

HPLC 测定早产儿咖啡因血药浓度

林闽¹, 黄志毅¹, 叶兰², 陈瑶^{1*} (1.厦门市妇幼保健院药学部, 福建 厦门 361003; 2.福建医科大学, 福州 350108)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定早产儿咖啡因血药浓度的方法。方法 色谱柱为 Inertil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水(28:72)为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 274 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL。结果 咖啡因血药浓度在 2.5~60 mg·L⁻¹内呈良好的线性关系($r^2=0.999\ 9$, $n=9$), 定量限为 0.125 mg·L⁻¹。提取回收率为 82.5%~89.7%, 方法回收率为 97.2%~103.0%; 日内与日间精密度 RSD 均<10%。随机检测 5 名负荷剂量给药的患儿次日咖啡因谷浓度为 (15.8±2.1)mg·L⁻¹, 另 5 例患儿给药 7 d 后检测咖啡因谷浓度为 (24.3±4.6)mg·L⁻¹, 均在有效线性范围内。结论 本方法灵敏、可靠, 可作为咖啡因血药浓度的常规监测方法。

关键词: 咖啡因; 血药浓度监测; 早产儿; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1; R917.101 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)07-0833-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.013

引用本文: 林闽, 黄志毅, 叶兰, 等. HPLC 测定早产儿咖啡因血药浓度[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 833-836.

Determination of Caffeine Plasma Concentration of Premature Infant by HPLC

LIN Min¹, HUANG Zhiyi¹, YE Lan², CHEN Yao^{1*} (1.Department of Pharmacy, Xiamen Maternity and Child Health Care Hospital, Xiamen 361003, China; 2.Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish HPLC determination method for the caffeine plasma concentration of premature infant. **METHODS** Chromatographic column was Inertil ODS-3(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water(28:72). Flow rate was set at 1 mL·min⁻¹ with column temperature of 30 ℃ and detection wavelength was 274 nm. Injection volume was 20 μL. **RESULTS** The calibration range of caffeine was 2.5–60 mg·L⁻¹ ($r^2=0.999\ 9$, $n=9$). Detection limit was 0.125 mg·L⁻¹. The average recoveries of extraction and method were 82.5%–89.7% and 97.2%–103.0%. RSDs of intra-day and inter-day were<10%. Caffeine valley concentration of five infants randomly selected with loading-dose were (15.8±2.1)mg·L⁻¹, while in other five infant were (24.3±4.6)mg·L⁻¹ after caffeine administration for 7 d. All the results were within methodological linear limitation. **CONCLUSION** The method is rapid, simple and accurate to be used for plasma concentration monitoring of caffeine.

KEYWORDS: caffeine; plasma concentration monitor; premature infant; HPLC

早产儿呼吸暂停(apnea of prematurity, AOP)是新生儿尤其是早产儿常见的临床表现^[1], 胎龄越小、出生体重越低、呼吸中枢发育越不成熟, AOP 的发生率越高。甲基黄嘌呤类药物是治疗 AOP 的首选药物^[2]。茶碱在新生儿体内代谢个体差异较大, 治疗有效血药浓度范围与中毒浓度非常接近, 广泛使用受到限制。而咖啡因具有半衰期长、不良反应少、透过血脑屏障快等特点^[2-3], 在 2006 年被中华医学会儿科分会新生儿学组作为国内早产儿 AOP 防治的推荐药物。在 2010, 2013, 2016 年欧洲呼吸窘迫综合征指南中均将咖啡因作为早产儿 AOP 的推荐药物。基于新生儿临床急救

的需要, 2011 年 7 月枸橼酸咖啡因注射液获得国家药品监督管理局生产许可, 豁免临床试验进入中国市场, 2013 年开始在各大医院应用的同时开始进行临床安全性多中心评估^[4], 在治疗原发性 AOP 方面已逐步取代茶碱的地位。

目前国内咖啡因治疗开展时间尚短, 病例数有限, 且全国范围内关于咖啡因治疗早产儿 AOP 的研究资料较少, 而因遗传因素及种族差异, 常规咖啡因治疗剂量在我国新生儿群体中是否能达到相应的治疗浓度尚不明确。故本研究建立 HPLC 检测咖啡因血药浓度的方法, 以期对咖啡因群体药理学及临床应用探寻最佳剂量提供方法学基础。

作者简介: 林闽, 女, 硕士, 药师 Tel: (0592)2668600 E-mail: cpu20080301@163.com *通信作者: 陈瑶, 女, 主任药师 Tel: (0592)2668600 E-mail: chenyaoxm@163.com

1 材料与仪器

1.1 药品和试剂

咖啡因对照品(中国计量科学研究院, 批号: 17001; 含量: 99.8%); 安替比林对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100506-201602; 含量: 100%); 空白血浆由厦门市妇幼保健院检验科提供; 乙酸乙酯、甲醇为色谱纯, 水为超纯水。

1.2 仪器

Agilent1260 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); HL-104 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多); TGL-16gR 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); XW-80A 漩涡混合器(海门市麒麟医用仪器厂); PH500 台式测试仪(Clean 仪器有限公司)。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的配制 精密称取咖啡因 10.0 mg, 加适量超纯水于烧杯溶解后, 置于 10 mL 量瓶中, 加入超纯水至刻度, 定容摇匀, 配制成 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品贮备液, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.1.2 内标液的配制 精密称取安替比林 20.0 mg, 加适量超纯水于烧杯溶解后, 置于 100 mL 量瓶中, 加入超纯水溶解至刻度, 定容摇匀, 配制成 $200\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标液, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.2 血样处理

取 $45\ \mu\text{L}$ 空白血浆加入 $5\ \mu\text{L}$ 咖啡因溶液和 $5\ \mu\text{L}$ 内标液, 漩涡振荡 1 min; 加入乙酸乙酯 $100\ \mu\text{L}$, 漩涡振荡 1 min; $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min ($2\sim 8\ ^\circ\text{C}$); 取上层清液 $100\ \mu\text{L}$ 置于真空干燥箱内 ($30\ ^\circ\text{C}$) 挥干, 残渣用 $30\ \mu\text{L}$ 流动相复溶, $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min ($2\sim 8\ ^\circ\text{C}$), 取上清液 $20\ \mu\text{L}$ 进样。

2.3 色谱条件

日本岛津 Inertsil ODS-3 色谱柱($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 流动相: 水-甲醇(72:28); 柱温: $30\ ^\circ\text{C}$; 检测波长: $274\ \text{nm}$ (参比波长 $360\ \text{nm}$); 流速: $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量: $20\ \mu\text{L}$ 。

2.4 专属性试验

取空白血浆、空白血浆加对照品、患儿血浆各 $50\ \mu\text{L}$, 按“2.2”项下方法操作, 记录色谱图。咖啡因保留时间为 $8.723\ \text{min}$, 内标物保留时间为 $11.736\ \text{min}$ 。拖尾因子为 0.98, 分离度 $R>1.5$, 峰形良好且分离度好, 结果见图 1。

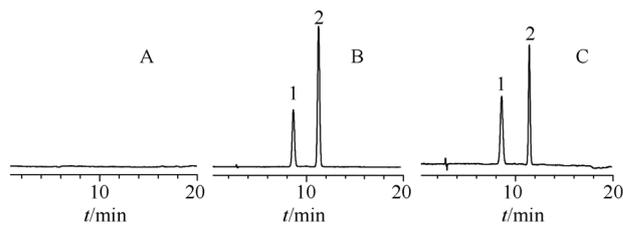


图 1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-加样血浆; C-患者血浆; 1-咖啡因; 2-安替比林。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank plasma; B-standard plasma; C-sample plasma; 1-caffeine; 2-antipyrine.

2.5 标准曲线的制备

取咖啡因对照品溶液, 用超纯水分别稀释成为 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, $600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液, 取空白血浆 $45\ \mu\text{L}$ 置 $1.5\ \text{mL}$ EP 管中, 分别加入咖啡因对照品溶液 $5\ \mu\text{L}$ 和内标液 $5\ \mu\text{L}$, 涡旋混匀, 配制成系列对照品溶液浓度分别为 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40, 50, $60\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。另取空白血浆 $45\ \mu\text{L}$, 加入生理盐水 $10\ \mu\text{L}$, 与空白血浆 $45\ \mu\text{L}$, 加入生理盐水与内标液各 $5\ \mu\text{L}$ 随进行检测。按“2.2”项下方法操作, 安替比林为内标物。以咖啡因质量浓度为横坐标(X), 对照品峰面积/内标液色谱峰面积为纵坐标(Y), 进行线性回归, 得到标准曲线方程为 $Y=0.057\ 6X-0.002\ 94$, $r^2=0.999\ 9$; 按信噪比 $S/N\geq 10$, 咖啡因定量限为 $0.125\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6 回收率试验

配制含咖啡因 2.5, 5, 20, $40\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 4 种浓度血浆样品, 按“2.2”项下方法处理, 记录咖啡因峰面积 A_1 ; 另取 4 种浓度咖啡因, 用流动相制备样品, 记录咖啡因峰面积 A , 以 A_1/A 的值, 即为提取回收率; 配制含同样浓度血浆样品, 按“2.2”项下方法处理并进行检测, 记录峰面积代入标准曲线进行计算, 所得实际浓度和理论浓度的比值即为方法回收率。结果见表 1。

表 1 HPLC 测定咖啡因血药浓度回收率($n=5$)

Tab. 1 Recovery determination of caffeine in plasma by HPLC($n=5$)

咖啡因浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	提取回 收率/%	RSD/ %	方法回 收率/%	RSD/ %
2.5	82.5 ± 4.3	5.16	97.2 ± 3.5	3.48
5	89.7 ± 7.2	6.88	102.9 ± 2.5	2.47
20	85.2 ± 4.3	4.28	98.4 ± 2.0	1.88
40	88.5 ± 7.3	6.63	103.0 ± 3.2	3.10

另取空白血浆 45 μL , 加入生理盐水与安替比林各 5 μL 随行检测, 按“2.2”项下方法操作, 记录安替比林峰面积 B_1 , 另取安替比林, 用流动相制备同浓度内标物, 记录峰面积 B , 以 B_1/B 的值为安替比林提取回收率, 同日内测得回收率为 $(78.53 \pm 1.39)\%$ ($n=5$), RSD 为 1.77%。

2.7 仪器精密度试验

配制含咖啡因 2.5, 5, 20, 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 血浆样品, 按“2.2”项下方法处理并进行检测; 同日重复测定 5 次并连续测定 5 d, 即日内精密度和日间精密度。结果见表 2。

表 2 HPLC 测定咖啡因血药浓度精密度($n=5$)

Tab. 2 Precision of determination of caffeine in plasma by HPLC($n=5$)

咖啡因浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	日内精密度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%	日间精密度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/%
2.5	2.52 ± 0.09	3.54	2.49 ± 0.12	4.80
5	5.02 ± 0.21	4.18	5.10 ± 0.16	3.14
20	20.99 ± 0.82	3.90	20.90 ± 0.58	2.77
40	41.94 ± 0.54	1.29	39.67 ± 1.21	3.05

2.8 样品稳定性试验

配制含咖啡因 2.5, 5, 20, 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 血浆样品, 分别在室温下放置 4 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 24, 48 h, -30 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 周, 反复冻融 5 次, 每种浓度在各自条件下均平行测定 5 次, 即样品稳定性。结果见表 3。

2.9 临床应用

经厦门市妇幼保健院伦理委员会批准, 选择经咖啡因治疗的患儿, 治疗方案采用 FDA 公布的标准剂量方案, 注射负荷量 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 枸橼酸咖啡因(即 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 咖啡因), 继之以每 24 h 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的维持量治疗。于次日给药前半小时采血, 按“2.2”项下方法操作进行咖啡因浓度的检测。5 名早产儿胎龄(32.51 ± 0.84)周, 出生体质量(2.08 ± 0.25)kg, 给药负荷剂量后次日检测咖啡因浓度为

(15.8 ± 2.1) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 另 5 名早产儿胎龄(32.97 ± 0.71)周, 出生体质量(2.23 ± 0.35)kg, 给药 7 d 后检测咖啡因浓度为(24.3 ± 4.6) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。检测样本浓度均在有效线性范围内。

3 讨论

3.1 方法的选择

目前国内外对于咖啡因浓度的检测方法包括酶联免疫法、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)以及高效液相色谱法。酶联免疫法自动化程度高, 但不能区分活性代谢物的各自浓度, 易受血浆中杂质的影响, 且配套试剂盒尚未在国内上市, 采用该方法尚不能实现。LC-MS/MS 以质谱为检测器, 灵敏度较高, 但其线性关系较差, 单次检测可能存在较大的偏差, 且仪器价格昂贵, 难以普及。目前国内已有采用 HPLC 测定咖啡因血药浓度的报道^[5-7], 但研究对象主要为健康成人, 每次检测需 0.5 mL, 而本研究所建立方法仅需 0.05 mL, 更适于早产儿样本检测。

3.2 样品前处理

文献[5-7]中关于血浆样本的处理, 主要为萃取法和沉淀法。前期试验发现, 等量沉淀剂提取回收率为甲醇 76.4%, 乙腈 72.3%, 5%高氯酸 66.2%, 但均有不同程度的杂质干扰; 而萃取法的氯仿毒性大且挥干困难; 等量萃取时二氯甲烷提取回收率为 63.74%, 但萃取相为下层液体, 操作不便, 易造成误差; 而乙酸乙酯-二氯甲烷混合液与单用乙酸乙酯萃取时提取回收率分别为 54.29% 和 52.05%, 相差甚小, 故而选用操作更为简易的乙酸乙酯进行萃取。

3.3 内标物的选择

国内大部分文献^[5-7]采用茶碱为内标, 忽略了新生儿体内咖啡因和茶碱的相互转换。而使用二羟丙茶碱为内标^[6], 前期试验发现其与茶碱保留时间(6.254 min)相近, 若咖啡因在患儿体内转化为茶

表 3 HPLC 测定咖啡因血药浓度稳定性($n=5$)

Tab. 3 Stability of determination of caffeine in plasma by HPLC($n=5$)

咖啡因浓度	血药浓度				
	室温 4 h	4 $^{\circ}\text{C}$, 24 h	4 $^{\circ}\text{C}$, 48 h	-30 $^{\circ}\text{C}$, 7 d	反复冻融
2.5	2.47 ± 0.07	2.48 ± 0.10	2.53 ± 0.13	2.45 ± 0.13	2.55 ± 0.14
5	5.01 ± 0.21	5.16 ± 0.08	5.19 ± 0.26	4.71 ± 0.25	5.28 ± 0.25
20	20.17 ± 0.86	21.01 ± 0.57	20.64 ± 0.85	21.25 ± 0.74	21.38 ± 0.69
40	41.15 ± 1.19	42.69 ± 1.44	38.29 ± 1.63	41.03 ± 0.70	41.50 ± 2.86

碱, 则易对结果产生影响。而内标物双呋喃氟脲嘧啶不易获得。本研究尝试用异丙安替比林作为内标物^[8], 但保留时间太长。后参考文献^[9], 尝试采用与氨基比林结构相似且极性更大的安替比林作为内标, 可与咖啡因和茶碱有效分离。

3.4 色谱条件优化

前期试验发现, 采用醋酸缓冲体系并未对峰形及保留时间有明显影响。且因醋酸盐会降低色谱柱的使用寿命, 故采用甲醇-水作为流动相, 通过调整确定甲醇-水的比例为 28:72。试验发现, 柱温为 20 °C 时待测物与内标的分离度为 1.36, 40 °C 时能完全分离但拖尾严重。最终采用柱温为 30 °C 以保证峰形良好。

3.5 临床应用

本研究检测 5 例患儿负荷剂量给药后次日检测咖啡因浓度 $(15.8\pm 2.1)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 另 5 例患儿给药 7 d 后检测咖啡因浓度为 $(24.3\pm 4.6)\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 符合文献报道^[5], 即咖啡因常规剂量使用下, 大部分患儿可达到说明书有效血药浓度 $(8\sim 30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 范围, 且低于不良反应发生的 $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血药浓度。近期研究显示, 高剂量咖啡因更能降低呼吸暂停的发生率和提高撤机成功率^[10], 但可增加心动过速、呼吸急促的发生率。且随着早产儿日龄的增加, 代谢酶日益成熟, 个体差异明显(范围在 1%~41%) 而使得咖啡因的血药浓度个体差异化日趋增大; 亦有研究发现, 胎龄低于 28 周或使用静脉营养支持的患儿会降低咖啡因的清除率。国内咖啡因治疗开展时间尚短, 病例数有限, 且在临床实践中咖啡因应用的剂量选择相差甚远, 故更需要进行咖啡因血药浓度检测以明确其分布特征及临床效应。

本研究建立的咖啡因血药浓度测定方法操作简便, 重复性好, 分析时间短, 灵敏度高, 能准确测定咖啡因的血药浓度, 可为早产儿群体药动学的研究提供有效、简便的方法学基础。

REFERENCES

- [1] 邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学[M]. 人民卫生出版社, 2011.
- [2] 唐晓艳, 王丹华. 咖啡因在新生儿中的应用进展[J]. 中国新生儿科杂志, 2014, 29(5): 343-346.
- [3] PICONE S, BEDETTA M, PAOLILLO P. Caffeine citrate: when and for how long. A literature review [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25 Suppl 3(4): 11-14.
- [4] DU L Z. Drug therapy for apnea of prematurity. [J] Chin J Pract Pediatrics(中国实用儿科杂志), 2015(2): 88-92
- [5] DENG Z Y, Hua J. Determination of caffeine in human serum by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2000, (2): 121-123.
- [6] SITU B, WU M Z, CHANG W J, et al. Determination of caffeine and theophylline in serum by HPLC application in premature pharmacokinetics [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2016, 36(12): 2089-2093.
- [7] ZHAO N P, WANG Z, ZHANG L, et al. Uncertainty evaluation in content determination of caffeine in plasma by HPLC [J]. Pract Pharm Clin Remed(实用药物与临床), 2013, 16(7): 589-592.
- [8] XIE Z, JIANG Y, REN J M, et al. Simultaneous determination of three components of Saridon Tablet in human plasma by RP-HPLC [J] China Pharm(中国药房), 2006, 17(18): 1395-1397
- [9] ZHU P X, WEI W, LU J X, et al. Study of method for dissolution test of Compound Aminopyrine Phenacetin tablets [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(2): 272-275.
- [10] STEER P, FLENADY V, SHEARMAN A, et al. High dose caffeine citrate for extubation of preterm infants: a randomised controlled trial [J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004, 89(6): F499-503.

收稿日期: 2018-06-26

(本文责编: 曹粤锋)