

LC - MS/MS 法测定家兔全血中的磷丙泊酚钠

殷望^{1,2}, 王瑜^{1,2}, 杨俊², 康仪², 刘进², 张文胜^{2*}

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 四川大学华西医院麻醉与危重急救研究室, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定家兔全血中水溶性异丙酚前药磷丙泊酚钠的浓度。方法 采用 Welch Ultimate XB C₈柱(100 mm × 2.1 mm, 3 μm), 7-羟基香豆素为内标, 流动相为 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵-乙腈(57:43), 流速 0.4 mL · min⁻¹。HPLC-MS/MS 采用负离子电喷雾离子源, 以多反应离子模式监测。全血样品经含内标的甲醇溶液直接沉淀蛋白后进样。结果 标准曲线的线性范围是 0.12 ~ 15 μg · mL⁻¹, 最低定量下限为 120 ng · mL⁻¹; 日内和日间 RSD 小于 7.04%, RSD 均小于 8.40%。结论 所用方法简便快速、准确灵敏, 可用于磷丙泊酚钠血药浓度的测定和药动学的研究。

关键词: 前药; 磷丙泊酚钠; LC-MS/MS; 血药浓度

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2012)01-0080-04

Determination of fospropofol in the rabbit whole blood by LC - MS/MS

YIN Wang^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, YANG Jun², KANG Yi², LIU Jin², ZHANG Wen-sheng^{2*}

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China 2. Laboratory of Anesthesia and Critical Care Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS) method for the determination of fospropofol in the rabbit whole blood. **METHODS** The analysis was conducted using a Welch Ultimate C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 3 μm). 7-hydroxycoumarin was used as internal standard. The mobile phase consisted of ammonium acetate (5 mmol · L⁻¹) and acetonitrile (57:43) at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. Negative electrospray ionization(ESI⁻) was used for LC-MS/MS determination. Quantification was performed in multiple reaction monitoring(MRM) mode. Blood samples were prepared by protein precipitation with methanol containing internal standard. **RESULTS** Calibration curves were established over a range of 0.12-15 μg · mL⁻¹ with a lower quantification limit of 120 ng · mL⁻¹. The intra- and inter-day accuracy expressed as relative error(RE) were within 7.04% and RSD were below 8.40%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate, sensitive and could be used for the determination of fospropofol in blood samples and for its pharmacokinetic studies.

Key words: Prodrug; Fospropofol; LC-MS/MS; Drug blood concentration

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2012)01-0080-04

磷丙泊酚钠(fospropofol disodium)为水溶性异丙酚前药,化学名称为磷酸 2,6-二异丙基苯氧甲基单酯二钠盐(C₁₃H₁₉O₅PNa₂,相对分子质量 332.24),在体内能迅速分解为异丙酚、甲醛和磷酸盐^[1]。针对该化合物及活性代谢物异丙酚的研究尤其是药动学研究已有报道^[1-3],均通过在全血样品中加入 10 mg · mL⁻¹全血的原钒酸钠固体来抑制碱性磷酸酶对磷丙泊酚钠的水解。但近期研究发现:在全血中加入 10 mg · mL⁻¹的原钒酸钠固体可能引起溶血,且溶血的程度在样品间不均一,导致磷丙泊酚钠及其代谢物异丙酚的测定不准确^[4]。为此,特建立一种快速、准确测定全血中磷丙泊酚钠的方法,为后续的药动学研究提供分析技术。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与动物

LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津);API 3200 三重四级杆串联质谱仪(美国 Applied Biosystems)。磷丙泊酚钠对照品(四川大学华西医院麻醉与危重急救研究室根据专利 ZL 99811440.5 合成,纯度大于 99%);7-羟基香豆素内标(中国药品生物制品检定所);甲醇和乙腈为色谱纯;其余试剂为分析纯;水为超纯水。健康、成年新西兰大白兔(四川省动物中心)。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 Welch Ultimate XB-C₈柱(100 mm × 2.1 mm, 3 μm) 流动相为 5 mmol · L⁻¹ 乙酸

作者简介:殷望(1986—),男,正攻读临床药学专业的硕士学位。

* 通信作者(Correspondent author),Email: zhang_ws@scu.edu.cn

铵-乙腈 (57:43) 流速为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 自动进样器温度为 $6 \text{ }^\circ\text{C}$ 进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

1.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式。检测方式为多反应离子监测 (MRM)。离子喷雾电压为 -4.5 kV , 离子源温度为 $550 \text{ }^\circ\text{C}$ 。气帘气为 10 psi , 雾化气为 60 psi , 辅助加热气为 65 psi , 碰撞活化气为 10 psi 。磷丙泊酚钠和 IS 的检测离子对分别为 m/z $287 \rightarrow 177$ 、 $160.7 \rightarrow 89.0$, 离子去簇电位 (DP) 分别为 -20 、 -40 V , 入口电位 (EP) 分别为 -5 、 -7 V , 碰撞出口电位 (CXP) 均为 -2 V , 碰撞能量 (CE) 分别为 -38 、 -33 eV , 采样时间均为 100 ms 。

1.2.3 溶液的配制 分别精密称取磷丙泊酚钠对照品 50.0 mg 和内标 50.3 mg 于 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容得约 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的磷丙泊酚钠对照品

贮备液和内标贮备液, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。对照品贮备液临用时用甲醇稀释成 1.2 、 2.0 、 4.0 、 8.0 、 10.0 、 20.0 、 50.0 、 100.0 、 $150.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照系列工作溶液。内标贮备液临用时用甲醇稀释成 $12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作溶液。

1.2.4 样品的处理 样品的处理采用全血直接沉淀蛋白的方法。给药后将取出的 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 家兔全血迅速加入到预装 $350 \text{ } \mu\text{L}$ 工作溶液的聚丙烯试管中, 漩涡震荡 1 min 后, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 。取上清液 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 进样。

1.2.5 质谱分析 使用 ESI 离子源, 采用负离子模式对磷丙泊酚钠和内标进行扫描。测得磷丙泊酚钠和内标的全扫描质谱图 (图 1)。将 m/z $287 \rightarrow 177$ 、 $160.7 \rightarrow 89.0$ 分别作为磷丙泊酚钠和内标的检测离子对。

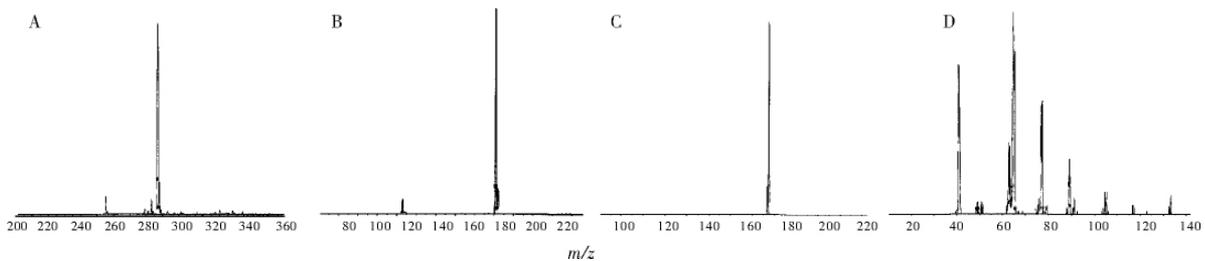


图 1 磷丙泊酚钠 (A、C) 和内标 (B、D) 的质谱全扫描质谱图

Fig 1 Chromatograms of fospropofol (A、C) and IS (B、D) by ESI-MS/MS

1.2.6 方法的专属性 分别取 6 只家兔的空白全血、空白全血加磷丙泊酚钠对照品和实验家兔给予磷丙泊酚钠后 20 min 采集的全血样品, 按“1.2.3”

项操作, 得到色谱图 (图 2)。磷丙泊酚钠、IS 分别在 1.1 、 1.2 min 时出峰。表明内源性物质不干扰磷丙泊酚钠和内标的测定。

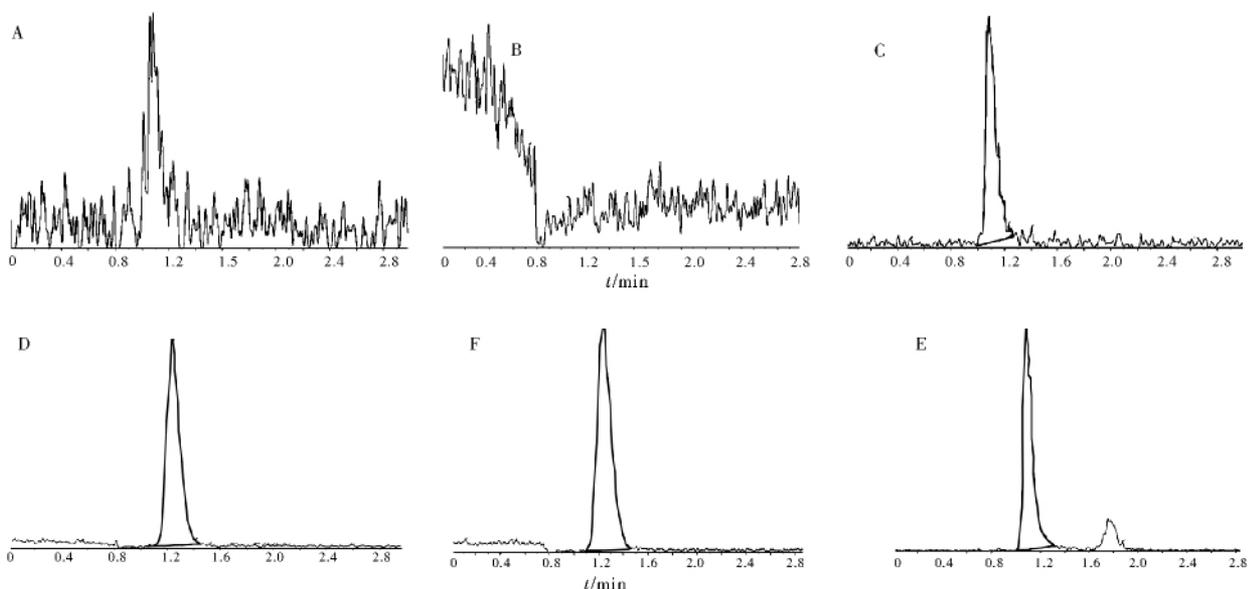


图 2 典型的磷丙泊酚钠和内标在家兔全血中的 MRM 色谱图

Fig 2 Representative MRM chromatograms of fospropofol and IS in the rabbit whole blood

A、B 表示空白全血样品; C、D 表示 $120 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的磷丙泊酚钠和 $12 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 IS; E、F 分别表示给药 20 min 后采集样品

1.2.7 标准曲线 取 50 μL 家兔空白全血 9 份, 分别加入 5 μL 对照系列工作溶液, 使磷丙泊酚钠在全血中的浓度分别为 0.12、0.20、0.40、0.80、1.00、2.00、5.00、10.00、15.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用磷丙泊酚钠和内标的峰面积之比为 Y 轴、磷丙泊酚钠的全血浓度为 X 轴建立标准曲线, 进行加权 ($1/X^2$) 回归建立 4 条标准曲线, 每条曲线包括了 9 个点 (0.12 ~ 15.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。结果表明: 被分析物的浓度和响应值成非线性的关系。典型的标准曲线的方程为: $Y = 1.79 \times 10^{-10} X^2 + 3.49 \times 10^{-4} X + 1.03 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9999$)。磷丙泊酚钠在全血中的最低检测限为 120 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N > 10$)。

1.2.8 准确度和精密度 按“1.2.7”项方法制备 4 个浓度的磷丙泊酚钠的最低定量限 (LLOQ) 样品及质控 (QC) 样品: 0.12、0.36、1.50、12.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按“1.2.4”项下处理。QC 样品分别在同日内连续测定 6 次, 并连续测定 3 d, 计算日内、日间准确度和精密度; LLOQ 样品在同一天测定 6 次, 测定 1 d, 计算准确度和精密度。结果表明: 对于 QC 样品, 日内和日间相对偏差在 $\pm 6.85\%$ 以内, RSD 分别小于 6.18% 和 5.53%。对于 LLOQ 样品, 相对偏差为 7.04%, $RSD = 8.40\%$ 。所有的结果都在可接受的范围内。

1.2.9 萃取回收率和基质效应 在 0.36、5.00、12.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 下评价待测物的萃取回收率和基质效应。配制磷丙泊酚钠对照工作溶液 (系列 A); 经过预处理的空白基质中分别加入 3 个 QC 浓度的对照品溶液 (系列 B); 空白基质中加入 3 个 QC 浓度的对照品溶液后再进行样品处理 (系列 C)。以系列 B 中样品进样得到的峰面积除以相应浓度的系列 C 中样品的峰面积, 计算萃取回收率。以系列 C 中样品进样得到的峰面积除以相应浓度的系列 A 中样品的峰面积, 计算基质效应。IS 的萃取回收率和基质效应在一个浓度下 (12 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 按上述方法计算。磷丙泊酚钠的基质效应和萃取回收率见表 1。结果表明: 在该实验条件下, 基质的离子抑制或增强作用对测定的影响可以忽略; 磷丙泊酚钠的萃取回收率均在 80% 以上, 符合要求。本研究中, 内标的基质效应是 $100.16\% \pm 4.92\%$, 萃取回收率为 $81.25\% \pm 4.62\%$ 均符合要求。

1.2.10 稀释的平行性 当样品浓度超过最高定量上限 (ULOQ) 时, 需要对样品进行稀释。稀释的平行性实验按以下步骤进行: 取空白全血样品 50 μL 加入 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的磷丙泊酚钠对照品 5 μL , 震荡后加入 1.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 350 μL , 处理后取 10 μL 上清液加入 990 μL 空白甲醇溶液中并混

合均匀。用该混合液进样 10 μL 。结果表明: 将 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的磷丙泊酚钠稀释 100 倍后, 得到的结果用标准曲线计算, 与 1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照浓度相比, 相对偏差 = 8.89%, $RSD = 2.81\%$, 证明稀释的过程符合要求。

表 1 磷丙泊酚钠的基质效应及萃取回收率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Matrix effect and exraction recovery of fospropofol ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

$C/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Matrix effect/%	Extraction recovery/%
0.36	86.43 \pm 6.28	89.38 \pm 1.51
5.00	81.55 \pm 4.41	90.59 \pm 5.90
12.00	85.46 \pm 2.68	88.80 \pm 4.80

1.2.11 稳定性试验 配制 3 个 QC 浓度的全血样品 ($n = 6$) 按“1.2.4”项方法操作, 考察处理后样品进样器的放置稳定性 (48 h, 6 $^{\circ}\text{C}$)、处理后样品的长期冰冻稳定性 (5 d, -20 $^{\circ}\text{C}$)。3 个浓度 48 h 相对偏差分别为 4.56%、-5.27%、-10.10%; 5 d 的相对偏差分别为 -6.10%、-5.72%、3.25%。结果显示: 处理后样品放置于 6 $^{\circ}\text{C}$ 的自动进样器中 48 h 后以及在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 5 d 后是稳定的。

1.2.12 药动学参数的测定 取 6 只新西兰大白兔 (2.1 ~ 2.7 kg), 实验前自由进食和饮水。将磷丙泊酚钠溶于 0.9% 生理盐水中, 配成 5% 的溶液。从每只兔耳缘静脉静注单剂量 64.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的磷丙泊酚钠。在给药前和给药后 1、3、5、7、10、15、20、30、45、60、90、120、180 min 时从对侧耳中动脉采血 50 μL , 并立即加到 350 μL 内标溶液中混匀。在 1、3、5、7 min 时间点, 内标浓度为 1.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 在 10、15、20、30 min 时间点, 内标浓度为 120 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 在 0、45、60、90、120、180 min 时间点, 内标浓度为 12 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按“1.2.4”项方法处理。将内标为 1.20、0.12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的点, 离心后的上清液用空白甲醇溶液稀释 100 倍和 10 倍。上清液分离后在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存并进样分析。药动学参数用 Winnonlin 5.2 药动学软件处理, 采用非房室模型进行计算。结果表明: 以上方法的 LLOQ 足够用于描述化合物的药动学参数。图 3 为磷丙泊酚钠在家兔体内的平均药-时曲线。主要的药动学参数使用非房室模型计算 (表 2)。

2 讨论

在研究待测物的样品处理中, 最初选择乙腈来沉淀蛋白, 因和甲醇相比, 乙腈沉淀效果更好, 用量更少, 有利于提高灵敏度。但用乙腈做沉淀剂时, 磷丙泊酚钠和内标的萃取回收率均低于 50%。试验

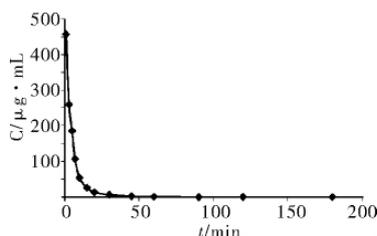


图3 家兔静脉注射 64.6 mg · kg⁻¹ 磷丙泊酚钠后血中的平均药-时曲线

Fig 3 Average concentration curves after an intravenous administration of fospropofol at 64.6 mg kg⁻¹ in the rabbits

表2 家兔静脉注射磷丙泊酚钠的药动学参数 (n = 6)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of intravenous fospropofol in the rabbits (n = 6)

Pharmacokinetic parameter	Fospropofol
$C_{max} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	456.00 ± 55.11
T_{max} / min	4.3 ± 1.0
MRT/min	15.99 ± 3.47
$Cl / \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	74.20 ± 17.63
ke / min^{-1}	0.05 ± 0.02
$t_{1/2} / \text{min}$	17.55 ± 9.22

中采用了甲醇、全血体积为 7:1 的比例沉淀蛋白,处理后,磷丙泊酚钠和内标的萃取回收率都提高到 80% 以上。有机溶剂直接沉淀全血可使血中的酯酶迅速失活,从而阻止磷丙泊酚钠的酶解,保证了测定的准确度。稳定性研究使用的是处理后的样品而不

是常规的血浆样品,因为在样品处理过程中,采集的全血样品已用含内标的甲醇溶液进行了直接沉淀。与文献比较^[1],实验的样品处理方法省去了将沉淀后的上清液浓缩的步骤,牺牲了灵敏度,但节约了时间。文中采用了 LC-MS/MS 的方法测定磷丙泊酚钠在家兔全血中的浓度。文中所用方法的定量范围宽,且仅需要 50 μL 的全血样品。

参考文献:

- [1] Schywalsky M, Ihmsen H, Tzabazis A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new propofol prodrug GPI 15715 in rats [J]. Eur J Anaesthesiol, 2003, 20(3): 182-90.
- [2] Jörg F, Harald I, Dirk H, et al. Pharmacokinetics and clinical pharmacodynamics of the new propofol prodrug GPI 15715 in volunteers [J]. Anesthesiology, 2003, 99: 303-13.
- [3] Jörg F, Harald I, Dirk H, et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new propofol prodrug GPI 15715 and propofol Emulsion [J]. Anesthesiology, 2004, 101: 626-39.
- [4] Struys MM, Fechner J, Schüttler J, et al. Erroneously published fospropofol pharmacokinetic-pharmacodynamic data and retraction of the affected publications [J]. Anesthesiology, 2010, 112: 1056-7.

收稿日期: 2011-03-20

半灌木千斤拔的生药学鉴别

陈青 李小云 蔡毅* 朱意麟 陈世琴

(广西中医学院, 广西南宁 530001)

摘要: 目的 对半灌木千斤拔进行生药学鉴别。方法 采用基源鉴别法、性状鉴别法、显微鉴别法鉴别半灌木千斤拔。结果 半灌木千斤拔原植物为半灌木,单叶互生,叶面几无毛;总状花序顶生,苞片蚌壳状,蝶形花白色。药材根呈长圆柱形,表面灰棕色;断面皮部棕褐色,木部宽广,类白色或淡黄棕色,有明显的放射状纹理。根横切面的皮层薄壁细胞内含红棕色物质;大型的分泌腔散在于皮层和韧皮部中。药材粉末中可见棕色块、草酸钙方晶、晶鞘纤维及含棕色物的薄壁细胞。结论 鉴别特征明显、稳定,可作为鉴别半灌木千斤拔的依据。

关键词: 半灌木千斤拔; 生药鉴定; 性状鉴别; 显微鉴别

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2012)01-0083-03

Pharmacognostical identification of *Flemingia fruticulosa*

CHEN Qing, LI Xiao-yun, CAI Yi*, ZHU Yi-lin, CHEN Shi-qin

(Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, 530001 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To identify the pharmacognostic characteristics of *Flemingia fruticulosa*. **METHODS** The resource, crude drug traits and microscopic features of *Flemingia fruticulosa* were studied. **RESULTS** *Flemingia fruticulosa* was a subshrub with

基金项目: 国家科技支撑课题(编号: 2007BAL10B07-02)

作者简介: 陈青(1961—),女,福建漳浦,从事形态学实验技术研究工作。

* 通信作者(Correspondent author), Email: Caiyi118@163.com