

快速柱前衍生-高效液相色谱法测定丙戊酸血药浓度

石苏英, 沈建幸(浙江省诸暨市人民医院临床药学室, 浙江 诸暨 311800)

摘要:目的 建立一种简便可行的快速柱前衍生-高效液相色谱法(HPLC)测定丙戊酸血药浓度。方法 患者血清经正己烷提取后在 C_{18} 柱上分析, 流动相为甲醇-水(75:25), 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 254 nm , 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。结果 丙戊酸在 $12.5\sim 400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 日内和日间 RSD 均小于 10% ($n=5$)。结论 本法简便、稳定, 用于丙戊酸的药浓度监测, 效果良好。

关键词: 丙戊酸; 高效液相色谱法; 血药浓度监测

作者简介: 石苏英, 女, 主管药师

Determination of Serum Valproic Acid Concentration by HPLC after Precolumn Derivatization

SHI Su-ying, SHEN Jian-xing (Department of Clinical Pharmacy, The Zhuji People's Hospital of Zhejiang Province, Zhuji 311800, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To Determine serum valproic acid concentration by HPLC. **METHODS** Serum sample was extracted with n-Hexane and analyzed on a C₁₈ column, The mobile phase consisted of methanol: deionized water(75:25), at a temperature of 30 °C. The compound was quantified by UV absorbance at a wavelength of 254 nm with a flow rate of 1 mL · min⁻¹. **RESULTS** The calibration curve of valproic acid in serum was linear in the range of 12.5 ~ 400 μg · mL⁻¹. The overall precision expressed as RSD(n = 5) was less than 10% for intra-day and inter-day. **CONCLUSION** This method was shown to be simple, convenient, reliable and suitable for monitoring the blood concentrations of valproic acid.

KEY WORDS: valproic acid; HPLC; blood concentration monitoring

抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)的有效血药浓度范围狭窄,个体差异大,不同厂家产品存在生物利用度上的差异,而其血药浓度与疗效和毒性密切相关,因此在治疗过程中需常规监测其血药浓度^[1]。丙戊酸(valproic acid, VPA)是一种广谱的 AEDs,是治疗失神性发作、全身强直-阵挛性发作、肌阵挛性发作的首选药物,因 VPA 无紫外特征吸收峰,目前测定 VPA 血药浓度的方法主要有荧光偏振免疫分析(FPIA)法和柱前衍生-高效液相色谱(HPLC)法,但 FPIA 法仪器昂贵,试剂盒效期短,成本高,基层医院难以推广。笔者建立了一种简便可行的柱前衍生-高效液相色谱法测定 VPA 的血药浓度。

1 材料与与方法

1.1 仪器

Agilent-1100 高效液相色谱仪; G1322A 在线脱气机, G1311A 泵, G1315B 阵列二极管检测器, G1328B 手动进样器, Agilent-1100 色谱工作站(以上均为美国安捷伦公司产品); AT-130 柱温箱(天津市金洲科学仪器有限公司); 台式离心机(上海手术器械厂); 旋涡振荡器(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 试剂与药品

VPA 对照品(批号: s07659-074, 由杭州华东医药公司提供); 甲醇为色谱纯; 水为重蒸馏水; 其余试剂均为分析纯。

1.3 标准溶液的配制

精密称取 VPA 对照品 50 mg 至 50 mL 棕色量瓶中, 用乙醇稀释成 1 mg · mL⁻¹, 临用前 1 倍稀释。精密称取 2-溴-对硝基苯乙酮对照品 50 mg 至 50 mL 棕色量瓶中, 用甲醇稀释成 1 mg · mL⁻¹, 避光保存。精密称取环己烷羧酸对照品 50 mg 至 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释成 1 mg · mL⁻¹, 临用前 5 倍稀释作为内标。

1.4 色谱条件

固定相: ZORBAX XDB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)(美国安捷伦公司), 柱温: 30 °C; 流动相: 甲醇-水(75:25); 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 254 nm。

1.5 样品处理

取血清 100 μL, 加内标储备液 50 μL, 硫酸(1 mol)100 μL, 用手摇匀, 加正己烷 2 mL, 旋涡振荡 2 min, 5 000 r · min⁻¹ 离心 5 min, 取上层有机相 1 mL, 加三乙胺 10 μL, 衍生化试剂 2-溴-对硝基苯乙酮 50 μL, 振荡混匀, 50 °C 水浴 15 min, 用 N₂ 吹干。用流动相 150 μL 溶解残余物(振荡 1 min), 取 50 μL 进样分析。

2 结果

2.1 色谱行为

在所选色谱条件下, VPA 能较好分离, 血清杂质对测定无干扰。

2.2 标准曲线

取空白血清 1950 μL, 加入 VPA 储备溶液 50 μL, 配成相当于血中 VPA 浓度为 12.5 μg · mL⁻¹ 的标准溶液, 以此类推, 再配成 VPA 浓度为 25, 50, 100, 200, 400 μg · mL⁻¹ 的标准溶液, 按“样品处理”项下操作, 内标法定量, 环己烷羧酸为内标, 以对照品峰面积与内标峰面积比值(Y)对浓度(C)进行线性回归, VPA 的线性方程分别为: Y = 0.0132C - 0.1071, r = 0.999 6 表明线性关系良好。以样品信号为噪声 3 倍作为最小可检测信号, VPA 最低检测限为 0.2 μg · mL⁻¹。

2.3 方法回收率和精密度

准确配制 VPA 浓度为 25, 100, 400 μg · mL⁻¹ 的含药血清, 按“1.5”项下操作, 测定血药浓度, 计算回收率。分别 1 至 5 d 内测定血药浓度, 计算日内和日间差异, 见表 1。

表 1 VPA 血样回收率及精密度(n = 5)

Tab 1 Recoveries and precisions for VAP in human serum(n = 5)

药物	浓度 /μg · mL ⁻¹	平均相对回收率 /(% ± SD)	RSD/%	
			日内	日间
VPA	25	98.3 ± 2.12	3.8	3.9
	100	97.5 ± 1.51	2.3	4.6
	400	99.2 ± 1.33	4.5	3.6

2.4 提取回收率

本法采取一次萃取,根据 VPA 的血药浓度有效范围,分别在 25,100 和 400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行提取回收率试验,平均绝对回收率分别为 83.0%,86.3%,85.2%。

2.5 稳定性试验

2.5.1 对照品衍生物稳定性试验 25,100,400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质控血清,经“1.5”项下进行处理后,在 0,16,24 h 进行测定,结果各浓度的 RSD 分别为 3.1%,4.3%,4.1%,表明对照品衍生物稳定性良好。

2.5.2 冻融试验 25,100,400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质控血清,按“1.5”项下进行处理后即时测定;再 -20°C 冷冻保存 48 h,室温下解冻后测定,如此连续 3 次,结果各浓度的 RSD 分别为 5.1%,4.6%,4.9%,表明对照品经过冻融后稳定性良好。

3 干扰试验

取癫痫患者(正在服用卡马西平、丙戊酸钠及托吡酯)的血清,加入苯巴比妥、苯妥英钠后,经“1.5”项下进行处理后,进行测定,在所选色谱条件下,VPA 能较好分离,血清杂质及卡马西平、苯巴比妥、苯妥英钠、托吡酯对测定无干扰。

4 讨论

4.1 文献^[2]报道,采用正己烷提取,蒸干速度慢,提取率与

正戊烷相当。在本研究中,作者发现用正戊烷提取时,挥发较快,同时测定结果差异也较大,考虑是衍生化不完全所致,故选择正己烷,在应用正己烷过程中,灵敏度、正确性、精密性、线性范围均能较好满足测定要求。

4.2 在摸索条件时发现,流动相的比例十分关键,甲醇含量超出 1%,VPA 就可能峰形不佳。

4.3 临床治疗癫痫时,苯巴比妥、苯妥英钠、卡马西平、托吡酯和 VPA 是常用药物,在本法测定中,进行了干扰试验,结果 VPA 出峰清晰,未见干扰。因此,用高效液相色谱法不失为一种理想的测定方法。

参考文献

- [1] ZHAO H C, LI Y. Practical Theroputical Drug monitor Handbook (实用治疗药物监测手册)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:4.
- [2] XU J M. Determination of serum valproic acid concentration by HPLC after precolumn derivatization[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志),2004,19(5):199.

收稿日期:2007-03-26