interactions between glucocorticoid and catecholamine signaling pathways [J]. Journal of allergy and clinical immunology, 2002, 110(6 Suppl): S247-S254.

[28] SHI F H, SHEN L, PAN M M, et al. The successful rapid adjustment of blood glucose in a patient with acute coronary syndrome, renal insufficiency, and diabetes: a case report of management coordinated by clinical pharmacists and clinicians [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 756. doi: 10.3389/fphar.2020.00756.

(编辑:刘雄志)

(收稿日期:2020-12-14 修回日期:2021-02-20)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2022.01.005

· 论著 ·

超高效液相色谱法测定奥卡西平活性代谢产物的血药浓度

宗静,李发双,茹毅,余绍春,雷嫣,李惠英(昆明市儿童医院,昆明 650034)

[摘要]**目的**:建立测定奥卡西平活性代谢产物 10,11-二氢-10-羟基卡马西平血药浓度的超高效液相色谱法。**方法**:采集静脉血样本、高氯酸沉淀蛋白,离心取上清液进样,色谱柱为 Waters ACQUITY UPLCBEH C_{18}(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),流动相为 0.05% 甲酸:乙腈=75:25,检测波长 254 nm,流速 0.20 mL/min,柱温 40 ℃。**结果**:10,11-二氢-10-羟基卡马西平在 5~100 μg/mL 浓度范围峰面积与内标峰面积比值对浓度比值的线性关系良好(r=0.999 9),回收率、精密度、稳定性、准确度均在限度要求范围内。**结论**:该方法操作简单、准确、灵敏,可用于临床监测奥卡西平活性代谢产物 10,11-二氢-10-羟基卡马西平血药浓度监测。

[关键词]癫痫;奥卡西平;10,11-二氢-10-羟基卡马西平;血药浓度;超高效液相色谱法

[中图分类号]R917 [文献标识码]A [文章编号]1672-108X(2022)01-0019-03

Determination for Blood Concentration of Oxcarbazepine Active Metabolite by Ultra-High Performance Liquid Chromatography

Zong Jing, Li Fashuang, Ru Yi, Yu Shaochun, Lei Yan, Li Huiying (*Kunming Children's Hospital*, *Kunming* 650034, *China*)

[**Abstract**]**Objective**: To establish the ultra-high performance liquid chromatography method for the blood concentration determination of active metabolite of oxcarbazepine 10,11-dihydro-10-hydroxyl carbamazepine. **Methods**: Venous blood samples were collected, proteins were precipitated by perchloric acid, and the supernatant was centrifuged and fed into the sample. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLCBEH C_{18}(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) with 0.05% formic acid aqueous solution : acetonitrile=75 : 25 as mobile phase. The detection wavelength was 254 nm, the flow rate was 0.20 mL/min, and the column temperature was 40 ℃. **Results**: The linearity of the peak area of 10, 11-dihydro-10-hydroxyl carbamazepine in the concentration ranged from 5 to 100 μg/mL and the peak area ratio of the internal standard to the concentration ratio were good (r=0.999,9), and the recoveries, precision, stability and accuracy were within the limit requirements. **Conclusion**: The method is simple, accurate and sensitive, which can be used for blood concentration monitoring of active metabolite of oxcarbazepine 10, 11-dihydro-10-hydroxyl carbamazepine.

[**Keywords**]epilepsy; oxcarbazepine; 10, 11-dihydro-10-hydroxyl carbamazepine; blood concentration; ultra-high performance liquid chromatography

奥卡西平是卡马西平的 10-酮基衍生物[1],临床上主要用于局限性和强直-阵挛性癫痫、三叉神经痛及情感性精神障碍的治疗。奥卡西平服药后药动学过程个体差异大,年龄、性别、联合用药等因素都会影响其疗效及不良反应[2],因此临床应监测血药浓度。

奥卡西平是前体药物,经口服完全吸收后会迅速代谢为活性产物 10,11-二氢-10 羟基卡马西平(MHD),生物利用度约 95%[3],因此监测 MHD 血药浓度具有临床意义[4],可有效反映奥卡西平的血药浓度,从而指导临床安全合理用药和制定个体化给药方案,减少药物不良反应。

MHD 的检测方法有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等。但前者保留时间较长(6~9 min)[5-7],目前医疗机构中需要测定 MHD 血药浓度的患儿与日俱

作者简介:宗静(1987.07-),女,硕士,主管药师,主要从事医院药学工作,E-mail: 1040734250@qq.com。

通讯作者:李惠英(1980.04-),女,硕士,副主任药师,主要从事医院药学工作,E-mail: 1819971603@qq.com。

增,太长的保留时间制约了该方法的普及;后者仪器方法成本较高,操作复杂。而超高效液相色谱法避开了这些不足,不但操作简单,而且保留时间明显缩短,相同时间内可以测定更多患儿的血药浓度,能够满足临床需要。

1　仪器与试剂

1.1　仪器

Waters CQUITY PLC 系统(Waters 公司,美国);电子天平(CP114,奥豪斯仪器);XH-B 型旋涡混合器(江苏康健);低温高速冷冻离心机(Thermo 公司,美国);低速离心机(安徽中科)。

1.2　试剂

10,11-二氢-10-羟基卡马西平对照品(美国 QCC,CAS:29331-92-8,纯度≥98%);6-甲氧基水杨酸标准品(内标,麦克林,CAS:3147-64-6,纯度≥98%);小牛血清(美国,批号 1751588);乙腈(MercK 公司,色谱纯);高氯酸(国药集团化学试剂有限公司,优级纯),甲酸(天津化学试剂三厂,分析纯);实验用水:娃哈哈纯净水。

2　方法与结果

2.1　标准溶液配制

分别精密称取 MHD 和内标物质各 10 mg,甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,得到浓度为 1 mg/mL 的标准溶液。

2.2　样品处理

取 200 μL 血清于 EP 管内,加入内标 6-甲氧基水杨酸 20 μL,涡旋混合后加入 7% 高氯酸 200 μL,涡旋 1 min 后,室温下以转速 14 000 r/min 高速离心 11 min,取上清液进样检测。

2.3　色谱条件

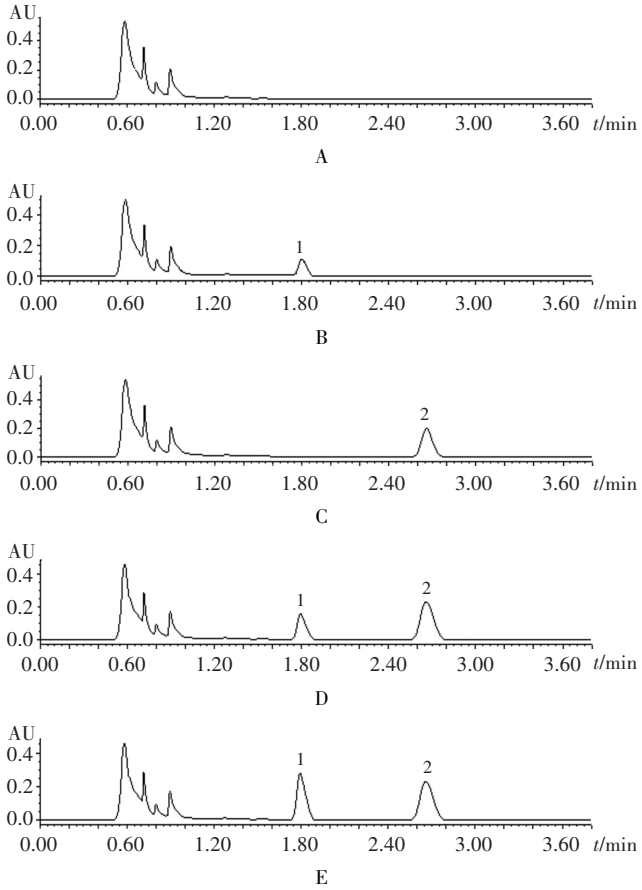
Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18}(2.1 mm×50 mm,1.7 μm),流动相为 0.05% 甲酸 : 乙腈 = 75 : 25(*V*/*V*),检测波长 254 nm,流速 0.20 mL/min,柱温 40 ℃。MHD 保留时间 1.81 min,内标保留时间 2.68 min,二者分离好,无血清内源性物质干扰,见图 1。

2.4　标准曲线

取 180 μL 空白血清至 EP 管中,分别加入 MHD 标准工作液及内标工作液 20 μL,涡旋混匀,制备成理论浓度为 100、75、50、25、10、5 μg/mL 的标准曲线血浆样本。按“2.2 项”对样本进行处理,“2.3 项”下的色谱条件进行样本测定。MHD 峰面积与内标峰面积比值(y)对浓度比值(x)绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 0.070\ 4x - 0.014\ 3$,$r = 0.999\ 9$,线性范围为 5 ~ 100 μg/mL。

2.5　精密度、准确度实验

取空白血清,分别制成 100、50、10 μg/mL 的高、中、低浓度的血清样品,按“2.2 项”、“2.3 项”下进行处理测定,每个浓度日间测定 5 次,得到日内精密度,连续测定 5 d,计算日间精密度,见表 1。



A:空白血清;B:空白血清+MHD;C:空白血清+内标;D:空白血清+MHD+内标;E:患儿血清+内标

1. MHD;2. 6-甲氧基水杨酸

图 1　MHD 和内标 UPLC 色谱图

表 1　MHD 精密度、准确度结果

浓度/(μg/mL)	样本数	检测浓度/(μg/mL)	准确度/%	日间精密度/%	日内精密度/%
100	5	97.56	7.1	1.45	2.04
50	5	54.44	3.9	2.43	1.25
10	5	12.70	2.0	1.11	1.02

2.6　回收实验

对照样本的制备:精密吸取 160 μL 小牛血清至离心管中,分别精密加入 MHD 标准曲线工作液 20 μL、内标 20 μL 及水 20 μL,涡旋混匀,制备成理论含 MHD 浓度为 10 μg/mL 的血浆样本,并平行制备 5 个样本。

加标样本的制备:精密吸取 160 μL 小牛血清至离心管中,分别精密加入 20 μL MHD 标准曲线工作液、内标 20 μL,共 3 份,再分别加入 20 μL MHD 标准液,制备成理论浓度为 60、35、20 μg/mL 的血浆样本,每个浓度平行制备 5 个样本。

按“2.2 项”下处理样本,“2.3 项”下色谱条件分析,并记录二者峰面积,计算两者比值 y,将其带入标准曲线计算样品浓度,并分别计算同一浓度样本的实测浓度的平均值、标准差、以及加标回收率的平均值、标准差和相

对偏差，见表 2。

表 2 MHD 加标回收率结果

MHD 浓度/(μg/mL)	测得量均值/(μg/mL)	回收率均值/%	RSD/%
60	58.35±0.15	94.64±1.57	1.05
35	31.99±0.48	90.74±1.39	1.49
20	19.31±0.29	88.03±1.51	1.53

2.7 稳定性实验

分别配制高、中、低 3 个浓度的血清样品，按“2.2 项”下方法处理血样，分别置于室温、4 ℃冰箱、-20 ℃冰箱，分别按“2.3 项”色谱条件进样测定，考察血清样品在室温、冷藏及冻融条件下 MHD 的稳定性，结果显示 MHD 和内标在以上温度条件下均保持稳定，见表 3。

表 3 MHD 稳定性实验结果

温度	MHD 浓度/(μg/mL)	测得量/(μg/mL)	RSD/%
室温	60	58.35±0.15	1.05
	35	31.99±0.48	1.49
	20	19.31±0.29	1.53
4 ℃	60	57.65±0.18	1.97
	35	34.67±0.14	1.04
	20	19.62±0.70	1.23
-20 ℃	60	55.48±0.10	2.70
	35	30.14±0.13	3.92
	20	17.81±0.05	2.41

3 讨论

奥卡西平与传统抗癫痫药物相比，具有患者耐受性好、药物相互作用少、对肝药酶诱导作用小等优势，广泛用于儿童癫痫治疗[8]。但该药治疗窗较窄，药代动力学受年龄、性别、体质量等多种因素影响，个体差异较大[9]，且患儿服用该药后出现的不良反应时间、严重程度不一，因此，在儿科临床应用中监测血药浓度是很有必要的，不仅有利于疗效评价，还可以减少不良反应，从而更安全、有效、合理用药。

样本前处理方法参考国内外文献[10-11]，采用甲醇、乙腈等进行蛋白沉淀，但回收率都不甚理想，采用 7% 高氯酸进行蛋白沉淀，经高速离心后取上清液进样，峰型较好、回收率较高。

本实验内标物的选择参考文献[12-13]，实验比较了甲硝唑、对氨基苯甲酸、6-甲氧基水杨酸，结果显示甲硝唑和对氨基苯甲酸出峰时间较早，容易与血浆内源性物质峰重合，调整色谱条件也较难分开。而 6-甲氧基水杨酸能与待测物分开且分离度较好，无内源性物质干扰，并且较稳定，符合内标要求。

流动相选择参考文献[14]，比较乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.1% 三氟乙酸水溶液、甲醇-0.05mL/L 磷酸二氢钾，实验显示甲酸-乙腈峰形较好，通过调整甲酸比例使得拖尾较小，选择 0.05% 甲酸：乙腈=75：25 作为流动相，发现其峰型较好，分离度符合标准。

MHD 在 240 nm 和 254 nm 有特征吸收峰。经过实验对比，254 nm 处的信号优于 240 nm，因此选择 254 nm 作为本实验检测波长。

本课题建立了测定 MHD 血药浓度的超高效液相色谱法，该方法操作简便、稳定性较好、易于重复且经济快捷，可以用于临床血药浓度的监测。

参考文献：

[1] 中华医学会神经病学分会电脑图与癫痫学组. 抗癫痫药物应用专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2011, 44(4): 56-64.

[2] 徐毅超, 楼洪刚, 阮邹荣, 等. 高效液相色谱法同时测定人血浆中拉莫三嗪和奥卡西平活性代谢物血药浓度及其临床应用分析[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 1(39): 165-168.

[3] 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立卡西平的浓度[J]. 中南药学, 2011, 9(9): 683-686.

[4] 朱依谆, 殷明, 邹莉波. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.

[5] 刘伟忠, 黄伟侨, 王广发, 等. 高效液相色谱法测定人血浆奥卡西平代谢产物浓度[J]. 医药导报, 2006, 6(25): 504-506.

[6] 张丽娜, 马小亚, 李莎, 等. 高效液相色谱法测定人血清奥卡西平活性代谢产物 10-羟基卡马西平浓度[J]. 医药导报, 2018, 37(2): 160-164.

[7] 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]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(4): 299-301.

[8] 林志燕, 刘海涛, 舒扬, 等. 年龄性别对癫痫患儿奥卡西平活性代谢物血药浓度的影响分析[J]. 儿科药学杂志, 2012, 18(6): 38-40.

[9] 林志燕, 刘海涛, 舒扬, 等. HPLC 法同时测定血中拉莫三嗪、奥卡西平活性代谢物药物浓度及其在儿童癫痫中的应用[J]. 儿科药学杂志, 2013, 19(2): 4-7.

[10] 王刚, 邓玉, 刘彬. HPLC 法同时测定癫痫患儿血中拉莫三嗪、奥卡西平代谢物——单羟基卡马西平药物浓度研究[C]. 中国药学会应用药理专业委员会第三届学术会议、中国药理学会制药工业专业委员会第十三届学术会议暨 2008 生物医药学术论坛论文汇编, 黑龙江哈尔滨: 2008.

[11] BEGAS E, TSAKALOF A, DARDIOTIS E, et al. Development validation of a reversed-phase HPLC method for licarbazepine monitoring in serum patients under oxcarbazepine treatment [J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31(9). doi: 10.1002/bmc.3950.

[12] 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.

[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(1): 106-109.

[14] FERREIRA A, RODRIGUES M, OLIVEIRA P, et al. Liquid chromatographic assay based on microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine, phenobarbital, phenytoin and the active metabolites carbamazepine-10, 11-epoxide and licarbazepine [J]. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 971(9): 20-29.

（编辑：杨丹）

（收稿日期：2019-09-24 修回日期：2019-12-12）