

高效液相色谱法测定血中苯妥英浓度

邱丰和 刘力 罗毅 卢涌泉

(军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

1 前言

苯妥英(PHT)是迄今应用最广而且也是最有效的治疗癫痫病的药物之一,在体内经过饱和和代谢过程^[1],呈现非线性动力学特征。PHT的生物利用度的个体差异很大,在按常规剂量服药时,不同病人的血药浓度有很大差异,据此有人把PHT归为“高风险”类药物^[2],临床上经常需要精确分析PHT的浓度以调整病人的用药量。测定PHT血药浓度的色谱方法有不少报道,主要有柱上衍生化气相色谱(GC)^[3,4]和高效液相色谱(HPLC)法^[5-7]。本工作主要参考Maya^[5]的方法,但在样品处理、流动相配比、流速及检测波长等方面作了改进。

2 材料与方法

2.1 仪器和药品

仪器:HP系列高效液相色谱仪[HP1050四元泵,1040M二极管阵列检测器(DAD)及HP Chemstation]。

主要试剂及标准品:甲醇(色谱纯),重蒸水,四氢呋喃(分析纯);卡马西平标准品由公安部二所提供。苯妥英标准品由实验室自制。PHT和卡马西平分别配制成0.3mg/mL和1mg/mL的储备液,于4℃冰箱内保存备用。

2.2 样品准备

血浆:取0.5mL血浆于10mL具塞离心试管中,加一定量PHT,再加含有3μg/mL卡马西平(内标)的乙酸乙酯4mL,旋涡混合1分钟。然后在2000g转速下,离心3分钟。取出上层清液,置于另一干净离心试管内,加5mL蒸馏水洗涤其中的水溶物,涡旋混合30秒,在2000g的转速下离心3分钟。将上层有机相转移到10mL梨形瓶,旋转蒸发至干。最后用200μL流动相溶解,取10μL进入LC。

病人血样:取0.5mL抗凝全血加入3μg/mL内

标,其它操作同上。

2.3 色谱分析条件

色谱柱为内装Spherisorb-C₁₈(5μm)的不锈钢分析柱(150×2mm,大连化学物理研究所);流动相为甲醇-水-四氢呋喃(45:55:5, V/V/V),流速0.3mL/min;柱温为室温;检测波长210±2nm。

3 结果与讨论

3.1 色谱行为

图1示出了空白血浆、外加PHT的血浆及病人血样的色谱图。在上述色谱条件下,血浆及血样中的杂质峰不影响PHT的测定。经过预处理后,病人血样中全血和血浆的色谱差别不大,为方便起见,我们直接从病人的全血中提取PHT。

3.2 标准曲线和最低检测限

分别配制含PHT 0.2, 0.4, 0.6, 1, 4, 10和20μg/mL血浆,按样品准备步骤操作,以最小二乘法对实验数据做回归分析,回归方程 $Y = 4.5454X - 0.0974$,其中Y为PHT浓度(μg/mL),X为PHT与内标的峰面积比, $r = 0.9995$ 。最低检测浓度0.05μg/mL。

3.3 方法回收率

配制含不同浓度PHT的血浆,按同样方法作色谱分析,计算出PHT的检出浓度、相对回收率及其相对标准偏差(见表1)。

表1 血浆中外加PHT的相对回收率及实验精密度数据

| 外加浓度 (μg/mL) | 检出浓度 (μg/mL) | 相对回收率 (%) | RSD (%) | n |
|-----------------|-----------------|--------------|------------|---|
| 0.4 | 0.337 | 84.3 | 7.8 | 6 |
| 4.0 | 3.97 | 99.3 | 2.1 | 6 |
| 10.0 | 9.55 | 95.5 | 1.3 | 6 |

3.4 方法应用

(1)70岁男性患者,长期服用苯妥英钠(早晚各一次,每次两片,每片含苯妥英钠200mg),因疗效不明显,想了解服药前后的血药浓度,以此为依据来调

整用药量。图 2c 是早晨服药后 1.5 小时全血的色谱图, PHT 浓度为 $6.42\mu\text{g/mL}$ 。

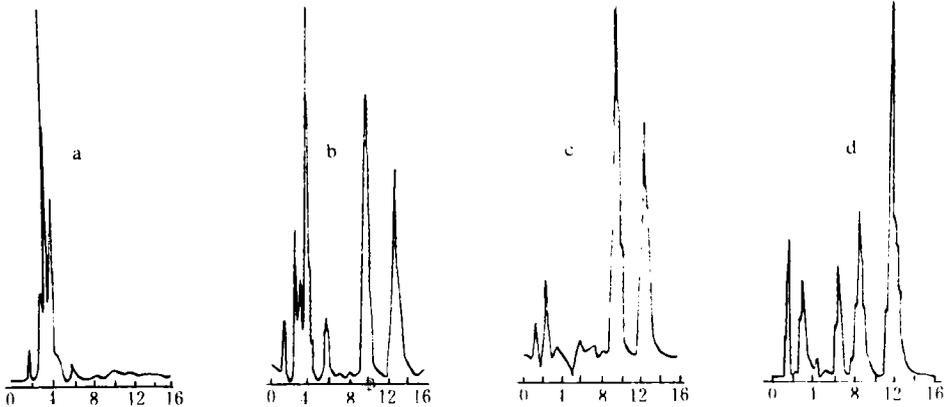


图 1 空血浆(a)、外加 PHT($4\mu\text{g/mL}$)的血浆(b)、病例 1 血样(c)和病例 2 血样(d)的色谱图
b, c 和 d 中的外加内标量均为 $3\mu\text{g/mL}$ 。

(2) 19 岁男性患者,有癫痫病史,服用过量药物以致昏迷,经某省级公安部门检验未发现血及胃内容物中有药物。用题示方法分析发现血中(见图 1d)含有大量 PHT。

关键词 高效液相色谱, 苯妥英, 血浆或全血

参考文献

- 1 Dodson W E, Prensky A L, de Vivo D C *et al.* Pediatrics, 1976;89:527
- 2 Doluisio J, Fedder D, Manley G *et al.* J Am Pharm

- Ass, 1973;13:278
- 3 Shimada K, Wakabayashi H. J Chromatogr, 1985; 339:331
- 4 Solow E B, Clin Chem, 1982;28(1):216
- 5 Maya M T, Farinha A R, Lucas A M *et al.* J Phar Biom Anal, 1992;10:1001
- 6 Vree T B, Steegers-Theunissen R P M, Baars A M *et al.* J Chromatogr Biom Appli, 1990;526:581
- 7 Liu H, Delgado M, Forman L J *et al.* J Chromatogr, 1993;616(1):105

A High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Phenytoin in Plasma or Whole Blood

Qiu Fenghe, Liu Li, Luo Yi and Lu Yongquan

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850)

An high performance liquid chromatographic method for the quantitative analysis of phenytoin(PHT) in human plasma or whole blood is described. After a one-step extraction of PHT and internal standard with ethyl acetate from human plasma or whole blood, samples were chromatographed on a Spherisorb- C_{18} column with a mobile phase of methanol-water-tetrahydrofuran(45/55/5, V/V/V) at a flow rate of 0.3mL/min. The eluant was monitored at 210nm. The linearity of the method was checked in the range of 0.2~ $20\mu\text{g/mL}$ in plasma. The recovery of PHT in plasma ranged from 84.3 to 99.3%.

Key words high performance liquid chromatography, phenytoin, plasma or whole blood