

· 药物分析与检验 ·

高效液相色谱法同时测定苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平血药浓度

陈 坚 朱伟群 方维军 张灯玲 丁宗政(上海 201600 上海松江中心医院)

摘要 目的:建立同时测定血清中苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平的浓度的高效液相色谱法(HPLC)。方法:血清乙酸乙酯提取浓集后进样,采用 C_{18} 柱($220 \times 4.6, 5\mu\text{m}$),以甲醇-水(50:50)为流动相,苯乙酮为内标物,在波长210nm处测定。结果:苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平的线性范围为 $0.63 \sim 44\mu\text{g/ml}$,三者平均回收率均大于97%,日内和日间误差小于5%。结论:本法快速、简便、准确,适用于治疗药物监测和药动学研究。

关键词 高效液相色谱法;苯巴比妥;苯妥英钠;卡马西平;血药浓度

Simultaneous determination of phenobarbital, phenytoin and carbamazepine in serum by HPLC

Chen Jian(Chen J), Zhu Weiqun(Zhu WQ), Fang Weijun(Fang WJ), *et al* (Shanghai Songjiang Center Hospital, Shanghai 201600)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To simultaneously determine phenobarbital, phenytoin and carbamazepine in serum by HPLC. **METHODS:** Acetophenone was selected as the internal standard. A UV detector($\lambda 210\text{nm}$) and C_{18} column was used. Serum sample(0.1 ml) was extracted with 1 ml acetic ether. The organic layer was evaporated to dryness under N_2 stream in at water bath 60°C . The residue was dissolved with $100\mu\text{l}$ acetophenone and $20\mu\text{l}$ was injected. The mobile phase was methanol water(50:50). **RESULTS:** The linearrange of phenobarbital, phenytoin and carbamazepine was $0.63 \sim 44\mu\text{g/ml}$. The RSD of inter-day and intra-day in three substances was less than 5%. The extraction recovery was more than 97%. The detection limits in serum was $0.25\mu\text{g/ml}$ for phenobarbital, phenytoin and carbamazepine. **CONCLUSION:** The method was accurate and sensitive, suitable for TDM and pharmacokinetic study of phenobarbital, phenytoin and carbamazepine.

KEY WORDS HPLC, phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, serum concentrations

苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平在临床上常用于抗癫痫治疗,并经常有联合用药情况,由于药物之间的相互影响,使血药浓度改变很大。由于血药浓度个体差异大,因此,在长期用药或增减药物剂量时对体内血药浓度进行监测显得十分必要。有关苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平的血药浓度测定方法众多,用高效液相色谱法测定血清中苯妥英钠和卡马西平的浓度国内已有报道^[1,2]。但尚无同时测定三者血药浓度的报道,我们建立此方法,适用于临床血药浓度监测和药动学研究。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: KONTRON 322 型高效液相色谱仪; KONTRON 332 型可变紫外检测器; KONTRON D450 数

据处理系统; 80-2 离心沉淀器(上海手术器械厂); H-92 微型混合器(西巴斯生物技术开发公司); 色谱柱: KONTRON $220 \times 4.6\text{mm}, 5\mu\text{m}$ 。

1.2 试剂: 甲醇为色谱纯; 乙酸乙酯、苯乙酮均为 AR 级; 苯巴比妥钠对照品、苯妥英钠对照品和卡马西平对照品(中国药品生物制品检定所)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 流动相为甲醇-水(50:50), 检测波长 210nm, 流速: 1.0ml/min , 灵敏度: 0.05AUFS 。

苯乙酮为内标物。此条件下苯巴比妥保留时间为 4.90min, 苯妥英钠为 8.16min, 卡马西平为 11.28min, 苯乙酮为 6.80min, 4 个峰能较好地分离, 血清内源物干扰少。色谱图见图 1, 2。

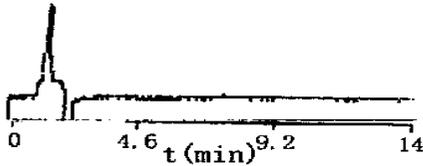


图1 空白色谱图

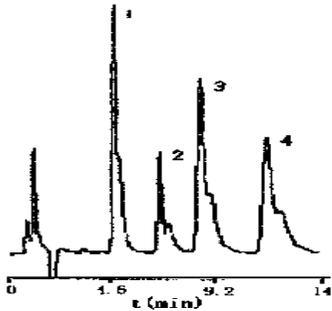


图2 血浓色谱图

1 - 苯巴比妥; 2 - 苯乙酮; 3 - 苯妥英钠; 4 - 卡马西平

2.2 标准溶液的配制:精密称取 105℃干燥至恒重的苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平 0.0210, 0.0220 和 0.0200g 分别至 50ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,分别得 420.00, 440.00 和 400.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。再精密吸取上述 3 种标准液各 10ml 于 50ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,得 84.00: 88.00: 80.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的苯巴比妥 - 苯妥英钠 - 卡马西平混合标准液。精密吸取一定量,配制成 1.31: 1.38: 1.25, 2.63: 2.69: 2.50, 5.25: 5.50: 5.00, 10.50: 11.00: 10.00, 21.00: 22.00: 20.00, 42.00: 44.00: 40.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的苯巴比妥 - 苯妥英钠 - 卡马西平系列标准液。另精密配制 5.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯乙酮溶液。

2.3 标准血清预处理:精密吸取正常人血清 0.1ml 2 份,一份加甲醇 0.1ml,另一份加标准液 0.1ml(苯巴比妥 - 苯妥英钠 - 卡马西平 = 5.25: 5.50: 5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$),混匀,各加乙酸乙酯 1ml 振荡提取 5min,离心(4000r/min)5min,精密吸取上清液 0.5ml,于 60℃水浴中 N 流吹干,用苯乙酮(5.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)标准液 100 μl 分别溶解残渣,取 20 μl 进样。

2.4 血清标准曲线的制备:精密吸取空白血清 0.1ml 7 份,分别加入苯巴比妥 - 苯妥英钠 - 卡马西平系列标准液 0.1ml(1.31: 1.38: 1.25, 2.63: 2.69: 2.50, 5.25: 5.50: 5.00, 10.50: 11.00: 10.00, 21.00: 22.00: 20.00, 42.00: 44.00: 40.00, 84.00: 88.00: 80.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$),余按标准血清预处理项下操作,此时的苯巴比妥 - 苯妥英钠 - 卡马西平系列浓度分别为 0.66: 0.69: 0.63, 1.31: 1.38: 1.25, 2.63: 2.69: 2.50, 5.25: 5.50: 5.00, 10.50:

11.00: 10.00, 21.00: 22.00, 20.00, 42.00: 44.00: 40.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。进样后分析测定,以标准液浓度为 X,样品峰与内标峰之比为 Y,作回归处理,其回归方程为: Y(苯巴比妥) = - 5.7693 + 30.5440 X,相关系数 $r = 0.9995$; Y(苯妥英钠) = - 25.8350 + 31.6200 X,相关系数 $r = 0.9994$; Y(卡马西平) = - 14.9800 + 39.6347 X,相关系数 $r = 0.9999$ 。

2.5 回收率试验:分别取苯巴比妥 - 苯妥英钠 - 卡马西平为 2.63: 2.69: 2.50, 10.50: 11.00: 10.00, 42.00: 44.00: 40.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的高、中、低 3 种浓度,每浓度取 5 份,依标准血清预处理法处理后即得苯巴比妥 - 苯妥英钠 - 卡马西平实际浓度为 1.31: 1.38: 1.25, 5.25: 5.50: 5.00, 21.00: 22.00: 20.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$,然后进样分析测定浓度,测得浓度与实际浓度之比即为方法回收率,结果见表 1。

表 1 方法回收率($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	实际浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	测得浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	回收率 (%)	平均回收 率(%)
苯巴比妥	1.31	1.35 \pm 0.04	103.06 \pm 2.99	
	5.25	5.36 \pm 0.25	102.10 \pm 4.80	101.80 \pm 1.44
	21.00	21.05 \pm 1.04	100.23 \pm 4.93	
苯妥英钠	1.38	1.40 \pm 0.03	101.63 \pm 2.73	
	5.50	5.34 \pm 0.14	97.09 \pm 2.47	100.86 \pm 3.45
	22.00	22.85 \pm 0.80	103.85 \pm 3.64	
卡马西平	1.25	1.30 \pm 0.04	104.40 \pm 3.30	
	5.00	4.88 \pm 0.22	97.50 \pm 4.44	101.15 \pm 3.47
	20.00	20.31 \pm 0.79	101.55 \pm 3.96	

一组用正常人血清准确配制高、中、低 3 种浓度,按上述方法,测定苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平峰面积,并与内标峰面积相比得到面积比 R1。另一组用水准确配制高、中、低 3 种浓度,按上述方法,测定苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平峰面积,并与内标峰面积相比得到面积比 R2。R1/R2(%) 即为绝对回收率,结果见表 2。

用乙酸乙酯 1ml 的提取率,结果见表 3。

2.6 精密度测定:配制一定浓度的苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平标准液,加入一定量内标,按回收率项下操作,每天测 5 次,共测 3d,结果见表 4,5。

2.7 最低检测浓度和线性范围:苯巴比妥的最低检出浓度为 0.131 $\mu\text{g}/\text{ml}$,苯妥英钠的最低检出浓度为 0.138 $\mu\text{g}/\text{ml}$,卡马西平的最低检出浓度为 0.250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平的血药浓度在 0.63 ~ 44.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内呈良好线性相关。

2.8 专一性试验:考虑到临床检测及药动学研究的干

表 2 绝对回收率($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	实际浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	R ₁	R ₂	回收率(%)	平均回收率(%)
苯巴比妥	1.31	0.1535 \pm 0.01	0.1722 \pm 0.01	103.06 \pm 2.99	101.80 \pm 1.44
	5.25	0.5625 \pm 0.02	0.6254 \pm 0.03	102.10 \pm 4.80	
	21.00	2.3290 \pm 0.11	2.6210 \pm 0.03	100.23 \pm 4.93	
苯妥英钠	1.38	0.1432 \pm 0.01	0.1769 \pm 0.01	101.63 \pm 2.73	100.86 \pm 3.45
	5.50	0.7378 \pm 0.02	0.8550 \pm 0.03	97.09 \pm 2.47	
	22.00	2.7870 \pm 0.16	3.4448 \pm 0.07	103.85 \pm 3.64	
卡马西平	1.25	0.1572 \pm 0.01	0.1766 \pm 0.01	104.40 \pm 3.30	101.15 \pm 3.47
	5.00	0.5577 \pm 0.03	0.6967 \pm 0.04	97.50 \pm 4.44	
	20.00	2.3942 \pm 0.22	2.7963 \pm 0.06	101.55 \pm 3.96	

表 3 提取率($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	实际浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	测得浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	回收率(%)	平均回收率(%)
苯巴比妥	1.31	1.34 \pm 0.02	102.03 \pm 1.58	100.74 \pm 1.12
	5.25	5.21 \pm 0.05	100.19 \pm 0.80	
	21.00	21.07 \pm 0.65	100.01 \pm 3.11	
苯妥英钠	1.38	1.39 \pm 0.03	100.72 \pm 0.72	100.11 \pm 0.57
	5.50	5.47 \pm 0.02	99.58 \pm 0.46	
	22.00	21.91 \pm 0.21	100.03 \pm 0.95	
卡马西平	1.25	1.24 \pm 0.01	100.08 \pm 0.81	99.85 \pm 0.31
	5.00	4.94 \pm 0.03	99.50 \pm 0.98	
	20.00	19.85 \pm 0.21	99.98 \pm 1.06	

表 4 日内精密性($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	实际浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	测得浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD(%)
苯巴比妥	1.31	1.26 \pm 0.03	2.38
	5.25	5.30 \pm 0.15	2.78
	21.00	21.11 \pm 0.25	1.17
苯妥英钠	1.38	1.36 \pm 0.06	4.41
	5.50	5.41 \pm 0.18	3.32
	22.00	22.34 \pm 0.55	2.47
卡马西平	1.25	1.28 \pm 0.03	2.33
	5.00	4.92 \pm 0.17	3.49
	20.00	20.01 \pm 0.44	2.19

扰情况,选择了几种可能合用的药物进样,结果保留时间扑痫酮为 4.03 min,安定为 14.04 min,可见以上药物对本法测定无干扰。

3 讨论

表 5 日间精密性($\bar{x} \pm s, n = 5$)

	实际浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	测得浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	RSD(%)
苯巴比妥	1.31	1.34 \pm 0.04	2.90
	5.25	5.36 \pm 0.25	4.70
	21.00	21.05 \pm 1.04	4.92
苯妥英钠	1.38	1.36 \pm 0.03	2.50
	5.50	5.41 \pm 0.14	2.54
	22.00	22.34 \pm 0.80	3.50
卡马西平	1.25	1.28 \pm 0.04	3.15
	5.00	4.92 \pm 0.22	4.55
	20.00	20.01 \pm 0.79	3.90

3.1 以前曾有报道血清样品处理用氯仿提取或采用乙腈蛋白沉淀法处理样品,但前者对苯妥英钠的测定有干扰,而后者则蛋白难以除尽,影响色谱柱的寿命。故经过反复测试和参考有关文献后,改用乙酸乙酯提取,从而克服了上述两者的缺点,提高了分离效果。

3.2 国内外有关高效液相色谱法测定抗癫痫药的血药浓度报道均为单药或二药,基于临床抗癫痫治疗常采用联合用药,而本法可同时测定 3 种药物的血药浓度,且灵敏度高,专一性强,重现性好。适用于临床治疗药物监测和药动力学研究。

参考文献

- 1 蔡鸿生,罗顺德,张先洲,等.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,1990,13(1):23.
- 2 任克勤,黄安铭.HPLC 法同时测定血清中苯妥英钠、卡马西平的浓度.中国医院药学杂志,1990,10(10):440.

收稿日期:1998-08-04