

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.21.014

高效液相色谱法同时测定癫痫患儿血清中丙戊酸钠 和 2-丙基-4-戊烯酸血药浓度*

李 赛¹, 苏凌樱^{2,△}

(1. 扬州大学附属淮安市妇幼保健院, 江苏 淮安 223000; 2. 南京医科大学附属淮安第一医院, 江苏 淮安 223000)

摘要:目的 建立同时测定癫痫患儿血清中丙戊酸钠及其代谢产物 2-丙基-4-戊烯酸血药浓度的高效液相色谱法。方法 以乙腈为蛋白沉淀剂,以 2-溴-4-硝基苯乙酮为衍生化试剂,以环己甲酸为内标物质,在超声条件下进行衍生化反应。色谱柱为 Bennetnach C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(75:25, V/V),流速为 1 mL/min,柱温为 25℃,检测波长为 243 nm,进样量为 10 μL。结果 丙戊酸钠、2-丙基-4-戊烯酸血药浓度分别在 5~200 μg/mL($r=0.9976$, $n=7$)和 0.5~16.0 μg/mL($r=0.9978$, $n=7$)范围内与所测峰面积和内标物质峰面积比值的线性关系良好,日内与日间精密度试验、稳定性试验的 RSD 均不超过 8%($n=5$),平均回收率分别在 94.60%~100.78%与 94.50%~97.00%之间, RSD 均不超过 8%($n=5$)。结论 该方法操作简便,准确度高,稳定性好,可用于同时测定癫痫患儿血清中丙戊酸钠和 2-丙基-4-戊烯酸的药血药浓度。

关键词:高效液相色谱法;丙戊酸钠;2-丙基-4-戊烯酸;血药浓度

中图分类号:R971+.6;R965.3

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)21-0052-04

Simultaneous Determination of Blood Concentration of Sodium Valproate and 2-Propyl-4-Pentenoic Acid in the Serum of Children with Epilepsy by HPLC

LI Sai¹, SU Lingying²

(1. Huai'an Women and Children's Health Care Hospital, Yangzhou University, Huai'an, Jiangsu, China 223000; 2. The Affiliated Huai'an No. 1 People's Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an, Jiangsu, China 223000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of blood concentrations of sodium valproate and 2-propyl-4-pentenoic acid in the serum of children with epilepsy. **Methods** The derivatization reaction was carried out under ultrasonic conditions with acetonitrile as protein precipitant, with 2-bromo-4-nitroacetophenone as derivatization reagent and cyclohexanecarboxylic acid as internal standard. The chromatographic column was Bennetnach C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water (75:25, V/V), the flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 25℃, the detection wavelength was 243 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of sodium valproate and 2-propyl-4-pentenoic acid were 5~200 μg/mL ($r=0.9976$, $n=7$) and 0.5~16.0 μg/mL ($r=0.9978$, $n=7$), respectively. The RSDs of intra-day and inter-day precision and stability tests were not more than 8% ($n=5$), the average recoveries of sodium valproate and 2-propyl-4-pentenoic acid were in the ranges of 94.60%~100.78% and 94.50%~97.00% with RSDs < 8% ($n=5$). **Conclusion** The method is simple, accurate and stable, which can be used for the simultaneous determination of the blood concentration of sodium valproate and 2-propyl-4-pentenoic acid in the serum of children with epilepsy.

Key words: HPLC; sodium valproate; 2-propyl-4-pentenoic acid; blood concentration

丙戊酸钠(VPA)是治疗儿童癫痫的一线药物^[1-2], 童^[3-4]。VPA 体内代谢产物多达 50 种,其中由细胞色素肝毒性为 VPA 最严重的不良反应,常见于 2 岁以下儿 P450(CYP450)催化生成的 2-丙基-4-戊烯酸(4-

*基金项目:江苏省药学会奥赛康医院药学基金项目[A201740]。

第一作者:李赛,男,硕士,主管药师,研究方向为神经药理学,(电子信箱)lisaihafy@163.com。

△通信作者:苏凌樱,女,硕士,主治医师,研究方向为癫痫基础与临床,(电子信箱)susanwestlife@126.com。

[13] GUO ZG, MAN YY, WANG XY, et al. Levo-tetrahydropal-matine attenuates oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia in mice[J]. Sci Rep, 2014(4):3905.

[14] 关秀峰,王 锐,曲秀芬,等. 延胡索的化学成分与药理作用研究进展[J]. 化学工程师, 2020, 34(3):57-60.

[15] 王风云,陈玉兴,周瑞玲,等. 谱效结合方法对绵茵陈大孔

吸附树脂精制工艺的评价[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2):166-168.

[16] 张 军,卫 罡,李文周,等. 护心复方药液大孔吸附树脂精制工艺的评价研究[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(12):1159-1163.

(收稿日期:2021-01-19;修回日期:2021-04-02)

ene-VPA)被认为是VPA产生肝毒性的主要物质^[5-8],可抑制线粒体 β 氧化,引起肝细胞脂质变性,与谷胱甘肽反应,降低机体的抗氧化能力,诱导肝损伤^[9-10]。目前,主要采用气相色谱-质谱联用法^[11]、液相色谱-质谱联用法^[12]及高效液相色谱(HPLC)法测定4-ene-VPA,但前2种方法由于成本过高,不适于在医疗机构广泛开展。本研究中参考文献[13],建立了同时测定癫痫患儿血清中VPA及其代谢产物4-ene-VPA血药浓度的HPLC法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1220型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);TDL80-2B型离心机(上海安亭科学仪器厂);AL104型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为0.1 mg);WH-3型微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器有限公司);XO-3200D型超声清洗机(南京先欧仪器制造有限公司,功率为80 W,频率为40 kHz);DHG-9101-A型电热鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

VPA口服溶液(赛诺菲<杭州>制药有限公司,批号为AHG0565,规格为每支300 mL:12 g);VPA对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100963-201101,纯度为94.5%);4-ene-VPA对照品(加拿大Toronto Research Chemicals公司,批号为1-LIJ-87-2,纯度 $\geq 98\%$);环己甲酸(批号为20120304),2-溴代-4-硝基苯乙酮(批号为20120703),甲醇、乙腈、正己烷、三乙胺(色谱纯),浓硫酸(分析纯),均购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水;空白血清由扬州大学附属淮安市妇幼保健院检验科提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Bennetnack C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m);

流动相:甲醇-水(75:25, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:243 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L;液相色谱工作站:Ezchrom Elite。

2.2 溶液配制

取VPA对照品10.00 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为1 mg/mL的VPA对照品贮备液;取4-ene-VPA对照品5.00 mg,精密称定,置5 mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得质量浓度为1 mg/mL的4-ene-VPA对照品贮备液;于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存,备用。取环己甲酸4.00 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,用正己烷溶解并定容,混匀,即得质量浓度为40 mg/L的内标提取液;取2-溴代-4-硝基苯乙酮100 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加乙腈溶解并定容,即得质量浓度为10 mg/mL的2-溴代-4-硝基苯乙酮溶液;于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存,备用。

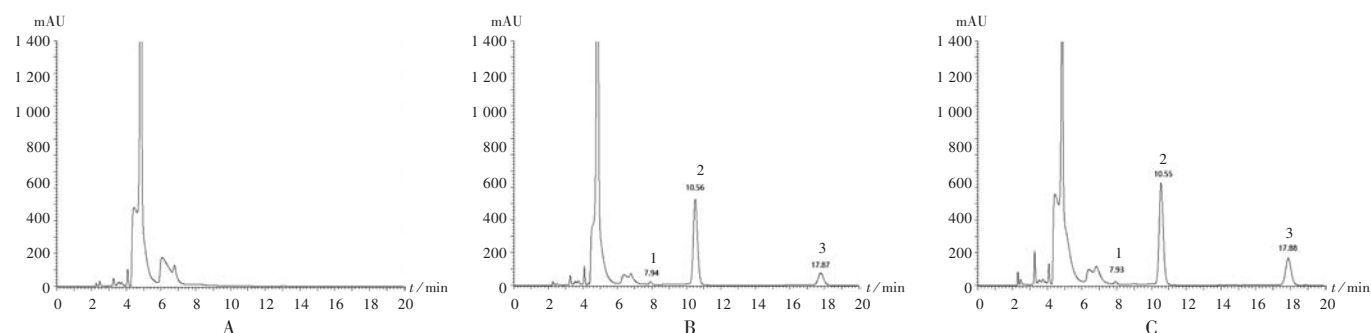
2.3 样品处理

取患儿血清250 μ L,加入500 μ L乙腈,沉淀蛋白,加入250 μ L(1 mol/L)稀硫酸,涡旋1 min,加入内标提取液1 mL,涡旋2 min;以4000 r/min的速率离心15 min,吸取上层有机相600 μ L置试管中,加入碱化液100 μ L,衍生化试剂50 μ L,混匀,于40 $^{\circ}$ C超声处理(功率为80 W,频率为40 kHz)5 min,氮气吹干。用100 μ L乙腈复溶,进样。

2.4 方法学考察

专属性试验:按2.3项下方法前处理样品,按2.1项下色谱条件进样测定。在此色谱条件下,VPA,4-ene-VPA与血清内源性物质均分离良好;4-ene-VPA、内标物质与VPA保留时间分别为7.93,10.55,17.88 min。色谱图见图1。

线性关系考察:精密吸取VPA对照品贮备液和4-ene-VPA对照品贮备液各适量,置试管中,40 $^{\circ}$ C吹干,加入空白血清250 μ L复溶,配成VPA质量浓度分别为5,10,20,40,80,160,200 μ g/mL和4-ene-VPA



1. 4-ene-VPA 2. 环己甲酸 3. VPA
A. 空白血清 B. 空白血清+VPA+内标提取液 C. 口服VPA后血清+内标提取液

图1 高效液相色谱图

1. 4-ene-VPA 2. cyclohexanecarboxylic acid 3. VPA

A. Blank serum B. Blank serum + VPA + internal standard extract C. Serum after oral administration of VPA + internal standard extract

Fig. 1 HPLC chromatograms

质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 16.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准血清样品, 各 7 份。按 2.3 项下方法操作, 分别以 VPA 和 4-ene-VPA 的血药浓度 (X) 为横坐标、所测峰面积与内标物质峰面积之比 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y_V = 0.0047X_V - 0.0048$, $r = 0.9976$ ($n = 7$); $Y_e = 0.0185X_e - 0.0083$, $r = 0.9978$ ($n = 7$)。结果表明, VPA 和 4-ene-VPA 血药浓度分别在 5~200 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.5~16.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与所测峰面积和内标物质峰面积比值的线性关系良好。

精密密度试验: 按线性关系考察项下方法分别配制 VPA 高、中、低 (100, 40, 10 $\mu\text{g/mL}$) 和 4-ene-VPA 高、中、低 (8, 4, 1 $\mu\text{g/mL}$) 3 种质量浓度的血清样品, 按 2.3 项下方法前处理, 按 2.1 项下方法进样测定, 每日重复测定 5 次, 共测定 5 d, 记录血清中 VPA 和 4-ene-VPA 实测血药浓度, 计算日内、日间 RSD。结果见表 1。

表 1 方法学考察结果 ($n = 5$)

Tab. 1 Results of the methodological investigation ($n = 5$)

待测物	理论血药浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密密度		日间精密密度		稳定性试验 (%)	
		实测血药浓度	RSD	实测血药浓度	RSD	平均回收率	RSD
		($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}$)	(%)	($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}$)	(%)		
VPA	100	99.54 $\pm$ 2.49	2.50	98.82 $\pm$ 3.08	3.12	98.72	4.56
	40	39.26 $\pm$ 1.18	3.00	39.72 $\pm$ 1.02	2.56	97.64	6.73
	10	9.96 $\pm$ 0.46	4.63	9.84 $\pm$ 0.56	5.73	97.46	7.81
4-ene-VPA	8	7.68 $\pm$ 0.43	5.63	7.94 $\pm$ 0.30	3.84	98.36	6.51
	4	3.74 $\pm$ 0.25	6.71	3.84 $\pm$ 0.26	6.79	96.87	5.96
	1	0.99 $\pm$ 0.07	6.62	0.98 $\pm$ 0.07	7.29	99.03	5.17

稳定性试验: 取精密密度试验项下 3 种质量浓度的 VPA 和 4-ene-VPA 血清样品各 5 份, 分别考察其在室温放置 12, 24 h, 反复冻融 3 次, -80°C 冰冻放置 15, 30 d 的稳定性。结果见表 1, 表明各质量浓度的血清样品稳定性良好。

加样回收试验: 按精密密度试验项下方法分别配制 VPA 高、中、低 (100, 40, 10 $\mu\text{g/mL}$) 和 4-ene-VPA 高、中、低 (8, 4, 1 $\mu\text{g/mL}$) 3 种质量浓度的血清样品, 按 2.3 项下方法前处理, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 每个血药浓度平行 5 份, 按公式 [相对回收率 (%) = 实测血药浓度 / 理论血药浓度 $\times$ 100%] 计算回收率。结果见表 2。

2.5 癫痫患儿血药浓度测定

采用 HPLC 法测定 12 例癫痫患儿血清中 VPA 和 4-ene-VPA 的血药浓度。VPA 治疗 5 d 后, 于晨起服药前采集静脉血 1~2 mL, 取血清, 按 2.3 项下方法前处理。结果见表 3。可见, 2 例合并托吡酯患儿血清中 4-ene-VPA 血药浓度明显降低, 与张玲敏等^[2]的研究结果类似, 但本研究中选取病例数较少, 目前无法形成具体结论, 还需进一步研究。

表 2 加样回收试验结果 ($n = 5$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 5$)

待测物	理论血药浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	实测血药浓度 ($\bar{X} \pm s, \mu\text{g/mL}$)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
VPA	100	100.80 $\pm$ 3.30	100.78	3.30
	40	38.98 $\pm$ 1.58	97.48	4.07
	10	9.46 $\pm$ 0.66	94.60	6.96
4-ene-VPA	8	7.70 $\pm$ 0.36	96.26	4.67
	4	3.78 $\pm$ 0.25	94.50	6.59
	1	0.97 $\pm$ 0.04	97.00	4.61

表 3 12 例癫痫患儿血药浓度测定结果

Tab. 3 Results of the determination of blood concentration in 12 children with epilepsy

序号	性别	年龄	体质量 (kg)	VPA 剂量 [mg/(kg·d)]	C_{VPA} ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{4\text{-ene-VPA}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	联合用药
1	女	5 个月	7.34	21.94	69.53	2.64	
2	女	2 岁	11.71	20.53	59.68	2.87	
3	男	3 岁	16.05	15.08	32.13	0.78	
4	男	5 岁	20.22	19.85	60.25	3.13	
5	女	1 岁	10.51	22.94	62.14	2.72	
6	女	12 岁	35.54	17.12	53.91	1.99	
7	女	4 岁	16.96	23.77	75.33	3.21	
8	男	2 岁	13.23	30.38	109.60	4.48	
9	男	2 岁	12.37	26.12	92.14	1.22	托吡酯 60 mg/d
10	男	1 岁	10.85	22.22	76.53	3.29	
11	女	6 岁	22.32	22.46	69.60	2.83	
12	女	2 岁	12.59	28.84	112.34	1.96	托吡酯 60 mg/d

3 讨论

联合用药可能会干扰 VPA 和 4-ene-VPA 血药浓度的测定结果, 本试验中考察了临床可能联用的药物, 如苯巴比妥、苯妥英钠、地西泮、卡马西平、拉莫三嗪、左乙拉西坦等对测定结果的影响。结果, 上述药物在该色谱条件下均对目标峰无干扰。

前期研究发现, 乙腈作为蛋白沉淀剂不仅能有效沉淀蛋白, 还能减弱加入内标提取液后引起的乳化现象, 缩短血样处理时间。乙腈同样适用于测定血清中 4-ene-VPA 的血药浓度^[14], 在复溶过程中, 乙腈具有较好的溶解性能, 尤其是检测低血药浓度 4-ene-VPA 时。

VPA 与 4-ene-VPA 分子结构相似, 均无特征性的紫外吸收基团。故适宜的衍生化反应条件是准确测定 VPA 及 4-ene-VPA 血药浓度的关键。目前, 应用较多的衍生化反应条件为 70°C 条件下水浴反应 15 min。但水浴温度过高, 可能会导致水蒸气进入反应液, 影响衍生化反应进行。另外, 在水浴反应过程中, 三乙胺的挥发也会在一定程度上影响反应进行, 导致衍生化反应不完全。本研究中创新性地采用超声法进行衍生化反应, 与水浴加热相比具有反应快、反应完全等优点^[15]。