

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作为内标, 10% 三氯醋酸去蛋白, 采用 Ultimate XB-C₁₈ (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, $r = 0.999\ 6$, 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-C₁₈ (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, $r = 0.999\ 6$. 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^[1]。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-16B 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

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-C₁₈(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℃。

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。

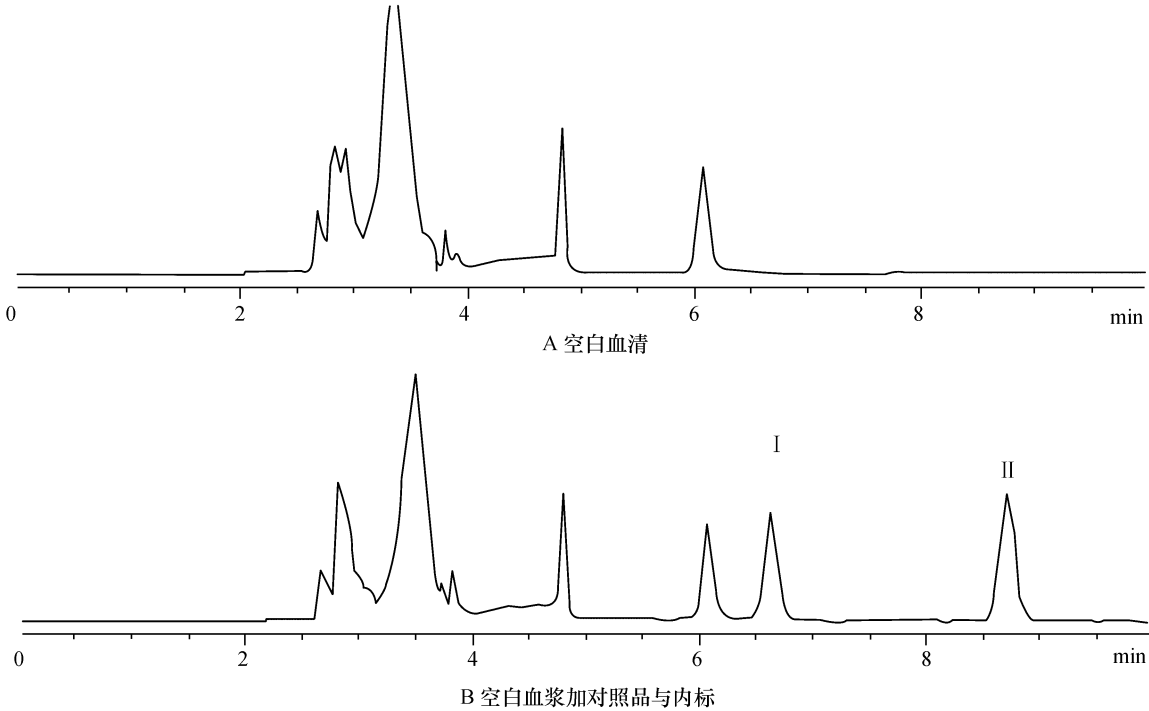


图1 血清中茶碱的高效液相色谱图
I :茶碱; II :咖啡因

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 = 0.999 2,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	RSD	平均实测浓度	RSD
	(mg/L)	(%)	(mg/L)	(%)
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。同样给用剂量于不同病人,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^[3]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)