

Nexera MX 平行液相色谱质谱联用系统 测定人血浆中的布洛芬含量

LCMSMS-324

摘要： 本文建立一种使用岛津 Nexera MX 平行液相色谱仪和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中布洛芬的方法。实验采用该系统在 2.5 min 内完成布洛芬含量的检测分析，采用同位素内标法布洛芬 -D3 定量，定量限 20 ng/mL，线性范围为 20-15000 ng/mL，相关系数 0.9977。定量下限与低中高三水平质控浓度日内、日间精密度 RSD 均小于 6.5%，各浓度水平样品的准确度在 91.3-116.9% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，采用 Nexera MX 超高速 LCMS 系统显著缩短分析时间，适合人血浆中布洛芬含量的快速准确高通量检测。

关键词： Nexera MX 平行液相 三重四极杆质谱 血浆 布洛芬

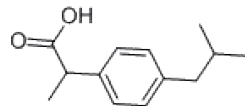
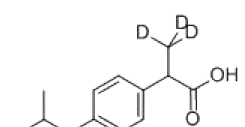
布洛芬属苯丙酸非甾体类抗炎消炎药，具有抗炎、镇痛、解热等作用，临床常用于缓解轻至中度疼痛以及普通感冒或流行性感引起的发热，是世界卫生组织、美国 FDA 唯一共同推荐的儿童退烧药。然而，临床研究发现，该药物半衰期较短，长期服用该药物会造成肾功能衰竭。因此，为使药物使用更为安全合理，顺应临床个体化的用药趋势，需对布洛芬药物建立一种高效、灵敏的检测方法，监测血药浓度，了解药物体内变化，减少临床用药不良反应的发生。

本实验采用 Nexera MX 超高速 LCMS 系统建立人血浆中布洛芬含量测定方法，与常规液质联用方法相比，Nexera MX 系统在保证方法精密度与稳定性的基础上，充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等分析时间，提供较以往两倍的 LCMS 处理速度与分析能力，显著缩短分析时间，提高生物样品检测速率，实现 LCMS 数据采集速度最大化，适用于大样本分析的超高通量检测。

实验部分

1.1 化合物信息

表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
布洛芬	Ibuprofen	15687-27-1	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	
布洛芬-D3 (IS)	Ibuprofen-d3	121662-14-4	C ₁₃ H ₁₅ D ₃ O ₂	

1.2 仪器

本实验使用岛津 Nexera MX 超快速平行液相与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×4 输液泵，DGU-20A5R×2 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack GIST C18(2.1 mm I.D.
×100 mm L., 2.0 μm)

流动相: A相 -2 mM 醋酸铵, 0.05% 氨水溶液
B相 - 乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40°C

进样量: 5 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为20%, 洗脱程序见表2、3。(表4为常规液相梯度洗脱程序, B相初始浓度为20%, 两系统液相梯度曲线图见图1、2。)

表2 分析流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.5	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Controller	Stop	

表3 冲洗平衡流路梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	20
2.50	Controller	Stop	

表4 常规液相梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
2.51	Pumps	Pump B Conc.	20
5.00	Controller	Stop	

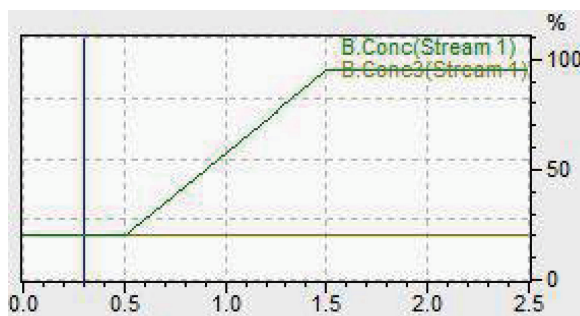


图1 MX系统液相梯度曲线图

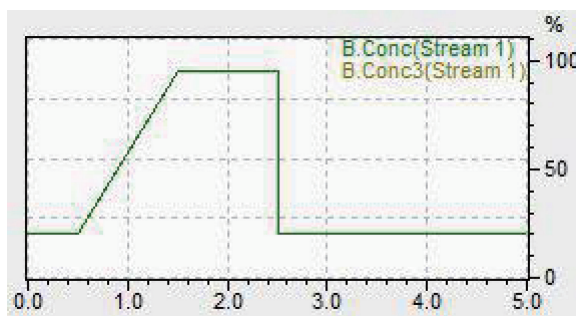


图2 常规液相梯度曲线图

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

离子化模式: ESI(-)

离子源接口电压: -4.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 147 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 5

表5 MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
布洛芬	205.15	161.20	14.0	9.0	12.0
布洛芬-D3	208.15	164.20	14.0	8.0	19.0

1.4 标准品与质控样品的配制

分别精密称取两份布洛芬适量, 用纯甲醇溶解配制两份 1.0 mg/mL 布洛芬储备液。取其中一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 1.0、2.5、7.5、25、75、250、750 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作曲线; 另一份储备液用 50% 甲醇溶液分别稀释成浓度为 3、30、600 $\mu\text{g/mL}$ 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 20 μL 加入 980 μL 人空白血浆中, 依次配制标准曲线 20、50、150、500、1500、5000、15000 ng/mL; 分别取三个不同浓度质控溶液 20 μL 加入 980 μL 人空白血浆中, 依次配制 60、600、12000 ng/mL 质控样品。

精密称取布洛芬 -D3 适量, 用纯甲醇溶液溶解配制为 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的布洛芬 -D3 储备液用 50% 甲醇溶液稀释为 5500 ng/mL 内标溶液, 待用。

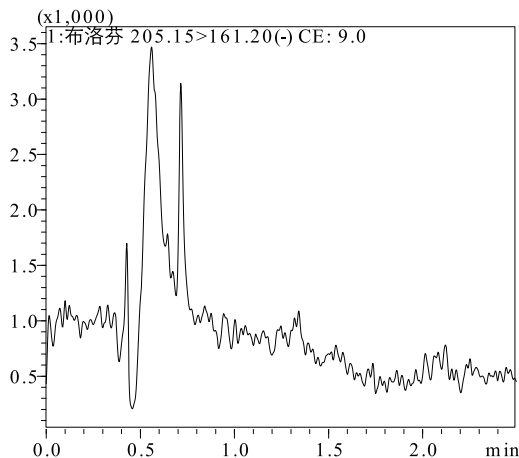
1.5 人血浆样品前处理方法

取人血浆样品 100 μL , 依次加入 5500 ng/mL 内标溶液 10 μL 、甲醇 400 μL , 涡旋混合 3 min, 13000 rpm/min 离心 10 min, 吸取上清液进样分析, 进样体积 5 μL 。

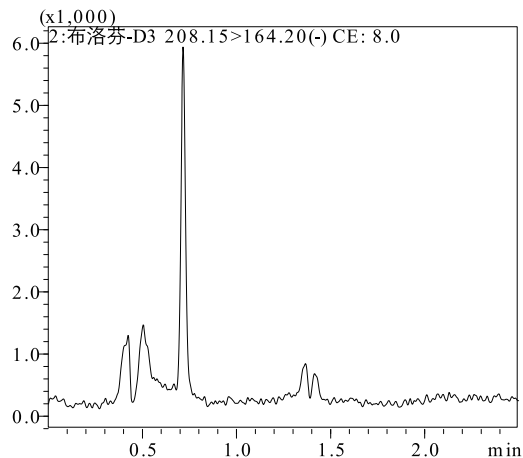
结果与讨论

2.1 方法选择性

取人空白血浆, 按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定, 得人空白血浆、20 ng/mL 人血浆基质加标样品的 MRM 色谱图, 见图 3。结果表明, 布洛芬与内标物的保留时间 t_R 均为 1.33 min。人空白血浆中的内源物质干扰, 对样品检测无明显影响, 方法具有较强选择性。



A



B

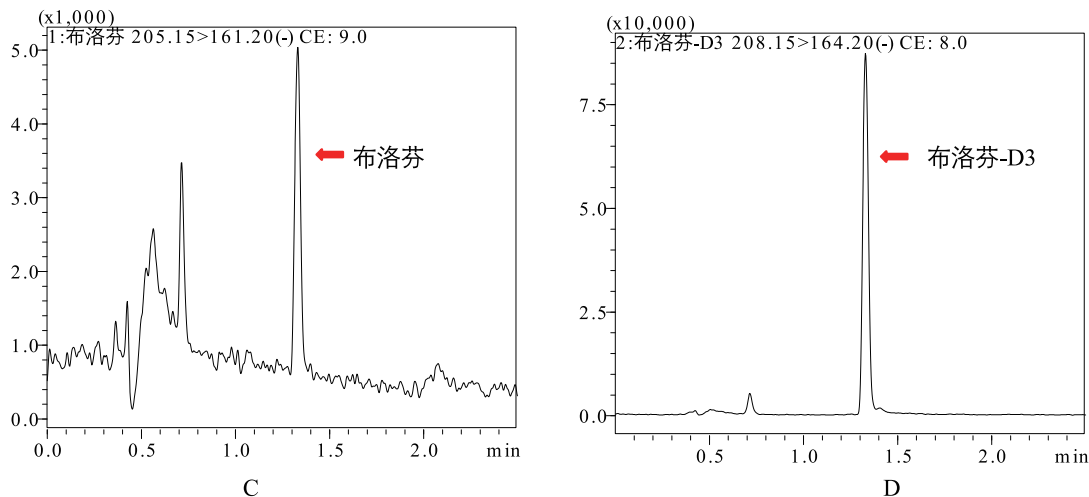


图3 布洛芬与布洛芬-D3MRM色谱图(A、B: 人空白血浆; C: 20 ng/mL布洛芬人血浆样品; D: 5500 ng/mL布洛芬-D3人血浆基质加标)

2.2 方法对比

为验证 Nexera MX 超高速平行液相和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统对目标物检测分析的稳定性与高效性，实验另外采用常规超高效液相 LC-30A 与 LCMS-8060 联用系统对布洛芬血浆样品进行检测。在相同的洗脱程序下，将常规液质联用系统与 MX 液质联用系统所得色谱图进行对比，结果发现，MX 液质联用系统检测所需的时间是常规液质联用系统检测的一半，即两者相比前者节省了一半的时间，且两套系统检测所得血浆样品中布洛芬与内标物峰行均无较大差异，所得色谱对比图见图 4、5。

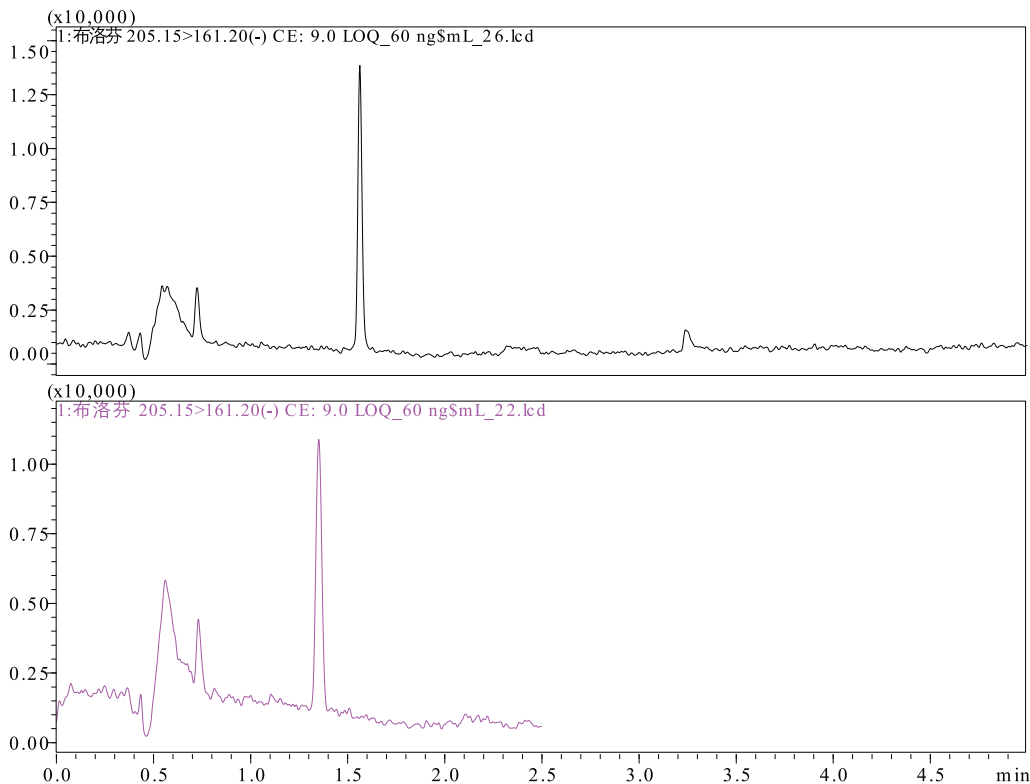


图4 常规液质联用系统(上)与MX液质联用系统(下)检测布洛芬血浆样品(60 ng/mL)色谱对比图

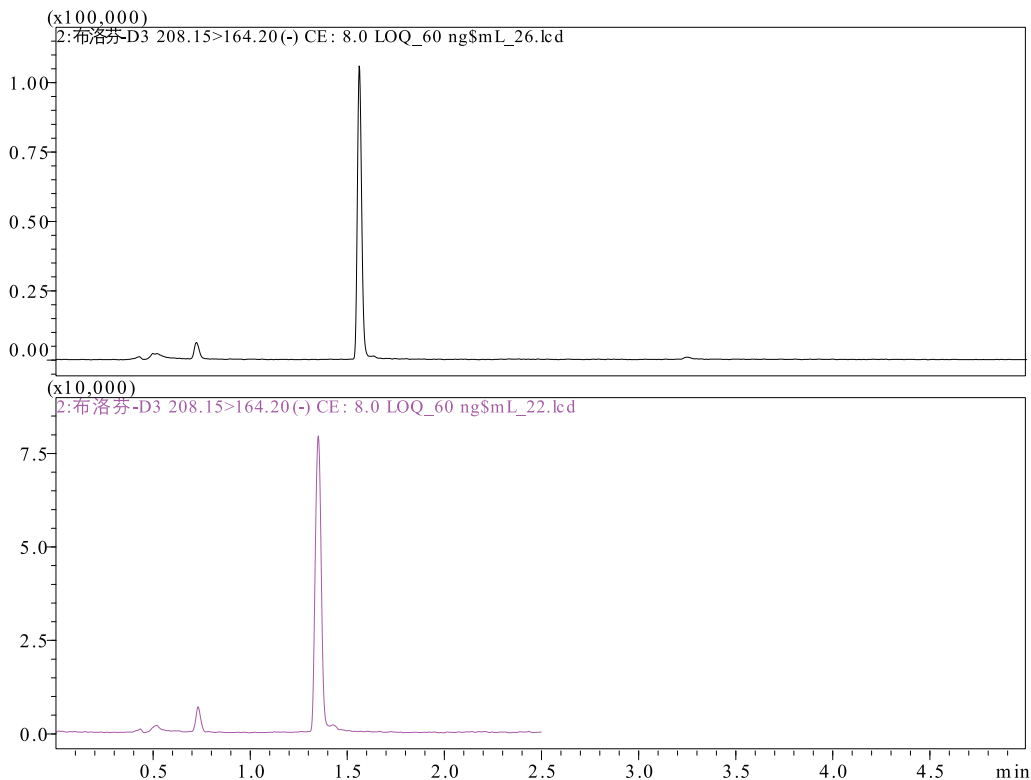


图5 规液质联用系统(上)与MX液质联用系统(下)检测布洛芬-D3血浆样品(5500 ng/mL)色谱对比图

2.2 线性范围

按照 1.4 项下人血浆样品配制方法制备 20、50、150、500、1500、5000、15000 ng/mL 人血浆标准工作曲线，按照 1.5 项中人血浆样品前处理方法处理人血浆样品，建立标准曲线，并用同位素内标法进行分析测定。以人血浆中布洛芬浓度与内标浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以布洛芬峰面积与布洛芬-D3 峰面积的比值 Y 为纵坐标，权重系数为 $1/C^2$ ，进行线性回归分析，所得标准曲线见图 6，人血浆中布洛芬线性回归方程及相关系数见表 6、7。结果表明 Nexera MX 超高速 LCMS 系统分析布洛芬在 20-15000 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

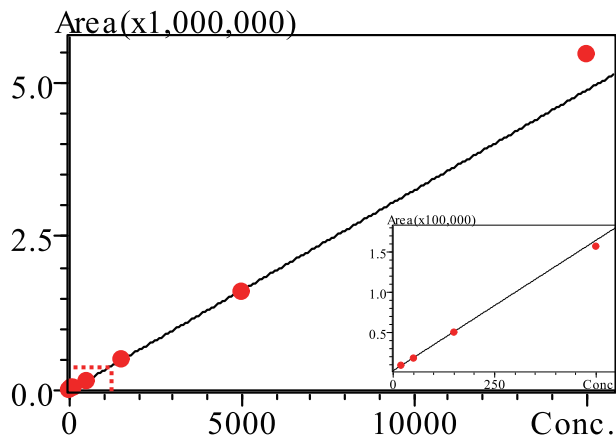


图6 布洛芬标准曲线

表6 布洛芬标准曲线参数(线性回归, 权重系数为 $Y=1/C^2$)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
布洛芬	$Y = (324.572)X + (2755.98)$	20-15000	103.1~111.9	0.9977

表7 标准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	准确度(%)
1	20	20.61	103.1
2	50	46.80	93.6
3	150	146.35	97.6
4	500	476.95	95.4
5	1500	1499.84	100
6	5000	4926.43	98.5
7	15000	16780.90	111.9

2.3 方法精密度与准确度

取已配制好的 60、600、12000 ng/mL 质控样品以及定量下限 20 ng/mL 样品，按照 1.5 方法制备，每个浓度的人血浆样品在 1 天内制备 12 份平行样品分析，连续测定 3 天，每日随行标准曲线，用测得质控样品中布洛芬峰面积的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 8。结果显示，Nexera MX 超高速 LCMS 系统分析各浓度水平精密度、准确度以及该方法的灵敏度均在接受标准内，并满足临床检测浓度要求。

■ 结论

本文建立一种使用岛津 Nexera MX 超高速平行液相和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定人血浆中布洛芬的方法。方法利用该系统在 2.5 min 内完成布洛芬含量的检测分析，采用同位素内标法布洛芬-D3 定量，定量限 20 ng/mL，线性范围为 20-15000 ng/mL。定量下限与低中高高三水平质控浓度的日内、日间精密度、准确度均满足检测需求。实验表明采用 Nexera MX 超高速 LCMS 系统利用其独特的双流路技术，充分利用系统冲洗、色谱柱平衡、自动进样器进样等时间，显著缩短分析时间，分析速度快，且实现分析效率的无损化，大幅度提高生物样品检测效率，适合于药代动力学试验、药物开发以及临床检验实验室大样本高通量分析。

表8 日内与日间精密度与准确度

检测日期	精密度 RSD%	LLOQ (20 ng/mL)		LOQ (60 ng/mL)		MOQ (600 ng/mL)		HOQ (12000 ng/mL)	
		实测浓度 (ng/mL)	准确度 %	实测浓度 (ng/mL)	准确度 %	实测浓度 (ng/mL)	准确度 %	实测浓度 (ng/mL)	准确度 %
Day 01		23.38	116.9	56.56	94.3	570.14	95.0	12580.81	104.8
		21.77	108.8	54.80	91.3	551.39	91.9	12182.54	101.5
		23.00	115.0	60.88	101.5	550.46	91.7	12909.06	107.6
		21.85	109.3	58.52	97.5	564.15	94.0	13121.07	109.3
		19.77	98.8	62.44	104.1	552.70	92.1	12659.12	105.5
		23.24	116.2	58.90	98.2	554.80	92.5	12524.29	104.4
		22.31	111.6	59.40	99.0	566.44	94.4	12540.12	104.5
		21.99	110.0	59.64	99.4	573.17	95.5	12658.58	105.5
		20.99	105.0	58.23	97.0	568.81	94.8	13088.16	109.1
		20.74	103.7	56.97	95.0	577.67	96.3	12613.22	105.1
		21.33	106.7	58.40	97.3	565.06	94.2	13242.98	110.4
		21.49	107.4	61.64	102.7	564.60	94.1	12713.76	105.9
	日内精密度	4.89	-	3.68	-	1.60	-	2.37	-
Day 02		18.66	93.3	59.93	99.9	589.57	98.3	12914.11	107.6
		21.03	105.2	64.24	107.1	608.45	101.4	13108.85	109.2
		19.32	96.6	58.69	97.8	602.00	100.3	12988.96	108.2
		22.71	113.6	62.19	103.7	600.10	100.0	12844.83	107.0
		20.48	102.4	60.48	100.8	618.69	103.1	13137.27	109.5
		22.58	112.9	60.66	101.1	612.87	102.1	13036.86	108.6
		18.73	93.6	57.58	96.0	609.36	101.6	13030.25	108.6
		22.49	112.5	64.87	108.1	620.13	103.4	13252.66	110.4
		19.72	98.6	58.76	97.9	604.64	100.8	13666.28	113.9
		19.58	97.9	58.90	98.2	599.52	99.9	13442.15	112.0
		20.03	100.2	60.85	101.4	587.98	98.0	13417.80	111.8
		22.84	114.2	59.22	98.7	596.39	99.4	13472.72	112.3
	日内精密度	7.73	-	3.71	-	1.70	-	1.94	-

	21.18	105.9	60.71	101.2	607.79	101.3	12848.70	107.1
	21.55	107.7	59.05	98.4	592.82	98.8	12918.40	107.7
	21.40	107.0	59.96	99.9	611.93	102.0	12693.86	105.8
	22.46	112.3	58.95	98.2	601.68	100.3	12893.14	107.4
	23.15	115.8	61.11	101.9	605.51	100.9	12756.02	106.3
	20.46	102.3	62.79	104.7	616.79	102.8	13104.31	109.2
Day 03	19.74	98.7	62.52	104.2	613.57	102.3	12823.54	106.9
	22.66	113.3	65.74	109.6	613.89	102.3	12774.66	106.5
	18.94	94.7	60.79	101.3	599.36	99.9	13386.01	111.6
	19.42	97.1	58.28	97.1	594.32	99.1	13347.73	111.2
	19.79	98.9	61.14	101.9	590.18	98.4	13226.34	110.2
	20.38	101.9	57.92	96.5	583.52	97.3	13127.42	109.4
日内精密度	6.52	-	3.62	-	1.78	-	1.83	-
日间精密度	6.40	-	3.63	-	3.84	-	2.53	-