

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术测定大鼠血浆中布洛芬含量

LCMSMS-321

摘要： 本文建立与验证了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定大鼠血浆中布洛芬的方法。方法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 0.9986。方法选择性考察结果表明大鼠空白血浆中无明显干扰，定量下限日内、日间精密度均小于 6%。低中高三水平质控浓度日内精密度 0.95-2.07%，日间精密度 2.19-3.50%，各浓度水平质控样品的准确度 91.8-112.1%，能够满足大鼠血浆中药物浓度准确定量的要求。低中高三质控样品布洛芬回收率均大于 90%，基质效应大于 92%。稳定性考察结果显示样品在室温下放置 12 小时稳定，3 次冻融循环布洛芬浓度无显著变化，大鼠血浆样品提取液待测环境下放置 96 h 稳定。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点，适合大鼠血浆中布洛芬含量的快速准确检测，可用于人体内布洛芬浓度的测定及其人体药代动力学研究，为指导临床布洛芬浓度检测提供帮助。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 大鼠血浆 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

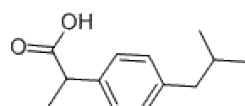
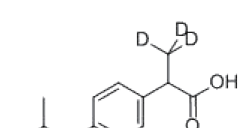
床个体化的用药趋势，需对布洛芬药物建立一种高效、灵敏的检测方法，监测血药浓度，了解药物体内变化，减少临床用药不良反应的发生。

本实验使用 LCMS-8060 建立更为灵敏、高效的大鼠血浆中布洛芬含量的检测方法，供相关人员参考。

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

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5R 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)

柱温: 40°C

进样量: 5 μL

流动相: A相 -2 mM 醋酸铵, 0.05% 氨水溶液;
B相 - 乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 20%,
洗脱程序见表 2。

流速: 0.4 mL/min

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
4.50	Pumps	Pump B Conc.	95
4.60	Pumps	Pump B Conc.	20
6.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8060

接口温度: 300°C

离子化模式: ESI(-)

DL 温度: 250°C

离子源接口电压: -4.0 kV

加热模块温度: 400°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

加热气: 空气 10.0 L/min

驻留时间: 147 ms

干燥气: 氮气 10.0 L/min

延迟时间: 3 ms

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 3

表3 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 μg/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 μg/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 大鼠空白血浆中, 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 大鼠空白血浆中, 依次配制成 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 大鼠血浆样品前处理方法

取大鼠血浆样品 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 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

布洛芬在一级质谱扫描下主要生成 $[M-H]^-$ 准分子离子峰 m/z 205.15，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 161.20；布洛芬-D3 在一级质谱扫描下主要生成 $[M-H]^-$ 准分子离子峰 m/z 208.15，对准分子离子峰进行产物离子扫描，生成主要碎片离子为 m/z 164.20，其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1-4。

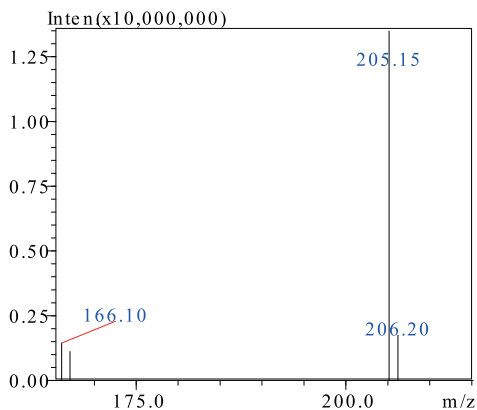


图1 布洛芬一级质谱图

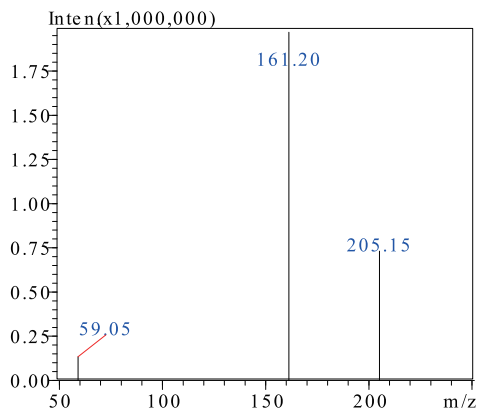


图2 布洛芬产物离子扫描图(CE值-13V)

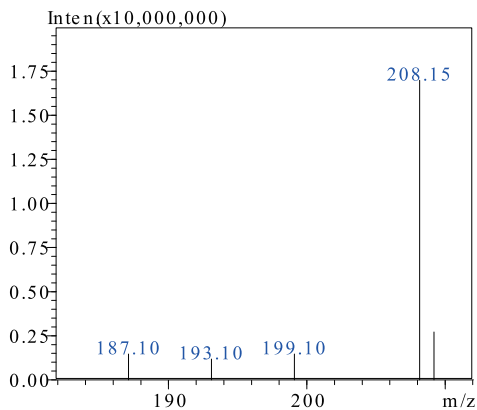


图3 布洛芬-D3一级质谱图

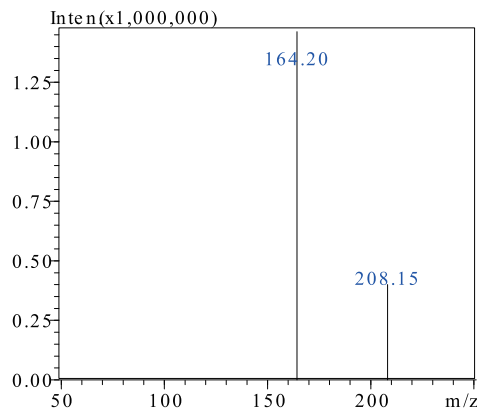
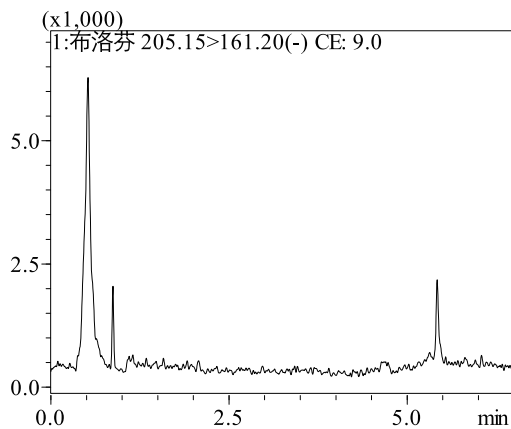


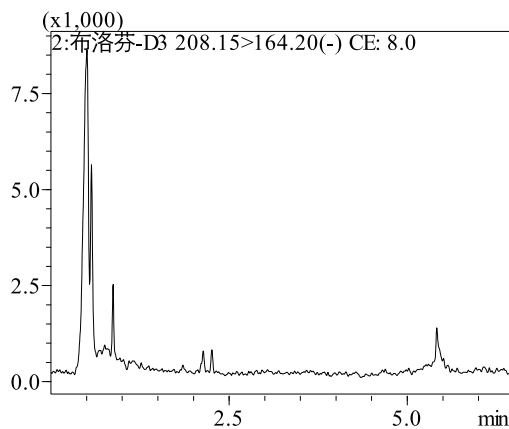
图4 布洛芬-D3产物离子扫描图(CE值-12V)

2.2 方法选择性

取大鼠空白血浆，按照 1.5 方法和选定的色谱条件处理并测定，得大鼠空白血浆、20 ng/mL 大鼠血浆基质加标样品的 MRM 色谱图，见图 5。结果表明，布洛芬与内标物的保留时间 t_r 均为 2.03 min。大鼠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

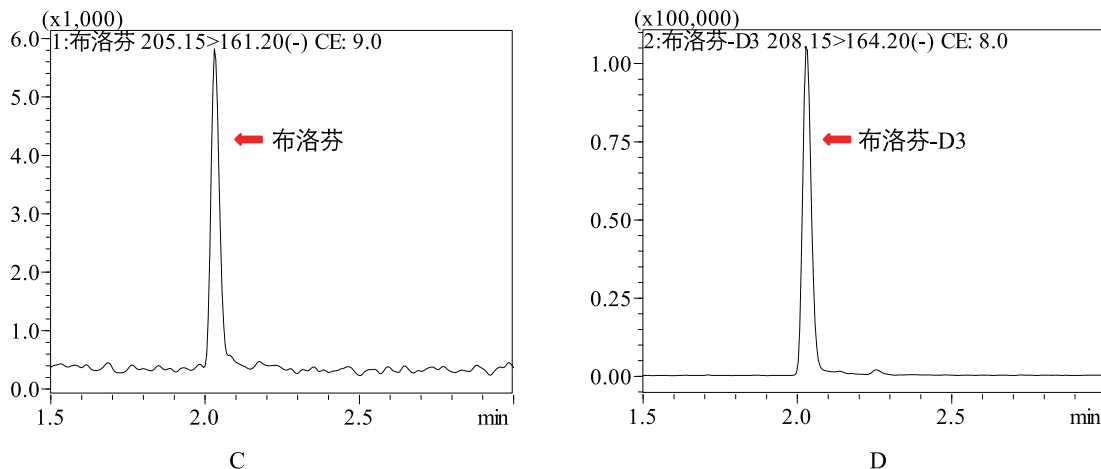


图5 布洛芬与布洛芬-D3MRM色谱图(A、B: 大鼠空白血浆;
C: 20 ng/mL布洛芬大鼠血浆样品; D: 5500 ng/mL布洛芬-D3大鼠血浆基质加标)

2.3 线性范围

按照 1.4 项下大鼠血浆样品配制方法制备 20、50、150、500、1500、5000、15000 ng/mL 大鼠血浆标准工作曲线，按照 1.5 项中 大鼠血浆样品前处理方法处理大鼠血浆样品，建立标准曲线，并用同位素内标法进行分析测定。以大鼠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，大鼠血浆中布洛芬线性回归方程及相关系数见表 4。结果表明布洛芬在 20-15000 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好。

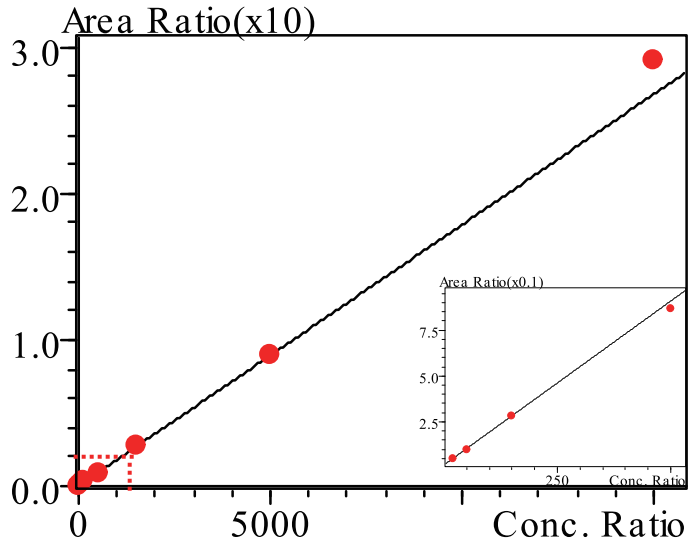


图6 布洛芬标准曲线

表4 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	$Y = (0.00178586)X + (0.0155891)$	20-15000	94.3~108.6	0.9986

表5 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	20.486	102.4
2	50	47.133	94.3
3	150	150.499	100.3
4	500	476.979	95.4
5	1500	1,493.372	99.6
6	5000	4,968.698	99.4
7	15000	16,296.362	108.6

2.4 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，每个浓度的大鼠血浆样品在 1 天内制备 6 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 6。其中布洛芬最低定量限 S/N 平均值为 37。结果表明，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，并已满足临床检测浓度要求。

表6 布洛芬日内精密度与日间将密度(3天, 每天n=6)

样品类型	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度	日间精密度	准确度%
		RSD%	RSD%	
LLOQ	20	4.91	5.97	90.2-111.5
LOQ	60	2.07	3.50	91.8-103.2
MOQ	600	1.32	3.13	93.3-104.9
HOQ	12000	0.95	2.19	104.6-112.1

2.5 回收率

取浓度为 60、600、12000 ng/mL 质控样品 (每个浓度重复 6 次)，按照 1.5 方法制备，以大鼠血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与大鼠空白血浆按照 1.5 方法处理后加入标准品溶液进样检测所得色谱峰面积 (A2) 之比，即 $A1/A2 \times 100\%$ ，考察大鼠血浆样本处理方法的提取回收率。实验结果见表 7，各浓度水平布洛芬回收率均大于 90%、RSD 小于 5%。

表7 布洛芬日内精密度与日间将密度(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率%	RSD%
LQC	0.15	95.1	4.14
MQC	5	90.8	4.40
HQC	80	94.0	0.95

2.6 基质效应

考察低、中、高三浓度水平质控样品(每个浓度重复6次),通过比较大鼠空白血浆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即为基质效应。结果见表8,各浓度水平基质效应因子均大于92%。

表8 基质效应考察结果(n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应%	A/A _{IS} 基质效应
LQC	60	92.7	99.5
MQC	600	98.1	105.3
HQC	12000	96.2	103.3
内标基质效应	-	93.1	-

2.7 稳定性试验

为评价生物样品在周围环境(如室温、光照)下的稳定性,将低、中、高三浓度水平质控样品(n=6)在室温桌面放置12h以上,按照1.5方法制备并进行测定,将测定值浓度与理论值进行比较。结果显示,三个浓度水平的质控样品测定值与理论值的差异均在±9%以内。大鼠血浆中布洛芬在室温下放置12h以上具有良好稳定性。

考察生物样品在处理、制备等过程中反复冻融的稳定性,将高、中、低质控样品(n=6)反复冻融三个周期,每一周期大于12h,经制备后同法测定,与理论值进行比较。结果显示,测定值与理论值的差异均在±8%以内。说明大鼠血浆中布洛芬的浓度在3次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

考察生物样品经制备后,在待测环境中的稳定性,将低、中、高三浓度水平质控样品(n=6)在待测环境下放置96h,将测定值与理论值进行比较。结果显示,测定值与理论值的差异均在±8%以内。说明大鼠血浆中布洛芬的浓度在待测环境中放置后,其含量可保持稳定。

2.8 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布洛芬的峰面积,空白样品中布洛芬及其内标物的通道中均没有明显的目标化合物色谱峰。

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LCMS-8060联用测定大鼠血浆中布洛芬的方法。该方法在6.5min内完成大鼠血浆中布洛芬的检测,采用同位素内标法定量,方法定量限20ng/mL,线性范围20-15000ng/mL,相关系数在0.9986。选择性考察结果表明大鼠空白血浆中没有对分析造成明显干扰的物质。方法中定量下限日内、日间精密度4.91%与5.97%,S/N平均值为37。低中高三水平质控浓度日内精密度0.95-2.07%,日间精密度2.19-3.50%,各浓度水平质控样品的准确度91.8-112.1%,能够满足大鼠血浆中药物浓度准确定量的要求;各浓度水平布洛芬回收率均大于90%,RSD小于5%,基质效应大于92%;稳定性实验结果显示样品在室温下放置12小时稳定,3次冻融循环布洛芬浓度无显著变化,大鼠血浆样品提取液待测环境下放置96h稳定。方法具有分析方法简单、分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点,满足布洛芬体内药物分析要求,适合大鼠血浆中布洛芬含量的快速准确检测。