

LC-MS/MS法测定人血浆中加巴喷丁的浓度^Δ

许萌*,周春华#,张雪宁,亢泽坤(河北医科大学第二医院药学部,石家庄 050000)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)32-4496-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.32.08

摘要 目的:建立测定人血浆中加巴喷丁(GBP)浓度的方法。方法:血浆样品经甲醇沉淀蛋白后,以磺胺甲噁唑为内标,采用液相色谱-串联质谱法测定。色谱柱为 Diamonsil C₁₈,流动相为水(含0.05%甲酸)-甲醇,梯度洗脱,流速为1 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为20 μL。采用电喷雾离子源,以多反应监测进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为 m/z 172.0→154.1(GBP)、 m/z 279.0→124.0(内标)。结果:GBP血药浓度在13.4~10 720.4 ng/mL范围内线性关系良好($r=0.992\ 3$, $n=5$),定量下限为13.4 ng/mL,最低检测限为4.0 mg/mL;日内、日间RSD均小于10%,相对误差为-4.93%~5.10%;提取回收率为86.2%~90.3%($RSD<5\%$, $n=6$),基质效应为87.6%~92.1%。采用该法测得10例癫痫患者体内GBP的血药浓度为2 075.19~4 078.87 ng/mL($n=20$)。结论:本方法灵敏度高、专属性好、适用性强,可用于癫痫患者体内GBP的血药浓度监测及药动学研究。

关键词 加巴喷丁;液相色谱-串联质谱;血药浓度;癫痫患者

Determination of the Concentration of Gabapentin in Human Plasma by LC-MS/MS

XU Meng, ZHOU Chunhua, ZHANG Xuening, KANG Zekun (Dept. of Pharmacy, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of gabapentin (GBP) in human plasma. METHODS: After precipitated by methanol, using sulfamethoxazole as internal standard, LC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of water (containing 0.05% formic acid)-methanol using a gradient elution program at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature 30 ℃, and sample size was 20 μL. The ESI was equipped and quantitative analysis was operated in positive ion and MRM mode. The mass transition ion-pairs were followed as m/z 172.0→154.1(GBP) and m/z 279.0→124.0 (internal standard). RESULTS: The linear range of GBP was 13.4-10 720.4 ng/mL ($r=0.992\ 3$, $n=5$). The limit of quantitation was 13.4 ng/mL, and the minimum detection limit was 4.0 ng/mL. RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 10%. Relative errors ranged -4.93%-5.10%. The recoveries ranged 86.2%-90.3% ($RSD<5\%$, $n=6$), and matrix effects ranged 87.6%-92.1%. The plasma concentration of GBP in 10 epileptic patients ranged 2 075.19-4 078.87 ng/mL ($n=20$). CONCLUSIONS: The method is proved to be sensitive, specific, practical and suitable for plasma concentration monitoring and pharmacokinetic study of GBP in epileptic patients.

KEYWORDS Gabapentin; LC-MS/MS; Plasma concentration; Epileptic patients

癫痫是大脑神经元突发性异常放电导致短暂大脑功能障碍的一种慢性疾病,也是我国神经系统疾病中仅次于脑血管疾病的第二大顽症^[1]。加巴喷丁(Gabapentin, GBP)是新一代抗癫痫药,对脑组织具有较高的亲和力。与其他抗癫痫药相比,GBP副作用小,可用于常规抗癫痫药不能有效控制或不能耐受的局限性发作患者,以及局限性发作并继发全身性癫痫患者的附加治疗^[2]。由于GBP的药动学特征存在个体差异,药物剂量与中毒等不良反应关系密切,且中毒症状与疾病症状不易区分^[3],因此GBP血药浓度监测对保证患者临床用药安全具有重要意义。目前,GBP药物浓度的测定方法主要包括高

效液相色谱(HPLC)法、毛细管电泳-激光诱导荧光检测法、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法、高效液相色谱-荧光检测法等,但均存在样品前处理过程烦琐、耗时长等缺点^[4-7]。本研究在已有文献的基础上,建立了一种快速检测人血浆中GBP浓度的LC-MS/MS法,并将其应用于临床,以期对GBP的临床研究及合理使用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪(配有在线脱气机、四元泵、自动进样器,美国Agilent公司);QTrap™ 3200型三重四级杆线性离子阱质谱仪[配有电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI)];Analyst 1.5.2数据处理系统(美国AB公司);TGL-16B型离心机(上海安亭科学仪器厂);MTN-2800D型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);XH-C型旋涡混合器(金坛市国旺实验仪器厂);GT-1860QTS型超声波清洗仪(广东固特超声股份有限

^Δ基金项目:河北省医学科学研究重点课题计划项目(No.20120082)

*药师,硕士。研究方向:药物的质量研究与控制。电话:0311-66007385。E-mail:xumeng0622@126.com

#通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药物分析、临床药学。电话:0311-66007385。E-mail:zhouchunhua80@126.com

公司)。

1.2 药品与试剂

GBP对照品(上海士锋生物技术有限公司,批号:EB02064,纯度:99%);磺胺甲噁唑对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:100025-3200904,纯度:99.6%);加巴喷丁胶囊(江苏恒瑞医药股份有限公司,批准文号:国药准字H20030662,批号:20151102,规格:0.1 g);甲醇、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。空白血浆由河北医科大学第二医院健康受试者提供。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相:水(A相,含0.05%甲酸,pH=3.6)-甲醇(B相),梯度洗脱(0~3 min, 95% B; >3~3.1 min, 95%→20% B; >3.1~13 min, 20% B,进样前按流动相初始条件平衡6 min);流速:1 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

ESI,以多反应监测(MRM)模式扫描,正离子方式检测;喷射电压(IS):5 500 V;离子源温度:650 ℃;雾化气(GS1, N₂)压力:413.70 kPa;辅助气(GS2, N₂)压力:448.18 kPa;气帘气(N₂)压力:206.85 kPa。用于定量分析的离子对分别为 m/z 172.0→154.1[GBP,解簇电压(DP):40 V,碰撞能(CE):17 eV]、 m/z 279.0→124.0(内标,DP:30 V,CE:21 eV)。

2.2 溶液的制备

精密称取GBP对照品适量,置5 mL量瓶中,加入适量甲醇,超声(频率:40 kHz)1 min使溶解,并用50%甲醇定容,配制质量浓度为1 072 μg/mL的对照品贮备液。取上述贮备液适量,用50%甲醇稀释,得质量浓度分别为0.268、1.07、8.58、17.2、21.4、42.8、107.2、214.4 μg/mL的系列标准溶液;同法制备低、中、高质量浓度(0.67、21.4、160.8 μg/mL)的对照品溶液,用于质控(QC)样品的制备。

精密称取内标对照品适量,置2 mL量瓶中,加入适量甲醇,超声(频率:40 kHz)1 min使溶解,并用50%甲醇定容,配制质量浓度为1 035.0 μg/mL的内标贮备液。取上述贮备液适量,用50%甲醇稀释,得质量浓度为20.7 μg/mL的内标溶液。

上述所有溶液均置于4 ℃冰箱中保存,备用。

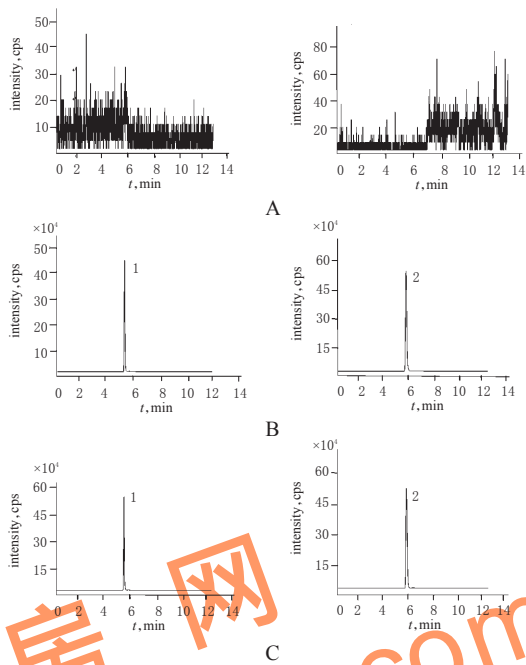
2.3 血浆样品处理

取血浆样品100 μL,置1.5 mL离心管中,精密加入甲醇和内标溶液各5 μL,涡旋混匀15 s,加入甲醇290 μL沉淀蛋白,涡旋混匀1 min,以离心半径10 cm、转速15 000 r/min离心10 min,取上清液,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 在“2.1”项色谱与质谱条件下,取空白血浆、空白血浆+GBP+内标、患者用药后的血浆样品+内标,除不加内标外,其余均按“2.3”项下方法处理,进样

分析,考察方法的专属性。结果显示,在“2.1”项色谱与质谱条件下,GBP和内标的色谱峰峰形良好,保留时间分别为5.69、5.95 min,血浆中的内源性物质不干扰待测物的测定,表明该方法专属性良好。典型色谱图见图1。



A.空白血浆;B.空白血浆+GBP+内标;C.患者用药后的血浆样品+内标;1.GBP;2.内标

A. blank plasma; B. blank plasma+GBP+internal standard; C. plasma sample after medication+internal standard; 1. GBP; 2. internal standard

图1 典型色谱图

Fig 1 Representative MRM chromatograms

2.4.2 标准曲线的绘制、定量下限和最低检测限的考察

精密量取“2.2”项下系列标准溶液及内标溶液各适量,加入至空白血浆100 μL中,得GBP质量浓度分别为13.4、53.6、428.8、857.6、1 072.0、2 144.1、5 360.2、10 720.4 ng/mL的血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样分析,记录色谱图。以待测物血药浓度为横坐标(x)、待测物与内标的峰面积比值为纵坐标(y),采用加权最小二乘法($w=1/x^2$)进行线性回归,得回归方程为 $y=0.070 1 \times 10^{-3}x+0.021 3$ ($r=0.992 3, n=5$),表明其血药浓度在13.4~10 720.4 ng/mL范围内线性关系良好,定量下限为13.4 ng/mL,最低检测限为4.0 ng/mL。

2.4.3 精密性与准确度试验 参照《化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则》^[8],精密量取“2.2”项下低、中、高质量浓度对照品溶液各适量,加至空白血浆100 μL中,配制成低、中、高质量浓度(33.5、1 072.0、8 040.0 ng/mL)的QC样品,同时制备定量下限质量浓度(13.4 ng/mL)的血浆样品,每质量浓度取6样本分析,连续测定3 d,按当日随行标准曲线计算各样品的实测质量浓度,考察精密度和准确度,其中精密密度以相对标准偏差(RSD)表示,准确度以相对误差(RE)表示。结果显示,各样品日内、日间RSD均小于10%,RE为-4.93%~5.10%。精密性与准确度试验结

果见表1。

表1 精密度与准确度试验结果

Tab 1 Results of precision and accuracy tests

理论质量浓度, ng/mL	日内精密度($n=6$)		日间精密度($n=3$)		RE, %
	实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$), ng/mL	RSD, %	实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$), ng/mL	RSD, %	
13.4	13.36 ± 0.45	7.5	13.44 ± 0.59	8.0	5.10
33.50	34.79 ± 3.73	6.4	33.05 ± 2.50	7.6	-4.93
1 072.0	1 078.33 ± 43.03	4.0	1 086.02 ± 31.96	2.9	-2.13
8 040.0	7 794.65 ± 443.38	5.7	8 095.68 ± 383.42	4.7	4.66

2.4.4 基质效应和提取回收率考察 取空白血浆 100 μ L, 置 1.5 mL 离心管中, 加入甲醇 200 μ L, 涡旋混匀 15 s, 以离心半径 10 cm、转速 15 000 r/min 离心 10 min, 分离上清液, 吹干; 在残渣中分别加入 GBP 低、中、高质量浓度对照品溶液及内标溶液各适量, 加入甲醇 290 μ L, 涡旋混匀 1 min, 取上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后, 取续滤液进样分析, 记录峰面积(B)。以水代替空白血浆进行上述操作, 进样分析, 记录峰面积(A)。取当日低、中、高质量浓度的 QC 样品, 按“2.3”项下方法处理后, 进样分析, 记录峰面积(C)。每质量浓度取 6 样本分析, 基质效应 = $B/A \times 100\%$, 提取回收率 = $C/B \times 100\%$ 。基质效应考察低、高质量浓度 (33.5 和 8 040.0 ng/mL) 血浆样品, 提取回收率考察低、中、高质量浓度 (33.5、1 072.0、8 040.0 ng/mL) 血浆样品。结果表明, 提取回收率分别为 90.3%、86.2%、89.9%, 内标的提取回收率为 91.2%, RSD 为 2.0%~4.3% ($n=6$); 基质效应为 87.6%、92.1%, 内标的基质效应为 90.4%, 表明在“2.1”项色谱与质谱条件下, 可忽略基质效应的影响^[9]。

2.4.5 稳定性试验 精密量取“2.2”项下低、中、高质量浓度对照品溶液各适量, 加至空白血浆 100 μ L 中, 配制低、中、高质量浓度 (33.5、1 072.0、8 040.0 ng/mL) 的 QC 样品各 3 份。分别考察室温下放置 4 h、-20 $^{\circ}$ C 放置 40 h、-20 $^{\circ}$ C 至室温反复冻融 3 次、-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存 60 d 的稳定性。结果显示, 各 QC 样品在上述条件下均稳定, RSD < 10% ($n=3$)。

2.5 临床应用

经医院医学伦理委员会审核通过后, GBP 血药浓度测定在河北医科大学第二医院进行。采用简单随机抽样法选取 2016 年 2—4 月我院服用 GBP 治疗的门诊癫痫患者 10 例, 年龄 18~50 岁, 均为原发性癫痫 (诊断符合国际抗癫痫联盟 2001 年制定的癫痫和癫痫综合征的诊断及分类标准^[10])。所有患者按药品说明书口服 GBP 胶囊: 第 1 天晚上给药 0.3 g; 第 2 天为每日 2 次, 每次 0.3 g; 从第 3 天开始, 每日 3 次, 每次 0.3 g。于第 5 天晨起服药前抽取静脉血 5 mL (参考药品说明书, 其消除半衰期为 5~7 h, 此时血药浓度已达稳态), 置肝素离心管中, 于 4 $^{\circ}$ C 下, 以离心半径 10 cm、转速 15 000 r/min 离心 10 min, 取上层血浆于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 待测。

采用上述 LC-MS/MS 法测定各患者体内 GBP 的血药浓度, 每例患者平行测定 2 次。结果显示, 10 例患者

体内 GBP 的血药浓度为 2 075.19~4 078.87 ng/mL ($n=20$), 详见表 2。

表2 患者临床资料和 GBP 血药浓度检测结果

Tab 2 Clinical data of patients and results of plasma concentration determination of GBP

序号	年龄, 岁	体质量, kg	性别	血药浓度, ng/mL
1	27	53	女	3 808.16
2	21	57	男	3 175.65
3	36	60	男	3 590.23
4	37	59	男	3 198.08
5	23	59	男	3 207.32
6	18	51	女	2 075.19
7	18	63	男	3 717.89
8	41	58	女	4 078.87
9	32	66	男	3 176.26
10	42	66	男	3 200.15

3 讨论

色谱条件是实现待测物良好分离效果的前提。本研究采用 Diamonsil C₁₈ 反相色谱柱, 并于前期试验结果发现, 以甲醇作为有机相时, 待测物色谱峰峰形优于乙腈。在流动相中加入甲酸, 可提高待测物的离子化效率, 改善其色谱峰峰形, 同时还可提高检测灵敏度。因此, 本课题组前期试验考察了不同浓度甲酸 (0.1%、0.5%、0.01%、0.05%) 对待测物色谱行为的影响。结果显示, 流动相中加入 0.05% 甲酸可以达到改善峰形、提高灵敏度的目的, 故最终确定水 (含 0.05% 甲酸)-甲醇作为流动相。

由于 GBP 极性较大, 没有合适的萃取溶剂可将其从血浆中萃取出来, 且固相萃取法成本较高; 同时, 由于 GBP 无紫外吸收, 也不会发射荧光, 若直接采用 HPLC 法测定则难度较大, 且样品需经过衍生化处理, 操作复杂^[7]; 国外有文献报道, 采用 LC-MS/MS 法测定人血清中 GBP 的含量, 采用液-液萃取法进行样品预处理, 需要用氮气吹干, 过程烦琐且耗时^[11]。本研究在已有文献的基础上建立了新的 LC-MS/MS 法, 样品处理采用简单、快速、易操作的蛋白沉淀法。前期试验分别考察了甲醇和乙腈作为沉淀试剂对待测物血药浓度测定的影响。结果显示, 以甲醇作为沉淀试剂时, GBP 的响应值较高, 并且与流动相的有机相一致, 因此将沉淀试剂选定为甲醇。

癫痫是神经科常见的慢性临床综合征, 其药物治疗仍有诸多问题亟待解决^[12-13]。抗癫痫药主要包括传统的一线药物和新型抗癫痫药两大类。其中, 传统的抗癫痫药不良反应较多, 而新型抗癫痫药 (如 GBP) 以其不良反应少、妊娠期患者耐受性好等优点一直受到广大医务工作者的关注^[14]。本研究采用 LC-MS/MS 法测定我院 10 例癫痫患者体内 GBP 的浓度。结果显示, 这 10 例患者的血药浓度均在有效治疗浓度范围 (有效治疗浓度一般为 2 000~7 000 ng/mL^[3]) 内。但在治疗过程中, 笔者发现有 1 例患者出现明显的嗜睡, 有 2 例出现恶心及胃肠不适等不良反应。GBP 胶囊的不良反应该大多与剂量相关, 且常见于用药早期^[3]。因此, 为理想地控制癫痫发

高效液相色谱法测定人血浆中伏立康唑的浓度^Δ

李学娟^{1*}, 刘四喜², 陈泽彬^{1#a}, 魏红¹, 杨卫国^{3#b}, 温鹏强⁴(1. 深圳市儿童医院药剂科, 广东深圳 518038; 2. 深圳市儿童医院血液科, 广东深圳 518038; 3. 深圳市儿童医院重症医学科, 广东深圳 518038; 4. 深圳市儿童医院儿科研究所, 广东深圳 518038)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)32-4499-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.32.09

摘要 目的: 建立测定人血浆中伏立康唑浓度的方法。方法: 血浆样品经乙腈沉淀蛋白后, 以酮康唑为内标, 采用高效液相色谱法测定。色谱柱为 Dionex U-3000 Dimonsil C₁₈, 流动相为三乙胺-冰醋酸-水混合溶液(1:1:98, V/V/V, pH 约为 4.0)-乙腈(40:60, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 255 nm, 柱温为 40 ℃, 进样量为 20 μL。结果: 伏立康唑血药浓度在 0.2~20.0 μg/mL 范围内线性关系良好, 定量下限为 0.2 μg/mL, 最低检测限为 0.03 μg/mL; 日内、日间 RSD 均小于 10%; 方法回收率为 92.06%~106.26% (RSD<5%, n=5), 提取回收率为 75.62%~90.59% (RSD<5%, n=5)。采用该法测得 10 例患儿体内伏立康唑的血药浓度为 0.22~4.90 μg/mL (n=10)。结论: 该方法简单、快速、专属性强, 可用于伏立康唑治疗药物监测。

关键词 伏立康唑; 血药浓度; 高效液相色谱法

Determination of Voriconazole in Human Plasma by HPLC

LI Xuejuan¹, LIU Sixi², CHEN Zebin¹, WEI Hong¹, YANG Weiguo³, WEN Pengqiang⁴(1. Dept. of Pharmacy, Shenzhen Children's Hospital, Guangdong Shenzhen 518038, China; 2. Dept. of Hematology, Shenzhen Children's Hospital, Guangdong Shenzhen 518038, China; 3. Dept. of Pediatric Intensive Care, Shenzhen Children's Hospital, Guangdong Shenzhen 518038, China; 4. Institute of Pediatrics, Shenzhen Children's Hospital, Guangdong Shenzhen 518038, China)

作, 同时最大限度地减少不良反应, 建议临床在治疗时, 应从小剂量开始, 缓慢地增加剂量至完全控制发作^[9]。

本文建立了测定人血浆中 GBP 的 LC-MS/MS 法, 该方法分析灵敏度高、专属性好、适用性强, 具有良好的精密性及准确度, 可用于临床血药浓度的监测及药动学的研究。将该方法应用于临床癫痫患者的血药浓度监测, 有助于临床及时发现治疗中存在的问题, 开展个体化治疗, 保障患者用药的安全、有效。

参考文献

- [1] 童晓欣, 童萼堂. 抗癫痫药的发展史与新型抗癫痫药[J]. 医药导报, 2007, 26(2): 111-115.
- [2] 袁敏, 徐丽君, 肖志龙, 等. 加巴喷丁对比卡马西平治疗三叉神经痛疗效与安全性的系统评价[J]. 中国药房, 2014, 25(40): 3795-3799.
- [3] 陈宝泉, 刘肖英, 李彩文. 新型抗癫痫药加巴喷丁[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(11): 900-902.
- [4] 董莉, 窦佳, 王书玉, 等. HPLC 法测定加巴喷丁胶囊的含量及有关物质[J]. 中国药师, 2015, 18(3): 520-522.
- [5] 蔡元丽, 杨甲甲, 王宇飞, 等. 毛细管电泳-激光诱导荧光检测法测定抗癫痫药加巴喷丁[J]. 色谱, 2010, 28

(12): 1179-1184.

- [6] 熊志立, 俞嘉, 何积芬, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中加巴喷丁的浓度及其药动学研究[J]. 药学学报, 2011, 46(10): 1246-1250.
- [7] 汪震, 刘东, 龚培力, 等. 高效液相色谱荧光检测法测定血浆加巴喷丁含量[J]. 中国药师, 2005, 8(8): 676-678.
- [8] 国家食品药品监督管理局. 化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则[S]. 2015-03-08.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 363-368.
- [10] Engel J Jr, International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE task force on classification and terminology[J]. *Epilepsia*, 2001, 42(6): 796-803.
- [11] Carlsson KC, Reubsæet JL. Sample preparation and determination of gabapentin in venous and capillary blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 34(2): 415-423.
- [12] 宋红伟, 李晓丽, 李世学. 动态脑电图在 60 例癫痫患者诊断中的应用分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(5): 90-91.
- [13] 范磊, 陈海燕. 472 例癫痫患儿用药情况调查与分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(6): 103-104.
- [14] 刘砚韬, 张伶俐, 黄亮, 等. 新型抗癫痫药物治疗儿童癫痫的研究进展[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志: 电子版, 2014, 10(1): 90-95.

Δ 基金项目: 深圳市卫生计生系统科研项目(No.201402053)

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 临床药学。电话: 0755-83008256。E-mail: xuejuanli@126.com

通信作者 a: 主任药师, 硕士。研究方向: 医院药事管理、临床药学。电话: 0755-83008225。E-mail: 13602602625@126.com

通信作者 b: 主任医师, 硕士。研究方向: 儿科危重症。电话: 0755-83008193。E-mail: replicater@163.com

(收稿日期: 2016-12-12 修回日期: 2017-08-18)

(编辑: 张元媛)