 4 (6):487-492.

[2] Walder K, Kantham L, Mcmillan J S, et al. Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation? [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6):1859-1866.

[3] Yuan G, Ken W, Terry S, et al. Elevation in Tanis expression alters glucose metabolism and insulin sensitivity in H4IIE cells [J]. *Diabetes*, 2003, 52(4):929-934.

[4] Pradhan A D, Manson J E, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus [J]. *JAMA*, 2001, 286:327-334.

[5] Rifai N, Joubran R, Yu H, et al. Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease [J]. *Clin Chem*, 1999, 45:1967-1973.

[6] Steel D M, Whitehead A S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein [J]. *Immunol-Today*, 1994, 15(2):81-88.

[7] Morrow D A, Rifai N, Antman E M, et al. Serum amyloid A predicts early mortality in acute coronary syndromes: a timi 11a substudy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 35(2):358-362.

[8] Kliewer S A, Willson T M. The nuclear receptor PPAR γ is bigger than fat [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8(5):576-581.

[9] Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, et al. Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6):2728-2735.

高效液相色谱法测定人血浆多柔比星浓度*

王增寿, 张 华, 朱光辉, 赵依娜

(温州医学院附属第二医院药剂科, 325027)

[摘要] 目的 建立测定人血浆多柔比星浓度的高效液相色谱法。方法 固定相: Hypersil ODS-C₁₈ 分析柱(5 μ m, 46 mm \times 250 mm); 流动相: 乙腈: 甲醇: 纯化水(32: 50: 18); 流速: 1.0 mL \cdot min⁻¹; 荧光检测器激发波长: 480 nm; 发射波长: 560 nm; 以柔红霉素为内标, 采用沉淀蛋白-脱水法提取样品。结果 多柔比星、内标与人血浆中其他成分分离良好, 在 10~1 000 ng \cdot mL⁻¹ 的范围内线性关系良好, 相关系数 $r=0.9994$ ($n=5$), 回收率为 101.89%, 日内及日间 RSD 均 < 10%, 最低检测限为 3 ng \cdot mL⁻¹。结论 该法取样量小, 操作简便快速, 适用于临床多柔比星的血药浓度监测和药动学研究。

[关键词] 多柔比星; 血药浓度; 高效液相色谱法

[中图分类号] R979.1; R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2006)02-0117-02

临床上往往通过测定患者血浆中多柔比星的浓度来调整给药方案。多柔比星的血药浓度测定方法国内外已有报道, 但以氯仿-甲醇萃取样品、高效液相色谱分离、荧光检测居多。这

些方法操作复杂, 回收率低。笔者在本实验中参考文献[1~4], 以柔红霉素(daunorubicin)为内标物, 采用沉淀蛋白-脱水法处理样品, 高效液相色谱荧光法检测, 既能将多柔比星与其他

成分分开,又能克服提取和测定过程中带来的误差。可用于多柔比星的临床血药浓度监测与药动学研究。

1 仪器与试剂

HP1100 型高效液相色谱仪(美国惠普),RF-10AXL 荧光检测器(日本岛津),涡旋混合器(上海医科大学仪器厂),TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),多柔比星对照品(浙江海正制药厂生产),柔红霉素对照品(浙江海正制药厂生产),甲醇(色谱纯),乙腈(色谱纯),无水硫酸钠(分析纯),水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 试液的配制 精密称取多柔比星对照品 20 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加甲醇溶解,并加至刻度配成 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的多柔比星标准储备液,置 4 °C 冰箱保存。精密称取柔红霉素对照品 20 mg,置于 100 mL 的容量瓶中,加甲醇溶解,并加至刻度,配成 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的柔红霉素标准储备液,置于 4 °C 冰箱保存。

2.2 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS- C_{18} (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) 不锈钢色谱柱;荧光检测波长:激发波长 480 nm、发射波长 560 nm;流动相:乙腈:甲醇:纯化水(32:50:18);流速:1.0 mL \cdot min $^{-1}$;进样量:20 μL 。

2.3 样品的预处理 精密吸取待测血浆 200 μL 置于 1.0 mL 的具塞塑料离心试管中,加 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的柔红霉素标准储备液 50 μL ,甲醇 200 μL ,混匀,加无水硫酸钠 0.4 g,涡旋混合 5 min,置 4 °C 冰箱 1 h,12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 15 min,吸取上清液 20 μL 进样测定^[5]。以上述色谱条件及样品处理方法得到的血浆色谱图中,多柔比星、内标与血清中其他成分完全分离,保留时间分别为 5.6 和 9.6 min。

2.4 标准曲线的绘制 取多柔比星标准储备液,用甲醇稀释成不同浓度(1 000,500,200,100,50,10 ng \cdot mL $^{-1}$) 的系列标准液。取 1.0 mL 的具塞塑料离心试管 6 只,分别加入不同浓度的多柔比星系列标准液 200 μL ,再分别加入空白血浆 200 μL 、1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的柔红霉素 50 μL ,混匀后,照样品预处理方法操作,吸取上清液 20 μL 进样分析,以多柔比星浓度(C)为横坐标,多柔比星的峰面积与柔红霉素的峰面积之比值(Y)为纵坐标作标准曲线,得线性回归方程为 $Y = 1.60596 \times 10^3 C - 3.2792 \times 10^4$ ($r = 0.9994, n = 5$),线性范围为 10 ~ 1 000 ng \cdot mL $^{-1}$,最低血浆检测限为 3 ng \cdot mL $^{-1}$ ($S/n = 3$)。

2.5 回收率试验 取正常人血浆适量,准确加入多柔比星,照“2.4”项下方法操作,吸取上清液 20 μL 进样,分析;将多柔比星的峰面积与柔红霉素峰面积的比值代入回归方程求得浓度并计算回收率,结果见表 1。

2.6 精密度试验 取正常人血浆适量,准确加入多柔比星对照品,照标准曲线制备方法操作,吸取上清液 20 μL 进样,分析;每批样品同一天内每隔 2 h 测定 1 次,连续测定 5 次;同批样品

每天测定 1 次,连续测定 5 d。将多柔比星峰面积与柔红霉素峰面积的比值代入回归方程求得浓度并计算精密度。结果见表 2。

表 1 多柔比星回收率试验结果

$n = 5$

加入/ (ng \cdot mL $^{-1}$)	测得/ (ng \cdot mL $^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %
10	10.67 \pm 0.59	106.70 \pm 5.90	5.53
200	194.82 \pm 9.46	97.41 \pm 4.73	4.86
1 000	1 015.53 \pm 27.89	101.55 \pm 2.79	2.75

表 2 多柔比星精密度试验结果

$n = 5$

加入/ (ng \cdot mL $^{-1}$)	日内变异		日间变异	
	测得/ (ng \cdot mL $^{-1}$)	RSD/ %	测得/ (ng \cdot mL $^{-1}$)	RSD/ %
10	10.71 \pm 0.85	7.93	10.63 \pm 0.96	9.03
200	194.46 \pm 11.58	5.95	194.07 \pm 9.30	4.79
1 000	1 016.12 \pm 34.33	3.38	1 015.84 \pm 56.58	5.57

2.7 样品的测定 对 20 例肝肾功能正常的肿瘤患者以 50 mg \cdot (m 2) $^{-1}$ 的剂量缓慢静脉滴注多柔比星,滴注完毕后 6 h 取静脉血 2 mL,抗凝制得待测血浆,按“2.3”项下处理及“2.2”项下色谱条件进行测定,结果编号为 1 ~ 20 的样品,多柔比星的浓度分别为 150.62,199.41,163.83,165.74,109.44,116.45,230.12,192.96,98.74,138.89,145.22,107.84,176.11,112.17,95.18,186.28,102.20,152.25,95.06,214.56 ng \cdot mL $^{-1}$,平均浓度为(147.65 \pm 42.47) ng \cdot mL $^{-1}$ 。

3 讨论

文献报道的高效液相色谱法测定多柔比星血药浓度的流动相均含有磷酸二氢铵和冰醋酸,配制复杂而且对仪器有损害。笔者在本实验中通过试验以乙腈:甲醇:纯化水(32:50:18)为流动相,可使血浆中多柔比星与内标物柔红霉素彻底分离,而且血浆中其他杂质不干扰实验结果。本实验中的流动相组成简单,既可获得满意的实验效果又可避免其对仪器的损害。本实验采用沉淀蛋白-脱水法,该法利用甲醇沉淀蛋白,使与血浆蛋白结合的多柔比星游离出来,结合高速离心法,去除蛋白效果好,色谱结果干扰因素少。加入无水硫酸钠脱去血浆中水分,使样品稀释倍数比单纯沉淀蛋白法低,提高了样品浓度。与有机溶剂提取法相比,本方法操作简单、回收率高,更适用于对临床用药进行常规检测。

[参考文献]

- [1] 何素梅,魏树理,吴传斌,等.反相高效液相色谱荧光检测法测定血浆或肝组织中多柔比星含量[J].药物分析杂志,1994,14(4):8-11.
- [2] 徐小薇,付强,李大魁,等.HPLC 测定兔血浆及淋巴组织中的多柔比星[J].中国药理学杂志,1996,31(2):96-99.
- [3] Van A J, Van T O, Beijnen J H. Determination of doxorubicin and metabolites in murine specimens by high-performance liquid chromatography[J]. J Chrom B,1998,712:129-143.
- [4] 范健,文旭,缪玉山,等.脂质体多柔比星与自由多柔比星在大鼠体内的药动学[J].中国药科大学学报,2001,32(5):354-358.
- [5] 王增寿,上官王宁,连庆泉,等.高效液相色谱法测定儿童血清丙酚浓度[J].儿科药理学杂志,2003,9(1):4-5.

[收稿日期] 2005-08-12 [修回日期] 2005-09-15

[基金项目] * 浙江省温州市科技计划项目(基金编号:Y2003-A036)

[作者简介] 王增寿(1967-),男,浙江温州人,副主任药师,学士,从事医院药学工作。电话:0577-88816257。