

Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统 超快速测定微量血浆中的卡马西平

LCMSMS-356

摘要： 本文建立了一种使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人微量血浆中卡马西平的方法。实验采用该系统在 1.5 min 内超快速完成卡马西平的检测，采用同位素内标法定量，定量限 0.1 μg/mL，线性范围为 0.1~20 μg/mL，相关系数 0.9983。定量下限与低中高三水平质控浓度批内、批间精密度 RSD 均小于 3.2%，各浓度水平质控样品的准确度在 89~112.3% 之间。同时考察了进样器放置稳定性及平行液相双流路之间的一致性，结果表明样品在该条件下存放稳定性良好，平行液相双流路之间一致性良好。此方法快速、简单、选择性强且灵敏度高，适用于临床卡马西平血药浓度高通量监测。

关键词： 平行液相 超快速 三重四极杆质谱 微量血浆 卡马西平

卡马西平是目前临床上常用的抗癫痫药物，对精神运动性发作最有效，对大发作、局限性发作、和混合型癫痫也有效，减轻精神异常对伴有精神症状的癫痫尤为适宜。对三叉神经痛、舌咽神经痛疗效较英妥类纳好，有抗利尿作用，预防或治疗躁狂抑郁症、抗心律失常。因其治疗指数低，安全范围窄 (4~12 μg/mL)，服用剂量与血药浓度之间个体差异较大，同时本身又是肝药酶诱导剂，因而国内外临床上普遍对卡马西平进行治疗药物监测 (TDM)。

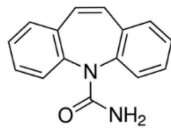
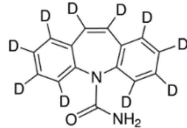
Nexera MX 超高速 LCMS 系统与常规液质联用仪相

比，Nexera MX 系统在保证方法精密度与稳定性的基础上，充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间，提供较以往两倍的处理速度与分析能力，显著缩短分析时间，提高生物样品检测速率，非常适用于药代动力学试验以及临床检验的高通量分析。本文采用 Nexera MX 系统建立了人血浆中卡马西平的含量测定方法，该方法操作简便快速、特异性好、灵敏度高，可以为临床人血浆中卡马西平血药浓度的检测工作提供很好的借鉴和参考。

实验部分

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
卡马西平 (CBZ)	Carbamazepine	298-46-4	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	
卡马西平-D10 (IS)	Carbamazepine-D10	132183-78-9	C ₁₅ H ₁₂ D ₁₀ N ₂ O	

1.2 仪器

本实验使用岛津 Nexera MX 超快速平行液相与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×4 输液泵，DGU-20A_{5R}、DGU-20A_{3R} 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. 5.89 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18(2.1 mm I.D.

×50 mm L.,2.0 μm)

流动相: A 相 - 超纯水, B 相 -0.1% 甲酸乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 1 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 50%, 洗脱程序见表 2、3。(表 4 为常规液相梯度洗脱程序, B 相初始浓度为 50%, 两系统液相梯度曲线图见图 1、2。)

表2 分析流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	50
0.51	Pumps	Pump B Conc.	90
1.50	Controller	Stop	

表3 冲洗平衡流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	50
1.50	Controller	Stop	

表4 常规液相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	50
1.50	Pumps	Pump B Conc.	90
1.50	Pumps	Pump B Conc.	90
1.51	Pumps	Pump B Conc.	50
3.00	Controller	Stop	

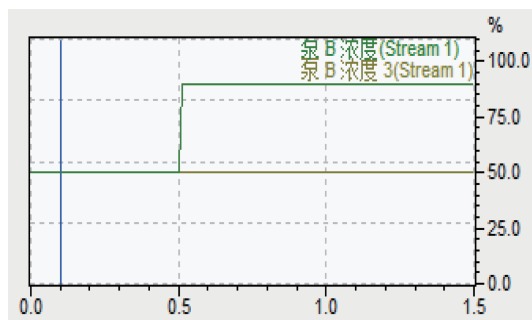


图1 MX系统液相梯度曲线图

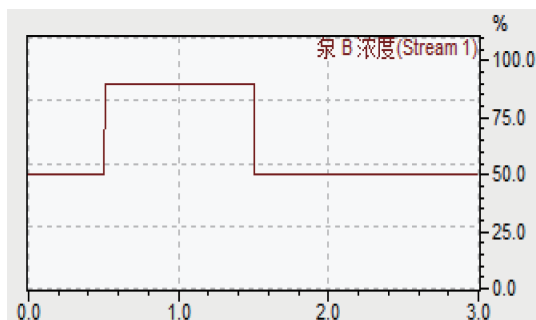


图2 常规液相梯度曲线图

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

离子化模式：ESI(+)

离子源接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热气：空气 10.0 L/min

干燥气：氮气 10.0 L/min

碰撞气：氩气

接口温度：300℃

DL 温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 5

表5 MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
CBZ	237.10	194.10	-16.0	-22.0	-19.0
CBZ-D10	247.10	204.10	-21.0	-22.0	-27.0

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份卡马西平适量，用甲醇溶解配制两份 1.0 mg/mL 卡马西平储备液。取其中一份储备液用甲醇逐级稀释成浓度为 1000、500、250、100、50、25、10、5 μg/mL 的标准工作曲线；另一份储备液用甲醇分别稀释成浓度为 750、150、15 μg/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 20 μL 加入 980 μL 人空白血浆中，依次配制成标准曲线 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 μg/mL；分别取三个不同浓度质控溶液 20 μL 加入 980 μL 人空白血浆中，依次配制成 0.3、3、15 μg/mL 质控样品。

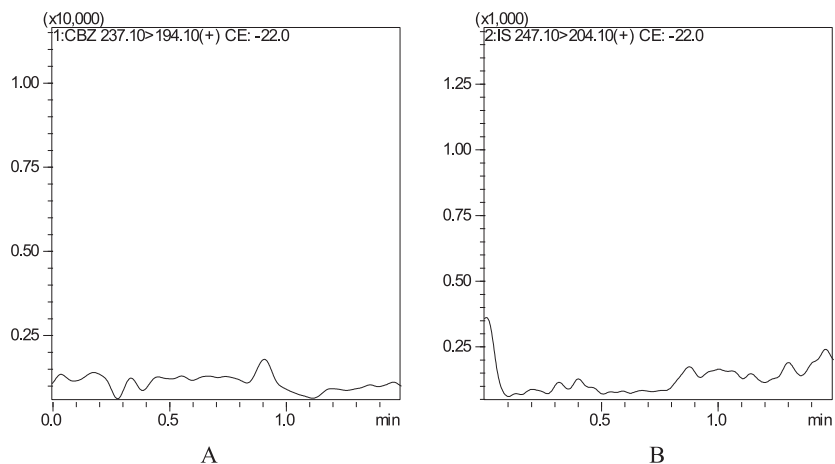
精密称取卡马西平 -D10 适量，用甲醇溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的卡马西平 -D10 储备液用甲醇稀释为 1.0 μg/mL 内标溶液，待用。

1.5 人血浆样品前处理方法

取 10 μL 血浆样品，加入 90 μL 水，加入 10 μL 内标溶液 (1.0 μg/mL)，加入 390 μL 甲醇，涡旋振荡 1 分钟，12000 转 / 分钟离心 5 分钟，取 10 μL 上清液，加 190 μL 甲醇，涡旋混匀后进样分析，进样体积 1 μL。

结果与讨论
2.1 方法选择性

取人空白血浆，按照 1.5 方法处理并测定，得人空白血浆 (double blank)、0.1 μg/mL 人血浆基质加标样品的 MRM 色谱图，见图 3。结果表明，人空白血浆中的内源物质干扰，对样品检测无明显影响，方法具有较强选择性。



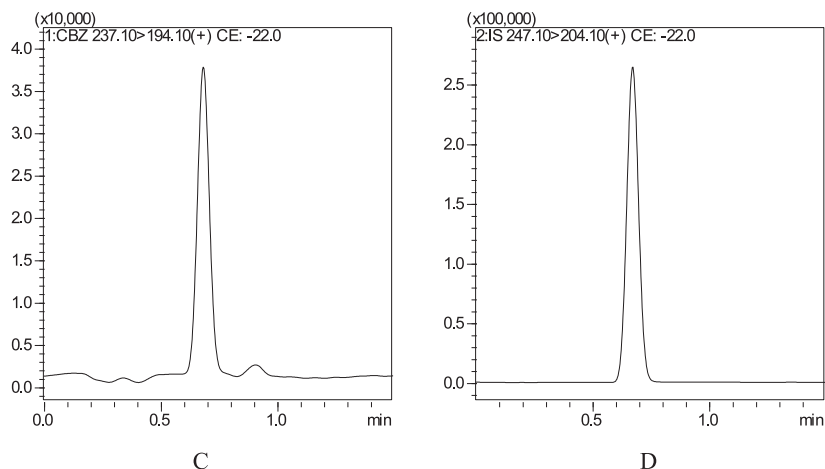


图3 卡马西平与卡马西平-D10色谱图(A、B: 人空白血浆; C、D: 0.1 μg/mL血浆基质加标样品)

2.2 线性范围及定量下限

按照 1.4 中的条件制备 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 μg/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 4 所示，线性方程及相关系数见表 6，其中 y 值代表卡马西平峰面积与卡马西平 -D10 峰面积的比值，x 值代表血浆中卡马西平浓度。结果表明 Nexera MX 超高速 LCMS 系统分析卡马西平在 0.1~20 μg/mL 的浓度范围内线性关系良好。

方法定量下限确定为 0.1 μg/mL，在此浓度水平，方法精密度和准确度均在接受标准内，RSD 为 1.82%，准确度在 93~97%，S/N 平均值为 30。

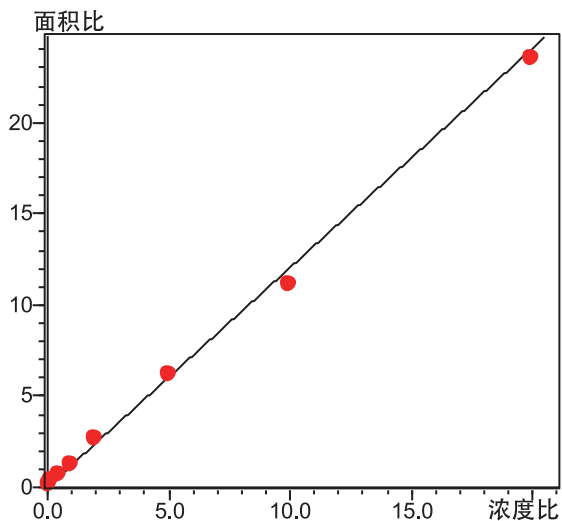


图4 卡马西平标准曲线

表6 校准曲线参数(线性回归, 权重为1/C²)

化合物	校准曲线	线性范围(μg/mL)	准确度(%)	相关系数 r
卡马西平	$Y = (1.20244)X + (0.0311379)$	0.1~20	91.7~106.5	0.9983

2.3 方法精密度与准确度

取已配制好的 0.3、3、15 $\mu\text{g/mL}$ 质控样品以及定量下限 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 样品, 按照 1.5 方法制备, 每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 6 份平行样品分析, 连续测定 3 天, 每日随行标准曲线, 用测得的质控样品中卡马西平浓度计算批内及批间精密度, 结果见表 7。结果显示, Nexera MX 超高速 LCMS 系统分析各浓度水平精密度、准确度均符合生物样本分析要求。

表7 方法批内批间精密度和准确度结果

理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	批内精密度 RSD%	批间精密度 RSD%	准确度%
0.1	1.82	3.20	89.0~98.0
0.3	0.94	1.39	107.7~112.3
3	1.08	1.87	100.2~106.1
15	1.21	1.43	95.24~100.6

2.4 方法回收率考察

考察三个浓度质控样品 (每个浓度重复 6 次) 的回收率, 结果如表 8 所示, 各浓度水平卡马西平的回收率均大于 90%。

表8 方法回收率结果

浓度水平	理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均回收率%
LQC	0.3	96.5
MQC	3	101.1
HQC	15	103.0

2.5 基质效应考察

基质效应考察三个浓度水平质控样品 (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 9, 各浓度水平基质效应因子及内标归一化基质效应因子均在 85%~115% 之间。

表9 基质效应考察结果

浓度水平	理论浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	基质效应因子	内标归一化基质效应因子
LQC	0.3	100.6%	101.1%
MQC	3	101.9%	102.4%
HQC	15	101.7%	102.1%
内标基质效应因子		99.6%	

2.6 稳定性实验

取已配制好的 0.3、15 $\mu\text{g/mL}$ 质控样品, 按照 1.5 方法处理样品, 进样器 (进样器温度 4 $^{\circ}\text{C}$) 放置 0 天、1 天及 2 天进行稳定性考察, 结果如下表所示, 表中结果显示该方法稳定性良好。

表10 进样器放置稳定性考察结果

理论浓度 (μg/mL)	精密度 RSD%	准确度%
0.3	1.10	109.3~112.3
15	1.20	97.4~99.9

2.7 双流路检测一致性考察

配制 0.3 ng/mL 卡马西平标准溶液，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，考察柱间差异，流路间差异，平行液相模式下仪器精密度，结果见表 11。在相同的洗脱程序下，将常规液质联用系统与 MX 液质联用系统所得色谱图进行对比，结果发现 MX 液质联用系统检测所需的时间是常规液质联用系统检测的一半，且两套系统检测所得色谱图无较大差异。

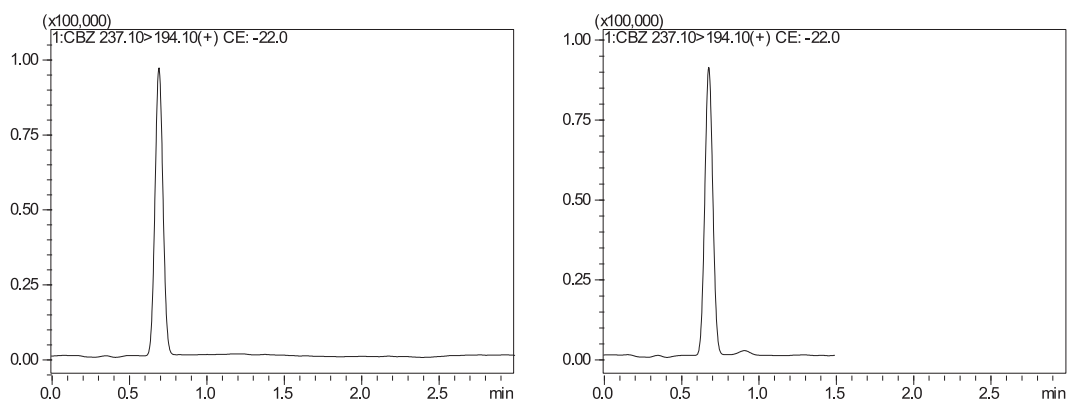


图5 常规液质联用系统(左)与MX液质联用系统(右)检测卡马西平对比图

表11 双流路检测一致性考察结果

常规二元高压液相模式			平行液相模式		
编号	保留时间(min)	峰面积	保留时间(min)	峰面积	
1	流路 1+柱 2	0.694	336091	0.680	313345
		0.694	339898	0.686	325601
		0.692	336943	0.682	318636
		0.689	336232	0.687	327670
		0.690	335076	0.683	315969
2	流路 1+柱 1	0.697	343158	0.688	334563
		0.695	349477	0.683	319457
		0.694	344633	0.688	338713
		0.697	334448	0.682	321018
3	流路 2+柱 1	0.697	338109	0.686	335429
		0.699	344712	0.681	323789
		0.700	355604	0.684	340272
		0.700	351291	0.680	326703
		0.697	352926	0.684	339144
RSD%	柱间差异 (1vs2)	0.41	1.44	0.42	2.68
	流路间差异 (2vs3)	0.28	2.55		

结论

本文建立一种使用岛津 Nexera MX 超高速平行液相和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中卡马西平的方法。方法利用该系统在 1.5 min 内超快速完成卡马西平的检测, 采用同位素内标法定量, 定量限 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 线性范围为 0.1~20 $\mu\text{g/mL}$, 相关系数 0.9983。定量下限与低中高三水平质控浓度的批内、批间精密度及准确度均满足检测需求, 稳定性、平行双流路的一致性结果均较好, 因此该方法快速、简单、选择性强、灵敏度高、稳定性好可满足人血浆中卡马西平的定量需求。实验结果表明采用 Nexera MX 超高速 LCMS 系统利用其独特的双流路技术, 充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等时间, 显著缩短分析时间, 大幅度提高生物样品检测效率, 适合于药代动力学试验以及临床检验的高通量分析。