

反相高效液相色谱法快速测定 3 种抗癫痫药物血药浓度

孙增先,周金玉,张骞峰,陶爱华(连云港市第一人民医院,江苏 连云港 222002)

摘要:目的 建立快速反相高效液相色谱法测定 3 种抗癫痫药血药浓度。方法 选择醋酸乙酯为萃取溶剂;采用 Nova Pak C₁₈ 柱(4 μ m,3.9mm $\times$ 150mm)为分析柱;0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH3.5)-甲醇(50:50)为流动相;检测波长 210nm;流速 1 mL/min。结果 该色谱条件下 3 种药物分离良好,苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平线性范围为 1~100,1~40,1~20 μ g $\cdot$ mL⁻¹,平均回收率分别为 99.8%,99.6%,100.6%。日内、日间 RSD 均小于 6%;用于 229 例临床患者监测,在服用苯妥英钠的患者中有 56.1%的患者血药浓度低于有效浓度,20.1%高于有效浓度,并出现中毒症状。结论 本法快速(5 min)、简便、结果准确,更适合临床应用。

关键词:反相高效液相色谱法;苯巴比妥;苯妥英钠;卡马西平;血药浓度

中图分类号:R917.01;R971.6 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2004)04-0316-03

Rapid determination of three antiepileptic drugs in serum by reversed phase high performance liquid chromatography

SUN Zeng-xian, ZHOU Jin-yu, ZHANG Qian-feng, TAO Ai-hua (*The First People's Hospital of Lianyungang, Lianyungang 222002, China*)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a rapid analytical method for the determination of phenobarbital (PB), phenytoin (DPH) and carbamazepine (CBZ) in serum by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). **METHOD** Ethyl acetate was selected as extract solvent. The analytical column was Nova-Pak C₁₈ column (3.9 mm $\times$ 150 mm, 4 μ m). The mobile phase consisted of 0.01 mol/L phosphate buffer solution (pH3.5):methanol (50:50). The detection wavelength was 210 nm and the flow rate was 1 mL/min. **RESULTS** Three drugs were separated well under the chromatographic condition. The linear range of PB, DPH and CBZ were 1-100, 1-40 and 1-20 μ g $\cdot$ mL⁻¹, respectively. The relative recoveries of PB, DPH and CBZ were 99.8%, 99.6% and 100.6%, respectively. The relative standard deviation (RSD) of within day and between day were all less than 6%. The method has been used for monitoring serum drug concentration of 229 epileptic patients, 56.1% of the patients who had taken DPH was found the serum concentration lower than effective level and 21.0% of these patients was found higher than effective level. **CONCLUSION** This method is rapid (less than 5 min), accurate, sensitive and more suitable for clinical application.

作者简介:孙增先(1964.9.22),男,副主任药师,研究方向为临床药学,Tel:0518-5605283

苯妥英钠(5, 5- Diphenylhydantoin, DPH)、苯巴比妥(Phenobarbital, PB)、卡马西平(Carbamazepine, CBZ) 均为临床常用一线抗癫痫药物。它们均能显著影响肝药酶的活性, DPH 还具有非线性动力学代谢特征, 血药浓度易受多种因素影响, 个体差异大, 临床需要个体化给药。有关上述 3 种药物的 HPLC 测定方法报道较多^[1-6], 但样品上柱分析周期较长(7~20 min), 影响实验室的分析效率。本实验借鉴已有的研究方法, 建立了快速 HPLC 法同时测定血清中 3 种抗癫痫药物浓度(上柱周期 5 min), 使其更适合临床实际应用。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(包括 600 四元梯度泵、在线脱气机、柱温箱、996 二极管阵列检测器、millennium32 色谱工作站), METTLER 320 酸度计(瑞士)。

DPH, CBZ 为 Sigma 公司产品, PB 为国家麻醉品实验室提供, 甲醇、醋酸乙酯为色谱纯试剂(美国 Tedia 公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Novar Pak C₁₈ 柱, 3.9 mm × 150 mm, 4 μm; 流动相: 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH3.5)- 甲醇(50: 50); 检测波长 210 nm; 流速 1 mL/min。

2.2 标准溶液的配制

精密称取 DPH 5.1 mg, PB 4.9 mg, CBZ 2.4 mg, 分置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到 PB, DPH, CBZ 标准贮备液。

2.3 萃取溶剂及 pH 的选择

取含药水溶液(PB, DPH, CBZ 均为 10 μg · mL⁻¹) 0.1 mL, 分别用 CH₂Cl₂, CHCl₃, 乙醚和醋酸乙酯 5 mL 提取, 分离有机层吹干, 0.1 mL 流动相复溶进样, 所得峰面积与同浓度水溶

液直接进样峰面积比较, 结果见表 1。

表 1 不同溶剂对 PB, DPH, CBZ 提取率的影响

Tab 1 Different solvent influence on PB, DPH and CBZ extraction recovery

溶剂	PB	DPH	CBZ
CH ₂ Cl ₂	89.8	72.9	70.1
CHCl ₃	90.1	73.4	69.3
乙醚	90.7	73.8	70.5
醋酸乙酯	93.4	83.2	81.6

根据表 1 结果选择醋酸乙酯作为萃取溶剂, 考察样品溶液 pH 对提取率的影响。取含药水溶液(PB, DPH, CBZ 均为 10 μg · mL⁻¹) 0.1 mL 5 份, 分别加入 0.1 mL 不同 pH 缓冲溶液(3.5, 6.4, 7.6, 10.0, 13.0), 分别用 5 mL 醋酸乙酯提取, 分离酯层吹干, 0.1 mL 流动相复溶进样, 所得峰面积与同浓度水溶液直接进样峰面积比较, 结果见表 2。表 2 所示, 在 pH7.6 时 3 种药物的提取率较高。

表 2 不同 pH 介质对 PB, DPH, CBZ 提取率的影响(%)

Tab 2 Different pH medium influence on PB, DPH and CBZ extraction recovery(%)

pH	PB	DPH	CBZ
3.5	93.1	82.9	76.1
6.4	88.5	81.2	78.3
7.6	93.0	86.5	82.9
10.0	32.7	51.4	72.9
13.0	9.0	25.0	68.3

2.4 血样处理

取血清 0.1 mL, 加 pH7.6 磷酸盐缓冲液 0.1 mL 混匀, 加醋酸乙酯 5 mL, 振荡 1 min, 离心 5 min(3 500 r/min), 取酯层 4 mL, 45 °C 水浴吹干, 残渣用 0.1 mL 流动相复溶, 20 μL 进样。色谱图见图 1。

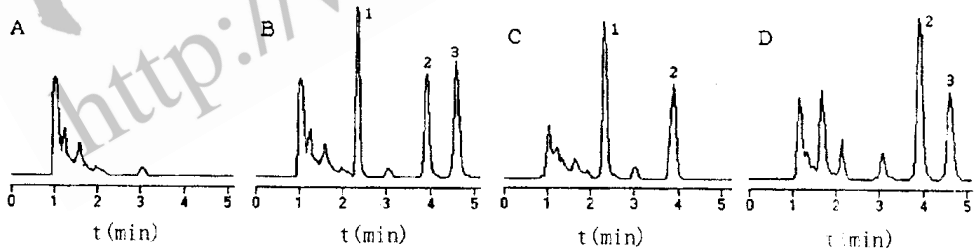


图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A: 空白血清, B: 空白血清加标样, C, D: 服药患者血清, 1: PB, 2: DPH, 3: CBZ

A: blank serum, B: blank serum with standard reference, C, D: samples, 1: PB, 2: DPH, 3: CBZ

2.5 检测波长选择

在图 1 所示的标样色谱图上, 使用 millennium 色谱软件提取 PB, DPH, CBZ 色谱峰的扫描光谱图(210~350 nm), 结果见图 2, 根据图 2 选择 210 nm 作为检测波长。

2.6 线性关系
分别准确吸取适量贮备液置尖底试管中, 水浴吹干, 加

无药血清, 超声助溶, 配成含 PB, DPH, CBZ 系列浓度标准血清, 按 2.4 项下操作, 用外标法峰面积定量, 得回归方程, 结果见表 3。

表 3 PB, DPH, CBZ 线性关系

Tab 3 Linear relationship of PB, DPH and CBZ

药物	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程	相关系数
PB	1 ~ 100	$A = 56\ 803\ C + 112142$	$r = 0.999\ 7$
DPH	1 ~ 40	$A = 64\ 011\ C + 41739$	$r = 0.999\ 8$
CBZ	1 ~ 20	$A = 11\ 0897\ C + 43141$	$r = 0.999\ 8$

2.7 回收率和精密度试验

按 2.6 项下方法配制高、中、低浓度的含药血清,照血样处理方法操作,分别于当日和连续 6d 内测定 PB、DPH 和 CBZ 浓度,计算回收率、日内和日间误差,结果见表 4。

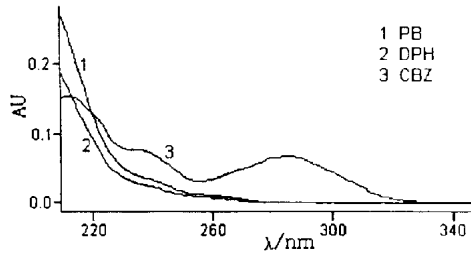


图 2 PB,DPH,CBZ 光谱图

Fig 2 Absorption spectra of PB,DPH and CBZ

表 5 229 例患者监测结果

Tab 5 Monitoring results of 229 patients

药物	例数 (n)	血药浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	有效浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	达有效浓度 例数(n)	小于有效浓度 例数(n)	大于有效浓度 例数(n)	最高监测浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
PB	31	14.6 ± 7.5	10 ~ 40	23	8	0	30.7
DPH	139	12.5 ± 12.9	10 ~ 20	33	78	28	71.8
CBZ	59	5.6 ± 5.5	4 ~ 12	26	27	6	26.3

3 讨论

文献^[1-4]采用甲醇-水(50:50)作为流动相,实验中发现在此种色谱条件下,PB、DPH 的 R_T 重现性较差,且峰形较宽,用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液($\text{pH}3.5$)替代水作流动相,峰形变得尖锐,且 R_T 重现性非常好。本法选用 Nova-pak C_{18} 柱($4\mu\text{m}$, $3.9\text{mm} \times 150\text{mm}$),提高色谱柱的分离效能,同时缩短分析周期,分析效率提高。由图 2 可见,该色谱条件下上柱分析周期仅为 5 min,更适常规监测分析要求。

用 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 、乙醚和醋酸乙酯作为萃取溶剂均有报道^[1-6],为了选择更好的萃取溶剂,本实验对不同溶剂的萃取率进行了比较,结果显示醋酸乙酯萃取效果较好,且具有沸点适中、不易乳化、分离体积易于控制的特点,可使操作标准化,提高测定结果的准确性和重现性。在样品处理时,未见文献对萃取介质的 pH 加以考察,多用有机溶剂直接萃取^[1,3,4,5,7]。从表 2 可见, pH 在 3.5 ~ 7.6 之间各组分的提取率较为接近,以 $\text{pH}7.6$ 为最好。当 pH 大于 7.6 时各组分的提取率随 pH 升高而下降,以 PB 最为显著。由此本实验确定提取介质 pH 为 7.6,与文献^[2,6]萃取介质 pH 相一致。

本法用于 229 例癫痫患者常规监测,由表 5 可见,临床单用 DPH 治疗的患者中,只有不到 1/4(33/139)患者血药浓度在有效浓度范围之内,超过一半患者(78/139)的血药浓度低于有效浓度,临床表现癫痫发作未被有效控制,还有 1/5(28/139)患者出现中毒症状,经停药、调整剂量后,中毒症状逐渐消失。结果与文献^[7]报道相近。应用中未见 CBZ 和 DPH 代谢产物对测定有干扰。以上说明用该法测定 PB、

表 4 回收率及精密度试验

Tab 4 Recovery and precision test of PB,DPH and CBZ

药物	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)	RSD(%)	
			日内	日间
PB	1	101.16	4.25	5.31
	50	98.47	3.66	4.35
	100	99.70	3.15	3.50
DPH	1	99.18	4.07	5.26
	20	98.67	3.28	3.52
	40	101.02	2.54	3.15
CBZ	1	100.08	4.83	5.55
	10	99.73	3.84	4.96
	20	102.08	3.90	3.85

2.8 干扰试验

在上述色谱条件下,对通常配伍的药物,如丙戊酸钠、扑米酮、地西泮、硝西泮、氯硝西泮、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑、氯氮革等进样分析,结果显示这些药物对本法测定没有干扰。

2.9 临床病例监测

本法用于 229 例患者监测及中毒确诊,结果见表 5。

DPH 和 CBZ 血药浓度作为药效学指标是可行的,为临床疗效的判定和中毒的确诊提供客观科学的依据,具有很好的临床实用价值。

参考文献

- [1] 陈坚,朱伟群,方维军,等.高效液相色谱法同时测定苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平血药浓度[J].中国现代应用药学杂志,1999,16(4):41.
- [2] 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[J].中国医院药学杂志,1994,14(9):389.
- [3] 付世江,段盛慧,任群翔.高效液相色谱法同时测定血清中茶碱、苯妥英钠、苯巴比妥及卡马西平的药物浓度[J].色谱,1997,15(2):178.
- [4] 杨国浓,朱国峰.高效液相色谱法测定苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平的血药浓度[J].中国现代应用药学杂志,2002,19(4):313.
- [5] 闫小华,李焕德,张松操,等.体液中多种药物与毒物的快速测定与临床应用研究 IV.RP-HPLC 法同时测定血清中 3 种抗癫痫药物[J].药物分析杂志,1996,16(1):3.
- [6] 王增寿,朱光辉,李光乾.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[J].中国现代应用药学杂志,2002,19(2):155.
- [7] 胡永狮,汤秋华.癫痫患者 2 种治疗药物浓度的监测及其临床意义[J].中国医院药学杂志,2000,20(2):93.

收稿日期:2003-05-10