

高效液相色谱法测定人血清中丙戊酸钠的含量

郁 健 王广基¹ 杜春波² 孙建国¹

(中国药科大学分析化学教研室, ¹药物代谢动力学研究中心, ²制药公司, 南京 210009)

摘要 建立了 HPLC 方法测定人血清中丙戊酸钠的药物浓度。采用反相柱和乙腈-水(60:40)作为流动相, 庚酸作为内标, 血样经提取后, 用 4-溴甲基-6-7-二甲氧基香豆素衍生化, 测定波长设在 λ_S 325 nm 和 λ_R 398 nm, 内标庚酸的保留时间为 4.57 min, 丙戊酸钠的保留时间为 5.21 min, 线性范围为 2~150 μ g/ml, 测定了 10 名健康受试者单次口服丙戊酸钠片剂后不同时间的血药浓度。

关键词 丙戊酸钠; 血药浓度; 高效液相色谱法; 荧光检测

丙戊酸钠(sodium valproate)又名二丙基乙酸钠, 为广谱抗癫痫药。因分子结构中缺乏有效的紫外吸收, 采用紫外检测的高效液相色谱法^[1]测定血药浓度时灵敏度较低且干扰因素多, 因此目前较多地使用气相色谱法^[2~6]。国外也有报道^[7,8]采用荧光检测的高效液相色谱法, 但需用自动催化柱前衍生化设备和特殊材料, 检测条件要求比较高。本文通过用丙戊酸钠与 4-溴甲基-6-7-二甲氧基香豆素衍生化, 提供了简便、灵敏、专属性好的 HPLC 荧光检测方法测定丙戊酸钠的血药浓度, 为丙戊酸钠的药动学研究提供了可靠的测定方法, 同时为测定血清样品中其它小分子脂肪酸提供了参考。

1 实验部分

1.1 仪器

Waters 600 泵, 420C 荧光检测器, PC 800 色谱处理系统(Waters公司, 美国)

1.2 药品和试剂

4-溴甲基-6-7-二甲氧基香豆素(BrDM C)为 Sigma 产品, 二氯甲烷、甲醇、三乙胺为分析纯, 庚酸、乙腈为色谱纯, 丙戊酸钠及丙戊酸钠片剂由江苏省药物研究所提供。

丙戊酸钠标准液: 精密称取丙戊酸钠精制品 10 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释到刻度, 摆匀, 于 4°C 低温保存, 备用。

庚酸标准内标液: 精密称取庚酸 50 mg 置于

50 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 于 4°C 低温保存, 备用。

BMD C 溶液(2 mg/ml): 取 BrDM C 50 mg 用乙腈 25 ml 溶解, 临用时配制。

1.3 色谱条件

色谱柱: Spherisorb C₁₈ 5 μ m, 150 mm × 4.6 mm (中国科学院大连化物所制造); 流动相: 乙腈-水(60:40); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 激发波长 325 nm, 发射波长 398 nm。

1.4 血样预处理

取血清 0.2 ml 加庚酸内标液 10 μ l 混匀, 加 0.1 mol/L 盐酸液 0.2 ml 混匀, 加二氯甲烷 3 ml, 混旋振荡 3 min, 4000 r/min 离心, 取出有机相, 于 40°C 水浴中挥发至干后加三乙胺 10 μ l 和 BrDM C 溶液 0.5 ml 混匀, 密塞, 于 60°C 水浴中加热 40 min, 冷却至室温, 取 20 μ l 进样, 测定。记录色谱图(图 1)

2 实验结果

2.1 色谱行为

用上述色谱条件和样品处理方法, 测定衍生化试剂、空白血清及血清中的丙戊酸钠, 其色谱图见图 1。内标的保留时间为 4.57 min, 丙戊酸钠的保留时间为 5.21 min, 丙戊酸钠及内标与血清中的杂质分离良好。

2.2 线性范围

2.2.1 丙戊酸钠标准曲线 分别精密吸取丙戊酸钠标准液适量, 制成每毫升含丙戊酸钠 2.5, 25, 50, 75, 100 和 150 μg 的标准系列, 各加庚酸内标液 10 μl 混匀, 然后各加三乙胺 10 μl 和 BrDM C 溶液 0.5 mL 混匀, 密塞, 于 60°C 水浴中加热 40

min 取 20 μl 进样, 结果用丙戊酸钠与庚酸的峰面积比 (f) 和丙戊酸钠的浓度 (C) 进行回归计算, 得回归方程: $C = 57.75f - 0.160$, $r = 0.9992$ ($n=5$), 线性范围: 2~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$

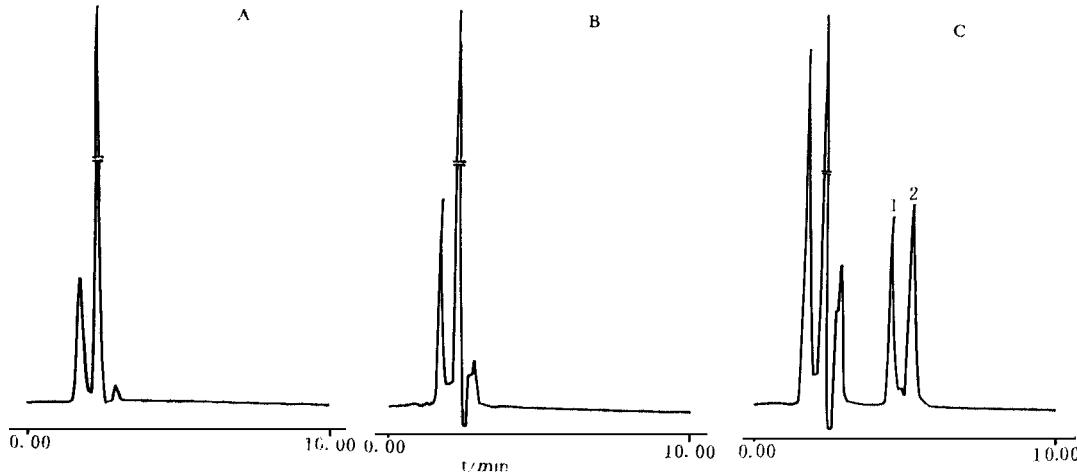


Fig 1 Typical HPLC chromatograms

A: BrDM C B: blank human serum C: sodium valproate in human serum 1: heptylic acid ($n=4.57\text{ min}$) 2: sodium valproate ($n=5.21\text{ min}$)

2.2.2 血清中丙戊酸钠的标准曲线 分别精密吸取丙戊酸钠标准溶液适量, 加入到空白血清 0.2 mL 中, 配制得每毫升含丙戊酸钠 2.5, 25, 50, 75, 100 和 150 μg 的标准系列, 并加入庚酸内标液 10 μl 混匀后按“血样预处理”项下操作, 结果用丙戊酸钠与庚酸的峰面积比 (f) 和丙戊酸钠的浓度 (C) 进行回归计算, 得方程: $C = 60.76f - 1.442$, $r = 0.9993$ ($n=5$), 线性范围: 2~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.3 血清中丙戊酸的回收率

取空白血清 0.2 mL 加入丙戊酸钠标准液适量, 配制成每毫升含丙戊酸钠 5, 25, 50, 75, 100 和 150 μg 的样品, 按“血样预处理”项下操作, 并将丙戊酸钠与庚酸的峰面积比代入“丙戊酸钠标准曲线”的线性方程中计算回收率, 结果见表 1

Tab 1 Recovery of sodium valproate in serum ($n=5$)

| Added ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Found in serum ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Recovery (%) | RSD (%) |
|--------------------------------------|---|-----------------|------------|
| 5 | 5.4 | 108.0 | 1.3 |
| 25 | 24.8 | 99.6 | 1.6 |
| 50 | 46.8 | 93.6 | 1.7 |
| 75 | 72.3 | 96.4 | 1.3 |
| 100 | 95.9 | 95.9 | 3.2 |
| 150 | 143.3 | 2.3 | |

2.4 精密度试验

取空白血清配制每毫升含丙戊酸钠 5, 50, 100 μg 的标准试样, 进行日内和日间精密度试验, 结果见表 2

Tab 2 Within-day and day-to-day precision and accuracy of sodium valproate in a standard samples ($n=5$)

| Given conc ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Within-day | | | Day-to-day | | |
|---|--------------------------------------|-----------------|------------|--------------------------------------|-----------------|------------|
| | Found ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Accuracy (%) | RSD (%) | Found ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Accuracy (%) | RSD (%) |
| 5 | 5.3 | 106.0 | 6.2 | 5.4 | 108.0 | 2.4 |
| 50 | 46.6 | 93.1 | 1.6 | 45.9 | 91.8 | 2.1 |
| 100 | 95.1 | 95.1 | 2.3 | 94.9 | 94.9 | 4.1 |

2.5 重现性试验

取受试者血样 0.2 mL 5 份, 分别照“血样预处理”项下操作测定, 按“血清中丙戊酸钠标准曲线”计算含量, 其重现性试验结果见表 3

Tab 3 Reproducibility of sodium valproate in samples ($n=5$)

| Sample | Found concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | RSD (%) |
|--------|--|------------|
| 1 | 52.3 | 2.4 |
| 2 | 61.1 | 2.5 |
| 3 | 26.5 | 3.5 |

2.6 受试者血药浓度测定

选健康男性志愿者 10名, 体重 71.9 ± 9.5 kg, 年龄 20~22岁, 均经体检证明心、肝和肾功能正常, 实验前一周未服任何药物, 受试期间禁烟、禁酒并统一伙食。空腹 1次口服丙戊酸钠片剂 400 mg (≥ 200 mg/片), 分别于服药前及服药后 0.50、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0 和 48.0 h 于肘静脉取血 3.0 mL 置试管中, 4000 r/min 离心, 取血清 0.2 mL 按“血样预处理”项下操作测定, 受试者平均血药浓度时间曲线见图 2

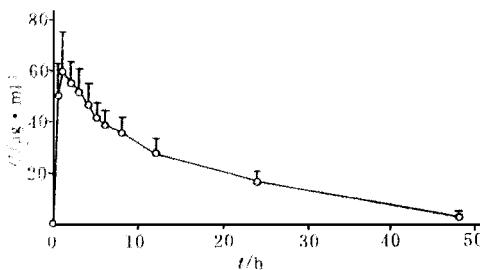


Fig 2 Mean serum concentration of sodium valproate after oral administration of a single dose of 400 mg ($n=10$)

3 讨 论

丙戊酸钠体内血药浓度的测定普遍采用气相色谱法, 用气相色谱法常要求在有机溶剂提取后, 经衍生化^[3]处理, 样品处理过程复杂, 常有溶剂峰或杂质峰的干扰, 影响丙戊酸钠的分离和测定, 本文采用 HPLC 荧光测定法, 可获得满意的分离和测定效果。

据文献报道^[7,9], 采用冠醚和碳酸钾系统以溴甲基甲氧基香豆素 (BMC) 为衍生化试剂, 测定血样中的丙戊酸和低级脂肪酸。本实验参照文献^[8]的三乙胺和乙腈系统以 BDMC 为衍生化试剂进行测定, 简便, 衍生化反应快, 溶液稳定, 干扰因素少。

丙戊酸钠及低级脂肪酸 HPLC 法常采用乙腈-水流动相系统。Wolf^[9]采用梯度自动催化柱前衍生化技术, 低流速状态下一次分离十二碳以上的八个脂肪酸。我们选用乙腈水 (60: 40) 分离庚酸和丙戊酸钠, 获得满意效果, 同时, 在 10 min 内良好地分离丁酸、戊酸、庚酸、丙戊酸和壬酸, 具有良好的专属性。

二氯甲烷沸点低, 提取后的血样除去溶剂只需在 40°C 条件下让其自然挥发, 无须吹氮气操作。使

用其它高沸点溶剂, 当水浴加热温度高于 50°C 或较长时间的加热, 引起游离丙戊酸和庚酸的挥发, 影响测定。

据文献报道^[10], 丙戊酸钠在体内主要与葡萄糖结合生成丙戊酸-葡萄糖苷酸 (VPA-G), 进一步代谢生成多种羧基、羟基及二元酸的代谢物。经采用不同比例的乙腈-水流动相 (65: 35, 60: 40, 50: 50), 分析受试者 12 h 血样, 未发现其它杂质色谱峰出现。由此说明, 在本实验条件下丙戊酸钠代谢物不影响其原药的测定。

参 考 文 献

- 1 Lovett LJ, Nygard GA, Erdmann G R, et al. HPLC determination of valproic acid in human serum using ultraviolet detection. *J Liquid Chromatogr.* 1987, **10** (4): 687
- 2 Nishioka R, Takeuchi M, Kawai S. Improved direct injection method and extractive methylation method for determination of valproic acid in serum by gas chromatography. *J Chromatogr.* 1985, **342**: 89
- 3 Bialer M, Friedman M, Rubinstein A. Rapid gas chromatographic assay for monitoring valproic acid and valproamide in plasma. *J Pharm Sci.* 1984, **73**: 991
- 4 Rege AB, Lertora JW, White LE, et al. Rapid analysis of valproic acid by gas chromatography. *J Chromatogr.* 1984, **309**: 397
- 5 Nishioka R, Kawai S. New method for the gas chromatographic determination of valproic acid in serum. *J Chromatogr.* 1983, **277**: 356
- 6 Cook NJ, Jewett DA. Determination of valproic acid in human serum by gas-liquid chromatography on OV-17 using nitro-ene-specific detection. *J Chromatogr.* 1983, **272**: 181
- 7 Wolf JH, Duin LV, Korf J. Automated analysis procedure for valproic acid in blood serum and brain dialysate by high-performance liquid chromatography with bromoanethoxy-coumarin as fluorescent label. *J Chromatogr.* 1989, **487**: 496
- 8 Bousquet E, Tirendi S, Santagati NA. Clean-up and determination of sodium valproate in serum by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Pharmazie.* 1991, **46** H 4: 257
- 9 Wolf JH, Korf J. Automated solid-phase catalyzed pre-column derivatization of fatty acid for reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis with fluorescence detection. *J Chromatogr.* 1988, **436**: 437
- 10 Dickenson RG, Hooper WD, Dunstan PR, et al. Urinary excretion of valproate and some metabolites in chronically treated patients. *Therapeutic Drug Monitoring.* 1989, **11**: 127

Determination of Sodium Valproate in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography

Yu Jian, Wang Guangji¹, Du Chunbe², Sun Jianguo¹

¹Department of Analytical Chemistry, ¹Department of Pharmacokinetics, ²Pharmaceutical Company, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract A method was reported for the determination of sodium valproate in serum by fluorimetric detection. HPLC is performed on a reversed-phase column with a mobile phase of acetonitrile/water(60:40) and with heptylic acid as an internal standard. Samples were derivatized with 4-bromomethyl-6,7-dimethoxy coumarin. The eluate was monitored at an excitation wavelength of 325 nm and an emission wavelength of 398 nm. The retention time of heptylic acid and sodium valproate was 4.57 min and 5.21 min, respectively. The serum standard curve was linear from 2 to 150 μ g/ml. The drug concentration was measured by this method after the sodium valproate tablets were orally administered by 10 volunteers.

Keywords Sodium valproate, Serum concentration, HPLC, Fluorimetric detection

’98国际华佗学术研讨会征文通知

经中华人民共和国科学技术委员会、中国科学技术协会和国家中医药管理局批准,由国家中医药管理局外事司、中国中医药学会、中国安徽省中医管理局联合主办,阜阳市人民政府、亳州市人民政府协办,定于1998年9月22日~25日在华佗故里举行’98国际华佗学术研讨会。

本次大会论文由大会学术委员会评审录用后,交付出版社正式出版。现将征集论文有关事项通知如下。

一、征文范围

- 1 华佗医学的源流与特点;
- 2 华佗医学在中医理论体系中的地位与贡献;
- 3 华佗医学的文献研究;
- 4 华佗医学在医疗、预防、保健、康复等方面的文献整理与探讨;
- 5 结合华佗医学对解剖学等的学术贡献探讨中医教育的历史、现状与发展;
- 6 结合华佗医学对脏腑辨证的贡献探讨脏腑辨证理论的形成与发展;
- 7 结合华佗医学的伤寒学说探讨外感热病脏腑辨证理论的形成与发展;
- 8 华佗医学(包括理论、方药、针灸、按摩、导引等)的临床研究;
- 9 结合华佗医学对外科学的贡献探讨中医外科学的历史、现状与发展;
- 10 结合华佗医学对针灸学的贡献开展针灸学的研究;
- 11 结合华佗医学对中药学的贡献开展中药这及中药资源开发的研究;
- 12 结合华佗医学对预防保健的贡献开展预防保健的研究;
- 13 论华佗高尚医德和精湛医术的精神及其意义;
- 14 结合华佗医学的贡献探讨中医学的发展方向;
- 15 结合华佗医学的贡献开展中医现代化的研究

二、注意事项

1 大会征文一般不超过6000字,并附有500字左右的摘要,请用稿纸正楷书写或打印,并写清作者姓名、单位和邮编及详细通讯地址。

2 会议论文将由著名专家组成的学术委员会负责审稿,审稿人有权对征文进行删改,凡不同意删改者,请寄稿时附文说明,来稿恕不退还。论文集正式出版时,适当收取版面费。

3 截稿日期:1998年5月31日

4 来稿请寄:安徽省中医管理局,地址:中国·安徽省合肥市丁家巷2号,邮编:230001,联系人:徐经凤,联系电话:0551-2649892,请在信封左下角标明“华佗征文”字样。