

高速毛细管电泳—电导法测定茶碱的血药浓度^{*}

杨冰仪, 莫金垣, 赖

(中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 高速毛细管电泳技术(HSCE)的主要特点在于通过增大分离电压和缩短毛细管, 将分析速度提高到几秒至几分钟内。采用高速毛细管电泳电导法对测定茶碱的血药浓度进行研究; 优化选择缓冲介质、毛细管长度和内径、分离电压等实验参数, 对从不同方面来提高分析速度进行初步探讨。结果表明: 茶碱在60 s内可以得到较好的分离测定, 线性范围为 $37.85 \sim 0.15 \mu\text{g/mL}$, 最小检出浓度为 $0.08 \mu\text{g/mL}$ 。此法快速、简便、灵敏, 耗费低廉, 符合临床监测血药浓度的要求。

关键词: 高速毛细管电泳; 电导检测; 茶碱; 血药浓度

中图分类号: O658.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 03-0108-03

茶碱是常用的治疗支气管哮喘药(结构见图1), 它的有效血药浓度窄($5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$)^[1], 易产生不良反应, 因此对其进行临床血药浓度监测具有重要的意义。

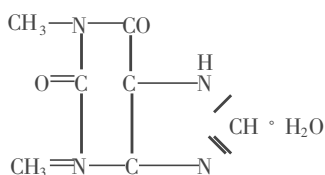


图1 茶碱的结构

Fig. 1 Structure of theophylline

常用的茶碱血药浓度的测定方法有免疫法(RIA)^[1]、高效液相色谱法(HPLC)^[2]和紫外分光光度法(UV)^[3]。RIA法测定准确快速, 但试剂盒昂贵, 不易普及; HPLC应用最广泛, 但分离柱价格昂贵, 易受污染, 对血浆样品的前处理要求高; UV法灵敏度与精密度较低。近年来, 毛细管电泳法(CE)因其具有高效、快速、样品用量少、成本低、柱子不易受污染的优点也被用于体内药物监测。文献报道的CE法测定血清中的茶碱, 主要是采用光学检测^[4,5]。光学检测受到毛细管内径小、光程短的限制, 给检测带来很多不便, 而且设备昂贵, 装置较复杂。

应用毛细管电泳电化学检测(electrochemical detection, EC)法则不受上述限制, 而且装置简单, 方便易行。电导检测(conductometric electrochemical

detection, CEC)是电化学检测中的一种模式, 它的通用性好, 只要被测定样品的电导率和缓冲体系的电导率有一定的差别, 就能被检测出来。尚未见有关于毛细管电泳电导法用于茶碱血药浓度测定的报道。

通常, CE中采用柱长 $50 \sim 100 \text{ cm}$ 、内径 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的毛细管, 分离电压一般小于 300 V/cm , 分析时间在 $5 \sim 30 \text{ min}$, 因此在保持CE高效的特点上, 提高CE的分析速度是CE技术发展的一个前沿方向。1991年Jorgenson等^[6]首次提出了高速毛细管电泳(high-speed capillary electrophoresis或fast capillary electrophoresis, HSCE或Fast-CE)技术, 通过采取不同的方法来使分析时间缩短至几分钟甚至几秒内。本文利用茶碱在碱性缓冲介质中易离子化的结构特点, 首次采用高速毛细管电泳电导法对测定茶碱血药浓度进行了研究, 同时对从不同方面来提高分析速度进行了初步探讨。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 毛细管电泳电化学检测装置(自组装)^[7]; 茶碱(对照品): 中国药品生物制品检定所提供; 氨茶碱注射液(0.125 g/mL): 山东新华药厂; 其余试剂均为分析纯。所需的溶液均用二次蒸馏水配制。

1.2 实验过程

(1) 样本: 大耳白兔, 体质量 2.5 kg 左右, 取血清; 正常人血清, 于 0°C 冰箱保存。

(2) 样品预处理: 含茶碱的血清样品 0.5 mL ,

^{*} 收稿日期: 2002-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29675033); 广东省自然科学基金资助项目(001237)

作者简介: 杨冰仪(1973年生), 女, 讲师, 博士研究生, 现在广东药学院工作; 通讯联系人: 莫金垣; E-mail:

cesmjy@zsu.edu.cn

加0.1 mL 0.1 mol/L HCl 和2.5 mL 氯仿/异丙醇（体积比为1:9），剧烈震荡15 s使其充分混合；2 000 r/min 离心5 min 后分层，弃去上层水相及变性蛋白，下层有机相移出并用氮气吹干；残渣用0.5 mL 5 mmol/L NaOH 溶解。

（3）血药标准溶液的配制：精密称取茶碱标准品适量，配置一定浓度的储备液，临用前稀释成标准系列。在0.5 mL 血清中准确添加系列茶碱标准液，制备成标准血清样品，按样品预处理方法操作，过0.45 μm 滤膜，并进行电泳分析。

（4）电泳实验：分离毛细管使用前依次用0.1 mol/L NaOH、二次蒸馏水、缓冲溶液清洗过，检测池，分离毛细管中装入相同的缓冲溶液，采用虹吸进样。进样后接上高压电源，进行分离检测。

2 结果与讨论

2.1 电泳操作条件 研究了缓冲介质、毛细管内径和长度及工作电压等实验参数对分析检测的影响，得到最优化的电泳操作条件为：10 mmol/L 的三羟甲基氨基甲烷—1 mmol/L 柠檬酸缓冲溶液，50 μm×30 cm 的分离毛细管，20 kV（667 V/cm）的分离电压。

2.2 血清中茶碱的测定

（1）标准曲线、方法回收率和精密度实验：在优化的实验条件下进行电泳分析，考察茶碱的线性范围及检出限。茶碱在37.85~0.15 μg/mL 的浓度范围内，浓度 c （μg/mL）与峰高 Y （输出信号mV）成良好的线性关系，最低检出浓度为0.08 μg/mL；在家兔和人的空白血清中分别加入系列标准的茶碱溶液，进行外标回收率实验，回收率在93.3%~106.7%之间，日内差与日间差的相对标准偏差在1.09%~5.23%之间。

（2）家兔血药浓度的监测：取家兔3只，分别于右耳缘静脉注射φ=5.0%的氨茶碱注射液0.1 mL/kg，给药后0.5、1、2、4、6、8、12 h左耳静脉取血，分离血清，经样品预处理后检测血液浓度。结果表明：家兔在静脉注射1.5 h左右达到血药浓度峰值，与文献报道基本吻合。

（3）茶碱临床血药浓度的测定：3例患者口服茶碱片200 mg，3 h后同时进行高速毛细管电泳电导法和放射免疫法测定其血清茶碱浓度，测定结果见表1。

3 结 论

在优化的实验条件下，茶碱在60 s内可以得到较好的分离测定。用高速毛细管电泳—电导法测

表1 高速毛细管电泳—电导法与放射免疫法测定茶碱血药浓度比较

Tab 1 The results of theophylline in serum detemining by HSCE $c/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$			
受试者编号	1	2	3
HSCE—电导法	15.28	10.20	14.32
RIA 法 ¹⁾	14.68	9.36	13.98

1) 中山大学医学院第一附属医院测试中心提供

定茶碱，样品前处理较简单，毛细管柱不易受血液污染而老化，方法快速、简便、灵敏，耗费低廉，符合临床监测血药浓度的要求。图2为血清中茶碱的毛细管电泳图。

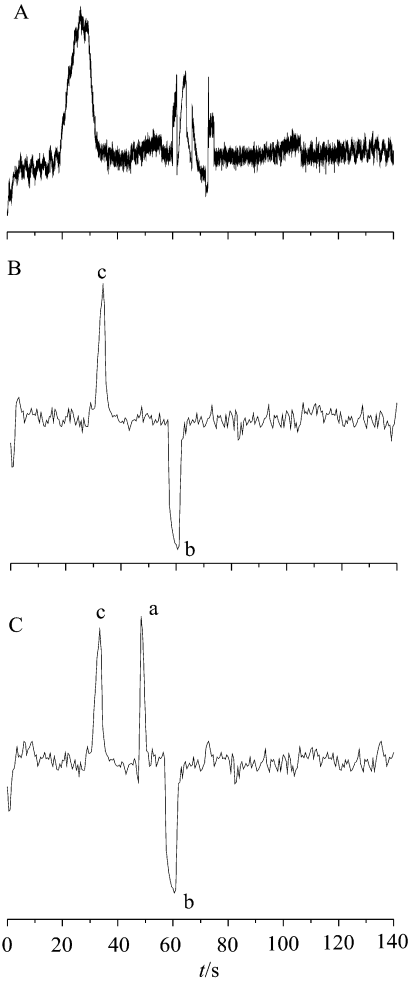


图2 血清中茶碱的毛细管电泳图
Fig 2 Electrophorogram of theophylline in human plasma
A: 未经处理的血清空白;
B: 经过前处理的血清空白（5 mmol/L NaOH 溶解）;
C: 血清样品
a: 茶碱; b: 溶剂峰; c: Na⁺

参考文献:

[1] 江明性. 新编药物学[M] . 北京: 科学出版社, 2000: 9.

[2] 屈建, 宋宇红, 王成军. 高效液相色谱测定血清中的血清[J] . 药物分析杂志, 1991, 11(2) : 153—155.

[3] 罗兰, 廖英姿, 买尔旦, 等. 双波长紫外分光光度法测定氨茶碱血药浓度[J] . 新疆医科大学学报, 2000, 23(4) : 351—352.

[4] 段京莉, 严宝霞. 高效毛细管电泳测定茶碱血药浓度方法的研究[J] . 中国药理学杂志, 1996, 31(2) : 99—101.

[5] 范国荣, 林梅, 胡晋红, 等. 毛细管电泳法测定茶碱血药浓度[J] . 药学进展, 2000, 24(3) : 167—169.

[6] MONNING C A, JORGENSEN J W. On column sample gating for high speed capillary zone electrophoresis[J] . Anal Chem, 1991, 63: 802—807.

[7] YANG X Y, MO J Y, XIE T Y, et al. A new amperometric detection cell for capillary zone electrophoresis[J] . Chin Chem Lett, 1998, 9(8) : 757—760.

Study on Determination of Theophylline in Serum
by High-speed Capillary Electrophoresis with Conductivity Detection

YANG Bing yi, MO Jin yuan, LAI Rong

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The characteristic of high-speed capillary electrophoresis (HSCE) lies in the feasibility to improve the separation speed within several seconds or minutes by increasing the voltage and shortening the length of the capillary . A new method of detemination of theophylline in serum by HSCE with conductivity detection was described. Effects of several important factors were investigated. Under the optimized conditions, theophylline was eluted in 60 seconds with the linear range and the detection limits of 37. 85 ~0. 15 $\mu\text{g/mL}$ and 0. 08 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The method was simple, rapid and highly reliable for clinical drug monitoring of theophylline.

Key words: high-speed capillary electrophoresis; conductivity detection; theophylline; clinical drug monitoring

·简 讯·

中山大学获国家自然科学基金资助大幅上升

最近, 国家自然科学基金委公布了 2002 年自然科学基金面上资助情况, 中山大学向国家自然科学基金申请的面上项目和经费均大幅上升, 共获资助项目 107 项, 比 2001 年增加 30 项; 获资助经费 1935. 5 万元, 比 2001 年增加 615 万元, 从 2001 年全国的第 10 位上升到 2002 年全国第 7 位, 科研实力大大增强。

中山大学所获得的国家自然科学基金资助项目中, 重点项目有 3 项, 专项基金资助项目中的学部主任基金项目有 4 项, 重大研究计划资助项目中的光电信息功能材料项目有 2 项。中山大学已有 15 名青年教师获得国家青年科学基金共 930 万元的资助, 在全国高校中仅次于北京大学、清华大学等 7 所大学, 位居第 8 位。

(本刊通讯员)