

# LC-MS/MS 法测定人血浆中奥司他韦含量

## LCMSMS-893

**摘要：**本文建立了三重四极杆液质联用仪测定血浆中奥司他韦的方法。血浆样品采用蛋白沉淀法进行前处理制备，可在 5.2 min 内快速、准确检测血浆中奥司他韦含量，所得数据采用同位素内标法定量。实验对线性范围、定量下限、精密度、准确度、回收率等方法学验证内容均进行考察，结果表明该方法满足生物样品方法学验证要求，具有分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点，适合血浆中奥司他韦含量的快速准确检测，可用于人体内奥司他韦浓度的测定及其人体药代动力学研究，为奥司他韦仿制药研发提供高精度的检测手段。

**关键词：**高效液相色谱 三重四极杆质谱仪 血浆 奥司他韦

### 技术特点：

- ❖ 采用蛋白沉淀法进行血浆前处理，提高了检测效率。
- ❖ 分析时间仅需 5.2 min，增大了检测通量。

奥司他韦是一种有效的神经氨酸酶抑制剂，对甲型流感和乙型流感都有效。是现今治疗流感和禽流感的首选药物。奥司他韦选择性地抑制神经氨酸酶，这种酶对于从宿主细胞释放流感病毒子代至关重要，从而防止新宿主细胞的感染和病毒在整个呼吸道的传播。

为了建立合适的给药方案，必须考虑不同人群的药代动力学 / 生物等效性应用。因此本文建立了一种灵敏、快速的高效液相色谱质谱联用方法，用于血浆中奥司他韦的测定，供相关检测人员用于奥司他韦药代动力学及生物等效性研究。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	柱温箱：	CTO-40C
输液泵：	LC-40B X3	质谱仪：	LCMS-8050
自动进样器：	SIL-40C X3	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.99

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津(上海)实验器材有限公司, PN:227-30048-01)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 -0.1% 甲酸乙腈

流速：0.6 mL/min

柱温：40°C

进样体积：1.0 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，初始程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value(%)
0.50	Pumps	B.Conc	5
1.80	Pumps	B.Conc	95

4.80	Pumps	B.Conc	95
4.90	Pumps	B.Conc	5
5.20	Controller	Stop	

#### 质谱条件

分析仪器：	LCMS-8050	D L 温度：	250°C
离子源：	ESI (+)	加热模块温度：	400°C
雾化气流速：	3.0 L/min	接口温度：	300°C
加热气流速：	10.0 L/min	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
干燥气流速：	10.0 L/min	MRM 参数：	见表 2

表 2 MRM 优化参数

No.	化合物	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	奥司他韦	196618-13-0	313.20	166.10*	-15.0	-22.0	-38.0
			313.20	225.10	-16.0	-12.0	-14.0
2	奥司他韦 -D3 (IS)	1093851-61-6	316.20	167.10*	-15.0	-22.0	-38.0

注：\* 表示定量离子对

#### 1.3 标准品与质控样品的配制

称取奥司他韦适量，用纯甲醇溶解配制成 1.0 mg/mL 的奥司他韦储备液，分成两份。取其中一份储备液用 50% 甲醇溶液逐级稀释成浓度为 25、50、150、500、1500、5000、10000 ng/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 75、1000、4000 ng/mL 的质控溶液。分别取标准工作曲线中各浓度点 20  $\mu$ L 加入 980  $\mu$ L 空白血浆中，依次配制成标准曲线 0.5、1、3、10、30、100、200 ng/mL；分别取三个不同浓度质控溶液 20  $\mu$ L 加入 980  $\mu$ L 空白血浆中，依次配制成 1.5、20、80 ng/mL 质控样品。

称取奥司他韦 -D3 适量，用纯甲醇溶液溶解配制成 1.0 mg/mL 储备液。将配制好的奥司他韦 -D3 储备液用 50% 甲醇溶液稀释为 500 ng/mL 奥司他韦 -D3 溶液。

#### 1.4 样品制备

取人血浆样品 100  $\mu$ L，加入 500 ng/mL 奥司他韦 -D3 溶液 20  $\mu$ L，使用涡旋预混合 20 s，再加入甲醇 400  $\mu$ L，以 1800 rpm 涡旋混合 2 min，最后以 13000 rpm/min 离心 10 min，吸取上清液进样分析，进样体积 1  $\mu$ L。

## ■ 结果与讨论

### 2.1 典型色谱图

按照 1.4 方法和选定的色谱条件处理并测定，得到血浆空白基质和 0.5 ng/mL 血浆基质加标样品的 MRM 色谱图。结果表明，奥司他韦与内标物的保留时间  $t_R$  为 1.51 min。

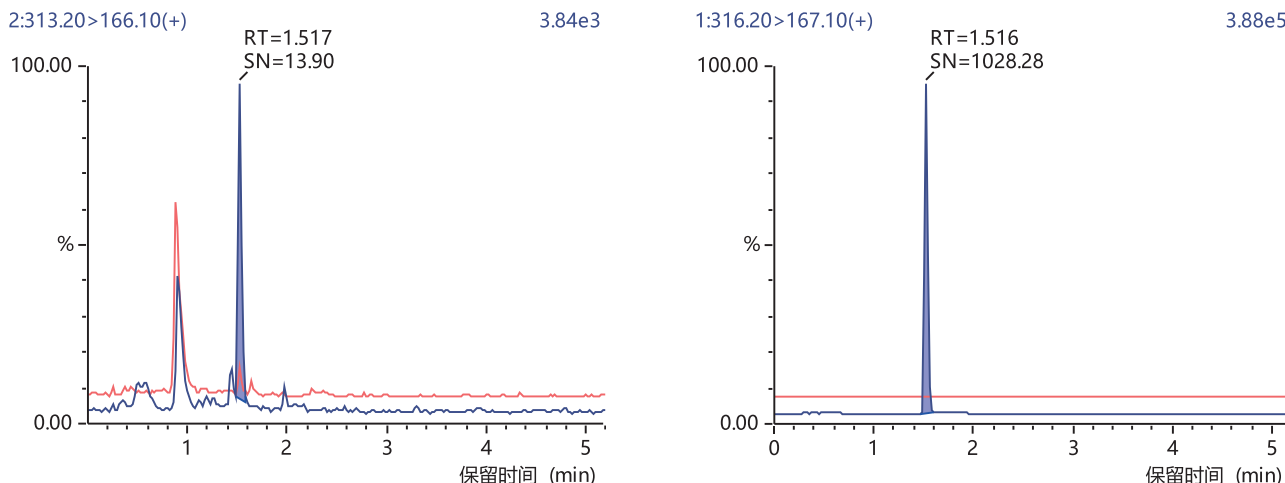


图1 0.5 ng/mL 奥司他韦（左）和奥司他韦 -D3（右）MRM 色谱图，图中红色曲线为血浆空白基质样品色谱图，蓝色曲线为血浆加标基质样品色谱图。

## 2.2 校准曲线

按照 1.3 项下血浆样品配制方法制备 25、50、150、500、1500、5000、10000 ng/mL 血浆标准工作曲线，按照 1.4 项中血浆样品前处理方法处理血浆样品，建立校准曲线，并用同位素内标法进行分析测定。以血浆中奥司他韦浓度与奥司他韦 -D3 浓度（以 1 计）的比值 X 为横坐标，以奥司他韦峰面积与奥司他韦 -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，所得校准曲线见图 2，血浆中奥司他韦线性回归方程及相关系数见图 2。结果表明奥司他韦定量限为 0.36 ng/mL，在 0.5-200 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好，相关系数  $R > 0.999$ ，准确度在 94.3% - 111.0% 之间。

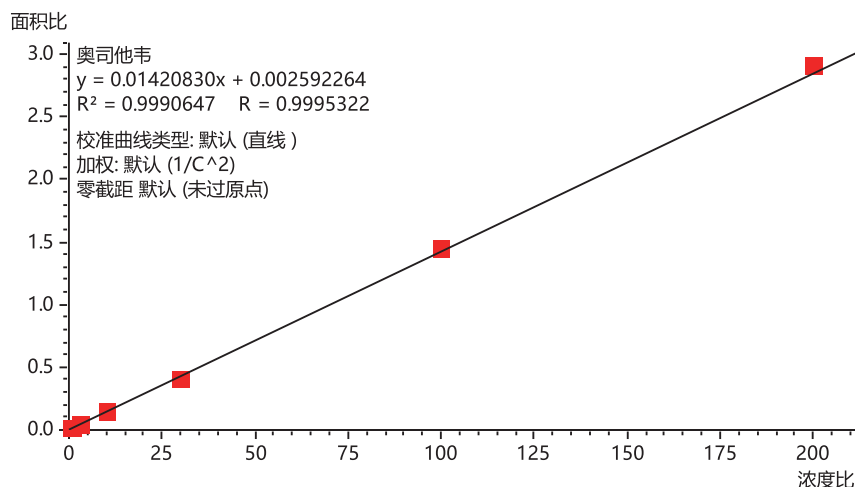


图2 奥司他韦校准曲线

## 2.3 方法精密度与准确度

取已配制好的 1.5、20.0、80.0 ng/mL 质控样品，按照 1.4 方法制备，每个浓度的质控血浆样品在每日制备 6 份平行样品分析，连续测定 3 日，每日随行校准曲线，用测得质控样品中奥司他韦浓度值的 RSD% 值计算其日间和日内差异，结果见表 3。

表3 奥司他韦日内精密度与日间精密度 (3日, 每日 n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD%	日间精密度 RSD%	准确度 %
LQC	1.5	3.48	4.32	101.13~112.47
MQC	20.0	3.27	3.61	94.25~106.74
HQC	80.0	3.25	3.01	99.47~111.44

#### 2.4 回收率

取浓度为 1.5、20.0、80.0 ng/mL 质控样品 (每个浓度重复 6 次), 按照 1.4 方法制备, 以血浆样本制备进样检测后色谱峰面积 (A1) 与空白血浆按照 1.4 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  $A1/A2 \times 100\%$ , 考察血浆样本处理方法的提取回收率。实验结果见表 4, 各浓度水平奥司他韦回收率 RSD 均不高于 3.02%。

表4 方法回收率结果 (n=6)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	平均回收率 %	回收率 RSD%
LQC	1.5	87.26	2.97
MQC	20.0	93.67	3.02
HQC	80.0	104.67	3.02

#### 2.5 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=3) 在室温放置 6 小时以上, 按照 1.4 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  $\pm 15\%$  以内, 并且 CV% 值均不高于 4.55%, 结果见表 5。血浆中奥司他韦在室温下存储 6 小时具有稳定性。

表5 样品室温放置稳定性考察结果 (n=3)

浓度水平	数据 1	数据 2	数据 3	平均回收率 %	回收率 RSD%
LQC	1.53	1.43	1.50	98.82	3.43
MQC	19.27	20.24	21.11	101.04	4.55
HQC	74.84	77.17	74.97	94.58	1.73

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 12 h, 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  $\pm 15\%$  以内, 并且 CV% 值均不高于 7.12%, 结果见表 6。说明血浆中奥司他韦的浓度在 3 次冻融循环的过程中不会发生显著的改变。

表6 样品冻融稳定性考察结果 (n=6)

浓度水平	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均回收率 %	回收率 RSD%
LQC	1.42	1.39	1.67	1.49	1.50	1.54	100.18	6.47
MQC	18.83	23.29	20.97	20.38	20.36	21.60	104.52	7.12
HQC	82.20	78.69	87.98	83.44	91.32	82.59	105.46	5.37

## ■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统联用测定血浆中奥司他韦的方法。该方法在 5.2 min 内完成血浆中奥司他韦的检测，采用同位素内标法定量，方法定量限 0.36 ng/mL，线性范围为 0.5~200 ng/mL，相关系数为 0.9995。方法的日内精密度 3.25%~3.48%，日间精密度 3.01%~4.32%，各浓度水平质控样品的准确度 94.3%~112.5%，满足血浆中药物浓度准确定量的要求；各浓度水平奥司他韦的回收率 RSD% 均不高于 3.02%；稳定性实验结果表明样品在室温下放置 6 小时稳定，3 次冻融循环奥司他韦浓度无显著变化。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，满足奥司他韦体内药物分析要求，适合血浆中奥司他韦含量的快速准确检测。

岛津应用云

