

LC-MS/MS 检测人血清中 20 种抗癫痫药物含量

LCMSMS-620

摘要：本文建立了一种使用岛津液相色谱质谱联用仪测定人血清中 20 种抗癫痫药物的定量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能。结果显示各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.9978，方法准确度偏差在 -5.3%~9.3% 之间，精密度 RSD 均小于 11.86%，可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

关键词：临床检测 LC-MS/MS 抗癫痫药物

癫痫病在我国又被称为“羊角风”，是一种慢性脑功能障碍综合征，多发病于儿童时期，发病后若不及时控制可留下脑损伤后遗症，影响智力发育。目前临床上常用的抗癫痫药物有丙戊酸钠、左乙拉西坦、奥卡西平等，这些药物大多治疗窗较窄，个体差异较大，不同的癫痫病患者对各种抗癫痫药物的敏感度不同，为了有效控制和治疗癫痫病情，减少毒副作用，神经精神药理学与药物精神病学协会 (AGNP) 的专家强烈推荐在抗癫痫药使用过程中开展血药浓度监测，这样可以帮助医生制订个体化给药方案，实现精准治疗，降低用药风险。

关于抗癫痫药物浓度监测的方法有免疫检测法、原子吸收法、色谱法，由于生物基质的复杂性，上述方法在抗干扰能力、灵敏度和检测通量方面有一定局限性，为了进一步提高检测的准确度和灵敏度，越来

越多的医院和第三方医学检测中心逐步开发出用于抗癫痫药物浓度监测的液相色谱串联质谱法。

目前市场上治疗癫痫的药物种类繁多，为了提高检测的准确度和灵敏度，并同时满足抗癫痫药物检测的广谱性需求，本文参考中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》，基于岛津 LCMS-8045 平台建立了一种简单高效的液相色谱质谱法同时测定人血清中抗癫痫药物的定量分析方法。

血清样本经蛋白沉淀和引入同位素内标后加水适当稀释后直接进样分析，内标法定量人血清中药物含量。该方法方便、快捷，只需 1 针进样，5 分钟内完成分析，实现了 20 种常见抗癫痫药物的同时快速分析，大大提高了分析效率和检测通量，能满足临床样本的联合检测需求，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8045，具体配置如下：

输液泵：LC-40B X3

检测器：LCMS-8045

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40S

系统控制器：SCL-40

工作站软件：LabSolutions Version 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18(50 mm × 2.1 mm × 1.8 μm)，
货号：227-32001-02

流动相：A 相 - 水，B 相 - 乙腈

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%

时间程序见表 1

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样器温度：15°C

进样量：2 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.30	60	5
1.00	85	15
1.50	85	15
2.00	55	45
2.50	55	45
3.00	5	95
3.50	5	95
3.60	95	5
5.00	95	5

质谱条件

离子化模式: ESI

加热气: 空气 10.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

驻留时间: 15 ms

离子源温度: 300°C

DL 管温度: 200°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

ID	化合物	模式	前体离子 > 产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	Carbamazepine	正离子	237.1000>194.1000	-15	-39	-15
2	Carbamazepine-D ₁₀	正离子	247.1000>175.1000	-12	-46	-15
3	Carbamazepine-Dihydro	正离子	255.2000>237.1500	-30	-10	-26
4	Carbamazepine-Epoxyde	正离子	253.1000>180.1000	-15	-25	-15
5	Ethosuximade	负离子	140.2000>41.9000	10	24	14
6	Ethosuximade-D ₃	负离子	143.2000>42.0000	25	25	15
7	Gabapentine	正离子	172.1000>137.1000	-15	-20	-15
8	Gabapentine-D ₁₀	正离子	182.1500>164.2500	-21	-15	-29
9	Lacosamide	正离子	251.1000>91.1000	-15	-30	-15
10	Lacosamide- ¹³ CD ₃	正离子	255.3000>108.1500	-13	-10	-19
11	Lamotrigine	正离子	256.0000>43.2000	-15	-35	-15
12	Lamotrigine- ¹³ C ₁₅ N ₄	正离子	261.0500>214.0000	-30	-29	-22
13	Levetiracetam	正离子	171.1000>126.1000	-15	-32	-15
14	Levetiracetam-D ₁₀	正离子	177.0000>132.1000	-22	-22	-11
15	Oxcarbazepine	正离子	253.1000>180.0000	-15	-20	-15
16	Oxcarbazepine- ¹³ C ₆	正离子	259.1500>242.1500	-30	-14	-26
17	Perampanel	正离子	350.1000>247.1000	-15	-25	-15
18	Perampanel- ¹³ C ₆	正离子	356.2000>219.1000	-20	-37	-24
19	Phenobarbital	负离子	231.2000>42.0000	11	16	13
20	Phenobarbital-D ₅	负离子	236.1000>42.0000	15	16	14
21	Phenytoin	正离子	253.2000>182.2000	-28	-17	-17
22	Phenytoin-D ₁₀	负离子	261.2000>106.1000	30	23	17
23	Pregabaline	正离子	160.1000>142.1000	-12	-16	-23
24	Pregabaline- ¹³ C ₃	正离子	163.2500>145.2000	-20	-14	-27
25	Primdone	正离子	219.0000>162.0000	-24	-14	-30
26	Primdone-D ₅	正离子	224.0000>167.2500	-11	-15	-18
27	Rufinamide	正离子	239.0000>127.0000	-15	-20	-15
28	Rufinamide- ¹⁵ ND ₂	正离子	242.2000>129.1500	-27	-16	-24
29	Stiripentol	正离子	217.0000>187.2000	-24	-14	-18
30	Stiripentol-D ₉	正离子	226.0000>196.2000	-11	-13	-19
31	Topiramate	负离子	337.9000>78.0000	23	33	13
32	Topiramate-D ₁₂	负离子	350.3000>78.0000	17	27	13
33	Valproic Acid	负离子	143.2000>143.2000	16	11	25
34	Valproic Acid-D ₆	负离子	149.2000>149.2000	15	10	25

1.3 样品制备和前处理

1.3.1 标准品 & 内标信息

表 3 标准品信息

ID	中文名	英文名	CAS/EC 号
1	丙戊酸	Valproic Acid	99-66-1
2	丙戊酸镁	2-propylpentanoate Acid Magnesium	62959-43-7
3	丙戊酸钠	2-propylpentanoic Acid Sodium	1069-66-5
4	卡马西平	Carbamazepine	298-46-4
5	卡马西平 10,11- 环氧化物	Carbamazepine-Epoxyde	36507-30-9
6	10,11- 二氢 -10- 羟基卡马西平	Carbamazepine-Dihydro	29331-92-8
7	拉莫三嗪	Lamotrigine	84057-84-1
8	苯妥英钠	Phenytoin	57-41-0
9	左乙拉西坦	Levetiracetam	102767-28-2
10	奥卡西平	Oxcarbazepine	28721-07-5
11	托吡酯	Topiramate	97240-79-4
12	苯巴比妥	Phenobarbital	50-06-6
13	扑米酮	Primidone	125-33-7
14	乙琥胺	Ethosuximide	77-67-8
15	加巴喷丁	Gabapentine	60142-96-3
16	普瑞巴林	Pregabalin	148553-50-8
17	卢非酰胺	Rufinamide	106308-44-5
18	司替戊醇	Stiripentol	49763-96-4
19	拉考沙胺	Lacosamide	175481-36-4
20	吡仑帕奈	Perampanel	380917-97-5

表 4 内标信息

ID	中文名	英文名	CAS/EC 号
1	丙戊酸 -D ₆	Valproic Acid-D ₆	87745-18-4
2	卡马西平 -D ₁₀	Carbamazepine-D ₁₀	132183-78-9
3	拉莫三嗪 - ¹³ C, ¹⁵ N ₄	Lamotrigine- ¹³ C, ¹⁵ N ₄	200-659-6
4	苯妥英 -D ₁₀	Phenytoin-D ₁₀	65854-97-9
5	左乙拉西坦 -D ₆	Levetiracetam-D ₆	1133229-30-7
6	奥卡西平 - ¹³ C ₆	Oxcarbazepine- ¹³ C ₆	NA
7	托吡酯 -D ₁₂	Topiramate-D ₁₂	1279037-95-4
8	苯巴比妥 -D ₅	Phenobarbital-D ₅	72793-46-5
9	扑米酮 -D ₅	Primidone-D ₅	73738-06-4
10	乙琥胺 -D ₃	Ethosuximide-D ₃	1189703-33-0
11	加巴喷丁 -D ₁₀	Gabapentin-D ₁₀	1126623-20-8
12	普瑞巴林 - ¹³ C ₃	Pregabalin- ¹³ C ₃	1189980-48-0
13	卢非酰胺 - ¹⁵ N, ² D ₂	Rufinamide- ¹⁵ N, ² D ₂	NA
14	司替戊醇 -D ₉	Stiripentol-D ₉	1185239-64-8
15	拉考沙胺 - ¹³ C, ³ D ₃	Lacosamide- ¹³ C, ³ D ₃	200-835-2
16	吡仑帕奈 - ¹³ C ₆	Perampanel- ¹³ C ₆	NA

1.3.2 样本制备

(1) 内标萃取液：分别移取内标储备液于 25 mL 容量瓶中，加入乙腈溶液定容得到内标萃取液（各化合物浓度为 0.083~5.00 $\mu\text{g/mL}$ ）；

(2) 校准品：分别移取标准品储备液于 2 mL 容量瓶中，加入正常人血清定容得到 6 个浓度的人血清基质校准品（各化合物浓度如表 5 所示）；

(3) 质控品：分别移取标准品储备液于 2 mL 容量瓶中，加入正常人血清定容得到 2 个浓度的人血清基质质控品（各化合物浓度如表 5 所示）。

表 5 校准品 & 质控品浓度信息

化合物	校准品 ($\mu\text{g/mL}$)						质控品 ($\mu\text{g/mL}$)	
	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	LQC	HQC
丙戊酸	2.40	4.80	7.20	24.00	48.00	120.00	12.00	60.00
卡马西平	0.40	0.80	1.20	4.00	8.00	20.00	2.00	10.00
卡马西平 10,11- 环氧化物	0.20	0.40	0.60	2.00	4.00	10.00	1.00	5.00
10,11- 二氢 -10- 羟基卡马西平	0.80	1.60	2.40	8.00	16.00	40.00	4.00	20.00
拉莫三嗪	0.40	0.80	1.20	4.00	8.00	20.00	2.00	10.00
苯妥英钠	0.50	1.00	1.50	5.00	10.00	25.00	2.50	12.50
左乙拉西坦	1.00	2.00	3.00	10.00	20.00	50.00	5.00	25.00
奥卡西平	0.80	1.60	2.40	8.00	16.00	40.00	4.00	20.00
托吡酯	0.32	0.64	0.96	3.20	6.40	16.00	1.60	8.00
苯巴比妥	1.00	2.00	3.00	10.00	20.00	50.00	5.00	25.00
扑米酮	0.50	1.00	1.50	5.00	10.00	25.00	2.50	12.50
乙琥胺	2.40	4.80	7.20	24.00	48.00	120.00	12.00	60.00
加巴喷丁	0.50	1.00	1.50	5.00	10.00	25.00	2.50	12.50
普瑞巴林	0.20	0.40	0.60	2.00	4.00	10.00	1.00	5.00
卢非酰胺	0.80	1.60	2.40	8.00	16.00	40.00	4.00	20.00
司替戊醇	0.30	0.60	0.90	3.00	6.00	15.00	1.50	7.50
拉考沙胺	0.40	0.80	1.20	4.00	8.00	20.00	2.00	10.00
吡仑帕奈	0.04	0.08	0.12	0.40	0.80	2.00	0.20	1.00

1.3.3 样本前处理

- (1) 移取 10 μL 校准品 / 质控品 / 待测血清样本于 1.5 mL 离心管；
- (2) 加入 60 μL 内标萃取液于 2000 rpm 涡旋混合 1 min；
- (3) 10000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min；
- (4) 取 50 μL 上清于进样小瓶并加入 400 μL 纯水混匀；
- (5) 上机后自动进样器以 2 μL 进样分析。

■ 实验结果

2.1 临床参考区间

表 6 临床参考区间

ID	名称	有效浓度 (µg/mL)	警戒浓度 (µg/mL)
1	卡马西平	4-12	20
2	10,11- 二氢 -10- 羟基卡马西平	10-35	40
3	卡马西平 10,11- 环氧化物	0.5	9.57
4	乙琥胺	40-100	120
5	加巴喷丁	2-20	25
6	拉考沙胺	0.87	20
7	拉莫三嗪	3-15	20
8	左乙拉西坦	10-40	50
9	奥卡西平	10-35	40
10	吡仑帕奈	0.097	1.46
11	苯巴比妥	10-40	50
12	苯妥英钠	10-20	25
13	普瑞巴林	2-5	10
14	扑米酮	5-10	25
15	卢非酰胺	5-30	40
16	司替戊醇	1-10	15
17	托吡酯	2-8	16
18	丙戊酸	50-100	120

* 数据来源于 AGNP 指南 (2017) 和 RECIPER 试剂盒。

2.2 线性关系

将 6 个标准浓度的校准品按 1.3.3 中前处理条件进行分析测定, 以浓度比为横坐标, 面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线得到相关系数、线性范围和校准品准确度见表 7。

表 7 标准曲线参数

#	名称	相关系数	线性范围 (µg/mL)	准确度 (%)
1	Carbamazepine	0.9999	0.4-20	88.3~113.2
2	Carbamazepine-Dihydro	0.9997	0.8-40	90.6~110.8
3	Carbamazepine-Epoxyde	0.9988	0.2-10	89.7~113.8
4	Ethosuximade	0.9998	2.4-120	86.2~110.5
5	Gabapentine	0.9999	0.5-25	95.7~105.5
6	Lacosamide	1.0000	0.4-20	95.1~103.5
7	Lamotrigine	0.9999	0.4-20	91.5~114.2
8	Levetiracetam	1.0000	1-50	95.4~105.6
9	Oxcarbazepine	0.9994	0.8-40	94.2~108.3
10	Perampanel	1.0000	0.04-2	94.4~106.6
11	Phenobarbital	0.9978	1-50	85.2~112.1
12	Phenytoin	0.9986	0.5-25	85.7~114.7
13	Pregabalin	1.0000	0.2-10	96.9~105.3
14	Primidone	0.9995	0.5-25	91.8~110.6

15	Rufinamide	0.9999	0.8-40	95.8~104.2
16	Stiripentol	0.9998	0.3-15	86.5~112.3
17	Topiramate	0.9987	0.32-16	87.9~114.6
18	Valproic Acid	0.9999	2.4-120	90.1~108.2

2.3 精密度 & 准确度实验

本实验分别对低浓度和高浓度的正常人血清基质加标样（质控品）进行6次重复测定，精密度相对标准偏差范围分别在1.37%~11.86% (LQC) 和0.91%~9.19%(HQC) 之间，准确度度相对标准偏差范围分别在-5.3%~9.3% (LQC) 和-3.4%~2.6%(HQC) 之间，满足临床检测要求，数据结果见附录表8和表9。

表8 LQC 精密度 & 准确度结果 (n=6)

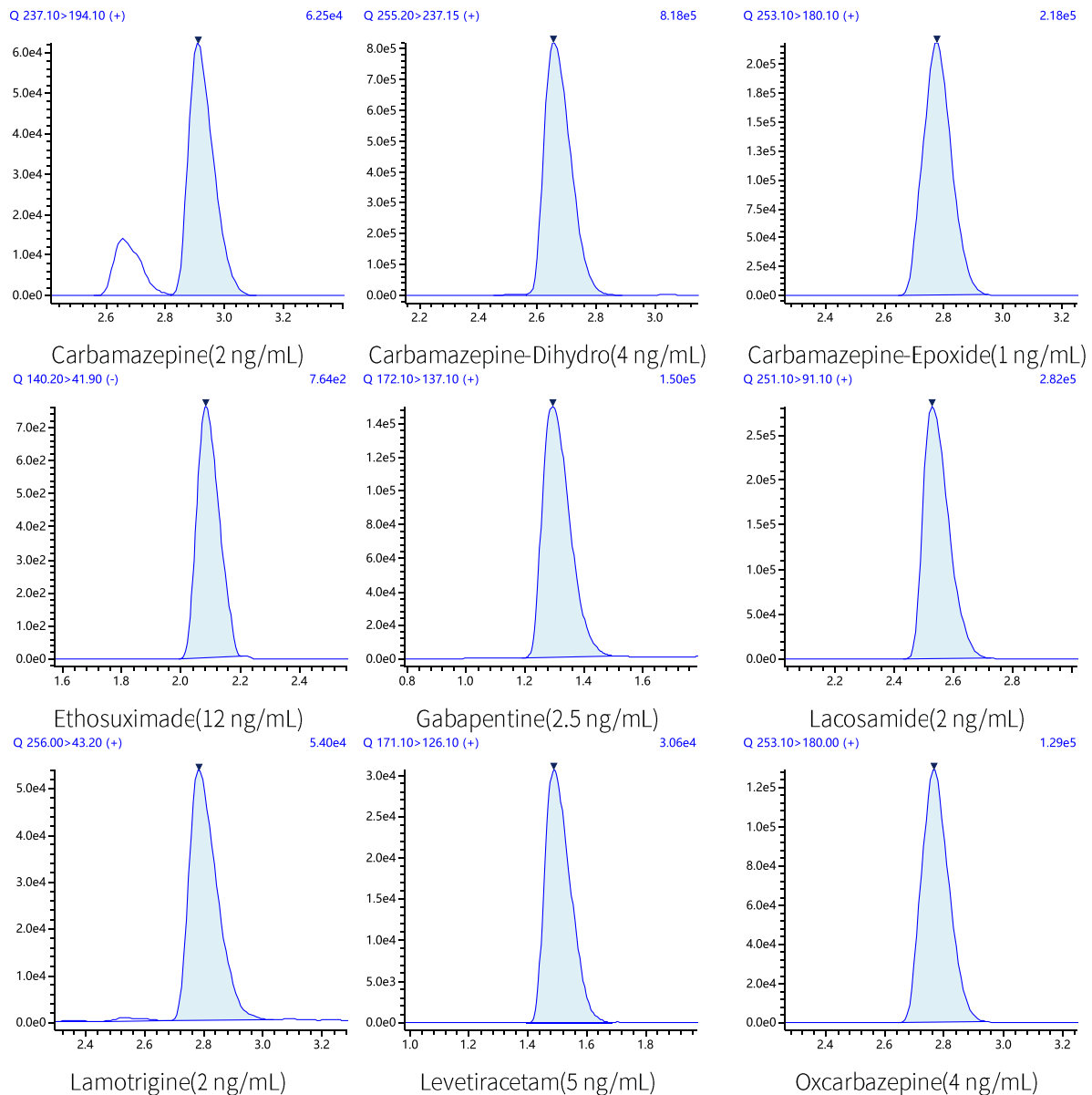
#	Sample	Mean(ng/mL)	%RSD	Target(ng/mL)	%Dev
1	Carbamazepine	1.97	3.74	2.00	-1.5%
2	Carbamazepine-Dihydro	3.96	3.90	4.00	-1.0%
3	Carbamazepine-Epoxyde	0.98	4.49	1.00	-2.0%
4	Ethosuximade	13.12	7.09	12.00	9.3%
5	Gabapentine	2.42	1.37	2.50	-3.2%
6	Lacosamide	2.05	1.83	2.00	2.5%
7	Lamotrigine	2.02	2.73	2.00	1.0%
8	Levetiracetam	4.75	1.51	5.00	-5.0%
9	Oxcarbazepine	3.79	2.01	4.00	-5.3%
10	Perampanel	0.21	2.64	0.20	5.0%
11	Phenobarbital	4.90	6.38	5.00	-2.0%
12	Phenytoin	2.49	7.80	2.50	-0.4%
13	Pregabalin	1.00	2.74	1.00	0.0%
14	Primidone	2.52	6.69	2.50	0.8%
15	Rufinamide	3.94	2.51	4.00	-1.5%
16	Stiripentol	1.52	11.86	1.50	1.3%
17	Topiramate	1.68	10.02	1.60	5.0%
18	Valproic Acid	11.84	4.10	12.00	-1.3%

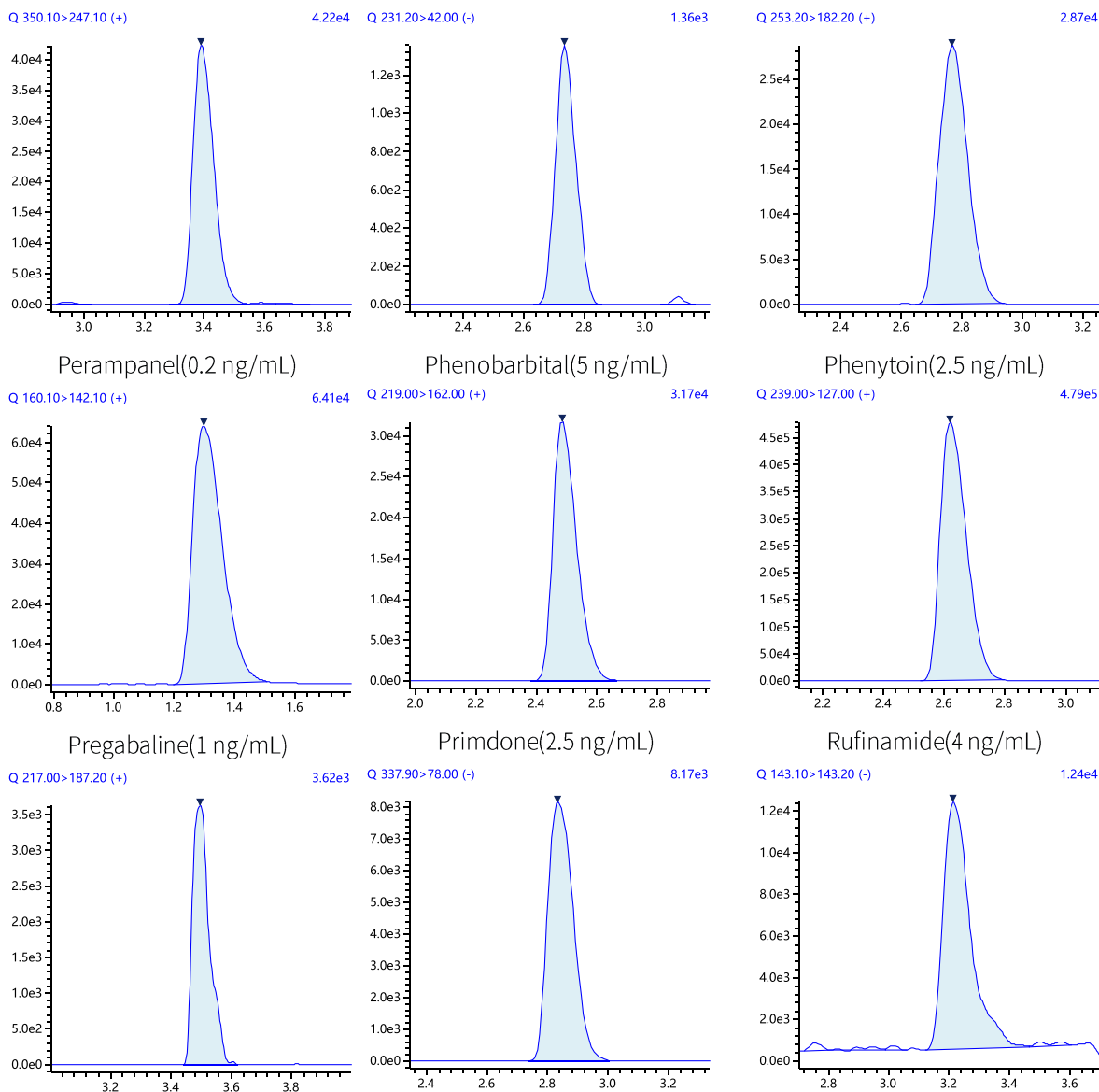
表9 HQC 精密度 & 准确度结果 (n=6)

#	Sample	Mean(ng/mL)	%RSD	Target(ng/mL)	%Dev
1	Carbamazepine	9.76	4.95	10.00	-2.4%
2	Carbamazepine-Dihydro	19.78	5.61	20.00	-1.1%
3	Carbamazepine-Epoxyde	4.91	5.33	5.00	-1.8%
4	Ethosuximade	60.69	4.42	60.00	1.2%
5	Gabapentine	12.31	1.11	12.50	-1.5%
6	Lacosamide	10.26	0.91	10.00	2.6%
7	Lamotrigine	9.93	3.85	10.00	-0.7%
8	Levetiracetam	24.45	1.86	25.00	-2.2%
9	Oxcarbazepine	19.84	2.41	20.00	-0.8%
10	Perampanel	0.98	3.76	1.00	-2.0%
11	Phenobarbital	24.16	9.19	25.00	-3.4%

12	Phenytoin	12.61	4.36	12.50	0.9%
13	Pregabalin	5.07	1.18	5.00	1.4%
14	Primidone	12.42	1.93	12.50	-0.6%
15	Rufinamide	20.05	1.20	20.00	0.3%
16	Stiripentol	7.25	4.36	7.50	-3.3%
17	Topiramate	8.04	3.07	8.00	0.5%
18	Valproic Acid	58.24	3.17	60.00	-2.9%

2.4 低浓度质控品色谱图





■ 结论

建立了一种使用岛津质谱 LCMS-8045 测定人血清中 20 种抗癫痫药物的定量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密性能。结果显示各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.9978，精密度相对标准偏差范围分别在 1.37%~11.86% (LQC) 和 0.91%~9.19%(HQC) 之间，准确度相对标准偏差范围分别在 -5.3%~9.3% (LQC) 和 -3.4%~2.6%(HQC) 之间，可满足临床日常检验需求。

岛津应用云

