

紫外分光光度法监测血清中苯妥英钠浓度的条件选择

解放军202医院药局

李国秀 嵇 杨

苯妥英钠是临床常用的抗癫痫有效药物,也有人用于抗心律不齐。它的血中药物有效浓度为 $10\sim 20\mu\text{g/ml}$ 。当血药浓度过高时,可出现副反应,如高于 $20\mu\text{g/ml}$ 时可能出现眼球震颤,高于 $30\mu\text{g/ml}$ 时可能发生共济失调,高于 $40\mu\text{g/ml}$ 时将引起嗜睡。若过低时则达不到治疗目的。由于苯妥英钠在体内吸收慢且不稳定,不同剂型其生物利用度有差异,甚至同种剂型批号不同、生产厂家不同,都会影响药物的血中浓度,而且体内半衰期在不同病人中又有很大差异(8~60小时之间)。为了保证病人的用药安全和治疗效果,苯妥英钠应进行血药浓度监测。

测定血中苯妥英钠浓度的方法有多种。有比色法、紫外分光光度法、气相色谱法、高效液相法、色质联用法,还有放射免疫法、酶免疫和荧光免疫法等。但一般中心医院,仪器设备有限,根据我们医院特点及现有条件,选用了易于开展的方法——紫外分光光度法,并在此法的基础上,对某些测定条件进行了一些改进,使它更切合于临床监测需要,结果较为满意,现将结果介绍如下:

一、实验部分

因为苯妥英钠标准品、二苯酮标准品都很难买到,因此我们使用了医院现有的药品和试剂。

(一) 药品和试剂

1. 注射用苯妥英钠(内含苯妥英钠0.25g、无水碳酸钠0.1g)上海第八制药厂生产,批号79100202。

2. 磷酸氢二钠—磷酸二氢钠缓冲液(取等量1M磷酸氢二钠、1M磷酸二氢钠溶液混合而成),pH6.8。均为分析纯试剂。

3. 1,2—二氯乙烷,化学纯试剂。

4. 1N氢氧化钠溶液(自制),分析纯试剂。

5. 50%氢氧化钠溶液(12.5N,自制)。

6. 饱和高锰酸钾溶液(约15%,自制)。

7. 正常人血清(本院血库提供)

8. 正庚烷,实验试剂

(二) 仪器

1. 10ml刻度离心管

2. 10ml具塞沉淀管

3. $10\mu\text{l}$ 、 $25\mu\text{l}$ 微量进样器

4. UV—120型紫外分光光度计(日本、岛津)

5. YKH—II型液体快速混合器(江西医疗器械厂生产)

6. 离心机

(三) 测定条件的确定

1. 注射用苯妥英钠的含量测定:按中国药典法(1977年版)进行含量测定(共测了18次),含量平均值为96.51%,变异系数 $CV=1.7\%$,据此算出:

注射用苯妥英钠145.06mg,相当于苯妥英钠100mg。

2. 二苯酮在UV—120型紫外分光光度计中特征峰值,谷值的确定:苯妥英钠在碱性加热条件下可被高锰酸钾氧化而生成二苯酮,该产物在紫外区有特征吸收峰。据报道,特征峰值在247nm处,谷值在300nm处,为确定所用仪器的峰,谷值的实际波长。我们做了下面实验:

(1) 精密称取注射用苯妥英钠145.06mg,于容量瓶中加入新鲜蒸馏水至100ml,配成1mg/ml苯妥英钠溶液。

(2) 精取上述溶液40 μ l(相当于40 μ g)于具塞沉淀管中,加入饱和高锰酸钾溶液2.5ml,50%氢氧化钠溶液1.6ml,摇匀,加入正庚烷3.2ml,密塞,于90 $^{\circ}$ C水浴上加热15分钟,冷却,于液体快速混合器上振荡二分钟,取正庚烷层于UV-120型紫外分光光度计上,从240nm到305nm处测定其吸收值:结果如表1。

表1 二苯酮在正庚烷溶液中的紫外吸收

入(nm)	A	入(nm)	A	入(nm)	A
240	0.221	270	0.065	*300	0.003
241	0.232	275	0.046	301	0.003
242	0.244	280	0.036	302	0.003
243	0.254	282	0.032		
244	0.264	284	0.029		
245	0.272	286	0.026		
246	0.279	288	0.021		
247	0.284	290	0.017		
248	0.287	292	0.014		
*249	0.288	294	0.009		
250	0.286	296	0.007		
255	0.246	297	0.006		
260	0.170	298	0.005		
265	0.106	299	0.004		

判定:二苯酮正庚烷溶液在本台紫外分光光度计中的特征峰值在249nm处,谷值在300nm处。

3. 最低检出限度实验:因每台仪器的检出灵敏度不同,为了掌握所用的紫外分光光度计能否检出苯妥英钠的最低有效血药浓度,需做最低检出限度实验:

取10ml刻度离心管两支,一管精确加正常人血清0.5ml(空白管),另一管精确加含苯妥英钠5 μ g的血清0.5ml,然后各精确加磷酸盐缓冲溶液(pH6.8)0.2ml,摇匀。各精确加1,2-二氯乙烷5ml,于液体快速混合器上振荡二分钟,然后置离心机上离心(2000~3000转/分)五分钟。各精确取1,2-二氯乙烷4ml,加1N NaOH1.5ml,振荡两分钟,离心。精确取NaOH液1.2ml,加入50%NaOH溶液1.6ml,饱和高锰酸钾溶液2.5ml混匀,再精确加正庚烷3.2ml,于80 $^{\circ}$ C水浴中加热二十分钟,冷却,振荡离心,取正庚烷于249nm、300nm处测定其吸收值,以正庚烷为空白,其结果见表2。

结果判断:含5 μ g苯妥英钠的血清中,经分离、提取、氧化生成二苯酮后,其紫外

表2 血清中加入苯妥英钠与空白血清吸收值对照表

波 长	249nm	300nm	ΔA (249~300)
空 白 血 清 管	0.007	0.002	0.004
5 μ g/ml血清管	0.038	0.002	0.036

吸收值为空白管吸收值的9倍,而一般要求3~5倍即可。故可以判定最低检出限度为5 μ g/ml以下,本仪器可用于本项测定。

4. 碱度对饱和高锰酸钾液氧化苯妥英钠的影响实验:不同碱度对饱和高锰酸钾氧化苯妥英钠的产物二苯酮有影响。为了使测定结果稳定,我们做了下面实验:精取苯妥英钠溶液20 μ l(相当于苯妥英钠20 μ g)加入饱和高锰酸钾溶液2.5ml,不同量50%

NaOH溶液,使NaOH浓度为1.0~8.0N,摇匀,再精确加正庚烷3.2ml,于80 $^{\circ}$ C水浴中加热二十分钟,放冷、振荡、离心,取正庚烷层于249nm、300nm处测定其吸收值,结果见图1。

结果讨论:苯妥英钠氧化生成二苯酮的量随着碱度的升高而升高,但我们认为碱度4N时较适宜。因为此时加入50%NaOH量仅为1.6ml,在10ml沉淀管中容积太大,不

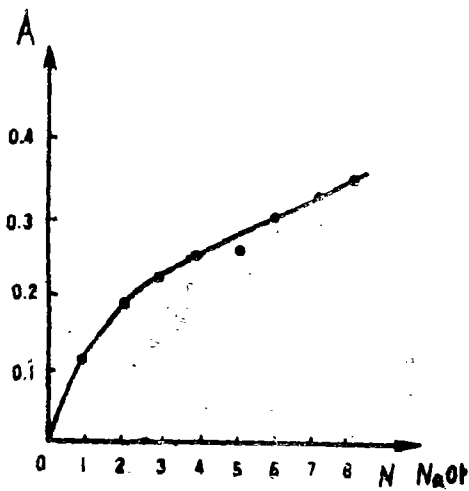


图1 硷度对苯妥英钠氧化的影响

好提取。另外虽然此硷度条件下生成二苯酮量不是最高量，但此差异可通过建立标准曲线时消除（含量其他条件相同、硷度也相同，氧化产物量应相等）。

5. 水浴温度与时间对苯妥英钠的氧化产物二苯酮的影响实验：取10ml苯妥英钠溶液（相当于苯妥英钠10 μ g）加入1N NaOH溶液1.2ml，饱和高锰酸钾溶液2.5ml、50% NaOH 1.6ml，摇匀，精加正庚烷3.7ml，密塞，分别于70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C、90 $^{\circ}$ C水浴中加热5~40分钟，测定正庚烷提取液的吸光度，结果见表3、图2。

表3 不同温度、时间氧化苯妥英钠的吸收值

吸收值 加进时间	浴温	70 $^{\circ}$ C	80 $^{\circ}$ C	90 $^{\circ}$ C
5'		0.063	0.133	0.153
10'		0.109	0.154	0.157
15'		0.116	0.153	0.165
20'		0.128	0.153	0.165
25'		0.130	0.150	0.158
30'		0.150	0.149	0.165
35'		0.160	0.150	0.165
40'		0.146	0.146	0.154

实验结果讨论：二苯酮的mp为48 $^{\circ}$ C，正庚烷的mp为96 $^{\circ}$ C，实验证明，苯妥英钠在硷性情况下加饱和高锰酸钾溶液氧化生成

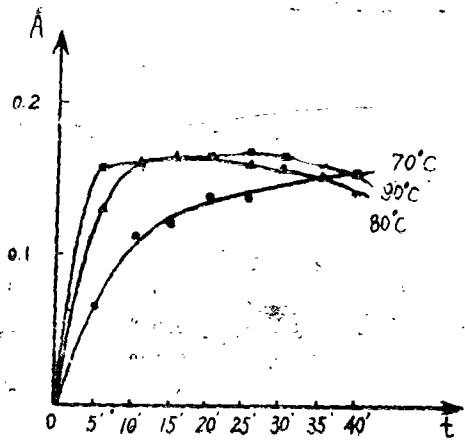


图2 温度和时间对氧化苯妥英钠的影响

二苯酮后，即使在加塞的沉淀管中，二苯酮也有程度不同的挥发，这对测定结果的准确性与稳定性影响很大。因此，我们选择了沸点较高的正庚烷作为溶媒。在较低的温度（80 $^{\circ}$ C）条件下加热氧化以尽量减少二苯酮的挥发。另外，我们认为正庚烷应在水浴加热氧化前加入较合适。这样可减少二苯酮的挥发，增加测定结果的准确性、稳定性。从上述实验结果中也可看出，温度越高，氧化产物达到相同吸收值所需时间越短，但温度越高，正庚烷、二苯酮越易挥发。温度低，加热时间长，拖延检验时间，门诊病人不欢迎。因此，我们认为80 $^{\circ}$ C二十分钟较合适。

二、标准曲线的绘制

根据上述实验结果，我们选择了下面条件进行标准曲线绘制：

配制含苯妥英钠5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、30 μ g/ml、40 μ g/ml的血清溶液，加入磷酸盐缓冲溶液0.2ml，摇匀，以5ml 1,2-二氯乙烷提取（溶液pH低于11时，苯妥英钠即以苯妥英形式存在，此时溶液pH为7）。精取1,2-二氯乙烷提取液4ml，再精加1N NaOH溶液1.5ml，振荡离心（此时溶液pH为14，苯妥英成盐而溶于NaOH溶液中），精取1.2ml NaOH提取液，加入饱和高锰酸钾溶液2.5ml、50% NaOH溶液1.6ml（使溶液硷度为4

N), 摇匀, 加入正庚烷3.2ml 水浴80℃加热20分钟, 于紫外分光光度计249nm、300nm

处测定正庚烷提取液的吸收度, 结果见表4、图3。

表4 血清中加入苯妥英钠的吸收值及回收率

吸收值 浓度	波 长	249nm	300nm	ΔA (249~300)	C (测出浓度)	回收率 %
5 $\mu\text{g/ml}$		0.026	0.001	0.025	4.60	92
10 $\mu\text{g/ml}$		0.058	0.001	0.057	10.12	101.2
20 $\mu\text{g/ml}$		0.122	0.004	0.118	20.65	103.3
30 $\mu\text{g/ml}$		0.178	0.007	0.171	29.80	99.37
40 $\mu\text{g/ml}$		0.239	0.010	0.229	39.82	99.70
						平均 99.12

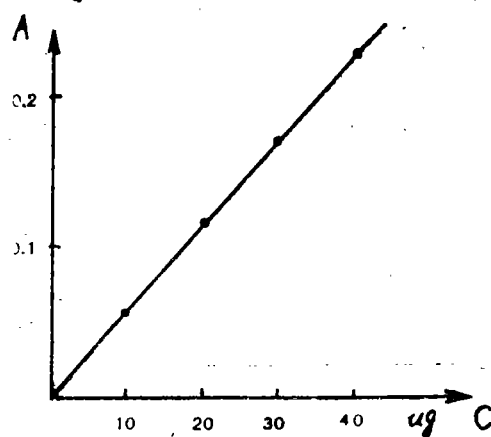


图3 血清中加入苯妥英钠的标准曲线

将上述吸收值数据进行线性回归, 得回归方程:

$$y = 172.6x + 0.2795$$

$$r = 0.9996$$

y: 浓度 x: 吸收值

用此回归方程绘制标准曲线见图3。

三、重复性试验

按上述绘制标准曲线的操作方法, 重复三次实验, 结果见表5。

将上述吸收值数据进行线性回归, 回归方程为: $y = 174.38x - 0.0068$

$$r = 0.9988$$

四、临床血药浓度监测初步结果

病人静脉血2ml (不抗凝) 离心二分

表5 重复性实验吸收值及回收率

		ΔA (249~300)	C μg	回收率
5 $\mu\text{g/ml}$	1	0.028	4.88	97.6
	2	0.025	4.35	87
	3	0.027	4.70	94
10 $\mu\text{g/ml}$	1	0.060	10.46	104.6
	2	0.057	9.93	99.3
	3	0.060	10.46	104.6
20 $\mu\text{g/ml}$	1	0.121	21.06	105.4
	2	0.118	20.57	102.85
	3	0.112	19.52	97.6
30 $\mu\text{g/ml}$	1	0.164	28.59	95.3
	2	0.171	29.81	99.37
	3	0.178	31.03	103.43
40 $\mu\text{g/ml}$	1	0.227	39.58	98.95
	2	0.229	39.93	99.83
	3	0.230	40.10	100.25

平均回收率99.34%

钟, 精取血清0.5ml, 按(三)所述方法进行监测, 此法可同时做多个样品, 时间大约需2小时左右。我们共监测了16例患者, 其中有住院患者3例、门诊患者13例, 其中有10 $\mu\text{g/ml}$ 以下者7例, 占43.7%; 10~20 $\mu\text{g/ml}$ 者8例, 占50%; 20 $\mu\text{g/ml}$ 以上者1例, 占6.3%。在监测的病例之中, 我们发现大多数苯妥英钠血药浓度在10 $\mu\text{g/ml}$ 以下的

病例，都是按100mg、一日三次或每晚服200~300mg的方式服药。这些病例，一般都症状改善不佳，有一病例，服药15天之后监测，血药浓度只有5.57 $\mu\text{g/ml}$ 。因此，我们建议临床医生给病人以负荷量，即第一天给予1克，分三次服用（300mg、300mg、400mg），以后可按每日三次，每次100mg服用。当服至第三天检测患者苯妥英钠血药浓度即达到10 $\mu\text{g/ml}$ 以上。上述血药浓度达到10~20 $\mu\text{g/ml}$ 的8例患者都是以这种方式服药的。据84年全国临床药理会议上有人报道，长期服用苯妥英钠的患者，在头一、两周，可能出现假稳态现象。因此，我们建

议临床、门诊长期用苯妥英钠的患者在调整维持量后，血药浓度监测工作最少应跟踪一个月左右（每周监测一次），直至血药浓度达到真正稳态时为止。

参 考 文 献

- [1] 吴柏林、陆文廉等：中国医院药杂志，12：538，1983
- [2] 中华人民共和国药典（一部），1977版 266页
- [3] 中国药学会主编：第二届全国临床药理学学术会议论文摘要集，210~213页
- [4] 南京药学院主编：药物分析，296页，人民卫生出版社，1980年7月

· 文摘 ·

地 高 辛 与 异 博 定

据报道，异博定能使心脏病患者和健康志愿受试者的地高辛稳态血药浓度由60%增加至80%。有关这种相互作用的研究表明，异博定能影响地高辛的代谢和肾排泄。其基本原理是否为药物动力学的相互作用而导致地高辛毒性的危险性增加，目前已对这一机理作了研究。

在受试者心律不齐期间采用直接试验的方法，异博定是否增加地高辛的毒性危险尚未得到证实。然而，地高辛可能使心律失常患者细胞内的钠升高和钾的浓度降低。这些改变可测定红细胞得以证实。其实验过程是采集服用地高辛受试者的血液，并测定其红细胞中钠的浓度。当地高辛与异博定并用

时，可采用上述同样方法重复试验。

结果表明，异博定能增加地高辛的血浆浓度和减少其排泄，从而证实了以往的研究。药物动力学的改变与红细胞中钠的浓度比对照组发生较大变化有关。而异博定对红细胞中钠的浓度无影响。

虽然是获得间接的证据，但作者认为，“上述数据表明，异博定可能增加心律失常患者服用地高辛的危险性”。并且提示，两药并用期间应监测地高辛的血浆浓度，使其维持在正常治疗范围内。

[AJP《澳大利亚药理学杂志》，65(768)：202，1984（英文）]

涂力成译 苏开仲校

氨 苄 青 霉 素 与 口 服 避 孕 药

已有研究表明，一些药物能够减少口服避孕药的功效，并提出了一些不同的机制。广谱抗菌素与导致避孕药失败的原因有关。根据动物实验表明，抗生素能通过阻碍炔雌醇的肠肝循环，从而减少口服避孕药的活性。在应用口服避孕药期间的妇女，为确定其并用氨苄青霉素的疗效已进行了研究。

13名妇女长期应用类甾醇类避孕药，当服用氨苄青霉素（500mg，3/日，共8天）后对其影响进行研究。对6名妇女还进行了另一组研究，除服用口服避孕药外，既无应用氨苄青霉素也无应用其他药物。采集血样，并分析炔雌醇、Levonorgestrel、卵泡刺激素、黄体激素和氨苄青霉素的浓

度。

获得的结果表明，血浆中炔雌醇、Levonorgestrel、卵泡刺激素、黄体激素的浓度均无显著改变。然而，观察到其中2名测得的炔雌醇浓度降低。

作者认为，“在这个研究中氨苄青霉素不降低口服类甾醇类避孕药的血浆浓度，并根据此结果提示，口服类甾醇类避孕药的妇女，合用氨苄青霉素不必担心，也无需调整避孕药的应用”。

[AJP《澳大利亚药理学杂志》，64(761)：556，1983（英文）]

苏开仲译 戴诗文校