

## 생체시료로 부터 미량 디페닐히단토인의 고상추출에 사용될 흡착제의 특성

김경래# · 이경원 · 심원희

성균관대학교 약학대학

(Received January 31, 1992)

### Characterization of Adsorbents for the Solid-Phase Extraction of Trace Diphenylhydantoin from Biological Samples

Kyoung Rae Kim#, Kyoung Won Lee and Weon Hee Shim  
College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

**Abstract**—The sorption and desorption properties of four different solid adsorbents were evaluated for the trace enrichment of diphenylhydantoin from biological samples. Graphitized carbon black(GCB) gave the highest adsorption coefficient. And among the organic solvents examined, methanol gave the highest desorption coefficient. Using the GCB column, the optimum elution volume of the eluting solvent was evaluated from the breakthrough curve of diphenylhydantoin. The usefulness of GCB as the solid adsorbent was examined for the solid-phase extraction of diphenylhydantoin from serum in the concentration range of 20-50 µg/ml.

**Keywords** □ Solid-phase extraction, diphenylhydantoin, graphitized carbon black, adsorption coefficient.

Diphenylhydantoin(5,5-diphenyl-2,4-imidazolidinedione, Dilantin, Phenytoin, DPH)은 여러 가지 발작증세 중 대발작 및 정신운동성 발작에 유효한 전간치료제로 가장 널리 처방되며 종종 phenobarbital과 같은 barbitale 약물 및 다른 항전간제를 병용 투여한다.<sup>1,2)</sup>

DPH의 치료혈중 농도는 10~20 µg/ml이며 LD<sub>50</sub>은 mice에 정맥주사시 92 mg/kg<sup>3)</sup>이다. 부작용으로는 임신 중 최기형 발생작용이 있다고 보고되었으며<sup>4)</sup> 혈중 농도 20~40 µg/ml에서 치욕증식, 안구진탕증, 탈모 등이 유발되므로 장기간에 걸친 효과적인 전간치료 혹은 급성중독 진단을 신속히 하기 위해서는 DPH 혈중 농도의 신속정확한 측정은 매우 중요하다.<sup>5,6)</sup>

생체액 중의 DPH 미량분석에 대한 많은 연구가

보고되었으나<sup>7,8)</sup> DPH와 병용투여되는 barbitale, 여러 항전간제들 및 대사산물들의 동시 분석은 gas chromatography(GC)<sup>9-15)</sup>와 high performance liquid chromatography(HPLC)법<sup>15-22)</sup> 의해서 대부분 이루어지고 있다. HPLC법보다 감도, 분리능, 정밀성 등에 우수성을 갖는 GC법을 적용하여 좀 더 정밀하게 DPH를 분석하기 위해서는 DPH의 amide와 imide기를 적당한 휘발성 기능기로 먼저 전환한다. 본 실험에서는 수분에 매우 안정하여 GC 및 gas chromatography-mass spectrometry 분석 성질이 우수한 tert-butyltrimethylsilyl(TBDMS) 유도체화 반응조건을 최적화하여 보고한 바 있다.<sup>23)</sup>

생체시료 중 미량의 약물을 정확히 분석할 때는 여러 유기성, 무기성 방해물질을 제거하여 목적성분을 선택적으로 분리하고 사용할 분석기기의 검출한계 이상으로 오염없이 농축하는 과정이 선행된다. 이제

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

까지 보고된 대부분의 DPH 분석농축방법으로는 용매 추출법이 이용되었다.<sup>9-21)</sup> 일반적으로 용매 추출법은 여러 단계에 걸친 조작이 요구되고 사용되는 용매 자체의 불순물에 의한 오염 및 시료의 손실 등의 문제점이 있으므로 복합시료 중 미량의 유기성분들을 신속히 분리농축하기 위해서 조작이 간단한 고상 추출법(solid-phase extraction; SPE)<sup>24,25)</sup> 최근에 개발되어 용매 추출법을 대체하고 있다.

고상 추출법의 고흡착제로서는 극성이 적은 유기성 흡착제인 RP-C<sub>18</sub>, XAD-2, XAD-7이 주로 사용되며 무기성인 비극성 흡착제 graphitized carbon black(GCB)과 Thermosorb(TS)도 사용되고 있다.<sup>26,27)</sup> RP-C<sub>18</sub>를 사용한 DPH의 고상추출법이 보고되었으니<sup>22)</sup> 최적의 흡착제와 용출유기용매를 결정하기 위해서는 이용가능한 흡착제들의 흡착계수 및 탈착계수와 같은 기초적인 물리적성질 조사가 선행되어야 한다.

본 연구에서는 2개의 benzene ring 때문에 편극성이 큰 DPH에 대한 최적의 흡착제를 선정하기 위하여 수용액 중에서 DPH에 대한 GCB, XAD-2, XAD-7과 TS의 동적흡착계수를 측정하였다. 또한 흡착된 DPH에 대한 최적의 용출용매를 선정하기 위해서 DPH를 용해하는 유기용매의 탈착성질을 조사하였다.

### 실험방법

**재료 및 시약**—60/80 mesh 크기의 GCB로 사용된 Carbo-pack B, 16/50 mesh의 XAD-2, XAD-7(Supelco, U.S.A.)과 80/100 mesh의 TS(Union Carbide, U.S.A.) 4종류의 고흡착제를 본 실험에서 조사하였다. 각 흡착제들은 methanol, acetone, methylene chloride 순으로 세정한 후 (Soxhlet 장치 사용) 진공하에서 가열하여 활성화시켰다. Diphenylhydantoin(DPH)과 medazepam(MZ)은 각각 부광약품과 중근당으로 부터 제공되었다. Petroleum ether, methanol, methylene chloride, dimethylformamide(Junsei, Japan)는 특급시약이고 acetone, ethyl acetate(Hyasi, Japan)은 HPLC급 시약이었다. TBDMS 유도체화 시약은 N-Methyl-N-(tert-butyl-dimethylsilyl)trifluoroacetamide(MTBSTFA)는 Pierce(Rockford, IL, U.S.A.) 것을 사용하였다. 사용된 물은 2차 정제한(Milli Q water system, U.S.A.) 탈 이온수였다.

**약물용액과 혈청시료**—DPH를 methanol에 10 mg/ml의 농도가 되도록 용해하여 DPH 원액을 조제하였다. MZ를 10 mg/ml의 농도가 되도록 methanol에 용해하여 내부표준원액으로 사용하였다. DPH 원액을 첨가하여 20 ppm MZ를 함유한 5에서 50 ppm까지의 농도범위의 DPH 표준 methanol 용액을 조제하였다. 탈 이온수를 pH 4로 조정한 후 DPH 표준원액을 첨가하여 50 ppm의 DPH 표준수용액을 조제하였다. 혈청에 DPH가 10에서 50 ppm 농도가 되도록 DPH 원액을 첨가한 후 pH 4 물을 가해서 10배 희석한 혈청시료를 조제하였다.

**Tert-butyl-dimethylsilyl(TBDMS) 유도체화 반응**—TBDMS 유도체화 최적반응 조건에 따라<sup>24)</sup> dimethylformamide(DMF) 40  $\mu$ l, MTBSTFA 10  $\mu$ l를 첨가한 후 상온에서 혼화하여 유도체화하였다.

**GC 분석조건**—GC는 flame ionization detector가 부착된 Pye Unicam GCV를 사용하였다. Cross-linked methylsilicone HP-1 fused silica capillary column (13 $\times$ 0.2 mm I.D. d<sub>f</sub>: 0.2  $\mu$ m)을 고정상으로 nitrogen gas를 이동상으로 사용하였다. Column 온도는 200 $^{\circ}$ C (4 min)에서 분당 6 $^{\circ}$ C로 280 $^{\circ}$ C까지 상승시켜 10분간 유지하였고 주입시료량은 0.6  $\mu$ l(30:1 split mode), 검출기와 주입부 온도는 각각 320 $^{\circ}$ C, 280 $^{\circ}$ C이었다. MZ에 대한 DPH의 peak height ratio를 검량선의 값과 비교하여 모든 정량 계산을 하였다.

**동적흡착계수 측정(Dynamic Adsorption Coefficient, K<sub>A</sub>)**—GCB, XAD-2, XAD-7, TS의 그램 당 DPH에 대한 흡착력을 50 ppm, pH 4 표준수용액을 사용하여 조사하였다. 각 흡착제(200 mg)가 기밀하게 충전되어 있는 내경 4 mm의 polypropylene column (Supelco, U.S.A.)에 50 ppm 표준수용액(5 ml)을 통과시켜 얻은 여액 중 3 ml를 취해 내부표준물질인 MZ를 최종농도가 20 ppm되게 가한 후 ethyl acetate로 2회 추출한 추출액 2 ml를 질소 gas로 60 $^{\circ}$ C에서 휘발시킨 후 앞에서 기술한 방법에 따라서 TBDMS 유도체로 전환시킨 다음 0.6  $\mu$ l를 GC에 주입하였다. 흡착계수 K<sub>A</sub>는 다음 식에 의해 산출하였다.

$$K_A = \frac{C_S}{C_L} = \frac{\mu\text{g of DPH per g of solid phase}}{\mu\text{g of DPH per ml of water phase}}$$

**유기용매의 동적탈착계수 측정(Dynamic Desorption Coefficient, K<sub>D</sub>)**—50 ppm 표준수용액 5 ml를

200 mg의 column에 통과시켜 DPH를 GCB에 동적으로 흡착시킨 후 methanol, acetone, acetonitrile, 혹은 ethyl acetate 5 ml를 통과시켜 DPH를 탈착시켰다. 탈착액 3 ml를 취해 내부표준물질인 MZ를 최종농도가 20 ppm이 되게 가하고 60°C로 질소 gas 하에 휘발시킨 후 앞에서 기술한대로 유도체화한 뒤 GC로 분석하였다. 탈착계수  $K_D$ 는 다음식에 의해서 산출하였다.

$$K_D = \frac{C_L}{C_S} = \frac{\mu\text{g of DPH per ml of organic liquid}}{\mu\text{g of DPH per g of GCB}}$$

**Breakthrough Curve 및 Elution Curve 측정**—사용한 HPLC 기기는 U6K injector 6000A solvent delivery system과 440 absorbance detector가 부착된 Waters Assoc. Model ALC 200이었다. HPLC용 stainless steel column(5 cm×2 mm i.d.)에 75 mg의 GCB를 기밀하여 충전한 후 injector와 UV detector 사이에 직접 연결하고 methanol 혹은 물을 이동상으로 사용하여 UV 검출 파장 240 nm에서 DPH를 online monitoring하였다. 탈착계수가 가장 큰 methanol을 낮은 유속(0.5 ml/min)으로 GCB column내로 통과시키면서 50 ppm 표준수용액을 각각 50, 100, 250  $\mu$ l씩 주입하여 UV response(0.4 AUFS)를 측정하여 검량선을 측정하였다. GCB column을 pH 4 물로 평형시킨 후 50 ppm 표준수용액(100  $\mu$ l)을 주입하고 pH 4의 물을 20분간 통과시키면서 (3 ml/min) response(0.01 AUFS)를 측정하여 DPH breakthrough curve를 측정하였다. 이동상을 methanol로 바꾼 후 (0.5 ml/min) 흡착된 DPH가 GCB column으로부터 용출되는 elution curve(0.4 AUFS)를 측정하였다.

**혈청 중의 DPH 정량**—유리 column(2 mm i.d.)에 GCB(50 mg)를 기밀하게 충전하여 GCB 고상추출 column을 만들었다. 이것을 methanol, acetone, methylene chloride 순서로 세정하고 감압하에서 가열하여(IR lamp) 활성화시켰다. pH 4 물(2 ml)로 평형시킨 GCB 고상추출 column에 20에서 50 ppm 혈청 시료 1 ml를 loading시킨 후 pH 4 물(3 ml)을 통과시키고 탈수한 후 petroleum ether(3 ml)를 통과하고, 감압하에서 건조시켰다. Methanol(2 ml)를 통과시켜 얻은 용출액을 휘발 건조시키고 탈착계수 측정에서 기술한 절차에 따라 DPH를 정량하였다.

## 결과 및 고찰

본 실험의 TBDMS 유도체화 조건 및 GC 분석조건을 사용하여 10분 이내에 내부표준물질인 MZ과 DPH를 높은 분리능으로 분리할 수 있었으며 5에서 50 ppm 농도 범위에서 일직선의 검량선을 얻을 수 있었다.<sup>24)</sup>

널리 고상추출용 고형제로 사용되는 흡착제 중에서 pH의 영향을 받지 않는 XAD-2, XAD-7, GCB, TS를 선정하여 DPH에 대한 흡착력을 조사하였다. 약산성 DPH( $pK_a=8.3$ )의 이온화를 억제하기 위하여 표준수용액의 pH를 4로 조정하였다. 약물들의 일반적인 독성 혈중 농도보다 높은 50 ppm 농도에서 각 흡착제들의 동적흡착 계수  $K_A$ 값을 구하였다(Table I). 보편적으로 사용되고 있는 비극성 XAD-2와 중간극성의 XAD-7보다 GCB의 흡착력이 월등히 강함을 보여주고 있다. 그러나, 흑연 유사구조를 가진 비극성 TS의 흡착력은 예상외로 가장 낮았다. GCB는 흑연 유사구조의 다환성 비극성 흡착제로서 편극성이 큰 기능단을 가진 분자들에 대해서 선택적으로 친화성이 크다.<sup>27,28)</sup>

Benzene ring을 2개 가진 편극성이 큰 DPH에 대한 GCB의 흡착계수가 예상대로 10,000 이상의 가장 높은 값으로 이것은 99.8% 이상의 흡착효율에 해당한다. GCB는 완전한 무기물질이므로 용매에 전혀 용해되지 않고 극성용매나, 열, pH에 안정한 장점을 지니고 있다.

최적의 흡착제인 GCB로부터 DPH를 높은 회수율로 탈착시킬 수 있는 용출 용매를 선정하기 위하여 DPH를 용해하는 4가지 유기용매의 탈착계수를 동적

**Table 1**—Dynamic adsorption coefficients in solid adsorbent-water systems

Solid adsorbent	Adsorption coefficients ( $K_A$ )	Adsorption efficiency (%)
GCB	>10,000	>99.8
XAD-7	2,562.2±62.9	99.0
XAD-2	1,354.6±43.2	98.2
TS	128.2±5.3	84.7

Conditions: Solid adsorbents, 200 mg packed into columns(4 mm i.d.); DPH 250  $\mu$ g in pH 4.0 water(5 ml); gravity flow; n=4.

**Table II**—Dynamic desorption coefficients in GCB-Liquid systems

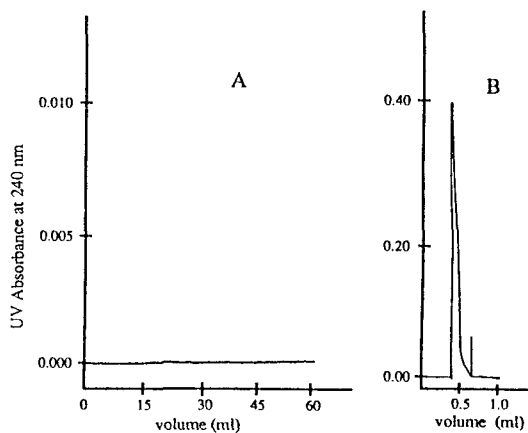
Liquid system	Desorption coefficients ( $K_d$ )	Desorption efficiency (%)
Methanol	$0.2232 \pm 0.0060$	84.8
Ethyl acetate	$0.0430 \pm 0.0058$	51.8
Acetonitrile	$0.0167 \pm 0.0009$	29.5
Aceton	$0.0065 \pm 0.0010$	14.0

Conditions: GCB, 200 mg packed into columns(4 mm i.d.); DPH 250  $\mu$ g in pH 4.0 water(5 ml); liquid solvent 5 ml; gravity flow; n=4.

탈착 조건하에서 조사하였다. Methanol, ethyl acetate, methylene chloride, acetone 순서로  $K_d$  값이 감소하는 경향을 보여주고 있다(Table II). 탈착계수가 클수록 용출 용매의 GCB로부터 약물의 회수율이 증가한다. 84.8%의 탈착효율에 해당하는 가장 높은 탈착계수를 가진 methanol을 최적의 용출 용매로 선정하였다. 용매의 용출용량을 5 ml 이상 증가시키면 탈착효율이 더 증가했을 것으로 사료된다.

선정된 GCB/methanol의 고상추출 흡착제/용매쌍을 혈액과 같은 복합생체시료에 적용할 때에는 DPH를 용출하기 전에 GCB 표면으로부터 시료의 대부분을 차지하는 수용성, 그리고 지용성 방해물질들을 제거해야 한다.<sup>26,27</sup> 흡착된 DPH가 GCB column에서 breakthrough되기 전까지 수용성 방해물질을 제거시키는 목적으로 통과 가능한 pH 4 물의 최대용량을 측정하기 위하여 DPH 표준수용액(100  $\mu$ l)을 주입한 후 통과되는 물을 20분간 on-line monitoring하여 breakthrough curve(Fig. 1A)를 구하였다. 60 ml의 물이 통과해도 GCB로부터 DPH가 breakthrough되지 않음을 보여주고 있다. 이것은 수용성 방해물질들을 제거하기 위해 pH 4의 물로 세정하는 동안 GCB에 DPH가 정량적으로 흡착되고 있음을 증명해 준다. 70 mg의 GCB column에서 5  $\mu$ g의 DPH의 breakthrough 용량이 60 ml 이상일 것으로 추산할 수 있다.

물이 통과되는 동안 GCB에 흡착되어 있는 DPH를 정량적으로 용출하는데 필요한 용출용매의 최소용량을 측정하여 GCB column의 흡착 및 탈착효율을 조사하기 위해서 methanol을 낮은 유속으로(0.5 ml/min) 통과시켰다. 얻어진 elution curve(Fig. 1B)는 methanol 1 ml 이내에 흡착된 DPH가 약간의 tai-



**Fig. 1**—Breakthrough curve(A) and methanol elution curve(B) for DPH.

**Table III**—Results of breakthrough studies on GCB column

	Passage of water	
	Without	After
Column efficiency (n)	89	139
Recovery (%)	NA	$99.5 \pm 1.5$
Elution volume (ml)	0.9	0.7

NA=not applicable

Conditions: GCB, 75 mg (5 cm $\times$ 2 mm i.d.); 50 ppm DPH, 100  $\mu$ l; methanol elution (0.5 ml/min); pH 4.0 water passage (3 ml/min); n=3.

ling을 보여주면서 용출되고 있음을 보여주고 있다.

GCB에 흡착된 DPH를 직접 methanol로 용출시킨 경우와 물을 통과시킨 후 용출시켰을 경우를 정량적으로 비교해 보았다(Table III). 후자의 경우에 오히려 GCB column efficiency가 1.6배 증가하고 99% 이상의 회수율을 내면서 methanol elution 용량이 감소함을 보여주고 있다. 이러한 결과는 DPH가 GCB column의 상단부분에 좁은 band 형으로 강하게 흡착되어 상당한 양의 물이 통과되는 동안에도 확산이 적게 일어나 band broadening이 적었다고 설명할 수 있다.

혈청 중의 수용성 단백질분들 염기성 유기물 기타 수용성 방해물질들을 제거시키기 위하여 pH 4 물로 세정한 후에는 지용성 유기방해물질을 제거하기 위해서 petroleum ether로 세정하였다. DPH가 첨가된 혈청 시료를(100  $\mu$ l) pH 4 물로 10배 희석한 후 GCB (50 mg) 고상추출 column에 loading시키고, pH 4 물

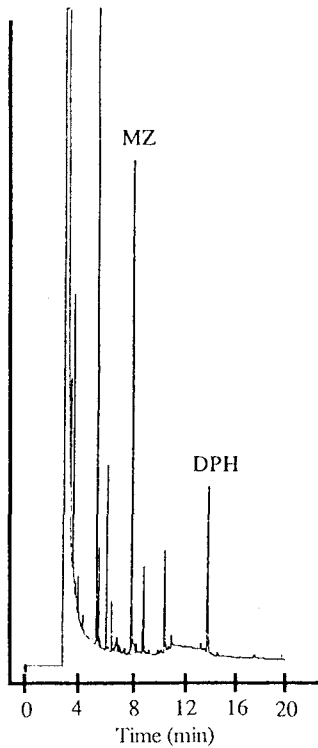


Fig. 2—Typical chromatogram of serum spiked with DPH.

Cross-linked methylsilicon HP-1 fused silica capillary column (13×0.2 mm i.d.); temperature programmed from 200°C (4 min) to 280°C at 6°C/min; 0.6 µl injected at split mode (30:1).

Table IV—Recoveries of known amounts of diphenylhydantoin added to human serum

Amount added (µg/ml)	Amount found (µg/ml)	Recovery (%)
20.0	15.0	75.0
30.0	24.0	80.0
40.0	32.2	80.4
50.0	40.3	80.6

Conditions: Serum, 100 µl diluted with pH 4.0 water (0.9 ml); GCB, 50 mg packed into glass columns (2 mm i.d.); methanol eluate, 1 ml; n=2.

(3 ml)과 petroleum ether (3 ml) 순서로 GCB를 세정한 후에 DPH를 methanol로 용출하였다. 용출시료를 분석하여 얻은 전형적인 chromatogram (Fig. 2)에서 GCB를 사용한 고상추출 전처리 방법이 혈청 중의 방해물질을 대부분 제거하며 선택적으로 DPH를 흡

착, 탈착하는데 효과적임을 보여주고 있다.

DPH를 20에서 50 ppm의 농도로 첨가한 혈청시료에 GCB/methanol 고상추출법을 적용하여 분석한 결과 75% 이상의 회수율을 얻었다 (Table IV). DPH 표준수용액에 적용했을 때보다 회수율이 떨어지는 것은 혈청 자체의 matrix effect 때문일 것으로 사료된다.

본 고상추출법은 20분 이내에 5단계에 걸쳐 적은 양의 생체시료를 전처리하여 DPH 분리 농축을 가능케하므로 기존의 용매추출법보다 훨씬 신속하며 간편하다.

결론적으로 본 연구에서 선정된 최적의 GCB/methanol 고상추출법이 미량의 생체시료로부터 신속히 DPH를 분리 농축하는데 효과적으로 사용될 수 있으며 또한 HPLC의 on-line 시료 전처리 precolumn으로서 확장되어 사용될 수 있으리라 기대된다.

#### 감사의 말씀

한국과학재단의 1988년도 기초연구비(과제번호 881-0204-005-2) 지원에 의해서 본 연구가 이루어졌으므로 감사드립니다.

#### 문헌

- 1) Richens, A. and Robin, A.(ed): *Drug Treatment of Epilepsy*, Henry Kimpton, London, pp. 61-76(1976).
- 2) Swinyard, E.A., Woodbury, D.M., Penry, J.K. Schmidt and Pippenger, C.E.(eds): *Antiepileptic Drugs*, Raven Press, New York, pp. 1-7(1982).
- 3) Richens, A. and Marks, V.(eds): *Therapeutic Drug Monitoring*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.
- 4) Wells, P.G., Harbison, R.D., Hassell, T.M., Johnston, M.C. and Dudley, K.H.(eds): *Phenytoin-Induced Teratology and Gingival Pathology*, Raven Press, New York, pp. 83(1980).
- 5) Porter, R.J., Woodbury, D.M., Penry, J.K. Schmidt and Pippenger, C.E.(eds): *Antiepileptic Drugs*, Raven Press, New York, p. 167-175(1982).
- 6) Gerson, B. and Anhalt, J.P.: *HPLC and Therapeutic Drug Monitoring*, Am. Soc. Clin. Pathol., Chicago, IL, (1980).

- 7) Horning, M.G. and Tsuji, K.(ed): *GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents*, M. Dekker, New York, pp. 477-518 (1978).
- 8) Kapetanovic, I.M.: Analysis of antiepileptic drugs. *J. Chromatogr.*, **531**, 421-457(1990).
- 9) Kumps, A. and Mardens, Y.: Improved gas-liquid chromatographic method for the simultaneous determination of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine and pyrimidine in biological fluids. *J. Chromatogr.*, **182**, 116-120(1980).
- 10) Sarhan, F., Ziegler, J.M., Nicolas, A. and Siest, G.: Rapid method for simultaneous determination of phenobarbital, diphenylhydantoin and their main hydroxylated metabolites by nitrogen selective gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **185**, 505-510(1980).
- 11) Bailey, Farmer, P.E., Hoskins, J.A., Lamb, J.H. and Peal, J.A.: Determination of plasma phenytoin by capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and with selective ion monitoring. *J. Chromatogr.*, **310**, 199-203(1984).
- 12) Shimada, K., Wakabayashi, H. and Sato, A.: Gas chromatographic determination of m- and p- hydroxyphenytoin in the urine of epileptic patients. *J. Chromatogr.*, **339**, 331-337(1985).
- 13) Rudenko, B.A., Lenchik, N.V. and Djabarov, D.N.: Gas chromatographic determination of nitrogen containing anticonvulsant drugs and opium alkaloids using a thermo-aerosol detector. *J. Chromatogr.*, **364**, 369-376(1986).
- 14) Inotsume, N., Higashi, A., Kinoshita, E., Matsnoka, T. and Nakano, M.: Rapid and sensitive determination of ethotoin as well as carbamazepine, phenobarbital, phenytoin and primidone in human serum. *J. Chromatogr.*, **383**, 166(1986).
- 15) Maurer, H.H.: Detection of anticonvulsants and their metabolites in urine within a general unknown analysis procedure using computerized gas chromatography-mass spectrometry. *Arch. Toxicol.*, **64**(7), 554-561(1990).
- 16) Dolan, J.W., Van der Wal, S.J., Bannister, S.J. and Snyder, L.R.: On-line liquid chromatographic analysis for drugs in serum with the technicon "Fast-LC" system: Performance data for theophylline and four commonly used anticonvulsants and their metabolites. *Clin. Chem.*, **126**(7), 871-880(1980).
- 17) Stout, S.A. and DeVane, C.L.: Tissue assay of phenobarbital, phenytoin and p-hydroxyphenytoin by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **285**, 500-508(1984).
- 18) Benjamin Gerson, Frances Bell and Sum Chan.: Antiepileptic agents-primidone, phenobarbital, phenytoin and carbamazepine by reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.*, **30**(1), 105-108 (1984).
- 19) Wed, N.: Simultaneous determination of eleven antiepileptic compounds in serum by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **305**, 127-133(1985).
- 20) Kushida, K. and Ishizaki, T.: Concurrent determination of valproic acid with other antiepileptic drugs by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **338**, 131-139(1985).
- 21) Lum, J.T., Vassanji, N.A. and Wells, P.G.: Analysis of the toxicologically relevant metabolites of phenytoin in biological samples by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **338**, 242-248(1985).
- 22) Juergens, U.: High performance liquid chromatographic determination of antiepileptic drugs by an advanced automated sample processor. *J. Chromatogr.*, **371**, 307-312(1986).
- 23) Kim, K.R., Lee, K.W. and Hong, J.K.: Simultaneous gas chromatography of barbiturates and diphenylhydantoin as tert-butyl-dimethylsilyl derivatives. Manuscript in preparation to be submitted to the *J. Chromatogr.*, 1992.
- 24) Yago, L.: Automated sample preparation using solvent extraction. *Int. Lab.*, **Nov/Dec**, 40(1985).
- 25) Dimson, P., Brocato, S. and Majors, R.E.: Automating solid phase extraction for HPLC sample preparation. *Amer. Lab.*, **Oct**, 82(1986).
- 26) Kim, K.R., Lee, Y.J. and Lee, H.S.: Solid-phase extraction of chloramphenicol with graphitized carbon black. *J. Chromatogr.*, **400**, 285(1987).
- 27) Kim, K.R. and Myoung, N.H.: Characterization of adsorbents as the solid matrices for the trace enrichment of drugs from biological samples: 1. Solid-phase extraction of flurazepam. *성균약학논문집*, **1**, 66-73(1989).