

毛细管电泳法同时测定血浆中茶碱、苯巴比妥、 苯妥英钠和卡马西平的浓度

纪松岗¹, 王春燕¹, 刘长海², 梁东升¹, 柴逸峰², 张国庆^{3*}

(1. 中国人民解放军第401医院药剂科 青岛 266071; 2. 第二军医大学药学院 上海 200433;

3. 上海东方肝胆外科医院药剂科 上海 200438)

摘要 目的:建立同时测定血浆中茶碱、苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平浓度的毛细管电泳法。**方法:**取血浆0.5 mL,用醋酸乙酯提取后吹干,用40 μ L 运行缓冲液溶解,进样于毛细管电泳仪进行分离测定。毛细管电泳条件:缓冲液为30 mmol \cdot L⁻¹磷酸氢二钠(pH=8.0)含75 mmol \cdot L⁻¹十二烷基硫酸钠(SDS),温度:30 $^{\circ}$ C,运行电压:30 kV,紫外检测波长:200 nm,压力进样10 s。**结果:**本法线性关系和精密度良好。**结论:**本法简便、快速、灵敏,适用于常规监测。

关键词:毛细管电泳法;茶碱;苯巴比妥;苯妥英钠;卡马西平

Simultaneous Determination of Theophylline, Phenobarbital, Sodium Phenytoin and Carbamazepine in Plasma by Capillary Electrophoresis

Ji Song - gang¹, Wang Chun - yan¹, Liu Chang - hai², Liang Dong - sheng¹,

Chai Yi - feng², Zhang Guo - qing^{3*}

(1. Department of Pharmacy, Hospital 401 Qingdao 266071, China;

2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

3. Department of Pharmacy, Eastern Hepato Biliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

Abstract Objective: To establish a method for the simultaneous determination of the concentrations of theophylline, phenobarbital, sodium phenytoin and carbamazepine in plasma by capillary electrophoresis. **Method:** The sample was extracted by ethyl acetate, and the extract was evaporated to dryness. The residue was reconstituted in 40 μ L of the running buffer for injection. The electrophoresis conditions were as follows: 30 mmol \cdot L⁻¹ Na₂HPO₄ (pH = 8.0) containing 75 mmol \cdot L⁻¹ SDS as running buffer, temperature 30 $^{\circ}$ C, voltage 30 kV, UV detection at 200 nm, sample injection by pressure for 10 s. **Results:** The established method has good linearity and precision.

Conclusion: This method is simple, rapid and sensitive.

Key words: capillary electrophoresis; theophylline; phenobarbital; sodium phenytoin; carbamazepine

茶碱、苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平都是治疗药物监测的主要药物,其血药浓度监测具有重要的临床意义已成为共识。目前在临床实践中,荧光偏振免疫法(FPIA)因其快速、简便而受到临床的欢迎,但成本昂贵,试剂盒效期短,不能同时测定多种药物。采用高效液相色谱法同时测定上述药物血药浓度已见报道^[1-8],但消耗有机溶剂多,仪器平衡较慢,不利于日常监测。本文采用毛

细管电泳法(CE)同时测定上述4种药物的血药浓度,克服了上述不足,取得令人满意的结果。

1 仪器与试剂

贝克曼 P/ACE 5000 毛细管电泳仪,空心熔融毛细管柱(河北永年光纤厂)。电热恒温水浴(上海华连医疗器械公司),液体快速混合器(江西医疗器械厂)。对照品茶碱、苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平、巴比妥(内标)均来自中国药品生物制品

* 通讯作者(corresponding author)

检定所, 醋酸乙酯、盐酸、磷酸氢二钠、十二烷基硫酸钠(SDS)均为分析纯。

2 电泳条件

毛细管柱长 57 cm(内径 50 μm), 运行缓冲液: 取适量 SDS 溶于 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠(用 1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调 $\text{pH} = 8.0$) 的缓冲液中使其浓度为 75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 温度: 30 $^{\circ}\text{C}$, 运行电压: 30 kV, 紫外检测波长: 200 nm, 压力进样 10 s。

3 样品处理与测定

取 0.5 mL 血浆于尖底试管中, 加入内标 8 μg 并混匀后, 再加入 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 0.1 mL, 醋酸乙酯 3 mL, 涡旋 3 min, 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取出醋酸乙酯层于尖底试管中, 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹干, 用运行缓冲液 40 μL 溶解并进样, 按上述电泳条件进行分离测定。

4 电泳图谱

在此电泳条件下, 4 种组分可在 10 min 内得到良好分离, 且未见血浆中杂质干扰测定(图 1)。

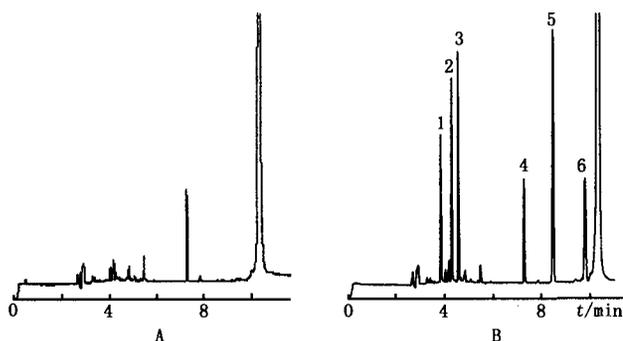


图 1 血浆样品电泳图

Fig 1 The electropherograms of plasma sample

A. 空白血浆(blank plasma) B. 加样血浆(plasma spiked with reference substances)

1. 茶碱(theophylline) 2. 巴比妥(barbital, IS) 3. 苯巴比妥(phenobarbital) 4. 杂质(impurity) 5. 苯妥英钠(sodium phenytoin) 6. 卡马西平(carbamazepine)

5 标准曲线制备

取空白血浆 0.5 mL, 分别加入对照品溶液, 使茶碱、苯巴比妥和苯妥英钠的浓度均为 4, 8, 16, 24, 32, 48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 卡马西平的浓度为 2, 4, 8, 12, 16, 24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按“样品处理与测定”项下所述方法进行操作, 以对照品峰的峰面积与内标峰的峰面积之比(Y)对对照品浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)进行线性回归, 线性关系良好, 茶碱、苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平回归方程分别为:

$$Y = 0.0375 + 0.0481X \quad r = 0.9997$$

$$Y = 0.0609 + 0.0715X \quad r = 0.9998$$

$$Y = 0.0972 + 0.1574X \quad r = 0.9999$$

$$Y = -0.0325 + 0.1804X \quad r = 0.9990$$

本方法的最低检测浓度为: 茶碱、苯巴比妥和卡马西平都为 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 苯妥英钠为 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3$)。

6 精密度试验

对茶碱、苯巴比妥和苯妥英钠的浓度均为 8, 24, 48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 卡马西平的浓度为 4, 12, 24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度水平进行了天和日间精密密度实验, 结果 4 种药物日内 $\text{RSD} < 2.4\%$ ($n = 3$), 日间 $\text{RSD} < 4.1\%$ ($n = 3$)。

7 方法回收率试验

取空白血浆 0.5 mL, 分别加入对照品溶液, 使茶碱、苯巴比妥和苯妥英钠的浓度均为 16, 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 卡马西平的浓度为 8, 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 按“样品处理与测定”项下所述方法进行操作, 计算方法回收率, 结果见表 1。

表 1 方法回收率($n = 3$)

Tab 1 The method recovery

组分 (component)	浓度 (concentration)/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	方法回收率 (recovery)/%	RSD/%
茶碱 (theophylline)	16	108.7	2.0
	32	101.4	2.2
苯巴比妥 (phenobarbital)	16	98.90	1.6
	32	102.6	1.2
苯妥英钠 (sodium phenytoin)	16	94.20	2.1
	32	102.6	1.7
卡马西平 (carbamazepine)	8	104.2	3.7
	16	103.1	2.8

8 讨论

8.1 缓冲液的选择 本文考察了运行缓冲液中 pH 、SDS 浓度和磷酸氢二钠浓度对分离的影响。在 CZE 模式下, 卡马西平不出峰, pH 为 7.5 及 9.0 时茶碱、苯妥英钠和苯巴比妥峰形较差, 当 pH 为 8.0 时, 它们的峰形较好, 且相互分离。在 $\text{pH} 8.0$ 的缓冲液中加入 SDS, 组分的迁移时间随 SDS 浓度的增加而增加, 当 SDS 的浓度在 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时, 卡马西平的峰形不理想, 当 SDS 浓度增加至 75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 4 种组分可完全分离, 且峰形理想。另外, 磷酸氢二钠浓度小于 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 血浆中的杂质峰干扰卡马西平出峰, 浓度增加至 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分离良好。因此确定运行缓冲液为 30 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠 ($\text{pH} = 8.0$) 含 75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS。

8.2 柱温的影响 卡马西平的峰形受柱温影响

较大,柱温增加可改善其峰形,根据实验选择柱温为 30 ℃。

8.3 检测波长的选择 由于同时测定 4 种组分,其紫外最大吸收波长不同,因此对紫外检测波长进行了选择。在波长分别为 200, 214, 254, 280 nm 时,4 种被测组分在 200 nm 处的紫外吸收最强。

8.4 小结 本法可同时测定茶碱、苯巴比妥、苯妥英钠和卡马西平的血药浓度,简便、灵敏,且仪器平衡快,便于常规快速监测。另外,本法测定成本低,减轻患者的经济负担。

参考文献

- ZHAO Yan(赵炎), YU Qin(余勤), LIANG Mao-zhi(梁茂植), *et al.* RP-HPLC determination of phenobarbital, phenytoin and carbamazepine in human plasma(RP-HPLC 法同时测定血浆中苯巴比妥、苯妥英和卡马西平浓度). *West China Med J*(华西医学), 2004, 19(1):104
- SUN Zeng-xian(孙增先), ZHOU Jin-yu(周金玉), ZHANG Qian-feng(张骞峰), *et al.* Rapid determination of three antiepileptic drugs in serum by reversed phase high performance liquid chromatography(反相高效液相色谱法快速测定 3 种抗癫痫药物血药浓度). *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学杂志), 2004, 21(4):316
- YANG Guo-nong(杨国浓), ZHU Guo-feng(朱国峰). Determination of phenobarbital, sodium phenytoin, carbamazepine in serum by HPLC(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). *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学杂志), 2002, 19(4):313
- FU Shi-jiang(付世江), DUAN Sheng-hui(段盛慧), REN Qun-xiang(任群翔). Simultaneous analysis of theophylline, phenobarbital, amobarbital and carbamazepine in serum by high performance liquid chromatography(高效液相色谱法同时测定血清中茶碱、苯妥英钠、苯巴比妥及卡马西平的药物浓度). *Chin J Chromatogr*(色谱), 1997, 15(2):178
- SHEN Jian-xing(沈建幸), CHEN Jun-liang(陈均良). Simultaneous determination of phenobarbital, phenytoin and carbamazepine in serum by RP-HPLC(高效液相色谱法同时测定苯巴比妥、苯妥英、卡马西平的血药浓度). *J China Pharm*(中国药房), 2004, 15(4):231
- JIAO Zheng(焦正), ZHONG Ming-kang(钟明康), SHI Xiao-hua(施孝华), *et al.* HPLC simultaneous determination of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin in human serum(HPLC 法同时测定血清中卡马西平、环氧化卡马西平和苯妥英). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2002, 22(6):445
- QI La-mei(齐腊梅). Determination of phenytoin, phenobarbital and carbamazepine concentration in serum by HPLC(HPLC 同时测定血清中苯妥英、苯巴比妥和卡马西平的浓度). *West China J Pharm*(华西药理学杂志), 2001, 16(6):455
- ZHU Guang-hui(朱光辉), WANG Zeng-shou(王增寿). Determination of phenobarbital, phenytoin and carbamazepine in serum by HPLC(高效液相色谱法同时测定苯巴比妥、苯妥英、卡马西平的血药浓度). *Chin J Clin Pharm*(中国临床药理学杂志), 2001, 10(1):21

(本文于 2005 年 1 月 4 日收到)