

# HPLC法测定人血清中拉莫三嗪浓度的方法改进

陈春枚\*, 赖剑锋, 陈志强(龙岩市第一医院药剂科, 福建 龙岩 364000)

中图分类号 R969.1; R971\*.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)32-4504-02  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.32.14

**摘要** 目的:对测定人血清中拉莫三嗪(LTG)浓度的方法进行改进。方法:血清样品经甲醇处理后以高效液相色谱(HPLC)法进行测定,色谱柱为Hypersil BDS C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(45:55, V/V),检测波长为250 nm,流速为1 ml/min,柱温为35℃。结果:LTG血药浓度在0.5~30.0 μg/ml范围内线性关系良好( $r=0.999\ 9$ ),日内、日间RSD均<5%,方法回收率为101.96%~102.74%。结论:改进后的方法简便、快速、准确,适合临床常规监测LTG血药浓度及LTG的药动学研究。

**关键词** 拉莫三嗪; 治疗药物监测; 高效液相色谱法

## Improvement of HPLC in Concentration Determination of Lamotrigine in Human Serum

CHEN Chun-mei, LAI Jian-feng, CHEN Zhi-qiang (Dept. of Pharmacy, the First Hospital of Longyan City, Fujian Longyan 364000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a rapid method for the concentration determination of lamotrigine (LTG) in human serum. METHODS: HPLC was adopted after serum samples treated with methanol. The column was Hypersil BDS C<sub>18</sub> (200 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (45:55, V/V) at the flow rate of 1 ml/min, the detection wavelength was 250 nm, and the temperature was 35℃. RESULTS: The linear range of LTG was 0.5-30.0 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ). The RSDs of intra-day and inter-day were all less than 5% and the recovery was 101.96%-102.74%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and fast, and suitable for the monitoring of LTG serum concentration.

**KEYWORDS** Lamotrigine; Therapeutic drug monitoring; HPLC

拉莫三嗪(lamotrigine, LTG)为苯三嗪类广谱抗癫痫药,其通过调节钠通道增加神经元稳定性发挥抗癫痫作用,常用于治疗12岁以上儿童及成人简单部分性发作、复杂部分性发作、继发性全身强直-阵挛性发作及原发性全身强直-阵挛性发作。常见不良反应有头痛、头晕、震颤、共济失调等,严重者可出现Steven-Johnson综合征。LTG单药治疗癫痫的疗效已有文献<sup>[1-3]</sup>报道,推荐的有效血药浓度为2.5~15 μg/ml,但血药浓度个体差异大<sup>[3]</sup>,疗效和不良反应发生率与血药浓度密切相关,开展治疗药物监测有重要的临床意义。笔者在文献[4]的基础上进行改进,建立了一种采用高效液相色谱(HPLC)法测定人血清中LTG浓度的方法,且操作简便、快速、准确。

## 1 材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱系统,包括510泵、717自动进样器、996二极管阵列检测器(美国Waters公司);Milli-Q纯水器(美国Millipore公司);AEG-120g电子分析天平(日本岛津公司);XW-80A涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);TGL 16M台式高速冷冻离心机[长沙英泰仪器有限公司,6号转子,最大离心力(RCF):17 000×g]。

### 1.2 药品与试剂

LTG对照品(美国Sigma公司,批号:080M1203V,纯度>98%);丙戊酸钠对照品(美国Sigma公司,批号:067K0761,纯度:98%);苯妥英钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100210-200401,纯度:99.7%);卡马西平对照品(中国食品药

品检定研究院,批号:100142-199503,纯度:99.7%);内标:苯乙酮(上海试剂一厂,批号:200209,纯度:99.0%);甲醇为色谱纯,磷酸、磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)等均为分析纯,水为我院自制注射用水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm);保护柱:Hypersil BDS C<sub>18</sub>(10 mm×2.1 mm, 3 μm);流动相:甲醇-0.01 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 3.8)(45:55, V/V,经0.45 μm微孔滤膜滤过);流速:1 ml/min;柱温:35℃;检测波长:250 nm;进样量:20 μl。

### 2.2 溶液的配制

准确称取LTG对照品1.2 mg,置于2 ml量瓶中,用甲醇溶解至刻度,配制成浓度为600 μg/ml的贮备液,临用前用甲醇稀释成各浓度的对照品溶液;精密量取苯乙酮3 μl,置于100 ml量瓶中,加甲醇定容,配成浓度为30 μg/ml的内标溶液;准确称取KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1.361 g,用水溶解定容至1 L,用磷酸调节pH值至3.8,配制成浓度为0.01 mol/L的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液。以上溶液均于4℃冰箱中保存,备用。

### 2.3 血样处理

精密吸取待测人血清样品200 μl,置于1.5 ml Eppendorf管中,加入内标溶液10 μl和甲醇溶液500 μl,涡旋振荡1 min,以离心半径为6 cm、转速为5 000 r/min离心10 min,取上清液20 μl进样测定。

### 2.4 分离度与专属性

按“2.1”项色谱条件对空白血清、空白血清+8.0 μg/ml LTG

\* 药师, 硕士。研究方向: 临床药学。电话: 0597-2205077。  
E-mail: fjccm2007@163.com

对对照品+内标、患者服药后血清样品+内标进行色谱分析。结果,LTG与内标峰分离良好,无明显的内生杂质峰干扰;临床常见的合用药物丙戊酸钠(75 μg/ml)、苯妥英钠(300 μg/ml)、卡马西平(250 μg/ml)对本检测均无干扰,色谱见图1。

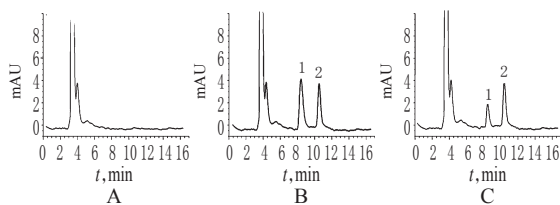


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+LTG对照品+内标;C.患者服药后血清样品+内标;1.LTG;2.苯乙酮

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + LTG standard + internal standard; C. patient's plasma + internal standard after drug treatment; 1. LTG; 2. interna standard

### 2.5 标准曲线的制备

取空白血清200 μl,置于1.5 ml Eppendorf管中,精密量取不同浓度、相同体积的LTG对照品溶液10 μl,配制成质量浓度为0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、30.0 μg/ml的血清对照品溶液,再分别加入内标溶液10 μl,按“2.3”项方法操作,记录色谱。以LTG与内标峰面积比(y)对LTG血药浓度(c)进行线性回归,得回归方程为 $y=0.2022c+0.0888$ ( $r=0.9999$ )。结果表明,LTG血药浓度在0.5~30.0 μg/ml范围内线性关系良好。

### 2.6 回收率及精密度试验

配制低、中、高(2.0、8.0、16.0 μg/ml)浓度的对照品血清样品各5份,分别于当日和连续5 d内测定,计算方法回收率及日内、日间相对标准差(RSD),结果见表1。表1结果表明,本方法重复性好,结果稳定,符合生物样品分析要求,可作为常规检测方法。

表1 回收率及精密度试验结果(n=5)

Tab 1 Results of recovery and precision test(n=5)

浓度, μg/ml	测得浓度, μg/ml	日内RSD, %	日间RSD, %	方法回收率, %
2.0	2.05	4.78	3.59	102.49
8.0	8.22	1.13	4.77	102.74
16.0	16.31	4.18	4.13	101.96

### 2.7 稳定性试验

配制低、中、高(2.0、8.0、16.0 μg/ml)浓度的对照品血清样品,在长期冻存(-20℃冻存7 d)、冻融(-20℃冻存24 h后室温解冻,连续3次)和提取上清液室温(放置0、2、6 h)条件下分别进行测定,结果见表2。

表2 稳定性试验结果(n=5)

Tab 2 Results of stability test(n=5)

浓度, μg/ml	长期冻存稳定性		冻融稳定性		提取上清液室温稳定性	
	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %
2.0	99.66	2.63	101.43	3.15	109.74	4.23
8.0	96.85	1.97	99.78	1.12	110.45	0.64
16.0	94.01	3.51	97.98	2.31	107.91	1.28

### 2.8 临床应用

采用笔者建立的方法为123例癫痫患者进行LTG血药浓度

监测,测定的最高血药浓度达18.31 μg/ml,最低为0.99 μg/ml,平均值为5.34 μg/ml。其中,在治疗窗之内66例,占53.66%;低于治疗窗49例,高于治疗窗8例,共占46.34%。

### 3 讨论

对于LTG血样前处理方法,文献[5-6]采用萃取法,操作较为烦琐。本试验采用甲醇溶液沉淀蛋白后取上清液直接进样,操作快速、简便,沉淀完全,适合于临床常规监测。LTG呈碱性与固定相表面的硅羟基键合,峰形易出现脱尾,文献[7]采用在流动相中加入三乙胺的方法来防止拖尾,操作较烦琐。本试验选用Hypersil BDS C<sub>18</sub>柱即可简化操作,有效避免拖尾现象,峰形良好。LTG及内标色谱峰的扫描光谱图(200~400 nm)中在近紫外区210 nm处的信号响应较强,但内源性干扰严重,经反复试验比较,取250 nm不仅可排除内源性干扰,还可获得最佳灵敏度,故选250 nm为本试验的检测波长。关于流动相的选择,文献[4]采用缓冲液浓度较高,对色谱柱损伤较大,文献[5]采用缓冲液与两种有机溶剂的配比,组成较为复杂,考虑到LTG的出峰时间和峰形均受到流动相pH值的影响,文献[8]则采用梯度洗脱,药物保留时间的重现性差。故本研究选择甲醇-0.01 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲液(pH 3.8)(45:55, V/V)为流动相进行梯度洗脱,既降低缓冲液浓度,简化配比,又使出峰时间达到最佳,有利于延长色谱柱的使用寿命。综上,本方法样品处理简单、快速,方法灵敏、重复性好、回收率高、线性范围广,适合临床常规监测LTG血药浓度及LTG的药动力学研究。

### 参考文献

- [1] Valencia I, Piñol-Ripoll G, Khurana DS, et al. Efficacy and safety of lamotrigine monotherapy in children and adolescents with epilepsy [J]. *Eur J Paediatr Neurol*, 2009, 13(2): 141.
- [2] Bentué-Ferrer D, Tribut O, Verdier MC. Therapeutic drug monitoring of lamotrigine [J]. *Therapie*, 2010, 65(1): 39.
- [3] Søndergaard KM, Nielsen KA, Dahl M, et al. Lamotrigine therapeutic thresholds [J]. *Seizure*, 2008, 17(5): 391.
- [4] 胡永狮,吴平,汤秋华.抗癫痫药拉莫三嗪的血药浓度测定及动物的药代动力学研究[J].*华西药理学杂志*, 2001, 16(1): 29.
- [5] 张国阳.RP-HPLC法测定人血清中拉莫三嗪的浓度[J].*中国药房*, 2010, 21(34): 3 206.
- [6] Rivas N, Zarzuelo A, López FG. Optimisation of a high-efficiency liquid chromatography technique for measuring lamotrigine in human plasma [J]. *Farm Hosp*, 2010, 34(2): 85.
- [7] 王来成,王涛,韩强,等. RP-HPLC法测定人血浆中拉莫三嗪的浓度[J].*中国药房*, 2011, 22(10): 887.
- [8] 杜军,李忆军. RP-HPLC测定拉莫三嗪和苯巴比妥的血药浓度[J].*中国医药导报*, 2010, 7(8): 39.

(收稿日期:2014-12-24 修回日期:2015-03-27)

(编辑:李 劲)