

经验交流

# 反相高效液相色谱法 测定微量血中苯巴比妥、苯妥英钠的含量

祁广建 孙淑艳 王笑康

张树森 唐风芝

(大连市卫生防疫站)

(阜新市卫生防疫站)

苯巴比妥(Phenobarbitone)、苯妥英钠(Phenytoin)是首选的抗癫痫药物,对该药的快速测定,有助于用药剂量的调整和给药方案的建立,使药物浓度稳定的维持在最佳的治疗范围内,避免毒副反应。

近年来用于这两种药物的分析方法研究发展很快(1-3),其中高效液相色谱法测定血药浓度具有快速、灵敏,样品处理简单的优点(4-7)。本文报道了用高效液相色谱法测定微量血中两种药物的分析方法,在临床血药浓度的测定上取得了满意的结果。

## 实验部分

### (一) 仪器与试剂

LC-3A型高效液相色谱仪,SPD-2A紫外检测器,C-R1B数据处理机(均为日本Shimadzu)7125型进样阀(美国Rheodyne),化学试剂均用分析纯,苯巴比妥、苯妥英钠标准(大连医学院)

### (二) 色谱操作条件

色谱柱:Zorbax-ODS(4.6×250mm),柱温:50℃,检测器波长:220nm,0.16AUFS,流动相:MeOH/H<sub>2</sub>O(60/40, V/V),流速:0.7ml/min。

### (三) 样品处理

精确吸取血清40~60μl于有塞离心管中,加入提取液1.0ml(提取液为氯仿:乙酸乙酯=98:2, V/V)混匀后超声提取5分钟,在2000~2500转/分下离心10分钟,用滴管吸取全部有机层于另一比色管中,原离心管中再加入提取液1.0ml,重复上述提取操作,合并提取液,在70℃水浴中用氮气吹干用流动相稀释至0.5~1.0ml供测试用。

### (四) 样品测定结果计算

外标法定量计算。

## 结果与讨论

### (一) 最佳操作条件的选择

#### (1) 提取液

目前所见报道中提取这两种药物常用的溶剂有氯仿、乙腈、正己烷/乙醚/异丙醚混合液等。实验证明,后两种提取液虽有较好的提取效果,但同时带来了大量的杂质而影响测定,氯仿又不能同时提取这两种药物。若加入一定量的乙酸乙酯,可改进提取率。通过选择确定,氯仿/乙酸乙酯(98/2, V/V)作提取液为宜。

#### (2) 流动相、检测波长和柱温

本文曾对如下流动相进行选择:(1)AcCN/MeOH/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(17/28/55, V/V/V), pH6.8;(2)AcCN/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(36/64, V/V), pH6.8;(3)MeOH/H<sub>2</sub>O(70/30, V/V);(4)MeOH/H<sub>2</sub>O(60/40, V/V)。结果表明,用(4)作流动相时分离度、灵敏度最佳,基线稳定,分析周期短。见图1。

对波长的试验表明,波长短时,被测组分响应较高,但噪音也增大,这是由于流动相中的杂质所致。在215~220nm波长时,基线和灵敏度均较满意。

柱温由30℃调到55℃,苯巴比妥的保留时间由6.58分缩短到5.70分,柱压由11760减小到6864.7kpa。柱温超过60℃时,流动相中甲醇生成气泡,无法测定。所以选取50℃为宜,此时被测组分即能与样品中杂质分开,分析时间又短。

### (二) 标样浓度与响应值的线性关系

精确吸取标准样,分别用流动相稀释成不同浓度,在上述色谱条件下定体积进样,每个浓度进样三次,用C-R1B处理机处理数据以峰高与绝对进样量作图,见图2。

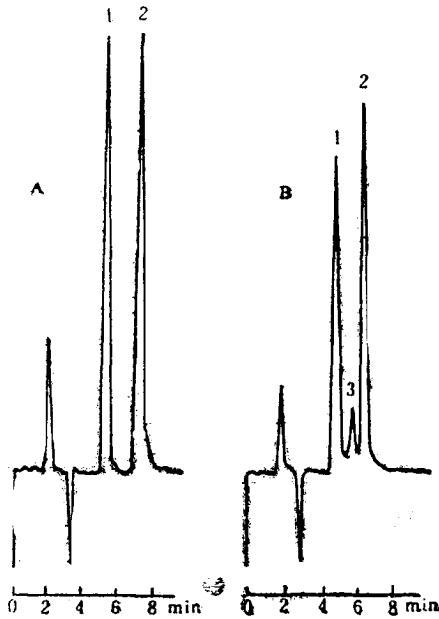


图 1 组分分离图

A——标样分离图 B——血清分离图

1. 苯巴比妥, 2. 苯妥英钠, 3. 杂质,

色谱条件 柱: Zorbax-ODS, 4.6×250nm,

流动相: MeOH/H<sub>2</sub>O(60/40, V/V)

流速: 0.7ml/min

检测器: UV-220nm, 0.16AUFS

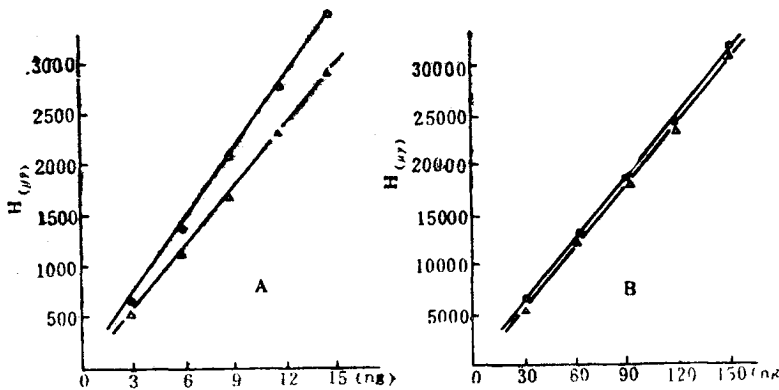


图 2 被测组分与响应值的线性关系

○ 苯巴比妥

△ 苯妥英钠

A 中  $r=0.9995$

$\Delta r=0.9996$

B 中  $r=0.9972$

$\Delta r=0.9971$

参 考 文 献

(1) 陆明廉, 药学通报, 20(11), 674(1985).  
 (2) 陆明廉, 《血药浓度测定与临床应用》, 上海科学技术出版社, 1986.  
 (3) H. Saito, J. Chromatogr., 243, 189(1982).  
 (4) 美国 Waters 公司, “药物测定与临床化学分析” 4 1986.  
 (5) 波多野博行 “高速液体クロマトグラフィーデータ集”, 株式会社アイピーシー. 东京. p3331.(1982).  
 (6) 张仁斌等, 《高效液相色谱在医药研究中的应用》, 上海科学技术出版社, p.84, 1983.

(三) 回收率测定

用空白血清作样品, 添加不同浓度的标准溶液 1.0ml, 按前述样品处理步骤操作, 见表 1.

表 1 回收率测定

组分名称	实验次数	添加量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	均值 (%)	标准差 (S)	变异系数 (CV%)
苯巴比妥	6	0.45	0.39~0.44	86.84~97.37	93.42	3.63	3.31
			0.83~0.89	91.78~98.61			
	6	0.90	3.38~3.44	93.96~95.57	94.89	0.73	0.67
			0.83~0.89	91.78~98.61			
	6	3.60	0.47~0.50	94.59~100.00	97.29	2.42	2.21
			0.91~0.98	91.14~98.599			
6	1.00	3.78~4.00	94.52~100.00	98.85	2.19	2.00	
		0.91~0.98	91.14~98.599				

用本法对部分癫痫病人的血清进行了实测完全满足了临床对血药浓度监测的需要。

致谢 本站孙广业同志, 大连化物所王俊德同志对本文给与指导, 大连医学院汪天柱同志提供血清样品, 特此致谢。

(7) 楼雅卿等, 北京医学院学报, 15(4), 273 (1981).

(收稿日期: 1986年12月5日)

Determination of Phenobarbitone and Phenytoin in Human Serum by Reversed-Phase HighPerformance Liquid Chromatography Qi Guangjian, Sun Shuyian and Wang Xiaokang, Dalian Sanitation and Antiepidemic Station, Zhang Shusen and Tang Fengzi, Fu xin Sanitation and Antiepidemic Station

A method for the determination of commonly antiepileptic drugs phenobarbitone and phenytoin in human serum by reversed-phase high-

performance liquid chromatography is described. Sample of serum was extracted with chloroform-ethyl acetate (98:2). The organic phase was evaporated, and reconstituted residue was analysed by HPLC. With a Zorbax-ODS column and a mobile phase of methanol-water(60:40). The flow rate was at 0.7ml/min. Detection wavelength was

at 220nm. The minimum detectable limits from serum were  $6.8 \times 10^{-10}g$  for phenobarbitone and  $8.5 \times 10^{-10}g$  for phenytoin, respectively. Recoveries from serum were 86.8~98.6% for phenobarbitone and 91.1-100.0% for phenytoin, respectively. This method is proved to be useful in clinical.

## 柱色谱分离卟啉衍生物的改进\*

谢虹 韩士田 崔凯荣 张长久

(河北师范学院化学系, 石家庄)

柱色谱是有机实验室中最有效的分离、制备的方法之一。传统的方法洗脱各组分时、费溶剂。为此, 人们采用各式加压柱色谱技术, 以提高洗脱速度(1-6), 取得了较好的分离效果。但加压给更换洗脱剂带来了不便。

我们在合成卟啉类化合物时, 所得产物复杂, 难以分离(7)。采用传统的柱色谱分离洗脱, 不仅费时, 耗费大量的溶剂, 且柱上各组分间易扩散、拖尾, 分离效果不佳。曾尝试采用加压法操作, 虽然加速了洗脱速度, 但由于样品溶解性差, 分离效果仍不理想。我们采用推出(或吹出)切割吸附

柱色谱方法, 分离卟啉衍生物取得了较好的效果。

利用这种改进的方法分离卟啉类混合物, 洗脱时间大大缩短。只需在常压条件下, 用选定的洗脱剂洗脱, 俟前组分抵达柱下端, 柱上展现出若干清晰色带即完成柱上分离。然后用前端装有橡皮塞的杆将吸附柱小心推出至洁净的玻璃板上。将有色卟啉衍生物按各色带进行切割。如图1所示(对于无色物质的柱色谱可在紫外灯照射下进行切割)。切割后的各组分分别用溶剂萃取。至此完成分离。

推出柱色谱使用的色谱柱以直筒形(即上下口

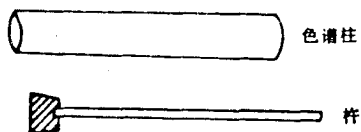
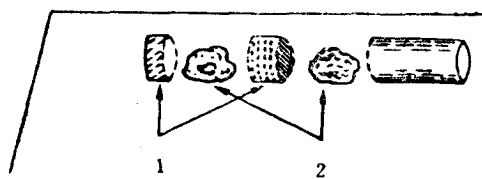


图1 色带的切割  
1. 吸附有物质的吸附剂,  
2. 未吸附有物质的吸附剂

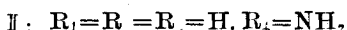
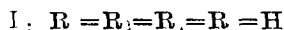
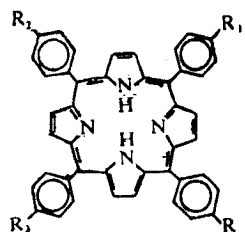
径与柱体均为同一直径)为佳。温州市鹿城生化仪器制造厂生产的色谱柱即可满足使用。如使用下口为尖嘴或活塞式色谱柱, 则可用氮气吹出吸附柱, 也可取得与推出同样好的效果。

此方法装柱时尚可使用薄层色谱规格的吸附剂, 使其兼具薄层色谱和柱色谱二者之优点, 从而提高分离效果。此法尤适宜于溶解性差、复杂组分的分离, 而用常规柱色谱分离, 往往因长时间洗脱, 致使色带产生扩散、拖尾等缺点。通过实验证明此法是一个简便、快速、省时、省试剂、分离效果好的方法。可使 $R_f$ 值相差大于0.05的混合物获得很好的分离。

上述操作一般需要1-2小时即可完成。

分离操作实例:

采用上述方法成功地分离了我们合成的氨基卟啉衍生物的混合物。合成的产物为以下几种结构:



\* 河北省科委资助的课题