

· 研究报告 ·

用 LC-MS 法测定人血浆中顺式阿曲库铵的浓度

辛 博^a, 万丽丽^a, 王 婧^a, 刘金变^b, 霍 炎^a, 郭 澄^a (上海交通大学附属第六人民医院: a. 药剂科, b. 麻醉科, 上海 200233)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱串联质谱方法(LC-MS)测定人血浆中顺式阿曲库铵的浓度,并应用于临床治疗药物监测。方法 采用盐酸普罗帕酮同位素内标,样品经 2% 甲酸水和含内标的乙腈溶液沉淀蛋白处理。HPLC 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈, 柱温 35 °C, 流速 0.3 ml/min, 流动相为 0.1% 甲酸水和 0.1% 甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱。质谱检测方式为 ESI 正离子模式, MRM 扫描, 监测阿曲库铵 m/z 464.6~358.4, 盐酸普罗帕酮(内标) m/z 342.2~116.2。结果 人血浆中顺式阿曲库铵在该条件下分离良好, 在 2~500 ng/ml 浓度范围内线性关系良好($r=0.9965$), 定量下限为 2 ng/ml。方法日内精密度 RSD<16.0%; 日间精密度 RSD<6.0%。平均回收率为 97.63%~111.93%; 血浆样品室温放置 4 h, -80 °C 放置 14 d, 处理后室温放置 24 h, 稳定性良好。结论 本方法简便、准确、快速、稳定, 适用于顺式阿曲库铵的血药浓度测定。

[关键词] 顺式阿曲库铵; 高效液相色谱串联质谱; 人血浆; 治疗药物监测

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)02-0148-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.201909001

Cisatracurium assay in human plasma by LC-MS

XIN Bo^a, WAN Lili^a, WANG Jing^a, LIU Jinbian^b, HUO Yan^a, GUO Cheng^a (a. Department of Pharmacy, b. Department of Anesthesiology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, 200233 Shanghai, China)

[Abstract] **Objective** To establish a LC-MS method of cisatracurium assay in human plasma for clinical therapeutic drug monitoring. **Method** Propafenone Hydrochloride was used as the internal standard. The plasma samples were treated with 2% formic acid aqueous solution and acetonitrile containing the internal standard to precipitate protein. Agilent SB-C₁₈ column was used for gradient elution with the mobile phase of 0.1% formic acid-water and 0.1% formic acid-acetonitrile solution at 35 °C and 0.3 ml/min flow rate. The degradation products of cisatracurium m/z 464.6-358.4 and propafenone hydrochloride m/z 342.2-116.2 were identified by ESI positive-ion detection. **Results** There was a linear range of cisatracurium in 2-500 ng/ml ($r=0.9965$) with a detection limit of 2 ng/ml. The intra-day coefficients of variation (CVs) were less than 16.00%, and the inter-day CVs were less than 6.00%. The mean recoveries were in the range of 97.63%-111.93%. The plasma samples were stable for 4 hours at room temperature, 14 days at -80 °C and 24 hours after pretreated. **Conclusion** This method was simple, accurate, fast and repeatable for the cisatracurium assay in human plasma.

[Key words] cisatracurium; LC-MS; human plasma; therapeutic drug monitoring

顺式阿曲库铵(cisatracurium, CA)是一种新型中时效非去极化肌松药,其结构式如图 1,因其代谢方式(Hofmann elimination, 霍夫曼降解)独特,同时释放较低水平的组胺,在临床麻醉过程中被广泛应用。因与其他非去极化肌松药一样,存在术后肌松残留作用^[1],且已成为麻醉后呼吸系统不良事件的主要原因。因此,为保证患者围术期安全,对顺

式阿曲库铵进行血药浓度监测十分必要。

CA 的稳定性主要受温度和 pH 影响,温度和 pH 升高可加快其消除,因此离体后的生物样本稳定性是血药浓度监测方法建立的一个难点。国内外文献报道测定人血浆中 CA 浓度的方法主要为高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FD)及高效液相色谱串联质谱法(LC-MS)^[2-6],但样本前处理方法较为复杂。本研究在既往文献报道的基础上,建立了一种更加简便、准确、快速、稳定的 LC-MS 方法,适用于人血浆中 CA 的血药浓度测定。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Agilent 6410, 美国 Agilent 公

[基金项目] 上海市科委科研项目(16DZ191110A); 上海市科委科研项目(16DZ1911109)

[作者简介] 辛 博, 博士, 药士, 研究方向: 临床药学, Email: jiayouxinbo@126.com

[通讯作者] 郭 澄, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 临床药学, Email: guopharm@126.com

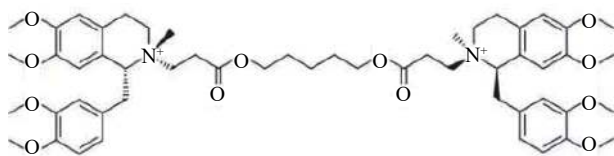


图1 顺式阿曲库铵的结构式

司); Triple Quad 三重四极杆质谱仪, 带电喷雾 (ESI) 离子源 (美国 Agilent 公司); 纯水机 (Millipore); 分析天平 (BP211D, 德国 Sartorius 公司)。对照品顺式阿曲库铵 (cisatracurium, CA, 批号: C496700, 纯度 90%, Toronto Research Chemicals Inc 公司); 对照品盐酸普罗帕酮 (propafenone hydrochloride, PPF, 批号: 101190-201101, 纯度 99.9%, 中国药品食品检定研究院); 乙腈、甲酸均为质谱纯 (美国 TEDIA 公司); 水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件

Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 3 μm), 柱温 35 °C; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液。线性梯度洗脱: 0~1 min, 20% B; 1~3 min, 50% B; 3~5 min, 20% B; 5~10 min, 20% B。流速 0.3 ml/min; 进样量 2 μl。

2.1.2 质谱条件

采用正离子工作模式; 离子源为 ESI 源; 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)。毛细管电压 4 000 V; 干燥器温度 350 °C; 干燥气流速 12 L/min; 雾化器压力 35 psi。MRM 监测离子对, 离子驻留时间、碰撞诱导解离电压及碰撞能量等参数见表 1。典型质谱图见图 2。

表 1 质谱条件

成分	母离子	子离子	驻留时间 (t/ms)	碰撞电压 (U/V)	电子倍增电压 (U/V)	碰撞能量 (U/V)
CA	464.4	358.4	20	110	200	20
PPF	342.2	166.2	200	130	200	17

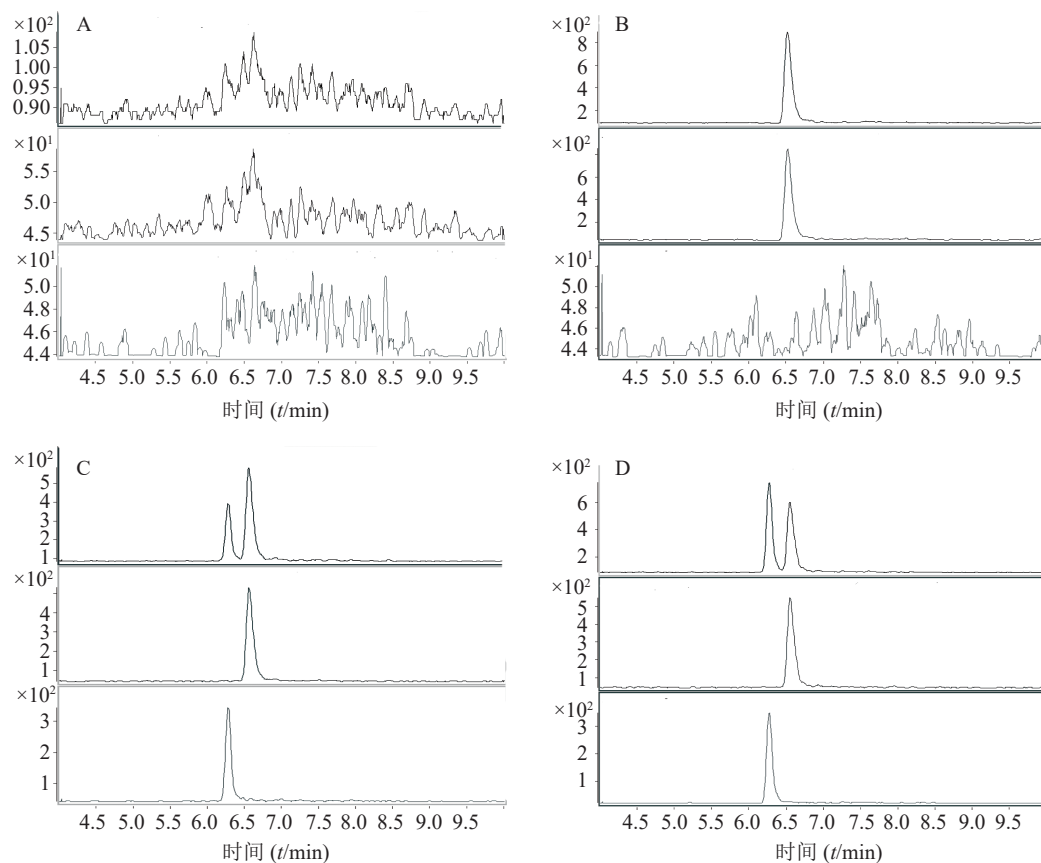


图 2 HPLC-MS 色谱图

A. 空白血浆样品; B. 含内标的空白血浆样品; C. CA 为 31.25 ng/ml 的血浆样品; D. 患者给药后血浆样品

2.2 对照品及内标溶液配制

CA标准储备液:精密称取CA 10 mg置10 ml容量瓶,加入2%甲酸甲醇溶液至刻度,溶解混匀,配制成相当于CA质量浓度为1 mg/ml的储备液,于冰箱(4℃)备用。

CA标准工作液:精密吸取CA储备液适量,用50%甲醇水溶液配制成系列浓度的工作溶液,其中,CA质量浓度分别为5 000、2 500、1 000、500、250、100、20 ng/ml。

PPF标准储备液:精密称取PPF 0.4 mg置2 ml容量瓶,加甲醇至刻度,溶解混匀,配制成相当于PPF质量浓度为0.2 mg/ml的储备液,于冰箱(4℃)备用。

PPF标准工作液:精密吸取PPF储备液适量,配制成200 ng/ml的含内标乙腈溶液。

2.3 血浆样品处理

精密吸取血浆30 μl,加入2%甲酸水溶液30 μl,振摇10 s,再加50 μl含内标乙腈溶液后旋涡振荡10 s,12 000 r/min离心10 min,转移上清液置进样

瓶,进样。

2.4 标准曲线及最低定量限

取空白人血浆,精密加入不同浓度的对照品溶液,配制成CA浓度为500、250、100、50、25、10、2 ng/ml的血浆标准品。以浓度为X轴,样品峰与内标峰的比值为Y轴,进行线性回归,经“1/X”权重得回归方程分别为: $Y = 7.43 \times 10^{-3} + 1.99 \times 10^{-2}X$ ($r = 0.9965$)。结果表明,CA在2~500 ng/ml内,线性关系良好。本方法CA的定量下限为2 ng/ml。

2.5 系统精密度与准确度(回收率)

配制CA浓度分别为8、80、400 ng/ml的血浆样品,日内误差以3个浓度各5个样品的测定结果表示;日间误差以3个浓度样品分别3个批次结果表示。人空白血浆分别加入不同浓度CA工作溶液,按照“2.3”项下方法提取后,相同色谱条件进行浓度测定。同时测定用流动相稀释为相应浓度的无基质溶液的峰面积,以计算绝对回收率。结果如表2所示。

表2 CA人血浆样品的系统精密度与准确度(回收率)

CA理论浓度(ng/ml)	日内			日间		
	测得浓度(ng/ml)	精密度RSD(%)	准确度REC(%)	测得浓度(ng/ml)	精密度RSD(%)	准确度REC(%)
8	8.53	2.39	106.67	8.52	2.00	106.46
80	89.54	1.77	111.93	88.16	3.48	110.19
400	390.53	15.9	97.63	398.59	5.19	99.65

2.6 稳定性试验

空白血浆分别配制成8、80、400 ng/ml的样品,每批次各3个,分别考察其①室温下放置4 h;②处理后室温放置24 h;③-80℃放置14 d的稳定性。结果如表3所示。

2.7 基质效应

取6个不同来源的人空白血浆30 μl,除不加

内标外,其余按“2.3”项下操作,取上清液,分别制备成CA浓度为31.25和1 000 ng/ml;PPF浓度为200 ng/ml的溶液,进样测定,记录峰面积。另用流动相将CA稀释成31.25和1 000 ng/ml;PPF浓度为200 ng/ml浓度的溶液,进样测定,记录峰面积。

基质效应=(空白基质中添加工作溶液峰面积/重组溶液中添加工作溶液峰面积)×100%

CA的基质效应为52%(RSD 2.09%~15.33%)。PPF的基质效应为96.71%(RSD 4.6%)。

2.8 方法在治疗药物监测中的应用

采用肌松仪监测患者注射苯磺顺式阿曲库铵后神经肌肉阻滞程度。给予4个成串刺激(train of four stimulation, TOF),给药后,T4最先发生衰减,T1最后衰减。当T1消失即仪器显示为0时,肌肉阻滞程度最大,随后逐渐恢复。分别在T0(T1消失至0)、TOFr 50(恢复至50%)、TOFr 90(恢复至90%)时采集输液对侧动脉血3 ml,并及时保存于4℃冰箱中。采用建立的方法测定样本血药浓度,结果见表4。同时记录T0(给药结束到T1消失至0)、

表3 CA人血浆样品不同条件下的稳定性

时间	样品浓度(ng/ml)	REC(%)	RSD(%)
室温4 h	低	103.50	9.28
	中	98.27	5.26
	高	101.33	3.73
处理后室温24 h	低	77.22	5.37
	中	112.95	10.83
	高	110.46	6.80
-80℃14 d	低	75.40	7.95
	中	113.67	23.61
	高	98.22	1.69

TOFr50(给药结束到恢复至50%)、TOFr90(给药结束到恢复至90%)发生所需时间,结果见表5、表6。

表4 6例受试者血浆中CA血药浓度测定结果

TOF (%)	浓度(ng/ml)					
	受试者1	受试者2	受试者3	受试者4	受试者5	受试者6
0	445.02	525.30	253.83	165.29	150.57	309.22
50	76.58	125.65	68.71	68.99	53.18	58.46
90	44.10	71.80	60.72	71.74	41.12	45.07

表5 6例受试者临床资料

基本信息	受试者1	受试者2	受试者3	受试者4	受试者5	受试者6
性别	女	女	女	男	女	男
年龄(岁)	50	49	53	70	36	40
体重(m/kg)	70	75	60	50	53	80
身高(l/cm)	165	165	164	161	165	173

表6 6例受试者达到各TOF值的时间

TOF(%)	时间(t/min)					
0	10	15	15	20	20	20
50	70	70	65	65	65	75
90	105	95	95	100	85	110

3 讨论

CA的代谢途径主要为Hoffman消除^[7],Hoffman消除受温度和pH值的影响。有研究显示^[8],将苯磺顺阿曲库铵注射液稀释于20%的甲醇中,室温下,10~15 min即可检测到大量降解产物N-甲基四氢罂粟碱和单季丙烯酸酯。血浆的pH值在7.4左右。我们发现,在CA血浆样本前处理过程中,如果不加入酸调节pH值,即使在-80℃的储存条件下,CA仍然会很快降解(结果未在文中体现)。为此,我们考察了不同比例的甲酸,最终确定了在样本前处理过程中加入2%的甲酸能够保证血浆中CA的稳定性。在既往报道中,多是加入一定浓度的硫酸来调控pH值^[2-6]。硫酸为有机酸,对测定仪器尤其是质谱仪的离子源损害很大。同时,加入硫酸并不能保证室温条件下样本的长时间稳定(<4 h)^[9]。本研究结果显示,加入2%的甲酸,室温

下样本稳定性可保持在24 h以上。此外,我们的样本前处理过程并不需要经过离心-上清液真空浓缩或氮吹浓缩-复溶-离心取上清液等^[2-6,9]复杂过程,更为省时、省力。经验证,本研究建立的方法测定CA血浆样本的精密度、准确度和稳定性均符合方法学要求。该方法更加简便、准确、快速、稳定,可应用于临床CA治疗药物浓度的监测。

【参考文献】

- [1] SZAKMANY T, WOODHOUSE T. Use of cisatracurium in critical care: a review of the literature[J]. *Minerva Anesthesiol*, 2015, 81(4): 450-460.
- [2] DEAR G J, HARRELSON J C, JONES A E, et al. Identification of urinary and biliary conjugated metabolites of the neuromuscular blocker 51W89 by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1995, 9(14): 1457-1464.
- [3] ZHANG H, WANG P, BARTLETT M G, et al. HPLC determination of cisatracurium besylate and propofol mixtures with LC-MS identification of degradation products[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1998, 16(7): 1241-1249.
- [4] SAYER H, QUINTELA O, MARQUET P, et al. Identification and quantitation of six non-depolarizing neuromuscular blocking agents by LC-MS in biological fluids[J]. *J Anal Toxicol*, 2004, 28(2): 105-110.
- [5] GAO J Y, YANG T, YE M, et al. High-performance liquid chromatography assay with programmed flow elution for cisatracurium in human plasma: application to pharmacokinetics in infants and children[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 955-956: 58-63.
- [6] GUO J R, YUAN X H, ZHOU X F, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium in patients undergoing surgery with two hemodilution methods[J]. *J Clin Anesth*, 2017, 38: 75-80.
- [7] KISOR D F, SCHMITH V D, WARGIN W A, et al. Importance of the organ-independent elimination of cisatracurium[J]. *Anesth Analg*, 1996, 83(5): 1065-1071.
- [8] BŁĄZEWICZ A, FIJAŁEK Z, WAROWNA-GRZEŚKIEWICZ M, et al. Determination of atracurium, cisatracurium and mivacurium with their impurities in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with charged aerosol detection[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(8): 1266-1272.
- [9] 吴祝峰. 顺苯磺阿曲库铵在先天性心脏病患者中的药动学与药效学研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016.

[收稿日期] 2019-09-01 [修回日期] 2020-01-09

[本文编辑] 李睿旻