

# 柱前衍生化HPLC法测定人血浆丙戊酸浓度的研究进展<sup>Δ</sup>

栾维励<sup>1\*</sup>,朱乐亭<sup>2</sup>,杨莉<sup>2</sup>,冯卫星<sup>3</sup>,王睿韬<sup>1</sup>,赵志刚<sup>2</sup>,梅升辉<sup>2#</sup>(1.北京市普仁医院药剂科,北京 100062;2.首都医科大学附属北京天坛医院药学部,北京 100050;3.首都医科大学附属北京儿童医院神经内科,北京 100069)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)11-1577-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.11.45

**摘要** 目的:了解柱前衍生化高效液相色谱(HPLC)法测定人血浆中丙戊酸(VPA)浓度的色谱条件和衍生化反应条件。方法:查阅近年来国内外相关文献,对柱前衍生化HPLC法测定人血浆中VPA浓度的色谱条件和衍生化反应条件进行归纳和总结。结果与结论:柱前衍生化HPLC法测定人血浆中VPA浓度的衍生化试剂主要为2-溴-对硝基苯乙酮和2-溴苯乙酮,酸化试剂主要为硫酸,反应用三乙胺催化,反应温度大多为50℃;色谱分离多用甲醇-水体系,内标大多选用环己烷羧酸。可以此为基础,建立更快、更准确、更稳定的VPA血药浓度测定新方法。

**关键词** 高效液相色谱法;柱前衍生化;丙戊酸;血浆浓度测定;治疗药物监测

丙戊酸(VPA)是一种不含氮的广谱抗癫痫药,作为原发性全面性癫痫、失神、肌阵挛发作的首选药物,对部分性发作、继发性全面性发作也有不同程度的治疗作用<sup>[1-2]</sup>。VPA血药浓度与药效的相关性明显大于其剂量与药效的相关性,其安全范围窄,有效的血药浓度范围为50~100 μg/ml,故<50 μg/ml不能有效控制病情,>100 μg/ml则会增加严重毒副反应发生率且疗效无明显增加<sup>[3]</sup>。VPA体内吸收和代谢存在较大的个体差异<sup>[2-3]</sup>,合并用药、药物剂型以及患者年龄、体质量等众多因素都可引起血药浓度的变化<sup>[4]</sup>。因此,VPA治疗癫痫患者长期用药或增减药物剂量时,需进行血药浓度监测,以此有效判断临床用药剂量与效果的关系,便于及时调整药物剂量,使VPA最小剂量发挥最大效果,降低毒副作用。建立准确的测定方法是准确测定VPA血药浓度的基础。VPA结构中没有紫外吸收基团,在使用高效液相色谱(HPLC)串联紫外检测器测定VPA血药浓度时需要进行柱前衍生化反应,原理为在酸性

条件下用有机溶剂提取血清中的VPA,在三乙胺催化下将VPA羧基端连接上具有紫外吸收的基团后测定。笔者查阅近年来国内外相关文献,拟对文献报道的柱前衍生化HPLC法测定人血浆中VPA浓度的色谱条件和衍生化反应条件进行归纳和总结,旨在为新方法的开发提供参考。

## 1 2-溴-对硝基苯乙酮作为衍生化试剂

### 1.1 色谱条件

以2-溴-对硝基苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的色谱条件见表1。由表1可见,测定方法均进行了方法学验证,流动相采用甲醇-水体系,流速大多为1.0 ml/min,柱温设置在25~30℃,进样体积均为20 μl,内标均为环己烷羧酸。线性范围均能满足临床测定需求,线性范围的质量浓度下限为5 μg/ml,上限为275.86 μg/ml。VPA的保留时间为8.8~13.7 min,内标的保留时间为5.5~7.3 min,检测波长为248~265 nm。

### 1.2 衍生化条件

表1 以2-溴-对硝基苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的色谱条件

研究者	流动相(I/I')	柱温,℃	流速,ml/min	波长,nm	内标	线性范围,μg/ml	进样体积,μl	待测物保留时间/内标保留时间,min
张伟东等 <sup>[5]</sup>	甲醇-水(77:23)	30	1.0	248	环己烷羧酸	19.43~275.86	20	9.82/5.88
李柄东等 <sup>[6]</sup>	甲醇-水(80:20)	30	1.0	265	环己烷羧酸	8.96~134.40	20	
周莉华等 <sup>[7]</sup>	甲醇-水(80:20)	30	0.9	265	环己烷羧酸	10~150	20	8.8/5.5
李文艳等 <sup>[8]</sup>	甲醇-水(72.5:27.5)	25	1.0	264	环己烷羧酸	5~250	20	13.7/7.3

以2-溴-对硝基苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的衍生化条件见表2。由表2可见,血清用量介于50~1 000 μl;萃取前加入的酸化液均为硫酸,浓度为1~3 mol/L,用量介于100~500 μl;萃取溶剂以正己烷为主,体积介于1~6 ml;衍生化试剂的浓度不同,用量变化较大,绝对用量介于25~1 000 μg;催化剂均为三乙胺,用量变化较大,从10~100 μl均有报道;反应温度介于48~60℃,反应时间介于10~15 min。

## 2 2-溴苯乙酮作为衍生化试剂

### 2.1 色谱条件

以2-溴苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的色谱条

件见表3。2-溴苯乙酮又名 $\alpha$ -溴苯乙酮或 $\omega$ -溴苯乙酮,是文献报道最多的衍生化试剂。由表3可见,以2-溴苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的文献报道中,多采用甲醇-水作为流动相,流速介于0.5~1.2 ml/min,柱温控制在30~40℃,进样体积为2~20 μl,内标均为环己烷羧酸。线性范围均能满足临床测定需求,质量浓度下限为6.25 μg/ml,上限为200 μg/ml。待测物保留时间介于2.725~18.565 min,内标保留时间介于1.63~8.615 min,检测波长为248 nm和262 nm。

### 2.2 衍生化条件

以2-溴苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的衍生化条件见表4。由表4可见,血清用量为100~250 μl;酸化液均为硫酸,浓度均为1 mol/L,用量从50~200 μl均有使用;萃取溶剂以正己烷为主,乙醚和正戊烷也有使用,体积介于0.6~4 ml;衍生化试剂的浓度不同,用量变化较大,绝对用量介于50~500 μg;催化剂均为三乙胺,用量为10~50 μl;反应温度为50~65℃,反应时间为10~15 min。

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81301118)

\* 药士。研究方向:药物分析、临床药学。电话:010-67096862。

E-mail:309352312@qq.com

# 通信作者:主管药师,博士。研究方向:药物化学、药物分析。

电话:010-67096857。E-mail:meishenghui1983@126.com

表2 以2-溴-对硝基苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的衍生化条件

研究者	血清用量, $\mu\text{l}$	萃取前酸化液品名	萃取前酸化液浓度, mol/L	萃取前酸化液用量, $\mu\text{l}$	萃取溶剂品名	萃取溶剂体积, ml	衍生化试剂质量浓度, mg/ml	衍生化试剂用量, $\mu\text{l}$	催化剂品名	催化剂用量, $\mu\text{l}$	反应温度, $^{\circ}\text{C}$	反应时间, min
张伟东等 <sup>[9]</sup>	200	硫酸	1	200	正己烷	3		20	三乙胺	20	48	15
李炳东 <sup>[8]</sup>	50	硫酸	1	100	石油醚	1	0.494	50	三乙胺	50	30	10
周莉华等 <sup>[7]</sup>	100	硫酸	3	100	正己烷	2	5	50	三乙胺	10	50	10
李文艳等 <sup>[9]</sup>	1000	硫酸	3	500	正己烷	6	10	100	三乙胺	100	55~60	15

表3 以2-溴苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的色谱条件

研究者	流动相(V/V)	柱温, $^{\circ}\text{C}$	流速, ml/min	波长, nm	内标	线性范围, $\mu\text{g/ml}$	进样体积, $\mu\text{l}$	待测物保留时间/内标保留时间, min
袁孔现等 <sup>[9]</sup>	乙腈-水(70:30)	40	1	248	环己烷羧酸	8.3~132.74	20	6.04/3.98
胡伟等 <sup>[10]</sup>	甲醇-水(60:40)	40	0.5	248	环己烷羧酸	16.632~166.32	2	2.725/1.63
杨春兰等 <sup>[11]</sup>	甲醇-水(82:18)	30	1	248	环己烷羧酸	12.5~150	10	
张志国等 <sup>[12]</sup>	甲醇-水(75:25)	30	1	248	环己烷羧酸	18.8~150.4	15	10.9/7.0
段自焯等 <sup>[13]</sup>	乙腈-水(75:25)	35	1	248	环己烷羧酸	6.25~200	20	
胡琳 <sup>[14]</sup>	甲醇-水(79:21)	40	1	248	环己烷羧酸	12.5~200	10	
汪宝军等 <sup>[15]</sup>	甲醇-水(75:25)	40	1	248	环己烷羧酸	11.24~180.96	20	7.1/4.7
陈艳等 <sup>[16]</sup>	甲醇-水(65:35)	30	1.2	262	环己烷羧酸	20~200	20	18.565/8.615

表4 以2-溴苯乙酮为衍生化试剂测定VPA血药浓度的衍生化条件

研究者	血清用量, $\mu\text{l}$	萃取前酸化液品名	萃取前酸化液浓度, mol/L	萃取前酸化液用量, $\mu\text{l}$	萃取溶剂品名	萃取溶剂体积, ml	衍生化试剂质量浓度, mg/ml	衍生化试剂用量, $\mu\text{l}$	催化剂品名	催化剂用量, $\mu\text{l}$	反应温度, $^{\circ}\text{C}$	反应时间, min
袁孔现等 <sup>[9]</sup>	100	硫酸	1	50	正戊烷	4	1	50	三乙胺	50	60~65	10
胡伟等 <sup>[10]</sup>	200	硫酸	1	100	正己烷	0.8	10.105	10	三乙胺	10	53	15
杨春兰等 <sup>[11]</sup>	100	硫酸	1	50	正己烷	0.6	10	10	三乙胺	10	55	15
张志国等 <sup>[12]</sup>	200	硫酸	1	200	正己烷	4	5.016	40	三乙胺	20	61~65	
段自焯等 <sup>[13]</sup>	100	硫酸	1	100	正戊烷	5	1.2	100	三乙胺	20	55	15
胡琳 <sup>[14]</sup>	250	硫酸	1	100	正己烷	2	10	50	三乙胺	20	50	10
汪宝军等 <sup>[15]</sup>	200	硫酸	1	100	乙醚	2	10	10	三乙胺	10	55	15
陈艳等 <sup>[16]</sup>	100	硫酸	1	100	正戊烷	4	10	10	三乙胺	10	50-55	10

### 2.3 其他衍生化试剂

文献报道中的VPA血药浓度监测除了以2-溴-对硝基苯乙酮和2-溴苯乙酮作为衍生化试剂外,还有少数文献使用2,4'-二溴苯乙酮和 $\epsilon$ -溴苯乙酮作为衍生化试剂,其液相色谱条件和衍生化条件与以2-溴-对硝基苯乙酮和2-溴苯乙酮作为衍生化试剂的相差不大。其他衍生化试剂测定VPA血药浓度的色谱

条件与衍生化条件见表5、表6。

表5 其他衍生化试剂测定VPA血药浓度的色谱条件

研究者	流动相(V/V)	柱温, $^{\circ}\text{C}$	流速, ml/min	波长, nm	内标	线性范围, $\mu\text{g/ml}$	进样体积, $\mu\text{l}$
邹小琴等 <sup>[7]</sup>	甲醇-乙醇-水	35	1.1	248	环己基丙酸	5~150.5	20
Chen ZJ等 <sup>[18]</sup>	甲醇-水(76:24)		1	254	辛酸	5~200	10

表6 其他衍生化试剂测定VPA血药浓度的衍生化条件

研究者	血清用量, $\mu\text{l}$	萃取前酸化液品名	萃取前酸化液浓度, mol/L	萃取前酸化液用量, $\mu\text{l}$	萃取溶剂品名	萃取溶剂体积, ml	衍生化试剂品名	衍生化试剂质量浓度, mg/ml	衍生化试剂用量, $\mu\text{l}$	催化剂品名	催化剂用量, $\mu\text{l}$	反应温度, $^{\circ}\text{C}$	反应时间, min
邹小琴等 <sup>[7]</sup>	50	硫酸	3	50	乙醚	2	2,4'-二溴苯乙酮	2	100	三乙胺	40	55	30
Chen ZJ等 <sup>[18]</sup>	200	盐酸	1	200	乙酸乙酯	1.5	2,4'-二溴苯乙酮	12	50	三乙胺	10	70	40

### 3 结语

VPA各种剂型的药品经酸化转变成VPA后,才能用有机溶剂萃取,常用的衍生化试剂有2-溴-对硝基苯乙酮和2-溴苯乙酮。在VPA的柱前衍生化测定过程中,色谱条件和衍生化条件是试验的重要影响因素。衍生化试剂用量与VPA浓度之比一般为2.5~10。张志国等<sup>[12]</sup>的研究考察了HPLC法测定VPA血药浓度的衍生化影响因素,当该比值 $<7.33$ 时可能会衍生化不完全,造成峰面积偏低。由于VPA可挥发,袁孔现等<sup>[9]</sup>探讨HPLC法测定血清中VPA浓度质控方法的研究显示,以水浴温度介于48~70 $^{\circ}\text{C}$ 、反应时间为10~20 min,经正交试验比较发现,在55 $^{\circ}\text{C}$ 反应15 min为宜<sup>[9]</sup>。胡伟等<sup>[10]</sup>采用柱前衍生HPLC法测定人血清中VPA浓度的研究发现,光照条件所得VPA峰面积为避光反应的10倍以上。氮气吹干的效果比空气吹干好,用不同流量的氮气吹干,相对标准偏差均在合理范围内<sup>[12]</sup>。付翠香等<sup>[19]</sup>的研究表明,反应温度 $>45^{\circ}\text{C}$ 时,VPA衍生物的峰面积不再增加,温度太高或加热时间太长,易引起VPA挥发而影响测定结果。

纳入本综述的文献中常用的萃取溶剂有正戊烷、正己烷

和乙醚。正戊烷沸点低、挥发性强、成本更低、提取更方便,且衍生化结束时基本挥干,测定结果稳定。周莉华等<sup>[7]</sup>研究发现,在酸性条件下用有机溶剂萃取VPA时,使用硫酸浓度为3 mol/L酸化比1 mol/L酸化的萃取回收率高。张伟东等<sup>[9]</sup>的研究发现,用正己烷萃取时会出现乳化现象,提高正己烷用量至3 ml即可防止乳化。段自焯等<sup>[13]</sup>的研究采用的萃取溶剂为正戊烷,结果显示峰形理想、分离效果好、柱效高。正戊烷沸点为36.1 $^{\circ}\text{C}$ ,水浴温度高于其沸点,因此水浴衍生化过程中无需氮气吹干,溶剂基本挥发至干,方法简便、快速。但是,李炳东<sup>[8]</sup>的研究认为正己烷、环己烷、正戊烷沸点均较低,操作中挥发会影响测定结果,且萃取时均会带入一定量的水分,直接影响检测结果,故采用石油醚作提取溶剂。由于VPA的衍生化反应产物与环己烷羧酸的结构相似,故较多选用环己烷羧酸为内标。

纳入本综述的文献大多采用甲醇-水作为流动相,可能是因为价格便宜且能满足分离测定需求。袁孔现等<sup>[9]</sup>的研究选择乙腈作流动相,因为乙腈的黏度低于甲醇,可以减小试验过程中产生的压力,降低试验设备负荷。三乙胺作为催化剂

# 丁香酚透皮吸收的研究进展<sup>Δ</sup>

孙晓彤<sup>1,2\*</sup>, 刘善新<sup>2#</sup>, 苏 酪<sup>2</sup>, 邵 新<sup>2</sup>, 王 平<sup>2</sup>, 胡晓飞<sup>1,2</sup> (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)11-1579-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.11.46

**摘要** 目的: 了解丁香酚透皮吸收的研究进展, 为其临床应用提供参考。方法: 查阅近年来国内外相关文献, 对丁香酚透皮给药的特性、透皮吸收的影响因素及透皮给药的方法等研究进行归纳和总结。结果: 丁香酚具有一定的透皮性能, 其透皮吸收的影响因素包括透皮吸收促进剂、基质的性质和药粉粒径等, 其透皮给药的方法包括制成纳米乳给药、环糊精包含的凝胶剂给药及穴位给药等。结论: 选择合适的基质、透皮吸收促进剂、透皮给药方法对丁香酚的透皮吸收具有重要意义。

**关键词** 丁香酚; 透皮吸收; 透皮给药

丁香酚是丁香及丁香罗勒油的主要成分, 作为一种天然香料, 具有解热、镇痛、抗炎、抗氧化、抑制花生四烯酸代谢、抗血小板聚集、抗血栓形成等药理活性<sup>[1-4]</sup>, 临床常用于镇痛、麻醉、抗炎等方面<sup>[5]</sup>。丁香酚等苯丙醇类清除一氧化氮(NO)自

由基的活性较好, 提示其对NO诱导的肿瘤有抑制作用<sup>[6]</sup>。丁香酚有优良的透皮吸收促进作用, 可发挥促参与治疗的双重功效。透皮给药系统(Transdermal drug delivery system, TDDS)或称透皮吸收系统(Trandermal therapeutic system,

能中和反应中生成的溴化氢, 阻止反应向逆反应进行, 使VPA酯化完全, 同时还可改善色谱峰峰形。

综上所述, 笔者归纳和总结了不同柱前衍生化HPLC法在测定VPA血药浓度中的色谱条件和衍生化条件, 结果显示柱前衍生化HPLC法测定VPA血药浓度的衍生化试剂主要为2-溴-对硝基苯乙酮和2-溴苯乙酮, 酸化试剂主要为硫酸, 反应用三乙胺催化, 反应温度大多为50℃, 反应产物多用环己烷提取; 色谱分离多用甲醇-水体系, 内标大多选用环己烷羧酸。建议以此为基础, 为VPA安全使用时的血药浓度监测建立更快、更准确、更稳定的新方法。

## 参考文献

[1] 王佳庆, 王莉文, 赵志刚. 4城市2011—2013年抗癫痫类药物使用情况的分析与比较[J]. 药品评价, 2014, 11(18): 24.  
[2] Hospira Inc. Depacon valproate sodium for intravenous injection[EB/OL]. [2015-08-15]http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/label/2015/020593s0321b1.pdf.2015.  
[3] 鞠永静. 1692例抗癫痫药物血药浓度监测结果与分析[J]. 药品评价, 2014, 11(18): 33.  
[4] Lin WW, Jiao Z, Wang CL, et al. Population pharmacokinetics of valproic acid in adult Chinese epileptic patients and its application in an individualized dosage regimen[J]. Ther Drug Monit, 2015, 37(1): 76.  
[5] 张伟东, 马金秋, 王娜. RP-HPLC法测定人血清中丙戊酸浓度及在癫痫患儿中的应用[J]. 中国药房, 2013, 24(18): 1673.  
[6] 李炳东. 柱前衍生化HPLC法测定人血清中丙戊酸钠的浓度[J]. 中国美容医学, 2012, 21(12): 195.

[7] 周莉华, 涂琼, 梅步云. HPLC法测定人血清中丙戊酸钠的浓度[J]. 中国药房, 2011, 22(26): 2441.  
[8] 李文艳, 彭梅. HPLC测定人血浆中丙戊酸钠的浓度[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2014, 54(7): 22.  
[9] 袁孔现, 毛名扬, 詹三华. HPLC测定血清中丙戊酸浓度质控方法的研究[J]. 河北医药, 2015, 37(4): 613.  
[10] 胡伟, 张婷, 吴永畅, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱法测定人血清中丙戊酸钠的浓度[J]. 中国临床药学杂志, 2013, 22(6): 342.  
[11] 杨春兰, 方会慧, 夏泉, 等. 柱前衍生化-HPLC法测定患者体内丙戊酸钠的血药浓度[J]. 安徽医药, 2011, 15(11): 1352.  
[12] 张志国, 雷力力, 李冬, 等. HPLC法测定丙戊酸钠血药浓度的衍生化影响因素考察[J]. 中国药房, 2010, 21(34): 3204.  
[13] 段自峰, 王法财, 沈炳香, 等. HPLC法测定患者丙戊酸钠血药浓度[J]. 海峡药学, 2014, 26(6): 152.  
[14] 胡琳. 高效液相色谱法测定丙戊酸钠的血药浓度[J]. 中国药业, 2013, 22(12): 16.  
[15] 汪宝军, 胡庭杰. 柱前衍生高效液相色谱法测定人血清中丙戊酸钠浓度[J]. 齐鲁药事, 2010, 29(11): 664.  
[16] 陈艳, 袁君, 王晓娟, 等. 柱前衍生HPLC法测定丙戊酸钠的血药浓度及其临床应用[J]. 安徽医药, 2010, 14(3): 289.  
[17] 邹小琴, 毛桂福, 钟小斌, 等. 衍生化-HPLC法测定人血清中丙戊酸浓度[J]. 中国当代医药, 2012, 19(23): 94.  
[18] Chen ZJ, Wang XD, Wang HS, et al. Simultaneous determination of valproic acid and 2-propyl-4-pentenoic acid for the prediction of clinical adverse effects in Chinese patients with epilepsy[J]. Seizure, 2012, 21(2): 110.  
[19] 付翠香, 王军, 郑京胜. 柱前衍生HPLC法测定丙戊酸钠的血药浓度[J]. 海峡药学, 2008, 20(9): 110.

Δ 基金项目: 山东省自主创新成果转化重大专项(No.2012ZHZX1C0405); 山东省中医药科技发展计划项目(No.2011-167)

\* 硕士研究生。研究方向: 中药新剂型与新制剂。电话: 0531-82949813。E-mail: 15864026362@163.com

# 通信作者: 研究员, 硕士。研究方向: 中药新剂型与新制剂。电话: 0531-82949813。E-mail: liushanxin66@163.com

(收稿日期: 2015-09-01 修回日期: 2015-11-04)

(编辑: 陶婷婷)