

LG-MS/MS 法测定人血浆中舒芬太尼的血药浓度

曾晓晖¹, 石磊¹, 赵树进¹, 张兴安², 谭建坤*, 刘礼胜² (广州军区广州总医院¹药学部, ²麻醉科, 广州 510010)

【摘要】 目的 建立液质联用(LG-MS/MS)法测定血浆中舒芬太尼血药浓度。方法 以芬太尼为内标, 血浆样品经乙腈沉淀蛋白后, 以 Ultimate XB C₁₈(100 mm×2.1 mm, 3.0 μm) 柱为色谱柱, 流动相为水-甲醇(15:85, V/V), 各含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵, 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 40℃; 质谱条件为电喷雾电离源(ESI), 检测方式为正离子电离、多离子反应监测(MRM), 用于定量分析的离子为舒芬太尼 m/z 387.2⁺→238.1, 芬太尼 m/z 337.2⁺→188.2。结果 舒芬太尼线性范围为 0.05~2 μg·L⁻¹ ($r=0.9964$), 线性关系良好。舒芬太尼的提取回收率为 83.68%~88.06%。批内和批间精密度 RSD 均 < 10%。结论 本研究建立的测定舒芬太尼血药浓度的方法简单、快速、准确、灵敏, 可用于临床上血药浓度监测和药动学研究。

【关键词】 液质联用; 舒芬太尼; 血药浓度

【文献标志码】 A

【文章编号】 1007-4406(2010)02-0093-04

Determination of sufentanil in human plasma by LG-MS/MS

ZENG Xiaohui¹, SHI Lei¹, ZHAO Shujin¹, ZHANG Xingan², TAN Jiankun*, LIU Lisheng² (¹Department of Pharmacy, ²Department of Anesthesiology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

【ABSTRACT】 *AIM* To develop a LG-MS/MS assay to determine sufentanil in human plasma. *METHODS* Fentanyl was used as an internal standard. Plasma samples were precipitated by acetonitril. The separation was carried out on an Ultimate XB C₁₈(100 mm×2.1 mm, 3.0 μm) column at 40℃. The mobile phase consisted of water-methanol solution (15:85, V/V) with 10 mmol·L⁻¹ ammonium acetate at a flow-rate of 0.2 mL·min⁻¹. Electrospray ionization(ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. Quantitation was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of the m/z 387.2⁺→238.1 for sufentanil, and m/z 337.2⁺→188.2 for fentanyl. *RESULTS* The liner calibration curves were obtained in the range of 0.05–2 μg·L⁻¹ for sufentanil. The extraction recovery for sufentanil was ranged from 83.68%–88.06%. The relative standard deviation of the intra-assay and inter-assay precision of variation was less than 10%. *CONCLUSION* It is an accurate, sensitive and rapid method that can be applied to the evaluation of sufentanil target, and suitable for clinical pharmacokinetic study of sufentanil.

【KEY WORDS】 LG-MS/MS; sufentanil; plasma drug concentration

舒芬太尼(sufentanil)为合成的阿片类镇痛药, 其结构是在芬太尼的 4 位上引入极性基团的 *N*-4 取代衍生物, 静脉给药起效快, 作用时间短, 血浆蛋白结合率高, 亲脂性强, 能迅速而广泛地分布于机体

各组织。用药后血液动力学较稳定, 适用于心血管、神经外科手术以及产科和术后镇痛, 但可发生呼吸抑制、胸部肌肉僵硬、心动过缓等不良反应。关于该药血药浓度的测定方法, 国内近一年来才有报道, 国

* 广东药学院 2009 年应届本科毕业生

【基金项目】 广东省科技厅成果推广项目(编号 2005C13G0101)

【作者简介】 曾晓晖(1981-), 女, 药师。从事临床药理学工作。Tel: 020-88390093; E-mail: healthy_mail@163.com

外报道多采用固相^[1-3]或液液^[4-5]萃取,以及梯度洗脱^[2,4]等分离后以液相色谱或液相色谱质谱方法测定。但这些方法操作复杂费时,且最低检测限较高。为此本试验建立了用LG-MS/MS测定人血浆中舒芬太尼浓度的方法,为药动学研究提供一种快速、简便、准确可靠的手段。

1 材料

1.1 仪器 Agilent RRLC1200/QQQ6410 系统,其包括G1322A 在线脱气机、G1312B 二元梯度高压泵、G1367C 自动进样器、G1316B 柱温箱、6410 三重四极杆质谱仪、B. 01. 03MassHunter 工作软件;AXLC1805 实验室超纯水机(阿修罗科技发展有限公司);BP110S 电子分析天平(日本产,广州机电工业理化计量中心检测);Centrifuge TGL-16B 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);DC-12H 恒温水浴锅和氮吹仪(上海安谱科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂 舒芬太尼对照品(湖北宜昌人福药业,批号为071101,规格为5 mg,纯度99.5%,干燥湿度0.01%,去碱度66.8%);内标:芬太尼对照品(湖北宜昌人福药业,批号为060401,规格为10 mg,纯度100.0%,干燥湿度0.04%,去碱度63.8%);空白血浆为本院提供;乙腈、甲醇、乙酸铵为色谱纯(Sigma公司);水为超纯水。

1.3 色谱条件 色谱柱:Ultimate XB C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 3.0 μm);流动相为水-甲醇(15: 85, V/V),各含10 mmol·L⁻¹乙酸铵;流速0.2 mL·min⁻¹;柱温40℃;进样量30 μL。

1.4 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI);毛细管电压(Capillary)4 000V;雾化气压力(Nebulizer)276 kPa;干燥气流速8 L·min⁻¹;干燥气温度350℃;离子化模式:正离子化(positive),扫描方式为多重反应监测(MRM),用于定量分析的离子为舒芬太尼 m/z 387.2⁺→238.1,芬太尼 m/z 337.2⁺→188.2。

2 方法与结果

2.1 对照品、内标贮备液的配制

2.1.1 对照品贮备液 精密称取舒芬太尼对照品3.75 mg,置50 mL的干燥棕色容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,配制成49.8 mg·L⁻¹的贮备液;于-20℃下避光保存。实验前用流动相依次稀释成49.8、9.96、0.996 μg·L⁻¹的对照品溶液。

2.1.2 内标贮备液 精密称取芬太尼对照品3.92 mg,置50 mL干燥棕色容量瓶中,用乙腈溶解并加至

刻度,配制成50.0 mg·L⁻¹的内标贮备液;于-20℃下避光保存。实验前用流动相稀释成10.0 μg·L⁻¹的内标液。

2.2 血浆样品的处理 避光条件下,精密加入血浆样品200 μL、内标液10 μL于2 mL塑料离心管中,旋涡振荡20 s;精密加入乙腈600 μL,立即旋涡2 min,200 00 r·min⁻¹离心5 min,吸取上清液置10 mL的具塞玻璃离心管内,于40℃水浴中氮气流吹干。残渣用流动相200 μL溶解,旋涡1 min混匀,再以20 000 r·min⁻¹离心5 min,吸取上清液置于样品瓶中,进样30 μL进行定量分析。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 将空白血浆、空白血浆加标准液及内标、受试者血浆样品按“2.2”项处理,在本试验的条件下进行分析,色谱图见图1。可见血浆舒芬太尼和内标物芬太尼峰形良好,分离完全,不受血浆内源性物质干扰,舒芬太尼、芬太尼的保留时间分别为3.058和2.463 min。

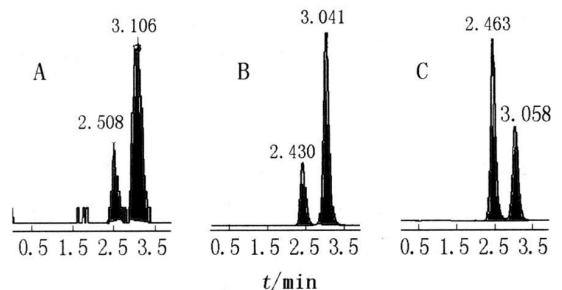


图1 舒芬太尼、芬太尼的色谱图

Figure 1. Mass chromatograms of sufentanil and fentanyl

A: blank plasma; B: blank plasma+ sufentanil and fentanyl; C: plasma obtained from a volunteer after administration

2.3.2 基质效应 以舒芬太尼为研究对象,在空白血浆中加入舒芬太尼标准溶液,使得成为含舒芬太尼为0.996 μg·L⁻¹的溶液来考察基质效应对测定舒芬太尼影响。按“2.2”项处理,得峰面积A为11 097,保留时间为3.044 min。同样,对0.996 μg·L⁻¹舒芬太尼标准溶液进行分析,得到相应的峰面积B为11 254,保留时间为3.056 min,以A/B接近1的方法考察舒芬太尼基质效应,结果表明本方法无基质效应。

2.3.3 标准曲线的制备 避光条件下,在离心管中分别精密加入舒芬太尼对照品标准溶液适量,氮气吹干,加入内标液10 μL、空白血浆200 μL,振荡混

匀,配成含舒芬太尼 0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5、2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列质量浓度,按“2.2”项处理。以血浆中待测物质量浓度为横坐标,以舒芬太尼的峰面积与内标物峰面积的比值为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归计算,求得标准曲线方程。标准曲线为: $y = 2.289\rho + 0.1658$, $r = 0.9964$ ($n = 7$)。线性范围为 0.05~ 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量限为 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R_{S,N} > 10$), 检测限为 0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R_{S,N} > 3$)。

2.3.4 精密度试验 避光条件下,取空白血浆,按“2.3.3”项法,配制含舒芬太尼质量浓度为 0.099 6、0.498、1.494 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品各 5 份,在不同天连续制备并测定 3 个分析批,计算批内、批间精密度。结果见表 1。

表 1 LG-MS/MS 法检测人血浆中舒芬太尼的精密度

Table 1. Precision of sufentanil in human plasma by LC-MS/MS ($\bar{x} \pm s$)

| $\rho(\text{Added}) / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Intra-assay ($n = 5$) | | Inter-assay ($n = 3$) | |
|--|---|--------|---|--------|
| | $\rho(\text{Measured}) / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | RSD/ % | $\rho(\text{Measured}) / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | RSD/ % |
| 0.099 6 | 0.096 \pm 0.007 | 6.97 | 0.099 \pm 0.008 | 7.56 |
| 0.498 | 0.507 \pm 0.032 | 6.36 | 0.494 \pm 0.042 | 8.44 |
| 1.494 | 1.405 \pm 0.088 | 6.28 | 1.389 \pm 0.116 | 8.36 |

2.3.5 提取回收率 避光条件下,精密配备含舒芬太尼质量浓度为 0.099 6、0.498、1.494 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液和标准血浆,按“2.2”项处理。比较 2 组峰面积,求得提取回收率。结果见表 2。

表 2 LG-MS/MS 法检测人血浆中舒芬太尼提取回收率

Table 2. Extraction recovery of sufentanil in human plasma by LC-MS/MS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

| $\rho(\text{Added}) / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | Extraction recovery/ % | RSD/ % |
|--|------------------------|--------|
| 0.0996 | 86.37 \pm 2.5 | 3.2 |
| 0.498 | 83.68 \pm 4.6 | 5.2 |
| 1.494 | 88.06 \pm 2.6 | 3.1 |

2.3.6 稳定性试验

2.3.6.1 贮备液 将舒芬太尼、芬太尼贮备液,在室内避光和不避光条件下分别放置 0、1、2、4 h 和在冰箱 - 20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存 20 d,进样分析,比较其含量变化。结果舒芬太尼贮备液在室内不避光条件下放置 1 h 后,有 50% 的发生光解,放置 2 h 后,约 75% 以上分解。在室内避光条件下放置 2 h 后, - 20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存 20 d,含量几无变化, RSD 分别为 1.01% 和 2.04%。

2.3.6.2 血浆样品 按照标准曲线制备方法,制备低、中、高质量浓度样品数份,分别置室温条件下存放 0、1、2、4 h 后和冻融 3 周期,按“2.2”项处理并测定,考察血浆样品、处理后溶液在室温下的稳定性及血浆样品冻融 3 周期的稳定性。结果血浆样品和处理完的样品溶液在避光、室温条件下至少 2 h 内性质较稳定, RSD 分别为 2.50% 和 4.75%。血浆样品在冻融 3 周期内含量没有下降, RSD 为 3.80%。

3 讨论

根据文献报道有采用芬太尼^[2, 3, 6]、丁丙诺啡^[5]作内标,而本实验采用芬太尼为内标,因为它与舒芬太尼的结构相近,舒芬太尼是芬太尼的 $N - 4$ 噻吩基衍生物,在本实验条件下完全分离,峰形较好,保留时间与舒芬太尼保留时间接近,且避开了杂质峰的干扰。

根据文献[6],采用 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵-乙腈作为流动相,在使用 ESI 离子源条件下,发现峰形较差且灵敏度达不到要求。之后比较了 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵-甲醇、水-甲醇(各含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵)、水-乙腈(各含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵) 3 种流动相,发现乙酸铵-甲醇的分离度、峰形明显优于乙酸铵-乙腈,但乙酸铵难溶于乙腈,最后选定水-甲醇(各含 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵)为流动相,峰形、分离度、灵敏度都很好。此外,我们采用 ESI 离子源,与参考文献[2, 6]所使用的 APCI 源不同,ESI 源的灵敏度更好,最低检测浓度达 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

本实验采用快速液相串联三重四级质谱仪测定人血浆中舒芬太尼的浓度,以 ESI 离子源、正离子电离的检测方法,采用 MRM(多重反应监测)扫描,较文献[1- 6]报道的方法具有更高的灵敏度和选择性,为临床药动力学研究提供了一种高效、简便的方法。

【参考文献】

- [1] Movig KL, Largen MC, Egberts AC. Analysis of low concentration sufentanil citrate/hupivacaine hydrochloride admixtures, using solid phase extraction followed by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 1999, 21(4): 845.
- [2] Schmidt R, Bremerich DH, Geisslinger G. High sensitive determination of sufentanil in human plasma of parturients and neonates following patient-controlled epidural analgesia (PCEA) [J]. J Chromatogr Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 836(1- 2): 98.
- [3] Palleschi L, Lucentini L, Ferretti E, et al. Quantitative determination of sufentanil in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 32(2): 329.
- [4] Martens-Lobenhoffer J. Very sensitive and specific determination of

sufentanil in human serum applying liquid chromatography-two stage mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 769(2): 227.

国现代应用药理学杂志, 2008, 8(25): 298.

[5] 肖彬, 张兴安, 施冲. 舒芬太尼临床药动力学研究及应用[J]. 中

[6] 刘维, 段京莉, 张现化, 等. 液相色谱-质谱联用测定全身麻醉患者血浆中舒芬太尼浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2008, 24(3): 245.

(2009-04-07 收稿)

高效液相色谱-电化学检测法测定人血浆中阿奇霉素的浓度

潘熠斌, 陈醒言, 胡国新 (温州医学院药学院药理学教研室, 温州 325035)

【摘要】 目的 建立测定人血浆中阿奇霉素浓度的高效液相色谱电化学(HPLC-ECD)检测法。方法 采用 ZORBAX XDB-C₁₈ 柱(Agilent 150 mm× 4.6 mm, 5 μm)进行分离;以乙腈-50 mmol·L⁻¹KH₂PO₄-K₂HPO₄ 缓冲液(pH=7.0)(70:30, V/V)为流动相;流速为 1.0 mL·min⁻¹;柱温为 45.0℃;ESA Coulochem III型电化学检测器检测,电压 650 mV。以克拉霉素为内标,待测血浆经乙腈沉淀后,上清液氮气吹干,用定量流动相溶解后进样。结果 本法线性关系良好($r = 0.9999$),线性范围 10~1000 μg·L⁻¹,定量下限为 10 μg·L⁻¹,回归方程 $\rho = 6.1328 A_i / A_s - 0.0195$;相对回收率均在 85%~115%内,绝对回收率 > 75%;日间、日内精密度的 RSD 均 < 10%。结论 该法简便、灵敏、特异,适用于人体药动力学及治疗药物检测的研究。

【关键词】 阿奇霉素; 高效液相色谱-电化学检测法; 人血浆

【文献标志码】 A

【文章编号】 1007-4406(2010)02-0096-04

Determination of azithromycin concentration in human plasma by HPLC-ECD

PAN Yibin, CHEN Xingyan, HU Guoxin (Department of Pharmacology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

【ABSTRACT】 AIM To develop a HPLC-ECD method for the determination of azithromycin concentration in human plasma. METHODS A ZORBAX XDB-C₁₈ column(Agilent 150 mm× 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisting of phosphate buffer (pH 7.0, 50 mmol·L⁻¹)-acetonitrile (70:30, V/V). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 45.0℃ and the electric potential of ECD was 650 mV. Clarithromycin was used as the internal standard. RESULTS The linear range of the plasma concentration of azithromycin was 10~1000 μg·L⁻¹ and the limit of quantification was 10 μg·L⁻¹. The regression equation was $\rho = 6.1328 A_i / A_s - 0.0195$, $r = 0.9999$. The relative range of recovery was 85%~115% and the absolute recovery of component added to plasma samples was more than 75%. Both the inter-day RSD and the intra-day RSD were less than 10%. CONCLUSION The method has high sensitivity and good selectivity, and it is suitable for therapeutic drug monitoring and the pharmacokinetic research of azithromycin in human plasma.

【KEY WORDS】 azithromycin; HPLC-ECD; human plasma

阿奇霉素(azithromycin)为新一代大环内酯类抗生素,与其他同类药物相比,不仅同样具有较广的抗菌谱,且组织分布广,组织和血液中药物浓度高,特

别是半衰期明显增长,使其在多数组织中作用持久,疗效显著。目前,测定血浆阿奇霉素浓度主要采用微生物法、衍生化高效液相荧光检测及高效液相-

【作者简介】 潘熠斌(1985-),男,硕士研究生。研究方向:临床药理学。Tel: 1377768802; E-mail: philips1985.6.3@tom.com

【通信作者】 陈醒言,副教授,硕士生导师。Tel: 13857793981; E-mail: dxy@wzmc.net