

固相萃取用于血浆中抗癫痫药物的提取

李冬梅 丁学开 梁民琦 吕永高(山东东营 257034 胜利石油管理局中心医院)

摘要 目的:探讨固相萃取法用于血浆中抗癫痫药物的提取。方法:以活化的 ODS 柱($40\mu\text{m}$)为固相萃取柱,二氯甲烷为洗脱剂,洗脱液浓缩后以 HPLC 法测定药物的浓度。结果:苯巴比妥、苯妥英在 $5.00 \sim 60.00\mu\text{g/ml}$ 范围内,卡马西平在 $2.50 \sim 20.00\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好, r 分别为 $0.9980, 0.9999, 0.9990$;绝对回收率分别为 $59.60\% \sim 68.7\%, 58.9\% \sim 68.0\%, 53.8\% \sim 57.3\%$;相对回收率分别为 $92.2\% \sim 98.6\%, 97.1\% \sim 102.6\%, 97.9\% \sim 102.0\%$, $RSD < 6\%$;血浓监测结果与经传统的液液萃取后所得结果非常接近。结论:固相萃取法操作简单、省时、提取干净,可用于血浆中抗癫痫药物的提取。

关键词 固相萃取;血浆;抗癫痫药物

Extraction of the antiepilepsy drugs in plasma by SPE

Li Dongmei(Li DM), Ding Xuekai(Ding XK), Liang Mingqi(Ling MQ), *et al*(*Pharmaceutical Department of Central Hospital, Sheng Li Oil Administration Bureau, Dongying 257034*)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To extract the antiepilepsy drugs in plasma by solid phase extraction(SPE). **METHOD:** Activated ODS columns($40\mu\text{m}$) were used as SPE columns and CH_2Cl_2 was used as solvent to extract the drugs in plasma, their concentrations were determined by HPLC. **RESULTS:** For phenobarbital phenytoin and carbamazepine, the linear range were $5.00 \sim 60.00\mu\text{g/ml}$ ($r = 0.9980$), $5.00 \sim 60.00\mu\text{g/ml}$ ($r = 0.9999$), and $2.50 \sim 20.00\mu\text{g/ml}$ ($r = 0.9990$)

respectively ,the absolute rewweries were 59 .60 % ~ 68 .7 % ,53 .80 % ~ 68 .0^ and 55 .4 % ~ 57 .3 % respectively ,and the relative rewweries were 92 .2 % ~ 98 .6 % ,97 .1 % ~ 102 .6 % and 97 .9 % ~ 102 .0 % respectively (RSD < 6 %) . Concentrations of drugs in plasma determined by SPE were similar to those by liquid phase extraction .**CONCLUSION:** SPE is rapid ,simple ,clean and suitable to the extraction of antiepilepsy drugs in plasma .

KEY WORDS SPE ,plas ma ,antiepilepsy drugs

苯妥英钠(PHT)、苯巴比妥(PBT)、卡马西平(CBZ)是临床常规监测的抗癫痫药物,其血浆中药物的提取方法为液液萃取法[陈希贤,吕建新,李东.高效液相色谱法同时测定人血清中茶碱与苯巴比妥、苯妥英、卡马西平的含量.中国医院药学杂志,1994,14(9): 390.]。该法操作较麻烦、用时长。我们以固相萃取法(Solid Phase Extraction ,SPE) 替之,操作简单、用时少、提取干净,现报道如下。

1 仪器与试剂

SC-I 型 SPE 净化富集预处理器(大连依利特) ;高效液相色谱仪:恒流泵(Tracor 951)、六通进样阀(Tracor 7125)、紫外检测器(Shimadzu SPD- MIA)、自动积分仪(SP4270)。

PHT、PBT 标准品(上海中山医院临床药学研究室提供)、CB2 标准品(中国药品生物制品检定所)、咖啡因标准品(CAF) (山东新华制药厂提供)。

甲醇、二氯甲烷、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾均为分析纯,水为三重蒸馏水。

2 实验与结果

2.1 固相萃取条件 SPE 柱: 200mg/3ml、ODS 柱(40μm,大连依利特) ,用前分别以 5ml 二氯甲烷、5ml 甲醇、5ml 磷酸盐缓冲液(pH = 7.4) 依次活化。

2.2 血浆中药物的 SPE 及含量测定 精取含有 PBT、PHT、CB2 及内标 CAF 的血浆 0.4ml ,加入等体积 pH = 7.4 的缓冲液,振荡混合后加在净化富集器 SPE 柱(已活化) 顶端。待血浆在柱上充分吸附后,以 5ml 磷酸盐缓冲液淋洗,抽真空 60s ,加入 3ml 二氯甲烷液洗脱,缓慢抽真空,收集洗脱液于尖底试管中,40℃水浴氮气下吹干,残渣以 50μl 甲醇复溶,以 HPLC 法测定药物浓度。

2.3 绝对回收率实验 测定不经预处理的纯药物 PHT、PBT、CB2 与内标物的峰高比。然后配制含 PHT、PBT、CB2 浓度与之相同的血浆,经固相萃取后,加入内标,分别测定 3 种药物与内标的峰高比,以前者为标准,计算药物的绝对回收率,结果见表 1。

2.4 标准曲线及线性范围 精取 5 份空白血浆(0.4ml) ,分别加入 1 μg/ ml 的 PHT : 2, 6, 12, 18 和 24 μl ;

表 1 绝对回收率(n = 3)

药品	浓度/μg·ml ⁻¹	平均回收率/ %
PBT	10.00	63.2
	20.00	68.7
	40.00	59.6
PHT	10.00	61.8
	20.00	68.0
	40.00	58.9
CB2	5.00	53.8
	10.00	57.3
	15.00	55.4

1 μg/ ml 的 PBT : 2, 6, 12, 18 和 24 μl ; 1 μg/ ml 的 CB2 : 1, 2, 4, 6, 8 μl , 配成相应浓度的标准系列。分别加入内标液 8 μl , 振荡混匀后依 2.2 项下操作。以待测物浓度 C(μg/ ml) 对待测物与内标物峰高比(h) 作线性回归, 结果见表 2。

表 2 线性范围及回归方程

药品	浓度范围/μg·ml ⁻¹	回归方程	r
PBT	5.00 ~ 60.00	C = 16.93h + 0.35	0.9980
PHT	5.00 ~ 60.00	C = 38.76h - 2.55	0.9999
CB2	2.50 ~ 20.00	C = 5.36h - 0.037	0.9990

2.5 精密度和相对回收率实验 取空白血浆 3 份, 分别配成 3 种浓度的含药血浆, 进行含量测定。每种浓度的血浆 1 d 内测定 3 次, 计算相对回收率及日内差。每种浓度的血浆分别在 5 d 内测定, 计算日间差。结果见表 3。

2.6 2 种血浆提取方法所得结果的比较 取空白血浆 3 份, 分别配成 3 种浓度的含药血浆, 分别按本法及液液萃取法^[1] 提取后进行含量测定, 结果见表 4。以 SPE 法对液液萃取法所得结果以最小二乘法作回归处理, 得 PBT 回归方程: Y = 0.9851 X + 0.4470, r = 0.9999; PHT: Y = 0.9969 X + 0.1396, r = 0.9989; CB2: Y = 0.9961 X - 0.0798, r = 0.9998。分析可见 2 种方法所得结果非常接近。

3 讨论

表 3 精密度及相对回收率

药品	实际浓度	日间差/ $n = 3$			日间差/ $n = 5$	
	/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	实测值/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	变异/ CV %	平均回收率/ %	实测值/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	变异/ CV %
PBT	10.00	9.41 $\pm$ 0.13	2.78	94.07 $\pm$ 2.53	9.29 $\pm$ 0.27	1.07
	20.00	20.02 $\pm$ 0.43	2.08	100.10 $\pm$ 2.06	19.89 $\pm$ 0.93	4.53
	40.00	38.02 $\pm$ 2.14	2.14	95.05 $\pm$ 2.04	38.42 $\pm$ 1.52	3.84
PHT	5.00	5.10 $\pm$ 0.18	3.53	102.00 $\pm$ 1.51	4.98 $\pm$ 0.20	4.05
	10.00	9.82 $\pm$ 0.06	0.61	98.20 $\pm$ 0.56	9.76 $\pm$ 0.29	2.97
	20.00	19.92 $\pm$ 0.97	5.37	99.58 $\pm$ 6.34	20.34 $\pm$ 1.07	5.26
CB2	5.00	4.95 $\pm$ 0.13	2.63	99.00 $\pm$ 2.64	5.06 $\pm$ 0.18	3.56
	10.00	10.01 $\pm$ 0.13	1.30	100.10 $\pm$ 1.27	9.91 $\pm$ 0.16	1.61
	20.00	20.14 $\pm$ 0.45	2.23	100.68 $\pm$ 2.25	19.95 $\pm$ 0.41	2.08

表 4 SPE 和液液萃取的结果比较

药 品	实际浓度	实测浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	
	/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	SPE 法	液液法
PBT	15.00	14.60	14.90
	25.00	25.71	25.61
	35.00	34.18	34.21
PHT	10.00	10.32	10.17
	15.00	14.98	15.10
	20.00	21.12	21.30
CB2	6.00	5.76	5.62
	10.00	9.94	9.92
	12.00	12.51	12.32

3.1 洗脱剂及其用量的确立 洗脱剂的强度对固相萃取结果至关重要。其太强,会将柱上某些不需要的强保留组分洗脱下来;太弱,将影响对药物的洗脱能力,降低回收率。综合考虑以上因素,实验选择二氯甲烷为洗脱剂,其洗脱力较强而且易于挥发有利于样品的最后浓缩,可获得较满意的回收率,结果见表 1。洗脱剂的用量一般为 0.5 ~ 0.8 ml/100 mg 固定相,实验表明洗脱剂

用量在 1 ~ 3 ml 范围内,药物的回收率随着洗脱剂用量的增加而有较大提高;大于 3 ml,回收率提高不明显。由于增加洗脱剂用量,将引进更多杂质并延长了萃取液的浓缩时间,因此最终确立 3 ml 为洗脱剂的用量。

3.2 SPE 注意事项 SPE 柱活化时,固定相不要抽干,否则导致填料床出现裂缝,影响药物与固定相间的吸附,从而降低样品的回收率;载样 SPE 柱在用二氯甲烷洗脱前抽真空时要尽可能去除柱上水份,因水与二氯甲烷不互溶,柱内残留水份将影响二氯甲烷与固定相充分作用,从而降低药物的回收率;加入二氯甲烷洗脱时,流速要适当,压力表显示要小于 0.01 MPa,这样有利于提高药物回收率。

3.3 SPE 的优点 SPE 省去了液液萃取的振荡、离心、有机相转移等步骤,因此操作更简单,用时也少;比较同一血浆经 2 种方法提取后的含量测定色谱图,可见 SPE 的样品杂质明显减少,因此可减轻对色谱柱的污染,延长其使用寿命。