

二维 HPLC 法测定血清中拉米夫定药物浓度

单锋^{1,2,3}, 张娟⁴, 王峰^{4,5}, 梁俊^{1,2,3}, 夏清荣^{1,2,3} (1.安徽医科大学附属心理医院药剂科, 合肥 230022; 2.合肥市第四人民医院药剂科, 合肥 230022; 3.安徽省精神卫生中心精神药理研究室, 合肥 230022; 4.湖南省德米特仪器有限公司, 长沙 410000; 5.中南大学湘雅二医院药学部, 长沙 410011)

摘要 目的: 建立二维高效液相色谱测定拉米夫定血药浓度的方法。方法: 血清样品经去蛋白剂处理后, 以二维高效液相色谱法进样分析。第一维色谱柱为 Aston SN (4.6×50mm, 5μm), 捕获柱为 Aston SH (4.6×10mm, 5μm), 第二维色谱柱为 Aston SNX4 (4.6×130mm, 5μm)。流动相: 第一维流动相为甲醇: 乙腈: 10mmol/L 乙酸水溶液 (二乙胺调 pH 至 5.35) = 4: 5: 16 (V: V: V), 第二维流动相为甲醇: 6.5mmol/L 乙酸水溶液 (三乙胺调 pH 至 3.8) = 2: 3 (V: V); 辅助流动相: 纯化水。第一维色谱泵流速为 0.5mL/min, 第二维色谱泵流速为 1.0mL/min; 柱温为 40°C, 紫外检测波长为 270nm, 进样量为 100μL。结果: 拉米夫定血药浓度在 204.80~12800 ng/mL 范围内线性关系良好 ($R^2=0.9999$, %RSD=0.9379), 定量下限为 204.80 ng/mL; 提取回收率为 91.14%~92.32%; 日内、日间的 RSD 均 < 3%。结论: 二维高效液相色谱法检测拉米夫定血药浓度简便高效、准确稳定、灵敏度高, 可用于拉米夫定的血药浓度监测和药动学研究。

关键词 拉米夫定; 二维高效液相色谱法; 血药浓度

中图分类号 R969.1; R978.7 **文献标志码** A

Concentration Determination of Lamivudine in Human Serum by 2-dimensional high performance liquid chromatography

SHAN Feng^{1,2,3}, ZHANG Juan⁴, WANG Feng^{4,5}, LIANG Jun^{1,2,3}, XIA Qing-rong^{1,2,3} (1. Dept. of Pharmacy, Affiliated Psychological Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 2. Dept. of Pharmacy, Hefei Fourth People's Hospital, Hefei 230022, China; 3. Psychopharmacology Laboratory, Anhui Mental Health Center, Hefei 230022, China; 4. ANAX Instruments Company Limited, Changsha 410000, China; 5. Dept. of Pharmacy, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China.)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the determination of lamivudine concentration in human serum. **METHODS:** The samples were detected and analyzed after eliminating the protein. The determination was performed on 2-dimensional high performance

[作者简介] 单锋, (1991-), 男, 硕士研究生, 主管药师, E-mail: 869575716@qq.com.

[通信作者] 夏清荣, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, E-mail: xiaqingrong519@hotmail.com.

liquid chromatography (2D-HPLC) which the extraction column was Aston SN with mobile phase consisted of methanol-acetonitrile-water (containing 10mmol/L acetic acid) (V:V:V=4:5:16, PH=5.35) at the flow rate of 0.5 mL/min and the analytical column was Aston SNX4 with mobile phase consisted of methanol- water (containing 6.5mmol/L acetic acid) (V:V = 2:3, PH=3.8) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 40°C and UV detection wavelength was set at 270nm. Injection volume was 100 μ L. RESULTS: The linear range of lamivudine were 204.80-12800 ng/mL ($R^2=0.9999$, %RSD=0.9379), and the quantitative lower limit was 204.80 ng/mL. The extraction recoveries were 91.14%~92.32%. The intra-day and inter-day RSD were all less than 3%. CONCLUSIONS: The 2D-HPLC method for the determination of plasma concentration of lamivudine is not only simple and efficient, but also accurate and stable, with high sensitivity suitable for the determination of plasma concentration and pharmacokinetic study of lamivudine.

KEY WORDS Lamivudine; 2-dimensional high performance liquid chromatography; plasma concentration

拉米夫定 (lamivudine, 3TC) 是第 2 代核苷类抗逆转录病毒药物, 口服吸收后在生物体内代谢生成其活性形式拉米夫定三磷酸盐 (L-TP), 通过阻碍病毒 DNA 合成, 发挥抗病毒作用^[1]。拉米夫定相较于其他核苷类逆转录酶抑制剂, 不良反应较为轻微, 广泛应用于临床上慢性乙型病毒性肝炎和 HIV 感染的治疗, 是目前国际上推荐的及国内常用的抗艾滋病三联用药治疗方案的基础药物^[2]。目前, 拉米夫定的耐药现象日趋严重^[3], 因此对其开展药物浓度监测、保证患者获得充分治疗、减少耐药的发生显得尤为重要。

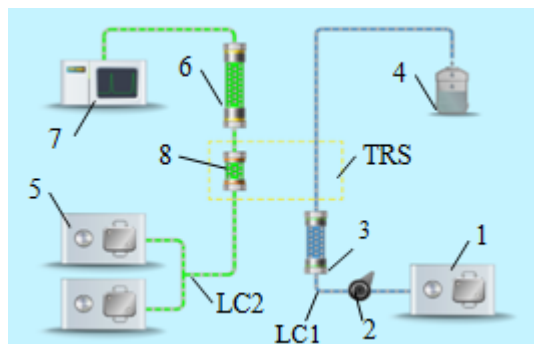
目前, 国内外拉米夫定的血药浓度检测主要采用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 和液相色谱—串联质谱法 (LC-MS/MS)^[4,5], 而二维高效液相色谱技术具有简便高效、准确稳定、灵敏度高的特点, 故本研究拟建立一种基于二维高效液相色谱技术的拉米夫定血药浓度 HPLC 检测方法, 以期为临床开展血药浓度监测、指导个体化给药以及实验室开展相关药动学研究提供一种稳定可靠的方法学基础。

1 材料

1.1 仪器

本实验使用全自动二维液相色谱系统。该系统由 FLC2701 全自动二维色谱耦合仪（湖南德米特仪器有限公司，中国）及岛津 LC-20AT_{VP} 液相色谱部件（日本岛津公司）构成；电子分析天平（AND，HR-200，日本）；高速离心机（奥盛，MINI-15K，中国）；漩涡混合器（琪特，XW-80A，中国）；冷藏冷冻箱（星星，BCD-221NMV，中国）；纯水仪（宜科，EKUS-I-120L，中国）。

本方法采用“柱柱转移”的二维系统的关联方式，共通过 3 个工序完成样品的二维分离与检测，具体工序见图 1。



A 全自动二维液相色谱仪结构

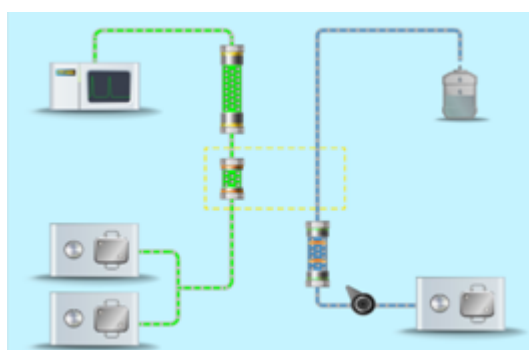
LC1：第一维液相色谱系统，包括 1.第一维色谱泵；

2.进样器；3.第一维色谱柱；4.废液收集器。

LC2：第二维液相色谱系统，包括 5.第二维色谱泵；

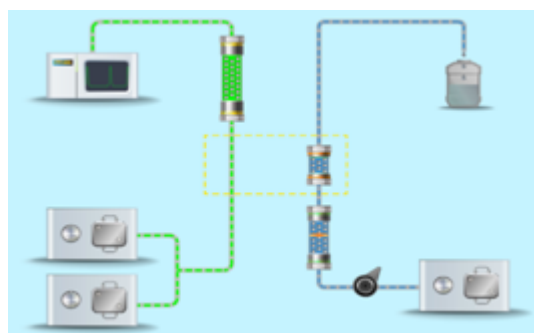
6.第二维色谱柱；7.紫外检测器。

TRS：捕获柱转移系统，包括 8（捕获柱）。



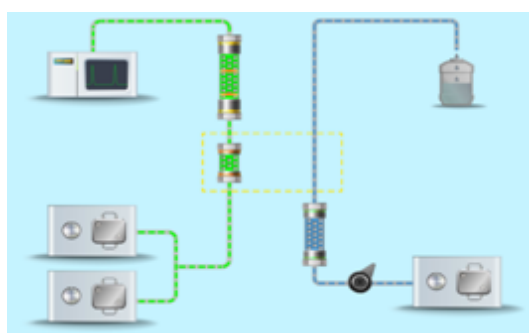
B 工序 1（样品在第一维色谱柱上分离）

注：样品通过自动进样器导入，样品中目标组分在第一维色谱柱上分离。



C 工序 2（目标组分被中间柱捕获）

注：第一维色谱柱与捕获柱连通，目标组分被捕获柱捕获。



D 工序 3（目标组分在第二维色谱柱上分离）

注：捕获柱与第二维色谱柱连通，目标组分在第二维色谱柱上分离，被检测器检测。

图 1 FLC 2701 全自动二维液相色谱系统结构及工作原理

Fig 1 The structure and the working principle of FLC 2701 automatic two-dimensional liquid chromatography system

FLC 采用化学物质发光或吸光特征（简称“化学发光或化学吸光”）并结合二维色

谱分离进一步去除干扰物质，有时也采用免疫萃取方法提纯样品（简称“免疫法”），以便获得良好的检测效果。

1.2 药品与试剂

拉米夫定对照品（含量 99.6%，批号：2-SEH-171-1，北京柏奥易思生物科技有限公司）；甲醇、乙腈、异丙醇（色谱纯，Merck, Germany）；磷酸、磷酸氢二铵、氨水、高氯酸、醋酸铵、乙二醇（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；前处理试剂：ORG-2 去蛋白剂（湖南德米特仪器有限公司，中国）；纯化水为双重蒸馏去离子水（纯水仪所制，不低于 GB17323 执行标准）；空白马血清（北京政博伟业生物科技有限公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：第一维色谱柱：Aston SN（4.6mm×50mm，5 μ m），第二维色谱柱：Aston SNX4（4.6mm×130mm，5 μ m），捕获柱：Aston SH4（4.6mm×10mm，5 μ m）。流动相：第一维流动相为甲醇：乙腈：10mmol/L 乙酸水溶液（二乙胺调 pH 至 5.35）=4: 5: 16（V: V: V），第二维流动相为甲醇：6.5mmol/L 乙酸水溶液（三乙胺调 pH=3.8）=2: 3（V: V）；辅助流动相：纯化水。流速：第一维色谱泵流速为 0.5mL/min，第二维色谱泵流速为 1.0mL/min。柱温：40 $^{\circ}$ C，检测波长：270nm，进样量：100 μ L，运行时间程序见表 1。

表 1 FLC 2701 系统运行时间程序

Tab 1 Time program for FLC 2701 system

工序流程	工序 1	工序 2	工序 3
时间	0-1.7min	1.7-2.6min	3.5-11min
系统工作状态	LC1 色谱柱工作，进行样品初级分离	样品中目标组分的转移	目标物在二维色谱柱中再次分离检测

2.2 对照品溶液的制备

准确称取拉米夫定对照品 3.40mg，置于 10mL 量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，制得质量浓度为 340 μ g/mL 的对照品贮备液，贮存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内避光保存备用。临用时用甲醇稀释成所需浓度的拉米夫定对照品溶液。

2.3 血清样品处理

将患者血样离心（3000 r/min）5min，取上层血清 400 μ L 置于 1.5mL EP 管中，再准确吸取 1000 μ L ORG-2 去蛋白剂加入 EP 管中，涡旋振荡 1min，高速离心（14500 r/min）8min，取上层清液 1000 μ L 于进样瓶中，吸取 100 μ L 进样分析。

2.4 专属性考察

按“2.3”项方法操作，在“2.1”项色谱条件下，考察方法的专属性，测得空白马血清、空白人血清、拉米夫定对照品、拉米夫定对照品+空白马血清的色谱图见图2。在该色谱条件下，11min内完成血浆中拉米夫定的检测，拉米夫定的保留时间约为9.3min，空白人血清与空白马血清色谱图中此处未发现干扰峰，表明拉米夫定的测定不受血浆中内源性物质的干扰，本方法具有较高的专属性。

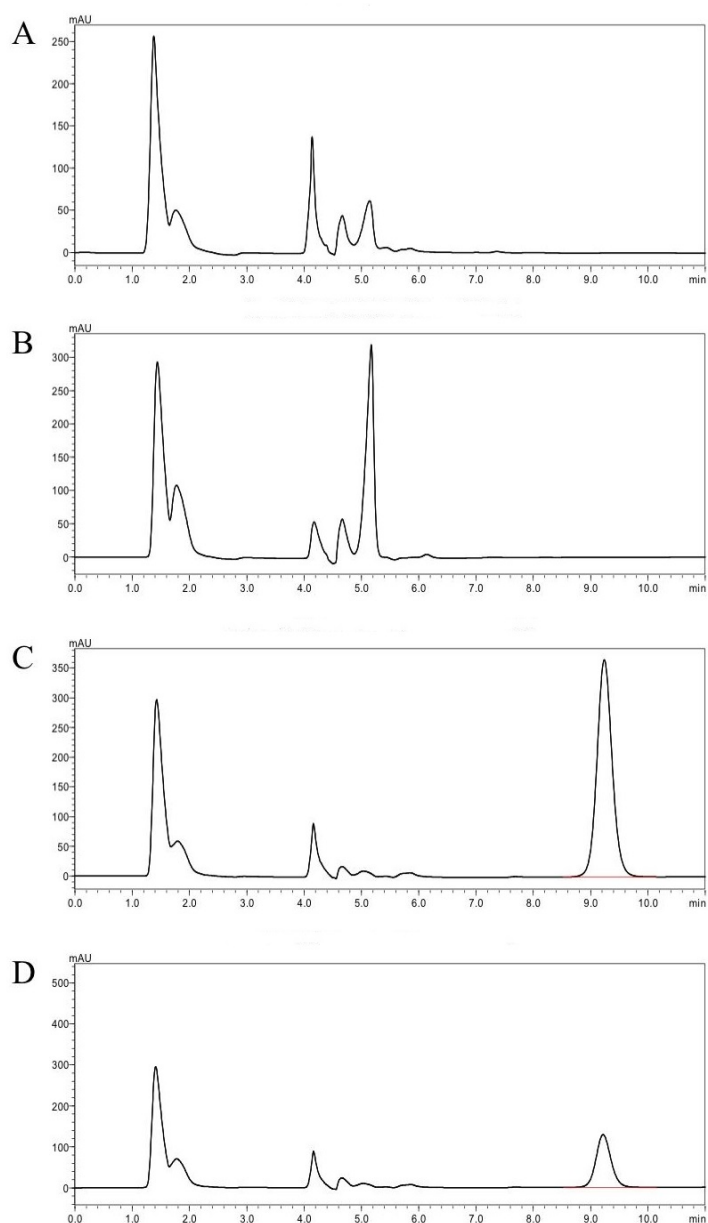


图2 拉米夫定二维液相色谱图

Fig 2 Two-dimensional liquid chromatogram of lamivudine

A. 空白马血清 (blank horse serum); B. 空白人血清 (blank human serum); C. 拉米夫定对照品溶液 (reference of lamivudine); D. 拉米夫定马血清溶液 (horse serum spiked with lamivudine)

2.5 标准曲线及定量下限

取质量浓度为 340 $\mu\text{g/mL}$ 的拉米夫定对照品贮备液，分别用空白血清逐级稀释成拉米夫定质量浓度为 204.80、512.00、1137.78、2560.00、4266.67、9600.00、12800.00 ng/mL 7 个浓度及空白血清用于标准曲线的绘制，按“2.3”项方法操作，在“2.1”项色谱条件下，进样分析。以测得拉米夫定的峰面积（Y）与其对应的质量浓度（X）进行线性回归，得到线性回归方程 $Y=642.448X + 157.026$ ($R^2=0.9999$, $\%RSD=0.9379$)。结果表明，拉米夫定血药浓度在 204.80~12800 ng/mL 范围内线性关系良好。血清中拉米夫定的检测定量下限为 204.80 ng/mL （信噪比 >10 ）。

2.6 精密度与准确度

取质量浓度为 340 $\mu\text{g/mL}$ 的拉米夫定对照品贮备液，分别用空白血清稀释成拉米夫定质量浓度为 425 ng/mL 、3400 ng/mL 、10200 ng/mL 的含药血清样本，按“2.3”项方法操作，在“2.1”项色谱条件下，进样分析，计算样品浓度。将实测浓度与配制浓度对照，考察日内、日间精密度和准确度。结果表明，该方法测定血清中拉米夫定浓度的精密度与准确度高、重现性好，符合生物样品分析要求（见表 2）。

表 2 拉米夫定精密度与准确度试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 2 Results of precision and accuracy tests of lamivudine ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

配制浓度 (ng/mL)	日内精密度			日间精密度		
	实测浓度 (ng/mL)	RSD (%)	准确度 (%)	实测浓度 (ng/mL)	RSD (%)	准确度 (%)
425	410.58 \pm 7.08	1.72	96.61	418.20 \pm 12.23	2.92	98.40
3400	3526.42 \pm 17.43	0.49	103.72	3542.77 \pm 39.58	1.12	104.20
10200	10065.07 \pm 37.19	0.37	98.68	10105.83 \pm 88.63	0.88	99.08

2.7 提取回收率

按“2.6”项方法配制拉米夫定质量浓度为 425 ng/mL 、3400 ng/mL 、10200 ng/mL 的含药血清样本，按“2.3”项方法操作，在“2.1”项色谱条件下，进样分析，记录血清样品中拉米夫定的色谱峰面积 A_x ，并与相应浓度对照品溶液直接进样记录的色谱峰面积比较 A_s ，计算提取回收率，结果见表 3。结果表明，拉米夫定低、中、高 3 个浓度的血清样本提取回收率均 $>70\%$ ，满足准确定量的要求。

表 3 拉米夫定回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab 3 Results of recovery tests of lamivudine ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

配制浓度 (ng/mL)	回收率	
	数值 (%)	RSD (%)
425	92.32 \pm 2.06	2.23
3400	91.26 \pm 1.86	2.04

2.8 稳定性试验

按“2.6”项方法配制拉米夫定质量浓度为 425 ng/mL、3400 ng/mL、10200 ng/mL 的含药血清样本，每组浓度平行 3 个样本，分别考察室温放置 24 小时、4℃ 条件放置 5 天、45℃ 条件放置 5 天、-20℃ 条件冻存放置 15 天、反复冻融 3 次的稳定性。样本处理按“2.3”项方法操作，在“2.1”项色谱条件下，进样分析，计算样品浓度。结果表明，拉米夫定低、中、高 3 个浓度的血清样本在上述条件下 RSD 值均 < 15%，稳定性良好，符合方法学要求。

3 讨论

拉米夫定作为第 2 代核苷类抗逆转录病毒药物，具有抗病毒高效、使用安全、不良反应相对轻微、耐受性良好等特点，被世界卫生组织（WHO）推荐为核苷类逆转录酶抑制剂（nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI）中的一线药物^[6]，亦是国际上推荐的控制、治疗艾滋病最为有效的高效抗逆转录病毒疗法（highly active antiretroviral treatment, HAART）的基础药物^[7]。然而，随着拉米夫定在临床的广泛使用，其耐药株不断出现，给临床抗病毒治疗带来了困难^[3, 8]，诸如像开发新型抗艾滋病复方药物（替诺福韦+拉米夫定+依非韦伦）等举措正在努力应对这一问题^[9]。开展拉米夫定血药浓度监测，指导临床个体化给药，提高拉米夫定的临床疗效、减少其不良反应的发生、避免或延缓耐药性的产生，降低患者的经济负担，意义尤为重大。为此，本实验旨在建立一种快速简便、准确稳定、灵敏度高的拉米夫定血药浓度检测方法，以期为临床安全、合理用药提供依据。

目前，国内外拉米夫定的血药浓度检测基本采用 HPLC 法和 LC-MS/MS 法^[4, 5]，而本方法是基于全自动二维液相色谱系统建立，相比 HPLC 法和 LC-MS/MS 法有诸多优点。样本前处理操作简单、步骤简便，一方面减少了检测人员的工作量，另一方面降低了因复杂的前处理操作过程带来的误差；此外，本方法避免了传统 HPLC 采用液液萃取法提取目标物^[10]，最大程度减少了有毒有害试剂对检测人员身体健康的影响。本法基于全自动二维液相色谱仪对样品进行色谱分析，采用“柱柱转移”的二维分离与检测，最大可实现 500 μ L 的进样体积，本实验中进样体积为 100 μ L，体现了二维液相色谱系统处理大体积样品的能力。拉米夫定在正常给药剂量下，血浆药物浓度范围在 1~8 μ g/mL，其线性范围为在 204.80~12800.00 ng/mL 中，而本实验发现 FLC2701 全自动二维液相色谱系统检测拉米夫定的定量下限可达到 20ng/mL，这与谢栋^[5]等人开发的拉米夫定 LC-MS/MS 方法中拉米夫定的定量下限相差无异，且标准曲线线性关系良好、方法学稳定性好，避免了质谱仪离子源易被污染导致灵敏度降低和 LC-MS/MS 法随行标准曲线带来的大工作量的问题。目前，该方法学正在进行临床样本验证阶段，对拉米夫定血药浓度与患者疾病严重程度、疗效及不良反应的相关性展开研究。

综上所述,该方法通过改进传统 HPLC 的样本前处理步骤以及采用二维液相色谱系统等措施,以达到降低系统误差、提高检测灵敏度及准确性等目的,确保检测过程及结果准确易用、稳定可靠,可为临床开展拉米夫定血药浓度监测、指导个体化给药以及实验室开展拉米夫定药动学研究提供一种稳定可靠的方法学基础,具有较好的推广价值。

(本研究获合肥市第六周期医学重点学科建设项目资助,在此表示感谢!)

参考文献

- [1] Johnson MA, Moore KH, Yuen GJ, et al. Clinical pharmacokinetics of lamivudine[J]. Clin Pharmacokinet, 1999, 36 (1) : 41-46.
- [2] Abhyankar D, Shedage A, Gole M, et al. Pharmacokinetics of fixed-dose combination of tenofovir disoproxil fumarate, lamivudine, and efavirenz: results of a randomized, crossover, bioequivalence study[J]. Int J Std Aids, 2017, 28 (5) : 491-498.
- [3] 刘秀荣, 邓丽宁, 侯宏波. 恩替卡韦联用阿德福韦酯治疗拉米夫定耐药的慢性乙型肝炎的系统评价[J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15 (1) : 43-47.
- [4] 邹尚荣, 李燕青, 周波, 等. HPLC 法同时测定人血浆中拉米夫定、齐多夫定和奈韦拉平的浓度[J]. 中国药房, 2014, 25 (18) : 1665-1668.
- [5] 谢栋, 吴蔚, 刘智, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中拉米夫定浓度及其生物等效性研究[J]. 中南药学, 2013, 11 (3) : 187-191.
- [6] Archary M, Mellleron H, Bobat R, et al. Population pharmacokinetics of abacavir and lamivudine in severely malnourished HIV-infected children in relation to treatment outcomes[J]. Br J Clin Pharmacol, 2019, 85 (9) : 2066-2075.
- [7] Diaco ND, Strickler C, Giezendanner S, et al. Systematic De-escalation of Successful Triple Antiretroviral Therapy to Dual Therapy with Dolutegravir plus Emtricitabine or Lamivudine in Swiss HIV-positive Persons[J]. EclinicalMedicine, 2018, 6: 21-25.
- [8] 于延锋. 恩替卡韦治疗拉米夫定耐药慢性乙型病毒性肝炎患者的临床效果[J]. 中国药物经济学, 2018, 12: 87-89.
- [9] 余史丹, 邬声远, 蓝丽爱, 等. LC-MS/MS 法研究替诺福韦、拉米夫定和依非韦伦在 SD 大鼠体内的组织分布[J]. 中南药学, 2018, 16 (5) : 581-589.
- [10] 朱旭, 孙亚欣, 邱枫, 等. RP-HPLC 法测定人血浆中拉米夫定的浓度[J]. 广东药学院学报, 2013, 29 (5) : 494-496.