

HPLC 法同时快速测定血清中 苯妥英、卡马西平的浓度

唐细兰^① 郭俊锐

(中山医科大学附属第三医院药剂科;广州,510630)

提 要 用反相高效液相色谱法同时测定人血清中苯妥英、卡马西平两种抗癫痫药物,以苯胺作内标物,血样处理用乙腈沉淀蛋白后,于 ODS 色谱柱上分离,甲醇:乙腈:水(30:20:50)为流动相,流速1.5ml/min,检测波长214nm,两种药物分离良好,样品预处理过程快速简便,整个过程仅需20min 即可检出,适用于临床病人抗癫痫药物血浓度监测。

主题词 苯妥英/血液;卡马西平/血液;色谱法,高压液相

中图分类号 R971.6

苯妥英、卡马西平是临床上常用的抗癫痫药,由于苯妥英的治疗浓度范围较窄,卡马西平的血药浓度个体差异大,服药后的体内药物浓度难以估计,故监测血药浓度是很有必要的。苯妥英、卡马西平的血药浓度测定方法众多,一般采用缓冲盐为流动相以有机溶剂作提取,操作过程较繁琐,且内标物需要进口或合成而得。本实验在文献^[1~4]报道的基础上,探索一种更快速,简便的检测方法。应用于苯妥英及卡马西平的血清浓度测定。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪 器 美国 Speteca-physics SP8810 高效液相色谱仪,SP100 可变波长检测器及 SP4270 积分仪。TGL-16G 高速台式离心机(上海医用分析仪器厂),XW-80 旋涡混合器(上海医科大学实验仪器厂)。

1.1.2 试 剂 苯妥英标准品由卫生部临床检验中心提供,卡马西平标准品由中国生物制品厂提供内标物苯胺为分析纯,甲醇、乙腈均为色谱纯,水为双蒸水。

1.2 色谱条件

Spherisorb ODS 柱(4.6mm×200mm),流动相是甲醇:乙腈:水(30:20:50v/v),流速1.5ml/min,紫

外检测波长214nm,灵敏度0.02,柱压2320Psi,室温,数据处理仪参数:衰减32,纸速0.25cm/min。

1.3 标准溶液的配制

精密称取苯妥英90mg,卡马西平50mg,以乙腈为溶剂,溶解混合于100ml 容量瓶中,苯胺用乙腈稀释4000倍作为内标贮备液贮存于4℃冰箱备用。

1.4 血药标准曲线的测定

精确配制7只25ml 容量瓶贮备液(以双蒸水为溶媒)内含苯妥英分别为900、630、450、225、112.5、56.25、28.13μg/ml,卡马西平分别为500、350、250、125、62.5、31.25、15.63μg/ml,依次吸取上述各贮备液10.0μl 置200.0μl 正常人血清中,使苯妥英血浓度分别为45、31.5、22.50、11.25、5.625、2.813、1.407μg/ml,卡马西平血浓度分别为25、17.5、12.5、6.25、3.125、1.563、0.782μg/ml。各加入内标物贮备液苯胺10.0μl,按血清样品处理,进样10.0μl,以样品/内标物的峰高比值与苯妥英或卡马西平浓度求算直线回归方程。

1.5 血清样品的处理

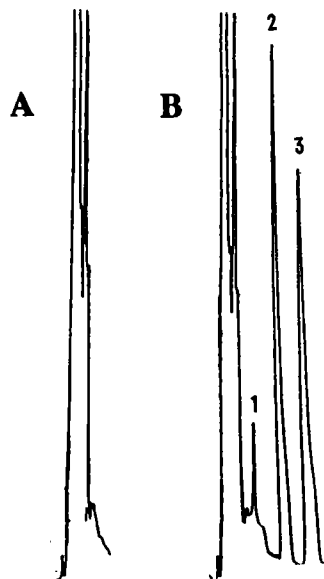
分离血清,取200.0μl 血清,加入10.0μl 内标苯胺混均,再加入400.0μl 乙腈沉淀蛋白,旋涡混合30s,高速离心(14500r/min)5min,取上清液10.0μl 进样。

^① 第一作者,1959年出生,女,学士,主管药师

2 结果

2.1 色谱

在本实验条件下,苯妥英和卡马西平、内标物苯胺均得到了良好的分离,保留时间分别为3.89min、5.19min、2.57min(附图)。



附图 空白与样本血清色谱

A 空白血清色谱;B 样本血清色谱;1)内标物(2.57min);2)苯妥英(3.89min);3)卡马西平(5.19min)

2.2 线性关系

以药物浓度为 X 轴,药物与内标峰高比值为 y 轴,直线回归方程:苯妥英 $y = -0.5526 + 0.09520x$, $r = 0.9996$;卡马西平 $y = -0.6371 + 0.1350x$, $r = 0.9992$;苯妥英最低检测浓度为 $0.706 \mu\text{g/ml}$,线性范围 $1.407 \sim 45 \mu\text{g/ml}$;卡马西平最低检测浓度为 $0.391 \mu\text{g/ml}$,线性范围为 $0.782 \sim 25 \mu\text{g/ml}$ 。

2.3 回收率

取试管4支各加入 $200.0 \mu\text{l}$ 健康人空白血清,各加入4种不同浓度的标准贮备液 $10.0 \mu\text{l}$,再加入苯妥英 $10.0 \mu\text{l}$,混合均匀后,按样品处理,每个样品进样6次(表1)。

2.4 精密度试验

2.4.1 日内重现性 在同1d 配制不同浓度的苯妥英、卡马西平血清样品,每一浓度样本各测定6次,测定日内精密度(表2)。

表1 苯妥英与卡马西平的血清回收率

苯妥英			卡马西平		
投入量	测得平均浓度	回收率 ¹⁾	投入量	测得平均浓度	回收率 ²⁾
($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)
35.50	36.10	101.69	18.50	19.63	103.41
17.75	16.95	95.49	9.25	9.36	101.19
8.88	9.24	104.05	4.63	4.54	98.06
4.44	4.57	102.93	2.31	2.42	104.76

1)平均回收率为 101.04 ± 2.19 , $cv = 2.17\%$; 2)平均回收率为 101.86 ± 1.31 , $cv = 1.29\%$

表2 苯妥英与卡马西平的日内重现性

苯妥英			卡马西平		
投入量	($\bar{x} \pm s$)	CV	投入量	($\bar{x} \pm s$)	CV
($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)
40.15	39.78 ± 0.21	0.53	18.70	18.6 ± 0.13	0.70
20.08	18.07 ± 0.18	0.99	9.36	8.93 ± 0.15	1.68
10.04	9.56 ± 0.16	1.67	4.68	4.74 ± 0.03	0.63
5.02	4.91 ± 0.12	2.44	2.34	2.38 ± 0.02	0.84
2.51	2.67 ± 0.02	0.75	1.17	1.67 ± 0.01	0.60

2.4.2 日间重现性 将不同浓度的苯妥英、卡马西平血清样品保存于 4°C 冰箱,每天取出重复测定,每种样本共测定6次,共6d,测定日间精密度(表3)。

表3 苯妥英与卡马西平的日间重现性

苯妥英			卡马西平		
投入量	($\bar{x} \pm s$)	CV	投入量	($\bar{x} \pm s$)	CV
($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	(%)
40.15	40.54 ± 0.19	0.47	18.70	19.85 ± 0.13	0.65
20.08	20.36 ± 0.20	0.98	9.36	8.57 ± 0.19	2.22
10.04	10.65 ± 0.35	3.29	4.68	5.14 ± 0.15	2.92
5.02	4.95 ± 0.22	4.44	2.34	2.53 ± 0.07	2.77
2.51	3.01 ± 0.03	0.99	1.17	1.18 ± 0.04	3.89

3 讨论

专一性在本色谱条件下,青霉素 G、氨基青霉

素、头孢唑啉、头孢氨苄、头孢拉定、头孢他定、头孢呋新、维生素 C 和肌苷均在 2min 内出峰,故不干扰本法测定,常用的抗癫痫药保留时间分别为:苯巴比妥 3.10min、硝基安定 5.37min、氯硝安定 5.48、舒乐安定 8.18min、安定 13.00min,由上可见苯巴比妥,舒乐安定、安定的保留时间均不干扰本法测定。而硝基安定和氯硝安定的保留时间与卡马西平接近,但在临床药物浓度监测中发现,服用常规剂量的患者血检测结果表明无峰形出现,故合用常规剂量的硝基安定或氯硝安定一般不影响卡马西平的测定。

根据上述资料表明,本方法灵敏度高,专一性强,线性范围广,重现性可靠,回收率良好,与其它 HPLC 法相比,具有样品预处理简单用乙腈沉淀蛋白,可免繁琐的提取过程等特点。

流动相以调节甲醇和乙腈及水的比例使两种药物得到了良好的分离,因未用盐类,无需每日清洗和平衡,内标物苯胺系化学品,易得且不受体内代谢产物的干扰,样品保留时间短,一个周期仅需 5min 即可完成。本法应用于临床获得较满意效果,但本文方法也有一定局限性,如硝基安定或氯硝安定用于抗癫痫时服用较大剂量可能对卡马西平的测定有干扰。

参 考 文 献

- 1 蔡鸿生,罗顺德,张先洲. 反相高效液相色谱法测定卡马西平血药浓度. 中国医院药学杂志,1993,13(1):25
- 2 张 泉,杨志英,任家佩,等. 用高效液相色谱法同时测定 3 种抗癫痫药血药浓度. 中国药学杂志,1992,27(1):19
- 3 Szab GK, Brown TR. Improved isocratic liquid-chromatographic simultaneous measurements of phenytoin, phenobarbital, primidone, carbamazepine, ethosuximide, and N-desmethyloximide in serum. Clin Chem, 1982,28:100
- 4 Kabra PM, Nelson MA, Marton LJ. Simultaneous very fast liquid-chromatographic analysis of ethosuximide, primidone, phenobarbital, phenytoin, and carbamazepine in serum. Clin Chem, 1983,29:473

(1995-05-15收稿 1995-08-11修回)

SIMULTANEOUS QUICK DETERMINATION OF PHENYTOIN AND CARBAMAZEPINE CONCENTRATIONS IN SERUM BY HPLC

Tang Xilan Guo Junrui

(Department of Pharmacy, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

Simultaneous determination of phenytoin and carbamazepine in serum by reversed phase HPLC was reported. Aniline was used as internal standard. Serum samples were pretreated by precipitating protein with acetonitrile, then separated by ODS chromatography. Methanol: Acetonitrile: Water (30:20:50) were used as flow-phase. Flowing speed 1.5ml/min. Detector wave length 214nm. Two drugs could be well separated. The sample pretreatment method was simple and quick, only 20 minutes was required for whole procedure. This method is valuable for monitoring antiepileptic drug concentrations in serum in clinical patients.

Subject headings phenytoin/blood; carbamazepine/blood; chromatography, highpressure liquid