

使用全自动前处理 LCMSMS 系统提高治疗药物监测的效率

对患者进行药物治疗时，通常对于给药管理困难的药物（如治疗效果范围窄或者中毒浓度范围与有效浓度范围相近）需要进行治疗药物监测（TDM: Therapeutic Drug Monitoring），即定量分析患者的血药浓度，根据药代动力学及药效学解析，对每位患者设计最佳的用药剂量及给药方法。传统的 TDM 分析方法主要使用高效液相色谱（HPLC）。近年来，为了提高分析准确度和精密度，开始使用具有出众选择性的液相色谱-质谱联用仪（LC/MS/MS）。在分析血清、血浆等样品时，通常需要进行除蛋白、稀释等前处理操作。在此过程中，由于操作人员技术水平的参差不齐而容易产生偏差或发生错误。并且，随着样品数量的增加，操作人员的作业负荷也随之增加。因此，在对大量样品进行测定的分析流程中，前处理操作显得十分重要。

本文使用全自动 LCMS 前处理 SCLAM-2000 和高效液相色谱-质谱联用仪 LCMS-8040 组合的全自动前处理 LC/MS/MS 系统，在解决上述 TDM 存在的问题基础上，更快速且高精度地进行 TDM 分析流程的示例。

1 实验部分

1.1 分析抗癫痫药

使用全自动前处理 LC/MS/MS 系统同时分析血清中的 7 种抗癫痫药及其活性代谢物。

1.1.1 仪器分析条件

色谱柱: Inertsil ODS-4 (2.1 mm I.D.×50 mm L., 2 μm)	柱温: 40℃
流动相: A 相-10mmol/L 醋酸铵-水溶液; B 相-甲醇	进样量: 1 μL
时间程序: B Conc. 3%(0-0.5min)-90%(3-5min)-3%(5.01-7min)	离子源接口电压: 4.5 kV/-3.5kV (ESI+/-)
流速: 0.4 mL/min	DL 温度: 150℃
	加热模块温度: 400℃
	雾化气: 3.0 L/min
	干燥气: 10 L/min

MRM 离子对: Levetiracetam(+) m/z171.15>126.10, Felbamate(+) m/z239.20>117.00, Carbamazepine-10,11-epoxide(+) m/z253.15>180.05, Carbamazepine(+) m/z237.20>194.05, Tiagabine(+) m/z376.25>111.05, Diazepam(+) m/z285.15>153.95, Topiramate(-) m/z338.10>78.00

1.1.2 前处理条件

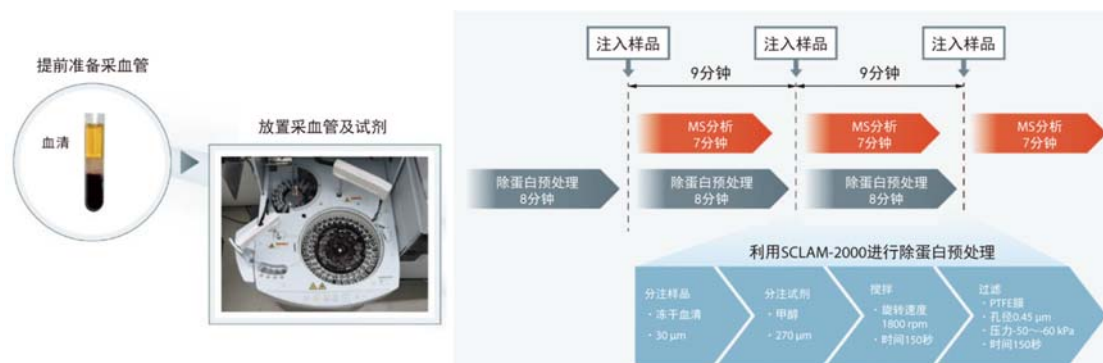


图 1 全自动前处理 LC/MS/MS 系统同时分析血清中的抗癫痫药的工作流程

对血清样品进行前处理时，通常需要添加有机溶剂以除蛋白，然后对固定成分进行离心分离，分取上清液。如果使用全自动前处理 LC/MS/MS 系统，只需放置采血管等，即可进行

前处理（如图 1），然后使用 LC/MS/MS 进行分析。因为 LC/MS/MS 分析和下一样品的前处理同时进行，所以可以大幅度地缩短每个样品所需要的测定时间，在本示例中，包括分析在内，每个样品只需要 9 min 的循环时间。

1.1.3 实验结果

图 2 为人血清中添加 7 种抗癫痫药和代谢物药物的加标样质谱图。因为 LC/MS/MS 可以根据目标药物的质量和结构，选择性地检测目标药物，所以由图 2 可知，未发现来自血清的杂质干扰。

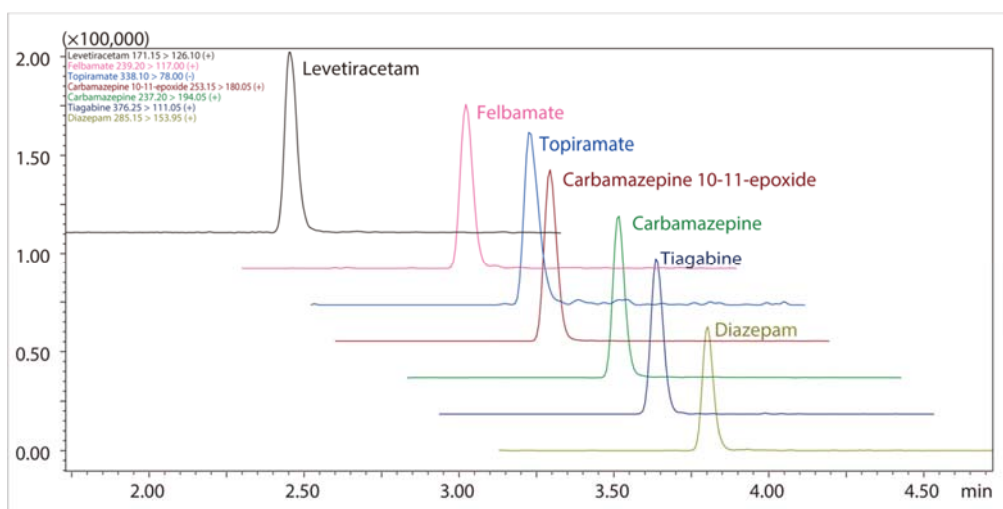


图 2 7 种抗癫痫药及代谢物的血清加标样的质谱色谱图

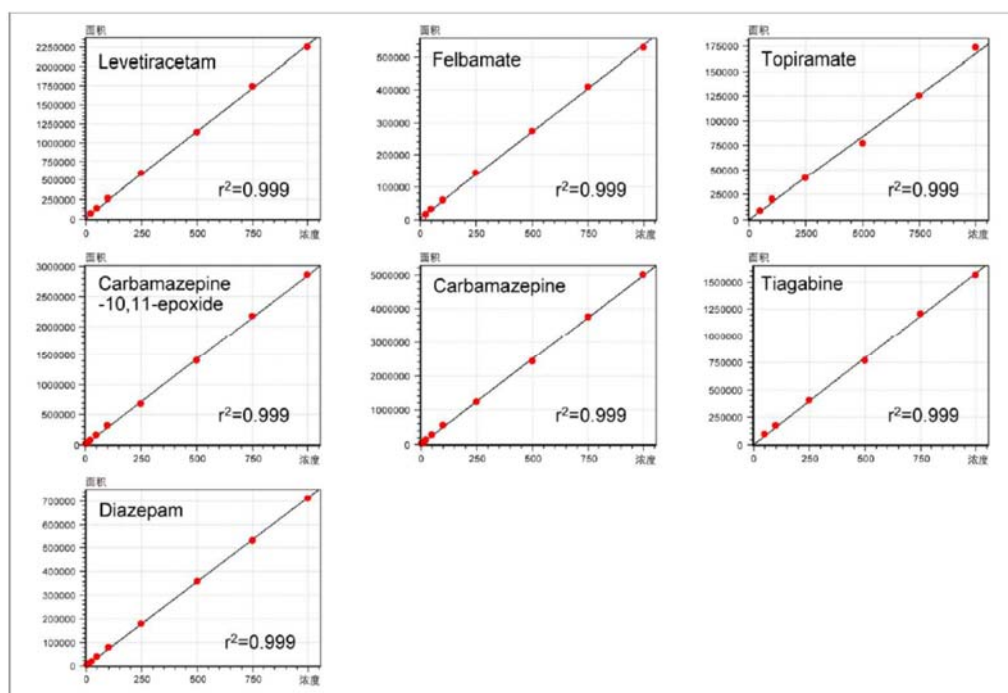


图 3 7 种抗癫痫药的校准曲线

在全自动前处理分析条件下进行连续分析并绘制标准曲线，以判断分析结果的准确度和精密度。由图 3 可知，在所设的标准曲线范围内，所有抗癫痫药的线性良好；由表 1 可知，在包括定量下限的所有范围内，准确度均在 100±15%以内，相对标准偏差%RSD 均在 15%以内，表示重复性良好。

表 1 抗癫痫药同时分析的验证结果

Compounds	Range (ng/mL)	QC samples concentration (ng/mL)			Accuracy(%)			%RSD (n=6)		
		LLOQ	Medium	ULOQ	LLOQ	Medium	ULOQ	LLOQ	Medium	ULOQ
Levetiracetam	10-750	10	100	750	94.6	106.1	99.2	3.42	1.23	1.98
Felbamate	25-1000	25	250	1000	98.6	101.8	99.6	6.28	1.88	1.50
Topiramate	500-10000	500	2500	10000	102.3	97.1	100.6	6.71	3.58	2.96
Carbamazepine-10,11-epoxide	5-1000	5	100	1000	92.9	107.8	99.3	7.48	3.32	1.41
Carbamazepine	10-1000	10	100	1000	90.6	110.3	99.1	3.79	3.42	1.19
Tiagabine	50-1000	50	250	1000	98.5	101.9	99.6	1.95	2.00	1.26
Diazepam	5-1000	5	250	1000	98.1	102.4	99.5	4.61	1.50	1.53

1.2 分析抗心律失常药

1.2.1 仪器分析条件

色谱柱: Mastro C18 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 3 μm) 离子源接口电压: 4.5 kV (ESI+)
DL 温度: 250°C
流动相: A 相-0.1%甲酸-水溶液; B 相-甲醇 加热模块温度: 400°C
时间程序: B Conc. 5%(0-1.5min)-100%(5.5-7.5min)-5%(7.51-10min) 雾化气: 3.0 L/min
干燥气: 15 L/min
流速: 0.4 mL/min MRM 离子对: Sotalol(+) m/z273.1>133.0,
柱温: 40°C Amiodarone(+) m/z646.0>58.2,
进样量: 0.3 μL N-Desethylamiodarone (+) m/z618.0>72.2,

1.2.2 前处理条件

样品体积: 50 μL; 试剂: 乙腈 200 μL; 振荡: 90 sec, 1900 rpm; 过滤: 150 sec。

1.2.3 实验结果

TDM 所涉及的目标药物种类繁多, 并且物理化学性质也各不相同; 因此, 分析流程中的操作及包括器具、器械在内的一系列标准作业是否正确, 对由此分析流程所得分析结果的有效性而言十分重要。以下对物理化学性质差异较大(尤其是亲水性差异较大)的抗心律失常药进行前处理和分析认证。

采用全自动前处理 LC/MS/MS 系列对高亲水性药物索他洛尔(分配系数 logP=2.6342)和高疏水性药物胺碘酮(logP=6.9326)及其活性代谢物 N-去乙基胺碘酮进行了同时分析。

通过连续分析并绘制标准曲线, 对准确度和精密度(重复性)进行验证。由表 3 可知, 在所设的标准曲线范围内, 高亲水性药物索他洛尔以及高疏水性药物胺碘酮及其代谢物 N-去乙基胺碘酮均得到良好的线性, 在包括定量下限的所有范围内, 准确度均在 100±15%以内, 相对标准偏差%RSD 均在 15%以内, 表示重复性良好。

上述结果表明, 全自动前处理 LC/MS/MS 系统的前处理及分析可以适用于众多亲水性和疏水性药物。

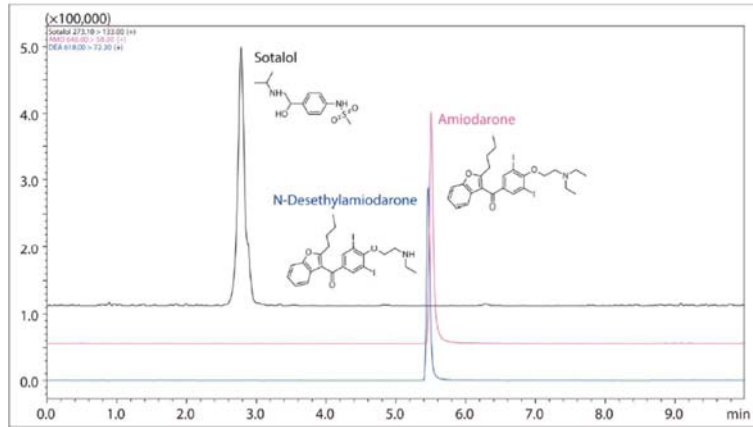


图 4 3 种抗心律失常药及代谢物的血清加标样的质谱色谱图

表 2 抗心律失常药同时分析的验证结果

Compounds	Range (ng/mL)	QC samples concentration (ng/mL)			Accuracy(%)			%RSD (n=6)		
		LLOQ	Medium	High	LLOQ	Medium	High	LLOQ	Medium	High
Sotalol	100 - 5000	100	1000	2000	107.0	101.2	101.1	3.20	1.83	1.80
Amiodarone	100 - 5000	100	1000	2000	99.2	102.6	100.6	3.78	1.66	1.99
N-Desethylamiodarone	100 - 5000	100	1000	2000	101.2	103.3	100.1	4.22	1.48	3.01

2 总结

综上所述，全自动前处理 LC/MS/MS 系统可以解决 TDM 中存在的因处理技术水平参差不齐而产生偏差和错误的问题，并且能够对众多物理化学性质不同的药物快速且高精度地进行分析。有望在 TDM 分析领域提高测定数据的可靠性和工作效率。