

HPLC 测定人血清中咖啡因浓度

邓子煜 华 剑(蚌埠 233004 蚌埠医学院附属医院药剂科)

摘要 目的:建立了反相 HPLC 测定人血清中咖啡因浓度的方法。方法:甲醇-水为流动相,茶碱为内标,紫外 254nm 处检测。结果:线性范围 2.5 ~ 40 μ g/ml,日内 RSD 为 1.28 % ~ 3.78 %,日间 RSD 为 2.18 % ~ 3.56 %,方法平均回收率为 99.86 %,最低检测浓度为 100ng/ml。结论:此法具有操作简便、省时、分离度好等特点,可用于咖啡

中国现代应用药学杂志 2000 年 4 月第 17 卷第 2 期

因临床药动学和药效学研究。

关键词 咖啡因;高效液相色谱法;血清浓度

Determination of caffeine in human serum by HPLC

Deng Ziyu(Deng ZY) ,Hua Jian(Hua J) (Department of Pharmacy ,Affiliated of Bengbu Medical College ,Bengbu 233004)

ABSTRACT OBJECTIVE:To establish a reverse-phase HPLC method for the determination of caffeine in human serum. **METHOD:**The mobile phase was methanol-water. Internal standard was theophylline. The detection wavelength was 254nm. **RESULTS:**The method was linear within the range of 2.5 to 40 μ g/ml and the limit of detection was 100ng/ml. The variations of within day ranged from 1.28% to 3.78% and those of day-to-day from 2.18% to 3.56%. The average recovery of caffeine was 99.86%. **CONCLUSION:**This assay is rapid, accurate, sensitive and simple, and can be applied to the study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of caffeine in clinical practise.

KEY WORDS caffeine, HPLC, serum concentration

咖啡因是一种中枢兴奋药,其有效浓度范围是5~20 μ g/ml。国内目前关于人体内咖啡因的药动学研究还报道较少,本文参考文献^[1,2],建立了反相HPLC测定人血清中咖啡因浓度的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Beckman SYSTEM GOLD 液相色谱仪(125泵,166检测器),80-2离心机(上海手术器械厂),XW-80A旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),SB-2200超声波清洗器(上海必能信超声有限公司)。

1.2 试剂

咖啡因、茶碱(蚌埠市药品检验所),甲醇为高效液相色谱试剂,高氯酸为分析纯,水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 标准溶液及内标液的配制

分别精称25mg的咖啡因及茶碱用水溶解,使其终浓度为1mg/ml,置于冰箱中保存。

2.2 色谱条件

分析柱为ODS C₁₈柱(5 μ m,250mm $\times$ 4.6mm),预柱为ODS C₁₈柱(5 μ m,45mm $\times$ 4.6mm),流动相:甲醇-水(40:60),流速:1ml/min,检测波长:254nm,咖啡因与内标的保留时间分别为4.85和4.18min,室温,AUFS=0.1。

2.3 血样处理

取血清0.5ml,加入内标14 μ l和7%高氯酸200 μ l,振荡20s,离心10min(4000r/min),用0.5 μ m滤膜过滤后,取上清液20 μ l进样。

2.4 色谱行为

处理后的空白血清在咖啡因及内标出峰处背景干净,无杂峰干扰,见图1。

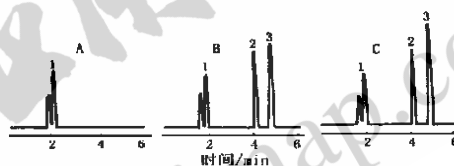


图1 色谱图

A - 空白血清;B - 咖啡因及内标血清;C - 健康志愿者血清;
1 - 人体内源物质;2 - 内标;3 - 咖啡因

2.5 标准曲线的制备

用空白血清分别配制成2.5,5,10,15,20,30和40 μ g/ml的咖啡因血清标准系列,按上述“血样处理”操作,以浓度c为横坐标,咖啡因与内标的面积比为纵坐标建立标准曲线。结果显示血样在2.5~40 μ g/ml范围内线性关系良好: $y = 0.01915 + 0.04486c$, $r = 0.9998$,最低检测浓度为100ng/ml。

2.6 回收率

按上述方法配成浓度为5,15和30 μ g/ml的样品各5份,以样品与内标峰面积比值计算回收率及RSD,结果见表1。

2.7 精密度

配成浓度为5,15和30 μ g/ml样品各5份,于同一天不同时间和不同日间提取,按上法求得日间、日内差异(表1)。

2.8 健康志愿者血药浓度

健康志愿者3名,男,20~22岁,体重55~63kg,于早晨8:00空腹一次服药200mg,用200ml温开水送服,

表 1 咖啡因的回收率及精密度试验/ $n = 5$

浓度 / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	回收率/ %		日内差异/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$		日间差异/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	
	$\bar{x} \pm s$	RSD/ %	$\bar{x} \pm s$	RSD/ %	$\bar{x} \pm s$	RSD/ %
5	100.08 $\pm$ 1.3	1.3	5.01 $\pm$ 0.064	1.28	5.04 $\pm$ 0.11	2.18
15	98.13 $\pm$ 0.58	0.6	14.81 $\pm$ 0.22	1.49	14.99 $\pm$ 0.52	3.47
30	101.37 $\pm$ 2.81	2.77	30.96 $\pm$ 1.17	3.78	31.22 $\pm$ 1.11	3.56

结果见表 2。

3 讨 论

表 2 血清咖啡因测定结果/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

序号	时间/h										
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	6.0	8.0	12.0	24.0
1	2.72	5.63	8.75	10.81	10.93	10.01	8.88	6.41	4.19	1.87	0.42
2	1.55	2.60	4.81	6.55	8.13	9.35	8.10	7.01	5.62	3.96	1.43
3	3.88	6.15	10.30	12.31	12.02	11.33	10.01	8.35	6.37	2.14	0.65

本法简单、易行,灵敏度高,稳定性好,所用流动相为甲醇-水,价廉低毒,相对回收率及精密度试验的 RSD 均小于 5%,可用于咖啡因的血药浓度测定及药动学研究。

参考文献

- 1 旌生.一次性采样测定人体咖啡因清除率.中山医科大学学报,1994,(3): 206.
- 2 何明三,汪经环,雷永军,等.HPLC 法测定痰液中咖啡因含量.中国医院药学杂志,1994,14(9): 391.

收稿日期:1999 - 04 - 16