

固相萃取结合 GC-FID 和 GC-MS 快速分析 血浆中巴比妥类药物

邱丰和 刘力 郭励 罗毅 卢涌泉

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 报道了用 X-5 树脂固相萃取分离纯化、GC-FID 和 GC-MS 定量和定性分析血浆中巴比妥类药物的方法, 含药物的血浆可直接用萃取柱处理, 操作简单方便, 用甲醇—乙酸乙酯作为洗脱剂, 不同药物的相对回收率为 95~105.4%, RSD 为 3.46~6.41%。检测灵敏度及线性范围适合血药浓度的监测及中毒急救分析的需要。

关键词 巴比妥类药物; 固相萃取; GC-FID; GC-MS

巴比妥类药物对中枢神经系统有抑制作用, 主要用于催眠、镇静、抗惊厥及麻醉前给药, 应用很广, 但超剂量服用能引起中毒, 致死剂量在 1~3 g 左右。由于该类药很易获得, 成为临床中毒病例中最常见的一类药物。有关该类药分析方法的报道已有很多, 主要有薄层色谱法^[1]、GC 法^[2,3]、GC-MS 法^[4,5]等, 但寻找更方便准确的分析方法, 仍是毒物分析工作者感兴趣的课题。

生物样品中的药物通常是用液—液萃取的方法提取, 但提取物往往含杂质较多, 近几年来, 固相萃取在毒物分析方面的应用有很大发展, 国内外先后发展了很多种类的固相萃取材料(如 C₁₈, XAD-2 等)。X-5 树脂是一种新型国产非极性大孔高分子吸附树脂, 通过近几年的应用表明, 有吸附量大、传质速率快、适用面广的特点, 在生物样品中毒物的提取方面有很好的应用前景。本文报告以 X-5 树脂固相萃取预处理, 用毛细管气相色谱和 GC-MS 法分析血浆中常见巴比妥类药物的结果。

实验部分

仪器和试剂

配有 FID 的 GC-9A 气相色谱仪, C-R2AX 积分仪(岛津公司), MCH-9 氢气发生器(北京精华仪器厂); ZFA-02 型旋转蒸发仪(上海玻璃仪器二厂); XW-891 旋涡混合器(永嘉华联仪器厂)。

所用各种药物和内标 SKF525A(盐酸丙基解痉素)均由公安部二所购得, 先配成 1 mg · ml⁻¹ 的储备液, 实验前稀释成 100 μg · ml⁻¹ 的工作液, 各种试剂均为分析纯。

X-5 大孔吸附树脂(40~60 目)为南开大学化工厂产品, 平时浸泡在甲醇中, 装柱前取出凉干。

缓冲溶液: 用 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 和 KH_2PO_4 配制 pH 6, 5, 4. 5, 4 的缓冲液、用柠檬酸 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Na_2HPO_4 ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 配制 pH 3 的溶液、用 KH_2PO_4 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 H_3PO_4 配制 pH 1. 7 的溶液。

萃取柱的装填与处理

萃取柱是自制带活塞的玻璃管柱, 准确称取树脂一定量, 倒入洗净的玻璃柱中, 用一盖有尼龙丝网的聚丙烯塑料圈压紧, 分别用氯仿和甲醇 5 ml 冲洗和活化, 然后用蒸馏水 3 ml 冲洗备用。

样品制备

取血浆 0. 5 ml, 加入一定量待测药物及内标, 用 2~4 倍体积蒸馏水或缓冲溶液稀释后过柱, 蒸馏水 5 ml 洗去水溶性杂质, 药物用甲醇—乙酸乙酯混合溶剂 (1: 1 v/v) 5 ml 洗下, 旋转蒸发至干, 甲醇 100 μl 溶解, 取 1 μl 进入 GC。

中毒血样 取血样 0. 5 ml, 加入内标 ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) 0. 5 ml, 用 pH 3 的缓冲溶液 2 ml 稀释, 其它操作同上。

色谱条件

GC—FID SE-54 (25 m \times 0. 25 mm) 柱, 采用程序升温, 起始温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率 30 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 终止温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min; 高纯氮作载气, 柱前压 150 kPa; 检测器为 FID, 温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 空气和氢气的流量调节在最佳范围内; 进样口温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 分流比 6: 1。

GC—MS SE-54 (10 m \times 0. 25 mm) 柱, 程序升温, 起始温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 升温速率 20 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 终止温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min; 载气为 He 气, 柱前压 50 kPa; 进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 无分流进样。

结果与讨论

色谱

图 1 示出了空白血浆和外加七种巴比妥类药物血浆的色谱图, 各种药物得到很好的分离, 血浆中杂质基本不干扰药物的测定。

标准曲线的绘制

分别配制浓度为 0, 0. 5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 和 30 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的混合药物的血浆溶液, 并分别加入 10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的内标, 加入 4 倍体积的缓冲溶液, 按样品制备方法过柱, 按上述色谱条件作色谱分析, 以样品浓度对样品峰面积和内标峰面积比值作线性回归分析, 各种参数列于表 1。

Tab 1 Retention time, linearity and detection threshold

Drug	t_R (min)	a	b	r	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Detection threshold ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
Barbital	3. 52	0. 321	19. 853	0. 993	0. 5~30	0. 5
Aprobarbital	4. 12	0. 104	16. 436	0. 996	0~30	0. 5
Amobarbital	4. 54	0. 331	14. 032	0. 994	0~30	0. 3
Pentobarbital	4. 68	0. 121	10. 404	0. 995	0~30	0. 3
Secobarbital	4. 93	0. 024	15. 652	0. 996	0~30	0. 5
Methylphenobarbital	5. 59	-1. 510	10. 539	0. 995	0~30	0. 3
Phenobarbital	6. 01	0. 117	12. 014	0. 992	0~30	0. 5

a. Intercept; b. Slope; r. Correlation coefficient.

固相萃取条件的考察和优化

pH 对回收率的影响

巴比妥类为酸性药物,调节样品 pH 使药物以分子状态存在,有利于药物在树脂上吸附,由图 2 可知,pH 调到 3 左右即可得到最佳的回收率。

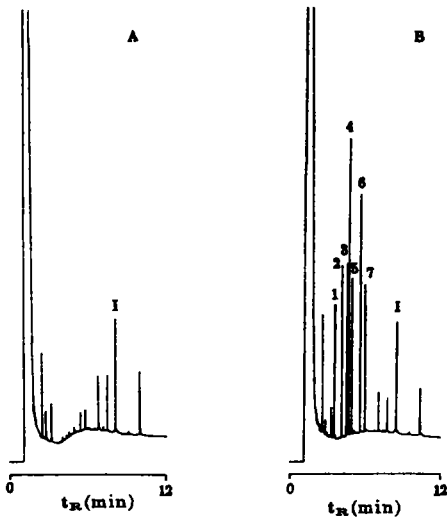


Fig 1 GC-FID chromatogram of blank plasma (A) and plasma spiked with 7 barbiturates (B) ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). I. Internal standard; 1. Barbital; 2. Aprobarbital; 3. Amobarbital; 4. Pentobarbital; 5. Secobarbital; 6. Methylphenobarbital; 7. Phenobarbital.

洗脱剂及其用量

在固相萃取过程中,影响药物回收率的最重要的因素之一是洗脱剂,选择洗脱剂首先要考虑的因素是它对药物的溶解度,其次是传质速率的快慢,为获得较高的回收率,多选用小分子的有机溶剂作洗脱剂。我们对照了甲醇、乙醇、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯及不同配比(5:1,3:1,1:1,1:3,1:5)的二元溶剂甲醇—氯仿、甲醇—乙酸乙酯和甲醇—二氯甲烷的洗脱效率,综合考虑回收率、溶剂毒性及普适性,选择甲醇—乙酸乙酯(1:1)作为洗脱剂。

为使吸附在树脂上的药物尽可能完全洗下,可用大量洗脱剂洗脱,但洗脱剂用量加大时,会引进一些杂质,给药物的分析带来不必要的干扰。由图 3 可知,洗脱剂用量超过 4 ml 时,药物回收率基本稳定。

X-5 树脂用量对药物回收率和相对回收率的影响

由于各种药物的极性不同,药物在树脂床上吸附和解吸附曲线不同,因此,规范树脂用量对方法的可靠性和稳定性是必要的。实验表明,X-5 树脂用量超过 0.3 g 时,药物回收率即基本

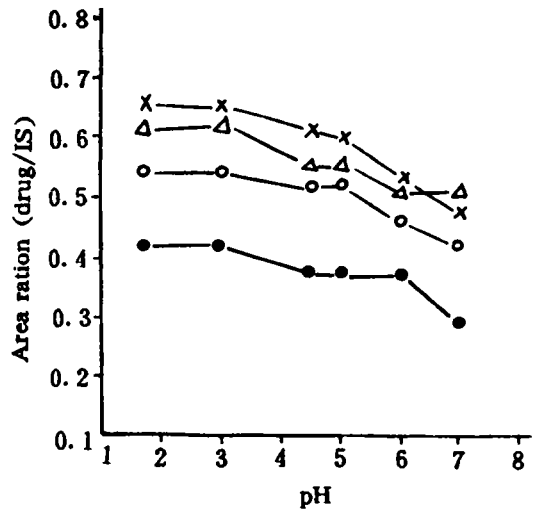


Fig 2 Diagram of relative recoveries vs pH in 0.5 ml plasma with $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of drugs. ●—● Barbital; ○—○ Aprobarbital; △—△ Amobarbital; ×—× Phenobarbital.

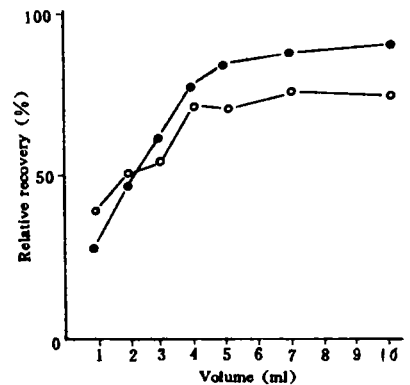


Fig 3 Diagram of relative recoveries vs volumes of solvents. ●—● SKF525A; ○—○ Phenobarbital. 0.5 ml plasma, $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of drugs.

稳定。

药物浓度对回收率的影响

图 5 示出苯巴比妥在不同柱子上的回收率随药物浓度的变化。当浓度一定时,回收率由两个因素决定,一是药物能否充分吸附,二是被吸附的药物能否完全被洗脱,当树脂用量少时(0.1 g),树脂床太短,浓度太高时药物不能充分吸附,回收率反而随浓度增加而降低,增加树脂用量虽然有利于吸附,却不利于洗脱,因此在树脂用量较多时,药物的回收率也并不随浓度增加而线性增加。这表明在药物浓度较低时,树脂的用量不宜太多,而药物浓度较高时,树脂用量太少也会降低药物的回收率。因此树脂用量一定的柱子,存在一个最佳适用的浓度范围。

方法回收率和精密度

配制含 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 各种药物的血浆,按样品处理方法过柱,测量各种药物的色谱峰面积,分别计算其相对回收率及其相对标准偏差(RSD)(见表 2)。

Tab 2 Relative recovery and precision of 7 barbiturates(n=6)

Drug	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)		Relative recovery (%)	RSD
	Added	Found		
Barbital	10.2	10.16	99.6	6.06
Aprobarbital	10.7	10.16	95.0	4.78
Amobarbital	9.9	10.11	102.1	5.80
Pentobarbital	10.0	10.54	105.4	5.36
Secobarbital	10.08	10.41	103.3	4.40
Methylphenobarbital	10.0	9.94	99.4	6.41
Phenobarbital	10.78	10.55	97.9	3.46

七种巴比妥类药物的 GC-MS

血浆中七种巴比妥类药物固相萃取提取物 GC-MS 的总离子流色谱图(TIC)见图 4。保留时间及特征离子见表 3。

Tab 3 The retention time and characteristic ions of 7 barbiturates in GC-MS

Drug	t_R (min)	Characteristic ion(m/z)
Barbital	4.15	156,141*,112,98
Aprobarbital	4.88	210,195,167*,124
Amobarbital	5.45	197,183,156*,141
Pentobarbital	5.58	197,156*,141*
Secobarbital	5.85	209,195,181,168*,153
Methylphenobarbital	6.38	246,231,218*,146,117
Phenobarbital	6.82	232,217,204*,163,117

* Base peak

方法应用

某患者因吵架服毒,发现时已昏迷,用所建方法处理分析病人血样,发现为速可眠(司可巴比妥)中毒,血中药物含量为 $26.2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。色谱图见图 5。

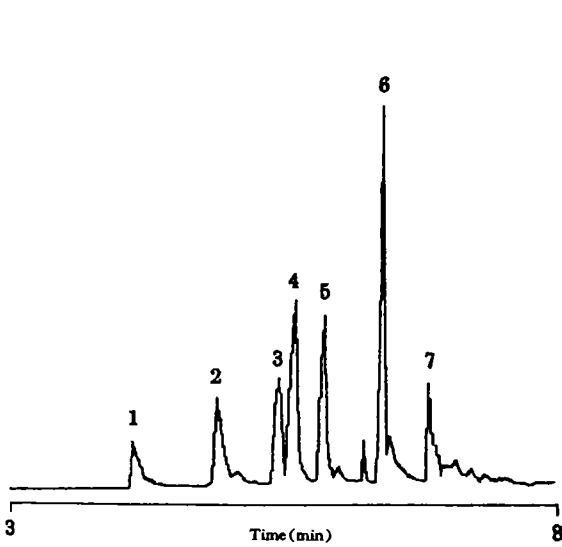


Fig 4 Total ion current chromatogram of 7 barbiturates in GC-MS ($10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 0.5 ml plasma).

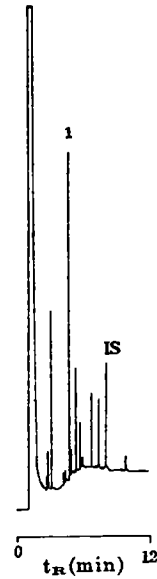


Fig 5 GC-FID chromatogram of the plasma from a poisoned patient. 1. Secobarbital; IS. Internal standard.

参 考 文 献

- 1 Lillsunde P, Korte T. Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC-MS identification. *J Anal Toxicol*, 1991, 5 : 71
- 2 Coudore F, Alazard J, Paire M *et al.* Rapid toxicological screening of barbiturates in plasma by wide-bore capillary gas chromatography and nitrogen-phosphorus detection. *J Anal Toxicol*, 1993, 17 : 109
- 3 Wallace JE, Hall LR, Harris SC. Determination of pentobarbital and certain other barbiturates by capillary gas-liquid chromatography. *J Anal Toxicol*, 1983, 7 : 178
- 4 Cailleux A, Turcant A, Premel-Cabic A *et al.* Identification of major drugs of abuse using chromatography. *J Chromatogr Sci*, 1982, 20 : 289
- 5 Soo VA, Bergert RJ, Deutsch DG. Screening and quantification of hypnotic sedatives in serum by capillary gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector, and confirmation by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem*, 1986, 32 : 325

RAPID IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF BARBITURATES IN PLASMA USING SOLID-PHASE EXTRACTION COMBINED WITH GC—FID AND GC—MS METHOD

FH Qiu, L Liu, L Guo, Y Luo and YQ Lu

(Institute of Toxicology and Pharmacology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT A rapid screening method for the quantitation and identification of 7 barbiturates in plasma is presented. The method employs solid-phase extraction at pH 3 using X-5 resin as adsorbent. Identification of each barbiturate is achieved by retention time and GC—MS. Detection threshold ($0.3 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in a 0.5 ml plasma sample and 1 μl injection volume), precision (RSD 3.46~6.41%), and linearity ($r > 0.99$) were satisfactory for blood level monitoring and clinical toxicological applications.

Key words Barbiturates; Solid-phase extraction; GC—FID; GC—MS