

建立同时测定人血浆中拉莫三嗪和奥卡西平的HPLC法

朱雪萍^{1*}, 陈晓萌², 秦玉花², 赵宁民², 马爱玲², 赵淑娟², 蔡海霞²(1. 郑州大学第五附属医院, 郑州 450052; 2. 郑州大学河南省人民医院, 郑州 450002)

中图分类号 R969.1; R971*.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)06-0526-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.06.18

摘要 目的: 建立同时测定人血浆中拉莫三嗪和奥卡西平的方法。方法: 采用高效液相色谱法进行测定。以氯唑沙宗为内标, 色谱柱为Dikma C₁₈, 流动相为甲醇-水-三氟乙酸(40:60:0.000 5), 流速为1 ml/min, 检测波长为240 nm。结果: 拉莫三嗪、奥卡西平血药浓度均在0.5~50 μg/ml范围内线性关系良好(r 分别为0.994 0、0.992 5), 提取回收率分别为92.50%~95.33%、88.78%~93.12%。拉莫三嗪、奥卡西平3种质量浓度(25、10、2 μg/ml)的5个平行样品连续测定的RSD分别为4.01%、6.15%、4.64%和3.05%、4.27%、9.01%。结论: 本方法操作简单、回收率高、精密度好, 可以同时用于测定拉莫三嗪和奥卡西平的血药浓度。

关键词 拉莫三嗪; 奥卡西平; 高效液相色谱法; 血药浓度

Establishment of HPLC Method for Simultaneous Determination of Lamotrigine and Oxcarbazepine in Human Plasma

ZHU Xue-ping¹, CHEN Xiao-meng², QIN Yu-hua², ZHAO Ning-min², MA Ai-ling², ZHAO Shu-juan², CAI Hai-xia²(1. The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of plasma concentrations of lamotrigine and oxcarbazepine. METHODS: HPLC method was adopted using chlorzoxazone as internal standard. The determination was performed on Dikma C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water-trifluoroacetic acid (40:60:0.0005) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was 240 nm. RESULTS: The linear ranges of lamotrigine and oxcarbazepine were both 0.5-50 μg/ml ($r=0.994\ 0$ and $r=0.992\ 5$); extraction recoveries were 92.50%-95.33% and 88.78%-93.12%. RSD of continuous sampling for 5 parallel samples of three concentrations of lamotrigine and oxcarbazepine (25, 10, 2 μg/ml) were 4.01%, 6.15%, 4.64% and 3.05%, 4.27%, 9.01%, respectively. CONCLUSION: The method is simple, with high recovery and good precision. It is suitable for the determination of lamotrigine and oxcarbazepine concentration in plasma.

KEY WORDS Lamotrigine; Oxcarbazepine; HPLC; Plasma concentration

统计分析, 比较不同性别受试者的药动学参数, 结果 c_{max} 、 $t_{1/2}$ 等差异均无显著性($P>0.05$)。

表2 健康志愿者单剂量口服400 mg 苯扎贝特片后主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of Bezafibrate tablets 400 mg in healthy volunteers after oral single dose ($\bar{x} \pm s, n=20$)

药动学参数	男性	女性	平均数值
$t_{1/2}$, h	2.06 ± 0.33	2.03 ± 0.27	2.05 ± 0.31
C_{max} , μg/ml	11.41 ± 3.24	11.06 ± 3.06	11.24 ± 3.15
t_{max} , h	1.93 ± 0.29	2.07 ± 0.38	2.02 ± 0.36
V_d/F , L/kg	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.05
CL/F, L/(h·kg)	7.73 ± 0.41	7.52 ± 0.28	7.68 ± 0.31
AUC _{0-12h} , μg·h/ml	35.46 ± 9.26	39.36 ± 9.63	37.54 ± 9.45
AUC _{0-∞} , μg·h/ml	40.34 ± 10.35	39.57 ± 9.28	39.46 ± 9.82

2.12 安全性评价

20名健康受试者中, 未发生明显不良反应, 说明受试者在试验期间对单次口服苯扎贝特片耐受良好。

3 讨论

参考文献^[1-3], 生物样品的提取回收率一般较低, 本试验考查了苯扎贝特的多种提取方法, 比如高氯酸等蛋白沉淀剂等, 最终选择乙醚-正己烷(2:1)为提取液, 较好地保证了苯扎贝特具有较高的提取回收率。最终确立的色谱检测条件和血浆提取

* 副主任药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药物分析、药品不良反应监测。电话: 0371-55615758。E-mail: 1296647908@qq.com

方法操作简便快速、准确性高、专一性强、成本低、检测灵敏度理想、回收率高、最低定量下限为0.1 μg/ml, 适合苯扎贝特的人体药动学研究。

参考文献^[1-4], 苯扎贝特在碱性条件下非常容易发生降解, 在氧化和酸性条件下也会发生降解。经筛选, 采用甲醇-0.01 mol/L 乙酸钠缓冲液(用冰乙酸调pH为4.0)-0.5 mol/L 四丁基溴化铵(65:35:0.2, V/V/V)作为本次试验的流动相, 可以有效地抑制苯扎贝特解离, 同时又保证苯扎贝特与内标和血浆内源物的分离度符合要求, 减少色谱峰拖尾。

20名健康志愿者单剂量口服400 mg 苯扎贝特片后, 血药浓度经DAS程序软件进行处理, 以AIC值作为模型识别指标, 结果符合二室开放模型; 药动学参数与国内外文献报道基本相符, 性别因素对本品药动学无明显影响($P>0.05$)。

参考文献

- [1] Castoldi D, Monzani V, Tonfanetti O. Determination of bezafibrate in human plasma and urine by high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogo Biomed Appl*, 1985, 344(8): 259.
- [2] 肖峰, 吴成义, 陶春蕾, 等. 苯扎贝特胶囊的人体生物利用度和生物等效性研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2008, 13(3): 315.
- [3] 谭力, 钱峰, 张杰, 等. 国产苯扎贝特片人体相对生物利用度的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2000, 16(4): 292.
- [4] 黄春森, 黄东. 苯扎贝特样品的稳定性探讨[J]. *中国医疗前沿*, 2008, 3(21): 103.

(收稿日期: 2012-04-21 修回日期: 2012-12-01)

拉莫三嗪是一种新型的抗癫痫类药,能稳定突触前膜,抑制谷氨酸和天冬氨酸的释放。奥卡西平是国际公认的较好的新型抗癫痫药,是卡马西平衍生物,在体内迅速代谢为活性产物单羟奥卡西平和环氧卡马西平,副作用较小,无不良药物相互作用。这2种药物个体差异较大,治疗窗窄,受多种药物相互作用的影响,且毒性反应与血药浓度密切相关。二者在临床上常有联用,均可借助血药浓度监测来调整剂量^[1-2],以达到提高疗效、规避不良反应的目的。本研究以氯唑沙宗为内标,用高效液相色谱(HPLC)法同时测定上述2种药物的血药浓度,操作简单、回收率高、精密度好,可以同时用于检测拉莫三嗪和奥卡西平的血药浓度。

1 材料

1.1 仪器

680高效液相色谱仪,包括ASI-100进样器、TCC-100柱温箱、UVD170U检测器(美国戴安公司);MM-3定时微量振荡器、可调微量加样枪(泰州科健医疗用品有限公司);0412-1离心机(上海安亭科学仪器厂);PS3120超声波清洗器(美国Sonic公司);FA1104电子分析天平(上海天平仪器厂,称量范围:0~120 g,读数精度:0.1 mg);TDZ5-WS多管架自动平衡离心机(上海恒勤仪器设备有限公司);NH-866涡旋混和器(莱利达国际公司)。

1.2 药品与试剂

拉莫三嗪对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100775-200401,纯度:100%);奥卡西平对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100657-200401,纯度:100%);内标:氯唑沙宗标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100364-200301,质量分数:100%,mg/ml);乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Dikma公司C₁₈柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.05%三氟乙酸-水(40:60:0.000 5,V/V/V);检测波长:240 nm;流速:1 ml/min;柱温:40 ℃;进样量:10 μl。

2.2 溶液的配制

取拉莫三嗪4.4 mg、奥卡西平5.2 mg,准确称定,分别用甲醇溶解并定容至10 ml量瓶中,使其质量浓度分别为440 μg/ml和520 μg/ml。准确称取内标氯唑沙宗标准品2.4 mg,加入甲醇溶解并定容至100 ml量瓶中,使其质量浓度为24 μg/ml。

2.3 血浆样品预处理

取血浆样品100 μl于1.5 ml离心管中,加入甲醇溶液300 μl,涡旋混合2 min,超声提取10 min,4 000 r/min离心15 min。定量吸取上清液,40 ℃空气吹干,残留物加流动相100 μl溶解,涡旋混合1 min,12 000 r/min离心15 min,取上清液20 μl进样,得含拉莫三嗪0.5~50 μg/ml、奥卡西平0.5~50 μg/ml的系列质量浓度标准血样。

2.4 专属性考察

在“2.1”项色谱条件下,取空白血浆按“2.3”项下方法处理后进样分析,结果表明血浆内源性物质对样品测定无干扰。取“2.3”项下标准血样处理后进样测定,记录色谱图(见图1)。结果表明拉莫三嗪、奥卡西平与内标氯唑沙宗的保留时间分别为7.41、15.44、18.14 min,各成分峰形良好、分离完全。

2.5 线性关系考察

取“2.3”项下含拉莫三嗪50、10、2、1、0.5 μg/ml和奥卡西平50、10、2、1、0.5 μg/ml的标准血样,处理后进样测定,记录色谱。

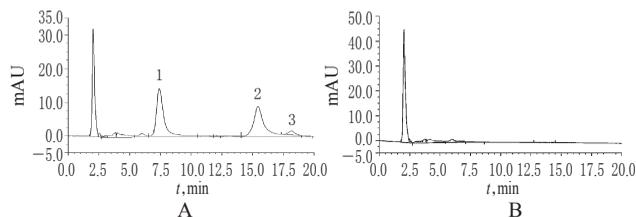


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆+拉莫三嗪标准品+奥卡西平标准品+氯唑沙宗标准品;B.空白血浆样品;1.拉莫三嗪;2.奥卡西平;3.氯唑沙宗

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma+lamotrigine standard+oxcarbazepine standard+chlorzoxazone standard; B. blank plasma; 1.lamotrigine; 2.oxcarbazepine; 3. chlorzoxazone

分别以样品与内标的峰面积比(Y)对浓度(c)线性回归。得拉莫三嗪、奥卡西平标准曲线方程分别为: $Y=0.551 1c-0.566 9$ ($r=0.994 0$)、 $Y=0.402 6c-0.589 5$ ($r=0.992 5$)。结果表明,拉莫三嗪、奥卡西平血药浓度均在0.5~50 μg/ml范围内线性关系良好。

2.6 精密性试验

精密量取“2.2”项下工作液,加入适量空白血浆,配成含拉莫三嗪分别为25、10、2 μg/ml和奥卡西平分别为25、10、2 μg/ml的低、中、高3种质量浓度血样。各血样按“2.3”项下方法处理后,连续测定5批,计算得3个浓度血样中拉莫三嗪的RSD分别为4.01%、6.15%、4.64%,奥卡西平的RSD分别为3.05%、4.27%、9.01%,结果见表1。

表1 拉莫三嗪和奥卡西平精密性试验结果(n=5)

Tab 1 Results of precision tests of lamotrigine and oxcarbazepine(n=5)

批次	拉莫三嗪, μg/ml			奥卡西平, μg/ml		
	低	中	高	低	中	高
1批	2.80	6.82	22.89	2.19	6.50	24.23
2批	2.56	6.14	23.29	2.34	5.95	19.22
3批	2.64	7.00	23.04	2.36	6.53	22.64
4批	2.54	7.06	24.37	2.40	6.29	23.54
5批	2.58	6.34	23.75	2.49	6.02	23.96
RSD, %	4.01	6.15	4.64	3.05	4.27	9.01

2.7 回收率试验

精密量取不同浓度的拉莫三嗪、奥卡西平标准溶液各10 μl,置于1.5 ml离心管中,40 ℃空气挥干,加入空白血浆0.5 ml,制成高、中、低3个质量浓度(5、25、50 μg/ml)的质控样品各5份,按“2.3”项下方法操作,将测得的峰面积与未经提取的标准溶液峰面积比较,计算提取回收率,即提取回收率= $A/A_s \times 100\%$ 。式中A为血浆样品溶液中药物的峰面积,A_s为相应标准溶液中药物的峰面积,结果见表2。

表2 拉莫三嗪和奥卡西平的提取回收率(n=5)

Tab 2 Extraction recoveries of lamotrigine and oxcarbazepine(n=5)

成分	加入浓度, μg/ml	提取回收率, %	RSD, %
拉莫三嗪	50.00	95.33	3.23
	25.00	95.25	6.40
	5.00	92.50	8.58
奥卡西平	50.00	93.12	3.55
	25.00	90.56	4.26
	5.00	88.78	9.01

2.8 稳定性试验

2.8.1 常温稳定性:取“2.6”项下低、中、高3种质量浓度血样,

分别于室温放置0、2、4 h后处理测定,计算得拉莫三嗪的RSD为2.55%~8.77%,奥卡西平的RSD为3.54%~8.25%。表明血样于室温放置4 h稳定,结果见表3。

表3 拉莫三嗪和奥卡西平常温稳定性试验结果($n=3$)

Tab 3 Results of stability tests of lamotrigine and oxcarbazepine under room temperature($n=3$)

时间, h	拉莫三嗪加入浓度, $\mu\text{g/ml}$			奥卡西平加入浓度, $\mu\text{g/ml}$		
	低	中	高	低	中	高
0	2.30	6.67	20.27	2.69	5.96	20.92
2	2.50	6.49	21.23	2.47	6.18	20.45
4	2.74	7.59	20.38	2.54	6.96	19.51
RSD, %	8.77	8.53	2.55	4.38	8.25	3.54

2.8.2 4℃稳定性(48 h):取上述3种浓度血样,分别于4℃放置0、24、48 h后处理测定,计算得拉莫三嗪的RSD为3.02%~5.70%,奥卡西平的RSD为3.42%~5.59%。表明血样于4℃放置48 h稳定,结果见表4。

表4 拉莫三嗪和奥卡西平4℃稳定性试验结果($n=3$)

Tab 4 Results of stability tests of lamotrigine and oxcarbazepine at 4℃($n=3$)

时间, h	拉莫三嗪加入浓度, $\mu\text{g/ml}$			奥卡西平加入浓度, $\mu\text{g/ml}$		
	低	中	高	低	中	高
0	2.56	6.81	23.04	2.34	6.49	22.64
2	2.49	6.74	20.84	2.42	6.17	20.54
4	2.41	6.13	22.26	2.26	5.99	22.66
RSD, %	3.02	5.70	5.06	3.42	4.07	5.55

2.8.3 多次冻融试验:取上述3种浓度血样各3份,于-20℃冷冻保存至少24 h后室温解冻重复3次后,处理测定。结果拉莫三嗪的RSD为1.49%~6.10%,奥卡西平各浓度的RSD为2.70%~8.22%。表明血浆样品3次冻融后稳定性良好,结果见表5。

表5 拉莫三嗪和奥卡西平多次冻融稳定性试验结果($n=3$)

Tab 5 Results of stability tests of lamotrigine and oxcarbazepine after repeated freeze-thawing($n=3$)

冻融次数	拉莫三嗪加入浓度, $\mu\text{g/ml}$			奥卡西平加入浓度, $\mu\text{g/ml}$		
	低	中	高	低	中	高
第1次	2.56	6.81	23.04	2.34	6.49	22.64
第2次	2.50	6.49	21.23	2.47	6.18	20.45
第3次	2.57	6.40	20.48	2.40	6.09	24.11
RSD, %	1.49	3.28	6.10	2.70	3.36	8.22

3 讨论

奥卡西平在257 nm波长处有最大吸收波长^[9],拉莫三嗪在225 nm波长处有最大吸收^[4]。本法采用了240 nm的波长,目的是为了兼顾两者的含量测定,减少基线的漂移和杂质峰的影响。

奥卡西平为卡马西平的流动相为衍生物,理化性质相似,且临床上一般不会同时应用奥卡西平与卡马西平,因此本试验首先尝试用卡马西平作为内标。但试验证实,卡马西平在本条件下保留时间约30 min左右,因此不适于作为内标。有文献报道,氯唑沙宗为内标时保留时间在拉莫三嗪和奥卡西平之后^[6],经试验验证,保留时间约18 min左右,且分离度良好,因此选用氯唑沙宗为内标。同时考虑本条件下奥卡西平与氯唑沙宗保留时间较接近,若两者浓度均较大可能会互相影响,因此将内标溶液配置为24 $\mu\text{g/ml}$,按照样品制备方法进样时内标质量浓度为18 $\mu\text{g/ml}$ 。

经考察在流动相为40%甲醇时样品分离度良好^[9],但若加入血浆样品时拉莫三嗪与内源性物质产生干扰,因此尝试在

流动相中加入酸,从而改变其保留时间,同时使峰形得到优化。在流动相中加入乙酸与磷酸时均未使拉莫三嗪与内源性物质达到理想分离度,因此选取0.1%三氟乙酸。此条件下化合物与内源性物质达到良好分离度,同时峰形较佳。但此浓度三氟乙酸会使柱压上升,经考察将三氟乙酸浓度减半,即0.05%三氟乙酸对柱压影响较小并可使化合物得到良好分离。

考虑到临床检测血药浓度会在同一时间检测多人的血样,因此选取3个浓度各5个平行样品连续测定对精密度进行考察。

临床血药浓度监测工作中经常需对血样标本进行保存,以进行批量监测。因此,本研究对常温稳定性、4℃稳定性、多次冻融稳定性进行了考察,以确定样品的可存放时间及存放条件。

随着HPLC在医院的普及,采用HPLC测定血药浓度将会日益广泛^[7]。

拉莫三嗪和奥卡西平在临床日常应用中存在联用现象,因此,在临床检测中有时会要求同时检测二者的血药浓度。有些患者医疗知识欠缺,出现中毒症状时说不清楚究竟自己以往用的是哪种药品;有些患者在某些不规范的医疗机构服用的中药制剂中掺杂有多种不明化学成分的药品,同时检测多种药物血药浓度就显得十分重要^[8]。现在三级医院等级评审工作中明确要求医院开展血药浓度监测工作,且不会仅仅限于大医院,许多基层医院均会开展血药浓度监测工作。鉴于这2种药物尚不能采用荧光偏振免疫分析(TDX)仪等专业化大型设备检测,增加采用HPLC法的血药浓度监测项目有很强的现实意义。

本研究采用HPLC法,可以同时测定拉莫三嗪和奥卡西平血药浓度。本法操作简单、回收率高、精密度好,适用于临床上单独检测拉莫三嗪或奥卡西平的血药浓度,也适于同时检测二者血药浓度。

参考文献

- [1] 杨洁,焦正,施孝金.高效液相色谱法同时测定人血浆中6种抗癫痫药物及2种活性代谢物的浓度[J].中国药理学杂志,2006,41(24):1899.
- [2] St. Louis EK.Minimizing AED adverse effects: Improving quality of life in interictal state in epilepsy care[J].*Curr Neuropharmacol*,2009,7(2):106.
- [3] 任汝仙,彭世萍,李雅琴,等.RP-HPLC法测定人血浆中奥卡西平浓度及其药动学研究[J].中国药房,2010,21(38):3596.
- [4] 刘海涛,唐跃年.HPLC法测定癫痫患儿血浆中拉莫三嗪的浓度[J].中国药房,2011,22(2):128.
- [5] 李佩瑾,蒋莉,刘官信.不同剂量拉莫三嗪对体外培养海马神经细胞存活及其BDNF和P-CREB表达的影响[J].重庆医科大学学报,2009,34(10):1330.
- [6] 杜军,李忆军.RP-HPLC测定拉莫三嗪和苯巴比妥的血药浓度[J].中国医药导报,2010,7(8):39.
- [7] 和凡,温预关,杨彤,等.LC/MS/MS法测定癫痫患儿血浆中拉莫三嗪的浓度[J].今日药学,2011,21(3):154.
- [8] 焦正,赵志刚,施孝金,等.比较HPLC和FPIA法测定人血清中卡马西平的血药浓度[J].中国临床药理学杂志,2004,20(4):291.

(收稿日期:2012-08-03 修回日期:2012-12-01)