

## 毛细管区带电泳法测定血浆中的苯妥英钠

刘 阳, 张颖冬, 石静平

(南京医科大学附属脑科医院, 江苏 南京 210029)

**摘要** 建立了以毛细管区带电泳测定血浆中苯妥英钠含量的方法。此法具有良好的重现性和线性关系, 日内、日间的平均相对标准偏差分别为 3.1% 和 4.7%, 平均回收率大于 95%, 标准曲线的相关系数为 0.998 5, 是一种简便、快速、准确、灵敏的测定方法。

**关键词** 高效毛细管区带电泳; 苯妥英钠; 血浆

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2002)01-0094-03

## Determination of Sodium Phenytoin in Plasma by High Performance Capillary Zone Electrophoresis

LIU Yang, ZHANG Ying-dong, SHI Jing-ping

(Brain Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** A method to determine sodium phenytoin in plasma by high performance capillary zone electrophoresis (CZE) has been established. CZE was performed in 25 mmol/L phosphate buffer solution (pH 12) at 20 °C. The capillary column size was 75  $\mu$ m i. d.  $\times$  30 cm (effective length). Sodium phenytoin was quantified with UV detector at 200 nm. The plasma was extracted by ether after plasma was processed with proteinase K for 3 h at 55 °C. Then the extract was evaporated to dryness. The residue was reconstituted in 1 mL of running buffer. The average recovery was higher than 95%. The precisions of intra-day and inter-day were 3.1% and 4.7% respectively. The detection limit of sodium phenytoin was 0.6 mg/L.

**Key words:** high performance capillary zone electrophoresis; sodium phenytoin; plasma

苯妥英钠(sodium phenytoin)作为抗癫痫药物用于临床治疗,有效血药浓度范围狭窄,个体差异大,具有饱和和代谢动力学性质,易产生毒性反应,因此临床上需要监测用药<sup>[1]</sup>。目前用于苯妥英钠测定的主要方法有放射免疫法(RIA)<sup>[2]</sup>、紫外分光光度法(UV)<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法(HPLC)<sup>[4,5]</sup>等。本文以毛细管区带电泳法(CZE)测定血浆中的苯妥英钠含量,具有简便、快速、成本低、回收率高且稳定的特点,适用于临床药物浓度测定。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

P/ACE 5010 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司)配有 200 nm、214 nm、254 nm 和 280 nm 4 块滤光片,Windows 控制和数据处理软件,未涂层石英毛细管为 75  $\mu$ m i. d.  $\times$  37 cm(有效长度 30 cm)(美国 Beckman 公司)。

苯妥英钠对照品(美国 Sigma 公司),蛋白酶 K

(美国 Merck 公司),空白血浆(南京市中心血站),磷酸、磷酸钠、乙醚、氢氧化钠和盐酸均为分析纯,所用试剂均用双蒸水配制。

#### 1.2 对照品溶液配制

称取 13.9 mg 苯妥英钠对照品溶于 10 mL 25 mmol/L pH 12 磷酸盐缓冲液中,制得含苯妥英钠质量浓度为 1.39 g/L 的对照品溶液。

#### 1.3 电泳条件

电泳缓冲液为 25 mmol/L pH 12 磷酸盐溶液,温度 20 °C,电压 22 kV,波长 200 nm,压力进样 5 s,分离时间 4 min。每次进样前以 0.1 mmol/L NaOH、双蒸水、电泳缓冲液各冲洗 2 min。

#### 1.4 样品处理

取 1 mL 含苯妥英钠对照品的血浆,加入 50  $\mu$ L 10 g/L 蛋白酶 K 溶液,混匀,置于 55 °C 水浴中保持 3 h。取出后加入 1 mL 0.5 mmol/L HCl 溶液,混匀,再加入乙醚抽提 3 次(每次 2 mL),合并乙醚提取液,以氮气吹干。残渣加入 1 mL 电泳缓冲液复

溶,以 14 000 r/min 的转速离心 5 min,取上清液进样检测。

### 2 实验结果

#### 2.1 标准曲线制备

以空白血浆加对照品溶液,配制对照品质量浓度分别为 2.0 mg/L,5.0 mg/L,10.0 mg/L,20.0 mg/L,30.0 mg/L,40.0 mg/L 和 50.0 mg/L 的系列血浆溶液,分别取 1 mL 血浆按“1.5”节处理后检测,以峰面积 A 对质量浓度 C(mg/L)进行线性回归,回归方程为  $A = 1\ 606.17C + 173.466$ ,  $r = 0.9985$ 。

#### 2.2 精密度测定

取含苯妥英钠质量浓度分别为 5.0 mg/L,14.5 mg/L 和 40.0 mg/L 的 3 种血浆溶液,1 d 内测定 5 次得到日内精密度,连续测定 5 d 得到日间精密度,结果见表 1。日内和日间的平均相对标准偏差分别为 3.1% 和 4.7%。

表 1 日内和日间精密度试验结果(n = 5)

Table 1 Intra-day and inter-day precisions of sodium phenytoin determination(n = 5)

Added (mg/L)	Intra-day		Inter-day	
	found (mg/L)	RSD (%)	found (mg/L)	RSD (%)
5.0	4.84 ± 0.18	3.7	4.84 ± 0.29	6.0
14.5	14.34 ± 0.51	3.5	14.38 ± 0.61	4.3
40.0	39.70 ± 0.99	2.2	39.53 ± 1.55	3.9

#### 2.3 回收率测定

取含苯妥英钠质量浓度分别为 5.0 mg/L,14.5 mg/L 和 40.0 mg/L 的 3 种血浆溶液进行测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 回收率试验结果(n = 3)

Table 2 Recovery of sodium phenytoin(n = 3)

Added (mg/L)	Found (mg/L)	Recovery (%)
5.0	4.64 ± 0.17	92.86 ± 3.38
14.5	13.99 ± 0.40	96.47 ± 2.77
40.0	38.62 ± 0.97	96.54 ± 2.44

#### 2.4 最低检测限

按信噪比为 3 测得最低检测限为 0.6 mg/L。

#### 2.5 与文献比较

RIA 存在放射性污染;UV 有操作繁琐、干扰因素多和灵敏度低等缺点,临床较少采用;HPLC 为较常用方法。高效毛细管区带电泳与高效液相色谱方法的比较见表 3。

表 3 毛细管区带电泳与高效液相色谱方法的比较

Table 3 Comparison of CZE and HPLC methods

Method	Linear range (mg/L)	Limit of detection (mg/L)	Impurity interfere	Cost	t <sub>R</sub> (min)
HPLC	5-80	0.4	great	high	>6
CZE	2-50	0.6	minor	low	<2.5

可见,虽然毛细管电泳法在线性范围、最低检测限方面略差于高效液相色谱法,但由于苯妥英钠的有效血药浓度为 10.0 mg/L ~ 20.0 mg/L,毛细管电泳法可以满足要求,并且具有干扰小、成本低、出峰快的优点。

#### 2.6 患者标本检测

早晨 8:00 取服用苯妥英钠治疗剂量的患者肘静脉血 2.5 mL,肝素抗凝,离心分离得 1 mL 血浆。经样品处理后,按“1.4”节所述电泳条件检测病人血浆标本,苯妥英钠迁移时间为 2.167 min,电泳图谱见图 1。

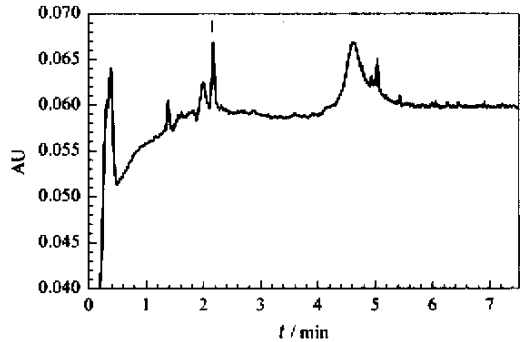


图 1 患者血浆的毛细管电泳图谱

Fig.1 Electropherogram of patient's plasma

1. sodium phenytoin.

### 3 讨论

苯妥英钠易溶于 pH > 11.7 的水溶液中,也可被弱酸分解为苯妥英。苯妥英为有机弱酸(pK<sub>a</sub> 为 8.3),难溶于水,易溶于乙醚<sup>[6,7]</sup>。根据其化学性质,我们选择快速、方便的 CZE 作为分离检测方法。

(1)在 3 个含对照品质量相同的标本中分别加入 1 mL 25 mmol/L pH 12 磷酸盐溶液或 0.5 mmol/L HCl,或者不加其他溶液,以乙醚抽提。比较 3 种 pH 条件下的抽提效果,可知加入 HCl 溶液的效果最好,但苯妥英钠的回收率也仅为 65%,这是因为苯妥英钠在血浆中与蛋白结合牢固(结合率达 90%),若加入 HCl 溶液以乙醚直接抽提,乙醚层下会有大量蛋白凝块。我们参考文献[8],在血浆中加入蛋白酶,于 55℃ 水浴 3 h 后,再加入 HCl 溶液,以乙醚抽提,水相中无蛋白凝块,回收率明显提高,

平均回收率大于 95%。

(2) 抽提后复溶溶液分别在 200 nm, 214 nm, 254 nm 和 280 nm 波长处进行检测, 以 200 nm 处紫外吸收最强, 峰面积最大, 所以选择 200 nm 作为检测波长。

(3) 在 pH 9~13 时, 随 pH 增加电渗流增大, 迁移时间缩短; 当 pH > 12 以后, 迁移时间变化减小; 故选择 pH 12 的缓冲液作为电泳缓冲液。

(4) 分别以 100 mmol/L, 50 mmol/L 和 25 mmol/L pH 12 磷酸盐溶液作为电泳缓冲液, 并调整进样时间进行电泳比较。以 25 mmol/L 磷酸盐溶液进样 5 s 时, 电流最小, 产生的焦耳热少, 保留时间短, 峰形尖锐, 所以选择 25 mmol/L 的磷酸盐溶液作为缓冲液, 压力加样 5 s。

(5) 电泳时电压在 5 kV ~ 25 kV 进行选择, 在 10 kV ~ 22 kV 电流与电压间符合欧姆定律, 而且随着电压升高, 电泳速度提高; 当电压大于 22 kV 后电流迅速升高, 并产生大量焦耳热, 而分离速度提高不大, 因此选择 22 kV 电压进行电泳。

参考文献:

[1] WANG Zu-su, PEI Yin-quan, JIN You-yu. *Clinical Psychopharmacology*. Beijing: Beijing Medical University & Peking Union Medical College Union Press, 1990. 175  
王祖诉, 裴印权, 金有豫. 临床精神药理学. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990. 175

[2] LI Zhen-jia, HAN Chun-sheng, WANG Jian-xun. *Prac-*

*tical Radioimmunology*. Beijing: Scientific & Technological Information Press, 1989. 524

李振甲, 韩春生, 王建勋. 实用放射免疫学. 北京: 科学技术文献出版社, 1989. 524

[3] CHEN Gang. *Theory & Practice on Therapeutic Drug Monitoring*. Beijing: The People's Military Medical Press, 1988. 388

陈刚. 治疗药物监测理论与实践. 北京: 人民军医出版社, 1988. 388

[4] YAN Xiao-hua, LI Huan-de, ZHANG Song-cao, et al. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1996, 16(1) 3

闫小华, 李焕德, 张松操, 等. 药物分析杂志, 1996, 16(1) 3

[5] LI Zhen-dong, XU Yan-gui, LIU Ying, et al. *Tianjin Pharmacy*, 1995, 7(2) 21

李振东, 徐彦贵, 刘颖, 等. 天津药学, 1995, 7(2): 21

[6] Pharmacopoeia Commission of Ministry of Health, the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 2*. Beijing: Chemical Industry Press, People's Health Press, 1990. 288

中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典, 二部. 北京: 化学工业出版社, 人民卫生出版社, 1990. 288

[7] Budavari S. *The Merck Index*. 12th ed. Whitehouse Station(USA): Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., 1996. 1 259

[8] AN Deng-kui. *Pharmaceutical Analysis*. 3rd ed. Beijing: People's Health Press, 1995. 288

安登魁. 药物分析. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 288

《实用高效液相色谱法的建立》(第二版) 征订启事

[美] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch 著

张玉奎 王杰 张维冰 译

本书以大量分析实例翔实论述了 HPLC 方法建立的基本思路和策略。作者在说明 HPLC 分离分析实际样品的方法建立时, 运用具体实例, 并结合计算机模拟的方法说明了方法建立的基本模式。对于不同类型样品和不同分析目的的实际分离过程, 作者运用循序渐进的方法, 系统地使读者逐步掌握方法建立的要领。本书可作为色谱实验人员日常分析中的案头参考书, 对于从事色谱理论和实验研究的科技人员也具有很高的参考价值。

本书于 2001 年 1 月由华文出版社出版, 共 763 页, 70 克胶版纸印刷, 每本定价 98 元, 邮寄费 2 元, 订购者请将购书款汇至 辽宁省大连市中山路 161 号, 国家色谱研究分析中心, 孙生才收(邮编 116012)。