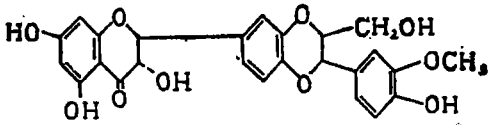


高效液相色谱法测定西列宾血药浓度方法的探讨

第三军医大学药理学系

祝丽君 戴富宝

西列宾系水飞蓟素中的主要成份。水飞蓟素中含有多种黄酮的混合物，西列宾约占总黄酮的49%左右，其结构如下：



水飞蓟素经药理实验及临床观察证明它有明显的降低血清胆固醇作用及降低肝脏脂质沉积作用。目前临床多用于慢性肝炎、降血脂和降胆固醇，有较好的疗效。有关西列宾在体内的定量分析国外未见报道，为了获得该药在体内药物代谢动力学的数据，使临床用药趋于合理化，需要有测定血药浓度的方法。本系精密仪器室与药理教研室合作，曾用高效液相色谱外标法进行了西列宾血浓度的测定。鉴于外标法重复性较差，为提高HPLC测定方法的准确性，本文首次报导采用内标法测定西列宾血浓度的方法。

实验部分

一、药品与试剂

西列宾标准品：本系药理教研室提供（纯度在98%以上）。

间一羟基联苯标准品：分析纯，上海试剂一厂

甲醇：分析纯

冰醋酸：分析纯，上海试剂一厂

水：去离子重蒸馏水

二、仪器与条件

美国PERKIN—ELMER系列3型高效液相色谱仪、LC—65T可变波长紫外检测器

Rheodyne 7215进样器

CDMC—IB型色谱微处理机

023型记录仪

不锈钢色谱柱（250mm×2.6mm）

不锈钢预柱（50×4.6mm 10）ODS（30~50μm）

固定相：Lichrosorb RP—18（10μm）
E. Merck

流动相：甲醇—水（4：6）（v/v）
含3% HAc（v/v）

流速：1.2ml/min 柱温：24℃

紫外检测波长：288nm

检测灵敏度：0.02AUF S，记录纸速度：15cm/HR

北京分析仪器厂：6751型液相色谱柱
高压匀浆填充机装柱。

三、标准液和样品液的制备

（1）西列宾标准液的配制：精密称取西列宾250mg于100ml容量瓶中，用甲醇溶解，定容（50μg/20μl），分别吸取此溶液将其稀释成浓度为0.5、1、2、4、8、16μg/20μl于10ml容量瓶中用甲醇稀释至刻度。

（2）间一羟基联苯（内标液）的配制：精密称取间一羟基联苯100mg置于100ml容量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度备用。

四、分析步骤

（1）装柱：取10μ ODS用四氯化碳—二氧六环（2：1）作为匀浆液，正己烷为顶替液，以400kg/cm²压力打入柱中，用联苯和萘测定柱效，理论塔板数为9935/m。

（2）标准曲线的绘制：取5μl间一羟基联苯甲醇液（内标）于6支10ml具塞

离心管中, 分别加入不同浓度的西列宾甲醇液 $20\mu\text{l}$, 再加入兔血浆 1ml 。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和水溶液 1ml , 乙醚 8ml , 康氏振荡器振摇 15分 , 3000转/分 离心 15分钟 , 分出醚层于水浴蒸干, 以 $50\mu\text{l}$ 甲醇溶解, 用HPLC分析, 微量进样品进样 $5\mu\text{l}$, 记录药物和内标的峰面积, 用它们的比值对西列宾的浓度作图, 得一标准曲线, 进行回归分

析。

五、分析方法的评价

(一) 标准曲线的线性关系

(1) 未经提取的标准曲线线性关系:

取含间一羟基联苯(内标) 0.2mg/ml 和西列宾 $0.1\sim 0.5\text{mg/ml}$ 的甲醇液 $5\mu\text{l}$ 进样, 间一羟基联苯的进样量为 $1\mu\text{g}$, 西列宾进样范围为 $0.5\sim 2.5\mu\text{g}$ 。线性数据见表1、图1:

表1 未经提取的西列宾标准曲线数据

进样量 (μg)	0.5	1	1.5	2.0	2.5
平均峰面积比 (A_s/A_i)	0.8128	1.5934	2.3664	3.2933	3.7834
CV (%) n = 3)	0.98	0.07	0.11	2.39	0.74

以峰面积比对进样量作图(图1), 回归方程为:

$$y = 8.1245x - 0.02215$$

$$\text{相关系数: } r = 0.9994$$

(2) 加血浆后经提取的标准曲线线性关系: 按HPLC标准曲线绘制项下的方法提取测定数据见表2。

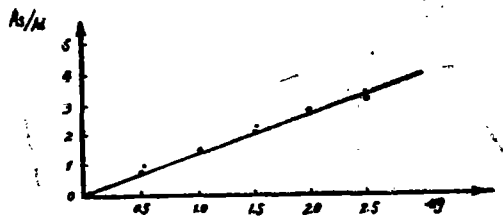


图1 西列宾标准曲线

表2 加血提取后的西列宾标准曲线数据

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0
平均峰面积比	0.2008	0.3648	0.5330	1.0348	2.3645	5.1721
CV (%) n = 3)	2.8	1.7	3.9	5.6	1.89	4.04

以峰面积比对西列宾血浆浓度作图(图2)。

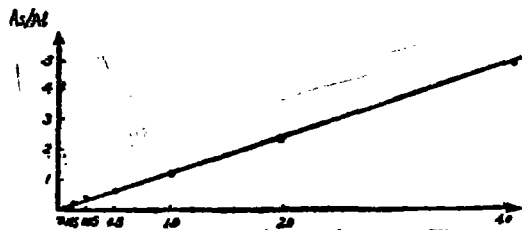


图2 西列宾血浆标准曲线

$$Y = 0.3216x - 0.0772$$

$$r = 0.9976$$

(二) 回收率测定

将含西列宾 $0.15, 0.30, 0.50, 0.90\mu\text{g}$ 甲

醇液于离心管中, 加血浆 1ml , 内标甲醇液 $5\mu\text{l}$, 按上法提取, 测得值与未经提取的测定值比较, 求得回收率见表3。

讨论

被测物西列宾在水飞蓟总黄酮中是以两种异构体形式共存的。加入兔血浆经提取后, 西列宾仍以两种异构体形式存在。因此, 计算时以两峰面积之和确定峰面积值。

在 100ml 流动相中, 改变水与醇液的体积比(4:6)或(5:5), 以(4:6)的比例分离效果最佳, 而水:甲醇(5:5)

表 3

西 列 宾 的 回 收 率

加 入 量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.15		0.30		0.50		0.90	
	测得值	回收率 (%)	测得值	回收率 (%)	测得值	回收率 (%)	测得值	回收率 (%)
1	0.130	86.67	0.248	82.67	0.437	87.40	0.781	86.78
2	0.134	89.33	0.256	85.33	0.445	89.00	0.750	83.33
3	0.129	86.00	0.242	80.67	0.436	87.20	0.772	85.78
平 均 值 (\bar{x})	0.131	87.33	0.249	82.89	0.439	87.87	0.768	85.30
CV (%)	1.9		2.3		0.92		1.69	

分离时,其峰面积有时是单峰,有时是双峰,重复性较差。

本法的内标曾选用 α -萘酚和间-羟基联苯。在柱效较高时, α -萘酚与西列宾能够分开且靠近,但当柱效降低后,彼此相互重叠,分离不好。改用间-羟基联苯做内标物与西列宾分离较好,又较靠近,故将间-羟基联苯做为内标物。

在上述试验条件下,兔空白血浆的某些杂质对西列宾的测定无干扰(图3)。



图 3 血浆中杂质

测定血浓度时,西列宾与血浆中的杂质

分离较好(见图4)。最低检测限为 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 血浆。

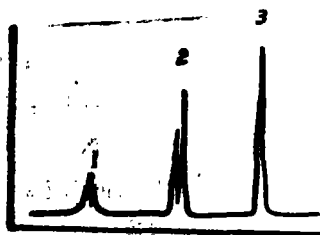


图4 ①—血浆中杂质;②—西列宾;③—内标
在一定范围内改变某些条件,如流速、压力、温度等,对西列宾血浓度的工作曲线无明显影响。因此本分析方法可达到药物动力学分析的要求。

参 考 文 献

- [1] G. Tittel et al: J. chromatogr, 135: 499, 1977
- [2] G. Tittel et al: J. chromatogr, 153: 277, 1978

新托品和催醒宁含量测定法研究

军事医学科学院毒物药物研究所 赵守孝 李 凌

新托品(benethtropine)为抗胆碱药,其抗胆碱作用比阿托品强1~10倍,外周作用与中枢作用相当,稳定性好⁽¹⁾。催醒宁[5-(1,3,3-trimethyl)-indoliny-1-N,N-dimethylcarbamate,缩写TID

C]为中枢可逆性胆碱脂酶抑制剂,是由纪庆娥等合成的⁽²⁻³⁾。该两药伍用,可以预防有机磷农药的中毒。催醒宁含量测定法已有报道⁽⁴⁾,但未见该药与新托品伍用时催醒宁的含量测定法。本文的目的是建立新托