

LC-MS/MS法测定人血浆中盐酸右美托咪定的浓度^Δ

任莉^{1,2*},徐波^{2#},张兴安²,关慧³,曾晓晖³,石磊³,李柳旬²,黎治滔²,屠伟峰²(1.南方医科大学,广州510515;2.广州军区广州总医院麻醉科,广州510010;3.广州军区广州总医院药学部,广州510010)

中图分类号 R969.1;R971⁺.43 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)02-0126-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.02.10

摘要 目的:建立测定人血浆中盐酸右美托咪定浓度的方法。方法:血浆样品用乙酸乙酯-二氯甲烷(4:1)萃取浓缩后进样。采用液-质联用(LC-MS/MS)法进样测定,以替米沙坦为内标,色谱柱为Agilent Eclipse Plus C₁₈,流动相为甲醇-1%甲酸水(75:25, V/V);采用电喷雾离子源(ESI),以多反应离子检测(MRM)方式进行检测。右美托咪定和内标检测离子对的 m/z 分别为201.1/95.1、512.2/276.1。结果:右美托咪定血药浓度在20~6 000 ng/L范围内线性关系良好($r=0.995 1$),最低定量限为20 ng/L,提取回收率为82.20%~96.37%,日内、日间RSD均在11%之内。结论:本方法具有快速、灵敏、重现性好等特点,可用于临床上盐酸右美托咪定血药浓度监测及药动学研究。

关键词 盐酸右美托咪定;液-质联用法;血药浓度

Determination of Dexmedetomidine Hydrochloride in Human Plasma by LC-MS/MS

REN Li¹, XU Bo², ZHANG Xing-an², GUAN Hui³, ZENG Xiao-hui³, SHI Lei³, LI Liu-xun², LI Zhi-tao², TU Wei-feng²(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Dept. of Anesthesiology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China; 3. Dept. of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of dexmedetomidine hydrochloride in human plasma. METHODS: Dexmedetomidine was extracted with acetic ether-dichloromethane (4:1) and LC-MS/MS was adopted using telmisartan as internal standard. The separation was performed on Agilent Eclipse Plus C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-1% formic acid (75:25, V/V). ESI source was applied. Dexmedetomidine and telmisartan (IS) were detected on multiple reaction monitoring (MRM) mode by the transitions from the precursor to the production (m/z 201.1/95.1, 512.2/276.1). RESULTS: The linear range of dexmedetomidine were 20-6 000 ng/L ($r=0.995 1$), and the lowest quantification limit was 20 ng/L. The relative recoveries were 82.20% -96.37%, and the RSDs of intra-day and inter-day were less than 11%. CONCLUSIONS: The method is proved to be rapid, sensitive and reproducible for the determination of dexmedetomidine in human plasma and pharmacokinetic study.

KEYWORDS Dexmedetomidine hydrochloride; LC-MS/MS; Plasma concentration

盐酸右美托咪定化学名为:(R)-4-[1-(2,3-二甲苯基)乙基]-1*H*-咪唑单盐酸盐,最早于2000年3月在美国上市。作为一种高选择性的 α_2 肾上腺素受体激动药,其亲和力比可乐定高8倍。右美托咪定具有镇痛、可唤醒的镇静和抗焦虑作用,已被广泛应用于消除谵妄、机械通气、减轻交感兴奋及炎症反应等诸多临床实践中。关于该药血药浓度的测定方法国内鲜有报道^[1-2],国外有采用气-质联用(GC-MS)法^[3]、液-质联用(LC-MS/MS)法^[4-6]、放射法^[7]等,此类方法能检测的最低浓度为5 ng/L。样品前处理方法有蛋白沉淀法^[1]、液液萃取法^[2,6]和固相萃取法^[4]等。本试验在此基础上采用Agilent 6410建立并验证了样品经液液萃取后测定人血浆中盐酸右美托咪定浓度

的LC-MS/MS法,为研究其药动学提供了一种可靠的手段。

1 材料

1.1 仪器

Agilent RR1200/QQQ6410系统,包括G1322A在线脱气机、G1312B二元梯度泵、G1367C自动进样器、G1316B柱温箱(美国Agilent公司);6410三重四极杆质谱仪、B.01.03MassHunter工作软件(美国Agilent公司);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(德国Sartorius公司);TDZ5-WS多管架自动平衡离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);H2050R台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);XW-80A型涡旋混合器(原上海医科大学仪器厂);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

右美托咪定对照品(上海香瀚生物科技有限公司,批号:20121002,纯度:98%);内标:替米沙坦对照品(昆明星昊四创

^Δ 全军医学科研“十二五”面上项目(No.CWS11J269);广东省广州市科技攻关计划项目(No.201300000176)

* 硕士研究生。研究方向:药动学。电话:020-88653387。E-mail:renli325@hotmail.com

通信作者:副教授,硕士研究生导师。研究方向:静脉麻醉药的精确给药。电话:020-88653387。E-mail:xubo333@hotmail.com

药业有限公司,批号:20111001)。甲醇为色谱纯,甲酸、醋酸乙酯、二氯甲烷均为分析纯;水为达18.25Ω级别的超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:美国Agilent Eclipse Plus C₁₈(4.6 mm×150 mm, 3.5 μm);流动相:甲醇-1%甲酸水(75:25, V/V);流速:0.5 ml/min;柱温:35 ℃;进样量:2 μl。

2.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);毛细管电压:4 000 V;喷雾气压力:45 psi;干燥气体流速:10 L/min;干燥气温度:350 ℃;离子化模式:正离子化,扫描方式:MRM;用于定量分析的离子为右美托咪定 m/z 201.1→95.1、替米沙坦 m/z 512.2→276.1。质谱特征离子图见图1。

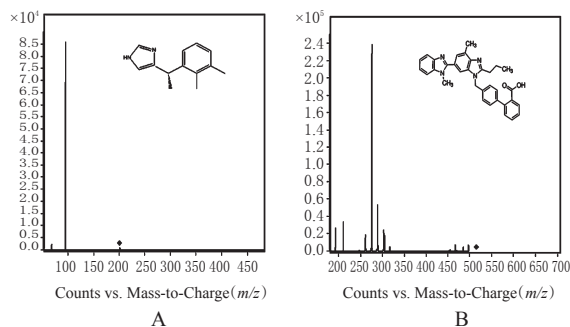


图1 质谱特征离子图

A.右美托咪定(m/z 201.1→95.1);B. 替米沙坦(m/z 512.2→276.1)

Fig 1 Mass spectra ion map

A. dexmedetomidine (m/z 201.1→95.1); B. telmisartan (m/z 512.2→276.1)

2.3 贮备液的配制

称取右美托咪定对照品1 mg、替米沙坦5 mg,分别置于10、50 ml量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,均配制成浓度为0.1 mg/ml的贮备液,分别贮存于-20、4 ℃冰箱避光保存备用。试验前按试验所需稀释成相应浓度的标准工作液并稀释配置640 ng/ml的内标替米沙坦甲醇溶液。

2.4 样品处理

精密加入血浆样品200 μl置于10 ml的玻璃离心管中,加入640 ng/ml的替米沙坦甲醇溶液10 μl、0.2 mol/L氢氧化钠溶液100 μl,快速振荡1 min,再加乙酸乙酯-二氯甲烷(4:1)1 ml,加盖密封,涡旋振荡2 min,以离心半径为8 cm,2 800 r/min离心10 min,吸取有机层800 μl置锥形玻璃离心管内,30 ℃水浴氮气挥干。进样前加入残渣溶解液(甲醇:水=80:20)100 μl,快速振荡30 s使残渣溶解,吸到1.5 ml离心管中,以离心半径为8 cm,20 000 r/min离心5 min,吸取上清液入进样瓶。

2.5 专属性考察

分别取6名受试者的空白血浆200 μl置于10 ml的带塞锥形玻璃离心管中,除不加内标外,按“2.4”项依法操作,进样2 μl,获得空白血浆样品的色谱图,见图2A;将一定浓度的标准溶液和内标溶液加入空白血浆中,依同法操作获得相应的色谱图,见图2B,右美托咪定、替米沙坦的保留时间分别约为3.0 min和3.6 min;取受试者给药后收集的血浆样品,依同法操作,

得色谱图2C。结果表明,血浆右美托咪定和内标替米沙坦峰形良好,分离完全,不受血浆内源性物质干扰。

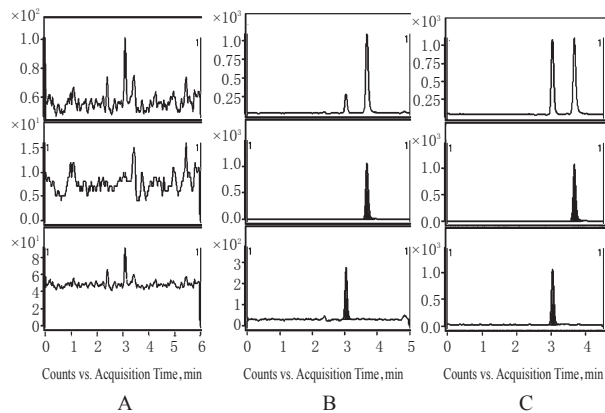


图2 典型色谱图

A. 空白血浆;B. 空白血浆+右美托咪定+替米沙坦;C. 血浆样品+替米沙坦

Fig 2 Typical chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + dexmedetomidine + telmisartan; C. plasma samples +telmisartan

2.6 标准曲线的制备

取空白血浆200 μl,分别加入质量浓度为0、0.4、1、2、4、10、20、40、80、120 μg/L的右美托咪定对照品溶液10 μl,振荡30 s,使血浆药物质量浓度分别相当于20、50、100、200、500、1 000、2 000、4 000、6 000 ng/L,其余按“2.4”项方法处理。经LC-MS/MS分析,记录色谱。以右美托咪定峰面积与内标峰面积之比(y)为纵坐标,血浆右美托咪定浓度与内标浓度之比(x)为横坐标进行线性回归,权重系数为1/x²,得典型代表方程为:y=167.653 2x+0.205 0(r=0.995 1,n=8)。结果表明,右美托咪定血药浓度在20~6 000 ng/L范围线性关系良好。

2.7 定量下限考察

血浆样品右美托咪定定量下限浓度为20 ng/L,平行对5个质量浓度为20 ng/L的含药血浆样品处理后进行色谱分析,其准确度平均为107.94%,RSD为9.04%。

2.8 精密度及回收率试验

按“2.6”项方法分别配制低(50 ng/L)、中(500 ng/L)、(4 000 ng/L)高浓度的右美托咪定血浆溶液各15份,分为3批,每批5份,并与每批的标准曲线同时进行,依“2.4”项方法处理后取2 μl进样,计算质控样品的测得浓度,与配制浓度对照,求得本法的精密度。同法以空白血浆,除不加标准系列溶液和内标外,按“2.4”项方法处理后,再加入相应浓度的右美托咪定和替米沙坦,取2 μl上清液进样,以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。采用1天的数据,将右美托咪定峰面积和内标峰面积的比值代入随行标准曲线,计算所得浓度和加入浓度的比值,即为方法回收率。右美托咪定精密度和回收率见表1。

2.9 介质效应

取9管空白血浆各200 μl平分3组,每组3管,除不加标准系列溶液和内标外,按“2.4”项方法处理后,于残渣中加入残渣溶解液80 μl后,分别加入低(1 μg/L)、中(10 μg/L)、高(80 μg/L)质

表1 精密度及回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

理论值, ng/L	日内精密度		日间精密度		提取回收率, %	方法回收率, %
	测得值, ng/L	RSD, %	测得值, ng/L	RSD, %		
50	51.46 ± 0.00	3.26	48.09 ± 0.00	8.24	96.37 ± 0.05	102.91 ± 3.35
500	485.89 ± 0.04	7.51	503.58 ± 0.04	8.76	92.00 ± 0.13	97.18 ± 7.30
4 000	4 145.11 ± 0.36	8.74	3 985.73 ± 0.40	10.11	82.20 ± 0.04	103.63 ± 9.05

量浓度的右美托咪定和内标替米沙坦(640 ng/ml)各10 μl。以此种处理方法测得的右美托咪定和内标峰面积与空白试管中加入80 μl残渣溶解液后,再加入相应浓度的右美托咪定和内标各10 μl混匀后测得的峰面积的比值计算百分比。结果低(50 ng/L)、中(500 ng/L)、高(4 000 ng/L)质量浓度的右美托咪定和内标替米沙坦(32 000 ng/L)的介质影响百分比分别为99.13%、105.27%、99.79%和99.50%,可见血浆介质对低、中、高3种质量浓度药物的测定影响均在85%~115%范围内,可视为无介质效应影响。

2.10 稳定性

配制1 000 ng/L的右美托咪定残渣溶解液溶液,考察了样品经冰箱-20℃避光放置7 d和14 d的稳定性,检测结果的RSD<15%。另按“2.6”方法项分别配制低(50 ng/L)、中(500 ng/L)、高(4 000 ng/L)质量浓度的质控血浆样品各6份样品,分为2组,每组每个质量浓度3个样品,考察样品处理后进样前残渣液复溶后经室温避光放置4 h的稳定性。低、中、高3个浓度样品检测结果的RSD分别为3.08%、2.28%、2.05%。再按“2.6”方法项分别配制低(50 ng/L)、中(500 ng/L)、高(4 000 ng/L)质量浓度的质控血浆样品各12份样品分析,分为4组,每组每个质量浓度3个样品。考察冻融1次、3次,-20℃下冻存3 d和15 d的稳定性。低、中、高3个质量浓度样品检测结果的RSD<15%,表明血浆样品在上述条件下放置稳定,见表2。

表2 稳定性试验结果(n=3)

Tab 2 Results of stability test(n=3)

放置条件	右美托咪定测得含量的百分比($\bar{x} \pm s$)%		
	50 ng/L	500 ng/L	4 000 ng/L
冻融1次	93.84 ± 0.07	98.59 ± 0.02	100.57 ± 0.01
冻融3次	92.85 ± 0.06	98.68 ± 0.02	101.78 ± 0.03
-20℃冻存3 d	91.03 ± 0.05	99.28 ± 0.03	99.24 ± 0.02
-20℃冻存15 d	89.44 ± 0.06	99.56 ± 0.02	97.97 ± 0.02

3 讨论

3.1 检测离子的选择

本研究利用LC-MS/MS法的定性功能,首先对较高浓度右美托咪定做Q1扫描,通过提取离子得到m/z为201.1的准分子离子峰;再对m/z 201.1做MS2扫描,发现其主要碎片离子峰m/z为95.1,与文献相符^[6]。

3.2 流动相的选择

同时以乙腈-水、甲醇-水系统作流动相进行考察,在比例相同的情况下,乙腈出峰时间漂移,因此选用甲醇系统作流动相。甲醇-水比例为75:25时,保留时间适宜。流动相中加入甲酸可以明显提高检测的灵敏度,缩短保留时间,但酸度过小保留时间不稳定,酸度过大会使血浆杂质干扰出现,经过研究显示以1%甲酸溶液为流动相水相较为理想。

3.3 前处理方法的探索

经考察无水乙醚、乙酸乙酯、乙酸乙酯-二氯甲烷(4:1)等作萃取剂进行血浆样品预处理,综合比较后确定了用乙酸乙酯-二氯甲烷(4:1)作为萃取剂,可以获得较高的萃取回收率,杂质不干扰药物和内标,但峰形稍拖尾。分析右美托咪定的分子结构式,采用氢氧化钠分别在1、0.5、0.2 mol/L条件下对血浆样品进行考察,结果显示加入0.2 mol/L氢氧化钠溶液100 μl的条件下,药物峰形明显改善。

综上所述,本试验所建立的LC-MS/MS法,右美托咪定性范围为20~6 000 ng/L,同时回收率较高而日内、日间RSD较低,稳定性考察中RSD均在15%以下。说明采用较为低端的Agilent 6410能取得与中、高端仪器相近的结果,并且其专属性强、准确度好、灵敏度高,最低检测浓度为20 ng/L,能够满足临床需要^[8],因此可为今后患者药动学研究提供方法学依据。

参考文献

- [1] 赵慧人,谭志荣,周淦,等.HPLC-MS/MS法研究盐酸右美托咪定注射液的人体药物代谢动力学[J].药物分析杂志,2008,28(5):698.
- [2] 舒成仁,黄露,葛苗苗,等.盐酸右美托咪定在健康人体的药动学[J].医药导报,2011,30(12):1 555.
- [3] Hui YH, Marsh KC, Menacherry S. Analytical method development for the simultaneous quantitation of dexmedetomidine and three potential metabolites in plasma[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 762(1/2):281.
- [4] Lee JI, Su F, Shi H, et al. Sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation of dexmedetomidine in pediatric plasma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1/2):195.
- [5] Ji QC, Zhou JY, Gonzales RJ, et al. Simultaneous quantitation of dexmedetomidine and glucuronide metabolites (G-Dex-1 and G-Dex-2) in human plasma utilizing liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18(15):1 753.
- [6] Li W, Zhang Z, Wu L, et al. Determination of dexmedetomidine in human plasma using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection: application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(5):897.
- [7] Bol CJ, IJzerman AP, Danhof M, et al. Determination of dexmedetomidine in rat plasma by a sensitive [3H]clonidine radioreceptor assay[J]. *J Pharm Sci*, 1997, 86(7):822.
- [8] Iirola T, Ihmsen H, Laitio R, et al. Population pharmacokinetics of dexmedetomidine during long-term sedation in intensive care patients[J]. *Br J Anaesth*, 2012, 108(3):460.

(收稿日期:2013-04-08 修回日期:2013-05-18)