# 咖啡因及代谢产物的尿药浓度测定方法建立及临床应用Δ

陈相龙[1,2*],赵　杨[2],黄琼叶[2],徐铭卿[2],李　悦[3],陆　超[3],孙鲁宁[2#a],王永庆[1,2#b](1.徐州医科大学药学院/江苏省新药研究与临床药学重点实验室,江苏 徐州　210004;2.南京医科大学第一附属医院临床药理研究室,南京 210029;3.江苏省妇幼保健院儿科,南京　210036)

**中图分类号**　R969.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2023)18-2233-05
**DOI**　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.18.11

**摘　要　目的**　建立同时测定尿液中咖啡因及3种代谢产物茶碱、副黄嘌呤和可可碱浓度的方法并应用于临床。**方法**　以咖啡因-$^{13}C_3$-d3为内标,尿液样本经乙腈沉淀蛋白后,采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术测定咖啡因及3种代谢产物的浓度。以Waters ACQUITY UPLC® BEH HILIC为色谱柱,60 mmol/L乙酸铵溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱,流速为0.5 mL/min,柱温为38 ℃,进样量为2 μL。采用电喷雾离子源,以多反应监测模式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为*m/z* 195.1→110.0(咖啡因)、*m/z* 181.1→124.0(茶碱)、*m/z* 181.1→124.0(副黄嘌呤)、*m/z* 181.1→138.0(可可碱)、*m/z* 198.1→140.1(内标)。采用上述方法测定19例早产儿呼吸暂停(AOP)患儿尿液中咖啡因及3种代谢产物的浓度。**结果**　咖啡因、茶碱、副黄嘌呤、可可碱检测质量浓度的线性范围分别为0.200～200、0.050～50.0、0.050～50.0、0.100～100 μg/mL(*r*均大于0.990),定量下限分别为0.200、0.050、0.050、0.100 μg/mL;日内、日间精密度的RSD均不高于10.37%,基质因子为85.68%～109.90%,提取回收率为93.53%～109.40%(RSD均小于15%),稳定性试验的RSD均小于15%。19例AOP患儿尿液中咖啡因及3种代谢产物的质量浓度分别为(27.346±7.951)、(0.351±0.223)、(0.428±0.395)、(0.472±0.374)μg/mL。**结论**　所建HPLC-MS/MS法操作简单、灵敏度高,可用于AOP患儿尿液中咖啡因及3种代谢产物浓度的测定。

**关键词**　咖啡因;代谢产物;早产儿呼吸暂停;尿药浓度;高效液相色谱-串联质谱法

## Method establishment and clinical practice for concentration determination of caffeine and its metabolites in urine

CHEN Xianglong[1,2], ZHAO Yang[2], HUANG Qiongye[2], XU Mingqing[2], LI Yue[3], LU Chao[3], SUN Luning[2], WANG Yongqing[1,2] (1. School of Pharmacy/Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy, Xuzhou Medical University, Jiangsu Xuzhou 210004, China; 2. Research Division of Clinical Pharmacology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 3. Dept. of Pediatrics, Jiangsu Women and Children Health Hospital, Nanjing 210036, China)

**ABSTRACT　OBJECTIVE** To establish a method for concentration determination of caffeine and its three metabolites, theophylline, paraxanthine and theobromine in urine, and apply it in clinical practice. **METHODS** Using caffeine-$^{13}C_3$-d3 as internal standard (IS), and the urine samples were protein precipitated with acetonitrile; HPLC-MS/MS method was adopted to determine the concentrations of caffeine and its three metabolites. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLC® BEH HILIC column with mobile phase consisting of 60 mmol/L ammonium acetate (A)-acetonitrile (B) (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was set at 38 ℃, and the sample size was 2 μL. The electrospray ionization detection was operated in a positive mode by multiple reaction monitoring. The detection ions for quantitative analysis were *m/z* 195.1→110.0 for caffeine, *m/z* 181.1→124.0 for theophylline, *m/z* 181.1→124.0 for paraxanthine, *m/z* 181.1→138.0 for theobromine, and *m/z* 198.1→140.1 for IS. The above method was used to determine the concentrations of caffeine and its three metabolites in the urine of 19 infants with apnea of prematurity (AOP). **RESULTS** The linear ranges of mass concentration of caffeine, theophylline, paraxanthin and theobromine were 0.200-200, 0.050-50.0, 0.050 0-50.0, and 0.100-100 μg/mL, respectively. The lower limits of quantification were 0.200, 0.050, 0.050 and 0.100 μg/mL (*r*>0.990), respectively. RSDs of intra-day and intra-day precision were not above 10.37%, and matrix factors were 85.68%-109.90%; extraction recoveries were 93.53%-109.40% (RSD≤15%), and RSDs of stability tests were all lower than 15%. The concentrations of caffeine and its three metabolites in the urine of 19 cases were (27.346±7.951), (0.351±

Δ**基金项目** 国家卫生健康委计划生育药具不良反应监测中心/江苏省卫生健康发展研究中心开放课题(No. JSHD2021004, No. JSHD2021011)

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:025-68305001。E-mail:820695430@qq.com

#a **通信作者** 副主任药师,副教授,硕士生导师,博士。研究方向:体内药物分析、临床药理学。E-mail:sunluning0521@aliyun.com

#b **通信作者** 主任药师,教授,博士生导师,博士。研究方向:临床药学、临床药理学。电话:025-68307601。E-mail:wyqjsph@163.com

0.223)，(0.428±0.395) and (0.472±0.374) μg/mL，respectively. **CONCLUSIONS** The established HPLC-MS/MS method is simple，sensitive and can be used for the determination of caffeine and its three metabolites in urine samples of AOP.
**KEYWORDS** caffeine；metabolites；apnea of prematurity；urinary drug concentration；HPLC-MS/MS

早产儿呼吸暂停(apnea of prematurity，AOP)是指早产儿呼吸暂停时间超过20 s，或呼吸暂停持续时间不足20 s但伴有皮肤青紫、心动过缓、血氧下降等情况[1]，严重者会导致机体严重缺氧，从而引起并发症，甚至死亡。

咖啡因是预防和治疗AOP的首选药物，与其他甲基黄嘌呤类药物相比，咖啡因的半衰期更长，治疗范围更广，成本效益更高[2-3]。咖啡因主要经肝脏代谢，可生成茶碱、可可碱和副黄嘌呤3种主要代谢产物，其中茶碱具有类似咖啡因的兴奋作用但相对较弱，可可碱和副黄嘌呤具有轻微的中枢神经系统刺激作用，能促进呼吸[4-5]。咖啡因的代谢和排泄很大程度取决于肝药酶和肾功能的发育程度[4,6]。由于早产儿体内肝药酶不足，肾功能尚未发育成熟，因此，咖啡因在早产儿体内的血浆清除率极低，半衰期可达101 h，易产生蓄积，而引发烦躁不安、呕吐、心动过速、脑和肠系膜血流速度降低等不良反应，还可增加脑出血和坏死性小肠结膜炎的发生风险[7-8]。

目前，关于咖啡因治疗的最佳剂量和时机尚无标准方案，尤其是胎龄小于29周的早产儿[7]。因此，咖啡因治疗AOP时，更加需要注意药物剂量和浓度监测。有研究表明，在早产儿的血液和尿液中，咖啡因的血药浓度和尿药浓度具有相关性[9]，这提示可以通过检测早产儿尿液中的咖啡因浓度来调整用药剂量，以避免血样采集对早产儿造成的创伤。基于此，本研究采用高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass，HPLC-MS/MS)技术测定了早产儿尿液中咖啡因及3种代谢产物(茶碱、可可碱、副黄嘌呤)的浓度并应用于临床，以分析早产儿体内咖啡因代谢的特点，旨在为咖啡因最佳剂量的探寻提供方法学基础，也为患儿的个体化治疗和临床安全用药提供依据。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括1290 Infinity型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、API 4000型三重四极杆液质联用仪(美国应用生物系统公司)、BP 211D型电子天平(德国Sartorius公司)、PCB-11型涡旋混合仪(德国Eppendorf公司)、Stratos型高速冷冻离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]、Milli-Q Gradient型纯水仪[密理博(中国)有限公司]。

### 1.2 主要药品与试剂

咖啡因对照品(批号1-SYC-135-1，纯度98%)、咖啡因-$^{13}C_3$-d3(内标，批号1-NAZ-37-1，纯度98%)、可可碱对照品(批号1-PYL-44-1，纯度98%)、茶碱对照品(批号ZZS-20-185-D6，纯度100%)、副黄嘌呤对照品(批号2-AAH-100-1，纯度99.14%)均购自加拿大Toronto Research Chemicals公司；甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯；乙酸铵为分析纯；水为纯水。

### 1.3 空白尿液

健康成人尿液由本研究室提供，于－40 ℃冷冻保存。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱与质谱条件

#### 2.1.1 色谱条件

以Waters ACQUITY UPLC® BEH HILIC(2.1 mm×150 mm，1.7 μm)为色谱柱，60 mmol/L乙酸铵溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0～4.2 min，1%A；4.2～4.5 min，1%A→45%A；4.5～6.0 min，45%A；6.0～6.2 min，45%A→1%A；6.2～7.5 min，1%A)；流速为0.5 mL/min；洗脱时间为7.5 min；柱温为38 ℃；进样量为2 μL。

#### 2.1.2 质谱条件

采用电喷雾离子源，以多重反应监测模式进行正离子扫描；离子源电压为4 500 V；温度为650 ℃；雾化气压为45 psi；涡轮气压为65 psi；气帘气压为35 psi；碰撞气压为10 psi。用于定量分析的其他参数见表1。

**表1 咖啡因及代谢产物、内标定量分析的其他参数**

| 待测成分 | 离子对*m/z* | 去簇电压/V | 射入电压/V | 碰撞能量/eV | 碰撞室射出电压/V | 保留时间/min |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 咖啡因 | 195.1→110.0 | 89.0 | 9.0 | 32.0 | 20.0 | 2.16 |
| 内标 | 198.1→140.1 | 77.0 | 9.0 | 27.0 | 25.0 | 2.16 |
| 茶碱 | 181.1→124.0 | 82.0 | 8.0 | 28.0 | 21.0 | 2.56 |
| 副黄嘌呤 | 181.1→124.0 | 74.0 | 6.0 | 29.0 | 19.0 | 2.78 |
| 可可碱 | 181.1→138.0 | 96.0 | 9.0 | 24.0 | 26.0 | 2.51 |

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 对照品储备液及内标储备液

精密称取咖啡因对照品10.20 mg、茶碱对照品10.00 mg、副黄嘌呤对照品10.09 mg(均经纯度校正为10.00 mg)，分别置于10 mL容量瓶中，加入50%甲醇溶解并定容，得咖啡因、茶碱、副黄嘌呤质量浓度均为1.00 mg/mL的单一对照品储备液。精密称取可可碱对照品10.00 mg(经纯度校正为10.00 mg)，置于10 mL容量瓶中，加入二甲基亚砜溶解并定容，得可可碱质量浓度为1.00 mg/mL的对照品储备液。精密称取内标10.00 mg(经纯度校正为10.00 mg)，置于10 mL容量瓶中，加入50%甲醇溶解并定容，得质量浓度为1.00 mg/mL的内标储备液。上述各储备液均于－40 ℃保存备用。

#### 2.2.2 标准曲线溶液和质控工作溶液

精密吸取“2.2.1”项下咖啡因、可可碱、茶碱和副黄嘌呤对照品储备液，加入50%甲醇稀释，得咖啡因质量浓度为0.200、0.400、1.20、4.00、12.0、40.0、120、180、200 μg/mL，可可碱质量浓度为0.100、0.200、0.600、2.00、6.00、20.0、60.0、90.0、100 μg/mL，茶碱、副黄嘌呤质量浓

度均为0.050、0.100、0.300、1.00、3.00、10.0、30.0、45.0、50.0 μg/mL的系列混合标准曲线溶液(以各成分质量浓度最低值为定量下限)。同法制得咖啡因质量浓度为0.500、6.00、10.0、160 μg/mL,可可碱质量浓度为0.250、3.00、5.00、80.0 μg/mL,茶碱、副黄嘌呤质量浓度均为0.125、1.50、2.50、40.0 μg/mL的质控工作溶液。上述各溶液均于-40 ℃保存备用。

2.2.3 内标工作溶液

精密吸取"2.2.1"项下内标储备液50 μL,置于1.5 mL EP管中,精密加入乙腈950 μL,涡旋混匀,得质量浓度为50.0 μg/mL的内标溶液;精密吸取上述内标溶液,置于100 mL容量瓶中,加入乙腈定容,得质量浓度为50.0 ng/mL的内标工作溶液,于4 ℃保存备用。

### 2.3 尿液样本预处理

精密吸取尿液样本10 μL,置于1.5 mL EP管中,加入"2.2.3"项下内标工作溶液150 μL,涡旋10 min;于4 ℃下,以16 000 r/min离心15 min,取上清液20 μL,加入乙腈180 μL稀释,涡旋混匀后,取上清液进样测定。

### 2.4 方法学考察

参照2020年版《中国药典》(四部)通则"9012"[10]对方法的专属性、标准曲线、精密度、准确度、基质效应、回收率、稳定性进行验证。

2.4.1 专属性考察

精密吸取6个不同来源的空白尿液样本10 μL,分别加入乙腈150 μL,按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定,记录空白尿液色谱图(图1A)。精密吸取"2.2.2"项下定量下限质量浓度溶液5 μL,挥干,加入空白尿液10 μL,涡旋混匀,分别加入乙腈150 μL,按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定,记录色谱图(图1B)。精密吸取"2.2.2"项下定量下限质量浓度溶液5 μL,挥干,加入患儿给药0~4 h后的尿液样本10 μL,涡旋混匀,分别加入乙腈150 μL,按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定,记录色谱图(图1C)。结果表明,尿液样本中内源性物质不干扰各成分和内标的测定。

2.4.2 标准曲线绘制

精密吸取"2.2.2"项下系列混合标准曲线溶液5 μL,挥干,加入空白尿液10 μL,涡旋混匀,按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定。以各待测成分质量浓度为横坐标($X$)、各待测成分与内标峰面积的比值为纵坐标($Y$),采用加权最小二乘法(加权因子为$1/X^2$)进行线性拟合。结果见表2。

2.4.3 精密度与准确度试验

取"2.2.2"项下定量下限质量浓度溶液和质控工作溶液,各质量浓度平行5份,按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定,考察日内精密度;连续测定3 d,考察日间精密度。将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,以相对误差(relative error,RE)考察准确度。结果显示,日内、日间精密度的RSD均不高于10.37%,RE为-5.00%~12.00%。结果见表3。

2.4.4 基质效应和提取回收率

取6个不同来源的空白尿液样本,加入"2.2.2"项下质控工作溶液,按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定,记录峰面积($A_1$);取6个不同来源的空白尿液样本,加入乙腈沉淀后,再加入"2.2.2"项下质控工作液及内标溶液(取内标储备液,加入50%甲醇稀释,得质量浓度为3 μg/mL),按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定,记录峰面积($A_2$);取EP管数支,加入"2.2.2"项下质控工作溶液,再加入初始比例的流动相溶液,按"2.3"项下方法预处理后,再按"2.1"项下条件进样测定,记录峰面积($A_3$)。基质因子$=A_2/A_3\times100\%$,提取回收率$=A_1/A_2\times100\%$。结果显示,咖啡因及3种代谢产物的基质因子为85.68%~109.90%,提取回收率为93.53%~109.40%,RSD均小于15%。

2.4.5 稳定性考察

按"2.2.2"项下方法分别制备低、高质量浓度的质控样本溶液(咖啡因质量浓度分别为0.500、160 μg/mL,可可碱分别为0.250、80.0 μg/mL,茶碱和副黄嘌呤均分别为0.125、40.0 μg/mL),各质量浓度平行3份,分别于室温下放置10 h、进样器放置20 h、长期冻存(-40、-80 ℃冻存45 d)和反复冻融3次(-40、-80 ℃)后,按"2.3"项下方法预处理,再按"2.1"项下条件进样测定,考察上述不同条件下各样品的稳定性。结果显示,各样品在上述不同条件下的稳定性良好,RSD均小于15%。

### 2.5 临床应用

2.5.1 纳入与排除标准

本研究的纳入标准为:(1)胎龄<34周;(2)伴有呼吸暂停,呼吸暂停时间>20 s,或伴有心率下降(心率<100次/min)或经皮血氧饱和度<80%。

本研究的排除标准为:(1)体温>38.5 ℃或<36.0 ℃;(2)临床怀疑或证实的败血症、中枢神经系统感染;(3)临床证实的缺氧缺血性脑病、癫痫;(4)临床怀疑或确诊的坏死性小肠结肠炎;(5)红细胞压积>65%或<40%;(6)血尿素氮>20 mg/dL或尿量<1 mL/(kg·h);(7)心脏超声证实动脉导管未闭并伴有血流动力学显著异常;(8)严重的先天性心脏病,如大动脉转位、左室发育不良综合征等;(9)颅内出血Ⅲ、Ⅳ级;(10)单纯阻塞性呼吸暂停,如颈部过度屈曲、气道分泌物过多等;(11)确诊的先天性气道发育畸形、先天性中枢神经系统发育异常等;(12)母亲有精神疾病或长期口服精神类药物;(13)母亲妊娠期使用吗啡类药物或药物成瘾者;(14)父母系近亲结婚或患儿有先天性遗传代谢性疾病等。

2.5.2 资料来源

收集2021年11月-2022年3月江苏省妇幼保健院收治的19例AOP患儿,其中男性9例,女性10例,胎龄(27.7±1.7)周,出生体重(1.08±0.34)kg。本研究方案经医院医学伦理委员会批准,伦理号为2021-SR-547。所有患儿监护人均签署了知情同意书。

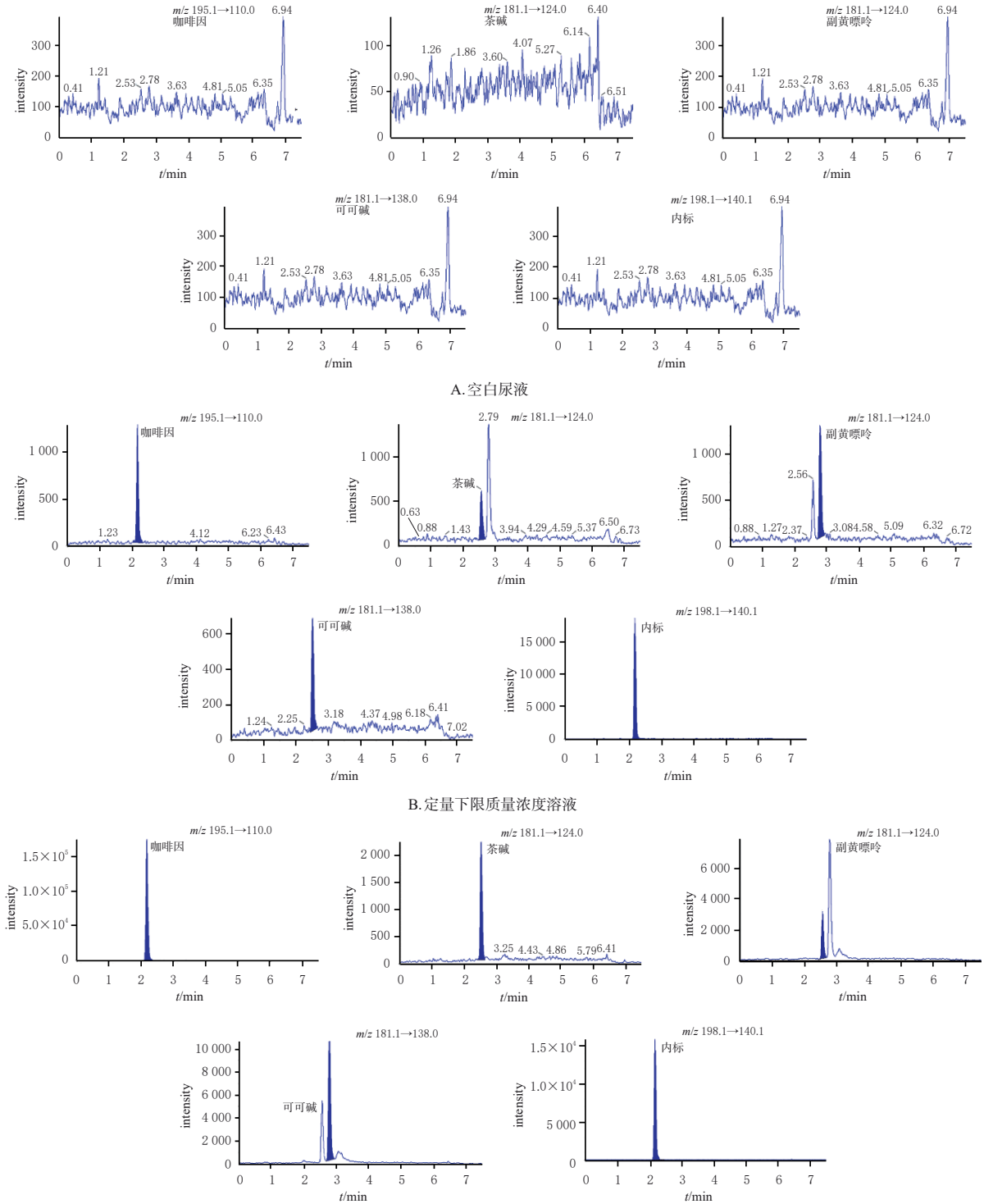


**图1　咖啡因及代谢产物的典型色谱图**

**表2　咖啡因及代谢产物的回归方程与线性范围**

| 待测成分 | 回归方程 | $r$ | 线性范围/(μg/mL) |
|---|---|---|---|
| 咖啡因 | $Y$=0.291$X$+0.007 | 0.997 | 0.200～200 |
| 茶碱 | $Y$=0.579$X$+0.002 | 0.998 | 0.050～50.0 |
| 副黄嘌呤 | $Y$=1.670$X$−0.019 | 0.998 | 0.050～50.0 |
| 可可碱 | $Y$=0.347$X$+0.001 | 0.997 | 0.100～100 |

2.5.3　用药情况、检测方法及检测结果

所有患儿均给予枸橼酸咖啡因注射液[意大利Alfasigma S.p.A.，国药准字HJ20181129，规格1 mL∶20 mg(相当于咖啡因10 mg)]。给药剂量为：以20 mg/kg(以药品中咖啡因含量计算，下同)为负荷剂量，静脉输注30 min后，间隔24 h，以10 mg/kg为维持剂量，每24 h缓慢静脉输注15 min。待枸橼酸咖啡因注射液静脉滴注0～4 h后，取患儿尿液样本，按“2.3”项下方法预处理后，再按“2.1”项下条件进样测定。结果显示，患儿尿液中咖啡因、茶碱、副黄嘌呤、可可碱的质量浓度分别为(27.346±7.951)、(0.351±0.223)、(0.428±0.395)、(0.472±0.374)μg/mL。

表3　咖啡因及代谢产物的精密度与准确度试验结果

| 待测成分 | 理论质量浓度/(μg/mL) | 日内($n$=5) | | | 日间($n$=15) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 实测质量浓度/(μg/mL) | RSD/% | RE/% | 实测质量浓度/(μg/mL) | RSD/% | RE/% |
| 咖啡因 | 0.200 | 0.19±0.01 | 6.37 | −5.00 | 0.19±0.01 | 4.45 | −5.00 |
| | 0.500 | 0.55±0.03 | 4.78 | 10.00 | 0.54±0.04 | 6.78 | 8.00 |
| | 6.00 | 6.71±0.39 | 5.86 | 11.83 | 6.54±0.29 | 4.46 | 9.00 |
| | 10.0 | 11.06±0.40 | 3.59 | 10.60 | 10.99±0.51 | 4.66 | 9.90 |
| | 160 | 155.00±7.97 | 5.14 | −3.12 | 160.21±11.40 | 7.12 | 0.13 |
| 茶碱 | 0.050 | 0.05±0.01 | 8.92 | 0 | 0.05±0.01 | 9.30 | 0 |
| | 0.125 | 0.14±0.01 | 6.38 | 12.00 | 0.13±0.01 | 8.49 | 4.00 |
| | 1.50 | 1.68±0.08 | 4.87 | 12.00 | 1.63±0.09 | 5.58 | 8.67 |
| | 2.50 | 2.74±0.13 | 4.57 | 9.60 | 2.70±0.17 | 6.32 | 8.00 |
| | 40.0 | 42.36±2.69 | 6.35 | 5.90 | 42.96±2.83 | 6.59 | 7.40 |
| 副黄嘌呤 | 0.050 | 0.05±0.00 | 5.55 | 0 | 0.05±0.00 | 7.43 | 0 |
| | 0.125 | 0.13±0.01 | 7.95 | 14.00 | 0.13±0.01 | 8.23 | 4.00 |
| | 1.50 | 1.58±0.09 | 5.88 | 5.33 | 1.52±0.09 | 5.81 | 1.33 |
| | 2.50 | 2.50±0.19 | 7.63 | 0 | 2.54±0.16 | 6.33 | 1.60 |
| | 40.0 | 42.56±3.21 | 7.53 | 6.40 | 43.36±3.01 | 6.95 | 8.40 |
| 可可碱 | 0.100 | 0.11±0.01 | 4.64 | 10.00 | 0.10±0.01 | 10.37 | 0 |
| | 0.250 | 0.26±0.02 | 6.10 | 4.00 | 0.24±0.02 | 9.05 | −4.00 |
| | 3.00 | 2.82±0.18 | 6.49 | −6.00 | 2.92±0.22 | 7.37 | −2.67 |
| | 5.00 | 5.19±0.31 | 5.98 | 3.80 | 4.97±0.36 | 7.28 | −0.60 |
| | 80.0 | 79.66±3.46 | 4.34 | −0.43 | 76.52±5.72 | 7.47 | −4.35 |

## 3　讨论

血药浓度监测是临床常用的监测手段，但由于早产儿的血量较少，血管较细，血液样本采集较难，故临床上较难进行常规血药浓度监测。《儿科人群药物临床试验技术指导原则》指出，应尽量减少早产儿的抽血量和/或静脉穿刺次数，以避免对早产儿造成不必要的损伤[11]。相较于血液样本，早产儿尿液样本的收集方式为非侵入性，可最大限度地减少早产儿侵入性血液采集的次数，同时还能实时监测早产儿体内咖啡因及代谢产物的浓度。咖啡因主要经肝脏代谢，约有84%转化为副黄嘌呤，12%转化为茶碱，4%转化为可可碱[12]。由于不同个体对咖啡因的代谢能力存在差异[8,12]，因此，同时测定咖啡因及代谢产物的浓度能准确地了解咖啡因在不同个体内的代谢情况，可为个体化用药提供依据。

本研究建立了同时检测AOP患儿尿液中咖啡因及3种代谢产物浓度的方法，一次性完成多个组分的测定，可提高测定效率和药物检测时效。AOP患儿静脉给予枸橼酸咖啡因后，通常在给药后0.5～2 h达到药物浓度峰值，血药浓度有效范围为10～20 mg/L，但此范围尚不是金标准，仍在不断完善中[13]。Cattarossi等[9]研究表明，胎龄29～34周早产儿使用咖啡因治疗24 h内的血药浓度和尿药浓度具有相关性，且二者比值接近1，提示检测尿药浓度可以作为评估咖啡因治疗范围的有效手段。本研究显示，AOP患儿尿液中咖啡因的质量浓度为(27.346±7.951)μg/mL，治疗效果较好，且未出现不良反应，这表明在该质量浓度下，咖啡因安全有效。但由于样本较少，结果存在一定局限性，仍需扩大样本进一步证实。

HILIC色谱柱的流动相通常含有浓度较高的乙腈，具有黏度低、系统背压小、检测灵敏度高等优点[14]。本课题组前期考察了水相60 mmol/L乙酸铵溶液和有机相乙腈的不同比例，当水相与有机相的初始比例为1∶99时，咖啡因及3种代谢产物的分离效果达到最佳，且具有合适的保留时间。此外，本研究的样品前处理采用乙腈沉淀蛋白法，该方法操作简单、快捷，样本前处理所需的尿液样本用量较少。

综上所述，本研究所建HPLC-MS/MS法操作简单、灵敏度高，可用于AOP患儿尿液中咖啡因及3种代谢产物浓度的测定。

## 参考文献


[1] POETS C F. Apnea of prematurity：what can observational studies tell us about pathophysiology? [J]. Sleep Med，2010，11(7)：701-707.

[2] EICHENWALD E C，WATTERBERG K L，AUCOTT S，et al. Apnea of prematurity[J]. Pediatrics，2016，137(1)：e20153757.

[3] PERGOLIZZI J，KRAUS A，MAGNUSSON P，et al. Treating apnea of prematurity[J]. Cureus，2022，14(1)：e21783.

[4] SZLAPINSKI S K，CHARRETTE A，GUTHRIE N，et al. Paraxanthine safety and comparison to caffeine[J]. Front Toxicol，2023，5：1117729.

[5] BHAT J A，KUMAR M. Neuroprotective effects of theobromine in permanent bilateral common carotid artery occlusion rat model of cerebral hypoperfusion[J]. Metab Brain Dis，2022，37(6)：1787-1801.

[6] 韩燕祯，王相际，杨朔鹏，等. 咖啡因及其代谢物的检测及应用研究进展[J]. 化学研究与应用，2020，32(5)：689-695.

[7] ABDEL-HADY H，NASEF N，SHABAAN A E，et al. Caffeine therapy in preterm infants[J]. World J Clin Pediatr，2015，4(4)：81-93.

[8] SAROHA V，PATEL R M. Caffeine for preterm infants：fixed standard dose，adjustments for age or high dose?[J]. Semin Fetal Neonatal Med，2020，25(6)：101178.

[9] CATTAROSSI L，VIOLINO M，MACAGNO F，et al. Correlation between plasma and urinary caffeine levels in preterm infants[J]. J Perinat Med，2006，34(4)：344-346.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[M].2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：466-472.

[11] 国家食品药品监督管理总局. 儿科人群药物临床试验技术指导原则[J]. 儿科药学杂志，2016，22(4)：43-47.

[12] NEHLIG A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption[J]. Pharmacol Rev，2018，70(2)：384-411.

[13] 杜立中. 早产儿呼吸暂停的药物治疗[J]. 中国实用儿科杂志，2015，30(2)：88-92.

[14] MCCALLEY D V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. J Chromatogr A，2017，1523：49-71.



（收稿日期：2023-04-24　修回日期：2023-07-24）

（编辑：陈　宏）