

液相色谱质谱联用法测定静脉复合麻醉患者血浆中舒芬太尼的浓度

梁宇^a, 韩吉^a, 王玲玲^b, 冯婉玉^a (中国医科大学附属第一医院 a. 药学部; b. 麻醉科 沈阳 110001)

摘要:目的 建立液相色谱质谱联用(LC-MS/MS)测定静脉复合麻醉患者血浆中舒芬太尼的药物浓度方法。方法 血浆样品经 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH溶液 $20\ \mu\text{L}$ 碱化后用乙醚萃取,以芬太尼为内标,采用LC-MS/MS测定。色谱柱为Diamonsil C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),以甲醇-5 mmol·L⁻¹醋酸铵-醋酸(74:26:0.5)为流动相,流速为 $0.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;质谱条件采用TIS离子源,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反应分别为 $m/z\ 387.2\rightarrow m/z\ 238.2$ (舒芬太尼)和 $m/z\ 337.4\rightarrow m/z\ 188.2$ (芬太尼)。结果 舒芬太尼在 $0.01\sim 1.00\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.998\ 1$)内线性关系良好,高、中、低3浓度的提取回收率在64.2%以上,日内、日间精密度均小于11.6%。结论 本试验建立的舒芬太尼血药浓度的测定方法简单、快速、准确、灵敏,可用于临床上复合麻醉中小剂量应用舒芬太尼患者的血药浓度测定及临床药动力学研究。

关键词:舒芬太尼;血药浓度;液相色谱质谱联用;复合麻醉

中图分类号:R969.1 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2012)02-0146-04

Determination of Sufentanil in Plasma of Patients Receiving Intravenous Combined Anesthesia by LC-MS/MS

LIANG Yu^a, HAN Ji^a, WANG Ling-ling^b, FENG Wan-yu^a (a. Department of Pharmacy; b. Department of Anesthesiology, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a LC-MS/MS method for the determination of sufentanil plasma concentration in patients receiving intravenous combined anesthesia. **METHODS** After adding $2\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH as the basification reagent, sufentanil was extracted from plasma by ether. Then sufentanil was determined by LC-MS/MS using fentanyl as the internal standard. Separation was carried on a Diamonsil C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol-5mmol·L⁻¹ ammonium acetate-acetic acid (74:26:0.5) at the flow rate of $0.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. TIS source was applied and operated in positive ion mode. Quantitative determination was performed using multiple reaction monitoring (MRM) of $m/z\ 387.2\rightarrow m/z\ 238.2$ for sufentanil, and $m/z\ 337.4\rightarrow m/z\ 188.2$ for fentanyl. **RESULTS** The calibration curve was in good linearity over the range of $0.01\sim 1.00\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.998\ 1$). The extraction recovery for sufentanil were more than 64.2%, while the intra-day and inter-day precision (RSD) were lower than 11.6%. **CONCLUSION** The method is shown to be simple, rapid, accurate and sensitive, which can be applied to the determination of sufentanil and the pharmacokinetics study of sufentanil in patients receiving intravenous combined anesthesia.

KEY WORDS: sufentanil; plasma concentration; LC-MS/MS; composite anesthesia

舒芬太尼是一种选择性 μ 受体激动剂,与其他阿片类药物相比,其镇痛效能强,起效时间短,有较宽的安全范围,在临床上被广泛应用。然而,它也存在阿片受体激动剂常见的副作用,主要有麻醉恢复期的恶心呕吐,呼吸抑制,心动过缓,低血压等,其中一些副作用是与剂量相关的,因此对舒芬太尼进行血药浓度监测并进行药动力学研究,对指导临床用药很有意义。

复合麻醉是临床上应用较多的一种麻醉方式,因为它可以避免由于单独使用一种麻醉药物剂量过大而带来的副作用。舒芬太尼作为复合麻醉中的镇痛药,剂量范围一般在 $0.1\sim 2\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,因此其血

药浓度极低,不易检测。舒芬太尼血药浓度的测定方法,国内较少报道^[1-3],且定量下限均难以满足复合麻醉小剂量静注舒芬太尼的药物浓度的测定。国外报道的方法主要有放射免疫法(RIA)、气相色谱法(GC)、液相色谱质谱联用法(LC-MS/MS)。RIA的精密度和准确度较低,GC需要将舒芬太尼衍生化^[4]。LC-MS/MS的结果较满意,但有的采用固相萃取^[5],成本较高;有的采用梯度洗脱^[6],操作复杂不易重复。因此本试验建立了简单快速,定量下限更低的测定血浆中舒芬太尼浓度的LC-MS/MS方法,并将其应用于受试者复合麻醉下舒芬太尼的药动力学研究。

作者简介:梁宇,女,硕士,药师 研究方向:药物分析及临床药代动力学 Tel: (024) 83282662 E-mail: wsliangyu@126.com

1 仪器与试剂

舒芬太尼对照品(宜昌人福药业有限责任公司 批号:091204);内标芬太尼对照品(宜昌人福药业有限责任公司 批号:091003);空白血浆(沈阳中心血站);甲醇为色谱纯;甲酸、无水乙醚和乙酸铵为分析纯;水为重蒸馏水。

API4000 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪 配备电喷雾离子源(TIS源) Analyte 数据采集软件(美国AB公司) 岛津9100泵(日本岛津);AL-104电子分析天平(德国梅特勒公司);XK96-A快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司);L-119型试管恒温加热仪(北京莱亨科贸有限公司);TDL-6A台式离心机(上海菲哈尔分析仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm,北京迪马公司);流动相为甲醇-5 mmol · L⁻¹ 醋酸铵-醋酸(74:26:0.5),流速为 0.5 mL · min⁻¹,柱温:25 °C。

质谱条件:离子源为 TIS 源;温度为 550 °C;正离子方式检测;源电压为 1 300 V;Gas1(N₂) 3.45 × 10⁵ Pa; Gas 2(N₂) 2.07 × 10⁵ Pa; Curtain Gas(N₂) 1.03 × 10⁵ Pa; CAD Gas(N₂) 4.14 × 10⁴ Pa;扫描方式为多反应监测(MRM),用于定量分析的离子反应分别为 m/z 387.2 → m/z 238.2(舒芬太尼)和 m/z 337.4 → m/z 188.2(芬太尼);扫描时间为 0.1 s。

2.2 血浆样品处理

向 400 μL 人血浆中分别加入甲醇 40 μL,内标溶液(5.09 μg · L⁻¹ 芬太尼甲醇溶液) 40 μL 和 2 mol · L⁻¹ NaOH 溶液 20 μL,涡旋 30 s,加入乙醚 2 mL,涡旋 1 min,振荡提取 10 min 后,以 3 500 r · min⁻¹ 离心 5 min,分离上清液,于 40 °C 空气流下吹干。残渣溶于 100 μL 流动相,取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.3 方法专属性

分别取 6 名受试者的空白血浆 400 μL,除不加内标外,按“2.2”依法操作,进行 LC-MS/MS 分析,获得空白血浆样品的色谱图,见图 1A;将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,见图 1B,其中舒芬太尼的保留时间约为 3.83 min,内标芬太尼的保留时间约为 3.42 min;取受试者静脉注射其他 3 种麻醉药物而未注射舒芬太尼的血浆样品作为阴性对照,见图 1C;取受试者静脉注射舒芬太尼后

收集的血浆样品,见图 1D。结果表明,空白血浆中内源性物质不干扰待测物及内标物的测定。

2.4 标准曲线的制备

取空白血浆 400 μL,加舒芬太尼标准系列溶液 40 μL,配制成相当于舒芬太尼血浆质量浓度为 0.01,0.02,0.05,0.20,0.50 和 1.00 μg · L⁻¹ 的样品,按“2.2”依法操作,每一浓度进行双样本分析,进样 20 μL,记录色谱图;以待测物浓度为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程为: $Y = 1.815 2\rho + 0.003 4$, $r = 0.998 1$,舒芬太尼在 0.01 ~ 1.00 μg · L⁻¹ 内线性关系良好。最低检测限为 0.01 μg · L⁻¹,RSD 为 5.9%($n = 6$)。

2.5 方法的精密度与准确度

取空白血浆 400 μL,按“2.4”项下的方法配制舒芬太尼低、中、高 3 个质量浓度(舒芬太尼分别为 0.020、0.100 和 0.800 μg · L⁻¹) 的样品。每个质量浓度分别制备 6 个样本,重复 3 个分析批,并与标准曲线同批测定,以当日的标准曲线,计算样品的测得浓度,与配制的浓度对照,求得本法的准确度与精密度,结果见表 1。

2.6 血浆样品提取回收率及基质效应

取空白血浆 400 μL,按“2.4”项下方法,制备舒芬太尼低、中、高 3 个质量浓度(0.02、0.10 和 0.80 μg · L⁻¹) 的样品,每一浓度进行 3 样本分析,得到

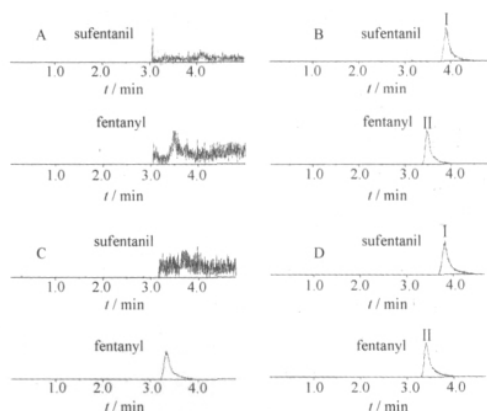


图 1 血浆中舒芬太尼和内标芬太尼的典型质谱图

A - 空白血浆; B - 空白血浆加入舒芬太尼至 0.80 μg · L⁻¹ 和内标芬太尼至 5.09 μg · L⁻¹; C - 受试者静脉注射其他 3 种药物后的阴性对照血浆样品; D - 2 号受试者静脉注射舒芬太尼后 3 min 血浆样品; I - 舒芬太尼; II - 芬太尼

Fig. 1 MRM Chromatograms of sufentanil and fentanyl in plasma
A - blank plasma; B - blank plasma spiked with sufentanil and fentanyl; C - plasma of volunteer who was given intravenous administration of other drugs; D - plasma of No. 2 volunteer at 3 min after intravenous administration of sufentanil; I - sufentanil; II - fentanyl

表 1 血浆中舒芬太尼测定的日内、日间精密度及准确度

Tab. 1 Intra- and inter-day precision and accuracy of sufentanil

Added concentration / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\bar{x} \pm s$ / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	Accuracy	Intra-day	Inter-day
			RSD/% ($n=6$)	RSD/% ($n=3$)
0.02	0.02 ± 0.002	0.4	9.2	11.6
0.10	0.10 ± 0.01	-2.6	5.0	9.0
0.80	0.81 ± 0.06	1.6	6.9	10.1

峰面积。同时另取空白血浆 400 μL , 各以 40 μL 甲醇代替舒芬太尼标准系列溶液和内标溶液制备空白样品, 按“2.2”项下操作, 向获得的上清液中加入相应浓度的标准溶液和内标溶液各 40 μL , 涡流混合 40 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干。残留物以 100 μL 流动相溶解, 进样分析, 获得相应峰面积 B。向干净的试管中加入内标液和舒芬太尼低、中、高 3 个浓度的标准溶液各 40 μL , 混匀后于 40 $^{\circ}\text{C}$ 空气流下吹干。残渣溶于 100 μL 流动相, 进样分析, 获得相应峰面积 C。以每一浓度 A/B 计算提取回收率, B/C 计算基质效应。结果表明, 舒芬太尼在 0.02、0.10 和 0.80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个质量浓度的血浆样品提取回收率分别为 (77.8 \pm 4.2) %、(64.2 \pm 2.6) % 和 (66.1 \pm 2.4) %, 基质效应分别为 (91.6 \pm 4.1) %、(94.0 \pm 6.4) % 和 (96.9 \pm 3.2) %。

2.7 稳定性考察

本试验考察了舒芬太尼血浆样品经液-液萃取处理后室温放置 4 和 24 h 的稳定性, 血浆样品室温放置 4 h 的稳定性, 血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环的稳定性及血浆样品冷冻 60 d 的稳定性。稳定性考察时, 取空白血浆 400 μL , 按“2.4”项下的方法配制舒芬太尼低、高 2 个质量浓度的血浆样品 (舒芬太尼质量浓度分别为 0.02 和 0.80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 每一种浓度水平进行 3 样本分析, 采用 LC-MS/MS 测定。数据表明, 处理后的血浆样品室温放置 24 h 内稳定 (RE 在 $\pm 12.0\%$ 之内, $\text{RSD} \leq 2.7\%$), 血浆样品室温放置 4 h 内稳定 (RE 在 $\pm 12.4\%$ 之内, $\text{RSD} \leq 3.9\%$), 舒芬太尼血浆样品经过 3 次冷冻-解冻循环后稳定 ($\pm 10.5\%$ 之内, $\text{RSD} \leq 4.5\%$), 舒芬太尼血浆样品经过 -20°C 冷冻 60 d 稳定 (RE 在 $\pm 10.0\%$ 之内, $\text{RSD} \leq 12.0\%$)。

3 临床应用

本试验已通过中国医科大学附属第一医院伦理委员会审核批准, 所有受试患者于实验前均签署知情同意书。选 9 名在全麻下行甲状腺部分切除术患者, 男女各半, 年龄在 25 ~ 65 岁, ASA I ~ II 级, 排

除有精神病史、神经性疾病史、美国纽约心脏病协会 (NYHA) 心功能分级 \geq III、肝肾功能不全、不能控制的高血压、术中失血量大于 500 mL、经常应用阿片类药物或镇静药的及长期服用抑制细胞色素药物 (红霉素、酮康唑、伊曲康唑等) 的患者。分别顺次静脉注射咪达唑仑 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 舒芬太尼 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 罗库溴铵 0.8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 依托咪酯 0.3 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 并于静脉注射舒芬太尼后的 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60 min 采静脉血 1.5 mL, 置于预先肝素化的离心管中, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后, 吸取血浆, 于 -20°C 冷冻保存待测。应用上述方法测定舒芬太尼的血药浓度, 其血药浓度-时间曲线见图 2。应用 DAS2.0 软件计算主要药动学参数, 结果为: $t_{1/2}$ 为 (22.343 \pm 6.969) min; AUC_{0-1} 为 (9.058 \pm 6.211) $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 (9.987 \pm 6.056) $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$; MRT_{0-t} 为 (13.082 \pm 4.519) min; CL 为 (0.051 \pm 0.024) $\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

4 讨论

在血浆样品处理方法的选择上, 文献等^[2-3]均采用乙腈沉淀蛋白法, 但定量下限较高, 最低的只达到 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而对于实施复合麻醉的患者, 舒芬太尼用量小, 其血药浓度低, 试验显示患者在静注舒芬太尼 20 min 后的血药浓度已降至 0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 本试验选择了液液萃取法, 可将定量下限降低到 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 满足临床实际需求。试验曾用正己烷-二氯甲烷-异丙醇 (300:150:15) 萃取, 但提取效果不理想, 改用乙醚提取效果较好。实验中对碱化试剂的浓度及用量进行了筛选, 结果表明 2 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 20 μL 效果最好, 响应值最高。实验发现, 在流动相中加入乙酸铵, 可使舒芬太尼分子更稳定的形成 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 准分子离子, 峰形较好。

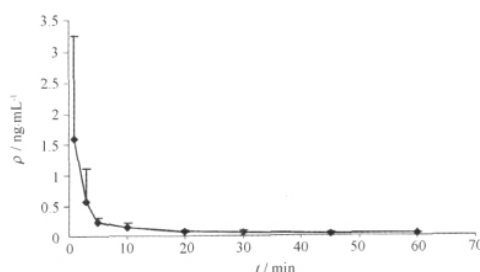


图 2 9 例患者单次静脉注射舒芬太尼后的平均药物浓度-时间曲线, $n=9$, $\bar{x} \pm s$

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve after a single intravenous dose of sufentanil in 9 volunteers, $n=9$, $\bar{x} \pm s$

目前任何全麻药单独使用都不够理想,而且单独使用会因剂量过大而引起毒副反应。因此,复合麻醉是目前临床应用较多的方式,它是通过应用两种以上的麻醉药物或其他辅助药物,来达到最佳的麻醉状态。本试验所述的4种药物作用分别为促遗忘、镇痛、肌松、镇静,其中舒芬太尼的主要作用是镇痛,还能抑制气管插管时心率加快、血压骤升的反应,该剂量的准确掌握起着至关重要的作用。根据该药说明书中表述,静脉给药250 μg舒芬太尼时,消除半衰期为240 min;明显比静脉给药1500 μg时的784 min短,而本实验静脉给药舒芬太尼仅为30 μg,而且没有相关文献报道此剂量下该药的药动学性质,本实验所得的半衰期为(22.343 ± 6.969) min,虽与说明书中差距较大,但符合说明书中剂量变小半衰期变短的规律。本实验的药动学参数对临床医师行气管插管的时间、给予补充剂量的时间有一定指导意义。

5 结论

本试验采用液相色谱-串联质谱技术,建立了灵敏度高、专属性强、简单快速的定量分析方法,用于

测定人血浆中舒芬太尼的浓度,并成功地将其应用于舒芬太尼的临床药动学研究,为继续研究舒芬太尼在特殊人群(肥胖、老人、肝肾功能不全等)的药动学特点奠定了基础。

REFERENCES

- [1] QI S H, HE Z Q, SUN B, *et al.* HPLC Determination of sufentanil in human plasma[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(4): 599-601.
- [2] LIU W, DUAN J L, ZHANG X H, *et al.* Determination of sufentanil concentration in general anesthetized patients plasma by HPLC-MS/MS[J]. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志), 2008, 24(3): 245-248.
- [3] ZENG X H, SHI L, ZHAO S J, *et al.* Determination of sufentanil in human plasma by LC-MS/MS[J]. *Chin J Clin Pharm*(中国临床药理学杂志), 2010, 19(2): 93-96.
- [4] XIAO B, ZHANG X A, SHI C. Studies on clinical pharmacokinetics of sufentanil and its application [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学杂志), 2008, 25(4): 298-301.
- [5] PALLESECHI 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): 329-336.
- [6] 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): 227-233.

(收稿日期: 2011-08-30)

吐温 80 的组分分析

张锐^{1,3}, 王玉^{1,2*}, 谭力², 张海燕³, 杨明³ (1. 中国药科大学, 南京 210009; 2. 江苏省食品药品检验所, 南京 210008; 3. 江西中医药大学, 南昌 330004)

摘要:目的 建立吐温 80 化学组分的分离和鉴定方法,为研究吐温 80 的致敏原奠定基础。方法 收集国内外不同企业生产的吐温 80 样品,先通过 HPLC-ELSD 确定了高效液相色谱分离吐温 80 组分的实验条件,然后通过 HPLC-MS 的方法鉴定各个色谱峰的化学组分归属。结果 不同结构类型的化学组分得到有效的分离,各色谱峰均得到准确的归属,不同厂家及批次吐温 80 的组分及其相对含量均有所不同,并有非法添加勾兑的问题存在。结论 建立的分离分析方法快速、简便、可用于对吐温 80 的生产质量控制,也可为下一步通过分离或合成的手段研究吐温 80 中不同组分的物理化学性质,发现致敏原奠定基础。关键词:吐温 80; 化学组分; 蒸发光散射; 质谱

中图分类号:R927 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2012)02-0149-06

Analysis of the Chemical Composition of Polysorbate 80

ZHANG Rui^{1,3}, WANG Yu^{1,2*}, TAN Li², ZHANG Hai-yan³, YANG Ming³ (1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute for food and drug control, Nanjing 210008, China; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330004, China)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160523)

作者简介:张锐,男,博士研究生,副研究员 研究方向:药物现代仪器分析 * 通讯作者:王玉,男,博士,主任药师,博士生导师 研究方向:药物分析和药品质量控制 Tel: (025) 86331982 E-mail: yuwanga@hotmail.com