

高效液相色谱法测定血清中苯巴比妥、苯妥英、卡马西平、氯硝基安定的浓度

王增寿 朱光辉 李光乾(温州 325027 温州医学院附属第二医院育英儿童医院)

摘要 目的: 建立血清中苯巴比妥(PB)、苯妥英(PT)、卡马西平(CBZ)、氯硝基安定(CNZP)浓度测定的高效液相色谱法。方法: 以PB、PT互为内标, ODS-Hypersil柱为分析柱, 甲醇-水- β -环糊精(45: 55: 0.01)为流动相; 流速为0.8 mL/min, 紫外检测波长254nm。结果: PB、PT、CBZ、CNZP分离良好, 最低检测浓度分别为0.25、0.5、0.05、0.015 $\mu\text{g/mL}$; 线性范围分别为2.5~40、2.5~40、1.25~20、0.02~0.32 $\mu\text{g/mL}$; 相对回收率分别为97.8%、102.1%、102.3%、103.3%; 日内、日间RSD均小于10%。结论: 该法操作简便, 结果可靠, 适用于临床开展药物浓度监测。

关键词 苯巴比妥; 苯妥英; 卡马西平; 氯硝基安定; 高效液相色谱法

Determination of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine and clonazepam in serum by HPLC

Wang Zengshou, Zhu Guanghui, Li Guangqian (The Affiliated second Hospital, Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical college, Wenzhou 325027)

ABSTRACT **AIM:** to establish an assay method for the determination of phenobarbital (PB), phenytoin (PT), carbamazepine (CBZ) and clonazepam (CNZP) in serum by high performance liquid chromatography (HPLC). **METHODS:** Internal standards were phenobarbital and phenytoin. The analytical column was ODS-Hypersil column. The mobile phase consisted of methanol-water- β -cyclodextrin (45: 55: 0.01) and the flow rate was 0.8 mL/min. The UV wavelength was 254nm. **RESULTS:** PB, PT, CBZ and CNZP were separated well. The lowest detection concentration of PB, PT, CBZ and CNZP were as following: 0.25, 0.5, 0.05 and 0.015 $\mu\text{g/mL}$; The linear relation was in the range of 2.5~40, 2.5~40, 1.25~20 and 0.02~0.32 $\mu\text{g/mL}$. Relative recovery rate were 97.8%, 102.1%, 102.3% and 103.3% respectively. The relative standard deviation (RSD) of within day and between day were all less than 10%. **CONCLUSION:** The method is found to be sensitive with constant result. The experiment will supply reference methods for the determination of PB, PT, CBZ and CNZP in serum.

KEY WORDS Phenobarbital, Phenytoin, Carbamazepine, Clonazepam, High performance liquid chromatography

苯巴比妥(PB)、苯妥英(PT)、卡马西平(CBZ)和氯硝基安定(CNZP)是临床最常用的有效抗癫痫药物。用高效液相色谱法测定抗癫痫药物已有不少报道, 但流动相多使用容易损耗仪器的磷酸缓冲液或有毒的乙腈及改性剂^[1,2], 并且都不能同时测定CBZ和CNZP两组分浓度^[3]。本文将方法进行改进后, 可同时测定血清中PB、PT、CBZ、CNZP浓度, 方法简便、灵敏, 结果可靠, 现报道如下:

1 材料与方法

1.1 仪器、药品及试剂 惠普1100型高效液相色谱仪(美国); 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); PB、PT、CBZ(上海黄河制药厂); CNZP(徐州第三制药厂); β -环糊精(干基纯); 甲醇(色谱纯); 磷酸二氢钾、氢氧化钠、二氯甲烷(均为AR); 水为重蒸水。

1.2 实验用溶液配制

1.2.1 标准贮备液及内标液 精密称取PB、PT、CBZ、CNZP各适量, 分别用甲醇溶解并定容至PB 1.0 mg/mL, PT

1. 0mg/ml, CBZ 0. 5mg/ml, CNZP 3. 2μg/ml 的标准储备液; 精取 PB、PT 储备液各适量, 分别用甲醇稀释 10 倍作内标液。置 4℃ 冰箱保存。

1. 2. 2 磷酸盐缓冲溶液(pH 7. 6) 精密称取磷酸二氢钾 27. 22g, 加水使溶解成 1000ml, 取 50ml, 加 0. 2mol/L 氢氧化钠溶液 42. 4ml, 再加水稀释至 200ml, 即得。

1. 3 色谱条件 色谱柱: ODS-Hypersil 柱(5μm、4. 6mm×100mm); 流动相: 甲醇-水-β环糊精(45: 55: 0. 01); 流速: 0. 8ml/min; 紫外检测波长: 254nm; 纸速: 5; 进样量: 20μl。

1. 4 样品预处理 取待测血清 200μl, 加入 100μg/ml 内标液(测定 PB、CBZ、CNZP 时, 以 PT 为内标; 测定 PT 时, 以 PB 为内标) 20μl 加缓冲液 400μl, 混匀, 加入二氯甲烷 2ml, 旋涡振荡 5min, 3500r/min 离心 10min, 移取有机相至尖底带盖塑料管中, 50℃ 水浴蒸干, 用 100μl 流动相复溶, 取 20μl 进样。

2 结果

2. 1 色谱图 用上述色谱条件及样品处理方法得到血清中 PB、PT、CBZ、CNZP 的色谱图。结果显示: PB、PT、CBZ、CNZP 完全分离, 保留时间分别为: 4. 99、11. 47、13. 43 及 14. 93min。

2. 2 标准曲线制备 取上述配制的各药物标准贮备液精密配制成含 PB、PT 为 40、20、10、5、2. 5μg/ml, 含 CBZ 为 20、10、5、2. 5、1. 25μg/ml, 含 CNZP 为 0. 32、0. 16、0. 08、0. 04、0. 02μg/ml 的血清标准液各 5 管, 按样品预处理及色谱条件测定。根据药物对内标的峰面积比(Y)与药物浓度(C)进行统计学处理, 得回归方程, 结果见表 1。

表 1 各药物的标准曲线方程与最低检出浓度

试药	线性方程(n=5)	r	最低检出浓度(r _{n=3}) (μg/ml)
苯巴比妥	Y= 0. 10074• C+ 0. 0332	0. 9994	0. 25
苯妥英	Y= 0. 12164• C- 0. 0926	0. 9993	0. 5
卡马西平	Y= 0. 50074• C- 0. 2134	0. 9993	0. 05
氯硝基安定	Y= 1. 14179• C- 0. 0036	0. 9997	0. 015

2. 3 回收率、精密度试验 用正常人血清配制高、中、低 3 档浓度的血样, 照“样品预处理”操作, 进样 20μl 分析; 每批样品同一天内重复测定 5 次, 同批血样连续测定数日, 结果代入回归方程求得浓度并计算回收率及精密度, 结果见表 2。

2. 4 血药浓度测定 患者血药浓度达到稳态后, 于下次给药前或早晨服药前采血, 待血清析出后, 3000r/min 离心 5min, 取血清 200μl 供 HPLC 分析。典型病例 1: 男 17y, CBZ 0. 15, tid, po. 症状控制不佳, 仍每周睡时抽搐 1 次, 测得 CBZ 血药浓度为 4. 27μg/ml; 嘱改 0. 2, tid, 症状控制较好。例 2: 女, 16y, 原先服 PB45mg, tid, 仍有癫痫发作, 后改 60mg, tid, po, 症状控制较好, 测得 PB 血药浓度为 27. 31μg/ml。例 3: 女, 14y, CNZP 2mg, bid, po, 症状控制不佳, 仍 1 月癫痫发作 1~ 2 次, 测得 CNZP 血药浓度 27. 63ng/ml; 嘱改 CNZP3mg,

bid, po 癫痫症状完全控制。

表 2 相对回收率与日内、日间精密度

试药	投入浓度 (μg/ml)	相对回收率 (%)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
苯巴比妥	40. 0	96. 5	5. 6	7. 2
	10. 0	103. 7	8. 4	5. 3
	2. 5	93. 3	6. 3	9. 1
苯妥英	40. 0	104. 2	4. 9	5. 1
	10. 0	94. 7	3. 7	6. 4
	2. 5	107. 4	8. 6	6. 7
卡马西平	20. 0	102. 4	9. 3	3. 8
	5. 0	97. 7	4. 4	7. 2
	1. 25	106. 9	5. 7	8. 4
氯硝基安定	0. 32	96. 3	3. 9	5. 5
	0. 08	105. 5	7. 0	6. 6
	0. 02	108. 2	5. 4	7. 3

3 讨论

3. 1 内标选择 临床中抗癫痫治疗时大多单用 PB、PT、CBZ、CNZP 或两者合用(PB 与 CBZ 合用、CBZ 与 CNZP 合用), 故本文选择了以 PB、PT 互为内标物。

3. 2 流动相选择 我们选用甲醇-水-β环糊精(45: 55: 0. 01)作为流动相, 利用 β环糊精具有改善色谱峰形, 提高柱效的特点, 无须在流动相中加入磷酸盐、二乙胺、乙腈等有腐蚀性或有毒性的成份, 而使 PB、PT、CBZ、CNZP 分离良好, 峰型理想, 并能准确地测定该 4 种药物的血浓度。

3. 3 干扰试验 本实验还进行了药物间的测定干扰试验, 结果表明: 维生素 B₆、复方脑安泰等药物的存在对本测定方法均无干扰; 艾司唑仑的存在对氯硝基安定的测定有一定的干扰。

参考文献

1 徐家明, 周爱华, 刘思忠, 等. 反相高效液相色谱法同时测定血清中苯妥英、卡马西平、苯巴比妥[J]. 中国医院药学杂志, 1991, 11(5): 195.

2 邵志高, 张宏文, 张 静, 等. 高效液相色谱法测定三种抗癫痫药血浓度及其临床应用[J]. 南京医学院学报, 1991, 11(1): 23.

3 陈素文主编. 实用药物液体浓度测定[M]. 第 1 版, 北京: 中国医药科技出版社, 1994, 202.

4 朱光辉, 王增寿. 高效液相色谱法测定苯巴比妥、苯妥英、卡马西平的血药浓度[J]. 中国临床药学杂志, 2001, 10(1): 21.

5 Edge JH, Walson PD, Rane A. Clonazepam and 7-amino clonazepam in human plasma[J]. Thera Drug mon. 1991, 13: 363.

6 蔡小淦, 姚彤炜, 潘 莉, 等. β环糊精流动相和手性配位交换 HPLC 法分离药物对映体[J]. 中国现代应用药学, 1998, 15(5): 36.

收稿日期: 2001- 07- 06