

HPLC – MS/MS 法同时测定三种抗癫痫药及其活性代谢物的血清浓度

Simultaneous determination of three antiepileptic drugs and one active metabolite in human serum by HPLC – MS/MS

付胜楠¹, 张家欣², 刘 昀³,
林晓纯¹, 裴旭哲⁴, 倪穗琴¹

(1. 广州市第一人民医院 药学部, 广东 广州 510180; 2. 广东药科大学 药学院, 广东 广州 510006; 3. 广州市老年医院 药学中心, 广东 广州 510550; 4. 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司, 上海 200050)

FU Sheng – nan¹, ZHANG Jia – xin²,
LIU Yun³, LIN Xiao – chun¹,
PEI Xu – zhe⁴, NI Sui – qin¹

(1. Department of Pharmacy, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180, Guangdong Province, China; 2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; 3. Pharmacy Center, Guangzhou Geriatric Hospital, Guangzhou 510550, Guangdong Province, China; 4. Shanghai AB Sciex Analytical Instrument Trading Co., Ltd., Shanghai 200050, China)

作者简介: 付胜楠(1988 –), 女, 副主任药师, 主要从事个体化用药方面的工作和研究

通信作者: 倪穗琴, 主任药师, 硕士生导师
Tel: (020) 81048106
E – mail: ywjd510@126.com

摘要:目的 建立高效液相色谱 – 串联质谱 (HPLC – MS/MS) 法同时检测拉莫三嗪 (LTG)、左乙拉西坦 (LEV)、奥卡西平 (OXC) 及其活性代谢物 10,11 – 二氢 – 10 – 羟基卡马西平 (MHD) 的血清浓度。方法 该方法用简单的一步蛋白沉淀法对血清样品预处理, 以 2 种抗癫痫药的稳定氘代化合物 (OXC – D4、LEV – D6) 为内标, 用 Phenomenex C₁₈ (100.0 mm × 4.6 mm, 3.0 μm) 色谱柱分离; 以含 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液 (A) – 甲醇 (B) 为流动相, 梯度洗脱 6 min, 流速 0.6 mL · min⁻¹; 柱温 40 °C; 用电喷雾离子源, 多反应监测模式进行正离子扫描分析。考察该方法的专属性、标准曲线与定量下限、精密度与回收率、基质效应和稳定性。以本院就诊的使用 LRG、LEV 或 OXC 治疗的患者纳入为研究对象, 于血药浓度达到稳态后采集血样并使用本研究开发的方法对血清浓度进行检测。结果 该方法专属性好, LTG、LEV、OXC 和 MHD 在 (0.20 ~ 25.00)、(0.39 ~ 50.00)、(0.04 ~ 5.00) 和 (0.31 ~ 40.00) μg · mL⁻¹ 范围内线性良好, LTG 的线性方程为 $y = 0.99x + 0.02$ ($r = 0.9992$), LEV 的线性方程为 $y = 0.55x + 0.01$ ($r = 0.9994$), OXC 的线性方程为 $y = 4.35x + 0.04$ ($r = 0.9989$), MHD 的线性方程为 $y = 0.56x + 0.01$ ($r = 0.9987$)。定量下限分别为 0.20、0.39、0.04 和 0.31 μg · mL⁻¹, 批内、批间的精密度与准确度良好, 相对误差 (RE) 和相对标准偏差 (RSD) 均 < 15.00%, 提取回收率为 88.56% ~ 112.18%, 无明显的基质效应和残留效应。LTG、LEV、OXC 和 MHD 血清样品在 -20 °C 放置 14 d、反复冻融 3 次 (-20 °C ~ 室温)、室温 3 h 和处理后置于进样器 (4 °C) 24 h 的条件下可保持稳定, RSD 均 ≤ 10.72%。145 例临床样本的分析显示线性范围能够满足临床需求。结论 本研究成功建立了一种可同时定量分析 LTG、LEV、OXC 和 MHD 血药浓度的 HPLC – MS/MS 法, 该方法简单、经济、准确、高效。

关键词: 拉莫三嗪; 左乙拉西坦; 奥卡西平; 10 – 羟基卡马西平; 抗癫痫药; 液相色谱 – 串联质谱法; 治疗药物监测

DOI: 10.13699/j.cnki.1001 – 6821.2025.17.018

中图分类号: R964 文献标志码: A

文章编号: 1001 – 6821 (2025) 17 – 2503 – 07

Abstract: Objective To establish and validate a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS) method for simultaneously determining the serum concentration of lamotrigine (LTG), levetiracetam (LEV), oxcarbazepine (OXC) and monohydroxycarbazepine (MHD), which is applied for clinical blood concentration detection. **Methods** A simple one – step precipitation method was used for the serum sample pretreatment, and stable isotopes of two antiepileptic drugs (OXC – D4, LEV – D6) as the internal

standard. The mobile phases were aqueous solution of 0.1% formic acid and 5 mM ammonium acetate(A) and methyl alcohol(B), and the gradient elution was performed at the speed of $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ for 6 min on Phenomenex C_{18} (100.0 mm $\times$ 4.6 mm, 3.0 μm). The column temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. Positive ion scan analysis was carried out in multi-reaction monitoring mode, using electrospray ion source. The specificity, standard curve and lower limit of quantification (LLOQ), accuracy and precision, extraction recovery, matrix effect and stability were evaluated. The patients treated with LRG, LEV or OXC in hospital were included as the research object. Blood samples were collected after the blood concentration reached a steady state and the serum concentration was detected by the method developed in this study. **Results** The method demonstrated good specificity. For LTG, LEV, OXC and MHD, outstanding linearity was observed in the ranges of (0.20–25.00), (0.39–50.00), (0.04–5.00), (0.31–40.00) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The linear equation of LTG was $y=0.99x+0.02$ ($r=0.9992$), LEV was $y=0.55x+0.01$ ($r=0.9994$), OXC was $y=4.35x+0.04$ ($r=0.9989$), and MHD was $y=0.56x+0.01$ ($r=0.9987$). The LLOQs were 0.20, 0.39, 0.04, 0.31 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. Acceptable accuracy as well as intra-batch and inter-batch precision were achieved; relative error (RE) and relative standard deviation (RSD) were all $<15.00\%$. The extraction recoveries reached the standard (88.56% ~ 112.18%, $\text{RSD} < 15.00\%$), without significant matrix effects and carryover effects. The serum samples of LTG, LEV, OXC, and MHD exhibited stability under the following conditions: storage at -20°C for 14 days, three freeze-thaw cycles (-20°C to room temperature), room temperature exposure for 3 hours, and post-treatment storage in the autosampler (4°C) for 24 hours, with all RSDs $\leq 10.72\%$. The analysis of 145 clinical samples showed that the linear range could meet the clinical needs. **Conclusion** This study successfully established a HPLC-MS/MS method to simultaneously quantify the serum concentration of LTG, LEV, OXC and MHD. The method is simple, economical accurate and efficient, which has promotional value.

Key words: lamotrigine; levetiracetam; oxcarbazepine; 10-hydroxycarbamazepine; antiepileptic drugs; high performance liquid chromatography tandemmass spectrometry; therapeutic drug monitoring

癫痫是一种普遍且严重的神经系统疾病,影响着全球超过7 000 万人^[1]。抗癫痫药物是治疗癫痫的主要方法,但个体差异和药物相互作用的风险要求对其进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM)^[2]。高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography tandemmass spectrometry, HPLC-MS/MS)是一种结合了色谱高分离能力和质谱高选择性、高灵敏性及高特异性为一体的先进临床检验技术^[3-4],避免了传统免疫法中的非特异性干扰,适用于同时检测多种抗癫痫药物。拉莫三嗪(lamotrigine, LTG)、左乙拉西坦(levetiracetam, LEV)、奥卡西平(oxcarbazepine, OXC)作为全面性癫痫的首选药物和局灶性癫痫的首选药物,在临床应用十分广泛^[2]。其中,OXC在体内主要转化为活性代谢物10,11-二氢-10-羟基卡马西平(monohydroxycarbamazepine, MHD)发挥抗癫痫作用^[5]。尽管OXC在体内含量低,但与MHD具有相似的抗癫痫效力^[6],且与MHD在体内存在动态平衡^[7],监测这一平衡对于理解个体代谢差异至关重要^[8]。本文建立了一种简单、经济、准确、高效的HPLC-MS/MS法,为癫痫患者的个体化治疗提供参考。

材料与方法

1 材料

药品与试剂 OXC标准品,纯度:99.80%,规格:每支100 mg,批号:100657-201102,LTG标准品,纯度:99.90%,规格:每支100 mg,批号:100775-201902,均购自中国食品药品检定研究院;MHD标准品,纯度:99.50%,规格:每支5 mg,批号:T10010F99575,购自上海源叶生物科技有限公司;LEV标准品,纯度:98.76%,规格:每支100 mg,批号:310A021,购自北京索莱宝科技有限公司;OXC-D4标准品(内标),纯度:96.00%,规格:每支1 mg,批号:6-NAV-171-1,LEV-D6标准品(内标),纯度:98.00%,规格:每支1 mg,批号:4-MGG-38-2,均购自加拿大TRC公司。

仪器 Jasper™ 高效液相色谱系统及 AB Sciex Triple Quad™ 4500MD 串联三重四级杆质谱仪,美国 AB Sciex 公司产品;CPA2250D 分析天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司产品;H1650 医用离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品;JOANLAB 7K 漩涡混合器,群安实验仪器有限公司产品。

2 检测条件、溶液配制与样品处理

本研究方法学建立和生物样本检测由广州市第

—人民医院完成。

色谱条件 色谱柱: Phenomenex C₁₈ (100.0 mm × 4.6 mm, 3.0 μm); 柱温: 40 °C; 以含 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液 (A) – 甲醇 (B) 为流动相; 梯度洗脱程序: 0 ~ 0.5 min, 60% B; 0.5 ~ 4.0 min, 60% → 98% B; 4.0 ~ 5.0 min, 98% B; 5.0 ~ 5.1 min, 98% → 60% B; 5.1 ~ 6.0 min, 60% B; 流速: 0.6 mL · min⁻¹; 进样量: 1 μL; 进样器温度: 4 °C。

质谱条件 用电喷雾离子源, 进行正离子多反应监测模式扫描; 气帘气压力 137.90 kPa; 离子源喷雾电压 5 500 V; 离子源温度 650 °C; 雾化气压力 413.69 kPa; 辅助加热器压力 413.69 kPa; 用于定量分析的离子对分别为 m/z 256.0 → 211.0 (LTG)、 m/z 171.0 → 126.2 (LEV)、 m/z 253.0 → 180.2 (OXC)、 m/z 255.0 → 194.1 (MHD)、 m/z 177.0 → 132.2 (LEV – D6)、 m/z 257.0 → 184.2 (OXC – D4), LTG、LEV、OXC、MHD、LEV – D6 和 OXC – D4 去簇电压分别为 80.00、47.00、54.85、70.00、40.80 和 54.85 V, 碰撞电压分别为 37.90、42.00、30.00、38.76、22.01 和 38.76 eV。

对照品储备液及工作溶液配制 精密称取 LTG、LEV、OXC 和 MHD 标准品, 加甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 2.50、10.00、1.00、0.50 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液。将上述对照品储备液按一定比例混合并用甲醇逐级稀释, 得到 LTG 质量浓度分别为 250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.91、1.95 μg · mL⁻¹, LEV 质量浓度分别为 500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81、3.91 μg · mL⁻¹, OXC 质量浓度分别为 50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 μg · mL⁻¹, MHD 质量浓度分别为 400.00、200.00、100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.13 μg · mL⁻¹ 的混合标准曲线工作液; 同法配制 LTG 质量浓度分别为 200.00、27.78、4.63 μg · mL⁻¹, LEV 质量浓度分别为 400.00、55.56、9.26 μg · mL⁻¹, OXC 质量浓度分别为 40.00、5.56、0.93 μg · mL⁻¹, MHD 质量浓度分别为 320.00、44.44、7.41 μg · mL⁻¹ 的混合质控工作液; 于 -20 °C 避光保存。

内标溶液配制 精密称取 LEV – D6 和 OXC – D4 各 1 mg, 加甲醇溶解, 分别制成 LEV – D6 和 OXC – D4 质量浓度均为 100 μg · mL⁻¹ 的内标储备液。取适量内标储备液, 加甲醇稀释得到上述成分质量浓度均为 10 ng · mL⁻¹ 的混合内标溶液, 于 -20 °C 避光保存。

标准曲线样品与质控样品配制 分别取不同浓度的混合工作溶液各 5 μL, 加入空白血清 (不含待测物) 45 μL, 混匀后制成 LTG 质量浓度分别为 25.00、

12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.20 μg · mL⁻¹, LEV 质量浓度分别为 50.00、25.00、12.50、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 μg · mL⁻¹, OXC 质量浓度分别为 5.00、2.50、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0.04 μg · mL⁻¹, MHD 质量浓度分别为 40.00、20.00、10.00、5.00、2.50、1.25、0.63、0.31 μg · mL⁻¹ 的标准曲线样品, 以及 LTG 质量浓度 0.20、0.46、2.78、20.00 μg · mL⁻¹, LEV 质量浓度 0.39、0.93、5.56、40.00 μg · mL⁻¹, OXC 质量浓度 0.04、0.09、0.56、4.00 μg · mL⁻¹, MHD 质量浓度 0.31、0.74、4.44、32.00 μg · mL⁻¹ 的低、中、高质量浓度血清质控样品。

血清样品处理 精密吸取 50 μL 待测血清样品, 加入 800 μL 混合内标溶液, 涡旋 1 min, 以 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取 100 μL 上清液, 加甲醇: 水 (50:50) 溶液 800 μL, 混匀后进样分析。

3 方法学考察

专属性 分别取不同来源的空白血清 6 份, 制成空白血清、空白血清 + 混合对照品溶液 (使 LTG、LEV、OXC、MHD 质量浓度分别为 0.20、0.39、0.04、0.31 μg · mL⁻¹) 和空白血清 + 内标 (LEV – D6、OXC – D4), 按“血清样品处理”方法处理后进样分析, 记录色谱图, 以考察方法专属性。

标准曲线与定量下限 (lower limit of quantification, LLOQ) 取标准曲线样品各 50 μL, 按“血清样品处理”方法处理后进样分析。分别以待测成分的质量浓度为横坐标 (x), 待测成分与对应内标的峰面积比值为纵坐标 (y) 进行线性回归分析 (权重为 $1/x^2$), 并确定 LLOQ。

精密度与回收率 按照“标准曲线样品与质控样品配制”及“血清样品处理”项下方法操作, 制备 LLOQ 和低、中、高质量浓度的血清质控样品, 每个浓度平行配制 6 份, 以随行标准曲线计算实测浓度, 比较实测浓度与理论浓度, 计算准确度, 以相对误差 (relative error, RE) 表示; 连续 3 d 重复测定, 计算批内、批间精密度, 以相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 表示。按照“标准曲线样品与质控样品配制”的方法制得低、中、高 3 个质量浓度的血清质控样品, 按“血清样品处理”项下操作后进样分析, 将待测物与内标峰面积比值记为 A 。取 6 份不同来源的空白血清, 按“血清样品处理”方法处理得空白基质, 加入低、中、高 3 种质量浓度的混合质控工作液和混合内标溶液, 使待测物及内标的质量浓度与上述血清质控样品相同, 待测物与内标峰面积比值记为 B 。提取回收率 (%) = $A/B \times 100\%$ 。

基质效应 取 6 份不同来源的空白血清, 按“血

清样品处理”方法处理得空白基质,分别加入与处理后的低、高质量浓度的质控样品浓度相当的对照品及内标进行分析,待测成分与内标峰面积比值记为 B 。另取低、高质量浓度的混合质控工作液,加甲醇制成与上述质量浓度对应的混合对照品溶液,加入等量内标,记录待测成分与内标峰面积比值为 C 。基质效应($\%$) = $B/C \times 100\%$ 。

稳定性 分别取定量下限、低、中、高浓度的血清质控样品 50 μL ,各平行 6 份,考察其 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 14 d、反复冻融 3 次($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ 室温)、室温 3 h 及按“血清样品处理”方法处理后置于进样器($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)24 h 的稳定性。

残留评估 取标准曲线样品中最高质量浓度的含药血清样品,按“血清样品处理”方法处理后进样分析,再同法测定空白血清以考察残留效应。

4 方法学应用

本研究经广州市第一人民医院伦理委员会批准(伦理批号:K-2024-061-01)。所有受试者均签署知情同意书。选取 2023 年 2 月至 2024 年 1 月在我院使用 LTG 或 LEV 或 OXC 治疗的 105 名患者的 145 个样本,年龄 5 ~ 90 岁,于血药浓度达稳态后,服药前 30 min 内使用干燥促凝管采集血样,以 $3\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,留取上清液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,待检。

结 果

1 方法学评价

专属性 LTG、LEV、OXC、MHD、LEV-D6 和 OXC-D4 色谱峰的峰形良好,保留时间分别为 1.87、2.27、4.36、4.09、2.26 和 4.34 min,内源性物质不干扰待测物和内标的测定,表明方法专属性良好,见图 1。

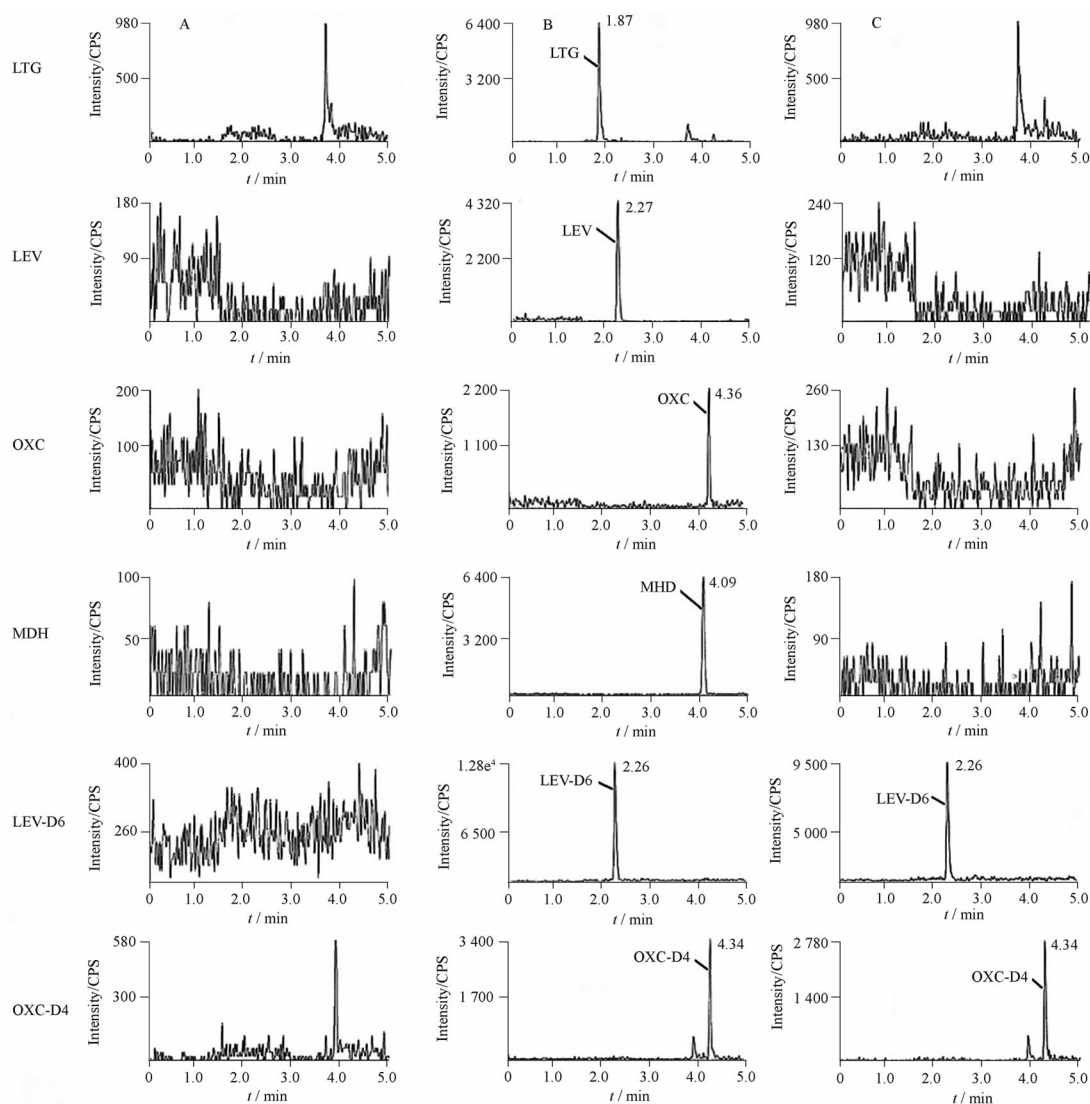


图 1 待测物和内标的典型色谱图

Figure 1 Typical chromatograms of the analytes and internal standards

A: Blank serum; B: Blank serum + analytes + internal standards; C: Blank serum + internal standards; LTG: Lamotrigine; OXC: Oxcarbazepine; LEV: Levetiracetam; MHD: Monohydro xycarbazepine.

标准曲线与定量下限 LTG(内标为LEV-D6)的线性方程为 $y = 0.99x + 0.02$ ($r = 0.999\ 2$),LEV(内标为LEV-D6)的线性方程为 $y = 0.55x + 0.01$ ($r = 0.999\ 4$),OXC(内标为OXC-D4)的线性方程为 $y = 4.35x + 0.04$ ($r = 0.998\ 9$),MHD(内标为OXC-D4)的线性方程为 $y = 0.56x + 0.01$ ($r = 0.998\ 7$),LTG、LEV、OXC和MHD分别在(0.20~25.00)、(0.39~50.00)、(0.04~5.00)和(0.31~40.00) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性良好,定量下限分别为0.20、0.39、0.04和0.31 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,可覆盖LTG、LEV和MHD的临床推荐浓度范围,即(2.5~15)、(12~46)和(3~35) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[9],同时OXC的线性范围得到显著扩展^[10-13]。

精密度与回收率 LTG、LEV、OXC和MHD的批内、批间准确度和精密度良好(RE和RSD均<15.0%),符合生物样品定量分析方法验证的相关要求^[14-15]。不同浓度各待测成分的提取回收率介于88.56%~112.18%之间。结果见表1。

基质效应 低、高质量浓度的质控样品的平均内标归一化基质效应因子介于87.23%~108.02%之间,说明基质不干扰LTG、LEV、OXC和MHD的测定,

详见表2。
稳定性 各质量浓度的血清质控样品在-20℃放置14 d、反复冻融3次(-20℃~室温)、室温3 h和处理后置于进样器(4℃)24 h的条件下,RSD均≤10.72%,说明LTG、LEV、OXC和MHD的质控样品在上述条件下可保持稳定。

表2 用液相色谱串联质谱法测定血浆中拉莫三嗪、左乙拉西坦、奥卡西平及其代谢产物质量浓度的基质效应($n = 6$)

Table 2 The matrix effects of the determination of lamotrigine, levetiracetam, oxcarbazepine and one active metabolite in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry($n = 6$)

Item	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Matrix effects ($\bar{x} \pm s, \%$)	RSD (%)
LTG	0.46	99.58 ± 8.44	8.48
	20.0	97.33 ± 2.40	2.47
LEV	0.93	102.50 ± 3.85	3.75
	40.0	97.87 ± 3.28	3.35
OXC	0.09	97.40 ± 5.25	5.39
	4.0	91.86 ± 1.93	2.10
MHD	0.74	92.46 ± 5.23	5.66
	32.0	93.01 ± 3.78	4.06

表1 用液相色谱串联质谱法测定血浆中拉莫三嗪、左乙拉西坦、奥卡西平及其代谢产物质量浓度的准确度与精密度($n = 6$)

Table 1 The precision and accuracy of the determination of lamotrigine, levetiracetam, oxcarbazepine and one active metabolite in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry($n = 6$)

Item	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Intra-batch			Inter-batch			Extraction recovery (%)
		Concentration	RSD	RE	Concentration	RSD	RE	
		($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	(%)	(%)	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	(%)	(%)	
LTG	0.20	0.19 ± 0.01	5.34	-0.58	0.19 ± 0.01	7.25	-2.12	-
	0.46	0.48 ± 0.02	3.13	4.13	0.49 ± 0.03	5.26	5.45	95.84 ± 5.33
	2.78	2.83 ± 0.16	5.79	2.04	2.94 ± 0.20	6.80	5.71	100.14 ± 2.21
	20.00	19.23 ± 0.66	3.41	-3.87	19.53 ± 0.64	3.26	-2.38	95.07 ± 5.19
LEV	0.39	0.38 ± 0.02	5.12	-2.33	0.41 ± 0.03	6.85	4.08	-
	0.93	0.93 ± 0.07	7.38	0.89	0.92 ± 0.09	9.27	-0.41	106.70 ± 5.47
	5.56	5.55 ± 0.21	3.87	-0.16	5.55 ± 0.33	5.94	-0.17	100.24 ± 3.14
	40.00	39.28 ± 1.93	4.92	-1.79	39.65 ± 2.09	5.26	-0.87	94.93 ± 3.97
OXC	0.04	0.039 ± 0.004	11.44	-0.27	0.04 ± 0.004	10.04	2.64	-
	0.09	0.09 ± 0.01	6.57	-1.00	0.09 ± 0.01	7.63	-2.06	99.43 ± 3.13
	0.56	0.58 ± 0.03	4.59	5.15	0.57 ± 0.04	7.47	2.08	96.31 ± 3.86
	4.00	3.98 ± 0.18	4.43	-0.50	3.88 ± 0.20	5.11	-3.07	98.10 ± 4.12
MHD	0.31	0.31 ± 0.02	5.82	-1.55	0.31 ± 0.02	7.92	-0.12	-
	0.74	0.76 ± 0.03	3.68	2.60	0.73 ± 0.05	6.46	-1.71	108.70 ± 1.64
	4.44	4.45 ± 0.47	10.66	0.17	4.29 ± 0.33	7.61	-3.37	99.69 ± 1.98
	32.00	31.54 ± 1.58	5.02	-1.43	31.67 ± 2.73	8.63	-1.02	99.66 ± 7.89

RSD: Relative standard deviation; RE: Relative error.

残留评估 通过分析,在待测物及其内标对应的保留时间处,空白血清中未观察到明显的色谱峰。此外,空白血清中的噪音与定量下限样品中相应色谱峰的峰面积比值低于0.10%,表明无明显的残留效应。

2 方法学应用

本研究检测了145份临床血清样品的LTG、LEV、OXC和MHD血药浓度,除1份样本的OXC浓度低于最低检测限外,其余144份样本的检测结果均在标准曲线的线性范围内,即LTG、LEV、OXC和MHD的稳态谷浓度波动范围分别为(1.14~24.47)、(0.77~41.65)、(0.05~2.37)和(4.35~34.87) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,证实了该方法适用于上述四种物质的常规TDM。

讨 论

癫痫的治疗常需联合用药。鉴于常用药物LTG、LEV和OXC联用的普遍性,同时监测这些药物及OXC的活性代谢物MHD的浓度对于优化治疗方案至关重要。然而,由于目标物浓度差异悬殊(如OXC可低至0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下,而LEV浓度可高达50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上),实现LTG、LEV、OXC和MHD的同时准确定量面临巨大技术挑战,这亦导致现有方法的报道较为有限。此前,仅少数外文文献用HPLC-MS/MS^[10,16-17]或高效液相色谱-紫外联用技术(high performance liquid chromatography-ultraviolet detection, HPLC-UV)^[18]实现了LTG、LEV、OXC和MHD的同时检测。国内研究虽有报道可同时测定LTG、LEV和MHD浓度的HPLC-MS/MS法,但未涵盖OXC^[19]。为此,本研究建立可同步定量检测LTG、LEV、OXC和MHD的HPLC-MS/MS方法,为临床精准用药提供技术支撑。

前处理策略的优化是方法实用性的核心。本研究用操作简便的蛋白沉淀法,摒弃已有报道的混合沉淀剂^[19],而选用单一有机溶剂甲醇,因其对MHD的回收率显著优于乙腈。此针对MHD和LEV高浓度导致“一步沉淀”法线性不佳的问题^[20],本研究用沉淀后稀释步骤,显著优化了所有目标物的线性关系,并提升了方法的精密度、准确度与稳定性。

线性范围的科学设定直接决定定量检测的可靠性。基于临床推荐浓度范围和仪器性能,本研究确定

了LTG、LEV和MHD的标准曲线线性范围,并通过145例临床样本验证。特别地,针对OXC缺乏明确治疗窗且现有文献报道的定量范围存在显著局限的问题:本研究发现约44.9%的临床样本的OXC浓度低于常规下限0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[10-12],同时10.2%的临床样本OXC浓度超出1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 上限^[13]。本研究通过优化前处理与色谱条件,将OXC的定量范围优化并拓宽至0.04~5.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,确保其覆盖绝大多数临床样本浓度,成功攻克了OXC极低检测限(0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与LEV高定量上限(50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)跨3个数量级的技术矛盾,解决了传统方法灵敏度不足或检测范围受限的问题。

在色谱柱的选择上,为平衡分离效率与实用性(如成本、柱压及色谱柱寿命),本研究并未采用文献中常用的小粒径(<3 μm)色谱柱^[10,16-17,19],而是创新性地选用更经济、耐用的3 μm 粒径C₁₈色谱柱,成功地在柱压低于15 MPa的条件下,于6 min内高效分离了LTG、LEV、OXC和MHD,检测时间与现有方法相当^[10]。

最后,在内标物的选择上,多种物质的定量检测通常依赖于非同位素内标或单一对应的同位素内标。例如,DUPOUEY等^[10]和LEI等^[16]分别选用3,5-二氨基-1,2,4-三氮唑和苯海拉明作为内标进行分析。然而,这些方法可能无法完全消除基质效应^[21]。本研究仅使用2个同位素内标OXC-D4和LEV-D6,即实现了4种物质的准确定量。该方法在显著降低成本的同时,确保了方法的高准确度和精密度,更具推广价值。

综上,本研究通过优化OXC的线性检测范围,显著提升了临床适用性;同时,通过优化色谱条件和内标物质,成功克服了OXC极低LLOQ(0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)与LEV高定量上限(50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)间跨3个数量级的技术挑战,解决了传统方法灵敏度不足或检测范围受限的问题。最终,本文建立了一种简单、经济、准确、高效的HPLC-MS/MS方法,能够同时准确测定LTG、LEV、OXC和MHD的血药浓度,为后续临床药代动力学研究和治疗药物监测应用奠定了方法学基础。

参考文献:

- [1] THIJS R D, SURGES R, O'BRIEN T J, et al. Epilepsy in adults [J]. *Lancet*, 2019, 393(10172): 689—701.
- [2] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑电图与癫痫学组. 抗癫痫发作药物联合使用中国专家共识[J]. *中华神经科杂志*, 2024, 57(2): 108—117.

- [3] RAPPOLD B A. Review of the use of liquid chromatography – tandem mass spectrometry in clinical laboratories: Part I – development[J]. *Ann Lab Med*, 2022, 42(2):121–140.
- [4] RAPPOLD B A. Review of the use of liquid chromatography – tandem mass spectrometry in clinical laboratories: Part II – operations[J]. *Ann Lab Med*, 2022, 42(5):531–557.
- [5] MAY T W, KORN – MERKER E, RAMBECK B. Clinical pharmacokinetics of oxcarbazepine[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(12):1023–1042.
- [6] FLESC H, CZENDLIK C, RENARD D, *et al.* Pharmacokinetics of the monohydroxy derivative of oxcarbazepine and its enantiomers after a single intravenous dose given as racemate compared with a single oral dose of oxcarbazepine[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(6):1103–1110.
- [7] RODRIGUES C, CHIRON C, REY E, *et al.* Population pharmacokinetics of oxcarbazepine and its monohydroxy derivative in epileptic children [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(12):2695–2708.
- [8] SCHORETSANTIS G, PAULZEN M, UNTERECKER S, *et al.* TDM in psychiatry and neurology: A comprehensive summary of the consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology, update 2017; a tool for clinicians [J]. *World J Biol Psychiatry*, 2018, 19(3):162–174.
- [9] PATSALOS P N, SPENCER E P, BERRY D J. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in epilepsy: A 2018 update[J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40(5):526–548.
- [10] DUPOUEY J, DOUDKA N, BELO S, *et al.* Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in human plasma samples using an ultra – high – performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method and its application in therapeutic drug monitoring[J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(12):2053–2060.
- [11] 陈婷婷, 刘富岗. RP – HPLC 法同时测定人血浆中左乙拉西坦、奥卡西平及其活性代谢产物的浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(20):2133–2136, 2164.
- [12] 卢伟, 张蓬华, 董永成, 等. UPLC – MS/MS 同时测定人血浆中 7 种抗癫痫药物及 1 种活性代谢产物的血药浓度[J]. *中国临床药学杂志*, 2021, 30(2):95–100.
- [13] 杨娟娟, 王陈翔, 周子晔, 等. LC – MS/MS 测定人血清中奥卡西平及其活性代谢产物 10 – 羟基卡马西平的浓度及其临床应用[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(22):2823–2827.
- [14] *Ch. P*(2020) Vol IV, 中华人民共和国药典 2020 版[S]. 四部. 2020:501–506.
- [15] FDA. Bioanalytical method validation and study sample analysis [EB/OL]. 2022 – 05 – 24 [2024 – 08 – 06]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m10-bioanalytical-method-validation-and-study-sample-analysis>.
- [16] LEI Y, TINGTING W, MEIYUN S, *et al.* Simultaneous determination of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry with positive/negative ion – switching electrospray ionization and its application in therapeutic drug monitoring [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(5):964–972.
- [17] DAVIS D E, SHERROD S D, GANT – BRANUM R L, *et al.* Targeted strategy to analyze antiepileptic drugs in human serum by LC – MS/MS and LC – Ion Mobility – MS[J]. *Anal Chem*, 2020, 92(21):14648–14656.
- [18] MILOSHESKA D, ROŠKAR R. Simple HPLC – UV method for therapeutic drug monitoring of 12 antiepileptic drugs and their main metabolites in human plasma[J]. *Molecules*, 2023, 28(23):7830.
- [19] 马英华, 赵宜乐, 姜锡娟, 等. 同位素稀释 – HPLC – ESI – MS/MS 法同时测定癫痫患儿血浆中左乙拉西坦、奥卡西平活性代谢物和拉莫三嗪的药物浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(16):1647–1652.
- [20] 杨希, 李璐, 何玲娟, 等. 人血浆中拉莫三嗪、奥氮平、喹硫平浓度的 UPLC – MS/MS 分析方法建立及治疗药物监测[J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(1):44–51.
- [21] PALTE M J, BASU S S, DAHLIN J L, *et al.* Development and validation of an ultra – performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the concurrent measurement of gabapentin, lamotrigine, levetiracetam, monohydroxy derivative of oxcarbazepine, and zonisamide concentrations in serum in a clinical setting[J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40(4):469–476.

(收稿日期 2024 – 11 – 04)