

# 样品固相净化及反相高效液相色谱法 测定血浆中茶碱

伍朝贇 郭平 叶利民 吴苏澄\*

(华西医科大学药学院, 成都 610041)

**摘要** 本文用氧化铝固相净化血样以消除血中杂质及某些合并用药的干扰, 用 Zorbax-C18 柱及甲醇- (0.05 mol/L) 醋酸钠缓冲液 (50:50) 为流动相, 254 nm 波长检测, 咖啡因为内标测定了茶碱人体血浆浓度的变化。该法样品处理简便、快速, 净化回收率好 (80~86%) 茶碱的检测限为 0.2 ng (信噪比 3), 在血浆中的最低检测浓度为 20 ng/ml, 标准曲线  $r$  为 0.9995, 日内变异系数 1.89%, 日间变异系数为 2.41%, 方法平均回收率为  $98.44 \pm 0.89\%$ 。

**关键词** 茶碱; 反相高效液相色谱法

茶碱为治疗哮喘的常用药, 其有效血清浓度为  $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ <sup>(1)</sup>, 当血清浓度为  $15 \mu\text{g/ml}$  时, 有可能产生副作用且随茶碱血清浓度增加中毒反应也增加<sup>(2)</sup>。由于茶碱代谢速率的个体差异较大, 治疗指数又窄, 因此, 临床监测茶碱的血药浓度, 调节给药剂量和制订合理的给药方案很有必要。用高效液相色谱法测定茶碱血药浓度, 国外已有报道, 在 70 年代初至中期多用吸附色谱和离子交换色谱, 此后主要用 RP-HPLC<sup>(3~6)</sup>, 但流动相多采用价格较贵的乙腈、四氢呋喃或加入离子对试剂, 有的内标物不易得, 或不能避免某些合并用药的干扰<sup>(7~8)</sup>。目前国内主要采用紫外分光光度法<sup>(9~10)</sup>, 其专属性较差。以上这些方法制备样品均较麻烦费时, 为此作者研究建立了用自制氧化铝柱固相净化血样和用 Zorbax-C18 柱, 以甲醇- (0.05 mol/L) 醋酸钠缓冲液 (pH 3.0) (50:50) 为流动相, 咖啡因为内标的反相高效液相色谱法。本法具有样品处理简便、灵敏度高和重现性好, 测定结果可靠, 并能除去大多数合并用药的干扰等优点。

## 实验部分

### 一. 仪器与试剂

岛津 LC-3A 高效液相色谱仪; 岛津 UVD-2 254 nm 固定波长检测器; 岛津 C-EIB 色谱数据处理机; 日立 056 记录仪; 旋涡混合器 (XW-80 型, 上海第一医学院仪器厂); 高速台式离心机 (TGL-16; 上海医疗器械六厂)。茶碱 (99.74%, 成都制药一厂); 咖啡因 (符合中国药典 1985 年版规定, 成都制药一厂); 氧化铝 (酸性, 70 ~ 325 筛孔; 中性、碱性, 100 ~ 200 目; 层析用, 上海五四试剂厂); 标准贮备液: 茶碱甲醇溶液 (1.0 mg/ml) 及内标咖啡因甲醇溶液 (1.0 mg/ml) 均置冰箱冷藏备用。

### 二. 测定方法与结果

(一) 色谱条件 色谱柱  $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm ID}$ , Zorbax-C18 ( $5 \mu\text{m}$ ), 保护柱  $5 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm ID}$ , YWG-ODS  $9 \sim 11 \mu\text{m}$ ; 流动相 甲醇-醋酸钠 (0.05 mol/L, 10%

本文于 1988 年 7 月 9 日收到。

\* 本校药学院八六级硕士研究生

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>调 pH 3.0) 50:50; 柱温 35°C; 流速 0.7 ml/min; 压力 80 kg/cm<sup>2</sup>; 灵敏度  $2 \times 10^{-2}$  aufs; 纸速 2.5 cm/min, 2 mV; 在以上条件下茶碱及咖啡因(内标)的保留时间分别为 7 和 9 min, 分离度为 2.5, 其色谱图见图 1 A。

(二) 样品处理 取血浆样品 0.5 ml, 加 0.8 ml 内标溶液 (0.01 mg/ml), 加 2 ml 甲醇沉淀蛋白, 旋涡振荡 0.5 min, 离心 15 min (3000 r/min) 取上清液加于氧化铝柱 (10 cm × 0.8 cm id, 具玻砂滤隔; 氧化铝 2 g, 湿法装柱, 以水、甲醇各 5 cm 洗涤, 弃去洗液)。以甲醇 2 ml 沿管壁洗下, 再以甲醇 5 ml 洗脱, 收集洗脱液, 空气流挥干, 残渣以 50 μl 流动相溶解, 离心 6 min (17000 r/min), 取上清液 10 μl 进样。色谱图见图 1B, C, 过柱后可除去血浆中大量具有紫外吸收的物质。

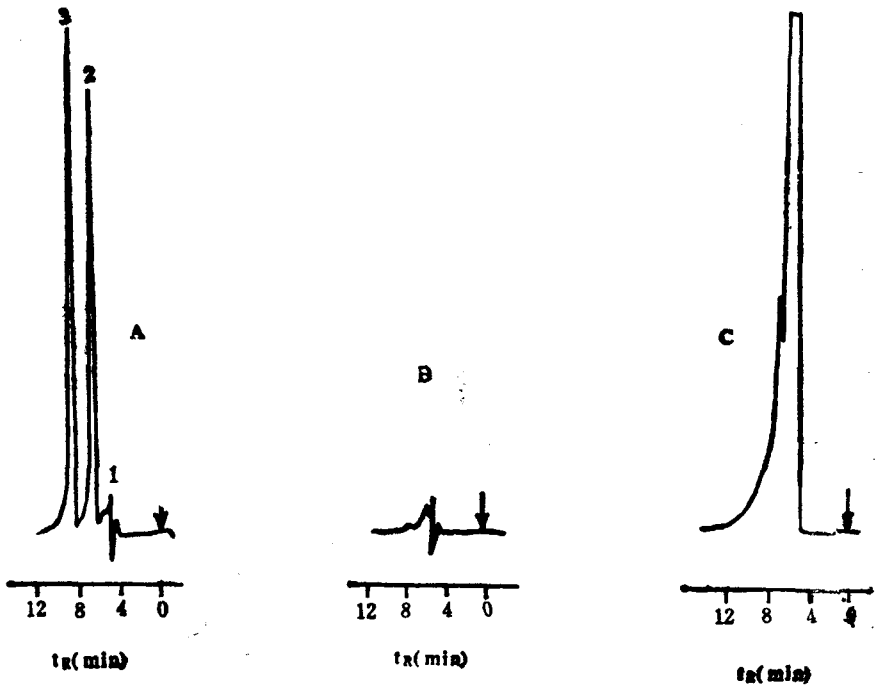


Fig 1. Chromatogram of sample plasma (A), drug-free plasma after clean up (B) and before clean up (C). 1. Impurities; 2. Theophylline; 3. Caffeine (IS).

(三) 标准曲线及检测限 于 0.5 ml 空白血浆中加入不同量的茶碱标准溶液 (0.01 mg/ml) 及一定量的咖啡因(内标)溶液 (0.01 mg/ml), 按样品处理方法过柱及进样, 以茶碱与内标峰高比浓度进行线性回归处理及作图  $r = 0.9995$ , 结果见图 2。

茶碱检测限为 0.2 ng (信噪比为 3), 血浆中最低检测浓度为 20 ng/ml。

#### (四) 精密度与回收率

**精密度** 分别取茶碱标准液适量, 配成 4, 16, 30 μg/ml 血浆, 各加内标溶液 0.8 ml, 按样品处理方法过柱后, 分别进样 8 次以上, 峰高比均值分别为  $0.4697 \pm 0.0090$ , CV 1.9% ( $n=8$ );  $1.5564 \pm 0.0306$ , CV 1.97% ( $n=11$ );  $2.8067 \pm 0.0510$ , CV 1.8% ( $n=9$ ), 得日内平均变异系数为 1.89%。

并于不同天配成含茶碱 10, 16, 30 μg/ml 血浆, 各加入内标液 0.8 ml, 同上处理后测定, 分别测得不同天的平均值为  $9.79 \pm 0.16$ , CV 1.7% ( $n=3$ );  $15.85 \pm 0.13$ , CV

0.82% (n=3);  $30.48 \pm 1.43$ , CV 4.7% (n=3), 得日间平均变异系数为 2.41%。

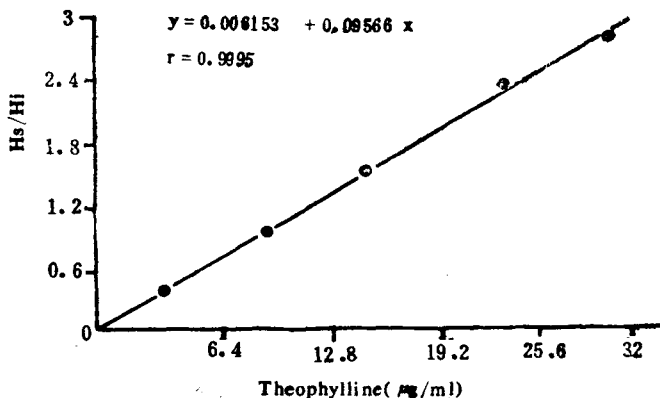


Fig 2. Calibration curve of the peak height ratio of theophylline over caffeine (IS) against theophylline plasma concentration.

**方法回收率** 于空白血浆中加入一定量的茶碱标准溶液, 按样品处理方法过柱后进样, 结果见表 1, 平均回收率为  $98.44 \pm 0.89\%$ 。

Tab 1. Recovery of theophylline from plasma

Amt added ( $\mu\text{g/ml}$ )	Amt found* ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recovery (%)	Average recovery (%)	CV (%)
4.0	3.95	98.75		
10.0	9.82	98.20	98.44	0.89
16.0	15.90	99.38		
24.0	23.72	98.83		
30.0	29.12	97.06		

\*Average of 3~5 determinations on different days.

### (五) 样品测定

用拟定法对 5 例静脉注射氨茶碱\* (5 mg/kg) 的门诊病人进行血浆茶碱浓度测定, 结果见图 3。

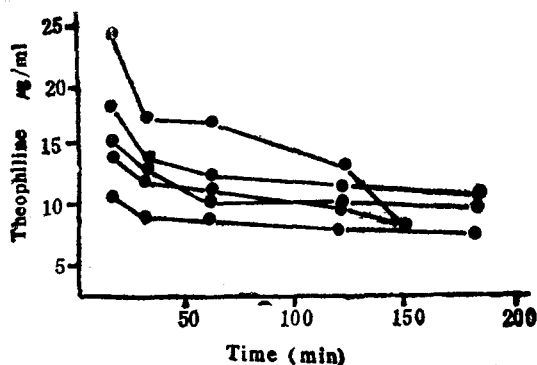


Fig 3. Concentration-time curve of plasma theophylline of five patients.

\*氨茶碱为茶碱与二乙胺的复盐, 含无水茶碱应为 77.0~83.0%, 含二乙胺应为 12.5~14.0%。

5例中男性2, 女性3, 年龄51~69岁, 症状除一例肺心病外, 其余均为慢性支气管炎、肺气肿, 每例均有合并用药, 为青霉素G-Na、复方SMZ片、必嗽平、舒喘灵、维生素C, 鲜竹沥等。

5例病员注射氨茶碱后15 min的血浆茶碱浓度在10.61~23.79  $\mu\text{g/ml}$ 。在注射后30 min内血浆茶碱浓度逐渐降低为原有浓度的4/5~2/3。此后30~180 min内降低较缓慢(仅一例显著降低)。

## 讨 论

一. 实验表明茶碱及咖啡因(内标)不易被氧化铝吸附, 而血浆中某些具有紫外吸收的杂质, 易被氧化铝柱吸附, 不易被甲醇洗脱, 因此可快速净化样品, 并获得较满意的回收率。作者曾试验用甲醇沉淀蛋白后, 不通过氧化铝柱, 则空白血浆样品进样后在茶碱和咖啡因保留值处有强杂质峰出现(见图IC)。还比较了三种氧化铝(酸性、中性、碱性), 对血浆中杂质的吸附, 均能达到相同的效果(但用中性氧化铝时茶碱回收量较低, 碱性氧化铝洗脱速度较慢)。氧化铝的用量以每0.5 ml血浆加氧化铝2g为宜, 低于此量血中杂质清除不够干净。该净化方法克服了溶剂萃取净化常常不易避免的乳化现象, 作者认为该法不仅可作为高效液相色谱法测定茶碱血药浓度的样品净化方法, 也可作为紫外测定茶碱血药浓度的样品净化方法。该净化方法尚具有可去除某些药物的干扰, 价廉和氧化铝柱易于制备等优点。

二. 临床中常与氨茶碱同时使用的药物有抗生素类如青霉素、庆大霉素、氯霉素、红霉素、麦迪霉素、螺旋霉素; 甾体激素如强的松、地塞米松; 止咳平喘药如必嗽平, 舒喘灵等, 分别取以上10种药物, 在上述测定条件下, 直接进样, 记录色谱图, 除强的松和氯霉素、青霉素出现色谱峰以外(保留时间分别为24, 9.24, 12.24 min), 其它均未出峰, 另分别取相同量以上药物, 加入含茶碱的血浆中, 按照样品处理方法过柱后进样, 强的松和青霉素的峰均消失, 氯霉素峰高降低。实验结果表明, 以上药物在本文所建立的净化方法和测定条件下除氯霉素外均不干扰测定。在所测5例病员中曾合并用复方SMZ、维生素C、鲜竹沥也未见干扰。

致谢 本校医学院陈文彬及其硕士研究生刘守智提供病例及血浆样品。

## 参 考 文 献

1. Jenne JW, et al. Pharmacokinetics of theophylline: application to adjustment of the clinical dose of aminophylline. *Clin Pharm Ther* 1972; **13**: 439.
2. Piafsky KM, et al. Dosage of theophylline in bronchial asthma. *New Engl J Med* 1975; **292**: 1218.
3. Franconi LC, et al. Determination of theophylline in plasma ultrafiltrate by reversed phase high pressure liquid chromatography. *Anal Chem* 1976; **48**: 372.
4. Scott NR, et al. Determination of the urinary metabolites of caffeine and theophylline by HPLC. *J Chromatogr* 1986; **375**: 321.
5. Bock JL, et al. Therapeutic drug monitoring using HPLC and rapid preparation: an assay for serum theophylline. *Ibid* 1984; **308**: 354.
6. Caccia LG, et al. High performance liquid chromatography determination of S-carboxymethyl-L-cysteine and theophylline in pharmaceutical preparations. *Farmaco Ed Prat* 1981; **36**: 396.
7. Kelly RC, et al. Cephalosporin antibiotics interference with the analysis for theophylline by high-performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1987; **24**: 838.

8. Robinson CA, Dobbs J. Acetazolamide interference with theophylline analysis by high performance liquid chromatography. *Ibid* 1978; **24**:2208.
9. 梁德荣, 等. 紫外分光光度法测定血浆茶碱浓度的改进. 华西医科大学学报 1987; **18**:256.
10. 刘孟平, 等. 小儿茶碱控释片的药动学及血清与唾液浓度相关性. 中国医院药学杂志 1987; **7**:435.

## SOLID PHASE CLEAN UP AND DETERMINATION OF THEOPHYLLINE IN PLASMA BY REVERSED PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

CY Wu, P Guo, LM Ye and SC Wu

(School of Pharmacy, West China University of Medical Science, Chengdu 61001)

**ABSTRACT** Theophylline is the drug of choice in the prevention and treatment of asthmatic symptoms. A plasma sample clean up procedure using alumina solid phase to eliminate the interference of plasma impurities and some other drugs and a RP-HPLC method to determine plasma theophylline concentration were developed. The system used a Zorbax-C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m) column. The mobile phase consists of a mixture of methanol and sodium acetate (50:50) buffer (pH 3.0). Detection at a wavelength of 254 nm showed no interfering peaks. Caffeine was used as an internal standard. The clean up procedure is simple, rapid and satisfactory. The detection limit of theophylline is 0.2 ng(R/N,3:1), the minimal detectable concentration of theophylline in plasma is 20 ng/ml. Calibration curve is linear ( $r=0.9995$ ) in the concentration range of 4  $\mu$ g/ml to 30/ $\mu$ g/ml. Within-day precision and day-to-day precision (CV) were 1.89% and 2.41% respectively. The average recovery of the method is  $98.44 \pm 0.89\%$ .

**Key words** Theophylline; RP-HPLC