

# LC-MS/MS法测定人血浆中卡马西平的浓度及其在室间质评中的应用<sup>Δ</sup>

梅升辉<sup>1\*</sup>, 杨莉<sup>1</sup>, 冯卫星<sup>2</sup>, 赵志刚<sup>1</sup>, 朱乐亭<sup>1#</sup> (1.首都医科大学附属北京天坛医院药学部, 北京 100050; 2.首都医科大学附属北京儿童医院神经内科, 北京 100045)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)08-1044-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.08.11

**摘要** 目的:建立并验证测定人血浆中卡马西平(CBZ)浓度的方法,并应用于CBZ的室间质评。方法:血浆样品经乙腈沉淀后,采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定。内标为氯雷他定,色谱柱为Kromasil C<sub>18</sub>,流动相为水(含0.1%甲酸)-乙腈,梯度洗脱,流速为0.6 ml/min,柱温为40 ℃;采用电喷雾离子源,以多反应监测方式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为 $m/z$  237.1→194.0(CBZ)、 $m/z$  383.1→267.0(内标)。结果:CBZ血药浓度在5~1 000 ng/ml范围内线性关系良好( $r>0.998$ ),定量下限为5 ng/ml;日内、日间RSD为1.00%~6.42%,相对偏差为-6.93%~0.32%;5个室间质评样品的检测结果分别为679.0、475.0、104.0、29.2、26.2 ng/ml,评价结果通过率为100%。结论:该方法灵敏、准确、专属性强,可用于CBZ血药浓度测定及其室间质评。

**关键词** 液相色谱-串联质谱法;卡马西平;血药浓度;室间质评

## Application of LC-MS/MS Method for the Determination of Carbamazepine in Human Plasma and External Quality Assessment

MEI Shenghui<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, FENG Weixing<sup>2</sup>, ZHAO Zhigang<sup>1</sup>, ZHU Leting<sup>1</sup> (1.Dept. of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2.Dept. of Neurology, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100045, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish and validate the method for the determination of carbamazepine (CBZ) in human plasma, and to apply the method for external quality assessment. METHODS: After precipitated with acetonitrile, the plasma sample was determined by LC-MS/MS. Using loratadine as internal standard, the determination was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of water (containing 0.1% formic acid)-acetonitrile (gradient elution) at flow rate of 0.6 ml/min and column temperature of 40 ℃. The ion transitions under MRM mode by ESI<sup>+</sup> ionization were performed at  $m/z$  237.1→194.0 and  $m/z$  383.1→267.0 for CBZ and internal standard, respectively. RESULTS: The linear range of CBZ were 5-1 000 ng/ml ( $r>0.998$ ). The limit of quantitation was 5 ng/ml. RSDs of inter-day and intra-day were 1.00%-6.42%; relative deviation were -6.93%-0.32%. The external quality assessment of 5 samples were 679.0, 475.0, 104.0, 29.2 and 26.2 ng/ml, respectively. The pass rate of assessment result was 100%. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate and specific. The method is applicable for the plasma concentration determination and external quality assessment of CBZ.

**KEYWORDS** LC-MS/MS; Carbamazepine; Plasma concentration; External quality assessment

- (3):226.
- [2] 朱爱国, 王建, 张桂芬. 我院2011—2013年质子泵抑制剂应用分析[J]. 中国药房, 2015, 26(14): 1 914.
- [3] 郑雪梅, 温悦, 孟德胜. 某三甲医院急诊科抗菌药物应用合理性分析[J]. 医药导报, 2011, 30(10): 1 377.
- [4] 胡敦梅, 杜光, 汪震, 等. 2006—2009年门诊处方抗菌药物应用情况分析[J]. 医药导报, 2011, 30(10): 1 357.
- [5] 武航海, 边原, 闫峻峰. 我院1 781 张门诊抗菌药物处方分析[J]. 中国药房, 2013, 24(20): 1 901.
- [6] 吴宏卫, 蔡琳, 郑芳芳. 我院儿科抗菌药物应用现状调查分析[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(3): 240.
- [7] 熊婷婷, 贾萍, 易宏英, 等. 我院门诊抗菌药物处方专项点评效果分析[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(5): 543.
- [8] 唐利飞. 五水头孢唑林钠联用甲硝唑治疗妇科感染的临床观察[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(10): 824.
- [9] 李凤云, 马超, 张树荣. 我院门诊抗菌药物应用合理性分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2013, 13(7): 602.
- [10] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 17版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 36.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81301118);多肽及小分子药物北京市重点实验室开放课题(No.2014DTYW03)

\* 药师, 博士。研究方向:药物化学和药物分析。电话:010-67096857。E-mail:meishenghui1983@126.com

# 通信作者:主管药师。研究方向:药物分析和治疗药物监测。电话:010-67096862。E-mail:zhuzhu6862@126.com

(收稿日期:2015-05-20 修回日期:2015-07-18)

(编辑:晏妮)

药动学是定量研究药物在生物体内吸收、分布、代谢和排泄,并运用数学原理和方法阐述血药浓度随时间变化规律的一门学科。血药浓度的准确测定是描述药物体内代谢过程的基础和前提,而血药浓度测定的准确性则依赖于测定方法的准确性和稳定性。生物样品基质复杂、干扰多、血药浓度通常较低且样品量少,为了获得准确而稳定的测定方法,美国、欧盟和中国相继出台了生物样品定量分析方法指导原则<sup>[1-3]</sup>。在根据指导原则进行方法开发的同时,还需定期进行室内质控和室间质评以保证测定结果的准确性和稳定性<sup>[4]</sup>。迄今为止,室间质评已在治疗药物监测和临床检验领域广泛开展<sup>[5-6]</sup>,卡马西平(CBZ)因其性质稳定,被广泛应用于治疗药物监测领域的质量评价。首届全国范围的药动学实验室生物样品检测室间质评活动于2014年开展,测定样品为CBZ。本研究建立并验证了测定CBZ血药浓度的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法,并顺利完成了室间质评样品的测定,为参与室间质评的相关实验室提供了参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Qtrap 5500 型质谱仪(美国 AB Sciex 公司);LC-20AD 型串联液相色谱系统(日本岛津公司);XS 105 DU 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);D2012 型高速离心机(美国 Scilogex 公司);Direct-Q3 型纯水器(美国 Millipore 公司)。

### 1.2 药品与试剂

CBZ 对照品(批号:100142-201105,纯度:99.7%)、氯雷他定对照品(内标,批号:100615-201103,纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲酸为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:Kromasil C<sub>18</sub>(50 mm×2.1 mm, 5 μm);流动相:水(A,含0.1%甲酸)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min, 90% A; >0.5~3 min, 90% A→10% A; >3~3.5 min, 10% A; >3.5~3.6 min, 10% A→90% A; >3.6~5.5 min, 90% A);流速:0.6 ml/min;柱温:40 °C;进样量:1 μl。

采用电喷雾离子源(ESI),以多反应监测(MRM)模式扫描,正离子方式检测。离子源温度:550 °C;离子喷雾电压(IS):5 500 V;雾化气(GS1)压力:50 psi;辅助加热气(GS2)压力:50 psi;气帘气(Curtain gas)压力:40 psi;碰撞气(Collision gas):Medium;入口电压:10 V;出口电压:15 V。用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  237.1→194.0(CBZ,去簇电压:40 V,碰撞电压:24 V)、 $m/z$  383.1→267.0(内标,去簇电压:100 V,碰撞电压:46 V)。CBZ 和内标的化学结构及质谱图见图 1。

### 2.2 溶液的配制

精密称取 CBZ 对照品 20.59 mg,用甲醇-水混合溶液(1:1, V/V,下同)溶解并定容至 10 ml 棕色量瓶中,得质量浓度为 2.059 mg/ml 的 CBZ 贮备液;再用甲醇-水混合溶液将其稀释,配制所需质量浓度的 CBZ 标准工作液。

精密称取内标对照品 20.50 mg,用乙腈溶解并定容至 10 ml 棕色量瓶中,得质量浓度为 2.050 mg/ml 的内标贮备液;再用乙腈将其稀释,配制质量浓度为 1 100 ng/ml 的内标溶

液。上述所有溶液均置于-80 °C 冰箱中保存,备用。

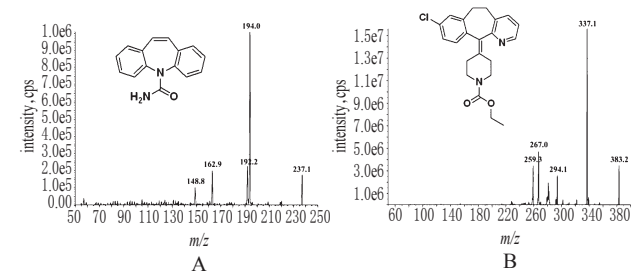


图1 CBZ和内标的化学结构及质谱图

A. CBZ; B. 内标

Fig 1 Chemical structures and mass spectrum of CBZ and internal standard

A. CBZ; B. internal standard

### 2.3 血浆样品的处理

2.3.1 标准曲线及质控血浆样品的处理 取空白血浆 90 μl,加入相应质量浓度的 CBZ 标准工作液及内标溶液各 10 μl,涡旋混匀 30 s,加入乙腈 300 μl,涡旋混匀 30 s,12 000×g 离心 2 min 后,取上清液 20 μl,加入乙腈-水混合溶液(1:1, V/V,下同)180 μl,涡旋混匀 30 s,12 000×g 离心 2 min,取上清液,进样分析。

2.3.2 待测血浆样品的处理 取待测血浆 100 μl,加入内标溶液 10 μl,涡旋混匀 30 s,加入乙腈 300 μl,涡旋混匀 30 s,12 000×g 离心 2 min 后,取上清液 20 μl,加入乙腈-水混合溶液 180 μl,涡旋混匀 30 s,12 000×g 离心 2 min,取上清液,进样分析。

### 2.4 方法学验证

2.4.1 专属性考察 在“2.1”项的条件下,内源性物质对 CBZ 和内标的测定均无显著干扰,CBZ 及内标峰形良好,保留时间分别为 3.54、3.65 min。其典型色谱图见图 2。

2.4.2 标准曲线的绘制及定量下限的考察 取空白血浆、相应质量浓度的 CBZ 标准工作液各适量,分别配制成 CBZ 质量浓度为 1 000、500、100、50、10、5 ng/ml 的血浆样品,按“2.3.1”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图。以待测物质量浓度(x)为横坐标、待测物与内标峰面积的比值(y)为纵坐标进行线性回归,加权因子为  $1/x^2$ ,连续测定 4 d。结果表明,CBZ 血药浓度在 5~1 000 ng/ml 范围内线性关系良好,其定量下限为 5 ng/ml。每日回归方程见表 1。

配制定量下限质量浓度(5 ng/ml)血浆样品,按“2.3.1”项下方法处理后,进样分析,连续测定 4 d,其日内相对偏差(RE)、日间 RE、日内 RSD、日间 RSD 分别为-0.43%、-6.93%、6.42%、5.37%。

2.4.3 残留效应 测定标准曲线最高质量浓度(1 000 ng/ml)血浆样品后,再测定空白溶剂以考察残留效应。结果表明,本方法的残留效应很小,不影响 CBZ 和内标的测定,符合生物样品定量分析指导原则的要求<sup>[1-3]</sup>。

2.4.4 准确度与精密度试验 分别配制 CBZ 定量下限质量浓度(5 ng/ml)的血浆样品和高、中、低质量浓度(750、500、15 ng/ml,下同)的质控样品,按“2.3.1”项下方法处理后,连续测定 4 d,每质量浓度取 5 样本分析,根据当日标准曲线计算各样品的实测质量浓度计算 RE 和 RSD,  $RE(\%) = (\text{实测质量浓度} - \text{理论质量浓度}) / \text{理论质量浓度} \times 100\%$ 、 $RSD(\%) = \text{实测质量浓度标准偏差} / \text{实测质量浓度平均值} \times 100\%$ ,分别考察方法的准确度与

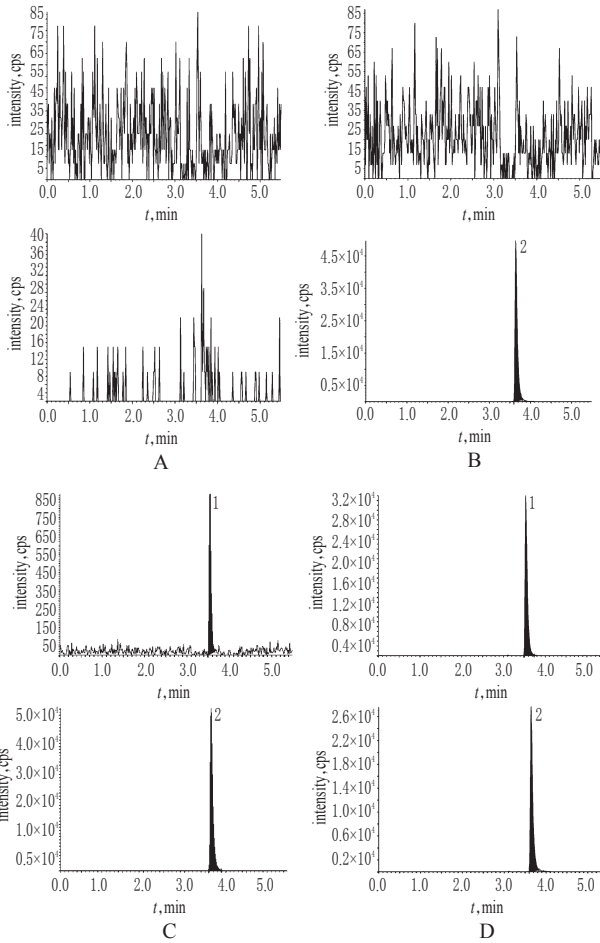


图2 典型色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+内标;C.空白血浆+CBZ(5 ng/ml)+内标;D.室间质评样品;1.CBZ;2.内标

Fig 2 Representative chromatograms

A.blank plasma; B.blank plasma + internal standard; C.blank plasma + CBZ (5 ng/ml) + internal standard; D.external quality assessment sample; 1.CBZ; 2.internal standard

表1 回归方程

Tab 1 Regression equation

批次	回归方程	r
1	$y=0.002\ 88x+0.000\ 610$	0.999 8
2	$y=0.002\ 73x+0.000\ 652$	0.998 8
3	$y=0.002\ 80x+0.000\ 769$	0.998 9
4	$y=0.002\ 47x+0.001\ 910$	0.998 9

精密度。结果显示,各样品的RE为-6.93%~0.32%,日内、日间RSD为1.00%~6.42%,表明本方法准确度、精密度良好<sup>[2-3]</sup>。准确度与精密度试验结果见表2。

表2 准确度与精密度试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 2 Results of accuracy and precision tests( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

批次	理论质量浓度,ng/ml	实测质量浓度,ng/ml	RE,%	RSD,%
日内	5	4.98±0.32	-0.43	6.42
	15	15.05±0.74	0.32	4.62
	500	490.17±19.23	-1.95	3.89
	750	712.83±17.52	-4.97	2.30
日间	5	4.68±0.08	-6.93	5.37
	15	14.78±0.38	-1.69	4.64
	500	491.50±5.50	-2.27	1.00
	750	724.04±12.13	-3.66	1.02

2.4.5 稀释效应 CBZ血药浓度的个体差异较大,有必要考察方法的稀释效应以扩大检测范围。本试验考察了稀释10倍和100倍的稀释效应。取空白血浆100 μl,加入乙腈300 μl,涡旋混匀30 s,12 000×g离心2 min,取上清液200 μl,加入乙腈1 800 μl,涡旋混匀30 s,12 000×g离心2 min,其上清液即为沉淀后的基质。将质量浓度分别为75 000、7 500 ng/ml的CBZ标准工作液用沉淀后的基质稀释至质量浓度为750 ng/ml后,按“2.3.1”项下方法处理,进样测定。稀释10倍及100倍的血浆样品的RE分别为-7.88%、-9.12%,RSD分别为5.82%、4.79%,均在±15%范围内,表明稀释10倍和100倍并不影响测定方法的准确度与精密度<sup>[2-3]</sup>。

2.4.6 基质效应和提取回收率试验 分别用空白溶剂和沉淀后的基质配制高、中、低质量浓度的质控样品,基质效应(%)=沉淀后基质配制的样品的峰面积/空白溶剂配制的样品的峰面积×100%,内标归一化的基质效应(%)=CBZ的基质效应/内标的基质效应×100%。按“2.3.1”项下方法分别用血浆和沉淀后的基质配制高、中、低质量浓度的质控样品,提取回收率(%)=血浆配制的样品的峰面积/沉淀后基质配制的样品的峰面积×100%,内标归一化的回收率(%)=CBZ的回收率/内标的回收率×100%。结果表明,本方法的基质效应较小,回收率稳定,不影响待测物和内标的测定<sup>[2-3]</sup>。基质效应和提取回收率试验结果见表3。

表3 基质效应和提取回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Results of matrix effect and recovery tests( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

待测物	理论质量浓度,ng/ml	基质效应,%	内标归一化的基质效应,%	提取回收率,%	内标归一化的回收率,%
CBZ	15	97.36±3.52	97.28±5.66	86.85±2.46	95.99±3.41
	500	107.86±4.04	100.72±6.71	95.03±4.46	101.74±2.73
	750	107.33±3.04	99.11±2.63	93.41±2.81	98.34±8.52
内标	110	107.39±7.10		93.40±3.41	

2.4.7 稳定性考察 分别配制高、中、低质量浓度的质控样品,考察室温(22 ℃)放置24 h、冻融循环3次(-80 ℃~22 ℃)和冷冻(-80 ℃)放置18 d的稳定性。结果显示,各样品的RE均在±15%范围内,RSD<10%,表明CBZ在上述条件下稳定。稳定性试验结果见表4。

表4 稳定性试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 4 Results of stability tests( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

测试条件	理论质量浓度,ng/ml	实测质量浓度,ng/ml	RE,%	RSD,%
室温放置24 h	15	15.30±1.08	1.85	7.10
	500	495.33±23.84	-1.08	4.65
	750	719.83±39.14	-3.95	5.34
冻融循环3次	15	14.93±0.530	-0.42	3.46
	500	483.33±25.67	-3.45	5.02
	750	727.67±45.28	-2.93	6.12
冷冻放置18 d	15	13.85±0.180	-8.50	2.21
	500	497.17±13.33	-2.61	5.88
	750	735.83±38.66	-2.77	5.37

## 2.5 室间质评样品的测定

药理学实验室生物样本检测室间质评样品共5个,按“2.3.2”项下方法处理,进样分析,其前后随行测定高、中、低质量浓度和定量下限质量浓度(每质量浓度取2样本分析,共8

个)质控样品。按当日标准曲线计算CBZ实测质量浓度,上报国家卫生计生委临床检验中心。质评结果表明,所有质评样品的测定结果均在允许范围内,通过率为100%。5个室间质评样品的测定结果见表5。

表5 5个室间质评样品的测定结果

Tab 5 Results of 5 samples external quality assessment

样本编号	测定结果,ng/ml	靶值,ng/ml	RE, %	允许范围,ng/ml	评价结果
201411	679.0	764.8	-11.22	611.8~917.8	通过
201412	475.0	520.1	-8.67	416.1~624.1	通过
201413	104.0	114.9	-9.49	91.9~137.9	通过
201414	29.2	32.6	-10.43	26.1~39.1	通过
201415	26.2	27.6	-5.07	22.1~33.1	通过

### 3 讨论

本试验建立的测定人血浆中CBZ质量浓度的LC-MS/MS法,样品采用一步沉淀法去除蛋白,具有简便、经济、快速等特点,适用于大样本的药动学研究;经考察,本方法专属性良好,不受内源性物质的干扰,且几乎没有残留效应;CBZ血药浓度在5~1 000 ng/ml范围内线性关系良好, $r>0.998$ ;各质控样品的RE均在 $\pm 15\%$ 范围内,日内、日间RSD均 $<15\%$ ,表明方法准确度、精密度良好;本方法几乎没有基质效应,各质控样品的回收率较为稳定;10、100倍的稀释倍数不影响待测物检测的准确性,可满足CBZ药动学研究的要求;稳定性试验结果表明,CBZ在室温放置、冷冻放置、冻融循环3次等条件下均稳定。将本血药浓度测定方法应用于首届药动学实验室生物样品检测室间质评样品的分析,各样品实测质量浓度均在允许范围内,其评价结果的通过率为100%。

CBZ作为一线抗癫痫用药,临床用量大,有效血药浓度范围为4~12 mg/ml<sup>[7]</sup>。而本次室间质评样品CBZ的质量浓度范围为5~1 000 ng/ml,可选方法包括液相色谱法(LC)、液质联用(LC-MS)法和LC-MS/MS法等。目前,文献报道的CBZ血药浓度测定方法主要为高效液相色谱(HPLC)法和LC-MS法。其中,HPLC法的定量下限为1 000 ng/ml,LC-MS法的定量下限为2 000 ng/ml<sup>[8-12]</sup>,而本试验所建立的LC-MS/MS法的定量下限为5 ng/ml,更接近于室间质评样品的质量浓度范围<sup>[11-13]</sup>,因此,本实验室选用LC-MS/MS法进行室间质评。虽然质评样品评价结果全部通过,但从结果可知,实测质量浓度均偏小,提示本方法可能存在系统偏差,可能是由于CBZ室间质控样品开封后存放时间较长吸潮所致。同时,评价结果还提示,高浓度样品的偏差较低浓度样品大,这可能是因为线性回归时采用了加权回归法(加权因子为 $1/x^2$ ),使方法更偏重于低浓度所致<sup>[14]</sup>。

综上所述,本试验建立并验证了测定人血浆中CBZ质量浓度的LC-MS/MS法,可应用于CBZ的室间质评。

### 参考文献

- [1] 钟大放,李高,刘昌孝.生物样品定量分析方法指导原则:草案[J].药物评价研究,2011,34(6):409.
- [2] US. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), et al. Guidance for industry: bioanalytical method validation[EB/OL]. [2015-02-21]. <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugsgen/documents/document/ucm368107.pdf>.
- [3] European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use[EB/OL]. [2015-02-05]. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- [4] 姚轶敏.室间质评在ISO15189医学实验室认可评审中的作用[J].中医药管理杂志,2014,22(2):276.
- [5] 徐建玲.室内质控和室间质评在临床微生物检验中的作用探讨[J].中国实用医药,2014,9(17):261.
- [6] 闫颖,张顺利,钟堃,等.2010—2012年度治疗药物监测室间质评结果分析[J].中国药物警戒,2013,10(12):755.
- [7] 鞠永静.1 692例抗癫痫药物血药浓度监测结果与分析[J].药品评价,2014,11(18):33.
- [8] 胡伟,马爱玲,刘宣彤,等.RP-HPLC法同时测定人血清中4种抗癫痫药的浓度[J].中国现代药物应用,2015,9(4):234.
- [9] 付成效,毕津莲,李湘斌,等.单步萃取-HPLC法同时测定人血清中3种抗癫痫药浓度[J].中国药房,2011,22(2):139.
- [10] 曲素欣,陈湛芳.液质联用法监测癫痫患儿卡马西平血药浓度及结果分析[J].中国医学创新,2014,11(26):101.
- [11] 陈凯云,骆利平,谢文毅,等.高效液相色谱-质谱串联法同时测定人血清中拉莫三嗪及卡马西平的含量[J].中国医院用药评价与分析,2012,12(12):1 108.
- [12] 陆川,张梦琪,茅晓寅,等.LC-MS/MS法同时测定人血清中卡马西平和拉莫三嗪浓度[J].中国药房,2011,22(6):514.
- [13] 时欣欣,徐红蓉,储楠楠,等.LC-MS/MS法测定人血浆中卡马西平的浓度[J].中国临床药理学杂志,2015,24(3):158.
- [14] 钟大放.以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J].药物分析杂志,1996,16(5):343.

(收稿日期:2015-09-19 修回日期:2016-01-04)

(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅