

HPLC-DAD 测定血浆拉莫三嗪、奥卡西平及 10-羟基卡马西平浓度效果观察

楼江 林能明 刘占利 王飞 李晴宇 史长城 严伟

【摘要】 目的 观察采用二极管阵列检测器的高效液相色谱法(HPLC-DAD)测定人血浆中拉莫三嗪(LTG)、奥卡西平(OXC)及活性代谢物 10-羟基卡马西平(MHD)浓度的效果。方法 以氯唑沙宗为内标,甲醇为蛋白沉淀剂,Agilent Zorbax Eclipse Plus C18(4.6×100mm,3.6μm)为分析柱,流动相为乙腈-10 mmol/L KH₂PO₄溶液(V/V,24:76,pH 5.5),流速为 0.8ml/min,进样量为 10μl,检测波长 220nm,参比波长 360 nm。结果 LTG、OXC 和 MHD 在 1.0~40.0 μg/ml 内线性关系良好,LTG 线性方程为 $y=0.171x+0.036$ ($r=0.99974$),MHD 的线性方程为 $y=0.091x+0.018$ ($r=0.99969$),OXC 的线性方程为 $y=0.130x+0.036$ ($r=0.99969$)。LTG、OXC 和 MHD 在低、中和高浓度质控(2.0、10.0 和 30.0μg/ml)的方法回收率在 93.4%~100.95%,日内和日间精密度均<6%。结论 采用 HPLC-DAD 方法测定人血浆中 LTG、OXC 及 MHD 浓度的专属性强、灵敏度高,适用于监测 LTG、OXC 及 MHD 的血药浓度。

【关键词】 高效液相色谱法 拉莫三嗪 奥卡西平 10-羟基卡马西平 血药浓度

Simultaneous quantitative determination of lamotrigine, oxcarbazepine and 10-monohydroxycarbazepine in human plasma by HPLC-DAD LOU Jiang, LIN Nengming, LIU Zhanli, et al. Department of Pharmacy, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China

【Abstract】 Objective To develop a new HPLC-based method for the simultaneous determination of lamotrigine (LTG), Oxcarbazepine (OXC) and 10-monohydroxycarbazepine (MHD) in human plasma. Methods LTG, MHD and OXC were extracted from human plasma samples by methanol. The analytes were separated on the Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column(4.6×100mm 3.6μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile-10mM KH₂PO₄(24:76V/V pH 5.5) and the flow rate of 0.8 ml/min. The injection volume was 10 μl and detective wavelength was set 220 nm. The chlorzoxazone was used as the internal standard (IS). Results The method was validated over the concentration range of 1.0~40.0 μg/ml for LTG, MHD and OXC, the regression equation was ($y=0.171x+0.036$, $r=0.99974$) for LTG, ($y=0.091x+0.018$, $r=0.99969$) for MHD and ($y=0.130x+0.036$, $r=0.99969$) for OXC. The extraction recoveries with low, medium and high quality controls (2.0,10.0 and 30.0μg/ml) ranged from 93.4% to100.95%. The Inter-and intra-day precisions were<6%. Conclusion The specificity and accuracy HPLC-DAD method have been validated for detection of LTG, MHD and OXC in human plasma, indicating that the method can be applied for monitoring of LTG, MHD and OXC clinically.

【Key words】 High performance liquid chromatography Lamotrigine Oxcarbazepine 10-monohydroxycarbazepine Plasma concentration

拉莫三嗪(lamotrigine,LTG)是苯三嗪类抗癫痫药物,主要通过阻断突触前膜电压敏感性钠离子通道,抑

制谷氨酸和天冬氨酸的释放,发挥抗癫痫作用;奥卡西平(oxcarbazepine,OXC)是卡马西平的 10-酮基衍生物,在体内可迅速转化成活性代谢物 10-羟基卡马西平(10-monohydroxycarbazepine,MHD)发挥抗癫痫作用^[1]。但上述两种药物药动学个体差异大,治疗窗窄(LTG 治疗窗 3~14μg/ml,OXC 治疗窗为 3~35μg/ml),服用相同剂量,部分患者可能出现不良反应,因此有学者建议对服用 LTG 和 OXC 的患者进行血药浓度监测,并根据血药浓度调整 LTG 和 OXC 用量,以提高 LTG 和 OXC 的

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.1.2017-1673

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目基金(2018RC061);

浙江省药学会医院药学专项科研自助基金(2016ZYY14)

作者单位:310006 杭州市第一人民医院药学部(楼江、林能明、王飞、李晴宇、史长城、严伟),儿科(刘占利)

通信作者:严伟,E-mail:yanwei_115@163.com

疗效并降低不良反应发生率^[2-4]。目前,国内外已有研究报道人血浆中 LTG、MHD 和 OXC 的分析方法,液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)虽灵敏度高,但仪器成本和维护费用昂贵;而文献报道的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法,大多采用液-液萃取或液-固萃取前处理法,该法耗时较长,操作繁琐且费用较贵;相比于文献报道的紫外检测器检测,二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)可对被测物质和内标进行全波长扫描,选取最优检测波长,同时可设定参比波长,消除噪音干扰,提高检测的灵敏度^[5-7]。本研究在文献报道的基础上,以甲醇为蛋白沉淀剂,建立了同时测定人血浆中 LTG、OXC 和 MDH 浓度的 HPLC-DAD 法,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 仪器 Agilent1260 高效液相色谱仪:包括四元泵(型号:G1311B)、自动进样器(型号:G1329B)、柱温箱(型号:G1316A)和 DAD 检测器(型号:G1315D)购自美国 Agilent 公司;低速离心机(DM0412S)、涡旋混合器(MX-S)购自美国赛洛捷克公司;低温高速离心机(5418R)购自德国艾本德股份公司;超纯水系统(Thermo fisher LabTower ED1)购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 药品与试剂 LTG(美国 Sigma 公司,纯度 $\geq 98\%$, 10mg);OXC(中检所,纯度:99.8%,100mg);MHD(南京康满林有限公司,纯度:97%,250mg),氯唑沙宗(中检所,纯度:99.7%,100mg),血浆:人体血浆,甲醇和乙腈(色谱级,德国默克公司),磷酸二氢钾(分析纯)。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱 Agilent Zorbax Eclipse Plus C18(4.6 $\times$ 100mm,3.6 μ m);柱温:35 $^{\circ}$ C;流动相:乙腈-10 mmol/L KH_2PO_4 (V/V, 24:76, pH5.5);流速:0.8ml/min;进样体积:10 μ l;检测波长 220nm,参比波长 360nm。

1.3.2 溶液的配制 LTG 标准液配置:精密称取 LTG 9.6mg,加甲醇溶解并定容至 10ml,得到 960 μ g/ml 的 LTG 标准液。OXC 标准液配置:精密称取 OXC 11.0mg,加甲醇溶解并定容至 10ml,得到 1100 μ g/ml 的 OXC 标准液。MHD 溶液配置:精密称取 MHD 19.6mg,加甲醇溶解并定容至 10ml,得到 1900 μ g/ml 的 MHD 标准液。精密吸取 LTG 4.17ml、OXC 3.64ml 和 MHD 2.11ml 置于容量瓶中,用甲醇溶解并定容至 10ml,得到 LTG、OXC 和 MHD 混合液,3 种物质浓度均为 400.0 μ g/ml。氯唑沙宗溶液配置:精密称取氯唑沙宗 10.0mg,用甲醇溶解并定

容至 10ml,得到 1000 μ g/ml 的内标液;精密吸取 500 μ l 氯唑沙宗标准液,置于 10ml 容量瓶中,用甲醇定容,得到 50 μ g/ml 的内标储备液。以上储备液均置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3.3 血浆样品预处理 精密吸取 200 μ l 血浆置于 1.5ml 离心管中,加入内标 50 μ l(浓度 50 μ g/ml)及 400 μ l 甲醇溶液,涡旋混匀 2min 后,4 $^{\circ}$ C 低温下离心 10min (14 000r/min),取 300 μ l 上清液于进样瓶,10 μ l 进样分析。

1.4 方法学验证 根据《中国药典 2015 版(第 4 部)》中《生物样品定量分析方法验证指导原则》对该方法的专属性、标准曲线、回收率、日内和日间精密度以及稳定性等进行考察^[8]。

1.4.1 专属性 取 6 份健康体检者的空白血浆,按“1.3.3”项方法处理后进样,考察该方法的专属性。

1.4.2 标准曲线 取 LTG、OXC 和 MHD 混合稀释液 400 μ g/ml,用甲醇逐级稀释得 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 μ g/ml 的 LTG、OXC 和 MHD 混合液;再用空白血浆将 10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 和 400.0 μ g/ml 的 LTG、OXC 和 MHD 混合液稀释 10 倍,得到 LTG、OXC 和 MHD 的血浆标准曲线浓度分别为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 和 40.0 μ g/ml。按“1.3.3”项方法处理后进样,测得 LTG、OXC 和 MHD 和内标的峰面积,以待测物峰面积和内标峰面积之比为纵坐标(y),各待测物浓度为横坐标(x),进行线性回归分析。

1.4.3 精密度和回收率实验 用空白血浆分别配置 LTG、MHD 和 OXC 的混合质控样品,低、中和高浓度分别为 2.0、10.0 和 30.0 μ g/ml,按“1.3.3”项方法处理后分析,每个浓度平行 5 份,计算日内精密度及方法回收率,该步骤连续测定 3d,计算日间精密度及方法回收率。精密度采用相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示, $\text{RSD} = \frac{\text{标准偏差}(\text{SD})}{\text{测定结果的平均数}} \times 100\%$, $\text{RSD} < 15\%$ 证明该方法精密度良好。方法回收率为测定结果的平均数与真实值之间的比值, $85\% < \text{方法回收率} < 105\%$,证明回收率良好。

1.4.4 稳定性试验 配置低、中、高 3 种浓度的 LTG、MHD 和 OXC 混合质控血浆,按“1.3.3”项处理后分析,每个浓度平行 5 份,观察样品室温放置(2、4、8 和 12h)、自动进样器放置(2、4、8 和 12h)和反复冻融(1、2 和 3 次)稳定性。 $\text{RSD} < 15\%$ 表明被测药物在上述条件下稳定性良好。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件,以待测物峰面积(LTG、OXC 和 MHD 峰面积)和内标峰面积之比为纵坐标(y),各待测物浓度为横坐标(x),进行线性回

归分析,当相关系数 $r \geq 0.999$ 时,证明线性关系良好。

2 结果

2.1 专属性 在本试验条件下,被测物及内标物均分

离良好(分离度 $R \geq 1.5\text{min}$),LTG、MHD、OXC 和内标物(internal standard,IS)的保留时间分别为 4.3、5.2、9.8 和 11.5min,空白血浆中的内源性物质不干扰测定结果,见图 1。

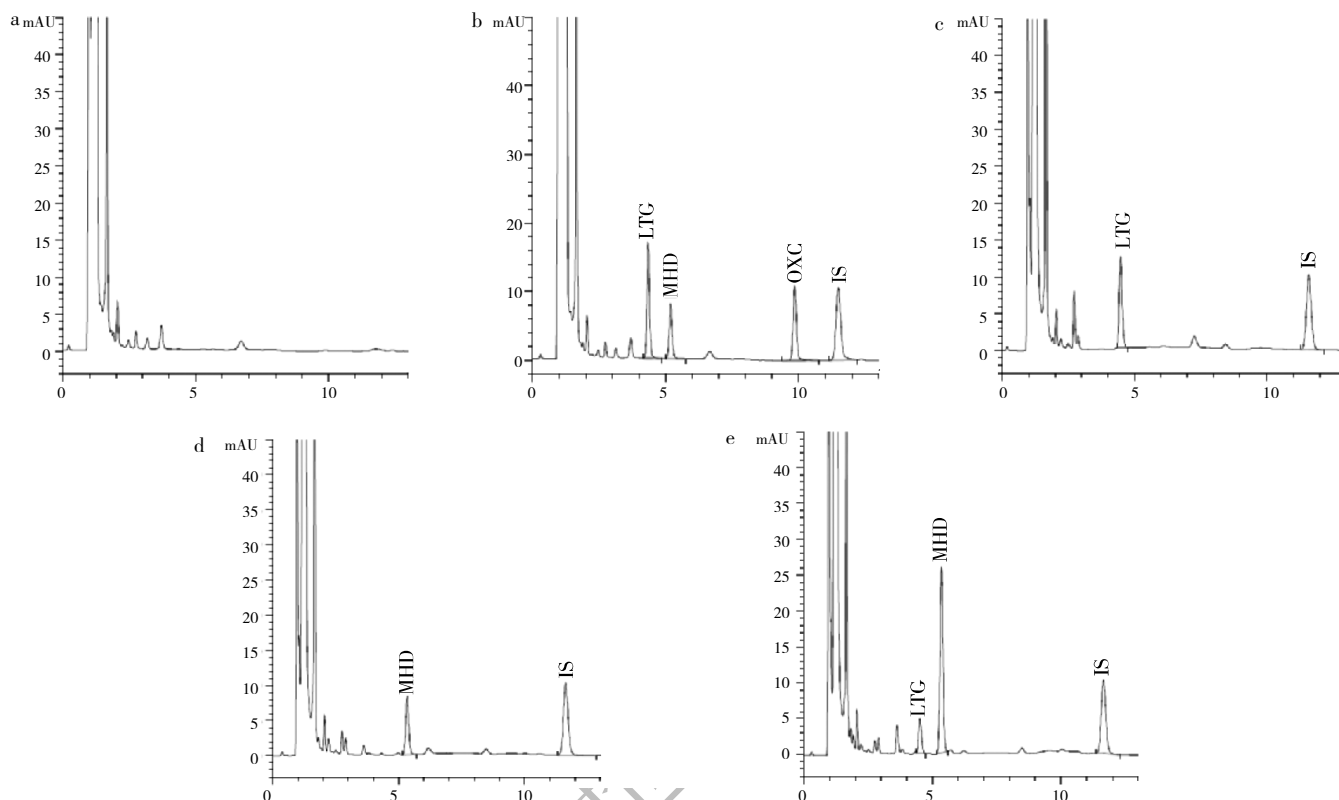


图 1 高效液相色谱图(a:空白血浆;b:LTG+MHD+OXC+IS;c:患者服用拉莫三嗪 12h 后的血浆样品 +IS;d:患者服用奥卡西平 12h 后的血浆样品 +IS;e:患者服用拉莫三嗪 + 奥卡西平 12h 后的血浆样品 +IS)

2.2 标准曲线 LTG 的线性回归方程为 $y=0.171x+0.036$ ($r=0.99974$),MHD 的线性回归方程为 $y=0.091x+0.018$ ($r=0.99969$),OXC 的线性回归方程为 $y=0.130x+0.036$ ($r=0.99969$),结果表明 LTG、MHD 和 OXC 在 1.0~

40.0 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好。

2.3 精密度和回收率 LTG、OXC 和 MHD 的方法回收率在 93.4%~100.95%,日内和日间精密度均 $<6\%$,结果表明该方法下 LTG、OXC 和 MHD 的回收率和精密度较好,见表 1。

表 1 LTG、OXC 和 MHD 的日内、日间精密度和回收率

药物浓度($\mu\text{g/ml}$)	日内精密度($n=5$)			日间精密度($n=15$)		
	均值 $\pm$ 标准差($\mu\text{g/ml}$)	RSD(%)	回收率(%)	均值 $\pm$ 标准差($\mu\text{g/ml}$)	RSD(%)	回收率(%)
LTG						
2.0	1.91 ± 0.04	1.94	95.30	1.87 ± 0.08	4.34	93.40
10.0	9.80 ± 0.18	1.87	98.04	9.81 ± 0.25	2.54	98.13
30.0	29.91 ± 0.54	1.80	99.70	29.5 ± 0.66	2.24	98.33
MHD						
2.0	2.02 ± 0.04	1.73	100.95	1.95 ± 0.05	5.28	97.55
10.0	9.82 ± 0.17	1.71	98.19	9.85 ± 0.21	2.15	98.54
30.0	29.91 ± 0.50	1.66	99.70	29.64 ± 0.60	2.04	98.80
OXC						
2.0	1.97 ± 0.06	2.95	98.35	1.98 ± 0.04	4.15	98.85
10.0	9.78 ± 0.14	1.43	97.79	9.79 ± 0.19	1.95	97.91
30.0	29.86 ± 0.64	2.14	99.53	29.69 ± 0.65	2.19	98.97

2.4 稳定性试验 LTG、MHD 和 OXC 在室温放置稳定性、自动进样器放置稳定性和冻融稳定性条件下的 RSD 均 $<8\%$,结果表明该方法下 LTG、MHD 和 OXC 的稳定性较好,见表 2。

表 2 LTG、OXC 和 MHD 在各种条件下的稳定性实验

药物浓度($\mu\text{g/ml}$)	室温放置稳定性		自动进样器放置稳定性		冻融稳定性	
	均值 $\pm$ 标准差($\mu\text{g/ml}$)	RSD(%)	均值 $\pm$ 标准差($\mu\text{g/ml}$)	RSD(%)	均值 $\pm$ 标准差($\mu\text{g/ml}$)	RSD(%)
LTG						
2.0	1.95 $\pm$ 0.06	2.82	1.99 $\pm$ 0.10	5.13	1.82 $\pm$ 0.04	2.47
10.0	10.02 $\pm$ 0.22	2.16	10.51 $\pm$ 0.39	3.66	9.66 $\pm$ 0.32	3.33
30.0	29.87 $\pm$ 0.52	1.73	30.72 $\pm$ 1.10	3.56	29.00 $\pm$ 0.52	1.78
MHD						
2.0	1.96 $\pm$ 0.08	3.93	2.09 $\pm$ 0.06	3.02	1.84 $\pm$ 0.04	2.28
10.0	10.04 $\pm$ 0.22	2.22	10.55 $\pm$ 0.35	3.27	9.89 $\pm$ 0.27	2.68
30.0	29.9 $\pm$ 0.59	1.97	30.84 $\pm$ 1.17	3.81	29.38 $\pm$ 0.54	1.83
OXC						
2.0	1.92 $\pm$ 0.07	3.38	2.10 $\pm$ 0.15	7.01	2.11 $\pm$ 0.07	3.51
10.0	9.95 $\pm$ 0.25	2.53	10.41 $\pm$ 0.29	2.77	9.88 $\pm$ 0.23	2.36
30.0	29.80 $\pm$ 0.59	1.99	30.78 $\pm$ 1.16	3.77	29.48 $\pm$ 0.61	2.08

3 讨论

3.1 检测波长的选择 本研究使用 DAD 对被测物质及内标的使用全紫外波长(190~400nm,步进值 2nm)进行扫描,发现近紫外区 210nm 处的信号较强,但溶剂吸收干扰严重。经反复试验比较,取 220nm 不仅可排除溶剂吸收干扰,还可获得最佳灵敏度,故选 220nm 为本研究的检测波长。试验发现 360nm 波长处样品没有吸收,且最接近检测波长,为消除基线噪音干扰,选择 360nm 作为本研究的参比波长。

3.2 流动相的选择 本试验曾尝试使用甲醇-水和乙腈-水作流动相,但发现被测物质色谱峰拖尾严重,这可能与被测物质含伯氨、叔氨等有机氮结构有关,它们可与 C18 色谱柱内未参加键合反应硅醇基发生正、负电荷的吸附,引起拖尾。当以 10mmol/L 和 50mmol/L KH_2PO_4 作水相,发现缓冲盐溶液可显著影响被测物质的色谱行为(包括色谱峰和保留时间),因缓冲液浓度越高,对色谱柱的损害可能越大,不易维护保养,最终选择 10 mmol/L KH_2PO_4 缓冲液作该条件的水相。

3.3 内标的选择 已有研究报道 LTG 或 OXC 的测定,可用苯巴比妥和氯唑沙宗作内标^[69]。本试验曾尝试使用另一苯二氮卓类药物地西泮和氯唑沙宗作内标,发现地西泮与被测物的保留时间相差较大,不适用于分析测定,但氯唑沙宗在该条件下分离度好,保留时间较适合,最后选择氯唑沙宗作为本研究的内标物质。

3.4 前处理的选择 文献报道 LTG、MHD 和 OXC 的测定,常采用液-液萃取或固相萃取作为前处理,操作繁

琐且费用昂贵^[6-7]。因此本研究曾尝试使用甲醇、乙腈和高氯酸溶液作为蛋白沉淀剂,发现高氯酸和乙腈的回收率较低,尤其是低浓度样品,因此本研究最后选用甲醇作为蛋白沉淀剂。

综上所述,本研究针对 LTG、MHD 和 OXC 血药浓度个体差异大的特点,建立了快速、灵敏和高效的测定人血浆中 LTG、MHD 和 OXC 的 HPLC-DAD 法,适用于服用 LTG 和 OXC 患者的常规治疗药物监测。

4 参考文献

- [1] Moshé SL, Perucca E, Ryvlin P, et al. Epilepsy: new advances[J]. Lancet, 2015, 385(9971):884-898.DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60456-6.
- [2] Johannessen Landmark C, Baftiu A, Tysse I, et al. Pharmacokinetic variability of four newer antiepileptic drugs, lamotrigine, levetiracetam, oxcarbazepine, and topiramate: a comparison of the impact of age and comedication[J]. Ther Durg Monit, 2012, 34(4):440-445. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31825ee389.
- [3] Hiemke C, Baumann P, Clement HW, et al. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: update 2017[J]. Pharmacopsychiatry, 2018, 51(1-02):9-62. DOI: 10.1055/s-0043-116492.
- [4] 中华医学会儿科学分会临床药理学组. 儿童治疗性药物监测专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(9):650-659.DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2015.09.005
- [5] Dupouey J, Doudka N, Belo S, et al. Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in human plasma samples using an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method and its application in therapeutic drug monitoring[J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30(12):2053-2060.DOI:

- 10.1002/bmc.3789.
- [6] 阙万才, 丘宏强, 程昱, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定人血浆中奥卡西平及其代谢物 10-羟基卡马西平的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31 (22): 2254-2256. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2015.22.025.
- [7] 沈芊, 王彦改, 曾红, 等. RP-HPLC 法同时测定人血清中拉莫三嗪、苯巴比妥、奥卡西平及其活性代谢物单羟基卡马西平的浓度[J]. 中国药房, 2016, 27(11): 1493-1496. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.11.17.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典第四部(2015 年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 341-344. DOI: 10.11669/cpj.2015.20.013.
- [9] 何大为, 王丽, 王寅初. 反相高效液相色谱法同时测定拉莫三嗪和卡马西平血药浓度[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 212-214. DOI: 10.16155/j.0254-1793.2006.02.036.

(收稿日期: 2017-12-02)

(本文编辑: 严玮雯)

(上接第 30 页)

- [7] Li D, Mallory T, Satomura S. AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma[J]. Clinica Chimica Acta, 2001, 313(2): 15-19. DOI: 10.1016/S0009-8981(01)00644-1.
- [8] Patterson DM, Rustin GJ. Controversies in the management of germ cell tumours of the ovary[J]. Curr Opin Oncol, 2006, 18(5): 500-506. DOI: 10.1097/01.cco.0000239891.44031.38.
- [9] Yamamoto R, Minobe S, Ebina Y, et al. Prenatal trisomy 21 screening using the Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein ratio[J]. Congenit Anom(Kyoto), 2004, 44(2): 87-92. DOI: 10.1111/j.1741-4520.2004.00013.x.
- [10] 俞菁, 何丽梅, 胡何宇, 等. 甲胎蛋白变异体 L2 在唐氏综合征筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2643-2644. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.011.
- [11] 全国妇幼卫生监测办公室. 中国妇幼卫生监测工作手册(2013 版)[R]. 全国妇幼卫生监测及年报通讯. 北京: 卫生部妇幼保健与社区卫生司, 2013, 50(1): 222-223. http://www.mchscn.org/Article_Class2.asp?ClassID=2.
- [12] 全国妇幼卫生监测办公室. 中国出生缺陷监测系统疑难和微小畸形报告指南(试用版 2012)[R]. 全国妇幼卫生监测及年报通讯. 北京: 卫生部妇幼保健与社区卫生司, 2013, 50(1): 1-7.
- [13] Royston P, Thompson SG. Model-based screening by risk with application to down's syndrome[J]. Statistics in medicine, 1992, 11(2): 257-268. DOI: 10.1002/sim.4780110211.
- [14] Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level[J]. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 1987, 94(5): 387-402. DOI: 10.1016/0020-7292(88)90310-4.
- [15] 陈坤, 陈忠. 医学科研方法[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 43-44.
- [16] Yamamoto R, Azuma M, Wakui Y, et al. Alpha-fetoprotein micro-heterogeneity: a potential biochemical marker for Down's syndrome[J]. Clin Chim Acta, 2001, 304(1-2): 137-141. DOI: 10.1016/S0009-8981(00)00381-8.
- [17] 伍红, 张育森, 吴晓霞, 等. 甲胎蛋白异质体在唐氏综合征筛查中的价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(02): 56-57.
- [18] 龙峰, 段纯, 刘佳南, 等. 孕中期甲胎蛋白异质体在唐氏综合征筛查中的临床意义[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2014, 6(3): 43-45. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7372.2014.03.016.
- [19] Huai L, Leng J, Ma S, et al. Replacing Alpha-Fetoprotein With Alpha-Fetoprotein-L3 Increases the Sensitivity of Prenatal Screening for Trisomy 21[J]. American Journal of Therapeutics, 2016, 23(6): e1754-e1757. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000418.
- [20] Yamamoto R, Azuma M, Hoshi N, et al. Lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein, an alternative variant to α -fetoprotein in prenatal screening for Down's syndrome[J]. Human Reproduction, 2001, 16(11): 2438-2444. DOI: 10.1093/humrep/16.11.2438.

(收稿日期: 2018-06-20)

(本文编辑: 严玮雯)