



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1971270 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200510110730. 8

(22) 申请日 2005. 11. 24

(73) 专利权人 复旦大学附属华山医院
地址 200031 上海市乌鲁木齐中路 12 号

(72) 发明人 焦正 施孝金

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
31200

代理人 包兆宜

(51) Int. Cl.

G01N 33/02 (2006. 01)

G01N 33/06 (2006. 01)

G01N 33/15 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1060675 C, 2001. 01. 17, 全文.

CN 1102989 A, 1995. 05. 31, 全文.

焦正、钟明康、施孝金、张静华. HPLC 法同时
测定人血清中卡马西平、环氧化卡马西平和苯妥

英. 药物分析杂志 22 6. 2002, 22(6), 446.

詹三华、李顺炜、毛名扬. RP-HPLC 法测定人
血浆中苯巴比妥、苯妥英和卡马西平浓度. 安徽
医药 7 2. 2003, 7(2), 135.

审查员 郑瑜

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种同时测定多种抗癫痫药物血药浓度的方法

(57) 摘要

本发明属医学检验领域, 涉及体内药物的分析测定方法, 具体涉及一种可同时测定人血浆中扑米酮、苯巴比妥、苯妥英、卡马西平, 拉莫三嗪、奥卡西平六种抗癫痫药物以及奥卡西平活性产物单羟奥卡西平和卡马西平活性产物环氧化卡马西平浓度的方法。本发明方法对待测样品经蛋白沉淀预处理后, 在酸性流动相条件下等度洗脱, 经色谱柱分离后, 用紫外检测器检测。本方法样品取样量少, 预处理方法简单、快速、灵敏, 无需昂贵的设备和试剂, 适用面广, 成本低, 适合于临床常规血药浓度的监测。

1. 一种同时测定多种抗癫痫药物血药浓度的方法,其特征是待测样品预处理,经酸性流动相在色谱柱分离后,用紫外检测器检测,包括以下步骤:

1) 样品预处理

取待测样品,加入定量的有机溶媒蛋白沉淀剂进行蛋白沉淀,
所述有机溶媒蛋白沉淀剂选自甲醇、乙腈或甲醇和乙腈的混合物;

2) 样品分离与分析

采用通用型液相色谱柱,其填料为 Zorbax RX-C₈, Agilent Zorbax RX-C₈ 色谱柱:
4.6mm×250mm,5 μ m,高效液相系统采用通用型的紫外检测器以及高压泵,采用甲醇-乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液的混合液为流动相,等度洗脱;甲醇:乙腈:0.1%三氟乙酸水溶液的体积比为 200±5:135±5:665±5,pH=2.1~2.5;

3) 紫外检测器检测,测峰面积,用标准曲线方程换算浓度;

所述的多种抗癫痫药物是扑米酮、苯巴比妥、苯妥英、卡马西平、拉莫三嗪、奥卡西平以及单羟奥卡西平和环氧卡马西平。

2. 按权利要求 1 所述的同时测定多种抗癫痫药物血药浓度的方法,其特征是所述的步骤 3) 的紫外检测器检测,其中:采用紫外检测器 215±1nm 测定扑米酮、拉莫三嗪、单羟奥卡西平、苯巴比妥和环氧卡马西平的峰面积,235±1nm 测定奥卡西平、苯妥英和卡马西平的峰面积,用标准曲线方程换算成浓度。

一种同时测定多种抗癫痫药物血药浓度的方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检验领域,涉及体内药物的分析测定方法。具体涉及一种可同时测定多种抗癫痫药物血药浓度的方法。

背景技术

[0002] 扑米酮 (Primidone, PRI)、苯巴比妥 (Phenobarbital, PB)、苯妥英 (Phenytoin, PHT)、卡马西平 (Carbamazepine, CBZ) 是传统的一线抗癫痫治疗药物,拉莫三嗪 (Lamotrigen, LTG)、奥卡西平 (Oxcarbazepine, OXC) 则是近十年上市的第二代抗癫痫药物。OXC 和 CBZ 在体内可分别代谢为活性产物单羟奥卡西平 (Monohydroxycarbamazepine, MHD) 和环氧卡马西平 (Carbamazepine 10,11-epoxide, CBZE)。由于这些药物的药动学个体间差异大、治疗窗窄,且药动学特性与抗癫痫效果、药物不良反应发生有相关关系,因此开展对上述药物的治疗药物监测有重要的临床意义。

[0003] 目前国内外测定抗癫痫药物血药浓度的方法主要采用高效液相色谱法 (HPLC) 和免疫法。免疫法只能测定 PB、CBZ 和 PHT,其他药物的测定只能采用 HPLC 法。现有技术的方法存在操作繁琐费时,效率低,测定周期长,所需仪器设备或试剂价格昂贵,分析成本高等种种缺陷,不适合常规治疗药物浓度监测。

发明内容

[0004] 本发明的目的是克服已知技术的缺陷,提供一种简便、快速、灵敏的可同时测定多种抗癫痫药物血药浓度的方法。

[0005] 本方法无需昂贵的设备和试剂,具有操作简便,快速,灵敏度高,血浆用量少,成本低等优点,并且能同时定量测定人血浆或血清中扑米酮 (PRI)、苯巴比妥 (PB)、苯妥英 (PHT)、卡马西平 (CBZ),拉莫三嗪 (LTG)、奥卡西平 (OXC) 6 种抗癫痫药物以及 OXC 活性产物单羟奥卡西平 (MHD) 和 CBZ 活性产物环氧卡马西平 (CBZE) 的浓度,适合常规治疗药物浓度监测。

[0006] 本方法的技术方案是:待测样品预处理,经酸性流动相在色谱柱分离后,用紫外检测器检测。

[0007] 包括下述步骤:

[0008] 1) 样品预处理

[0009] 取待测样品,加入定量的有机溶媒蛋白沉淀剂进行蛋白沉淀,

[0010] 所述有机溶媒蛋白沉淀剂选自甲醇、乙腈或甲醇和乙腈的混合物;

[0011] 2) 样品分离与分析

[0012] 采用通用型的液相色谱柱,其填料为 Zorbax RX-C₈,高效液相系统采用通用型的紫外检测器以及高压泵,采用甲醇、乙腈和酸性水溶液 (pH = 2.1 ~ 2.5) 的混合液作为流动相,等度洗脱;

[0013] 本方法流动相优选甲醇-乙腈-0.1%三氟乙酸 (200±5 : 135±5 : 665±5) 混

合液；

[0014] 采用紫外检测器 $215 \pm 1\text{nm}$ 测定检测 PRI、LTG、MHD、PB 和 CBZE 的峰面积， $235 \pm 1\text{nm}$ 测定 OXC、PHT 和 CBZ 的峰面积，用标准曲线方程换算成浓度。

[0015] 与现有的技术相比，本方法的贡献在于：采取了不同实验方法，针对测定物进行了实验条件优化，采用了不同的分析色谱柱，以 Zorbax RX-C₈ 为色谱柱填料，优化了流动相条件，采用酸性水溶液甲醇-乙腈-0.1% 三氟乙酸作为流动相。

[0016] 本方法具有以下优点：

[0017] 1. 预处理方法：一步有机溶媒蛋白沉淀法，简便价廉，适用于常规检测。

[0018] 2. 分离条件：分离采用填料为 Zorbax RX-C₈ 的色谱柱作为固定相，甲醇、乙腈和酸性水溶液的混合液作为流动相，等度洗脱，20 分钟内完成 PRI、PB、LTG、OXC、MHD、CBZ、CBZE 和 PHT 八种抗癫痫药物和内标的分离。而且，内源性物质和常用合并用药不干扰上述药物的测定。

[0019] 3. 检测时针对不同的待测药物采用不同的波长，避免内源性物质的干扰，且获得最佳的响应信号。

[0020] 4. 内标选用价廉易得的药物盐酸普萘洛尔，安全性好且有合适的保留时间。

[0021] 本发明方法快速准确、灵敏度高、操作简便、成本低、适合于临床常规监测。所述的 PRI、LTG、MHD、PB、CBZE、OXC、PHT 和 CBZ 的线性范围分别是 $5 \sim 50$ ， $1 \sim 25$ ， $1 \sim 50$ ， $5 \sim 100$ ， $1 \sim 10$ ， $0.5 \sim 25$ ， $1 \sim 50$ ， $1 \sim 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。平均方法回收率分别为 98.7%，97.0%，97.9%，102.9%，100.0%，99.2%，100.1% 和 101.7%。日内和日间精密度 RSD 均小于 15%。

附图说明

[0022] 图 1：典型色谱图：空白血浆 A1：215nm，A2：235nm。

[0023] 图 2：典型色谱图：空白血浆 + 标准品 (B1：215nm，B2：235nm) PRI、MHD、PHT 均为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，LTG、OXC、CBZ 均为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，PB $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，CBZE $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0024] 图 3：服用 LTG+PB+CBZ 的癫痫患者的色谱图，其中 C1：215nm，C2：235nm。

[0025] 图 4：服用 PRI+OXC+PHT 的癫痫患者的色谱图，其中 D1：215nm，D2：235nm，1-PRI；2-LTG；3-MHD；4-PB；5-CBZE；6-OXC；7-PHT；8-CBZ；9- 盐酸普萘洛尔。

具体实施方式

[0026] 实施例 1

[0027] 色谱条件

[0028] Agilent Zorbax RX-C₈ 色谱柱：4.6mm×250mm，5 μm；流动相：甲醇-乙腈-0.1% 三氟乙酸 (200：135：665)；流速： $1.5\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；柱温： 40°C ；双波长双通道检测：215nm 检测 PRI、LTG、MHD、PB 和 CBZE，235nm 检测 OXC、PHT 和 CBZ。

[0029] 血浆样品预处理

[0030] 取血浆样品 $100 \mu\text{L}$ ，加 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 盐酸普萘洛尔甲醇工作液 $300 \mu\text{L}$ ，涡旋混合 30s，离心 $12000 \times g$ ， 4°C ，10min，取上清液 $20 \mu\text{L}$ 直接进样，内标法以峰面积定量。

[0031] 选择性

[0032] 取不同来源的 10 位健康志愿者的血样,按照上述样品制备和测定方法进行测定,未发现内源性物质对上述测定组分有干扰。取常用的抗癫痫药物、精神类药物和非处方药物适量进样,结果显示多虑平、硝基安定、安定、氯硝安定、氟哌啶醇等精神类药物和甲硝唑、对乙酰氨基酚、硝苯地平、布洛芬、阿昔洛韦等均不干扰样品测定。PRI、LTG、PB、OXC、PHT、CBZ、MHD、CBZE 和内标盐酸普萘洛尔的典型保留时间分别为:4.5、5.4、7.4、10.9、17.4、18.5、6.7、8.8、14.9min。各测试组分峰形良好、分离完全。整个色谱分析过程时间为 20min。

[0033] 线性试验

[0034] 精密称取标准物质适量,用甲醇溶解,空白血浆稀释定容,制成含 PRI 5, 10, 12.5, 25, 37.5, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 LTG 1, 5, 6.25, 12.5, 18.75, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 MHD 1, 5, 12.5, 25, 37.5, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 PB 5, 15, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 CBZE 1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 OXC 0.5, 2.5, 6.25, 12.5, 18.75, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 PHT 1, 5, 12.5, 25, 37.5, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 CBZ 1, 5, 6.25, 12.5, 18.75, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列浓度标准血样。各取血浆 100 μL ,按“血浆样品预处理”方法操作。以待测组分与内标峰面积比(x)和待测组分的浓度(y)作加权(1/x)线性回归,表 1 为回归方程与线性关系,表明各待测组分标准曲线回归方程。

[0035] 准确度和精密度

[0036] 精密称取标准物质适量,用甲醇溶解,空白血浆稀释定容,制成含 PM 10, 20, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 LTG 2, 10, 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 MHD 2, 20, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 PB 10, 40, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 CBZE 2, 4, 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 OXC 1, 10, 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 PHT 2, 20, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、含 CBZ 2, 10, 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的低、中、高质控血样。各取血浆 100 μL ,按“血浆样品预处理”方法操作,考察皮内和批间精密度和准确度。根据线性回归方程计算其实测浓度,计算每种浓度的实测平均值及相对标准偏差(RSD)表示, $(C_{\text{实测}}/C_{\text{理论}}) \times 100\%$ 即为回收率。表 2 为批内精密度,表 3 是批间精密度,表 4 是回收率试验结果。

[0037] 实验结果表明:内源性物质不干扰待测物的测定。且上述待测组分和内标物质峰形对称、分离良好。

[0038] 同时,本方法已在实际患者血药浓度的测定中得到了验证。

[0039] 表 1

[0040]

药物	回归方程	r	线性范围 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
PRI	$Y = 0.0081706X + 0.0013784$	0.9986	5 ~ 50
LTG	$Y = 0.037961X + 0.011992$	0.9992	1 ~ 25
MHD	$Y = 0.019040X + 0.021026$	0.9994	1 ~ 50
PB	$Y = 0.012446X - 0.0011166$	0.9993	5 ~ 100
CBZE	$Y = 0.027788X + 0.0018558$	0.9969	1 ~ 10
OXC	$Y = 0.015737X - 0.0024455$	0.9992	0.5 ~ 25
PHT	$Y = 0.0044029X - 0.0012089$	0.9992	1 ~ 50
CBZ	$Y = 0.024838X - 0.0023432$	0.9995	1 ~ 25

[0041] 表 2

[0042]

药物	低			中			高		
	理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%
PRI	10	9.58±0.38	4.02	20	20.38±0.72	3.54	40	39.71±1.24	3.11
LTG	2	1.83±0.13	7.28	10	10.10±0.47	4.69	20	19.76±0.61	3.07
MHD	2	2.01±0.10	4.97	20	20.43±0.90	4.41	40	39.47±1.07	2.72
PB	10	10.17±0.43	4.27	40	40.65±1.67	4.11	80	78.14±1.66	2.13
CBZE	2	1.96±0.13	6.82	4	4.04±0.19	4.72	8	7.76±0.24	3.05
OXC	1	1.03±0.11	10.88	10	9.63±0.46	4.81	20	18.87±0.23	1.22
PHT	2	2.04±0.24	11.58	20	20.37±1.04	5.08	40	39.51±1.17	2.96
CBZ	2	2.04±0.05	2.65	10	10.06±0.39	3.85	20	19.62±0.40	2.04

[0043] 表 3

[0044]

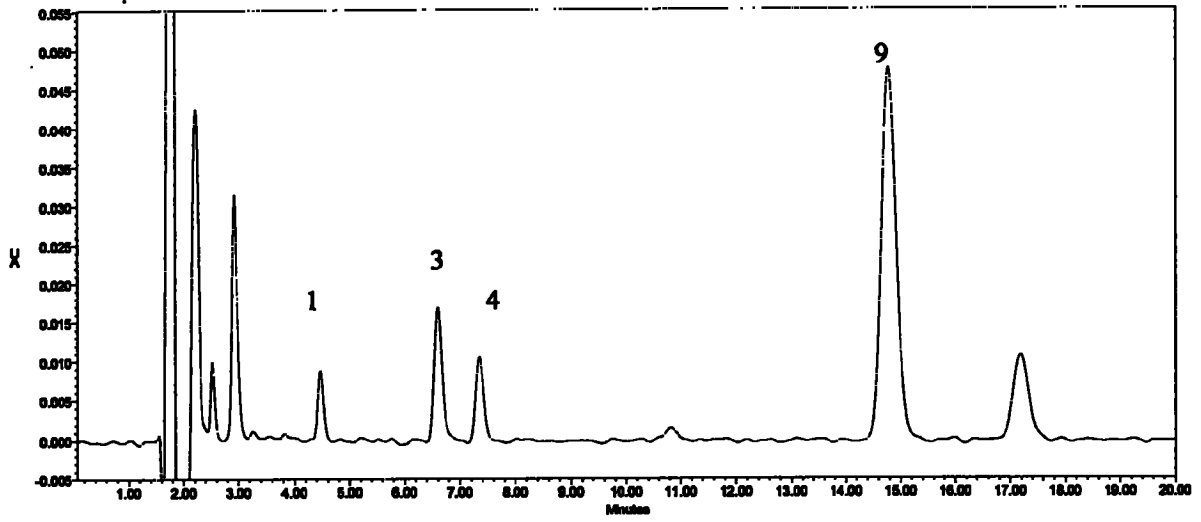
药物	低			中			高		
	理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	理论浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%
PRI	10	9.95±0.37	3.69	20	20.43±0.77	3.78	40	39.30±1.11	2.83
LTG	2	1.96±0.10	5.31	10	10.13±0.33	3.30	20	19.51±0.39	2.00
MHD	2	1.92±0.17	9.01	20	20.26±0.55	2.71	40	39.20±0.65	1.67
PB	10	10.00±0.37	3.68	40	40.46±0.83	2.05	80	78.32±1.05	1.34
CBZE	2	2.03±0.16	7.98	4	4.14±0.09	2.24	8	7.84±0.18	2.31
OXC	1	0.97±0.05	4.77	10	9.75±0.37	3.84	20	19.29±0.63	3.28
PHT	2	2.06±0.12	5.69	20	20.35±0.55	2.73	40	39.64±0.67	1.68
CBZ	2	2.02±0.07	3.23	10	10.06±0.32	3.16	20	19.65±0.48	2.45

[0045] 表 4

[0046]

药物	提取回收率		方法回收率	
	回收率 /%	RSD/%	回收率 /%	RSD/%
PRI	104.6±0.67	0.64	98.7±2.58	2.61
LTG	106.8±4.98	4.66	97.0±3.98	4.10
MHD	99.1±9.51	9.59	97.9±5.18	5.29
PB	107.7±7.76	7.20	102.9±5.51	5.36
CBZE	103.7±2.50	2.41	100.0±3.36	3.36
OXC	101.7±9.98	9.81	99.2±4.49	4.53
PHT	97.6±10.52	10.78	100.1±2.31	2.30
CBZ	106.7±4.04	3.79	101.7±3.37	3.31

D1: 215nm



D2: 235nm

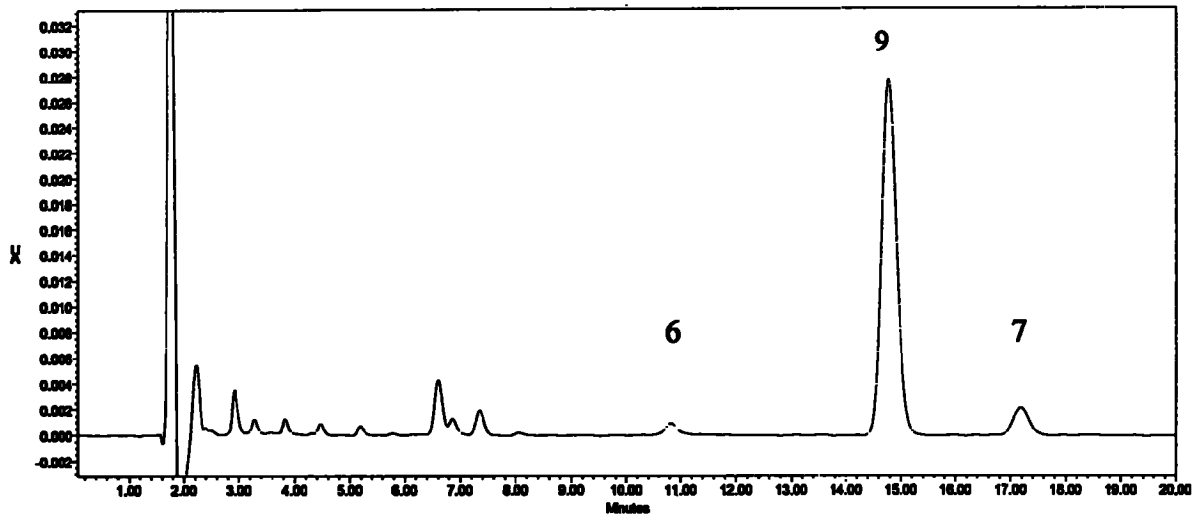


图 4