

# 超高效液相色谱串联质谱检测动物组织中 卡马西平及其代谢物的残留量

杨盛茹<sup>1</sup>, 姚喜梅<sup>2</sup>, 邹建<sup>1</sup>, 刘洪斌<sup>3</sup>

(1. 河南牧业经济学院食品工程学院, 河南郑州 450046) (2. 中国标准化协会, 北京 100048)

(3. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 102609)

**摘要:** 卡马西平为治疗癫痫和三叉神经痛等精神疾病药物, 但其具有刺激抗利尿激素释放, 可引起水钠潴留副作用。水钠潴留可造成组织水肿, 体重异常, 为养殖环节非法注水提供了保水抗利尿的可能, 因此检测动物组织中卡马西平对打击非法注水意义重大。本文采用超高效液相色谱串联质谱建立动物组织中卡马西平及其代谢物环氧卡马西平残留检测方法。样品经过 0.2% 甲酸乙腈提取, Oasis PRiME HLB 柱净化后, 经 Acquity UPLC BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 分离, 以甲醇和 0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 正离子 MRM 信号采集模式, 两种药物能在 8 min 内分离完好, 在 1.0~50.0 μg/L 浓度范围内, 线性良好, 相关系数均在 0.999 以上; 方法定量限均为 1.0 μg/kg, 通过 1.0、10、20 μg/kg 三个浓度的加标回收实验表明, 回收率为 72.3%~106.8%, RSD% 值为 1.43%~10.3%。该方法为防范动物产品中非法药物添加和注水等违法行为提供了一定的技术参考。

**关键词:** 抗利尿激素; 卡马西平; 代谢物; 超高效液相色谱串联质谱; 注水肉; 水钠潴留

文章编号: 1673-9078(2018)04-221-226

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.033

## Simultaneous Determination of Carbamazepine and Its Metabolites in Animal Matrix Using Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

YANG Sheng-ru<sup>1</sup>, YAO Xi-mei<sup>2</sup>, ZOU Jian<sup>1</sup>, LIU Hong-bin<sup>3</sup>

(1. College of Food Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

(2. China Association for Standardization, Beijing 100048, China)

(3. China Animal Disease Control Center, Beijing 102609, China)

**Abstract:** Carbamazepine is a drug for the treatment of psychiatric illnesses, such as epilepsy, trigeminal neuralgia and so on. However, it also can stimulate the release of antidiuretic hormone, causing side effect of water-sodium retention. Water-sodium retention can lead to tissue edema and weight disorders, which provides the possibility of water retention and antidiuretic by illegal water injection in the breeding process. Therefore, it is of great significance to detect carbamazepine in animal tissues for cracking down on illegal water injection. A multiresidue method based on ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for the determination of carbamazepine and its metabolites in animal matrix. In this method, samples were extracted by acidified acetonitrile, and purified by Oasis PRiME HLB SPE column, and then carbamazepine and its metabolites were analyzed by Acquity UPLC BEH C18 column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) using methanol and 0.1% formic acid as the mobile phases. The signals were acquired through the MRM mode. All analytes could be well-separated by a gradient program during 8 minutes. The calibration curves of carbamazepine and its metabolites had a good linear in a concentration range of 1.0~50.0 μg/L with the correlation coefficient more than 0.999, and the limits of quantitation were all less than 1.0 μg/kg in animal matrix. The recoveries of 1.0, 10, 20 μg/kg fortified samples ranged from 72.3% to 106.8%, with RSDs of 1.43% to 10.3%. The new method provides a certain reference for the prevention of illicit drug addition and water injection in animal products.

收稿日期: 2017-04-01

基金项目: 十二五国家科技支撑计划项目 (2014BAD13B05); 河南省重点科技攻关项目 (162102210107)

作者简介: 杨盛茹 (1988-), 女, 硕士, 主要从事食品质量安全研究

通讯作者: 刘洪斌 (1985-), 男, 工程师, 主要从事动物产品质量安全研究

**Key words:** antidiuretic hormone; carbamazepine; metabolites; UPLC-MS/MS; affusion meat; water-sodium retention

卡马西平作为《世界卫生组织基本药物标准清单》和《中国国家基本药物目录》在列药物,主要用于治疗癫痫和三叉神经痛等精神疾病<sup>[1]</sup>。同时具有治疗心律失常和抗利尿的作用,但随着该类药物的广泛使用,其毒副作用也日益受到重视。较常见的不良反应有视力模糊或复视、惊厥,剧烈眩晕或嗜睡,诱发的刺激抗利尿激素释放,可引起水钠潴留。水钠潴留可造成组织水肿,体重异常增加<sup>[2]</sup>。这为不法分子向动物体内非法注水,并通过药物保水抗利尿功能,以达到增重增收的目的提供了可能。同时新版兽药典并未收录卡马西平及其代谢物,因此检测动物组织中卡马西平及其代谢物异常含量,对打击非法药物添加和注水具有重要意义。

自2001年开始,关于卡马西平及其代谢物的检测研究多见于医学研究领域<sup>[3-6]</sup>,主要有分光光度法<sup>[7,8]</sup>、液相色谱法<sup>[9,10]</sup>、离子色谱法<sup>[11]</sup>和质谱法<sup>[12,13]</sup>;近几年环境领域的研究也逐步开展<sup>[14,15]</sup>,目前尚未见有动物组织中检测方法的报道,因此本文建立动物组织中卡马西平及其代谢物残留超高效液相色谱串联质谱检测方法,方法前处理操作简单,灵敏度高,稳定性好,能较好的满足动物组织中卡马西平及其代谢物的检测需求,以便更好地防范和监管动物源性食品非法添加的问题。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与耗材

卡马西平、10,11-环氧化卡马西平购于百灵威公司,纯度均在97%以上;乙腈、甲醇、乙酸乙酯和甲酸等有机溶剂均为色谱纯,购自美国Fisher公司;Waters Oasis PRiME HLB SPE柱(60 mg, 3 cc)购于美国waters公司。

用甲醇将上述标准品配制单标母液,并配制10 μg/mL混合储备液于-20℃保存,使用时现配成系列标准工作液;猪肉、猪肝和猪肾购于农贸市场,经

LC-MS/MS分析确认为阴性样本。

### 1.2 仪器设备

超高效液相色谱仪(Acquity UPLC)配三重四极杆质谱仪(Quattro premier XE),美国waters公司;3K15型离心机,美国sigma公司;纯水仪,美国millipore公司。

### 1.3 实验部分

#### 1.3.1 前处理过程

提取:准确称取2 g(精确到0.01 g)动物组织样品于50 mL离心管中,加入10 mL 0.2%甲酸乙腈,9500 r/min离心5 min取上清液于另一50 mL离心管中,再用10 mL 0.2%甲酸乙腈重复提取一次,合并两次提取液,待过净化柱。

净化:将提取液全部转移至事先用3 mL 0.2%甲酸乙腈活化的Oasis PRiME HLB柱中,流速1~2 d/s,收集全部滤过液,50℃氮气吹至近干,1 mL初始流动相定容,12000 r/min离心5 min,0.22 μm滤膜过滤待上机测定。

#### 1.3.2 液相条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流速:0.3 mL/min;流动相A:甲醇,B:0.1%甲酸水溶液,0~0.5 min,3%A保持不变,0.5~3.5 min,3%A线性变化至90%;3.5~5.0 min,90%A保持不变,5.0~5.5 min,90%A线性变化至3%;5.5~8.0 min,3%A保持不变。

#### 1.3.3 质谱条件

电离模式:ESI+;毛细管电压:3.5 kV;萃取锥孔电压:3 V;RF透镜电压:0.5 V;源温:110℃;脱溶剂温度:350℃;锥孔气流速:50 L/h;脱溶剂气流速:550 L/h;碰撞气流速:0.17 mL/min;采集模式:MRM;各种药物优化母离子和子离子及对应聚焦电压和碰撞电压值见表1。

表1 卡马西平及其代谢物检测离子、对应质谱参数及保留时间

Table 1 Qualitative ions, quantitative Ions\* and relevant parameters of carbamazepine and its metabolites

化合物名称	母离子( <i>m/z</i> )	子离子( <i>m/z</i> )	驻留时间/ms	聚焦电压/V	碰撞电压/V	保留时间 t/min
卡马西平	237.2	192	0.1	25	20	3.98
		194*	0.1		20	
10,11-环氧化卡马西平	253.2	180*	0.1	18	23	3.65
		210	0.1		15	

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件优化

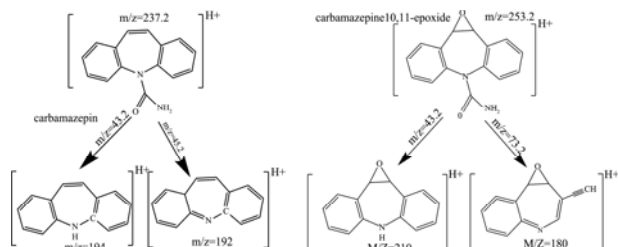


图1 卡马西平及其代谢物母离子及其碎片离子结构图

Fig.1 Structures of parent and fragment ions of carbamazepine and its metabolites

由于卡马西平及其代谢物具有伯胺结构，试验考虑采用正离子模式，将浓度为 1 mg/L 的卡马西平及其代谢物标准溶液以流动泵直接进样方式采集卡马西平及 10,11-环氧化卡马西平准分子离子峰  $m/z$  237.2 和  $m/z$  253.2，对其准分子离子峰进行二级质谱扫描，得到定性和定量碎片离子信息，卡马西平子离子峰为  $m/z$  192 和  $m/z$  194，10,11-环氧化卡马西平子离子峰为  $m/z$  180 和  $m/z$  210，然后对碰撞气能量、电喷雾电压、雾化气、源温等质谱参数进行优化，卡马西平及其代谢物母离子及其碎片离子结构图见图 1。

质谱采集的驻留时间 (dwell time) 的设定，对目标化合物峰型采集的准确性和相应的灵敏度至关重要，过大的驻留时间能降低单位时间采集色谱峰的采样点数，从而影响目标化合物的灵敏度和准确性，而过小的驻留时间则会增加采集点数，但会降低扫描频次，因此实验经优化，最终确定 0.1 ms 作为实验用最优驻留时间。

### 2.2 不同过滤膜对药物回收率的影响

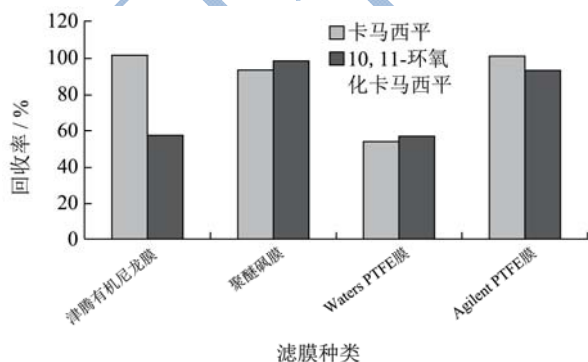


图2 不同滤膜过滤条件下回收率对比图

Fig.2 Comparison of recoveries under different filtration membrane filtration conditions

前处理过程中过滤步骤是去除杂质，基质效应和

保护仪器的关键环节，因此滤膜的选择在前处理方法优化中至关重要，本文考察了 4 种型号的滤膜对 50  $\mu\text{g/L}$  混合标准溶液的吸附影响，试验选取津腾有机尼龙膜、聚醚砜膜、Waters PTFE 膜和 Agilent PTFE 膜等四种适用于绝大多数有机溶剂和水溶液的滤膜，通过图 2 可以看出 waters PEFT 膜滤对两种药物均有吸附，吸附率分别是 46%和 43.2%；津腾有机尼龙膜对 10,11-环氧化卡马西平吸附严重，吸附率在 42.2%；聚醚砜膜与 Aglient PTFE 滤膜滤过性能较好，药物吸附更少，综合性价比考虑，试验选取聚醚砜膜作为实验用过滤膜。

### 2.3 前处理条件

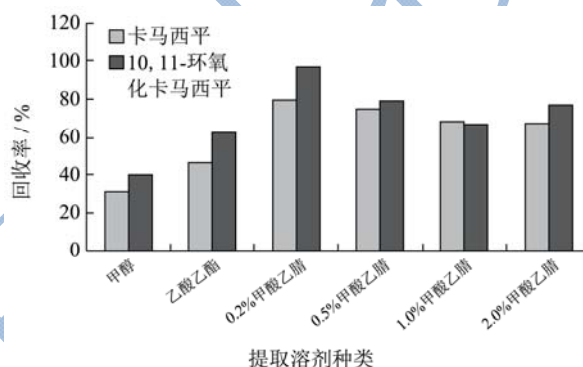


图3 不同提取条件下回收率

Fig.3 Recoveries under different extraction methods

目前关于卡马西平及其代谢物的研究多见于医学和环境领域，基质多为血浆<sup>[3-7]</sup>、尿液<sup>[16]</sup>和环境废水<sup>[14,15]</sup>等，前处理方法较为简单，动物组织中前处理方法未见报道，鉴于动物组织的复杂性，本文通过空白猪肝样品添加 10  $\mu\text{g/kg}$  卡马西平及其代谢物混标溶液，分别选取甲醇、乙酸乙酯、0.2%甲酸乙腈、0.5%甲酸乙腈、1%甲酸乙腈和 2%甲酸乙腈为提取溶剂处理样品，结果表明：当甲醇为提取剂时，蛋白沉淀差，样品整体较为浑浊，杂质干扰较大；乙酸乙酯为提取剂时，沉淀蛋白较完全，但回收率较差，卡马西平回收率仅为 46.1%，实验中酸化乙腈为提取溶剂，提取效率普遍高于 60%，原因主要为酸性条件有助于该类药物在提取溶剂的溶解；但通过图 3 可以看出随着酸量的增加，回收率略有下降，0.2%甲酸乙腈提取效果最好，卡马西平及其代谢物回收率均能达到 75%以上。

提取液经 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱净化，Oasis PRiME HLB 是一新型的反相吸附剂，该吸附剂利用了 Oasis HLB 的水可浸润性和保留特性，无需进行吸附剂的活化和平衡步骤，根据提取溶剂有机相比例不同，可分为捕获+洗脱型和通过型两种净化模式，该款萃取柱能够去除蛋白、盐和磷脂等 95%以上的基

质干扰物,即使是跟 HLB 相比,它能够去除比 HLB 多 90%的磷脂,能够有效去除动物组织样品中的大部分基质干扰,实验结果表明,卡马西平及其代谢物适用于 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱通过型净化模式,回收率能达到 70%以上。

### 2.4 基质效应

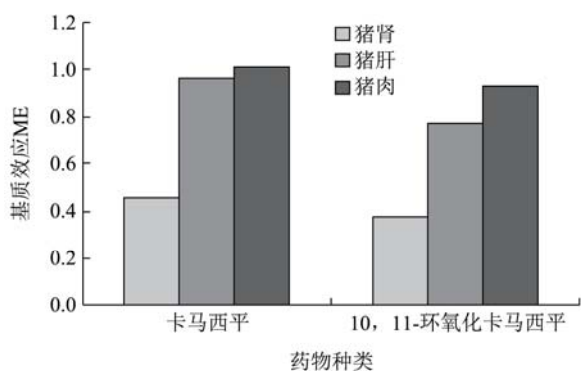


图4 基质效应图

Fig.4 The matrix effect in animal matrix

动物组织成分较为复杂,样品虽经前处理,但仍有各种有机物(脂类、糖类、可溶性蛋白或肽类及其代谢产物等)保留在待测样品溶液中,当这些物质与目标化合物共流出色谱柱进入电离源时,将严重影响目标化合物的离子化过程,对检测药物的信号产生抑制或增强的效果。试验采用提取后添加法量化基质效应的影响,试验按照 1.3.1 方法处理组织样本(猪肉、猪肝和猪肾),然后添加 10 μg/kg 混合标准溶液制成

基质加标溶液,与溶剂加标溶液进行比较,基质效应(ME)=标液在空白动物组织中峰面积/标液在纯溶剂中峰面积,若比值小于 1.0,说明基质对待测物的响应产生抑制作用;若大于 1.0,说明基质的存在增强效果;若等于 1.0,说明待测物的响应未受影响。试验结果发现 2 种药物在三种基质中均存在不同程度的基质抑制作用,其中猪肾基质对两种药物存在严重抑制作用,ME 分别为 0.45 和 0.37;两种药物在猪肉基质抑制效果不明显,因此为减少基质效应带来的影响,应在实际检测中采用空白基质加标溶液。不同药物基质抑制程度见图 4。

### 2.5 线性方程及灵敏度实验

实验采用空白组织样品经 1.3.1 方法处理,在 1.0~50.0 μg/L 浓度范围内分别添加卡马西平及其代谢物混标溶液,配制 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/L 基质加标溶液,依次进样,以定量离子色谱峰面积为纵坐标,化合物浓度为横坐标做标准曲线,实验结果表明在猪肉、猪肝、猪肾组织中,卡马西平及其代谢物在 1.0~50.0 μg/L 范围内均能线性良好,相关系数均大于 0.999,以猪肾组织为例,卡马西平及其代谢物线性方程、相关系数、检出限和定量限等参数见表 2。

将处理好的空白组织样品逐级稀释标准溶液,按 3 倍信噪比确定方法检出限(LOD),10 倍信噪比确定方法的定量限(LOQ),卡马西平及其代谢物的方法定量限均为 1.0 μg/kg。

表 2 猪肾中卡马西平及其代谢物线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear equations, correlation coefficients, detection limits, and quantification limits of carbamazepine and its metabolites in porcine kidney

化合物	线性方程	线性系数 r	线性范围/(μg/L)	LODs/(μg/kg)	LOQs/(μg/kg)
卡马西平	y=2067.9x-1468.2	0.9993	1.0~50.0	0.4	1.0
10,11-环氧化卡马西平	y=1697.7x-1126.7	0.9995	1.0~50.0	0.5	1.0

表 3 动物组织中卡马西平及其代谢物添加回收率、RSD 值 (n=6)

Table 3 Spiked recoveries, RSDs of carbamazepine and its metabolites in animal matrix(n=6)

化合物	添加水平/(μg/kg)	猪肉		猪肝		猪肾	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
卡马西平	1.0	73.2	4.21	77.5	8.41	72.3	6.47
	10	82.8	4.71	78.3	8.67	84.7	4.29
	20	86.6	3.26	88.1	4.58	85.6	1.43
10,11-环氧化卡马西平	1.0	82.1	3.23	79.8	5.07	98.9	5.42
	10	93.5	7.73	91.1	3.19	99.6	3.54
	20	83.2	2.92	103.7	2.74	106.8	6.29

## 2.6 回收率实验

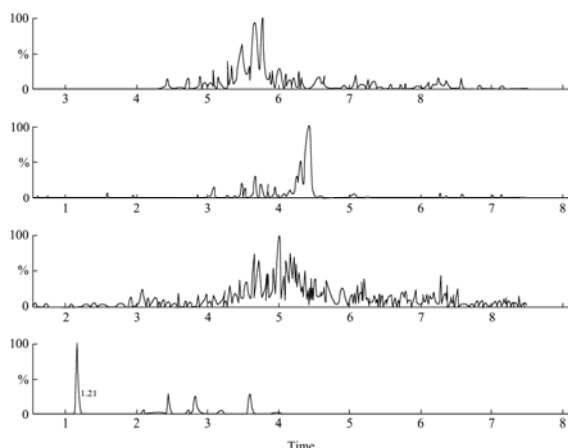


图5 空白猪肾样品MRM图

Fig.5 The MRM chromatograms of the blank porcine kidney

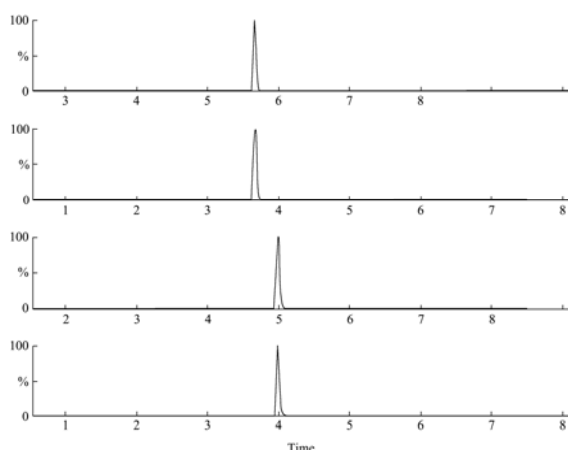


图6 空白猪肾基质中添加1.0 µg/kg卡马西平及其代谢物选择离子图

Fig.6 The chromatograms obtained from blank porcine kidney spiked with 1.0 µg/kg of carbamazepine and its metabolites

取空白猪肉、猪肝、猪肾样品,添加浓度为1.0、10、20 µg/kg三个水平混标溶液,每个浓度6个平行,按1.3.1方法进行添加回收实验,空白样品与添加样品总离子图(以猪肾样本为例)见图5、6,回收率为70.9%~106.8%,RSD%值为1.43%~10.3%,结果见表3。

## 2.7 实际样品检测

本实验对从屠宰场及农贸市场共抽检猪肉、肝、肾样品50份进行测定,并随样由不同实验人员进行盲样添加试验,最终从抽检的50份样本中未检出卡马西平及其代谢物,随测盲样检出卡马西平4.7 µg/kg(添加量为5.0 µg/kg),检测结果符合欧盟2002/657/EC中对回收率的要求,进一步证实该方法适用于动物组织中卡马西平及其代谢物检测。

## 3 结论

本实验通过卡马西平及其代谢物结构分析对其液相、质谱参数进行优化,并优化提取试剂和过滤膜,最终建立了动物组织中卡马西平及其代谢物UPLC-MS/MS检测方法,通过方法学验证和基质效应研究证实该方法灵敏度较高,回收率和稳定性较好,能够满足动物组织中该类药物残留检测要求,对防范人药兽用、非法添加行为和打击注水肉提供一定的技术依据。

## 参考文献

- [1] Alrashood S T. Chapter three-Carbamazepine [J]. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, 2016, 41: 133-321
- [2] 喻东山.卡马西平不良反应和药物相互作用的研究进展[J].医药导报,2010,29(10):1281-1284  
YU Dong-shan. Advances in the study of carbamazepine adverse reactions and drug interactions [J]. Herald of Medicine, 2010, 29(10): 1281-1284
- [3] Roberto M, Fiorenzo A, Giovanna C, et al. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients [J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 762(2): 109-116
- [4] Van R G F, Badenhorst D, Swart K J, et al Determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 769(1): 1-7
- [5] ZHU Yong-xin, CHANG Hua, Wulster-Radcliffe M, et al. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of carbamazepine and its main metabolite in rat plasma utilizing an automated blood sampling system [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 38(1): 119-125
- [6] Lopes B R, Barreiro J C, Baraldi P T, et al. Quantification of carbamazepine and its active metabolite by direct injection of human milk serum using liquid chromatography tandem ion trap mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2012, 889: 17-23
- [7] Kanakapura B, Sameer A M. Utilization of bromination reactions for the determination of carbamazepine using bromate-bromide mixture as a green brominating agent [J].

- Arabian Journal of Chemistry, 2014, 7(3): 297- 305
- [8] 陈世文,刘玲,姜宁. 紫外分光光度法测定癫痫患者的卡马西平血药浓度[J]. 中国药业, 2010, 19(9): 18-19
- CHEN Shi-wen, LIU Ling, JIANG Ning. Determination of Serum carbamazepine concentration by UV-spectrophotometry [J]. China Pharmaceuticals, 2010, 19(9): 18-19
- [9] Maryam V, Shiva G, Masoumeh S. Chemometrics enhanced HPLC-DAD performance for rapid quantification of carbamazepine and phenobarbital in human serum samples [J]. Talanta, 2014, 119(5): 17-23
- [10] 阙万才,丘宏强,程昱,等. 固相萃取\_高效液相色谱法测定人血浆中奥卡西平及其代谢产物 10-羟基卡马西平的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(22): 2254-2256
- QUE Wan-cai, QIU Hong-qiang, CHENG Yu, et al. Determination of oxcarbazepine and its metabolite 10,11-dihydro-10-hydroxy carbamazepine in human plasma by solid phase extraction and HPLC [J]. Chin. J Clin. Pharmacol., 2015, 31(22): 2254-2256
- [11] WU Shu-chao, XU Wei, Qamar S, et al. Ion chromatography combined with online electrochemical derivatization and fluorescence detection for the determination of carbamazepine in human plasma [J]. Talanta, 2012, 101(22): 541-545
- [12] QU Li-hua, FAN Yuan-jie, WANG Wen-jun, et al. Development, validation and clinical application of an online-SPE-LC-HRMS/MS for simultaneous quantification of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and its active metabolite carbamazepine 10,11-epoxide [J]. Talanta, 2016, 158: 77-88
- [13] 戴博,张华峰,宋青,等. 高效液相色谱-质谱联用法同时测定苯巴比妥、丙戊酸钠、苯妥英钠和卡马西平的血药浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(3): 213-215
- DAI Bo, ZHANG Hua-feng, SONG Qing, et al. Determination the concentrations of phenobarbital, sodium valproate, phenytoin sodium and carbamazepine in human plasma for simultaneous quantification by HPLC-MS [J]. Chin. J Clin. Pharmacol., 2011, 27(3): 213-215
- [14] TEO Hui-ling, WONG Ling-kai, LIU Qin-de, et al. Simple and accurate measurement of carbamazepine in surface water by use of porous membrane-protected micro-solid-phase extraction coupled with isotope dilution mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 912: 49-57
- [15] Oberleitner L, Dahmen-Levison U, Garbe L A, et al. Application of fluorescence polarization immunoassay for determination of carbamazepine in wastewater [J]. Journal of Environmental Management, 2017, 193: 92-97
- [16] Behbahani M, Najafi F, Bagheri S, et al. Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for pre-concentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1308(14): 25-31