

固相萃取-HPLC法测定人血清中10-羟基卡马西平的浓度

杨杰*(武汉市儿童医院,武汉 430016)

中图分类号 R969.1;R971⁺.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)05-0620-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.05.15

摘要 目的:建立测定人血清中10-羟基卡马西平(MHD)浓度的方法,促进临床个体化用药和相关药动学研究。方法:血清样品采用固相萃取,用高效液相色谱法进样测定。色谱柱为Venusil C₁₈,流动相为甲醇-水(45:55),流速为0.8 ml/min,紫外检测波长为230 nm。结果:本试验中内源性物质不干扰测定,MHD血药浓度在2.49~39.82 mg/L范围内线性关系良好($r=0.9998$),检测限为0.4 mg/L;高、中、低(2.49、19.91、39.82 mg/L)质量浓度平均提取回收率为97.2%~101.2%,平均方法回收率为98.3%~100.8%,日内和日间RSD均<10%。结论:该方法快速、稳定、准确,适用于MHD的血药浓度测定和相关药动学研究。

关键词 奥卡西平;10-羟基卡马西平;固相萃取;高效液相色谱法;血药浓度

Determination of Hydroxyl Carbamazepine Concentration in Human Serum by SPE-HPLC

YANG Jie(Wuhan Children's Hospital, Wuhan 430016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of 10-hydroxy carbamazepine (MHD, serum concentration and promote clinical individualized medication. METHODS: Serum samples were extracted by solid phase and measured by HPLC. It was performed on a Venusil C₁₈ column with a mobile phase consisted of methanol-water (45:55) at a flow rate of 0.8 ml/min, and the detection wavelength was 230 nm. RESULTS: Endogenous substances did not interfere with the determination in the method. The serum concentration of MHD showed a good linear relationship in the range of 2.49-39.82 mg/L ($r=0.9998$). The limitation of detection (LOD) was 0.4 mg/L. The mean extraction and method recoveries of high-dose(2.49 mg/L), medium-dose (19.91 mg/L) and low-dose (39.82 mg/L) MHD were in the range of 97.2%-101.2% and 98.3%-100.8%, respectively. The RSD of inter-day and intra-day were all less than 10%. CONCLUSIONS: The method is specific, accurate, sensitive and applicable to determine MHD serum concentration and study related pharmacokinetics.

KEY WORDS Oxcarbazepine; 10-hydroxy carbamazepine; Solid phase extraction; HPLC; Serum concentration

奥卡西平(Oxcarbazepine, OXC)主要适用于单纯及复杂部分性癫痫发作的治疗,也可用于继发性强直阵挛发作的单药治疗以及难治性癫痫的加用治疗^[1],目前在国内儿科临床上应用广泛,已成为儿童抗癫痫一线药物。该药是卡马西平(CBZ)的10-酮基衍生物,口服吸收后被肝细胞溶质芳基酮还原酶迅速且完全地代谢为主要抗癫痫活性产物10-羟基卡马西平(10-hydroxy carbamazepine, MHD)^[2],因此药学界关于OXC药动学、药效学的研究,通常是以患者血清中MHD浓度作为考察指标。目前,国内关于MHD血药浓度测定的方法主要是高效液相色谱法,但此方法的样品前处理均是采用萃取法^[3-5]或蛋白沉淀法^[6],操作烦琐且耗时较长,或杂质较多、干扰较大。由于方法学的缺陷,MHD血药浓度监测在临床普遍应用不足,造成目前国内大样本的监测数据和药动学研究报道较少。因此,本研究拟通过先进的固相萃取(Solid Phase Extraction, SPE)进行提取定量,建立了一种快速、稳定、准确的10-羟基卡马西平血药浓度的测定方法,以促进临床个体化用药和相关药动学研究。

1 材料

1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪,包括四元泵、DAD-VL 检测器、在线脱气装置、手动进样器、柱温箱、中文色谱工作站(美国Agilent公司);Cleanert SPE-ODS C₁₈固相萃取柱(天津博纳艾杰尔

科技有限公司,规格:200 mg/3 ml,批号:BL0061L0709);WH-1 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂);LDZ4-0.8A 台式离心机(北京医用离心机厂,本试验离心半径:8 cm);AB204 万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

MHD 对照品(华中科技大学同济药学院合成,批号:051020,纯度>99%);0.9%氯化钠注射液(武汉滨湖双鹤药业有限责任公司,批号120704-201);甲醇为色谱醇,试验用水为德国SG超纯水机自制,空白人血清为实验室自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Venusil C₁₈(250 mm×4.6 mm,10 μm);流动相:甲醇-水(45:55);流速:0.8 ml/min;柱温:30 ℃;紫外检测波长:230 nm。

2.2 对照品溶液的制备

准确称取MHD对照品43.8 mg,置于10 ml量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度,得质量浓度为4380 mg/L的MHD贮备液,于4 ℃保存,临用时用甲醇稀释成质量浓度为438、219、131.4、109.5、65.7、54.75、27.38 mg/L的MHD系列对照品溶液。

2.3 血样处理

准确量取患者血清样品0.1 ml,注入预先活化的固相萃取柱(活化方法:取甲醇和纯化水适量,交替反复淋洗3次,临用前用纯化水2 ml润洗1次),待其自然沥干后用0.9%氯化钠注射液0.5 ml淋洗,弃去淋洗液,固相萃取柱于1000 r/min离心

* 副主任药师,硕士。研究方向:医院药学及临床药学。电话:027-82433435

1 min,最后准确量取70%甲醇溶液0.2 ml洗脱,收集洗脱液涡旋混匀,取20 μ l进样测定。

2.4 专属性考察

在“2.1”项色谱条件下,MHD的保留时间在11 min左右,峰形较好,血清中内源性杂质峰不干扰测定,具有较好的专属性。空白血清、患者服药后血清样品、MHD对照品的色谱见图1。

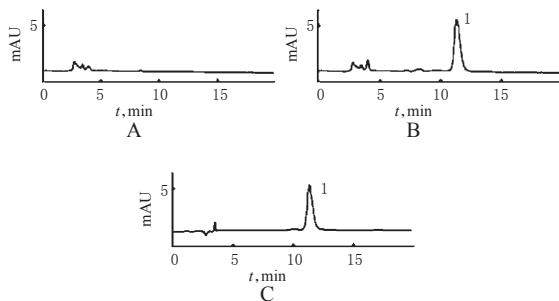


图1 高效液相色谱图

A.空白血清; B.患者服药血清样品; C.MHD对照品; 1.MHD

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank serum B. patient serum sample; C. hydroxyl carbamazepine standard solution; 1. MHD

2.5 标准曲线的制备及检测限、定量限的考察

吸取空白人血清1 ml,共7份,分别精密加入“2.2”项MHD系列对照品溶液0.1 ml,涡旋混匀10 min,配制成MHD质量浓度为39.82、19.91、11.95、9.95、5.97、4.98、2.49 mg/L的标准血清样品。然后按“2.3”项方法操作,记录色谱图。以待测物峰面积(A)为纵坐标,待测物浓度(c)为横坐标,按照加权最小二乘法进行线性回归,得回归方程为 $A=15.95c+0.78$ ($r=0.9998$)。结果表明,MHD血药浓度在2.49~39.82 mg/L范围内线性关系良好。最低定量限为2.49 mg/L,检测限(信噪比为3)为0.4 mg/L。

2.6 精密度及准确度试验

取空白人血清2 ml 数份,分别加入低、中、高(2.49、19.91、39.82 mg/L)质量浓度的MHD对照品溶液0.2 ml,配制成MHD质量浓度为2.49、19.91、39.82 mg/L的质控(QC)样品。按“2.3”项方法操作,进样测定,依据标准曲线的回归方程计算MHD的浓度,以测得量的平均值与理论值之比求算准确度(方法回收率)。每个QC样品制备5份,同日内每隔2 h处理一组低、中、高浓度样品,共处理5组,计算得到日间精密度;在连续5 d内连续测定5个分析批次,得到日间精密度。精密度及回收率试验结果见表1。

表1 精密度及回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery test($\bar{x} \pm s, n=5$)

| 加入量, mg/L | RSD, % | | 方法回收率, % | | 提取回收率, % | |
|--------------|--------|-------|-----------------|----------------|-----------------|--------|
| | 日内精密度 | 日间精密度 | 日内 | 日间 | $\bar{x} \pm s$ | RSD, % |
| 2.49 | 3.8 | 6.1 | 100.7 \pm 3.8 | 98.6 \pm 6.0 | 101.2 \pm 3.1 | 3.1 |
| 19.91 | 2.9 | 4.3 | 100.8 \pm 2.9 | 97.2 \pm 4.2 | 99.1 \pm 1.2 | 1.2 |
| 39.82 | 4.8 | 5.1 | 98.3 \pm 4.7 | 96.7 \pm 4.9 | 97.2 \pm 2.2 | 2.3 |

由表1可知,QC样品的日内RSD=2.9%~4.8%,日间RSD=4.3%~6.1%,均<10%($n=5$);分析方法的准确度在96.7%~100.8%之间,均符合体内生物样品分析的要求。

2.7 提取回收率试验

取空白人血清,同法配制低、中、高(2.49、19.91、39.82 mg/L)

质量浓度的QC样品各5份,分别按“2.3”项方法操作,进样测定,以测得的峰面积与未经处理的相应浓度对照品溶液直接进样测得的峰面积之比,得到提取回收率,见表1。结果表明,在本操作方法下,血清中MHD的提取回收率高于97.2%。

2.8 稳定性试验

取空白人血清适量,同法配制低、中、高(2.49、19.91、39.82 mg/L)质量浓度的血清样品,室温放置12 h后一式5份按“2.3”项方法进行样品处理,血清样品中MHD的RSD($n=5$)分别应为3.8%、2.6%、4.1%;同法配制低、中、高质量浓度的血清样品,反复冻融3次,按“2.3”项方法进行样品处理,结果血清样品中MHD的RSD($n=5$)分别为5.8%、4.7%、5.7%;同法配制低、中、高质量浓度的血清样品,于-20℃冻存2周后进行样品处理,结果血清样品中MHD的RSD($n=5$)分别为5.7%、6.7%、6.3%。稳定性试验结果显示,室温下样品在12 h内基本保持稳定,反复冻融样品稳定性良好,-20℃下样品至少可以稳定保存2周。

2.9 临床应用

应用本研究建立的方法监测174例次癫痫患者口服OXC后MHD的血药浓度,结果回归方程为 $c=0.4655D+3.983$ ($R^2=0.4517$)。OXC给药日药剂量(D)-MHD稳态血药谷浓度(c)散点图见图2。

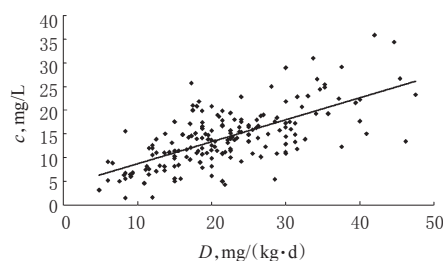


图2 OXC给药日剂量-MHD稳态血药谷浓度散点图

Fig 2 Scatter gram of OXC daily dosages-MHD serum concentration

3 讨论

SPE-高效液相色谱法测定MHD血药浓度国内少有报道,庞德志等^[1]曾采用乙醚提取3次,合并、蒸干、复溶后进样测定,但烦琐且耗时较长,用乙醚提取血清中的MHD,提取2次仅能使回收率达70%~80%左右,提取3次才可使回收率达90%以上;另一方面,乙醚蒸干尽管实验室采用了排气装置,但挥发性强,依然会污染实验室的空气。

本研究采用1倍于血清量的洗脱液将MHD从SPE柱上洗脱后直接进样,该方法简便、快速、准确,且使用试剂少,不污染空气。尽管本研究将样品稀释了1倍,但其回收率高,提取回收率与上述乙醚提取3次相当甚至更高,完全可以满足MHD血药浓度监测和药动力学研究的需求。

MHD结构中有两个苯环,在200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,其在210、230、254及270 nm波长处分别有吸收峰,本试验采用230 nm作为检测波长,其吸收度虽然不是最大,但完全可满足实际检测的需要。本方法采用血清量少,特别适合于测定儿童MHD的血药浓度。

OXC近年来应用较多,采用本研究方法检测MHD的血清药物浓度,有利于大样本测定,以便及时、准确地为临床提供参考,为儿科临床个体化用药提供依据。

我院万古霉素血药浓度监测与临床应用评价

马莹*,魏润新#,钱南萍,范毅(泰州市人民医院,江苏泰州 225300)

中图分类号 R978.1⁺2;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)05-0622-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.05.16

摘要 目的:为临床合理使用万古霉素提供参考。方法:分析和评价我院2011年1月—2013年5月122份使用万古霉素病历中血药浓度监测结果及相关用药信息。结果:122例患者中,有118例进行了病原学检查,查出革兰阳性球菌的有78例,占66.10%;万古霉素谷浓度监测129例/次,平均值为(11.4±6.5) mg/L;用药前后患者肌酐值未出现明显变化。结论:万古霉素使用时应当根据患者实际体质量计算给药剂量,根据肌酐清除率确定给药间隔时间。进行治疗药物监测的药师应与临床建立沟通机制,及时将监测结果和调整建议反馈给临床医师。

关键词 万古霉素;血药浓度监测;用药行为

Evaluation of Blood Concentration Monitoring of Vancomycin and Its Clinical Application in Our Hospital

MA Ying, WEI Run-xin, QIAN Nan-ping, FAN Yi (Taizhou Municipal People's Hospital, Jiangsu Taizhou 225300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for rational clinical use of vancomycin. METHODS: The blood concentration monitoring results of 122 patients used vancomycin and related information of drug use were analyzed and evaluated in our hospital from Jan. 2011 to May 2013. RESULTS: Among the 122 cases, 118 patients conducted pathogen detection. Gram-positive cocci were found in 78 cases, accounting for 66.10%. Trough concentration monitoring of vancomycin was 129 cases/times, with the average as (11.4±6.5) mg/L. The level of creatinine did not change significantly before and after treatment. CONCLUSIONS: The dosage of vancomycin should be calculated according to the patients' weight; and medication intervals should be decided according to the creatinine clearance rate. Pharmacists who conduct TDM monitoring need to establish a communication mechanism with the clinical department, feed back the monitoring results and adjustment advice to clinicians timely.

KEYWORDS Vancomycin; Blood concentration monitoring; Medication behavior

万古霉素是一种糖肽类抗生素,对多种革兰阳性菌有杀菌活性,对葡萄球菌,特别是金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌(包括耐甲氧西林菌株)、肺炎链球菌、化脓性链球菌、肠球菌具有抗菌作用,但是对所有革兰阴性菌、明串珠菌、分枝杆菌天然耐药^[1]。万古霉素使用个体差异大,影响因素多,对其血药浓度进行监测十分必要。以往我院万古霉素监测的谷浓度范围为5~10 mg/L。根据国内外最新的研究表明,谷浓度过低易诱导耐药菌出现,过高又易出现肾脏毒性。因此,笔者对我院2011年1月—2013年5月应用万古霉素治疗并进行血药浓度监测的病例进行回顾性分析,对用药剂量、血药浓度监测值、肾功能指标等相关情况进行总结分析,以期从中发现规

律,为制订个体化给药方案和减少不良反应提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料来源

资料来源于我院2011年1月—2013年5月住院期间应用万古霉素并进行血药浓度监测的患者病历,采用从医院信息系统(HIS)调取电子病历和手工检索原始病历的方法,对患者性别、年龄、体质量、科室、诊断、用药情况、病原学检查结果、用药前后的肌酐值、不良反应等进行统计、分析。

1.2 用药合理性判定

统计万古霉素的应用情况。以《新编药理学》(17版)^[2]及药品说明书规定的限定日剂量(DDD)计算万古霉素的药物利

参考文献

- [1] Northam RS, Hernandez AW, Litzinger MJ, et al. Oxcarbazepine in infants and young children with partial seizures[J]. *Pediatr Neurol*, 2005, 33(5):337.
- [2] May DTW, Korn-Merker E, Rambeck B. Clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(12):1 023.

- [3] 黄小芬,陈凤.反相高效液相色谱法测定人血浆中10-羟基卡马西平浓度[J]. *海峡药学*, 2013, 25(4):279.
- [4] 庞德志,宋新文,汪洋,等.高效液相色谱法测定羟基卡马西平血药浓度[J]. *儿科药学杂志*, 2008, 14(3):14.
- [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, 25(6):504.
- [6] 林志燕,刘海峰,舒杨,等.HPLC法同时测定血中拉莫三嗪、奥卡西平活性代谢药物浓度及其在儿童癫痫中的应用[J]. *儿科药学杂志*, 2013, 19(1):4.

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0523-86361360。E-mail:abluehorse@sina.com

通信作者:主任药师。研究方向:临床药学、医院药学。电话:0523-86361360。E-mail:wyawrx_01@sina.com

(收稿日期:2014-09-17 修回日期:2014-10-20)

(编辑:李 劲)