

## · 论著 ·

## 用疏水改性的白及多糖制备载紫杉醇纳米粒并对其表征

成念<sup>1</sup>, 赵文萃<sup>2</sup>, 张琦<sup>2</sup>, 王艳萍<sup>2</sup>, 韩丹<sup>2</sup>, 肖轩昂<sup>2</sup> (1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000; 2. 解放军 208 医院, 吉林 长春 130062)

**[摘要]** **目的** 讨论白及多糖作为药物递送载体的可行性。**方法** 制备疏水性胆甾醇琥珀酰基白及多糖(CHSB)后,以紫杉醇(PTX)为模型药物,采用透析法制备载药纳米粒子,然后在透射电镜(TEM)下观察其形态;用动态光散射仪(DLS)检测其粒径、粒径分布和 Zeta 电位;用高效液相色谱法(HPLC)测定其包封率和载药量,并考察其体外释放情况;采用差示量热扫描法(DSC)确证药物在载药纳米粒子中的存在形式;采用 MTT 法考察纳米粒子的体外抗肿瘤活性,用荧光标记法观察肝癌细胞 QGY-7703 对纳米粒子的摄取情况。**结果** 制备的纳米粒呈规则球形,粒度分布均匀,药物包载于纳米粒内部,载药量和包封率在一定范围受 CHSB 的影响,载药纳米粒对肝癌细胞的杀伤性强于游离药物,在细胞内可观察到罗丹明 B 标记的纳米粒呈现的荧光。**结论** CHSB 作为难溶性药物载体具有较高的可行性,因此可作为一种极具潜力的纳米载体材料。

**[关键词]** 白及多糖;疏水改性;紫杉醇;纳米粒;抗肿瘤

**[中图分类号]** R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)01-0048-06

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.012

## Paclitaxel loaded nanoparticles with cholesterol succinyl bletilla striata polysaccharide as a carrier

CHENG Nian<sup>1</sup>, ZHAO Wencui<sup>2</sup>, ZHANG Qi<sup>2</sup>, WANG Yanping<sup>2</sup>, HAN Dan<sup>2</sup>, XIAO Xuanang<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the feasibility of bletilla striata polysaccharide as a drug delivery material. **Method** With hydrophobic cholesterol succinyl bletilla striata polysaccharide (CHSB) as the carrier, the model drug paclitaxel (PTX) loaded nanoparticles were prepared via dialysis method. The morphology of nanoparticles was observed by Transmission Electron Microscope (TEM). The particle size, distribution and zeta potential were characterized by Dynamic Light Scattering instrument (DLS). The entrapment efficiency, drug loading and in vitro release were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used to confirm the drug form in the drug loaded nanoparticles. The *in vitro* antitumor activity of nanoparticles was assayed by MTT. The uptake of nanoparticles by QGY-7703 liver cancer cells was observed by fluorescence labeling method. **Results** The prepared nanoparticles had spherical shape with uniform particle size distribution. The drug was loaded in the interior of the nanoparticles. Drug loading and encapsulation efficiency were affected by the CHSB in certain range. The cytotoxicity of drug loaded nanoparticles on liver cancer cells was stronger than the free drug. The fluorescence of Rhodamine B labeled drug nanoparticles were observed in the cells. **Conclusion** Cholesterol succinyl bletilla striata polysaccharide (CHSB) is highly feasible as an insoluble drug carrier. It can be used as a potential Nano carrier material.

**[Key words]** bletilla striata polysaccharide; hydrophobic modification; Paclitaxel; nanoparticles; antitumor

白及多糖(bletilla striata polysaccharide, BSP)是中药白及中分离制备得到的一种具有确定组成和结构的新型葡萄甘露聚糖<sup>[1]</sup>。结构中含有丰富的活性羟基,亲水性好。引入疏水性的胆甾醇基,可使其呈两亲性,并以亲水性弱的紫杉醇为模型药物,运用

透析法制备载药纳米粒子,并对其进行表征,如其形态、粒径、Zeta 电位、包封率及载药量、体外释放、细胞毒性试验和细胞摄取试验等。

### 1 仪器与试剂

CQX25-06 超声清洗器(上海必能信超声公司);CP225D 微量电子天平(北京赛多利斯仪器系统公司);SHZ-D 循环水式真空泵(巩义予华仪器有限公司);79-2 型双向磁力搅拌器(江苏荣华仪器制

**[作者简介]** 成念,硕士研究生.E-mail:809752613@qq.com

**[通讯作者]** 张琦,博士,副主任药师,研究方向:药物新剂型.E-mail:zqi8229@126.com

造有限公司);ZK-82B型真空干燥器箱(上海实验仪器总厂);UH-500B超声波细胞破碎仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);98-1-C型数字控温电热套(天津泰斯特仪器有限公司);FD-1B-50压盖型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);透析袋( $M_w$ 10000,上海源叶生物科技有限公司);LC-10AVT高效液相色谱仪(PHLC,日本岛津);透射电子显微镜JEM-1400(日本电子);NanoZS激光粒度分析仪(Malvern公司);Pyris Diamond TG/DTA热重/差热综合分析仪(美国PE公司);THZ-82A涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);细胞共培养板(Corning Incorporated);细胞培养箱(Heal Force);激光共聚焦显微镜(德国蔡司);超净工作台(苏州净化设备公司)。

白及多糖(实验室自制,相对分子质量 $1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ );琥珀酸酐(天津市光复精细化工研究所);胆甾醇(北京鼎国生物技术公司);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC,上海源叶生物科技有限公司);4-二甲氨基吡啶(DMAP,天津市凯玛生化科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO,天津富宇精细化工有限公司);紫杉醇原料药(PTX,江苏红豆杉生物技术科技股份有限公司);无水乙醇(天津富宇精细化工有限公司);乙腈(Fisher Scientific公司);罗丹明B(Sigma公司);紫杉醇对照品(南京标科生物有限公司);pH7.4磷酸缓冲液(PBS,实验室自配);十二烷基硫酸钠(天津市福晨化学试剂厂);乙酸乙酯(天津市福晨化学试剂厂);噻唑兰(MTT, Sigma公司);Hoechst 33342(Scientific Research Special公司);1640培养基(Gibco公司);胰酶(Gibco公司);PBS(Gibco公司);新生小牛血清(浙江天航生物技术有限公司);肝癌细胞QGY-7703(上海研域生物工程有限公司);水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

**2.1 白及多糖疏水改性反应** 取一定量的胆甾醇琥珀酸酐(CHS)、EDC和DMAP,其中CHS:EDC:DMAP=1:1.2:1(mol/mol/mol,EDC、DMAP为催化剂),溶解于20 ml的DMSO中,室温搅拌,反应活化2 h;将活化反应液滴入溶有0.5 g白及多糖的50 ml DMSO溶液中,反应48 h,停止反应。将反应液滴入500 ml无水乙醇中,析出白色沉淀,抽滤,分别用适量的乙醇、四氢呋喃和乙醚洗涤产物,80℃下真空干燥,即得胆甾醇琥珀酰基白及多糖(CHSB)<sup>[2]</sup>。改变CHS的用量,可制备出多种取

代度(DS)的CHSB,本研究制备取代度分别为6.55%、7.30%、8.95%的CHSB进行实验研究<sup>[2]</sup>。

**2.2 紫杉醇纳米颗粒的制备** 磁力搅拌下,将PTX的DMSO溶液(3 mg/ml)3 ml分别缓慢加入到取代度为6.55%、7.30%、8.95%的CHSB的DMSO溶液(1.5 mg/ml)20 ml中,搅拌1 h后,缓慢加入120 ml蒸馏水,继续搅拌24 h。再将溶液转入透析袋( $M_w$ 10000)于蒸馏水中透析24 h。所得纳米粒子溶液于冰浴下采用探头超声仪小功率超声2次,每次5 min,将得到的稳定无沉淀的纳米粒子溶液冷冻干燥后,得到取代度分别为6.55%、7.30%、8.95%的载紫杉醇纳米粒。室温保存备用<sup>[3]</sup>。

### 2.3 载紫杉醇纳米颗粒的表征

**2.3.1 形态** 将新制备的或冻干后复溶分散的空白和载药纳米粒子(以DS 6.55%为例)溶液经适当稀释后滴在具有碳支持膜的铜网上,滤纸沥干,自然干燥后于透射电镜(TEM)下观察<sup>[4]</sup>。

**2.3.2 粒径及Zeta电位** 将新制备的或冻干后复溶分散的载药纳米粒子溶液倒入比色杯中,置激光粒度分析仪(DLS)中检测,每个样品重复3次。

**2.3.3 纳米颗粒的载药量和包封率** 通过HPLC测定。称取3 mg载药纳米粒,加入3 ml乙腈,细胞破碎仪探头超声15 min(仪器工作程序为“2 s,2 s”)使得纳米粒子结构被充分破坏,过0.45  $\mu$ m微孔滤膜,续滤液作为供试品溶液。每次进样20  $\mu$ l,测定样品的峰面积,结合紫杉醇的标准曲线计算载药量和包封率(载药量=纳米粒所含药量/纳米粒总重量 $\times 100\%$ 、包封率=纳米粒所含药量/投药量 $\times 100\%$ )。色谱条件:色谱柱为WondaSil™ C<sub>18</sub>柱(150 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m),流速为1.0 ml/min,紫外检测波长为227 nm,流动相为乙腈-水(60:40, V/V)<sup>[5,6]</sup>。

**2.3.4 药物在载体中的存在形式** 用DSC表征。分别称取少量PTX、CHSB、空白纳米粒子及载药纳米粒子,以10℃/min升温,加热样品至220℃,记录样品DSC曲线。仪器使用前用钢校正,在氮气保护下测定样品。

**2.3.5 体外释放情况** 精密称取载药纳米粒子3 mg,加入5 ml透析介质(pH7.4 PBS+0.1% SDS)溶解后,转移至透析袋( $M_w$ 10000)中,浸于20 ml透析介质中。于(37 $\pm$ 1)℃下,100 r/min振荡。分别在0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、72、96 h吸取透析液1 ml,同时补充1 ml同温度的透析介质。HPLC法测定含量,根据标准曲

线计算 PTX 含量,计算释放百分率。样品处理方法:加入 2 ml 乙酸乙酯,涡旋 5 min,静置分层后取上层液体,重复 2 次,合并萃取液,于真空下挥干溶剂。进样前,加入 100  $\mu$ l 乙腈复溶,混匀。

**2.4 细胞摄取试验** 用 PBS 缓冲液分别配制浓度为 12.5  $\mu$ g/ml 的罗丹明 B 标记的 3 种不同取代度的载药纳米粒子溶液和浓度为 5  $\mu$ g/ml 的 Hoechst 33342 溶液,避光保存,备用。取适宜大小的盖玻片放入 24 孔板中,将肝癌细胞 QGY-7703 以每孔约 50 000 个的密度接种于 24 孔板中,放入培养箱中孵育过夜,使细胞贴壁。给予罗丹明 B 标记的载药纳米粒子溶液 12.5  $\mu$ l,置培养箱 37  $^{\circ}$ C 下培养 3 h,用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,去除未被细胞吞噬的纳米粒子,然后加入 4% 的甲醛溶液于 4  $^{\circ}$ C 固定 30 min,再用预冷的 PBS 洗涤,重复 3 次。每孔加入 300  $\mu$ l Hoechst 33342 溶液(细胞核染料),放入培养箱 37  $^{\circ}$ C 孵育 5 min,对细胞核进行染色。孵育完毕,快速吸除染液,再用预冷的 PBS 冲洗 3 遍,除去多余的染料。最后将盖玻片置于载玻片上,依次调节激光共聚焦显微镜的波长为 405、488 nm,其中 405 nm 为 Hoechst 33342 的激发波长,488 nm 为罗丹明 B 的激发波长,并分别拍照。

**2.5 体外细胞毒性试验** 用 PBS 缓冲液配制浓度分别为 6.25 $\times$ 10<sup>-1</sup>、1.25 $\times$ 10<sup>-2</sup>、2.5 $\times$ 10<sup>-2</sup>、5 $\times$ 10<sup>-2</sup>、1 $\times$ 10<sup>-3</sup>、2 $\times$ 10<sup>-3</sup>、4 $\times$ 10<sup>-3</sup>、8 $\times$ 10<sup>-3</sup>  $\mu$ g/ml 的空白纳米粒子溶液,浓度分别为 6.25 $\times$ 10<sup>-5</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-4</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-3</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-2</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-1</sup>、6.25、6.25 $\times$ 10、6.25 $\times$ 10<sup>2</sup>  $\mu$ g/ml 的 PTX 溶液(加入不超过总体积 1% 的 DMSO 助溶)及相同浓度的 3 种不同取代度的载药纳米粒子溶液(按 PTX 含量计)和浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液,备用。将处于指数生长期的肝癌细胞 QGY-7703 接种于 96 孔板中,每孔约 5000 个细胞,于 37 $^{\circ}$ C 下在 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜,待细胞完全贴壁后,分别加入 2  $\mu$ l 上述空白纳米粒子溶液、PTX 溶液及载药纳米粒子溶液,使得空白纳米粒子终浓度分别为 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80  $\mu$ g/ml,PTX 溶液及载药纳米粒子终浓度分别为 6.25 $\times$ 10<sup>-7</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-6</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-5</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-4</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-3</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-2</sup>、6.25 $\times$ 10<sup>-1</sup>、6.25  $\mu$ g/ml,并设空白对照组。将 96 孔板放入培养箱继续培养 24、48 h。取出 96 孔板,每孔加入 20  $\mu$ l MTT 溶液,加毕,放入培养箱中孵育 4 h 后取出,去除培养基,加入 150  $\mu$ l DMSO,轻轻振摇混匀。采用酶标仪在 490 nm 波长下检测各孔吸光度值 A,计算细胞存活率和 IC<sub>50</sub>。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 纳米粒子的表征

**3.1.1 形态学表征** 纳米颗粒的表面形态如图 1 所示,可见制备的纳米粒子外观较好,基本上呈球状分布。

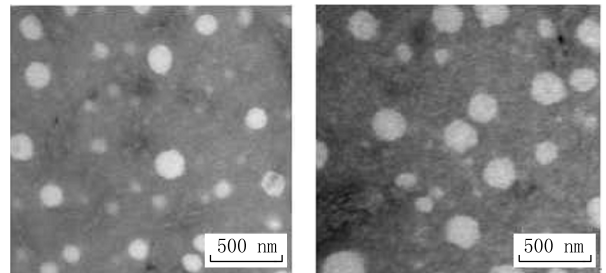


图 1 空白(左)、载药(右)纳米粒子形态

**3.1.2 纳米颗粒的粒径、Zeta 电位、载药量和包封率** 见表 1。

表 1 纳米颗粒的粒径、Zeta 电位、载药量和包封率

CHSB 的取代度(%)	粒径分布(nm)	Zeta 电位(mV)	载药量(%)	包封率(%)
6.55	100~250	-5.7	12.99	59.25
7.30	120~300	-8.87	17.72	72.06
8.95	90~350	-3.37	14.07	53.47

所制备纳米粒子的 Zeta 电位绝对值在 3~9 之间。取代度为 7.30% 的纳米粒粒径稍大于 6.55% 的载药纳米粒,载药量与包封率在 3 种纳米粒中最高;取代度为 8.95% 的纳米粒粒径分布最广,并且载药量与包封率较低,可能是因为疏水性取代基多,疏水性较强,不利于 CHSB 自聚集成纳米粒子,对药物包裹也比较少。

**3.1.3 DSC 表征结果** 在 3 种不同取代度的纳米粒中选取取代度为 6.55% 的 CHSB 进行 DSC 表征实验,见图 2。

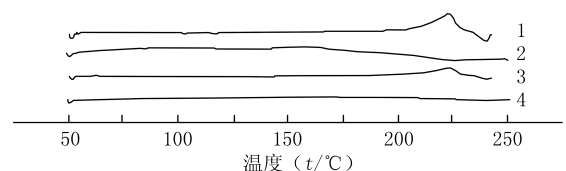


图 2 PTX、空白纳米粒子及载药纳米粒子的差示量热扫描(DSC)表征结果

1.PTX;2.空白纳米粒子;3.PTX-空白纳米粒子(3:10);4.载药纳米粒子

如图所示,PTX 在 215  $^{\circ}$ C 出现尖锐的熔点吸热

峰,空白纳米粒子无明显吸热峰,载药纳米粒子的图谱显示 PTX 的特征几乎消失,而 PTX-空白纳米粒子(3:10)的物理混合物的图谱上 PTX 在 215 °C 的吸收峰只是有所减弱。DSC 图谱表明 PTX 与 CHSB 之间并非是简单的物理混合,而是药物被包载于载体材料内部。

**3.1.4 药物的体外释放** 3种不同取代度的载药纳米粒的体外释放,见图3。

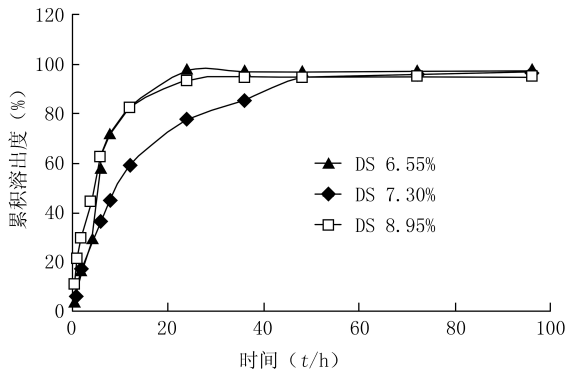


图3 不同取代度 CHSB 制备的载药纳米粒子的体外释放情况

从试验数据可以看出,药物的释放分为两个阶段,即快速释放阶段和缓慢释放阶段。3个取代度的 CHSB 制备的载药纳米粒子在 1 h 内释放量均小于 40%,取代度为 7.30% 的 CHSB 制备的载药纳

米粒子缓释效果最好,取代度为 8.95% 的 CHSB 制备的载药纳米粒子在前期释放最快。3种载药纳米粒子在 96 h 内释放量均达到 95.0% 以上。

**3.2 细胞摄取试验** 通过激光共聚焦显微镜观察纳米颗粒在细胞内的内吞和分布,见图4。

罗丹明 B (Rhodamine B) 标记的载药纳米粒子与 QGY-7703 细胞共孵育 3 h,在激发波长 488 nm 下可观察到明显的红色荧光(见图4, Rhodamine B 项)。经 Hoechst 33342 细胞核染色后在 405 nm 下,可观察到蓝色荧光(见图4, Hoechst 33342 项)。将前两个通道重叠后,观察到红色荧光在蓝色荧光周围(见图4, Over lay 项),说明纳米颗粒主要分布在细胞核周围,纳米颗粒被内吞进入了 QGY-7703 细胞。

**3.3 体外细胞毒性试验** 细胞毒性试验显示,所制备的空白纳米粒子在设定的浓度范围内,细胞活性接近 100%,几乎无毒性(见图5),表明载体材料 CHSB 具备良好的生物安全性,适宜于作为药物载体。载药纳米粒子在设定浓度范围内对 QGY-7703 细胞有杀伤性,且呈剂量依赖性,杀伤力随浓度的增大而增强,随时间的延长而增大,载药纳米粒子相对于同浓度的药物溶液来说,细胞毒性更大(见图6),这可能是由于细胞对纳米粒子的摄取比游离药物多,载药纳米粒比游离药物更易进入细胞内。另外

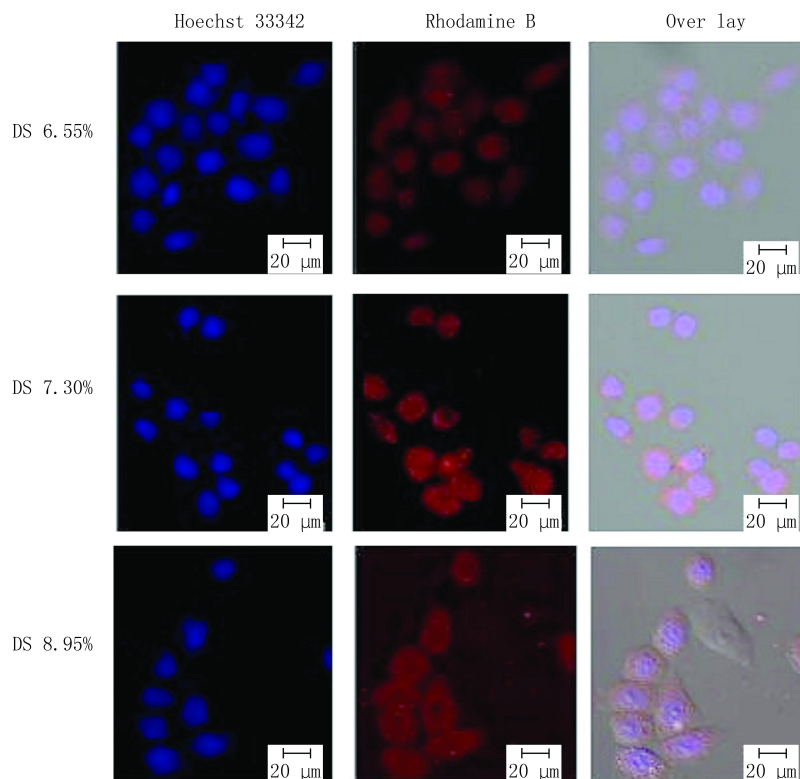


图4 QGY-7703 细胞对载药纳米粒子摄取的电镜图

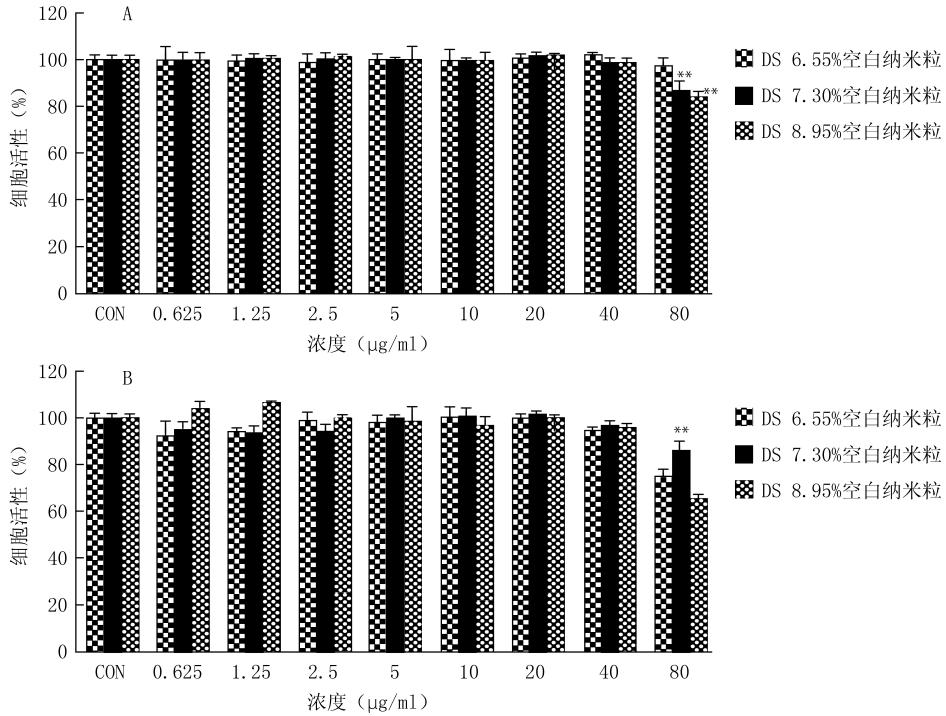


图5 空白纳米粒子对 QGY-7703 细胞的活性影响

(A 为 24 h 时;B 为 48 h 时, n=6) \* P<0.05, \*\* P<0.01, 与空白对照组 (CON) 比较

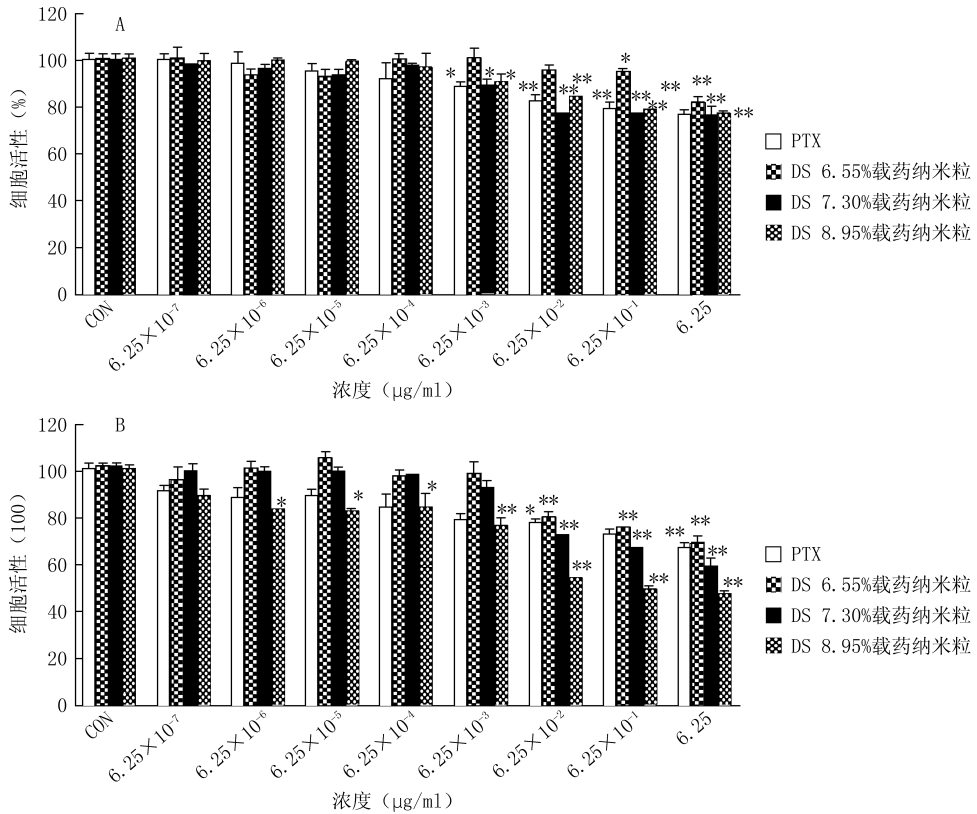


图6 载药纳米粒子对 QGY-7703 细胞的活性影响

(A 为 24 h 时;B 为 48 h 时, n=6) \* P<0.05, \*\* P<0.01, 与空白对照组 (CON) 比较

通过 SPSS 22 统计软件得到表 2, 可知 3 种 CHSB 的 IC<sub>50</sub> 远小于游离紫杉醇, 其中取代度为

8.95% 的载药纳米粒抑制肿瘤效果最好, IC<sub>50</sub> 为 0.88 μg/ml。

表2 PTX与3种不同取代度载PTX  
纳米粒的IC<sub>50</sub>值(48 h, n=6)

	PTX	SD 6.55%	SD 7.30%	SD 8.95%
IC <sub>50</sub> (μg/ml)	8 657.44	25.81	7.77	0.88

#### 4 结论

本实验合成了3种取代度分别为6.55%、7.30%、8.95%的CHSB,并利用透析法制备载PTX-CHSB纳米颗粒。纳米颗粒在透射电镜(TEM)下观察到近似球形,置激光粒度分析仪(DLS)中检测到颗粒粒径分布较窄。载药量及包封率与白及多糖上胆甾醇琥珀酰基的取代度有一定的关系,在取代度为7.30%时载药量与包封率最大,分别为17.72%和72.06%。在DSC下可以看出药物包载于载体材料中,并非是简单的物理混合。在体外释放实验中载药纳米粒均表现出了一定的缓释能力,无突释现象;在体外细胞摄取试验中显示罗丹明B标记的纳米粒子被内吞进了细胞内。体外药效学结果显示:所选用载体材料具有较好的生物安全性,所制备的载药纳米粒对肿瘤细胞有一定的杀伤能力,且与同浓度的药物溶液相比,杀伤性更大,间接表明了载药纳米粒子更容易被细胞摄取。

本实验从制剂学及体外药效学角度考察了疏水

改性后的白及多糖作为载药纳米粒的载体材料的可行性,为难溶性药物的新剂型研究提供了一定的基础。

#### 【参考文献】

- [1] 孙达锋,史劲松,张卫明,等.白及多糖胶研究进展[J].食品科学,2009,30(3):296.
- [2] 毕亚静,王艳萍,刘福强,等.胆甾醇琥珀酰基白及多糖的制备及其理化性质研究[J].药学实践杂志,2013,31(3):220-222.
- [3] 赵雪竹,刘洋,王艳萍,等.原料纯度对白及多糖疏水改性反应取代度的影响[J].药学实践杂志,2015,33(3):221-225.
- [4] 杨文智.疏水改性普鲁兰多糖及其自组装载药纳米粒的研究[D].北京:北京协和医学院,2009.
- [5] 李磊.胆固醇基-羧甲基可德兰衍生物自聚集纳米粒子的制备以及作为抗肿瘤药物载体的研究[D].北京:中国协和医科大学,2010.
- [6] Gupta PN, Jain S, Nehate C, et al. Development and evaluation of paclitaxel loaded PLGA: poloxamer blend nanoparticles for cancer chemotherapy [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 69: 393-399.
- [7] Thomas RG, Moon MJ, Lee S, et al. Paclitaxel loaded hyaluronic acid nanoparticles for targeted cancer therapy: In vitro and in vivo analysis [J]. Int J Biol Macromol, 2015, 72: 510-518.

〔收稿日期〕 2016-08-27 〔修回日期〕 2016-11-08

〔本文编辑〕 顾文华

(上接第47页)

- [12] 储小曼,郭岑,张丽芬.丙戊酸的代谢特征与其肝毒性的相关性[J].中国医学院杂志,2013,33(19):1611-1614.
- [13] Surendraddoss J, Chang TKH, Abbott FS. Assessment of the role of in situ generated (E)-2, 4-diene-valproic acid in the toxicity of valproic acid and (E)-2-ene-valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. Toxicol Appl Pharm, 2012, 264(3): 413-422.
- [14] Kiang TKL, Teng XW, Karagiozov S, et al. Role of oxidative metabolism in the effect of valproic acid on markers of cell viability, necrosis, and oxidative stress in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. Toxicol Sci, 2010, 118(2): 501-509.
- [15] 刘爱旗,夏璐. CCK-8法与MTT法检测兔成纤维细胞活性的比较研究[J].中国医学创新,2013,10(2):12-13.
- [16] 陈海鹰,曹雨诞,颜晓静,等.醋制降低京大戟对人正常肝细胞L02的毒性及机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(6): 866-870.
- [17] 王灿,马虹英,王方杰,等.丙戊酸肝毒性的早期预警及预防

研究状况[J].中国临床药理学杂志,2015,31(2):150-154.

- [18] Abarikwu SO, Farombi EO, Pant AB. Biflavonone-kolaviron protects human dopaminergic SH-SY5Y cells against atrazine induced toxic insult [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(4): 848-858.
- [19] Lee MS, Lee YJ, Kim BJ, et al. The relationship between glucuronide conjugate levels and hepatotoxicity after oral administration of valproic acid [J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(7): 1029-1035.
- [20] Chen ZJ, Wang XD, Wang HS, et al. Simultaneous determination of valproic and 2-propyl-4-pentenoic acid for the prediction of clinical adverse effects in Chinese patients with epilepsy [J]. Seizure, 2012, 21: 110-117.
- [21] Gao S, Miao H, Tao X, et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabolites in human plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(21): 1939-1944.

〔收稿日期〕 2016-05-31 〔修回日期〕 2016-09-29

〔本文编辑〕 顾文华