维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)01－0108－02

顶空气相色谱法测定二氯乙酸二异丙胺尿药浓度

蔡素芳，肖永红，余泽波

(重庆医科大学临床学院感染科，重庆 400016)

【摘 要】目的：建立顶空气相色谱法测定尿中二氯乙酸二异丙胺浓度。方法：Agilent DB－5MS 毛细管色谱柱(30m×0.25mm)，柱温：40℃保持 2min，以 5℃/min 升至 80℃保持 2min，再以 20℃/min 升至 200℃保持 8min；进样口温度 200℃，分流比 5:1；氢火焰检测器，检测温度 300℃；载气为高纯 N_2，流速 1ml/min，H_2 35ml/min，空气 350ml/min；内标仲丁醇。结果：标准曲线线性范围为 8～800μg/ml，尿中二氯乙酸二异丙胺提取回收率为 88.75%～98.06%，相对回收率为 97.36%～103.25%，日内和日间 RSD 分别为 2.95%～6.62%和 2.45%～5.61%，最低检测浓度为 2μg/ml。结论：该法操作简单，杂质干扰小，提取回收率高，适合于二氯乙酸二异丙胺尿药浓度的测定。

【关键词】二氯乙酸二异丙胺；尿药浓度；顶空气相色谱法

【中国图书分类法分类号】R917；R975⁺.5 【文献标识码】B 【收稿日期】2002－10－30

Determination of diisopropylamide dichloroacetate concentrations in urine by GC-HS

CAI Sufang, et al

(*Department of Infectious Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a method for determination of diisopropylamide dichloroacetate(DADA) concentrations in urine. *Methods*: GC－HS was applied to quantitative analysis. Using Agilent DB－5MS capillary column(30m×0.25mm), the column temperature was ascended from 40℃ to 200℃ according to program. Initial temperature was 40℃ and maintained 2 mins, then temperature rose to 80℃ at 5℃/min rate and maintained 2 mins, finally temperature rose to 200℃ at 20℃/min rate and maintained 8 mins. The injector temperature was 200℃. The detector temperature was 300℃. Nitrogen was used as carrier gas, and the flow rate was 1 ml/min. The flow rate of hydrogen was 35 ml/min. The flow rate of air was 350 ml/min. An internal standard was secondary butanol. *Results*: The calibration curve was linear within 8～800μg/ml. The recovery rate of the extraction were 88.75%～98.06%. The recovery rate were 97.36%～103.25%。Within－day and between－day RSD were 2.95%～6.62% and 2.45%～5.61% respectively. Detectable concentration limited was 2μg/mL. *Conclusion*: The GC－HS method is simple, reliable, and suitable for urine DADA concentration analysis.

【Key words】Diisopropylamide dichloroacetate; Drug concentration in urine; GC－HS

二氯乙酸二异丙胺为维生素 B_{15} 的活性成分，具有抗脂肪肝、改善肝功能、提高组织细胞呼吸及氧呼吸率的作用，对受损的肝细胞有促进其再生的作用，主要用于急慢性肝炎、脂肪肝、早期肝硬化及其它疾病引起的肝功能障碍[1～4]。对该药物的浓度测定国外已有报道，但所采用的 GS 法预处理复杂费时，提取回收率低[5]。本文所建立的方法操作简单，杂质干扰小，提取回收率高，适合于尿药浓度测定和药代动力学的研究。

1 试剂与方法

作者介绍：蔡素芳(1969－)，女，主治医师，硕士，主要研究方向：传染病及药物临床研究。

1.1 仪器

Agilent 6890N 型气相色谱仪，Agilent 7694E 型顶空分析仪，Agilent 1100 化学工作站。

1.2 试剂

二氯乙酸二异丙胺对照品(南昌弘益医药研究所提供，批号 000201，含量 99.6%)，内标仲丁醇(上海试剂一厂，AR，含量大于 99%)。氢氧化钠(重庆东方试剂研究所，AR)。

1.3 实验方法

1.3.1 顶空条件

根据二氯乙酸二异丙胺的沸点为 83.05℃，确定测定溶液的平衡温度为 100℃，定量管温度为 130℃，传输管温度为 150℃；然后按拟定的尿液样品的预处理方法制备相同的三份尿液样品，置于顶空仪中，分别平衡 20，30，40min 后，仪器

维普资讯 http://www.cqvip.com

自动取顶空气完成测定,结果显示平衡时间以 30min 为佳。

1.3.2 色谱条件

Agilent DB-5MS 毛细管色谱柱(30m × 0.25mm),柱温:40℃保持 2min,以 5℃/min 升至 80℃保持 2min,再以 20℃/min 升至 200℃保持 8min;进样口温度 200℃,分流比 5:1;氢火焰检测器,检测温度 300℃;载气为高纯 N_2,流速 1ml/min,H_2 35ml/min,空气 350ml/min,尾吹气 20ml/min。

1.3.3 尿液样品的预处理

1.3.3.1 氢氧化钠用量的确定

按拟定的尿液样品的预处理方法配制相同的 5 份尿液样品,分别加入 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0ml,然后在上述顶空条件和色谱条件下进行测定,结果显示 0.1mol/L 氢氧化钠溶液的用量为 0.6mL 时色谱峰面积最大。

1.3.3.2 尿液样品的预处理

取空白尿液 5ml 置于 20ml 顶空瓶中,加入一定量二氯乙酸二异丙胺对照品溶液 2mg/ml 的仲丁醇溶液 0.5ml,再加入 0.1mol/l 氢氧化钠溶液 0.6ml,用蒸馏水补至 10ml 定容,混匀后加盖密封待测。

1.3.4 测定方法

将盛有预处理后的尿液样品的顶空瓶放入顶空仪中,在上述顶空条件下平衡 30min,仪器自动取顶空气 1mL,注入色谱系统在上述色谱条件下完成测试,记录色谱图。

2 结 果

2.1 方法特异性

尿液样品色谱图见图 1,图谱表明仲丁醇和二氯乙酸二异丙胺色谱峰没有杂质峰干扰,其保留时间分别为 3.02min 和 3.62min。

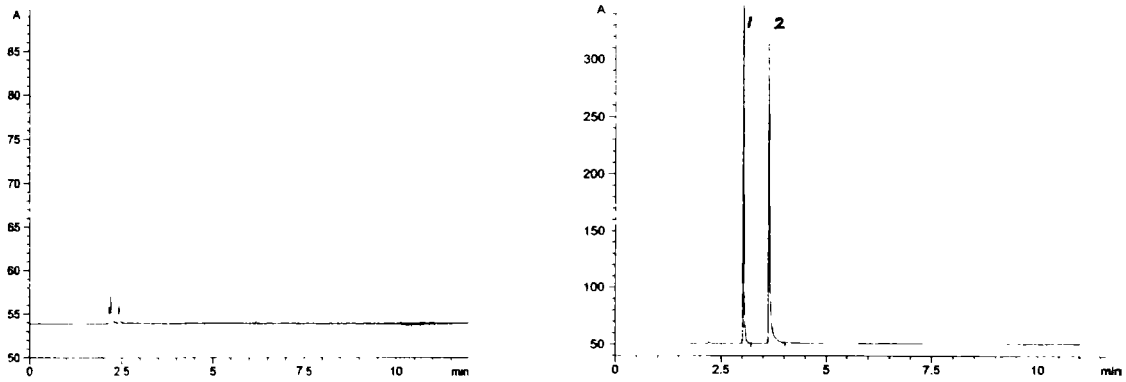


图 1 气相色谱图 A. 空白尿液 B. 尿液 + 对照品 1. 仲丁醇 2. 二氯乙酸二异丙胺

2.2 标准曲线的制备及最低检测浓度

于空白尿液中加二氯乙酸二异丙胺对照品溶液,使其尿药浓度分别为 8,20,40,80,200,400,600,800μg/ml,按上述预处理及测定方法进行测定。以二氯乙酸二异丙胺与内标峰面积比值(Y)对二氯乙酸二异丙胺尿药浓度(X)作回归计算,求得回归方程为:$Y = 0.0440 + 0.0098X$,$r = 0.9993$。当信噪比为 2 时,尿中二氯乙酸二异丙胺的最低检测浓度为 2μg/ml。

2.3 校正因子的测定

于空白尿液中分别加二氯乙酸二异丙胺对照品溶液和内标溶液,使其尿药浓度分别为 8,20,80,200,400,600,800μg/ml,按上述预处理及测定方法进行测定。分别以二氯乙酸二异丙胺和内标峰面积(Y)对其尿药浓度(X)作回归计算,求得回归方程分别为:$Y_{内标} = 7.2828 + 2.1297X_{内标}$,$Y_{DADA} = 13.0921 + 4.1006X_{DADA}$,$r$ 值分别为 0.9999 和 0.9999,以两条曲线的斜率之比求得校正因子为 0.5194。

2.4 稳定性试验

按尿液样品预处理方法制备一份尿液样品,使其尿药浓度为 20μg/ml,分别在 0,2,4,6,9,10,16h 各测定 1 次,以峰面积计算 RSD 为 3.89%,可见处理好的样品溶液至少在 16h 稳定性良好。

2.5 精密度和回收率试验

于空白尿液中加二氯乙酸二异丙胺对照品溶液,使尿药浓度分别为 8 400 800μg/ml,按上述预处理及测定方法进行测定。每一浓度在日内测定 5 次,求得日内 RSD 分别为 4.76%,2.95%,6.62% 和相对回收率分别为 98.32%,103.25%,97.36%;在连续 5 日内对 3 个浓度分别测定 1 次,求得日间 RSD 分别为 2.45%,3.58%,5.61%。

(下转第 112 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

本组手术死亡 4 例(7.3%),死亡率虽高于文献报道的成年人患者双瓣膜机械瓣替换术死亡率[1,2],但仍在可以接受的范围。其中 3 例心功能为Ⅳ级,1 例为Ⅲ级。因此该组患者手术死亡率偏高,可能与患者心功能差、手术时机较晚有关系。肺动脉高压,延长了重症监护时间。说明肺动脉高压仍然是该类患者手术的危险因素。

术后随访平均 4.6 年,最长 11 年。术后第 1 年死亡 1 例,其余随访的患者均存活。且心功能显著改善。术前心功能Ⅲ级以上占 90%。术后最后一次随访心功能结果Ⅰ级 84%,Ⅱ级 16%,无Ⅲ级、Ⅳ级。说明低龄患者双瓣膜机械瓣替换术后心功能仍能得到很好的恢复,患者的生活质量可以明显改善。术后患者左室内径明显缩小,也进一步证明低龄患者双瓣膜机械瓣替换术能获得较满意效果。本组 29 例长期回该院随访的患者,彩超检查均未发现有瓣膜相对狭窄的征像。

在本组术后随访的患者中,没有因严重出血等相关并发症而被迫停用抗凝药物的患者,即使是华发灵与阿斯匹灵合用的患者。因此,此类患者行机械瓣替换术,并不会因为术后需抗凝治疗而增加相关并发症,机械瓣替换术对此类患者仍是目前最好的选择。

本研究结果表明了 10～20 岁年龄段的风湿性二尖瓣及主动脉联合瓣膜病变患者,行双瓣膜机械瓣替换,是一种并发症少,效果理想的手术。然而,对该类患者手术 10 年以后的效果还有待进一步观察。对 10 岁以下的联合瓣膜病变患者,其治疗方式也有待进一步探讨。

参 考 文 献

[1] 胡盛寿,孙晓刚,郭加强,等. 2261 例二尖瓣及主动脉联合瓣膜置换术临床结果与随访[J]. 中华胸心血管外科杂志 2002;18(1):11－13.

[2] Stanley John, Edwin Ravikumar, Coli N. John, et al. Bashi. 25－yer experience with 456 combined mitral and aortic valve replacement for rheumatic heart disease[J]. AnnThorac Surg, 2000;69:1167－1172.

[3] Weinstein GS, Mavroudis C, Ebert PA. Preliminary experience with aspirin for anticoagulation in children with prosthetic cardiac valves[J]. AnnThorac Surg, 1982;33:549－553.

(上接第 109 页)

2.6 提取回收率

于空白尿液中加二氯乙酸二异丙胺对照品溶液,使尿药浓度分别为 8,400,800μg/ml,同时制备相同浓度的二氯乙酸二异丙胺对照品溶液各一份,按上述预处理及测定方法进行测定,以尿液样品与对照品样品的药物峰面积之比,计算提取回收率分别为 88.75%,98.06%,93.27%。

3 讨 论

二氯乙酸二异丙胺在碱性条件下离解成二氯乙酸和二异丙胺,其中二异丙胺为该药的活性成分,其分子量小,易挥发,可采用 GC 法测定其浓度。YangJM 等[5]采用的 GC 法预处理复杂费时,提取回收率低。而本文所采用的方法具有以下优点:(1)预处理简单,只需加入适量碱液即可。(2)杂质峰干扰小,药物峰、内标峰与杂质峰能完全分离。(3)相对回收率在 95%～110%之间。(4)日内和日间 RSD 均小于 10%。(5)提取回收率高,在 80%以上。因此本法更适合于二氯乙酸二异丙胺尿药浓度测定和药代动力学的研究。

参 考 文 献

[1] Schneider D, Helwig V, Stanied K, et al, Studies on the chemical identity and biological functions of pangamic acid[J]. Arzneim. －Forsch. /Drug Res, 1999;49(I):335－343.

[2] 王泽民,主编. 当代结构药物全集[M]. 北京:北京科学技术出版社,1993;1739－1739.

[3] Krushaar A, Schunk R, Thym F. Pharmacology of diisopropylamine dichloroacetate[J]. Arzneimittel－Forsch, 1963;13(1):109－113.

[4] Stackpoole P. Review of the pharmacology and therapeutic effects of diisopropylamine dichloroacetate[J]. J. Clin. Pharmac, 1969;9(2):282－291

[5] Yang JM, Woods WE, Weckman TW, et al. The detection, pharmacokinetics and behavioral effects of diisopropylamine dichloroacetate(DADA) in the horse: a preliminary report[J] Gen Pharmac, 1988;19(5):683－688.