

· 研究报告 ·

## 液相色谱-串联质谱法测定全脑缺血损伤模型大鼠体内拉莫三嗪血药浓度及药动学研究

钱庆庆, 季闽春, 孙光春 (复旦大学附属上海市第五人民医院药剂科, 上海 200240)

**[摘要]** **目的** 建立液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定大鼠血浆样品中拉莫三嗪浓度的方法,并进行药动学研究。**方法** 取12只SD大鼠,假手术组、脑缺血损伤模型组各6只,拉莫三嗪10 mg/kg灌胃,分别于5 min、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36 h眼眶隐静脉丛取血,采用LC-MS/MS法测定其血药浓度,并用DAS软件计算药动学参数。**结果** 拉莫三嗪的药动学参数属于一级动力学两房室模型,拉莫三嗪在假手术大鼠体内的药动学参数  $c_{max}$  (1382.87±61.17)  $\mu\text{g/L}$ ,  $t_{1/2}$  (40.43±6.77) h,  $AUC_{0-\infty}$  (123.45±70.70)  $\text{mg}\cdot\text{h/L}$ 。全脑缺血损伤模型大鼠中药动学参数  $c_{max}$  (1713.50±65.11)  $\mu\text{g/L}$ ,  $t_{1/2}$  (73.72±17.46) h,  $AUC_{0-\infty}$  (188.15±76.37)  $\text{mg}\cdot\text{h/L}$ 。**结论** 本方法适用于大鼠血浆中拉莫三嗪浓度的测定。假手术组和模型组大鼠拉莫三嗪灌胃后均于2 h达到峰值,但模型组拉莫三嗪的  $t_{1/2}$  较长,血药浓度较高,可为后期药效学研究提供依据。

**[关键词]** 拉莫三嗪;液相色谱-串联质谱法;大鼠血浆;药动学

**[中图分类号]** R969.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)05-0443-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.013

## Study on plasma concentration and pharmacokinetics of lamotrigine in cerebral ischemia model rats by LC-MS/MS

QIAN Qingqing, JI Minchun, SUN Guangchun (Department of Pharmacy, Fifth People's Hospital of Shanghai Affiliated to Fudan University, Shanghai 200240, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a sensitive method for determination of concentration of lamotrigine (LTG) in rat plasma and to study the pharmacokinetics by LC-MS/MS. **Methods** 12 rats were divided evenly into model group and sham-operated group. LTG was given as single dose of 10 mg/kg *via* intragastrical administration. Blood samples were collected from orbital saphenous venous plexus at 5 min, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 36 h after dosing. The LTG concentrations in rat plasma were assayed by LC-MS/MS. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS software. **Results** In sham-operated group,  $c_{max}$  (1382.87±61.17)  $\mu\text{g/L}$ ,  $t_{1/2}$  (40.43±6.77) h;  $AUC_{0-\infty}$  (123.45±70.70)  $\text{mg}\cdot\text{h/L}$ . In model group,  $c_{max}$  (1713.50±65.11)  $\mu\text{g/L}$ ,  $t_{1/2}$  (73.72±17.46) h,  $AUC_{0-\infty}$  (188.15±76.37)  $\text{mg}\cdot\text{h/L}$ . **Conclusion** The method is proved to be suitable for the determination of LTG in rat plasma. LTG concentration reached peak value at 2 h in both groups. However, model group had a longer  $t_{1/2}$  and higher concentration than that in sham-operated group, which is a valuable information for further pharmacodynamics study.

**[Key words]** lamotrigine(LTG);LC-MS/MS;rat plasma;pharmacokinetic

缺血性脑损伤具有高发病率和致残率,对人类健康危害极大,而脑缺血后的认知功能障碍(包括学习记忆能力损伤)是引起老年性痴呆的重要原因之一,给家庭和社会带来沉重的负担。由于脑缺血和癫痫的神经损伤机制有一定的相似性,与钠通道

的激活以及细胞内钙超载有关<sup>[1]</sup>。抗癫痫药作为脑缺血时的一种可能的神经保护策略正受到越来越多的关注,而新型抗癫痫药拉莫三嗪(lamotrigine, LTG)就是其中之一。

许多动物实验研究发现,LTG可减轻脑缺血时的组织损伤和神经功能缺损。Yi等<sup>[2]</sup>报道LTG对新生大鼠的缺血性脑损伤有改善作用,可减轻脑水肿、减少齿状回及皮层的细胞死亡。LTG对全脑缺血沙土鼠亦有神经保护作用,可减轻海马区锥体细胞损伤,并有行为学改善作用<sup>[3,4]</sup>。LTG抗缺血性脑损伤作用机制主要包括:Na<sup>+</sup>通道阻滞作用,稳

**[基金项目]** 上海市卫计委青年科研项目(20114Y018)

**[作者简介]** 钱庆庆,学士,主管药师,研究方向:脑卒中相关药物的体内分布及药动学研究, Tel: 13167137980, Email: qingqing\_qian1100@163.com

**[通讯作者]** 孙光春,主任药师,硕士生导师, Tel: (021)24289007, Email: SGC\_hospital@yeah.net

定神经元突触前膜而抑制兴奋性氨基酸递质的释放;抑制电压敏感性  $\text{Ca}^{2+}$  通道,减少突触前膜  $\text{Ca}^{2+}$  内流而抑制突触传递<sup>[5]</sup>;抑制兴奋性神经传递<sup>[5,6]</sup> 等等。

目前对于 LTG 的药动学研究比较明确,主要是采用 HPLC 法进行研究,方法有所不同。Walker<sup>[7]</sup>采用 HPLC 对大鼠体内血清、脑脊液脑细胞外液中 LTG 的药动学进行了对比;Lee 等<sup>[8]</sup>报道采用液质联合的方法,对口服 LTG 后人体内血药浓度进行测定等等。

但是在全脑缺血损伤的情况下,LTG 的药动学研究还未见报道。大鼠永久性双侧颈总动脉结扎可造成全脑低灌注脑缺血损伤模型,因此,在本研究中笔者拟构建大鼠短暂性全脑缺血脑损伤模型,以假手术大鼠为对照,研究 LTG 在脑缺血状态下的药动学行为,研究成果将为 LTG 在临床上用于缺血性脑损伤及其认知功能障碍的治疗提供新的实验基础,具有一定的社会及经济效益。

## 1 仪器和试剂

### 1.1 仪器

6470 型串联质谱(LC-MS/MS),1290 液相色谱系统(Agilent 公司);METTLER AE240 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);涡旋仪;超声仪;离心机。

### 1.2 试剂

LTG 片(50 mg/片)购自葛兰素史克,LTG 标准品(纯度 $\geq 98\%$ )、褪黑素(内标,纯度 $\geq 98\%$ )均购自 Sigma 公司。

甲酸(500 ml,ROE SCIENTIFIC INC),甲醇、乙腈(色谱纯,默克公司),水为超纯去离子水。

### 1.3 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠,鼠龄 10 周,体重 250~300 g。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱及质谱条件

色谱柱为 XSelect HSS T<sub>3</sub> Column (2.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 100 mm);流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B);洗脱梯度:0~5 min,15%~95% B;5~5.1 min,95%~15% B;5.1~8 min,15% B;流速 0.4 ml/min;进样量 3  $\mu\text{l}$ ;柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

采用 ESI 离子源,正离子模式;毛细管电压 4 000 V;碰撞气温度 300  $^{\circ}\text{C}$ ;碰撞气流速 8 L/min;喷雾压力 40 psi;气流温度 300  $^{\circ}\text{C}$ ;鞘气流速

11 L/min。LTG 及内标质谱条件见表 1,质谱图见图 1。

表 1 LTG 与内标质谱参数

成分	母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	去簇电压 (V)	碰撞能量 (V)
LTG	256.0	109.0	147	65
内标	233.1	159.0	100	30

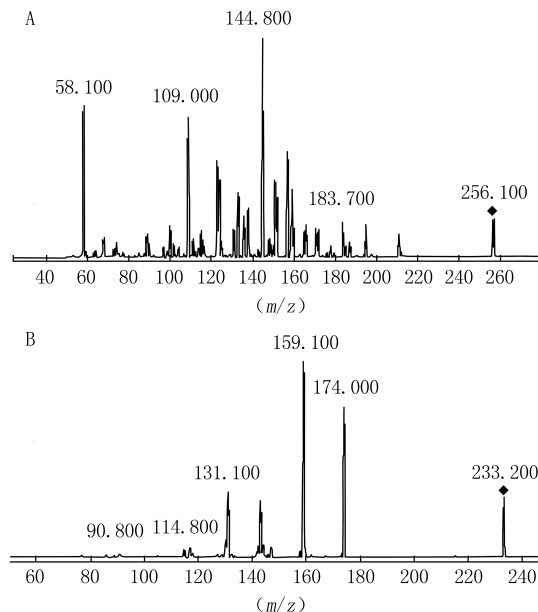


图 1 LTG 与内标褪黑素

A. LTG; B. 内标褪黑素

### 2.2 溶液的配制

#### 2.2.1 对照品溶液

精密称取 LTG 对照品 10 mg,置于 10 ml 容量瓶中,甲醇溶解并定容,配制成 1 mg/ml 的储备液。

#### 2.2.2 内标溶液

精密称取褪黑素对照品 10 mg,置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解定容,并稀释配制成 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的储备液。

### 2.3 血浆样品预处理

取血浆 100  $\mu\text{l}$ ,加入内标 20  $\mu\text{l}$ ,混合,加入甲醇 300  $\mu\text{l}$ ,涡旋震荡 1 min;13 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$ ,离心 10 min,取上清液进行 LC-MS/MS 分析。

### 2.4 专属性试验

取大鼠空白血浆 100  $\mu\text{l}$ ,分别按照“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下方法检测。测得空白血浆色谱图 2A;将 LTG 和内标溶液加入空白血浆,同法操作,测得色谱图 2B;取给药后收集的血浆样,见色谱图 2C。结果显示,LTG 和内标的保留时间分别为 1.78、2.34 min,且空白血浆中的内源性物质不干扰

测定,说明本方法具有较高的专属性。

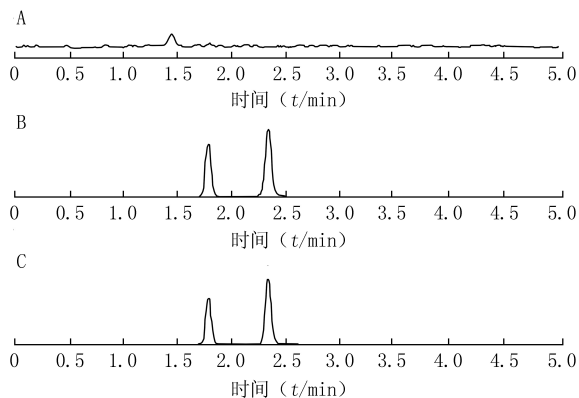


图2 专属性试验色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+LTG+内标;C.给药LTG后的血浆

### 2.5 标准曲线

取空白血浆 100  $\mu$ l,加入 LTG 标准曲线系列溶液 10  $\mu$ l,配成相当于 LTG 血浆浓度为 0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1 000 ng/ml 的样品,按照“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下方法检测,记录色谱图,以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法(1/X)进行回归运算,即得标准曲线: $Y=0.0026X+0.0107$ , $r=0.9997$ ;血浆中 LTG 定量限为 0.1 ng/ml。

### 2.6 精密度试验

取空白血浆 100  $\mu$ l,分别配制 LTG 低、中、高(3、30、100 ng/ml)3种浓度的样品,按照“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下方法检测,每个浓度进样6次,连续测定3d,计算精密度,结果见表2。

表2 LTG 精密度试验结果(n=6)

浓度 (mg/kg)	精密度(RSD,%)	
	日内	日间
3	9.65	11.01
30	7.38	6.60
100	3.59	4.74

### 2.7 回收率试验

取空白大鼠血浆溶液,分别配制成3种浓度的LTG标准品(3、30、100 ng/ml),以提取后所得浓度与未提取直接进样所得浓度之比考察样品的回收率,每个浓度平行进样3次。结果显示,LTG低、中、高3种浓度的回收率分别为84.81%、91.91%、93.19%。

### 2.8 样品测定与药动学研究

将大鼠随机分为假手术+LTG组(6例)和慢性脑缺血模型+LTG组(6例)。采用大鼠永久性

双侧颈总动脉结扎(two-vessel occlusion,2-VO)。大鼠术前12h禁食,4h禁水,1%戊巴比妥钠45 mg/kg腹腔注射麻醉,沿颈正中切开,分离出双侧颈总动脉,双重丝线结扎,缝合皮肤。假手术对照组大鼠只分离、不结扎颈总动脉,缝合皮肤。术后给予充足的食物与水,并注意保暖。于手术后1h口服给药,给药剂量10 mg/kg。分别在给药后的5 min,0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24和36h静脉采血0.5 ml,置于肝素化试管中,离心,分取血浆,于-80  $^{\circ}$ C保存待测。

按照“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下方法对LTG浓度进行检测。将得到的血药浓度-时间数据用DAS软件进行拟合,计算药动学参数。

大鼠给药LTG(10 mg/kg)后主要药动学参数见表3,血药浓度-时间曲线见图3。

表3 LTG 主要药动学参数( $\bar{x}\pm s$ ,n=6)

参数	假手术组	模型组
$c_{max}$ ( $\rho_B/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	1 382.87 $\pm$ 61.06	1 713.50 $\pm$ 65.11
$t_{max}$ (t/h)	2	2
$t_{1/2}$ (t/h)	40.43 $\pm$ 6.77	73.72 $\pm$ 17.46
AUC <sub>0-t</sub> (mg·h/L)	32.36 $\pm$ 0.54	36.50 $\pm$ 1.65
AUC <sub>0-∞</sub> (mg·h/L)	123.45 $\pm$ 70.69	188.15 $\pm$ 86.37
CL <sub>Z</sub> /F(L·kg/h)	0.11 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.04

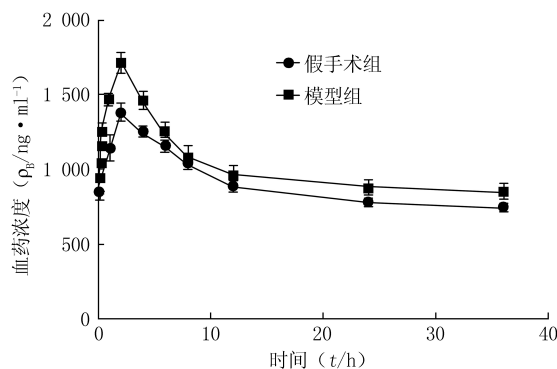


图3 大鼠给药LTG后的血药浓度-时间曲线

### 3 结论

本研究中,笔者采用大鼠短暂性全脑缺血脑损伤动物模型,研究LTG在脑缺血状态下的药动学行为。研究显示,LTG药动学属于一级动力学二房室模型,与文献[9]报道一致。本实验中,假手术组和模型组大鼠灌胃LTG均于2h达到峰值,与文献报道基本一致<sup>[3,4]</sup>,但模型组大鼠LTG的 $t_{1/2}$ 较长,血药浓度较高,研究结果将为LTG在临床上用于

(下转第460页)

- 2236.
- [11] LOPEZ-VALDES HE, CLARKSON AN, AO Y, *et al.* Memantine enhances recovery from stroke[J]. *Stroke*, 2014, 45(7): 2093-2100.
- [12] LIU C, LIN N, WU B, *et al.* Neuroprotective effect of memantine combined with topiramate in hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Brain Res*, 2009, 1282: 173-182.
- [13] CHEN B, WANG G, LI W, *et al.* Memantine attenuates cell apoptosis by suppressing the calpain-caspase-3 pathway in an experimental model of ischemic stroke[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 351(2): 163-172.
- [14] KUMAR A, SINGH A, EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management; an update[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(2): 195-203.
- [15] TROTMAN M, VERMEHREN P, GIBSON CL, *et al.* The dichotomy of memantine treatment for ischemic stroke: dose-dependent protective and detrimental effects[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(2): 230-239.
- [16] CHEN ZZ, YANG DD, ZHAO Z, *et al.* Memantine mediates neuroprotection via regulating neurovascular unit in a mouse model of focal cerebral ischemia[J]. *Life Sci*, 2016, 150: 8-14.
- [17] TAKAHASHI H, XIA P, CUI J, *et al.* Corrigendum: Pharmacologically targeted NMDA receptor antagonism by NitroMemantine for cerebrovascular disease[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 20750.
- [18] 郭叶群. 盐酸美金刚对大鼠脑中动脉闭塞后同侧丘脑继发损害的保护作用及其机制研究[D]. 广州:暨南大学, 2015.
- [19] WANG YC, SANCHEZ-MENDOZA EH, DOEPPNER TR, *et al.* Post-acute delivery of memantine promotes post-ischemic neurological recovery, peri-infarct tissue remodeling, and contralesional brain plasticity[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37(3): 980-993.
- [20] KAFI H, SALAMZADEH J, BELADIMOGHADAM N, *et al.* Study of the neuroprotective effects of memantine in patients with mild to moderate ischemic stroke[J]. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13(2): 591-598.
- [21] MOKHTARI M, NAYEB-AGHAEI H, KOUCHEK M, *et al.* Effect of memantine on serum levels of neuron-specific enolase and on the glasgow coma scale in patients with moderate traumatic brain injury[J]. *J Clin Pharmacol*, 2018, 58(1): 42-47.
- [22] BAKHSHAYESH B, HAJINORI M, SAADAT SMS, *et al.* Comparing the effect of memantine and placebo on clinical outcome of intracranial hemorrhage: a randomized double blind clinical trial[J]. 2015, 1(3):11-18.
- [23] ORGOGOZO JM, RIGAUD AS, STOFFLER A, *et al.* Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300)[J]. *Stroke*, 2002, 33(7): 1834-1839.
- [24] 邓娜. 美金刚治疗缺血性脑卒中后失语的疗效观察[D]. 重庆:重庆医科大学, 2015.
- [25] BERTHIER ML, GREEN C, LARA JP, *et al.* Memantine and constraint-induced aphasia therapy in chronic poststroke aphasia[J]. *Ann Neurol*, 2009, 65(5): 577-585.
- [26] BARBANCHO MA, BERTHIER ML, NAVAS-SANCHEZ P, *et al.* Bilateral brain reorganization with memantine and constraint-induced aphasia therapy in chronic post-stroke aphasia: an ERP study[J]. *Brain Lang*, 2015, 145-146: 1-10.
- [收稿日期] 2018-05-23 [修回日期] 2018-06-27  
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 445 页)

缺血性脑损伤及其认知功能障碍的治疗提供新的实验基础,具有一定的社会及经济效益。

## 【参考文献】

- [1] CALABRESI P, CUPINI LM, CENTONZE D, *et al.* Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53(6):693-702.
- [2] YI YH, GUO WC, SUN WW, *et al.* Neuroprotection of lamotrigine on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats: relations to administration time and doses[J]. *Biologics*, 2008, 2(2):339-344.
- [3] SHUAIB A, MAHMOOD RH, WISHART T, *et al.* Neuroprotective effects of lamotrigine in global ischemia in gerbils. A histological, *in vivo* microdialysis and behavioral study[J]. *Brain Res*, 1995, 702(1-2):199-206.
- [4] WIARD RP, DICKERSON MC, BEEK O, *et al.* Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 1995, 26(3): 466-472.
- [5] CALABRESI P, SINISCALCHI A, PISANI A, *et al.* A field potential analysis on the effects of lamotrigine, GP 47779, and felbamate in neocortical slices[J]. *Neurology*, 1996, 47(2): 557-562.
- [6] AHMAD S, FOWLER LJ, WHITTON PS, *et al.* Effects of combined lamotrigine and valproate on basal and stimulated extracellular amino acids and monoamines in the hippocampus of freely moving rats[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2005, 371(1):1-8.
- [7] WALKER MC, TONG X, PERRY H, *et al.* comparison of serum, cerebrospinal fluid and brain extracellular fluid pharmacokinetics of lamotrigine[J]. *Brit J Pharmacol*, 2000, 130(2):242-248.
- [8] LEE W, KIM JH, KIM HS, *et al.* Determination of lamotrigine in human serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Neurol Sci*, 2010, 31(6): 717-720.
- [9] 叶广仁,宋志彬,郑国俊,等. 中国成年人拉莫三嗪药代动力学及丙戊酸对其影响[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2007, 7(3):191-193.
- [收稿日期] 2017-08-30 [修回日期] 2018-09-03  
[本文编辑] 李睿旻