

# HPLC-ESI-MS/MS 同时测定癫痫患儿血浆中丙戊酸、苯巴比妥和托吡酯的药物浓度

马英华, 赵宜乐, 秦亚彬, 韩雨, 姜锡娟, 张古英(河北省儿童医院药学部, 石家庄 050031)

**摘要:** 目的 建立基于高效液相色谱串联质谱技术(HPLC-ESI-MS/MS)同时测定癫痫患儿血浆中丙戊酸、苯巴比妥和托吡酯浓度的方法, 用于癫痫患儿的血药浓度监测及结果分析。方法 样品用有机溶剂沉淀蛋白法进行前处理, 分别以丙戊酸-D6、托吡酯-D12、苯巴比妥-D5 为内标, 采用 Phenomenex Kinetex® EVO C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 2.6 μm), 以 0.07% 甲酸-1 mmol 乙酸铵-水(A)和甲醇(B)作为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>。质谱检测系统采用电喷雾离子源负离子模式, 多离子反应监测模式扫描。考察该方法的专属性、定量下限(LLOQ)、标准曲线、残留效应、稀释效应、准确度、精密度、基质效应和稳定性。结果 丙戊酸在 0.6~120 μg·mL<sup>-1</sup> 线性关系良好( $r=0.998\ 9$ ), LLOQ 为 0.6 μg·mL<sup>-1</sup>; 苯巴比妥在 0.25~50 μg·mL<sup>-1</sup> 线性关系良好( $r=0.999\ 1$ ), LLOQ 为 0.25 μg·mL<sup>-1</sup>; 托吡酯在 0.25~50 μg·mL<sup>-1</sup> 线性关系良好( $r=0.999\ 0$ ), LLOQ 为 0.25 μg·mL<sup>-1</sup>。批内和批间精密度 RSD≤8.0%, 稳定性良好, 不受普通基质和溶血基质(溶血程度≤5%)的影响, 方法学验证均符合中国药典 2020 年版规定。结论 本方法快速、简便、稳定、经济, 具有较高的灵敏度和特异性, 可应用于监测临床癫痫患儿丙戊酸、苯巴比妥和托吡酯的血药浓度。

**关键词:** 丙戊酸; 托吡酯; 苯巴比妥; 高效液相色谱串联质谱; 血药浓度监测; 儿童

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)02-0232-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.02.012

引用本文: 马英华, 赵宜乐, 秦亚彬, 等. HPLC-ESI-MS/MS 同时测定癫痫患儿血浆中丙戊酸、苯巴比妥和托吡酯的药物浓度[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(2): 232-237.

## Simultaneous Determination of Valproic Acid, Phenobarbital and Topiramate in Plasma of Epileptic Children by HPLC-ESI-MS/MS

MA Yinghua, ZHAO Yile, QIN Yabin, HAN Yu, JIANG Xijuan, ZHANG Guying(Department of Pharmacy, Children's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for simultaneous determination of valproic acid, phenobarbital and topiramate in plasma of epileptic children by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-ESI-MS/MS). **METHODS** The samples were pre-treated by precipitation protein method with organic solvent. Valproic acid-D6, topiramate-D12, and phenobarbital-D5 were used as internal standard. Chromatographic column: Phenomenex Kinetex® EVO C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 2.6 μm); flow phase: 0.07% formic acid-1 mmol ammonium acetate-water(A) and methanol(B), gradient elution; flow speed: 0.5 mL·min<sup>-1</sup>. Ion source was electric spray ion source, multireaction monitoring mode for quantitative analysis, using negative ion monitoring mode. The specificity, lower limit of quantitation(LLOQ), standard curve, residual effect, dilution effect, accuracy, precision, matrix effects and stability were investigated. **RESULTS** The linear range of valproic acid was 0.6~120 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.998\ 9$ ), and LLOQ was 0.6 μg·mL<sup>-1</sup>. The linear range of phenobarbital was 0.25~50 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 1$ ), and LLOQ was 0.25 μg·mL<sup>-1</sup>. The linear range of topiramate was 0.25~50 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 0$ ), and LLOQ was 0.25 μg·mL<sup>-1</sup>. The intra-batch and inter-batch precision RSD was ≤8.0%, with good stability, and this method was not affected by common matrix and hemolysis matrix(hemolysis degree ≤5%). The methodology validation was in line with the provisions of Chinese Pharmacopoeia(2020 edition). **CONCLUSION** This study determined the blood concentration of valproic acid, phenobarbital and topiramate in children with HPLC-ESI-MS/MS, which is rapid, simple, stable, economical, and high sensitivity and specificity. It can be applied to therapeutic drug monitoring of valproic acid, phenobarbital and topiramate in clinical children with epilepsy.

**KEYWORDS:** valproic acid; topiramate; phenobarbital; HPLC-ESI-MS/MS; therapeutic drug monitoring; children

癫痫是一种慢性神经系统疾病, 特征是由异常神经元放电而引起大脑短暂功能障碍, 全世界约有 5 000 万人患有这种疾病<sup>[1-2]</sup>。治疗癫痫的首要方案就是抗癫痫药物(antiepileptic drugs, AEDs)

基金项目: 河北省卫生健康委医学科学研究课题计划项目(20211469)

作者简介: 马英华, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: 502487490@qq.com

治疗,通常采用单一用药或联合用药的方式进行治疗,而根据新诊断儿童癫痫的初始单药治疗专家共识<sup>[3]</sup>,丙戊酸(valproic acid, VPA)是多种癫痫类型的初始单药首选药物,治疗效果较好。苯巴比妥(phenobarbital, PHB)也有较好的镇静和抗癫痫效果,广泛用于新生儿和儿童癫痫发作,以及耐药的惊厥和非惊厥性癫痫持续状态<sup>[4-5]</sup>。但由于传统 AEDs 具有非线性药动学特点,治疗范围狭窄,不良反应较多,血药浓度波动范围大,临床效应与血药浓度的关系密切,需要定期进行治疗药物监测<sup>[6-7]</sup>。而新型 AEDs 托吡酯(topiramate, TPM)也经常作为联合用药的一线二线用药,其对癫痫的多种发作类型有效,且不易产生耐药性,一般用于初诊为癫痫的患者或曾经合并用药现转为单药治疗的癫痫患者<sup>[8]</sup>。但 TPM 在儿童和婴幼儿有更高的清除率和分布容积,血药浓度偏低,而肝肾功能不全的患者服用 TPM 后,清除率会降低<sup>[9]</sup>。同时与 TPM 的用药剂量和控制加量速率有关的不良反应有泌汗障碍、影响生长发育和认知功能<sup>[10]</sup>。因此为了患儿用药的安全性和有效性,临床需要通过 AEDs 进行治疗药物监测,定期监测血药浓度,及时调整优化给药方案,降低不良反应发生率,使患者得到更安全、合理的药物治疗,尤其是儿童患者。

目前,大多数医院开展 AEDs 的治疗药物监测多采用均相酶放大免疫法、化学发光免疫分析、荧光偏振免疫分析法或 HPLC。免疫法试剂盒酶活性受环境影响大,且待测物受结构类似物干扰影响检测的准确度和特异性。而近几年由于 HPLC-MS/MS 具有较高的色谱分离能力和质谱选择性,并且可以同时检测多种药物,特异性、灵敏度高,所以应用该法测定该类物质越来越普遍。但是应用 HPLC-MS/MS 检测生物样品时,内源化合物可能会对目标化合物的离子化效率产生影响,从而影响分析的准确性,而稳定同位素标记内标(stable isotope labeling-internal standard, SIL-IS)可以抵消基质效应的影响。通过查阅文献,国内外尚无采用同位素内标法同时检测 VPA、PHB 和 TPM 血浆中浓度的方法,基于此,本实验室建立一种简单、快速、灵敏度高的高效液相色谱-质谱联用方法(HPLC-ESI-MS/MS)同时测定癫痫患儿血浆中 VPA、PHB 和 TPM 的浓度,大大提高了检测效率,节约了仪器成本,同时稳定同位素作为内标提高了分析的准确度和精密度,从而为临床上 AEDs

治疗药物监测和个体化精准给药方案提供方法技术依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Triple Quad™ 4 500MD 液相色谱串联质谱检测系统,配有三重四级杆质量分析器, Toubo V 电喷雾离子源(AB SCIEX 公司); Jasper™ HPLC 20ADxr(日本岛津); Analyst® 1.6.3 MD 软件(AB SCIEX 公司); Explorer R 准微量天平(Ohaus 公司); WH-861 型旋涡混合器(太仓市华利达实验设备有限公司); BY-R20 型高速冷冻离心机(北京白羊医疗器械有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

VPA(CAS: 99-66-1; 批号: 100963-201705)、TPM(CAS: 97240-79-4; 批号: 100783-201502)、VPA-D6(批号: 100142-201705)、TPM-D12(CAS: 1279037-95-4; 批号: 100597-201503)均购自 Toronto Research Chemicals(CAN); PHB(CAS: 50-06-6; 批号: MFCD00066494)、PHB-D5 (1 mL 甲醇中含 1.0 mg, 批号: FE03052010)均购自 Supelco(USA)。甲醇[色谱级, Fisher Chemical, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 乙腈、甲酸(色谱级, 美国 Mreda technology inc); 水为纯净水(娃哈哈集团有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Phenomenex Kinetex® EVO C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 2.6 μm), 流动相为 0.07%甲酸-1 mmol/L 乙酸铵-水(A)和甲醇(B), 梯度洗脱(0~0.2 min, 80%A; 0.2~1.4 min, 80%→50%A; 1.4~1.5 min, 50%→5%A; 1.5~2.5 min, 5%A; 2.5~2.6 min, 5%→80%A; 2.6~3.5 min, 80%A), 流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 50 °C, 进样量为 2 μL。

### 2.2 质谱条件

离子源为电喷雾(ESI)离子源, 负离子模式, 离子源温度: 550 °C; 源喷射压力: -4 500 V; 雾化气(Gas 1): 55 psi; 加热气(Gas 2): 50 psi; 气帘气(CUR): 20 psi。接口加热, 氮气发生器全程通入氮气, 多反应离子监测模式进行定量分析。VPA、PHB、TPM 及内标的质谱参数见表 1, VPA、PHB、TPM 的结构式和二级质谱图结果见图 1。

### 2.3 溶液配制

2.3.1 对照品溶液配制 精密称定适量对照品,

表 1 3 种 AEDs 及内标的质谱参数

Tab. 1 MS parameters of the 3 antiepileptic drugs and internal standards

化合物	保留时间/min	分子式	母离子( <i>m/z</i> )	子离子( <i>m/z</i> )	去簇电压/V	碰撞能量/eV
VPA	2.23	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	143.2	143.2	-55	-20
VPA-D6	2.23	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> D <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	149.2	149.2	-55	-20
TPM	1.76	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>8</sub> S	338.1	77.9	-90	-30
TPM-D12	1.77	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> D <sub>12</sub> NO <sub>8</sub> S	350.1	77.9	-90	-30
PHB	1.62	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	231.0	231.0	-50	-15
PHB-D5	1.65	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> D <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	236.0	236.0	-50	-15

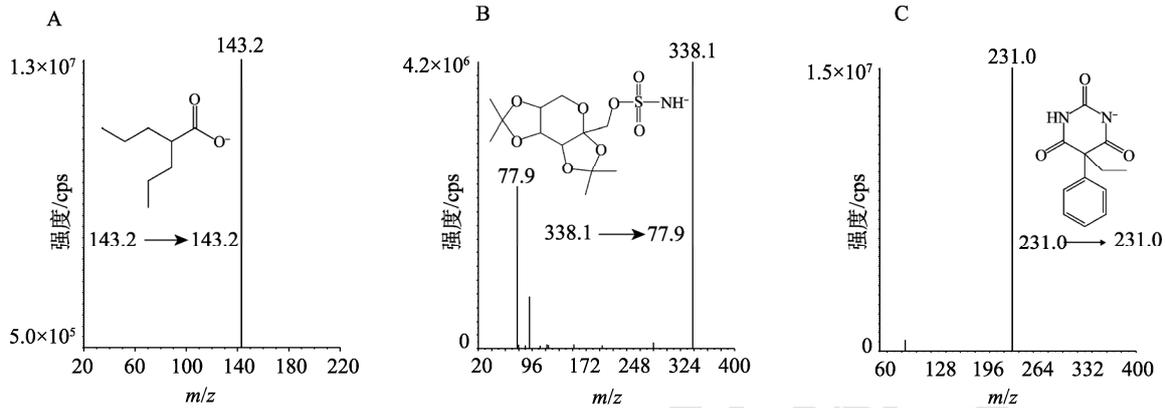


图 1 VPA(A)、TPM(B)和 PHB(C) 3 种 AEDs 的二级质谱图

Fig. 1 Negative MS<sup>2</sup>-spectras of the 3 antiepileptic drugs VPA(A), TPM(B), PHB(C)

加甲醇溶解并定容，混匀，配制成储备液，其中 VPA 浓度为 10.0 mg·mL<sup>-1</sup>，PHB 浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup>，TPM 浓度为 10.0 mg·mL<sup>-1</sup>。分别移取 3 种 AEDs 储备液适量，用甲醇稀释，制得混合对照品储备液，其中 VPA 浓度为 1 200 μg·mL<sup>-1</sup>，PHB 和 TPM 的浓度为 500 μg·mL<sup>-1</sup>，所有储备液均于 -20 °C 冰箱保存备用。

**2.3.2 标准曲线和质控工作溶液配制** 取混合储备液适量，用甲醇稀释，配成系列浓度的标准曲线工作液，其中 VPA 标准曲线浓度分别为 6, 24, 48, 60, 120, 240, 600, 1 200 μg·mL<sup>-1</sup>，质控样品溶液浓度分别为 12, 300, 900 μg·mL<sup>-1</sup>；PHB 和 TPM 标准曲线浓度分别为 2.5, 1, 20, 25, 50, 100, 250, 500 μg·mL<sup>-1</sup>，质控样品溶液浓度分别为 5, 125, 375 μg·mL<sup>-1</sup>。

**2.3.3 内标溶液配制** 分别取 VPA-D6 和 TPM-D12 对照品适量，加甲醇溶解并定容，配制成储备液，其浓度分别为 5.0, 0.25 mg·mL<sup>-1</sup>。PHB-D5 储备液浓度为 1.0 mg·mL<sup>-1</sup>。分别取 3 种内标储备液适量，用甲醇：乙腈(4：1)的沉淀剂稀释，配制含 2.4 μg·mL<sup>-1</sup> VPA-D6 和 1 μg mL<sup>-1</sup> PHB-D5，TPM-D12 的混合内标工作液。

## 2.4 血浆样品处理

取血浆样品 100 μL，加入 300 μL 内标工作液(蛋白沉淀剂)，涡旋混合 3~5 min，在 4 °C 以 13 680×g 离心 10 min，取上清液进样分析。

## 2.5 专属性试验

分别取不同来源的 6 份空白血浆，按“2.4”项下方法操作，得到空白血浆色谱图；同时在空白血浆中加入 3 种抗癫痫药的混合对照品溶液各 6 份，按“2.4”项下方法操作，质谱检测分析。结果见图 2，在待测物的保留时间处无内源性物质的干扰，而 PHB、TPM 和 VPA 的保留时间分别为 1.62, 1.76, 2.23 min。

## 2.6 标准曲线及定量下限(LLOQ)

取空白血浆 90 μL，加入不同浓度的系列混合标准曲线溶液各 10 μL，配制成系列标准曲线样品溶液和质控样品溶液，按“2.4”项下方法操作。其中 VPA 标准曲线浓度分别为 0.6, 2.4, 4.8, 6, 12, 24, 60, 120 μg·mL<sup>-1</sup>，质控样品溶液浓度分别为 1.2, 30, 90 μg·mL<sup>-1</sup>；PHB 和 TPM 标准曲线浓度分别为 0.25, 0.1, 2, 2.5, 5, 10, 25, 50 μg·mL<sup>-1</sup>，质控样品溶液浓度分别为 0.5, 12.5, 37.5 μg·mL<sup>-1</sup>。采用最小二乘法线性拟合标准曲线参数，回算校

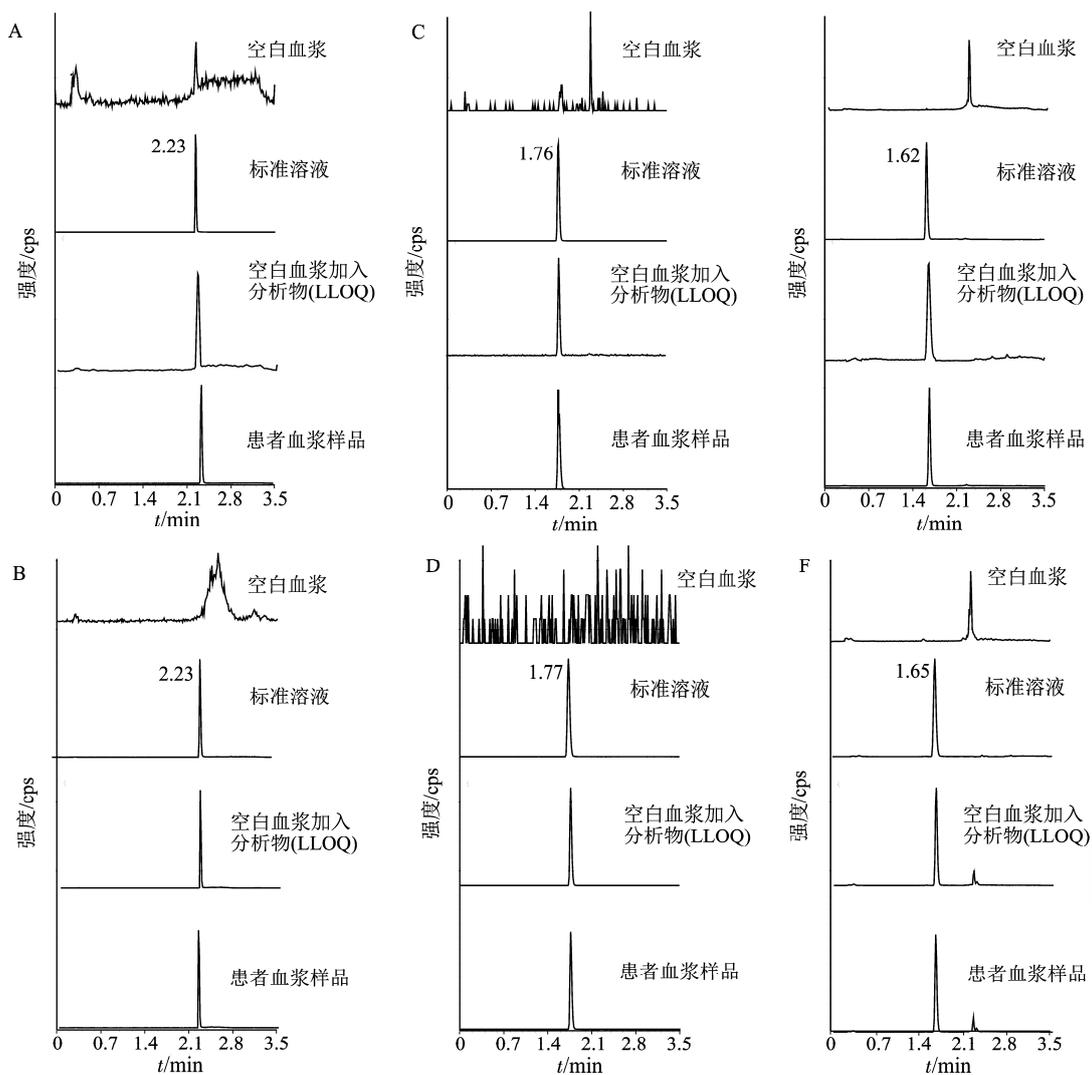


图 2 VPA、TPM 和 PHB 3 种 AEDs 及内标的典型 HPLC-MS/MS 图

A-VPA; B-VPA-D6; C-TPM; D-TPM-D12; E-PHB; F-PHB-D5。

Fig. 2 Representative HPLC-MS/MS chromatograms of the three antiepileptic drugs and internal standards

A-VPA; B-VPA-D6; C-TPM; D-TPM-D12; E-PHB; F-PHB-D5.

表 2 3 种 AEDs 的标准曲线方程、相关系数( $r$ )、线性范围及 LLOQ

Tab. 2 Linear equations, linear ranges, correlation coefficients( $r$ ), and LLOQ of the 3 antiepileptic drugs

化合物	标准曲线方程	$r$	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LLOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
VPA	$Y=0.0177x+0.00132$	0.9989	0.6~120	0.6
PHB	$Y=0.0642x-0.00274$	0.9991	0.25~50	0.25
TPM	$Y=0.1128x-0.00042$	0.9990	0.25~50	0.25

正标准样品浓度,以待测物与内标的峰面积之比( $Y$ )对待测物的浓度( $X$ )进行线性回归,设置权重系数为  $1/x^2$ 。VPA、PHB 和 TPM 的标准曲线在各自的线性范围内线性良好,相关系数( $r$ )>0.998,符合色谱法测定要求,结果见表 2。LLOQ 信噪比( $S/N$ )>5。

### 2.7 残留和稀释可靠性

注射定量上限样品之后,空白样品中的残留

不超过 LLOQ 的 20%,且不超过内标的 5%。VPA、PHB 和 TPM 样品的残留效应符合要求。

配制浓度为  $240\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (VPA)、 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (PHB 和 TPM)的混合对照品样品溶液各 5 份,模拟超高浓度样品。以空白血浆等比稀释 5 倍,按“2.4”项下方法操作,考察稀释因子为 5 的稀释可靠性。样品稀释 5 倍后的准确度差异 $\leq 1.66\%$ ,RSD $\leq 1.34\%$ ,结果说明稀释因子为 5 具有可靠性。

### 2.8 准确度及精密度

取空白血浆  $90\ \mu\text{L}$ ,加入不同浓度的混合标准曲线工作液各  $10\ \mu\text{L}$ ,配制 LLOQ、低、中、高 4 个浓度的质控样品,每个浓度平行制备 5 份,按“2.4”项下方法操作,进样检测,考察批内准确度和精密度;不同日期分别测定 3 批(3 d 内),每

批均按上述操作方法,考察并计算批间准确度和精密度。VPA、PHB和TPM的批内和批间准确度和精密度结果见表3,结果均<15%,符合生物样品定量分析的基本要求<sup>[11]</sup>。

## 2.9 基质效应

在生物样品定量分析中,生物性内源化合物可能会对目标化合物的离子化效率产生影响,从而影响分析的准确性,尤其是采用蛋白沉淀法进行样品前处理时,不能有效去除主要引起基质效应的盐类和磷脂,因此需要在方法开发和验证阶段考察基质效应。此外,在实际检测工作中,由于儿童个体较小,常常因为抽血困难而发生溶血现象,而额外的血红细胞成分会引起基质效应,因此对于溶血血浆的基质考察也非常有必要。根据中国药典2020年版规定,考察基质效应计算的内标归一化基质因子的变异系数要求≤15%。

表3 3种AEDs的批内及批间准确度和精密度  
Tab. 3 Within-run and between-run accuracy and precision of 3 antiepileptic drugs

化合物	理论质量浓度 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	批内精密度		批间精密度	
		准确度/%	RSD/%	准确度/%	RSD/%
VPA	0.6	99.1	7.5	99.1	8.0
	1.2	97.7	3.8	98.1	4.0
	30	99.5	1.6	97.4	4.7
	90	99.3	1.2	99.1	3.9
PHB	0.25	100.1	2.1	102.5	4.3
	0.5	102.6	4.0	101.0	4.2
	12.5	99.9	1.8	95.5	4.6
	37.5	97.0	1.9	95.5	2.1
TPM	0.25	106.7	4.6	105.4	5.6
	0.5	106.3	2.4	105.0	2.7
	12.5	102.7	2.0	98.8	4.3
	37.5	100.3	2.6	99.6	2.8

2.9.1 正常血浆基质效应 取不同供体的6份空白血浆各100  $\mu\text{L}$ ,按“2.4”项下方法操作,得到空白基质,加入低、高质控样品,上机进样,得

到峰面积A;用纯水代替血浆,按“2.4”项下方法操作,加入低、高质控样品各6份,进样分析,得到峰面积B。基质因子=A/B $\times$ 100%,内标归一化基质因子=待测物基质因子/内标基质因子 $\times$ 100%。通过计算,VPA、PHB和TPM内标归一化基质因子变异系数<15%,结果见表4,表明不同基质对3种AEDs的检测结果没有影响。

2.9.2 溶血血浆基质效应 取适量的新鲜全血到干净的离心管内,于-20  $^{\circ}\text{C}$ 冷冻 $\geq$ 30 min。将溶血全血进行解冻,加入适量至空白血浆中,配备5%溶血样品。按“2.9.1”项下方法操作,计算溶血样品的内标归一化的基质因子,考察溶血血浆基质效应。由表4可知,VPA、PHB和TPM内标归一化基质因子变异系数<15%,说明溶血的基质(溶血程度 $\leq$ 5%)对检测结果没有影响。

## 2.10 稳定性

制备低和高浓度质控样品溶液20份,分成4批,分别考察在室温放置4 h、5  $^{\circ}\text{C}$ 进样器中放置8 h、反复冻融3次、-20  $^{\circ}\text{C}$ 冻存45 d的稳定性。结果表明,VPA、PHB和TPM的RSD $\leq$ 6.0%,稳定性良好。结果见表5。

## 2.11 临床实际样品测定

将上述建立的液质联用检测方法应用于72例临床样本(来源:河北省儿童医院)进行血药浓度测定分析。依据相关参考文献,VPA的有效血药浓度为50~100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,TPM的有效血药浓度为2~10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,PHB的有效血药浓度为10~40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,而测定的63例VPA儿童血浆(1~16岁)的稳态血药浓度在1.89~110.9  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,20例TPM儿童血浆(1~16岁)的稳态血药浓度在1.23~10.95  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,2例PHB儿童血浆的稳态血药浓度为11.91  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (4岁)和30.91  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (9岁)。由于临床有需求进行PHB血药浓度监测,所以进行了方法开发,但是实际样本获得较少,后续实验验证会进行进一步的研究。

表4 3种AEDs的正常血浆及溶血血浆的基质效应

Tab. 4 Matrix effects in normal plasma and hemolysis plasma of 3 antiepileptic drugs %

化合物	理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	正常血浆				5%溶血血浆样品			
		绝对基质效应	RSD	相对基质效应	RSD	绝对基质效应	RSD	相对基质效应	RSD
VPA	1.2	0.95 $\pm$ 0.04	4.3	0.92 $\pm$ 0.03	3.2	0.85 $\pm$ 0.04	4.9	0.94 $\pm$ 0.06	6.2
	90	0.99 $\pm$ 0.05	4.9	0.99 $\pm$ 0.04	4.3	1.07 $\pm$ 0.03	3.0	1.05 $\pm$ 0.04	3.8
PHB	0.5	1.05 $\pm$ 0.04	4.1	0.95 $\pm$ 0.04	4.4	0.87 $\pm$ 0.05	5.4	0.98 $\pm$ 0.03	2.7
	37.5	1.05 $\pm$ 0.02	2.3	0.94 $\pm$ 0.02	2.3	1.06 $\pm$ 0.03	2.5	1.02 $\pm$ 0.03	2.6
TPM	0.5	1.10 $\pm$ 0.04	3.4	0.95 $\pm$ 0.04	4.0	0.88 $\pm$ 0.05	5.7	1.00 $\pm$ 0.02	2.3
	37.5	1.03 $\pm$ 0.05	4.5	0.96 $\pm$ 0.04	4.3	1.08 $\pm$ 0.04	3.7	1.05 $\pm$ 0.03	3.2

表 5 3 种 AEDs 稳定性结果

Tab. 5 Stability results of three antiepileptic drugs

待测物	理论浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	室温下放置 4 h		5 °C 进样器中放置 8 h		反复冻融 3 次		-20 °C 冻存 45 d	
		含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD/%						
VPA	1.2	1.15±0.04	4.0	1.12±0.03	3.0	1.15±0.07	5.8	1.23±0.06	5.3
	90	92.67±0.09	2.5	90.07±2.47	2.7	94.07±2.66	2.8	92.57±4.36	4.7
PHB	0.5	0.49±0.01	2.3	0.49±0.01	2.4	0.49±0.01	1.2	0.51±0.03	6.0
	37.5	38.18±0.47	1.2	38.55±1.59	4.1	37.89±0.66	1.7	40.05±1.73	4.3
TPM	0.5	0.49±0.01	1.8	0.48±0.01	2.1	0.47±0.01	2.6	0.49±0.01	2.6
	37.5	38.48±0.62	1.6	38.5±1.61	4.2	38.54±0.52	1.4	40.07±1.82	4.5

### 3 讨论

本实验方法考察了不同的梯度洗脱程序进行色谱条件的摸索,最终使 VPA、TPM 和 PHB 得到较好的分离。同时考察了流动相以甲醇-水不同比例进行洗脱,结果显示 TPM 和 PHB 峰型分叉,且 VPA 有拖尾现象,因此考虑调整流动相 pH 以期改善峰型,考察了在流动相中加入 0.05% 甲酸、0.07% 甲酸和 0.1% 甲酸,酸浓度过小峰型改善效果不佳,酸浓度过大会对色谱柱造成伤害,最终选择在流动相中加入 0.07% 甲酸作为液相条件时,3 种物质峰型均较好。

在生物分析定量方法中,内源性干扰物导致的基质效应对液质分析的准确度和精密密度造成负面影响,所以在方法建立时应该尽量降低或消除基质效应。降低基质效应的影响首先可以通过色谱条件的修改,使待测物的保留时间远离离子抑制区域<sup>[12]</sup>。其次, SIL-IS 可以抵消基质效应的影响<sup>[13]</sup>。SIL-IS 具有与待测物类似的物理化学性质、离子化效率及色谱保留时间,所以待测物与内标的比值可以抵消基质效应的影响。因此, SIL-IS 是生物分析方法中的首要选择,本研究即采用 3 种 AEDs 的 SIL-IS(VPA-D6、TPM-D12 和 PHB-D5) 作为内标。实验结果也表明, VPA-D6、TPM-D12 和 PHB-D5 作为内标,基质效应(正常血浆和溶血程度 ≤5% 的血浆)对检测影响甚小,且有较高的准确度和精密密度。

### 4 结论

本研究采用 HPLC-ESI-MS/MS 技术建立了同时测定儿童血浆中 3 种 AEDs 浓度的方法。本实验通过对色谱条件的优化,3 种 AEDs 达到了良好的分离,且峰型良好。通过采用 SIL-IS 大大抵消了生物样本的基质效应,且最大限度提高了分析的准确度和精密密度。该方法简便、快速、灵敏、稳定,且不受生物内源性物质和溶血效应(≤5%)的干扰,同时测定 3 种 AEDs 节约了仪器和试剂成本,适用于

临床 VPA、TPM 和 PHB 儿童治疗药物监测和药动学研究。

### REFERENCES

- [1] 许倍铭, 陈冰. 新型抗癫痫药物的治疗药物监测研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(35): 5036-5040.
- [2] XIANG W P. Progress in pharmacokinetics of new-generation antiepileptic drugs in pediatric population[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2016, 32(24): 2323-2325.
- [3] 中华医学会儿科学分会神经学组. 新诊断儿童癫痫的初始单药治疗专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(10): 734-737.
- [4] PACIFICI G M. Clinical pharmacology of phenobarbital in neonates: Effects, metabolism and pharmacokinetics[J]. Curr Pediatr Rev, 2016, 12(1): 48-54.
- [5] BRODIE M J, KWAN P. Current position of phenobarbital in epilepsy and its future[J]. Epilepsia, 2012, 53(Suppl 8): 40-46.
- [6] GHODKE-PURANIK Y, THORN C F, LAMBA J K, et al. Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics[J]. Pharmacogenet Genomics, 2013, 23(4): 236-241.
- [7] BRODIE M J, DICHTER M A. Antiepileptic drugs[J]. N Engl J Med, 1996, 334(3): 168-175.
- [8] LIU B, LI Y M, ZHANG J M, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of topiramate capsule and tablets in healthy volunteers[J]. J Pediatr Pharm(儿科药理学杂志), 2014, 20(5): 38-41.
- [9] JOHANNESSEN LANDMARK C, JOHANNESSEN S I, PATSALOS P N. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs: Current status and future prospects[J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2020, 16(3): 227-238.
- [10] YANG C S, ZHANG L L, LIN Y Z, et al. Literature analysis of the safety of topiramate for domestic children[J]. Chin J Obstet Gynecol Pediatr Electron Ed(中华妇幼临床医学杂志: 电子版), 2014, 10(5): 42-47.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 2020.
- [12] TRUFELLI H, PALMA P, FAMIGLINI G, et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Mass Spectrom Rev, 2011, 30(3): 491-509.
- [13] BAKHTIAR R, MAJUMDAR T K. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007, 55(3): 262-278.

收稿日期: 2021-12-15

(本文责编: 蔡珊珊)