

• 论 著 •

LC-MS/MS 法测定人血浆中丙戊酸的浓度^{*}

张丽娜, 张 丹[#], 马婧怡, 刘 曼, 杨 漫, 邓 鸣, 刘会臣[△]

(航天中心医院临床药理室, 北京 100049)

摘 要:目的 建立快速、灵敏的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血浆中丙戊酸的浓度。方法 采用乙腈沉淀蛋白法处理人血浆样本, 选用 Shimpack VP-ODS 色谱柱(150 mm×2.0 mm I.D., 5 μm), 以甲醇:5 mmol/L 乙酸铵(55:45, v/v)为流动相, 流速为 0.4 mL/min, 采用 API3200 型三重四极杆串联质谱仪的多重反应监测(MRM)扫描方式进行监测, 电喷雾离子化源, 负离子方式, 选择监测离子反应分别为 m/z 142.9→m/z 142.9(丙戊酸)和 m/z 179.0→m/z 179.0(1-庚烷磺酸)。结果 丙戊酸和内标 1-庚烷磺酸的保留时间分别为 3.03、2.38 min; 血浆中丙戊酸的线性范围为 0.800~80.0 μg/mL($r>0.99$), 定量下限为 0.800 μg/mL; 批内、批间精密性(RSD)均小于 15%; 准确度(RE)均在±15%的范围以内; 平均提取回收率为(84.1±2.4)%; 平均基质效应因子为(104.3±2.0)%。稳定性试验中, 在各种贮存条件下的血浆中, 丙戊酸均较稳定。结论 该方法适用于人血浆中丙戊酸浓度的测定及丙戊酸半钠缓释片的人体药代动力学研究。

关键词:丙戊酸; 液相色谱-串联质谱法; 药代动力学; 血浆

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)09-1183-04

Determination of valproic acid in human plasma by LC-MS/MS method^{*}

ZHANG Lina, ZHANG Dan[#], MA Jingyi, LIU Man, YANG Man, DENG Ming, LIU Huichen[△]

(Department of Clinical Pharmacology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China)

Abstract: **Objective** To develop a rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometric(LC-MS/MS) method for the determination of valproic acid in human plasma. **Methods** After treating human plasma sample by acetonitrile protein precipitation method, the analytes were separated on a Shimpack VP-ODS analytical column(150 mm×2.0 mm I.D., 5 μm) with the mobile phase of methanol and 5 mmol/L ammonium acetate(55:45, v/v) at a flow rate of 0.4 mL/min. Detection was carried out by adopting the multiple reaction monitoring(MRM) scanning mode in the API3200 triple quadrupole tandem mass spectrometer, electrospray ionization source, negative ion mode, selected monitoring ionic reactions were m/z 142.9→m/z 142.9(valproic acid) and m/z 179.0→m/z 179.0(1-sulfonic acid). **Results** Valproic acid and internal standard 1-sulfonic acid retention time were 3.03 min and 2.38 min respectively. The plasma valproic acid linear range was 0.800—80.0 μg/mL($r>0.99$) with the lower limit of quantitation(LLOQ) 0.800 μg/mL. The intra- and inter-batch relative standard deviations(RSD) were both less than 15%, and the relative errors(RE) were within ±15%. The mean extraction recovery rate was(84.1±2.4)%, and the mean matrix effect factor was(104.3±2.0)%. In the stability study, valproic acid was found to be stable in plasma under various storage conditions. **Conclusion** This method is suitable for the determination of valproic acid in human plasma and human pharmacokinetic study of valproic acid semisodium sustained release tablet.

Key words: valproic acid; LC-MS/MS; pharmacokinetic; plasma

丙戊酸半钠为丙戊酸钠的衍生物, 由丙戊酸钠和丙戊酸组成, 其摩尔比为 1:1。丙戊酸半钠缓释片适用于偏头痛和癫痫的预防^[1]。口服后在胃肠道中会很快溶解为丙戊酸, 在血液和血浆中循环的活性化合物均为丙戊酸。丙戊酸的药代动力学和疗效个体差异较大^[2]。本试验建立了快速、准确、灵敏、专属性强且重现性好的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法用以测定人血浆中丙戊酸的浓度, 并同时应用于进行丙戊酸半钠缓释片的人体药代动力学研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 API3200 型三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子化源、Analyst 1.4.2 数据处理软件(美国 Applied Biosystem 公司); Prominence LC-20A 超快速高效液相色谱系统, 包括 LC-20AD 溶剂输送泵、SIL-20AHT 自动进样器、CBM-20A 系统控制器、CTO-20A 柱温箱以及 DGU-20A3 在线脱气机(日本 Shimadzu Technologies 公司); AP250D 电子分析天平(美国 Ohaus 公司); Sigma 3-18K 台式高速离心机(德国 Sartorius Stedim Biotech 公司); QB-600 型高速振荡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); KLZ-UV 纯水仪(成都唐氏康宁科技发展有限公司); MDF-U73V 医用低温箱(日本 SANYO

^{*} 基金项目: 航天中心医院科研项目(YN201501)。

作者简介: 张丽娜, 女, 初级药师, 主要从事药代动力学研究。 [#] 共同第一作者: 张丹, 女, 高级工程师, 主要从事药代动力学研究。

[△] 通信作者, E-mail: huichenliu@163.com。

Electric 有限公司);HYCD-282 医用冷藏冷冻箱(青岛海尔特种电器有限公司)。

1.1.2 试剂 丙戊酸钠(纯度 100%,批号 007QB1,European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care);1-庚烷磺酸钠(纯度 99.0%,批号 20110901,国药集团化学试剂有限公司)。甲醇(色谱纯,批号 126273 和 127848,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);乙腈(色谱纯,批号 112189,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);其他试剂均为分析纯;超纯水为去离子水经由 KLZ-UV 纯水仪纯化制得。所需空白血浆均来自健康志愿者。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shimpack VP-ODS 柱(150 mm×2.0 mm I.D, 5 μ m);保护柱为 Security Guard Cartridges C18(4 mm×2.0 mm I.D, 5 μ m);流动相为甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(v:v=55:45);流速为 0.4 mL/min;柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量 1 μ L。

1.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源,检测方式为负离子模式;离子喷射电压为-4 500 V;温度为 450 $^{\circ}$ C;源内气体 1(GS1, N₂)压力为 30 psi;气体 2(GS2, N₂)压力为 50 psi;气帘气体(CUR, N₂)压力为 30 psi;扫描方式:多重反应监测(MRM);定量分析的离子反应分别为:m/z 142.9→m/z 142.9(丙戊酸)和 m/z 179.0→m/z 179.0(1-庚烷磺酸),解簇电压(DP)分别为:-34 V 和-46 V,碰撞能量(CE)分别为:-10 eV 和-15 eV;碰撞气(CAD, N₂)压力:3 psi;Q1、Q3 分辨率均为 unit。

1.2.3 溶液的配制 (1)对照品储备液的配制:精确称取丙戊酸钠对照品适量,用超纯水溶解并稀释,配制成浓度为 6.40 mg/mL 的丙戊酸储备液。(2)对照品血浆的配制:取适量的丙戊酸储备液,使用混合空白血浆将其稀释成丙戊酸浓度分别为 0.800、3.00、8.00、20.0、40.0、60.0、80.0 μ g/mL 的对照品血浆。(3)质控样本(QC)的配制:取适量的丙戊酸储备液,用超纯水稀释,配制成浓度分别为 200、3 000 μ g/mL 的丙戊酸溶液。分别取适量上述 2 个溶液及储备液,使用混合空白血浆将其稀释成丙戊酸浓度分别为 2.00、30.0、64.0 μ g/mL 的 QC 样本。(4)QC 溶液的配制:取适量的丙戊酸储备液,分别用超纯水稀释成丙戊酸浓度分别为 10.0、150、320 μ g/mL 的 QC 溶液。(5)内标溶液的配制:精确称取 1-庚烷磺酸钠适量,用超纯水溶解并稀释,配制成浓度为 357 μ g/mL 的 1-庚烷磺酸溶液。精确量取该溶液适量,用超纯水稀释,配制成浓度为 35.7 μ g/mL 的 1-庚烷磺酸内标溶液。

1.2.4 血浆样本的处理 12 名健康受试者单次口服丙戊酸半钠缓释片、丙戊酸钠缓释片,给药剂量为 500 mg。应用静脉留置针从前臂静脉采集血样,采血时间点分别为受试者每次用药前 0.5 h 内和用药后 1、2、3、4、6、8、10、12、14、16、24、36、48、72、96 h。采用建立的 LC-MS/MS 方法对血浆中丙戊酸的浓度进行测定。分别精密取血浆样本 50 μ L、内标 1-庚烷磺酸溶液 10 μ L、超纯水 10 μ L 以及沉淀剂乙腈 250 μ L 置于 1.5 mL EP 管中,涡流 1 min,离心 10 min(10 000×g)。取全部上清液,加入超纯水 180 μ L,涡流 1 min。取混匀后的样液 100 μ L 转移至进样瓶中进行 LC-MS/MS 分析。

2 结果

2.1 质谱分析 用蠕动泵以 10 μ L/min 的恒定流速分别将丙戊酸溶液(0.868 μ g/mL)和 1-庚烷磺酸溶液(1.00 μ g/mL)泵入 MS/MS 系统,进行碎片离子分析,分别得到两者的二级全扫描质谱图,见图 1。丙戊酸无碎片离子,因此选择其母离子 m/z 142.9 作为 Q1 和 Q3 监测的对象;虽然内标 1-庚烷磺酸有碎片离子,但为了确保内标能够完全反映分析物的被分析状态,因此对于内标也选择其母离子 m/z 179.0 作为 Q1 和 Q3 监测的对象。

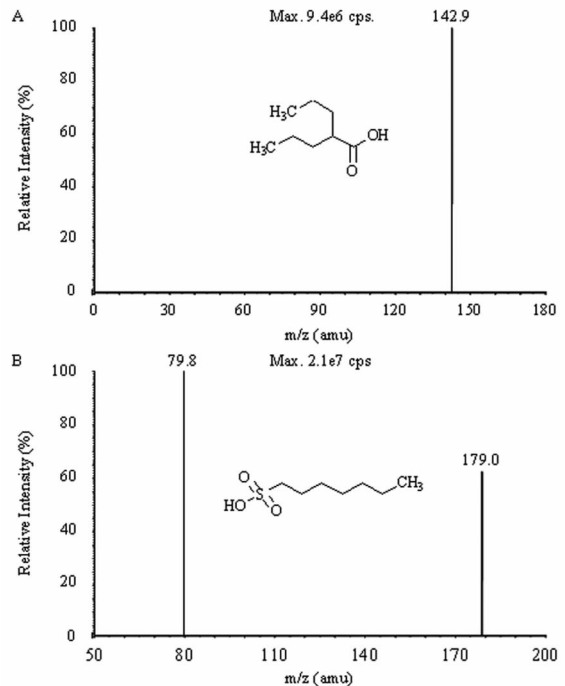


图 1 丙戊酸(A)和内标 1-庚烷磺酸(B) [M-H]⁻的二级全扫描质谱图

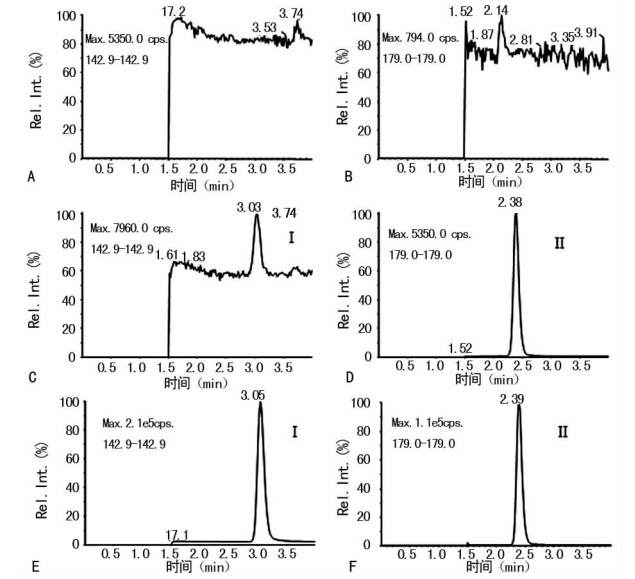
2.2 选择性 以等体积的超纯水代替内标溶液,其余按上述“1.2.4 血浆样本的处理”操作,分别处理 6 个不同来源的空白血浆,得到 6 个来源的空白血浆经处理后的色谱图;另分别取定量下限(LLOQ)样本、1 名受试者用药后收集的血浆样本,按上述“1.2.4 血浆样本处理”操作,分别得到相应的色谱图。其中 1 个来源的空白血浆、LLOQ 样本及 1 名受试者用药后收集的血浆样本经处理后的色谱图分别见图 2A、2B、2C。丙戊酸、内标 1-庚烷磺酸的保留时间分别约为 3.03、2.38 min。结果表明,丙戊酸和内标 1-庚烷磺酸的测定均不受空白血浆中内源性物质的干扰。

2.3 基质效应 6 个不同来源的空白血浆分别按“1.2.4 血浆样本的处理”操作后得到空白血浆基质,分别加入低、中、高浓度的 QC 溶液和内标溶液。以上述样本进样得到的峰面积除以相应浓度的 QC 溶液和内标溶液直接进样得到的峰面积求算血浆样本中的内源性物质对分析物丙戊酸、内标 1-庚烷磺酸的基质效应因子。结果表明,在血浆样本中,内源性物质分别对低、中、高浓度的丙戊酸的基质效应因子:(106.3±1.6)%、(103.1±1.0)%、(103.4±1.6)%,平均基质效应因子(104.3±2.0)%;在血浆样本中,内源性物质对内标 1-庚烷磺酸的基质效应因子(103.6±1.7)%。

2.4 线性范围、LLOQ 对照品血浆按“1.2.4 血浆样本的处理”操作进样分析后,以血浆中分析物丙戊酸的理论浓度为横坐标(X),分析物与内标峰面积的比值为纵坐标(Y),采用加权($W=1/\chi^2$)最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程即标准曲线,典型线性方程为 $Y=0.0517X+0.00256$, $r=0.9995$ 。血浆中丙戊酸的线性范围为 $0.800\sim80.0\ \mu\text{g/mL}$ 。

每分析批 6 样本的 LLOQ 样本按“1.2.4 血浆样本的处理”操作,连续 3 分析批,以各分析批的标准曲线来计算该分析批 LLOQ 样本的浓度。根据各分析批 LLOQ 样本的测定结果计算其相对误差(RE)及批内、批间的相对标准偏差(RSD),见表 1。结果表明,每个 LLOQ 样本的测定浓度和理论浓度的 RE 值均不超过 $\pm 20\%$,平均测定浓度和理论浓度的 RE 值不超过 $\pm 20\%$,批内和批间的 RSD 值不大于 20% 。测定血浆中丙戊酸的 LLOQ 为 $0.800\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.5 准确度、精密度 低、中、高每浓度各 6 个样本的 QC 样本按“1.2.4 血浆样本的处理”操作,连续 3 分析批,以每分析批的标准曲线来计算该分析批 QC 样本的浓度,根据各分析批 QC 样本的测定结果计算本试验方法的准确度与精密度,见表 1。每个 QC 样本的测定浓度和理论浓度的 RE 值均不超过 $\pm 15\%$,每一浓度的 QC 样本的平均测定浓度和理论浓度的 RE 值均不超过 $\pm 15\%$,且批内和批间 RSD 值均不大于 15% 。结果表明,方法的准确度和精密度均较高,重现性好。



注:A 表示空白血浆;B 表示 LLOQ 样本(浓度为 $0.800\ \mu\text{g/mL}$)加入内标溶液($35.7\ \mu\text{g/mL}$);C 表示 1 名受试者口服丙戊酸钠缓释片 500 mg 后 8 h 采集的血浆样本加入内标溶液($35.7\ \mu\text{g/mL}$)。

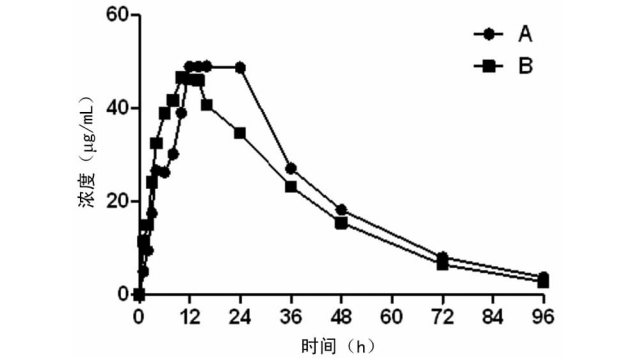
图 2 丙戊酸(I)和内标 1-庚烷磺酸(II)的典型 MRM 色谱图

表 1 测定人血浆中丙戊酸的准确度、精密度 ($n=18$)					
分析物	浓度($\mu\text{g/mL}$)		精密度 $RSD(\%)$		准确度
	加入量	测定量($\bar{x}\pm s$)	批内	批间	$RE(\%)$
丙戊酸	0.800	0.778 ± 0.031	2.9	8.6	-2.8
	2.000	2.040 ± 0.050	2.3	3.8	2.0
	30.000	30.200 ± 0.600	2.0	2.3	0.7
	64.000	63.100 ± 0.900	1.2	2.4	-1.4

2.6 提取回收率 低、中、高浓度每浓度各 6 个样本的 QC 样本按“1.2.4 血浆样本的处理”操作。另取空白血浆按“1.2.4 血浆样本的处理”操作后得到空白血浆基质,再加入低、中、高浓度的 QC 溶液及内标溶液。以前后两者进样得到的峰面积的比值,计算血浆样本中丙戊酸、1-庚烷磺酸的提取回收率。结果表明,在血浆样本中,低、中、高浓度的分析物丙戊酸的提取回收率: $(83.3\pm 4.1)\%$ 、 $(84.6\pm 1.8)\%$ 、 $(84.5\pm 0.6)\%$,平均提取回收率 $(84.1\pm 2.4)\%$;在血浆样本中,内标 1-庚烷磺酸的提取回收率 $(89.8\pm 1.4)\%$ 。

2.7 稳定性试验 低、中、高浓度每浓度各 3 个样本的 QC 样本按“1.2.4 血浆样本的处理”操作。分别进行血浆样本在室温环境下放置 10 h,经过 3 次反复冻融、处理后于自动进样器中室温环境下放置 24 h 及在 $-80\ ^\circ\text{C}$ 条件下长期冰冻放置 42 d 后血浆样本中丙戊酸的稳定性考察。测定浓度和理论浓度的 RE 值均在 $\pm 15\%$ 以内。结果表明,在室温放置、反复冻融、处理后于自动进样器中放置以及长期冰冻放置过程中,血浆样本中的丙戊酸稳定,各种贮存条件不影响本方法对样本的准确测定。

2.8 血浆样品检测结果 采用建立的 LC-MS/MS 方法对 12 名健康受试者血浆中丙戊酸的浓度进行测定。其中 1 名受试者口服丙戊酸钠缓释片、丙戊酸钠缓释片 500 mg 后,丙戊酸的血药浓度-时间曲线,见图 3。



注:A 表示丙戊酸钠缓释片;B 表示丙戊酸钠缓释片。
图 3 1 名受试者口服丙戊酸钠缓释片、丙戊酸钠缓释片 500 mg 后丙戊酸的药浓度-时间曲线

3 讨论

国内外测定人血浆中丙戊酸的方法主要采用液相色谱法^[3-5]、液相色谱-荧光检测法^[6-8]、气相色谱法^[9-10]等。由于丙戊酸在紫外区无特征吸收,以上方法多以环己烷羧酸、庚酸为内标,经历硫酸酸化,正己烷、乙醚等萃取试剂萃取,2-溴苯乙酮、4-溴甲基-6,7-二甲氧基香豆素等衍生化试剂和三乙胺衍生化后才能在紫外波长下有吸收^[4,6],前处理过程较复杂,其中萃取试剂和衍生化试剂选择不同,衍生试剂和三乙胺加入量不同,衍生化反应的温度、时间、使用气体和气体流量等衍生化反应条件不同,均会导致相应试验结果有较大差异^[4,11]。本试验采用沉淀蛋白法提取,前处理方法简单快速,避免衍生化反应条件对试验结果的影响;以乙腈为沉淀剂,1-庚烷磺酸为内标,沉淀剂和内标均简单易得。

另外,有文献报道采用液相色谱法测定,丙戊酸钠的最低检测限为 $1\ \text{mg/mL}$,内标和丙戊酸钠保留时间分别约为 5.5、8.8 min^[3]。本方法采用 LC-MS/MS 法测(下转第 1189 页)

- ori, 2009, Suppl 143(317):112-115.
- [10] Kienle S. Fever in cancer treatment: coley's therapy and epidemiologic observations[J]. Glob Adv Health Med, 2012, 1(1):92-100.
- [11] Hunziker S, Hügler T, Schuchardt K, et al. The value of serum procalcitonin level for differentiation of infectious from noninfectious causes of fever after orthopaedic surgery[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(1):138-148.
- [12] Worthington T, Dunlop D, Casey A, et al. Serum procalcitonin, interleukin-6, soluble intercellular adhesion molecule-1 and IgG to short-chain exocellular lipoteichoic acid as predictors of infection in total joint prosthesis revision[J]. Br J Biomed Sci, 2010, 67(2):71-76.
- [13] Sharma P, Patel K, Baria K, et al. Procalcitonin level for prediction of postoperative infection in cardiac surgery[J]. Asian Cardiovasc Thorac Ann, 2016, 24(4):344-349.
- [14] Nie H, Jiang D, Ou Y, et al. Procalcitonin as an early predictor of postoperative infectious complications in patients with acute traumatic spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2011, 49(6):715-720.
- [15] Schuetz P, Albrich W, Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future[J]. BMC Med, 2011, 9(1):107.
- [16] Carnino L, Betteto S, Loiacono M, et al. Procalcitonin as a predictive marker of infections in chemotherapy-induced neutropenia[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(4):611-615.
- [17] Auriti C, Fiscarelli E, Ronchetti MP, et al. Procalcitonin in detecting neonatal nosocomial sepsis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2012, 97(5):F368-F370.
- [18] Schuttrumpf S, Binder L, Hagemann T, et al. Utility of procalcitonin concentration in the evaluation of patients with malignant diseases and elevated C-reactive protein plasma concentrations[J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(4):468-473.
- [19] 林琳, 孙晓非, 谭肖鹏, 等. 血清降钙素原(PCT)鉴别肿瘤患者发热原因的价值探讨[J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(1):48-51.
- [20] 张爱敏, 张鹏. 动态监测 ICU 恶性肿瘤患者血清降钙素原水平的临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2011, 18(3):162-165.
- [21] Charles PE, Dalle F, Aho S, et al. Serum procalcitonin measurement contribution to the early diagnosis of candidemia in critically ill patients[J]. Intensive Care Med, 2006, 32(10):1577-1583.

(收稿日期:2016-12-18 修回日期:2017-02-12)

(上接第 1185 页)

定,专属性强,血浆用量少;灵敏度明显提高,保留时间明显缩短,能够满足丙戊酸的人体药代动力学研究的需要。

参考文献

- [1] Dutta S, Zhang YM, Lee LL, et al. Comparison of the bioavailability of 250 and 500 mg divalproex Sodium extended-release tablets in healthy volunteers[J]. Biopharm Drug Dispos, 2004, 25(8):353-357.
- [2] 邓芳. HPLC 法测定丙戊酸的血液浓度[J]. 中国当代医药, 2011, 18(16):49-50.
- [3] 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):2441-2442.
- [4] 沈陈军, 陈新贵, 王勇, 等. 改进 HPLC 法测定人血清中丙戊酸钠的浓度[J]. 皖南医学院学报, 2016, 35(1):18-21.
- [5] Zhang JF, Zhang ZQ, Dong WC, et al. A new derivatization method to enhance sensitivity for the determination of low levels of valproic acid in human plasma[J]. J Chromatogr Sci, 2014, 52(10):1173-1180.
- [6] 蔡金星, 翁立鹏, 郑清煌, 等. 丙戊酸钠缓释片的人体生物等效性研究[J]. 海峡药学, 2012, 24(7):221-224.
- [7] 崔一民, 孙培红, 刘玉旺, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定人血清中丙戊酸钠浓度[J]. 中国药房, 2005, 16(4):286-288.
- [8] Zhong Y, Jiao Z, Yu YQ. Simultaneous determination of mycophenolic acid and valproic acid based on derivatization by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20(4):319-326.
- [9] 荆照政, 林春花, 陈松, 等. 气相色谱法测定血清中丙戊酸钠浓度[J]. 中南大学学报(医学版), 2004, 29(5):614-616.
- [10] Deng CH, Li N, Ji J, et al. Development of water-phase derivatization followed by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry for fast determination of valproic acid in human plasma[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006, 20(8):1281-1287.
- [11] 张志国, 雷力力, 李冬, 等. HPLC 法测定丙戊酸钠血液浓度的衍生化影响因素考察[J]. 中国药房, 2010, 21(34):3204-3206.

(收稿日期:2016-12-16 修回日期:2017-02-10)