# 技术方法

文章编号:1000-5404(2005)20-2086-02

## 高效液相色谱法测定人血浆中甲苯咪唑含量

## Determination of human plasma mebendazole by reverse-phase high performance liquid chromatography

何颖娜,尚京川,张晓萍,母昭德,景淑华,封家富 (重庆医科大学药物化学与生物材料研究室,重庆 400016)

**提 要: 目的** 建立固相萃取、反相高效液相色谱测定人血浆中甲苯咪唑的方法。**方法** 血浆加入阿苯哒唑为内标,以0.5 mol/L的硼砂-NaOH缓冲液3 ml碱化后经乙醚提取,固相萃取,进行HPLC测定,采用Hypersil BDS $C_{18}$(4.6 mm×200 mm 5 μm)色谱柱,流动相为甲醇-0.1 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$溶液(60∶40, V/V);流速1.0 ml/min;检测波长310 nm。**结果** 甲苯咪唑血药浓度为0.05~1.6 μg/ml,峰面积与血药浓度呈线性关系,方法平均回收率为97.21%。平均RSD为3.56%;最低检测限为0.02 μg/ml。**结论** 该方法符合生物样品分析要求,为甲苯咪唑的体内含量测定提供了一种简便、准确、灵敏度高的分析方法。

甲苯咪唑(mebendazole, MBZ)分子式为$C_{16}H_{13}N_3$-$O_3$,化学名称为(5-苯甲酰基-lH-苯并咪唑-2-基)氨基甲酸甲酯。为苯并咪唑类广谱抗蠕虫药物,对鞭虫、蛔虫、蛲虫、钩虫及绦虫(包虫病)均有良好的疗效。

目前,国内对生物样品中甲苯咪唑的含量测定的报道均为样品经液液提取,进行HPLC测定的分析方法[1,2],由于人血浆样品成分复杂,单纯使用液-液萃取,无法完全去除样品中内源性干扰物质,我们参考文献[1~4]建立了固相提取、反相高效液相法测定人血浆中MBZ的方法,报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器与试剂

美国Agilent 1100高效液相色谱仪,UV1100紫外检测器,Model TJ-R离心机(美国贝克曼公司)QL-901漩涡混匀器(江苏海门市琪琳医用仪器厂),固相萃取仪(重庆市长江化工厂),Bond-Elut $C_{18}$固相萃取小柱(Analytichem Internation公司)。

甲苯咪唑片剂、甲苯咪唑标准品(西安杨森制药公司),阿苯哒唑标准品(中美史克制药公司),甲醇(色谱纯,美国天地公司),所用硼砂、乙醚及其它试剂均为分析纯。

#### 1.2 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS $C_{18}$(4.6 mm×200 mm, 5 μm)(大连依力特公司);流动相:甲醇-0.1 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$(60∶40);流速:1.0 ml/min;检测波长:310 nm;柱温:35 ℃。

**作者简介**:何颖娜(1977-),女,河北省石家庄市人,硕士,助理工程师,主要从事药物分析方面的研究。电话:(023)68485808

**通讯作者**:尚京川,电话:(023)68485808

**收稿日期**:2004-09-15;**修回日期**:2005-02-05

#### 1.3 样品的收集与处理

健康男性受试者8名(年龄21~25岁,体质量54~75 kg,身高163~183 cm),于受试前晚起禁食12 h,禁水2 h,次日晨起(8:00)口服甲苯咪唑片剂(50 mg/片)4片,服药后2 h自由进水,服药后4 h和10 h统一进食标准餐。

取各受试者服药前及服药后不同时间的肘静脉血约4.0 ml,置肝素抗凝管内,离心后取血浆,-20 ℃冰箱内保存供血药浓度测定用。

#### 1.4 样品预处理及测定

取待测血浆1 ml精密加入内标物阿苯哒唑溶液(0.6 μg/ml) 50 μl、pH 10.5浓度为0.5 mol/L的硼砂-NaOH缓冲液3 ml,混匀,再加乙醚4 ml,漩涡振荡3 min,离心15 min(3 000 r/min)吸取上清液于另一试管中,50 ℃水浴挥干溶剂,残渣加入1 ml甲醇混匀1 min,溶解,再加水8 ml,混匀,上$C_{18}$固相萃取柱(固相萃取柱预先用6 ml甲醇、6 ml蒸馏水活化,再用5 ml pH 10.5浓度为0.05 mol/L的硼砂-NaOH缓冲液平衡),依次用15 ml蒸馏水、15 ml 15%甲醇冲洗,抽干,0.5 ml甲醇洗脱。收集洗脱液,混匀后吸取50 μl进行HPLC分析,记录色谱图、峰面积,以内标法定量。

#### 1.5 统计学处理

所有数据采用$\bar{x} \pm s$表示,使用SPSS 10.0进行数据处理,相关系数的假设检验采用$t$检验。

### 2 结果

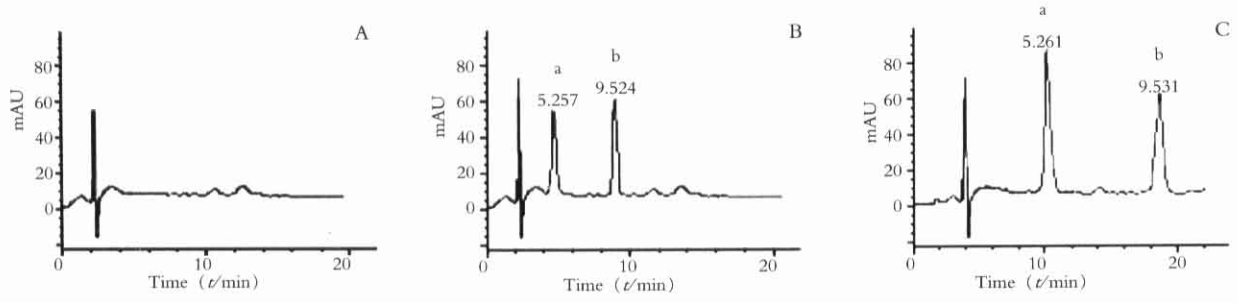
#### 2.1 方法的专属性

在本色谱条件下,血浆中甲苯咪唑、阿苯哒唑的色谱图(图1)表明血浆杂质对测定无影响。

#### 2.2 标准曲线的制备

精密吸取人空白血浆1 ml于10 ml试管中,分别加入用标准贮备液稀释的系列标准溶液50 μl,使其最终血浆浓度分别为0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.6 μg/ml,再加入阿苯哒唑溶液50 μl(0.6 μg/ml)作为内标,按"样品处理方法"操作,记录

色谱图、峰面积，以 MBZ 浓度 C(μg/ml)对 MBZ 与内标的积分面积比 $A_i/A_s$ 拟合线性回归。标准曲线为：$C = 1.893\ 3\ A_i/A_s - 0.122\ 8$，相关系数 $r = 0.999\ 2$($P < 0.05$)，最低检测限为 0.02 μg/ml（信噪比为 3∶1）。




A：空白血浆；B：空白血浆 + MBZ(a) + 内标(b)；C：血浆样品

**图 1　甲苯咪唑血浆浓度测定色谱图**

### 2.3　回收率和精密度

取空白血浆加入一定量的 MBZ 贮备液，使其血浆浓度分别为 0.05、0.4、1.6 μg/ml 按“样品处理方法”操作，根据峰面积比计算 MBZ 在血浆中的回收率，结果见表 1。日内误差和日间误差按回收率方法，对每个血浆样品分别在日内各做 5 次，并在连续 5 d 内分别各做 1 次，结果见表 2。

**表 1　回收率测定结果($n = 5$)**

| 加入量(μg/ml) | 测得量(μg/ml) | 回收率(%) |
|---|---|---|
| 0.050 | 0.048 | 96.00 |
| 0.40 | 0.39 | 97.50 |
| 1.60 | 1.57 | 98.13 |

**表 2　精密度测定结果($n = 5$)**

| 加入量 | 日内 | | 日间 | |
|---|---|---|---|---|
| (μg/ml) | $\bar{x} \pm s$ | RSD (%) | $\bar{x} \pm s$ | RSD (%) |
| 0.05 | $0.048 \pm 2.5 \times 10^{-3}$ | 5.21 | $0.048 \pm 3.6 \times 10^{-3}$ | 7.50 |
| 0.40 | $0.39 \pm 0.012$ | 3.08 | $0.38 \pm 0.017$ | 4.47 |
| 1.60 | $1.57 \pm 0.038$ | 2.42 | $1.56 \pm 0.064$ | 4.10 |

### 2.4　样品测定

采用本法测定健康受试者不同时间(0.5、1、3、5、7、9、12、16、24 h)血浆中的甲苯咪唑的含量，结果见表 3。

**表 3　血浆中甲苯咪唑的含量($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)**

| 时 间(h) | 血药浓度(ng/ml) |
|---|---|
| 0.5 | $20.3 \pm 2.15$ |
| 1 | $28.6 \pm 4.93$ |
| 3 | $60.8 \pm 10.82$ |
| 5 | $101.6 \pm 13.7$ |
| 7 | $160.2 \pm 15.9$ |
| 9 | $91.5 \pm 14.6$ |
| 12 | $74.9 \pm 8.16$ |
| 16 | $48.4 \pm 5.12$ |
| 24 | $20.9 \pm 3.54$ |

## 3　讨论

提取条件的选择　血浆样品成分复杂，单纯使用液-液萃取(LLE)无法完全去除内源性干扰物质，因此本实验结合使用固相萃取(SPE)，结果证明内源性的干扰物质明显减少，效果极佳。笔者分别选用乙醚、氯仿作为提取溶剂进行比较。其中氯仿层在下层，不易吸取。而乙醚位于上层，便于吸取，易挥发，内源性干扰物质少，样品提取完全，故选用乙醚为提取溶剂。

检测波长的选择以甲醇 - 0.1 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$ (60∶40)为溶剂，配制一定浓度的甲苯咪唑溶液，进行紫外扫描，甲苯咪唑在 247 nm 和 310 nm 处有两个吸收峰，文献[1,2]选用 247 nm 作为检测波长，但是在 247 nm 处测定时人血浆样品中的内源性干扰物质较多，甲苯咪唑与阿苯哒唑无法实现基线分离，而以 310 nm 作为检测波长，干扰较少，因此本研究选择 310 nm 作为检测波长。

**关键词**：甲苯咪唑；固相萃取(SPE)；反相高效液相色谱(RP-HPLC)；血浆样品

**中图法分类号**：R446.112　　**文献标识码**：B

**参考文献：**

[1] 王长虹，孙殿甲，苗爱东，等. O/W 型甲苯咪唑口服乳剂兔体内药物动力学研究[J]. 中国医院药学杂志，1999，19(10)：591 - 594.

[2] 李　岩，孙殿甲，苗爱东，等. 口服甲苯咪唑微丸的药物动力学及生物利用度[J]. 中国医院药学杂志，1999，19(11)：649 - 651.

[3] Steenbaar J G, Hajee C A, Haagsma N. High-performance liquid chromatographic determination of the anthelmintic mebendazole in eel muscle tissue[J]. J Chromatogr, 1993, 615(1): 186 - 190.

[4] Valois M E, Takayanagui O M, Bonato P S, *et al*. Determination of albendazole metabolites in plasma by HPLC[J]. J Anal Toxicol, 1994, 18(2): 86 - 90.

（编辑　龙　亮）