

## 治疗药物监测（TDM）解决方案



# 前 言

治疗药物监测（Therapeutic drug monitoring, TDM）是以药物动力学与药效动力学理论为指导，借助现代先进分析技术，通过对患者血液或其他体液中药物浓度检测，实现给药方案个体化，提高药物疗效，避免或减少药物毒副反应，达到最佳治疗效果；同时也可以为药物过量中毒的诊断和处理提供有价值的实验室依据，将临床用药从传统的经验模式提高到比较科学的水平。

在发达国家，TDM 已成为临床实验室常规检查项目和临床医生用药的依据。在我国卫生部临床检验中心规定已将 TDM 列为常规工作，但是由于各医院水平发展不平衡，TDM 工作主要在大城市中部分大型医院开展，因此，出现很多患者因为用药不合理影响到临床药物的治疗效果或导致药物中毒的事件。现今，药物不良反应中的 A 型反应（量变型异常）是由药物药理作用的延伸或增强所引起与剂量明显相关，发生率较高、死亡率较低、可以预测，TDM 对 A 型反应有重要临床指导作用。实施 TDM 的临床指征有：1>、药物治疗指数低，安全范围窄，治疗血药浓度往往与中毒浓度接近，如地高辛和环孢素等；2>、血药浓度与药理作用具有相关性；3>、具有非线性动力学特性的药物。如：苯妥英钠、普萘洛尔等。4>、长期用于治疗 and 预防的药物；5>、药动学个体间血药浓度差异大的药物，如三环类抗忧郁药；6>、怀疑病人药物中毒，有些药物中毒症状与剂量不足时的症状类似，而临床又难以辨别。如抗癫痫药物苯妥因中毒。7>、心、肝、肾、肠道疾病引起 ADME 显著变化者，肝肾功能不全或衰竭者使用主要经肝代谢消除或肾排泄的药物；8>、合并用药产生相互作用可能影响疗效；9>、确认患者是否按医嘱服药，以及提供治疗上的医学法律依据等其他情况。

TDM 隶属于临床检验范畴，我国尚未相关测定方法的评估指导意见，大部分实验室仍然参考《群体药代动力学研究技术指导原则》或《临床前药代动力学研究技术指导原则》等进行方法学考察，有关测定需求的确定、允许总误差、质量控制方法、方法验证流程等，与现代临床检验学的质量管理与方法验证存在较大差距。

岛津公司作为全球著名的分析仪器综合生产厂商，进入中国已经 30 多年，始终秉承创业宗旨“以科学技术向社会做贡献”，不断钻研领先时代、满足社会需求的科学技术。岛津公司迎合客户需求和行业发展趋势，推出了《治疗药物监测（TDM）解决方案》。本应用文集汇集了 LC、LCMSMS 等不同测试方法以满足检测的需求，供广大医学检验行业从业人员参考。

岛津企业管理（中国）有限公司  
分析中心 / 质谱中心

## 部分 TDM 的药物品种

No	监测药物	化合物
1	免疫抑制药	环孢素、他克莫司、麦考酚酸酯、西罗莫司、咪唑立宾、霉酚酸、强的松等
2	强心苷类	地高辛，洋地黄毒苷
3	抗心律失常药	奎尼定、利多卡因、普鲁卡因、胺碘酮
4	抗癫痫药	卡马西平、丙戊酸钠、苯妥卡因、苯巴比妥、乙琥胺、拉莫三嗪、托吡酯、非氨酯、加巴喷丁、氨己烯酸、唑尼沙胺、奥卡西平、泰加平、左乙拉西坦
5	抗肿瘤药	甲氨蝶呤、顺铂、5-FU(氟尿嘧啶)、多烯他赛、表阿霉素、司莫司汀、柔红霉素、多柔比星、伊马替尼等 10 余种
6	抗精神病药	氯氮平、奥氮平、喹硫平、利培酮、米氮平、阿立哌唑、氨磺必利、齐拉西酮、舍曲林等 30 余种
7	抗生素	庆大霉素、卡那霉素、妥布霉素、链霉素、万古霉素、去甲万古霉素、两性霉素 B；氧氟沙星、莫西沙星、氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、黄连素、替加环素、美罗培南、卡泊芬净、头孢哌酮、舒巴坦、利奈唑胺等 20 余种
8	三环唑抗抑郁药	阿米替林、丙咪嗪
9	抗结核药	异烟肼、利福平、吡嗪酰胺
10	抗病毒药	沙奎那韦、英地那韦、奈非那韦、替比夫定
11	抗真菌药	伊曲康唑、酮康唑
12	平喘药	氨茶碱
13	抗躁狂药	碳酸锂
14	循环系统	胺碘酮、去乙酰胺碘酮、普萘诺尔、美托洛尔、倍他诺尔、阿替诺尔等
15	胃肠道药物	奥美拉唑、兰索拉唑、泮托拉唑、雷贝拉唑等
16	单抗药物	曲妥珠，贝伐珠

# 目 录

第 1 章 液相色谱/质谱联用法.....	1
1.1 常规三重四极杆液质联用法.....	2
■ 精神病类药物.....	2
1.1.1 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法对精神病患者临床治疗性药物监测 .....	2
1.1.2 LCMS-8050 测定血浆中 4 种抗精神病药含量.....	8
■ 免疫抑制剂类药物.....	13
1.1.3 LCMS-8050 分析全血中免疫抑制剂.....	13
1.1.4 LCMS-8050 快速分析血浆中的霉酚酸.....	18
■ 抗肿瘤类药物.....	20
1.1.5 LCMS-8050 快速分析血浆中的舒尼替尼及阿西替尼.....	20
■ 抗真菌类药物.....	22
1.1.6 LCMS-8050 快速分析血浆中的伏立康唑.....	22
1.1.7 LCMS-8050 快速分析血浆中的伊曲康唑.....	24
■ 抗病毒类药物.....	27
1.1.8 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中替比夫定.....	27
■ 多种类药物.....	34
1.1.9 LC-MS/MS 测定 12 种药物血药浓度的集成方法.....	34
■ 单抗类药物.....	39
1.1.10 采用 nSMOL 试剂盒建立人血浆中贝伐珠单抗定量分析方法的重现性验证 .....	40
1.1.11 基于 nSMOL 技术和 Skyline 软件的曲妥珠单抗 LC-MS/MS 定量分析方法开发... ..	44
1.2 Online SPE-三重四极杆液质联用法.....	51
1.2.1 自动前处理-超高效液相色谱/质谱在线分析系统用于血清中十种抗精神病药的直 接检测.....	52
1.3 全自动前处理与液质在线联用系统.....	59
1.3.1 使用全自动前处理 LCMSMS 系统提高治疗药物监测的效率 .....	61
第 2 章 液相色谱法.....	65
2.1 岛津常规液相色谱法.....	66
2.1.1 高效液相色谱法测定人血清中氯丙嗪含量.....	66
2.1.2 高效液相色谱法测定人血清中氯氮平含量.....	69
2.2 FLC 全自动液相色谱法 .....	72
2.2.1 新型 2D-LC-UV 建立莫西沙星 TDM 测定方法.....	73
2.2.2 FLC2420 全自动二维液相色谱系统测定血浆中奥卡西平代谢物.....	80
2.2.3 FLC2701 全自动二维液相色谱系统测定血浆中的丙戊酸.....	86
2.2.4 全自动二维液相色谱法测定腹腔感染患者血清中替加环素浓度 .....	92
附录: AGNP 精神科治疗药物监测共识指南(2011)附录表 5 .....	97

## 第 1 章 液相色谱/质谱联用法



三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050

三重四极杆液质联用仪 LCMS-8060

三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 和 LCMS-8060，实现了灵敏度和速度的创新性突破。其全新的离子导向技术增强了离子聚焦能力和信号响应，30000 u/sec 超快的数据采集速度和 5 msec 极性切换速度，使 LCMS-8050 和 LCMS-8060 在保证高灵敏度的同时还具有出众的分析速度。因此，LCMS-8050 和 LCMS-8060 的问世为复杂的生物分析提供了高灵敏度、高稳定性，并缩短了分析时间。

### 岛津质谱技术特点：

#### ❖ UF-Swiching 技术

独有的 UFMS 技术优化的，其主要的性能优势是将传统的正离子/负离子两种离子化模式同步化。真正意义上实现了正、负离子同时采集，极大的提高了三重四极质谱的超快速检测能力。

#### ❖ UF-Scaning 技术

独创的超快速扫描技术 UF-Scaning 技术（扫描速度 30000 u/sec），能够在不损失灵敏度和质量检测范围的同时实现质量误差的最小化。

#### ❖ UF-Sweeper III 技术

独有的 UF-Sweeper III 快速技术，实现了离子碰撞过程的超低串扰和高质量端检测的高灵敏度。在超高速扫描的情况下高质量端的信号强度稳中有升，避免了因扫描速度加快造成的质量检测范围狭窄。

#### ❖ UF-Sensitivity 技术

岛津优化了离子源接口，实现离子源接口加热气→加热块→DL（脱溶剂管）的三重脱溶剂系统的组合，最大程度上提高了化合物的离子化效率和仪器的检测灵敏度。在中药成分鉴定，食品，香料，农残兽残，药物代谢物鉴定，生物大分子的蛋白质组研究中具有不可比拟的灵敏度优势。

## 1.1 常规三重四极杆液质联用法

### ■ 精神病类药物

#### 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法对精神病患者临床治疗性药物监测

**摘要：**建立一种测定人血清中临床治疗精神病药物血药浓度的超高效液相色谱串联质谱法（UHPLC-MS/MS）并用于考察某医院新接收患者治疗前目标药物血药浓度。样品经处理后，用超高效液相色谱LC-30A快速分离八种临床常用精神病治疗用药，三重四极杆质谱仪LCMS-8060进行定量分析，使用D6-氯丙嗪同位素内标定量，在 $0.1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ~ $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内绘制校准曲线，线性良好，相关系数为0.9981以上。对高、中、低三浓度生物样品进行批次内、批次间精密考察，RSD%在10.10以下。

**关键词：**治疗药物监测 精神病用药 超高效液相色谱串联质谱法

治疗药物监测（Therapeutic Drug Monitoring, TDM）是在临床药理学和现代分析化学的基础上发展的一门边缘学科；根本目的是促进临床安全有效用药，对那些安全范围窄、个体差异大或需要长期使用的药物，通过药物浓度检测和实施剂量调整，达到个体化用药和治疗的目的。其临床意义在于：①实现给药方向个体化；②缩短治疗时间、提高治疗成功率，降低质量费用；③诊断和处理药物过量中毒；④提高患者用药依从性。精神病指严重的心理障碍，患者的认识、情感、意志、动作行为等心理活动均可出现持久的明显的异常；不能正常的学习、工作、生活；动作行为难以被一般人理解；在病态心理的支配下，有自杀或攻击、伤害他人的动作行为。药物治疗是治疗手段的其中一种，但由于患者本身属性问题，可能很难表述前期用药情况。本文意在建立8种精神病常用药的LCMSMS检测方法，客观反映患者在入院给药前的血药浓度情况。

### 1 实验部分

#### 1.1 药物

氯氮平、喹硫平、利培酮、阿立哌唑、奋乃静、氟哌啶醇、氯丙嗪、舒必利、D6-氯丙嗪由北京大学医学部公共卫生学院提供，纯度均大于98%。

#### 1.2 血清

取自山东某精神病治疗医院检验科。病人入院采血离心取上清得。

#### 1.3 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A与三重四极杆质谱仪LCMS-8060联用系统。具体配置为LC-30AD×2输液泵，DGU-20A5在线脱气机，SIL-30ACMP自动进样器，CTO-20A柱温箱，CBM-20A系统控制器，LCMS-8060三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.80色谱工作站；AG-135 电子天平（瑞士Mettler公司）；XW-80A型微型漩涡混合仪（金坛市盛蓝仪器制造有限公司）； Heraeus Pico 21 离心机（Thermo Scientific，德国）。

#### 1.4 试剂

乙腈购自美国Fisher公司（Fairlawn, NJ, USA）；实验用水由Milli-Q Plus水净化系统（Millipore, Ltd.）经去离子与二次净化制得；甲酸（纯度99%，LCMS级，Wako, Japan）；其余试剂均为分析纯，购自北京化学试剂公司。

## 2 方法和结果

### 2.1 对照品溶液及内标溶液的配制

精密称取 5 mg 各对照品，置于 50 mL 容量瓶中，加乙腈溶解定容，配制成  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品储备液，从各个容量瓶中取出 100  $\mu\text{L}$  溶液置 10 mL 容量瓶中，以甲醇定容后稀释得到一系列不同浓度的对照品溶液 1, 2, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；另精密称取盐酸巴马汀，以甲醇配制成  $20\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的内标溶液。

### 2.2 标准曲线与质控样品的配制

取空白血清 100  $\mu\text{L}$ ，加入混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ，加入内标 5  $\mu\text{L}$ ，配制成相当于血清浓度为 0.1, 0.2, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，按“生物样品处理”项下操作，记录各个化合物与内标的峰面积，以浓度为横坐标，峰面积比值为纵坐标，绘制标准曲线。

### 2.3 血清样品处理方法

取人血清 100  $\mu\text{L}$ ，加入 5  $\mu\text{L}$  内标，乙腈补足 300  $\mu\text{L}$  体积，12000 rpm 离心 15 min，分离上清液，1  $\mu\text{L}$  进行 LC-MS/MS 分析。

### 2.4 色谱条件

色谱柱：Inertsil® ODS-4  $2.1\times 100\text{mm}$ ,  $2.1\mu\text{m}$ 。 流速： $0.4\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；  
流动相：乙腈-水（0.01%甲酸）； 柱温： $40^\circ\text{C}$ ；  
梯度：0.00 min: 25:75; 3.50 min: 30:70; 3.51 min: 25:75; 5.00 min: 25:75; 进样量为 1  $\mu\text{L}$ 。

### 2.5 质谱条件

离子化模式：ESI(+) 接口温度： $300^\circ\text{C}$   
离子喷雾电压：4.5 kV 加热模块温度： $400^\circ\text{C}$   
雾化气：氮气 3.0 L/min 扫描模式：多反应监测(MRM)  
加热气：氮气 10.0 L/min 驻留时间：30 ms  
干燥气：氮气 10.0 L/min 延迟时间：2 ms  
碰撞气：氩气 MRM 参数：见表 1  
DL 温度： $250^\circ\text{C}$

### 2.6 方法学考察

#### 2.6.1 专属性试验

选择性是通过对人空白血清 ( $n>6$ ) 的检测进行验证的。所有样品的结果表明生物基质不干扰待测物的测定。正离子、多反应检测模式下，典型的多反应检测图谱如图 1。

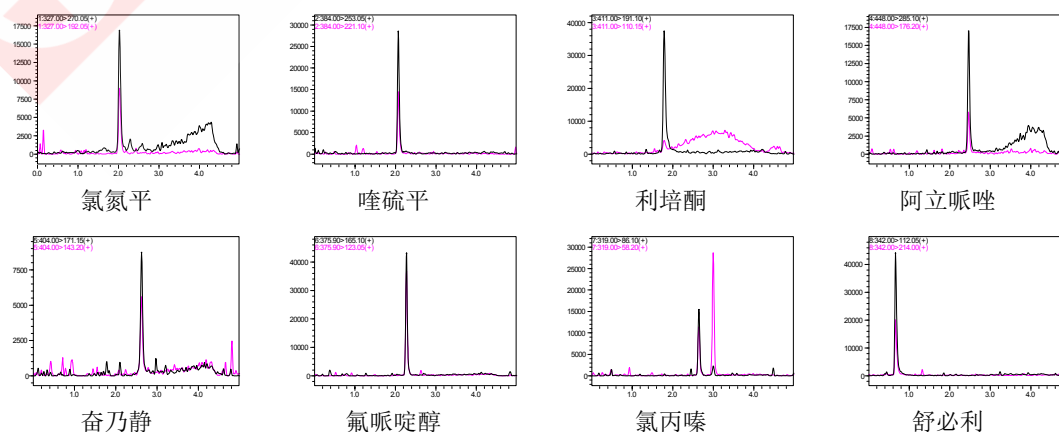


图 1 人血清 1.0 ng/mL 溶液各个药物典型色谱图

表 1 MRM 优化参数

化合物名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
氯氮平 Clozapine	5786-21-0	327.00	270.05*	-22.0	-25.0	-20.0
			292.05	-16.0	-50.0	-19.0
喹硫平 Quetiapine	111974-69-7	384.00	253.05*	-20.0	-25.0	-20.0
			221.10	-20.0	-35.0	-20.0
利培酮 Risperidone	106266-06-2	411.00	191.10*	-20.0	-30.0	-20.0
			110.15	-29.0	-50.0	-12.0
阿立哌唑 Aripiprazole	129722-12-9	448.00	285.10*	-17.0	-27.0	-11.0
			176.20	-17.0	-33.0	-13.0
奋乃静 Prochlorperazine	58-38-8	404.00	171.15*	-29.0	-24.0	-30.0
			143.20	-29.0	-29.0	-15.0
氟哌啶醇 Haloperidol	52-86-8	375.90	165.10*	-24.0	-25.0	-22.0
			123.05	-23.0	-45.0	-21.0
氯丙嗪 Chlorpromazine	50-53-3	319.00	86.10*	-23.0	-21.0	-29.0
			58.20	-22.0	-45.0	-22.0
舒必利 Sulpiride	15676-16-1	342.00	112.05*	-24.0	-26.0	-23.0
			214.10	-24.0	-34.0	-15.0
D6-氯丙嗪 Chlorpromazine-D6	1228182-46-4	325.00	92.10	-23.0	-21.0	-23.0

\*为定量离子对

## 2.6.2 线性关系考察

分别取空白生物样品,加入适量的系列浓度标准溶液,配制成系列浓度的模拟生物样品。按“2.3 生物样品处理方法”进行处理后进样。记录各成分与内标的峰面积比值,以浓度与峰面积比值做线性回归绘制标准曲线,结果如表 2 所示。

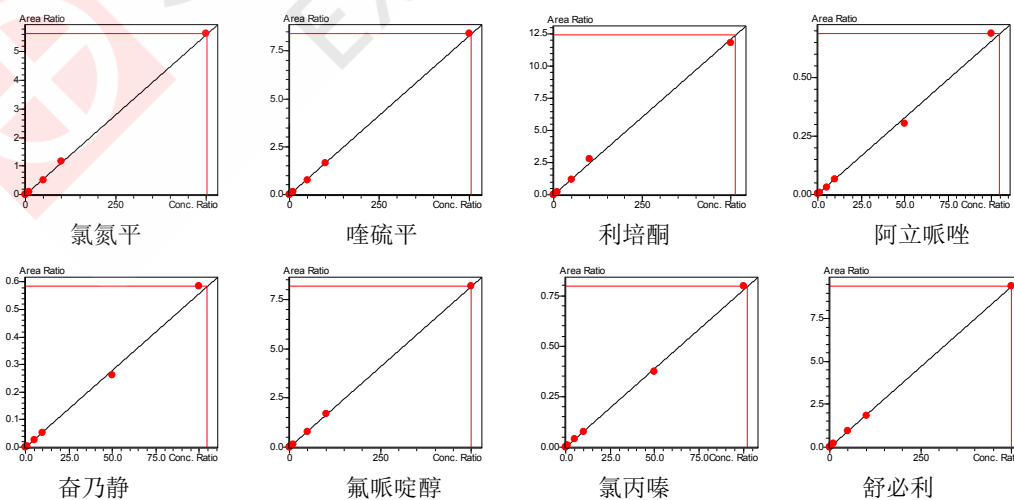


图 2 各个药物的标准曲线

表 2 线性结果

化合物	回归方程	回归系数 r	线性范围(ng/mL)
氯氮平	$Y = 0.0112X + 0.000194$	0.9994	0.1-500
喹硫平	$Y = 0.0166X - 0.000288$	0.9996	0.1-500
利培酮	$Y = 0.0242X + 0.00101$	0.9983	0.1-500
阿立哌唑	$Y = 0.00654X + 0.00191$	0.9981	0.1-100
奋乃静	$Y = 0.00558X + 0.000220$	0.9981	0.1-100
氟哌啶醇	$Y = 0.0163X + 0.00267$	0.9998	0.1-500
氯丙嗪	$Y = 0.00777X + 0.000373$	0.9993	0.1-100
舒必利	$Y = 0.0187X + 0.00436$	0.9999	0.1-500

### 2.6.3 准确度

对校准曲线上所有点进行准确度分析，结果见表 3

表 3 准确度结果

浓度 (ng/mL)	0.1	0.2	1	5	10	50	100	500
氯氮平	94.8	82.2	91.8	97	94.1	95.2	103.6	100.5
喹硫平	109.8	85.9	87.6	97.5	90.7	93.1	100.6	101.2
利培酮	101.5	102.1	91.4	104.1	92.5	102.7	113.5	102.5
阿立哌唑	110.6	113.4	93.6	96.1	97.1	94.4	104.7	-
奋乃静	90.3	85.8	88.9	94.9	93.4	93.1	104.6	-
氟哌啶醇	113.4	105.2	92.7	97.1	93.5	96.5	103.1	100.1
氯丙嗪	108.1	99.1	87.2	101.4	98.5	95.7	102.4	-
舒必利	96.2	104.9	91.4	103.3	104.1	102.1	101.3	100.1

### 2.6.4 精密度

分别取空白生物样品，加入适量的对照品标准溶液，配制低、中、高三个浓度的 QC 样品，按“2.3 生物样品处理方法”进行处理后进样。每个浓度进行 6 样本分析，连续测定三批，进行回收率和精密度实验，结果见表 4，结果表明，方法的回收率、批内及批间精密度符合要求。

表 4 精密度结果

化合物	加入量 (ng·mL <sup>-1</sup> )	批内精密度	RSD	批间精密度	RSD
		( $\bar{x} \pm s, n=6$ )	(%)	( $\bar{x} \pm s, n=5$ )	(%)
氯氮平	0.2	0.202±0.014	6.96	0.198±0.014	7.09
	10	10.57±0.33	4.25	9.936±0.989	5.25
	100	89.21±2.55	2.86	92.98±8.38	10.10
喹硫平	0.2	0.214±0.012	5.66	0.207±0.016	7.94
	10	10.74±0.106	1.21	10.12±0.768	9.46
	100	100.68±1.09	1.08	95.44±6.92	7.25

	0.2	0.180±0.009	5.24	0.189±0.017	9.12
利培酮	10	9.60±0.064	2.84	9.46±0.275	2.91
	100	104.71±1.20	1.05	105.83±3.04	2.63
	0.2	0.194±0.017	8.60	0.201±0.017	8.35
阿立哌唑	10	9.28±0.386	4.67	9.96±0.516	6.48
	100	102.79±3.37	3.28	101.28±4.98	4.92
	0.2	0.196±0.009	4.54	0.200±0.013	6.28
奋乃静	10	9.71±0.230	2.98	10.23±0.469	6.49
	100	96.44±3.68	4.26	105.65±5.09	5.94
	0.2	0.194±0.008	4.37	0.196±0.011	5.57
氟哌啶醇	10	9.54±0.203	2.13	9.54±0.205	2.15
	100	103.78±1.30	1.25	105.59±2.75	2.60
	0.2	0.196±0.011	5.59	0.186±0.015	8.26
氯丙嗪	10	9.74±0.298	3.06	9.66±0.297	3.07
	100	107.28±3.87	3.61	109.17±4.19	3.83
	0.2	0.212±0.014	7.55	0.200±0.018	9.11
舒必利	10	10.16±0.267	2.63	10.18±0.247	2.42
	100	106.47±1.33	1.25	109.94±3.92	3.56

## 2.7 入院病人血清筛查

对入院进行治疗的精神病患者进行治疗前抽血化验,筛查治疗前用药种类以及用药剂量,以实现对症下药,结果如下见表5。

表5 精神病患者入院血清筛查结果(ng/mL)

No.	氯氮平	喹硫平	利培酮	阿立哌唑	奋乃静	氟哌啶醇	氯丙嗪	舒必利
1	1.748	1.577	9.507	2.804	8.734	4.094	0.390	----
2	1.093	0.761	3.554	0.569	7.457	6.924	0.399	----
3	20.081	12.331	17.645	----	58.363	9.128	----	----
4	----	3.024	1.422	----	4.924	5.236	----	----
5	3.709	----	2.107	9.384	4.256	1.656	----	----
6	4.666	1.491	2.311	2.524	6.355	5.807	----	----
7	----	0.715	1.247	1.390	2.012	1.206	----	0.228
8	----	----	----	273.731	----	2.971	3.489	----
9	8.476	2.032	3.552	18.225	11.269	6.193	2.249	1.038
10	109.852	3.358	6.400	13.843	13.812	9.154	----	----
11	0.892	94.973	1.141	0.220	2.615	8.573	0.823	----
12	0.274	156.824	0.676	0.353	1.589	----	0.249	----
13	0.197	0.466	0.458	----	1.338	----	0.217	----
14	0.191	0.149	12.988	0.561	1.005	----	0.349	----
15	131.097	0.139	0.263	34.999	1.017	----	0.491	----
16	1.252	1.188	3.685	3.307	6.227	0.738	----	134.264
17	124.038	1.334	3.929	21.692	7.147	3.245	5.143	1.043
18	5.249	0.529	2.153	12.199	----	12.548	2.927	----
19	0.235	0.158	0.299	----	0.962	5.365	1.057	----
20	----	0.124	0.306	0.157	0.980	----	1.276	----
21	----	0.195	0.378	0.087	0.875	----	0.442	----
22	----	1.067	2.131	7.632	----	4.033	----	0.459
23	----	0.811	1.048	4.881	2.214	3.934	0.835	0.651
24	8.661	2.215	2.744	12.606	----	14.882	4.824	1.542
25	0.313	0.137	0.239	0.600	0.820	----	0.153	----

26	----	3.663	3.815	7.551	2.706	3.362	2.150	----
27	0.262	0.162	0.245	----	1.204	5.431	0.136	----
28	0.152	0.256	0.300	----	0.449	----	0.339	----
29	----	83.432	9.697	0.213	0.519	----	0.185	----
30	----	82.884	0.558	2.196	----	0.603	0.636	----
31	0.155	0.145	11.892	----	0.647	3.643	0.301	----
32	36.116	1.721	2.040	8.529	3.250	2.617	----	----
33	45.814	0.155	0.618	----	1.079	----	0.195	0.363
34	0.508	0.411	0.517	0.046	0.818	3.939	0.175	1.187
35	3.511	18.368	2.309	17.227	2.581	4.370	2.031	0.545
36	0.147	----	0.751	0.126	0.307	----	0.984	----
37	0.248	0.117	0.143	----	0.296	11.872	0.389	----
38	----	0.069	0.179	----	----	3.398	0.940	----
39	1.877	1.255	1.692	0.968	1.470	3.195	0.497	5.561

### 3 结论

本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用进行神经病患者治疗药物监测，根据监测结果可以清楚患者入院前体内的药物种类及其含量，指导用药处方，能够更准确进行个体化用药，缩短治疗周期，提高治疗效果。

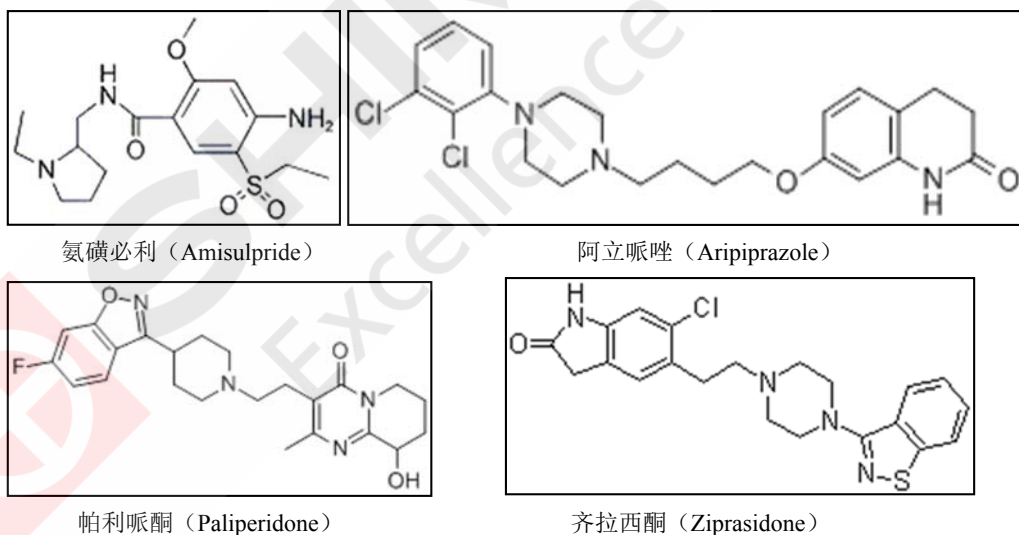
# LCMS-8050 测定血浆中 4 种抗精神病药含量

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中氨磺必利、阿立哌唑、帕利哌酮和齐拉西酮 4 种抗精神病药含量的方法。以内标法定量, 校准曲线线性良好, 线性相关系数均不低于 0.9952。对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08 ~ 0.63% 和 0.65 ~ 6.76% 之间, 仪器检出限和定量限分别为 0.003~0.008 ng/mL 和 0.011~0.025 ng/mL。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势, 可用于血浆样品中 4 种抗精神病药含量的检测。

**关键词:** 三重四极杆质谱 抗精神病药 血浆

根据德国药物浓度监控组织 AGNP 最新的专家共识指南 (AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011, 44, 195-235.), 出于用药安全性和合理性考虑, 阿立哌唑 (Aripiprazole)、氨磺必利 (Amisulpride)、帕利哌酮 (Paliperidone)、齐拉西酮 (Ziprasidone) 等药物浓度监控的临床需求等级较高 (Level: recommended or strongly recommended)。对该类药物的血浆浓度进行定期监测将有助于临床医生确定给药方案及评估治疗效果, 从而最大程度上消除由于个体差异造成的副作用影响, 使给药方案个体化, 有效提高药物治疗水平, 达到临床安全、有效、合理的用药。

高效液相色谱-串联质谱法检测此类药物浓度具有灵敏度高、重复性好、通量高等特点, 能够给临床提供快速、准确的分析结果。本文利用岛津 LCMS-8050 建立了血浆样本中 4 种抗精神病药含量的快速、高灵敏度的检测方法。



## 1 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-20A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-20AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.72 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Inertsil Sustain C18 Column (2.1 mm I.D. 柱温: 40°C  
 ×150 mm L., 5 μm) 进样量: 5 μL  
 流动相: A 相-0.1%甲酸水溶液, B 相-乙腈 洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为25%,  
 流速: 0.45 mL/min 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	25
4.50	Pumps	Pump B Conc.	90
5.50	Pumps	Pump B Conc.	90
5.60	Pumps	Pump B Conc.	25
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)  
 加热气: 空气 10.0 L/min  
 雾化气: 氮气 2.0 L/min  
 干燥气: 氮气 10.0 L/min  
 碰撞气: 氩气  
 接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C  
 加热模块温度: 400°C  
 扫描模式: 多反应监测(MRM)  
 驻留时间: 40 ms  
 延迟时间: 3 ms  
 MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

化合物	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
氨磺必利	Amisulpride (AMI)	71675-85-9	370.10	242.05* 196.00	-30.0	-27.0 -41.0	-25.0 -19.0
d5-氨磺必利	AMI-d5	-	375.20	242.00	-14.0	-27.0	-25.0
阿立哌唑	Aripiprazole (ARI)	129722-12-9	448.10	285.05* 176.05	-11.0	-27.0 -32.0	-30.0 -17.0
d8-阿立哌唑	ARI-d8	1089115-06-9	456.10	293.10	-14.0	-28.0	-19.0
帕利哌酮	Paliperidone (PAL)	144598-75-4	427.20	207.10* 110.00	-30.0	-28.0 -43.0	-21.0 -19.0
d4-帕利哌酮	PAL-d4	1020719-55-4	431.20	211.10	-14.0	-28.0	-21.0
齐拉西酮	Ziprasidone (ZIP)	146939-27-7	413.10	194.05* 159.05	-17.0	-29.0 -43.0	-19.0 -30.0
d8-齐拉西酮	ZIP-d8	1126745-58-1	421.10	194.05	-14.0	-30.0	-19.0

注: \*表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配制

标准溶液配制: (1) 将 100 mg/L 混合标样储备液以 50%甲醇水溶液逐级稀释得到浓度分别为 2.0、4.0、10.0、20.0、100.0、200.0、1000.0、2000.0 ng/mL 的标准溶液。

(2) 取 50 μL 上述标准溶液, 加入到 950 μL 空白血浆中, 依次配制得到浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL 的基质标准溶液, 经过如下 1.4 步骤处理所得上清液上机测试。

### 1.4 样品前处理方法

取 100 μL 血浆样品, 加入 10 μL 混合内标溶液 (各内标浓度 1.0 mg/L), 加入 900 μL 乙腈, 涡旋振荡 1 min, 10000 rpm 离心 10 min, 取上清液上机检测。

## 2 结果与讨论

### 2.1 基质标准和空白色谱图

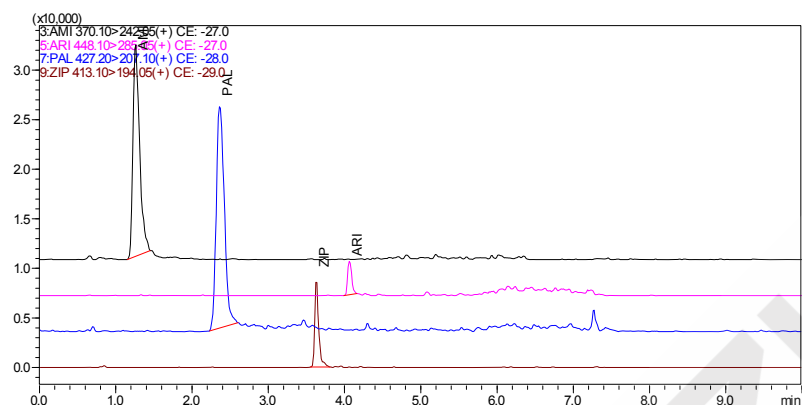


图1 0.1 ng/mL 基质标准样品 MRM 色谱图

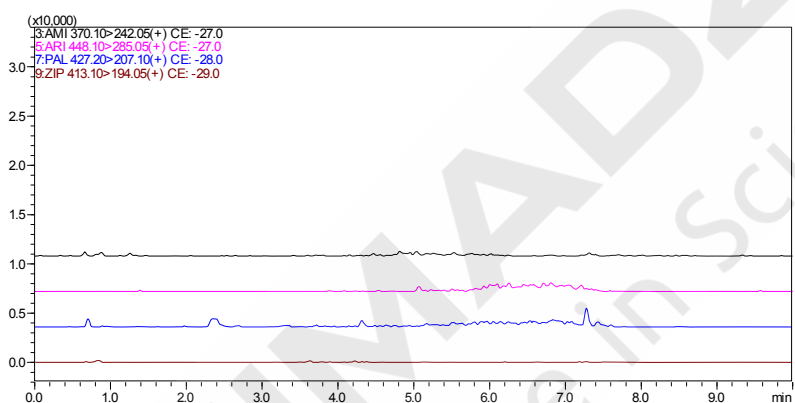
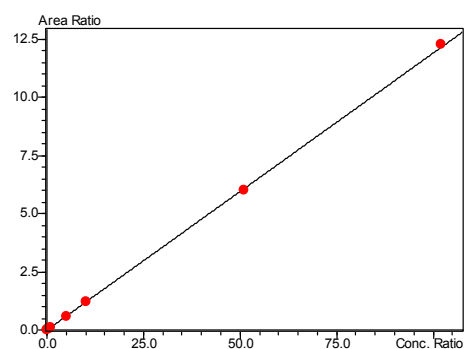
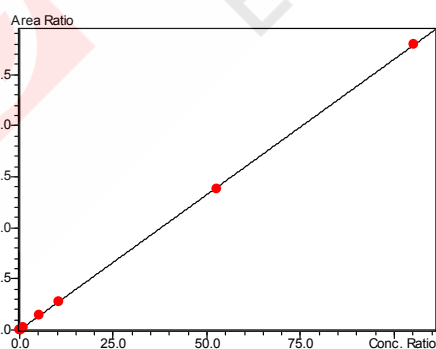


图2 空白血浆色谱图

### 2.2 线性范围

将浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0 和 100.0 ng/mL 的 4 种目标物标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线, 如图 3 所示, 线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

在 100 ng/mL 混标分析结束后, 空白样品进样考察 Carryover, 样品无明显残留 (使用甲醇/乙腈/异丙醇/水=1:1:1:1 作为洗针液, 洗针模式设置为 Rinse Pump>Rinse Port)。



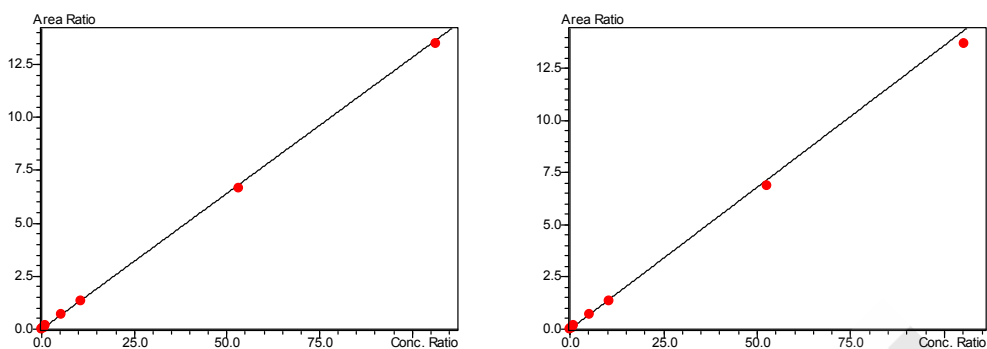


图3 校准曲线（上左为 AMI, 上右为 ARI, 下左为 PAL, 下右为 ZIP）

表 3 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	R <sup>2</sup>	准确度 (%)
AMI	$Y = (0.1325)X + 0.0018$	0.1-100	0.9997	98.0-102.8%
ARI	$Y = (0.1191)X + 0.0015$	0.1-100	0.9986	95.0-105.1%
PAL	$Y = (0.1284)X + 0.0025$	0.1-100	0.9990	97.0-105.2%
ZIP	$Y = (0.1360)X + 0.0035$	0.1-100	0.9952	93.1-108.2%

### 2.3 精密度实验

配制目标物浓度分别为 0.2, 5.0, 100 ng/mL 的混合标样，平行测定各 6 次，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积重复性结果如表 4 所示，仪器重复性良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

名称	RSD (% , 0.2 ng/mL)		RSD (% , 5.0 ng/mL)		RSD (% , 100 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
AMI	0.29	3.28	0.22	1.03	0.13	0.81
ARI	0.10	6.76	0.11	5.49	0.08	4.28
PAL	0.63	2.37	0.27	0.65	0.32	0.80
ZIP	0.19	1.90	0.09	2.35	0.08	3.14

### 2.4 灵敏度实验

对目标物浓度为 0.10 ng/mL 标准溶液进样分析，由信噪比计算各目标组分仪器检出限 (ILOD, S/N=3) 和仪器定量限 (ILOQ, S/N=10)，结果如表 5 所示。

表 5 检出限和定量限

名称	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
AMI	0.005	0.017
ARI	0.008	0.025
PAL	0.006	0.021
ZIP	0.003	0.011

### 2.5 回收率实验

在空白血浆中添加 4 种目标物和内标，按照 1.4 对样品处理后进样分析，计算加标回收率，结果如表 6 所示。

表 6 加标回收实验

名称	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)
AMI	60	105.8	600	98.8

ARI	60	107.9	600	91.7
PAL	10	102.1	100	92.0
ZIP	10	107.5	100	97.5

### 3 结论

本文建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中氨磺必利、阿立哌唑、帕利哌酮和齐拉西酮 4 种抗精神病药含量的方法。以内标法定量，校准曲线线性良好，线性相关系数均不低于 0.9952。对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.63% 和 0.65~6.76% 之间，仪器检出限和定量限分别为 0.003~0.008 ng/mL 和 0.011~0.025 ng/mL。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势，可用于血浆样品中 4 种抗精神病药含量的检测。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## ■ 免疫抑制剂类药物

### LCMS-8050 分析全血中免疫抑制剂

**摘要:** 本文建立了超高效液相色谱串联三重四极杆质谱检测全血中免疫抑制剂分析方法。采用 ClinMass<sup>®</sup> LC-MS/MS 完整检测试剂盒 MS1100 进行样品处理分析。该方法所建立的标准曲线在临床检测浓度他克莫司 1.37-65  $\mu\text{g/L}$ 、西罗莫司 1.45-66.8  $\mu\text{g/L}$ 、依维莫司 1.62-71.7  $\mu\text{g/L}$ 、环孢霉素 A25.8-1746  $\mu\text{g/L}$  的范围内，均呈良好线性关系。质控样品平行进样四次，其 RSD% 值在 2.21%-9.66% 范围内，方法重现性良好。

**关键词:** 免疫抑制剂 全血 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

免疫抑制剂是一类常被用于器官移植受着抗移植排斥反应的重要化合物，其也被用于治疗免疫介导性疾病或免疫系统紊乱以及非自身免疫性炎症反应，如重度过敏性哮喘。此类药物的治疗浓度范围通常较窄，需要精确检测病人全血中药物浓度，保证给予病人正确的药物剂量。在本实验中，对全血样本采用在线分离，使用液相色谱串联质谱法检测分析免疫抑制剂他克莫司、西罗莫司、依维莫司与环孢霉素 A (CSA)。

#### 1 材料与方法

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 UHPLC Nexera X2 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。系统配备高压切换阀 FCV-32AH、等度洗脱样品上样 SPE 柱 (SPE 泵) 与等度组分洗脱 (MP 泵)。样品组分检测采用免疫抑制剂 ClinMass<sup>®</sup> LC-MS/MS 完整检测试剂盒 MS1100 (RECIPE 化学品与仪器有限公司, 德绍尔大街 3 号, 慕尼黑 80992, 德国)。标准品、质控样品、SPE 柱、分析色谱柱与流动相溶剂均由该检测试剂盒提供。样品前处理采用蛋白沉淀法进行。取全血样品 100  $\mu\text{L}$ ，加入 220  $\mu\text{L}$  含有内标的沉淀剂，孵育、离心。离心后，取 50  $\mu\text{L}$  上清液进样分析。

#### 2 分析条件

UHPLC: Nexera X2 UHPLC

柱温: 60  $^{\circ}\text{C}$

进样体积: 50  $\mu\text{L}$

质谱仪: LCMS-8050

离子源参数:

离子源温度: 200  $^{\circ}\text{C}$

加热气: 10  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

雾化气: 3  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

脱溶剂管温度: 250  $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度: 200  $^{\circ}\text{C}$

干燥气: 10  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

接口电压: 2.5 kV

采集时间: 30 msec

延迟时间: 3 msec

离子源: ESI 源, 正离子模式

扫描模式: MRM

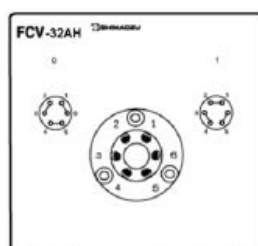


图 1 FCV-32AH 六路高压切换阀配备在样品上样柱 (SPE 泵) 与等度样品洗脱 (MP 泵) 间  
初始状态 SPE 泵: 0.1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  MP 泵: 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  FCV: 1 号位

表 1 快速洗脱液相参数与分析时间

Time (min)	Pump/FCV	Action	Setting
0.00	FCV	position 1	loading
0.00	Pump SPE	flow rate	0.1 mL/min
0.00	Pump MP	flow rate	0.5 mL/min
0.1	Pump SPE	flow rate	2.5 mL/min
0.50	FCV	Position 0	elution
0.5	Pump SPE	flow rate	2.5 mL/min
0.51	Pump SPE	flow rate	0.1 mL/min <sup>1</sup>
1.30	Pump MP	flow rate	0.5 mL/min
1.35	Pump MP	flow rate	1.0 mL/min
1.49	Pump SPE	flow rate	0.1 mL/min
1.50	Pump SPE	flow rate	2.5 mL/min
1.55	Pump MP	flow rate	1.0 mL/min
1.65	Pump MP	flow rate	0.5 mL/min
1.65	FCV	position 1	conditioning
1.99	Pump SPE	flow rate	2.5 mL/min
2.00	Pump SPE	flow rate	0.1 mL/min
2.00	Pump MP	flow rate	0.5 mL/min

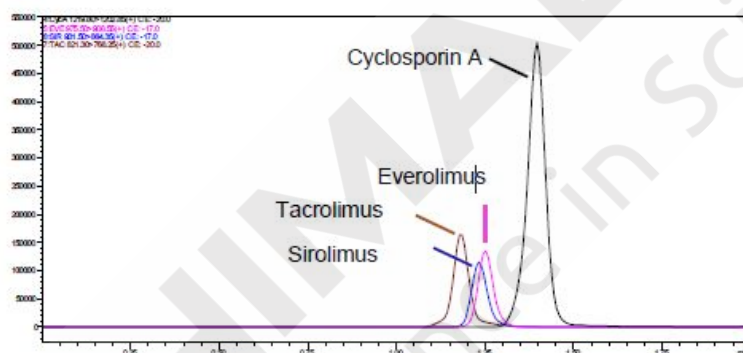


图 2 SPE 柱在线等度洗脱，他克莫司、西罗莫司、依维莫司与环孢霉素 A 在 2 min 内 LC-MS 分离色谱图

表 2 免疫抑制剂 MRM 优化参数与保留时间 (T/I 表示目标物与内标)

Compound		MRM 1	MRM 2	RT
Tacrolimus	T	821.3>768.2	821.5>576.1	1.20
Sirolimus	T	931.5>864.3	931.6>882.3	1.25
Everolimus	T	975.5>908.5	975.8>926.4	1.25
Cyclosporin A	T	1219.8>1202.8	1219.9>1184.6	1.40
<sup>13</sup> Cd <sub>2</sub> -Tacrolimus	I	825.4>772.3	825.4>580.1	1.20
<sup>13</sup> Cd <sub>3</sub> - Sirolimus	I	935.6>864.3	935.6>882.4	1.25
<sup>13</sup> Cd <sub>2</sub> - Everolimus	I	981.6>914.5	981.5>932.6	1.25
d <sub>12</sub> -Cyclosporin	I	1231.8>1214.9	1232.1>1196.8	1.40

### 3 结果

经在线固相萃取与等度洗脱后，免疫抑制剂所得色谱峰峰型尖锐、良好，于 2 min 内完成洗脱分离。经多次测定，所建立的标准曲线在临床检测浓度他克莫司 1.37-65 μg/L、西罗莫司 1.45-66.8 μg/L、依维莫司 1.62-71.7 μg/L、环孢霉素 A 25.8-1746 μg/L 的范围内，均呈良好线性关系。覆盖标准曲线浓度范围的五个质控样品分别进样分析四次，评估分析方法重现性，其 RSD% 值在 2.21%-9.66% 范围内。

表 3 他克莫司、西罗莫司、以他韦与环孢霉素 A 质控样品重现性评估

Tacrolimus	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy
	Level I (3.71 µg/L)	[%]	Level II (7.66 µg/L)	[%]	Level III (15.2 µg/L)	[%]	Level IV (28.6 µg/L)	[%]	Level V (53.4 µg/L)	[%]
Control 1	3.35	90.40	7.47	97.50	14.05	92.50	26.62	93.10	54.95	102.90
Control 2	3.72	100.20	7.60	99.20	14.71	96.70	28.45	99.50	52.62	98.50
Control 3	3.86	104.20	7.76	101.30	15.50	102.00	30.37	106.20	56.72	106.20
Control 4	3.79	102.10	7.85	102.40	15.84	104.20	28.94	101.20	54.83	102.70
Mean	3.68	7.67	15.03	28.59	54.78	Mean	3.68	7.67	15.03	28.59
SD	0.23	0.17	0.80	1.55	1.68	SD	0.23	0.17	0.80	1.55
%RSD	6.15	2.21	5.35	5.41	3.06	%RSD	6.15	2.21	5.35	5.41

Sirolimus	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy
	Level I (4.18 µg/L)	[%]	Level II (12.6 µg/L)	[%]	Level III (21.0µg/L)	[%]	Level IV (31.5µg/L)	[%]	Level V (62.5 µg/L)	[%]
Control 1	3.72	89.00	11.88	94.30	19.71	93.80	27.63	87.70	67.95	108.70
Control 2	3.85	92.10	13.14	104.30	21.30	101.40	26.88	85.30	57.61	92.20
Control 3	3.64	87.20	11.76	93.30	18.86	89.80	30.42	96.60	62.17	99.50
Control 4	3.65	87.20	10.97	87.00	17.08	81.30	29.00	92.10	58.29	93.30
Mean	3.71	11.94	19.24	28.48	61.50	Mean	3.71	11.94	19.24	28.48
SD	0.10	0.90	1.76	1.56	4.75	SD	0.10	0.90	1.76	1.56
%RSD	2.62	7.52	9.14	5.48	7.72	%RSD	2.62	7.52	9.14	5.48

Everolimus	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy
	Level I (4.18 µg/L)	[%]	Level II (12.6 µg/L)	[%]	Level III (21.0µg/L)	[%]	Level IV (31.5µg/L)	[%]	Level V (62.5 µg/L)	[%]

Control 1	4.20	108.00	12.60	102.40	18.64	91.80	28.29	95.20	59.17	103.10
Control 2	3.87	99.50	13.04	106.00	20.95	103.20	26.35	88.70	61.02	106.30
Control 3	3.96	101.70	12.38	100.60	20.07	98.80	28.95	97.50	57.50	100.20
Control 4	4.07	104.60	12.11	98.40	19.79	97.50	27.78	93.50	58.08	101.20
Mean	4.02	12.53	19.86	27.84	58.94	Mean	4.02	12.53	19.86	27.84
SD	0.14	0.40	0.95	1.10	1.55	SD	0.14	0.40	0.95	1.10
%RSD	3.56	3.16	4.81	3.96	2.63	%RSD	3.56	3.16	4.81	3.96

Cyclosporin	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy	Control	Accuracy
	Level I (58.7 µg/L)	[%]	Level II (116 µg/L)	[%]	Level III (228 µg/L)	[%]	Level IV (676 µg/L)	[%]	Level V (1571 µg/L)	[%]
Control 1	59.01	100.5	118.07	101.8	213.73	93.7	651.67	96.4	1596.58	101.6
Control 2	54.03	92.0	126.69	109.2	220.84	96.9	623.76	92.3	1524.04	97.0
Control 3	55.90	95.2	106.26	91.6	210.99	92.5	648.83	96.0	1617.68	103.0
Control 4	51.32	87.4	102.87	88.7	205.89	90.3	619.42	91.6	1593.47	101.4
Mean	55.06	113.47	212.86	635.92	1582.94	Mean	55.06	113.47	212.86	635.92
SD	3.23	10.96	6.23	16.68	40.71	SD	3.23	10.96	6.23	16.68
%RSD	5.87	9.66	2.93	2.62	2.57	%RSD	5.87	9.66	2.93	2.62

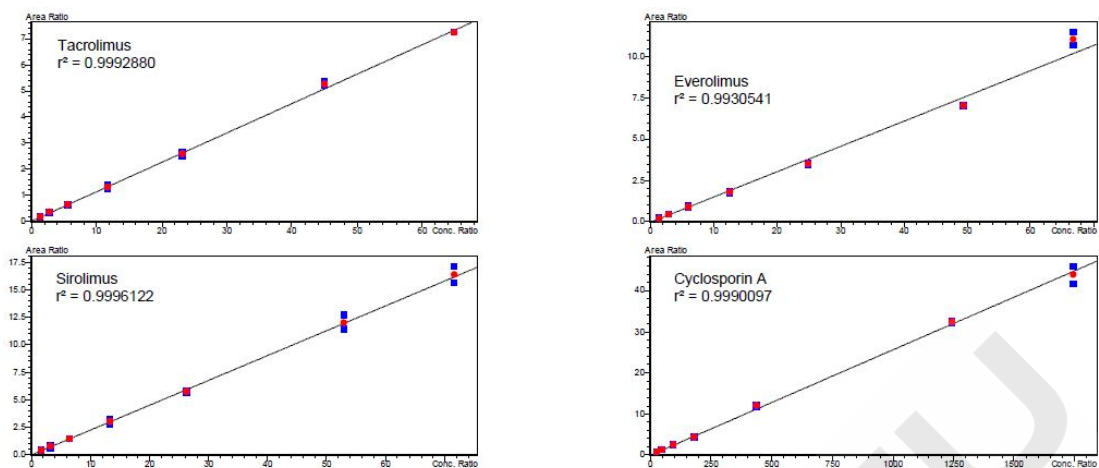


图3 他克莫司、西罗莫司、依维莫司与环孢霉素 A 标准曲线

#### 4 结论

使用岛津 LCMS-8050 和全血在线分析免疫抑制剂 ClinMass®完整检测试剂盒，分析方法简便，在临床检测浓度范围内检测灵敏度高，并呈良好的线性关系。



SHIMADZU  
Excellence in Science

# LCMS-8050 快速分析血浆中的霉酚酸

霉酚酸酯是一种用于治疗肾移植后难治性排斥反应的免疫抑制剂。本文使用高灵敏度三重四极杆液相色谱质谱联用仪LCMS-8050对血浆中的霉酚酸进行快速分析。该分析操作中的前处理方法简单，只需进行除蛋白处理即可得到高准确度和精度的定量结果。

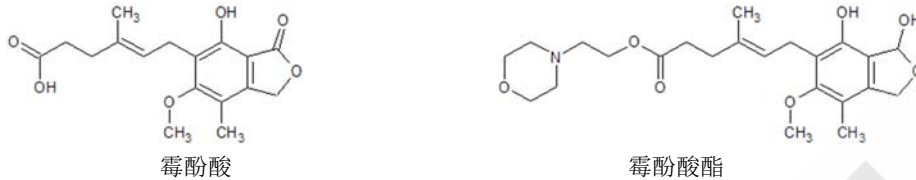


图1 霉酚酸酯和霉酚酸的结构式

## 1 制备样品

使用血浆中浓度为0.2、0.6、2、6、20  $\mu\text{g/mL}$  的标准样品 (STD样品) 绘制标准曲线; 将血浆中浓度为0.5、5、15  $\mu\text{g/mL}$  的质控样品 (QC 样品) 用于认证。在STD 样品和QC 样品中添加内标物质和乙腈, 除蛋白后用水稀释上清液, 作为分析样品。内标物质使用霉酚酸的稳定同位素标记化合物 (霉酚酸-d3)。因为不需要进行固相萃取等耗时耗力的前处理, 操作方法简单, 所以可在短时间内低成本地完成前处理。具体前处理流程如图2所示。

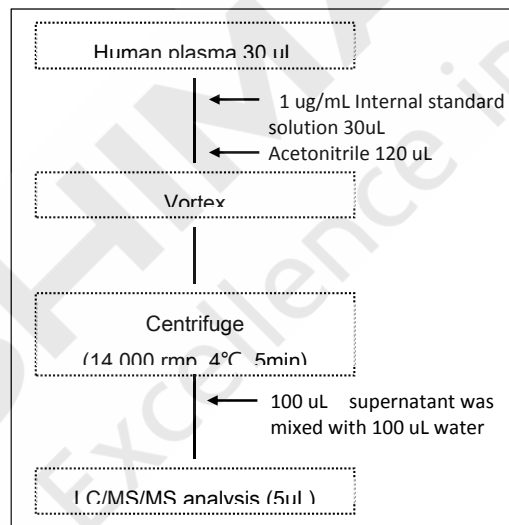


图2 前处理的流程图

## 2 LC/MS/MS分析条件

色谱柱 : Shim-pack GIS (75 mm L.  $\times$  2.1 mm I.D., 3  $\mu\text{m}$ )

流动相 : 1% 醋酸水溶液 / 乙腈 = 1 / 1

分析时间 : 4 min

流速 : 0.3 mL/min

柱温 : 40°C

进样体积 : 5  $\mu\text{L}$

离子源电压 : +4.0 kV (ESI-正离子)

DL 温度 : 150°C

加热模块温度 : 200°C

接口温度 : 400°C

雾化气流速 : 3 L/min

干燥气流速 : 5 L/min

加热的流速 : 15 L/min

表 1 MRM 参数

化合物名称	离子化模式	MRM 离子对
霉酚酸	+	321.40>207.30
霉酚酸-d3	+	324.40>210.30

### 3 测试结果

由图3可知, 在0.2~20  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围, 回归系数在0.999以上, 说明线性良好。表3为血浆标准曲线在各浓度下的准确度和重复性, 结果显示所有校准点重复性均在5%以下, 准确度均在 $100 \pm 10\%$ 以内, 结果良好。

表2 血浆基质中各标准样品的测定结果

	血浆中的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度 (%)	浓度的重复性 (%)
STD1	0.2	94.9	3.68
STD2	0.6	101.8	4.38
STD3	2	101.1	3.55
STD4	6	104.7	3.05
STD5	20	97.5	3.22

表3 QC 样品的测定结果

	血浆中的浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度 (%)	浓度的重复性 (%)
QC 1	0.5	108.5	1.60
QC 2	5	104.9	3.66
QC 3	15	103.5	2.55

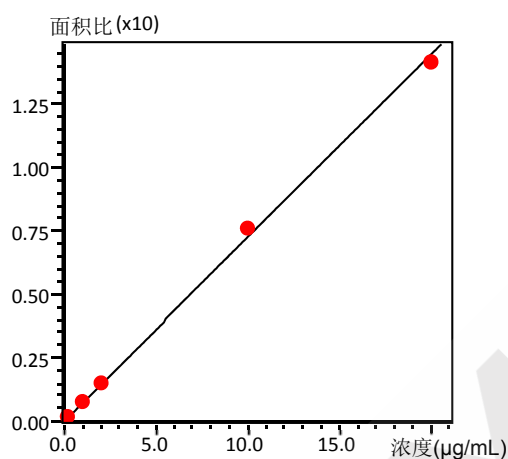


图3 霉酚酸的标准曲线

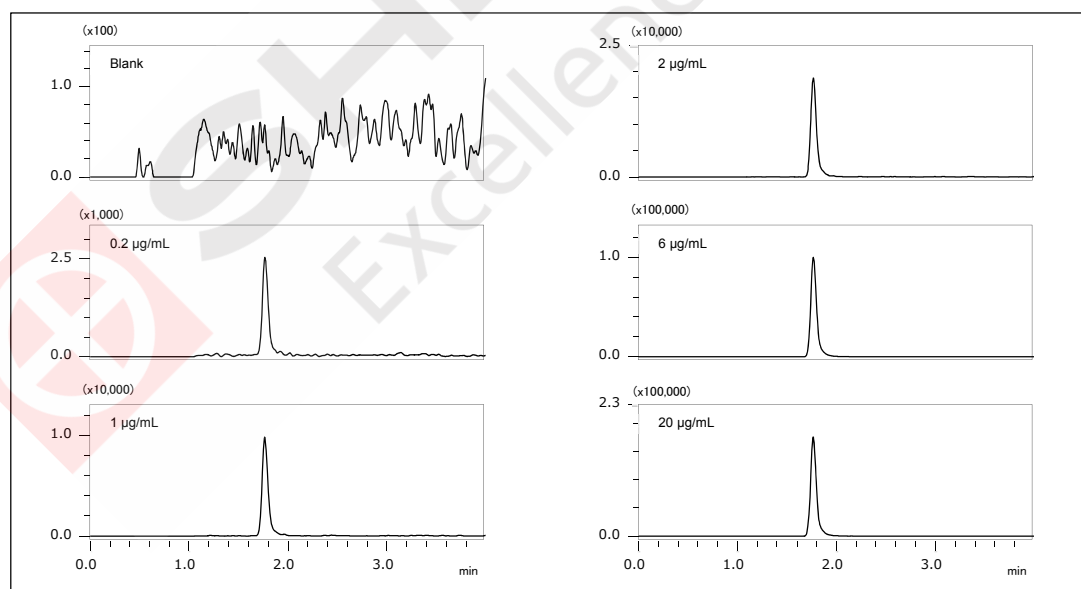


图4 空白样品和血浆中含霉酚酸的各浓度样品的色谱图

由表3所示, QC样品的重复性在5%以下、浓度准确度在100~110%之间, 说明分析结果的精度和准确度高。

## ■ 抗肿瘤类药物

### LCMS-8050 快速分析血浆中的舒尼替尼及阿西替尼

本文使用三重四极杆液相色谱质谱联用仪LCMS-8050 对分子靶向治疗药物舒尼替尼和阿西替尼进行分析的示例。该分析操作中的前处理方法简单，只需进行除蛋白处理即可得到高准确度和精度的定量结果。

#### 1 制备样品

表3 中列举了各标准样品 (STD 样品) 与QC样品的浓度。其中, STD 样品用于绘制标准曲线, QC样品用于认证。向STD样品和QC样品中添加内标物质以及乙腈, 除蛋白后用10 mmol/L 甲酸铵水溶液稀释上清液, 用于分析样品。内标物质使用伊马替尼的稳定同位素标记化合物 (伊马替尼-d8)。

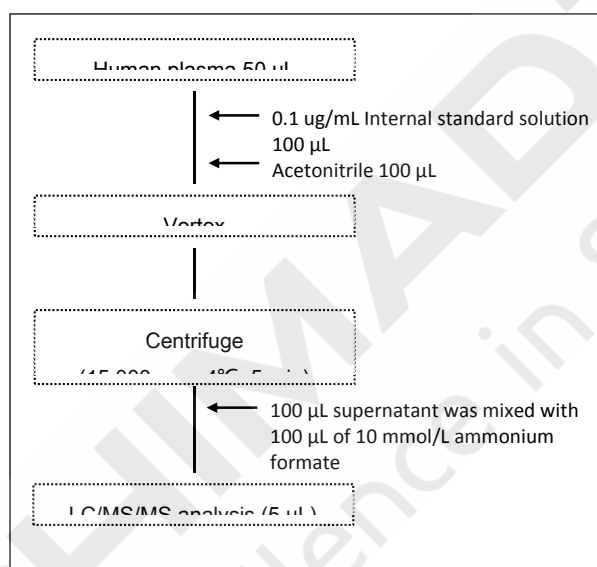


图1 前处理的工作流程

#### 2 LC/MS/MS分析条件

色谱柱 : Shim-pack GIS (75 mm L. × 2.1 mm

进样体积 : 5  $\mu$ L

I.D., 3  $\mu$ m)

离子源电压 : +4.0 kV (ESI-正离子)

流动相 : A: 10mmol/L甲酸铵-水溶液

DL 温度 : 150°C

B: 甲醇

加热模块温度 : 200°C

时间程序 : B.Conc. 10% (0.25 min)  $\rightarrow$  80%

接口温度 : 300°C

(2.00 - 3.00 min)  $\rightarrow$  10% (3.01 - 5.00 min)

雾化气流速 : 3 L/min

流速 : 0.3 mL/min

干燥气流速 : 5 L/min

柱温 : 40°C

加热气流速 : 15 L/min

表1 MRM 参数

化合物名称	离子化模式	MRM 离子对
舒尼替尼	+	399.40>283.30
阿西替尼	+	387.40>356.30
SU12662	+	371.40>283.30
伊马替尼-d3	+	502.50>394.40

### 3 测定结果

由于舒尼替尼、舒尼替尼的代谢物SU12662以及阿西替尼的异构体分离，因此，在同一色谱图中出现了2个峰。对分离的异构体峰进行分组，合计峰面积后绘制标准曲线。由图可知，所有标准曲线的相关系数均在0.999以上，说明线性良好。

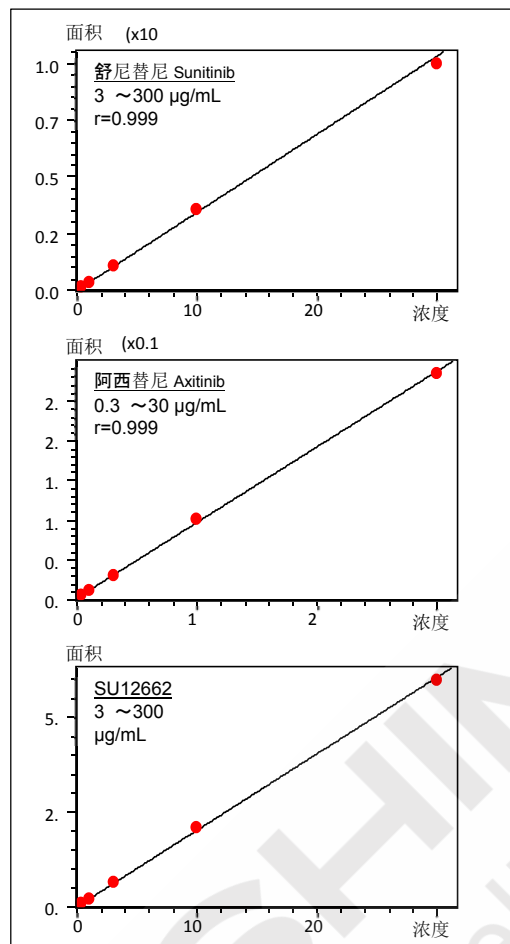


图2 各化合物的标准曲线

表2 血浆中各化合物以及QC样品的测定结果

		血浆中的浓度 (µg/mL)	准确度 (%)	浓度的重复性 (%)
舒尼替尼 (Sunitinib)	STD1	3	100.1	5.73
	STD2	10	98.9	2.19
	STD3	30	102.0	2.58
	STD4	100	102.3	2.34
	STD5	300	96.7	2.74
	QC1	5	100.7	4.05
舒尼替尼 (Sunitinib)	QC2	50	95.5	1.36
	QC3	250	96.0	2.24
	STD1	0.3	102.5	8.71
阿西替尼 (Axitinib)	STD2	1	94.2	6.36
	STD3	3	101.2	3.67
	STD4	10	103.1	2.97
	STD5	30	99.0	3.06
	QC1	0.5	85.3	8.26
	QC2	5	88.5	4.56
阿西替尼 (Axitinib)	QC3	25	91.2	4.43
	STD1	3	97.1	4.70
	STD2	10	98.7	2.73
SU12662	STD3	30	102.1	1.66
	STD4	100	103.5	1.92
	STD5	300	98.7	2.67
	QC1	5	97.2	4.07
	QC2	50	96.5	1.26
	QC3	250	97.8	3.17

表2为血浆标准曲线以及QC样品在各浓度的准确度及重复性。由表2可知，所有校准点以及QC的重复性均在10%以下，准确度均在100±15%以内，结果良好。

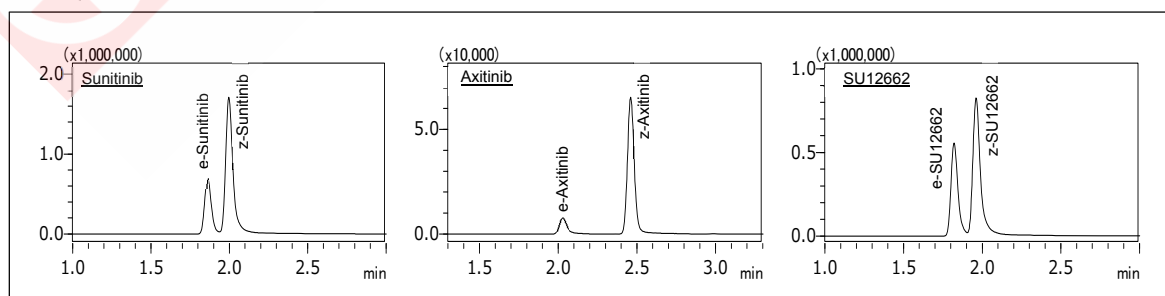


图3 各化合物的色谱图

## ■ 抗真菌类药物

### LCMS-8050 快速分析血浆中的伏立康唑

伏立康唑为一种三唑类抗真菌药，被广泛用于治疗曲霉属和念珠菌属真菌引起的感染。本文使用高灵敏度三重四极杆液相色谱质谱联用仪 LCMS-8050 对血浆中的伏立康唑进行快速分析的示例。该分析操作中的前处理方法简单，只需进行除蛋白处理即可得到高准确度和精度的定量结果。

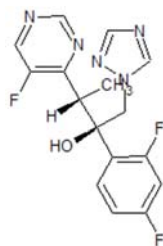


图1 伏立康唑的结构式

#### 1 制备样品

使血浆中浓度为0.1、0.5、1、2.5、5、10  $\mu\text{g/mL}$ 的标准样品（STD样品）绘制标准曲线；将使血浆中浓度为0.2、4、8  $\mu\text{g/mL}$ 的质控样品（QC样品）用于认证。在STD样品及QC样品中添加内标物质和乙腈，除蛋白后将上清液作为分析样品。内标物质使用伏立康唑的稳定同位素标记化合物（伏立康唑-d<sub>3</sub>）。因为不需要进行固相萃取等耗时耗力的前处理，操作方法简单，所以可在短时间内低成本地完成前处理。

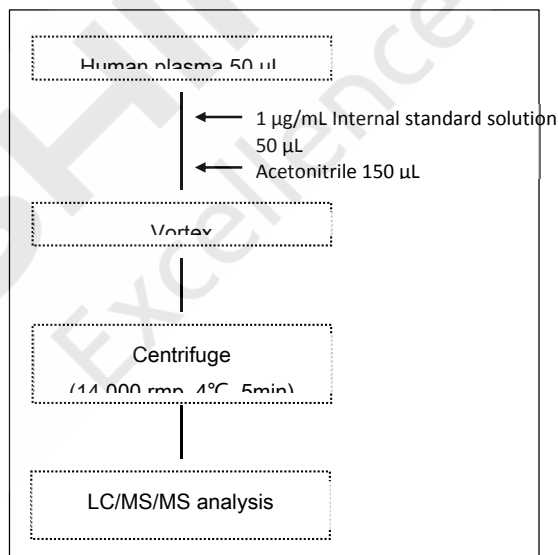


图2 前处理的流程图

#### 2 LC/MS/MS 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIS (75 mm L.  $\times$  2.1 mm I.D., 3  $\mu\text{m}$ )  
流速：0.4 mL/min  
流动相：A:10mmol/L 醋酸铵-水, 柱温：40  $^{\circ}\text{C}$   
B:甲醇 进样体积：1  $\mu\text{L}$   
时间程序：B. Conc. 30 % (0 - 0.50 min)  $\rightarrow$  离子源电压：+4.0 kV (ESI-正离子)  
100 % (1.50 - 3.00 min)  $\rightarrow$  30 % (3.01 - 5.00)

DL 温度 : 250 °C  
 加热模块温度 : 400 °C  
 接口温度 : 300 °C

雾化气流速 : 3 L/min  
 干燥气流速 : 10 L/min  
 加热气流速 : 10 L/min

表 1 MRM 参数

化合物名称	离子化模式	MRM 离子对
伏立康唑	+	350.20>281.20
伏立康唑-d3	+	353.20>284.20

### 3 制备样品

由图3可知, 在0.1~10 µg/mL 的浓度范围, 回归系数在0.999以上, 说明线性良好。表3为血浆标准曲线在各浓度的准确度及重复性。由此可知, 所有校准点均的重复性均在5 %以下, 准确度均在100 ± 10%以内, 结果良好。

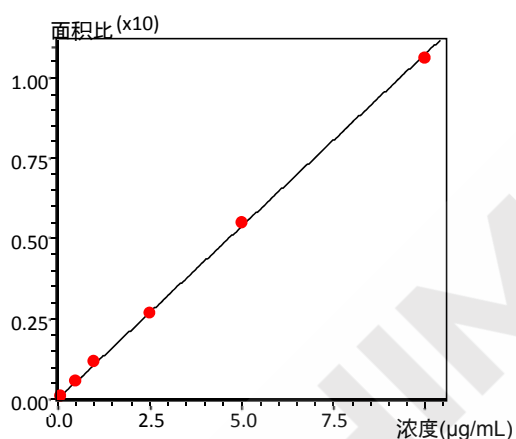


图 3 伏立康唑的标准曲线

表 2 血浆各标准样品的测定结果

	血浆中的浓度 (µg/mL)	准确度 (%)	浓度的重复性 (%)
STD1	0.1	93.1	3.04
STD2	0.5	101.2	1.58
STD3	1	105.8	2.61
STD4	2.5	99.6	1.50
STD5	5	101.7	1.22
STD6	10	98.7	1.16

表 3 QC 样品的测定结果

	血浆中的浓度 (µg/mL)	准确度 (%)	浓度的重复性 (%)
QC 1	0.2	98.6	1.74
QC 2	4	103.6	1.56
QC 3	8	99.0	1.70

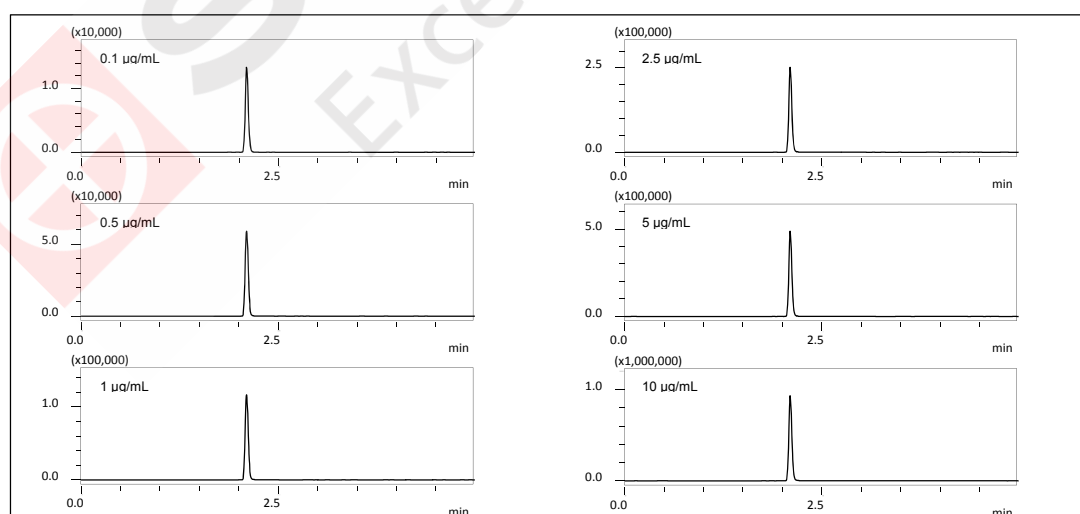


图 4 血浆中含伏立康唑的各浓度样品的色谱图

由图4可知, QC样品的重复性在5%以下、浓度准确度为100~110%之间, 说明分析结果的精度和准确度高。

## LCMS-8050 快速分析血浆中的伊曲康唑

伊曲康唑为一种三唑类抗真菌药，被广泛用于治疗白菌、曲霉以及念珠菌等真菌引起的感染。本文使用高灵敏度三重四极杆液相色谱质谱联用仪LCMS-8050 对血浆中的伊曲康唑及其活性代谢物羟基伊曲康唑进行快速分析的示例。该分析操作中的前处理方法简单，只需进行除蛋白处理即可得到高准确度和精度的定量结果。

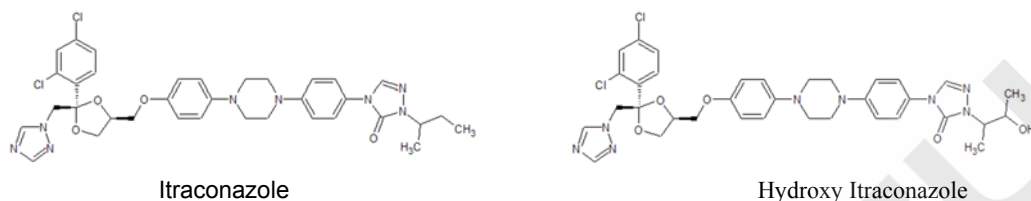


图1 伊曲康唑以及羟基伊曲康唑的结构式

### 1 制备样品

将已知浓度的伊曲康唑以及羟基伊曲康唑溶解于“水:甲醇=1:1”的溶液中，制备添加用标准液。将该溶液和内标物质的乙腈溶液添加到人血浆中，除蛋白后用1%乙酸水溶液稀释上清液，制备用于绘制标准曲线的标准样品以及用于认证的QC样品。内标物质使用伊曲康唑的稳定同位素标记化合物（伊曲康唑-d3）。本方法采用的前处理方法（如图2）简单，无需进行如固相萃取那样耗时耗力的操作步骤，时间短，成本低。

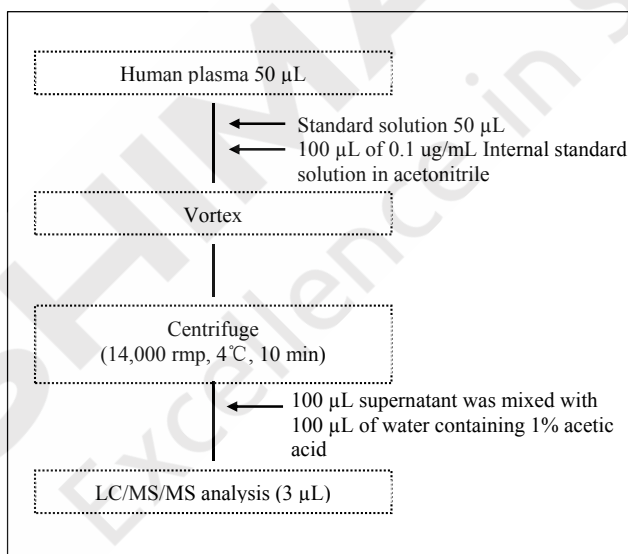


图2 前处理流程

### 2 LC/MS/MS 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIS (75 mm L. × 2.1 mm I.D., 3 µm)

流动相：1% 醋酸水溶液 / 乙腈=1 / 1

分析时间：4 min

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样体积：5 µL

离子源电压：+4.0 kV (ESI-正离子)

DL 温度：150°C

加热模块温度：200°C

接口温度：400°C

雾化气流速：3 L/min

干燥气流速：5 L/min

加热气流速：15 L/min

表 1 MRM 参数

化合物名称	离子化模式	MRM 离子对
伊曲康唑	+	705.40>392.40
羟基伊曲康唑	+	721.40>408.40
伊曲康唑-d3	+	710.40>397.35

### 3 测定结果

由图3可知在10~1000  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围，相关系数在0.999以上，说明线性良好。

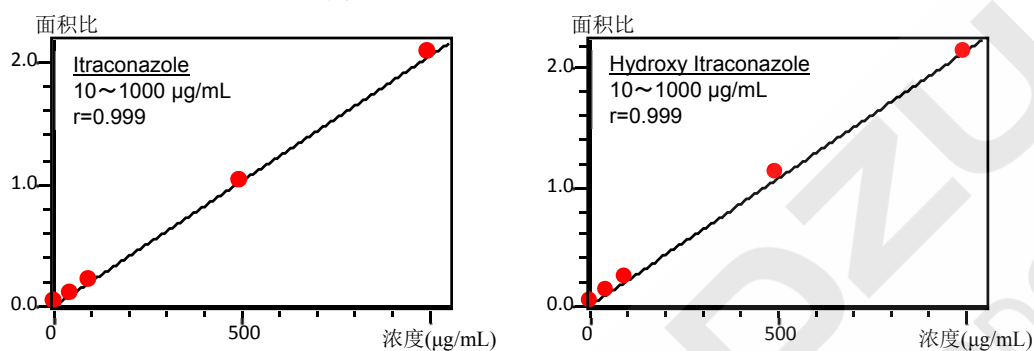


图 3 伊曲康唑和羟基伊曲康唑的校准曲线

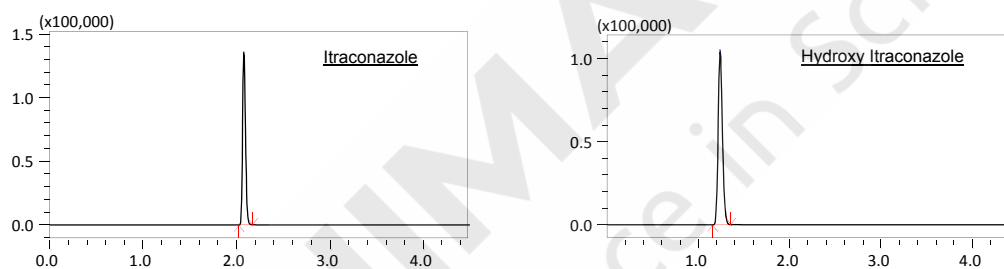


图 4 伊曲康唑和羟基伊曲康唑的色谱图

由表2可知，所有校准点的重复性均在15%以下，且准确度在 $100 \pm 10\%$ 以内，结果良好。

表 2 血浆各标准样品的测定结果

		血浆中浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度 (%)	重复性 (%)
Itraconazole	STD1	10	107.3	2.07
	STD2	50	98.9	1.52
	STD3	100	93.7	0.62
	STD4	500	99.1	0.30
	STD5	1000	101.1	0.59
Hydroxy Itraconazole	STD1	10	100.5	11.41
	STD2	50	98.3	4.47
	STD3	100	100.1	0.82
	STD4	500	102.1	1.15
	STD5	1000	99.0	5.55

表 3 QC 样品的测定结果

		血浆中浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	准确度 (%)	重复性 (%)
Itraconazole	QC1	25	98.7	0.65
	QC2	250	98.8	0.82
	QC3	750	103.3	0.38

Hydroxy Itraconaz ole	QC1	25	81.3	3.27
	QC2	250	90.4	4.36
	QC3	750	86.9	3.10

由表 3 可知，重复性在 5%以下、浓度准确度在 80~105%之间，说明分析结果的精度和准确度高。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## ■ 抗病毒类药物

### 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定血浆中替比夫定

**摘要:** 本文建立并验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定血浆中替比夫定的方法。方法采用同位素内标法替比夫定-D<sub>3</sub> 定量, 方法定量限 1.0 ng/mL, 线性范围为 1.0~10000 ng/mL, 相关系数 0.9999。方法选择性实验表明空白血浆中不存在明显干扰; 方法的日内精密密度 1.52~2.18%, 日间精密密度 1.58~2.11%, 各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4%, 能够很好地满足血浆中药物浓度准确定量的要求; 各浓度水平替比夫定的回收率均在 100%左右, 基质效应因子均大于 80%, 内标归一化基质效应因子在 100%左右; 稳定性实验结果表明样品在室温下放置 8 小时稳定, 3 次冻融循环浓度无显著变化, 处理后的样品在自动进样器内 (10℃) 放置 72 小时替比夫定无显著变化。将方法用于给药后病人血药浓度分析, 结果表明相同给药剂量和采样时间不同病人体内血药浓度差异显著, 利用本方法能够为临床个性化给药方案的确定提供有力保障。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点, 适合血浆中替比夫定含量的快速检测, 可用于人体替比夫定血药浓度的测定及其人体药代动力学研究。

**关键词:** 超快速液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 替比夫定

替比夫定 (Telbivudine) 即  $\beta$ -L-2'-胸腺嘧啶脱氧核苷 (LdT) 是一种 L 型核苷, 具有高效、选择性以及抑制乙型肝炎病毒复制的特异性抗病毒活性, 能够比拉米夫定更有效地抑制乙肝病毒 DNA 复制。研究替比夫定的药代参数对于治疗不同程度的肝损伤乙肝患者就有非常重要的临床指导意义。

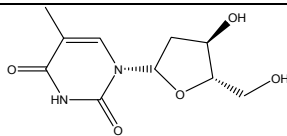
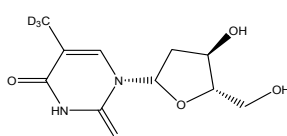
目前生物样品中替比夫定血药浓度测定方法的文献报道较少, 主要以液质联用的方法为主, 但是缺少能够快速、高灵敏地检测该药物血药浓度的方法。本工作针对以往检测方法检测限低, 样品前处理过程复杂、费时等特点, 建立了一种快速、灵敏、选择性好、特异性强的 LC-MS/MS 方法, 用于定量测定人血浆中替比夫定浓度, 以支持该药物的药代动力学特征研究, 及相关的临床追踪研究。

## 1 实验部分

### 1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1。

表 1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
替比夫定	Telbivudine	3424-98-4	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	
替比夫定-D <sub>3</sub> (IS)	Telbivudine-D <sub>3</sub>	/	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> CD <sub>3</sub>	

## 1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.60 SP2 色谱工作站。

## 1.3 分析条件

液相条件	分析仪器: LCMS-8050
色谱柱: Inertsil Sustain C18 Column (3.0 mm I.D.×100 mm L., 3 μm)	离子源: ESI, 正离子模式分析
流动相: A 相-0.1% 甲酸水溶液	雾化气流速: 3.0 L/min
B 相-乙腈流速: 0.4 mL/min	加热气流速: 8.0 L/min
柱温: 40℃	接口温度: 250℃
进样量: 2 μL	DL 温度: 150℃
自动进样器温度: 10℃	加热模块温度: 350℃
洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 洗脱程序见表 2。	干燥气流速: 12.0 L/min
质谱条件	扫描模式: 多反应监测(MRM)
	驻留时间: 100 ms
	MRM 参数: 见表 3

表 2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
4.10	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Controller	Stop	

表 3 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
替比夫定	243.10	127.10	-26.0	-10.0	-13.0
替比夫定-D3	246.10	130.10	-16.0	-9.0	-25.0

## 1.4 标准样品和质控样品的配制

用纯水配制两份 1.0 mg/mL 替比夫定储备液。一份储备液用纯水逐级稀释成浓度为 0.1 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、500 μg/mL、1000 μg/mL 的工作曲线; 另一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 0.3 μg/mL、40 μg/mL、800 μg/mL 的质控溶液。取 10 μL 标准工作曲线加入 990 μL 空白血浆中, 依次配制成标准曲线; 取 10 μL 质控溶液加入 990 μL 空白血浆中, 依配制成低浓度 (LQC)、中浓度 (MQC)、高浓度 (HQC) 质控样。

用纯水配制 1.0 mg/mL 替比夫定-D3 储备液, 并稀释至 100 μg/mL, 配制成内标工作液。

含酶内标工作液配制: 取 40 μL 内标工作液, 加到试管中, 加入 200 μL 替比夫定水解酶 (>1 U/μL), 再加入 360 μL 纯水, 得到含酶工作液。同时取 40 μL 内标工作液, 加到试管中, 加入 560 μL 纯水, 制得不含酶工作液。

## 1.5 样品前处理方法

由于替比夫定进入体内会被磷酸化, 为测定血浆中的替比夫定, 在前处理过程中首先通

过磷酸水解酶去磷酸化后，再进一步对血浆中的替比夫定进行提取。

取 100  $\mu\text{L}$  血浆样品，加入 40  $\mu\text{L}$  含酶内标工作液，涡旋振荡 1 分钟，37 $^{\circ}\text{C}$  水浴孵育 1 小时，水解酶在孵育的过程中将血浆中的磷酸化替比夫定完全去磷酸化后，加入 200  $\mu\text{L}$  乙腈，13000 r/min 离心 5 分钟，取 200  $\mu\text{L}$  上清液进样分析，进样体积 2  $\mu\text{L}$ 。

## 1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。

最低定量限 (LLOQ) 的考察，分别处理 6 份 LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20%，测量误差不超过理论值的 80~120%，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的标准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 1/x。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (3 ng/mL、400 ng/mL、8000 ng/mL)，日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度/理论浓度 $\times$ 100%计算。准确度在 85~115% 范围内，精密度不超过 15%。

替比夫定回收率考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，通过比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

稳定性考察，三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次)，比较室温下放置 8 小时/3 次冻融循环的质控样品的测定浓度与理论浓度之间的差异，三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异应均在 $\pm 15\%$  以内，CV% 值均小于 15%。提取样品的自动进样器稳定性，处理后的分析批在自动进样器中放置 72 小时内再次分析，再次分析的结果应满足整个分析批的接收标准。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

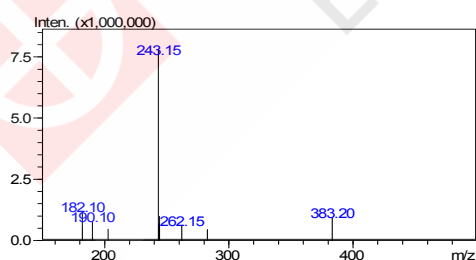


图 1 替比夫定的一级质谱图

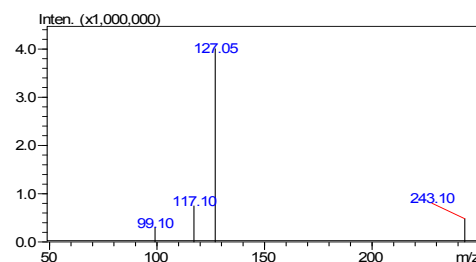


图 2 替比夫定的产物离子扫描图(CE 值-8 V)

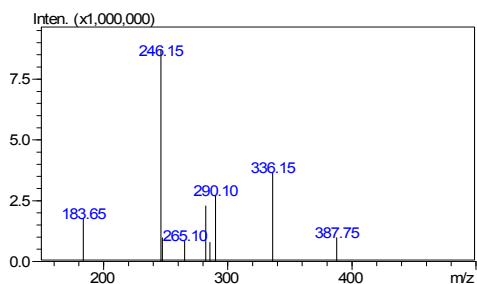


图3 替比夫定-D<sub>3</sub>的一级质谱图

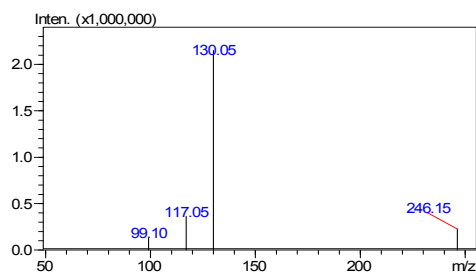


图4 替比夫定-D<sub>3</sub>的产物离子扫描图(CE值-8 V)

## 2.2 方法选择性

考察空白基质和 1 ng/mL 血浆基质加标样品，结果如图 5、6 所示，替比夫定及其同位素内标的检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

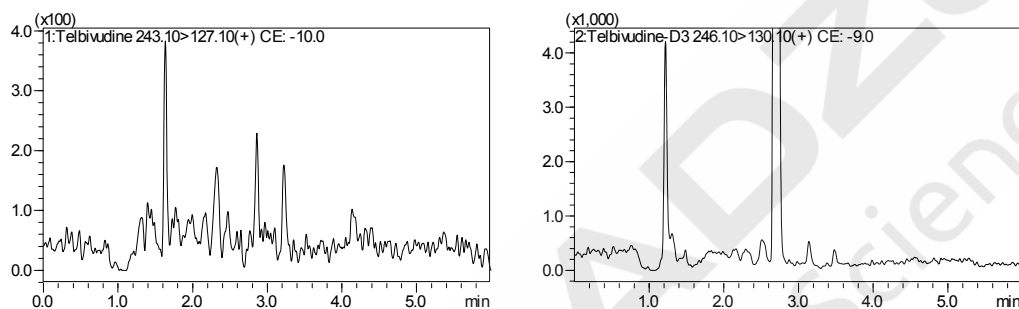


图5 空白血浆样品的 MRM 色谱图

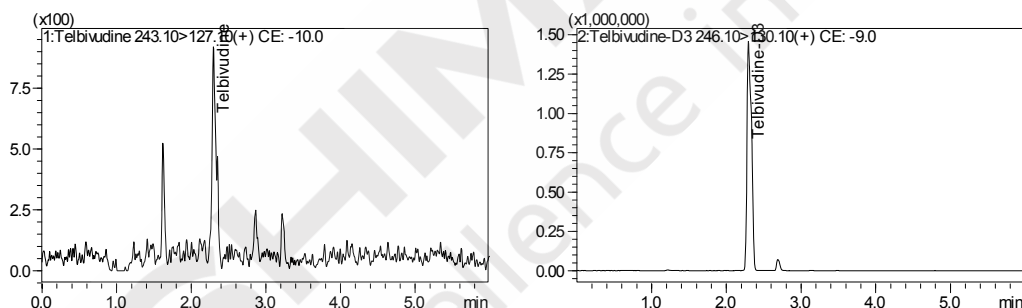


图6 1 ng/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图

考察同位素内标对替比夫定测定结果的影响，处理过程加入同位素内标的空白样品（QC0 样品）如图 7 所示，与图 6 1 ng/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图比较，替比夫定的检测通道中目标化合物的干扰不对最低定量限造成干扰。结果表明同位素内标不会对替比夫定的准确测定造成影响。

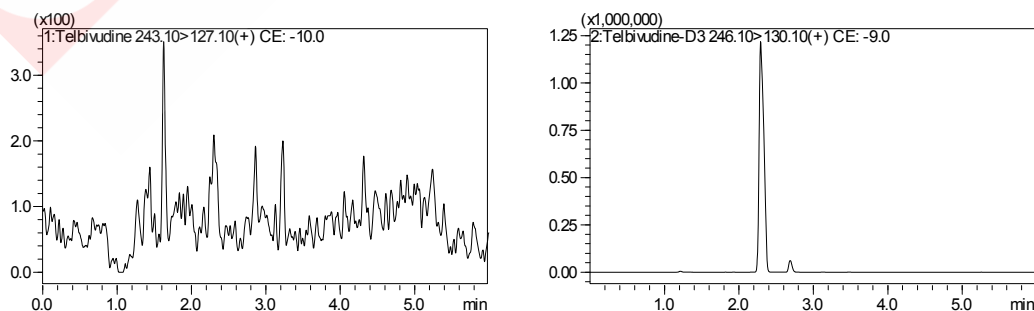


图7 QC0 的 MRM 色谱图

考察目标化合物对同位素内标响应值的影响，选择 10000 ng/mL 的血浆基质加标样品在

处理过程不加入同位素内标,结果如图8所示,重复6个样品分析所得到的同位素内标通道的干扰峰面积平均值为5198,此分析批同位素内标的面积最小值为4075831,干扰峰面积仅占同位素内标的最小峰面积的0.1%,替比夫定不会对其同位素内标的响应值造成明显干扰。

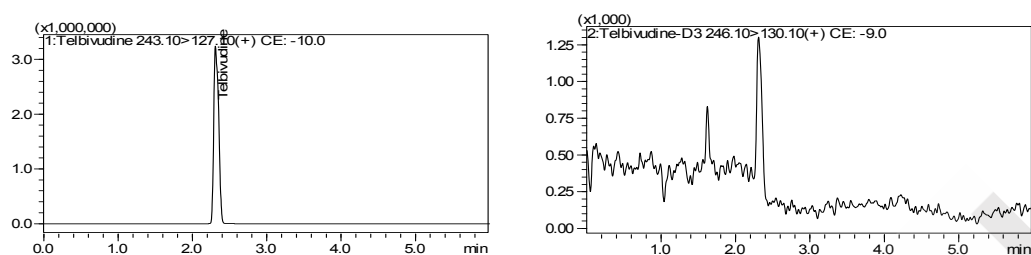


图8 10000 ng/mL 的血浆基质加标样品(无内标)的MRM 色谱图

### 2.3 线性范围和最低定量限

按照1.4中的条件制备1 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL、2000 ng/mL、5000 ng/mL、10000 ng/mL的血浆加标样品,按1.5中的前处理条件处理样品,按照1.3中的仪器条件进行测定,同位素内标法进行定量。所得校准曲线如图9所示,线性方程及相关系数见表4,其中y值代表替比夫定峰面积与替比夫定-D3峰面积的比值,x值代表血浆中替比夫定浓度。方法检出限确定为1 ng/mL,在此浓度水平,精密度和准确度均在接受标准内,6次重复分析RSD为5.98%,准确度为98.2~114.8%,S/N平均值为22.4。

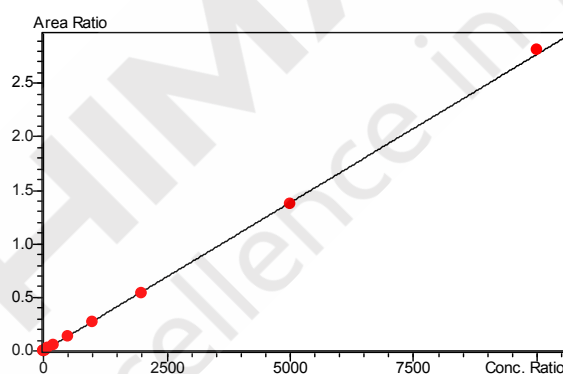


图9 替比夫定标准曲线

表4 校准曲线参数(线性回归,权重为1/C)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
替比夫定	$Y = (2.77 \times 10^{-4})X + (3.39 \times 10^{-5})$	1~10000	93.1~116.6%	0.9998

### 2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度,结果如表5所示。方法的日内精密度1.52~2.18%,日间精密度1.58~2.11%,各浓度水平质控样品的准确度91.6~114.4%。

表5 方法日间精密度和日内精密度结果(3天,每天重复6次)

理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 CV%	日间精密度 CV%	准确度%

3	2.18	2.11	107.7~114.4
400	1.52	1.58	91.6~95.9
8000	1.76	1.68	95.4~101.3

## 2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品LQC、MQC、HQC（每个浓度重复6次）的回收率，结果如表6所示，各浓度水平替比夫定的回收率分别为 $100.6\pm 2.5\%$ 、 $104.5\pm 1.5\%$  and  $104.3\pm 1.6\%$ ，内标的回收率为 $106.7\pm 1.4\%$ 。实验结果表明替比夫定及其内标的回收率一致，并且与浓度无相关性，满足准确定量的要求。

表 6 方法回收率结果(n=6)

浓度水平	浓度 (ng/mL)	平均回收率%
LQC	3	100.6
MQC	400	104.5
HQC	8000	104.3

## 2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子均在 100%左右。

表 7 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	3	82.3%	99.0%
MQC	400	81.7%	101.0%
HQC	8000	90.8%	101.5%
内标基质效应因子		83.1%	

## 2.7 稳定性考察

由于采样过程中样品会放置在室温条件下，因此方法验证过程中考察样品的 8 小时室温稳定性，比较三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）放置在室温下 8 小时后进行测定的浓度值与理论值的差异，结果表明三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在 $\pm 5\%$ 以内，并且 CV%值均小于 1.5%。血浆中替比夫定在室温下 8 小时内具有稳定性。

样品采集后保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ ，测定前室温放置融化后再混匀进行测定，因此需要对样品的冻融稳定性进行考察。比较三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次）经过 3 次冻融循环后进行测定的浓度值与理论值的差异，结果表明测定值与理论值的差异均在 $\pm 5\%$ 以内，并且 CV%值均小于 2.0%。说明血浆中替比夫定的浓度在 3 次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

## 2.8 提取样品在自动进样器内的稳定性

考察提取样品在自动进样器（10℃）中的稳定性，整个分析批完成分析后依然放置在自动进样器中，72 小时内重复分析，实验结果表明 72 小时内重复分析的分析批中标准曲线、质控样品均满足准确定量的要求，由此表明所提取的样品在自动进样器内放置 72 小时内具有稳定性。

## 2.9 实际样品分析

利用经过验证的血浆中替比夫定的测定方法，对服用替比夫定一定时间后所采集的 64 例病人血浆中药物浓度进行测定，典型色谱图如图 10、11 所示，其中病人 1 血药浓度为 108 ng/mL，病人 2 血药浓度为 4320 ng/mL。结果表明在同一给药剂量的情况下，服药后相同采样时间的情况下，不同病人体内的血药浓度差异非常大，对于临床合理用药提供指导。

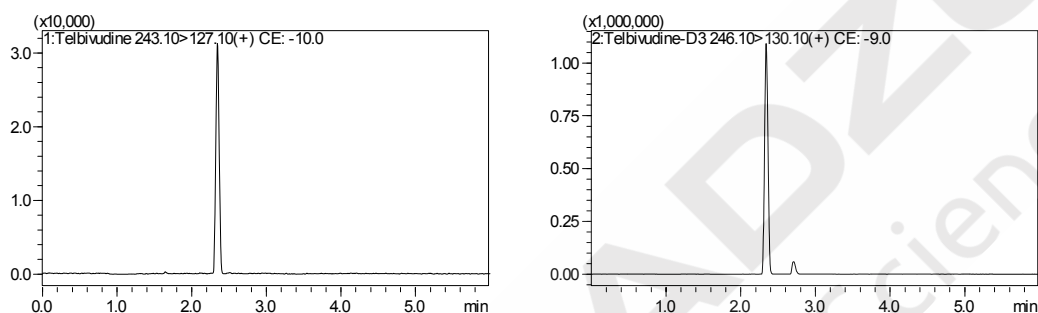


图 10 病人 1 的 MRM 色谱图

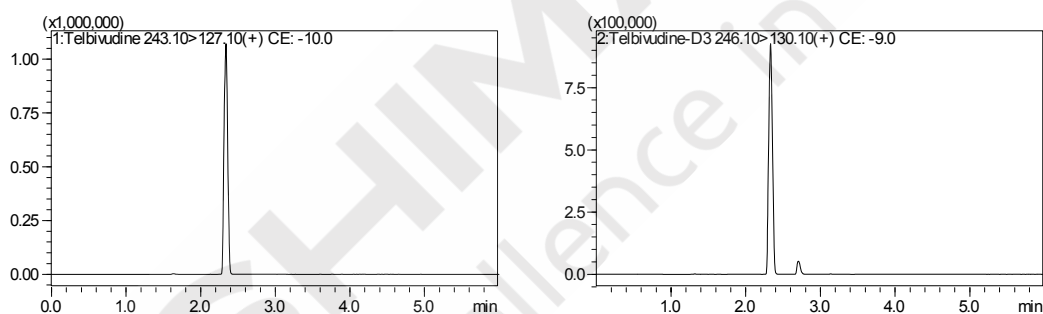


图 11 病人 2 的 MRM 色谱图

## 3 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 MS-8050 联用测定血浆中替比夫定的方法。该方法在 6 min 内完成血浆中替比夫定的检测，采用同位素内标法定量，方法定量限 1 ng/mL，线性范围为 1~10000 ng/mL，相关系数在 0.9998。选择性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质，并且替比夫定和其同位素内标之间无相互干扰。方法的日内精密度 1.52~2.18%，日间精密度 1.58~2.11%，各浓度水平质控样品的准确度 91.6~114.4%，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平替比夫定的回收率均在 100%左右，基质效应因子均大于 80%，内标归一化基质效应因子在 100%左右；稳定性实验结果表明样品在室温下放置 8 小时稳定，3 次冻融循环替比夫丁浓度无显著变化，处理后的样品在自动进样器内（10℃）放置 72 小时替比夫定无显著变化。实验样品分析结果表明本方法能够成功用于临床病人样品分析，为指导临床合理用药提供帮助。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中替比夫定含量的快速准确检测。

## ■ 多种类药物

### LC-MS/MS 测定 12 种药物血药浓度的集成方法

**摘要:** 本文建立了简单稳定的前处理方法和 12 种不同类型药物的血药浓度监测的 LC-MS/MS 集成方法。这 12 种药物包含免疫抑制剂, 抗癫痫药, 抗肿瘤药, 抗生素, 强心苷类, 平喘药等。标准品添加到血清或全血中, 使用 LC-MS/MS 在有效血药浓度范围前后分析, 得到了高灵敏, 线性良好的标准曲线, 也获得了稳定的回收率, 良好的重现性和准确度。同时比较内标法和外标法定量, 证明了外标法定量在治疗药物监测中的可行性。此方法实现了综合医院常进行治疗药物监测的 12 种药物的同时分析, 改善了不同试剂不同方法的繁琐性, 也降低了试剂盒的成本。

**关键词:** TDM LC-MS/MS 血药浓度

现在治疗药物监测(TDM: therapeutic drug monitoring)还是以免疫法和 HPLC 法为主, 但是因为免疫法的试剂盒成本高, 有效期比较短, 同时监测几种药物需要准备多种试剂盒。另外 HPLC 灵敏度低, 能检测到的血药浓度范围窄。相比之下, LC-MS/MS 可以同时监测多种药物, 检测灵敏度高, 动态范围宽, 适合用于需要严密控制血药浓度的药物监测。目前各实验室开发的 LC-MS/MS 分析方法, 大部分是以每个药物或病种为单位, 还没有大通量的多种不同治疗药物的同时分析法。本实验针对改善以往检测方法的缺点, 建立了简单的前处理方法和 12 种药物同时分析的方法, 并进行了方法学验证。

## 1 实验部分

### 1.1 化合物信息

下面列表中的化合物是本实验中分析的中日友好医院以及国内综合医院目前监测的药物品种。包括 1) 免疫抑制剂类药: 环孢霉素 A(CsA), 他克莫司 (FK506), 雷帕霉素 (RPM), 霉酚酸 (MPA); 2) 抗癫痫类药: 卡马西平 (CBZ), 苯巴比妥 (PB), 苯妥英钠 (DPH), 丙戊酸钠 (VPA); 3) 抗肿瘤类药: 甲氨蝶呤 (MTX); 4) 抗生素类药: 万古霉素 (VCM); 5) 强心苷类药: 地高辛 (DGX); 6) 平喘类药: 茶碱 (TPL)。

表 1 化合物信息

	检查项目	英文名	药品分类	分子式	分子量	有效血药浓度
1	环孢霉素 A	Cyclosporin A (CsA)	免疫抑制剂药	C <sub>62</sub> H <sub>111</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	1201.84	80~1400 μg/L
2	他克莫司	Tacrolimus (FK506)		C <sub>44</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>12</sub>	803.48	5~15 μg/L
3	霉酚酸	Mycophenolic acid (MPA)		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	320.13	1~4 μg/mL
4	雷帕霉素	Rapamycin (RPM)		C <sub>51</sub> H <sub>79</sub> NO <sub>13</sub>	913.56	3~12 μg/L
5	卡马西平	Carbamazepine (CBZ)	抗癫痫药	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	236.10	4~12 μg/mL
6	苯巴比妥	Phenobarbital (PB)		C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	232.09	10~40 μg/mL
7	苯妥英钠	Phenytoin sodium (DPH)		C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>2</sub>	274.07	10~20 μg/mL
8	丙戊酸钠	Sodium Valproate (VPA)		C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NaO <sub>2</sub>	166.10	40~125 μg/mL
9	甲氨蝶呤	Methotrexate (MTX)	抗肿瘤药	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	454.17	0.5~4.5 μg/mL
10	万古霉素	Vancomycin (VCM)	抗生素	C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> C <sub>12</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1447.43	10~20 μg/mL
11	地高辛	Digoxin (DGX)	强心苷类	C <sub>41</sub> H <sub>64</sub> O <sub>14</sub>	780.43	0.8~2 μg/L
12	茶碱	Theophylline (TPL)	平喘药	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	180.07	10~20 μg/mL

## 1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站。

表 2 HPLC conditions (Nexera MP)

Analytical Column	ODS Column (2.1 x 50mm, 3µm)
Mobile phase A	10mM Ammonium Formate
Mobile phase B	Methanol
Time program	10%B(0min) → 95%B(4min) → 95%B(5min) → 10%B(5.1min) → 10%B(7min)
Flow rate	0.4 mL/min
Column oven temp.	55°C

表 3 MS conditions (LCMS-8060)

Ionization mode	ESI Pos/Neg
Nebulizer gas	1.5 L/min
Drying gas	10.0 L/min
Heating gas	10.0 L/min
Heat block temp.	400°C
DL temp.	200°C
Interface temp.	200°C
Applied voltage	+4kV(DGX +1kV)/-3kV

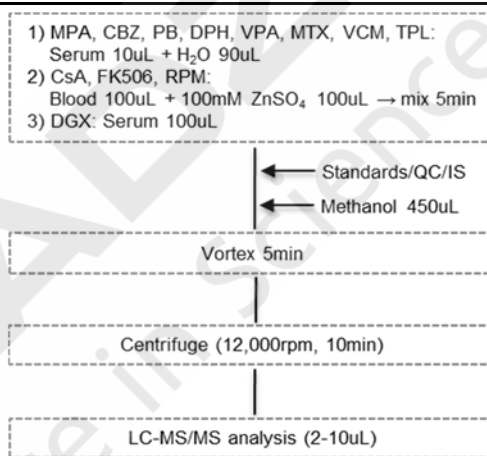


图 1 Sample pretreatment

## 1.3 样品前处理

如图 1 所示

## 2 结果与讨论

### 2.1 LC-MS/MS 法同时分析 TDM 标准品的结果

使用图 1 所示的前处理方法, 分析 12 种药物和 3 种同位素内标。每种化合物检测了 1 个定量离子对和 1 个定性离子对, 色谱条件和质谱条件都以有效血药浓度范围较低的地高辛为主调整, 有效血药浓度高的化合物的子离子选择第 5-6 个强度高的离子作为定量离子。12 种药物和 3 种同位素内标 CsA-d4, DGX-d3, CBZ-d8 的色谱质谱流出图的结果如图 2 所示。

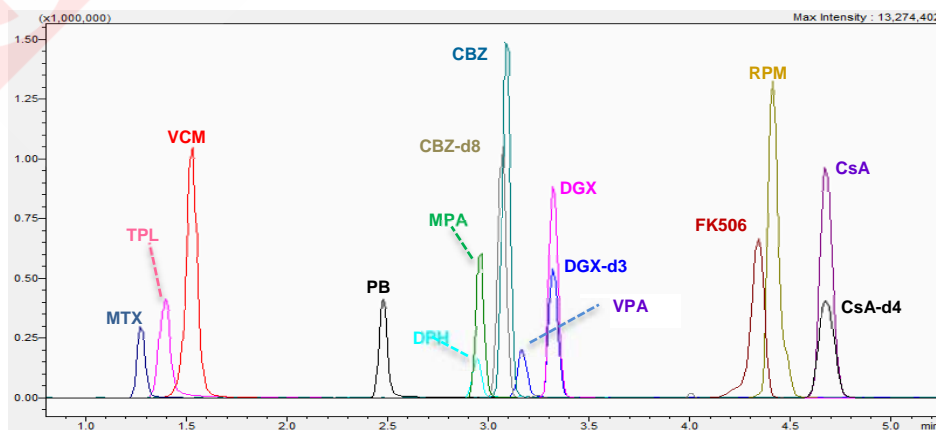


图 2 Simultaneous analysis of 12 TDM compounds and 3 internal standards.

## 2.2 标准曲线的线性和准确度的考察

在有效血药浓度范围前后进行外标法定量，结果如表 4 所示，标准曲线的相关系数都在 0.999，低中高浓度 QC 样品的准确度在 93.1%~104.4%。如图 3 所示以 DPH 为例显示了其标准曲线和在 0, 1, 2, 8, 16, 32  $\mu\text{g/mL}$  浓度点的色谱质谱流出图，也确认了空白血清中没有对分析造成干扰的物质。

表 4 Linearity of 12 TDM compounds and accuracy of QC samples.

Compounds	Therapeutic concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Linearity ( $\mu\text{g/mL}$ )	$r^2$	QC Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )			Accuracy (%)		
				Low	Medium	High	Low	Medium	High
MPA	1 ~ 4	0.1 - 6.4	0.999	0.8	1.6	3.2	103.9	101.9	100.4
CBZ	4 ~ 12	0.1 - 12.8	0.999	0.8	1.6	3.2	94.3	93.1	94.1
PB	10 ~ 40	1 - 128	0.999	8	16	32	102.5	99.8	99.1
DPH	10 ~ 20	1 - 128	0.999	8	16	32	100.1	97.6	99.8
VPA	40 ~ 125	1 - 128	0.999	8	16	32	96.1	102.9	100.1
MTX	0.5 ~ 4.5	0.1 - 6.4	0.999	0.8	1.6	3.2	104.4	103.3	103.3
VCM	10 ~ 20	0.5 - 64	0.999	4	8	16	100	100.3	93.8
TPL	10 ~ 20	0.5 - 64	0.999	4	8	16	102.5	94.1	95.9
DGX ( $\mu\text{g/L}$ )	0.5 ~ 2	0.05 - 6.4	0.999	0.5	1	2	98.3	99.2	97.9
CsA ( $\mu\text{g/L}$ )	80 ~ 1400	25 - 1600	0.999	200	400	800	99.1	99.5	99.7
FK506 ( $\mu\text{g/L}$ )	5 ~ 15	0.5 - 32	0.999	5	10	20	99.9	100.7	100.6
RPM ( $\mu\text{g/L}$ )	3 ~ 12	0.5 - 32	0.999	5	10	20	102.7	100.9	98.9

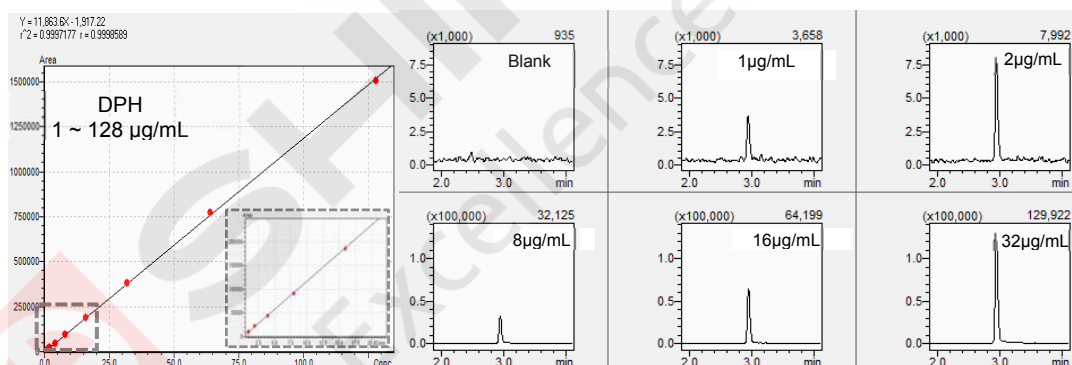


图 3 Results of DPH: Calibration curve and MRM chromatograms at different calibration points.

## 2.3 重现性和回收率的考察

针对这 12 种药物进行了日内和日间的重现性和回收率的考察：日内考察进行了 3 次不同批次的前处理，每个样品检测了 6 次；日间考察连续进行了 3 天的不同批次的前处理，每个样品检测了 6 次。结果如表 5 所示，每个药物的回收率都非常稳定，并且在 85% 以上，在低浓度点的重现性也都在 20% 以内。

表 5 Reproducibility and recovery of 12 TDM compounds.

Compounds	Within-day (n=18)						Inter-day (n=30)					
	Low (%)		Medium (%)		High (%)		Low (%)		Medium (%)		High (%)	
	CV	Recovery	CV	Recovery	CV	Recovery	CV	Recovery	CV	Recovery	CV	Recovery
MPA	14.5	85	11.1	85	11.1	86	14.5	87	9.5	87	9.4	87
CBZ	3.9	88	3.8	84	2.1	85	5	88	5.2	83	5.1	83
PB	8.8	100	3.6	101	3.7	103	8.7	99	4.4	98	5.5	100
DPH	5.4	97	3.5	100	3.9	100	5.9	97	4.9	98	6.1	98
VPA	18.2	104	6.9	96	4.6	101	15.9	107	9.8	97	6.7	99
MTX	5.4	94	3.4	96	2.1	107	7.1	96	3.7	94	3.6	106
VCM	12.2	98	9.2	101	5.7	104	10.8	99	7.9	108	5.9	107
TPL	6.9	100	2.9	104	2.7	105	6.2	99	5.4	101	4.7	102
DGX	9.5	102	8.7	103	9.1	105	11.7	106	10.2	105	9.3	108
CsA	8.2	102	9.9	93	4.5	94	13.1	111	9.9	107	16.5	111
FK506	11.9	102	11.6	98	11.1	99	11.5	96	16.4	94	10.6	92
RPM	9.1	98	8.5	96	5.5	97	11.5	85	9.7	108	6.2	92

\*Recovery (%) = Area{(serum or blood + standard) / pretreatment} / Area{serum or blood / pretreatment + standard} x 100%

\*Within-day (n=18): n=6 x 3 pretreatment

\*Inter-day (n=30): n=6 x 5 pretreatment / 3day

#### 2.4 CsA 内标法和外标法标准曲线的比较

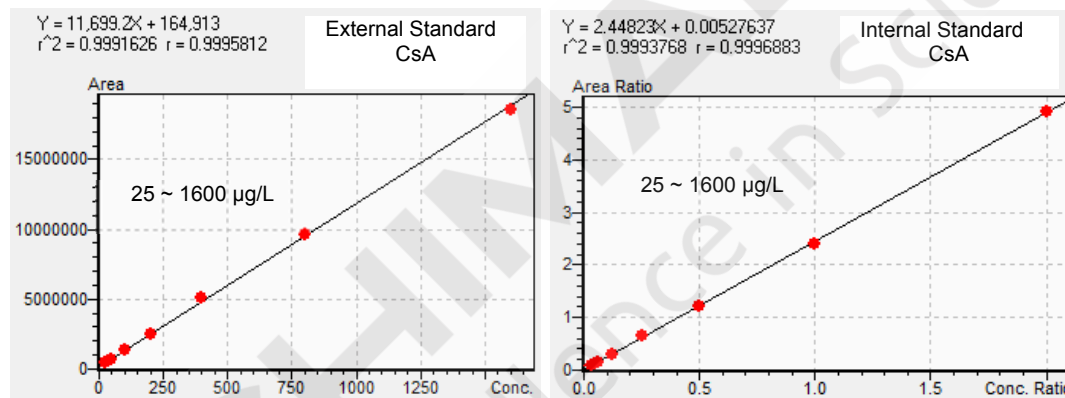


图 4 Compare calibration curves of internal and external standard for CsA.

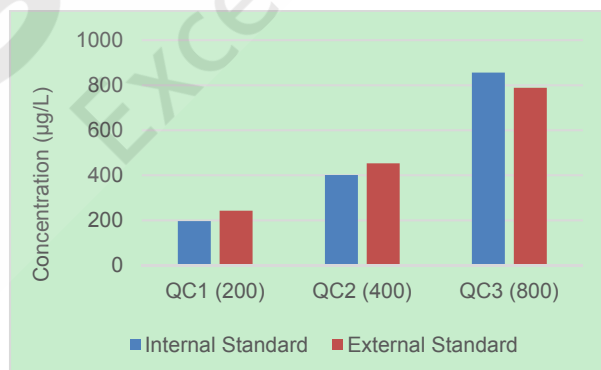


图 5 Comparison of internal and external standard using QC quantitative results.

考察内标法和外标法的定量准确性，如图 4 所示以 CsA 为例在 25 µg/L~1600 µg/L 范围内比较了标准曲线的线性，得到了非常类似的结果。并且使用低中高浓度的 QC 样品比较了 2 种方法的定量准确性，如图 5 所示都得到了准确的定量结果。进一步检测 20 种实际样品比较了 2 种方法，得到的定量结果非常接近，跟免疫法的结果也有很高的相关性，说明了外标法定量在治疗药物监测中的可行性。

另外，针对 12 种药物还检测了每个药物 20 种以上的实际样品来验证这一方法，使用有效血药浓度范围前后的标准曲线，外标法定量得到的实际样品浓度跟免疫法的结果进行了比较，结果表明这 2 种方法有很高的相关性，也证明了 12 种药物同时分析的 LC-MS/MS 方法在临床检测中使用的可能性。

### 3 结论

本文建立了超高效液相色谱串联三重四极杆质谱监测 12 种不同类型药物的血药浓度的分析方法。此方法结合简单的前处理，实现了综合医院常进行治疗药物监测的 12 种药物的同时分析。这一简单低成本高效率的检测方法，不仅灵敏度高，而且稳定性和准确度也高，因此充分能替代之前的检测方法，改善不同试剂不同方法的繁琐性。

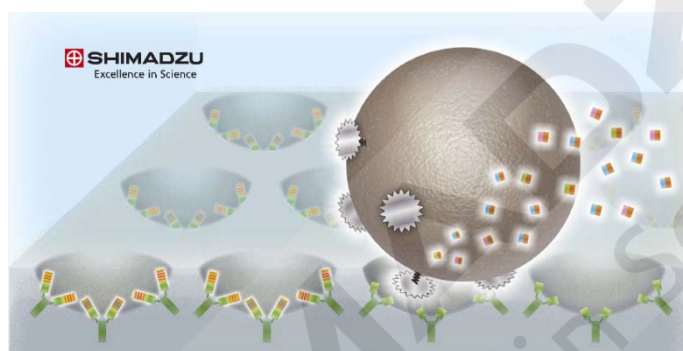


SHIMADZU  
Excellence in Science

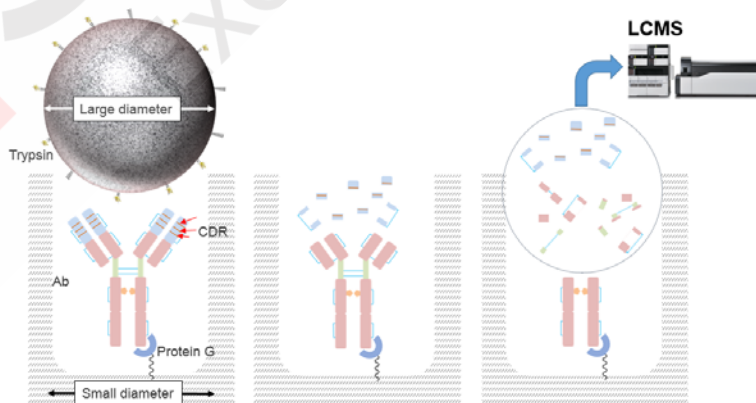
## ■ 单抗类药物

单克隆抗体药物是利用淋巴细胞杂交瘤或基因工程技术制备得到的药物。在抗肿瘤方面，单克隆抗体药物通过干预肿瘤发生发展中的信号通路，或激活机体对肿瘤的免疫反应，实现对肿瘤的靶向杀伤作用。

这类单克隆抗体药物常使用蛋白酶解方法进行样品前处理，首先将单克隆抗体分子水解为多个多肽片段，通过对特征性肽段进行检测，从而实现对抗体药物的定量分析。经该方法酶解得到的多肽片段种类数量众多，组分较复杂，因此大大减弱了检测灵敏度。为了简化该前处理方法，岛津公司推出了一项全新的技术——纳米表面分子导向限制性酶解（nSMOL, nano-Surface and Molecular Orientation Limited Proteolysis）技术，该技术由岛津公司 Takashi Shimada 博士开发，可用于所有单克隆抗体药物的定量分析。



nSMOL 技术可在近生理条件下，完成对抗体药物的选择性酶解，并获得与之相应的特征性肽段组分。其工作原理是利用抗体树脂对样品中单克隆抗体药物进行捕获，之后通过蛋白酶纳米颗粒对树脂上抗体成分进行限制性酶解，得到多肽片段。该酶解主要针对抗体的 Fab 区域，Fab 区域外余下部分不受酶解作用且仍保留在原树脂上（如图所示）。因此，nSMOL 技术不仅能够保证获得特异性的抗体序列片段，而且限制性酶解技术大大降低了样品的复杂性，缩短样品前处理时间，提高了检测灵敏度。岛津利用该技术的研究成果已在多个国际期刊中发表。



nSMOL 技术结合岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 或 LCMS-8060 能够较好地解决单克隆抗体药物在定量分析中面临的问题，我们希望该技术能为有关从业人员提供新思路、新方法，也希望该技术能在抗体药物临床前及临床研究中发挥重要作用。

# 采用 nSMOL 试剂盒建立人血浆中贝伐珠单抗定量分析方法的 重现性验证

**摘要:** 本实验采用 nSMOL 试剂盒对人血浆中贝伐珠单抗进行样品前处理, 建立贝伐珠单抗的定量检测方法, 获得 0.146-300  $\mu\text{g/mL}$  的线性范围, 线性关系良好, 并验证得出 nSMOL 试剂盒样品前处理与分析方法在不同人员间转移所得结果具有良好的重现性。实验结果表明 nSMOL 试剂盒在单克隆抗体类药物检测中, 可简化处理步骤、缩短样品处理时间, 并提供标准化处理方法, 获得单抗类药物特征性肽段, 提高检测方法的特异性与灵敏度, 具有适用性广、实用性强等优势, 为应用 LC-MS/MS 技术检测与研发单抗类药物提供可靠工具。

**关键词:** nSMOL 试剂盒 三重四极杆质谱 贝伐珠单抗 生物定量分析

贝伐珠单抗, 商品名“阿瓦斯汀”, 是一种阻碍血管生成的药物, 属于人源化抗-VEGF 单克隆抗体, 可通过与血管内皮生长因子(VEGF-A)特异性结合, 阻止其与受体相互作用, 发挥对肿瘤血管的多种作用, 如使现有的肿瘤血管退化, 从而切断肿瘤细胞生长所需氧气及其他营养物质等, 可提高化疗药物的效果, 常用于治疗转移性结直肠癌、肺癌、宫颈癌等。临床研究表明, 贝伐珠单抗药代动力学参数具有体内清除率较低、典型中央室体积较窄、半衰期时间长等特点, 因此可靠的血浆中贝伐单抗血药浓度检测方法对治疗效果、用药安全性评价与指导临床用药剂量, 均具有重要作用。

目前, 对生物样本中单抗浓度检测使用较多的为酶联免疫吸附剂测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法, 但该方法具有无法区分内源变化产生的抗体类似物与外源性单抗药物等不足。在生物大分子分析检测领域中, 样品前处理专业技术与蛋白质特征性肽段定量方法较为缺乏。为此, 岛津公司自主研发的 nSMOL 试剂盒, 通过纳米表面限制性和导向性酶解抗体药物实现 Fab 区域的选择性酶解, 建立液质联用法对人血浆中贝伐珠单抗进行定量分析, 简化并缩短样品前处理时间, 提高单抗药物检测的特异性与灵敏度。此外, 此类通用分析方法经验证之后, 可实现分析方法在不同地点、不同人员间的转移, 确保结果具有出色的重现性。本实验则采用 nSMOL 试剂盒进行人血浆样本前处理, 建立液质联用方法, 进行不同人员间所得结果的重现性验证分析。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵, DGU-20A5R 在线脱气机, SIL-30ACMP 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.80 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱: Shim-pack GISS C18

(2.1 mm I.D. $\times$ 50 mm L., 1.9  $\mu\text{m}$ )

流动相: A 相-0.1 %甲酸水溶液

B 相-0.1 %甲酸乙腈

流 速: 0.4 mL/min

柱 温: 50 $^{\circ}\text{C}$

进样量: 5  $\mu\text{L}$

自动进样器温度: 15 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 1%, 洗脱程序见表 1。

## 质谱条件

分析仪器: LCMS-8060  
离子源: ESI (+)  
离子源接口电压: 0.5 kV  
雾化器流速: 3 L/min  
加热气流速: 10 L/min

接口温度: 300°C  
DL 温度: 250°C  
加热模块温度: 450°C  
干燥气流速: 10 L/min  
扫描模式: MRM  
MRM 参数: 见表 2

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	1
5.00	Pumps	Pump B Conc.	30
5.01	Pumps	Total Flow	0.4
5.02	Pumps	Pump B Conc.	95
5.03	Pumps	Total Flow	1
5.83	Pumps	Pump B Conc.	95
5.85	Pumps	Pump B Conc.	1
6.20	Pumps	Total Flow	1
6.22	Pumps	Total Flow	0.4
7.00	Controller	Stop	

表 2 MRM 优化参数

选择的肽段	区域	MRM 通道[m/z]	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
FTFSLDTSK	重链 CDR2	523.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→797.40(y7 <sup>+</sup> )*	-38.0	-18.0	-34.0
		523.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→898.50(y8 <sup>+</sup> )	-38.0	-20.0	-30.0
		523.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→650.30(y6 <sup>+</sup> )	-38.0	-19.0	-34.0
VLIYFTSSLHSGVPSR	轻链 CDR2	588.30([M+3H] <sup>3+</sup> )→775.90(y14 <sup>++</sup> )	-22.0	-17.0	-28.0
		588.30([M+3H] <sup>3+</sup> )→939.50(y9 <sup>+</sup> )	-22.0	-27.0	-28.0
		588.30([M+3H] <sup>3+</sup> )→602.30(y6 <sup>+</sup> )	-22.0	-28.0	-22.0
STAYYLQMNSLR	重链 CH1	642.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→861.50(y7 <sup>+</sup> )	-24.0	-25.0	-20.0
		642.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→748.40(y6 <sup>+</sup> )	-24.0	-22.0	-28.0
		642.30([M+2H] <sup>2+</sup> )→620.30(y5 <sup>+</sup> )	-24.0	-24.0	-32.0
P14R (IS)	-	512.10→292.30*	-38.0	-20.0	-20.0
		512.10→389.30	-38.0	-16.0	-28.0
		512.10→757.50	-38.0	-19.0	-38.0

注: \*表示定量离子

### 1.3 标准样品配制

取适量人空白血浆加入贝伐珠单抗储备母液, 配制成浓度为 1 mg/mL 的工作母液。用空白血浆将工作母液逐级稀释, 制备浓度分别为 0.146、0.293、0.586、1.17、2.34、4.69、9.38、18.8、37.5、75、150、300 μg/mL 的贝伐珠单抗血浆基质标准曲线, 4°C 保存, 待用。

### 1.4 血浆样品制备方法

实验人员分为两组。两组实验操作人员分别按照 nSMOL 单克隆抗体质谱定量试剂盒中的血浆样品制备方法, 进行样品制备。

## 2 结果与讨论

### 2.1 线性关系

按照 1.3 项下血浆样品配制方法制备 0.146、0.293、0.586、1.17、2.34、4.69、9.38、18.8、37.5、75、150、300 μg/mL 血浆标准工作曲线, 按照 nSMOL 试剂盒操作步骤处理血

浆样品，建立标准曲线，并用内标法进行分析测定。以血浆中贝伐珠单抗特征性肽段浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以贝伐珠单抗特征性肽段峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为  $Y=1/C^2$ ，进行线性回归分析，两组所得标准曲线见图 1、图 2，线性回归方程及相关系数见表 1、表 2。结果表明贝伐珠单抗分别在 0.146-300  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围内线性范围良好，两组数据对比表明，具有较高重现性。

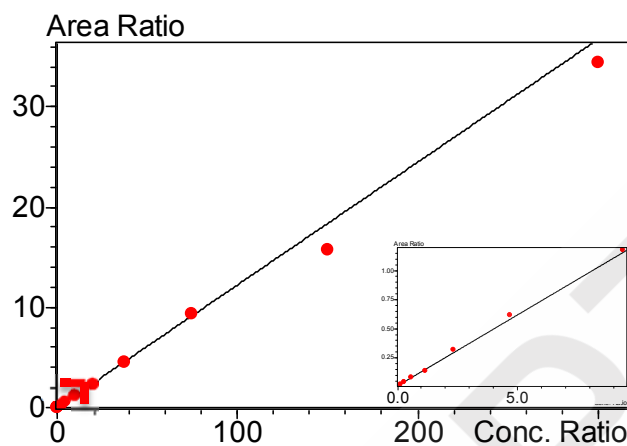


图 1 组一所得贝伐珠单抗标准曲线 (FTFSLDTSK, m/z 523.30→797.40)

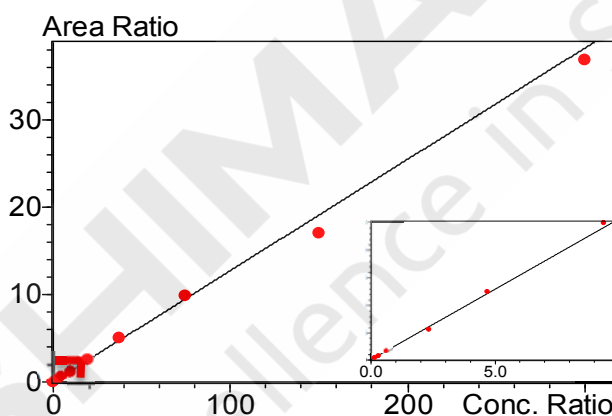


图 2 组二所得贝伐珠单抗标准曲线 (FTFSLDTSK, m/z 523.30→797.40)

表 1 贝伐珠单抗标准曲线参数 (线性回归, 权重系数为  $Y=1/C^2$ )

化合物	肽段信息	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	组别	校准曲线	准确度(%)	相关系数 r
贝伐珠单抗	FTFSLDTSK	0.146-300	组一	$Y = (0.122437)X + (0.00665970)$	85.6-110.4	0.9968
			组二	$Y = (0.125267)X + (0.00424743)$	82.7-114.2	0.9953

表 2 标准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	实测浓度 (ng/mL)		准确度(%)	
		组一	组二	组一	组二
1	0.146	0.139	0.147	95.4	100.7
2	0.293	0.308	0.279	105.2	95.4
3	0.586	0.634	0.680	108.2	116.0
4	1.17	1.085	0.968	92.8	82.7

5	2.34	2.584	2.159	110.4	92.3
6	4.69	5.000	4.887	106.6	104.2
7	9.38	9.586	9.860	102.2	105.1
8	18.8	19.071	19.855	101.4	105.6
9	37.5	36.420	39.311	97.1	104.8
10	75	75.924	78.403	101.2	104.5
11	150	128.452	135.845	85.6	90.6
12	300	281.443	294.504	93.8	98.2

### 3 结论

本实验采用 nSMOL 试剂盒成功获取人血浆中贝伐珠单抗药物特征性酶解肽段，简化并缩短了样品前处理的时间与步骤。所建贝伐珠单抗液质联用定量检测方法，实现了仅使用 5  $\mu\text{L}$  血浆样品达到 0.146  $\mu\text{g/mL}$  的定量限，线性范围为 0.146-300  $\mu\text{g/mL}$ ，线性关系良好。通过两组不同人员对样品进行前处理制备与定量检测，验证了采用 nSMOL 试剂盒进行样品前处理与定量分析可在不同人员间进行转移，且确保数据具有出色的重现性。实验表明，该方法具有灵敏度高、分析时间短、适用性广、实用性强等特点，并可灵活转换，为蛋白类大分子药物定量分析与新药研发提供有利的分析工具。

# 基于 nSMOL 技术和 Skyline 软件的曲妥珠单抗 LC-MS/MS 定量分析方法开发

**摘要:** 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 与 Skyline 软件联用建立曲妥珠单抗定量分析方法。通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出, LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法, 进行肽段筛选、碰撞能量优化, 最终确认曲妥珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法, 本文完成血浆中曲妥珠单抗药物的定量分析方法开发, 定量特征肽段为 IYPTNGYTR(542.80>404.70), 线性范围为 0.122 µg/mL~125 µg/mL。

**关键词:** 三重四极杆质谱 Skyline 曲妥珠单抗 定量分析

曲妥珠单抗是一种抗 Her2 的重组 DNA 衍生的人源化单克隆抗体, 它通过人体表皮生长因子竞争性结合 Her2, 从而阻断癌细胞的生长, 曲妥珠单抗还可以刺激身体自身的免疫细胞去摧毁癌细胞。随着曲妥珠单抗在临床的广泛应用, 对该药物在人体血浆中定量检测的精密度和准确度要求也日益提高。

随着液相色谱和质谱技术以及生物样品分离技术的发展, LC-MS/MS 定量技术在蛋白质定量研究中的应用日益广泛。相对于传统的免疫分析方法(例如 ELISA), LC-MS/MS 定量技术提高了蛋白分析的精密度和准确度。基于质谱法的蛋白定量在抗体药物临床前及临床研究中受到越来越多的关注, 为了使蛋白质定量技术与药物研究和临床检验更加紧密结合, 岛津公司将其超快速液相色谱-质谱联用平台和强大的定量蛋白质组学软件 Skyline 集成一体。根据蛋白质序列和用户自定义, Skyline 软件可以用来设计、改善以及优化选择反应监测(SRM)/多反应监测(MRM)、全扫描质谱和串联质谱定量法。Skyline 软件不仅将结果和方法优化结合起来, 也为蛋白质定量的研究工作提供了标准化的工作流程。同时岛津研发工程师们为简化复杂生物基质中抗体药物的定量分析工作, 对抗体药物前处理过程进行了独特的设计, 发明了 nSMOL 前处理试剂包, 该方法能够有效富集血浆/血清中的抗体药物, 实现 Fab 区域的选择性酶解, 提高酶解效率, 极大降低了酶解产物的复杂性, 对于复杂生物基质中抗体药物的准确定量提供了非常有利的工具。

本文基于岛津 LCMS-8060 液质联用系统, 通过 Skyline 设计完成 MRM 通道的优化, 实现抗体药物定量及定性肽段的初步筛选, 进一步通过血浆样品的分析, 挑选特异性的定量和定性肽段, 完成 LCMS 方法结合 nSMOL 前处理技术定量分析血浆中曲妥珠单抗的方法开发工作。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 SP1 色谱工作站, Skyline Ver.3.5.0.9319 软件。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱: Waters BEH Peptide C18 2.0 mm I.D.×150 mm L., 1.7 µm (方法开发) / Inertsil Sustain

Swift C18 Column (2.1 mm I.D.×50 mm L., 1.9 μm) (定量分析)

流动相: A 相-0.1%甲酸水溶液

B 相-0.1%甲酸乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 10 μL

肽段筛选洗脱条件:

梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 洗脱程序 0.0-3.0 min, 5%; 3.0-35.0 min, 5%~40%; 35.0-37.5 min, 40%~95%; 37.5-45.0 min, 95%; 45.5-50.0 min, 5%。

定量分析洗脱条件:

梯度洗脱, B 相初始浓度为 1%, 流速 0.4 mL/min; 洗脱程序 0.00-1.50 min, 1%; 1.50-5.00 min, 1%~30%; 5.02-5.83 min, 95%; 5.85~7.00 min, 1%; 0-5.01 min, 0.4 mL/min; 5.03-6.20, 1 mL/min; 6.20-7.00 min, 0.4 mL/min。

### 质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

源温度: 300°C

离子化模式: ESI(+)

DL 温度: 250°C

离子源接口电压: 1.0 kV

加热模块温度: 400°C

加热气: 空气 15.0 L/min

扫描模式: 多反应监测(MRM)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

驻留时间: 17 ms

干燥气: 氮气 5.0 L/min

延迟时间: 3 ms

碰撞气: 氩气

定量分析 MRM 参数: 见表 1

### 1.3 样品前处理过程

肽段筛选和 MRM 通道构建:

10 μg/mL 曲妥珠单抗标准品, 按照 nSMOL 试剂盒样品前处理过程进行曲妥珠单抗酶解, 获得的酶解混合物直接上机分析。

血浆中曲妥珠单抗的定量分析:

配制曲妥珠单抗血浆基质标准曲线: 浓度分别为 0.122、0.244、0.488、0.975、1.95、3.90、7.80、15.6、31.3、62.5、125 μg/mL, 按照 nSMOL 试剂盒操作步骤进行样品前处理, 获得的酶解混合物直接上机分析。

表 1 MRM 参数 (曲妥珠单抗定量分析方法)

肽段选择	MRM 通道 [m/z]	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)	肽段作用
GLEWVAR	415.70→660.30*	-16.0	-15.0	-34.0	定性肽段
	415.70→531.30	-16.0	-16.0	-40.0	
	415.70→345.20	-16.0	-20.0	-24.0	
FTISADTSK	485.15→721.30*	-19.0	-18.0	-38.0	定性肽段
	485.15→608.30	-19.0	-20.0	-32.0	
	485.15→521.20	-19.0	-21.0	-26.0	
IYPTNGYTR	542.80→404.70*	-20.0	-18.0	-30.0	定量肽段
	542.80→808.40	-20.0	-18.0	-28.0	
	542.80→610.30	-20.0	-25.0	-22.0	
P14R (IS)	512.10→292.30*	-38.0	-20.0	-20.0	内标

512.10→389.30	-38.0	-16.0	-28.0
512.10→757.50	-38.0	-19.0	-38.0
512.10→660.40	-38.0	-17.0	-24.0
512.10→563.30	-38.0	-17.0	-40.0

注：\*表示定量离子

## 2 结果与讨论

### 2.1 曲妥珠单抗特征肽段的筛选

利用 Skyline 软件预测曲妥珠单抗特征肽段的操作流程如图 1 所示。将 Skyline 软件预测的曲妥珠单抗的离子对列表直接导入到 LabSolutions 中建立完整的 LC-MS/MS 方法（图 2），利用该方法分析检测曲妥珠单抗酶解产物（见图 3），然后将分析结果导入 Skyline 软件，排查色谱峰，删除未检出肽段，结果如图 4 所示。

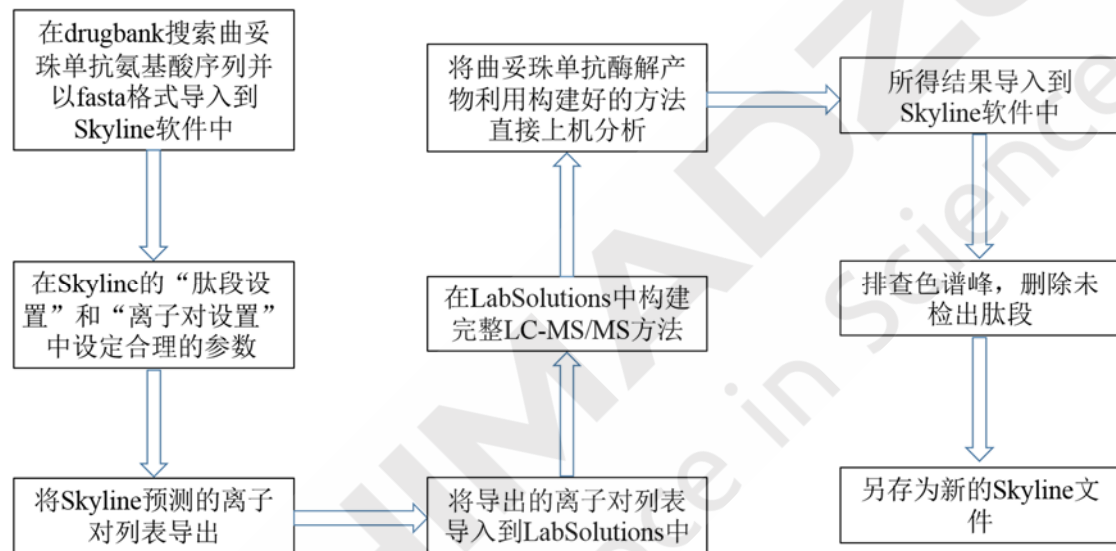


图 1 Skyline 软件预测曲妥珠单抗特征肽段的操作流程

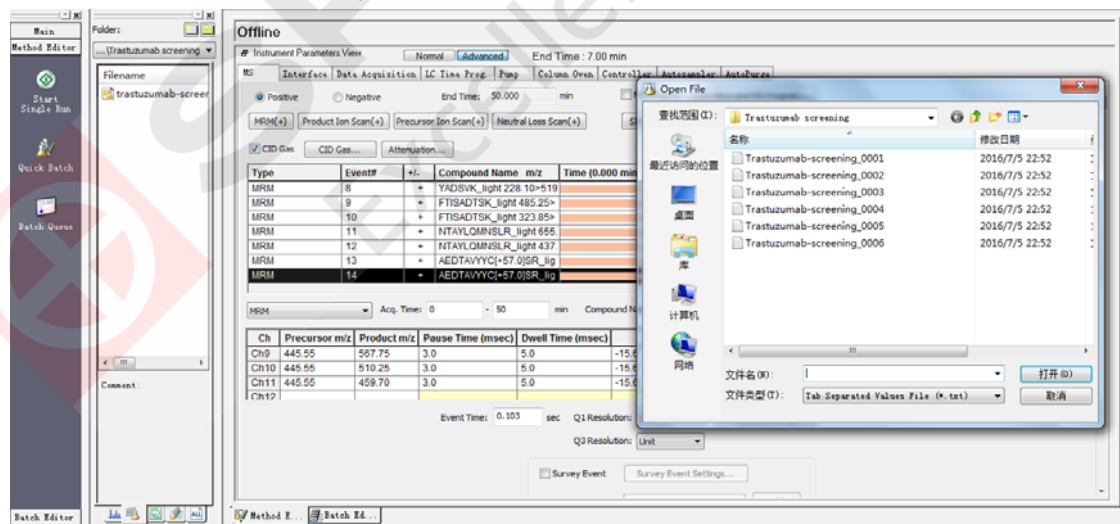


图 2 将 Skyline 预测的离子对列表信息导入 LabSolutions 构建完整的 LC-MS/MS 方法

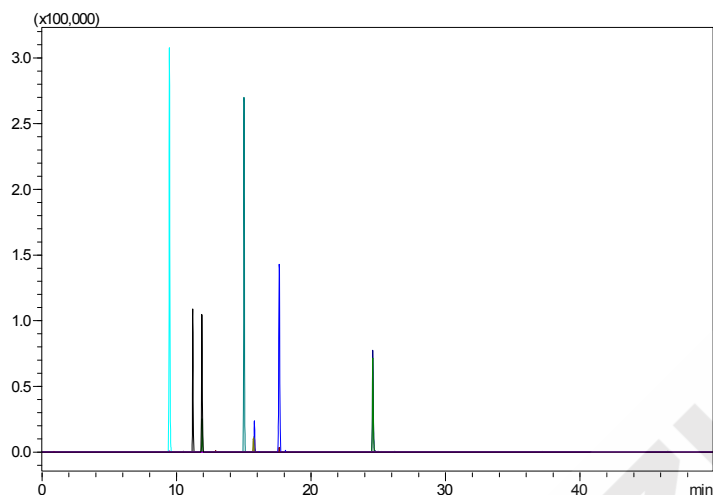


图3 肽段筛选获得的MRM色谱图

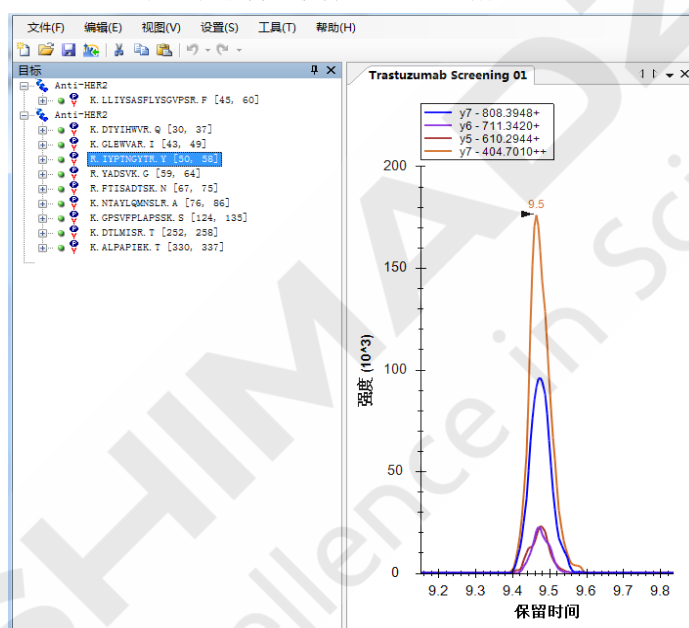


图4 筛选结果导入Skyline文件后的检出肽段确认

## 2.2 碰撞能量优化

将 Skyline 软件中的导出参数设置为“预定模式”、“碰撞能量优化”，导出 MRM 离子对列表，基于筛选时采用的液相分离条件，同步对已筛选的 10 个肽段的 MRM 通道进行碰撞能量优化，LCMS-8060 能够实现 Dwell time 最小 0.8 ms，Pause time 最小 1.0 ms 的设置，极大地提高了 MRM 通道的单次分析通量，曲妥珠单抗的 10 个肽段 MRM 通道碰撞能量同步进行优化。将 LabSolutions 的分析结果导入 Skyline 软件，对碰撞能量优化结果进行确认，碰撞能量优化过程重复 1 次，不同能量下所选择肽段的 MRM 通道面积变化重复性良好（见图 5），最终根据两次分析的平均值导出含有最佳碰撞能量值的 MRM 离子对列表（见表 2）。表 2 中所涉及到曲妥珠单抗相关肽段中与 Fab 区域相关的特征肽段包括 LLIYSASFLYSGVPSR、DTYIHWVR、IYPTNGYTR、GLEWVAR、YADSVK、FTISADTSK、NTAYLQMNSLR、GPSVFPLAPSSK；与 Fc 区域相关的特征肽段包括 DTLMISR、ALPAPIEK。根据抗体药物的结构特点，绝大多数抗体药物的保守区域氨基酸序列差异较小，可变区域的氨基酸序列具有较大差异。在 LCMS 定量分析目标蛋白方法开发的过程中，主要工作即是挑选出目标蛋白的特异性肽段，该实验利用 nSMOL 技术处理样品，该技术利用纳米颗粒表

面固定化胰酶技术实现抗体药物的 Fab 区域的选择性酶解，所筛选出的 10 个肽段中有 8 个位于 Fab 区域，从而极大地降低了酶解产物的复杂性，大大缩小了目标肽段的筛选范围，充分体现了 nSMOL 技术的高选择性。因此利用 nSMOL 前处理可以简化 LCMS 方法开发阶段的筛选过程，提高方法开发的速度。

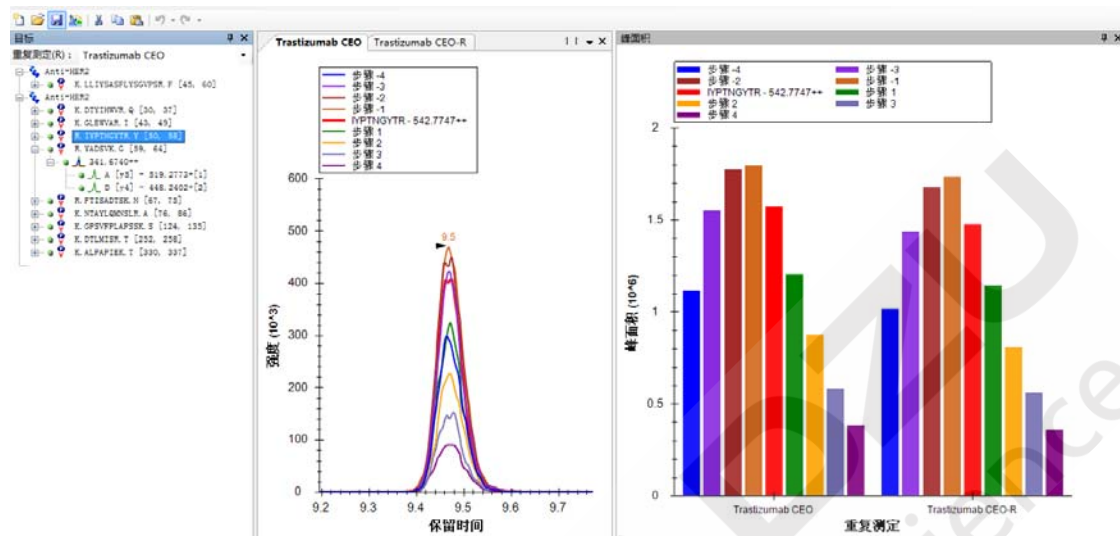


图 5 Skyline 软件进行碰撞能量优化结果查看

表 2 MRM 参数 (Skyline 筛选最佳碰撞能量肽段列表)

肽段选择	前体离子	产物离子	CE (V)	肽段归属
LLIYSASFLYSGVPSR	886.98	1270.64 [y12+]	-33.0	VL/CDR2
	[M+2H] <sup>2+</sup>	359.20 [y3+]	-27.0	
	591.66	765.39 [y7+]	-19.1	
	[M+3H] <sup>3+</sup>	602.32 [y6+]	-21.1	
DTYIHWVR		359.20 [y3+]	-15.1	VH/CDR1
		597.32 [y4+]	-18.6	
	363.85	460.27 [y3+]	-14.6	
	[M+3H] <sup>3+</sup>	487.76 [y7+]	-14.6	
GLEWVAR		437.24 [y6+]	-10.6	VH/CDR2
		660.35 [y5+]	-16.1	
	415.73	531.30 [y4+]	-16.1	
	[M+2H] <sup>2+</sup>			
IYPTNGYTR		808.39 [y7+]	-19.2	VH/CDR2
		711.34 [y6+]	-27.2	
	542.77	610.29 [y5+]	-25.2	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	404.70 [y7+]	-17.2	
YADSVK	341.67	519.28 [y5+]	-15.2	VH/Fab
	[M+3H] <sup>2+</sup>	448.24 [y4+]	-13.2	
FTISADTSK		721.37 [y7+]	-14.9	VH/Fab
	485.25	608.29 [y6+]	-18.9	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	521.26 [y5+]	-18.9	
NTAYLQMNSLR		1024.52 [y8+]	-23.7	VH/Fab
	655.83	861.46 [y7+]	-25.7	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	748.38 [y6+]	-23.7	
GPSVFPLAPSSK		846.47 [y8+]	-19.2	CH1/Fab
	593.83	699.40 [y7+]	-21.2	
	[M+2H] <sup>2+</sup>	418.23 [y4+]	-29.2	
DTLMISR	418.22	619.36 [y5+]	-16.2	CH2/Fc

	[M+2H] <sup>2+</sup>	506.27 [y4+]	-16.2	
		654.38 [y6+]	-14.3	
ALPAPIEK	419.75	486.29 [y4+]	-20.3	CH2/Fc
	[M+2H] <sup>2+</sup>	327.69 [y6++]	-14.3	

### 2.3 血浆中曲妥珠单抗定量分析结果

利用 Skyline 软件导出含最佳碰撞能量的 MRM 列表，构建 LC-MS/MS 方法，根据蛋白定量特异性原则选择 CDR 区域的 GLEWVAR、FTISADTSK、IYPTNGYTR 作为特征肽段进行定量分析，定量分析的典型色谱图如图 6 所示，在 0.122~125 μg/mL 范围内 IYPTNGYTR 具有良好的线性关系，标准曲线见图 7。实验结果证明通过 Skyline 筛选出的特征肽段在生物基质中满足特异性要求，其中 IYPTNGYTR 灵敏度较高，作为定量肽段；GLEWVAR 和 FTISADTSK 具有较好的选择性，可作为定性肽段进行分析。

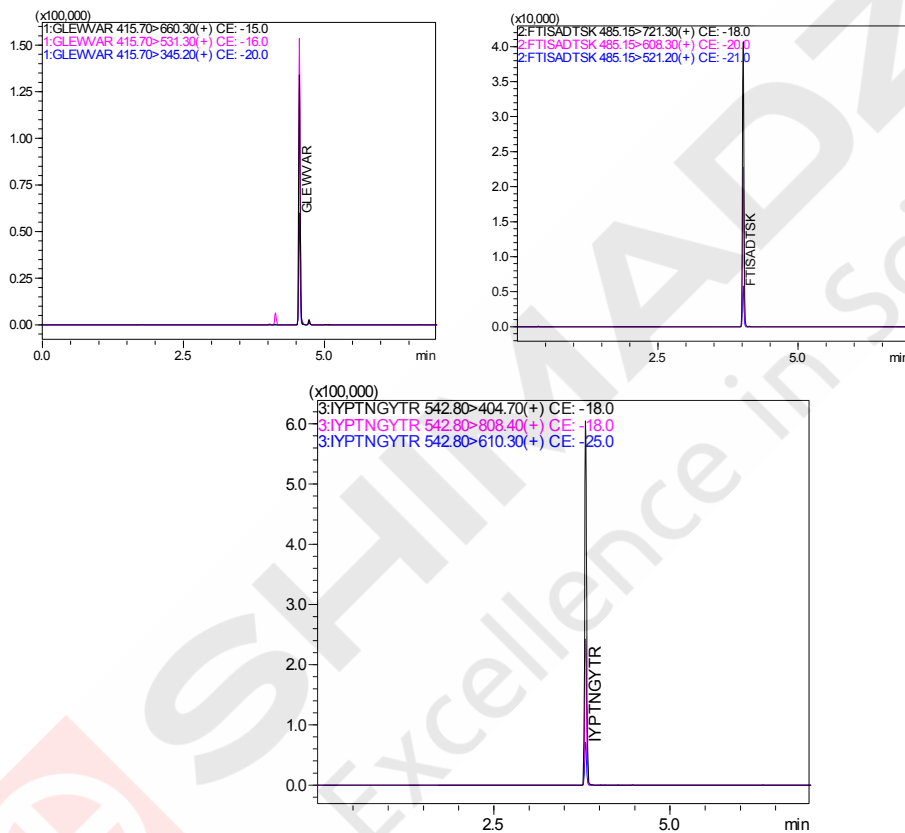


图 6 血浆中曲妥珠单抗 nSMOL 前处理后 LC-MS/MS 分析获得的典型色谱图

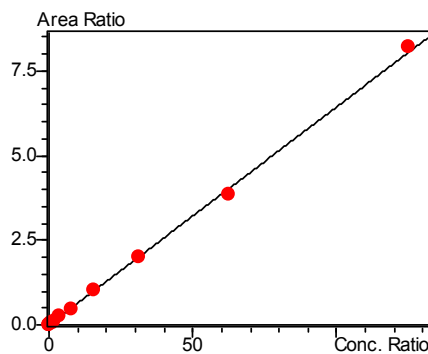


图 7 曲妥珠单抗定量检测的标准曲线 (IYPTNGYTR (542.80>404.70))

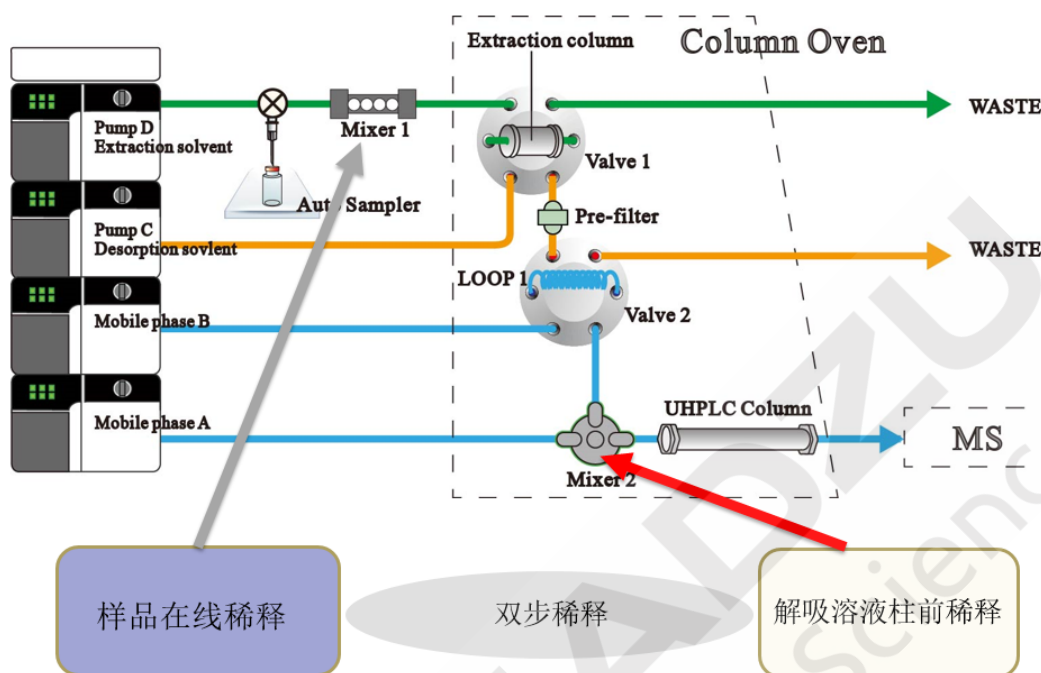
表 3 标准曲线的线性方程和相关系数

抗体药物名称	肽段信息	校准曲线	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相关系数 r	准确度 (%)
曲妥珠单抗	IYPTNGYTR (定量)	$Y = (0.0644864)X + (-0.00317900)$	0.122~125	0.9995	91.5~114.0

### 3 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 与 Skyline 软件联用建立血浆中曲妥珠单抗定量分析的工作流程。结合 nSMOL 前处理技术，实现抗体药物 Fab 区域选择性酶解，从而显著降低了方法开发的复杂程度。在本实验筛选阶段，共有 10 个肽段具有明显的色谱峰，其中 8 条肽段与曲妥珠单抗的 Fab 区域相关，而曲妥珠单抗具有代表性的特异性肽段集中于 Fab 区域，充分体现了 nSMOL 技术的高选择性，从而极大地降低了酶解产物的复杂性，提高方法开发的速度。实验通过 Skyline 软件完成 MRM 通道的设计和方法的输出，LabSolutions 基于 Skyline 导出的 MRM 分析方法，进行肽段筛选、碰撞能量优化，最终确认曲妥珠单抗的特征肽段及其对应的 MRM 离子对。基于以上所建立的方法，本文完成血浆中曲妥珠单抗药物的定量分析方法开发，定量特征肽段为 IYPTNGYTR (542.80>404.70)，线性范围为 0.122  $\mu\text{g/mL}$ ~125  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 1.2 Online SPE-三重四极杆液质联用法



在线分析系统的流路图

### 双步稀释说明：

- 1、萃取前样品的在线稀释：  
萃取前的在线稀释实现了目标物的脱附以及在线转为弱溶剂。
- 2、解吸液的柱前稀释  
第二步稀释即大体积解吸液的引入这一步，目的是实现目标物的柱头聚焦。

### 该系统的特点和优势：

- ❖ 破除 SPE 柱局限性，大大提高 SPE 柱的尺寸、耐压、材料的选择范围。
- ❖ 破除分离色谱柱的局限性，可使用 UHPLC 高压柱，分离条件与 SPE 萃取条件相互独立。
- ❖ 连接质谱无需分流，提高方法灵敏度。
- ❖ 解吸条件实现最优化，解吸条件与色谱分离条件相互独立。
- ❖ 旁路稀释功能改进，单泵实现在线稀释，稀释比例可调，结构简单经济，重复性好。

# 自动前处理-超高效液相色谱/质谱在线分析系统用于血清中十种抗精神病药的直接检测

**摘要:** 本文建立了自动前处理-超高效液相色谱/质谱在线分析系统用于血清中十种抗精神病药的直接检测方法。在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.01~0.06% 和 1.12 ~ 4.54% 之间；方法检出限和方法定量限分别介于 0.000801~0.688  $\mu\text{g/L}$  和 0.00321~2.75  $\mu\text{g/L}$  之间。对两种浓度级别加标血清样品进行检测，回收率介于 58.75~136.75% 之间，RSD 介于 0.87~7.69% 之间。本法无需前处理，全程自动化运行，对比离线方法，在线方法 10 min 内完成自动前处理和色谱分离检测，允许强溶剂的大体积进样，灵敏度高、精密度高。

**关键词:** 抗精神病药 自动前处理 在线分析 三重四极杆质谱仪

利培酮、奋乃静等抗精神病药，可以改善精神分裂症，临床应用广泛，且疗效显著。但由于其可引起药源性锥体外系反应如帕金森综合症、静坐不能、急性肌张力障碍等副作用，服用过量将伴有失眠、焦虑、激越、头痛、口干等副作用，严重者可能导致心源性猝死，因此建立血液中抗精神病药的检测在临床检验、法医学鉴定等领域有重要意义。

一般血液样品处理成血清或血浆后，需用蛋白沉淀的方式提取上清液进样分析。对于样品量多、人手紧张、要求快速出数据的用户，如此手工前处理存在诸多不便且数据误差大。本文使用岛津自动前处理-超高效液相色谱/质谱在线分析系统（流路设计见图1），只需进行过滤处理，即可对血清中十种抗精神病药进行自动分析。

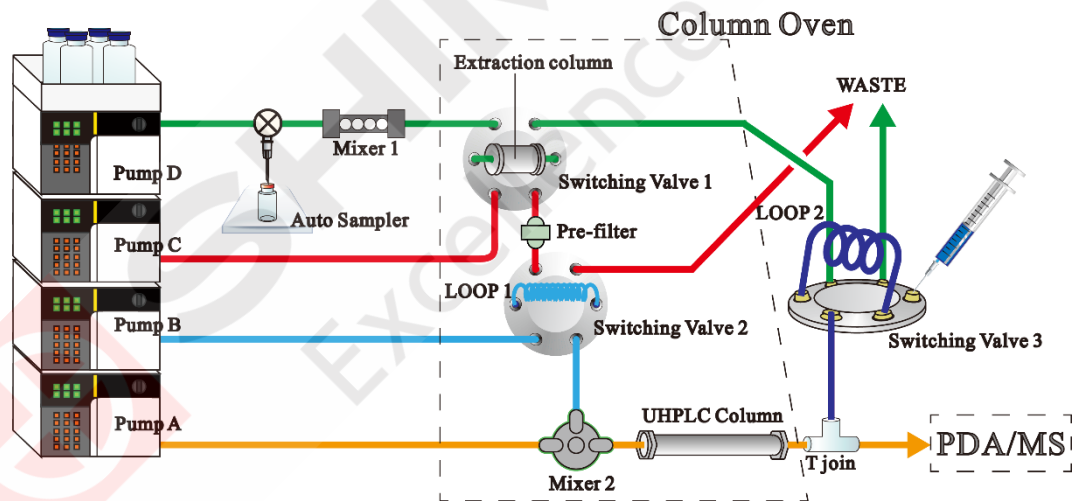


图1 自动前处理-超高效液相色谱质谱在线分析系统的流路设计

## 1 实验部分

### 1.1 仪器配置

表 1 仪器配置

硬件	配置
控制器	CBM-20A
泵 C&D	LC-20AD
泵 D 溶剂切换阀	FCV-11AL, 初始状态为 A: 泵 D1 (上样液), 泵 C1 (解吸液) 送液; B 状态为泵 D2 (平衡液), 泵 C1 送液

泵 A&B	LC-30AD
自动进样器	SIL-30AC
柱温箱	CTO-20AC, 内置切换阀 1 和切换阀 2
切换阀 1	FCV-20AH <sub>2</sub> , 初始状态=1: 2-3 口、6-1-4-5 口分别联通
切换阀 2	FCV-32AH, 初始状态=1: 2-3 口、6-1-4-5 口分别联通
脱气机	DGU-20A <sub>5</sub> ×2
切换阀 3	无
混合器 1	LC2010 柱前混合器, SN 228-37112-91
混合器 2	LC-30A 混合器 MiRC 20 μL
过滤器	0.5 μm 虑孔, 零死体积在线过滤器 SN 290-46042-06
定量环 1	500 μL 不锈钢定量环
定量环 2	无
PDA	SPD-M20A
MS	LCMS-8040
工作站	LabSolutions Ver. 5.60

## 1.2 分析条件

### 萃取、解吸条件

萃取柱: Shim-pack MAYI-C8(G) 10 L×4.6

萃取溶液: 甲酸/水/乙腈 (0.2/95/5, v/v)

流速: 2 mL/min

柱温: 40℃

进样体积: 50 μL

萃取时间: 2 min

解吸溶液: 乙腈/甲醇 (80/20, v/v)

解吸流速: 0.2 mL/min

平衡溶剂: 甲醇

平衡流速: 2 mL/min

切阀时间、清洗程序: 将时间程序表2

### 液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm×50 mm L, 1.6 μm粒径

流动相: A相-0.1%甲酸+5mM乙酸铵水溶液;

B相-乙腈

流速: 0.5 mL/min

柱温: 40℃

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为8%, 时间程序见表2。

### 质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250℃

加热模块温度: 400℃

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 12 ms

延迟时间: 3 ms

喷针位置: +3 mm

MRM 参数: 见表 3

表 2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Column Oven	CTO.RVL	0
3.40	Pumps	SV(Pump C)	B
3.50	Column Oven	CTO.RVR	0
3.60	Column Oven	CTO.RVL	1
4.50	Pumps	Pump B Conc.	8
8.50	Column Oven	CTO.RVR	1
8.50	Pumps	Pump B Conc.	60
8.50	Pumps	SV(Pump C)	A

8.60	Pumps	Pump B Conc.	100
9.98	Pumps	Pump B Conc.	100
9.99	Pumps	Pump B Conc.	8
10.00	Controller	Stop	

表 3 MRM 参数

名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
利培酮	106266-06-2	411.20	191.15*	-30.0	-34.0	-20.0
			110.15	-30.0	-51.0	-20.0
齐拉西酮	146939-27-7	413.10	194.05*	-15.0	-28.0	-20.0
			159.10	-15.0	-43.0	-30.0
喹硫平	111974-69-7	384.15	253.20*	-30.0	-23.0	-27.0
			221.20	-30.0	-39.0	-23.0
氟哌啶醇	52-86-8	376.15	165.20*	-30.0	-25.0	-17.0
			123.20	-30.0	-41.0	-22.0
阿立哌唑	129722-12-9	448.15	285.20*	-22.0	-27.0	-20.0
			176.20	-22.0	-34.0	-18.0
氯丙嗪	50-53-3	319.10	86.20*	-22.0	-22.0	-16.0
			58.20	-22.0	-38.0	-23.0
舍曲林	79617-96-2	306.05	159.10*	-30.0	-26.0	-30.0
			275.10	-30.0	-12.0	-19.0
奋乃静	58-38-8	404.10	171.15*	-20.0	-24.0	-18.0
			143.10	-20.0	-30.0	-26.0
氯硝安定	1622-61-3	316.00	270.05*	-23.0	-25.0	-28.0
			214.05	-23.0	-39.0	-21.0
阿普唑仑	28981-97-7	309.20	281.10*	-24.0	-27.0	-29.0
			205.10	-24.0	-42.0	-20.0

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

标准样品配制：分别用乙腈和水配制如表 4 种 8 个浓度级别的混合标准溶液（表 4）。

表 4 标样配制浓度

化合物	浓度级别 (µg/L)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
利培酮	0.00800	0.0200	0.0400	0.0800	0.200	0.400	0.800	2.00
齐拉西酮	0.0400	0.100	0.200	0.400	1.00	2.00	4.00	10.0
喹硫平	0.0200	0.0500	0.100	0.200	0.500	1.00	2.00	5.00
氟哌啶醇	0.0200	0.0500	0.100	0.200	0.500	1.00	2.00	5.00
阿立哌唑	0.0800	0.200	0.400	0.800	2.00	4.00	8.00	20.0
氯丙嗪	0.00800	0.0200	0.0400	0.0800	0.200	0.400	0.800	2.00
舍曲林	0.400	1.00	2.00	4.00	10.0	20.0	40.0	100
奋乃静	0.400	1.00	2.00	4.00	10.0	20.0	40.0	100
氯硝安定	5.00	12.5	25.0	50.0	125	250	500	1.25E+03
阿普唑仑	4.00	10.0	20.0	40.0	100	200	400	1.00E+03

在线方法样品前处理：血清过滤后进样。

离线方法样品前处理：取 50 µL 血清加入 150 µL 乙腈，涡旋 3 min 后于 12000 rpm 高速离心 5 min，取上清液用乙腈定容至 200 µL 待测。

## 2 结果讨论

### 2.1 优化萃取条件和解吸条件

对萃取溶剂进行优化, 选取 5mM 乙酸铵水溶液/乙腈(95/5, v/v), 乙酸/水/乙腈(0.2/95/5), 水/乙腈进行优化, 最终选取乙酸/水/乙腈(0.2/95/5) 作为最优萃取溶剂。

对萃取流速进行优化, 选择 2 mL/min, 3 mL/min, 4 mL/min 进行优化, 最终选取 2 mL/min 作为最优萃取流速。

对萃取时间进行优化, 设置 1 min, 2 min, 3 min 作为萃取时间, 最终选取 2 min 作为萃取时间。

对解吸溶剂进行优化, 选取甲酸/甲醇(0.1/99.5, v/v), 甲酸/乙腈(0.1/99.5, v/v), 100% 甲醇, 100%乙腈, 甲醇/乙腈(20/80, v/v), 甲醇/乙腈(50/50, v/v), 甲醇/乙腈(80/20, v/v), 作为解吸溶剂, 最终选取甲醇/乙腈(20/80, v/v) 作为最优萃取溶剂。

对解吸速度进行优化, 选取 0.2 mL/min, 0.3 mL/min 和 0.4 mL/min 进行优化, 最终选取 0.2 mL/min 作为最优流速。

对切换阀 2 的切阀时间进行优化, 选取 3.0~4.0 min (间隔 0.1 min) 进行优化, 最终选取 3.5 min 作为最优切阀时间。

对泵 C 平衡溶液进行优化, 选取 100%水, 100%甲醇, 100%乙腈, 甲醇/水(50/50, v/v), 乙腈/水(50/50, v/v) 进行优化, 最终选取 100%甲醇作为泵 C 平衡溶液。

### 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱图如图 2 所示。

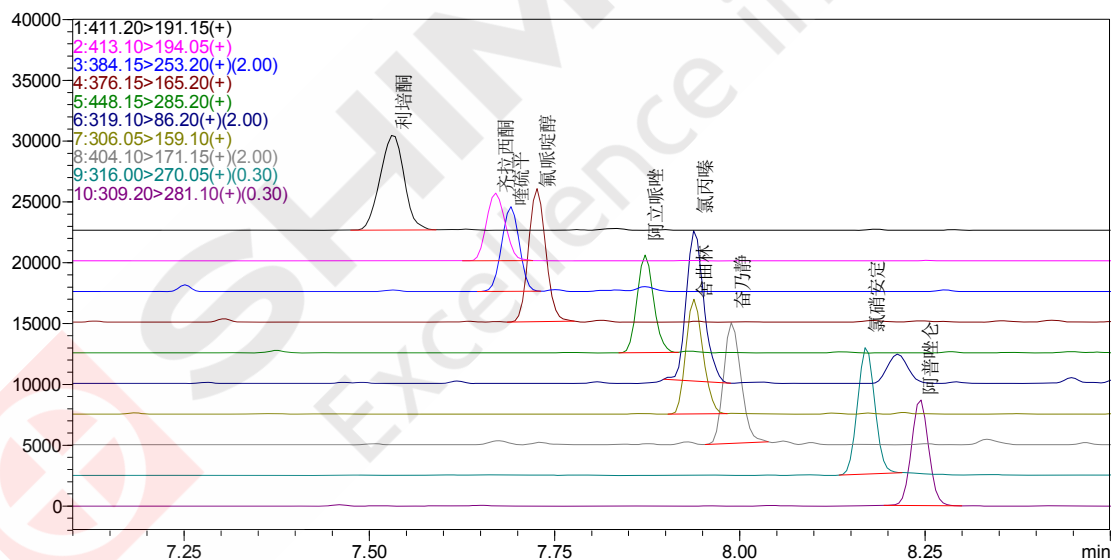


图 2 十种生长素标准样品的 MRM 色谱图 (浓度级别 1: 0.00800~5.00  $\mu\text{g/L}$ )

### 2.4 标准曲线和检出限

按 1.2 中的分析条件进行测定, 外标法制作校准曲线, 如图 3 所示线性良好。线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限见表 5: 十种抗精神病药的线性相关系数均大于 0.9972, 检出限介于 0.000801~0.688  $\mu\text{g/L}$ , 定量限介于 0.00321~2.75  $\mu\text{g/L}$  之间。

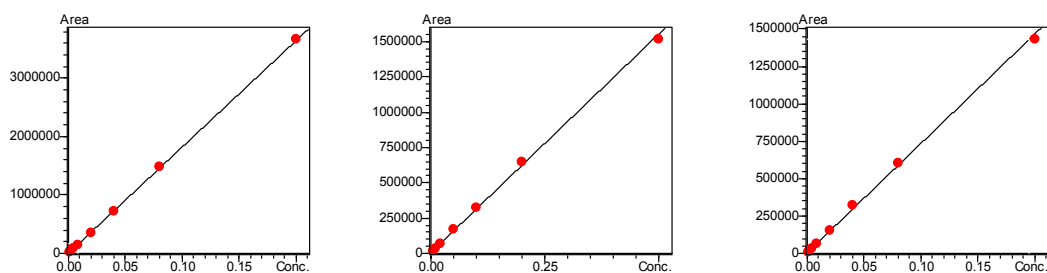


图3 利培酮、喹硫平和氯丙嗪的标准工作曲线

表5 10种物质的校准曲线参数

名称	校准曲线	相关系数 r	线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ )	检出限* ( $\mu\text{g/L}$ )	定量限** ( $\mu\text{g/L}$ )
利培酮	$Y = (1.82282e+007)X + (2499.88)$	0.9999	0.00800~2.00	0.00080 1	0.00321
齐拉西酮	$Y = (1.70074e+006)X + (4452.61)$	0.9988	0.0400~4.00	0.00891	0.0356
喹硫平	$Y = (3.09441e+006)X + (5194.65)$	0.9992	0.0500~0.500	0.00572	0.0229
氟哌啶醇	$Y = (4.31181e+006)X + (9916.14)$	0.9972	0.0200~2.00	0.00412	0.0165
阿立哌唑	$Y = (553682)X + (6811.70)$	0.9984	0.0800~20.0	0.0254	0.102
氯丙嗪	$Y = (7.32360e+006)X + (4106.56)$	0.9993	0.00800~2.00	0.00185	0.00740
舍曲林	$Y = (218658)X + (5283.00)$	0.9986	0.400~100	0.142	0.569
奋乃静	$Y = (88445.5)X + (2474.88)$	0.9984	1.00~100	0.0722	0.289
氯硝安定	$Y = (101919)X + (6994.22)$	0.9994	5.00~1.25E+03	0.688	2.75
阿普唑仑	$Y = (92225.7)X + (21083.5)$	0.9982	4.00~1.00E+03	0.573	2.29

注：\* 级别2浓度标样重复进样7次，计算浓度标准偏差SD，计算方法检出限MDL=3.14×S；\*\*方法定量限MQL=4×MDL。

## 2.5 精密度实验

对表6中三个浓度级别的标样进行分析，平行进样6次。十种抗精神病药的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.01~0.06%和1.12~4.54%之间，仪器精密度良好。

表6 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物	RSD% (级别2)		RSD% (级别5)		RSD% (级别8)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
利培酮	0.06	1.39	0.02	3.12	0.04	2.39
齐拉西酮	0.05	2.76	0.02	3.18	0.04	2.61
喹硫平	0.06	3.60	0.01	2.97	0.04	2.19
氟哌啶醇	0.06	2.47	0.02	1.12	0.05	2.78
阿立哌唑	0.06	3.83	0.02	3.73	0.04	2.69
氯丙嗪	0.06	2.96	0.01	3.01	0.04	2.66
舍曲林	0.05	4.54	0.01	3.07	0.04	2.12
奋乃静	0.05	2.21	0.01	1.53	0.03	3.49
氯硝安定	0.05	1.66	0.01	1.42	0.04	2.06
阿普唑仑	0.04	1.80	0.02	2.29	0.04	2.21

## 2.6 与离线方法的比较

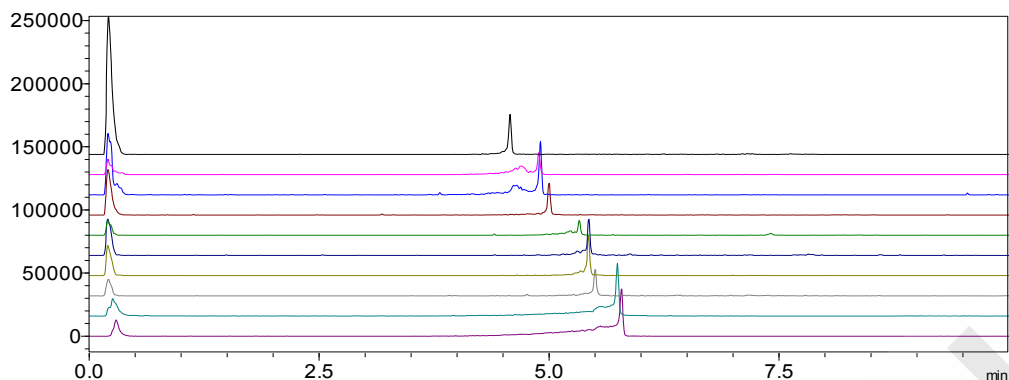


图4 离线方法进样 50  $\mu$ L 乙腈提取液得到 MRM 色谱图 (级别3 加标浓度)

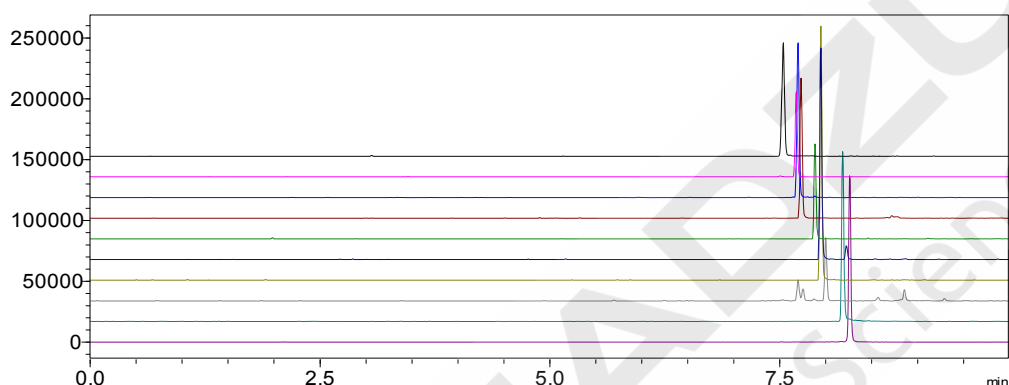


图5 在线方法进样 50  $\mu$ L 乙腈提取液得到 MRM 色谱图 (级别3 加标浓度)

离线方法前处理使用乙腈作为沉淀剂去除蛋白, 高速离心后得到的上清液主要成分为乙腈。图4为离线方法进样 50  $\mu$ L 乙腈提取液得到 MRM 色谱图, 由图可知, 大体积的强洗脱剂乙腈进入 ODS 色谱柱后产生显著的溶剂效应, 十种抗精神病药都被分成两个峰, 前一个随乙腈在死时间出峰, 后一个产生严重的前拖尾; 图5为在线方法进样 50  $\mu$ L 乙腈提取液得到 MRM 色谱图, 由于系统具有大体积进样二步稀释的功能, 得到的色谱峰尖锐、对称, 峰宽均少于 6 s。

## 2.7 基质加标实验

在血清样品中添加浓度级别3和级别7的混合标样, 分析结果如图7所示, 图6为空白血清。对两种浓度级别加标血清样品进行检测, 回收率介于 58.75~136.75%之间, RSD 介于 0.87~7.69%之间, 具体检测值和回收率见表7。从表7中可以看出, 齐拉西酮在两个加标浓度下回收率都是最低的, 分析可能是其与血清中蛋白有较强的结合能力, 导致其萃取、解吸比例较小, 最终得到较低的回收率。

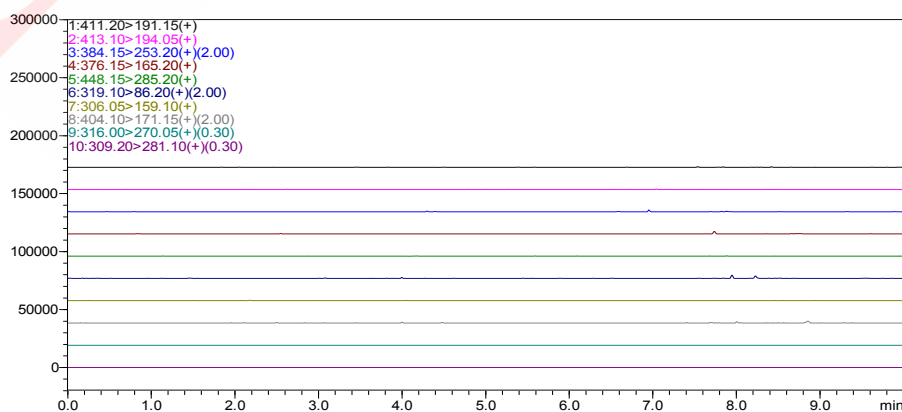


图6 空白血清

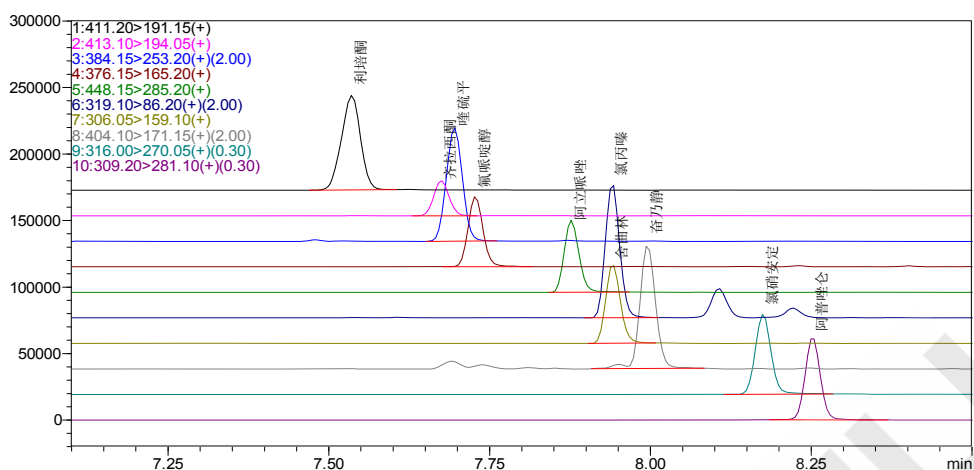


图7 级别3 浓度加标样品 MRM 色谱图

表7 血清样品检测量和回收率(n=3)

目标物	空白	加标回收率 (级别3)		加标回收率 (级别7)	
	检出量 ( $\mu\text{g/L}$ )	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)
利培酮	ND	4.04	103.04	1.56	136.75
齐拉西酮	ND	3.78	58.75	1.56	83.17
喹硫平	ND	7.45	108.00	1.17	128.00
氟哌啶醇	ND	1.93	93.50	0.87	132.67
阿立哌唑	ND	3.33	98.00	3.85	112.50
氯丙嗪	ND	7.48	125.04	6.39	110.42
舍曲林	ND	2.64	101.33	1.24	116.83
奋乃静	ND	3.14	112.25	7.69	109.67
氯硝安定	ND	1.78	75.93	1.24	98.67
阿普唑仑	ND	6.54	82.00	1.43	112.33

\*ND 为未检出

### 3 总结

建立了自动前处理-超高效液相色谱/质谱在线分析系统直接测定血清中十种抗精神病药的方法。对萃取条件、解吸条件、自动化控制时间程序进行优化, 在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积 RSD 分别在 0.01~0.06% 和 1.12~4.54% 之间; 十种抗精神病药的线性相关系数均大于 0.9972, 方法检出限和方法定量限分别介于 0.000801~0.688  $\mu\text{g/L}$  和 0.00321~2.75  $\mu\text{g/L}$  之间。对两种浓度级别加标血清样品进行检测, 回收率介于 58.75~136.75% 之间, RSD 介于 0.87~7.69% 之间。结果表明本在线方法无需对血清样品做任何处理, 即可对分析物进行直接检测。对比离线方法, 在线方法 10 min 内完成整个分析, 允许强溶剂的大体积进样, 全程全自动分析, 灵敏度高、精密度好。

## 1.3 全自动前处理与液质在线联用系统



CLAM-2000/LC/MS/MS (全自动前处理 LC/MS/MS 系统)

为实现血液或其他生物样品的自动化前处理，岛津推出了一款全自动前处理系统--CLAM-2000 (Clinical Laboratory Automated sample preparation Module)。CLAM-2000 (RUO) 是基于岛津的广泛血凝分析仪的技术，只需简单放置采血管或其他样品管，系统就会自动完成对血样或其他样品的前处理，然后自动输送至 LCMS 进行分析。因此，该系统能够最大限度地减少人为误差和样品前处理的差异；有助于更安全性，更快，更简单的实现临床研究中高精度的工作流程。可应用于医药部门、医疗部门或生物分析实验室。

### 仪器特点



#### 前处理与 LC-MS/MS 分析的无缝集成

- ◇ 只需简单放入采血管、必要试剂和专用处理管，系统自动进行前处理。
- ◇ 每个样品并行处理，以优化仪器的使用和样品通量。
- ◇ 将实验室人员从繁琐的样品前处理中解放出来，从而提高实验室效率。



#### 精密控制分析结果

- ◇ 易于通过软件来管理试剂、校准曲线、控制样品和系统维护，确保系统的性能和可靠性。
- ◇ 可视化的图表和数字，去提醒用户试剂量的减少或 QC 样品结果的变化。

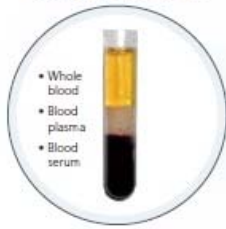


#### 减少操作错误和提高实验室安全程序

- ◇ 消除手动操作涉及生物样品，如配药。提高重复性的数据，最大限度地减少与用户接触的危险生物材料。
- ◇ 潜在的感染性废物被隔离在系统内。在分析完成后，根据实验室指定的程序，处理掉这些废物。

# 样品分析流程

Prepare blood collection tubes in advance.



- Whole blood
- Blood plasma
- Blood serum

Place blood collection tubes and reagents.



Handheld barcode reader input (option)  
(P/N 088-52640-01 Handy Barcode Reader (AT20Q-SM(U)))



Enter samples and reagents.



## Examples of Analysis Windows

Main CLAM-2000 GUI Window

← Click to switch between these windows →

LabSolutions Data Window

# 使用全自动前处理 LCMSMS 系统提高治疗药物监测的效率

对患者进行药物治疗时，通常对于给药管理困难的药物（如治疗效果范围窄或者中毒浓度范围与有效浓度范围相近）需要进行治疗药物监测（TDM: Therapeutic Drug Monitoring），即定量分析患者的血药浓度，根据药代动力学及药效学解析，对每位患者设计最佳的用药剂量及给药方法。传统的 TDM 分析方法主要使用高效液相色谱（HPLC）。近年来，为了提高分析准确度和精密度，开始使用具有出众选择性的液相色谱-质谱联用仪（LC/MS/MS）。在分析血清、血浆等样品时，通常需要进行除蛋白、稀释等前处理操作。在此过程中，由于操作人员技术水平的参差不齐而容易产生偏差或发生错误。并且，随着样品数量的增加，操作人员的作业负荷也随之增加。因此，在对大量样品进行测定的分析流程中，前处理操作显得十分重要。

本文使用全自动 LCMS 前处理 SCLAM-2000 和高效液相色谱-质谱联用仪 LCMS-8040 组合的全自动前处理 LC/MS/MS 系统，在解决上述 TDM 存在的问题基础上，更快速且高精度地进行 TDM 分析流程的示例。

## 1 实验部分

### 1.1 分析抗癫痫药

使用全自动前处理 LC/MS/MS 系统同时分析血清中的 7 种抗癫痫药及其活性代谢物。

#### 1.1.1 仪器分析条件

色谱柱: Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D.×50 mm L., 2 μm) 柱温: 40℃  
进样量: 1 μL  
流动相: A 相-10mmol/L 醋酸铵-水溶液; 离子源接口电压: 4.5 kV/-3.5kV (ESI+/-)  
B 相-甲醇 DL 温度: 150℃  
时间程序: B Conc. 3%(0-0.5min)-90%(3-5min)-3%(5.01-7min) 加热模块温度: 400℃  
流速: 0.4 mL/min 雾化气: 3.0 L/min  
干燥气: 10 L/min  
MRM 离子对: Levetiracetam(+) m/z171.15>126.10, Felbamate(+) m/z239.20>117.00, Carbamazepine-10,11-epoxide(+) m/z253.15>180.05, Carbamazepine(+) m/z237.20>194.05, Tiagabine(+) m/z376.25>111.05, Diazepam(+) m/z285.15>153.95, Topiramate(-) m/z338.10>78.00

#### 1.1.2 前处理条件

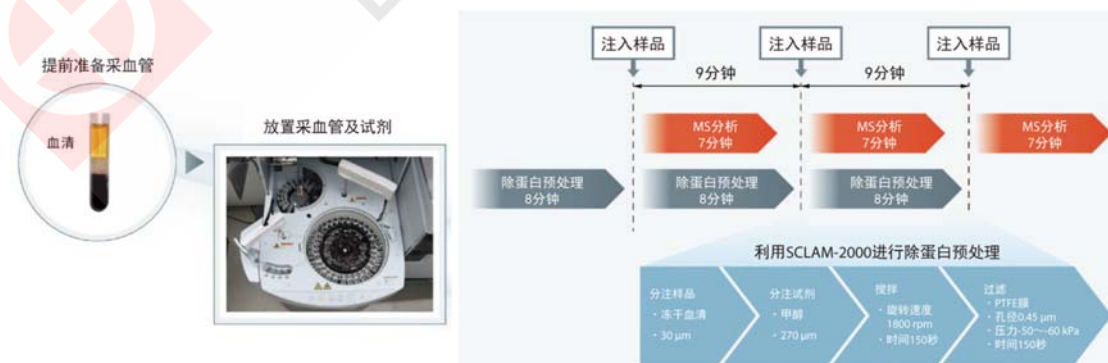


图 1 全自动前处理 LC/MS/MS 系统同时分析血清中的抗癫痫药的工作流程

对血清样品进行前处理时，通常需要添加有机溶剂以除蛋白，然后对固定成分进行离心分离，分取上清液。如果使用全自动前处理 LC/MS/MS 系统，只需放置采血管等，即可进行

前处理（如图 1），然后使用 LC/MS/MS 进行分析。因为 LC/MS/MS 分析和下一样品的前处理同时进行，所以可以大幅度地缩短每个样品所需要的测定时间，在本示例中，包括分析在内，每个样品只需要 9 min 的循环时间。

### 1.1.3 实验结果

图 2 为人血清中添加 7 种抗癫痫药和代谢物药物的加标样质谱图。因为 LC/MS/MS 可以根据目标药物的质量和结构，选择性地检测目标药物，所以由图 2 可知，未发现来自血清的杂质干扰。

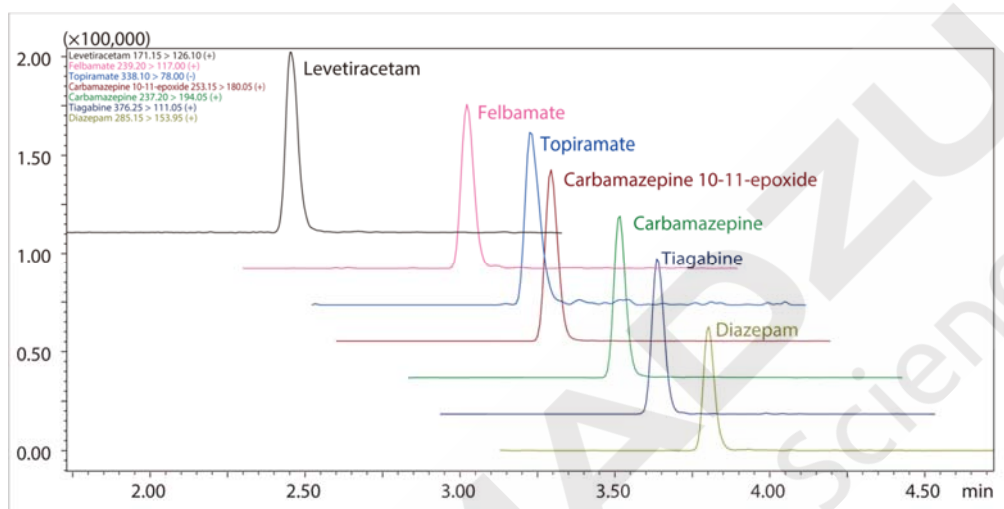


图 2 7 种抗癫痫药及代谢物的血清加标样的质谱色谱图

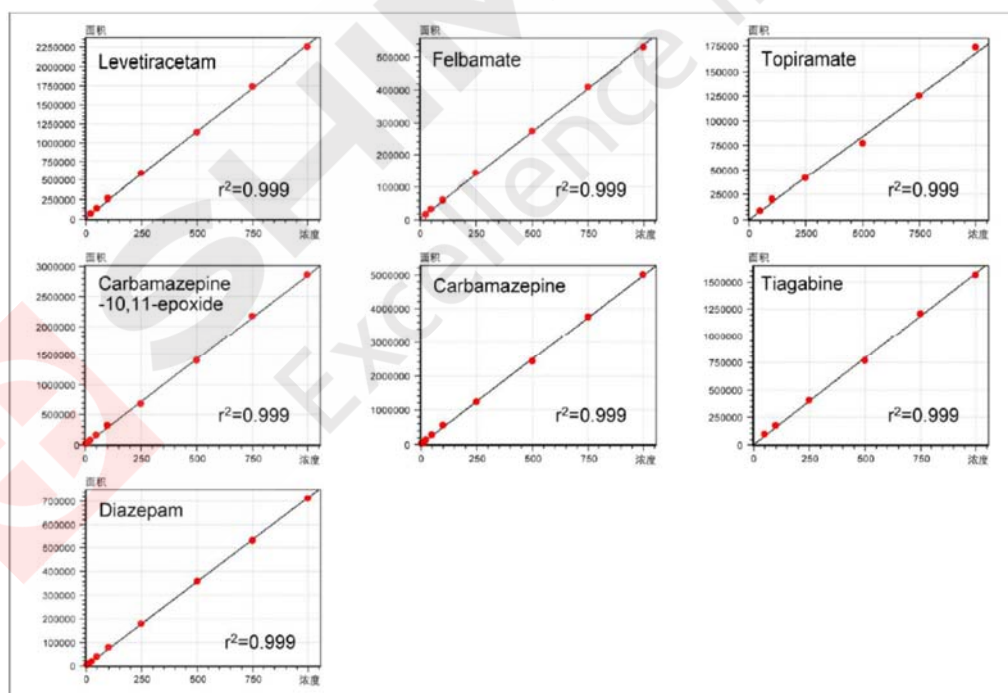


图 3 7 种抗癫痫药的校准曲线

在全自动前处理分析条件下进行连续分析并绘制标准曲线，以判断分析结果的准确度和精密度。由图 3 可知，在所设的标准曲线范围内，所有抗癫痫药的线性良好；由表 1 可知，在包括定量下限的所有范围内，准确度均在  $100 \pm 15\%$  以内，相对标准偏差 %RSD 均在 15% 以内，表示重复性良好。

表 1 抗癫痫药同时分析的验证结果

Compounds	Range (ng/mL)	QC samples concentration (ng/mL)			Accuracy(%)			%RSD (n=6)		
		LLOQ	Medium	ULOQ	LLOQ	Medium	ULOQ	LLOQ	Medium	ULOQ
Levetiracetam	10-750	10	100	750	94.6	106.1	99.2	3.42	1.23	1.98
Felbamate	25-1000	25	250	1000	98.6	101.8	99.6	6.28	1.88	1.50
Topiramate	500-10000	500	2500	10000	102.3	97.1	100.6	6.71	3.58	2.96
Carbamazepine-10,11-epoxide	5-1000	5	100	1000	92.9	107.8	99.3	7.48	3.32	1.41
Carbamazepine	10-1000	10	100	1000	90.6	110.3	99.1	3.79	3.42	1.19
Tiagabine	50-1000	50	250	1000	98.5	101.9	99.6	1.95	2.00	1.26
Diazepam	5-1000	5	250	1000	98.1	102.4	99.5	4.61	1.50	1.53

## 1.2 分析抗心律失常药

### 1.2.1 仪器分析条件

色谱柱: Mastro C18 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 3 μm)

流动相: A 相-0.1%甲酸-水溶液; B 相-甲醇

时间程序: B Conc. 5%(0-1.5min)-100%(5.5-7.5min)-5%(7.51-10min)

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 0.3 μL

离子源接口电压: 4.5 kV (ESI+)

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

雾化气: 3.0 L/min

干燥气: 15 L/min

MRM 离子对: Sotalol(+) m/z273.1>133.0,

Amiodarone(+) m/z646.0>58.2,

N-Desethylamiodarone (+) m/z618.0>72.2,

### 1.2.2 前处理条件

样品体积: 50 μL; 试剂: 乙腈 200 μL; 振荡: 90 sec, 1900 rpm; 过滤: 150 sec。

### 1.2.3 实验结果

TDM 所涉及的目标药物种类繁多, 并且物理化学性质也各不相同; 因此, 分析流程中的操作及包括器具、器械在内的一系列标准作业是否正确, 对由此分析流程所得分析结果的有效性而言十分重要。以下对物理化学性质差异较大(尤其是亲水性差异较大)的抗心律失常药进行前处理和分析认证。

采用全自动前处理 LC/MS/MS 系列对高亲水性药物索他洛尔(分配系数  $\log P=2.6342$ ) 和高疏水性药物胺碘酮( $\log P=6.9326$ ) 及其活性代谢物 N-去乙基胺碘酮进行了同时分析。

通过连续分析并绘制标准曲线, 对准确度和精密度(重复性)进行验证。由表 3 可知, 在所设的标准曲线范围内, 高亲水性药物索他洛尔以及高疏水性药物胺碘酮及其代谢物 N-去乙基胺碘酮均得到良好的线性, 在包括定量下限的所有范围内, 准确度均在  $100\pm 15\%$  以内, 相对标准偏差 %RSD 均在 15% 以内, 表示重复性良好。

上述结果表明, 全自动前处理 LC/MS/MS 系统的前处理及分析可以适用于众多亲水性和疏水性药物。

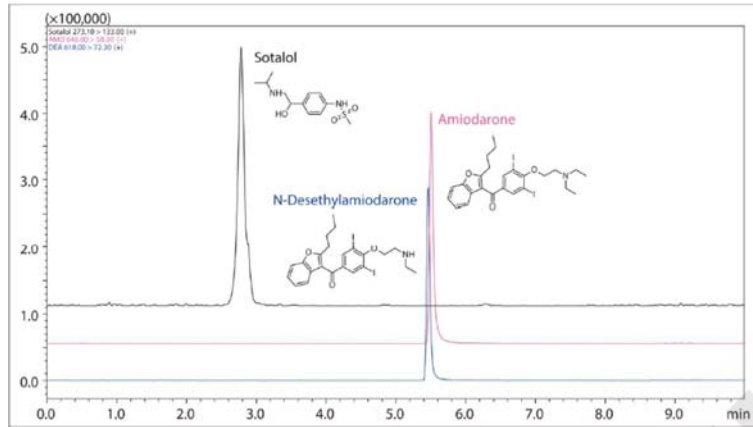


图 4 3 种抗心律失常药及代谢物的血清加标样的质谱色谱图

表 2 抗心律失常药同时分析的验证结果

Compounds	Range (ng/mL)	QC samples concentration (ng/mL)			Accuracy(%)			%RSD (n=6)		
		LLOQ	Medium	High	LLOQ	Medium	High	LLOQ	Medium	High
Sotalol	100 - 5000	100	1000	2000	107.0	101.2	101.1	3.20	1.83	1.80
Amiodarone	100 - 5000	100	1000	2000	99.2	102.6	100.6	3.78	1.66	1.99
N-Desethylamiodarone	100 - 5000	100	1000	2000	101.2	103.3	100.1	4.22	1.48	3.01

## 2 总结

综上所述，全自动前处理 LC/MS/MS 系统可以解决 TDM 中存在的因处理技术水平参差不齐而产生偏差和错误的问题，并且能够对众多物理化学性质不同的药物快速且高精度地进行分析。有望在 TDM 分析领域提高测定数据的可靠性和工作效率。

## 第 2 章 液相色谱法



Nexera UHPLC(LC-30A)高效液相色谱仪



Nexera-i(LC-2040)高效液相色谱仪

### i-Series 系列仪器特点:

Nexera-i UHPLC系统中, 广泛应用于医药、化学、食品、环境领域, 既可作为个人使用的专有分析系统, 也可用于多人员共用的开放系统。自动进样器可容纳216位样品瓶, 并且样品仓开放访问, 轻松追加新样品; 仪器体积小, 便于实验室的装置管理及迁移。

#### ■ Innovative-创新化: 创新化设计以实现未来型实验室

- ❖ ICM(Interactive Communication Mode) ---从实验室中解放操作者
- ❖ 不受操作环境影响, 实现仪器远程监控
- ❖ 可靠性和稳定性最大化
  - ✓ 光路系统与流通池双重控温功能保证实验不受室温变化影响
  - ✓ 微量进样(1 $\mu$ L及以下)时重现性依旧卓越
  - ✓ 进样周期缩短一半, 有效提升分析效率

#### ■ Intuitive-直观化: 直观化控制以追求便利操作

- ❖ 将图形用户界面(GUI)整合于仪器控制面板及工作站中
- ❖ 快速批表功能: 根据图形化显示样品瓶位置快速建立批处理序列

#### ■ Intelligent-智能化: 智能化方案以提升工作效率

- ❖ 即使批表中包含多种方法也可实现分析流程自动化
- ❖ 兼容不同公司分析方法, 实现分析方法的快速转移



## 2.1 岛津常规液相色谱法

### 高效液相色谱法测定人血清中氯丙嗪含量

**摘要:** 本文建立使用岛津高效液相色谱仪 LC-16 测定人血清中氯丙嗪含量的方法。该方法使用 C18 色谱柱进行分离, 内标法定量, 线性范围为 10~400 ng, 相关系数 0.9996, 加标回收率为 91.2%。实验分析结果表明, 该方法可用于人血清中氯丙嗪的快速检测, 为临床药物监测与个体化用药提供准确检测方法。

**关键词:** 高效液相色谱 血清 氯丙嗪

氯丙嗪 (Chlorpromazine, CAS: 50-53-3), 吩噻嗪类代表药物, 为中枢多巴胺受体的拮抗药, 具有镇静、抗精神病、镇吐、降低体温及基础代谢、 $\alpha$ -肾上腺素能受体及 m-胆碱能受体阻断等作用, 临床常用于控制精神分裂症、各种原因引起的呕吐, 亦用于低温麻醉及人工冬眠; 与镇痛药合用, 可治疗癌症晚期病人的剧痛。临床中, 不同病人存在个体差异, 精神病类药物亦存在多种用药禁忌与不良反应, 因此个性化用药、监测药物浓度对临床疗效与减少不良反应至关重要。本文使用岛津高效液相色谱仪 LC-16 建立快速检测人血清中氯丙嗪含量, 为临床药物监测提供检测方法。

#### 1. 实验条件

##### 1.1 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-16。具体配置为 LC-16 输液泵, 手动进样器, CTO-16 柱温箱, SPD-16 紫外检测器, CBM-20Alite 系统控制器, LabSolutions 色谱工作站。

##### 1.2 分析条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS (4.6 mm I.D.×150 mm L., 5.0  $\mu$ m)

流动相: A 相-水; B 相-甲醇

洗脱方式: 等度洗脱

紫外检测波长: 254 nm

流速: 1.0 mL/min

进样量: 20  $\mu$ L

##### 1.3 标准品溶液的配制

向具塞试管中分别加入内标安定 30  $\mu$ L 与氯丙嗪标准溶液, 配制成含氯丙嗪标准品 10、50、100、200、400 ng 的标准工作曲线。配制后, 依次加入胎牛血清 0.5 mL、NaOH 溶液、重蒸乙醚、Vitamin C (0.1 mol/L) 溶液, 涡旋振荡并静置。分层后, 吸取上层乙醚层置于离心管中, 乙醚挥干后, 加入流动相后振荡, 取上清液进样分析。

##### 1.4 样品制备

向具塞试管中分别加入内标安定 30  $\mu$ L、人血清样品 0.5 mL、NaOH 溶液、重蒸乙醚、Vitamin C (0.1 mol/L) 溶液，涡旋振荡并静置。分层后，吸取上层乙醚层置于离心管中，乙醚挥发后，加入流动相后振荡，取上清液进样分析。

## 2. 结果与讨论

### 2.1 标准品液相色谱图

含氯丙嗪 50 ng 的标准品色谱图，见图 1。氯丙嗪、安定保留时间  $t_R$  分别为 3.98 min、3.65 min。

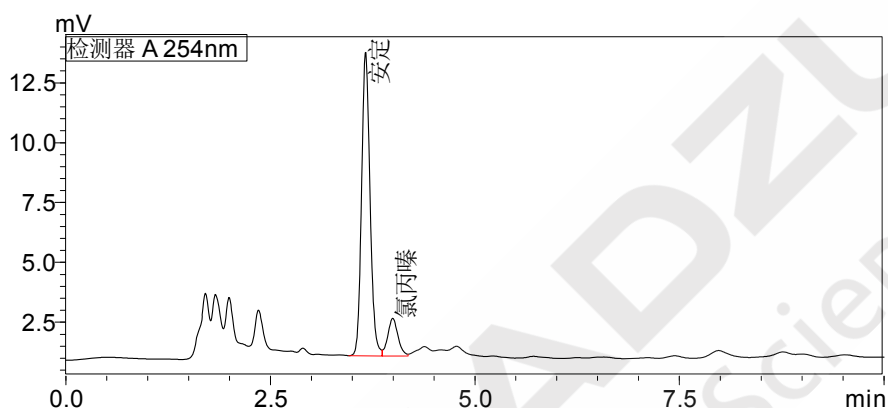


图 1 含氯丙嗪 50 ng 的标准溶液色谱图

### 2.2 标准曲线

按 1.3 项下制备氯丙嗪血清样本标准曲线，并按 1.2 中的分析条件进行测定，以血清中氯丙嗪含量与内标含量（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以氯丙嗪峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标，进行线性回归分析，所得标准曲线见图 2，血清中氯丙嗪线性回归方程及相关系数见表 1。结果表明氯丙嗪分别在 10~400 ng 的含量范围内均与峰面积线性关系良好。

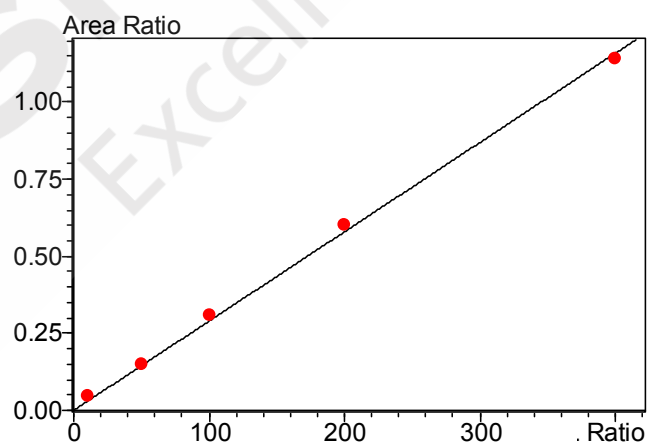


图 2 氯丙嗪标准曲线

表 1 氯丙嗪标准曲线参数（线性回归，无权重）

名称	线性范围 (ng)	线性方程	相关系数
氯丙嗪	10~400	$Y = 0.00289833X + 0$	0.9997

### 2.3 加标回收率与样品检测

按照 1.4 项下方法分别制备人血清样本 5 份，其中一份加入氯丙嗪标准品 100 ng 作为加标样品，考察其加标回收率，并对病人血清样本进行检测。实验所得色谱图见图 3、4，实验结果见表 2。

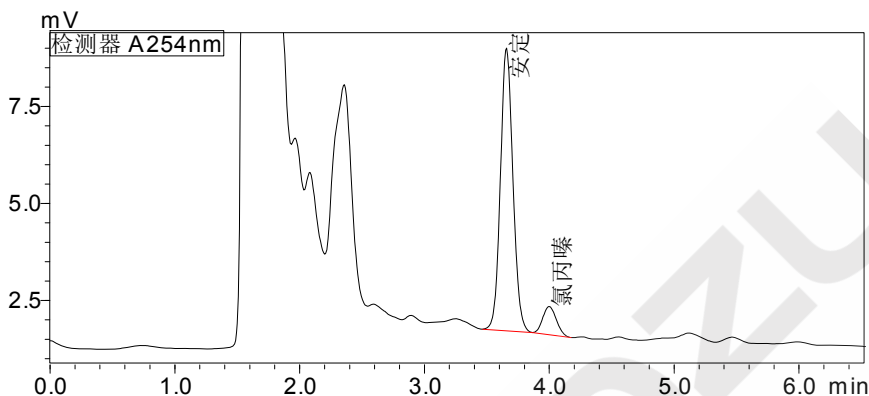


图 3 氯丙嗪血清样品 1 色谱图

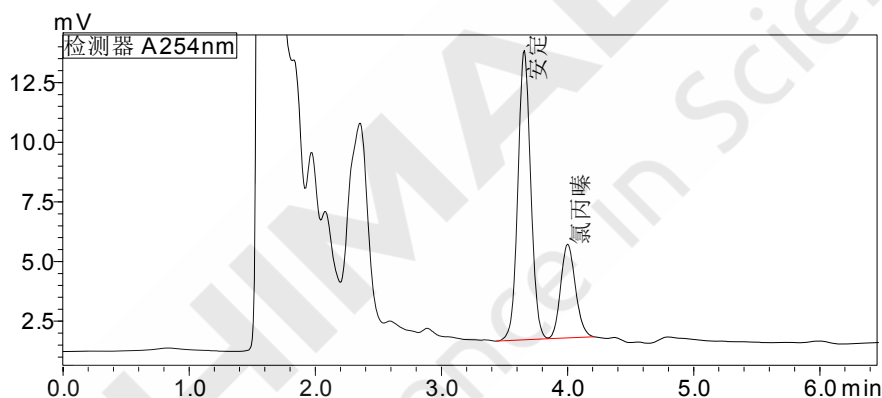


图 4 氯丙嗪血清样品 1 加标色谱图

表 2 加标回收率

名称	检测浓度/ng (每毫升血清中含量)	加标回收率
样品 1	73.6	-
样品 1 加标 100 ng	-	91.2%
样品 2	未检出	-
样品 3	44.0	-
样品 4	18.8	-

### 3. 结论

本文建立使用岛津高效液相色谱仪 LC-16 测定人血清中氯丙嗪含量的方法。该方法使用等度洗脱方式，内标法定量，线性范围为 10~400 ng，相关系数 0.9996，加标回收率为 91.2%。实验结果表明，该方法可快速检测人血清中氯丙嗪含量，为临床药物监测提供准确检测方法，可供相关检测人员参考。

# 高效液相色谱法测定人血清中氯氮平含量

**摘要：** 本文建立使用岛津高效液相色谱仪 LC-16 测定人血清中氯氮平含量的方法。该方法使用 C18 色谱柱进行分离，等度洗脱方式，内标法定量，线性范围为 50~800 ng，相关系数 0.9993，并检测人血清样品 10 例。实验分析结果表明，该方法适用于人血清中氯氮平的快速检测，为临床使用氯氮平监测血药浓度提供准确的检测方法。

**关键词：** 高效液相色谱 血清 氯氮平

氯氮平(Clozapine, CAS: 5786-21-0)是一种非典型的抗精神病药物，具有强大的抗精神病作用，临床常用于治疗急性与慢性精神分裂症及各种亚型。然而，随着临床治疗的广泛应用，氯氮平的镇静作用与抗胆碱不良反应不断增多，常见有头晕、无力、嗜睡、流涎、恶心、呕吐、口干、便秘、体位性低血压、心动过速等，另有临床统计发现，服用氯氮平后会在 1%~2% 患者身上引发致命的血液疾病，因此监测氯氮平血药浓度对药物使用安全与临床疗效具有重要意义。本文使用岛津高效液相色谱仪 LC-16 建立快速检测人血清中氯氮平含量，为临床药物监测提供检测方法。

## 3. 实验条件

### 1.1 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-16。具体配置为 LC-16 输液泵，手动进样器，CTO-16 柱温箱，SPD-16 紫外检测器，CBM-20Alite 系统控制器，LabSolutions 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack VP-ODS (4.6 mm I.D.×150 mm L.,5.0 μm)

流动相：A 相-水；B 相-甲醇

洗脱方式：等度洗脱

紫外检测波长：254 nm

流速：1.0 mL/min

进样量：20 μL

### 1.3 标准品溶液的配制

向具塞试管中分别加入内标安定 30 μL 与氯氮平标准溶液，配制成含氯氮平标准品 50、100、200、400、800 ng 的标准工作曲线。配制后，依次加入胎牛血清 0.5 mL、NaOH 溶液、重蒸乙醚、Vitamin C (0.1 mol/L) 溶液，涡旋振荡并静置。分层后，取上层乙醚层置于离心管中，乙醚挥干后，加入流动相并振荡，取上清液进样分析。

### 1.4 样品制备

向具塞试管中分别加入内标安定 30 μL、人血清样品 0.5 mL、NaOH 溶液、重蒸乙醚、Vitamin C (0.1 mol/L) 溶液，涡旋振荡并静置。分层后，取上层乙醚层置于离心管中，乙醚挥干后，加入流动相并振荡，取上清液进样分析。

## 4. 结果与讨论

### 2.1 标准品液相色谱图

含氯氮平 400 ng 的标准品色谱图，见图 1。氯氮平、安定保留时间  $t_R$  分别为 3.77 min、4.53 min。

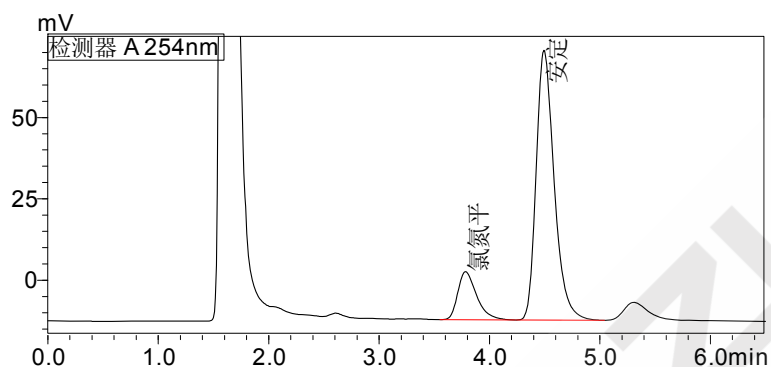


图 1 含氯氮平 400 ng 的标准溶液色谱图

### 2.2 标准曲线

按 1.3 项下制备氯氮平血清样本标准曲线，并按 1.2 中的分析条件进行测定，以血清中氯氮平含量与内标含量（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以氯氮平峰面积与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标，进行线性回归分析，权重系数 1/C，所得标准曲线见图 2，血清中氯氮平线性回归方程及相关系数见表 1。结果表明氯氮平分别在 50~800 ng 的含量范围内均与峰面积线性关系良好。

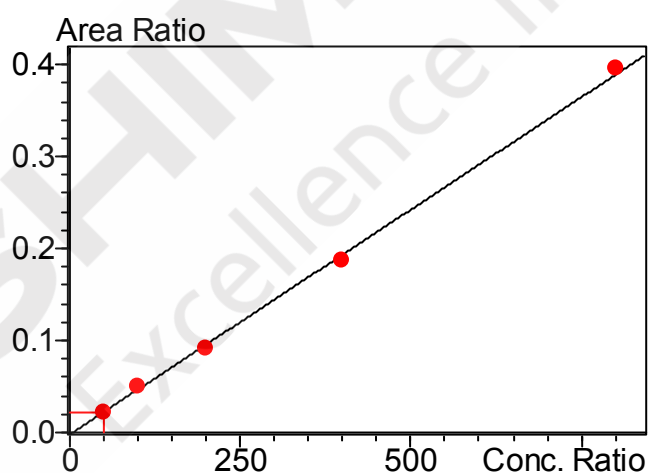


图 2 氯氮平标准曲线

表 1 氯氮平标准曲线参数（线性回归，权重系数 1/C）

名称	线性范围 (ng)	线性方程	相关系数	准确度 (%)
氯氮平	50~800	$Y = (0.000488794) X + (-0.00198252)$	0.9993	96.5~105.4

### 2.3 样品检测

按照 1.4 项下方法分别制备人血清样品 10 份，并进行检测，实验所得结果见表 2。

表2 人血清样本中氯氮平含量

名称	检测浓度/ng (每毫升血清中含量)
样品 1	181.4
样品 2	190.1
样品 3	123.8
样品 4	176.4
样品 5	217.4
样品 6	162.6
样品 7	139.0
样品 8	106.2
样品 9	96.1
样品 10	134.6

### 3. 结论

本文建立使用岛津高效液相色谱仪 LC-16 测定人血清中氯氮平含量的方法。该方法使用等度洗脱方式，内标法定量，线性范围为 50~800 ng，相关系数 0.9993。实验结果表明，该方法可快速检测人血清中氯氮平含量，为临床药物监测提供准确检测方法，可供相关检测人员参考。



SHIMADZU  
Excellence in Science

## 2.2 FLC 全自动液相色谱法



**FLC 全自动药物分析系统 (FLC2420)**

全自动色谱系统 (FLC×HPLC) 由 FLC (全自动二维液相前端装置, 湖南德米特仪器有限公司) 和 HPLC (高效液相色谱仪, 岛津公司) 两部分组成。该系统主要是进行血药浓度测定, 血浆样品经自动化处理后, 直接传递至HPLC进行定量分析。FLC可对目标物进行传递及纠偏控制, 从而能获得高度稳定准确的测定结果。

### ■ 技术特点:

- ◇ 测定种类多, 满足临床复杂用药的需求。
- ◇ 自动化程度高, 适应临床报告及时效性要求。
- ◇ 分析成本低, 并且支持自建测定方法。
- ◇ 可靠性程度高, 支持首次测定成功率考核。

### ■ 质量目标

- ◇ 满足临床血药浓度线性范围需求。
- ◇ 线性范围内RCVK值小于20%。
- ◇ 线性范围内准确度偏差在25%内。
- ◇ 12份样品平均分析时间小于12 min, 适应临床快速检测需求。
- ◇ 具备完整质控回溯体系及失控处理程序。

# 新型 2D-LC-UV 建立莫西沙星 TDM 测定方法

**摘要:** 采用新型二维液相色谱结合紫外检测系统 (2D-LC-UV) 建立莫西沙星治疗药物监测 (TDM) 测定方法, 并用于肾移植术后感染患者的药物浓度测定。**方法** 2D-LC-UV 由一维液相色谱及二维液相色谱系统构成, 一维色谱柱为 Aston SC1(4.6×20mm, 5μm), 负责在线富集及一维分离, 二维色谱柱为 Aston SX2(4.6×50mm, 5μm), 负责目标物的进一步分离; 检测波长为 296nm; 柱温 40℃。样品去除蛋白后进样 200μL, 采用“中心切割”模式并利用捕获柱转移目标物; 外标法计算结果。莫西沙星在 0.05-4.73μg·mL<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数为 0.99997; 日间精密性、日内精密性均小于 3%, 准确度为 92.81%-98.30%; 常规条件变异 (RCV) 小于 15.4%; 溶血、黄疸、高脂肪、常见协同用药不干扰测定; 急诊测定响应时间 35.7min。本法具有抗干扰能力强、自动化程度高、准确度和精密性良好的特点, 适合莫西沙星治疗药物监测的常规应用。

**关键词:** 高效液相色谱法 莫西沙星 治疗药物监测 2D-LC

莫西沙星是第四代喹诺酮类抗菌药物, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及厌氧菌都有抗菌活性, 常用于呼吸道感染及其他感染性疾病的治疗。感染是肾移植术后患者的常见并发症, 严重的感染可影响移植术后的肾功能甚至危及生命, 极大地影响了肾移植病人的近、远期生存率。临床常选用广谱抗菌药莫西沙星以覆盖可能的病原菌, 并与其他抗菌或抗病毒药联用, 控制术后感染。由于药物治疗过程较复杂, 应及时监控并注意有肾毒性或经肾脏代谢的抗菌药物的剂量调整, 同时要注意药物副作用, 避免二重感染等不良反应的发生。

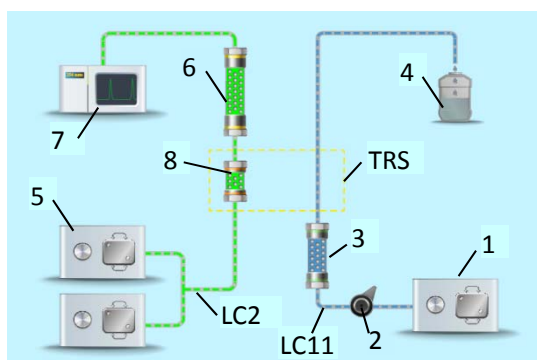
TDM 隶属于临床检验范畴, 我国尚未相关测定方法的评估指导意见, 大部分实验室仍然参考《群体药代动力学研究技术指导原则》或《临床前药代动力学研究技术指导原则》等进行方法学考察, 有关测定需求的确定、允许总误差、质量控制方法、方法验证流程等, 与现代临床检验学的质量管理与方法验证存在较大差距。如采用液质联用测定莫西沙星的文献, 与 EP-6A 推荐的临床报告范围验证差距巨大, 因此文献所述线性范围并不能作为临床莫西沙星 TDM 浓度报告范围; 如采用常规液相色谱的文献, 涉及难以控制不确定度的操作过程, 对于实验操作者要求较高, 难以建立室内质量控制体系, 不利于临床样品检测。

本文选择采用可控设计、高自动化的 2D-LC-UV 系统, 测定流程中全部工序的不确定度可以有效控制, 并参考美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 相关指南, 建立并评估莫西沙星的 TDM 方法, 用于肾移植后感染患者术的药物浓度测定。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2D-LC-UV 系统由 FLC2420 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-20A 液相色谱部件构成, FLC2420 连接第一维色谱泵、第二维色谱泵、检测器、自动进样器等色谱功能模块, 自动根据设定模式分配成第一维色谱系统 (LC1), 第二维色谱系统 (LC2); 其中第一维色谱柱 (LC1 column) 主要负责样品在线富集及第一维分离, 第二维色谱柱 (LC2 column) 主要负责进一步分离检测, 两维系统通过智能流路控制系统 (TRS) 连接, 采用“中心切割”模式及捕获柱转移目标物, 具体结构见图 1。GH-202 电子分析天平 (AND, 日本); XW-80A 旋涡混合器 (上海琪特分析仪器有限公司); TDZ4-WS 低速离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司); 松下低温冰箱。



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 废液收集瓶

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)

图1 FLC 2420 全自动二维液相色谱系统结构

## 1.2 药品与试剂

莫西沙星对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 20160329, 纯度 96.0%); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 ACS 公司); 高氯酸、醋酸钠、醋酸 (分析纯, 南京化学试剂有限公司); 马血清 (北京政博伟业生物科技有限公司, 批号: 160128)。

## 2 方法

### 2.1 溶液的配制

#### 2.1.1 莫西沙星对照品溶液配制

精密称取莫西沙星对照品 7.70mg 于 25mL 容量瓶中, 用适量蒸馏水溶解后加乙二醇定容至刻度, 混匀, 即得浓度为  $295.68\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的莫西沙星标准溶液, 转移至密封螺口瓶中, 置  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。使用时稀释至所需浓度的工作液。

#### 2.1.2 质控样品的配制

精密吸取适量莫西沙星相应工作液, 用人血清配制成为  $0.14$ 、 $0.85$ 、 $4.26\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的低、中、高三个浓度的质控样品, 取 3ml 分装至 5ml 螺口瓶中, 置  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 使用前超声复溶并恢复至室温, 每瓶冻融次数不超过 10 次。

### 2.2 血样处理

在 EPP 管中加入 12%高氯酸  $900\mu\text{L}$ , 精密加入  $300\mu\text{L}$  血浆, 涡旋震荡 1min,  $14500\text{r}/\text{min}$  离心 8min (离心力为  $11988g$ ), 取上清  $1000\mu\text{L}$  加入 1.5ml 进样瓶中, 加入  $5.0\text{ mol/L}$  磷酸钠  $100\mu\text{L}$  调节 pH 值, 摇匀 10s, 进样  $200\mu\text{L}$ 。

### 2.3 定量方法

采用外标工作曲线法定量, 将莫西沙星样品峰面积代入标准曲线, 计算所得浓度。每批随行测定高、中、低质控样品。

### 2.4 色谱条件

LC1 系统中第一维色谱柱为 Aston SC1( $4.6\text{ mm}\times 20\text{ mm}$ ,  $5\mu\text{m}$ , ANAX, 中国), 流动相为乙腈:甲醇:  $20.0\text{ mmol/L}$  磷酸钠= $200:100:180(\text{V}/\text{V}/\text{V})$ ,用磷酸调节 pH 至 6.5; 流动相为 LC2 系统中第二维色谱柱为 Aston SX2( $4.6\text{ mm}\times 50\text{ mm}$ ,  $5\mu\text{m}$ , ANAX, 中国), 流动相为乙腈:水 (含  $20.0\text{ mmol/L}$  磷酸钠, 用三乙胺调 pH 至 7.2) : 水 (含  $20.0\text{ mmol/L}$  磷酸钠, 用磷酸调 pH 至 3.0)= $53:25:22(\text{V}/\text{V}/\text{V})$ ; 捕获柱为 Aston SP3( $4.6\text{ mm}\times 20\text{ mm}$ ,  $5\mu\text{m}$ , ANAX, 中国)。柱温  $40^{\circ}\text{C}$ , 检测波长  $296\text{ nm}$ , 流速  $1.2\text{ mL}/\text{min}$ ; 进样体积  $200\mu\text{L}$ , FLC2420 系统通过 3 个工序流程进行目标组分莫西沙星的二维分离 (图 2), 工序 1 中, 样品通过自动进样器进样, 在第一维色谱柱进行初步分离, 工序 2 中, 样品中目标组分莫西沙星转移至捕获柱中, 工序 3 中捕获柱中的目标组分在第二维流动相淋洗下进一步分离, 被后端 UV 检测器检测。

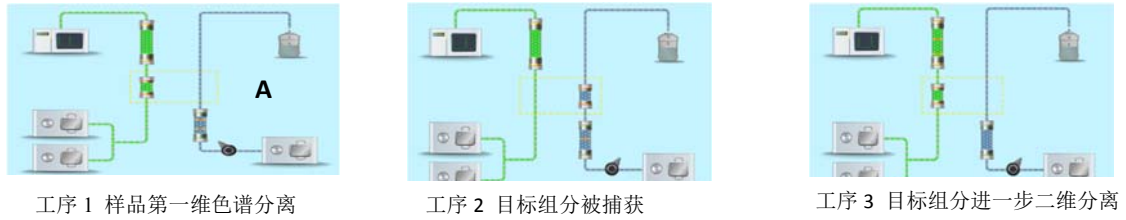


图2 FLC2420二维分离检测工序

3个二维工序由色谱工作站时间程序控制，无需人为干预，实现高度自动化的快速分析，每个工序中主要部件条件见表1。

表1 FLC 2420系统运行时间程序

时间 (min)	时间程序设置				
	0-0.8	0.81-1.79	1.80-2.80	2.81-3.80	3.81-8.00
TRS状态	第一维色谱柱与捕获柱断开	第一维色谱柱与捕获柱断开	第一维色谱柱与捕获柱连接	捕获柱与第二维色谱柱连接	捕获柱与第二维色谱柱断开
主要功能	完成样品在线富集	进行第一维色谱分离	目标物转移至捕获柱	目标物转移至二维柱	目标物进一步分离

## 2.5 色谱行为和方法专属性

所述运行工序条件下，莫西沙星保留时间  $t_R$  为 6.68 min，总色谱图时间为 8.0 min，其中第一维工序与捕获工序占用 2.80 min，因此第二维分离实际只有 5.2 min，色谱峰在  $t_R \pm 1.4$  min 内无干扰峰及其他干扰，另外本方法测试高血脂、黄疸及轻微溶血样品，在空白色谱图中莫西沙星色谱峰处未观察到干扰。

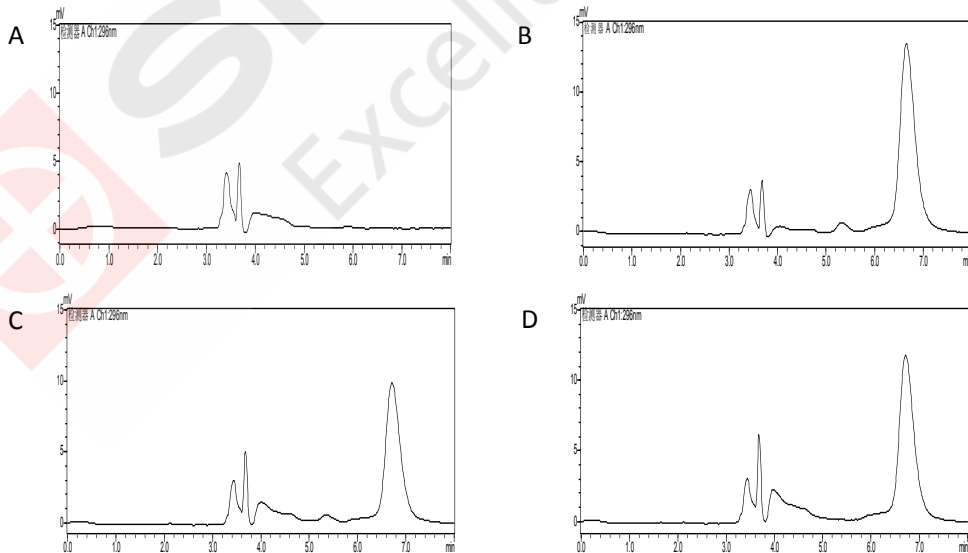


图2 莫西沙星的 2D-LC 色谱图

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 对照品溶液 (reference,  $0.85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) C. 对照品+空白血浆 (blank plasma spiked with reference,  $0.64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) D. 患者血样 (patient blood sample,  $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

由于移植术后感染患者术用药非常复杂，常有多种药物联用的情况。因此本实验采集

临床患者用药后 2 小时及 24 小时血样,按本条件进行测试,每种药物对不少于 6 名患者进行平行测定,观察 25 种药物对莫西沙星结果的影响。结果表明氧氟沙星在不同保留时间出峰,其他药物并不干扰测试。

表 2 肾移植术后感染患者合并用药的影响结果

序号	药物	出峰时间
1	伏立康唑	未出峰
2	氟康唑	未出峰
3	卡泊芬净	未出峰
4	美罗培南	未出峰
5	头孢哌酮/舒巴坦	未出峰
6	氧氟沙星	5.3min
7	环丙沙星	未出峰
8	替考拉宁	未出峰
9	亚胺培南/西司他丁	未出峰
10	替硝唑	未出峰
11	复方磺胺甲恶唑	未出峰
12	头孢呋辛酯	未出峰
13	更昔洛韦	未出峰
14	吗替麦考酚酯	未出峰
15	环孢素 A	未出峰
16	他克莫司	未出峰
17	甲泼尼龙	未出峰
18	咪唑立宾	未出峰
19	地尔硫卓	未出峰
20	硝苯地平	未出峰
21	美托洛尔	未出峰
22	缬沙坦	未出峰
23	奥美拉唑	未出峰
24	兰索拉唑	未出峰
25	泮托拉唑	未出峰

## 2.6 急诊测定响应时间

TDM 实际工作中,临床患者有时出现严重中枢神经毒副反应,需要尽早判断是否为莫西沙星浓度过高,因此对测定方法具有快速性要求。本方法以 2D-LC 开机为计时起点,完成一个急诊样品及一个平行室内质控品所需的时间为急诊测定响应时间。连续运行六次,评估测定方法与系统的快速性能力。急症测定响应时间综合反应测定方法的快速能力,涉及离心机、超声波、振荡器等辅助设备使用的耗时程度,测定系统的平衡能力,样品处理工序耗时程度,测定方法复杂程度等。表 3 显示本方法实际的急诊测定响应时间约为 35.7 min。

表 3 急诊测定响应时间结果

编号	工作内容			平均时间
	时间段 1	时间段 2	时间段 3	
	开机并核对流动相状况,执行系统自动平衡程序;同时执行样品签收,分离血浆,溶解质控,样品去蛋白程序	急诊样品与质控样品测定时间,同时进行期间控制程序	质控判读,结果抄录与核对,系统关机或待机	

1	15min	18min	3min	36 min
2	17min	17min	3min	37min
3	17min	17min	2min	36 min
4	15min	17min	3min	35 min
5	15min	17min	3min	35 min
6	16min	17min	2min	35min
				35.7min

## 2.7 常规条件下变异 (routine condition variance, RCV)

RCV 是评估测定方法常规运行条件下精密度的重要指标,也是室内质控中靶值和运行误差范围确定的依据。本方法将熟练测定人员定义为:能熟知移液器校准与应用,2D-LC-UV 系统工作原理、运行流程,本测定方法不确定度传递顺序与关系,以及质量控制品的使用方法。熟练测定人员在测样过程中对不同样品跟随测定质控品,每次测定 2-5 份质控品,完成 20 次质量控制品测定后,计算 RCV 值,本测定方法低、中、高 RCV 分别为 15.4%、12.7%、9.4%。

## 2.8 标准曲线与线性范围

使用标准储备液,配成浓度分别为 0.05、0.12、0.30、0.76、1.89、4.73  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的莫西沙星标准含药血浆,按“2.2”项下方法操作处理、“2.4”项下色谱条件进样。以浓度为自变量 (X),峰面积为因变量 (Y) 作权重回归计算,莫西沙星在 0.05-4.73  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  呈良好线性关系,回归方程为:

$$Y = 3.05812 \times 10^{-2}X - 1.527637 \times 10^{-2}, r = 0.99997$$

## 2.9 最低检测限与最低定量限

最低检测限 (LOD) 以  $S/N > 3$  计算,最低定量限 (LLOQ) 以莫西沙星色谱峰完全达到基线分离,峰面积  $RSD \leq 20\%$ ,准确度在 80%—120% 计算。结果血浆中莫西沙星的最低检测限和最低定量限分别为 0.02  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  与 0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,能满足临床对莫西沙星的治疗药物检测要求。

## 2.10 绝对回收率

精密量取 0.14、0.85、4.26  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的低、中、高 3 个浓度的莫西沙星质控样品,按“2.2”项下方法操作处理、“2.4”项下色谱条件进样。与对应浓度的莫西沙星对照品工作液峰面积进行比较,平行 3 组。结果低、中、高 3 个浓度处理样品的绝对回收率为 95.84%、98.23%、93.81%。

## 2.11 精密度与准确性

精密量取 0.14、0.85、4.26  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的低、中、高 3 个浓度的莫西沙星质控样品,1 天内测定 5 次,连续测定 3 天,计算莫西沙星的日内、日间精密度和准确性,结果见表 4。

表 4 日内、日间精密度和准确度

浓度 (concentration) $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内精密度 (intra-day precision)		日间精密度 (inter-day precision)	
	回收率 (recovery) /%	RSD/%	回收率 (recovery) /%	RSD/%
0.14	98.30	1.6	93.42	2.3
0.85	92.81	2.4	96.56	1.8
4.26	94.15	1.9	95.61	2.7

## 2.12 稳定性考察

取低、中、高 3 个浓度的莫西沙星质控样品,分别于室温、10 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$  放置 0、2、4、

8、12 h, 此外, 质控样品经反复冻融 10 次 (-80℃) 进行样品检测, 结果在以上实验条件下 RSD 均小于 8.2%, 结果表明, 在次实验条件下血浆中的莫西沙星稳定性良好, 符合临床治疗药物监测要求。

### 2.13 临床样本测定

采集 8 例移植术后服用莫西沙星的患者 2 h 血样, 13 例 24 h 后患者血样, 采用本实验建立的方法进行测定, 测定过程未发生干扰, 药物浓度范围在 0.21-4.13  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 其中 2 例患者出现明显的中枢神经反应 (表 5), 因缺少大样本数据以及前瞻性设计方案, 尚不能进行统计学意义上的浓度-毒副反应评估, 进一步的结论待不断完善。

表 5 21 例莫西沙星测定结果与中枢神经反应观察

样本情况	序号	患者	测定结果	中枢神经副反应
服药后 2h 血样	1	郑益 X	3.59	无
	2	隆德 X	3.82	无
	3	何星 X	4.13	头晕头痛、麻木、眩晕、嗜睡
	4	刘立 X	2.26	无
	5	毛桂 X	3.31	无
	6	曾 X	3.58	无
	7	蒋 X	3.61	无
	8	邹 X	2.90	无
服药后 24h 血样	9	郑益 X	0.98	无
	10	隆德 X	0.64	无
	11	毛桂 X	0.35	无
	12	曾 X	0.89	无
	13	肖孝 X	0.21	无
	14	刘 X	1.16	无
	15	杨又 X	0.69	无
	16	黄友 X	0.73	无
	17	江 X	1.54	烦躁、眩晕、失眠
	18	刘志 X	0.78	无
	19	王宇 X	0.62	无
	20	谢详 X	0.91	无
	21	屈 X	0.26	无

### 3 讨论

目前已有一些应用全自动二维液相色谱系统监测的药物如: 奥卡西平、异烟肼、双氯芬酸钠的报道, 此方法可以提高仪器灵敏度和分离度, 实现高度智能化的目的。本文所用 2D-LC-UV 具有其他二维液相不具备的优点, 如样品测定完成后色谱柱无需清洗; 流动相由于事先进行了灭菌和密封处理, 可以长期放置, 无需每日配置; 另外系统采用热量智能补充技术, 色谱柱通常 15 min 可以平衡完毕。这些技术大大节省仪器准备和维护时间, 增加 TDM 的实时性能力。

实验采用直接蛋白沉淀法, 减少处理样品中的损失与前处理时间并考察了分别用高氯酸和乙腈对样品进行前处理的绝对回收率。实验结果表明, 用高氯酸作为沉淀剂的样品绝对回收率为 98.8%—93.3%, 用乙腈作为沉淀剂的样品绝对回收率为 81.2%—86.4%, 可能是由于莫西沙星为酸碱两性化合物, 在酸试剂溶液中更易提取完全, 有利于提高样品的提取回收率。因此我们选用高氯酸作为莫西沙星的蛋白沉淀剂, 完全满足外标法测定的要求。

新型 2D-LC-UV 测定莫西沙星血药浓度的方法，设备结构比常规色谱复杂，涉及多根色谱柱，因此操作人员需要了解二维色谱的结构、原理及关键步骤，比如需要注意流动相的挥发，影响第 1 工序中一维色谱的分离稳定性；另外流路较多，需要认真检查是否跑空等问题。综合而言，由于此系统集成样品自动化富集与分离系统，灵敏度与自动化程度很高，使用简单，结果准确，对临床开展莫西沙星的治疗药物监测工作有很好的促进作用。



# FLC2420 全自动二维液相色谱系统测定血浆中奥卡西平代谢物

**摘要:** 采用全自动二维液相色谱系统建立奥卡西平的 TDM 测定方法, 样品去除蛋白后直接进样, 柱转移结合“中心切割”模式转移目标物, 外标法计算结果。奥卡西平代谢物的保留时间为 5.24 min; 方法的线性范围为 1.37-43.87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 相关系数 0.9997; 方法准确度在 87.3%-104.8%之间; 日间精密度、日内精密度均小于 2.4%; 常规条件变异(RSD)小于 5.1%。本方法具有很快的测定速度, 高度自动化能力, 抗干扰能力强、稳定准确, 多种癫痫药物测定无需更换色谱柱。

**关键词:** 二维色谱 抗癫痫药物 治疗药物监测 奥卡西平

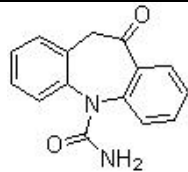
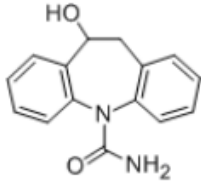
奥卡西平 (oxcarbazepine, OXC) 为卡马西平 (carbamazepine, CBZ) 的 10-酮基衍生物, 是新一代 AEDs, 临床上用于成人和 4 岁以上儿童的部分癫痫发作或全身强直阵挛性发作的辅助治疗。同其他 AEDs 一样, 奥卡西平治疗浓度范围较窄, 易发生中毒, 且 OXC 可以诱导细胞色素 CYP3A4/5 和抑制 CYP2C19, 对容易受细胞色素 P3A4/5 和 P2C19 影响的药物能产生不同程度的影响。Friis 等在用 OXC 治疗的 947 例患者中有 33% 发生不良反应, 最常见的有眩晕、构音障碍、嗜眠、恶心/呕吐、头痛、震颤、视力障碍等, 研究认为可能与奥卡西平的给药剂量和血药浓度有关。因此, 随着 OXC 在临床上的广泛应用, TDM 成为指导奥卡西平合理用药的一种安全有效的手段。

OXC 在人体内会完全且迅速地代谢为 10-羟基卡马西平 (10-hydroxycarbamazepine, mono-hydroxy derivative, MHD), 且 MHD 为血浆中发挥疗效的主要活性物质, 故对血清中的 MHD 进行测定。有文献报道用 HPLC-UV 法测定血浆中 MHD 浓度, 但样品处理复杂, 涉及的试剂种类和用量、方法操作步骤和时间均较多。本实验采用自动化程度高且具备良好的耐受性及可定量性的新型全自动二维液相色谱系统, 建立了一种快速、稳定、准确且无需内标的方法, 用于定量测定人血清中 MHD 的浓度, 以支持 OXC 的药代动力学特征研究, 及相关的临床追踪研究。

## 1 实验

### 1.1 化合物信息

表 1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
奥卡西平	Oxcarbazepine	28721-07-5	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	
10-羟基卡马西平	10-hydroxycarbamazepine	29331-92-8	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	

## 1.2 仪器

本实验使用全自动二维液相色谱系统。该系统由 FLC2420 全自动二维色谱耦合仪及岛津 LC-20A 液相色谱部件构成。

## 1.3 分析条件

色谱柱：第二维色谱柱 Nucleoshell PFP 色谱柱 (4.6×100mm, 2.7μm, Macherey-Nagel)；

第一维色谱柱 Aston ACP 色谱柱 (4.6×30mm, 5μm, ANAX)；

中间柱 ASTON SH 色谱柱 (4.6×10mm, 3μm, ANAX)

流动相：第一维流动相为水 (含 20.0mmol/L 磷酸钠)；乙腈：甲醇=300:100:100 (V/V/V)，磷酸调 pH 至 5.4；第二维流动相通过低压梯度四元泵自动配比，具体见表 2。

表2 第二维流动相比例 (V:V:V)

A: 乙腈	B: 碱移动相	C: 酸移动相	D: 甲醇
33	47	20	0

注：碱流动相为水 (含 20.0 mmol/L 的磷酸钠)，三乙胺调 pH 至 7.2；酸流动相为水 (含 20.0 mmol/L 的磷酸钠)，磷酸调 pH 至 3.0。

流速：第一维色谱泵流速为 0.7 mL/min；第二维色谱泵流速为 1.0 mL/min

柱温：40℃ 检测波长：236 nm 进样量：50 μL

系统二维工序由色谱工作站时间程序控制，无需人为干预，实现高度自动化的快速分析，每个工序中主要部件条件见表 3。

表3 FLC 2420系统运行时间程序

时间 (min)	0-1.00	1.01-1.44	1.45-2.25	2.26-3.35	3.36-6.80
TRS 状态	第一维色谱柱与中间柱断开	第一维色谱柱与中间柱断开	第一维色谱柱与中间柱连接	中间柱与第二维色谱柱连接	中间柱与第二维色谱柱断开
主要功能	完成样品在线富集	进行第一维色谱分离	目标物转移至中间柱	目标物转移至二维色谱柱	目标物进一步分离

## 1.4 溶液的配制

准确称取 10-羟基卡马西平对照品 3.67 mg，用异丙醇溶解并定容至合适的体积，得浓度为 365.60 μg·mL<sup>-1</sup> 的 10-羟基卡马西平母液，置-76℃冰箱中保存。使用时稀释至所需浓度的工作液。

精密吸取适量上述母液，用人血清稀释成低浓度(LQC)、中浓度(MQC)和高浓度(HQC)质控样品，浓度分别为 2.19、10.97、36.56 μg·mL<sup>-1</sup>。

## 1.5 样品前处理方法

准确吸取 12%高氯酸 900 μL 至 1.5 mL EP 管中，再准确加入 300 μL 血清，涡旋振荡 1 min 后，高速离心 (14500 r/min) 8 min，取 1000 μL 上层清液，准确吸取 100 μL 磷酸钠调节 pH。

## 1.6 方法验证

### 1.6.1 色谱行为和专属性考察

在上述色谱条件下，分别对奥卡西平代谢物的空白血样、标准品溶液、空白血样中加入标准品和受试者服药后的血样进行的测定，考察方法的专属性。

### 1.6.2 二维色谱转移回收率和精密度考察

转移回收率和精密度是体现药物在二维色谱系统准确、稳定传递的重要指标。本试验采用的二维色谱系统可对每一步转移进行监控,其中用于考察目标物经过分析柱的出峰情况的运行模式称为 LC2 条件模式。将配制好的奥卡西平代谢物标准溶液在上述分析条件下进行检测,得到的峰面积与其在 LC2 条件模式下得到的峰面积进行比较,考察该目标物在二维系统中的转移回收率和精密度。

### 1.6.3 二维色谱对后续色谱峰的去除效果的考察

临床实际血样应用液相色谱进行测定时,常常在目标峰之后仍有杂质被分离出来形成后续干扰峰,影响后一针乃至后几针样品的连续分析,使得实际分析时间较长,满足不了高通量临床样本的测定。而本研究应用的新型二维色谱系统在第一维色谱柱(LC1)后仅对包含目标物的一段分离产物进行截取,大部分干扰物在转移前端即随废液排走,同时中间柱在特定的移动相洗脱条件下,又将一部分杂质拦截,从而实现连续进样不受后续干扰的影响。随机选取受试者服用奥卡西平后的血样 10 份,在上述条件下连续测定,考察二维色谱对目标物后续色谱峰的去除效果。

### 1.6.4 线性关系和定量限(LOQ)的考察

参考美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)相关指南,配制系列浓度的奥卡西平代谢物工作溶液,按上述方法处理并测定,以加样血清中奥卡西平代谢物浓度为纵坐标,峰面积为横坐标绘制工作曲线,得到的线性回归方程。

### 1.6.5 萃取回收率的考察

将高、中、低 3 个水平浓度的奥卡西平代谢物质控样品,按照上述方法进行处理并测定,每个浓度设置 5 组平行和标准溶液对照,比较质控样品和标准溶液对照的药物峰面积,得出该方法的萃取回收率。

### 1.6.6 方法的准确度和精密度考察

对奥卡西平代谢物高、中、低 3 个水平浓度的质控样品进行处理并测定,每个浓度设置 5 组平行,测出结果代入线性回归方程计算浓度,比较该浓度与理论添加的浓度,得出方法的添加回收率和变异系数,检验准确度和日内精密度。连续 3 天配制并测定上述浓度样品,考察方法日间精密度。

### 1.6.7 样品稳定性的考察

取奥卡西平代谢物高、中、低 3 个水平浓度的质控样品,经过 0, 1, 2, 3 次(-76℃)反复冻融后测定,考察血浆样品的冻融稳定性;在室温条件放置 8 h 后测定,考察血浆样品的放置稳定性;将奥卡西平代谢物工作曲线和三个浓度的质控样品的处理液放置在自动进样器中(10℃),于 12 h 内重复进样分析,考察样品处理液的存放稳定性;将三个浓度的质控样品于-76℃冷冻条件下储藏,分别于放置前(0 天)及冷冻存放 30 天, 60 天, 90 天后,将样品取出,解冻后处理并分析,考察血浆样品冰冻保存稳定性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱行为和专属性

实验结果表明,血浆内源性物质及其它杂质均不干扰样品的分离测定。奥卡西平代谢物的保留时间为 5.24 min, 色谱图见图 2。

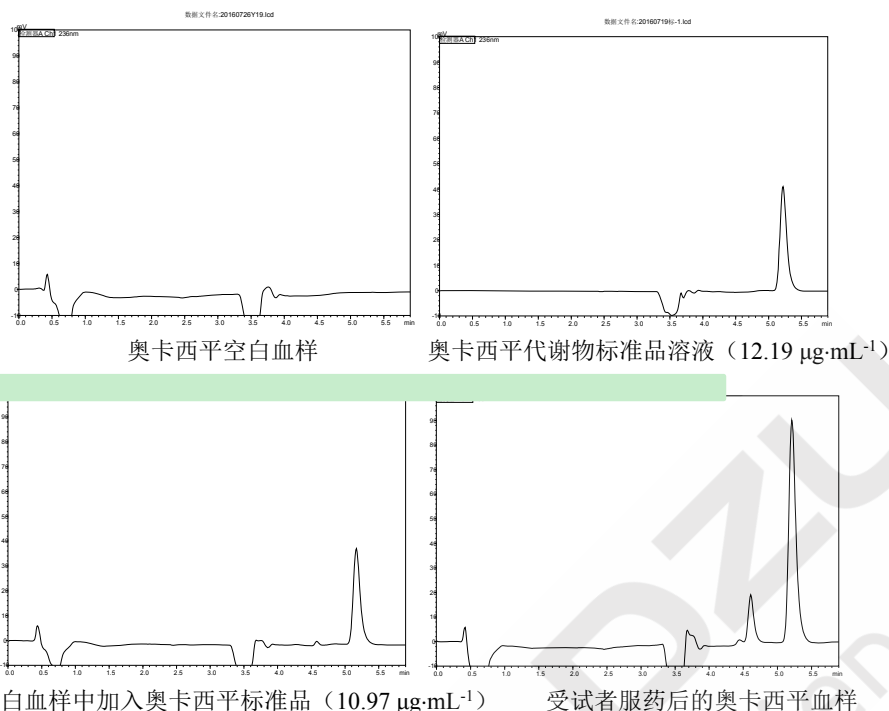


图2 奥卡西平代谢物色谱图

## 2.2 二维色谱转移回收率和精密度

由表4可知，奥卡西平代谢物在全自动二维液相色谱系统的转移过程中损失较少，重复性好且可监控。

表4 奥卡西平代谢物的转移回收率和精密度

浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	峰面积					平均值	LC2 峰面积	平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5				
12.19	302609	301376	302705	301088	302221	30200	303979	99.35	0.24

## 2.3 二维色谱对后续色谱峰的去除

随机选取受试者服用奥卡西平后的血样10份，在上述条件下连续测定，所得色谱峰均纯净无干扰，而在LC2条件下连续测定时，第一针之后的每一针分析时均出现了大小不一的干扰峰。试验结果表明，本方法具有强大的后续干扰去除能力，能做到真正的超快速测定。

## 2.4 线性范围和最低定量限

将配制好的1.37、2.74、5.48、10.97、21.94、43.87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  系列梯度奥卡西平代谢物工作溶液，按上述方法处理并测定，以加样血清中奥卡西平代谢物浓度为纵坐标，峰面积为横坐标绘制工作曲线（见图3）。结果表明：当奥卡西平代谢物在1.37-43.87  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内时，浓度和峰面积呈良好的线性关系，线性回归方程为：

$$Y = 22853.6X - 4726.43, \quad R^2 = 0.9997;$$

方法的最低定量限为1.37  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。奥卡西平代谢物的治疗浓度参考范围、实验室危急值和线性范围见表5，该线性范围包含其治疗浓度参考范围和实验室危急值，满足临床测定范围的要求。

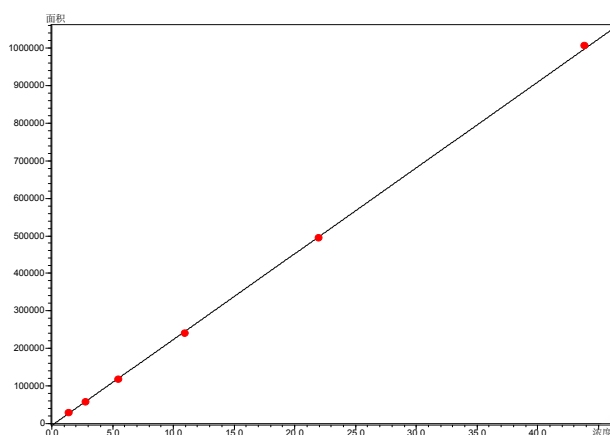


图3 奥卡西平代谢物工作曲线

表5 奥卡西平代谢物的治疗浓度参考范围、实验室危急值和线性范围

药物	治疗浓度参考范围 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	实验室危急值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	线性范围 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
奥卡西平代谢物	10-35	40	1.37-43.87

## 2.5 萃取回收率

高、中、低三个水平浓度奥卡西平代谢物质控样品的平均萃取回收率均在 98.2%以上, 变异系数不超过 1.7%, 具体数据见表 6。

表6 萃取回收率 (n=5)

药物	浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	萃取回收率 (%)					平均回收率 (%)	变异系数 (%)
		98.4	100.7	100.7	99.8	99.9		
奥卡西平代谢物	2.19	98.4	100.7	100.7	99.8	99.9	99.9	0.9
	10.97	98.2	101.6	99.1	99.4	98.8	99.4	1.3
	36.56	95.8	99.3	98.6	97.3	99.8	98.2	1.7

## 2.6 方法的准确度和精密度

考察三个浓度水平质控样品的回收率、日内精密度和日间精密度, 结果如表 7-8 所示。各浓度水平质控样品的准确度为 97.7% -104.8%, 日内、日间精密度变异系数均小于 2.4%。该分析方法的灵敏度高, 稳定性好, 符合生物等效性研究的方法学要求。

表7 方法回收率及日内精密度 (n=5)

药物	浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	测定值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )					平均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RSD (%)	平均回收率 (%)
		2.15	2.10	2.10	2.17	2.18			
奥卡西平代谢物	2.19	2.15	2.10	2.10	2.17	2.18	2.14	1.8	97.7
	10.97	11.05	11.05	11.01	11.03	11.07	11.04	0.2	100.7
	36.56	37.99	39.38	39.10	37.20	37.85	38.30	2.4	104.8

表8 方法日间精密度 (n=5)

药物	浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	当天测定平均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )			平均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RSD (%)
		1 d	2 d	3 d		
奥卡西平	2.19	2.14	2.17	2.15	2.15	0.7

代谢物	10.97	11.04	10.99	11.23	11.09	1.1
	36.56	38.30	37.92	38.6	38.27	0.9

### 2.7 样品稳定性

实验结果表明：血浆中奥卡西平代谢物在3次冻融循环的过程中不会发生显著的改变；质控样品在室温下8 h后的测定值与0 h对照测定值的差异均在±10%以内，变异系数均小于1.6%，表明血浆中奥卡西平代谢物在室温下8 h内具有稳定性；处理液放置在自动进样器中（10℃）12 h内重复分析的分析批中奥卡西平代谢物工作曲线、质控样品均满足准确定量的要求，说明样品处理液在自动进样器存放12 h内均具有稳定性；奥卡西平代谢物血浆样品在-76℃冰冻条件下保存90天内稳定。

### 3 结论

本文建立了一种使用全自动二维液相色谱系统测定血浆中奥卡西平代谢物的方法。该方法在6.0 min内完成血浆中奥卡西平代谢物的检测，采用外标法定量，方法定量限1.37 μg·mL<sup>-1</sup>，线性范围为1.37-43.87 μg·mL<sup>-1</sup>，相关系数0.9997。专属性考察结果表明血浆内源性物质及其它杂质均没有对分析造成明显干扰，并且连续进样没有后续色谱峰干扰的影响。方法的日内精密度0.2~2.4%，日间精密度0.7~1.1%，各浓度水平质控样品的准确度97.7%-104.8%，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；稳定性实验结果表明样品在室温下放置8 h稳定，3次冻融循环奥卡西平代谢物浓度无显著变化，处理后的样品在自动进样器内（10℃）放置12 h奥卡西平代谢物无显著变化。本方法具有前处理简单、测定快速、灵敏度高、准确性好、稳定性强等特点，能满足临床报告及时性、准确性和测定范围等要求，可作为治疗药物浓度监测和临床药学研究对于奥卡西平样本测定的有效方法。

# FLC2701 全自动二维液相色谱系统测定血浆中的丙戊酸

**摘要:** 本文建立并验证了使用全自动二维液相色谱系统测定血浆中丙戊酸的方法。样品去除蛋白后直接进样,柱转移结合“中心切割”模式转移目标物;外标法计算结果。方法的线性范围为 4.89-156.42  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 相关系数 0.9997;方法准确度在 87.3%-104.8%之间;日间精密度、日内精密度均小于 2.6%;常规条件变异(RSD)小于 7.8%;可在 5 min 之内完整出峰。本方法具有很快的测定速度,高度自动化能力,抗干扰能力强、稳定准确,可应用于丙戊酸的临床监测。

**关键词:** 二维色谱 抗癫痫药物 治疗药物监测 丙戊酸

丙戊酸(sodium valproate)即 2-丙基戊酸,是一种结构与卡马西平、苯妥英、苯巴比妥不相关的不含氮的抗癫痫药物。是治疗癫痫小发作、大发作和肌阵挛发作的首选药之一,是临床常用的一线广谱抗癫痫药。

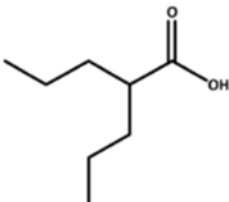
目前生物样品中测定丙戊酸的测定方法主要以免疫法高效液相色谱荧光检测法为主,免疫法样品测定时受环境因素影响较大,且试剂盒价格昂贵、保质期短,造成测样成本较高;由于丙戊酸分子结构紫外吸收较弱,多采用衍生化后荧光检测器测定,但前处理过程繁琐,实验操作步骤对实验结果影响较大。本实验建立了一种快速、灵敏、选择性好、特异性强的二维液相色谱方法,用于定量测定人血浆中丙戊酸的浓度,以支持该药物的治疗药物监测。

## 1 实验

### 1.1 化合物信息

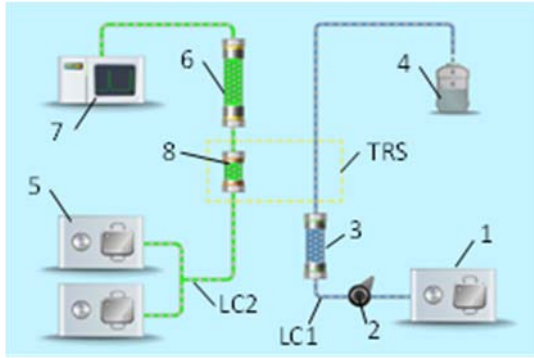
目标化合物信息见表 1。

表 1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
丙戊酸	valproic acid	1069-66-5	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$	

### 1.2 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-20A 液相色谱部件构成,FLC2701 连接第一维色谱泵、第二维色谱泵、检测器、自动进样器主等色谱功能模块,自动根据设定模式分配成第一维色谱系统(LC1),第二维色谱系统(LC2);其中第一维色谱柱(LC1 column)主要负责样品在线富集及第一维分离,第二维色谱柱(LC2 column)主要负责进一步分离检测,两维系统通过智能流路控制系统(TRS)连接,采用“中心切割”模式及中间柱转移目标物,具体结构见图 1。



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 废液收集瓶

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: 中间柱转移系统, 包括 8 (中间柱)

图1 FLC 2701全自动二维液相色谱系统结构

### 1.3 分析条件

色谱柱: 第二维色谱柱: Nucleoshell PFP 色谱柱 (4.6×100 mm, 2.7 μm, Macherey-Nagel, 德国);

第一维色谱柱: Aston ACP 色谱柱 (4.6×30 mm, 5 μm, ANAX, 中国)

中间柱: ASTON SH 色谱柱 (4.6×10 mm, 3 μm, ANAX, 中国)

流动相: 第一维移动相为水 (含 20.0 mmol/L 磷酸钠): 乙腈: 甲醇=300:100:100 (V/V/V), 磷酸调 pH 至 5.4; 第二维移动相通过低压梯度四元泵自动配比, 具体见表 2。

表2 第二维移动相比例 (V:V:V)

A: 乙腈	B: 碱移动相	C: 酸移动相	D: 甲醇
28	32	40	0

注: 碱移动相为水 (含 20.0 mmol/L 的磷酸钠), 三乙胺调 pH 至 7.2; 酸移动相为水 (含 20.0 mmol/L 的磷酸钠), 磷酸调 pH 至 3.0。

流速: 第一维色谱泵流速为 1.0 mL/min; 第二维色谱泵流速为 1.0 mL/min

柱温: 40°C 进样量: 200 μL

系统二维工序由色谱工作站时间程序控制, 无需人为干预, 实现高度自动化的快速分析, 每个工序中主要部件条件见表 3。

表3 FLC 2701系统运行时间程序

时间 (min)	0-0.64	0.65-5.30	0-0.80	0.81-1.59	1.60-2.30	2.31-5.30
TRS 状态	中间柱与第二维色谱柱连接	中间柱与第二维色谱柱断开	第一维色谱柱与中间柱断开	第一维色谱柱与中间柱断开	第一维色谱柱与中间柱连接	中间柱处理独立状态
主要功能	上一针目标物转移至二维色谱柱	上一针目标物进一步分离	完成样品在线富集	进行第一维色谱分离	目标物转移至中间柱	目标物转移至中间柱

### 1.4 标准样品和质控样品的配制

准确称取丙戊酸钠对照品 15.80 mg, 用异丙醇溶解并定容至合适的体积, 得浓度为 1564.2 μg · mL<sup>-1</sup> 的丙戊酸钠母液, 置 -76°C 冰箱中保存。使用时醇稀释至所需浓度的工作液。

精密吸取适量上述母液, 用人血清稀释成低浓度 (LQC)、中浓度 (MQC)、高浓度 (HQC) 质控样品, 浓度分别为 9.11、47.93、95.86 μg · mL<sup>-1</sup>。

### 1.5 样品前处理方法

准确吸取 12%高氯酸 900 μL 至 1.5 mL EP 管中, 再准确加入 300 μL 血清, 涡旋振荡

1 min 后，高速离心（14500 r/min）8 min，取 1000  $\mu$ L 上层清液，准确吸取 100  $\mu$ L 磷酸钠调节 pH。

## 1.6 方法验证

### 1.6.1 色谱行为和专属性的考察

在上述色谱条件下，分别对丙戊酸的空白血样、标准品溶液、空白血样中加入标准品和受试者服药后的血样进行的测定，考察方法的专属性。

### 1.6.2 二维色谱转移回收率和精密度考察

转移回收率和精密度是体现药物在二维色谱系统准确、稳定传递的重要指标。本试验采用的二维色谱系统可对每一步转移进行监控，其中用于考察目标物经过分析柱的出峰情况的运行模式称为 LC2 条件模式。本试验将配制好的丙戊酸标准溶液进行检测，得到的峰面积与其在 LC2 条件模式下得到的峰面积进行比较，考察目标物在该二维系统中的转移回收率和精密度。

### 1.6.3 线性范围和定量限（LOQ）的考察

参考美国临床实验室标准化协会（Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI）相关指南，配制系列浓度的丙戊酸工作溶液，按上述方法处理并测定，以加样血清中药物浓度为纵坐标，峰面积为横坐标绘制工作曲线，得到的线性回归方程，考察丙戊酸的线性范围。

### 1.6.4 萃取回收率的考察

将高、中、低 3 个水平浓度的丙戊酸质控样品，按上述方法处理并测定，每个浓度设置 5 组平行和标准溶液对照，比较质控样品和标准溶液对照的药物峰面积，得出该方法的萃取回收率。

### 1.6.5 方法准确度和精密度的考察

对丙戊酸高、中、低 3 个水平浓度的质控样品进行处理并测定，每个浓度设置 5 组平行，测出结果代入线性回归方程计算浓度，比较该浓度与理论添加的浓度，得出方法的添加回收率和变异系数，检验准确度和日内精密度。连续 3 天配制并测定上述浓度样品，考察方法日内、日间精密度。

### 1.6.7 样品稳定性考察

将高、中、低 3 个水平浓度的丙戊酸质控样品，经过 0, 1, 2, 3 次（-76 $^{\circ}$ C）反复冻融后测定，考察血浆样品的冻融稳定性；在室温条件放置 8 h 后进行测定，考察血浆样品的放置稳定性；将丙戊酸工作曲线和三个浓度的质控样品处理液放置在自动进样器中（10 $^{\circ}$ C），于 12 h 内重复进样分析，考察样品处理液的存放稳定性；将三个浓度的质控样品于-76 $^{\circ}$ C 冷冻条件下储藏，分别于放置前（0 天）及冷冻存放 30 天，60 天，90 天后，将样品取出，解冻，处理并分析，考察血浆样品冰冻保存稳定性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱行为和专属性

实验结果表明，血浆内源性物质及其它杂质均不干扰样品的分离测定。丙戊酸的保留时间为 3.55 min，色谱图见图 2。

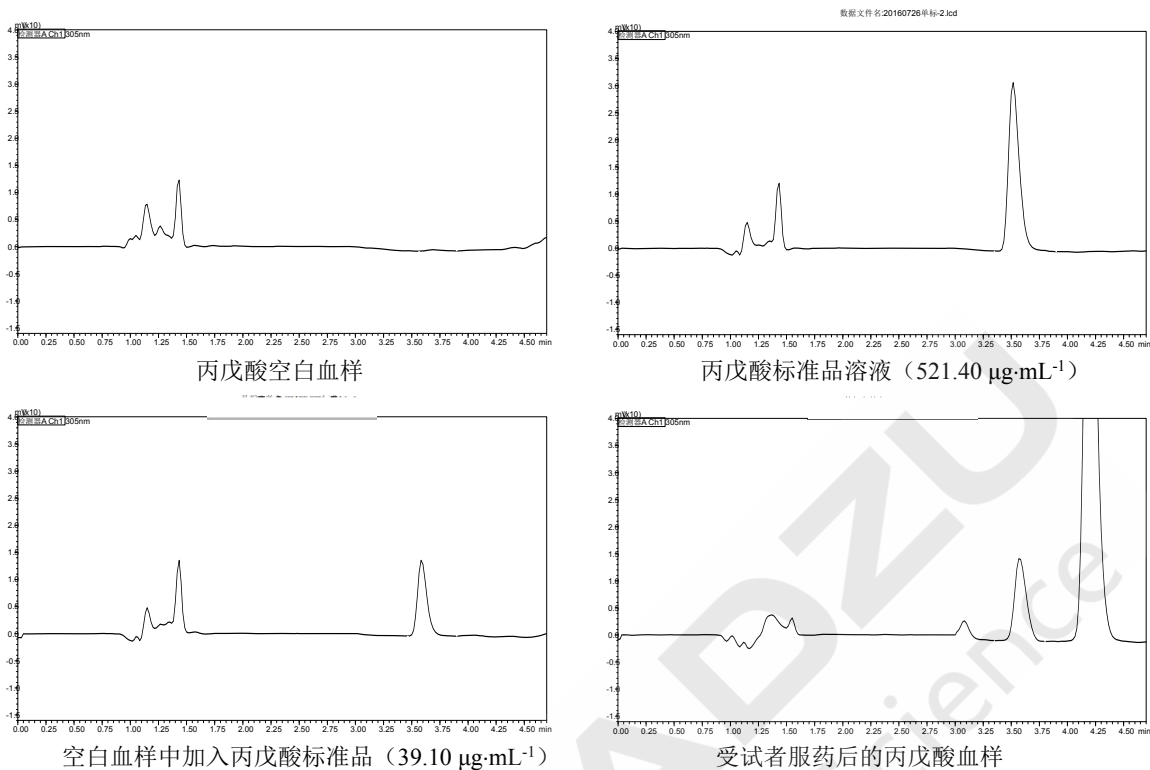


图2 丙戊酸色谱图

## 2.2 二维色谱转移回收率和精密度

设置5组平行，转移回收率和精密度见表4。结果表明丙戊酸在该新型二维系统转移过程中损失较少，重复性好且可监控。

表4 各药物转移回收率和精密度

药物	浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	峰面积					平均值	LC2 峰面 积	平均回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5				
丙戊酸	521.40	303133	301955	304273	298910	306418	302938	326215	92.68	0.92

## 2.3 线性范围和最低定量限

将配制好的4.89、9.77、19.55、39.10、78.20、156.39  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列梯度丙戊酸工作溶液，按上述方法处理并测定，以加样血清中丙戊酸浓度为纵坐标，峰面积为横坐标绘制工作曲线（见图3）。结果表明：当丙戊酸在4.89-156.39  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内时，浓度和峰面积呈良好的线性关系，线性回归方程为：

$$Y = 2037.92X + 2808.99, R^2=0.9997;$$

方法的最低定量限为4.89  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。丙戊酸的治疗浓度参考范围、实验室危急值和线性范围见表5，该线性范围包含其治疗浓度参考范围和实验室危急值，满足临床测定范围的要求。

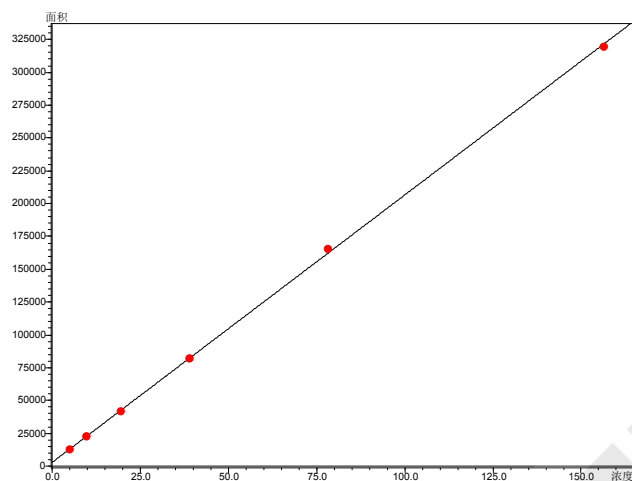


图3 丙戊酸工作曲线

表5 丙戊酸的治疗浓度参考范围、实验室危急值和线性范围

药物	治疗浓度参考范围 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	实验室危急值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	线性范围 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
丙戊酸	50-100	120	4.89-156.42

#### 2.4 萃取回收率

高、中、低三个水平浓度丙戊酸质控样品的平均萃取回收率均在89.2%以上，变异系数不超过3.0%，具体数据见表6。

表6 萃取回收率 (n=5)

药物	浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	萃取回收率 (%)					平均回收率 (%)	变异系数 (%)
丙戊酸	9.11	91.7	86.1	92.8	88.5	89.1	89.2	3.0
	47.93	94.2	95.6	100.0	96.2	98.2	96.8	2.4
	95.86	102.4	103.2	107.2	102.3	105.1	104.0	2.0

#### 2.5 方法的准确度和精密度

实验结果表明，本研究建立的丙戊酸分析方法的回收率在95.2%~99.4%之间，日内、日间精密度变异系数小于2.6%。该分析方法的灵敏度高，稳定性好，符合生物等效性研究的方法学要求。回收率和日内精密度结果见表7，日间精密度结果见表8。

表7 方法回收率和日内精密度 (n=5)

药物	浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	测定值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )					平均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RSD (%)	平均回收率 (%)
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d			
丙戊酸	9.11	8.84	8.34	8.93	8.73	8.83	8.73	2.6	95.9
	47.93	45.72	45.34	45.33	46.01	45.79	45.64	0.6	95.2
	95.86	97.54	94.24	91.75	97.54	95.23	95.26	2.6	99.4

表8 方法日间精密度 (n=5)

药物	浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	当天测定平均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )			平均值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	RSD (%)
		1 d	2 d	3 d		
丙戊酸	9.11	8.84	8.34	8.93	8.73	2.6
丙戊酸	47.93	45.72	45.34	45.33	45.64	0.6
丙戊酸	95.86	97.54	94.24	91.75	95.26	2.6

	9.11	8.73	8.89	8.87	8.83	1.0
丙戊酸	47.93	45.64	44.66	45.91	45.40	1.4
	95.86	95.26	96.33	96.86	96.15	0.8

## 2.6 样品稳定性

实验结果表明血浆中丙戊酸在3次冻融循环的过程中不会发生显著的改变；质控样本在室温下8 h后的测定值与0 h对照测定值的差异均在±10%以内，变异系数均小于1.6%，表明血浆中丙戊酸在室温下8 h内具有稳定性；12 h内重复分析的分析批中丙戊酸工作曲线、质控样品均满足准确定量的要求，丙戊酸的样品处理液在自动进样器存放12 h内均具有稳定性；丙戊酸血浆样品-76℃冰冻条件下保存90天内稳定。

## 3 结论

本文建立了FLC2701全自动二维液相色谱系统测定血浆中丙戊酸的方法，该方法在3.55 min内完成血浆中丙戊酸的检测，方法定量限 $4.89 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，线性范围为 $4.89\text{-}156.42 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ，相关系数在0.9997。选择性考察结果表明空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。方法的日内精密度0.6~2.6%，日间精密度0.8~1.0%，能够满足血浆中药物浓度准确定量的要求；稳定性实验结果表明样品在室温下放置8 h稳定，3次冻融循环丙戊酸浓度无显著变化，处理后的样品在自动进样器内放置12 h丙戊酸无显著变化。方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中丙戊酸含量的快速准确检测。

本文采用的全自动二维液相色谱系统应用了先进的在线固相萃取技术，具有测定结果稳定、重复性好、测样时间短等优势，具体表现在：1.大体积进样解决普通液相灵敏度不够的问题，该系统最大进样量可达1100  $\mu\text{L}$ ，而传统液相通常只有10-20  $\mu\text{L}$ ；2.本系统具有在线过滤及清洗装置，同时一维色谱柱填料吸附性小，不易压塌，能耐受大体积生物样本的冲击，解决了常规在线固相萃取柱寿命不长的问题；3.高分离度保证目标物色谱峰不受杂质干扰；4.流动相自动净化、色谱柱自动清洗，大大节省仪器准备和维护时间，增加TDM的实时性能力；5.系统具有纠偏功能，改善常规二维色谱峰形差的问题；6.具有共柱体系的优势，不同药物间切换无需频繁更换色谱柱，节约时间成本。

# 全自动二维液相色谱法测定腹腔感染患者血清中替加环素浓度

**摘要:** 建立全自动二维色谱法 (2D-LC-UV) 测定血清中替加环素浓度的方法, 用于临床上腹腔感染患者替加环素治疗药物浓度监测。150  $\mu\text{L}$  样品进样, 在一维柱 ASTON C8 (100 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{L}$ ) 上初步分离, 通过中间柱 ASTON SCX (20 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 截取保留并在二维柱 Agilent Extent-C18 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 上进一步分离, 直至最终测定。一维柱流动相为 30 mmol/L 磷酸二氢钠-乙腈-甲醇 (40:30:30, pH=5.4), 中间柱流动相为纯水, 二维柱流动相为 30 mmol/L 磷酸二氢钠-乙腈 (75:25, pH=3.5), 流速均为 1.0 mL/min, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ , 紫外检测波长为 244 nm。采集 40 名腹腔感染患者静滴替加环素 (首剂量 100 mg, 维持剂量 50 mg q12h) 血清样本, 测定峰浓度、中浓度、谷浓度结果, 并估算 AUC 值。在所建立的色谱条件下, 替加环素与各杂质分离良好, 线性范围为 0.03-30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 最低检测限为 10 ng/mL。40 名腹腔感染患者平均血清峰浓度为 (1.60 $\pm$ 0.77)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 中浓度为 (0.84 $\pm$ 0.36)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 谷浓度为 (0.57 $\pm$ 0.25)  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 估算平均 AUC 值为 (22.66 $\pm$ 9.77)  $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。此法操作简单, 准确、精密度好, 适用于替加环素浓度-药效研究及临床监测。

**关键词:** 替加环素 血清浓度 腹腔感染 AUC

替加环素 (Tigecycline) 为新一代四环素抗生素, 具有广谱抗菌活性, 特别是对于一些重要的耐药致病菌, 如鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, Ab)、肺克杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、耐万古霉素肠球菌 (*Vancomycin resistant enterococcus*, VRE) 等, 均具有较高活性。替加环素为时间依赖型抗生素, 其治疗策略依据是 AUC>MIC 或 T>MIC 的值作为参考, 而现有药动学研究结果显示, 替加环素给药后, 在人体内迅速分布于各组织, 其半衰期长, 个体间血药浓度差异较大, 尤其是 ICU 腹腔感染的患者, 最高可达 209.5%。因此, 简单的相同剂量给药或依据体重换算给药的方式并不一定适用于所有感染患者。建立快速、准确的替加环素浓度测定方法, 计算患者的 AUC 值, 有助于对替加环素药物浓度-药效关系做进一步研究。本文所建立的新型前端二维色谱法操作简单, 检测方法灵敏, 准确度高, 并已应用于临床腹腔感染患者替加环素的血清药物浓度测定。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

替加环素对照品 (北京百灵威科技有限公司, 纯度 99.0%); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 磷酸二氢钠、磷酸 (分析纯, 南京化学试剂有限公司); 去离子水由 Millipore 纯水机制备。

### 1.2 仪器

2D-LC-UV 系统由岛津公司的 LC 20A 色谱部件 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) 与湖南德米特仪器有限公司的 FLC2701 全自动二维液相色谱耦合仪构成。FLC2701 通过高度集成的微流控系统将色谱泵、检测器、进样器等色谱部件耦合在一起, 构成全自动二维液相色谱系统。进样器为岛津 SIL-20AC 自动进样器; 第二维色谱系统 (LC2) 包括岛津 LC-20AT vp 四元低压色谱泵、岛津 SPD-20Avp 检测器, 工作站为岛津 LC Solution 工作站。

### 1.3 色谱条件

第一维色谱柱为 ASTON C8 (100 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相为 30 mmol/L 磷酸二氢钠-

乙腈-甲醇 (40:30:30, pH=5.4); 中间柱为 ASTON SCX (20 mm×4.6 mm, 5 μm); 第二维液相色谱柱为 Agilent Extent-C18 (150 mm×4.6mm, 5 μm), 流动相为 30 mmol/L 磷酸氢二钠-乙腈 (75:25, pH=3.5), 流速均为 1.0 mL/min。色谱柱温为 40℃, 紫外检测波长为 244 nm。进样体积 150 μL。采样外标法计算样品中替加环素的浓度。

#### 1.4 对照品溶液的制备

精密称取替加环素 10.11 mg, 置于 10 mL 容量瓶中, 加纯水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 1.011 mg·mL<sup>-1</sup> 的替加环素储备液。取该储备液适量, 依次稀释至浓度为 0.3033、1.011、3.033、10.11、30.33、101.1、303.3 μg·mL<sup>-1</sup> 的标准工作溶液。

#### 1.5 血清样品前处理

取血清样品 200 μL 放入 1.5 mL 离心管中, 加 40 μL 10% 的高氯酸, 震荡涡旋后 14000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液 150 μL, 进样 HPLC 分析。

#### 1.6 方法学验证

观察替加环素血药浓度测定时的方法特异性, 计算待测物在高、中、低 3 个浓度血清样中的准确度、精密度, 及考察待测物在血清样本中的稳定性。

#### 1.7 腹腔感染患者替加环素血清药物浓度的测定及 AUC 计算

采集我院 ICU 病区 40 名静滴替加环素治疗腹腔感染患者的血清样本进行血药浓度检测。每位患者均 100 mg 静滴 (0.5 h) 为首剂量给药, 维持剂量为 50 mg (12 h)。连续给药 3 天后, 第 4 天上午患者开始采集血清样本。共三个时间点, 分别为: ①峰浓度 C<sub>1</sub> (静滴 0.5 h 结束后), ②中浓度 C<sub>2</sub> (给药时间间隔中点, 即 6 h), ③谷浓度 C<sub>0</sub> (下次给药前)。2 mL 促凝管全血采集后经 3000 r/min 离心, 10 min 后取上清转移, -20℃ 冻存待检。

将冻存样本化冻后, 按“血清样品前处理”项下操作, 进行 HPLC 分析, 采样外标法计算样本中替加环素血清浓度, 每位患者三个血清样本, 随行一个质控。

借鉴杨阳<sup>[7]</sup>等人对时间依赖型碳青霉烯类抗生素设计的简易 AUC 计算方式, 通过将血药浓度-时间曲线下面积划分为多个梯形, 以替加环素峰、中、谷三个时间点的浓度值构建的梯形面积, 来估算患者体内替加环素 AUC 值。计算公式如下:

$$AUC_{0-24} = 2 \times AUC_{0-12}$$

$$AUC_{0-12} = [(t_1 \times C_1) + (t_2 - t_1) \times (C_1 + C_2) + (t_0 - t_2) \times (C_0 + C_2)] / 2$$

t 为对应浓度取血时间点。

## 2 结果

### 2.1 方法专属性试验

在本试验所采用的色谱条件下, 替加环素的保留时间为 9.8 min 左右, 峰形良好, 杂质峰对样品测定均没有干扰 (图 1)。

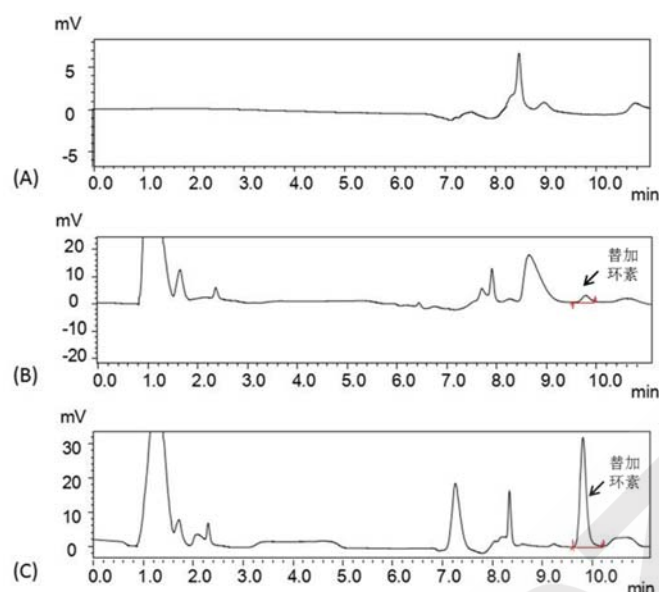


图1 替加环素全自动二维液相色谱图

A. 空白血清; B. 空白血清中加入替加环素 (LLOQ); C. 替加环素谷浓度血清样品谷浓度应为给药前

## 2.2 线性关系考察

取替加环素标准工作溶液配成浓度为 0.03033、0.1011、0.3033、1.011、3.033、10.11、30.33  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的标准含药血清。按“血清样品前处理”项下方法操作，并同时制备空白样品，进行 HPLC 分析，记录色谱图，制备标准曲线。计算替加环素峰面积  $A_s$  对浓度  $C$  作权重回归计算，得替加环素回归方程： $y = 80407C - 130.94$  ( $r=0.9992$ )。结果显示，替加环素血清浓度在 0.03 ~ 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内线性关系均良好，最低定量下限为 30  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，最低检测限为 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 2.3 精密度与准确度

制备含替加环素浓度分别为 0.05、1、25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的标准含药血清，每个浓度各配制 5 份样品，按“血清样品前处理”项下操作，将测得的替加环素峰面积  $A_s$  代入随行标准曲线方程，计算各样品的浓度，连续测定 3 批样品，根据批样品浓度计算本法的准确度与精密度，结果见表 2，本方法的准确度与精密度符合生物样品分析要求。

表2 血清中替加环素精密度 (RSD,  $n=5$ )、准确度 ( $n=5$ )

样本类型	加入浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	批内精密度 RSD/%	批间精密度 RSD/%	批内准确度 /%	批间准确度 RSD/%
血清	0.05	5.7	6.9	108.0 ± 4.2	101.8 ± 6.9
	1	3.5	4.8	97.7 ± 1.8	100.3 ± 4.8
	25	1.3	2.5	102.8 ± 0.7	100.1 ± 2.5

## 2.4 稳定性

配制并处理含替加环素浓度为 0.05、1、25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的标准含药血清数份，其中 3 份按“血清样品前处理”项下操作处理后立即进样测定并于进样器放置，分别于室温下放置 4 h，反复冻融及冰冻放置 1 周条件下的稳定性，同时考察了待测样品溶液于进样器中的稳定性。结果见表 3，结果表明替加环素血清样品稳定性均较好。

表3 血清中替加环素的稳定性试验 ( $n=3$ )

加入浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )		0.05		1		25	
		Mean	RE (%)	Mean	RE (%)	Mean	RE (%)
测得浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	室温放置 4 h	0.0480	-4.0	1.017	1.7	24.70	-1.2
	反复冻融	0.0503	0.7	1.030	3.0	25.33	2.1
	冰冻 1 周	0.0470	-6.0	1.003	0.3	24.67	-1.3
	进样器放置 6 h	0.0513	2.7	0.983	-1.7	25.30	1.2

## 2.5 临床患者血药浓度的测定结果

40 名腹腔感染患者平均血清峰浓度为  $(1.60 \pm 0.77) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，中浓度为  $(0.84 \pm 0.36) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，谷浓度为  $(0.57 \pm 0.25) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。应用本方法检测，无杂峰干扰，结果浓度值均在线性范围内（图 2）。

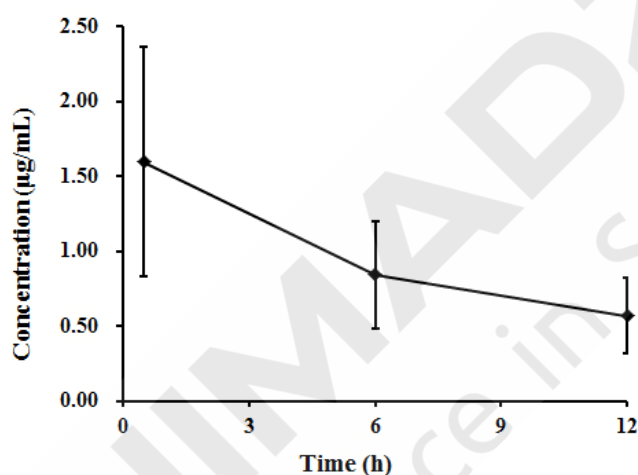


图 2 40 名腹腔感染患者替加环素血清浓度值

采用简易 AUC 计算方式，计算每位患者的 AUC 结果。本研究中， $t_1=0.5$ ， $t_2=6$ ， $t_0=12$ ，代入  $\text{AUC}_{0-24} = 2 \times [(t_1 \times C_1) + (t_2 - t_1) \times (C_1 + C_2) + (t_0 - t_2) \times (C_0 + C_2)] / 2$ 。通过公式估算 40 名腹腔感染患者 AUC 值，结果平均 AUC 值为  $(22.66 \pm 9.77) \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 3 讨论

替加环素血药浓度测定的方法报道已有不少，为了提高检测灵敏度，许多方法采用质谱来进行检测。由于质谱的检测成本较高，建立稳定、重现性较高、成本较低的替加环素血清药物浓度测定方法，有利于推动医院开展替加环素浓度-药效的研究。本研究中，采用全自动二维色谱仪，通过色谱柱的二次分离，大大减少血中干扰杂质的影响。本实验中，定量下限  $30 \text{ ng}/\text{mL}$ ，低于普通紫外检测器的高效液相 ( $50 \text{ ng}/\text{mL}$ )，略高于液相色谱-质谱联用法 ( $10 \text{ ng}/\text{mL}$ )，但成本更低。

ICU 重症患者病情严重且救治紧急，通过测定多个点来计算患者给药后替加环素的 AUC 值较难实现。借鉴杨阳等人对同样是时间依赖性的碳青霉烯类抗生素设计的简易 AUC 计算方式是可能的解决方案之一。由于替加环素在体内吸收与消除为二室模型，因此，仅通过峰、谷浓度值计算 AUC 值，与真实值会存在较大差异，增加给药时间点中间浓度来粗略估算 AUC 值可以实现取血点少，但更结果更接近 AUC 真实值。此法较常规多点取血计算 AUC 的实用性更高。

临床 40 名 ICU 腹腔感染患者的血清峰、中、谷浓度平均值个体间差异较大，这与文献报道结果相似。虽然替加环素非代谢酶底物，较少发生药物联用相互作用，但①救治的危重患者常出现低蛋白血症、水肿和高动力循环状态等特殊生理状态，使体内药物的处置过程变得复杂；②患者肺上皮细胞、血管内皮细胞发生病理生理病变，这些都可能是产生个体差异的原因。

替加环素属于时间-浓度双依赖型抗生素，已有文献报道腹腔感染 PK/PD 靶目标为  $AUC_{0-24} / MIC \geq 6.96$ ，因此，进一步结合患者 MIC 值，可通过  $AUC_{0-24} / MIC$  的比值来作为临床给药剂量调整的依据。



## 附录：参考 AGNP 精神科治疗药物监测共识指南（2011）附录表 5。

表 5 推荐的参考浓度范围、实验室警戒浓度和治疗药物监测的推荐等级

药物及活性代谢产物		治疗参考浓度范围/ 推荐的药物浓度	半衰期(h)	实验室警戒浓度	TDM 推 荐等级	转换 因子	参考文献	备注
英文	中文							
<b>抗抑郁药</b>								
Agomelatine	阿戈美拉汀	7 ~ 300 ng/mL (口服 50 mg 后 1 ~ 2 h)	1 ~ 2	600 ng/mL	4	4.11	[78]	由于消除速度快,在长期治疗时谷浓度测不到,所以优先测定峰浓度,仅限于特定指征
Amitriptyline + nortriptyline	阿米替林 + 去甲替林	80 ~ 200 ng/mL	10 ~ 28 30	300 ng/mL	1	3.41 3.61	[282,502,672]	
Bupropion + hydroxybupropion	安非他酮 + 羟安非他酮	225 ~ 1 500 ng/mL	8 ~ 26 17 ~ 47	2 000 ng/mL	3	4.17 3.91	[151,152,336,529,636]	安非他酮不稳定,其代谢产物在一定程度上也不稳定,血浆或血清必须在 -20 °C 冻存
Citalopram	西酞普兰	50 ~ 110 ng/mL	33	220 ng/mL	2	3.08	[42,73,111,339,388,442,471,491,549,598]	N-去甲基代谢产物对药理作用没有贡献
Clomipramine + norclomipramine	氯米帕明 + 去甲氯米帕明	230 ~ 450 ng/mL	16 ~ 60 36	450 ng/mL	1	3.18 3.32	[239]	
Desipramine	地昔帕明	100 ~ 300 ng/mL	15 ~ 18	300 ng/mL	2	3.75	[502]	CYP2D6 酶慢代谢者消除延长
Desvenlafaxine	去甲文拉法辛	100 ~ 400 ng/mL	11	600 ng/mL	2	3.8	[520]	
Dosulepin = Dothiepin	度硫平	45 ~ 100 ng/mL	18 ~ 21	200 ng/mL	2	3.39	[102,325,414,541]	
Doxepin + nordoxepin	多塞平 + 去甲多塞平	50 ~ 150 ng/mL	15 ~ 20	300 ng/mL	2	3.58 3.77	[172,321,393,445]	
Duloxetine	度洛西汀	30 ~ 120 ng/mL	9 ~ 19	240 ng/mL	2	3.36	[21,640,703]	没有活性代谢产物
Escitalopram	艾司西酞普兰	15 ~ 80 ng/mL	30	160 ng/mL	2	3.08	[409,679]	N-去甲基代谢产物对药理作用没有贡献。参考范围下限根据一项 PET 研究(80% 5-HT 转运体占有率)[409]计算而来;上限来自 SPC。
Fluoxetine + norfluoxetine	氟西汀 + 去甲氟西汀	120 ~ 500 ng/mL	4 ~ 6 d 4 ~ 16 d	1 000 ng/mL	2	3.23 3.39	[84,187,410,442,545]	去甲氟西汀的消除半衰期长(平均 14 d),对 CYP2D6 酶有持久、强力的抑制
Fluvoxamine	氟伏沙明	60 ~ 230 ng/mL	20	500 ng/mL	2	3.14	[353,587,631,634,639]	对 CYP1A2、CYP2C19 具有抑制作用
Imipramine + desipramine	米帕明 + 地昔帕明	175 ~ 300 ng/mL	11 ~ 25 15 ~ 18	300 ng/mL	1	3.57 3.75	[72,229,245,510,538]	羟化代谢产物
Maprotiline	马普替林	75 ~ 130 ng/mL	20 ~ 58	220 ng/mL	2	3.60	[231,321,384]	活性代谢产物 N-去甲基马普替林
Mianserine	米安色林	15 ~ 70 ng/mL	14 ~ 33	140 ng/mL	3	3.78	[191,192,453]	
Milnacipran	米那普仑	50 ~ 110 ng/mL	5 ~ 8	220 ng/mL	2	2.24	[206,315]	
Mirtazapine	米氮平	30 ~ 80 ng/mL	20 ~ 40	160 ng/mL	2	3.77	[257,367,397,440,552,591]	N-去甲基代谢产物对药理作用没有贡献
Moclobemide	吗氯贝胺	300 ~ 1 000 ng/mL	2 ~ 7	2 000 ng/mL	3	3.72	[225,291,327]	代谢产物没有药理活性
Nortriptyline	去甲替林	70 ~ 170 ng/mL	30	300 ng/mL	1	3.8	[30,31,504,506,510]	羟化代谢产物
Paroxetine	帕罗西汀	30 ~ 120 ng/mL	12 ~ 44	240 ng/mL	3	3.04	[242,243,410,443]	
Reboxetine	瑞波西汀	60 ~ 350 ng/mL	13 ~ 30	700 ng/mL	3	3.19	[483,484]	
Sertraline	舍曲林	10 ~ 150 ng/mL	26	300 ng/mL	2	3.27	[15,49,258,281,410,443,545,696]	N-去甲基代谢产物的消除半衰期是舍曲林的两倍,但活性只有舍曲林的 1/20

药物及活性代谢产物		治疗参考浓度范围/ 推荐的药物浓度	半衰期(h)	实验室管 成浓度	TDM 推 荐等别	转换 因子	参考文献	备注
英文	中文							
Tranylcypromine	反苯环丙胺	≤50 ng/mL	1-3	100 ng/mL	4	7.51	[103,329]	由于对单胺氧化酶的不可逆抑制作用,血浆浓度与药物作用无关
Trazodone	曲唑酮	700-1 000 ng/mL	4-11	1 200 ng/mL	2	2.69	[250,262,268,447,590]	
Trimipramine	曲米帕明	150-300 ng/mL	23	600 ng/mL	2	3.4	[142,187,223,326]	活性代谢产物 N-去甲基曲米帕明
Venlafaxine + O-desmethylvenlafaxine	文拉法辛 + O-去甲文拉法辛	100-400 ng/mL	5 11	800 ng/mL	2	3.61 3.8	[85,241,316,443,545,550,592, 684,696]	对大多数患者来说,O-去甲文拉法辛是体内主要的活性成分,N-去甲基文拉法辛对药理作用没有贡献。低浓度时,该药主要作为选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂发挥作用
<b>抗精神病药物</b>								
Amisulpride	氨磺必利	100-320 ng/mL	12-20	640 ng/mL	1	2.71	[64,89,441,461,531,613,690]	没有代谢产物
Aripiprazole	阿立哌唑	150-500 ng/mL	60-80	1 000 ng/mL	2	2.23	[33,273,306,368,452,612]	代谢产物脱氢阿立哌唑在体内有活性,但尚不清楚它对临床效应有多大贡献
Aserpine	阿塞那平	2-5 ng/mL	24	10 ng/mL	4	3.5	[707]	
Benperidol	苯哌利多	1-10 ng/mL	5	20 ng/mL	3	2.62	[472,589]	长期接受高剂量治疗的患者,由于适应性改变,有可能耐受较高的浓度
Bromperidol	溴哌利多	12-15 ng/mL	20-36	30 ng/mL	2	4.38	[609,656,735]	
Chlorpromazine	氯丙嗪	30-300 ng/mL	15-30	600 ng/mL	2	3.14	[127,559]	
Chlorprothixene	氯普噻吨	20-300 ng/mL	8-12	400 ng/mL	3	3.17	[542]	
Clozapine	氯氮平	350-600 ng/mL	12-16	1 000 ng/mL	1	3.06	[175,507,493,507,678]	主要代谢产物 N-去甲基氯氮平的抗精神病作用尚不明确
Flupenthixol	氟哌噻吨	1-10 ng/mL	20-40	15 ng/mL	2	2.3	[40,543,564]	
Fluphenazine	氟奋乃静	1-10 ng/mL	16	15 ng/mL	1	2.29	[564,680]	
Flupirtine	氟司必林	0.1-2.2 ng/mL	7-14 d	4.4 ng/mL	2	2.1	[611]	
Haloperidol	氟哌啶醇	1-10 ng/mL	12-36	15 ng/mL	1	2.66	[74,214,480,494,508,674,680]	长期接受高剂量治疗的患者,由于适应性改变,有可能耐受较高的浓度
Iloperidone	伊洛立酮	5-10 ng/mL	18-33	20 ng/mL	3	2.34	[476,576]	
Levomepromazine	甲氧异丁嗪	30-160 ng/mL	16-78	320 ng/mL	3	3.04	[656]	
Melperone	美哌隆	30-100 ng/mL	4-6	200 ng/mL	3	3.8	[83,324]	CYP2D6 弱抑制剂
Olanzapine	奥氮平	20-80 ng/mL	30-60	150 ng/mL	1	3.2	[32,56,63,132,208,240,418, 478,509,602,711]	给予奥氮平双剂量治疗时,如果药物浓度超过 150 ng/mL,患者会出现注射后综合症。
Paliperidone	帕利哌酮	20-60 ng/mL	23	120 ng/mL	2	2.35	[26,70,131,466]	帕利哌酮-9-羟代谢物
Perazine	培拉嗪	100-230 ng/mL	8-16	460 ng/mL	1	2.95	[91]	
Perphenazine	奋乃静	0.6-2.4 ng/mL	8-12	5 ng/mL	1	2.48	[564,637,680]	
Pimozide	匹莫齐特	15-20 ng/mL	23-43	20 ng/mL	3	2.17	[649]	
Pipamperone	匹胺哌啶酮	100-400 ng/mL	17-22	500 ng/mL	3	2.66	[82,517]	
Prothipendyl	丙硫吡地	5-10 ng/mL	2-3	20 ng/mL	4	3.35	[436]	

药物及活性代谢产物		治疗参考浓度范围/ 推荐的药物浓度	半衰期(h)	实验室警戒浓度	TDM 推荐等级	转换因子	参考文献	备注
英文	中文							
Phenobarbital	苯巴比妥	10-40 μg/mL	80-120	50 μg/mL	1	4.31	[88,499]	
Phenytoin	苯妥英	10-20 μg/mL	20-60	25 μg/mL	1	3.96	[88,380,499]	
Pregabalin	普瑞巴林	2-5 μg/mL	6	10 μg/mL	3	6.28	[68,77,88,343,432,499]	
Primidone( active metabolite phenobarbital)	扑米酮(活性代谢产物 苯巴比妥)	5-10 μg/mL	14-15	25 μg/mL	2	4.58	[88,499]	所给数据仅限于扑米酮,活性代谢产物苯巴比妥的推荐血浆浓度是10-40 μg/mL。
Rufinamide	卢非酰胺	5-30 μg/mL	7	40 μg/mL	2	4.2	[511]	
Stiripentol	司替戊醇	1-10 μg/mL	4-13	15 μg/mL	2	4.27	[503]	
Sulfthiamine	硫磺嘧	2-8 μg/mL	3-30	12 μg/mL	2	3.46	[88,375,429]	
Tapabine	噻加宾	20-200 ng/mL	7-9	300 ng/mL	2	2.66	[88,235,343,499]	
Topiramate	托吡酯	2-8 μg/mL(清晨)	21	16 μg/mL	3	2.95	[88,226,343,431,499]	
Valproic acid	丙戊酸	50-100 μg/mL	18	120 μg/mL	2	6.93	[16,88,216,301,499,682,683]	
Vigabatrin	氨己烯酸	2-10 μg/mL	5-8	20 μg/mL	4	7.74	[88,342,398,499,719]	
Zonisamide	唑尼沙胺	10-40 μg/mL	60	40 μg/mL	2	4.71	[247,448,449]	
<b>抗焦虑/催眠药物</b>								
Alprazolam	阿普唑仑	5-50 ng/mL	12-15	100 ng/mL <sup>§</sup>	4	3.22	[586,686]	<sup>§</sup> 长期使用苯二氮卓类药物者,有效血浆浓度可以明显高于不使用者。
Bromazepam	溴西洋	50-200 ng/mL	15-35	300 ng/mL <sup>§</sup>	4	3.16	[218,286,586]	
Brotizolam	溴替唑仑	4-10 ng/mL(C <sub>max</sub> )	3-6	20 ng/mL	4	2.53	[341,669]	
Bupropion ( active metabolite 6-hydroxybupropion)	丁氟环酮 (活性代谢物6-羟基丁氟环酮)	1-4 ng/mL	2-3	8 ng/mL <sup>§</sup>	3	2.59 2.49	[178,580,586]	
Chlordiazepoxide	利眠宁	400-3 000 ng/mL	5-30	3 500 ng/mL	4	3.48	[408,586]	
Clonazepam	氯硝西洋	4-80 ng/mL	19-30	100 ng/mL	4	3.17	[181,467,586]	
Diazepam and metabolites	地西洋和代谢物	200-2 500 ng/mL	24-48	3 000 ng/mL	4	3.51	[224,261,264,586]	活性代谢物有去甲西洋,奥沙西洋和替马西洋
Flunitrazepam	氟硝西洋	5-15 ng/mL	10-30	50 ng/mL	4	3.2	[80,425]	
Lorazepam	劳拉西洋	10-15 ng/mL	12-16	30 ng/mL	4	3.2	[164,196,218,267]	
Lormetazepam	氯甲西洋	2-10 ng/mL	8-14	100 ng/mL	4	2.98	[3,515]	
Midazolam	咪达唑仑	6-15 ng/mL C <sub>max</sub> :60-80 ng/mL	1-3	1 000 ng/mL	4	3.06	[35,261,323]	
Nitrazepam	硝西洋	30-100 ng/mL	18-30	200 ng/mL	4	3.56	[467,586]	
Nordazepam	去甲西洋	20-800 ng/mL	50-90	1 500 ng/mL	4	3.69	[586]	
Opipramol	奥匹哌醇	50-500 ng/mL	11	1 000 ng/mL	3	2.87	[386]	
Oxazepam	奥沙西洋	200-1 500 ng/mL	4-15	2 000 ng/mL	4	3.49	[586]	

药物及活性代谢产物		治疗参考浓度范围/ 推荐的药物浓度	半衰期(h)	实验室警 戒浓度	TDM 推 荐等规	转换 因子	参考文献	备注
英文	中文							
Pregabalin	普瑞巴林	2-5 µg/mL	6	10 µg/mL	3	6.28	[76,77]	
Temazepam	替马西泮	20-900 ng/mL	5-13	1 000 ng/mL	4	3.51	[586]	
Triazolam	三唑仑	2-20 ng/mL	1-5	40 ng/mL <sup>‡</sup>	4	4.12	[586]	
Zolpidem	唑吡坦	80-150 ng/mL	1-4	300 ng/mL	4	3.23	[586]	
Zopiclone	佐匹克隆	10-50 ng/mL	5	150 ng/mL	4	3.48	[586]	室温下不稳定
<b>抗痴呆药</b>								
Donepezil	多奈哌齐	30-75 ng/mL	70-80	75 ng/mL	2	2.64	[492,563,652]	
Galantamine	加兰他敏	30-60 ng/mL	8	90 ng/mL	3	3.48	[322,333,734]	
Memantine	美金刚	90-150 ng/mL	60-100	300 ng/mL	3	5.58	[251,378]	
Rivastigmine	卡巴拉汀	口服 8-20 ng/mL(饭后 1-2 h);外贴 5-13 ng/mL (贴附新剂前1 h)	1-2	40 ng/mL	3	4	[597,147,391]	
<b>治疗药物依赖相关障碍的药物</b>								
Acamprosate	阿坎酸	250-700 ng/mL	13	1000 ng/mL	3	8.68	[287,288,424]	
Buprenorphine	丁丙诺啡	0.7-1.6 ng/mL 服用24 mg 后的 C <sub>min</sub> < 9 ng/mL	2-5	10 ng/mL (C <sub>max</sub> )	2	2.38	[120,130,383]	
Bupropion + Hydroxybupropion	安非他酮 + 羟基安非他酮	550-1 500 ng/mL	20 20	2 000 ng/mL	2	4.17 3.91	[345]	安非他酮不稳定, 抽血后血浆或血清需要冻存(-20℃), 在一项临床研究中, 300 mg 是使血浆浓度达到预期最有效的剂量。
Clomethiazole	氯美噻唑	100-5 000 ng/mL	2-54			6.19	[672]	酒精依赖患者可能比健康受试者能够耐受更高的血浆浓度
Disulfiram	戒酒硫	50-400 ng/mL	7	500 ng/mL	3	3.37	[203,344,586]	戒酒硫(DSF)是一个前药, 它的活性代谢产物二乙基硫代甲基氨基甲酸酯(DDTC-Me)曾被推荐作为戒酒硫测量测定的标志物。在一项 300 mg DSF 下的药代动力学中, DSF 的稳态浓度为(170 ± 10) ng/mL, DDTC-Me 为(290 ± 20) ng/mL。
Levomethadone	左美沙酮	250-400 ng/mL	14-55	400 ng/mL 100 ng/mL <sup>‡</sup>	2	3.23	[146]	<sup>‡</sup> 非阿片类药物使用者的有效或中毒血浆浓度明显低于阿片类药物使用者。慢性使用者可能需要“中毒”浓度以避免戒断症状的发生。
Methadone	美沙酮	400-600 ng/mL	24-48	600 ng/mL 300 ng/mL <sup>‡</sup>	2	3.23	[146,188,595]	
Naltrexone + 6β-naltrexol	纳曲酮 + 6β-纳曲醇	25-100 ng/mL	4-13	200 ng/mL	2	3.06 3.04	[99,211,252,424]	
Varenicline	伐尼克兰	4-5 ng/mL	24	10 ng/mL	3	4.73	[202,532]	
<b>抗帕金森病药物</b>								
Amantadine	金刚烷胺	0.3-0.6 µg/mL	10-14	1.2 µg/mL	3	5.98	[320]	

药物及活性代谢产物		治疗参考浓度范围/ 推荐的药物浓度	半衰期(h)	实验室测 或浓度	TDM 推 荐等级	转换 因子	参考文献	备注
英文	中文							
SPCQuetiapine	喹硫平	100 - 500 ng/mL	7	1 000 ng/mL	2	2.61	[112,212,236,289,498,603,627,689,723]	当患者晚上使用缓释剂型药物,第2天早晨抽血,预期血药浓度将比谷浓度高2倍
Risperidone + 9-hydroxyrisperidone	利培酮 + 9-羟利培酮	20 - 60 ng/mL	3 24	120 ng/mL	2	2.44 2.35	[150,406,426,437,469,475,553,557,617,729,737]	
Serindole	舍吡啶	50 - 100 ng/mL	55 - 90	200 ng/mL	2	2.27	[71,109,110,653,728,729]	在治疗剂量下,活性代谢产物脱氢舍吡啶在40 - 60 ng/mL的浓度范围内,由于其抑制代谢作用,具有浓度依赖性QT间期延长作用。
Sulpiride	舒必利	200 - 1 000 ng/mL	8 - 14	1 000 ng/mL	2	2.93	[460,656]	没有代谢产物,肾脏消除
Thioridazine	硫利达嗪	100 - 200 ng/mL	30	400 ng/mL	1	2.7	[190,656]	CYP2D6 酶代谢者禁用
Ziprasidone	齐拉西酮	50 - 200 ng/mL	6	400 ng/mL	2	2.55	[126,419,427,688,693]	该药应与饭同服,否则吸收会降低,血药浓度将比预期值低
Zotepine	佐替平	10 - 150 ng/mL	13 - 16	300 ng/mL	3	3.01	[376,642]	
Zuclophethisol	氯噻吨	4 - 50 ng/mL	15 - 25	100 ng/mL	3	2.49	[310,371,692]	
情感稳定剂								
Carbamazepine	卡马西平	4 - 10 µg/mL	10 - 20	20 µg/mL	2	4.23	[512]	活性10,11-环氧化代谢产物具有临床效应
Lamotrigine	拉莫三嗪	3 - 14 µg/mL	7 - 21	30 µg/mL	2	3.9	[455,558]	到目前为止,作为情感稳定剂尚无专门的参考浓度范围。丙戊酸会使其消除半衰期增加至48 - 70 h。
Lithium	锂	0.5 - 1.2 mmol/L (4 - 8 µg/mL)	24	1.2 mmol/L (8 µg/mL)	1	125.8	[593,721]	消除半衰期随年龄增长而延长
Valproic acid	丙戊酸	50 - 100 µg/mL	18	120 µg/mL	2	6.93	[16,216,301,683]	急性躁狂发作期,一些个体可以耐受120 µg/mL。
抗癫痫药物								
Carbamazepine	卡马西平	4 - 12 µg/mL	10 - 20	20 µg/mL	2	4.25	[87,338,499]	活性10,11-环氧化代谢产物具有临床效应
Clobazam and N-desmethyloclobazam	氯巴占 + N-去甲氯巴占	30 - 300 ng/mL 300 - 3 000 ng/mL	18 - 42	500 ng/mL 5 000 ng/mL	2	3.33 3.49	[278,499]	活性N-去甲基代谢产物具有临床效应
Clozapepam	氯硝西泮	20 - 70 ng/mL	40	80 ng/mL	2	3.17	[44,464,499]	7-氨基代谢产物保留一定的活性
Ethosuximide	乙琥胺	40 - 100 µg/mL	33 - 55	120 µg/mL	2	7.08	[88,499]	
Felbamate	非尔氨酯	30 - 60 µg/mL	15 - 23	100 µg/mL	2	4.2	[290,343,499]	
Gabapentin	加巴喷丁	2 - 20 µg/mL	6	25 µg/mL	3	5.84	[75 - 77,343,398,499]	
Lucosamide	拉科酰胺	1 - 10 µg/mL	13	20 µg/mL		2.66	[47]	
Lamotrigine	拉莫三嗪	3 - 14 µg/mL	7 - 21	20 µg/mL	2	3.9	[88,343,455,456,499,610]	丙戊酸会增加消除半衰期至48 - 70 h
Levetiracetam	左乙拉西坦	10 - 40 µg/mL	6 - 8	100 µg/mL (清晨)	2	3.87	[88,343,430,499]	
Methsuximide + N-desmethylnmethsuximide	甲琥胺 + N-去甲甲琥胺	10 - 40 µg/mL	1 - 3 36 - 45	45 µg/mL	2	4.92 5.29	[88]	该代谢产物是体内主要的活性成分
Oxcarbazepine + 10-hydroxycarbamazepine	奥卡西平 + 10-羟卡马西平	10 - 35 µg/mL	5 10 - 20	40 µg/mL	2	3.96 3.73	[88,343,428,499]	

药物及活性代谢产物		治疗参考浓度范围/ 推荐的药物浓度	半衰期(h)	实验室警戒浓度	TDM 推荐等级	转换因子	参考文献	备注
英文	中文							
Biperiden	比哌立登	C <sub>max</sub> :4~6.5 ng/mL. (用4 mg 后为0.5~2 h)	18~24	13 ng/mL	3	3.21	[270]	
Bomaprine	波那普林	C <sub>max</sub> :0.7~7.2 ng/mL. (用4 mg 后1~2 h)	30	14 ng/mL	3	3.04	[433]	
Bromocriptine	溴隐亭	低剂量(2.5 mg):0.1~0.3 ng/mL. 高剂量(25 mg):1.0~4.0 ng/mL.	38	8 ng/mL	3	1.53	[168]	
Cabergoline	卡麦角林	C <sub>max</sub> :58~144 pg/mL. (用药4周,服药后0.5~4 h)	63~68	390 pg/mL	3	2.21	[168]	室温下不稳定,血清或血浆应冻存(<-20℃)
Carbidopa	卡比多巴	C <sub>max</sub> :20~200 ng/mL. (用药后2 h)	2	400 ng/mL	3	4.42	[574]	室温下不稳定,血清或血浆应冻存(<-20℃)
Levodopa O-Methyldopa	左旋多巴+ O-甲基多巴	C <sub>max</sub> :0.9~2.0 μg/mL. (服用250 mg 后0.6~0.9 h);0.7~10.9 μg/mL. (与25 mg 卡比多巴合用)	1~3	5 μg/mL	3	5.07	[4,135,394,479,574]	室温下不稳定,血清或血浆应冻存(<-20℃)。合并卡比多巴或苄丝肼时消除半衰期和血浆浓度均会增加。
Entacapone	恩他卡朋	C <sub>max</sub> :0.4~1.0 μg/mL	0.5	2 μg/mL	3	3.28	[304,570]	室温下不稳定,血清或血浆应冻存(<-20℃)
Pramipexole	普拉莫素	0.39~7.17 ng/mL	8~12	15 ng/mL	3	4.73	[730]	
Ropinidole	罗匹尼罗	0.4~6.0 ng/mL	3~10	12 ng/mL	3	3.84	[657]	
Tapiride	泰必利	C <sub>max</sub> :1~2 μg/mL	3~4	4 μg/mL	3	3.05	[108]	
Tokopone	托卡朋	C <sub>max</sub> :3~6 μg/mL	2	12 μg/mL	3	3.66	[177,346]	
<b>其他药物</b>								
Atomoxetine	托莫西汀	200~1000 ng/mL(口服 1.2 mg/(kg·d)后60~90 min)	4	2000 ng/mL	3	3.91	[233,302,446,583]	建议的参考范围是测定的治疗有效者的峰浓度。CYP2D6 酶慢代谢者的消除半衰期为21 h。
Dexmethylphenidate	右旋甲酯	13~25 ng/mL(口服 20 mg 后4 h)	2	44 ng/mL	2	4.29	[663]	5.2~5.5 ng/mL 与多巴胺转运体50%的阻断率有关[614]。
Methylphenidate	哌醋甲酯	13~22 ng/mL. 去甲哌醋甲酯(20 mg 速释剂后2 h; 或40 mg 缓释剂后6~8 h)	2	44 ng/mL	2	4.29	[331,422,614,615]	哌醋甲酯室温不稳定,推荐的浓度范围是C <sub>max</sub> 。
Modafinil	莫达非尼	1000~1700 ng/mL. (200 mg/d)	10~12	3400 ng/mL	3	4.21	[733]	

注:以质量浓度单位表述的血浆药物浓度乘以转换因子即可转换成摩尔浓度;nmol/L = ng/mL × CF。<sup>a</sup>活性代谢产物与药物的治疗作用和不良反应有关。所列参考浓度范围和实验室警戒浓度仅为母药浓度。为与其2种不同指征保持一致,安非他酮、卡马西平、拉莫三唑和丙戊酸的参数被2次列出。本表由 CH, PB, SU, BR 和 HK 编制, AC, OD, KE, MF, MG, CG, GG, FH, UH-R, CH, EJS, HK, GL, UL, TM, BP, BS, MU, SU, GZ 审核



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## 岛津企业管理(中国)有限公司/岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

### 北京

北京市朝阳区朝外大街16号中国人寿大厦14F  
邮政编码: 100020  
电话: (010) 8525-2310/2312  
传真: (010) 8525-2326/2329

### 上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫天地二期C801栋  
邮政编码: 200233  
电话: (021) 3419-3888  
传真: (021) 3419-3666

### 沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11F  
邮政编码: 110016  
电话: (024) 2325-5577  
传真: (024) 2383-6378

### 四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层  
邮政编码: 610015  
电话: (028) 8619-8421/8422  
传真: (028) 8619-8420

### 武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦1座41层4116室  
邮政编码: 430022  
电话: (027) 8555-7910  
传真: (027) 8555-7920

### 广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼  
邮政编码: 510010  
电话: (020) 8710-8603  
传真: (020) 8710-8698

### 西安

西安市南二环西段88号老三届世纪星大厦24层G座  
邮政编码: 710065  
电话: (029) 8838-6016  
传真: (029) 8838-6497

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座  
邮政编码: 830000  
电话: (0991) 230-6271/6272  
传真: (0991) 230-6273

### 昆明

昆明市青年路432号天恒大酒店908室  
邮政编码: 650021  
电话: (0871) 315-2987  
传真: (0871) 315-2991

### 南京

南京市鼓楼区汉中路2号金陵饭店亚太商务楼27层B单元  
邮政编码: 210005  
电话: (025) 8689-0258  
传真: (025) 8689-0237

### 重庆

重庆市渝中区青年路38号重庆国贸中心1702室  
邮政编码: 400010  
电话: (023) 6380-6057/6058  
传真: (023) 6380-6551

### 深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼F2.6-1C  
邮政编码: 518042  
电话: (0755) 8340-2852  
传真: (0755) 8389-3100

### 河南

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室  
邮政编码: 450007  
电话: (0371) 8663-2981  
传真: (0371) 8663-2982

### 香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City,  
Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong  
电话: (00852) 2375-4979  
传真: (00852) 2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439  
400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准  
样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证  
注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知