

规检测。本实验通过对不同提取方法比较, Takara 公司的 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 试剂盒, 能够快速裂解大部分微生物, 使其释放核酸, 并可直接用于 PCR 检测反应, 不仅节省时间, 且减少了样品之间的污染, 使检测灵敏度大大提高。金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌经稀释后少至 2 CFU·PCR⁻¹, 相当于 20 CFU·mL⁻¹ 也可被检测出。

其次, 如何去除样品中存在的死菌及其基因组 DNA 的干扰? 本研究利用 PMA 能渗透到细胞壁或者细胞膜不完整的死细胞体内, 插入 DNA 共价结合, 从而使死细胞中的 DNA 不能进行 PCR 扩增; 而活细胞的完整细胞壁、细胞膜能够阻止 PMA 渗透到菌体内与 DNA 共价结合, 因而其 PCR 扩增几乎不受影响^[8-9]。PMA 的这种性质为 PCR 检测区分样品中死活菌提供了可靠的方法依据。本研究发现, 当 PMA 终浓度为 3 μg·mL⁻¹, 使用 500 W 卤素灯曝光 10 min, 可有效抑制样品中死细胞 DNA 的 PCR 扩增, 因此 PMA 与 RT-PCR 技术的结合能够更加准确检测出样品中活菌的存在。

在对人工污染药品的无菌检测中, RT-PCR 与药典方法的检测结果一致, 表明 RT-PCR 可应用于无菌检验, 且该法具有灵敏度高、特异性好、耗时少(从基因组抽提到 PCR 扩增整个过程只需要 4 h 左右)的优势, 显示该法在大量无菌样品的快速检测方面, 具有明确的可操作性和实际应用价值。

REFERENCES

- [1] DING L X, SU X M, AKIRA Y. Research progress of VBNC bacteria-A review [J]. Acta Microbiol Sin(微生物学报), 2011, 51(7): 858-862.
- [2] DREIER J, STORMER M, KLEESIEK K. Two novel real-time reverse transcriptase PCR assays for rapid detection of bacterial contamination in platelet concentrates [J]. Clin Microbiol, 2004, 42(10): 4759-4764.
- [3] MOHAMMADI T, PIETERSZ R N, SCHOLTALBERS L A, et al. Optimal sampling time after preparation of platelet concentrates for detection of bacterial contamination by quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Vox Sang, 2005, 89(4): 208-214.
- [4] NADKARNI M A, MARTIN F E, JACQUES N A, et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range(universal) probe and primers set [J]. Microbiology, 2002, 148(1): 257-266.
- [5] HORZ H P, VIANNA M E, GOMES B P. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 5332-5337.
- [6] MOHAMMADI T, REESINK H W, VANDENBROUCKE-GRAULS C M, et al. Optimization of real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of eubacterial 16S ribosomal DNA in platelet concentrates [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4796-4798.
- [7] MOHAMMADI T, REESINK H W, VANDENBROUCKE-GRAULS C M, et al. Removal of contaminating DNA from commercial nucleic acid extraction kit reagents [J]. J Microbiol Methods, 2005, 61(2): 285-288.
- [8] LUO J F, LIN W T, GUO Y. Detection of viable bacterium cells based on propidium monoazide in combination with PCR [J]. J South Chin Univ Technol(Nat Sci Ed)(华南理工大学学报), 2010, 38(9): 142-146.
- [9] ZHU R G. Application of ethidium bromide monoazide for quantification of pathogenic viable cells of *vibrio parahaemolyticus* in seafood using real-time polymerase chain reaction [J]. Food Sci(食品科学), 2011, 32(20): 206-210.

收稿日期: 2013-04-18

HPLC-MS 同时测定人血浆中卡马西平和苯妥英钠的血药浓度

任秀华, 杜光, 杨惠, 刘东* (华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 武汉 430030)

摘要: 目的 建立一种快速、灵敏并同时测定人血浆中卡马西平(CBZ)和苯妥英钠(PT)浓度的高效液相色谱-质谱联用检测方法。方法 以兰索拉唑为内标, 血浆样品经乙腈沉淀后, 经 HPLC-MS 分离分析。采用 Diamonsil C₁₈ 柱(2.1 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水(含 0.1% 甲酸)=0.20 : 0.10; 流速: 0.3 mL·min⁻¹, 采用电喷雾离子源(ESI), 以多反应监测方式(MRM)进行正离子监测, CBZ、PT 和兰索拉唑的定量分析离子对分别为 *m/z* 237.0/194.0, 253.2/182.0, 392.0/188.2。结果 CBZ 在 40.30~20 150.00 ng·mL⁻¹(*r*=0.993 7)内线性良好, 为 40.3 ng·mL⁻¹, 低(66.08 ng·mL⁻¹)、中(660.8 ng·mL⁻¹)、高(16 120 ng·mL⁻¹)3 个浓度的平均回收率 RSD 均<15%。PT 在 80.1~40 050.0 ng·mL⁻¹(*r*=0.997 6)内线性良好, 最低定量限为 80.1 ng·mL⁻¹, 低(133.5 ng·mL⁻¹)、中(1 335.00 ng·mL⁻¹)、高(32 040.00 ng·mL⁻¹)3 个浓度的平均回收率 RSD 均<15%。结论 该方法快速简便, 灵敏准确, 可用于 CBZ 和 PT 同时应用时两者的血药浓度监测及其药动学研究。

作者简介: 任秀华, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (027)83663519 E-mail: xiuhua_ren@yahoo.com *通信作者: 刘东, 男, 博士, 主任药师 Tel: (027)83663641 E-mail: ld_2069@163.com

关键词: 卡马西平; 苯妥英钠; 高效液相色谱串联质谱法; 血药浓度监测

中图分类号: R917.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)12-1337-06

Simultaneous Determination of Carbamazepine and Phenytoin in Human Plasma by HPLC-MS

REN Xiuhua, DU Guang, YANG Hui, LIU Dong* (Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rapid and sensitive HPLC-MS method for simultaneous quantitative determination of carbamazepine(CBZ) and phenytoin(PT) in human plasma. **METHODS** Plasma samples were precipitated with acetonitrile and determined by HPLC-MS using lansoprazole as an internal standard. The separation was carried out on a Diamonsil C₁₈ column(2.1 mm×150 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-water(including 0.1% formic acid)(0.20 : 0.10) and with a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. ESI was performed in the MRM positive mode using target ions at *m/z* 237.0/194.0(CBZ), 253.2/182.0(PT), and 392.0/188.2(lansoprazole), respectively. **RESULTS** The RSD of average recovery rate for CBZ on three levels of concentration of low(66.08 ng·mL⁻¹), medium (660.8 ng·mL⁻¹) and high (16 120 ng·mL⁻¹), were <15%. The calibration curves of CBZ was obtained in the range of 40.3-20 150.0 ng·mL⁻¹(*r*=0.993 7) with good linearity. The low limit of quantitation was 40.3 ng·mL⁻¹. Meanwhile, the RSD of average recovery rate for PT on three levels of concentration of low (133.5 ng·mL⁻¹), medium (1 335.00 ng·mL⁻¹) and high (32 040.00 ng·mL⁻¹), were also <15%. The calibration curves for PT was obtained in the range of 80.1-40 050.0 ng·mL⁻¹(*r*=0.997 6) with good linearity. The low limit of quantitation was 80.1 ng·mL⁻¹. **CONCLUSION** The method provides a sensitive, accurate, precise and reliable analytical procedure for the therapeutic drug monitoring of CBZ and PT simultaneously in clinic and pharmacokinetic studies.

KEY WORDS: carbamazepine; phenytoin; HPLC-MS; therapeutic drug monitoring

卡马西平(carbamazepine, CBZ)、苯妥英钠(phenytoin, PT)是临床常用的抗癫痫药,由于各药的药理作用及临床指征不同,临床常联合用药以获得最佳治疗效果。CBZ和PT具有自身诱导作用,体内处置过程复杂,存在较大个体差异。同时,CBZ和PT治疗浓度范围窄,抗癫痫作用和不良反应与血药浓度密切相关,长期服用不良反应较多,易产生耐药性。因此常规监测其血药浓度,有助于实现给药剂量个体化^[1-2]。目前国内外测定CBZ及PT血药浓度的方法主要有荧光偏振免疫法(FPIA)^[3]、酶增强免疫法(EMIT)、放射免疫分析法(RIA)、气相色谱法(GC)、和高效液相色谱法(HPLC)^[4]、毛细管电泳法^[5-6]、高效液相-质谱联用法(HPLC-MS)^[7]。其中免疫法在临床血药浓度监测(TDM)中较为常用但测定成本高,试剂盒有效期短,且代谢产物可能干扰测定。HPLC的主要缺点是检测限太高,因此需要用有机溶剂提取,再吹干浓缩,增加了处理步骤。HPLC-MS的高特异性、高灵敏度、分析时间短使其用来监测CBZ及PT的血药浓度显得更为经济、适用。因此,本试验建立同时测定人血浆中CBZ及PT浓度的HPLC-MS法,以期为临床血药浓度监测提供更为经济、适用、方便的方法,同时可为FPIA或EMIT法的一个重要补充。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津), SIL-20ACHT 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱。MS/MS 系统[美国 API3200 型质谱仪,配有电喷雾离子化源(ESI)]。数据采集: API3200 Analysis 15.0 软件(美国 AB 公司)。AB-265S 型精密天平(日本梅特勒公司),漩涡混合器(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 药品与试剂

CBZ 对照品(中国食品药品检定研究院,批号: 100142-201004; 供含量测定用); PT 对照品(中国食品药品检定研究院,批号: 100210-201002; 供含量测定用); 兰索拉唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号: 100709-200902; 供含量测定用); 色谱纯甲醇和乙腈(Tedia 公司); 甲醇(分析纯)天津标准科技有限公司; 分析纯甲酸(天津市东丽区科技有限公司); 试验用水(Milli-Q 超纯水)。

1.3 对照品和内标溶液的配制

对照品溶液: 分别精密称取 CBZ、PT 对照品 41.3, 133.5 mg, 分别置于 50, 100 mL 量瓶, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得 CBZ (826 μg·mL⁻¹)储备液、PT(1.335 mg·mL⁻¹)储备液, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

内标溶液配制: 精密称取 29.2 mg 兰索拉唑对

照品,置于 100 mL 量瓶中,配成浓度为 $292 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液,取储备液 5 mL 稀释至 25 mL,配成浓度为 $58.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标工作液。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

色谱柱: Diamonsil C_{18} 柱(2.1 mm \times 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(含 0.1%甲酸)=0.20 : 0.10; 流速: $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 自动进样器温度: $15 \text{ }^\circ\text{C}$; 柱温: $40 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量: $5 \mu\text{L}$ 。采用 ESI-MRM 方式监

测; 毛细管电压: 4.5 kV ; 源温度: $450 \text{ }^\circ\text{C}$; 锥孔气体流速: $40 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; 去溶剂气体流速: $40 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; 气帘气流速: $25 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; EP 5.0。

CBZ 质谱条件: m/z 237.0/194.0; DP 40 V; EP 5 V; CE 24 V; CXP 5 V; PT 质谱条件: m/z 253.2/182.0; DP 30 V; EP 7 V; CE 25 V; CXP 5 V; 兰索拉唑质谱条件: m/z 392.0/188.2; DP 70 V; EP 6 V; CE 25 V; CXP 4 V。

CBZ、PT 和兰索拉唑的碎片离子质谱图见图 1。

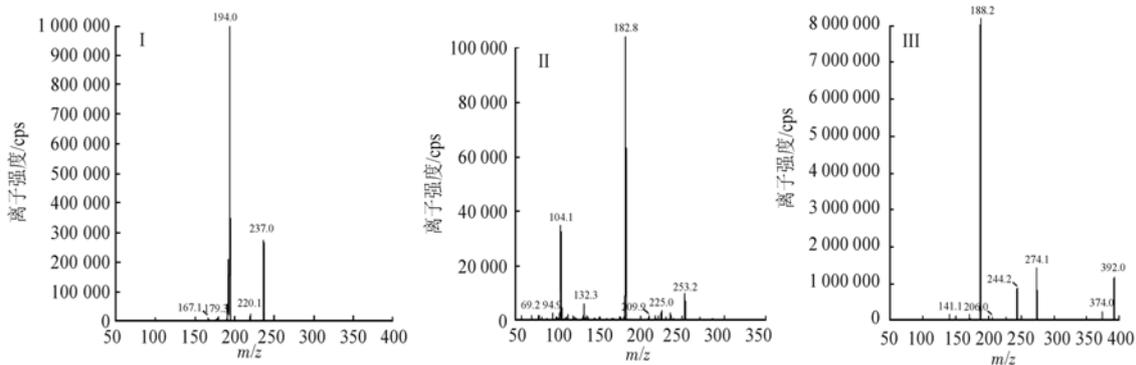


图 1 产物离子扫描质谱图

I-CBZ; II-PT; III-兰索拉唑

Fig 1 Full-scan production spectra chromatograms

I-CBZ; II-PT; III-lansoprazole

2.2 样品预处理

取血浆样品 $200 \mu\text{L}$, 加入 $58.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标兰索拉唑 $20 \mu\text{L}$, 混匀, 加入 $400 \mu\text{L}$ 乙腈, 涡漩混合 1 min, $16\ 600 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液 $5 \mu\text{L}$ 进样。

2.3 专属性试验

取空白血浆 $200 \mu\text{L}$, 除不加内标外, 按“2.2”项下方法操作, 得空白血浆样品色谱图。将一定浓度 CBZ-PT 混合对照品溶液和内标溶液加入空白血浆中, 同法操作获得色谱图。CBZ、PT 和内标兰索拉唑保留时间分别约为 2.81, 2.45, 2.65 min。取临床患者口服 CBZ 和 PT 后收集的血浆样品, 按照“2.2”项下方法操作, 得色谱图。结果表明, 分别为从色谱图中可以看出, 空白血浆中内源性物质不干扰测定 CBZ、PT 和内标兰索拉唑, 本法具有较高的专属性。结果见图 2。

2.4 标准曲线的制备及定量下限的确定

取空白血浆 $180 \mu\text{L}$, 分别加入 CBZ 和 PT 对照品溶液 $20 \mu\text{L}$, 配制成相当于 CBZ 血浆浓度为 40.30, 66.08, 201.50, 660.80, 2 015.00, 6 608.00 和 20 150.00 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; PT 血浆浓度为 80.10, 133.50, 400.50, 1 335.00, 4 005.00, 13 350.00,

$40\ 050.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品。按“2.2”项下操作, 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权($W=1/C^2$)最小二乘法进行回归运算, 绘制标准曲线, 得到 CBZ 和 PT 直线回归方程分别为: $Y=0.003\ 94X+0.056\ 3$, $r=0.993\ 7$; $Y=0.000\ 411X+0.009\ 25$, $r=0.997\ 6$; 二者血浆中最低定量下限分别可达 40.3, 80.10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $S/N>10$ 。平行对 5 个同时含 $40.30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ CBZ 和 $80.10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT 的血浆样品处理后进行色谱分析, 得 CBZ 方法回收率平均为 93.78%, RSD 为 6.29%; PT 方法回收率平均为 92.58%, RSD 为 5.71%。2 种药物最低定量下限回收率 RSD 均 $<15\%$ 。

2.5 精密度与回收率试验

分别配制低(CBZ $66.08 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, PT $133.50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中(CBZ $660.80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, PT $1\ 335.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高(CBZ $16\ 120.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, PT $32\ 040.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)3 个浓度的血浆对照品各 15 份, 分为 3 批, 每批 5 份, 并与每批的标准曲线同时按“2.2”项下操作, 计算质控样品的测得浓度, 与配制浓度对照, 求得本法的相对回收率、日内精密度、日间精密度, 2 种药物的相对回收率 RSD 均 $<15\%$, 结果见表 1。

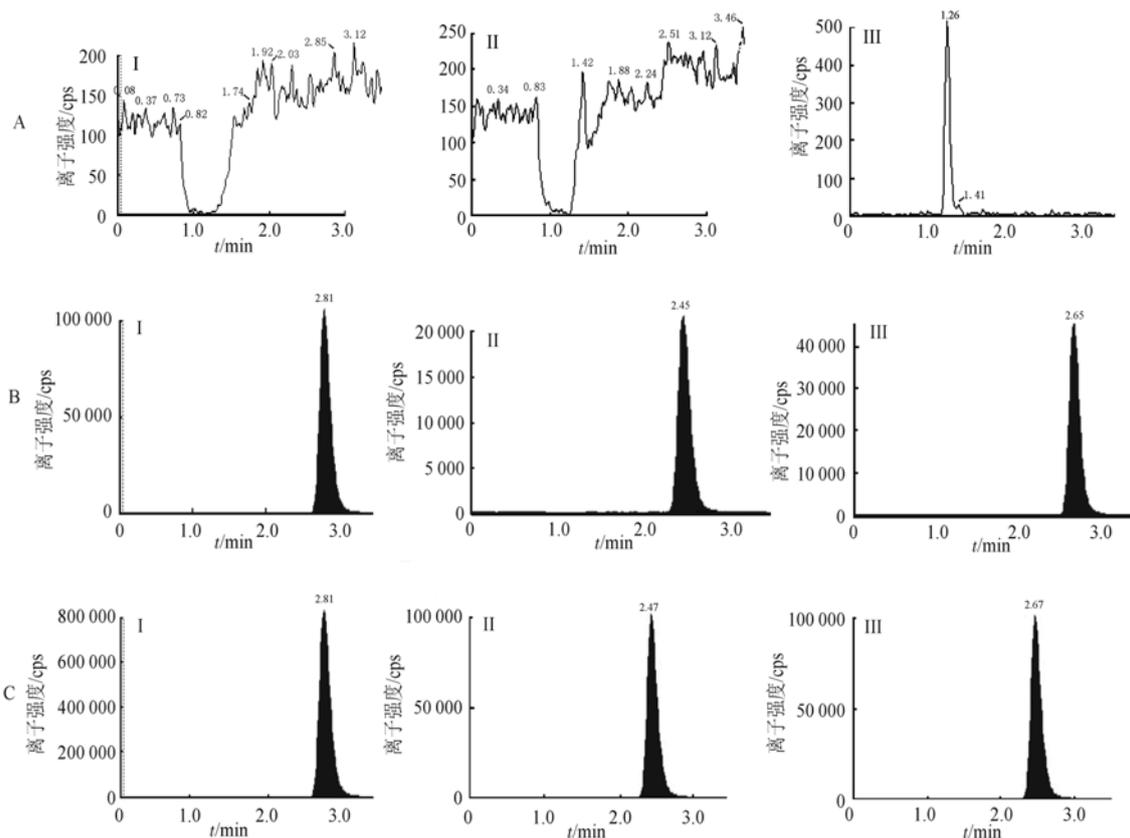


图 2 CBZ、PT 的人血浆 HPLC-MS 色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+对照品; C-患者血浆样品; I-CBZ; II-PT; III-兰索拉唑

Fig 2 Representative HPLC-MS chromatograms for CBZ and PT in human plasma

A-blank plasma; B-blank plasma+reference substance; C-sample; I-carbamazepine; II-phenytoin; III-lansoprazole

表 1 CBZ 和 PT 相对回收率与日内、日间精密性($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Recovery rate and intra-day and inter-day precision of CBZ and PT($\bar{x} \pm s$)

加入浓度/ g·mL ⁻¹	日内精密性			日间精密性		
	实测浓度/ng·mL ⁻¹	RSD/%	相对回收率/%	实测浓度/ng·mL ⁻¹	RSD/%	相对回收率/%
66.08	60.49±2.21	3.65	91.54±3.34	59.90±2.26	3.77	90.65±3.42
CBZ 660.80	693.67±18.50	2.67	104.97±2.80	707.80±9.98	1.41	107.11±1.51
16 120.00	14 340.00±443.69	3.09	88.96±2.75	14 520.00±580.52	4.00	90.65±3.60
133.50	123.93±7.76	6.26	92.83±5.81	129.00±3.67	2.85	96.63±2.75
PT 1 335.00	1 349.33±52.71	3.91	101.07±3.95	1380.00±36.06	2.61	103.37±2.70
32 040.00	30 126.67±931.56	3.09	94.03±2.91	29 600.00±324.04	1.09	92.38±1.01

以血浆质控样本 CBZ, PT 和兰索拉唑峰面积除以相应浓度的标准溶液峰面积计算绝对回收率。CBZ 低(66.08 ng·mL⁻¹)、中(660.80 ng·mL⁻¹)、高(16 120.00 ng·mL⁻¹)3 种浓度的绝对回收率分别为 101.88%, 102.72%、89.03%; PT 低(133.50 ng·mL⁻¹)、中(1 335.00 ng·mL⁻¹)、高(32 040.00 ng·mL⁻¹)分别为 102.07%、103.28%, 89.44%; 内标兰索拉唑的绝对回收率为 98.49%。

2.6 基质效应考察

取空白血浆 180 μ L, 加入 400 μ L 乙腈, 涡漩

震荡 1 min, 16 600 r·min⁻¹ 离心 10 min, 转移上清 780 μ L 至另一 EP 管中, 再加入 58.4 μ g·mL⁻¹ 内标兰索拉唑 20 μ L, 以及 CBZ 和 PT 低、中、高浓度各 20 μ L 后混匀(每个浓度各 5 管), 5 μ L 进样, 得峰面积, 并与相应浓度的对照品溶液直接进样的面积比较, 计算基质效应。CBZ 低(66.08 ng·mL⁻¹)、中(660.80 ng·mL⁻¹)、高(16 120.00 ng·mL⁻¹)3 种浓度平均基质效应分别为 99.40%, 98.58%, 97.55%, PT 低(133.50 ng·mL⁻¹), 中(1 335.00 ng·mL⁻¹), 高(32 040.00 ng·mL⁻¹)3 种浓度平均基质效应分别为

97.34%, 97.44%, 97.47%; 内标兰索拉唑的平均基质效应为 91.21%; 表明基质基本不干扰检测。

2.7 稳定性考察

2.7.1 室温放置 4 h 稳定性考察 配制低(CBZ 66.08 ng·mL⁻¹, PT 133.50 ng·mL⁻¹)、中(CBZ 660.80 ng·mL⁻¹, PT 1 335.00 ng·mL⁻¹)、高(CBZ 16 120.00 ng·mL⁻¹, PT 32 040.00 ng·mL⁻¹)对照品血浆各 5 份, 室温放置 4 h, 按“2.2”项下方法进行处理测定, 计算三者浓度, 结果 CBZ 和 PT 低、中、高 3 种浓度的 RSD 均<5.0%, 表明 CBZ 和 PT 血浆样品室温放置 4 h 稳定。结果见表 2。

2.7.2 冻融条件下的稳定性 配制低(CBZ 66.08 ng·mL⁻¹, PT 133.50 ng·mL⁻¹)、中(CBZ 660.80 ng·mL⁻¹, PT 1 335.00 ng·mL⁻¹)、高(CBZ 16 120.00 ng·mL⁻¹, PT 32 040.00 ng·mL⁻¹)对照品血浆各 5 份, 在 24 h 内 25~ -80 °C 之间反复冻融 4 次, 按“2.2”项下方法进行处理测定, 计算三者浓度, 结果 CBZ 和 PT 低、中、高 3 种浓度的 RSD

均<4.2%, 说明 CBZ 和 PT 在冻融 4 次循环条件下稳定。结果见表 2。

2.7.3 HPLC-MS 中放置 6 h 稳定性考察 配制(CBZ 66.08 ng·mL⁻¹, PT 133.50 ng·mL⁻¹)、中(CBZ 660.80 ng·mL⁻¹, PT 1 335.00 ng·mL⁻¹)、高(CBZ 16 120.00 ng·mL⁻¹, PT 32 040.00 ng·mL⁻¹)对照品血浆各 5 份, 按“2.2”项下进行处理, 置于自动进样器中放置 6 h 后测定, 结果显示低、中、高 3 种浓度的 RSD 均<3.56%, 表明 CBZ 和 PT 血浆样品处理 6 h 后稳定。结果见表 2。

2.7.4 长期稳定性 配制(CBZ 66.08 ng·mL⁻¹, PT 133.50 ng·mL⁻¹)、中(CBZ 660.80 ng·mL⁻¹, PT 1 335.00 ng·mL⁻¹)、高(CBZ 16 120.00 ng·mL⁻¹, PT 32 040.00 ng·mL⁻¹)对照品血浆各 5 份, 置于 -80 °C 冷冻保存 1 个月后, 取出按“2.2”项下方法处理, 结果显示低、中、高 3 种浓度的 RSD 均<3.46%, 表明 CBZ 和 PT 血浆样品 -80 °C 冷冻保存 1 个月后稳定。结果见表 2。

表 2 稳定性测定结果(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Determination of stability(n=5, $\bar{x} \pm s$)

	添加值/ ng·mL ⁻¹	室温放置 4 h 稳定性		冻融 4 次循环稳定性		HPLC-MS-6 h 稳定性		1 个月稳定性	
		实测浓度/ng·mL ⁻¹	RSD/%						
CBZ	66.08	59.64±1.83	3.07	62.24±1.93	3.10	61.70±2.20	3.56	60.88±1.51	2.49
	660.80	674.40±9.15	1.36	697.00±11.07	1.59	706.60±6.73	0.95	692.00±8.00	1.16
	16 120.00	14 480.00±327.11	2.26	14 480.00±327.10	1.78	14 280.00±443.80	3.11	14 400.00±406.20	2.82
PT	133.50	121.60±4.04	3.32	124.20±5.22	4.20	135.40±5.82	4.30	121.00±4.18	3.46
	1 335.00	1 380.00±30.00	2.17	1 358.00±30.33	2.23	1 370.00±20.00	1.46	1 374.00±16.73	1.22
	32 040.00	30 360.00±1379.49	4.54	30 640.00±415.93	1.36	29 880.00±1 294.90	4.33	31 760.00±702.00	2.21

2.7.5 储备液稳定性 配制 CBZ(826 μg·mL⁻¹)、PT(1.335 mg·mL⁻¹)、兰索拉唑(292 μg·mL⁻¹)储备液, 分别置冰箱中(4 °C)放置 30 d 后, 取出用甲醇稀释至一定浓度的对照品混合液(CBZ 220.60 ng·mL⁻¹、PT 445.00 ng·mL⁻¹、兰索拉唑 1946.67 ng·mL⁻¹)直接测定(平行操作 5 份), 得峰面积 A₁, 与新配溶液的测定结果 A₂ 进行比较, 以外标法计算储备液的含量, 结果 CBZ、PT、兰索拉唑三种储备液分别为标示量的 98.26%, 97.33%, 95.69%, 表明 3 种储备液 4 °C 冷藏 30 d 稳定。

2.8 临床血药浓度监测

监测 16 例使用抗癫痫药物患者的血药浓度, 男 11 例, 女 5 例, 年龄 16~65 岁, 其中 CBZ 合用 PT 2 例。于次日服药前抽取患者肘静脉血样

3 mL, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 分离血浆置于 -80 °C 保存至 HPLC-MS 分析。按“2.2”项下处理样品, 按“2.1”项色谱条件进样分析, 分别代入当天的随行标准曲线, 计算实测浓度, 测得 CBZ 血药浓度 0.1~8.81 μg·mL⁻¹, PT 0.22~34.10 μg·mL⁻¹。按单药治疗的有效血药浓度范围 CBZ 4~12 μg·mL⁻¹, PT 10~20 μg·mL⁻¹ 统计, 有 81.8% 的 CBZ 的血药浓度值在治疗窗内, PT 仅有 1 例在治疗窗内(14.3%)。

3 讨论

有文献报道采用 HPLC-UV 同时测定 CBZ、PT 和苯巴比妥人血药浓度, 血浆样本的处理多采用有机溶剂提取法, 操作过程较繁琐, 比较费时费力, 且需消耗过多的样品^[2-4]。而 HPLC-MS 将

HPLC的强分离能力与MS的高灵敏和强专属性结合,用乙腈沉淀蛋白,取上清液过滤直接进样,大大简化了样本处理的过程,同时取血量少,实用性较好。戴博等^[7]采用HPLC-MS同时测定苯巴比妥、丙戊酸钠、PT和CBZ的血药浓度,文中采用正负离子模式同时监测,对4种成分进行了有效的测定。笔者曾摸索4种成分的质谱条件,发现苯巴比妥、丙戊酸钠适宜在负离子模式下监测。由于API3200系统未满足同时正负离子监测模式,因此采用正离子模式同时测定CBZ、PT的人血药浓度,在本实验条件下,以兰索拉唑为内标,样品和内标的保留时间均较短,除样品峰外,没有其他杂质峰干扰。血浆样品预处理简单,进样量少,检测限低,适合临床CBZ、PT血药浓度监测,同时为CBZ、PT药动学研究提供一种准确、可靠、简便的测定方法。

本实验监测16例患者,9例为单用CBZ,且药物浓度均在CBZ的有效治疗浓度范围内;5例单用苯妥英钠,仅1例在治疗窗内,1例超出治疗窗,3例低于最低有效治疗浓度;另2例为2种药物联合应用,CBZ均低于其最低有效治疗浓度,PT1例低于最低有效治疗浓度,1例超限。临床癫痫治疗多主张单一用药,单药难以控制的患者则需联合使用抗癫痫药物,此时应考虑药物间相互作用对药动学参数的影响。CBZ、PT均为肝药酶诱导剂,合用时可加快其他药物或自身的清除率,使半衰期缩短,血药浓度下降,本实验临床监测结果与文献报道一致^[1]。此外,CBZ与PT具有相

同的神经系统不良反应,合用时低浓度也会发生中毒反应。因此,联合用药时更应重视监测各个药物的浓度,并根据测定结果和临床表现制定个体化给药方案,尽可能达到安全、有效、经济的合理用药目的。

REFERENCES

- [1] MA W B. Induction effect of antiepileptic drugs combined on hepatic drug metabolizing enzyme [J]. Mod Pract Med(现代实用医学), 2011, 23(6): 711-713.
- [2] YAN J, QIN Q, ZHANG T, et al. A study on the relations of serum concentration of carbamazepine, phenytoin and phenobarbital to adverse reactions and to therapeutic efficacy [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2011, 31(7): 580-584.
- [3] CHENG Z, GUO R C, WANG B J, et al. Determination and comparison of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin in human serum by HPLC and FPIA methods [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2008, 43(12): 950-954.
- [4] ZHANG X C, XU Y Y. Simultaneous determination of phenobarbital, phenytoin, CBZ, and theophylline in human plasma by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2005, 25(11): 1096-1097.
- [5] LIU Y H, YANG X H. Determination of serum concentrations of phenobarbital, phenytoin sodium and carbamazepine by MEKC [J]. J China Pharm(中国药房), 2008, 19(5): 348-349.
- [6] JI S G, WANG C Y, LIU C H, et al. Simultaneous determination of theophylline, phenobarbital, sodium phenytoin and carbamazepine in plasma by Capillary ElectroPhoresis [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2005, 25(10): 1173-1175.
- [7] DAI B, ZHANG H F, SONG Q, et al. Determination the concentrations of phenobarbital, sodium valproate, phenytoinsodium and carbamazepine in human plasma for simultaneous quantification by HPLC-MS [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2011, 27(3): 213-215.

收稿日期: 2013-03-30

HPLC-MS/MS 测定地高辛片中羟基洋地黄毒苷和洋地黄毒苷的含量

朱建喜¹, 庄波阳^{2*}, 王凌³, 林敏² (1.南京军区福州总医院九五临床部药械科, 福建 莆田 351100; 2.福建省药品检验所, 福州 350001; 3.福建医科大学省立临床学院, 福建省立医院药学部, 福州 350001)

摘要: 目的 采用HPLC-MS/MS建立同时测定地高辛片中羟基洋地黄毒苷和洋地黄毒苷的方法。方法 色谱柱 Agilent C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(40:60), 三重四极杆串联质谱检测, 电喷雾离子化源(ESI), 在负离子条件下以多反应监测(MRM)方式进行扫描定量。结果 羟基洋地黄毒苷浓度在0.025 65~2.565 μg·mL⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系, *r*为0.999 3; 洋地黄毒苷浓度在0.025 95~2.596 μg·mL⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系, *r*为0.999 8; 羟基洋地黄毒苷平均加样回收率为99.7%, RSD=2.2%; 洋地黄毒苷平均加样回收率为100.9%, RSD=2.3%。结论 本方法简便、准确可靠, 适用于地高辛片中羟基洋地黄毒苷和洋地黄毒苷两个主要有关物质的控制。

作者简介: 朱建喜, 男, 主管药师 Tel: 13599556375 E-mail: 13599556375@vip.163.com *通信作者: 庄波阳, 男, 硕士, 药师 Tel: 13489942115 E-mail: zhuangboyang0@yahoo.com.cn