

# LCMSMS 法检测血浆中卡泊三醇含量

## LCMSMS-611

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测血浆中卡泊三醇含量的方法。该方法采用内标法定量, 在 2.5~500 ng/mL 范围内, 相关系数大于 0.999。LOQ 基质标液 2.5 ng/mL 连续 6 次进样保留时间 RSD% 小于 0.3%, 峰面积的 RSD 为 4.90%, 仪器精密度良好。三个浓度样品加标回收率在 94.60~110.00% 之间, 测试结果的 RSD 在 3.24~7.28% 之间, 该方法稳定可靠, 可为研究药物给药后血浆中卡泊三醇的血浆浓度检测。

**关键词:** 卡泊三醇 血药浓度检测 三重四极杆液质联用仪

卡泊三醇是一种合成维生素 D<sub>3</sub>, 相对分子质量为 412.6, 分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>, 化学名为 9、10- 开环胆甾 -24- 环丙基 -5、7、10 (19)、22- 四烯 -1、3、24 三醇。卡泊三醇 (Calcipotriol), 是合成的维生素 D<sub>3</sub> 类似物, 对 1, 25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> 受体有较强的亲和力。卡泊三醇是角朊细胞分化和增生的强调剂, 能够抑制角朊细胞增殖、促进角朊细胞成熟分化, 使其成熟过程转向正常, 同时, 卡泊三醇具有抑制皮损区局部

炎症。卡泊三醇软膏经皮肤给药后, 约有 5-6% 的药物透过皮肤吸收进入体循环, 并且大多数吸收的药物被代谢成低活性的代谢产物。生物样品中药物的分析由于其基质的复杂性以及微量甚至痕量, 导致其对分析方法的要求较高。

本文建立了一种采用三重四极杆液质联用仪进行卡泊三醇检测, 可为于相关分析人员提供参考。

### 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验采用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。

具体配置为:

系统控制器 : CBM-40

输液泵 : LC-40D XR×2

自动进样器 : SIL-40C XR

柱温箱 : CTO-40C

质谱仪 : LCMS-8045

色谱工作站 : LabSolutions Ver.5.99

#### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱 : Shimpack GISS (50mm × 2.1mm × 1.9 μm) P/N:227-30048-01;

流动相 : A-0.1% 氨水; B- 乙腈

流速 : 0.25 mL/min

柱温 : 40°C

进样体积 : 10 μL

洗针方式 : 外壁洗针

洗脱方式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
4.10	Pumps	Pump B Conc.	5
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI-	接口温度：300°C
雾化气流速：3 L/min	干燥气流速：10 L/min
加热模块温度：400°C	加热气流速：10 L/min
D L 温度：200°C	扫描模式：多反应监测 (MRM)
MRM 参数：见表 2	

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	采集模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	卡泊三醇	负	411.10	355.30*	15	15	24
				393.40	21	12	13
2	氯唑沙宗	负	168.00	132.00	15	18	15

\* 代表定量离子对。

1.3 标准溶液制备

以乙腈水配制标准贮备液 (1000 µg/mL)，并配置标准工作液 0.25、0.5、1.25、2.5、12.5、25.0、50 µg/mL 工作液、取 10 µL 工作液加入 990 µL 空白血浆，制备成 2.5、5、12.5、25、125、250、500 ng/mL 共 7 个标准系列基质标液，并加入氯唑沙宗做内标 (终浓度为 100 ng/mL)，加三倍乙腈沉淀，12000 rpm 离心 10 min，取上清上机分析。

1.4 样品前处理

将给药后的血浆溶液，加入氯唑沙宗做内标 (终浓度为 100ng/mL)、经三倍乙腈提取、蛋白沉淀后，12000 rpm 离心 10 min，取上清上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 专属性

基质空白和基质标液 MRM 重叠谱图显示，对照品和内标目标峰保留时间处，未见明显干扰。

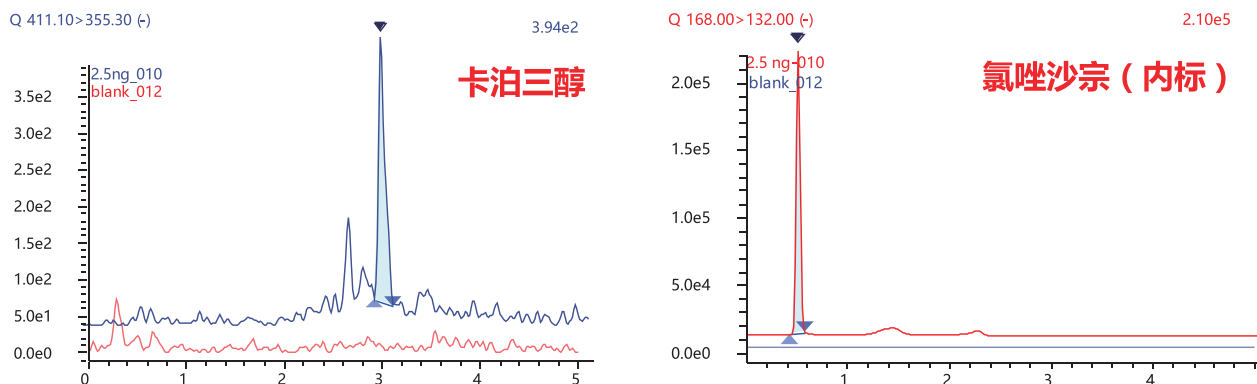


图 1 基质空白和 2.5 ng/mL 基质对照溶液 MRM 重叠色谱图

## 2.2 线性关系

按照 1.3 配制 7 个不同浓度的标准系列溶液，按照 1.2 中的分析条件进行测定。以峰面积比为纵坐标，以浓度比为横坐标，内标法绘制标准曲线。各化合物标准曲线见图 2，定量限为 2.5 ng/mL，信噪比为 16.37，准确度范围为 88.4%-107.08%。

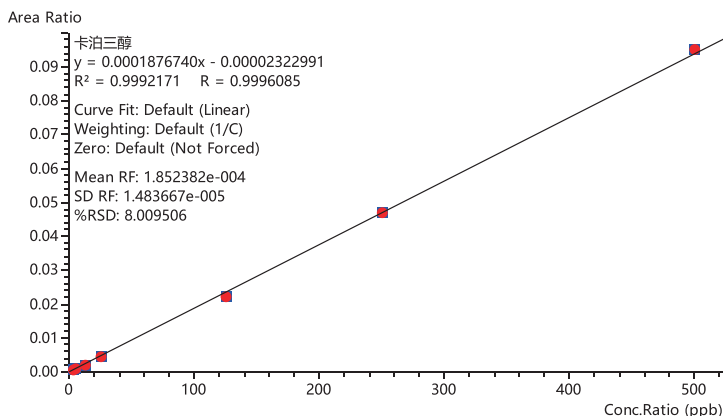


图 2 标准曲线

## 2.3 精密度实验

对定量限基质标液 2.5 ng/mL、连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的精密度结果如表 4 所示。保留时间 RSD% 小于 0.27%，峰面积的 RSD 为 4.90%，仪器精密度良好。

卡泊三醇							
Data#	数据文件名	级别号	保留时间	面积	浓度 (ppb)	精确度%	统计
1	2.5ng-repeat-001.lod	0	3.048	1,683	2.516	—	☑
2	2.5ng-repeat-002.lod	0	3.045	1,494	2.209	—	☑
3	2.5ng-repeat-003.lod	0	3.041	1,660	2.478	—	☑
4	2.5ng-repeat-004.lod	0	3.049	1,684	2.517	—	☑
5	2.5ng-repeat-005.lod	0	3.041	1,683	2.516	—	☑
6	2.5ng-repeat-006.lod	0	3.064	1,647	2.456	—	☑
	平均		3.048	1,642	2.449	0.0	
	%RSD		0.272433	4.509868	4.903733	0.000000	
	最大		3.064	1,684	2.517	0.0	
	最小		3.041	1,494	2.209	0.0	
	标准偏差		0.008304	74.040957	0.120076	0.000000	

图 3 精密度结果 (n=6)

## 2.4 加标回收实验

使用空白基质配制为三个不同浓度的加标样品，每个浓度平行制备三份，按照 1.4 处理后上机分析，样品检测结果和加标回收结果见表 3。三个浓度加标回收率在 94.60~110.00% 之间，测试结果的 RSD 在 3.24~7.28% 之间，方法可靠。

表 3 样品加标回收率 (n=3)

化合物名称	基质空白 ng/mL	2.5 ng/mL		20 ng/mL		400 ng/mL	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
卡泊三醇	N.D.	94.60	7.28	110.00	5.04%	104.50	3.24

注：N.D. 表示未检出。

## 2.5 残留考察

高浓度标准样品 (500 ng/mL) 分析完成后, 进样分析溶剂空白, 分析结果与定量下限 (2.5 ng/mL) 比对, 残留考察结果表明, 卡泊三醇和内标的定量检测通道中无残留。

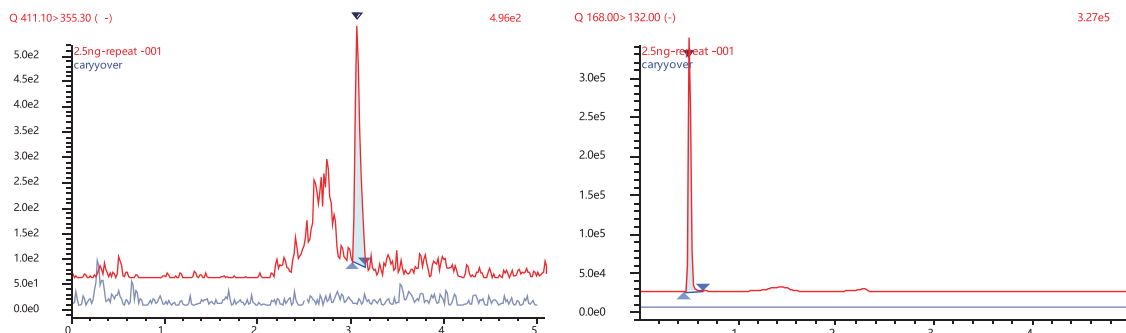


图 4 残留考察溶剂空白和定量下限 MRM 重叠图

## 2.6 样品检测

用该方法检测给药后不同时间点的血药浓度, 下图为某一时间点两针的 MRM 色谱图, 检测结果为 17.19 ng/mL 和 18.03 ng/mL, 重复性良好。

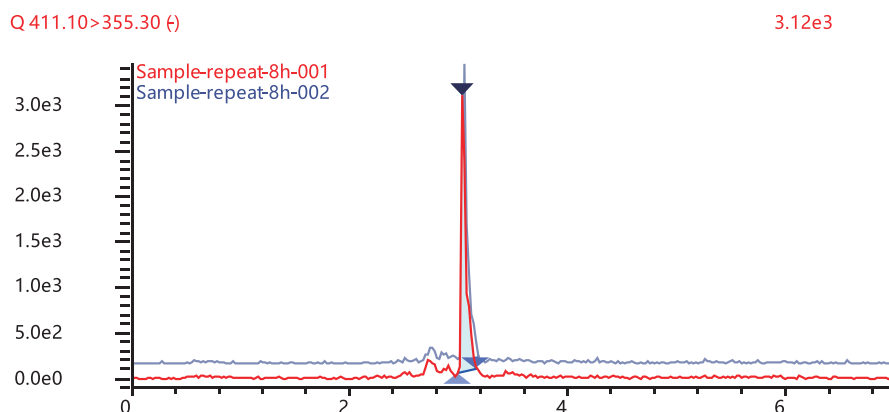


图 5 样品检测的 MRM 色谱图

## ■ 结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045 测定血浆中卡泊三醇含量的方法。该方法可快速准确的检测给药后血浆中卡泊三醇含量的变化, 进而为进一步的研究给药后的皮肤组织分布和 PK 检测提供方法参考。

岛津应用云

