

• 检验技术与方法 •

紫外分光光度法测定氨茶碱中毒方法的建立与应用

陈姿如,陈礼明,吴 名,杜书明
(武警后勤学院附属医院,天津 300162)

摘 要:**目的** 建立血清中氨茶碱定量分析的紫外分光光度法,探讨对氨茶碱中毒患者实际应用的价值,为临床氨茶碱中毒提供诊疗依据。**方法** 取 0.5 mL 血清加 0.2 mL 的 0.1 mol/L 盐酸溶液,再加入三氯甲烷:异丙醇(95:5)的萃取液 4.0 mL。充分震荡萃取,高速离心,取有机层于另一试管中加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL 混匀反提,高速离心后取氢氧化钠层 50 μ L 紫外扫描。**结果** 血清中氨茶碱最大吸收峰在(275 $\pm$ 1) nm 处,浓度在 5.0~60 μ g/mL 范围内呈线性,回归方程为 $Y=0.0101X+0.0065$,相关系数(r)=0.999 8,回收率为 85.5%~102.4%,相对标准差(RSD)为 3.5%~4.8%。日内、日间 RSD 分别为 3.08%~5.00%和 3.16%~4.95%,最低检出浓度 2.0 μ g/mL。**结论** 该方法操作简便、分析快速、结果准确。为临床诊断氨茶碱中毒提供了一个简便准确的检测方法。

关键词:血液; 氨茶碱; 中毒; 紫外分光光度法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.039 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)08-0890-02

Establishment and application of determination of aminophylline poisoning method by UV spectrophotometry

Chen Ziruo, Chen Liming, Wu Ming, Du Shuming

(Affiliated Hospital of Tianjin Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjing 300162, China)

Abstract:**Objective** To establish a quantitative analysis of serum theophylline UV spectrophotometry, aminophylline poisoning patients to explore the value of practical application, provide the basis for clinical diagnosis and treatment of theophylline poisoning.
Methods 0.2 mL of 0.1 mol/L hydrochloric acid solution was put into 0.5 mL serum, then added 4.0 mL extract liquid. 50 μ L of sodium hydroxide layer was detected by UV scanning after high-speed centrifugation. **Results** The results of serum theophylline absorption maxima was (275 $\pm$ 1) nm, concentration of 5.0~60 μ g/mL range linear regression equation was $Y=0.0101X+0.0065$ ($r=0.9998$). The recovery rate was from 85.5% to 102.4% and the relative standard deviation (RSD) was from 3.5% to 4.8%. The intra-day and inter-day RSD were 3.08%~5.00% and 3.16%~4.95%. The minimum detectable concentration was 2 μ g/mL. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate results for detecting aminophylline poisoning.

Key words: blood; aminophylline; poisoning; ultraviolet spectrophotometry

氨茶碱(Aminophylline)是一种常用药,临床应用广泛,尤其是治疗支气管哮喘患儿的常用药。由于氨茶碱的有效治疗剂量与中毒剂量非常接近,容易导致中毒而出现中毒症状。随着近年中国城市工业化的发展,环境污染日趋严重,哮喘尤其是小儿哮喘的发病率逐年增高,氨茶碱中毒的病例也随之越来越多。另外,有一部分患者是因情感纠葛、生气而自杀性地误服氨茶碱中毒^[1]。临床上迫切需要快速检验氨茶碱中毒的方法,为临床急救提供诊断依据。作者根据自己实验室条件,参考文献^[2-5],建立了适用于氨茶碱中毒快速检验的双光束紫外分光光度法,应用于临床能够明确诊断是否氨茶碱中毒,并开展了氨茶碱血药浓度检测,对患者个体化用药有重要意义^[6]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 50 例氨茶碱中毒患者,女性 38 例,男性 12 例,均出现呕吐,烦躁不安,呼吸、心跳加快等中毒症状。健康人血清和中毒患者血清来源于医院急诊科。

1.2 检测原理 氨茶碱在 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中,在(275 $\pm$ 1) nm 处有最大吸收峰,根据其吸收峰的吸光度大小与氨茶碱浓度成正比的特点计算其浓度。

1.3 仪器与试剂 UV-2600 双光束紫外/可见分光光度计,50 μ L 微量比色池(上海天美科学仪器有限公司),LG16-B 高速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司),SK-1 型快速混匀器

(常州国华电器有限公司)。氨茶碱标准品(纯度 99.0%,天津希思思生化科技有限公司),三氯甲烷、异丙醇为分析纯。

1.4 方法 取带盖塑料试管标注 V 和 B, V 管加患者血清 0.5 mL, B 管加健康人混合血清 0.5 mL, 分别加 0.1 mol/L 的盐酸溶液 0.2 mL, 再加入三氯甲烷:异丙醇(95:5)的萃取液 4.0 mL。用 SK-1 型快速混匀器充分震荡萃取,静置 5 min,以 8 000 r/min 高速离心 5 min,取有机层分别于另一试管中,再加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2.0 mL 反提,充分震荡,以 8 000 r/min 高速离心 5 min,取氢氧化钠层待用。设定扫描波长范围为 200~400 nm 处,取 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 50 μ L 于微量比色杯中做基线测量,然后扫描 V 和 B 管的氢氧化钠溶液层,氨茶碱最大吸收峰在(275 $\pm$ 1) nm 处。根据(275 $\pm$ 1) nm 处的最大吸收峰进行定性,查标准曲线或回归方程求出患者血清中氨茶碱浓度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件进行统计学处理,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 氨茶碱最大吸收峰 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液配制 100 μ g/mL 的氨茶碱标准贮备液。然后再用 0.1 mol/L 氢氧化钠稀释氨茶碱贮备液,使其氨茶碱浓度为 30、20、10 μ g/mL 的标准应用液。以 0.1 mol/L 氢氧化钠为空白做基线测量,分

别对氨茶碱标准应用液进行扫描。结果氨茶碱在(275±1)nm 处有最大吸收峰。因此确定(275±1)nm 为氨茶碱检测波长,这与文献[3]报道相符。

2.2 空白试验 取健康人混合血清 0.5 mL,分别加入 3 个带塞塑料试管中,按本文 1.4 方法萃取血清样品。用其中 1 份 50 μL 做基线扫描,然后扫描其他 2 份空白液。空白试验表明:健康人血清在 220~400 nm 无吸收峰。

2.3 线性范围与检出限 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液精确配制 100 μg/mL 的氨茶碱标准贮备液。取配制好的 100 μg/mL 的氨茶碱标准贮备液,用健康人混合血清逐级稀释为 0.0、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、80.0 μg/mL 的氨茶碱工作应用液,取 0.5 mL 于 7 个带盖塑料试管中。分别加 0.2 mL 的 0.1 mol/L 盐酸溶液,再加萃取液 4.0 mL。下面步骤按方法按本文 1.4 操作进行。设定扫描波长范围为 200~400 nm,取 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 50 μL 于微量比色杯中做基线测量,然后扫描不同浓度的氨茶碱标准和空白管上层液(氢氧化钠溶液层),氨茶碱最大吸收峰在(275±1)nm。按上述操作方法做 5 次平行试验,根据在(275±1)nm 测定的平均吸光度值(Y)并对氨茶碱质量浓度(X)进行回归,得线性回归方程 $Y=0.0101X+0.0065$,相关系数(r)=0.9998,线性范围为 5.0~60 μg/mL,氨茶碱最低检出浓度为 2.0 μg/mL。

2.4 精密度试验 取健康人混合血清 20.0 mL,分别配制 0.0、5.0、10.0、15.0、20.0 μg/mL 氨茶碱浓度血清样品,分别取其 0.5 mL 于 5 支塑料试管中。其他操作按本文 1.4 操作进行。在同一日不同时间及不同日间按上述方法测定氨茶碱浓度($n=5$),计算日内日间相对偏差,结果见表 1。

表 1 血清中氨茶碱浓度的精密度试验结果($n=5$)

氨茶碱浓度 (μg/mL)	日内		日间	
	$\bar{x}$ (μg/mL)	RSD(%)	$\bar{x}$ (μg/mL)	RSD(%)
5.0	4.86	3.08	5.05	3.16
10.0	9.65	4.35	10.85	4.79
15.0	15.95	5.00	14.55	4.12
20.0	19.20	4.11	20.40	4.95

2.5 方法回收率试验 采用加入回收法,取健康人混合血清配制的氨茶碱浓度为 5.0 μg/mL 的血清样品 1.0 mL,分别加入 5.0、10.0、15.0、20.0、30.0 μg 氨茶碱标准品混匀,理论浓度值为 10.0、15.0、20.0、25.0、35.0 μg/mL,各取 0.5 mL 于带盖塑料试管中,并取空白血清 0.5 mL 作对照,按本文 1.4 操作进行($n=5$),求出回收率值。结果经统计学处理,其回收率为 85.5%~102.4%,相对标准差(RSD)为 3.5%~4.8%。

表 2 血清中氨茶碱浓度的回收试验结果($n=5$)

配置浓度(μg/mL)	实测浓度(μg/mL)	RSD(%)	回收率(%)
15.0	13.8	3.5	92.0
20.0	17.1	3.8	85.5
25.0	25.6	4.8	102.4
35.0	32.1	4.5	91.7

2.6 血清氨茶碱定量与血液透析 氨茶碱有效治疗浓度较小(5~20 μg/mL),个体差异大,当血药浓度低时,不能有效缓解

哮喘,血药浓度高又会引起中毒症状,在临床上经常遇见氨茶碱中毒病例。本文统计 50 例氨茶碱中毒患者,血液氨茶碱透析前后浓度分别为(48.80±21.70)μg/mL 和(7.62±3.86)μg/mL,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明及时进行透析治疗是降低氨茶碱血药浓度,控制中毒症状发作的有效措施。

3 讨论

目前测定氨茶碱血药浓度的方法包括高效液相色谱法(HPLC)、荧光偏振法(TDX)、均相酶免疫法等,但这些方法所需仪器昂贵,操作繁琐,当疑似氨茶碱中毒需要做出鉴别时,上述仪器是不能做出快速鉴定的,紫外分光光度法则显现出快速、简便、准确的优点。作者参考有关 HPLC 和紫外分光光度法文献^[7-10],根据自己实验室中毒标本较多的情况,建立了适用于氨茶碱中毒快速检测的双波长紫外分光光度法,对样本的萃取进行了改良,减少反提液 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液的量,提高方法的检出率和准确度,增加离心速度(8 000 r/min),提高了氢氧化钠扫描液的清晰度,使测定减少了许多干扰因素。本方法测定氨茶碱血清药物浓度的方法回收率为 83.8%~102.8%,RSD 为 3.1%~4.9%。日内、日间 RSD 分别为 3.08%~5.00%和 3.16%~4.95%,最低检出浓度 2.0 μg/mL。本方法操作简便、分析快速、结果准确,比较适用于基层医院开展氨茶碱血药浓度监测,实行个体化用药^[11-12],避免或减少茶碱中毒的危险;另外通过氨茶碱测定方法的实际应用表明:该方法操作时间不多于 20 min,非常适用于对疑似氨茶碱中毒的快速诊断和疗效观察。

参考文献

[1] 陈礼明,陈姿如,杜书明. 化学性药物中毒 1244 例临床分析[J]. 武警医学院学报,2008,17(5):431-432.

[2] 吴文飞,刘明忠. 一阶导数紫外分光光度法测定气喘合剂中氨茶碱含量[J]. 药学实践杂志,1999,17(3):157-159.

[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] 曾明光,吴正中,谢玉琼,等. 高效液相色谱法快速测定血清茶碱浓度及临床应用[J]. 中国医院药学杂志,2003,23(12):738-739.

[5] 黄健,张明雄,戴志凌,等. 反相高效液相色谱法测定茶碱的血药浓度[J]. 中国药业,2003,12(12):70-71.

[6] 周育无. 氨茶碱血药浓度监测及个体化给药方案设计[J]. 中国实用医药,2008,3(5):11-12.

[7] 李乃青,李岩,潘作东,等. 紫外分光光度法测定氨茶碱的血浆药物浓度[J]. 中国医学工程,2009,17(3):202-204.

[8] 王爱凤,赵红卫,时艳平,等. 改进的 HPLC 法测定血清茶碱的浓度[J]. 数理医药学杂志,2002,15(5):470.

[9] 邓子煜,华建. 高效液相色谱法测定人体血清中茶碱浓度[J]. 蚌埠医学院学报,2001,26(3):266-267.

[10] 梁增杰,伍良. 氨茶碱血药浓度的临床监测及分析[J]. 现代医院,2006,6(6):95-96.

[11] 夏培源. 10 例临床监测氨茶碱血药浓度过高的讨论[J]. 中国医院药学杂志,1985,5(6):248-249.

[12] 许静,李燕,徐进,等. 氨茶碱治疗小儿哮喘的血药浓度监测分析[J]. 儿科药学杂志,2004,10(1):31-32.