

RP-HPLC 法测定癫痫患者血浆中奥卡西平血药浓度和药动学研究

詹三华, 袁孔现

铜陵市人民医院 药剂科, 安徽 铜陵 244000

摘要: **目的** 建立人血浆中奥卡西平药物浓度的 RP-HPLC 检测方法, 并研究其在人体内的药动学。**方法** 采用液-液萃取法, 用萃取液甲基叔丁基醚萃取癫痫患者血浆中的奥卡西平后, 以阿普唑仑为内标。色谱柱为 Kromasil 100A C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 40 °C, 流动相为甲醇-乙腈-水-磷酸 (30:30:40:0.04), 体积流量 1.0 mL/min, 紫外检测波长 243 nm, 固定进样量 20 μL。以 3p97 软件计算 10 名受试者清晨空腹单剂量口服奥卡西平片 600 mg 后的平均药动学参数。**结果** 血浆中内源性杂质对样品测定无干扰, 奥卡西平在 21.6~2 160.0 μg/L ($r=0.999 2$) 线性关系良好, 最低定量限 21.6 μg/L; 方法回收率为 95.45%~107.69%; 日内 RSD 值为 4.97%~7.35%, 日间 RSD 值为 4.81%~11.27%。含药血浆经 3 次冻融后稳定性良好。**结论** 本方法操作快速、简便、灵敏度高、准确度高, 可用于含奥卡西平血样的即时检测分析和临床药动学研究。

关键词: 奥卡西平; 血药浓度; 药动学; 反相高效液相色谱

中图分类号: R283.6; R944.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)01-0040-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.01.009

Determination of oxcarbazepine in plasma of epileptic patient by RP-HPLC and pharmacokinetics study

ZHAN San-hua, YUAN Kong-xian

Department of Pharmacy, the People's Hospital of Tongling, Tongling 244000, China

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for the determination of oxcarbazepine in plasma of epileptic patient and to study its pharmacokinetics. **Methods** Acidified plasma samples were processed by a simple liquid-liquid extraction. Alprazolam was used as internal standard. The HPLC analytical column was Kromasil 100A C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 40 °C, the mobile phase consisted of a mixture of CH₃OH-CH₃CN-H₂O-H₃PO₄ (30:30:40:0.04), and delivered at a flow of 1.0 mL/min. The UV detection wavelength was set at 243 nm, and the injection volume was 20 μL. The pharmacokinetic parameters of oxcarbazepine in 10 volunteer after a single oral dose of Oxcarbazepine Tablets (600 mg) were calculated using 3p97 Software. **Results** The drug from plasma did not interfere with the determination of oxcarbazepine and alprazolam. The concentration of oxcarbazepine in plasma had good linearity relationship ($r = 0.999 2$) in the range of 21.6 — 2 160.0 μg/L. The lowest detection limit was 21.6 μg/L. The recovery ranges were 95.45% — 107.69%. The RSD values of intra- and inter-day were 4.97% — 7.35% and 4.81% — 11.27%, respectively. The sample stability was good after freeze thaw for three times. **Conclusion** The method is simple, sensitive, and accurate. This could be used for the immediate analysis of the concentration of oxcarbazepine in plasma and pharmacokinetics study.

Key words: oxcarbazepine; plasma concentration; pharmacokinetics; RP-HPLC

奥卡西平是卡马西平的 10-酮基衍生物, 由诺华制药公司研制, 临床用于复杂性部分发作、全身强直阵挛性发作的单药治疗以及难治性癫痫的辅助治疗^[1]。奥卡西平的治疗窗窄, 抗癫痫效果、药物不良反应与药动学特征有关。为了评价疗效或确定

给药方案, 方便个体化给药, 提高药物治疗水平, 达到临床安全、有效、合理使用, 预防药品不良反应的发生, 开展奥卡西平治疗药物监测具有重要的临床意义。本实验在参考文献研究^[2-4]的基础上, 采用以阿普唑仑为内标, 建立了测定奥卡西平的血药

收稿日期: 2013-07-25

作者简介: 詹三华 (1967—), 男, 安徽省太湖县人, 主任药师, 学士学位, 药剂科主任, 研究方向为医院药学。Tel: (0562) 5838080

浓度的 RP-HPLC 法, 为临床合理用药提供依据, 便于确立癫痫患者使用奥卡西平的个体化给药方案。

1 仪器和试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪, 配置 LC—20AD 四元泵, SPD—20AV 紫外检测器, CTO—20A 柱温箱, LC solution 液相色谱工作站(日本岛津公司); XW—80A 型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂); LD4—2A 型离心机(北京医用离心机厂); 79328A 型电光分析天平(万分之一, 上海天平仪器厂); MDF—382E 超低温冰箱(日本三洋电机生物医学有限公司)。

1.2 药品和试剂

奥卡西平对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 100657-200401, 规格 100 mg); 阿普唑仑对照品(中国食品药品检定研究院国家麻醉品检定实验室, 批号 1218-9702, 规格 100 mg); 奥卡西平片(商品名为曲莱, 瑞士诺华制药有限公司, 规格 300 mg/片, 批号 110309、110512)。乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 磷酸、氢氧化钠(分析纯); 纯化水(本实验室自制); 空白血浆由本院血库配型室提供。

1.3 受试者

10 名男性志愿者, 汉族, 年龄(25.8±8.6)岁, 体质量(52.7±6.4) kg, 身高(166.8±4.2) cm。试验前所有受试者经肝、肾功能、血压、心电图检查均正常。无药物过敏史。受试前 2 周内未服用任何药物。受试者了解受试须知后, 签署知情同意书。试验经铜陵市人民医院医学伦理委员会审批通过。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil 100A C₁₈ (250 mm×4.6 mm,

5 μm), 柱温: 40 °C, 流动相: 甲醇-乙腈-水-磷酸(30:30:40:0.04), 体积流量: 1.0 mL/min, 紫外检测波长: 243 nm, 进样量: 20 μL。在该色谱条件下, 血浆样品经液-液萃取法处理后, 其中内源性物质不干扰奥卡西平和内标物阿普唑仑的测定, 奥卡西平与阿普唑仑分离良好, 两者保留时间分别为 4.308、6.906 min。奥卡西平的最低定量限为 21.6 μg/L

2.2 溶液的制备

精密称取奥卡西平对照品 13.5 mg, 加甲醇溶解并定容至 25 mL, 得 540.0 mg/L 奥卡西平标准贮备液。4 °C 避光冷藏, 使用时用甲醇稀释成 54.0 mg/L 奥卡西平工作溶液。

精密称取阿普唑仑对照品 12.0 mg, 加甲醇溶解并定容至 25 mL, 得 480.0 mg/L 阿普唑仑标准贮备液。4 °C 避光冷藏, 使用时用甲醇稀释成 48.0 mg/L 阿普唑仑工作溶液。

2.3 血浆样品的预处理

取受试血浆 0.5 mL, 置 15 mL 锥底离心玻璃管中, 加入 48.0 mg/L 阿普唑仑内标溶液 2 μL, 加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 50 μL 碱化样品, 涡旋混匀 30 s 后加甲基叔丁基醚 5.0 mL, 涡旋震荡萃取 2 min, 4 000 r/min 离心 3 min, 取上层有机相于 65 °C 水浴 N₂ 流挥干, 残渣加 100 μL 流动相溶解, 即得。

2.4 专属性试验

空白血浆、空白血浆+奥卡西平对照品+阿普唑仑和受试者口服奥卡西平片 3 h 后的血浆样品色谱图见图 1。可见, 奥卡西平、阿普唑仑的保留时间分别为 4.308、6.906 min。血浆中内源性物质对样品的测定无干扰, 色谱图的峰形良好, 分离完全。单组色谱分析时间为 10 min。

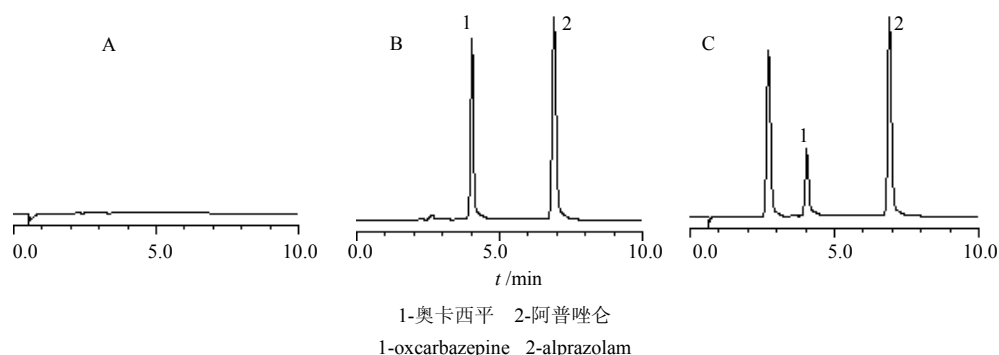


图1 空白血浆(A)、空白血浆+奥卡西平对照品+阿普唑仑(B)和患者3 h 血浆样品(C)的 RP-HPLC 图谱
Fig. 1 RP-HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma+oxcarbazepine+alprazolam (B), and plasma sample at 3 h (C)

2.5 线性关系考察

精密吸取 54.0 mg/L 奥卡西平工作液适量, 加入空白血浆中, 制成 21.6、43.2、86.4、172.8、540.0、1 080.0、2 160.0 $\mu\text{g/L}$ 系列质量浓度标准血样, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。取含奥卡西平系列浓度标准血样, 按“血浆样品的预处理”项下方法处理, 进样测定。每个质量浓度测定 3 次, 结果取平均值。分别以样品与内标峰面积比对质量浓度作线性回归, 得标准曲线方程 $Y=0.6738X+0.0018$, $r=0.9992$, 结果表明血浆中奥卡西平在 21.6~2 160.0 $\mu\text{g/L}$ 线性关系良好。

2.6 精密度试验

取含奥卡西平质量浓度为 21.6、172.8、2 160.0 $\mu\text{g/L}$ 血浆样品, 按“血浆样品的预处理”项下方法处理, 于 1 d 内每个质量浓度测定 5 次, 计算日内精密度; 在同 1 周内每天进行 1 次检测, 计算日间精密度。结果见表 1。

表 1 精密度试验结果 ($n=5$)

Table 1 Results of precision test ($n=5$)

加入质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	测得质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%	
21.6	日内	23.0	5.22
	日间	22.7	9.25
172.8	日内	186.1	4.35
	日间	180.5	3.77
2 160.0	日内	2 061.7	4.07
	日间	2 130.7	4.52

2.7 稳定性试验

将含药血浆反复冷冻 ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)、融化, 按“血浆样品的预处理”项下方法处理, 测定, 1 周内每天测定 1 次, 连续测定 5 次。结果表明血浆样品 5 d 内反复冻融测定稳定性良好, 结果见表 2。

表 2 稳定性试验结果 ($n=5$)

Table 2 Results of stability ($n=5$)

血样	测得质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	RSD/%
1	303.4 ± 21.9	7.22
2	542.2 ± 13.0	2.40
3	$1 115.1\pm 35.9$	3.22

2.8 回收率试验

取含奥卡西平质量浓度为 21.6、172.8、2 160.0 $\mu\text{g/L}$ 血浆样品, 按“血浆样品的预处理”项下方法处理, 进样测定并计算。每个质量浓度测定 5 次,

结果取平均值。结果见表 3。

表 3 方法回收率试验结果 ($n=5$)

Table 3 Results of recovery test ($n=5$)

加入质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
21.6	106.30 ± 7.81	7.35
172.8	107.69 ± 5.61	5.21
2 160.0	95.45 ± 4.74	4.97

2.9 药物干扰试验

取临床常用的抗癫痫药、抗精神病药和抗菌药, 配制成 50.0~100.0 mg/L 的甲醇溶液, 各取适量与奥卡西平、阿普唑仑对照品溶液混合, 加空白血浆, 按“血浆样品的预处理”项下方法处理, 进样检测。结果在该实验条件下, 卡马西平、丙戊酸、巴比妥、苯妥英、地西洋、氯硝西洋、艾司唑仑、头孢曲松、头孢哌酮和替硝唑等药物不干扰奥卡西平和阿普唑仑的测定。

2.10 人体药动力学试验

10 名受试者清晨空腹单剂量口服奥卡西平片 600 mg, 分别于给药前 0 h 及给药后 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0、36.0、48.0 h 抽取前臂静脉血 3.0 mL, 分离血浆, 按“血浆样品的预处理”项下方法处理, 以奥卡西平与阿普唑仑峰面积比代入标准曲线方程, 计算血浆中奥卡西平的质量浓度。10 名受试者单剂量口服奥卡西平片 600 mg 的平均药-时曲线见图 2。药-时数据经 3p97 软件处理, 所得药动力学参数符合一室模型, 主要药动力学参数见表 4。

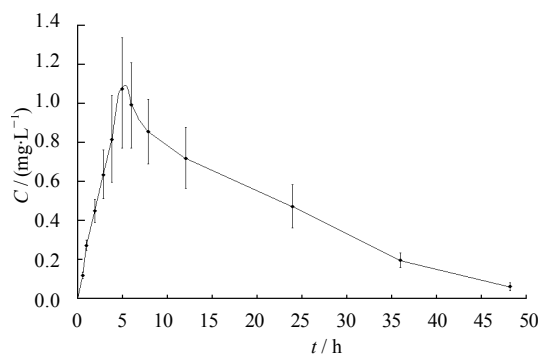


图 2 10 名受试者单剂量口服奥卡西平片 600 mg 的平均药-时曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of oxcarbazepine in 10 volunteers after a single oral dose of 600 mg Oxcarbazepine Tablets (600 mg)

表4 10名受试者单剂量口服奥卡西平片600 mg的药动学参数 (n=10)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of oxcarbazepine in 10 volunteers after a single oral dose of Oxcarbazepine Tablets (600 mg) (n=10)

受试者	$t_{1/2K_e}$ /h	t_{max} /h	$C_{max}/(mg \cdot L^{-1})$	$AUC_{0-48}/(\mu g \cdot h \cdot L^{-1})$	$AUC_{0-\infty}/(\mu g \cdot h \cdot L^{-1})$	MRT_{0-48} /h	$MRT_{0-\infty}$ /h
1	14.65	7.0	0.85	16.82	18.45	20.23	26.68
2	19.68	6.0	1.62	26.22	29.15	33.49	39.74
3	25.22	4.0	0.88	40.55	48.49	56.36	63.98
4	12.09	8.0	1.15	22.66	27.71	34.68	39.25
5	10.66	5.0	0.98	36.84	39.54	51.22	58.23
6	20.44	4.0	1.08	23.81	26.64	24.59	27.11
7	19.49	6.0	0.64	29.74	35.20	44.42	52.68
8	12.26	3.0	1.08	22.65	29.54	38.90	45.55
9	15.68	8.0	0.92	18.86	22.68	33.60	39.43
10	19.34	5.0	1.42	14.68	17.26	20.52	24.56
$\bar{x} \pm s$	15.95 ± 4.62	5.60 ± 1.71	1.06 ± 0.28	25.28 ± 8.36	29.47 ± 9.57	35.80 ± 12.28	41.72 ± 13.55

结果显示, 10名男性受试者单剂量口服奥卡西平片600 mg后, 测得奥卡西平的血药峰浓度(C_{max})个体差异较大(0.64~1.62 mg/L), 达峰时间 t_{max} 在5 h左右, 平均为(5.60±1.71) h, 平均 $t_{1/2K_e}$ 为(15.95±4.62) h, 表明本药在体内滞留时间较长。

3 讨论

3.1 药物特点

奥卡西平药理作用和临床疗效优于卡马西平^[5], 阻断脑细胞的电压相关性钠通道, 稳定过度兴奋的神经细胞膜, 抑制神经元过度放电, 降低经突触传递的兴奋冲动。奥卡西平单药或联合用药治疗癫痫的疗效与卡马西平、苯妥英钠、丙戊酸相当, 但患者更易于耐受, 对肝药酶诱导和自身诱导作用小, 与其他药物之间的相互作用小。奥卡西平相比于其他新型抗癫痫药物的不良反应较少, 且易于控制, 常见不良反应为低钠血症^[6]。在使用奥卡西平替换卡马西平期间, 应当监测使用的抗癫痫药物的血药浓度。奥卡西平可作为传统抗癫痫药物的替代药物使用。

3.2 测定波长的选择

文献报道奥卡西平在210、243、256、302 nm有吸收, 且在256、302 nm处有最大吸收^[2-4]。由于210 nm与甲醇的最大截止波长205 nm比较接近, 流动相中的甲醇对实验检测会产生较大的干扰, 故不采用。本实验选择243 nm波长进行检测, 兼顾

奥卡西平和阿普唑仑的吸收光谱, 在此波长处, 两者均有较好的灵敏度, 且基线的波动很小。

3.3 流动相的选择和色谱系统的养护

流动相使用混合试剂, 配制时先调配0.1%磷酸水溶液, 经微孔滤膜滤过后加入色谱纯甲醇、乙腈, 经超声脱气后即可使用。对流动相中各组分的比例调节以优化色谱分析的灵敏度、准确度和色谱峰的分度, 最终确定本实验使用的流动相配比。流动相中加入磷酸有助于调节pH值, 以避免实验中的拖尾现象。检测实验结束后先用乙腈-水(10:90) 0.5 mL/min冲洗色谱柱60 min, 以清除色谱柱中沉积的水溶性杂质, 然后以乙腈-水(90:10) 0.5 mL/min冲洗色谱柱60 min后过夜, 以保养色谱柱和色谱分析系统。

3.4 内标的选择

文献报道可供选择的内标物有甲喹酮、地西洋、艾司唑仑等。经实验条件对比发现, 如果使用时西洋作内标, 色谱图中奥卡西平峰与地西洋峰相距太远, 分析时间较长。使用艾司唑仑为内标时, 虽然在本实验条件下, 色谱图中奥卡西平峰与艾司唑仑峰分离较好, 但是如果患者是在使用奥卡西平替换卡马西平治疗期间, 则艾司唑仑峰与卡马西平峰非常接近, 容易发生融合, 进而出现积分误差, 影响分析结果的准确性。因此选用阿普唑仑为内标, 结果发现, 奥卡西平、卡马西平、阿普唑仑分离度良好, 不出现交叉干扰。

3.5 血样检测的即时性

含奥卡西平的血样需要立即进行提取、检测。血样中含有的奥卡西平在等待检测期间仍然会因血液中的酮基还原酶的作用而降解,因此需要即时检测。如果不能即时检测或者因为送检时间较长而耽误,可将血样在 -20°C 冷冻贮存后送检或提取后送检。

3.6 排除干扰

RP-HPLC 法测定奥卡西平的方法中,检测所需的奥卡西平剂量微小,应避免血样中带入的其他物质的干扰,特别是因治疗需要而联用的其他抗癫痫药、抗精神病药等药物。排除干扰的方法应从多方面考虑,在本实验中,血样提取时加入氢氧化钠即可排除大多数酸性物质的干扰,如苯妥英、苯巴比妥、丙戊酸等药物,这些药物可留存于血样中不被甲基叔丁基醚萃取。另外,在色谱分析中,也可适当调整流动相的配比,使色谱峰尽量分离,以排除杂质的干扰。

3.7 有效治疗窗

奥卡西平在肝脏或血液内细胞溶质芳基酮还原

酶的作用下迅速转化为 10-羟基卡马西平。奥卡西平在癫痫患者体内的稳态浓度较低^[2],仅为 $0\sim 2.1\text{ mg/L}$,本方法的线性范围基本涵养奥卡西平的治疗窗,能够满足临床药物浓度监测,也能用于患者过量服药情况下的中毒药物浓度监测。

参考文献

- [1] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M].第17版.北京:人民卫生出版社,2011:216.
- [2] 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.
- [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):3596-3598.
- [4] 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.
- [5] 黄圣明,王海珍,黄希顺.奥卡西平治疗癫痫的临床研究[J].中国实用神经疾病杂志,2010,13(1):30-32.
- [6] 徐德,郑荣远.新型癫痫药物的严重不良反应及其防范[J].药物警戒与合理用药,2010,9(2):74-78.