

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.08.002

高效液相色谱法测定利卡西平血药浓度

周清武

(四川省绵阳市中心医院药学部,四川 绵阳 621000)

摘要:目的 建立测定人血浆中利卡西平(MHD)药物浓度的高效液相色谱(HPLC)法。方法 以多索茶碱为内标,空白全血为色标,乙酸乙酯萃取血样,色谱柱为 Beckman Coulter-ODS 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.3%醋酸(24:76),流速为 1.1 mL/min,柱温为 30℃。紫外检测波长为 240 nm。结果 血浆中内源性杂质对样品及内标测定无干扰,利卡西平血药浓度在 2.0~50.0 μg/mL 范围内与样品和内标峰高比线性关系良好,回归方程为 $C=31.4802Y-0.0608$, $r=0.9998$ ($n=6$);日内精密度的 $RSD<5.84\%$ ($n=5$),日间精密度的 $RSD<6.42\%$ ($n=5$);方法回收率为 99.40%~103.50%,平均相对误差介于 -0.60%~3.50%;检测限为 0.5 μg/mL。结论 该方法操作简便,检测灵敏、准确,可用于利卡西平常规血药浓度的测定。

关键词: 高效液相色谱法;利卡西平;血药浓度;杂质

中图分类号:R969.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)08-0005-04

Determination of Blood Concentration of Licarbazepine by HPLC

Zhou Qingwu

(Department of Pharmacy, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan, China 621000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of drug concentration of licarbazepine(MHD) in human plasma.

Methods With doxofylline as internal standard, drug-free whole blood as shade guide, the samples were extracted by ethyl acetate. Beckman Coulter-ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was acetonitrile-0.3% acetic acid (24:76), the flow rate was 1.1 mL/min, the column temperature was 30℃, and the UV detection wavelength was 240 nm.

Results The endogenous impurities in plasma had no interference to the determination of the sample and the internal standard. The concentration of MHD showed good linearity in the range of 2.0~50.0 μg/mL. The regression equation was $C=31.4802Y-0.0608$, $r=0.9998$ ($n=6$). The intra-day RSD was less than 5.84% ($n=5$) and the inter-day RSD was less than 6.42% ($n=5$). The methodology recoveries were between 99.40% and 103.50%. The average relative error were between -0.60% and 3.50%. The limit of detection was 0.5 μg/mL. **Conclusion** This method is simple, sensitive and accurate, which can be used for routine determination of blood concentration of MHD.

Key words: HPLC; licarbazepine; blood concentration; impurities

利卡西平(licarbazepine, monohydroxycarbamazepine, MHD)^[1-2]为较新型的广谱抗癫痫药物^[3],可单独应用或与其他抗癫痫药合用治疗局限性及全身性癫痫发作,对顽固性癫痫也有作用^[4-5]。其前体药物奥卡西平(OXC),在体内吸收快而完全,并能迅速转化为利卡西平^[6]。利卡西平为一级动力学肾消除,儿童消除较快^[7],稳态药物浓度较低,影响了其临床有效应用,而老人消除较慢。其嗜睡及低钠血症等严重不良反应的出现,影响了该药物在临床的安全应用^[8]。为安全有效地用好

利卡西平,进行药物浓度监测很有必要,近年来相关研究较多。为寻找适合于本实验室的准确、灵敏、简单和快捷的检测方法,本研究中优化色谱条件及血样处理流程,建立了测定人血浆利卡西平药物浓度的高效液相色谱(HPLC)法,有利于更好地指导临床奥卡西平的个体化合理用药。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Beckman Coulter 高效液相色谱仪(美国 Beckman

第一作者:周清武,男,副主任药师,主要从事体内药物分析工作,(电话)0816-2234278(电子信箱)798951932@qq.com。

[21] Liu Y, Wang L, Zhao Y, et al. Nanostructured lipid carriers versus microemulsions for delivery of the poorly water-soluble drug luteolin[J]. Int J Pharm, 2014, 476(1-2): 169-177.

[22] Liu Y, Liu D, Zhu L, et al. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome[J]. Food Research International, 2015, 74: 97-105.

[23] How CW, Rasedee A, Manickam S, et al. Tamoxifen-loaded

nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: characterization, stability assessment and cytotoxicity[J]. Colloid Surface B Biointerfaces, 2013, 112: 393-399.

[24] Bergonzi MC, Hamdouch R, Mazzacupa F, et al. Optimization, characterization and in vitro evaluation of curcumin microemulsions[J]. Lwt - Food Sci Technol, 2014, 59(1): 148-155.

(收稿日期:2017-12-28;修回日期:2018-01-16)

公司,包括 RC-11 微量进样器,HT-230A 柱温箱, System Gold 126 溶剂泵, System Gold 166 紫外检测器); KJO-4282 C₁₈ 保护柱(4 mm×3 mm, Phenomenex 公司); FA1004 型电子天平(感量为 0.1 mg, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司); TG16-II 型台式高速离心机(长沙平风仪器仪表有限公司); Qilinbeier 旋涡混匀器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Qiujiang 移液器(上海求精生化仪器厂); T10205-94 微型打气筒(邢台平乡振兴打气筒厂)。

1.2 试药

利卡西平标准品(美国,批号 D0305A);多索茶碱葡萄糖注射液(安徽国森药业有限公司,批号为 161028022,规格为每瓶 100 mL:多索茶碱 0.3 g 与葡萄糖 5 g);乙腈(成都市科龙化工试剂厂,色谱纯);异丙醇(成都市科龙化工试剂厂,分析纯);乙二醇和无水乙醇(成都金山化学试剂有限公司,分析纯);冰醋酸(台山市新宁制药有限公司);灭菌注射用水(四川科伦药业股份有限公司);血浆样品,取自本院做治疗药物浓度监测的门诊及住院患者。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Beckman Coulter-ODS 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), KJO-4282 C₁₈ 型保护柱(4 mm×3 mm);流动相:乙腈-0.3% 醋酸(24:76, V/V);流速:1.1 mL/min;柱温:30℃;紫外检测波长:240 nm,记录时间为 10 min;进样量:20 μL;检测灵敏度:0.1 mAU。

2.2 溶剂制备

标准贮备液:称取 50.0 mg 利卡西平,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加无水乙醇溶解并定容,即得质量浓度 1 000 μg/mL 的利卡西平标准浓配液,取 20.0 mL 浓配液,用乙二醇-水(37:13)稀释至 100 mL,即得 200 μg/mL 的利卡西平标准贮备液,密封,贮于-20℃冰箱中备用。用前吸取少量置 1.5 mL 塑料离心管中并密封,在 26℃水浴中静置 10 min 平衡至室温。

内标液:精密量取多索茶碱葡萄糖注射液(100 mL:多索茶碱 0.3 g)8.0 mL,加乙二醇-水(37:13)稀释至 100 mL,即得质量浓度为 240 μg/mL 的多索茶碱内标液,密封,贮于-20℃冰箱中备用。用前吸取少量置 1.5 mL 塑料离心管中并密封,在 26℃水浴中静置 10 min 平衡至室温。

2.3 血浆样品处理

在 10 mL PVC 塑料试管中加入样品血浆 400 μL, 240 μg/mL 多索茶碱内标液 40 μL,空白全血 40 μL 作为色标,涡漩 10 s,混匀,加异丙醇 100 μL,乙酸乙酯

2.0 mL,再旋涡 30 s,萃取,以 2 000 r/min 的速率离心 10 s 分离血浆蛋白,取尽上层无色酯液 20 mL 锥形试管中,锥形试管置 40℃水浴瓶中,用微型打气筒鼓入空气使挥干,加注射用水 100 μL,涡漩 10 s,使萃取物溶解或混匀,取 20 μL 上机检测。

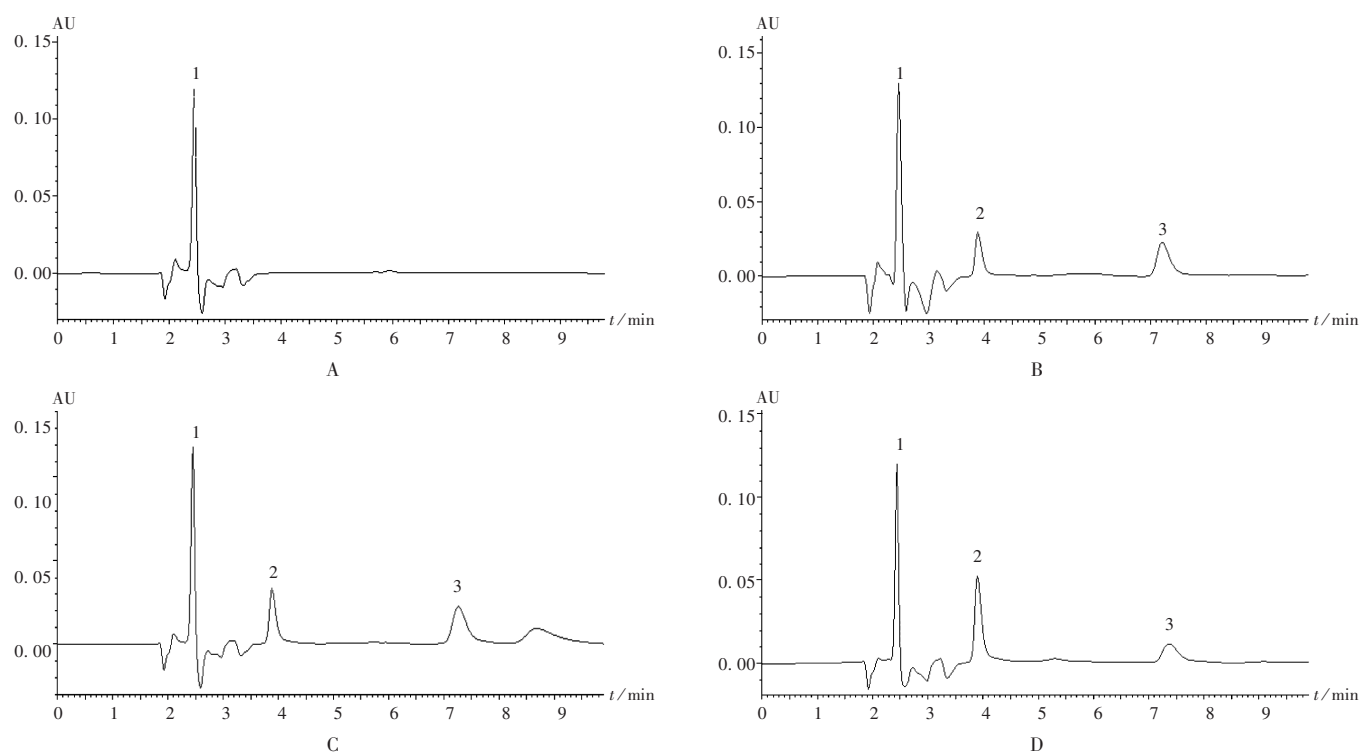
2.4 方法学考察

专属性考察:分别用注射用水和空白血浆稀释利卡西平标准贮备液,得质量浓度为 25 μg/mL 的利卡西平标准水溶液和利卡西平标准血浆液。利卡西平标准水溶液参照 2.3 项下方法,加入多索茶碱内标后混匀检测;空白血浆和利卡西平标准血浆液分别按 2.3 项下方法处理后检测。结果表明,血浆杂质对内标和利卡西平的检测均无干扰,杂质、内标与利卡西平分离完全,保留时间分别为 2.5,3.9,7.2 min,重复性良好。色谱图见图 1。

标准曲线绘制与检测限测定:取 6 支 10 mL PVC 塑料试管,分别加入质量浓度为 200 μg/mL 的利卡西平标准贮备液适量,用空白血浆稀释,涡漩 10 s 使混匀,得质量浓度为 2,10,20,30,40,50 μg/mL 的系列血浆利卡西平标准工作液各 400 μL。其余操作同 2.3 项下方法,得 HPLC 系列色谱图,以血浆利卡西平质量浓度(C)对标准品与内标物的峰高比(Y)进行线性回归,得标准曲线方程 $C = 31.4802Y - 0.0608$, $r = 0.9998$ ($n = 5$)。最低检测限为 0.5 μg/mL。

精密度与准确度试验:精密度以日内和日间 RSD 表示。准确度以测得浓度与配制浓度的接近程度(相对误差)来表示,测得浓度/配制浓度×100%,即为方法回收率。用空白血浆分别稀释质量浓度为 200 μg/mL 的利卡西平标准贮备液,得高、中、低质量浓度(30,10,2 μg/mL)的血浆利卡西平标准样品,按 2.3 项下方法处理,各样品日内重复操作 5 次,考察日内精密度及准确度;连续测定 5 d,考察日间精密度。结果显示,日内精密度的 $RSD < 5.84\%$ ($n = 5$),方法回收率为 99.40%~103.50%,平均相对误差为-0.60%~3.50%,日间精密度的 $RSD < 6.42\%$ ($n = 5$)。符合 2010 年版《中国药典(二部)》中生物样品检测的 RSD 应小于 15%,相对误差在±15%以内的基本要求^[9]。结果见表 1。

提取回收率试验:分别用注射用水和空白血浆稀释质量浓度为 200 μg/mL 的利卡西平标准贮备液,得高、中、低质量浓度(30,10,2 μg/mL)的利卡西平水溶液标准样品和利卡西平加标血浆样品各 400 μL。水溶液标准样品分别加入质量浓度为 240 μg/mL 的多索茶碱内标 40 μL,涡漩 10 s 混匀后上机检测。加标血浆样品按 2.3 项下方法处理后检测。同法操作 5 次。用利卡西平



1. 杂质 2. 多索茶碱 3. 利卡西平
A. 空白血浆 B. 多索茶碱+利卡西平 C. 空白血浆+多索茶碱+利卡西平 D. 患者血浆+多索茶碱

图1 高效液相色谱图

表1 利卡西平的精密度与准确度试验结果($\bar{X} \pm s, n=5$)

配制质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	日内精密度				日间精密度	
	测定质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	方法回收率(%)	平均相对误差(%)	RSD(%)	测定质量浓度($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)
30	30.29 ± 0.72	100.97	0.97	2.33	29.82 ± 0.40	1.98
10	9.94 ± 0.19	99.40	-0.60	1.91	9.84 ± 0.29	4.37
2	2.07 ± 0.12	103.50	3.50	5.83	2.02 ± 0.09	6.41

的血浆检测浓度/水溶液检测浓度 $\times 100\%$,计算提取回收率。结果显示,高、中、低质量浓度加标血浆样品的平均提取回收率分别为77.20%,77.02%,79.94%,RSD分别为2.33%,1.92%,5.83%($n=5$)。

稳定性试验:分别配制利卡西平高、中、低质量浓度(30,10,2 $\mu\text{g/mL}$)的加标血浆样品,各质量浓度分别配制5份,室温避光放置,并分别于0,2,4,6,8 h时,检测利卡西平的质量浓度。结果显示,各样品室温放置8 h内的质量浓度变化较小,RSD介于0.93%~5.38%($n=5$)。

干扰性试验:在收集到的68例临床利卡西平血样中,有些患者合用了左乙拉西坦、苯妥英钠、拉莫三嗪、丙戊酸钠、卡马西平、托吡酯、地西洋和氯硝西洋等抗癫痫药物中的个别药物,或其他非抗癫痫药物,在检测利卡西平血药浓度时,均未发现有干扰现象。

2.5 临床应用

某患者,女,32岁,身高155 cm,体质量55 kg,使用

奥卡西平近2个月,目前口服奥卡西平300 mg,每天2次,近次给药的10.5 h采血送检,检测质量浓度为8.53 $\mu\text{g/mL}$,应用药代动力学公式原理计算,得知患者利卡西平的消除半衰期($t_{1/2}$)为10.4 h,现在可能的稳态谷峰质量浓度波动范围为8.0~10.0 $\mu\text{g/mL}$,低于有效质量浓度参考范围(12~35 $\mu\text{g/mL}$)^[10-11],近期偶有癫痫发作,肾消除速率居中[群体 $t_{1/2}$ 为(9.3 $\pm$ 1.8)h],为有效性考虑,药师建议:口服奥卡西平600 mg,每天2次,患者将来可能的利卡西平稳态谷峰质量浓度波动范围为16.0~20.0 $\mu\text{g/mL}$,1周后可复查药物稳态谷质量浓度。

3 讨论

流动相选择:有文献使用磷酸盐作流动相^[1],优点是可提供较稳定的酸性环境,色谱稳定性较好,缺点是磷酸盐浓度较高,易堵塞色谱柱,损伤溶剂泵,且配制较烦琐,易长霉;也有文献用三氟乙酸^[12]或甲酸^[13]提供酸性环境,因本实验室贮备有冰醋酸,故用0.3%的醋酸

提供酸性环境,色谱效果较好,具有醋酸浓度较低、容易配制、合用乙腈、流动相组成较简单等优点。

血样处理方法考察:有文献使用甲醇沉淀血浆蛋白^[14],也有文献用乙醚^[1]、二氯甲烷^[12]、甲基叔丁基醚^[15]和乙酸乙酯^[13,16]处理血样,有文献加用异丙醇提高回收率^[12]。考虑到甲醇、二氯甲烷对人体毒性较大,乙醚回收率较低,甲基叔丁基醚较难得到,故选用毒性较小的乙酸乙酯+异丙醇处理血浆样品,利卡西平萃取率较理想,杂质、内标和样品峰形较尖锐,分离较好。

波长选择:利卡西平检测波长多选择210~240 nm的较短波长^[12,15],但波长越短,杂质峰越多,基线容易飘移,故本研究选用240 nm作为检测波长。

内标选择:多索茶碱葡萄糖注射液的室温有效期可达2年(说明书),有文献报道可用作HPLC检测内标^[17],且患者体内多不含多索茶碱。研究显示,多索茶碱与利卡西平样品及血浆杂质之间分离度和重复性都比较好。用乙二醇-水(37:13)混合溶剂配制利卡西平的标准贮备液和多索茶碱内标液,优点是在-20℃的冰箱中贮存不会结冰,用时便于吸取,在26℃水浴中静置10 min平衡至室温后,溶剂挥发很少,吸水也很少,配制试剂的质量浓度稳定性较好。

鼠标读数:试验发现,在确定没有杂质峰与样品或内标峰有重叠的情况下,内标和样品的峰前较远处,有时会因倒峰现象而导致电脑的峰高读数产生较大偏差,如果改用鼠标读数,即用鼠标在检测峰最高点与峰前近低点的读数差,得到绝对峰高值,读数会比电脑直接读数准确。

溶剂选择:利卡西平的样品提取物常用流动相或甲醇溶解,但考虑到毒性问题,本实验室用注射用水100 μL作替代溶剂,混合得到澄清或乳浊液体,上机试验,无保护柱堵塞情况,效果良好。

有效质量浓度:利卡西平的有效质量浓度参考范围目前尚无定论,一般认为是3~35 μg/mL^[18]。但有文献报道为12~35 μg/mL^[10-11]时,可更好地控制癫痫发作;大于35 μg/mL时,易发生疲劳、头痛、头晕、嗜睡、低钠血症等不良反应(说明书)。

相关参数:利卡西平的群体药代动力学参数,奥卡西平片有说明书记载,吸收分数(F)大于0.95,表观分布容积(V_d)为0.68 L/kg,达峰时间(T_m)为5 h,肾消除分数(F_u)大于0.95,儿童 $t_{1/2}$ 为5~9 h,成人 $t_{1/2}$ 为(9.3±1.8) h,老人更长。群体药代动力学参数结合血药浓度检测值等个体药代动力学参数,应用药代动力学公式原理,能较准确地推算出患者个体的利卡西平消除半衰期和稳态血药浓度波动范围,便于指导患者个体化合理用药。

参考文献:

- [1] 何益锋,程 钢,周述香,等. 高效液相色谱法测定人血浆中奥卡西平活性代谢物利卡西平的浓度[J]. 中南药学,2011,9(9):683-686.
- [2] 冯健全,许俊羽,吴 晔,等. RP-HPLC法测定人血浆和唾液中奥卡西平活性代谢物的浓度[J]. 中国药理学杂志,2013,29(4):299-301.
- [3] 劳荣巨,李伟恩,胡荣亮,等. 奥卡西平治疗儿童癫痫血药浓度监测及其临床应用研究[J]. 中国药业,2016,25(17):88-90.
- [4] 李 霞,刘小红,杨 乐. 不同年龄阶段癫痫患儿奥卡西平活性代谢物血药浓度的临床价值[J]. 现代检验医学杂志,2015,30(1):143-148.
- [5] 张瑞晓. 奥卡西平治疗儿童癫痫64例[J]. 山东医药,2014,54(8):104-105.
- [6] 田 洁,宋少刚,时 涛,等. RP-HPLC法测定血浆中奥卡西平及其代谢产物的浓度[J]. 中国药师,2009,12(12):1689-1691.
- [7] 马 婧,黄晓会,陈霖晖,等. 癫痫患儿奥卡西平活性代谢产物血药浓度监测结果分析[J]. 中国医药,2016,11(11):1634-1636.
- [8] 汪 洋,张华年,陈渝军,等. 奥卡西平活性代谢物血清浓度与临床疗效和安全性的关系[J]. 医药导报,2016,35(9):955-959.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录196.
- [10] 单若莹. 奥卡西平治疗成人癫痫发作的血药浓度、临床疗效和安全性探讨[J]. 中国继续医学教育,2015,7(15):132-133.
- [11] 邹 蓉,赵合庆,戴永萍,等. 年龄及联合用药对癫痫患者奥卡西平血药浓度的影响[J]. 临床神经病学杂志,2015,28(2):110-113.
- [12] 杨常成,段小月. 用RP-HPLC法同时测定拉莫三嗪和奥卡西平的血药浓度[J]. 药学服务与研究,2009,9(4):295-297.
- [13] 张全英,徐文俊,俞蕴莉. 高效液相色谱法测定癫痫患者血浆中奥卡西平活性代谢物的浓度及其血药浓度与疗效关系评价[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(1):106-109.
- [14] 林志燕,刘海涛,舒 扬,等. 217例次癫痫患儿血清奥卡西平代谢物浓度监测分析[J]. 医药导报,2013,32(1):12-14.
- [15] 迟丹怡,李中东,焦 正,等. 人血浆中奥卡西平及其代谢物10-羟基卡马西平的HPLC法测定[J]. 药物分析杂志,2006,26(9):1195-1198.
- [16] 谢 宁,林志霞,杨红梅,等. HPLC法测定人血浆中奥卡西平及其活性代谢产物的浓度[J]. 中国药房,2015,26(11):1496-1498.
- [17] 朱金平,林秀丽,陈春枚,等. 互为内标法测定人血清茶碱与多索茶碱的浓度[J]. 海峡药学,2011,23(6):243-245.
- [18] 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.

(收稿日期:2017-08-16;修回日期:2017-12-07)