

人血浆中左乙拉西坦和卡马西平同时测定方法的建立[△]

史敏^{1,2*},任炳楠²,吴惠珍²,刘平¹,吴茵^{1,2#}(1.河北医科大学研究生学院,石家庄 050017;2.河北省人民医院药学部,石家庄 050051)

中图分类号 R969.1;R971⁺.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)08-0987-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.08.14



摘要 目的 建立同时测定人血浆中左乙拉西坦和卡马西平浓度的方法。方法 血浆样品经甲醇沉淀蛋白后,以卡马西平-D10为内标,采用高效液相色谱-串联质谱法测定其中左乙拉西坦和卡马西平的浓度。以XBridge BEH C₁₈为色谱柱,以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为0.35 mL/min,柱温为40℃,进样量为2 μL;离子源为电喷雾离子源,采用多反应监测模式进行正离子扫描,用于定量分析的离子对分别为 m/z 171.3→126.3(左乙拉西坦)、 m/z 237.1→194.1(卡马西平)、 m/z 247.1→204.1(内标)。结果 左乙拉西坦和卡马西平检测质量浓度的线性范围分别为0.5~50、0.2~20 μg/mL(r 分别为0.997 3、0.998 5),定量下限分别为0.5、0.2 μg/mL;日内、日间RSD均不高于10.00%,日内、日间RE均在±4.00%之内,平均提取回收率为95.60%~105.00%,平均内标校正基质因子为98.40%~110.00%,稳定性试验的RSD均不高于5.60%。采用该法测得22例患者血浆中左乙拉西坦、卡马西平的浓度分别为3.36~40.90、3.64~9.93 μg/mL。结论 所建同时测定人血浆中左乙拉西坦、卡马西平浓度的高效液相色谱-串联质谱法快速、灵敏、准确、稳定,可用于癫痫患者血药浓度监测和药动力学研究。

关键词 左乙拉西坦;卡马西平;血药浓度;高效液相色谱-串联质谱法

Establishment of the method for simultaneous determination of levetiracetam and carbamazepine in human plasma

SHI Min^{1,2}, REN Bingnan², WU Huizhen², LIU Ping¹, WU Yin^{1,2}(1. Graduate School, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Dept. of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the method for simultaneous determination of levetiracetam and carbamazepine concentrations in human plasma. **METHODS** After plasma samples were precipitated with methanol, using carbamazepine-D10 as the internal standard, the concentrations of levetiracetam and carbamazepine were determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The determination was performed on XBridge BEH C₁₈ column with methanol-0.1% formic acid as mobile phase (gradient elution) at the flow rate of 0.35 mL/min. The column temperature was set at 40℃, and sample size was 2 μL. With electrospray ion source, a multiple reaction monitoring mode was used for positive ion scanning; the detected ion pairs for quantitative analysis were m/z 171.3→126.3 (levetiracetam), m/z 237.1→194.1 (carbamazepine), 247.1→204.1 (internal standard). **RESULTS** The linear range of the concentrations of levetiracetam and carbamazepine were 0.5-50 and 0.2-20 μg/mL ($r=0.997\ 3$ and $0.998\ 5$), respectively; the lower quantitative limits were 0.5 and 0.2 μg/mL, respectively. RSDs of intra-day and inter-day were all no more than 10.00%. RE of intra-day and inter-day were within ±4.00%; the average extraction recoveries rate were 95.60%-105.00%; the average internal standard correction matrix factors were 98.40%-110.00%; RSDs of stability tests were all not higher than 5.60%. The concentrations of levetiracetam and carbamazepine in the plasma of 22 patients measured by this method were 3.36-40.90 and 3.64-9.93 μg/mL, respectively. **CONCLUSIONS** The established method for determining the concentration of levetiracetam and carbamazepine in human plasma is fast, sensitive, accurate and stable, and can

[△] 基金项目:中国博士后科学基金面上资助项目(No.2018M641-609)

* 硕士研究生。研究方向:临床药学。E-mail:shimin140603@163.com

通信作者:副主任药师,硕士生导师,博士。研究方向:临床药学。E-mail:wuyin82@163.com

be used for the monitoring of plasma concentration and pharmacokinetic study in epilepsy patients.

KEYWORDS levetiracetam; carbamazepine; plasma concentration; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

卡马西平为传统抗癫痫药,可用于治疗癫痫大发作和复杂部分性发作,且对精神运动性发作的疗效较好,还可用于治疗三叉神经痛和舌咽神经痛,是临床上较常用的广谱抗癫痫药^[1]。但由于该药的治疗窗窄、个体差异大、疗效及不良反应与血药浓度密切相关,所以临床常需要对其进行治疗药物监测以帮助提高疗效或降低不良反应发生率^[2]。左乙拉西坦为第二代广谱抗癫痫药,可有效控制部分顽固性癫痫发作,其药动学参数与剂量成线性相关,且药物间相互作用较小^[3]。但相关研究指出,对于特殊人群尤其是危重患者和孕妇、儿童、老年患者,仍需对其血药浓度进行监测^[4]。抗癫痫治疗常采用多药联合以提高疗效,《抗癫痫药应用专家共识》指出,对于症状性部分性癫痫发作的患者,临床可使用左乙拉西坦联合卡马西平治疗^[5]。临床实践表明,两药联合可协同增效,能以不同作用机制抑制癫痫发作,从而降低患者的发作频率,并有效改善其认知水平^[6]。癫痫治疗的个体差异大,联合用药方案易受患者年龄、体质量等自身因素的影响,故为确保患者用药的安全性和有效性,在临床治疗中需要开展及时、准确的治疗药物监测,定期检测患者体内的药物浓度,为制订最优的个体化给药方案提供依据。目前,抗癫痫药血药浓度常用的检测方法有均相酶免疫法、高效液相色谱法和液质联用法,但上述方法耗时长且操作复杂^[7-10]。本文拟运用高效液相色谱-串联质谱(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)法同时测定人血浆中左乙拉西坦和卡马西平的浓度,以期为两药联合个体化方案的制订和药动学的研究提供技术支持。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LC-20AD型高效液相色谱系统及AB Sciex Triple Quad 3200MD型串联三重四极杆质谱仪(日本Shimadzu公司),XW-80A型旋涡混合器(上海精科实业有限公司),KQ5200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),TGL-16M型高速离心机

(湖南湘仪实验仪器开发有限公司),NewClassic型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)等。

1.2 主要药品与试剂

左乙拉西坦对照品(批号15J-SPF-82-1,纯度98.7%)购自美国Panphy Chemicals公司;卡马西平对照品(批号100142-201105,纯度99.7%)购自中国食品药品检定研究院;卡马西平-D10对照品(内标,批号L-072,纯度99.4%)购自加拿大TLC Pharmaceutical Standards公司;甲醇、甲酸(批号分别为1140207、F0167,均为色谱纯)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

1.3 血浆

健康人空白血浆由河北省人民医院体检中心提供,样本血浆为河北省人民医院门诊及住院患者检测样本(医学伦理批件号2022046)。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 以XBridge BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm,2.5 μm)为色谱柱,以甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~0.3 min,15% A;0.3~1.5 min,15% A→95% A;1.5~3.6 min,95% A;3.6~3.8 min,95% A→15% A);流速为0.35 mL/min;柱温为40℃;进样器温度为4℃;进样量为2 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源,离子源温度为550℃;以多反应监测模式进行正离子扫描;离子源喷射电压为5 500 V;雾化气压力为55 psi;加热气压力为50 psi;气帘气压力为20 psi;用于定量分析的离子对分别为 m/z 171.3→126.3(左乙拉西坦)、 m/z 237.1→194.1(卡马西平)、 m/z 247.1→204.1(内标),解簇电压均为110 V,碰撞能量分别为18、15、15 V。左乙拉西坦、卡马西平以及内标的二级全扫描质谱图见图1。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取左乙拉西坦、卡马西平对照品各适量,分别置于5 mL容量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成上述成分质量浓度分别为1、0.4

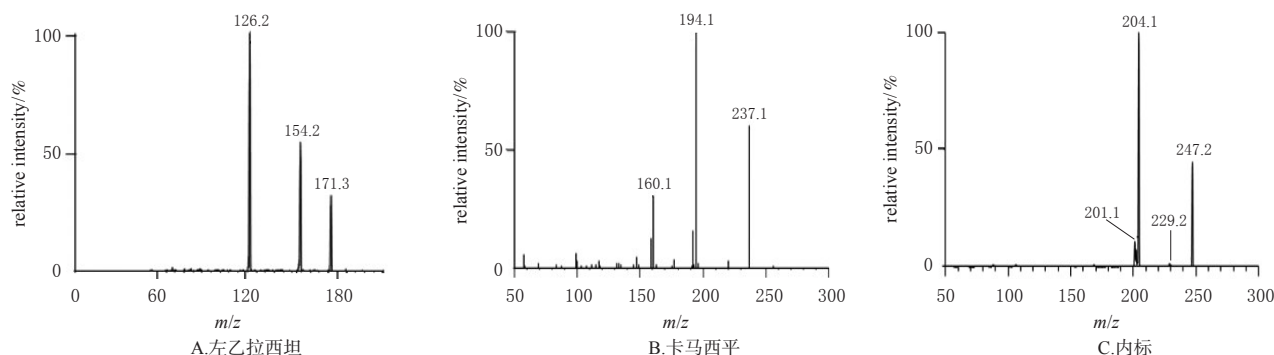


图1 左乙拉西坦、卡马西平和内标的二级全扫描质谱图

mg/mL的对照品储备液,置于-20℃保存,备用。精密吸取上述对照品储备液适量,混合后用甲醇稀释成两者质量浓度分别为500、200 μg/mL的混合对照品工作液,再用甲醇稀释成左乙拉西坦质量浓度分别为350、250、100、50、10、5 μg/mL,卡马西平质量浓度分别为140、100、40、20、4、2 μg/mL的混合对照品工作液,备用;同法制得左乙拉西坦质量浓度分别为400、200、15、5 μg/mL,卡马西平质量浓度分别为160、80、6、2 μg/mL的混合质控工作液,备用。

2.2.2 内标溶液 精密量取二甲基亚砜1 mL,精密加入卡马西平-D10对照品1.04 mg,溶解,摇匀,制成质量浓度为1.04 mg/mL的储备液。精密量取上述储备液适量,用甲醇稀释成质量浓度为290 ng/mL的内标溶液,置于4℃保存,备用。

2.3 血浆样品的处理

精密量取血浆样品10 μL,加入290 ng/mL的内标溶液90 μL,涡旋2 min,以12 000 r/min离心10 min,取上清液10 μL,加入50%甲醇90 μL稀释后,取2 μL进样分析。

2.4 专属性考察

分别取6份不同来源的空白血浆、空白血浆+混合

对照品溶液(左乙拉西坦质量浓度为0.5 μg/mL,卡马西平质量浓度为0.2 μg/mL)和样本血浆,按“2.3”项下方法处理(空白血浆不加入内标溶液),再按“2.1”项下测定条件进样分析,记录色谱图。结果显示,左乙拉西坦、卡马西平、内标色谱峰的峰形良好,保留时间分别约为2.5、3.2、3.2 min,内源性物质对各成分测定无明显干扰,表明方法专属性良好,其提取离子流图见图2。

2.5 线性关系与定量下限考察

取空白血浆90 μL,置于1.5 mL塑料离心管中,加入“2.2.1”项下混合对照品工作液10 μL,涡旋1 min,制成左乙拉西坦质量浓度分别为50、35、25、10、5、1、0.5 μg/mL,卡马西平质量浓度分别为20、14、10、4、2、0.4、0.2 μg/mL的模拟血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下测定条件进样分析,记录峰面积。以待测成分的质量浓度(x)为横坐标、待测成分与内标峰面积的比值(y)为纵坐标,根据最小二乘法(权重 $1/x^2$)进行线性回归,得左乙拉西坦的回归方程为 $y=0.1990x+0.0139$ ($r=0.9973$),卡马西平的回归方程为 $y=0.2940x+0.0407$ ($r=0.9985$),两者检测质量浓度的线性范围分别为0.5~50、0.2~20 μg/mL,定量下限分别为0.5、0.2 μg/mL。

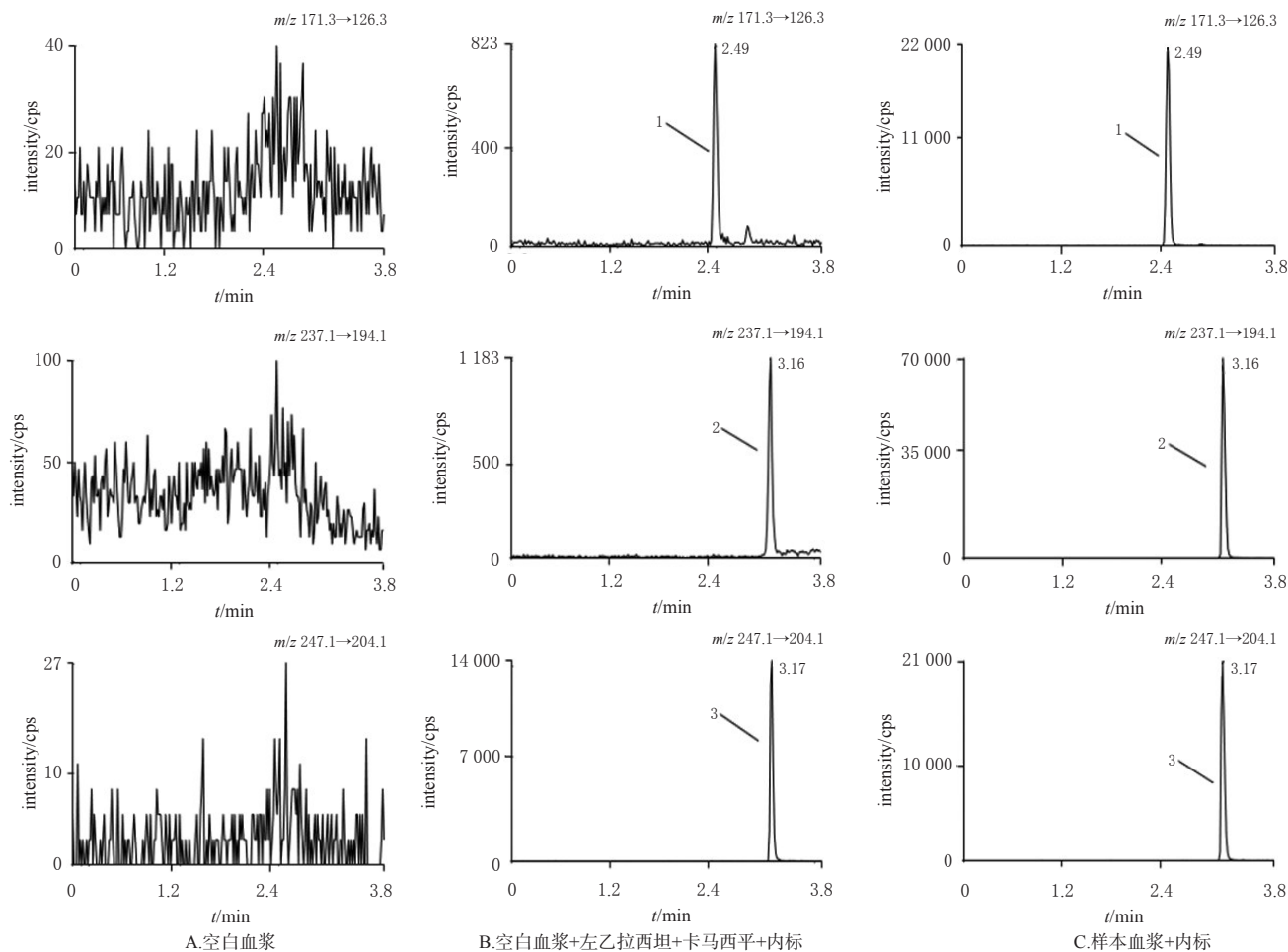


图2 左乙拉西坦和卡马西平定量分析的提取离子流图

2.6 精密度与准确度试验

按“2.5”项下方法配制左乙拉西坦定量下限(0.5 μg/mL)和低、中、高质量浓度(1.5、20、40 μg/mL),卡马西平定量下限(0.2 μg/mL)和低、中、高质量浓度(0.6、8、16 μg/mL)的模拟血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下测定条件进样分析,每个质量浓度平行测定6份,计算日内精密度(以RSD表示);连续测定3 d,计算日间精密度(以RSD表示)。根据随行标准曲线计算血浆样品中左乙拉西坦、卡马西平的质量浓度,以实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,计算准确度(以RE表示)。结果见表1。

表1 左乙拉西坦和卡马西平定量分析的精密度、准确度和提取回收率试验结果

待测成分	理论质量浓度/ (μg/mL)	日内(n=6)				日间(n=3)				提取回收率(n=6)	
		实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ (μg/mL)	RSD/ %	RE/ %	实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ (μg/mL)	RSD/ %	RE/ %	结果($\bar{x} \pm s$)/ %	RSD/ %		
左乙拉西坦	0.5	0.49±0.02	4.08	-2.00	0.48±0.02	4.17	-4.00				
	1.5	1.44±0.05	3.47	-4.00	1.49±0.09	6.04	-0.67	95.60±5.65	5.91		
	20	19.63±0.37	1.88	-1.85	20.51±0.96	4.68	2.55	104.00±6.93	6.66		
	40	38.73±0.39	1.01	-3.18	40.25±1.50	3.73	0.63	105.00±4.94	4.70		
卡马西平	0.2	0.20±0.01	5.00	0	0.20±0.02	10.00	0				
	0.6	0.60±0.02	3.33	0	0.59±0.02	3.39	-1.67	100.90±3.54	3.51		
	8	8.29±0.15	1.81	3.63	8.24±0.13	1.58	3.00	102.00±3.91	3.83		
	16	16.37±0.16	0.98	2.31	16.31±0.40	2.45	1.94	102.30±2.78	2.72		

2.7 提取回收率试验

按“2.5”项下方法配制左乙拉西坦低、中、高质量浓度(1.5、20、40 μg/mL),卡马西平低、中、高质量浓度(0.6、8、16 μg/mL)的混合血浆质控样品,按“2.3”项下方法处理后,再按“2.1”项下测定条件进样分析,记录待测成分与内标峰面积比值 R_1 。另取空白血浆,按“2.3”项下方法处理(不加入内标)后,加入混合质控工作液及内标溶液(1 μg/mL,按“2.2.2”项下方法制得,下同)适量,获得与上述混合血浆质控样品中待测成分及内标相同质量浓度的样品,按“2.1”项下测定条件进样分析,记录待测成分与内标峰面积比值 R_2 。每个质量浓度平行测定6份,按下式计算提取回收率:提取回收率=(R_1 的平均值)/(R_2 的平均值)×100%,结果见表1。

2.8 基质效应考察

取6份来源不同的空白血浆,按“2.3”项下方法处理(不加入内标)得到空白基质,加入低、高质量浓度的混合质控工作液及内标溶液(1 μg/mL),按“2.1”项下测定条件进样分析,记录待测成分与内标峰面积。另用甲醇稀释低、高质量浓度的混合质控工作液,得到与上述样品质量浓度相同的样品,加入等量内标,按“2.1”项下测定条件进样分析,记录待测成分与内标峰面积。按下式计算内标校正基质因子:内标校正基质因子=[(有基质

存在时待测成分峰面积/无基质存在时待测成分峰面积)/(有基质存在时内标峰面积/无基质存在时内标峰面积)]×100%。结果显示,左乙拉西坦的平均内标校正基质因子为104.70%~110.00%(RSD≤5.03%, $n=6$),卡马西平的平均内标校正基质因子为98.40%~101.60%(RSD≤3.8%, $n=6$),提示左乙拉西坦和卡马西平的检测不受基质的影响。

2.9 稳定性试验

按“2.7”项下方法配制左乙拉西坦、卡马西平低、中、高质量浓度的混合血浆质控样品,按“2.3”项下方法处理,分别于处理前在-20℃下放置14 d、-20℃~室温循环冻融3次、室温放置24 h,处理后在进样器中放置24 h,再按“2.1”项下测定条件进样分析,每个条件平行测定6次,考察稳定性(以RSD表示)。结果见表2。

表2 左乙拉西坦和卡马西平定量分析的稳定性试验结果(n=6)

待测成分	理论质量浓度/ (μg/mL)	-20℃下放置14 d		循环冻融3次		室温放置24 h		进样器放置24 h	
		实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ (μg/mL)	RSD /%	实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ (μg/mL)	RSD /%	实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ (μg/mL)	RSD /%	实测质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/ (μg/mL)	RSD /%
左乙拉西坦	1.5	1.41±0.06	4.26	1.56±0.05	3.21	1.56±0.08	5.13	1.64±0.06	3.66
	20	18.15±0.47	2.59	19.40±0.37	1.91	20.80±0.70	3.37	21.73±0.68	3.13
	40	36.43±2.04	5.60	43.99±0.87	1.98	39.23±0.77	1.96	39.72±0.65	1.64
卡马西平	0.6	0.59±0.03	5.08	0.59±0.02	3.39	0.60±0.02	3.33	0.61±0.02	3.28
	8	8.24±0.11	1.33	8.24±0.15	1.82	8.18±0.09	1.10	8.41±0.35	4.16
	16	16.28±0.57	3.50	16.27±0.49	3.01	16.30±0.53	3.25	15.90±0.71	4.47

2.10 测定方法的应用

收集22例患者的样本血浆,其中单用左乙拉西坦的患者10例、单用卡马西平的患者10例、同时使用两种药物的患者2例,收集其全血至少1 mL(所有患者已连续服药1周并在下次服药前采集血样),置于含乙二胺四乙酸的采血管中,以3 500 r/min离心10 min后分离上层血浆,按“2.3”项下方法处理,再按“2.1”项下测定条件进样分析,根据随行标准曲线计算患者血浆中左乙拉西坦和卡马西平的浓度,每个样本检测1次,结果见表3。结果显示,所测血药浓度均在定量分析的线性范围内,左乙拉西坦的变异系数大,提示不同患者体内左乙拉西坦血药浓度的差异大。

表3 左乙拉西坦、卡马西平血药浓度测定结果

待测成分	n	结果($\bar{x} \pm s$)/ (μg/mL)	中位数/ (μg/mL)	最小值/ (μg/mL)	最大值/ (μg/mL)	四分位距/ (μg/mL)	变异系数/ %
左乙拉西坦	12	11.63±11.23	8.16	3.36	40.90	7.59	96.56
卡马西平	12	6.10±1.73	5.58	3.64	9.93	1.99	28.36

3 讨论

本文建立了同时测定左乙拉西坦、卡马西平血药浓度的HPLC-MS/MS法,该方法操作简单、分析时间短,3.8 min内即可完成对两种药物的快速分析,大大缩短了

检测时间,节省了检测成本。此外,建立治疗药物监测方法时还需要考虑临床的可操作性,特别是对于采血困难的患者(如儿童等特殊人群),开发可同时测定多种药物血药浓度的方法很有必要。本文所建立的方法仅使用10 μL血浆就可同时测定两种抗癫痫药的血液浓度,对于采血困难的患者也可顺利实施治疗药物监测。

卡马西平治疗窗窄,不良反应多,其推荐的治疗浓度监测范围为4~12 μg/mL^[11]。左乙拉西坦在特殊人群中的个体差异较大,其推荐的治疗浓度监测范围为20~40 μg/mL^[12]。本文建立的方法中左乙拉西坦、卡马西平的线性范围均可覆盖其有效治疗浓度范围,可用于抗癫痫联合用药方案的血液浓度检测。

本文采用的血浆样品前处理方法为蛋白沉淀法,与液液萃取法及固相萃取法等方法^[13-14]相比,蛋白沉淀法的操作简单,所用材料、试剂更少,所耗时间更短,更适用于临床治疗药物监测。本方法在沉淀蛋白后,离心取血浆样品上清液,用50%甲醇进一步稀释10倍后再进样分析,可减少基质效应对液质联用方法测定药物浓度的影响。

综上所述,本文成功建立了同时测定血浆中左乙拉西坦、卡马西平浓度的方法。该方法操作简便、分析快速、样品处理方法简单,适用于两药的血液浓度监测及药动学研究。

参考文献

[1] KISHORE P, RAJNARAYANA K, REDDY M S, et al. Validated high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of phenytoin, phenobarbital and carbamazepine in human serum[J]. *Arzneimittelforschung*, 2003, 53(11): 763-768.

[2] 毕重文, 杨丽, 李丹青, 等. UPLC-MS/MS法检测人血清中卡马西平浓度及其临床应用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(12): 1715-1718.

[3] LYSENG-WILLIAMSON K A. Levetiracetam: a review of its use in epilepsy[J]. *Drugs*, 2011, 71(4): 489-514.

[4] JARVIE D, MAHMOUD S H. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam in select populations[J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2018, 21(1s): 149s-176s.

[5] 中华医学会神经病学分会脑电图与癫痫学组. 抗癫痫药

物应用专家共识[J]. *中华神经科杂志*, 2011, 44(1): 56-65.

[6] 赵晓静. 左乙拉西坦联合卡马西平与托吡酯治疗难治性癫痫的临床效果和安全性[J]. *中国现代药物应用*, 2020, 14(22): 207-209.

[7] 高元峰, 欧阳林旗, 肖望重, 等. HPLC法外标法快速测定人血清中卡马西平的血液浓度[J]. *海峡药学*, 2020, 32(3): 49-52.

[8] 毕重文, 付广华, 李丹青, 等. 均相酶免疫法与液质联用法测定人血清中卡马西平浓度的比较[J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(18): 1852-1854, 1874.

[9] 王伟, 丁仁奎, 李清艳, 等. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中卡马西平、文拉法辛、罗格列酮和硝苯地平的浓度[J]. *中国药房*, 2018, 29(2): 194-198.

[10] KIM K B, SEO K A, KIM S E, et al. Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(4): 771-777.

[11] JI P, DAMLE B, XIE J D, et al. Pharmacokinetic interaction between efavirenz and carbamazepine after multiple-dose administration in healthy subjects[J]. *J Clin Pharmacol*, 2008, 48(8): 948-956.

[12] STEPANOVA D, BERAN R G. Measurement of levetiracetam drug levels to assist with seizure control and monitoring of drug interactions with other anti-epileptic medications (AEMs)[J]. *Seizure*, 2014, 23(5): 371-376.

[13] GHORABA Z, AIBAGHI B, SOLEYMANPOUR A. Application of cation-modified sulfur nanoparticles as an efficient sorbent for separation and preconcentration of carbamazepine in biological and pharmaceutical samples prior to its determination by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1063: 245-252.

[14] 邓利娟, 王峰, 林小小, 等. 在线固相萃取-HPLC法测定血清中卡马西平的血液浓度[J]. *海峡药学*, 2013, 25(11): 189-191.

(收稿日期: 2021-12-22 修回日期: 2022-03-24)

(编辑: 邹丽娟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅