利用 LCMS-8050 CL 定量分析血清中 26 种抗癫痫药物

LCMSMS-457

摘要： 本文使用岛津临床质谱仪 LCMS-8050 CL，结合德国 Recipe 公司的抗癫痫药物试剂盒，利用蛋白沉淀的前处理方法，建立了血清中 26 种抗癫痫药物浓度监测的定量分析方法。采用内标法建立标准曲线，26 种抗癫痫药线性相关性良好，相关系数均在 0.9992 以上，准确度在 94.2~105.9% 之间。试剂盒中 LQC 和 HQC 两个质控连续 6 针进样的峰面积比 RSD 小于 5.44%，准确度在 88.6~113.2% 之间。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，可为临床抗癫痫药物浓度监测提供参考。

关键词： LCMS-8050 CL　抗癫痫　血清　治疗药物浓度监测

治疗药物监测 (Therapeutic drug monitoring , TDM) 是临床药理学的重要研究内容之一 , 主要通过采用灵敏的现代分析测试手段来定量分析患者血液样本中的药物及其代谢产物的浓度 , 探讨血药浓度与药物疗效、毒性之间的关系 , 以确定药物有效浓度及毒性浓度之间的范围 , 并可根据药物动力学公式来计算最佳的治疗剂量 , 做到用药个体化 , 指导临床合理用药。

癫痫是一种具有持续性产生痫性发作倾向的脑部疾患；特点是持续存在能产生痫性发作的易感性，并出现相应的神经生物学、认知、心理学和社会功能等方面的后果。目前市场上治疗癫痫的药物种类繁多，2015 年抗癫痫药销售份额前十的产品占整个市场份额的 99%。排名前三的分别是丙戊酸钠、左乙拉西坦和奥卡西平。不同的癫痫病患者对各种抗癫痫药物的敏感度不同，个体差异较大，为了实现最佳治疗效果，需要对服药患者体内的药物浓度进行监测。

目前用于抗癫痫药物浓度监测的方法有免疫检测法、原子吸收法、色谱法，为了提高检测的准确度和灵敏度，越来越多的医院和第三方医学检测中心逐步开发出用于抗癫痫药物浓度监测的液相色谱串联质谱法。

本文基于抗癫痫药物商品化试剂盒，利用岛津 LCMS-8050 CL 开发了定量分析血清中抗癫痫药物的方法。该方法方便、快捷，实现了 26 种抗癫痫药物的同时快速分析，供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱仪 LCMS-8050 CL（国械注进 20182400195）。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack Volex PFPP (50 mm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm)；

P/N：227-32021-02

流动相：A 相 -5 mM 甲酸铵水溶液；B 相 - 甲醇 / 乙腈 =1/1

流速：0.6 mL/min

柱温：40°C

进样量：0.5 µL

自动进样器温度：10°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1　梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.5	Pump	B.Conc	5
1	Pump	B.Conc	16
1.5	Pump	B.Conc	16
2.5	Pump	B.Conc	40
3	Pump	B.Conc	40
3.5	Pump	B.Conc	85
3.8	Pump	B.Conc	85
3.81	Pump	B.Conc	5
4.5	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI+/-

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：10.0 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：250°C

加热模块温度：400°C

干燥气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：5 ms

MRM 参数：见表 2

1.3 试剂盒信息

品牌：德国 Recipe

组成：血清基质标品、血清基质质控、内标、蛋白沉淀剂

表 2　抗癫痫药物及其内标 MRM 参数

CAS 号	中文名	英文名	前体离子 m/z	产物离子 m/z	CE (v)
29331-92-8	利卡西平	10,11-Dihydro-10-OH-Carbamazepine	255.0	194.1	-25
				165.1	-25
298-46-4	卡马西平	Carbamazepine	237.1	194.1	-39
				165.1	-39
104839-39-6	10- 羟基 - 奥卡西平	Carbamazepine-Diol	271.3	180.1	-25
				210.1	-25
36507-30-9	卡马西平 10,11- 环氧化物	Carbamazepine-Epoxide	253.1	180.1	-25
				210.1	-25
25451-15-4	非氨酯	Felbamate	239.1	117.1	-21
				65.1	-55
60142-96-3	加巴喷丁	Gabapentine	172.1	137.1	-20
				55.1	-40
175481-36-4	拉科酰胺	Lacosamide	251.1	91.1	-30
				74.1	-35
84057-84-1	拉莫三嗪	Lamotrigine	256	58.1	-35
				43.2	-35

102767-28-2	左乙拉西坦	Levetiracetam	171.1	126.1	-32
				69.1	-45
28721-07-5	奥卡西平	Oxcarbazepine	253.1	180	-20
				236	-20
7206-76-0	2- 乙基 -2- 苯基丙二酰胺	Phenylethylmalonamide	207.1	91.1	-30
				117.1	-20
380917-97-5	吡仑帕奈	Perampanel	350.1	247.1	-25
				219.1	-25
57-41-0	苯妥英	Phenytoin	253.25	182.2	-20
				77.1	-48
148553-50-8	普瑞巴林	Pregabaline	160.1	142.1	-16
				97	-16
125-33-7	扑米酮	Primidone	219.1	162.1	-20
				91.1	-20
150812-12-7	瑞替加滨	Retigabine	304.2	109	-20
				230.1	-20
106308-44-5	卢非酰胺	Rufinamide	239	127	-20
49763-96-4	斯利潘托	Stiripentol	217	187.2	-14
				159.1	-17
115103-54-3	噻加宾	Tiagabine	376.1	247.1	-21
				149	-29
77-67-8	乙琥胺	Ethosuximide	140.3	42.2	23
1497-17-2	N- 去甲基甲琥胺	N-Desmethylmethsuximide	188.3	42	20
1950/6/6	苯巴比妥	Phenobarbital	231.2	42	16
61-56-3	舒噻嗪	Sulthiame	289.2	225.1	20
				132.1	27
97240-79-4	托吡酯	Topiramate	338.2	78	29
				96	22
99-66-1	丙戊酸	Valproic acid	143.2	143.2	0
68291-97-4	唑尼沙胺	Zonisamide	211.2	119.1	14
				63.9	53
-	d10- 卡马西平	d10-Carbamazepine	247.1	175.1	-46
-	d4- 非氨酯	d4-Felbamate	243.3	121	-18
-	d3- 拉科酰胺	d3-Lacosamide	254.3	91.1	-41
-	13C3- 拉莫三嗪	13C3-Lamotrigine	259	59.1	-33
-	d6- 左乙拉西坦	d6-Levetiracetam	177	132.1	-22
-	d4- 奥卡西平	d4-Oxcarbazepine	257.3	184.1	-33
-	d5- 2- 乙基 -2- 苯基丙二酰胺	d5-Phenylethylmalonamide	212.1	93.1	-24
-	d4- 普瑞巴林	d4-Pregabaline	164	146.2	-16

-	d5- 扑米酮	d5-Primidone	224.3	167.1	-13
-	d4- 瑞替加滨	d4-Retigabine	308.2	113	-36
-	d9- 斯利潘托	d9-Stiripentol	226	196.2	-13
-	d6- 噻加宾	d6-Tiagabine	382.1	253.1	-21
-	d3- 乙琥胺	d3-Ethosuximide	143.2	42.1	24
-	d5- 苯巴比妥	d5-Phenobarbital	236.1	42	16
-	d12- 托吡酯	d12-Topiramate	350.3	78	27
-	d6- 丙戊酸	d6-Valproic acid	149.2	149.2	0
-	15N,d4- 唑尼沙胺	15N,d4-Zonisamide	216.2	123.1	14

标准品、质控品和样品前处理

精密吸取标准品（或质控品或样品）50 μL，加入 100 μL 含有内标的蛋白沉淀剂，涡旋混匀 30 s，10000 g 离心 5 分钟，吸取上清液待分析。

结果与讨论

3.1 抗癫痫药物色谱图

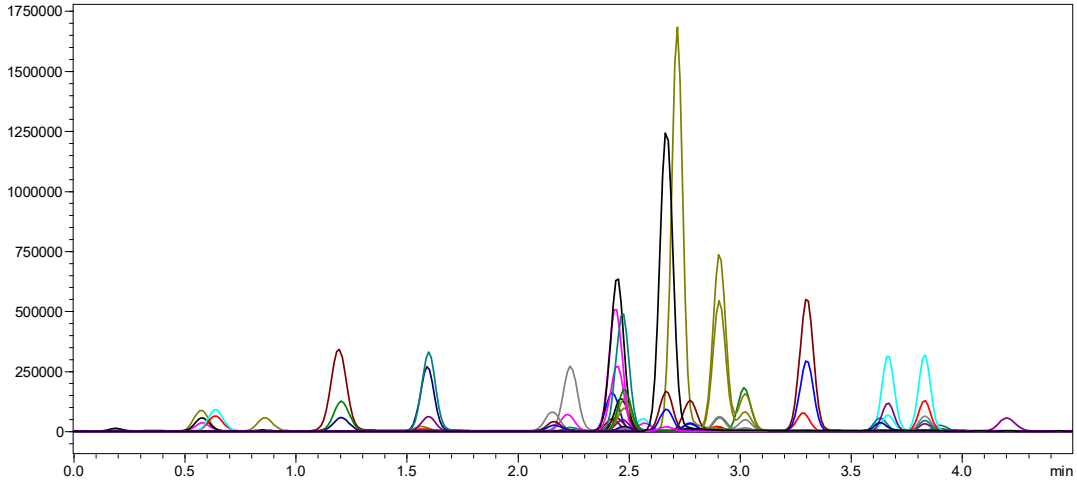

图 1　抗癫痫药物色谱图（标曲中间点 L2）

表 3　血清基质标曲和质控浓度

目标物	血清基质标曲浓度（ng/mL）			血清基质质控（ng/mL）	
	L1	L2	L3	LQC	HQC
10,11-Dihydro-10-OH-Carbamazepine	2.8	14.1	42.9	7.68	19.4
Carbamazepine	1.44	7.39	20.6	4.06	9.24
Carbamazepine-Diol	0.542	2.78	8.74	1.62	3.85
Carbamazepine-Epoxide	0.625	3.23	9.57	1.66	3.94
Felbamate	7.04	34.8	106	18.8	45.4
Gabapentine	1.87	8.63	27.8	4.65	11
Lacosamide	0.879	4.52	13.9	2.43	5.66

Lamotrigine	1.55	7.86	23.1	4.17	9.86
Levetiracetam	4.32	21.6	67.3	11.9	29.1
Oxcarbazepine	0.249	1.3	3.99	0.76	1.88
Phenylethylmalonamide	0.711	3.75	11.5	2.11	5.03
Perampanel	0.0974	0.485	1.46	0.281	0.633
Phenytoin	1.94	9.43	28.3	4.91	11.2
Pregabaline	0.565	3	9.56	1.51	4.02
Primidone	1.63	9.12	28.8	4.67	11.3
Retigabine	0.134	0.727	2.3	0.388	0.961
Rufinamide	3.11	15.5	47.4	8.93	20.8
Stiripentol	1.24	5.86	17.8	3.32	7.83
Tiagabine	0.0204	0.103	0.316	0.0602	0.14
Ethosuximide	8.33	39.4	119	21.2	50.7
N-Desmethylmethsuximide	3.44	15.9	50.9	9.07	21.2
Phenobarbital	3.54	16.3	51.3	9.65	22.7
Sulthiame	0.946	4.5	12.7	2.43	5.74
Topiramate	1.23	5.85	17.7	3.26	7.74
Valproic acid	8.59	37.9	114	22.6	52.9
Zonisamide	3.05	14.2	42.5	8.29	19.8

3.2 抗癫痫药物血清基质标曲相关信息

采用内标法建立标准曲线，结果如表 4 所示。结果显示，26 种抗癫痫药在线性浓度范围内线性相关性良好，相关系数均在 0.9992 以上，准确度在 94.2~105.9% 之间（表 4）。

表 4　抗癫痫药物血清基质标准曲线相关参数（采用 1/C 加权）

目标物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %
10,11-Dihydro-10-OH-Carbamazepine	Y = (1.25559)X + (0.0323192)	0.9997	96.3~102.6
Carbamazepine	Y = (0.617675)X + (-0.0648802)	0.9997	96.6~102.4
Carbamazepine-Diol	Y = (0.898148)X + (-0.0221804)	0.9995	95.3~103.4
Carbamazepine-Epoxide	Y = (3.08943)X + (-0.179619)	0.9996	96.0~102.8
Felbamate	Y = (0.107331)X + (-0.0361019)	0.9998	97.9~102.9
Gabapentine	Y = (0.107685)X + (-0.0304816)	0.9999	98.8~100.9
Lacosamide	Y = (0.249149)X + (0.00698630)	0.9999	98.8~100.9
Lamotrigine	Y = (0.149038)X + (0.0263362)	0.9993	94.8~103.7
Levetiracetam	Y = (0.0143571)X + (-0.00276382)	0.9997	97.2~103.9
Oxcarbazepine	Y = (0.315198)X + (0.0119151)	0.9999	99.1~101.2
Phenylethylmalonamide	Y = (0.315173)X + (0.0496432)	0.9999	98.8~101.7
Perampanel	Y = (21.6916)X + (0.352736)	0.9994	96.3~105.1

Phenytoin	Y = (0.0412568)X + (0.0104746)	0.9992	94.2~104.1
Pregabaline	Y = (0.161023)X + (0.0238825)	0.9997	97.3~103.7
Primidone	Y = (0.0355124)X + (0.0192058)	0.9999	99.0~101.4
Retigabine	Y = (0.168644)X + (-0.00256282)	0.9999	99.7~100.3
Rufinamide	Y = (3.60201)X + (-0.919409)	0.9999	98.1~101.4
Stiripentol	Y = (0.390582)X + (0.00634797)	0.9995	96.9~104.3
Tiagabine	Y = (3.68760)X + (0.00610601)	0.9999	97.6~101.7
Ethosuximide	Y = (0.0665237)X + (-0.0281573)	0.9999	99.7~100.4
N-Desmethylmethsuximide	Y = (0.0134140)X + (0.00210189)	0.9992	95.6~105.9
Phenobarbital	Y = (0.0456657)X + (-0.0312873)	0.9992	95.8~105.7
Sulthiame	Y = (0.654952)X + (0.0359962)	0.9992	96.1~105.6
Topiramate	Y = (0.546572)X + (0.00174642)	0.9995	95.5~103.2
Valproic acid	Y = (0.449515)X + (-0.360189)	0.9999	98.4~102.2
Zonisamide	Y = (0.268857)X + (-0.00497531)	0.9997	97.5~103.5

3.3 精密度和准确度测定

利用试剂盒中 LQC 和 HQC 两个质控进行精密度测定（连续 6 针进样），LQC 和 HQC 两个质控点各个化合物的浓度如表 3 所示，数据统计分析得到精密度和准确度测定结果如表 5 所示。连续 6 针进样的峰面积比 RSD 小于 5.44%，准确度在 88.6~113.2% 之间（表 5）。

表 5　抗癫痫药物质控 LQC 和 HQC 精密度和准确度测定结果

目标物	峰面积比 RSD%		准确度 %	
	LQC	HQC	LQC	HQC
10,11-Dihydro-10-OH-Carbamazepine	3.87	4.00	96.9~104.7	93.0~100.5
Carbamazepine	1.89	4.83	96.7~100.2	94.5~103.9
Carbamazepine-Diol	3.77	5.44	92.5~99.3	95.9~106.4
Carbamazepine-Epoxide	0.76	4.05	102.5~104.0	98.5~106.6
Felbamate	2.16	2.30	97.2~101.2	92.2~96.1
Gabapentine	4.59	4.49	104.3~113.2	99.3~108.6
Lacosamide	0.85	1.85	107.8~109.5	104.3~108.2
Lamotrigine	1.54	1.36	109.4~112.8	108.4~111.2
Levetiracetam	3.77	2.11	104.1~111.7	96.2~100.1
Oxcarbazepine	2.06	4.57	104.2~108.8	95.6~104.9
Phenylethylmalonamide	1.08	3.53	107.7~110.0	109.0~114.2
Perampanel	4.28	4.48	102.8~109.6	99.4~110.5
Phenytoin	1.34	3.40	103.3~105.9	100.0~106.4
Pregabaline	2.55	0.94	101.8~107.5	95.8~97.6
Primidone	5.52	5.08	98.4~109.9	100.8~112.1
Retigabine	3.88	2.29	97.8~107.9	102.8~111.3

Rufinamide	1.39	4.26	107.9~110.8	94.6~102.5
Stiripentol	4.39	5.54	105.4~107.4	96.2~107.2
Tiagabine	2.74	3.99	95.5~100.9	95.9~103.9
Ethosuximide	2.98	1.10	86.3~91.3	90.5~92.5
N-Desmethylmethsuximide	1.68	2.05	107.6~111.0	106.0~110.2
Phenobarbital	3.76	1.50	94.1~100.9	88.6~91.2
Sulthiame	0.61	3.55	105.6~111.2	97.3~104.6
Topiramate	5.07	4.76	98.1~105.9	92.4~100.9
Valproic acid	3.72	3.38	97.1~104.3	87.6~93.3
Zonisamide	2.28	1.87	98.5~102.6	92.7~95.9

3.4 实际样本测定结果

利用以上方法对 10 个临床癫痫病服药患者血清样本（S1~S10）进行定量分析，结果如下表所示。

表 6　临床患者样本检测结果

目标物	样品浓度（ng/mL）									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
10,11-Dihydro-10-OH-Carbamazepine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25.97
Carbamazepine	-	6.35	-	-	-	-	-	6.49	5.55	-
Carbamazepine-Diol	-	1.34	-	-	-	-	-	2.05	0.93	1.72
Carbamazepine-Epoxide	-	1.41	-	-	-	-	-	2.17	0.77	2.54
Felbamate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabapentine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacosamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lamotrigine	4.88	3.72	-	-	-	-	-	2.54	-	-
Levetiracetam	-	17.45	16.23	9.38	7.25	7.89	5.62	-	1.21	-
Oxcarbazepine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.28
Phenylethylmalonamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perampanel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenytoin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pregabaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Primidone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Retigabine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rufinamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stiripentol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiagabine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethosuximide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Desmethylmethsuximide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phenobarbital	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Sulthiame	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Topiramate	-	-	-	-	-	-	-	-	1.47	-
Valproic acid	-	-	-	39.57	-	-	55.69	53.63	-	-
Zonisamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：- 代表未检出

结论

本文使用岛津临床质谱仪 LCMS-8050 CL，结合德国 Recipe 公司的抗癫痫药物试剂盒，利用蛋白沉淀的前处理方法，建立了血清中 26 种抗癫痫药物浓度监测的定量分析方法。采用内标法建立标准曲线，26 种抗癫痫药线性相关性良好，相关系数均在 0.9992 以上，准确度在 94.2~105.9% 之间。试剂盒中 LQC 和 HQC 两个质控连续 6 针进样的峰面积比 RSD 小于 5.44%，准确度在 88.6~113.2% 之间。该方法分析速度快、稳定性和准确度好，可为临床抗癫痫药物浓度监测提供参考。

岛津企业管理(中国)有限公司 – 分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center
Email: sshzyan@shimadzu.com.cn Tel: 86(21)34193996 http://www.shimadzu.com.cn