

HPLC-MS/MS 法测定人血浆中盐酸戊乙奎醚及应用

余 勤, 梁茂植, 张丽娟, 秦永平, 南 峰, 向 瑾

(四川大学华西医院 GCP 中心临床药理研究室, 四川 成都 610041)

Determination of Penethyclidine in Human Plasma by HPLC-MS/MS

YU Qin, LIANG Mao-zhi, ZHANG Li-juan, QIN Yong-ping, NAN Feng, XIANG Jin
(Laboratory of Clinical Pharmacology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Penethyclidine in human plasma was simultaneously determined by HPLC-MS/MS. The electrospray ion trap mass spectrum in the positive mode and MRM were adopted to detect the concentration of Penethyclidine. The standard curve was linear over the ranges of 0.078 125-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The lowerst limits of quantitation of assay was 0.078 125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The relative recoveries of Penethyclidine were 91.3%-99.4%. The extraction recoveries of Penethyclidine were 79.9%-92.1 %, and it has a good precision with relative standard deviation of both less than 15%. The method is simple, quick, sensitive and reproducible. The results are reliable and accurate.

Keywords: HPLC-MS/MS; ESI; Penethyclidine; pharmacokinetics

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2007) 增刊-72-02

盐酸戊乙奎醚(Penethyclidine Hydrochloride, 简称 PH)为抗胆碱类药物, 主要对中枢神经有较强的抗 M、N 样作用, 对外周神经有较强的抗 M 作用和一定程度的抗 N 样作用。对有机磷解毒、平滑肌的痉挛性收缩引起的支气管哮喘, 慢性支气管炎肺炎等有很好的效果。由于戊乙奎醚对心血管系统没有影响, 不致引起心率和血压的变化, 因此较肾上腺素能 β 受体兴奋剂有一定的优越性^[1]。目前已报道的戊乙奎醚药动力学研究测定方法有 GC/MS/MS 和用放射受体和放射性同位素方法^[2-3]。

1 仪器和试剂

1.1 ESI-MS 仪器装置

采用岛津 SIL-HTC 系列 HPLC 仪(含系统控制器, 高压梯度输液泵, 全自动进样器)与美国 ABI 公司 API 3000 三重四极杆串联质谱仪。Analyst 色谱工作站。

实验用甲醇、甲酸、石油醚、甲醚为 HPLC 级, 醋酸胺等其他化学试剂均为分析纯。实验中所用纯水为 MILLIPORE 公司 RiOsTM-16 仪制备的 I 类水。

盐酸戊乙奎醚化学对照品: 成都力思特制药股份有限公司提供(批号 060501, 纯度: 99.1%, 检验报告书编号: Y004-06001); 内标维拉帕米: 中国药品生物制品检定所提供的标定化学对照品(批号 10233-0102)。

2 测定方法

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Gemini C₁₈(50×2.1 mm, 5 μm); 流动相: $V(\text{CH}_3\text{OH}): V(5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1})$

NH_4AC)=90:10 (用 10%甲酸调 pH 5.8); 流速: $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 室温 ($19\text{ }^\circ\text{C}$)。

2.1.2 质谱条件 ESI 离子源, 采用选择性离子监测模式同时测定戊乙奎醚 (m/z 316.20/128.30), 和内标维拉帕米 (m/z 454.6/303.4)。

2.2 血浆样品处理

取 0.2 mL 血浆样品, 加入 0.1 mL 内标工作液, 漩涡混匀。加入 $0.1\text{ mL } 0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$ 溶液, 漩涡混匀后加入 3 mL 石油醚/乙醚 (70/30) 萃取液, 漩涡萃取 6 min , 离心 7 min ($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 转移上层有机相于另一尖底试管。下层液再加入 3 mL 石油醚/乙醚 (70/30) 第二次萃取, 漩涡萃取 6 min , 离心 7 min ($3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 转移上层有机相于前述尖底试管合并, 置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中通空气流挥干。残留物溶于 $80\text{ }\mu\text{L}$ 流动相, 漩涡混匀溶解, 分装入全自动进样器, 进样 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。记录戊乙奎醚和内标离子流质谱图的质谱峰面积, 计算戊乙奎醚和内标的峰面积比, 从标准曲线求出样品中戊乙奎醚浓度。

2.3 标准曲线和线性范围

取 0.1 mL 空白血浆共 9 份, 加入 0.1 mL 戊乙奎醚标准系列工作液, 配成各含 10、7.5、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25、0.078 125 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 血浆样品, 按 2.2 方法处理, 记录戊乙奎醚和内标离子流质谱图的质谱峰面积, 以戊乙奎醚和内标峰面积比对应其浓度进行线性回归, 得戊乙奎醚血浆标准曲线回归方程: $Y=0.077X+0.000352$ ($r=0.999\ 6$)。戊乙奎醚在 $0.078\ 125\sim 10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性良好, 最低定量限分别为 $0.078\ 125\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 结果

3.1 预处理回收率

按 2.2 方法处理含戊乙奎醚浓度分别为 7.5、2.5、1.25、0.312 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 血浆样品, 每种浓度各做 7 份, 平行操作。所得峰面积与对照品溶液直接进样所得峰面积进行比较, 预处理回收率为 $80.5\%\sim 92.1\%$ 。

3.2 方法回收率和精密度

取空白血浆, 配制戊乙奎醚浓度分别为 7.5、2.5、1.25、0.312 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 血浆样品各 7 份, 按 2.2 处理方法进行处理, 并进样测定, 分别计算日内、日间差异及方法回收率。方法回收率为 $91.3\%\sim 99.4\%$, 日内精密度的 $6.38\%\sim 10.57\%$, 日间精密度的 $7.13\%\sim 9.44\%$ 。

3.3 血浆样品稳定性

取 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 保存的血浆样品, 在 0、7、14、21 和 28 天按前述血浆样品处理方法进行操作, 测定其浓度, 血浆样品在 $-30\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 28 天, 戊乙奎醚浓度结果稳定。对比测定冻融 0、1、2、3 次的血浆样品以及室温放置 0、2、4 h 的血浆样品, 测定结果表明, 在冻融和室温放置条件下, 戊乙奎醚浓度结果稳定。对比测定样品处理完后立即进样与放置 0、2、4、24、48、60 h 后进样, 测定结果表明, 上述时间放置后戊乙奎醚浓度结果稳定。对比测定样品处理完后立即溶解进样与溶解后分别放置 8 h、12 h 后进样, 测定结果表明, 预处理后残留物复溶后放置 12 h 戊乙奎醚测定结果稳定。

3.4 应用

该方法已用于盐酸戊乙奎醚气雾剂人体药动学研究, 获得满意结果。

4 讨论

文献报道^[4]多在流动相中添加了三乙胺, 故本工作比较了在流动相中添加三乙胺和不添加三乙胺, 发现含三乙胺的流动相测定灵敏度降低约 10 倍, 为保证有足够的灵敏度, 选择用不含三乙胺的流动相, 用甲酸调节 pH 值, 有利于提高待测物的离子化效率。文献报道^[2-4]内标的选择多以氘标戊

(下转第 78 页)

司产品; 甲酸(分析纯): 上海凌峰化学试剂有限公司产品。

1.3 测试条件

流动相为甲酸铵和乙腈溶液, $V(10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{甲酸铵}(\text{pH } 4.5)): V(\text{乙腈})=60: 40$; 固定相 Waters Xterra C_{18} 柱 ($50\times 2.1\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流速: $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样体积 $5\text{ }\mu\text{L}$; 电离源及检测模式: ESI 源正离子模式 SRM 扫描; 检测通道: 罗红霉素 $m/z\ 837.5\rightarrow m/z\ 679.5$, 内标克拉霉素 $m/z\ 748.5\rightarrow m/z\ 158.1$; 样品为室温条件下分离。在该色谱条件下, 罗红霉素和内标的保留时间分别为 1.49 min 和 1.41 min 。

1.4 血浆样品前处理方法 血浆样品前处理为采用 3 倍体积乙腈沉淀蛋白, 上清液 N_2 吹干, 流动相重建后进样分析。

2 结果和讨论

血浆中罗红霉素在 $10\sim 1\ 000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系均良好($r^2>0.999$), 最低定量限(LLOQ)为 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 血浆样品中罗红霉素提取回收率为 $(96.67\pm 7.84)\%$ 。罗红霉素高、中、低浓度质控及 LLOQ (800 、 400 、 30 和 $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)血浆样品测定结果的天内、天间及周间相对标准偏差分别为 $\leq 4.50\%$ 、 $\leq 8.18\%$ 和 $\leq 7.52\%$, 6 次重复进样的相对标准偏差 $\leq 4.86\%$ 。稳定性试验表明血浆样品室温下放置 24 h 或处理后放置 12 h 及 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冻融 3 次对测定结果无影响。6 份来自于不同受试者的血浆基质效应研究证实, 该样品预处理方法对血浆中罗红霉素和克拉霉素浓度的测定无影响。

建立的罗红霉素 LC-MS/MS 测定法样品处理简单、特异性和灵敏度高, 准确性和精确性好, 可为罗红霉素临床药代动力学研究提供简捷、准确的分析测定方法。

参考文献:

- [1] 邹健军, 彭向东, 李 兵, 等. 人血浆中罗红霉素的 HPLC-MS 测定及生物等效性研究[J]. 中南药学, 2004, 2(4): 214-216.

.....
(上接第 73 页)

乙奎醚作为内标, 本工作比较了苯海拉明和维拉帕米, 最后确定维拉帕米作内标。戊乙奎醚为碱性药物, 碱化条件是影响药物回收率的重要因素, 本工作尝试了不同的碱化条件后, 最终采用 $0.1\text{ mL } 0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH, 获得较好得药物萃取回收率和提取稳定性。本工作同时考察了使用乙酸乙酯、二氯甲烷、石油醚/乙醚 (70/30)萃取和用乙腈直接沉淀蛋白的提取情况, 以用石油醚/乙醚 (70/30) 两次萃取的回收率高并且结果稳定, 故在 $0.1\text{ mL } 0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 条件下, 用石油醚/乙醚 (70/30)萃取两次。

本工作建立的高效液相色谱-质谱法测定人血浆中戊乙奎醚浓度的方法, 操作简单、灵敏度高、重现性好、结果准确, 可用于药动学和其他相关的研究。

参考文献:

- [1] 郭 英, 谢建平, 莫正纪. 盐酸戊乙奎醚药理研究及临床应用的新进展[J]. 华西医学, 2004, 19 (4): 702-703.
[2] 薛 明, 阮金秀, 袁淑兰, 等. 盐酸戊乙奎醚外消旋体在家兔体内的药代动力学研究[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36 (8): 17-19.
[3] 乔建忠, 袁淑兰, 张振清, 等. 盐酸戊乙奎醚在小鼠体内的药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2003, 38 (12): 942-944.
[4] 薛 明, 阮金秀. LC-MS/MS 及离子簇技术分析鉴定盐酸戊乙奎醚外消旋体在大鼠体内的代谢产物[J]. 药学学报, 2002, 37 (10): 802.