

气相色谱法检测人尿中 R, S-美芬妥英浓度*

黄松林 谢红光 王伟 许振华 蒋长虹 周宏灏

(湖南医科大学遗传药理学研究所 长沙 410078)

提 要 建立了人尿中 R, S-美芬妥英的气相色谱(GC)手性分离与检测方法。在选定的色谱条件下能很好地分离 R, S-美芬妥英,尿中其它物质无干扰。用外标法定量,线性范围为 12.5~2500 $\mu\text{g/L}$ 尿,最小检出浓度为 6 $\mu\text{g/L}$ 尿。方法具有样本制备简便、分析时间短、线性范围宽、干扰少、灵敏和准确等优点,已广泛用于人体内美芬妥英代谢的研究和肝药酶 CYP2C19 酶活性的检测。

关键词 气相色谱法, R-美芬妥英, S-美芬妥英, CYP2C19 酶, 手性分离, 尿

分类号 O658/Q5

1 前言

美芬妥英(mephenytoin, MP)是乙内酰胺类抗癫痫药,因长期用药可引起严重的药物不良反应,现仅作为工具药用于研究 MP 型药物氧化代谢的遗传多态性及其种族差异^[1]。MP 是由 S-美芬妥英(S-MP)和 R-美芬妥英(R-MP)两种对映体组成的混旋体。在人体内, S-MP 主要通过肝药酶 CYP2C19 酶^[2]代谢,即 S-MP 主要通过羟化反应快速生成 4'-羟基美芬妥英(4'-OH-MP),而 R-MP 则通过另一种肝药酶缓慢生成 5-苯基-乙基-乙内酰胺(PEH)^[3]。人群中 S-MP 羟化代谢呈二态分布,有强代谢者(EMs)和弱代谢者(PMs)之分。S-MP 的 PMs 同时也不能代谢经 CYP2C19 酶代谢的药物,如安定、去甲安定、普萘洛尔、甲基苯巴比妥、环烯巴比妥、奥美拉唑、丙咪嗪和氟呱等。为了测定个体对 S-MP 的代谢能力和 CYP2C19 酶活性,通常采用 HPLC 等方法测定其代谢产物 4'-OH-MP 的含量^[4]。但由于尿中 4'-OH-MP 的回收率很低,无法将 MP 羟化代谢障碍和药物吸收不良、未服药或尿样收集不完全等因素相区别^[1]。因此近年已采用 GC-NPD 或 GC-MS 方法测定服药后 0~8h 和 8~24h 尿样中 S-MP 和 R-MP 对映体的含量,求其 S/R 比值以反映个体羟化代谢能力^[5];但是,现有的 GC-NPD 或 GC-MS 方法存在分析时间长和分离不完全等缺点^[5,6]。本文所述方法具有快速、简便、灵敏和准确等优点,已广泛用于不同个体间或种族间美芬妥英代谢能力和

CYP2C19 酶活性的研究^[7]。

2 材料与方 法

2.1 药品与试剂

R, S-美芬妥英标准品由 G. R. Wilkinson 博士(Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA)赠送。美芬妥英口服片(100mg/片)购自美国 Sandoz 制药公司。二氯甲烷、甲醇和乙酸乙酯为市售分析纯试剂,水经去离子双蒸处理。

2.2 仪器

气相色谱仪为美国 HP 5890II 系列配有电子压力调节器、氮磷检测器(NPD)和 HP Vectro 486/33 VL 化学工作站(Chem Station)。手性石英毛细管柱(Chirasil-Val, 25m \times 0.25mm, 编号:9334)为美国 Alltech 产品。

2.3 标准溶液的配制

精确称取一定量 S-MP 和 R-MP,用 50% 甲醇水配成单标储备液(0.5g/L),用尿稀释储备液配成工作液(50mg/L)。标准溶液在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下冻藏。

2.4 分离与检测条件

参考 Wedlund 等^[5]方法进行修改,柱温 190 $^{\circ}\text{C}$,进样器 220 $^{\circ}\text{C}$,NPD240 $^{\circ}\text{C}$,检测器钽电流 30pA。高纯氮气流速为 0.85mL/min,高纯氢气和压缩空气的流速分别是 3.5 和 120mL/min。

2.5 尿样本的制备方法

精确吸取含有不同浓度的标准品的正常人尿样

* 国家自然科学基金(C39200154, A39270794, F39330230)和美国 CMB92-568 资助项目
本文收稿日期:1996-07-14, 修回日期:1996-09-08

或服药后收集的尿样 1 mL, 分别加入 4 mL 二氯甲烷, 振荡 4 min 后离心(3 500 r/min) 10 min; 吸取有机相 3 mL 于另一洁净试管中, 放入 37°C 恒温水浴, 用氮气吹干。残渣用 30 μ L 乙酸乙酯溶解, 取 5 μ L 进样(图 1)。

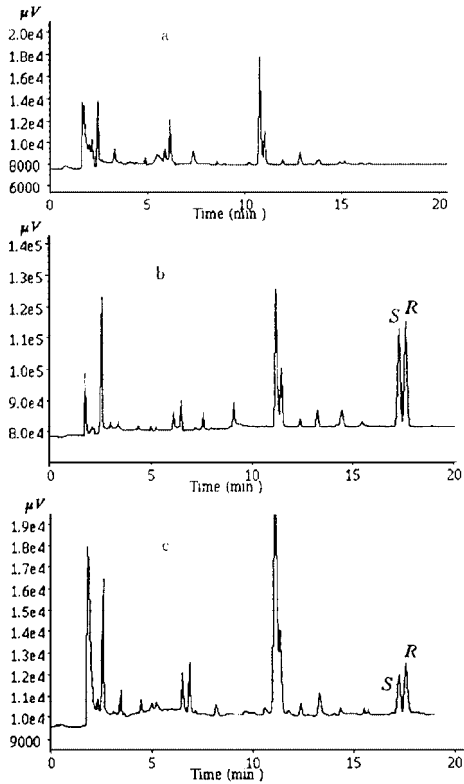


图 1 *S*-美芬妥英和 *R*-美芬妥英的气相色谱手性分离色谱图

Fig. 1 Chiral capillary gas chromatograms of *S*- and *R*-mephenytoin enantiomers

a. 空白尿, b. 标准尿样, c. 实测尿样。

a. blank urine, b. spiked urine, c. unknown urine.

2.6 标准曲线的制备

取 *S*-MP, *R*-MP 标准工作液, 用空白尿稀释成 12.5, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0, 625.0, 1250.0 和 2500.0 μ g/L 浓度的标准尿样; 标准样品制备与检测方法同上。以 *S*-MP 和 *R*-MP 的峰面积对标准尿样的 *S*-MP 和 *R*-MP 浓度作直线相关分析。

2.7 方法的质量控制评价

与空白尿对照, 以信噪比大于或等于 3 的尿尿样浓度为最小检测浓度。配制标准尿样 100 μ g/L, 500 μ g/L 和 2500 μ g/L 平行样各 5 份($n = 5$), 分别在

同一天内提取与检测, 以分析日内变异系数(CV); 按其日内变异分析方法, 在不同天内配制上述 3 个水平浓度的平行标样各 10 份($n = 10$), 并分别提取与检测, 以分析其日间变异系数(CV); 并据此计算相对回收率(测定值/加入值 $\times 100\%$)。

3 结果

尿样中 *S*-MP 和 *R*-MP 在现有分离与检测条件下获得较好分离, 且尿中杂质无干扰(图 1), 每个尿样分析时间小于 18 min。标准曲线及最小检测浓度见表 1。方法的回收率和重复性见表 2。

表 1 线性回归方程和最低检测限

Table 1 The linear regression equation and the lowest limit of detection

回归方程 Regression equation $Y = bX + a$ ($Y: \mu V$)	相关系数 Correlation coefficient (r)	最低检测限 The lowest limit of detection ($\mu g/L$)
<i>S</i> -MP $Y = 81.85X + 1340.92$	0.9989	6
<i>R</i> -MP $Y = 78.44X + 1690.72$	0.9994	6

表 2 人尿中 *S*-MP 和 *R*-MP 检测的变异系数和相对回收率

Table 2 Coefficient of variations (%) and relative recoveries (%) in determination of *S*-MP and *R*-MP in human urine

	CV(%)		回收率 Recovery(%) ($n = 5$)
	日内 intra-day ($n = 5$)	日间 inter-day ($n = 10$)	
<i>S</i> -MP	4.14	4.22	96.86 \pm 2.43
<i>R</i> -MP	2.93	3.49	96.23 \pm 2.61

4 讨论

目前手性分离 *S*-MP 和 *R*-MP 的方法主要有手性毛细管气相色谱法^[5,6]和用 β -环糊精作手性试剂的液相色谱方法^[8]。比较分析发现, 液相色谱方法灵敏度低, 线性范围窄, 故气相色谱法被广泛应用; 但在气相色谱方法中却存在分离不完全或时间过长等缺点。我们根据现有文献方法^[5,6]进行改进, 发现上述分离条件能明显缩短出峰时间, 并能使 *S*-MP 和

R-MP 获得基线分离(图 1-b 和 c), 最低检测浓度明显降低, 线性范围明显增宽, 方法稳定, 重复性好, 能满足简便、灵敏、快速和准确等要求, 已取代现有同类方法而被广泛应用于中国人群的 CYP2C19 酶活性分析^[7]。

参 考 文 献

- 1 谢红光, 周宏灏. 湖南医学, 1993; 10(2): 112
- 2 Goldstein J A, Faletto M B, Romke-Sparks M *et al.* Biochemistry, 1994; 33: 1743
- 3 Kupfer A, Roberts R K, Schenker S *et al.* J Pharmacol Exp Ther, 1981; 218: 193
- 4 Xie H G, Huang S L, Zhou H H. J Chromatogr B: Biomed Appl, 1995; 668(1): 125
- 5 Wedlund P J, Sweetman B J, McAllister C B *et al.* J Chromatogr Biomed Appl, 1984; 307: 121
- 6 匡唐永, 张家美, 邹安庆等. 药理学报, 1993; 28(4): 307
- 7 Xie H G, Xu Z H, Huang S L *et al.* Pharmacogenetics, 1996; 6(3): 235
- 8 Rona K, Szabo I. J Chromatogr Biomed Appl, 1992; 537: 173

Determination of R- and S-Mephenytoin in Human Urine by Gas Chromatography

Huang Songlin, Xie Hongguang, Wang Wei, Xu Zhenhua,
Jiang Changhong and Zhou Honghao

(Pharmacogenetics Research Institute, Hunan Medical University, Changsha, 410078)

Abstract The levels of R- and S-mephenytoin in human urine were determined by chiral capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector. The conditions of the chromatography and detection included a chiral capillary column (Chirasil-Val, 25m × 0.25mm i.d., Alltech), column temperature (T) 190°C, injector T 220°C, detector T 240°C, and the flow-rates of 0.85, 3.5 and 120 mL/min for nitrogen, hydrogen and air respectively. Based on the above conditions, the satisfactory separation of R- and S-mephenytoin was gained, and other interference from urine sample was not found. The linear curves for both tested compounds ranged between 12.5 and 2500 µg/L, with a minimum detectable concentration of about 6 µg/L. Because of its simplicity, rapidity, sensitivity and accuracy, this method has been extensively used for testing metabolic ability of S-mephenytoin polymorphic oxidation in the Chinese populations and for the determination of the activity of hepatic drug-metabolizing enzyme CYP2C19 using mephenytoin S/R ratio of the urine samples of subjects as an indicator.

Key words gas chromatography, R-mephenytoin, S-mephenytoin, enzyme CYP2C19, chiral separation, human urine

《高效液相色谱法及其专家系统》征购

由中国科学院大连化学物理研究所-国家色谱研究分析中心卢佩章院士、张玉奎研究员和梁鑫淼博士共同编著的《高效液相色谱法及其专家系统》一书由辽宁科学技术出版社正式出版。该书是基于大连化学物理研究所这个集体自七十年代初至今对高效液相色谱柱、仪器、色谱方法以及近几年发展的色谱专家系统的研究成果, 通过作者系统地总结编写而成的。全书共 48.4 万字, 分六章。书价 37 元/本, 包装费 2.5 元, 邮费 5.5 元/本, 共 45 元。

欲订购者, 请与《色谱》编辑部孙树平联系。地址: 大连市中山路 161 号, 邮编: 116012, 电话: 3693405。