

# 高效液相色谱法测定尿中美芬妥英及代谢产物 4'-羟基美芬妥英

阮邹荣 程源深 丁德云

(浙江医科大学附属第二医院临床药理研究所, 杭州 310009)

美芬妥英(mephenytoin, MP)化学名为 3-甲基-5-苯基-5-乙基乙内酰脲(3-methyl-5-phenyl-5-ethyl-hydantoin), 是一抗癫痫药。因 MP 可引起再生障碍性贫血和肝脏损伤等毒性反应, 现主要作为工具药, 用于 MP 型药物氧化代谢的遗传多态性研究<sup>(1)</sup>。

MP 因乙内酰脲环上的 5 位碳具不对称性, 所以有 *R*-和 *S*-两种旋光异构体。在人体内, MP 主要通过两条途径代谢并存在立体选择性; 即 *R*-MP 主要通过 *N*-去甲基生成具抗癫痫活性的 nirvanol; *S*-MP 主要通过芳香基对位羟化生成无活性的 4'-羟基美芬妥英(4'-OH-MP)<sup>(2)</sup>。对 *S*-MP 4' 羟化代谢研究表明, 人群中大多数个体能迅速进行羟化代谢为强代谢者(extensive metabolizers, EMs), 而少数人则表现出 *S*-MP 羟化代谢缺陷, 为弱代谢者(poor metabolizers, PMs)<sup>(3,4)</sup>。*S*-MP 羟化代谢受遗传控制<sup>(5,6)</sup>, 并存在种族差异<sup>(7,8)</sup>。

测定尿中 *S*-和 *R*-MP 含量有 GC 法<sup>(4,9)</sup>; 测定 4'-OH-MP 含量有 GLC 法和 HPLC 法<sup>(2)</sup>。上述 HPLC 法操作繁琐, 仅测定代谢物, 且 GC-MS<sup>(10)</sup> 可同时测定 MP 和 4'-OH-MP, 但设备昂贵, 分析费时。本文建立的 RP-HPLC 法可测定尿中 MP 和 4'-OH-MP 的含量, 并应用本法对 10 名汉族健康志愿者进行 MP 羟化代谢的研究。

## 实 验 部 分

### 仪器和试剂

美国 Bio-Rad HPLC Gradient Module: 1350 型泵; 1705 型可变波长检测器; Rheodyne 7125 型进样阀; 岛津 C-R3A 积分仪。

MP 片剂(mesantoin®, 100 mg/片); Sandoz, 瑞士; MP 标准品(*S*-和 *R*-MP 各为一半); Bern 大学临床药理所, 瑞士; 4'-OH-MP 标准品; Vanderbilt 大学临床药理室, 美国; β-葡萄糖醛酸甙酶 B-1; Sigma, 美国; 苯巴比妥(phenobarbital, PB)作内标物, 上海新亚药厂; 甲醇和乙腈为 HPLC 级; 其余试剂均为国产 AR 级; 水经二次重蒸馏处理。

### 分离分析方法

**人尿样的萃取** 测定 MP 时, 取尿样 1.0 ml, 加 PB 5 μg/ml 的甲醇液 50 μl, 混匀, 加乙醚 5.0 ml, 振摇 5 min, 离心 3000 r/min, 5 min, 吸取上层有机相于离心管中, 30℃ 水浴蒸干, 残渣加 50 μl 流动相溶解, 进样 20 μl。

**4'-OH-MP 测定** 取尿样 50 μl, 加水 0.95 ml, 置于 10 ml 具塞试管中, 加入 β-葡萄糖醛酸甙酶(5000 Fishman units)的醋酸缓冲液(pH 5.0) 50 μl, 混匀, 37℃ 培养 12 h, 取出后加 20 μg/ml PB 的甲醇液 50 μl, 混匀, 加乙醚 3.0 ml, 密塞, 振摇 5 min, 离心 3000 r/min, 5 min, 吸取上层醚层于离心管中, 30℃ 水浴蒸干, 残渣加 0.1 ml 流动相溶解, 20 μl 进样。

**色谱条件**  $\mu$ Bondpack RP-C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm ID (中国科学院大连化学物理研究所), 柱温 50  $^{\circ}$ C; 流动相: 乙腈-水 (40:60, v/v), 流速: 1.20 ml/min; UV 波长 210 nm, 灵敏度 0.05 AUFS; 记录纸速 2 mm/min。在上述色谱条件下, MP, 4'-OH-MP 和 PB 的保留时间分别为 6.8, 4.2 和 5.4 min, 见图 1。

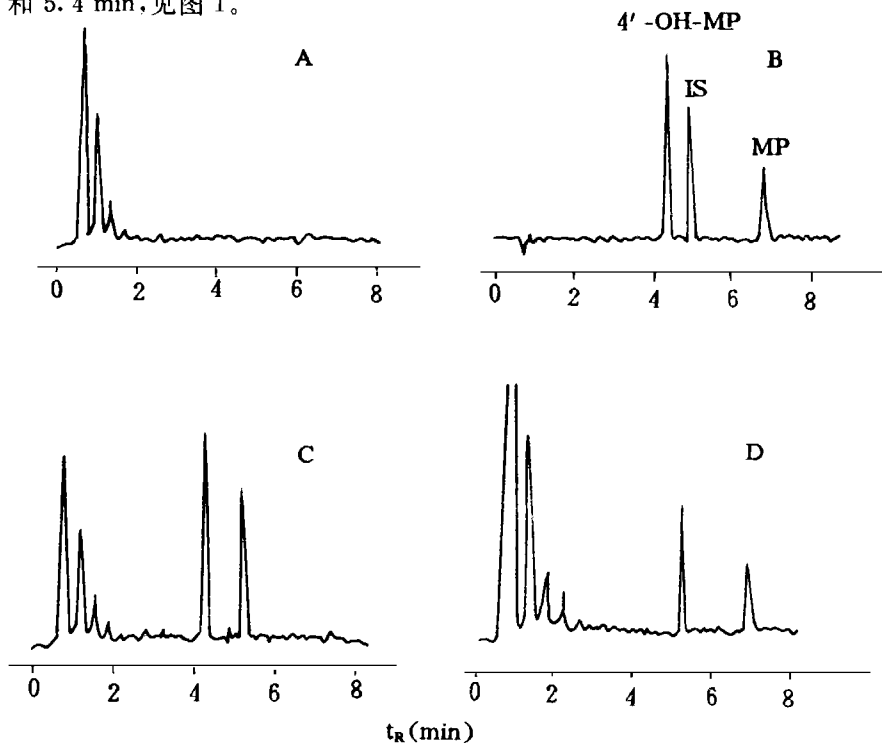


Fig 1 Chromatograms of mephenytoin and 4'-hydroxymephenytoin. A. Blank urine; B. Standard solution; C. 4'-OH-MP in urine; D. MP in urine.

## 实验结果

**标准曲线** 精密吸取含有 MP 0.05, 0.10, 0.30, 0.50, 1.00  $\mu$ g/ml 尿样 1.0 ml; 吸取含有 4'-OH-MP 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0  $\mu$ g/ml 尿样 0.05 ml, 按上述方法提取后, 进样测定峰高(H), 以峰高比( $H_{\#}/H_{\text{标}}$ )为 Y 值, 尿药系列浓度为 X 值作线性回归, 求得 MP:  $Y=1.7987X+0.0177$ ,  $r=0.9998$  ( $n=5$ ); 4'-OH-MP:  $Y=0.01566X+0.0189$ ,  $r=0.9992$  ( $n=4$ )。

**回收率试验** 对 MP 浓度为 0.05, 0.30, 1.00  $\mu$ g/ml 及 4'-OH-MP 浓度为 0.50, 10.00, 100.00  $\mu$ g/ml 尿样, 经样品提取方法处理后回收率测定结果见表 1。

Tab 1 Recovery of mephenytoin and 4'-hydroxymephenytoin from urine

Compd	Added ( $\mu$ g/ml)	Measured ( $\bar{x} \pm s; n=5$ )	Recovery (%)
MP	0.050	0.048 $\pm$ 0.002	96.0
	0.300	0.285 $\pm$ 0.013	95.0
	1.000	0.980 $\pm$ 0.018	98.0
4'-OH-MP	0.50	0.46 $\pm$ 0.04	92.0
	10.00	9.13 $\pm$ 0.29	91.3
	100.00	98.34 $\pm$ 4.31	98.3

**精密度试验** 测定 MP 浓度为 0.05, 0.30, 1.00  $\mu\text{g/ml}$  和 4'-OH-MP 浓度为 0.50, 10.00, 100.00  $\mu\text{g/ml}$  尿样的日内和日间变异, 结果见表 2。

**Tab 2 Precision of the method (n = 6)**

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Within day		Day-to-day	
	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
<b>MP</b>				
0.05	0.049 $\pm$ 0.002	2.96	0.048 $\pm$ 0.003	5.34
0.30	0.300 $\pm$ 0.012	4.04	0.300 $\pm$ 0.016	5.40
1.00	0.990 $\pm$ 0.016	1.62	1.100 $\pm$ 0.024	2.18
<b>4'-OH-MP</b>				
0.50	0.44 $\pm$ 0.03	6.63	0.44 $\pm$ 0.04	9.45
10.00	9.25 $\pm$ 0.25	2.75	9.26 $\pm$ 0.33	3.60
100.00	102.76 $\pm$ 2.67	2.60	99.95 $\pm$ 3.88	3.88

**检测限** 当信噪比为 2 时, MP 和 4'-OH-MP 的最低检测浓度分别为 25.0 ng/ml 和 50 ng/ml。

### 方法应用

10 名汉族健康志愿者, 男女各半, 年龄 20.0  $\pm$  1.0 岁(19~22 岁), 体重 53.87  $\pm$  9.84 kg (42~69 kg), 经体检, 肝、肾、心、血功能均为正常, 无胃肠道疾病。排空膀胱后, 一次口服 MP 片剂 100 mg, 收集服药后 12 h 尿样, 测定尿排泄总量, 取 10 ml 于玻璃试管中密塞, -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。MP 和 4'-OH-MP 尿药浓度应用上述方法测定, 并计算 MP 和 4'-OH-MP 12 h 尿中的排泄量, 计算个体 S-MP 的羟化代谢指数(hydroxylation index, HI)和代谢比值(metabolic ratio, MR)。

$$\text{HI} = \frac{\text{S-MP 口服量}(\frac{1}{2} \text{ MP 剂量})}{12 \text{ h 尿中 } 4' \text{-OH-MP 排泄量}}$$

$$\text{MR} = \frac{\text{MP 尿中排泄量}(0 \rightarrow 12 \text{ h})}{4' \text{-OH-MP 尿中排泄量}(0 \rightarrow 12 \text{ h})}$$

10 名志愿者一次口服 MP 100 mg 后 12 h 尿中 MP 和 4'-OH-MP 的排泄量结果见表 3。

**Tab 3 Urinary excretion of mephenytoin (MP) and 4'-hydroxymephenytoin (4'-OH-MP) after an oral administration of 100 mg of racemic mephenytoin in Chinese subjects**

No.	Sex	Age	MP (0~12 h) (mg)	4'-OH-MP (0~12 h) (mg)	HI	Log <sub>10</sub> HI	MR	Log <sub>10</sub> MR
1	M	20	0.05	31.82	1.68	0.23	0.002	-2.77
2	M	20	0.11	15.74	3.41	0.53	0.007	-2.13
3	M	21	0.21	14.68	3.66	0.56	0.015	-1.82
4*	M	22	0.39	0.04	1349.18	3.13	105.29	1.02
5	M	21	0.05	25.82	2.08	0.32	0.002	-2.68
6	F	19	0.06	12.13	4.42	0.64	0.005	-2.27
7	F	19	0.03	8.00	6.71	0.83	0.004	-2.39
8*	F	20	1.04	0.13	409.57	2.61	8.518	0.93
9	F	20	0.08	11.64	4.61	0.66	0.007	-2.13
10	F	19	0.11	10.72	5.01	0.70	0.011	-1.96

\* Average of results of two assays.

表中可知,10名志愿者中有2名(No.4和No.8)MP和4'-OH-MP的排泄量显著高于另8名。HI和MR值也显著大于另8名。且这两名受试者服药后2h主诉有头晕、嗜睡感,而另8名服药后主诉无任何不适。

## 讨 论

*S*-MP羟化代谢分型方法国外学者采用的有两种。用GC法测定服药后尿样中*S*-和*R*-MP对映体的比值,*S/R*值 $\geq 0.95$ 者为PMs,*S/R*值 $< 0.95$ 者为EMs<sup>(4)</sup>;采用GC法测定服药后8h或12h尿中4'-OH-MP的排泄量或计算羟化代谢指数, $\text{Log}_{10}\text{HI}$ 值 $\geq 1.10$ 者为PMs, $\text{Log}_{10}\text{HI}$  $< 1.10$ 者为EMs<sup>(3)</sup>。*S*-MP 4'-羟化代谢MR值分型点(antimode)至今未见报道。测定尿中4'-OH-MP的排泄量或计算HI进行的分型方法难以区分服药非依从性、尿样收集不完全和药物吸收不良的EMs和真正的PMs,所以,采用*S/R*值分型方法较多。但最近研究表明,测定*S/R*值分型,由于*S*-MP较不稳定,对*S/R*值影响较大<sup>(11)</sup>,因而近来有人采用两种方法同时进行分型测定,以确保分型的准确性<sup>(12,13)</sup>。

我们采用乙腈和水为流动相,紫外低波长(210nm)检测,能测定口服100mgMP(*S*-和*R*-MP的混旋体)片剂后12h尿中MP(含*S*-和*R*-MP)和4'-OH-MP的含量,MP和4'-OH-MP的最低检测浓度达25ng/ml和50ng/ml。PMs由于尿中4'-OH-MP含量较低,可将尿样加大到1.0ml;EMs尿中4'-OH-MP含量较高,取样量只需0.05ml,加水至1.0ml。

由于*R*-MP *N*-去甲基代谢和尿中原型的排泄速率在*S*-MP 4'-羟化代谢PMs和EMs中无显著性差异<sup>(2,14)</sup>,本文采用测定服药后12h尿中MP和4'-OH-MP排泄量,计算个体HI和MR值进行的分型方法,为研究我国人*S*-MP氧化代谢的遗传多态性提供了准确、简便的分型测定方法。

用上述方法,对10名健康志愿者*S*-MP分型测定结果表明,我国人体内*S*-MP 4'羟化代谢速率存在巨大的个体差异,其中2名为PMs,余8名为EMs,为进一步研究我国多民族的人群*S*-MP羟化代谢缺陷的频率和分子遗传机制提供了可靠手段。

**关键词** 美芬妥英;4'-羟美芬妥英;高效液相色谱法

## 参 考 文 献

- 1 Wilkinson GR, et al. Genetic polymorphism of *S*-mephenytoin hydroxylation. *Pharmacol Ther* 1989;43:53.
- 2 Kupfer A, et al. Stereoselective metabolism of mephenytoin in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;218:193.
- 3 Jacqz E, et al. Phenotyping polymorphic drug metabolism in the French Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol* 1988;35:167.
- 4 Wedlund PJ, et al. Mephenytoin hydroxylation deficiency in Caucasians; frequency of a new oxidative drug metabolism polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1984;36:773.
- 5 Inaba T, et al. Family studies of mephenytoin hydroxylation deficiency. *Am J Hum Genet* 1986;38:768.
- 6 Ward SA, et al. *S*-mephenytoin 4'-hydroxylase is inherited as an autosomal-recessive trait in Japanese families. *Clin Pharmacol Ther* 1987;42:96.
- 7 Nakamura K, et al. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquine and mepheny-

- toin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Ibid* 1985;38: 402.
- 8 Bertilsson L, et al. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylation of debrisoquine and *S*-mephenytoin. *Ibid* 1992;51: 388.
- 9 匡唐泳,等. 手性毛细管气相色谱法测定人尿中美芬妥英光学异构体含量的方法学研究. 药学报 1993; 28: 307.
- 10 Baumann P, Jonzier-Perey M. GC and GC-MS procedures for simultaneous phenotyping with dextromethorphan and mephenytoin. *Clin Chim Acta* 1988;171: 211.
- 11 Zhang Y, et al. Limitation of the use of the urinary *S/R*-mephenytoin ratio in pharmacogenetic studies. *Br J Clin Pharmacol* 1991;31: 350.
- 12 Doshi BS, et al. Frequency of impaired mephenytoin 4'-hydroxylation in an Indian population. *Ibid* 1990;30: 779.
- 13 Pollock BG, et al. *S*-Mephenytoin 4'-hydroxylation in older Americans. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40: 609.
- 14 Wedlund PJ, et al. Phenotypic differences in mephenytoin pharmacokinetics in normal subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;234: 662.

## DETERMINATION OF MEPHENYTOIN AND 4'-HYDROXYMEPHENYTOIN IN URINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ZR Ruan, YS Cheng and DY Ding

(*Institute of Clinical Pharmacology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310009*)

**ABSTRACT** A simple, sensitive and reproducible HPLC assay is described for the determination of mephenytoin and 4'-hydroxymephenytoin in human urine. Phenobarbital was used as an internal standard. The compounds were separated on a  $\mu$ -Bondapak RP-C<sub>18</sub> column using a mobile phase of acetonitrile—distilled water (40:60, v/v). The temperature of the column was maintained at 50°C, and the UV detector was set at 210 nm. Calibration curves in the range 0.05~1.00  $\mu$ g/ml for mephenytoin and 0.5~100.0  $\mu$ g/ml for 4'-hydroxymephenytoin were linear ( $r=0.9998$  and  $r=0.9992$ , respectively). The average recovery was  $95.10 \pm 2.95\%$ , and the relative standard deviation within day and day to day was less than 10%. The detection limit for mephenytoin was 25 ng/ml and 4'-hydroxymephenytoin was 50 ng/ml. The method was used to study the metabolism of *S*-mephenytoin 4'-hydroxylatoin in 10 healthy volunteers. The 12 h urinary metabolic ratio (MR) and hydroxylation index (HI) were calculated to express interindividual variation in metabolism. Two of them exhibited defective 4'-hydroxylation of *S*-mephenytoin as poor metabolizers (HI: 1349.18 and 409.57; MR: 105.29 and 8.52). In the remaining 8 subjects, the HI ranged from 1.68 to 6.71 and the MR ranged from 0.002 to 0.015, as extensive metabolizers of *S*-mephenytoin.

**Key words** Mephenytoin; 4'-Hydroxymephenytoin; HPLC