

反相高效液相色谱法测定人血清中拉莫三嗪的浓度

王晓娟¹, 袁君¹, 黄庆¹, 赵伍西²

作者单位:¹淮南市第一人民医院药学部, 安徽 淮南 232007; ²淮南联合大学医学系, 安徽 淮南 232007

通信作者: 赵伍西, 女, 副教授, 研究方向为药理学, E-mail: 1738500858@163.com

基金项目: 淮南市科技计划项目(2013A4307)

摘要:目的 建立人血清拉莫三嗪浓度的反相高效液相色谱方法。方法 以艾司唑仑为内标, 乙酸乙酯为萃取剂, C₁₈柱分析柱, 流动相甲醇:磷酸二氢钠缓冲液(56:44, pH 6.0), 流速 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm, 柱温 30 °C。结果 拉莫三嗪在 0.10 ~ 100.00 mg/L 范围浓度内线性关系良好($r = 0.999\ 6$), 定量浓度下限为 0.10 mg/L, 高、中、低质控样品相对回收率在 80% ~ 120% 之间, 提取回收率分别为 90.95%、90.98%、95.10%, 日内、日间相对标准偏差(RSD)均 < 5%。结论 该方法准确, 分析时间较短, 线性范围大, 可用于服用拉莫三嗪病人的血清浓度的临床常规监测。

关键词:拉莫三嗪/分析; 色谱法, 高压液相; 血药浓度

Determination of lamotrigine in human serum by RP-HPLC

WANG Xiaojuan¹, YUAN Jun¹, HUANG Qing¹, ZHAO Wuxi²

Author Affiliations: ¹Department of Pharmacy, Huainan First People's Hospital, Huainan, Anhui 232007, China;

²Department of Medicine, Huainan Union University, Huainan, Anhui 232007, China

Abstract: Objective To establish an Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) method for the concentration of lamotrigine in human serum. **Methods** Estazolam was used as internal standard, ethyl acetate was used as extractant, and lamotrigine was analyzed via a C₁₈ column and mobile phase methanol:sodium hydrogen phosphate buffer (56:44, pH 6.0) under the flow rate of 1.0mL/min, at the column temperature of 30°C. The detection occurred at wave length of 210nm. **Results** Lamotrigine has a good linear relationship within the concentration range of 0.10-100.00 mg/L ($r = 0.999\ 6$) with a quantitative lower limit of 0.10 mg/L. The extraction recoveries rate of high, medium and low quality control samples was in the range of 80%-120%. The extraction recovery rates were 90.95%, 90.98% and 95.10% respectively, and the relative standard deviations (RSD) within and between days were < 5%. The intraday and intraday precisions were less than 5%. **Conclusion** The method is accurate and sensitive, the analysis time is short, and the linear range is large. It can be used to detect the serum concentration of lamotrigine for its clinical applications.

Key words: Lamotrigine/analysis; Chromatography, high pressure liquid; Serum concentration

拉莫三嗪(lamotrigine)是一种电压门控式钠离子通道阻滞剂,为广谱抗癫痫药,广泛用于控制各种类型的癫痫发作,被抗癫痫药物应用专家共识^[1]癫痫(2011年)列为健康育龄期妇女特发性全面性癫痫及症状性部分性癫痫的首选用药。但由于拉莫三嗪受遗传因素、联合用药等因素影响,有效血药浓度个体差异大,与剂量相关性差,治疗窗窄,因此临床应用需进行拉莫三嗪的血药浓度监测^[2-6]。本研究于2013年5月至2016年5月查阅相关文献^[7-9]建立了人体血清拉莫三嗪浓度的反相高效液相色谱方法,测定时间缩短,线性范围扩大,准确性提高,适用于拉莫三嗪血药浓度的临床常规监测,为拉莫三嗪的个体化治疗提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1260 高效液相色谱仪, DAD-G1316A 检测器; FA1104 电子天平(上海良平仪器厂); XW-80A 涡旋振荡器(上海医科大学仪器厂); H-1850R 型号离心机(湖南湘仪仪器厂); 高纯度氮气和氮吹仪(BYDCY-24S); DK-420 数显恒温水浴锅(上海三发科学仪器有限公司), D1810C 自动双重纯水蒸馏器(上海申胜生物技术有限公司)。

1.2 试剂 拉莫三嗪对照品、艾司唑仑对照品(中国药品生物制品检定所,批号 10075-20041、1219-0102); 乙腈含量 ≥ 99.9% (色谱纯,批号 S92150, sigma 公司); 正戊烷含量 ≥ 98.5% (色谱纯,上海凌峰化学试剂有限公司,批号 20150310); 甲醇含量 ≥ 99.8%、乙酸乙酯含量 ≥ 99.5%、氯仿含量 ≥ 99.5% (均

为色谱纯,国药集团化学试剂有限公司,批号分别为20141022、20151202、20150921);磷酸二氢钠含量 $\geq 99.5\%$ (天津市光复科技有限公司,批号20140731);自制重蒸馏水;正常人空白混合血清(淮南市第一人民医院检验科提供)。

1.3 溶液的配制 拉莫三嗪储备液配制:精密称取拉莫三嗪对照品25 mg,加入甲醇溶解,定容到100 mL容量瓶中,得250 mg/L拉莫三嗪储备液。艾司唑仑内标液配制:精密称取艾司唑仑对照品38.6 mg,加甲醇溶解,定容到50 mL容量瓶中,得浓度为772 mg/L的艾司唑仑内标液。上述溶液放置在4℃冰箱保存备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱规格Agilent C₁₈(4.6×150 mm, 5 μm)(Agilent公司);流动相配比为甲醇:磷酸二氢钠缓冲液(56:44, pH 6.0);流速1.0 mL/min;检测波长210 nm,液相色谱柱温30℃;进样量10 μL。

2.2 样品处理 精密吸取艾司唑仑内标液10 μL于离心管中氮气吹干,加入混合血清样品100 μL,乙酸乙酯600 μL涡旋2 min,离心5 min(8 000 r/min)。取出上清液,下层再次加入600 μL乙酸乙酯,涡旋2 min,离心5 min(8 000 r/min),合并两次上清液。55℃水浴,氮气吹干,残渣用流动相100 μL溶解,混匀30 s,离心5 min(8 000 r/min),于“2.1 色谱条件”下取10 μL进样测定。

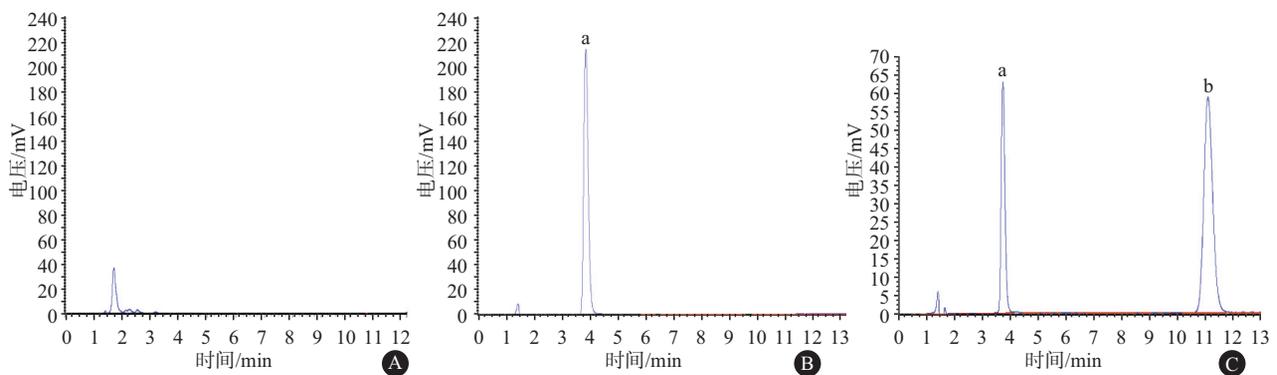
2.3 方法专属性 取空白血清按“2.2”项下方法处理分析,拉莫三嗪和内标峰型良好,两者保留时间分别为3.8 min和11.5 min,空白血清内源性物质不

干扰测定。按照上述方法考察同时加入卡马西平、苯妥英钠及丙戊酸钠对实验的干扰,卡马西平及苯妥英钠保留时间分别为7.4 min和6.5 min,丙戊酸钠无峰,三者均不干扰拉莫三嗪测定。结果见图1。

2.4 标准曲线与线性范围 拉莫三嗪储备液用甲醇稀释,配成浓度分别为0.10、0.50、2.50、10.00、25.00、50.00、100.00 mg/L的拉莫三嗪标准液。按2.2项下方法处理进样测定。以拉莫三嗪与内标峰面积比值为纵坐标(Y),拉莫三嗪质量浓度为横坐标(X),进行线性回归。得拉莫三嗪回归方程 $Y = 0.020 1X + 0.025 2$ ($r = 0.999 6$),在0.10~100.00 mg/L范围内线性关系良好,定量下限为0.10 mg/L。

2.5 精密度和回收率 取空白血清100 μL,准确加入一定量的拉莫三嗪标准储备液,配制低、中、高质量浓度分别为0.25、2.50和25.00 mg/L的拉莫三嗪质控血清,每个浓度各5份,取上述系列浓度的标准质控血清样品,按“2.2”项下方法操作,以当日回归方程计算各药物浓度,以加入质量浓度与实测质量浓度之比计算相对回收率。上述3种浓度的标准质控血清样品在同一天内分别测定3次和连续3 d每天测定1次,测得的血药浓度计算日内精密度和日间精密度,结果见表1。

2.6 稳定性 取2.5项方法配制的0.25、2.50、25.00 mg/L浓度的拉莫三嗪质控血清,室温放置24 h, -20℃冰冻7 d和-20℃冰冻1个月的稳定性。按“2.2”项下方法操作,分别测定拉莫三在室温放置24 h和-20℃冷冻7 d、1个月前后的拉莫三嗪峰面积之比,相对标准偏差(RSD)分别为1.5%、1.2%及



注:a为拉莫三嗪,b为艾司唑仑

图1 拉莫三嗪和艾司唑仑的反相高效液相色谱图:A为空白血清图;B为拉莫三嗪血清图;C为拉莫三嗪+艾司唑仑血清图

表1 人血清中拉莫三嗪的精密度和回收率

拉莫三嗪	重复次数	日内精密度/(mg/L, $\bar{x} \pm s$)	相对标准偏差/%	日间精密度/(mg/L, $\bar{x} \pm s$)	相对标准偏差/%	相对回收率/%
0.25 mg/L	5	0.28±0.01	2.60	0.26±0.01	3.47	101.0
2.50 mg/L	5	2.59±0.10	3.68	2.38±0.11	4.71	101.4
25.00 mg/L	5	26.08±0.28	1.06	26.50±0.26	0.97	103.9

0.9%,表明在此条件下,拉莫三嗪稳定性良好。

3 讨论

以艾司唑仑为内标,而非文献报道^[10-11]的氯唑沙宗,因可能需要同时监测卡马西平、苯巴比妥、苯妥英钠等药物的血浓度,可以缩短实验时间和节约检测成本,但多种成分同时监测,拉莫三嗪与苯巴比妥分离度较差,还需进一步优化。流动相的组成、比例选择参考相关文献^[12-13],甲醇与水,或乙腈与水影响拉莫三嗪和内标峰型,而采用甲醇:磷酸二氢钠缓冲液(56:44, pH 6.0)峰型较为理想。乙酸乙酯作为萃取溶剂,比乙醚、乙酸乙酯、氯仿、正戊烷毒性低,杂质峰少,回收率高而稳定,分离效果好。但乙酸乙酯挥发慢,因此血样处理采用55℃水浴,氮气吹干。

应用本方法监测数百例服用拉莫三嗪病人的血清药物浓度,所有病人的血清浓度均在0.10~100.00 mg/L线性之内,无特殊情况当天可以出监测报告,说明该方法方便、快捷、准确,能够满足拉莫三嗪血清浓度的临床常规监测需要,给临床癫痫病人拉莫三嗪个体化治疗提供科学、准确的用药依据。

参考文献

- [1] 中华医学会神经病学分会脑电图与癫痫学组.抗癫痫药物应用专家共识[J].中华神经科杂志,2011,44(1):56-65.
- [2] 赵明明,孙亚欣,陈雨卉,等.拉莫三嗪的药代动力学研究进展

- [J].广东药学院学报,2012,28(5):578-583.
- [3] 何艳玲,和凡,莫小兰,等.遗传因素与合用丙戊酸的南方癫痫患儿对拉莫三嗪疗效的相关性[J].实用医学杂志,2017,33(19):3280-3283.
- [4] 杨帆,陈亚南,张媿,等.丙戊酸对癫痫患者拉莫三嗪血药浓度的影响[J].中国临床药理学杂志,2016,32(10):883-886.
- [5] 苗秋丽,闫荟羽,李艳娇,等.拉莫三嗪联合丙戊酸钠疑似致中毒性表皮坏死溶解症1例[J].医药导报,2017,36(1):102-104.
- [6] 朱雪萍,陈晓萌,秦玉花,等.建立同时测定人血浆中拉莫三嗪和奥卡西平的HPLC法[J].中国药房,2013,24(6):526-528.
- [7] 刘春,任惠.新型抗癫痫药物拉莫三嗪研究进展[J].实用临床医学,2015,16(2):104-107.
- [8] 张华.拉莫三嗪联合丙戊酸钠治疗难治性癫痫部分性发作的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2016,32(12):1085-1087.
- [9] 广东省药学会.拉莫三嗪个体化给药临床药师指引[J].今日药学,2016,26(4):217-224.
- [10] 张媿,李新林,周敬凯,等.高效液相色谱法测定人乳汁中拉莫三嗪的浓度[J].中国临床药理学杂志,2015,31(5):375-377,387.
- [11] 左晶,汪洋,许琼,等.高效液相色谱法测定人血清中拉莫三嗪浓度[J].中国临床药理学杂志,2012,28(8):603-605.
- [12] MALLAYASAMY SR, ARUMUGAM K, JAIN T, et al. A sensitive and selective HPLC method for estimation of lamotrigine in human plasma and saliva: application to plasma-saliva correlation in epileptic patients [J]. Arzneimittelforschung, 2010, 60(10):599-606.
- [13] HOTHAKK, KUMAR SS, BHARATHI DV, et al. Rapid and sensitive LC-MS/MS method for quantification of lamotrigine in human plasma: application to a human pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2012, 26(4):491-496.

(收稿日期:2019-04-02,修回日期:2019-05-12)

◇ 编读往来 ◇

校对诀要

为保证作者文稿刊出准确无误,责编会将编辑的文稿发回作者,要做好这份刊前稿样的核校,作者的操作诀要是:(1)必须回答编者提出的问题(将有批注或文字提问)。详核文题、作者姓名和单位名称(邮编)、科室。(2)对正文(包括外文拼写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对。无原则问题,尽量不改动。(3)务请核查文内角码是否与文末参考文献序号相对应。参考文献缺项的内容,按本刊规定格式补充(如前3位作者全部著录,卷、期要同时写明,作者名刊名宜缩写)。(4)认真核查法定计量单位及药物剂量;认真核校文内、表和图中的数字有无计算错误;认真复核统计学处理,写出统计量的具体值(如 χ^2 值、 t 值、 P 值的大小)。(5)若改动,必须将编辑编审的电子稿(编辑发回的刊前稿样)下载后用“修订格式”直接修改发回即可——切勿删去修改痕迹。切勿另行启用其它稿样修改。(6)校毕应于3 d内发回修改稿,可附以修改说明。

(郝希春)