

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定血浆中纳美芬

LCMSMS-134

摘要: 本文建立并验证一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 联用测定血浆中纳美芬的方法。方法采用同位素内标法定量, 方法定量限 10 pg/mL, 线性范围为 10~10000 pg/mL, 相关系数在 0.9992。方法选择性实验表明空白血浆中不存在明显干扰; 方法的日内精密密度 2.37~6.06%, 日间精密密度 2.56~7.52%, 各浓度水平质控样品的准确度 88.3~112.3%, 能够很好地满足血浆中药物浓度准确定量的要求; 各浓度水平质控样品纳美芬的回收率均大于 80%, 基质效应因子均大于 85%, 内标归一化基质效应因子均在 105% 左右; 另外, 系统残留率考察结果表明高浓度样品分析后在系统中的残留量不影响低浓度样品的定量准确性, 关于同位素内标对纳美芬定量准确性的考察表明同位素内标不会影响纳美芬的准确定量。方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点, 适合血浆中纳美芬含量的快速检测, 满足低给药剂量时 (30 μg) 药代动力学研究的需要。

关键词: 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 血浆 纳美芬 药代动力学

纳美芬是一种特异性吗啡受体阻断剂。临床上纳美芬用于治疗抗休克、酒精中毒、麻醉催醒、心力衰竭、脊髓损伤等。在预防戒毒患者复吸方面, 由于纳美芬生物利用度高, 无滥用可能, 是一种非常有效的, 低副作用的阿片类毒品拮抗剂。

目前血浆中纳美芬定量分析的方法包括免疫分析、高效液相色谱/电化学检测、气相色谱/质谱等方法。免疫分析方法的最低定量限能够达到 0.3 ng/mL。目前

有文献报道血浆中纳美芬检测的 LC-MS/MS 方法, 方法定量限达到 0.1 ng/mL。但是静脉注射纳美芬 30 μg, 半小时后血浆中的药物浓度要低于 0.1 ng/mL。为了满足纳美芬药代动力学研究的需要, 本文以岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 联用测定血浆中纳美芬的方法, 实现血浆中纳美芬的高灵敏度、快速检测。

实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1

表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
纳美芬	Nalmefene	55096-26-9	C ₂₁ H ₂₅ NO ₃	
纳美芬-D3 (IS)	Nalmefene-D3	55096-26-9	C ₂₁ H ₂₂ D ₃ NO ₃	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8080 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8080 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 SP2 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Inertsil Sustain C18 (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 2 μm)

流动相：A 相 -10 mM 醋酸铵
B 相 - 甲醇
流速：0.4 mL/min

柱温：40°C
进样量：20 μ L
洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 45%，洗脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	85
2.00	Pumps	Pump B Conc.	85
2.10	Pumps	Pump B Conc.	45
3.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8080
离子源：ESI，正离子模式分析
Probe 温度：450°C
HSID 温度：300°C

雾化气流速：2.0 L/min
加热气流速：12.0 L/min
雾帘气：1.50 L/min
离子源电压：4.5 kV
扫描模式：多反应监测 (MRM)
MRM 参数：见表 3

表3 MRM参数

名称	前体离子	产物离子	驻留时间 (ms)	EV (V)	CE(V)	CCL4(V)
纳美芬	340.15	268.00	100	10.0	-34.0	-8.0
纳美芬-D3 (内标)	343.25	268.20	100	20.0	-36.0	-8.0

1.4 标准样品和质控样品的配制

用甲醇配制两份 1.0 mg/mL 纳美芬储备液。一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 500 ng/mL、250 ng/mL、100 ng/mL、40 ng/mL、20 ng/mL、5 ng/mL、2 ng/mL、0.5 ng/mL 的标准工作曲线；另一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 400 ng/mL、15 ng/mL、1.5 ng/mL 的质控溶液。取 20 μ L 标准工作曲线加入 980 μ L 空白血浆中，依次配制成标准曲线 10 pg/mL、40 pg/mL、100 pg/mL、400 pg/mL、800 pg/mL、2000 pg/mL、5000 pg/mL、10000 pg/mL；取 20 μ L 质控溶液加入 980 μ L 空白血浆中，依配制成低浓度 (LQC) 30 pg/mL、中浓度 (MQC) 300 pg/mL、高浓度 (HQC) 8000 pg/mL 质控样。

用甲醇配制 1.0 mg/mL 纳美芬 -D3 储备液，50% 甲醇溶液进一步稀释成浓度为 50 ng/mL 的内标溶液。

1.5 样品前处理方法

取 200 μ L 血浆样品，加入 20 μ L 内标溶液 (50 ng/mL)，加入 400 μ L 甲醇，涡旋振荡 1 分钟，6000 g 离心 5 分钟，取上清液进样分析，进样体积 20 μ L。

1.6 方法验证

考察方法的选择性，对空白基质样品进行样品前处理后进样分析。

最低定量限 (LLOQ) 的考察，分别处理 6 份 LLOQ 样品，分析结果满足 6 次的相对标准偏差不超过 20%，测量误差不超过理论值的 80~120%，同时目标化合物大于 10 倍信噪比。

线性关系的考察，通过分析空白血浆配制的标准曲线，在三个不同的分析批中对线性关系进行考察，采用浓度与化合物面积和内标面积比值计算回归曲线，权重采用 1/x²。

方法精密度和准确度的考察，在方法验证的三个分析批中考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC (30 pg/mL、300 pg/mL、8000 pg/mL)，日内精密度通过计算一个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差，日间精密度通过计算不同天完成的三个分析批中每个质控样品浓度的相对标准偏差；方法准确度通过公式计算：测量浓度 / 理论浓度 \times 100% 计算。准确度在 85~115% 范围内，精密度不超过 15%。

纳美芬回收率考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），比较经过样品前处理的质控样品和空白基质后加标样品，两者的目标化合物面积平均值的比值为回收率。

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），通过比较空白基质后加标样品与浓度一致的标准溶液，两者的目标化合物面积平均值所得比值评价基质效应。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

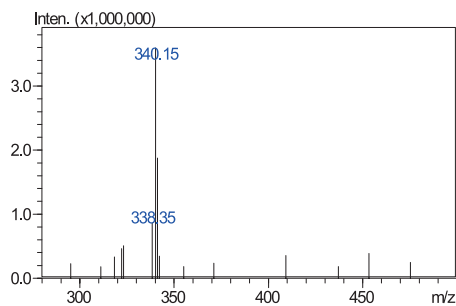


图1 纳美芬的一级质谱图

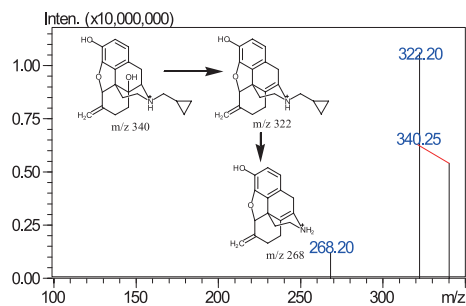


图2 纳美芬的产物离子扫描图(CE值-50 V)

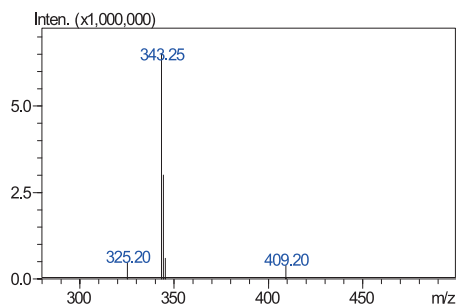


图3 纳美芬-D3的一级质谱图

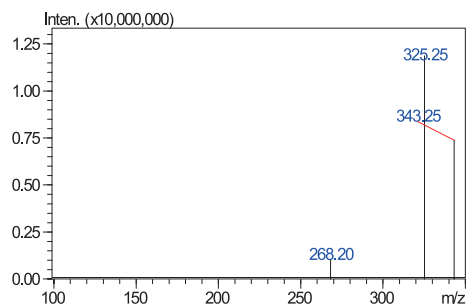


图4 纳美芬-D3的产物离子扫描图(CE值-50 V)

2.2 方法选择性

考察空白基质和 10 pg/mL 血浆基质加标样品，结果如图 5、6 所示，纳美芬及其内标的检测通道中目标化合物的干扰均不对最低定量限造成干扰。

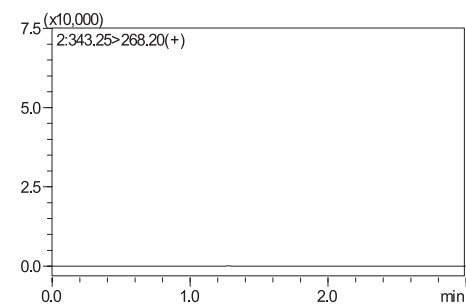
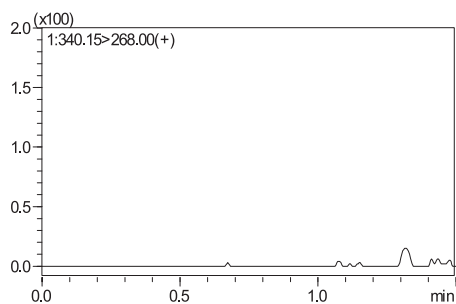


图5 空白血浆样品的MRM色谱图

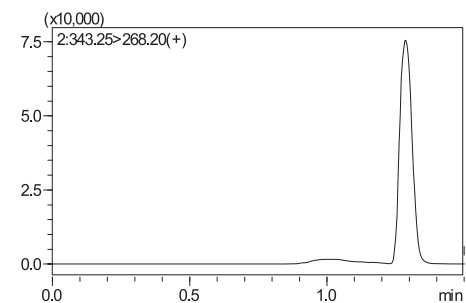
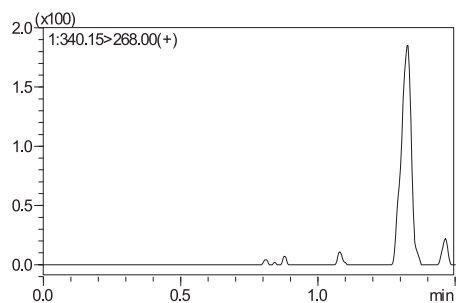


图6 10 pg/mL血浆基质加标样品的MRM色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

按照 1.4 中的条件制备 10 pg/mL、40 pg/mL、100 pg/mL、400 pg/mL、800 pg/mL、2000 pg/mL、5000 pg/mL、10000 ng/mL 的血浆加标样品，按 1.5 中的前处理条件处理样品，按照 1.3 中的仪器条件进行测定，同位素内标法进行定量。所得校准曲线如图 7 所示，线性方程及相关系数见表 4，其中 y 值代表纳美芬峰面积与纳美芬 -D3 峰面积的比值，x 值代表血浆中纳美芬浓度。方法检出限确定为 10 pg/mL，在此浓度水平，方法精密度和准确度均在接受标准内，RSD 为 6.14%，准确度在 88.1~105.1%，S/N 平均值为 122。

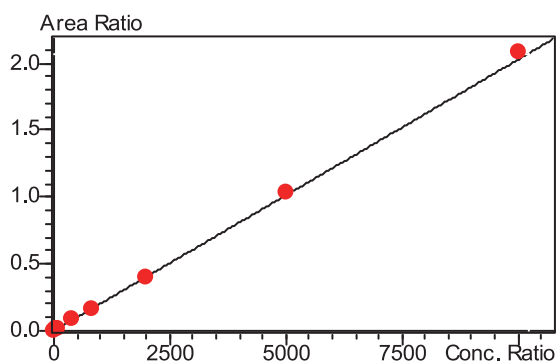


图7 纳美芬标准曲线

表4 校准曲线参数 (线性回归, 权重为 $1/C^2$)

名称	校准曲线	线性范围 (pg/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
纳美芬	$Y = (2.03 \times 10^{-4}) X + (1.59 \times 10^{-4})$	10~10000	88.7~113.7	0.9992

2.4 方法精密度和准确度考察

考察三个浓度水平质控样品的日间精密度和日内精密度，结果如表 5 所示。方法的日内精密度 2.37~6.06%，日间精密度 2.56~7.52%，各浓度水平质控样品的准确度 88.3~112.3%。

表5 方法日间精密度和日内精密度结果(3天, 每天重复6次)

理论浓度 (pg/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度 %
30	6.06	7.52	88.3~112.3
300	2.40	2.88	91.8~99.9
8000	2.37	2.56	95.1~103.8

2.5 方法回收率考察

考察三个质控样品 LQC、MQC、HQC (每个浓度重复 6 次) 的回收率，结果如表 6 所示，各浓度水平纳美芬的回收率均大于 80%。

表6 方法回收率结果(每个浓度重复6次)

浓度水平	浓度 (pg/mL)	平均回收率 %
LQC	30	83.2
MQC	300	85.8
HQC	8000	85.0

2.6 基质效应考察

基质效应的考察三个浓度水平质控样品 LQC、MQC、HQC（每个浓度重复 6 次），分别计算各浓度水平的基质效应及内标归一化基质效应，结果见表 7，各浓度水平基质效应因子均大于 85%，内标归一化基质效应因子均大于 105%。

表7 基质效应考察结果(每个浓度重复6次)

浓度水平	理论浓度 (pg/mL)	基质效应因子	内标归一化基质 效应因子
LQC	30	88.4%	106%
MQC	300	88.9%	107%
HQC	8000	88.1%	106%
内标基质效应因子		83.1%	

2.7 系统残留考察 (Carryover)

考察系统残留的影响，完成浓度最高点分析后，其后分析空白样品中纳美芬的峰面积，空白样品中纳美芬及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰。

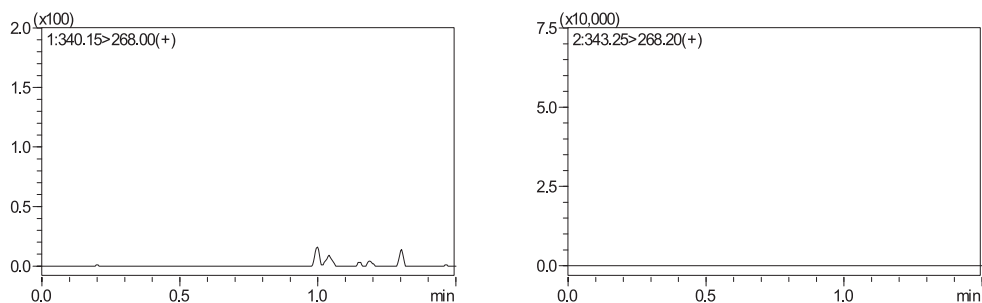


图8 最高浓度点后分析的空白样品的MRM色谱图

2.8 同位素内标对目标物的影响

考察同位素内标纳美芬 -D3 对目标化合物通道的影响，在空白血浆中加入内标物纳美芬 -D3（QC0 样品），结果如图 9 所示，同位素内标不影响纳美芬的定量分析。

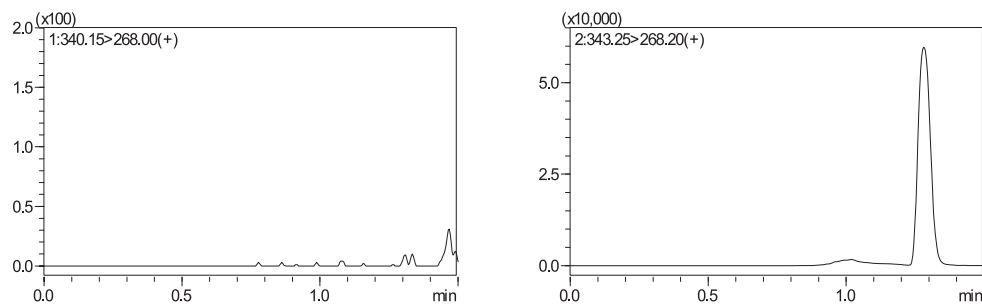


图9 QC0样品的MRM色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 MS-8080 联用测定血浆中纳美芬的方法。该方法在 3 min 内完成血浆中纳美芬的检测，采用同位素内标法定量，方法定量限 10 pg/mL，线性范围为 10~10000 pg/mL，相关系数在 0.9992。空白血浆中不存在对纳美芬分析的明显干扰，表明方法具有良好的选择性；方法的日内精密度 2.37~6.06%，日间精密度 2.56~7.52%，各浓度水平质控样品的准确度 88.3~112.3%，能够很好地满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平纳美芬的回收率均大于 80%，基质效应因子均大于 85%，内标归一化基质效应因子均大于 105%；系统残留率考察结果表明高浓度样品分析后在系统中的残留量不影响低浓度样品的定量准确性；关于同位素内标对纳美芬定量准确性的考察说明同位素内标不会影响纳美芬的准确定量。方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合血浆中纳美芬含量的快速检测，满足低给药剂量时（30 μg）时药代动力学研究的需要。