

【基础研究】

通信作者:贺志安(1962-),男,河南新乡人,硕士,教授,研究方向:体内药物分析;E-mail:309378297@qq.com.

operation, good selectivity, high sensitivity and meeting the requirements of biological sample analysis.

Key words: high performance liquid chromatography; lamotrigine; therapeutic drug monitoring

拉莫三嗪(lamotrigine, LTG)是一种新型苯三嗪类抗癫痫药,主要用于治疗各种类型癫痫疾病,是儿童^[1]和孕妇癫痫患者的首选药物,也可用于治疗各种类型情感障碍和抑郁症等。LTG 通过抑制兴奋性神经递质谷氨酸和天门冬氨酸的释放,阻断突触前膜电压依赖性钠离子通道,抑制动作电位爆发,保证神经元的稳定性,从而发挥抗癫痫作用。由于 LTG 药动力学和药效学个体差异较大,治疗窗较窄,且癫痫患者复发率高,易受联合用药^[2]、怀孕^[3]、药物代谢酶和转运体基因多态性^[4]等多种因素影响,故需要对 LTG 进行血药浓度监测,以达到个体化的用药方案,确保不良反应与疗效之间的平衡。高效液相色谱法(high performance liquid chromatographic method, HPLC)技术应用较广泛,是监测 LTG 浓度的有效手段。国内外建立的一些测定 LTG 的 HPLC 法^[5-6]预处理多采用萃取、氮吹等,操作复杂繁琐,分析时间长,可能影响临床医生的决策。本研究建立了简单、快捷、实用的测定人血清中 LTG 浓度的 HPLC 法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 LTG 标准品(上海远慕生物科技有限公司,纯度 >98%), 苯代三聚氰胺标准品[梯希爱(上海)化成工业发展有限公司,纯度 >98%], 甲醇、乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯), 乙酸铅(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯), 人血清(新乡医学院第二附属医院提供)。ES Industries Sonoma C18(2) 色谱柱(北京东方朗锐科技有限公司, 50.0 mm × 2.1 mm, 3 μm)。高效液相色谱仪(日本岛津公司), 超纯水机(美国 Pall Corporation 公司), 十万分之一分析天平(日本岛津公司), 高速离心机(德国 Centrifuge Eppendorf 公司), OF1 旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司), EP 管(中国罗氏公司)。

1.2 LTG 溶液配制 精密称量 LTG 标准品粉末 37.75 mg, 置于 100 mL 容量瓶, 用甲醇稀释定容得浓度为 0.377 5 g · L⁻¹ 的储备液备用。

1.3 内标溶液配制 精密称量 216.09 mg 苯代三聚氰胺标准品粉末, 置于 100 mL 容量瓶, 用甲醇稀释至 100 mL, 得到浓度为 2.160 9 g · L⁻¹ 的储备液, 从中取 250 μL 置于 100 mL 容量瓶, 得浓度为 5.40 mg · L⁻¹ 的工作液。

1.4 LTG 色谱条件 色谱柱: ES Industries Sonoma C18(2) (50.0 mm × 2.1 mm, 3 μm); 流动相: A 相为超纯水, B 相为纯甲醇, 体积分数 20% 甲醇洗脱, 流速为 0.6 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL; 柱温 40 °C; 紫

外检测波长 207 nm, 分析时间 6 min。

1.5 样本处理 取 150 μL 样本血清于 1.5 mL EP 管中, 加入 150 μL 甲醇、150 μL 苯代三聚氰胺、15 μL 0.40 g · mL⁻¹ 的乙酸铅水溶液, 充分涡旋混匀 1 min 后室温放置 10 min, 25 °C 12 000 r · min⁻¹ 涡旋离心 10 min, 离心后取上清液 300 μL 置于已加入 300 μL 超纯水的进样瓶, 混匀后吸样 20 μL 进行 HPLC 定量分析。

1.6 方法学验证

1.6.1 方法的选择性 依据《中国药典》2015 年版通则中“生物样品定量分析方法验证指导原则”^[7]对所建方法进行验证。分别取 6 份未服用 LTG 的正常人血清考察选择性, 不加苯代三聚氰胺, 用 150 μL 甲醇、150 μL 乙腈和 15 μL 乙酸铅沉淀蛋白, 样本处理方法同“1.5 项”操作, 处理完样品按“1.4 项”方法进行分析, 以峰面积响应值衡量干扰组分。按照 ISO15189:2012 医学实验室-质量和能力认可准则的要求^[8]对仪器进行校准, 做好实验室各个环节的质量控制, 规范工作流程, 保证结果及时可靠。

1.6.2 标准曲线 依据药典要求^[7], 将配制好的 LTG 储备液加入空白血浆中, 得到 LTG 为 1.18、2.36、4.72、9.44、18.88、37.75 mg · L⁻¹ 的血清标准品, 余下操作同“1.5 项”方法, 处理完样品按“1.4 项”方法进行分析。考察线性关系共做 6 套标准曲线, 评价仪器对 LTG 分析物的响应, 通过已知浓度的分析物与仪器检测真实值的比较建立标准曲线。

1.6.3 准确度与精密度评价 依据“标准曲线”自制 LTG 定量下限(1.18 mg · L⁻¹)、低浓度(2.36 mg · L⁻¹)、中浓度(18.88 mg · L⁻¹)、高浓度(28.31 mg · L⁻¹)质控样品, 每个浓度 5 份, 分 3 批在不同工作日测定, 按“1.5 项”方法操作, 处理完样品按“1.4 项”方法进行分析, 计算批内、批间精密度与准确度。准确度是描述方法测定值与真实值的接近程度, 准确度 = (测定值/真实值) × 100%, 采用已知质控样品评估批内和批间准确度。精密度通过相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)评价, 批内、批间 RSD 不超过 15%, 定量下限 RSD 不超过 20%^[7]。

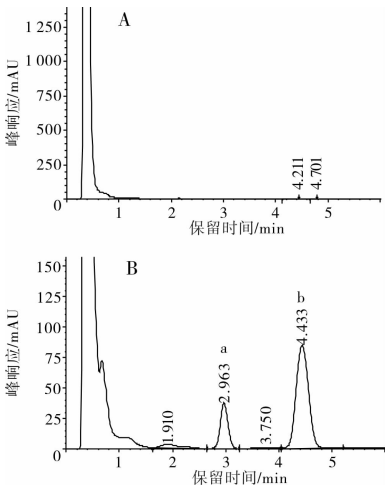
1.6.4 残留评价 将接近定量上限浓度的高浓度样品(LTG 浓度 28.31 mg · L⁻¹)加入到空白血清中制备高浓度质控样品, 按“1.5 项”方法处理, 按“1.4 项”方法进行分析, 考察高浓度样品在空白样品中的残留。

1.6.5 样本稳定性评价 将配制好的 LTG 储备液加入到空白血清中, 配成高浓度(28.31 mg · L⁻¹)

和低浓度($2.36\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)血清质控样品,模拟样本血清,经“1.5 项”方法处理后室温放置 24 h,进行 HPLC 分析,每个浓度 5 份,评价 LTG 经沉淀蛋白法处理后室温放置 24 h 的稳定性情况。将未经蛋白沉淀处理的高、低浓度质控样品分别放置 2~8℃ 冰箱存放 1 周后,按“1.5 项”处理进行 HPLC 分析,每个浓度 5 份,评价样品在 2~8℃ 放置 1 周的稳定性。

2 结果

2.1 方法的选择性 结果见图 1。LTG、苯代三聚氰胺的保留时间分别为 4.43、2.96 min,LTG、苯代三聚氰胺处均无干扰。



A:空白;B:LTG+苯代三聚氰胺。a:苯代三聚氰胺峰;b:LTG 峰。

图 1 LTG 和内标苯代三聚氰胺的选择性

Fig.1 Selectivity of LTG and benzoguanamine

2.2 标准曲线 结果见图 2。LTG 在 $1.18\sim37.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内线性关系良好,标准曲线为 $Y=0.013\,05X+0.032\,38$, $r=0.999$ 。

表 1 HPLC 法测定 LTG 的准确度与精密度

质控样品浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		批内准确度/%			批内 RSD/%			批间准 确度/%	批间 RSD/%
<i>n</i>		第 1 批	第 2 批	第 3 批	第 1 批	第 2 批	第 3 批		
1.18	5	84.07±2.77	101.20±1.84	114.75±1.29	3.30	1.82	1.12	99.94±13.13	13.13
2.36	5	92.12±1.14	100.08±0.82	106.78±2.32	1.24	0.81	2.71	99.66±6.37	6.39
18.88	5	99.57±0.99	95.51±1.39	96.02±0.82	1.00	1.46	0.85	97.03±2.13	2.19
28.31	5	99.46±0.70	97.91±1.29	105.82±2.01	0.70	1.32	1.90	101.06±3.78	3.74

表 2 HPLC 法测定人血清中 LTG 的稳定性

Tab.2 Stability of the determination of LTG in human serum by HPLC

质控样品浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	准确度/%	
	24 h	1 周
2.36	105.08	92.80
2.36	103.81	88.98
2.36	104.24	92.80
2.36	105.08	89.83
2.36	104.24	89.83
30.20	104.07	93.01
30.20	105.36	91.29
30.20	104.01	95.83
30.20	102.85	94.21
30.20	102.45	94.30

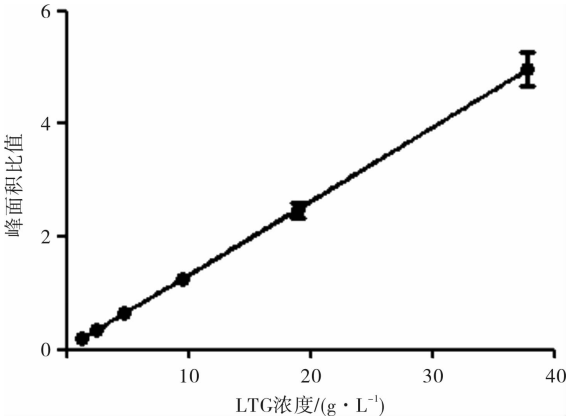


图 2 HPLC 法测定 LTG 浓度的标准曲线

Fig.2 Standard curve for the determination of LTG concentration by HPLC

2.3 精密度与准确度评价 结果见表 1。LTG 在定量下限($1.18\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、低浓度($2.36\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、中浓度($18.88\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、高浓度($28.31\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)质控样品批内及批间 RSD 均小于 13.2%,样本适应性好,符合要求。

2.4 残留评价结果 各分析物在空白中的残留与定量下限浓度峰面积比值均 <20%,内标在空白中的残留与定量下限浓度峰面积比值均 <5%,因此该方法的残留结果符合要求,不影响准确度、精密度及样品结果的测定。

2.5 样本稳定性评价 结果见表 2。处理过的血清质控样品室温放置 24 h,样品的准确度结果稳定;未处理过的血清质控样品在 2~8℃ 存放 1 周,样品的准确度结果稳定。

3 讨论

LTG 主要用于治疗癫痫及精神障碍类疾病,服用量过少达不到抗癫痫的效果,严重影响患者的生活质量,服用过量可引发各种不良反应。TERAO 等^[9]研究表明,LTG 用药最常见的不良反应是皮疹。有研究显示,患有癫痫和情绪障碍的孕妇患者一线药物是 LTG,而且体内血药浓度水平波动较大^[3],建议在孕前、孕中及分娩后对此药进行常规血药浓度监测。为达到病情控制与药物不良反应之间的平衡,一般建议临床医生使用神经精神药理学与药物精神病

学协会专家组推荐治疗浓度范围(推荐浓度为 $3 \sim 14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,警戒浓度 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[10]对癫痫患者进行剂量调整。但 LTG 的有效治疗浓度范围尚存在争议,国内学者普遍认为,LTG 抗癫痫的治疗浓度范围是 $1 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11-13],血药浓度大于 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不良反应发生率显著增加^[13]。考虑到种族体质差异、个体差异性大,LTG 受药物联合应用、基因多态性等因素影响较多,仅凭给药剂量很难确定体内 LTG 的真实浓度,仍需要通过药物浓度监测寻找最佳治疗浓度范围,使治疗方案更具个体化,因此需要建立简便、快速的 HPLC 法运用于临床服用 LTG 患者的药物浓度监测。

本研究建立 HPLC 法测定人血清 LTG 的血药浓度,依据《中国药典》2015 年版四部中“生物样品定量分析方法验证指导原则”^[7]对该方法进行验证。本实验中流动相选择纯甲醇和超纯水,体积分数 20% B 相等度洗脱,有助于延长色谱柱寿命,简化配比。采用苯代三聚氰胺作为内标,与 LTG 结构相似,保留时间适中,与样品峰无干扰,且性质稳定,物美价廉,可以满足内标的要求。以往测定方法的预处理大多采用甲醇沉淀蛋白法,而本研究采用甲醇和乙酸铅沉淀蛋白法测定 LTG 的浓度效果较好,离心后提取上清液即可上机处理,样品干净,检测结果准确。此方法操作简单、快速,采用 ES Industries Sonoma C18(2) 色谱柱能有效缩短分析时间,仅需 6 min 即可在液相色谱仪上完成 1 个标本的检测,且分离度较好,峰形较好,可以实现高通量样本的快速测定。经反复实验比较发现,LTG 和内标在 207 nm 紫外吸收波长下响应最强,无内源性干扰。方法学验证结果显示,本方法的选择性较好,不受其他内源性物质的干扰,空白基质干扰小,残留结果符合要求;LTG 在 $1.18 \sim 37.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好($r=0.999$),在定量下限、低、中、高浓度批内与批间 RSD 均小于 13.2%,样本适应性好,不同储存条件下 LTG 结果稳定,这与其理化性质稳定有关,能确保测定结果反映患者采样时的分析物浓度,可以满足所有临床样本的检测需求。本方法仅需 150 μL 血清样本,可实现小样本准确测定药物水平,适合临床常规 LTG 药物浓度监测,有利于基层医院送检样本的集中处理。

综上所述,本研究建立了分析速度快、操作简

便、选择性好、准确度高、符合生物样品分析要求的测定 LTG 临床血药浓度的 HPLC 分析方法,有助于达到临床精准治疗。

参考文献:

- [1] 张晓莉,曾蛟,顾家鹏,等. 5 种抗癫痫药物单药治疗初诊癫痫患儿 2a 单药保留率比较[J]. 新乡医学院学报,2016,33(4): 297-301.
- [2] NICOLSON A,APPLETON R E,CHADWICK D W,*et al.* The relationship between treatment with valproate, lamotrigine, and topiramate and the prognosis of the idiopathic generalised epilepsies [J]. *J Neurol Neurosur*,2004,75(1):75-79.
- [3] CLARK C T,KLEIN A M,PEREL J M,*et al.* Lamotrigine dosing for pregnant patients with bipolar disorder [J]. *Am J Psychiatry*, 2013,170(11):1240-1247.
- [4] LOVRIC M,BOZINA N,HAJNSEK S,*et al.* Association between lamotrigine concentrations and ABCB1 polymorphisms in patients with epilepsy [J]. *Ther Drug Monit*,2012,34(5):518-525.
- [5] 徐善森,张焜,周敬凯,等. 高效液相色谱法测定人血浆中拉莫三嗪、奥卡西平及其代谢物浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2015,31(12):1176-1179.
- [6] BARBOSA N R,MÍDIO A F. Validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in human plasma [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*,2000,741(2): 289-293.
- [7] 中国药典委员会. 中国药典 2015 年版第四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:363-368.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02(ISO 15189:2012IDT) 医学实验室质量和能力认可准则[M]. 北京:中国计量出版社,2013:1-50.
- [9] TERAO T,ISHIDA A,KIMURA T,*et al.* Assessment of safety and efficacy of lamotrigine over the course of 1-year observation in Japanese patients with bipolar disorder: post-marketing surveillance study report [J]. *Neuropsych Dis Treat*,2017,13:1441-1448.
- [10] HIEMKE C,BAUMANN P,BERGEMANN N,*et al.* AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011 [J]. *Pharmacopsychiatry*,2011,44(6):195-235.
- [11] 张颖. 特殊类型癫痫患者 120 例应用拉莫三嗪的疗效分析 [J]. 中南医学科学杂志,2016,44(3):341-344.
- [12] 陈晓燕,张鹏,何学仙,等. 癫痫患者拉莫三嗪血药浓度与疗效及剂量关系的研究 [J]. 宁夏医学杂志,2014,36(4):305-307.
- [13] 廖卫平,宋志彬,杨少青,等. 拉莫三嗪治疗癫痫的有效性 with 剂量、血药浓度及合并用药关系的研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志,2005,31(6):438-441.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)