

## RP-HPLC 法测定人血清中茶碱浓度的改进

陈 东 ,付成效

( 南华大学 第一附属医院 药剂科 ,湖南 衡阳 421001)

**摘 要:** 目的 建立反相高效液相色谱法测定人血清中茶碱浓度。 方法 血清样品加入咖啡因为内标, 10% 三氯醋酸去蛋白, 采用 Ultimate XB-C<sub>18</sub> ( 250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱分离, 流动相为甲醇: 水 = 30: 70, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 273 nm, 柱温为 30℃。 结果 茶碱在 1.76 ~ 44.00 mg/L 浓度范围线性关系良好,  $r = 0.9996$ , 血清最低检测限为 0.44 mg/L, 日内精密度和日间精密度良好, 回收率较高。 结论 本法操作简便, 结果准确可靠。可满足临床快速监测的需要。

**关键词:** HPLC; 茶碱; 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 - 0111 - 03

## Determination of Theophylline Concentration in Human Serum by Improved RP-HPLC Method

CHENG Dong, FU Cheng-xiao

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

**Abstract: Objective** To determine theophylline rapidly in serum by concentration of theophylline in serum.

**Method** The separation was performed on Ultimate XB-C<sub>18</sub> ( 4.6 mm × 250 mm 5 μm) column with methanol-water ( 30: 70 ) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min. The wavelength for detection was 273 nm. The column temperature was 30℃. Trichloroacetic acid was used to precipitate the serum protein. **Results** The calibration curve had good linearity between 1.76 ~ 44.00 mg/L,  $r = 0.9996$ . The intra-day precision and inter-day precision were all good. The average recovery were all respective. **Conclusions** This method is accurate, rapid, and simple. It can be used as a routine method by TDM.

**Key words:** HPLC; theophylline; serum concentration

茶碱是治疗哮喘的有效药物之一,为甲基黄嘌呤类衍生物,常用药物氨茶碱是茶碱和乙二胺的复盐,成盐后水溶性提高,主要药理作用来自茶碱<sup>[1]</sup>。由于其安全范围较窄,剂量个体差异大,易产生毒副作用,因此监测茶碱血药浓度对临床治疗有重要意义,本实验室曾采用氯仿与丙醇的混合溶剂提取,操作较烦琐,且对身体毒害较大。笔者改用三氯醋酸沉淀蛋白质后,直接进样测定血清茶碱浓度,方法快速、简便,效果令人满意。

### 1 仪器与试剂

HP1100 型高效液相色谱仪, HP1100 色谱工作站, VWD 紫外检测器; 光学读数分析天平( 型号: TG328A ); XW-80A 漩涡混合器( 上海医科大学仪器厂 ); TGL-46B 高速离心机( 上海安亭科学仪器厂 ); 甲醇为色谱纯( TEDIA company inc ), 水为自制纯化水, 三氯醋酸( 上海沪华化工 ); 茶碱( 中国药品生物制品检定所提供, 批号为 100121-199903 ), 咖啡因

收稿日期: 2009 - 09 - 10

通讯作者: 陈东, 药师, E-mail: paulfcx@yahoo.com.cn.

对照品(由国家麻醉品实验室提供,批号为1215-9503)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件色谱柱

Ultimate XB-C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 甲醇: 水 = 30: 70; 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 273 nm; 柱温: 30°C。

### 2.2 工作液的配制

2.2.1 茶碱工作液 精密称定茶碱对照品11.0 mg 至 25 mL 容量瓶中,用 30% 甲醇溶解,并稀释至刻

度 配成 440.0 mg/L 的贮备溶液。

2.2.2 内标工作液 取咖啡因,用 30% 甲醇配制成 127.0 mg/L 的溶液。

### 2.3 血清样品处理

取血清样品 0.2 mL 置刻度离心管中,加入内标液 20 μL 充分摇匀,再加入 10% 三氯醋酸 0.1 mL,涡旋振荡 30 s 3 000 r/min 离心 10 min 吸取上清液 20 μL 进样。

### 2.4 专属性考察

以“2.1”项下色谱条件,分别按“2.3”项下血清处理方法处理,得到空白血清、空白血清加对照品和内标以及服用茶碱药物的患者血清样品色谱图。

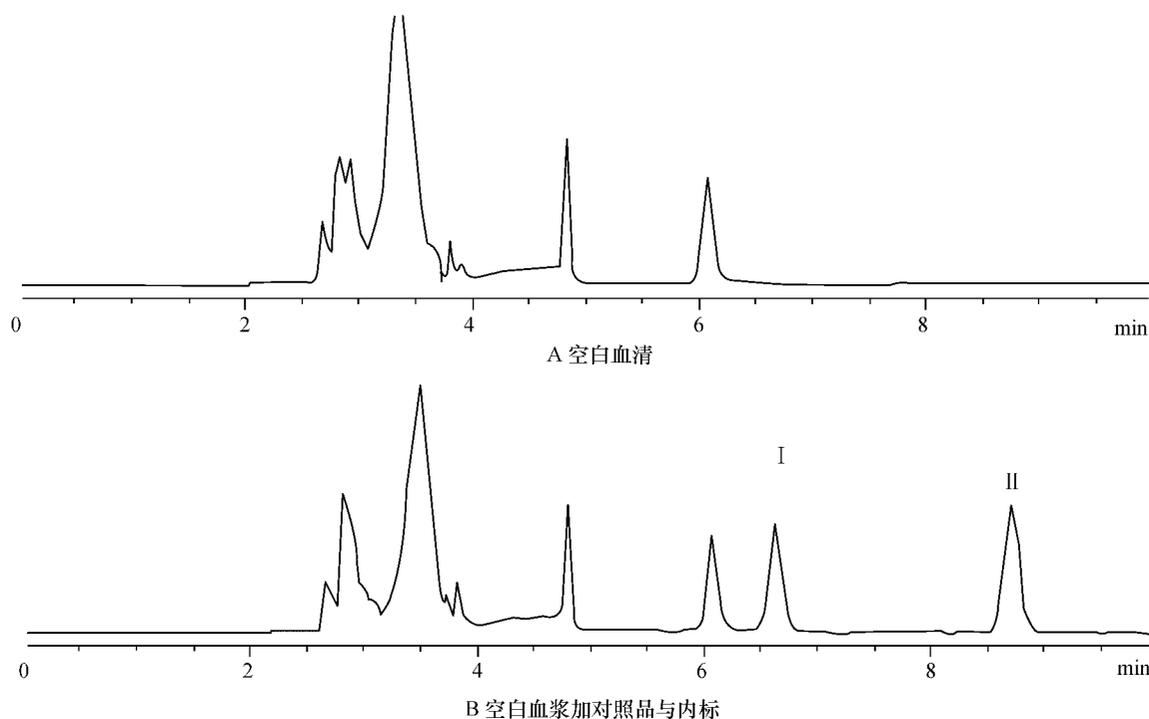


图1 血清中茶碱的高效液相色谱图

I: 茶碱; II: 咖啡因

### 2.5 线性关系考察

取 6 支刻度离心管,各加健康人血清 0.2 mL,分别加入不同浓度的茶碱对照品液各 20 μL,混匀,配成含茶碱(1.76、4.40、8.80、17.60、26.40、44.00 mg/L)标准系列血样,按照血清样品处理项下进行处理,进样,以浓度(C)对样品与内标峰面积比(A)进行线性回归,计算标准曲线方程为:  $A = 0.094C - 0.0501$ ,  $r = 0.9992$ ,线性范围为 1.76 ~ 44.00 mg/L。以信噪比  $S/N = 3:1$  计,茶碱最低检测浓度为 0.44 mg/L。

### 2.6 方法回收率和精密度试验

取低、中、高 3 种浓度血清样品溶液,按照“2.3”项下血清样品处理,进样,于一日内 5 次和连续 5 天内分别考察其回收率和日内、日间 RSD 结果见表 1。

表 1 血清中茶碱回收率试验结果 (n = 5)

质量浓度(mg/L)	平均实测浓度(mg/L)	方法回收率(%)	RSD(%)
1.76	1.95 ± 0.15	110.7	7.69
8.80	8.79 ± 0.17	99.9	1.92
26.40	25.21 ± 0.67	95.5	2.65

表2 血清中茶碱精密度试验结果(n=5)

质量浓度 (mg/L)	日内精密度		日间精密度	
	平均实测浓度 (mg/L)	RSD (%)	平均实测浓度 (mg/L)	RSD (%)
1.76	1.89 ± 0.18	9.52	1.91 ± 0.17	8.90
8.80	8.91 ± 0.14	1.57	8.82 ± 0.23	2.61
26.40	25.36 ± 0.81	3.19	26.0 ± 0.77	2.96

### 2.7 稳定性试验

分别配制 1.76、8.80、26.40 mg/L 低、中、高茶碱血清样品,于 -20℃ 冰箱保存,分别在 1、2、3 天取出于 37.5℃ 水浴融化后,按照“2.3”项下血清样品处理。结果其 RSD 均小于 10%。

### 2.8 病人血清中茶碱浓度的测定

例 1,男,74 岁,临床诊断为慢性肺阻,氨茶碱静脉滴注,一天一次 0.25 g/次,一周后静脉抽血,测定血药浓度为 22.50 mg/L,病人有较严重的恶心,呕吐中毒症状。例 2,男,74 岁,临床诊断为肺部感染,氨茶碱静脉滴注,一天一次 0.25 g/次,一周后静脉抽血,测定血药浓度为 5.60 mg/L。同样给药剂量于不同病人,造成较大的血药浓度差异,提示茶碱类药物使用应个体化。

## 3 讨论

目前,茶碱常用的血药浓度监测方法<sup>[3]</sup>有紫外—可见分光光度法(UV),高效液相色谱法

(HPLC) 荧光偏振免疫法(FPIA)。UV 法不具备分离功能,纯化样品比较困难,FPIA 法检测茶碱血药浓度,样品预处理相对简单,测定快速,但存在不少因素制约此方法广泛应用,FPIA 法所需仪器,由于价格昂贵,国内只有大型医院才能配备。HPLC 法所需仪器为高效液相色谱仪,具备分离与定量检测功能,专属性强,准确度高。

原法采用氯仿—丙醇混合溶剂提取,提取液采用氮气吹干比较困难,且氯仿、丙醇对身体存在较大的毒性,另外,由于提取过程繁琐,操作一致性和稳定性相对较差。本方法样品处理只需加三氯醋酸直接沉淀蛋白,操作简便。另外,流动相不含盐类,减少了对仪器的损害。样品 20 min 内完成预处理,整个色谱过程在 10 min 内完成,耗时短,分离效果好。

茶碱血药浓度个体差异大,治疗时仅凭经验给予氨茶碱往往达不到有效血药浓度,为确保用药安全有效,应在药物监测下进行剂量个体化。

#### 参考文献:

- [1] 贺金莲. 茶碱类药治疗哮喘作用评价[J]. 中国医院用药评价与分析, 2008, 8(3): 176-177.
- [2] 诸骏仁, 桑国卫. 《中华人民共和国药典》临床用药须知, 2005 年版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 243-246.
- [3] 卢协勤, 张会杰. HPLC 法测定茶碱血药浓度及其临床应用[J]. 湖北民族学院学报·医学版, 2008, 25(4): 18-21.

(此文编辑 蒋湘莲)

(上接第 106 页)

## 3 讨论

支气管肺灌洗技术已广泛应用于建立有人工气道、重症哮喘、支气管内膜结核等患者,疗效肯定。但在寒冷季节,一般室外温度为 4 ~ -2℃,本科和其他科室均有空调和暖气,使室内温度控制在 14 ~ 16℃,但较人体体内温度 37.5℃ 要低 23.5 ~ 21.5℃,对照组患者使用室温下的灌洗液进行肺灌洗,感觉有一股冰冷的液体流入体内,瞬时全身寒颤,四肢肌肉紧张,剧烈咳嗽,随之血氧饱和度下降,心率增快,血压上升明显,并拒绝下次灌洗,从而影响病人疗效。而实验组患者在使用加温后与人体体温相接近的灌洗液进行肺灌洗时,感觉一股暖流流入体内,血氧饱和度、心率、血压变化小,整个灌洗过

程中患者无明显不适,并且均乐于接受下次肺灌洗,大大增加肺灌洗的安全性和依从性。

综上所述,加温灌洗液在寒冷季节肺灌洗效果好,值得推广。

#### 参考文献:

- [1] 苏成珍. 对人工气道患者行支气管肺泡灌洗术的护理[J]. 中国中医急症, 2009, 18(12): 2083-2084.
- [2] 刘青, 刘剑波, 周正. 支气管灌洗术治疗支气管哮喘重度急性发作 13 例分析[J]. 中国误诊杂志, 2007, 7(24).
- [3] 李建行, 赵敏, 李香兰, 等. 经支气管镜灌洗注药治疗初治空洞型肺结核疗效研究[J]. 临床荟萃, 2009, 24(19): 1722-1723.

(此文编辑 蒋湘莲)