

· 论 著 ·

柱前衍生-HPLC 法测定人血清中 丙戊酸钠的方法改进

费 燕, 林秀丽, 胡永狮, 张 荣

[摘要] 目的 建立快速柱前衍生-HPLC 法测定人血清中丙戊酸钠(VPA)。方法 选择对溴苯甲酰甲基溴为衍生化试剂, 壬酸为内标, Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 为分析柱; 流动相为乙腈-水 (75:25, V/V); 检测波长 254 nm; 流速 1.0 ml/min; 柱温 40 ℃。结果 VPA 的血清浓度在 25.0 ~ 250.0 mg/L 范围内线性关系良好 ($r = 0.9991$), 平均回收率为 $(100.43 \pm 0.73)\%$, 日内、日间 RSD 均 < 5%; 123 例服用 VPA 的癫痫患者应用本法监测, 有 53.7 % 的患者血药浓度在有效浓度范围之内, 46.3 % 的患者血药浓度低于或高于有效浓度。结论 本法快速、简便、准确, 适合临床常规监测 VPA 血清浓度需要。

[关键词] 高效液相色谱法; 丙戊酸钠; 柱前衍生

中图分类号: R971⁺.16; R917 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)05-0418-03

Improvement of precolumn derivatization HPLC assay method in determination of sodium valproate in human serum

FEI Yan, LIN Xiu-li, HU Yong-shi, ZHANG Rong. Department of Pharmacy, 175 Hospital of PLA / the Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China

[Abstract] **Objective** To establish a rapid analysis method for the determination of sodium valproate in serum by HPLC after precolumn derivatization. **Methods** *p*-bromophenacyl bromide was selected as derivative reagent. Nonanoic acid was used as an internal standard. The analytical column was Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-water (75:25, V/V). The detection wavelength was 254 nm and the flow rate was 1.0 ml/min, column temperature was 40℃. **Results** The linear calibration curve was obtained in the concentration range of 25.0 ~ 250.0 mg/L ($r = 0.9991$). The mean relative recovery was $(100.43 \pm 0.73)\%$. The relative standard deviation (RSD) of within day and between day were all less than 5%. The method was used for monitoring serum sodium valproate concentration of 123 epileptic patients, 53.7 % of the patients who had taken sodium valproate was found the serum concentration in effective level and 46.3 % lower or higher than effective level. **Conclusion** This method is found to be rapid, accurate, sensitive and more suitable for the determination of the concentration of sodium valproate in serum.

[Key words] HPLC; sodium valproate; precolumn derivatization

丙戊酸钠(sodium valproate, VPA)是临床常用的一线广谱抗癫痫药,可有效控制 90% 全身性癫痫的失神发作、肌阵挛发作和强直-阵挛性发作,并对单纯、复杂部分性发作及部分继发性大发作也有一定的疗效。该药主要经肝脏代谢,由于与血浆蛋白呈非线性结合,不同个体的药动学差异较大,剂量难以掌握,易致中毒,需对其血药浓度进行常规监测,

有效血药浓度为 50 ~ 100 mg/L。因 VPA 无紫外特征吸收峰,以往的测定多采用荧光偏振免疫法、气相色谱法、均相酶联免疫法、薄层色谱衍生法及散色免疫比浊法等方法^[1-3],近年来已有采用 HPLC 柱前衍生化法测定血药浓度的报道,但所用衍生化试剂、条件及效果各不相同。本研究在文献[4]的基础上对测定方法进行了改进,建立了一种以对溴苯甲酰甲基溴为衍生化试剂,壬酸为内标(internal standard, IS),操作简便而快速的测定人血清中 VPA 的 HPLC 方法。

作者简介: 费 燕(1980-),女,安徽当涂人,硕士,主管药师,从事药物分析和临床药学工作

作者单位: 363000 福建漳州,解放军 175 医院药剂科

1 材 料

- 1.1 仪器系统 高效液相色谱仪(美国 Waters),包括 510 泵,717 自动进样器,996 二极管阵列检测器;Milli-Q 纯水器(美国 Millipore);XW-80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);电子分析天平(岛津 AEG-120 g);TGL 16M 台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司)。
- 1.2 试剂 VPA 对照品(Sigma,批号:067K0761);对溴苯甲酰甲基溴(Fluka,批号:10861/1 32400);乙腈、甲醇(Tedia,色谱纯),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

- 2.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈(4.6 mm × 200 mm, 5 μm);柱温 40 ℃;流动相为乙腈-水(75:25, V/V);检测波长 254 nm;流速 1.0 ml/min;进样量 10 μl。
- 2.2 溶液的配制 精密称取 VPA 对照品 25 mg 于 25 ml 的量瓶中,用甲醇溶解至刻度,配成浓度为 1.0 g/L 的对照品工作液;取壬酸 20 μl 于 10 ml 的量瓶中,加乙腈定容,配成 2 μl/ml 的 IS 工作液;精密称取对溴苯甲酰甲基溴 500 mg 于 25 ml 量瓶中,加入三乙胺 30 μl 后用乙腈稀释至刻度得衍生化试剂,以上溶液均于 4℃ 冰箱中保存备用。
- 2.3 血清样品的处理 精密取血清样品 200 μl 于 1 ml Eppendorf 管中,加入 10 μl IS 溶液,混匀后,加入 pH 7.0 磷酸二氢钾缓冲液 50 μl,乙腈 300 μl,漩涡振荡 1 min,5000 r/min 离心 10 min,定量吸取上清液 200 μl,加入含有 50 μl 衍生化试剂的安瓿中,封口,于 70 ℃ 反应 20 min,冷却后取上清液 10 μl 进样分析。
- 2.4 检测波长选择 IS 及 VPA 衍生物色谱峰的扫描光谱图(200 ~ 400 nm)中两组分的吸收光谱基本相同,最大吸收波长均为 254 nm,故选择 254 nm 作为检测波长。
- 2.5 标准曲线的制备 取空白血清 200 μl 置于 1 ml Eppendorf 管中,精密量取不同浓度、相同体积的 VPA 对照品溶液 10 μl,再分别加入 10 μl IS 液,按

- “血清样品的处理”项下操作,经 HPLC 分析,记录色谱图,测得 VPA 峰面积 A₁ 与 IS 峰面积 A₂,计算峰面积比 A₁/A₂。以血清浓度 C(mg/L)与峰面积比经最小二乘法线性回归,得标准曲线方程: $C = 60.183 A_1/A_2 - 4.9431$, $r = 0.9991$,线性范围为 25.0 ~ 250.0 mg/L,表明线性关系良好。当信噪比(S/N) = 3 时,VPA 的最低检测限可达到 5.0 mg/L。
- 2.6 分离度与专属性 按上述色谱条件对空白血清、VPA 标准品血清以及患者血清样品进行色谱分析,色谱图可见 VPA 与 IS 峰,无明显的内生杂质峰干扰,两者的保留时间分别为 8.07、10.82 min。临床常用的配伍药物,如苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平、地西洋、氯硝西洋等,对本检测均无干扰。
- 2.7 回收率及精密度实验 配制低、中、高 3 个浓度(50.0、75.0、150.0 mg/L)的含药血清样品各 5 份,分别于当日和连续 5 d 内测定,计算方法回收率及日内、日间精密度,结果见表 1。该方法重现性好,结果稳定,符合生物样品分析要求,可作为常规检测方法。
- 2.8 冻融实验 配制已知浓度的血清样品各 3 份,置冰箱冷冻室中,冻融 2 次,冻融时间间隔 24 h,于冻融前、冻融后分别取样 200 μl,按“2.3”项下操作,测定样品浓度,结果显示,冻融 2 次,浓度无显著性差异。
- 2.9 临床应用 采用本研究建立的方法为 123 例癫痫患者进行 VPA 的血药浓度监测,测定的最大血药浓度达 138.46 mg/L,最小为 26.53 mg/L,平均值为 (67.91 ± 24.81) mg/L;其中在治疗窗之内 66 例,占 53.7%;低于治疗窗 50 例,高于治疗窗 7 例,共占 46.3%。
- 3 讨 论
- 和国内文献报道的其他 HPLC 方法相比较^[5-7],本研究选用对溴苯甲酰甲基溴为衍生化试剂,在三乙胺催化下反应完全,实验条件更温和,同时,由于 VPA 为挥发性药物,在氮气流下易挥发,当水浴温度高,时间长的情况下,对测定结果产生影响,本研究所采取的封闭式衍生化条件,无须氮气吹干,有效解决这一问题,实验步骤更为简化,干扰(下转第 426 页)

表 1 VPA 回收率及精密度实验(n = 5)

加入量(mg/L)	日内			日间	
	测定量(mg/L)	回收率(%)	RSD(%)	测定量(mg/L)	RSD(%)
50	50.48 ± 1.73	100.95	3.43	50.65 ± 2.14	4.22
75	74.70 ± 1.42	99.60	1.90	75.94 ± 2.79	3.67
150	151.11 ± 2.04	100.74	1.35	146.54 ± 3.61	2.46

导致根折^[6]。百齿可双锥度纤维桩由单一方向、预先拉直的纤维包埋在还氧树脂基质中构成,这种设计均匀分散应力,使桩的抗挠曲强度高达 500 GPa,接近金属桩,而弹性模量和牙本质很接近,这种低弹性模量可将应力消散,且百齿可双锥度纤维桩可以通过树脂粘结剂与牙本质之间达到很强的粘结效果,形成一个近似同质性的结构^[7],从而使应力沿牙根均匀分布,降低了牙齿根折的风险。这与本研究结果基本一致,观察组使用百齿可双锥度纤维桩核无一例根折,对照组纯钛桩核出现了 4 例根折。因其结构特性,纤维桩极少折裂,即使折断也为牙颈部桩与核之间的折裂,且纤维桩折裂后易于用专用去桩钻取出,有再行修复的机会。因其生物特性,百齿可双锥度纤维桩核不影响影像学检查,且纤维桩与复合树脂粘接性好,使用树脂材料形成桩核,操作简便,极大地缩短了临床操作时间,方便了患者。另外,百齿可双锥度纤维桩核颜色与牙体组织接近,若与全瓷冠结合修复前牙,能达到极佳的美容效果。总之,与传统的铸造金属材料相比,石英纤维桩的强度、硬度、美学性能、抗腐蚀、抗疲劳性能、生物相容性及操作便捷性均较优越^[8]。

【参考文献】

- [1] 赵铁民. 口腔修复学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:90-106.
- [2] Ricketts DN, Tait CM, Higgins AJ. Post and core systems, refinements to tooth preparation and cementation[J]. Br Dent J, 2005, 198(9):533-541.
- [3] McLaren JD, McLaren CI, Yaman P, et al. The effect of post type and length on the fracture resistance of endodontically treated teeth[J]. J Prosthet Dent, 2009, 101(3):174-182.
- [4] Peroz I, Blankenstein F, Lange KP, et al. Restoring endodontically treated teeth with posts and cores: a review[J]. Quintessence Int, 2005, 36(9):737-746.
- [5] Zimmer S, Gohlich Q, Ruttermann S, et al. Long-term survival of Cerec restorations: a 10-year study[J]. Oper Dent, 2008, 33(5):484-487.
- [6] 吴红霞, 吴友农, 陈培生. 纤维桩外形和深度对牙根应力分布影响的三维有限元分析[J]. 口腔医学研究, 2004, 20(4):382-385.
- [7] Monticelli F, Goracci C, Ferrai M. Micromorphology of the fiber postresin core unit: a scanning electron microscopy evaluation[J]. Dent mater, 2004, 20(2):176-183.
- [8] 王春风, 吴占放, 吴 纲, 等. 玻璃纤维桩修复下颌前磨牙残根、残冠的临床疗效[J]. 东南国防医药, 2010, 12(3):209-211.

(收稿日期:2010-06-26;修回日期:2010-07-23)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)

(上接第 419 页)因素少,保证了结果的准确性与重现性。与文献[4]比较,本研究采用了乙腈与水的二元流动相系统,未使用缓冲液等盐类物质,更有利于保护色谱柱,延长色谱柱的使用寿命。本方法所需样品量少,样品处理简单、快速,方法灵敏、回收率高、线性范围广,适用于临床上 VPA 的血药浓度监测及 VPA 的药动学研究,同时也为测定血清样品中其他小分子脂肪酸提供了参考。

VPA 是临床常规抗癫痫药物,常联合用药,产生药物间相互作用,如卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥可使 VPA 代谢加快,血药浓度降低;当与苯妥英钠、卡马西平合用时还可增加肝脏的毒性^[8]。此外,患者在使用过程中因疗效不佳而盲目增加剂量,也容易引起不良反应,如白细胞减少、脱发、共济失调、嗜睡等,因此需加强对 VPA 的血药浓度监测以达到疗效最高而不良反应最少的临床效果。采用本法监测的结果与临床观察完全吻合:治疗窗之内的患者,控制癫痫发作的效果较好,发作次数减少,发作间隔延长,症状减轻;低于治疗窗,疗效较差,高于治疗窗,疗效尚可,个别患者出现肝功出现异常、震颤等不良反应。该方法可用于 VPA 的常规监测,为

临床正确诊断并及时治疗提供了有力的参考依据。

【参考文献】

- [1] 王兰君, 李国兴, 张爱霞. 癫痫患者丙戊酸钠血药浓度监测及个体化给药[J]. 中国医院用药评价与分析, 2007, 7(3):201-202.
- [2] 陈邦元, 郭贵宾, 丁 妍, 等. HPLC 法测定止咳平喘片中氨茶碱的含量[J]. 东南国防医药, 2007, 9(4):267-269.
- [3] 金 燕. 散射免疫比浊抑制法检测卡马西平、丙戊酸浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(9):519-520.
- [4] 胡永狮, 吴 平, 黄惠丽. 衍生化法测定癫痫患儿血清中丙戊酸的浓度[J]. 华西药学杂志, 2001, 16(6):434-436.
- [5] 何汉军. 高效液相色谱法测定人血清中丙戊酸钠浓度[J]. 南华大学学报:医学版, 2007, 35(4):604-605.
- [6] 崔一民, 孙培红, 刘玉旺, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定人血清中丙戊酸钠浓度[J]. 中国药房, 2005, 16(4):286-288.
- [7] 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.
- [8] 陈光辉. 难治性癫痫的原因及药物治疗策略[J]. 东南国防医药, 2003, 6(5):469-474.

(收稿日期:2010-03-08;修回日期:2010-04-18)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)