

# 血浆中羟乙膦酸钠含量测定方法研究

邵 青 李士敏 郑 琦 曾 苏

(浙江医科大学药学系分析中心, 杭州 310031)

**摘要** 利用羟乙膦酸 (EHD P)与磷酸钙形成共沉淀收集血浆中羟乙膦酸钠, 再使无机磷形成不溶性三乙胺磷钼酸络合物而除去。采用高氯酸解离 EHD P的 P-C-P 键使转化为无机磷, 钼蓝乙酸丁酯萃取比色法测定释放的无机磷。结果表明: 方法平均回收率为  $(102.97 \pm 4.93)\%$ ,  $n=5$ , 精密度试验 RSD 为 3.21%,  $n=7$ , 线性范围为  $0.516 \sim 15.48 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $r=0.9992$ )。

**关键词** 羟乙膦酸钠; 分析方法; 血药浓度

随着人口的老龄化, 骨质疏松症引起的各种骨折日趋增多, 羟乙膦酸钠能抑制破骨细胞功能而不降低骨细胞的活性, 作用很强, 是防治骨松症很有前途的药物<sup>[1]</sup>。目前, 国外报道的血药浓度测试方法多采用同位素标记法<sup>[2,3]</sup>, 国内尚未见报道。我们参考 Bisaz 报道的方法<sup>[3]</sup>利用羟乙膦酸能与磷酸钙形成共沉淀收集血浆中羟乙膦酸钠, 并使血浆中无机磷形成水不溶性三乙胺磷钼酸络合物, 以除去无机磷的干扰, 然后采用高氯酸高温酸解的方法解离 EHD P的 P-C-P 键, 使转化为无机磷, 并用钼蓝乙酸丁酯萃取比色法<sup>[4,5]</sup>测定其含量。方法灵敏 稳定 重现性好, 可用于血浆中羟乙膦酸钠含量的测定。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

日立 U-2000型紫外分光光度计 (日本日立); 80-1型离心机 (上海手术器械厂生产); WH-90A型微型混合器 (上海亚荣生化仪器厂生产)。

### 1.2 试剂

羟乙膦酸钠标准溶液: 精密称取羟乙膦酸钠约 25 mg, 加水溶解, 并于 100 ml 量瓶中定容 (含量为  $258 \mu\text{g}/\text{ml}$ )。

**钼锑贮存液:** 取分析纯浓硫酸 90.5 ml, 缓缓加入水约 200 ml 中, 搅匀, 冷却。另称取钼酸铵 25.0 g 溶于上述硫酸液中, 再加 0.4% 酒石酸锑钾液 100 ml, 冷却后用水稀释至 500 ml, 摆匀, 贮于棕色瓶中, 冰箱保存。

**钼锑抗混合显色液:** 准确量取钼锑贮存液 100 ml, 加入抗坏血酸 0.50 g 溶解即可。该显色液保存时间为 24 h, 宜用前配制。

其他试剂均为分析纯。

## 2 方 法

### 2.1 标准曲线制备

分别精密量取羟乙膦酸钠标准溶液 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60  $\mu\text{l}$  于 10 ml 离心管中, 加入高氯酸 0.4 ml, 190°C 油浴 15 min, 冷却, 将酸解液定量移至 50 ml 量瓶中, 加 25% 氢氧化钠液 0.74 ml 中和, 加入酚酞指示剂 1 滴, 用 0.2 mol/L 硫酸液调至红色褪去, 精密加入钼锑抗混合显色液 4.7 ml 及乙酸丁酯 3.0 ml, 加水定容至 50 ml, 混匀, 于 35°C 水浴 10 min, 取出, 振摇 1 min, 静置 1 h 后, 以 0  $\mu\text{l}$  为空白液, 在 642 nm 波长处测定吸收度, 以浓度  $C(\mu\text{g}/\text{ml})$  对吸收度  $A$ , 求得其标准曲线的线性回归方程为:  $A = 0.05357C - 0.00194$  ( $r=0.9992$ )。

## 2.2 血样分析方法

取血浆 1.0 ml, 加 1% 三氯醋酸液 3.0 ml, 混匀, 于离心机中离心, 倾取上清液, 加 2.5 mol/L 氯化钙液 50 μl, 滴加 2% 氢氧化钠液至溶液刚产生沉淀, 离心, 弃去上清液, 沉淀加 1 mol/L 盐酸液 1.0 ml 溶解, 加 5% 铬酸铵液 0.6 ml 及 1% 三乙胺液 0.45 ml, 冰浴放置 10 min, 离心, 上清液过滤, 滤液加 2.5 mol/L 氯化钙液 50 μl, 滴加 2% 氢氧化钠液至产生沉淀, 离心, 弃去上清液, 沉淀加 0.4 ml 高氯酸溶解, 按标准曲线制备项下的方法操作并测定吸收值, 用标准曲线回归方程计算羟乙膦酸钠的含量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 最大吸收波长的确定

以空白试剂制得的乙酸丁酯萃取液为参考, 按标准曲线法得到的乙酸丁酯样品萃取液在 U-2000 紫外分光光度计上扫描, 得一扫描光谱图, 如图 1 所示, 在 642 nm, 720 nm 波长处分别有二个相近的吸收峰, 由于在 642 nm 波长处的吸收值较 720 nm 处的值稍大, 为提高检测灵敏度, 本文选用 642 nm 作为测定波长。

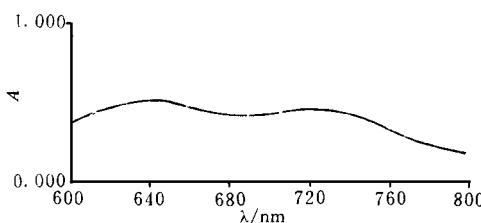


Fig. 1. Spectrogram of extract

### 3.2 显色剂中各试剂浓度配比的优选

按标准曲线法, 分别对钼锑抗混合显色液的酸度 (3 mol/L ~ 3.75 mol/L) 及钼酸铵浓度 (2% ~ 6.5%), 酒石酸锑钾浓度 (0.06% ~ 0.15%), 抗坏血酸浓度 (0.5% ~ 1.5%) 进行优选。结果表明: 以 5% 钼酸铵、0.0% 的酒石酸锑钾, 0.5% 的抗坏血酸配比, 显色液酸度控制在 3.25 mol/L (即反应液酸度在

0.325 mol/L) 为佳。反应液酸度增加, 反应灵敏度下降, 但反应液酸度在 0.3 mol/L 时, 下层空白反应液有蓝色, 故反应液酸度应控制在 0.3 mol/L 以上, 以 0.325 mol/L 为好。钼酸铵浓度增加, 反应灵敏度提高, 但当浓度为 6.5% 时, 酯层和水层分层处有沉淀状物, 对吸光度测定有影响。酒石酸锑钾及抗坏血酸的用量对吸光值大小影响不大。

### 3.3 方法学检验

3.3.1 回收率试验 取空白血浆 1.0 ml, 加入一定量的羟乙膦酸钠, 按血样分析方法操作, 在 642 nm 波长处测定吸收值, 并按回归方程计算, 结果见表 1

Tab 1. Results of recovery test

| No. | Added<br>(μg/ml) | Found<br>(μg/ml) | Recovery<br>(%) | Mean<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----|------------------|------------------|-----------------|-------------|------------|
| 1   | 1.29             | 1.42             | 110.08          | 102.97      | 4.79       |
| 2   | 2.58             | 2.59             | 100.39          |             |            |
| 3   | 3.87             | 4.08             | 105.43          |             |            |
| 4   | 5.16             | 5.02             | 97.29           |             |            |
| 5   | 10.32            | 10.49            | 101.65          |             |            |

3.3.2 精密度试验 取空白血浆 1.0 ml, 加入一定量羟乙膦酸钠, 按血样分析方法操作, 在 642 nm 波长处测定吸收值, 并按回归方程计算。共重复测定 7 份, 结果平均测得量为  $8.74 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ , RSD 为 3.2%。

3.3.3 血浆空白干扰试验 取空白血浆 1.0 ml, 按血样分析方法操作, 在 642 nm 波长处测定吸收值为 0.007, 对羟乙膦酸钠测定几无干扰。

3.3.4 乙酸丁酯中显色液的稳定性 取一定量的羟乙膦酸钠, 按标准曲线法操作得乙酸丁酯萃取液, 分别在放置 10 min ~ 24 h 后测定吸收值。结果表明: 乙酸丁酯萃取液吸收值在放置 50 min 起至 24 h 间测得的吸收值 RSD 为 0.63%, 证明该萃取液在 24 h 内保持稳定。

3.3.5 反应时间的影响 取相同量的羟乙膦酸钠, 按标准曲线法, 加入钼锑抗混合显色

液,定容后,在35℃水浴中保温不同时间(1~30 min)后,取出,振摇1 min,放置1 h后,在642 nm波长处,测定吸收值。结果表明:水浴保温5 min后,反应已完全,本文选用水浴保温10 min以后再萃取。

本文介绍的方法与Bisaz采用的同位素标记钼蓝比色法相比,简化了血浆前处理步骤,提高了羟乙膦酸钠的回收率及测定重现性,取消了同位素标记的步骤,并采用乙酸丁酯萃取生成的磷钼蓝,有效地排除了血样预处理中外加试剂对测定的干扰,克服了水液中比色液稳定性差的缺点,使比色液在24 h内保持稳定。方法灵敏、精密、稳定。是一种非同位素法测定血浆中羟乙膦酸钠含量的较

好的方法。

### 参 考 文 献

- 1 杨燕军.骨质疏松症的药物治疗.医药导报,1994,13(6): 259
- 2 William RM, William RK, Wakim JM. Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate(disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1972, 21: 503
- 3 Bisaz S, Felix R, Fleisch H. Quantitative determination of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate in urine and plasma. *Clinica Chimica Acta*, 1975, 65: 299
- 4 江孝绰,尧元金,胡敏杰.水中低浓度磷含量的测定.环境科学研究,1991,4(2): 18
- 5 中国科学院南京土壤研究所编.土壤理化分析.上海科学技术出版社,1978. 97

## Study on Determination of Disodium Etidronate in Plasma

Shao Qing, Li Shimin, Zheng Qi, Zeng Su

*School of Pharmacy, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031*

**Abstract** This paper introduces a method on determination of disodium etidronate(EHDP) in plasma. The procedure is based on a coprecipitation of EHDP with calcium phosphate, elimination of inorganic phosphate as an insoluble triethylamine-phosphomolybdate complex, decomposition of the P-C-P bond with perchloric acid and molybdate blue butylacetate abstraction colorimetry determination of the inorganic phosphate released. The results showed that the average recovery was  $102.9\% \pm 4.9\%$ , and  $n=5$ , precision  $RSD=3.21\%$ , and  $n=7$ . The linear range of the method was  $0.516\text{--}15.48\mu\text{g}/\text{ml}$ .

**Key words** Disodium etidronate; Analytical method; Plasma drug concentration