

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2023.08.009

· 论著 ·

## 高效液相色谱法测定新生儿咖啡因血药浓度及临床应用

李赛<sup>1</sup>, 李寿林<sup>1</sup>, 苏凌瓔<sup>2</sup>(1. 淮安市妇幼保健院, 江苏淮安 223001; 2. 南京医科大学附属淮安第一人民医院, 江苏淮安 223300)

**[摘要]**目的: 建立测定新生儿血清中咖啡因血药浓度的高效液相色谱法, 并对使用咖啡因治疗原发性呼吸暂停新生儿的血药浓度进行测定。方法: 色谱柱为 ZORBAX Extend C<sub>18</sub> 柱, 流动相为乙腈-水(19:81, V/V), 柱温 25 ℃, 流速 1 mL/min, 检测波长 273 nm。结果: 咖啡因血药浓度在 1.0~160.0 μg/mL 范围内呈良好的线性关系( $r=0.998\ 9$ ), 平均回收率 98.40%~102.40%, 日内与日间相对标准差(RSD)≤9.63%, 检测 10 例患儿给药 7 d 后咖啡因血药浓度为(20.53±11.12) μg/mL。结论: 建立的高效液相色谱法准确、快速, 经验证适用于新生儿血清中咖啡因血药浓度测定。

**[关键词]** 新生儿; 咖啡因; 高效液相色谱法; 血药浓度

**[中图分类号]** R969.3

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1672-108X(2023)08-0031-04

### Determination of Caffeine Blood Concentration in Neonates by High Performance Liquid Chromatography and Its Clinical Application

Li Sai<sup>1</sup>, Li Shoulin<sup>1</sup>, Su Lingying<sup>2</sup>(1. Huai'an Women and Children's Health Care Hospital, Jiangsu Huai'an 223001, China; 2. The Affiliated Huai'an No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Jiangsu Huai'an 223300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of caffeine blood concentration in neonates, and to determine the concentration of caffeine in neonates with primary apnea. **Methods:** The determination was performed on ZORBAX Extend C<sub>18</sub> column with mobile phase acetonitrile-water (19:81, V/V) at the column temperature of 25 ℃ and flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was 273 nm. **Results:** Caffeine blood concentration showed good linearity ( $r=0.998,9$ ) in the range of 1.0 to 160.0 μg/mL, with mean recoveries of 98.40% to 102.40%. Inter-day and intra-day relative standard deviation (RSD) was ≤9.63%. The average caffeine blood concentration in 10 children was (20.53±11.12) μg/mL after 7 d of administration. **Conclusion:** The established high performance liquid chromatography method is accurate, rapid and validated for the determination of caffeine blood concentration in neonates.

**[Keywords]** neonates; caffeine; high performance liquid chromatography; blood concentration

原发性呼吸暂停是新生儿重症监护中常见的临床问题之一,尤其对于胎龄<32 周早产儿<sup>[1]</sup>。咖啡因是一种中枢神经兴奋药物,是治疗早产儿呼吸暂停的重要药物,能够减少呼吸暂停发生,提高撤机成功率,改善肺功能和气体交换,减少支气管发育不良的发生率<sup>[2-3]</sup>。咖啡因具有起效快、不良反应小等优点,近年来,已逐渐代替氨茶碱成为治疗早产儿呼吸暂停的首选药物<sup>[4]</sup>。

目前尚未有明确咖啡因有效血药浓度范围的报道,有研究表明与临床受益相关的咖啡因浓度范围为 8~30 μg/mL<sup>[5]</sup>。接受咖啡因治疗时,当患儿出现烦躁不安、颤抖等神经系统症状,心动过速、高血压等心血管系统症状或呼吸暂停频繁发生时,需及时进行血药浓度监测,调整给药方案<sup>[6-7]</sup>。咖啡因在新生儿体内半衰期较长(3~4 d),存在药物蓄积的可能,尤其对于肝肾功能发育不全患儿。此外,随着矫正胎龄的增加,新生儿咖啡因代谢能力日益增强,应答不充分患儿需考虑较高的维持剂量。在国内咖啡因用于治疗早产儿呼吸暂停时间较短,咖啡因与其他药物的相互作用研究数据有限,当不能确定可能发生的相互作用时,均需及时测定咖啡因血药浓

度,调整治疗方案,确保患儿用药安全。杨俊毅等<sup>[8]</sup>建立了测定成人患者血浆中咖啡因浓度的高效液相色谱(HPLC)法,但其血浆用量需 0.5 mL,内标物选择为茶碱,因在新生儿体内可发生茶碱和咖啡因相互转化,易导致新生儿咖啡因浓度测定不准确。司徒冰等<sup>[9]</sup>建立了 HPLC 法同时测定早产儿体内咖啡因和氨茶碱血药浓度,内标物选择为二羟丙茶碱,但其出峰位置与氨茶碱较接近,不易完全分离,对色谱柱分离效果要求较高。故本研究拟建立适用于新生儿的咖啡因浓度测定,且易操作、测定准确的 HPLC 法。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

Agilent1220 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);AL104 梅特勒电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);XO-D 型超声清洗机(南京先欧仪器制造有限公司);MC-7pro 离心机(群安实验仪器有限公司);WH-3 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);DHG-9101-A 型电热鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有

作者简介:李赛(1987.08-),男,硕士,主管药师,主要从事儿科临床药学工作,E-mail: lisaihafy@163.com。

通信作者:苏凌瓔(1986.03-),女,硕士,副主任医师,主要从事儿科临床药学工作,E-mail: susan.westlife@126.com。

限公司)等。

### 1.2 试剂

咖啡因对照品(批号 AK02391,含量≥99%,万佳标准物质研发中心有限公司);乙酰苯胺(批号 20140620,含量≥99%,国药集团化学试剂有限公司);甲醇(国药集团化学试剂有限公司,色谱级);乙腈(国药集团化学试剂有限公司,色谱级);高氯酸(南京化学试剂有限公司,分析纯);磷酸二氢钾(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);灭菌注射用水(山东齐都药业有限公司,批号 3B21121304,规格 500 mL);健康儿童空白血清(淮安市妇幼保健院检验科提供)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(19:81,V/V);检测波长 273 nm;流速 1 mL/min;柱温 25 °C;进样量 10 μL;液相色谱工作站 Ezchrom Elite。

### 2.2 对照品溶液的配制

2.2.1 咖啡因对照品溶液 精密称取咖啡因对照品 10.1 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为 1.0 mg/mL 咖啡因对照品溶液。

2.2.2 乙酰苯胺对照品溶液 精密称取乙酰苯胺对照品 12.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度为 1.19 mg/mL 乙酰苯胺对照品溶液。

### 2.3 样品处理

精密量取血清样品 200 μL,加入乙酰苯胺对照品溶液 50 μL,涡旋振荡 30 s,加入 10%高氯酸溶液 50 μL,涡旋振荡 3 min,7 000 r/min 离心 10 min,取上清液,微孔滤膜滤过后,进样分析。

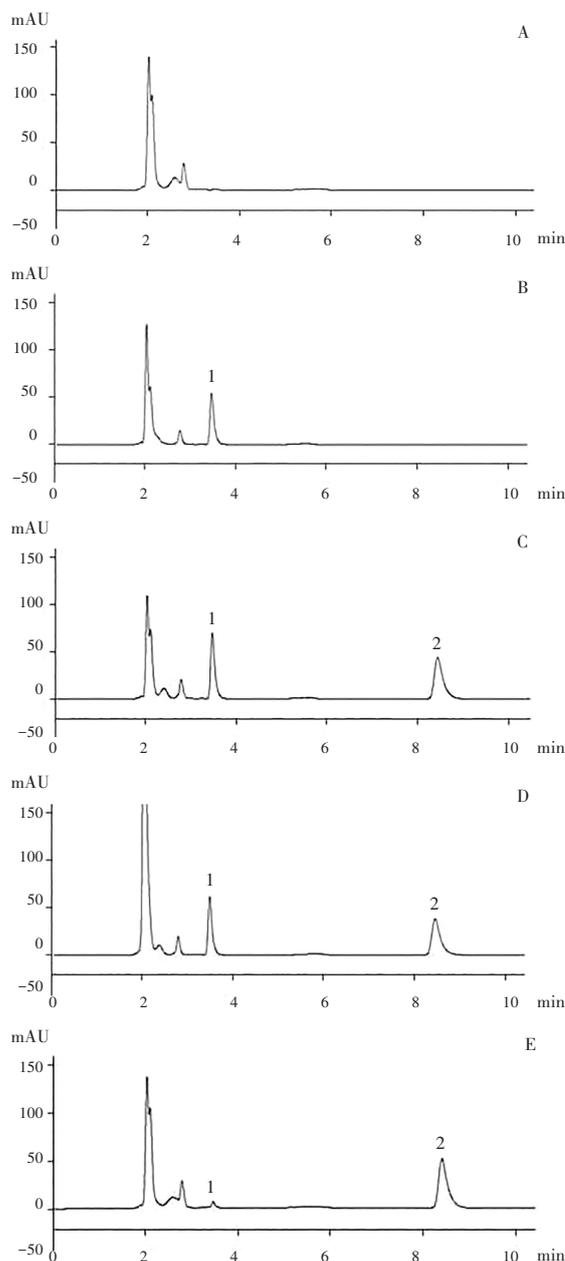
### 2.4 专属性实验

按“2.1”项下色谱条件进行测定,咖啡因和乙酰苯胺色谱峰型较好,分离度>1.5,血清中内源性杂质对咖啡因和乙酰苯胺均无干扰。咖啡因的保留时间为 3.48 min,乙酰苯胺的保留时间为 8.45 min,色谱图见图 1。咖啡因出峰时间稍短于林闯等<sup>[10]</sup>报道的 8.72 min,本方法能够达到更快速检测的目的。

### 2.5 标准曲线的绘制

分别精密吸取“2.2.1”项下稀释后咖啡因对照品溶液适量于 EP 管中,室温氮气吹干,加入空白血清 200 μL,配制成咖啡因浓度分别为 1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0 μg/mL 的系列标准血清。按“2.3”项下方法处理,记录色谱图。以咖啡因与内标峰面积比值(Y)为纵坐标,咖啡因浓度(X, μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,应用 SPSS 软件进行加权线性回归,权重因子选择  $W=1/X^2$ ,见表 1。根据表 1 数据,得加权标准曲线

回归方程为  $Y=0.039\ 65X-0.004\ 65$ , $r=0.998\ 9$ , $n=8$ 。结果表明,咖啡因血药浓度在 1.0~160.0 μg/mL 范围内线性关系良好。按信噪比(S/N)≥10,咖啡因定量限为 0.5 μg/mL,与司徒冰等<sup>[9]</sup>研究结果一致。



A. 空白血清;B. 空白血清+咖啡因;C. 空白血清+咖啡因+乙酰苯胺;D. 患者血清+乙酰苯胺;E. 定量下限;1. 咖啡因;2. 乙酰苯胺

图 1 咖啡因色谱图

表 1 咖啡因标准曲线

| 浓度(X) | 峰面积比值(Y) | 权重因子( $W=1/X^2$ ) |
|-------|----------|-------------------|
| 1.0   | 0.036 5  | 1.000 000 00      |
| 2.5   | 0.087 2  | 0.160 000 00      |
| 5.0   | 0.188 1  | 0.040 000 00      |
| 10.0  | 0.403 9  | 0.010 000 00      |
| 20.0  | 0.775 2  | 0.025 000 00      |
| 40.0  | 1.671 6  | 0.000 625 00      |
| 80.0  | 3.282 7  | 0.000 156 25      |
| 160.0 | 7.020 9  | 0.000 039 06      |

2.6 精密度实验

按“2.5”项下方法配制咖啡因高、中、低(130.0、20.0、2.5 μg/mL)3种浓度血清样品,按“2.3”项下方法处理并进行检测,计算血清中咖啡因血药浓度,每日重复测定5次,重复测定5d,计算日内、日间相对标准差(RSD)。结果表明,咖啡因的高、中、低浓度的日内、日间RSD均<9.63%,符合生物样品分析要求,见表2。

表2 精密度实验结果(n=5)

| 加入浓度/<br>(μg/mL) | 日内               |       | 日间               |       |
|------------------|------------------|-------|------------------|-------|
|                  | 实测浓度/<br>(μg/mL) | RSD/% | 实测浓度/<br>(μg/mL) | RSD/% |
| 130.0            | 127.10±7.48      | 5.89  | 126.68±3.60      | 2.84  |
| 20.0             | 20.44±1.39       | 6.80  | 20.38±1.16       | 5.69  |
| 2.5              | 2.48±0.24        | 9.63  | 2.54±0.23        | 9.06  |

2.7 回收率实验

按“2.5”项下方法配制咖啡因高、中、低(130.0、20.0、2.5 μg/mL)3种浓度血清样品,按“2.3”项下方法处理并进行检测,每个浓度各做5份,记录各浓度样品溶液中测定咖啡因峰面积和内标物峰面积比值,并

根据咖啡因标准曲线和线性回归方程计算各浓度标准品中咖啡因的实测浓度( $R_t$ ),计算咖啡因  $R_t$  与理论浓度( $R_s$ )之比,相对回收率( $R = R_t/R_s \times 100\%$ )。结果显示,咖啡因高、中、低浓度质控样品相对回收率在98.40%~102.40%范围内,符合生物样品分析的要求,见表3。

表3 回收率实验结果(n=5)

| 加入浓度/(μg/mL) | 实测浓度/(μg/mL) | 平均回收率/% | RSD/% |
|--------------|--------------|---------|-------|
| 130.0        | 128.68±5.52  | 98.98   | 4.29  |
| 20.0         | 19.68±1.90   | 98.40   | 9.67  |
| 2.5          | 2.56±0.27    | 102.40  | 10.55 |

2.8 稳定性考察

按“2.5”项下方法配制咖啡因高、中、低(130.0、20.0、2.5 μg/mL)3种浓度血清样品各5份,分别在室温放置12h、4℃放置3d、-80℃放置1个月、-80℃反复冻融3次,按“2.3”项下方法处理并进行检测,考察样品稳定性。结果氨茶碱血清样品浓度无明显变化,提示氨茶碱血清样品在室温放置12h、4℃放置3d、-80℃放置1个月、-80℃反复冻融3次稳定性良好,见表4。

表4 稳定性考察(n=5)

| 加入浓度/<br>(μg/mL) | 室温放置12h      |       | 4℃放置3d       |       | -80℃放置1个月    |       | -80℃反复冻融3次   |       |
|------------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|                  | 实测浓度/(μg/mL) | RSD/% | 实测浓度/(μg/mL) | RSD/% | 实测浓度/(μg/mL) | RSD/% | 实测浓度/(μg/mL) | RSD/% |
| 130.0            | 127.44±6.38  | 5.00  | 126.32±4.00  | 3.17  | 129.72±4.38  | 3.38  | 128.68±4.77  | 3.71  |
| 20.0             | 20.32±1.30   | 6.38  | 20.38±1.75   | 8.59  | 20.26±1.82   | 8.96  | 21.14±1.52   | 7.21  |
| 2.5              | 2.52±0.13    | 5.17  | 2.48±0.25    | 10.04 | 2.52±0.23    | 9.05  | 2.38±0.28    | 11.66 |

2.9 临床应用

本研究经淮安市妇幼保健院伦理委员会批准(伦理号2019069),患儿监护人均已签署知情同意书。随机选取10例于2021年10月至2022年3月在该院新生儿病区接受咖啡因治疗患儿,于给药7d后采集血样,离心后,采用已建立的HPLC法进行血药浓度检测。10例患儿中,男4例,女6例,胎龄(32.07±1.32)周,出生体质量(1.45±0.37)kg,血药浓度(20.53±11.12)μg/mL。因早产儿体内代谢咖啡因差异较大,半衰期为40~230h,估算稳态血药浓度为给药后8~48d,达稳态时间较长且差异大,为保证治疗安全性和有效性,参考文献[9-10],选取给药7d后进行血药浓度检测。7例患儿血药浓度在有效范围内,1例采用较高维持剂量20.30mg/(kg·d),血药浓度>30μg/mL,但监测过程中未发现不良反应。见表5。

测,本试验对可能联用的几种药物,如地塞米松、头孢噻肟、氟康唑、维生素K<sub>1</sub>等进行了分析,结果显示上述药物在该色谱条件下对本试验测定均无干扰,不影响咖啡因血药浓度测定。

表5 10例患儿血清咖啡因血药浓度监测结果

| 序号 | 性别 | 胎龄/<br>周 | 出生体<br>质量/kg | 负荷剂量/<br>[mg/(kg·d)] | 维持剂量/<br>[mg/(kg·d)] | 血药浓度/<br>(μg/mL) |
|----|----|----------|--------------|----------------------|----------------------|------------------|
| 1  | 女  | 30.43    | 1.40         | 14.29                | 10.00                | 15.53            |
| 2  | 女  | 27.29    | 0.69         | 18.84                | 20.30                | 42.98            |
| 3  | 女  | 29.57    | 1.20         | 16.66                | 16.66                | 26.82            |
| 4  | 男  | 31.14    | 1.30         | 29.23                | 13.85                | 6.76             |
| 5  | 女  | 29.57    | 1.60         | 20.00                | 9.38                 | 28.65            |
| 6  | 女  | 32.43    | 2.04         | 19.61                | 9.80                 | 16.86            |
| 7  | 男  | 29.57    | 1.90         | 20.00                | 9.47                 | 4.51             |
| 8  | 女  | 30.00    | 1.40         | 14.28                | 11.43                | 24.60            |
| 9  | 男  | 30.57    | 1.60         | 10.00                | 11.25                | 18.86            |
| 10 | 男  | 30.14    | 1.40         | 14.29                | 7.14                 | 19.75            |

3 讨论

本研究建立了一种测定新生儿血清咖啡因的HPLC检测方法,经方法学验证咖啡因在1.0~160.0μg/mL浓度范围内表现出良好线性关系( $r = 0.9995$ ),平均回收率98.40%~102.40%,日内与日间RSD≤9.63%,均符合要求。临床上联用药物可能影响咖啡因血药浓度检

目前国内外对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HPLC法<sup>[10-12]</sup>。其中,因酶联免疫法因国内无配套试剂盒,LC-MS/MS法仪器价格昂贵等原因,普及程度不高,国内大部分文献均采用HPLC法测定咖啡因浓度。有研究<sup>[8,13-14]</sup>选择茶碱作为内标物质,但此方法并不适用于早产儿血清咖啡因浓度检测,因咖啡因和茶碱可在早产

儿体内发生相互转化。给予茶碱后,咖啡因浓度约为茶碱浓度的 25%;给予咖啡因后,预计 3%~8%咖啡因转化为茶碱。因此,选择合适的内标物,探讨合适的色谱条件,成为准确检测早产儿体内咖啡因血药浓度的关键。本实验选用乙酰苯胺为内标物,出峰时间 8.45 min,能够与咖啡因有效分离,且避免内源物质干扰测定。

流动相选择方面,本实验先后考察了甲醇-水、甲醇-甲酸水、甲醇-乙酸水、甲醇-磷酸二氢钾水和乙腈-水等流动相系统<sup>[9]</sup>。结果显示,采用甲醇-水为流动相时,咖啡因色谱峰拖尾严重,峰形不佳。采用醋酸缓冲体系以及磷酸二氢钾等调节流动相 pH 时,峰形有所改善,但不明显,且缓冲盐的加入会降低色谱柱使用寿命。实验发现,采用乙腈-水作为流动相可明显改善咖啡因峰形,通过调整体积比为 19:81 时,目标峰与杂质峰可完全分离,且 10 min 内可完成出峰,达到快速检测目的。

枸橼酸咖啡因于 2011 年豁免临床试验进入中国市场,由于国内治疗开展时间较短,遗传、种族等因素影响以及早产儿人群药物代谢动力学相关研究资料有限,咖啡因在新生儿人群的不同个体以及胎龄之间血药浓度差异较大。乐娟等<sup>[15]</sup>研究显示,30 例呼吸窘迫综合征早产儿给予相同剂量咖啡因后的谷浓度为 (25.45 ± 11.61) μg/mL,变异系数为 44.88%。本研究中 10 例患儿咖啡因给药 7 d 后浓度为 (20.53 ± 11.12) μg/mL,变异系数达 54.16%,但本研究中选取病例数量有限,需进一步验证。人体代谢咖啡因主要酶为 CYP1A2,若同时使用已有报道的可减缓咖啡因在成人体内清除的活性物质如西咪替丁、酮康唑等,或同时使用可增强咖啡因清除的活性物质如苯巴比妥、苯妥英钠等,均可能影响咖啡因血药浓度。本研究中 2 例患儿咖啡因血药浓度 < 8 μg/mL,调查病例发现以上 2 例患儿均联用苯巴比妥。但本研究中纳入病例较少,目前无法形成具体结论,仍需进一步研究。

本研究通过试验摸索建立 HPLC 法测定新生儿血清中咖啡因血药浓度,采用乙腈-水 (19:81, V/V) 为流动相,乙酰苯胺为内标物,通过对 10 例患儿血清中咖啡因血药浓度测定,确定了本方法的可行性,适于临床常规开展。

#### 参考文献:

[1] 赵颖, 田秀英, 刘鸽. 不同剂量咖啡因治疗早产儿原发性呼吸暂停临床效果评估[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(1): 33-36.  
[2] DU L, TONG X, CHEN C, et al. Caffeine citrate for apnea of prematurity: a prospective, open-label, single-arm study in Chinese neonates [J]. *Frontiers in pediatrics*, 2020, 8: 86. doi:

10.3389/fped.2020.00076.

- [3] SWEET D G, CARNIELLI V, GREISEN G, et al. European consensus guidelines on the management of respiratory distress syndrome--2019 update [J]. *Neonatology*, 2019, 115(4): 432-451.  
[4] SHIVAKUMAR M, JAYASHREE P, NAJIH M, et al. Comparative efficacy and safety of caffeine and aminophylline for apnea of prematurity in preterm ( $\leq 34$  weeks) neonates: a randomized controlled trial [J]. *Indian pediatrics*, 2017, 54(4): 279-283.  
[5] 耿晓萌, 史宝海. 咖啡因在早产新生儿疾病中的临床应用进展[J]. 中国小儿急救医学, 2016, 23(4): 263-267.  
[6] AVILES-OTERO N, KUMAR R, KHALSA D D, et al. Caffeine exposure and acute kidney injury in premature infants with necrotizing enterocolitis and spontaneous intestinal perforation [J]. *Pediatric nephrology*, 2019, 34(4): 729-736.  
[7] ZHANG X, ZHANG H T, YONG L, et al. Clinical effect and safety of different maintenance doses of caffeine citrate in treatment of apnea in very low birth weight preterm infants: a prospective randomized controlled trial [J]. *Chinese journal of contemporary pediatrics*, 2019, 21(6): 558-561.  
[8] 杨俊毅, 蒋学华, 林舒, 等. RP-HPLC 同时测定血浆中对乙酰氨基酚和咖啡因的浓度[J]. 华西药学期刊, 2003, 18(2): 110-112.  
[9] 司徒冰, 吴敏芝, 常伟杰, 等. HPLC 法测定咖啡因和茶碱的血药浓度及在早产儿药动学研究中的应用[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(12): 2089-2093.  
[10] 林闽, 黄志毅, 叶兰. 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.  
[11] LCA B, RBVBA B. Validation of a sensitive UHPLC-MS/MS method for cytochrome P450 probe substrates caffeine, tolbutamide, dextromethorphan, and alprazolam in human serum reveals drug contamination of serum used for research [J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2020, 179: 112983. doi: 10.1016/2019/112983.  
[12] CARMEN L, JAVIER L, ALEJANDRO A G, et al. HPLC method for quantification of caffeine and its three major metabolites in human plasma using fetal bovine serum matrix to evaluate prenatal drug exposure [J]. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2018. doi: 10.1155/2018/2085059  
[13] 曾勇, 高晶. HPLC 同时测定对乙酰氨基酚和咖啡因血药浓度的研究[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(5): 602-604.  
[14] 李莉明, 彭向东, 阳国平, 等. HPLC-MS/MS 同时测定人血浆中对乙酰氨基酚和咖啡因含量的方法学研究[J]. 中南药学, 2010, 8(6): 419-422.  
[15] 乐娟, 彭锐, 何琪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱检测血浆咖啡因浓度方法的建立和临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(8): 703-708.

(编辑:邓境)

(收稿日期:2022-05-18 修回日期:2022-07-13)

《儿科药学期刊》投稿网址: <http://www.ekyxzz.com.cn>。