

# HPLC-荧光法测定人血清中顺式阿曲库铵的浓度

沈 芊\*, 吕鲜艳, 元华龙(首都医科大学宣武医院药剂科, 北京 100053)

中图分类号 R971<sup>+</sup>.2;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)42-3983-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.42.17

**摘要** 目的:建立测定人血清中顺式阿曲库铵浓度的方法。方法:血清酸化后采用二氯甲烷液-液萃取法处理,以高效液相色谱(HPLC)-荧光法进样测定,色谱柱为Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>,流动相为1.0%三氟乙酸-乙腈(58:42),流速为0.8 ml/min,柱温为常温,荧光检测波长分别为280 nm( $E_x$ )、320 nm( $E_m$ )。结果:顺式阿曲库铵血药浓度在15.625~2 000 ng/ml范围内线性关系良好( $r=0.999 3$ ),平均提取回收率为78.78%~83.59%,平均方法回收率为98.58%~101.23%,日内、日间RSD均小于10%。结论:本方法操作简便、灵敏度高、重现性好、结果可靠,可满足临床上血清中顺式阿曲库铵血药浓度检测和药动力学研究的需要。

**关键词** 顺式阿曲库铵;血药浓度;高效液相色谱-荧光法

## Determination of Cisatracurium Concentration in Human Serum by HPLC-fluorescence Method

SHEN Qian, LYU Xian-yan, YUAN Hua-long (Dept. of Pharmacy, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of cisatracurium concentration in human serum. METHODS: The serum sample was extracted by dichloromethane liquid-liquid extraction after acidification. HPLC-fluorescence method was adopted. The determination was performed on Kromasil 100-5 C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of 1.0% TFA-acetonitrile (58:42) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was normal atmospheric temperature; the detection wavelength was set at 280 nm ( $E_x$ ) and 320 nm ( $E_m$ ). RESULTS: The linear range of cisatracurium was 15.625-2 000 ng/ml ( $r=0.999 3$ ). Average extraction recovery was 78.78%-83.59%, and average method recovery was 98.58%-101.23%, respectively. The inter-day and intra-day RSDs were less than 10%. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, reproducible and reliable, and can meet the demand of concentration determination and pharmacokinetics study of cisatracurium.

**KEYWORDS** Cisatracurium; Serum concentration; HPLC-fluorescence method

顺式阿曲库铵作为一种新型的中时效非去极化肌松药,是构成阿曲库铵消旋混合物的10种同分异构体之一,但其肌松作用强度约为阿曲库铵的3倍<sup>[1]</sup>。其安全治疗窗宽、作用强、恢复快,无蓄积作用,不释放组胺,代谢不依赖肝肾功能,临床上可根据患者条件和手术需要,通过调整剂量和给药方式来调整起效时间和作用时间,从而达到满足不同手术麻醉诱导的需求,是理想的麻醉肌松药<sup>[2]</sup>。为了监测术后不同时间患者体内顺式阿曲库铵的浓度,笔者建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)-荧光法测定顺式阿曲库铵的血药浓度,现报道如下。

## 1 材料

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪,包括LC-20AD泵、RF-10AxL荧光检测器、SIL-20AC进样器(日本岛津公司);FE20 pH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);GI-1多用振荡器(北京冰箱电机厂);高速离心机(Biofuge pico)、XS205DU精密电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);KQ-300E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

顺式阿曲库铵对照品(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:48110304RS,含量:97.8%);内标:盐酸维拉帕米(中国食品药品检定研究院标准物质与标准化研究所,批号:100223-200102);乙腈为色谱纯,三氟乙酸、硫酸、二氯甲烷为分析纯;健康人空白血样由本院体检中心提供。

## 2 方法

\*副主任药师,硕士。研究方向:临床药理学。电话:010-83198831。E-mail:shenqian-sq@163.com

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:1.0%三氟乙酸-乙腈(58:42);流速:0.8 ml/min;柱温:常温;荧光检测波长:280 nm(激发波长,  $E_x$ ), 320 nm(发射波长,  $E_m$ );进样量:20 μl。

### 2.2 溶液的配制

准确称取顺式阿曲库铵对照品5.11 mg,用pH 3.0的硫酸溶液定容至5 ml,得到质量浓度为1 mg/ml的顺式阿曲库铵对照品贮备液;精密量取该对照品贮备液适量,用pH 3.0的硫酸溶液配制成100、10 μg/ml的对照品系列溶液,置4℃冰箱避光保存。另准确称取内标盐酸维拉帕米2.01 mg,用乙腈定容至10 ml,得到质量浓度为201 μg/ml的内标贮备液;精密量取该内标贮备液适量,用乙腈配制成2.01 μg/ml的内标溶液,置4℃冰箱避光保存。

### 2.3 血样的处理

精密量取血样0.25 ml置于1.5 ml塑料离心管中,加入0.2 mol/L硫酸溶液50 μl和2.01 μg/ml的内标溶液50 μl,振荡30 s,加入二氯甲烷350 μl,振荡30 s。以离心半径6 cm、12 000 r/min离心10 min,吸出二氯甲烷溶液。再次加入二氯甲烷350 μl同上操作,合并两次提取的二氯甲烷溶液,常温下氮气吹干,以流动相100 μl重溶后进样20 μl进行分析。

## 3 结果

### 3.1 方法专属性考察

空白血清、空白血清加内标、空白血清加内标及对照品、含药血清按“2.3”项下方法处理,进样分析得色谱图1。在本色谱条件下,顺式阿曲库铵和内标维拉帕米的出峰时间分别为5.92、8.19 min。血清内源性物质和其他物质均不干扰体内顺

式阿曲库铵和内标的测定,峰形良好。

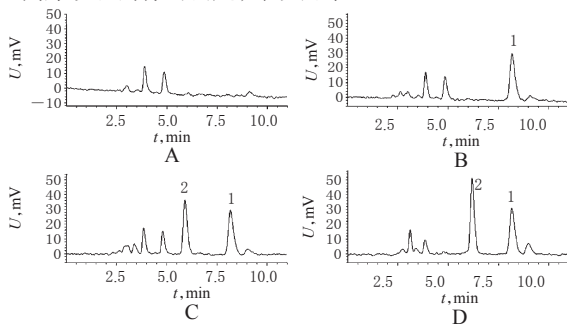


图1 高效液相色谱图

A.空白血清;B.空白血清+内标;C.空白血清+内标+顺式阿曲库铵对照品;D.含药血清;1.维拉帕米;2.顺式阿曲库铵

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank serum; B. blank serum+internal standard; C. blank serum+internal standard+cisatracurium control; D. serum containing drug; 1. verapamil; 2. cisatracurium

### 3.2 标准曲线的制备

精密量取顺式阿曲库铵对照品工作液,用适量空白血清配制成为2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25和15.625 ng/ml的系列对照品血清,按照“2.3”项下方法处理,并进行色谱分析,记录色谱。以顺式阿曲库铵与内标峰面积比(y)为纵坐标,以浓度(x)为横坐标,进行线性回归,得线性方程 $y=0.0013x-0.0027$ ( $r=0.9993$ )。结果表明,顺式阿曲库铵血药浓度在15.625~2 000 ng/ml范围内线性关系良好。

### 3.3 精密度试验

用空白血清分别配制高、中、低(1 000、250、31.25 ng/ml)3个质量浓度的顺式阿曲库铵质控样品,分别按照“2.3”项下方法处理后进行分析。第1天每个浓度点测定5份,其后5 d内测定5次,计算日内和日间测得浓度,求出日内和日间RSD,结果见表1。

表1 精密度及回收率试验结果(n=5)

Tab 1 Results of precision and recovery tests(n=5)

加入量, ng/ml	日内精密度		日间精密度		方法回收率, %	RSD, %	提取回收率, %	RSD, %
	实测值, ng/ml	RSD, %	实测值, ng/ml	RSD, %				
31.25	32.57	7.86	34.07	9.25	101.23	8.08	78.78	9.10
250	247.68	4.25	247.95	5.19	98.58	5.26	83.59	7.61
1 000	1 031.25	3.24	1 109.39	3.73	100.94	4.72	79.76	6.71

### 3.4 回收率试验

用空白血清分别配制高、中、低(1 000、250、31.25 ng/ml)3个质量浓度的质控样品各5份,按“2.3”项下方法处理分析。将测定的顺式阿曲库铵峰面积与内标峰面积的比值代入回归方程,得出顺式阿曲库铵的浓度,除以加入量即为方法回收率。另以流动相配制相应浓度的顺式阿曲库铵溶液,不经处理直接进样分析,分别记录顺式阿曲库铵的峰面积,计算提取回收率,结果见表1。

### 3.5 稳定性试验

用空白血清分别配制高、中、低(1 000、250、31.25 ng/ml)3个质量浓度的质控样品若干份,分为两组,一组加入0.2 mol/L硫酸溶液50  $\mu$ l,另一组加入纯净水50  $\mu$ l,进行血样冻存、多次冻融、样品处理后室温放置及4  $^{\circ}$ C冷藏放置的考察。

结果显示,加入0.2 mol/L硫酸溶液组的样品-20  $^{\circ}$ C冰冻7 d、冻融3次后、样品处理后室温保存12 h、样品处理后4  $^{\circ}$ C保存1 d后测定的顺式阿曲库铵的回收率均在95%以上,表明稳定性良好。而未加酸组样品在-20  $^{\circ}$ C保存3 d后已检测不

到顺式阿曲库铵。加酸组稳定性试验结果见表2。

表2 加酸组稳定性试验结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Results of stability tests under acid( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

加入量, ng/ml	平均回收率 %			
	处理后室温保存12 h后	处理后4 $^{\circ}$ C保存7 d后	冻融3次后	-20 $^{\circ}$ C冷冻7 d后
31.25	98.81 $\pm$ 6.11	97.81 $\pm$ 7.31	98.57 $\pm$ 6.97	95.57 $\pm$ 7.85
250	99.52 $\pm$ 4.35	97.52 $\pm$ 5.62	97.34 $\pm$ 5.38	96.58 $\pm$ 6.08
1 000	99.29 $\pm$ 4.76	96.88 $\pm$ 4.53	98.78 $\pm$ 5.03	97.03 $\pm$ 5.47

## 4 讨论

目前测定顺式阿曲库铵血药浓度的方法主要有高效液相色谱-荧光(HPLC-FLU)法<sup>[3-5]</sup>、高效液相色谱电雾式检测器(HPLC-CAD)法<sup>[6]</sup>和液-质联用(HPLC-MS)法<sup>[7]</sup>,后两者虽然灵敏度高,但仪器昂贵、分析成本较高。

笔者曾根据文献<sup>[8]</sup>使用1.5%三氟乙酸-乙腈(55:45)作流动相,但顺式阿曲库铵及内标维拉帕米出峰时间在5 min左右,与血中的杂质峰不能完全分离,通过调整三氟乙酸的浓度及其与乙腈的配比,发现使用1.0%三氟乙酸-乙腈(58:42)作流动相时,顺式阿曲库铵及内标维拉帕米两者分离效果好,且能与血中杂质完全分离。

血样处理方法曾尝试采用直接沉淀蛋白后取上清液进样<sup>[9]</sup>,但最低检出浓度难以满足临床需求,故采用二氯甲烷提取挥发后用流动相重溶的方法,提高了检出灵敏度,满足了临床需求。

顺式阿曲库铵结构中含有酯键和季铵基团,酯键易断裂,水解生成相应的酸和醇等杂质,而季铵在放置过程中可能会发生Hofmann消除反应,产生的降解产物会干扰顺式阿曲库铵的测定。因此,在样品处理过程中需用硫酸酸化血样以减少其分解。如果样品不能当日测定,可加入0.2 mol/L硫酸溶液50  $\mu$ l于-20  $^{\circ}$ C冰冻保存或处理后冷藏保存,并在7 d内进行测定。

综上所述,本法建立的RP-HPLC法准确灵敏、快速简便,适用于临床顺式阿曲库铵的血药浓度测定和药动学的研究。

## 参考文献

- [1] 谭丹,杜智勇,杨天德.顺式阿曲库铵的临床应用研究[J].中国医药指南,2008,6(5):72.
- [2] 谢柯祺,兰志勋.顺式阿曲库铵在麻醉诱导期的应用[J].实用医院临床杂志,2010,7(3):17.
- [3] 李娟,陈冰,杨婉花,等.离子对高效液相荧光法测定人血浆中顺式阿曲库铵的浓度[J].药物分析杂志,2011,31(4):713.
- [4] 王述蓉,江启蓉,冯碧敏.高效液相色谱荧光法测定人血浆中顺式阿曲库铵浓度[J].中国药业,2012,21(15):32.
- [5] 周定利,钟玲,邱妍川,等.兔血浆中顺式阿曲库铵的HPLC-荧光测定[J].重庆医科大学学报,2008,33(6):724.
- [6] Błazewicz A, Fijałek Z, Warowna-Grzeskiewicz 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, 1 217(8):1 266.
- [7] Wang P, Zhang H, Stewart JT, et al. Simultaneous detection of cisatracurium, its degradation products and propofol using positive ion detection followed by negative ion detection in a single LC/MS run[J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 17(3):547.

(收稿日期:2014-03-08 修回日期:2014-04-09)