

癫痫患儿血浆中拉莫三嗪、左乙拉西坦和吡仑帕奈浓度测定方法的建立及应用^Δ

宋文琳^{1*}, 周莹¹, 陈浩然², 林子越³, 李岩⁴, 刘杰⁵, 金太伟¹, 周旭强^{6#}(1. 苏州市吴江区儿童医院药剂科, 江苏苏州 215200; 2. 苏州市吴江区儿童医院综合办公室, 江苏苏州 215200; 3. 苏州大学药学院, 江苏苏州 215100; 4. 苏州大学附属儿童医院神经内科, 江苏苏州 215008; 5. 浙江中医药大学附属第二医院生殖科, 杭州 310005; 6. 苏州市吴江区儿童医院检验科, 江苏苏州 215200)

中图分类号 R969;R971+6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)10-1313-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.10.13



摘要 目的 建立同时测定癫痫患儿血浆中拉莫三嗪(LTG)、左乙拉西坦(LEV)和吡仑帕奈(PER)浓度的方法并应用于临床。方法 血浆样品经乙腈沉淀蛋白后,以PER-D₅为内标,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法检测。色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈,流动相为含0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,柱温为40 °C,进样量为5 μL,分析时间为5 min;采用电喷雾离子源,以多反应监测方式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为m/z 255.9→144.9(LTG)、m/z 171.1→126.1(LEV)、m/z 350.1→219.0(PER)、m/z 354.9→220.2(内标)。采用上述UPLC-MS/MS法测定14例联合用药癫痫患儿血浆中上述药物的稳态谷浓度。结果 LTG、LEV、PER检测质量浓度的线性范围分别为0.15~24 μg/mL ($R^2>0.993$)、0.312 5~50 μg/mL ($R^2>0.997$)、6.25~1 000 ng/mL ($R^2>0.995$),定量下限分别为0.15 μg/mL、0.312 5 μg/mL、6.25 ng/mL;3种药物日内、日间精密度的RSD均不高于9.83%,准确度(相对误差)为-9.33%~13.72%($n=6$ 或 $n=18$);平均提取回收率为86.4%~97.9%,平均基质效应为86.9%~110.0%($n=6$);稳定性试验的相对误差绝对值均低于15%。14例患儿体内LTG、LEV、PER的稳态谷浓度分别为(5.64±4.03) μg/mL、(10.67±8.78) μg/mL、(450.20±251.27) ng/mL,谷浓度达标率分别为71.4%、37.5%、84.6%。结论 所建UPLC-MS/MS法专属性强、检测速度快,可用于联合用药癫痫患儿的血药浓度监测。

关键词 拉莫三嗪;左乙拉西坦;吡仑帕奈;癫痫患儿;治疗药物监测;超高效液相色谱-串联质谱法

Establishment and application of the method for plasma concentration determination of lamotrigine, levetiracetam and perampanel in children with epilepsy

SONG Wenlin¹, ZHOU Ying¹, CHEN Haoran², LIN Ziyue³, LI Yan⁴, LIU Jie⁵, JIN Taiwei¹, ZHOU Xuqiang⁶
(1. Dept. of Pharmacy, Children's Hospital of Suzhou Wujiang District, Jiangsu Suzhou 215200, China; 2. General Office, Children's Hospital of Suzhou Wujiang District, Jiangsu Suzhou 215200, China; 3. School of Pharmacy, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215100, China; 4. Dept. of Neurology, Children's Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215008, China; 5. Dept. of Reproductive Medicine, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China; 6. Dept. of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Suzhou Wujiang District, Jiangsu Suzhou 215200, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish a method for simultaneous determination of plasma concentration of lamotrigine(LTG), levetiracetam(LEV) and perampanel(PER) in children with epilepsy and apply this method in clinical practice. **METHODS** Plasma proteins were precipitated with acetonitrile. Using PER-D₅ as internal standard, ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was adopted. The determination was performed on ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid with 5 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 40 °C, and sample size was 5 μL. The analysis time was 5 min. The electrospray ionization source and multiple reaction monitoring mode were used for positive ion scanning. The ion pairs used for quantitative analysis of LTG, LEV, PER and internal standard were m/z 255.9→144.9, m/z 171.1→126.1, m/z 350.1→219.0 and m/z 354.9→220.2, respectively. The steady-state trough concentrations of the aforementioned drugs in the plasma of 14 pediatric epilepsy patients receiving combination therapy were determined using the same UPLC-MS/MS method as above.

^Δ 基金项目 江苏省药学会-恒瑞医院药学基金项目(No. H202309);江苏省药学会-天晴医院药学科研项目(No.T202513)

* 第一作者 主管药师。研究方向:小儿用药。E-mail: 1193086737@qq.com

通信作者 主管技师。研究方向:医学检验新技术。E-mail: 747758795@qq.com

RESULTS The linear ranges of LTG, LEV and PER were 0.15-24 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2>0.993$), 0.312 5-50 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2>0.997$) and 6.25-1 000 ng/mL ($R^2>0.997$), respectively. The lower limits of quantification were 0.15 $\mu\text{g/mL}$, 0.312 5 $\mu\text{g/mL}$ and 6.25 ng/mL , respectively. RSDs of intraday and interday precision tests of the three drugs were no more than 9.83%, and the accuracies (relative errors) were between -9.33% and 13.72% ($n=6$ or $n=18$); the average extraction recovery rates were 86.4%-97.9%, and the average matrix effects were 86.9%-110.0% ($n=6$). The absolute values of the relative errors in the stability tests were all below 15%. The steady-state trough concentrations of LTG, LEV and PER were $(5.64 \pm 4.03)\mu\text{g/mL}$, $(10.67 \pm 8.78)\mu\text{g/mL}$ and $(450.20 \pm 251.27)\text{ng/mL}$, respectively; the rates of achieving target trough concentrations were 71.4%, 37.5% and 84.6%, respectively.

CONCLUSIONS The established UPLC-MS/MS method is specific, rapid and suitable for the plasma concentration monitoring in epileptic children receiving combination therapy.

KEYWORDS lamotrigine; levetiracetam; perampanel; epilepsy; children; therapeutic drug monitoring; UPLC-MS/MS method

癫痫是一类由于脑部神经元异常放电引起的反复发作的慢性脑病,以儿童和老年人为主要发病人群。我国癫痫患者约有900万例,其中儿童占70%~80%^[1-2]。临床实践显示,50%的癫痫患者首次单用一种抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)难以控制其病情发作,故中华医学会神经病学分会相关指南推荐在首种AEDs治疗失败后,临床需立即考虑合理的多药联合治疗^[3]。吡仑帕奈(perampanel, PER)是一种高选择性、非竞争性 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸型谷氨酸受体拮抗剂,可用于 ≥ 4 岁儿童及成人伴或不伴继发全面发作的部分性发作癫痫的治疗^[4]。PER作用机制独特,在难治性癫痫治疗中常作为添加药物与其他AEDs联合使用^[5]。在针对儿童患者的治疗方案中,常见的联用方案包括PER联合左乙拉西坦(levetiracetam, LEV)、拉莫三嗪(lamotrigine, LTG)等。研究指出,12岁以下儿童对LEV的清除率高于成人,其血药浓度也可能异于成人,因此当儿童患者联合使用LEV时,临床应密切关注LEV血药浓度以保障疗效及安全性^[6-7];LTG因可能引发危及生命的皮疹、多器官超敏反应等严重不良反应,与PER联用时可竞争性结合血浆蛋白而导致血药浓度升高,加之LTG在小于7岁儿童体内的血药浓度与给药剂量无关^[8],故临床应对儿童患者体内LTG的血药浓度进行实时监测。

多药联合监测可提高临床检测效率、减少样本采集量,特别是对于采血困难的儿童患者,开发能同时检测多种常用AEDs血药浓度的方法具有一定的临床意义。目前,血药浓度的检测方法主要有均相酶免疫法、荧光免疫法、化学发光免疫法、液相色谱法和超高效液相色谱-串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法等。其中,免疫法依靠抗体与药物的特异性结合,通过荧光、化学发光信号定量,待测物易受结构类似物干扰而导致检测结果呈假阳性,加之多数试剂盒每次只能用于检测1种待测物,故在联合用药患者血药浓度监测中的应用受限;液相色谱固定相种类多、流动相选择范围广,具有较好的选择性和重复性,但检测结果易受内源性物质干扰;UPLC-MS/MS法同时具备液相色谱的高分离度和质

谱的高灵敏度、高特异性,能区分待测物与其代谢物、结构类似物,无交叉反应,且单次进样可同时检测多种待测物,是联合用药患者血药浓度监测的理想选择^[9-10]。基于此,本研究拟建立一种同时测定癫痫患儿血浆中PER、LTG和LEV质量浓度的UPLC-MS/MS法,并将其应用于临床,以期为癫痫患儿的个体化精准用药提供技术支持。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括UPLC-Xevo TQ-S型超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪(美国Waters公司)、Milli-Q Advantage型超纯水仪(美国Millipore公司)、AB-204-N型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)、995型超低温冰箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Vortex Genie 2型涡旋振荡仪(美国Scientific Industries公司)、Allegra 64R型高速低温离心机(美国Beckman公司)等。

1.2 主要药品与试剂

PER对照品(批号P126771,纯度98%)、LEV对照品(批号B1528010,纯度99%)、LTG对照品(批号H2217428,纯度98%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;吡仑帕奈- D_5 (PER- D_5)对照品(内标,批号C20221028,纯度100%)购自加拿大TRC公司;甲酸、乙腈、甲醇均为色谱纯,水为实验室自制超纯水。

1.3 空白血浆

人空白血浆由苏州市吴江区儿童医院血库提供。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

以ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)为色谱柱,以含0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液为流动相A(水相)、乙腈为流动相B(有机相)进行梯度洗脱(0~1 min, 5%B; 1~3.5 min, 5%B \rightarrow 95%B; 3.5~4.5 min, 95%B; 4.5~4.6 min, 95%B \rightarrow 5%B; 4.6~5 min, 5%B);流速为0.3 mL/min;柱温为40 $^{\circ}\text{C}$;进样量为5 μL ;分析时间为5 min。

采用电喷雾离子源,以多反应监测(multiple reac-

tion monitoring, MRM)方式进行正离子扫描;离子源温度为500 °C;喷雾电压为3 kV;喷雾器压力为7 bar(1 bar=100 kPa);鞘气流速为150 L/h;干燥气体流速为1 000 L/h。3种AEDs及内标的质谱参数见表1。

表1 3种AEDs及内标的质谱参数

待测物	保留时间/min	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔能量/eV	碰撞能量/eV
LTG	3.03	255.9	144.9	36	32
LEV	2.73	171.1	126.1	22	12
PER	4.21	350.1	219.0	76	30
内标	4.19	354.9	220.2	130	47

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液和血浆标准曲线、质控样品溶液

精密称取LTG、LEV、PER对照品10.70、11.01、4.53 mg,用乙腈溶解并定容,分别制成质量浓度约为1 mg/mL的单一对照品储备液。分别吸取上述单一对照品储备液240、500、10 μ L至同一容量瓶中,混匀并用稀释剂(乙腈与水按体积比1:1混合,下同)250 μ L稀释;取上述混合溶液,用稀释剂稀释,分别制成LTG质量浓度分别为240、120、60、30、15、3、1.5 μ g/mL,LEV质量浓度分别为500、250、125、62.5、31.25、6.25、3.125 μ g/mL,PER质量浓度分别为10 000、5 000、2 500、1 250、625、125、62.5 ng/mL的系列工作液。参考上述方法,配制LTG高、中、低质量浓度(200、50、3.75 μ g/mL),LEV高、中、低质量浓度(400、100、7.5 μ g/mL),PER高、中、低质量浓度(8 000、2 000、150 ng/mL)的质控工作液。以上溶液均于-80 °C下保存,备用。

精密吸取上述系列工作液20 μ L,加入空白血浆180 μ L,以1 000 r/min涡旋混匀1 min,制成LTG质量浓度分别为24、12、6、3、1.5、0.3、0.15 μ g/mL,LEV质量浓度分别为50、25、12.5、6.25、3.125、0.625、0.312 5 μ g/mL,PER质量浓度分别为1 000、500、250、125、62.5、12.5、6.25 ng/mL的血浆标准曲线样品溶液。精密吸取上述质控工作液,同法配制LTG高、中、低质量浓度(20、5、0.375 μ g/mL),LEV高、中、低质量浓度(40、10、0.75 μ g/mL),PER高、中、低质量浓度(800、200、15 ng/mL)的血浆质控样品溶液。以上溶液均于-80 °C下保存,备用。

2.2.2 内标储备液

精密称取PER-D₅对照品1.02 mg,加入乙腈1.02 mL,制成质量浓度为1 mg/mL的内标储备液,备用。

2.3 血浆样品处理

精密吸取血浆样品100 μ L,加入蛋白沉淀剂(经乙腈稀释的内标储备液,PER-D₅的最终质量浓度为5 ng/mL)600 μ L,以1 000 r/min涡旋混匀2 min,再于4 °C下以18 000 r/min离心5 min;精密吸取上清液100 μ L,加入稀释剂900 μ L,涡旋混匀1 min,取5 μ L进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性

取不同来源的人空白血浆样品、中质量浓度血浆质控样品、某联合用药(LEV+PER)患儿血浆样品,按“2.3”项下方法处理(空白血浆样品不加内标)后,再按“2.1”项下条件进样分析,记录色谱图。结果(图1,空白血浆样品略)显示,空白血浆中的内源性物质不会对LTG、LEV、PER和内标的检测产生干扰,方法专属性良好。

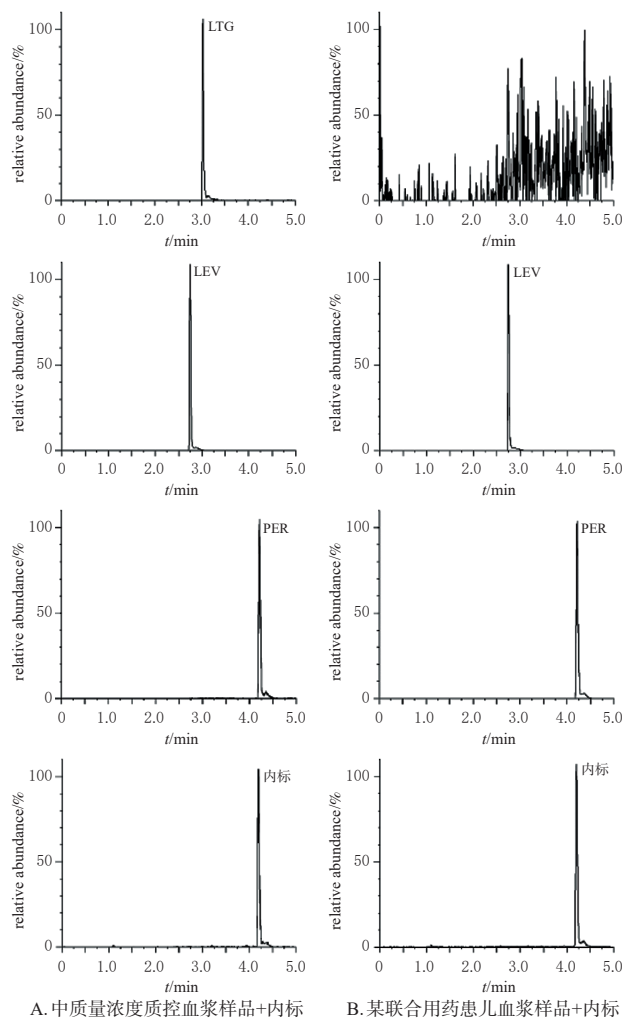


图1 3种AEDs及内标的典型MRM图

2.4.2 标准曲线绘制与定量下限考察

取“2.2.1”项下各血浆标准曲线样品溶液,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样分析,记录色谱图。分别以LTG、LEV、PER质量浓度为横坐标(x)、其峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(y),使用加权最小二乘法(加权系数 $1/x^2$)进行线性回归,得3种AEDs的回归方程,具体结果见表2。

2.4.3 精密度和准确度试验

按“2.2.1”项下方法分别配制LTG、LEV、PER定量下限质量浓度血浆样品及低、中、高质量浓度血浆质控样品,平行6份,按“2.3”项下方法处理后再按“2.1”项下

表2 3种AEDs定量分析的回归方程、线性范围及定量下限

待测物	回归方程	R ²	线性范围	定量下限
LTG	y=119.664x+2.336.25	0.993.87	0.15~24 μg/mL	0.15 μg/mL
LEV	y=47.802.3x-1.835.24	0.997.64	0.312.5~50 μg/mL	0.312.5 μg/mL
PER	y=0.562.9x-0.007.5	0.995.19	6.25~1.000 ng/mL	6.25 ng/mL

条件进样分析,考察日内精密性(以RSD表示)和准确度[以实测质量浓度与理论浓度的相对误差(relative error, RE)表示];连续测定3 d,考察日间精密性和准确度。结果(表3)显示,日内、日间精密性试验的RSD均不高于9.83%,准确度试验的RE为-9.33%~13.72%(n=6或18),表明方法精密性与准确度良好。

表3 3种AEDs定量分析的精密性和准确度试验结果

待测物	理论质量浓度	日内(n=6)			日间(n=18)		
		实测质量浓度	RSD/%	RE/%	实测质量浓度	RSD/%	RE/%
LTG	0.15 μg/mL	(0.14±0.01) μg/mL	7.14	-6.67	(0.15±0.01) μg/mL	6.67	0
	0.375 μg/mL	(0.38±0.02) μg/mL	5.26	1.33	(0.38±0.02) μg/mL	5.26	1.33
	5 μg/mL	(5.52±0.20) μg/mL	3.62	10.40	(5.40±0.19) μg/mL	3.52	8.00
	20 μg/mL	(22.63±0.78) μg/mL	3.45	13.15	(21.63±1.03) μg/mL	4.76	8.15
LEV	0.312.5 μg/mL	(0.34±0.01) μg/mL	2.94	8.80	(0.35±0.03) μg/mL	8.57	12.00
	0.75 μg/mL	(0.74±0.04) μg/mL	5.41	-1.33	(0.73±0.04) μg/mL	5.48	-2.67
	10 μg/mL	(10.74±0.41) μg/mL	3.82	7.40	(10.20±0.66) μg/mL	6.47	2.00
	40 μg/mL	(47.76±4.41) μg/mL	9.83	12.10	(44.53±3.96) μg/mL	8.89	11.33
PER	6.25 ng/mL	(6.03±0.33) ng/mL	5.47	-3.52	(6.23±0.50) ng/mL	8.03	-0.32
	15 ng/mL	(13.60±0.65) ng/mL	4.78	-9.33	(13.63±0.80) ng/mL	5.87	-9.13
	200 ng/mL	(215.12±13.90) ng/mL	6.46	7.56	(212.76±11.79) ng/mL	5.54	6.38
	800 ng/mL	(909.78±27.78) ng/mL	3.05	13.72	(876.02±52.05) ng/mL	5.94	9.50

2.4.4 提取回收率及基质效应试验

按“2.2.1”项下方法配制LTG、LEV、PER低、高质量浓度的血浆质控样品,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样测定,记录各待测物与内标的峰面积比值(A)。取6份不同来源的空白血浆,按“2.3”项下方法处理后,再加入LTG、LEV、PER相应质量浓度的对照品溶液(最终质量浓度与上述质控样品一致),按“2.1”项下条件进样测定,记录各待测物与内标的峰面积比值(B)。以稀释剂配制相应质量浓度的待测物溶液(最终质量浓度与上述质控样品一致),按“2.1”项下条件进样测定,记录各待测物与内标的峰面积比值(C)。每质量浓度平行6份,以A/B×100%计算提取回收率,以B/C×100%计算基质效应。结果(表4)显示,3种AEDs的平均提取回收率为86.4%~97.9%,平均基质效应为86.9%~110.0%(n=6)。

表4 3种AEDs定量分析的提取回收率、基质效应、稳定性试验结果(n=6)

待测物	理论质量浓度	提取回收率/%	基质效应/%	稳定性(RE)/%			
				室温放置6 h	4℃放置24 h	3次冻融	-80℃放置30 d
LTG	0.375 μg/mL	88.4±5.9	109.7±4.7	-9.5	-14.8	14.2	14.9
	20 μg/mL	96.8±12.5	106.6±13.3	11.4	9.4	13.1	10.3
LEV	0.75 μg/mL	87.7±6.2	110.0±6.8	-2.7	-9.6	11.7	5.2
	40 μg/mL	97.9±12.4	104.6±12.9	7.6	5.8	11.5	9.2
PER	15 ng/mL	86.4±5.0	86.9±3.6	-5.8	-4.1	12.5	11.8
	800 ng/mL	97.0±15.4	94.4±11.1	14.4	10.5	14.3	13.7

2.4.5 稳定性考察

按“2.2.1”项下方法配制LTG、LEV、PER低、高质量浓度的血浆质控样品溶液,每质量浓度平行6份,分别考察其在室温下放置6 h、4℃下放置24 h、冻融(-80℃~室温)3次、在-80℃下放置30 d的稳定性(以RE表示)。结果(表4)显示,在上述条件下,3种AEDs的RE绝对值均低于15%,提示各质控样品在上述条件下稳定性良好。

2.5 临床应用

以2024年11月-2025年7月在苏州市吴江区儿童医院神经内科门诊就诊的14例联合用药癫痫患儿为对象。待其血药浓度达稳态后,于下次服药前0.5 h采集静脉血2 mL,经抗凝处理后分离血浆。取患儿血浆样品适量,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”项下条件进样分析,记录峰面积并代入随行回归方程计算3种AEDs的血浆谷浓度。本研究方案经该院医学伦理委员会批准(编号2024027、2024027-1),且所有采血操作均获得患儿家属同意。各患儿的基本信息及AEDs血药浓度检测结果见表5。

表5 14例癫痫患儿的基本情况及AEDs血药浓度检测结果

序号	性别	年龄	体重/kg	用药方案	LTG/(μg/mL)	LEV/(μg/mL)	PER/(ng/mL)
1	女	8岁5个月	37	PER 2 mg,每晚1次+LTG 25 mg,每天2次	1.618		112.345
2	女	8岁10个月	38	PER 2 mg,每晚1次+LEV 500 mg,每天2次		3.981	161.626
3	男	8岁7个月	30	LTG 150 mg,每天2次+PER 6 mg,每周1次	6.145		217.947
4	女	15岁3个月	50	LTG 50 mg,每天2次+PER 8 mg,每晚1次	8.497		233.296
5	男	11岁5个月	45	PER 12 mg,每晚1次+LEV 500 mg,每天2次		29.359	433.150
6	男	9岁4个月	38	PER 4 mg,每晚1次+LEV 625 mg,每天2次		16.351	446.177
7	女	6岁9个月	40	PER 4 mg,每晚1次+LTG 50 mg,每天2次	2.687		521.288
8	女	10岁11个月	30	LEV 500 mg,每天2次+PER 12 mg,每晚1次		3.745	561.819
9	男	9岁9个月	39	PER 12 mg,每晚1次+LEV 100 mg,每天2次		12.898	563.918
10	男	14岁9个月	73	PER 4 mg,每晚1次+LTG 100 mg,每天2次	13.153		618.866
11	女	7岁4个月	42	LEV 200 mg,每天2次+PER 8 mg,每晚1次		7.198	748.179
12	男	14岁3个月	72	PER 4 mg,每晚1次+LEV 200 mg,每天2次		7.237	974.500
13	男	11岁1个月	28	LTG 50 mg,每天1次+PER 12 mg,每晚1次	3.554		259.487
14	男	12岁1个月	42	LTG 150 mg,每天2次+LEV 750 mg,每天2次	3.812	4.581	

由表5可知,14例患儿LTG、LEV、PER的稳态谷浓度分别为(5.64±4.03) μg/mL、(10.67±8.78) μg/mL、(450.20±251.27) ng/mL。研究指出,LTG、LEV、PER的治疗浓度参考范围分别为3~15 μg/mL、10~40 μg/mL、180~980 ng/mL^[11],参考以上范围计算谷浓度达标率,14例患儿上述3种AEDs的稳态谷浓度达标率分别为71.4%(5/7)、37.5%(3/8)、84.6%(11/13)。

3 讨论

3.1 检测方法及内标的选择

由于儿童个体差异较大、药物相互作用复杂,定期监测AEDs血药浓度对于提升疗效、预防不良反应具有重要的临床意义。UPLC-MS/MS法集液相色谱的高分离度和质谱的高灵敏度、高特异性于一体,能同时测定生物样品中的多种化合物的质量浓度,可极大缩短分析

时间、提高检测效率^[10]。稳定的同位素内标是UPLC-MS/MS定量分析的首选,不仅能消除仪器进样误差,而且能最大程度地降低基质效应的影响^[12]。出于经济成本考量和样品可及性,本研究选择PER-D₅作为内标。经方法学验证发现,采用单一内标即可满足3种AEDs同时检测的需求。

3.2 血浆样品前处理与色谱条件优化

高效的前处理方法可最大限度地缩短生物样品的周转时间。针对样品前处理,本研究选择了简单、快速的蛋白沉淀法,具有操作简便、成本较低的特点。本课题组前期在筛选蛋白沉淀剂时发现,当以含内标的甲醇作为沉淀剂时,PER色谱峰拖尾明显,LTG色谱峰较宽;而以含内标的乙腈作为沉淀剂时,LTG、LEV、PER色谱峰峰形对称,且提取回收率相对较高。另外,本课题组还发现,经蛋白沉淀处理后,所得上清液与流动相初始梯度的极性差异较大,若直接进样,3种AEDs的色谱峰较宽;若经稀释剂稀释后再进样分析,3种AEDs的色谱峰峰形得以明显改善,基质效应亦有所降低。

在流动相选择上,本课题组前期发现,当水相中含有甲酸时,待测物的色谱响应较强,故进一步对水相的酸碱量[甲酸(0.05%、0.1%、0.2%、0.1%)+乙酸铵(5 mmol/L)]进行筛选。结果显示,LTG和LEV在甲酸盐体系中的色谱响应较强,PER在不同酸碱体系中的色谱响应差异不大,故本研究最终确定水相为含0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液。经梯度洗脱条件优化后,本研究最终确定了“2.1”项下的检测条件。进一步的方法学考察结果显示,血浆内源性物质对待测物的检测无干扰,3种AEDs的线性范围均可覆盖文献报道的有效治疗浓度范围。

3.3 临床样品检测结果分析

本研究成功将所建UPLC-MS/MS法用于检测联合用药癫痫患儿的血药浓度。结果显示,纳入的14例患儿中,LTG、LEV、PER的稳态谷浓度达标率分别为71.4%、37.5%、84.6%。其中,LEV低于推荐治疗浓度参考范围下限的患者比例较高,与刘匡一等^[13]的研究结果相同。与单药治疗相比,联合用药所致药物相互作用可使血药浓度发生明显变化;同时,单药治疗时的有效浓度范围可能并不适用于联合用药者。这提示,对于存在明显药物相互作用的联合用药方案,临床应加强治疗药物监测,结合联合用药情况、患儿病情综合评估并调整目标治疗浓度范围,以保障用药安全、有效。

综上所述,本研究建立了一种可同时检测LTG、LEV和PER血药浓度的UPLC-MS/MS方法,该方法专属性强、检测速度快,可用于联合用药癫痫患儿的血药浓度监测。

参考文献

- [1] 中国抗癫痫协会. 临床诊疗指南:癫痫病分册:2023修订版[M]. 北京:人民卫生出版社,2023:6-15.
- [2] SUN T Q, YU T F, LIU P C. Global, regional, and national burden of epilepsy, 1990-2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study in 2021[J]. *Cost Eff Resour Alloc*, 2025, 23(1):28.
- [3] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑电图与癫痫学组. 抗癫痫发作药物联合使用中国专家共识[J]. *中华神经科杂志*, 2024, 57(2):108-117.
- [4] LAVU A, ABOULATTA L, ABOU-SETTA A M, et al. Efficacy and safety of perampamil in epilepsy: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *Seizure Eur J Epilepsy*, 2022, 102:54-60.
- [5] WU C M, WU H T, ZHOU Y Y, et al. Effectiveness analysis of three-drug combination therapies for refractory focal epilepsy[J]. *Neurotherapeutics*, 2024, 21(3):e00345.
- [6] DE OLIVEIRA PEREIRA A R, LEÃO I A, DIAS L A, et al. Levetiracetam for myoclonic seizures in idiopathic generalized epilepsy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Epilepsy Behav*, 2025, 171:110512.
- [7] SHI M, LIU C X, HE L E, et al. Therapeutic drug monitoring and the therapeutic reference range of levetiracetam for Chinese patients: problems and issues[J]. *Seizure Eur J Epilepsy*, 2023, 109:26-33.
- [8] 中国药师协会药学服务创新工作委员会. 抗癫痫药物拉莫三嗪个体化药学服务专家共识[J]. *医药导报*, 2025, 44(9):1367-1378.
- [9] 马英华, 赵宜乐, 姜锡娟, 等. 同位素稀释-HPLC-ESI-MS/MS法同时测定癫痫患儿血浆中左乙拉西坦、奥卡西平活性代谢物和拉莫三嗪的药物浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(16):1647-1652.
- [10] JIANG R Q, ZHANG D J, ZHAO Z G, et al. Simultaneous determination of 24 antiepileptic drugs and their active metabolites in human plasma by UHPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 232:115437.
- [11] HIEMKE C, BERGEMANN N, CLEMENT H, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: update 2017[J]. *Pharmacopsychiatry*, 2018, 51(1/2):e1.
- [12] 秦怡, 张瑞霞, 吕雅瑶, 等. 3种常用碳青霉烯类抗生素血药浓度UPLC-MS/MS检测方法的建立[J]. *中国药房*, 2024, 35(3):343-347.
- [13] 刘匡一, 虞佳, 熊国营, 等. UHPLC-MS/MS测定人血浆中4种一线抗癫痫药物浓度及其临床应用[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(17):2236-2240.

(收稿日期:2025-11-17 修回日期:2026-03-24)

(编辑:张元媛)