

血清中美西律的柱前衍生化-液相色谱荧光检测

张慧¹, 余琛^{1*}, 刘罡一¹, 贾晶莹¹, 洪有采¹, 徐修容²

(1. 上海市徐汇区中心医院, 上海 200031; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要: 目的 建立血清中盐酸美西律的柱前衍生化-液相色谱荧光检测法。方法 血清样品用丙酮液直接沉淀蛋白后, 定量加入荧光胺丙酮溶液, 得盐酸美西律的荧光衍生物。采用 Alltima C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为分析柱; 流动相为甲醇-水-2.4 mol·L⁻¹ 二乙胺-磷酸缓冲液(pH 4.0) (70: 28: 2); 荧光检测激发波长(E_x) 为 392 nm, 发射波长(E_m) 为 480 nm。盐酸美西律的保留时间为 6.5 min。结果 盐酸美西律在 0.100 ~ 6.400 mg·L⁻¹ 线性关系良好。本法的最低检测质量浓度为 5 μg·L⁻¹, (S/N ≥ 4)。批内、批间精密度的为 1.34% ~ 5.31%。结论 本法操作简便, 有良好的灵敏度和专一性, 可满足盐酸美西律的临床血药浓度的监测和药代动力学研究。

关键词: 盐酸美西律; 柱前衍生化; 高效液相色谱荧光检测法; 血药浓度

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)03-0215-03

HPLC-fluorescent spectrometric determination of serum mexiletine concentration after derivatization with fluram

ZHANG Hui¹, YU Chen¹, LIU Gang-yi¹, JIA Jing-ying¹, HONG You-cai¹, XU Xiu-rong²

(1. Shanghai Xu Hui District Central Hospital, Shanghai 200031, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: **Aim** To establish an HPLC-fluorescent spectrometric method for the determination of mexiletine hydrochloride in plasma after derivatization with fluram. **Methods** Fluram acetone solution was added to the deproteinized plasma with acetone to obtain the derivative of mexiletine. The HPLC method was performed on a column of Allitima C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-water-diethylamine-phosphoric acid buffer (2.4 mol·L⁻¹, pH 4.0) (70: 28: 2), and the detective wavelength were set at E_x 392 nm and E_m 480 nm. **Results** Mexiletine has a liner range over the concentration range from 0.100 - 6.400 mg·L⁻¹. The lowest detectable concentration of this method was 5 μg·L⁻¹ (S/N ≥ 4). The intra-day and inter-day RSDs were 1.34% - 5.31%, respectively. **Conclusion** This method is simple, selective and can be used for therapeutic drug monitoring (TDM) and pharmacokinetic studies of mexiletine.

Key words: mexiletine hydrochloride; pre-column derivatization; HPLC-FLU; serum drug concentration

盐酸美西律(mexiletine hydrochloride), 又名慢心律。是一钠通道阻滞剂类的抗心律失常药物, 有抑制心肌传导作用, 还具有抗惊厥和局部麻醉作用, 临床上主要用于急、慢性室性心律失常和对利多卡因治疗无效的室性心律失常^[1]。但该药的安全范围较小, 个体差异大, 肝、肾功能的变化以及药物间的相

互作用均能影响该药的代谢和血药浓度^[1, 2], 而临床疗效和不良反应又均与该药的药浓度有一定的相关性, 故有必要进行临床血药浓度监测。本实验根据盐酸美西律属伯胺类化合物的特点, 建立了盐酸美西律血药浓度的柱前衍生化-液相色谱荧光检测法。该方法与文献^[3-7]报道的各种方法相比, 具有费用低廉、取血量少、操作简便、快速、可靠和定量检测灵敏度高的特点, 可很好地满足临床上盐酸美西律药物检测的需要。

收稿日期: 2002-04-16.

基金项目: 上海市徐汇区卫生局科研基金资助项目(C01-55).

* 通讯作者 Tel: 86-21-54030245, Fax: 86-21-54030254,

E-mail: chen-yu@online.sh.cn

材料和方法

仪器 岛津 SPD-10A 泵; 日立 F1000 荧光检测器; Rheodyne 7725 进样器(带 20 μL 定量环); LCCO-I 型柱温箱(无锡保灵电子设备厂); CDP-4S 色谱数据处理机(上海五丰电液成套工程有限公司); XW-80 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂); SB3200 超声波清洗器(上海必能信超声波仪器厂); TGL-16G 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

药品与试剂 盐酸美西律对照品, 上海第二制药厂(批号: 92003; 纯度 > 98%); 荧光胺, Fluka 公司(EEC No: 2538145; 纯度 > 98%); 其他试剂均为分析纯, 水为纯水。

0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液(pH 9.2)的配制: 硼酸 0.62 g 和硼砂 2.19 g, 加水溶解后, 稀释至 100 mL。

2.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二乙胺-磷酸缓冲液(pH 4.0)的配制: 精密量取二乙胺 25 mL, 加水约 50 mL, 振摇, 使之溶解, 再用磷酸调节至 pH 4.0。

荧光胺丙酮溶液的配制: 称取荧光胺适量用丙酮配制成质量浓度为 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的丙酮溶液。

贮备液与对照液 精密称取盐酸美西律适量用甲醇配制成质量浓度为 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮备液, 使用时用水稀释成 1 和 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照液。上述溶液均置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存。

色谱分析条件 分析柱为 Alltima C_{18} (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水-2.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二乙胺-磷酸缓冲液(pH 4.0) (70: 28: 2); 柱温为 50 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 荧光检测波长为 E_x : 392 nm, E_m : 480 nm。

生物样本及衍生化处理 取血清 50 μL 置 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 加丙酮 100 μL 。旋涡振荡 1 min, 超声处理 2 min, 经高速离心 3 min (17 000 $\times g$) 后, 取上清液 50 μL 置另一 1.5 mL 具塞塑料离心管中, 加 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 荧光胺丙酮溶液 50 μL , 旋涡振荡 30 s, 加 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液(pH 9.2) 50 μL , 旋涡振荡 30 s, 静置 5 min 后, 高速离心 3 min (17 000 $\times g$), 取上清液 20 μL 进样。

结果

1 线性范围和检测灵敏度

在空白血清中加入不同量的盐酸美西律对照液, 配制成质量浓度分别为 0.100, 0.200, 0.400, 0.800, 1.600, 3.200 和 6.400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸美西律血清标准液。按生物样本预处理方法处理后进样。

求出盐酸美西律的峰高(H)对盐酸美西律的浓度(C)进行线性回归, 得回归方程为: $C = 0.0149 + 1.817 \times 10^{-4} H$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。结果表明, 盐酸美西律在 0.100 ~ 6.400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰高呈线性关系。本法的最低检测质量浓度为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ($S/N \geq 4$)。盐酸美西律的保留时间为 6.5 min, 色谱图见图 1。

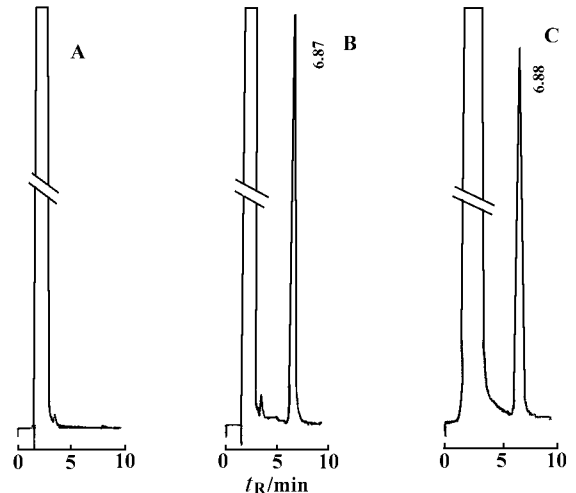


Figure 1 Chromatograms of blank serum (A), serum spiked with mexiletine (B, $t_R = 6.87$ min) and human plasma after oral administration of mexiletine (C)

2 精密度与回收率

2.1 精密度 在空白血清中加入不同量的盐酸美西律对照液后, 按生物样本预处理方法处理后进样。结果见表 1。

2.2 回收率 在空白血清中加入不同量的盐酸美西律对照液后, 按生物样本预处理方法处理后进样, 计算相对回收率, 结果见表 1。另取相应量的对照液直接进样测定, 按血清样品中的盐酸美西律的峰高与直接进样相应量的盐酸美西律的峰高计算提取回收率。盐酸美西律的平均提取回收率为 99.21%。

3 干扰性试验

为了考察方法的特异性, 作者选择了一些在临床上常与盐酸美西律联合使用以及一些其他抗心律失常药物进行了干扰性试验。结果表明盐酸普罗帕酮、盐酸普萘洛尔、胺碘酮、盐酸维拉帕米、盐酸索他洛尔及硫氮萘酮等对测定均无干扰。

4 样品分析

临床心律失常患者, 分别服用不同剂量的盐酸美西律片剂, 7 d 后于再次服药前静脉取血, 离心分离血清, 按生物样本衍生化处理测定, 计算血药浓度(稳态谷值)。临床血样测定初步结果表明, 3 位

患者给药后(150 mg/次, q 8 h)的稳态谷值分别为 1.438, 0.702 和 0.936 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 另一位患者给药后 (50 mg/次, q 12 h)的稳态谷值为 0.210 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Table 1 Recoveries of mexiletine hydrochloride from human plasma ($\bar{x} \pm s$)

Amount added/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Intra-day (n = 6)		Inter-day (n = 6)		Recovery of the method (n = 12)	
	Amount measured	RSD / %	Amount measured	RSD / %	Amount measured	Recovery / %
0.200	0.210 \pm 0.008	3.81	0.206 \pm 0.009	4.57	0.208 \pm 0.009	104 \pm 4
0.800	0.78 \pm 0.03	3.79	0.785 \pm 0.010	1.34	0.785 \pm 0.021	98.2 \pm 2.7
3.200	3.24 \pm 0.17	5.31	3.21 \pm 0.06	1.71	3.22 \pm 0.12	101 \pm 4

讨论

文献报道的体内盐酸美西律检测方法有高效液相色谱-紫外检测法^[4,5]、二硫化碳衍生化气相色谱法^[3]、高效薄层荧光扫描法^[6]、气相色谱-质谱法^[7]等。因仪器条件的限制,上述气相色谱法、高效薄层荧光扫描法和气相色谱-质谱法在临床血药浓度监测中少有应用。目前在临床血药浓度监测中,最常用的是高效液相色谱-紫外检测法,但由于血样中内源性杂质干扰大,需经液-液萃取法来富集、净化。

盐酸美西律的化学名为 1-(2,6-二甲苯氨基)-2-丙胺,是一伯胺类化合物。荧光胺是一常用荧光衍生化试剂,可同伯胺及大多数氨基酸反应,反应迅速,衍生物具有高荧光强度,而试剂本身则迅速水解为不发荧光的产物,是一理想的柱前衍生化试剂。为此利用盐酸美西律可与荧光胺反应的特性,采用血样直接沉淀后,定量加入荧光胺丙酮溶液,用高效液相色谱-荧光检测法测定其荧光衍生物,此法的灵敏度和选择性较 HPLC-UV 法均有很大的提高。

文献^[8]报道荧光胺的反应条件为 pH 8 ~ 10, 室温。在本实验中作者对影响衍生化效率的主要因素:反应时的 pH 值、缓冲液的种类、反应的时间以及荧光胺所需的浓度,采用正交法进行了优选。每个因素选择 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表对含 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸美西律血样进行预处理并测定,结果表明,在 pH 9.2, 使用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸缓冲液,静置 5 min, 荧光胺质量浓度为 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,反应效果最佳。

根据文献^[9]报道,盐酸美西律的有效血药浓度为 0.5 ~ 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 作者在临床血药浓度检测时,将血药浓度范围定为 0.1 ~ 6.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而本方法的最低检测质量浓度可达 5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本方法专一性较好,操作简便,检测灵敏度高,不仅可很好地满足

临床上盐酸美西律药物监测的需要,亦可用于该药的药代动力学研究。

References:

- [1] Sun C. *Clinical Medicines and Chemical Reagents* (临床药物及化学试剂) [Z]. Shanghai: Encyclopedia of China Publishing House, 1995. 196.
- [2] Lin Q, Guo ZG, Li XP. Effect of cimetidine on the mexiletine pharmacokinetics [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 1991, 16(3): 215 - 218.
- [3] Li P, Kong QH, Ji SG, et al. Mexiletine pharmacokinetics in healthy volunteers and the correlation of mexiletine plasma concentrations with its therapeutic effects in patients [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 1991, 7(1): 37 - 43.
- [4] Lv JS, Hang DB, Yan XF, et al. Determination of mexiletine in serum and the study of the volunteer pharmacokinetics by HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药理学), 1988, 5(3): 28 - 33.
- [5] Ren KQ, Huang AM. Determination of mexiletine and lidocaine by HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药理学杂志), 1992, 12(5): 211 - 213.
- [6] Ling Q, Guo ZQ. HPTLC determination of mexiletine in plasma [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1992, 12(4): 211 - 213.
- [7] Dasgupta A, Yousef O. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of serum mexiletine concentration after derivatization with perfluorooctanoyl chloride, a new derivative [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 705(2): 283 - 288.
- [8] Zhang RB, Xu XR. *HPLC — Application in Medical Research* (高效液相色谱在医学研究中的应用) [M]. Shanghai: Shanghai Science Technical publishing House, 1983. 201 - 202.
- [9] Chen G. *Therapeutic Drug Monitoring (Theory and Practice)* (治疗药物监测:理论与实际) [M]. Beijing: Chinese People's Military Surgeon Publishing House, 1988. 341 - 345.