

血清中华法林浓度的反相高效液相色谱分析

梁 统 丁 航 李 杰* 周克元 凌光鑫

(广东医学院生化教研室, 湛江 524023)

摘要 采用反相高效液相色谱法测定了血清中华法林的含量。Spherisorb C₁₈ 分析柱, 0.01 mol/L 磷酸二氢钾—乙腈(42:58 V/V, pH 3.1)作为流动相, 210 nm 波长检测, 样品用甲醇处理。血清中华法林钠的最低检测浓度为0.2 µg/ml, 浓度从0~10 µg/ml 范围内呈良好的线性关系, 回收率好, 相对标准偏差小于5%。本法简单, 快速, 适合于药代动力学的研究及治疗药物浓度监测。

关键词 华法林 高效液相色谱 治疗药物监测

华法林(Warfarin)是常用的抗凝药物, 临床常用于心血管手术后防止血栓形成。若用药过量, 会造成出血倾向, 因此临床上对其血药浓度监测十分重视。建立血中华法林的测定方法, 对研究华法林的药代动力学, 探讨其血药浓度与抗凝血效果的关系很有必要。已报道的测定方法有薄层层析法^[1],

高效液相色谱法^[2]。本文报道一种简单, 快速的测定血中华法林浓度的方法。

仪器及试剂

法国 Gilson 公司高效液相色谱仪, 可调波长检测器, N₂型记录仪。美国 PE 公司 Lambda 2S

*附院外科

紫外/可见分光光度计。华法林钠 (Sigma 公司产品), 乙腈(上海脑研究所, 光谱纯), 甲醇(黄岩化工厂, HPLC (级)), 磷酸二氢钾为分析纯, 试剂配制用三次蒸馏水。

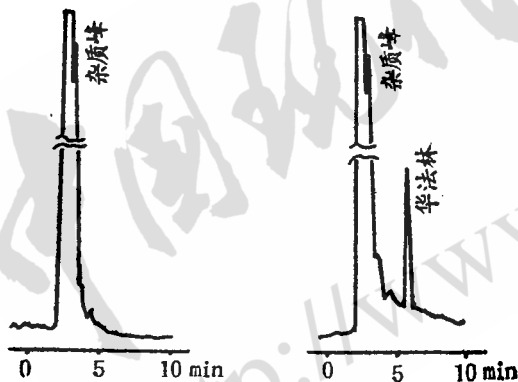
方法与结果

1 标准贮备液配制

称取适量华法林钠标准品, 用含甲醇50%的水溶液溶解, 稀释, 配成200 µg/ml 的标准贮备液, 存放于4 °C, 六个月内稳定。

2 色谱条件

Spherisorb C₁₈ 分析柱 (250×4.6 mm, 5 µm, 大连化学物理研究所 填充), 流动相: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液-乙腈 (42:58, V/V, pH 3.1), 经减压过滤后使用, 流速1.0 ml/min, 检测波长210 nm, 灵敏度0.05 A.u.s, 室温。分离图谱见图1。a 为正常空白血清色谱图, b 为服用华法林钠治疗的病人血清色谱图。华法林的洗脱时间为5.9 min。图2为华法林钠标准品的紫外可见光谱扫描图。



a. 空白血清色谱图 b. 服用华法林钠病人血清色谱图

图 1

3 样品预处理

于100 µl 血清中加入200 µl 甲醇, 立刻于旋涡混合器上振荡30 S, 4000 r/min 离心10 min, 取上清液20 µl 进样测定。

4 方法学评价

4.1 标准曲线的制作 分别取含华法林钠0、0.5、1.5、3.0、6.0、10.0 µg/ml 的血清各100 µl, 按样品处理方法进行。以浓度为横座标, 对应的峰高

为纵座标作图, 得线性曲线, 见图3。其回归方程为: $y = -0.01823 + 0.6643x$, $r = 0.9999$ 。

4.2 精密度 日内精密度: 配三种华法林浓度, 日内连续测定5次; 日间精密度: 三种浓度每天各测一次, 连续测定5天, 结果见表1。

4.3 回收率试验 取三种华法林浓度的血清, 按样品预处理方法进行, 据测得的浓度与加入浓度进行比较。见表2。

4.4 干扰试验 在本文色谱条件下, 常与华法林钠联用的药物心痛定出峰时间是7.8 min, 而地高辛、

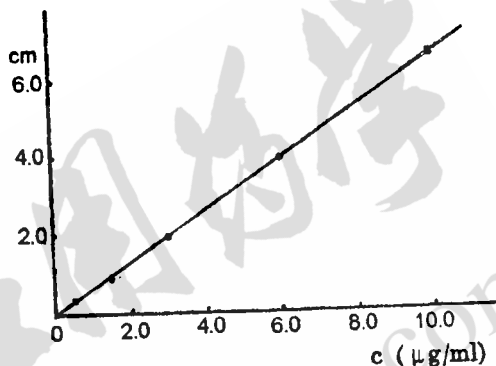


图 2

表 1 精密度试验 (n=5)

浓度(µg/ml)	RSD%	
	日 内	日 间
0.500	4.7	4.9
3.000	0.9	2.3
10.000	1.8	1.8

表 2 回收率试验 (n=3)

加入浓度 (µg/ml)	测得浓度 (µg/ml)	回收率 (%)	RSD(%)
0.500	0.460	92.0	6.0
2.000	1.735	86.8	1.8
6.000	5.445	90.8	2.5

双氢克尿噻均检测不到有关峰, 均不干扰华法林的测定。内源性物质不干扰测定, 见图1。已用该方法测定服用华法林治疗的病人血样40多个, 都无干扰。

5 临床病例监测

利用本法测定了四例进行换瓣手术后口服华法

林钠抗凝治疗的病人血样,手术后病人每天服用华法林钠一次,于下一次服药前抽血测定华法林浓度及凝血酶原时间(PT),结果见表3。

讨 论

1 检测波长的选择

用 Lambda-2S 紫外/可见分光光度计对华法林钠标准品进行扫描,结果见图2。其最强吸收峰在208 nm, 308 nm 波长有较弱吸收峰。为了提高检测的灵敏度,我们选择了最强吸收峰附近波长210

检测灵敏度较低,血清中华法林钠最低检测浓度仅为0.6 $\mu\text{g/ml}$ 。在210 nm 波长血中华法林钠最低检测浓度可达0.2 $\mu\text{g/ml}$ (信噪比为:31)。

2 缓冲液 pH 的选择

华法林分子具有一个酚基团,PK 值为5.1^[4],其保留时间及峰形受流动相 pH 的影响较大, pH 值在2.8~7.0范围内,随 pH 值降低,容量因子增大,可能是抑制了华法林分子上的酚基团的 H^+ 离解,脂溶性增大的缘故。选择 pH 3.1的缓冲液,可避开前面较大的干扰峰,峰形亦较理想。

3 样品预处理

本方法直接用甲醇沉淀蛋白,简单、快速无干扰,回收率较高,特别适合临床血药浓度检测及药代动力学的研究。

4 血药浓度与凝血酶原时间的关系

目前对术后服用华法林钠治疗的病人主要是通过测定凝血酶原时间来调整用药剂量,一般控制剂量在 PT 值为正常对照值的1.5~2.0倍左右。测定的结果表明,同一个体血药浓度在一定范围内随 PT/对照比值增大而升高,两者有较好相关性。PT/对照比值在1.5~2.0范围内,对应的血药浓度范围为1.20~2.36 $\mu\text{g/ml}$ 。

表3 病人血药浓度及凝血酶原时间测定结果

患 者	每天服药 剂 量 (mg)	术后测定 时 间 (天)	PT/对照	浓 度 ($\mu\text{g/ml}$)
陈 某	9	3	1.0	0.68
	9	4	1.4	1.67
	9	5	1.3	1.68
	9	6	1.5	2.25
	6	7	1.6	2.17
	6	8	1.6	2.47
林 某	6	2	1.0	0.31
	6	3	1.3	0.63
	6	6	1.8	1.21
	4.5	7	1.8	1.20
	4.5	8	1.8	1.35
	6	2	1.2	0.92
欧 某	6	4	1.4	1.11
	6	7	1.6	2.05
	6	9	1.8	1.88
	3	11	2.0	2.36
	6	3	1.3	1.02
	6	4	1.3	1.48
周 某	6	6	1.6	1.68
	6	7	1.7	1.59

nm 进行检测。然而在低波长检测,对流动相组分要求较高,很多有机溶剂的紫外截止波长大于210 nm,不能使用,例如四氢呋喃,正丁醇、丙酮等^[3]。我们曾试用了甲醇—磷酸盐流动相体系,甲醇的紫外截止波长是205 nm,与检测波长210 nm 较接近,透光率低,基线波动亦较大。乙腈的紫外截止波长为190 nm,与磷酸盐组成的流动相在 210 nm 检测可获得稳定的基线及较高的灵敏度。用308 nm 波长

参 考 文 献

- 1 贺卫东,祝丽君,孔庆洪等.薄层色谱法测定血浆中华法林浓度.第二军医大学学报,1989,10(2):152
- 2 Steyn J. M and Van der merwe H. M. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of warfarin from biological fluids in the low nanogram range. J Chromatogr, 1986, 378: 254.
- 3 史坚.现代柱色谱分析.第一版.上海:上海科学技术文献出版社,1988:336~341
- 4 Gareil P, Gramond J. P and Guyon F. Separation and determination of warfarin enantiomers in human plasma samples by capillary zone electrophoresis using a methylated β -cyclodextrin-containing electrolyte. J Chromatogr, 1993.615:317.

收稿日期:1995-10-09