

· 研究报告 ·

反相高效液相色谱-柱前衍生法测定人血清中丙戊酸浓度

陈 碧, 黄晓亮, 李 辉 (湖南省郴州市第一医院药学部, 湖南 郴州 423000)

[摘要] 目的 建立人血清中丙戊酸浓度测定方法。方法 将血清酸化,用乙醚提取,以环己烷羧酸为内标, α -溴苯乙酮为衍生化试剂,采用高效液相色谱法测定。色谱柱: Eclipse Plus C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相: 甲醇-水(70:30),检测波长: 248 nm,流速: 1.0 ml/min。结果 血清中丙戊酸浓度线性范围为 8.65~173 μ g/ml,平均回收率>99.27%,日内和日间 RSD<5%。结论 本法快速、简便、准确,适合于临床血药浓度监测。

[关键词] 丙戊酸; 血药浓度; 衍生化; 高效液相色谱法

[中图分类号] R92

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)03-0255-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.016

Determination of valproate in serum by precolumn derivatization HPLC

CHEN Bi, HUANG Xiaoliang, LI Hui (Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a determination method for valproate in serum. **Methods** Serum sample was acidified by sulfuric acid and extracted with ethyl ether, cyclohexanecarboxylic acid was selected as an internal standard, α -bromoacetophenone as derivative reagent. Determination was performed with HPLC with methanol: water (70:30) as the mobile phase. The analytical column was Eclipse Plus C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μ m), detected at 248 nm, the flow rate was 1.0 ml/min. **Results** The linear range of valproate was 8.65~173 μ g/ml. The mean relative recovery was bigger than 99.27%. Both the relative standard deviation (RSD) of inter-day and intra-day was less than 5%. **Conclusions** The method is rapid, accurate, sensitive and suitable for clinical therapeutic drug monitoring.

[Key words] valproate; serum concentration; derivatization; HPLC

丙戊酸(valproate, VPA)是临床常用的一线广谱抗癫痫药,有效血药浓度范围为 50~100 μ g/ml。由于丙戊酸体内个体差异大,需对其血药浓度进行常规监测。目前测定方法多采用荧光偏振免疫法(FPIA)^[1]、气相色谱法(GC)^[2]。新近采用 HPLC 衍生法测定丙戊酸钠血药浓度的报道^[3~7]较多,但所采用的血样前处理方法、衍生化试剂、衍生条件及色谱条件各不相同。笔者将临床血样酸化后,选用乙醚萃取,以环己烷羧酸为内标, α -溴苯乙酮为衍生化试剂,建立了反相高效液相色谱法测定人血清中的 VPA 浓度,本法操作简单,结果稳定可靠,适合临床常规检测。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦有限公司);G1322A 在线脱气机,G1311A 四元泵,G1329A 自动进样器,G1316A 柱温箱,G1314A VWD 检测器(美国惠普安捷伦公司);80-2 台式离心机(上海医疗器械有限公司);XW-80A 旋涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂);电热恒温水浴锅(医疗器械五厂)。

1.2 试剂 丙戊酸镁对照品(江苏恒瑞医药有限公司,含量 99.8%); α -溴苯乙酮(Aladdin Chemistry Co. Ltd,含量 98%);环己烷羧酸(Aladdin Chemistry Co. Ltd,含量 99%);甲醇(国药集团化学试剂有限公司,色谱纯);水为自制蒸馏水;其他试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Eclipse Plus C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m);流速: 1.0 ml/min;柱

[作者简介] 陈 碧,本科,主任药师,研究方向:药物个体化给药方案及干预性研究。Tel: (0735)2379022; E-mail: chenbi4688@sina.com

[通讯作者] 黄晓亮,本科,主管药师,研究方向:体内药物浓度监测方法研究。E-mail: huangxiaoliang2009@163.com

温:30℃;流动相:甲醇-水(70:30,V/V);紫外检测波长:248 nm;进样体积:20 μl。

2.2 相关溶液的配制

2.2.1 丙戊酸标准溶液 精密称取丙戊酸镁对照品 74.55 mg 置 100 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得到 745.5 μg/ml 的丙戊酸镁对照品溶液,相当于丙戊酸标准溶液 692 μg/ml,置冰箱中冷藏保存。

2.2.2 内标溶液 精密称取环己烷羧酸 140 mg 置 100 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得到 1.4 mg/ml 的环己烷羧酸溶液,置冰箱中冷藏保存。

2.2.3 衍生化试剂 精密称取 α-溴苯乙酮 500 mg 置 50 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得到

10 mg/ml 的衍生化试剂溶液,置冰箱中冷藏保存。

2.3 样品处理与测定 精密吸取血清 200 μl,加内标溶液 15 μl,再加 0.1 mol/L 的硫酸 100 μl,摇匀,加乙醚 5 ml,涡旋振荡 3 min 后提取,3 000 r/min 离心 2 min,转移上清液至干净试管,加衍生化试剂 15 μl、三乙胺 10 μl,摇匀,置 50~55℃ 水浴中衍生化反应至自然挥干,丙戊酸及内标分别生成苯甲酰甲基丙戊酸、苯甲酰甲基环己烷羧酸。吸取流动相 [甲醇-水(70:30)] 200 μl 复溶,4 000 r/min 离心 2 min,转移上清液至进样瓶,取 20 μl 进样。在本实验条件下,空白血清、空白血清+丙戊酸标准溶液+内标溶液及患者血清+内标溶液进样后色谱图见图 1。

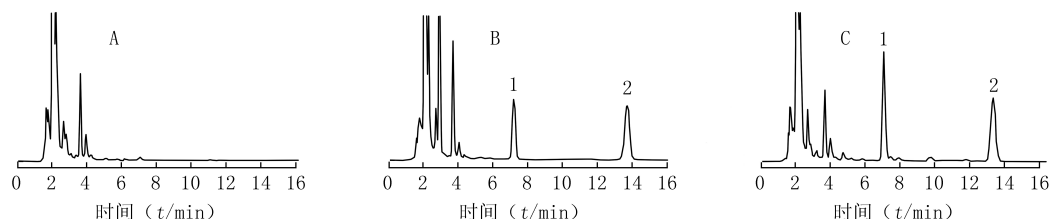


图 1 丙戊酸及内标衍生化后的 HPLC 色谱图

A. 空白血清样品;B. 空白血清+丙戊酸+内标;C. 患者血清+内标;1. 苯甲酰甲基环己烷羧酸;2. 苯甲酰甲基丙戊酸

2.4 标准曲线 取 200 μl 空白血清,精密加入 20 μl 不同浓度的 VPA 标准溶液,使其浓度分别为 8.65、17.3、34.6、69.2、138.4、173 μg/ml,按“2.3”项下方法进行操作。以 VPA 浓度 Y 对 VPA 衍生物峰面积与内标衍生物峰面积之比值 X 进行线性回归,得到 VPA 的回归方程为: $Y=79.6636 X+0.2344$, $r=0.9996$ 。丙戊酸在 8.65~173 μg/ml 范围内线性关系良好。标准曲线图见图 2。

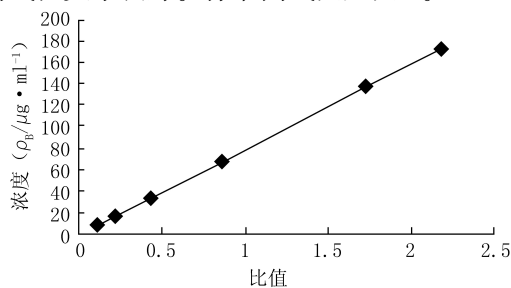


图 2 丙戊酸标准曲线图

2.5 回收率和精密度试验 新配制 VPA 低、中、高(24.6、73.8、147.6 μg/ml)3 个浓度的血清样品,按“2.3”项样品处理方法操作,利用线性回归方程测定其结果,计算其方法回收率。同一天内每个浓度测定 5 次,得日内 RSD。同法每天测低、中、高 3 个浓度的标准血清液各 1 份,连续测定 5 d,得日间 RSD。结果见表 1。

2.6 稳定性试验 配制 VPA 低、中、高(24.6、73.8、147.6 μg/ml)3 个浓度的血清样品各 8 份,置 2~8℃ 冰箱中冷藏保存,分别于 0、24、48、72、96、120、144、168 h 取出,自然恢复到室温后,按“2.3”项样品处理方法操作,测定样品浓度,RSD<5%,结果无显著性差异,说明血清样品在 2~8℃ 中放置 7 d,性质稳定,不影响血药浓度测定结果。

2.7 干扰试验

2.7.1 配制 500 μg/ml 的 α-溴苯乙酮衍生试剂在

表 1 丙戊酸回收率和精密度试验($n=5$)

样品浓度 ($\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	日内			日间		
	测定量 ($\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	回收率(%)	RSD(%)	测定量 ($\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	回收率(%)	RSD(%)
24.6	24.42±0.4	99.27	2.28	24.28±0.4	98.7	3.32
73.8	73.94±1.1	100.19	1.18	74.08±1.9	100.38	2.41
147.6	147.85±1.6	100.17	0.86	147.96±2.8	100.24	1.86

“2.1”项色谱条件下直接进样,保留时间在3 min前,对环己烷羧酸衍生物及丙戊酸衍生物的吸收峰无干扰,色谱图见图3。

2.7.2 取200 μl 空白血清,加入临床常用的抗癫痫一线药物:苯巴比妥(258 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、苯妥英钠(150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、卡马西平(80 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、地西洋(89.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)各20 μl ,混匀后,按“2.3”项样品处理方法操作,在“2.1”项色谱条件下进行测定,其色谱图见图4。结果表明,这些常用抗癫痫药物在丙戊酸衍生物及环己烷羧酸衍生物保留时间出峰处无吸收峰,对结果无干扰。

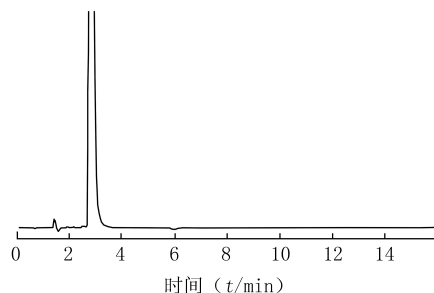


图3 α -溴苯乙酮 HPLC 色谱图

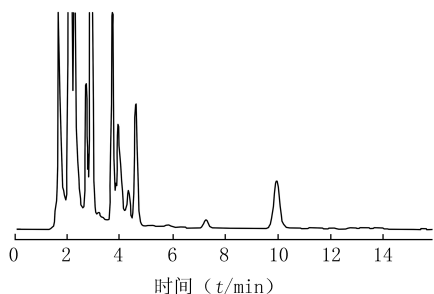


图4 干扰试验 HPLC 色谱图

3 讨论

3.1 柱前衍生物是关键 丙戊酸及环己烷羧酸分子结构中不含有紫外特征吸收基团,实验中将丙戊酸标准溶液和环己烷羧酸内标溶液直接进样,并未检测到吸收峰,因此,在样品处理时进行柱前衍生化形成具有紫外吸收基团的衍生物就成为本法的关键。本法采用 α -溴苯乙酮为衍生化试剂,在三乙胺的催化下,反应完全彻底,基线稳定,结果稳定可靠,完全可以满足 HPLC 法测定人血清中丙戊酸血药浓度的临床需要。

3.2 检测波长的确定 文献报道中检测波长有248 nm^[3]、262 nm^[4,7]和266 nm^[5],将“2.3”项中同一份制备液转移至进样瓶中,将 VWD 检测器检测波长分别设定为248、262、266 nm 依次进样,结果显示,当检测波长为248 nm 时丙戊酸及内标衍生物处均可获得更大的吸收峰。

3.3 提取溶剂的考察 文献报道从生物样品中萃取丙戊酸可选用二氯甲烷、正己烷等。经试验,二氯甲烷提取时位于下层,转移过程中易带入杂质,且沸点高、毒性大,挥干浓缩过程中对实验环境和条件要求高。正己烷比重低,涡旋震荡提取易产生乳化现象,且衍生化反应不完全,吸收峰面积较乙醚提取低,笔者选用乙醚提取,萃取回收率 $>60\%$,由于沸点低,可在55 $^{\circ}\text{C}$ 衍生反应时自然挥干,操作简便,无需使用氮吹仪。

3.4 衍生化条件的考察 实验对丙戊酸及环己烷羧酸衍生化条件:催化剂三乙胺的用量(5、10、20、30 μl)、水浴温度(40、55、70 $^{\circ}\text{C}$)、光照条件(室光、日光灯、避光)分别进行考察,结果表明:三乙胺用量10 μl 效果最佳。水浴温度40 $^{\circ}\text{C}$ 内标及对照品衍生物吸收峰略有拖尾,且衍生化不完全;55 $^{\circ}\text{C}$ 与70 $^{\circ}\text{C}$ 差异不大,但55 $^{\circ}\text{C}$ 吸收峰面积略高,相较于乙醚的低沸点,更适宜自然挥干。在避光、室光、日光灯3种光照条件下,吸收峰峰形及峰面积均相差不大,因此,光照对衍生化影响不大。

3.5 内标的重要性 由于本法相较于常规 HPLC 法多了一步柱前衍生化的过程,干扰因素急剧增大。在实际操作过程中,不同的患者之间,即使丙戊酸血药浓度非常接近,但平行操作后,丙戊酸衍生物的吸收峰峰面积可能会相差很大。因此必须加入环己烷羧酸做内标,以丙戊酸衍生物峰面积对环己烷羧酸衍生物峰面积的比值作为参考,以此消除衍生化反应以及样品处理过程中的误差。每隔半年验证一次标准曲线,每周进行一次标准一点法校正,结果基本相同,证明本方法稳定可行。

【参考文献】

- [1] 孙利伟,闫红月. 荧光偏振免疫法测定丙戊酸钠血清药物浓度[J]. 中国实用医药, 2010, 5(29): 127-128.
- [2] 汤方萍,王伟娇,李艳飞. 气相色谱法同时测定丙戊酸钠和托吡酯血药浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8): 674-675.
- [3] 杨春兰,方会慧,夏泉,等. 柱前衍生化-HPLC 法测定患者体内丙戊酸钠的血药浓度[J]. 安徽医药, 2011, 15(11): 1352-1354.
- [4] 阳波,李湘斌. 柱前衍生高效液相色谱法测定人血清中丙戊酸钠浓度[J]. 中南药学, 2006, 4(5): 360-362.
- [5] 李顺炜,毛名扬,李国忠. 改进的柱前衍生-高效液相色谱法测定人血中丙戊酸钠[J]. 中国医药药学杂志, 2005, 25(8): 713-714.
- [6] 郭丽萍,李霞. 高效液相色谱法测定人血清中丙戊酸钠浓度[J]. 中国药师, 2007, 10(7): 723-725.
- [7] 孙增先,张骞峰,周金玉,等. 柱前衍生-高效液相色谱法测定丙戊酸钠血药浓度[J]. 中国临床药学杂志, 2004, 13(2): 93-95.

【收稿日期】 2014-10-31 【修回日期】 2015-04-09

【本文编辑】 顾文华