

单步萃取-HPLC法同时测定人血清中3种抗癫痫药浓度

付成效*, 毕津莲#, 李湘斌, 阳波, 邓丽菁(南华大学第一附属医院药剂科, 衡阳市 421001)

中图分类号 R971⁺.6;R969.1

文献标识码 A

文章编号 1001-0408(2011)02-0139-03

摘要 目的:建立以单步萃取-高效液相色谱法同时测定人血清中卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥浓度的方法。方法:血清样品采用二氯甲烷单步萃取后进样测定,色谱柱为Ultimate XB-C₁₈,流动相为甲醇-水(70:30),流速为1 mL·min⁻¹,检测波长为240 nm,柱温为25 ℃,内标为2-氨基-2-氯-5-硝基二苯酮。结果:卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥血药浓度分别在1.33~33.25 mg·L⁻¹($r=0.999\ 6$)、1.96~49.0 mg·L⁻¹($r=0.999\ 5$)、2.88~72.0 mg·L⁻¹($r=0.998\ 8$)范围内线性关系良好,最低检测限分别为0.06、0.13、0.14 mg·L⁻¹,方法回收率分别为94.0%~109.1%、93.6%~98.7%、97.0%~105.2%,日内、日间RSD均<10%。结论:本法操作简便、快速、准确、经济实用,可满足临床快速监测的需要。

关键词 单步萃取;高效液相色谱法;卡马西平;苯妥英钠;苯巴比妥;血清浓度

Simultaneous Determination of Serum Concentration of 3 Kinds of Anti-epilepsies Drugs by HPLC with Single Step Extraction

FU Cheng-xiao, BI Jin-lian, LI Xiang-bin, YANG Bo, DENG Li-jing (Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish an HPLC method with single step extraction for the determination of the serum concentration of the carbamazepine (CBZ), phenytoin (PHT), phenobarbital (PBB). METHODS: The serum samples were extracted once with dichloromethane. The residue was dissolved and analyzed with Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was composed of methanol-water (70:30) with a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 240 nm, the column temperature was 25 ℃, and 2-amino-2-chloro-5-nitrobenzophenone was used as internal standard. RESULTS: The linear range of carbamazepine, phenytoin and phenobarbital were 1.33~33.25 mg·L⁻¹($r=0.999\ 6$), 1.96~49.0 mg·L⁻¹($r=0.999\ 5$) and 2.88~72.0 mg·L⁻¹($r=0.998\ 8$), respectively. The detection limit were 0.06 mg·L⁻¹, 0.13 mg·L⁻¹, 0.14 mg·L⁻¹. The intra-day precision and inter-day precision were less than 10%, the average recoveries were 94.0%~109.1%, 93.6%~98.7%, 97.0%~105.2%, respectively. CONCLUSION: The method is simple, rapid, accurate, economical and practical. It can be used for fast determination in the clinic.

KEY WORDS Single step extraction; HPLC; Carbamazepine; Phenytoin; Phenobarbital; Serum concentration

癫痫是一种由大脑神经元异常放电所引起的短暂中枢神经系统功能失调为特征的慢性脑部疾病。卡马西平(CBZ)、苯妥英钠(PHT)、苯巴比妥(PBB)是临床上常用的抗癫痫药,由于这3种药物血药浓度范围窄,且存在明显的个体差异,易发生不良反应。某些不法厂商利用广大患者对中药的高度信任,在中药成分中添加西药,而在说明书上不详细注明其添加成分,从而使患者屡屡遭受严重损害。因此,为了提高临床用药的有效性和安全性,减少不良反应,需要对治疗药物进行监测。紫外-可见分光光度法测定血药浓度,操作简便,成本较低,但方法本身不具备分离功能,受结构相近的其他药物、代谢产物和内源杂质的干扰,灵敏度较低。免疫法测定血药浓度,虽特异性、灵敏度高,分析简便,但只能测定1种药物,不能同时测定多种药物,且成本高,试剂盒有效期短。本文参考相关文献^[1]建立以高效液相色谱法同时测定人血清3种抗癫痫药

浓度的方法,快速、准确、经济实用,为促进临床合理用药提供客观依据。

1 材料

1.1 仪器

HP1100型高效液相色谱仪,包括HP1100色谱工作站、VWD紫外检测器(美国惠普公司);TG328A光学读数分析天平(上海精科天平仪器厂);XW-80A漩渦混合器(上海医科大学仪器厂),TGL-16B高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试剂

卡马西平对照品(批号:171222-200504)、苯妥英钠对照品(批号:100210-200401)、苯巴比妥对照品(批号:171222-200504)、2-氨基-2-氯-5-硝基二苯酮对照品(内标,批号:1228-9701)均为中国药品生物制品检定所提供。甲醇为色谱纯,二氯甲烷为分析纯,水为自制纯化水。

dian population [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 50(12):655.
[8] Ouerhani S, Oliveira E, Marrakchi R, *et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms and risk of bladder cancer in a Tunisian population[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 176(1):48.

*药师,硕士研究生。研究方向:临床药学与中药质量控制。电话:0734-8279029。E-mail:paulfcx@126.com

#通讯作者:副主任药师。研究方向:临床药学。电话:0734-8279029。E-mail:hyxql14406@163.com

[9] Chen J, Stampfer MJ, Ma J, *et al*. Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction[J]. *Atherosclerosis*, 2001, 154(3):667.

[10] Zhang GS, Dai CW. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases[J]. *Thrombo Res*, 2001, 104(3):189.

(收稿日期:2009-12-07 修回日期:2010-06-24)

2 方法^[1,2]与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(70:30);流速:1.0 mL·min⁻¹;紫外检测波长:240 nm;柱温:25 ℃。

2.2 血清样品的处理

精密量取血清样品0.4 mL,加入浓度为145 mg·L⁻¹的2-氨基-2-氯-5-硝基二苯酮内标溶液20 μL,混匀,随后加入二氯甲烷2 mL,振荡2 min,3 000 r·min⁻¹离心5 min,取下层有机相,氮气吹干,用流动相100 μL复溶,3 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液进样分析。

2.3 方法专属性考察

将空白血清、空白血清加对照品、患者血清标本按“2.2”项下方法处理后进样测定,色谱见图1。在该色谱条件下,苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平、内标的保留时间分别为4.18、4.83、5.33、7.74 min。

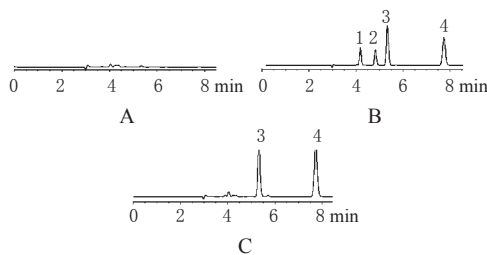


图1 高效液相色谱图

A.空白血清;B.空白血清+对照品+内标;C.服用卡马西平的血清样品;
1.苯巴比妥;2.苯妥英钠;3.卡马西平;4.2-氨基-2-氯-5-硝基二苯酮

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank serum; B. blank serum+reference substance+internal standard;
C. serum sample after administration of carbamazepine; 1. PBB; 2. PHT;
3. CBZ; 4. internal standard

2.4 标准曲线的制备

准确称取干燥至恒重的卡马西平对照品13.3 mg、苯妥英钠对照品19.6 mg、苯巴比妥对照品14.4 mg,分别置于50、50、25 mL容量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,浓度分别为266、392、576 mg·L⁻¹,作为贮备液。随后,用空白血浆和贮备液配制卡马西平浓度为1.33、3.33、6.65、13.3、19.95、33.25 mg·L⁻¹,苯妥英钠浓度为1.96、9.90、19.8、23.76、29.4、49.0 mg·L⁻¹,苯巴比妥浓度为2.88、14.4、23.04、28.8、43.2、72.0 mg·L⁻¹的混合系列标准溶液。按照“2.2”项下方法处理操作,记录色谱峰面积。以浓度(c)为横坐标,目标化合物与内标的峰面积比(Y)为纵坐标绘制标准曲线,并使用Excel软件进行线性回归计算,获得血清标准曲线回归方程分别为: $Y_{卡马}=0.175 8c_{卡马}-0.020 4$ ($r=0.999 6, n=6$)、 $Y_{苯妥}=0.020 4c_{苯妥}-0.005 8$ ($r=0.999 5, n=6$)、 $Y_{苯巴}=0.016 6c_{苯巴}-0.005 2$ ($r=0.998 8, n=6$),结果表明,三者血药浓度分别在1.33~33.25、1.96~49.0、2.88~72.0 mg·L⁻¹范围内线性关系良好。

2.5 回收率试验

2.5.1 方法回收率:取空白血清和“2.4”项下贮备液配制成卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥低、中、高3种浓度的血清样品,按照“2.2”项下方法操作,记录色谱峰面积。计算每种浓度样品方法回收率,结果见表1。

2.5.2 提取回收率:取低、中、高3种浓度的质控样品,按照“2.2”项下方法操作,测定卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥峰面积A₁,同时分别配制相同浓度的甲醇水溶液直接进样,测定卡

表1 回收率及精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Results of recovery and precision test($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物组别	浓度/mg·L ⁻¹	方法回收率/%	平均提取回收率/%	精密度	
				日内RSD/%	日间RSD/%
卡马西平	1.33	109.1		6.42	7.71
	6.65	96.8	86	2.54	3.04
	26.60	94.0		4.14	3.65
苯妥英钠	3.92	96.1		8.94	7.85
	15.84	98.7	81	5.11	4.86
	39.20	93.6		4.68	4.89
苯巴比妥	5.76	105.2		4.50	5.23
	28.80	99.3	78	5.09	5.56
	57.60	97.0		6.11	5.47

马西平、苯妥英钠、苯巴比妥峰面积A₂,计算各浓度样品提取回收率(提取回收率=A₁B/A₂×100%(B为稀释倍数)),结果见表1。

2.6 精密度试验

按照“2.4”项下的方法取3种浓度质控样品,按照样本测定方法平行操作3次,连续3 d。日内和日间精密度结果见表1。

2.7 最低检测浓度

以待测物峰高等于3倍基线噪音时的浓度作为最低检测限,本方法最低检测浓度分别为卡马西平0.06 mg·L⁻¹,苯妥英钠0.13 mg·L⁻¹,苯巴比妥0.14 mg·L⁻¹。

2.8 稳定性试验

取血浆质控样品液低、中、高3组9个样品,分别即时测定、冰箱冷藏室72 h放置后测定、冰箱冷冻室72 h放置后测定、连续冻融3次并解冻后测定。结果其RSD均<10%。

2.9 临床应用^[9]

患者男,作药物筛查。其从民间购买未标明成分组成及规格的神奇药丸。将药丸与血样同时进行处理并分析。药丸样品液含有苯妥英钠与苯巴比妥,而血样中还含有卡马西平,血清浓度分别为卡马西平1 mg·L⁻¹、苯妥英钠34.2 mg·L⁻¹、苯巴比妥18.4 mg·L⁻¹。血清中苯妥英钠高出中毒浓度(20 mg·L⁻¹)较多,患者有复视、笨拙、行走不稳和步态蹒跚、严重嗜睡、幻觉、恶心、语言不清等症状,符合苯妥英钠中毒表现。患者每天吃2丸,分3次服用,每次2种丸各取1/3。经分析,2种丸中一丸含苯妥英钠与苯巴比妥,一丸含卡马西平。建议患者停药2 d,停止使用该民间药丸,从医院或者药店购买国家批准的药品。

3 讨论

多数文献^[4~7]报道,使用苯乙酮、苯二氮草类药物为内标,也有选择互为内标,笔者认为,苯二氮草类药物也有用来抗癫痫使用,一旦患者同时服用,将影响测定。参照《中国药典》二部中氯硝西泮有关物质检查,选用2-氨基-2-氯-5-硝基二苯酮作为内标,峰形好,保留时间适宜。

笔者曾使用乙腈、三氯醋酸沉淀蛋白法进行样品处理,结果色谱图基线漂移,样品液对色谱柱污染较重,后改用单步萃取法,出峰效果好。对萃取液中加入磷酸缓冲液(pH=6.86)与未加入缓冲液直接萃取进行比较,前者中,3种药物的转移率较高,考虑到样品处理的简便,决定采用直接萃取。

笔者曾试用过乙醚进行萃取,萃取率较高,但是色谱图上基线不平稳,干扰测定,本法选择二氯甲烷作为萃取液,色谱图出峰效果好。

本试验过程中,对波长λ 215、210、220、240 nm进行了考察,采用前三者,各药物色谱响应值比较大,但是在样品色谱图中,卡马西平峰旁有一血清内源性杂质峰干扰,影响测定;

3种头孢克洛制剂在健康人体内的药动学及生物等效性研究

余俊先*, 史丽敏#, 王曼丽, 杨春秀, 王汝龙(首都医科大学附属北京友谊医院药剂科, 北京市 100050)

中图分类号 R944.5;R969.1;R978.1[†]

文献标识码 A

文章编号 1001-0408(2011)02-0141-03

摘要 目的:比较3种头孢克洛制剂在健康志愿者体内的药动学,并评价3种制剂的生物等效性。方法:18名男性健康志愿者,单剂量三交叉分别口服干混悬剂(受试制剂1)、头孢克洛分散片(受试制剂2)和头孢克洛片(参比制剂)500 mg后,用高效液相色谱(HPLC)法测定血浆药物浓度,数据经DAS软件处理,计算药动学参数并评价生物等效性。结果:头孢克洛受试制剂1、2与参比制剂的 c_{\max} 分别为 (13.94 ± 3.76) 、 (13.54 ± 2.27) 、 $(13.86 \pm 3.13) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, t_{\max} 分别为 (0.56 ± 0.13) 、 (0.55 ± 0.14) 、 $(0.51 \pm 0.13) \text{h}$, $t_{1/2}$ 分别为 (0.67 ± 0.09) 、 (0.68 ± 0.15) 、 $(0.80 \pm 0.26) \text{h}$, AUC_{0-4} 分别为 (15.16 ± 2.58) 、 (14.56 ± 1.70) 、 $(14.74 \pm 2.07) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。受试制剂1、2的 F_{0-4} 分别为 $(103.80 \pm 17.80)\%$ 、 $(100.50 \pm 18.40)\%$ 。统计分析表明,2种头孢克洛受试制剂的 c_{\max} 、 t_{\max} 、 AUC_{0-4} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 与参比制剂相比均无显著性差异。结论:头孢克洛干混悬剂和分散片与参比制剂生物等效。

关键词 头孢克洛;高效液相色谱法;药动学;生物等效性

Pharmacokinetics and Bioequivalence of 3 Kinds of Cefaclor Preparations in Healthy Volunteers

YU Jun-xian, SHI Li-min, WANG Man-li, YANG Chun-xiu, WANG Ru-long (Dept. of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the pharmacokinetics of 3 kinds of cefaclor preparations in healthy volunteers, and to evaluate the bioequivalence of 3 kinds of preparations. METHODS: 18 healthy volunteers received a single dose of 500 mg cefaclor dry suspension (test preparation 1), 500 mg cefaclor dispersible tablets (test preparations 2) or 500 mg cefaclor tablets (reference preparation) respectively. The plasma concentrations of cefaclor were determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters and relative bioequivalence of cefaclor were calculated using DAS software. RESULTS: The pharmacokinetic parameters of test preparation 1, test preparation 2 and reference preparation were as follows: c_{\max} $(13.94 \pm 3.76) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(13.54 \pm 2.27) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(13.86 \pm 3.13) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; t_{\max} $(0.56 \pm 0.13) \text{h}$, $(0.55 \pm 0.14) \text{h}$ and $(0.51 \pm 0.13) \text{h}$; $t_{1/2}$ $(0.67 \pm 0.09) \text{h}$, $(0.68 \pm 0.15) \text{h}$ and $(0.80 \pm 0.26) \text{h}$; AUC_{0-4} $(15.16 \pm 2.58) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $(14.56 \pm 1.70) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(14.74 \pm 2.07) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$. F_{0-4} of test preparation 1 and test preparation 2 were $(103.80 \pm 17.80)\%$ and $(100.50 \pm 18.40)\%$. There was no significant difference of c_{\max} , t_{\max} , AUC_{0-4} , $\text{AUC}_{0-\infty}$ between 3 kinds of preparations. CONCLUSION: The dry suspension, dispersible tablets and reference tablets of cefaclor are bioequivalent.

KEY WORDS Cefaclor; HPLC; Pharmacokinetics; Bioequivalence

头孢克洛是人工半合成的第2代头孢菌素,对流感嗜血杆菌、肠杆菌、淋病奈瑟菌有较强的杀菌作用,具有口服吸收好,体内分布广泛的特点,被广泛应用于治疗各种敏感致病菌引起的感染。头孢克洛属于时间依赖型抗菌药,其24 h内的血药浓度大于90%菌株抑菌浓度(MIC₉₀)的时间(T)不应低于35%,因此深入了解其药动学特点有益于临床的合理应用^[1]。本次试验的目的是研究健康志愿者口服3种头孢克洛制剂后的体内药动学并评价其生物等效性,为其临床应用提供试验支持。

1 材料

1.1 仪器

换用240 nm波长测定时,杂质峰由于在该波长下无紫外吸收而被屏蔽。

参考文献

- [1] 张国宏,潘丽春,赵婧岚.单步萃取-HPLC法测定人血清中卡马西平浓度[J].中国医院药学杂志,2007,27(3):341.
- [2] 国家药典委员会编.中华人民共和国药典(二部)[S].北京:化学工业出版社,2005:770.
- [3] 李红健,冉国侠,曹丽蒙,等.3种抗癫痫药的血药浓度监

* 主管药师,博士。研究方向:临床药理学。电话:010-63138515。E-mail: yujunxian@sohu.com

通讯作者:主任药师。研究方向:临床药学。电话:010-63138511。E-mail: shilimin0430@sina.com

1100 高效液相色谱系统,包括四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、工作站(美国Agilent公司);BS124S分析天平(德国塞多利斯股份公司);pH211酸度计(北京哈纳纳科技有限公司);3-18K高速低温离心机(美国Sigma公司)。

1.2 药品和试剂

受试制剂1:头孢克洛干混悬剂(河北省石家庄市华新制药厂,批号:061001,规格:每袋125 mg);受试制剂2:头孢克洛分散片(河北省石家庄市华新制药厂,批号:061003,规格:每片250 mg);参比试剂:头孢克洛片(浙江华立南湖制药有限公司,批号:060703,规格:每片250 mg);头孢克洛标准品(批号:

测及个体化用药体会[J].中国药房,2001,12(3):160.

- [4] 杨国浓,朱国峰.高效液相色谱法测定苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平的血药浓度[J].中国现代应用药学,2002,19(4):313.
- [5] 涂厉标,祝永明.HPLC法同时测定人血清中苯巴比妥、苯妥英和卡马西平的浓度[J].中国药师,2005,8(11):934.
- [6] 李颖.RP-HPLC法同时测定血清苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平的浓度[J].齐鲁药事,2007,26(9):537.
- [7] 刘义钊,周述香,曾玲.SPE-HPLC法同时测定5种抗癫痫药的血药浓度[J].中南药学,2008,6(6):686.

(收稿日期:2009-11-13 修回日期:2010-03-05)