

사람 혈장 중 페니토인 분석 및 생체이용률시험

강해정, 이해자, 남권호, 윤여민¹, 강희경, 유은숙*
제주대학교 의과대학 약리학교실, ¹진단검사의학교실 및 의과학연구소

Studies on The Plasma Analysis and Bioavailability of Phenytoin in Human

Hae Jung Kang, Hae Ja Lee, Kweon Ho Nam, Yeo Min Yoon¹, Hee Kyeong Kang, Eun Sook Yoo*

Departments of Pharmacology, ¹Laboratory Medicine, College of Medicine and Institute of Medical Science,
Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract: A developed assay method to evaluate the pharmacokinetics of phenytoin in human plasma was investigated by reverse-phase HPLC-UV. We found the analytic condition that separate phenytoin from internal standard (triamcinolone acetone) in human plasma sample at the wavelength of 225 nm. Proteins of the plasma samples were removed enough by using 0.1 N HCl. Mobile phase is consisted of buffer (pH3.0):CH₃CN (65:35), and retention time of phenytoin is 8.2 min at a flow rate of 0.9 ml/min.. The fundamental parameters such as linearity, accuracy, precision for this bioanalytical method validation were suitable to pharmacokinetic study and bioequivalence test. Eight volunteers in fasting were administered single dose of 100 mg of phenytoin (one tablet) orally together with 240 ml water for pharmacokinetic studies. The maximum concentration (0.82 µg/ml) of phenytoin was attained at 6.63 hour after dosing. T_{1/2} and AUC were 14.88 hr and 25.181 µg/hr/ml respectively.

According to our study, the accurate analysis for phenytoin achieved and the proposed guidance can be applied to pharmacokinetic study and bioequivalence test in human.

Key words: Phenytoin, bioavailability, pharmacokinetics, HPLC, human plasma

서론

후발의약품 (generic drug)의 약효동등성 평가를 위한 생물학적동등성시험은 1970년대부터 미국, 일본,

유럽 등 선진 각국에서 실시되어 왔으며 우리나라에서도 1988년 생물학적동등성시험 기준을 제정하여 1989년 1월 1일 이후 허가된 신약과 동일한 의약품을 제조할 경우 반드시 생물학적동등성시험을 실시하도록 규정하고 있다. 또한, 우리나라에서는 2000년 8월 의약분업의 실시로 인하여 대체조제의 필요성이 대두되고 2001년 7월 약사법이 개정되어 대체조제의 허용범위가 생물학적동등성 입증품목만으로 한정됨

*Corresponding author: eunsyoo@cheju.ac.kr

· 본 연구는 식품의약품안전청 약효동등성관리사업의 지원으로 수행되었음.

에 따라 1989년 이전에 허가 받은 많은 후발의약품들에 대한 생물학적동등성 시험의 수요가 급증하고 있다. 이에 따라 생물학적동등성시험을 활성화하기 위한 여러 가지 대책이 강구되어 왔으며 2001년 9월부터 다빈도처방의약품 24개 성분의 405 품목을 1차년도 생물학적동등성 시험 대상으로 선정하고 총 85개 기관이 25개로 그룹화하여 참여함으로써 생물학적동등성시험 추진에 효율성을 증대시켰다. 또한, 2차년도 23개 성분, 3차년도 20개 성분의 생물학적동등성 시험을 효과적으로 수행하기 위하여 대조약에 대한 생체이용률시험을 통한 표준 생물학적동등성시험 지침을 작성하는 연구용역사업을 실시하여 생물학적동등성 시험의 기간을 단축시키고 시험기관을 확대하며 시험결과의 신뢰성 또한 확보할 수 있는 방안을 모색하고 있다.

대상성분인 페니토인은 간질의 경련발작 (대발작, 정신운동성 발작, 초점성 발작)에 페니토인으로서 보통 성인 1회 90 mg을 1일 3회 경구투여하며, 디기탈리스 중독으로 인한 부정맥에는 첫날 0.9g, 2-3째날 270-540 mg 투여되는 약물이다.

□ 일반 혈액검사

검사항목	기준치	피험자 결과									
		K.M.S	K.S.C	P.S.Y	O.D.J	Y.H.C	Y.W.J	L.G.H	H.J.H	average	표준편차
WBC(K/ul)	4-10	6.6	6.6	9.5	5.7	6.7	4.4	5.5	10.5	6.7	2.22
SegmentedN(%)	50-75	64.6	52.8	68.1	54	52.7	40.5	57.8	59.3	54.8	7.76
Lymphocyte(%)	20-44	25.8	37.1	22.7	33.1	38.4	46.8	34.7	30.9	34.5	6.89
Monocyte(%)	2-9	6.7	7.3	6	9.7	6.4	11.1	6.4	6.2	7.6	1.86
Eosinophil(%)	0-5	2.3	2.3	2.7	2.8	1.5	1.4	0.7	3	2.5	1.43
Basophil(%)	0-2	0.6	0.5	0.5	0.4	1	0.2	0.4	0.6	0.7	0.48
RBC(M/ul)	4.2-6.3	5.01	5.21	5.29	5.08	4.69	5.09	5.09	5.18	5.1	0.19
Hb(g/dl)	13-17	16.2	16.3	16.7	15.3	15.2	16.7	15.9	16.3	16.0	0.60
HCT(%)	39-52	47.4	47.3	48.7	44.6	43.8	48.1	45.7	48.3	46.2	2.23
MCV(fl)	81-96	94.6	90.8	92.1	87.8	93.4	94.5	89.8	93.2	91.2	2.60
MCH	27-33	32.3	31.3	31.6	30.1	32.4	32.8	31.2	31.5	31.6	0.81
MCHC(g/dl)	32-36	34.2	34.5	34.3	34.3	34.7	34.7	34.8	33.7	34.6	0.69
Platelet(K/ul)	150-450	353	277	258	246	219	153	234	272	232.0	41.64
RDW-CV(%)	11.5-14.5	14.2	12.7	12.7	12.3	13	12.7	12.2	12.4	12.6	0.27
PDW(fl)	15.0-17.5	9.8	10.7	11.2	9.8	12.8	13.5	9.8	11.6	11.4	1.31
MPV(fl)	7.4-12.5	8.7	9.4	9.6	8.8	10.8	11.2	8.7	10	9.8	0.88
P-LCR	15-46	13.9	19.6	22.5	15.2	32.1	35	15.3	25	23.5	7.18

본 연구에서는 페니토인의 생체이용률시험을 통하여 페니토인의 표준 생물학적동등성시험지침을 제시함으로써 생물학적동등성시험의 활성화 및 과학적이고 합리적인 약효동등성시험 관리를 도모하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대조약의 성분명, 명칭, 제형

성분명 : 페니토인

명 칭 : 환인 히단토인정 (diphenylhydantoin)

제 형 : 정제

2. 피험자 선정기준 및 방법

가. 지원자 모집

지원자 모집공고를 통하여 만 19~55세의 건강한 성인으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장, 심혈관계, 중추신경계, 내분비계 및 혈액질환의 병력이 없고 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 모집 공고 (2003. 8 .25. ~2003. 9.1)하고 지원신청서를 받아 지원자 8명을 모집하였다.

□ 혈액화학검사

검사항목	기준치	피험자 결과									
		K.M.S	K.S.C	P.S.Y	O.D.J	Y.H.C	Y.W.J	L.G.H	H.J.H	average	표준편차
BUN	5.0-23.0	10.8	13.7	13.7	11.4	11.6	13.5	10.1	11.7	11.9	1.39
Creatinine	0.6-1.5	0.9	1.1	0.9	1.1	1.1	0.9	0.9	1.1	1.0	0.11
Na	135-146	141	141	141	139	141	140	140	140	140.4	0.73
K	3.6-5.0	4.2	4.7	4	4.1	4.3	3.8	4	3.9	4.1	0.26
Cl	98-111	109	109	109	105	108	107	107	107	107.7	1.32
T.Calcium	8.5-10.5	9.7	9.6	9.2	9.4	9.9	9.5	9.6	9.8	9.6	0.22
Glucose	70-110	89	98	98	86	94	89	97	91	92.4	4.45

□ 소변검사

검사항목	기준치	피험자 결과								
		K.M.S	K.S.C	P.S.Y	O.D.J	Y.H.C	Y.W.J	L.G.H	H.J.H	
SG	1.005-1.030	1.025	1.025	1.025	1.02	>=1.030	1.02	1.02	1.015	
pH	5.0-8.5	6	6	6	6.5	6	7	7.5	7	
GLU	- ~	-	-	-	-	-	-	-	-	
KET	- ~	-	-	+/-	-	-	-	-	-	
BLD	- ~	-	1+	+/-	-	-	-	-	-	
BIL	- ~	-	-	1+	-	1+	-	-	-	
URO	± ~	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	
NIT	- ~	-	-	+	-	-	-	-	-	
PRO	- ~	-	-	+/-	-	-	-	-	-	
RBC	0-4	0-1	2-3	2-3	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	
WBC	0-4	0-1	0-1	2-3	0-1	2-3	0-1	3-5	0-1	
SQE	0-4									
TRE	0-4									
RTE	0-1									
Bact.	~			few				few		
Casts	~									
Crystal	~									
Others	~									

나. 건강검진

지원자 8명에 대한 건강진단 (식품의약품안전청 고시 제 2002-60호호 생물학적동등성시험기준 제10조에 의함)은 제주대학교 병원에서 문진과 내과적인 진찰을 받고 일반혈액검사, 혈액화학검사, 소변검사 등의 임상병리검사를 실시하였다.

다. 선정기준

생물학적동등성시험기준 제10조 및 제11조에 따라 선정기준에 모두 합당하고 제외기준에 해당되지 않는 자로서 생체이용률시험에 적합한 건강한 사람으

로 판정된 8명을 피험자로 선정하였다.

라. 지원자 동의방법

본 시험에 참여하는 지원자는 설명회를 실시하여 본 시험의 목적, 방법, 이상약물반응 발생 가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 설명한 후 피험자의 자유의사에 의한 시험참가 동의를 문서로 받았다.

마. 최종 선정된 피험자

본 시험의 피험자로 최종 선정된 사람은 평균체중 65.6 kg, 평균연령 27.5세의 건강한 지원자 8명이었다.

3. 시험방법

가. 시험 전날 피험자 관리

시험 전일 오후 6시 30분에 로베로호텔 옆에 위치한 태광식당에서 모든 피험자에게 동일한 정식을 1인분씩을 제공하였다. 식사종료 시점인 8시 이후부터 익일 투약 후 5시간까지는 금식시켰다. 저녁식사를 마친 후 본 시험의 목적, 방법, 이상약물반응 발생 가능성 및 이에 대한 대책 등에 대하여 다시 주지시켰다. 8명의 피험자에게 피험자 번호를 알려주었다. 투약 12시간전부터 채혈종료시까지 혹은 투약 후 72시간까지 피험자들이 안정을 취할 수 있도록 수용 관리하고자 호텔(채혈장소 인근 로베로호텔)에 투숙하여 휴식을 취하도록 하였다. 또한 투약 12시간 전부터 채혈종료시까지 피험자의 운동, 식사, 흡연, xanthine계 음료 및 음주 등을 제한관리하였다.

나. 시험 당일

시험당일 오전 6시에 피험자 전원을 기상시켜 세면 및 샤워를 하고 제주대병원에 7시에 도착하여 시험 준비에 착수하였다. 피험자들의 상완 정맥부위에 heparin-locked catheter를 설치하고 blank 혈액으로 각각 5mL 씩을 채혈하였다. 실수로 인한 채혈시간의 변동을 사전에 방지하기 위해 시험 전에 채혈자 및 피험자들에게 증례기록서를 배부하였다. 채혈 및 관리인원으로는 전문의 1인, 채혈관리 2인, 채혈보조인원 2인, 시험담당자 1인 및 시험책임자로 총 8인을 참가시켰다. 피험자에 대한 투약은 오전 8시부터 환인히단토인정(페니토인 100 mg)을 물 240 mL와 함께 투약하였다. 피험자간 복용시간의 차이는 채혈시간을 고려하여 약 2분 간격으로 하였다. 채혈은 약물의 혈중소실반감기를 토대로 반감기의 3배 이상인 72 시간동안 실시하였고, 채혈 횟수는 약물 투약 직전과 투약 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 시간의 총 14시점에서 실시하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2mL의 혈액을 빼내어 버리고 약 5mL의 혈액을 채취하여 피험자 관리번호와 채혈시간이 기재

되어 있는 vacutainer에 넣었다. 채혈 후마다 I.V. catheter 안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리 식염수를 주입하였다. 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 혈장을 취하여 혈장 분리관에 옮겨 담고 분석시 까지 -70°C 에서 보관하였다. 식사에 의한 영향을 배제하기 위하여 투약 전 12 시간 이상 절식한 상태에서 투약 후 5 시간까지는 금식 상태를 유지시켰으며, 투약 후 5시간째 채혈을 마친 후 동일한 점심식사(병원식)를 섭취하였다. 12 시간째 채혈이 끝난 후 다시 동일한 저녁 식사를 섭취하였다. 시험 전과정을 통하여 피험자 개개인의 상태를 관찰하여 증례기록서에 기록하였으며, 채혈이 끝난 후에는 담당의사에 의해 혈액, 맥박, 기타 이상 유무를 확인하였다.

4. 검체처리 및 분석방법

가. 분석대상

혈장 중 미변화체인 페니토인의 농도를 측정하였다.

나. 주요기기 및 장치

분석기기 : Shimadzu HPLC system

UV detector : SPD-10AV vp

Pump : LC-10AD vp

Degasser : DGU-14A

System controller : SCL-10A vp

Column oven : Waters

Column : YMC Pro C18

(4.6mm X 150mm, 5 μm)

Guard cartridge system : Security guard,

C18, 4mmLX3mmID

(Phenomenex)

원심분리기 : Microspin, Hanil

Deep Freezer : Ilshin

다. HPLC 조건

전처리된 혈장 시료는 다음의 HPLC 조건에서 정량하였다. UV검출기 (225nm)를 사용하였으며, 컬럼은

YMC Pro C18 (4.6mm X 150mm, 5 μ m) 및 Security guard, C18, 4mm L X 3mm ID (Guard cartridge system, Phenomenex)를 사용하였다. 이동상으로는 pH 3.0 완충용액 (15mM KH_2PO_4 , phosphoric acid로 pH 조정)과 아세트니트릴을 65 : 35로 제조하여 유속 0.9 ml/min에서 정량하였다. 컬럼 오븐을 이용하여 온도는 40°C로 하였다 (1, 2).

라. 검량선 작성

페니토인을 메탄올에 녹여 농도를 1mg/mL로 만든 후 냉장 보관하고, 이 용액을 물로 희석하여 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 수용액을 만들었다 (3). 혈장 180 μl 에 이 용액 20 μl 를 가하여 농도가 각각 0.2, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g/ml}$ 가 되도록 혈장시료를 만들었다. 각각의 표준 혈장 200 μl 에 내부표준물질로 triamcinolone acetonide (10 $\mu\text{g/ml}$) 100 μl 를 가한 후 흔들어 섞었다. 여기에 0.1 N HCl 100 μl 를 가한 후 흔들어 섞고 1 ml의 methylene chloride를 넣어 5 분간 잘 흔들어 주었다. 10,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 유기층을 eppendorf tube에 옮기고 30분간 50°C의 수욕상에 방치하여 증

발시킨 후 잔사를 이동상 100 μl 에 녹여 이를 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 이 상층액 20 μl 를 취하여 HPLC에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피이크 면적에 대한 페니토인의 피이크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였으며 하루에 실험을 4번 시행하여 일내 재현성을 구하였고 연속하여 4일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

마. 혈장시료의 처리

피험자로부터 각 시간별로 채취하여 -70°C에 보관했던 혈장시료를 실온에 방치하여 녹인 후 200 μl 를 취하여 eppendorf tube에 옮기고 여기에 내부표준물질로 triamcinolone acetonide (10 $\mu\text{g/ml}$) 100 μl 를 가한 후 검량선 작성 방법과 동일한 방법으로 전처리하여 HPLC에 주입하였다.

바. 혈중농도계산

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피이크면적에 대한 페니토인의 피이크면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장중 엘도스테인의

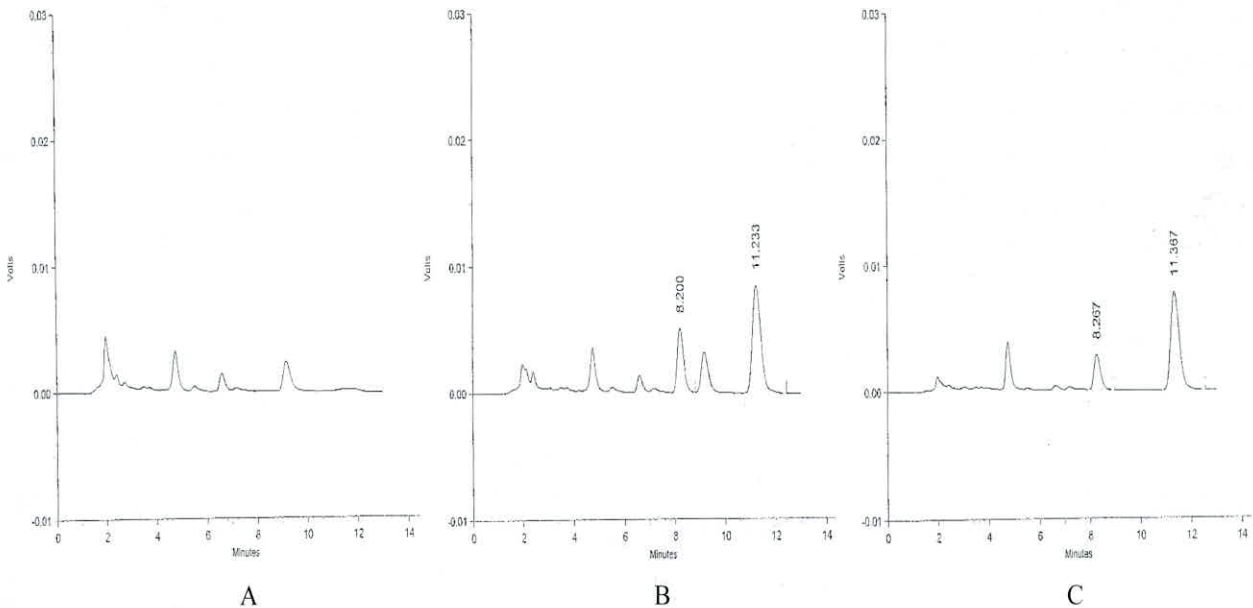


Fig. 1. Chromatogram of phenytoin analysis in human plasma. A, Blank plasma; B, Plasma containing internal standard and phenytoin(2 $\mu\text{g/ml}$); C, Plasma of a volunteer at 4 hour after drug administration (Phenytoin; 8.2 min, Internal standard; 11.3 min)

농도를 구하였다 (4).

결과 및 고찰

1. 분석조건의 검증

(1) 특이성

검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Fig. 1과 같았으며, 페니토인 피이크의 유지시간은 약 8.2분, 내부표준물질 피이크의 유지시간은 약 11.3분 이었다.

(2) 직선성

0.2, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 페니토인 표준액에 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 triamcinolone acetonide를 spike한 혈장시료를 검체처리하여 HPLC로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 페니토인의 검량선의 계산식은 $\text{Concentration} = 4.5077 \times \text{Peak area ratio} + 0.0243 (R^2=0.9999)$ 이었다 (Fig. 2).

(3) 정밀성 및 정확성

0.2, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 페니토인 혈장표준액을 상기의 검체처리방법으로 처리하여 분석하였다.

① 정밀성

페니토인과 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를

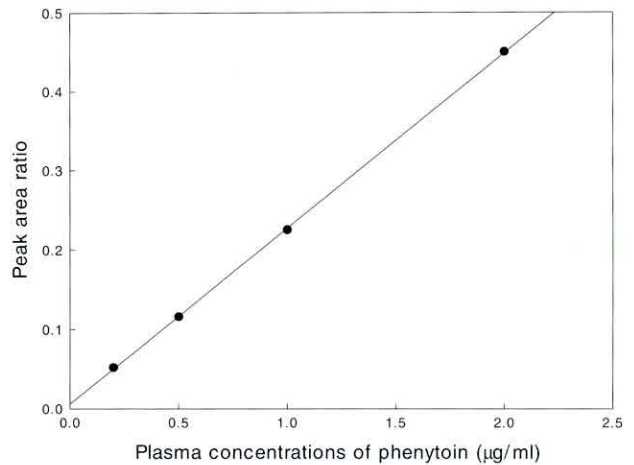


Fig. 2. Calibration curve for phenytoin. (Concentration = $4.5077 \times \text{Peak area ratio} + 0.0243, R^2 = 0.9999$)

페니토인과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다. 하루에 4번 시행하여 일내 정밀성 (% CV로 표시)을 구하였고 4일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성 (% CV로 표시)을 구하였다.

Table 1. Precision and accuracy of phenytoin analysis in human plasma

농도 ($\mu\text{g/ml}$)	정밀성(CV%)		정확성%(n=7)
	일내(n=4)	일간(n=4)	
0.2	3.83	6.75	104.88
0.5	3.25	10.06	99.38
1	1.07	7.49	98.97
2	1.87	8.89	100.18

Table 2. Plasma concentration of phenytoin according to time profile

Subject	Time(hr)													
	1	2	3	4	5	6	8	10	12	24	36	48	72	
V1	0.417	0.898	0.941	1.097	0.927	1.083	0.961	1.116	0.902	0.796	0.444	0.369	0.124	
V2	0.423	0.668	0.789	0.690	0.653	0.607	0.588	0.610	0.592	0.362	0.221	0.099	0.037	
V3	0.617	0.696	0.699	0.812	0.734	0.784	0.600	0.624	0.434	0.361	0.107	0.044	ND	
V4	0.053	0.732	0.997	1.133	1.148	1.158	1.207	1.177	1.062	1.038	0.894	0.567	0.358	
V5	0.363	0.531	0.621	0.698	0.592	0.633	0.574	0.570	0.485	0.284	0.104	0.038	ND	
V6	0.322	0.505	0.484	0.641	0.551	0.600	0.491	0.531	0.380	0.294	0.069	0.024	ND	
V7	0.190	0.215	0.330	0.410	0.561	0.535	0.555	0.567	0.547	0.325	0.135	0.052	ND	
V8	0.432	0.600	0.582	0.660	0.630	0.735	0.692	0.757	0.683	0.588	0.386	0.273	0.059	
평균	0.352	0.606	0.680	0.768	0.724	0.767	0.708	0.744	0.635	0.506	0.295	0.183	ND	
표준오차	0.170	0.201	0.225	0.242	0.210	0.233	0.247	0.258	0.237	0.278	0.278	0.200	ND	

ND : not detected

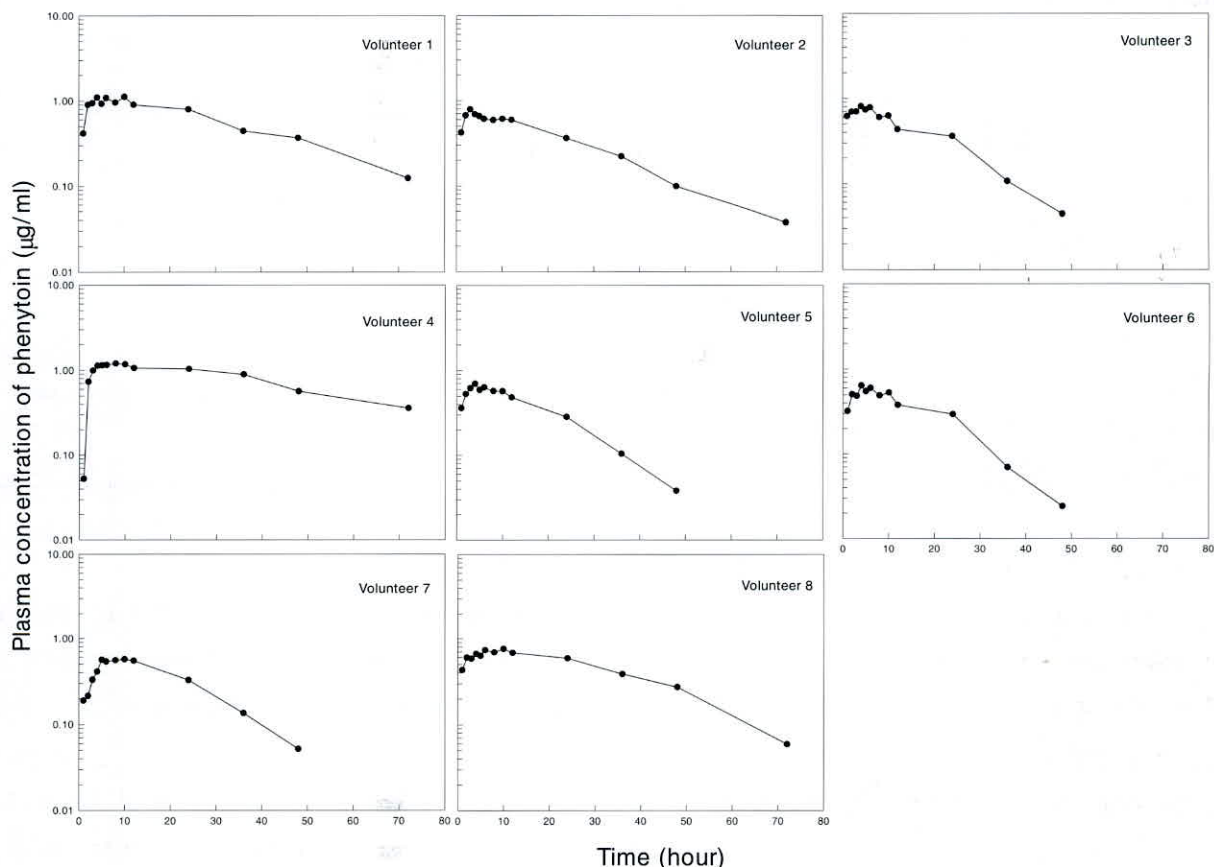


Fig. 3. Plasma concentrations of phenytoin after single oral administration of 100mg phenytoin in eight fasting volunteers.

② 정확성

검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였다.

2. 각 피험자의 시간에 따른 혈장 중 페니토인의 농도추이

각 피험자에게 페니토인 100mg을 투여한 후 구한 시간별 혈장 중 약물 농도를 Table 2에 나타내었으며, 각 피험자에 있어서의 혈장 중 약물농도-시간 곡선을 Fig. 3에 나타내었고 이를 평균 혈장 중 약물농도-시간 곡선으로 그려보면 Fig. 4와 같다.

3. 약물속도론적 파라메타의 산출

각 피험자의 C_{max} , T_{max} , AUC, $t_{1/2}$, K_e 등의 생체이용률 파라메타는 식약청의 KB-Test program을 이용하여 구하였다.

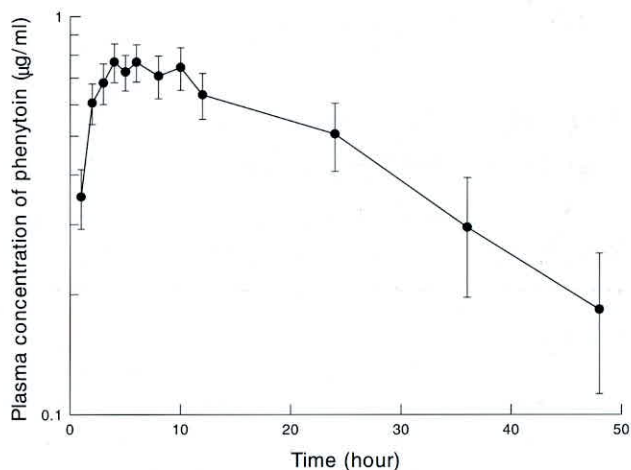


Fig. 4. Mean Plasma concentrations of phenytoin after single oral administration of 100mg phenytoin in eight fasting volunteers (Mean±S.E.).

사람 혈장 중에서 페니토인의 HPLC 분석법을 검토하고 실제로 사람에게 투여하여 혈장 중 농도를 측정하였으며 이로부터 혈중농도-시간곡선하면적 (AUC)과

Table 3. Plasma concentration of phenytoin according to time profile

	AUCt(0-t) ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	AUC(0-inf) ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	AUCt/AUC (%)	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	Tmax (h)	T _{1/2} (h)	k (h ⁻¹)
V1	39.38	43.04	91.48	1.12	10.0	20.6	0.0337
V2	19.90	20.69	96.17	0.79	3.0	14.7	0.0472
V3	16.10	16.76	96.09	0.81	4.0	10.3	0.0671
V4	55.68	71.13	78.27	1.21	8.0	29.9	0.0232
V5	14.32	14.87	96.33	0.70	4.0	9.9	0.0701
V6	12.62	12.92	97.64	0.64	4.0	8.7	0.0793
V7	14.42	15.20	94.84	0.57	10.0	10.5	0.0662
V8	29.00	30.24	95.91	0.76	10.0	14.4	0.0480
평균	25.18	28.11	93.34	0.82	6.6	14.9	0.0543
표준편차	15.34	20.13	6.35	0.22	3.2	7.2	0.0195

최고혈중농도 (C_{\max})와 최고혈중농도 도달시간 (T_{\max})을 구하였다. 그 결과 C_{\max} , T_{\max} , $t_{1/2}$ 및 AUC의 평균치는 각각 $0.82 \mu\text{g/ml}$, 6.63 hr , 14.88 hr , $25.181 \mu\text{g/hr/ml}$ 이었다. 검량선의 농도 $0.2 - 2 \mu\text{g/ml}$ 에서 양호한 직선성, 정확성, 정밀성을 보였다. 이러한 분석조건을 바탕으로 한 연구방법 및 결과는 이후로 약물체내동태 및 생물학적동등성 시험의 연구에 유용하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kim YG, Cho MK, Kwon JW, et al. Effects of cysteine on the pharmacokinetics of intravenous phenytoin in rats with protein-calorie malnutrition. *Int J Pharmaceu.* 2001;229:45-55.
2. Burstein AH, Pharm D, Fisher KM, et al. Absorption of phenytoin from rectal suppositories formulated with a polyethylene glycol base. *Pharmacotherapy* 2000;20: 562-567.
3. Hara S, Hagiwara J, Fukuzawa M, et al. Determination of phenytoin and its metabolites in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Sci* 1999;15:371-375.
4. Joshi MV, Pohujani SM, Kshirsagar NA, et al. Simultaneous HPLC measurements of Phenobarbitone, phenytoin and carbamazepine from plasma samples. *Indian J Pharmacol* 1990;22:177-179.