

LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中右旋酮洛芬的浓度

陈姗姗, 孙莹莹, 韦阳*, 王恪申

(浙江省医学科学院药物所 杭州 310013)

摘要 目的: 建立 LC-MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中右旋酮洛芬的浓度。方法: 血浆样品采用乙腈沉淀法处理, 取上清液进行。以乙腈(每 500 mL 中加入甲酸 10 μ L) - 水(80:20 v/v) 为流动相; 用 Zorbax Eclipse SB-C₁₈ 柱(5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) 色谱柱分离; 以布洛芬为内标。流速 0.5 mL \cdot min⁻¹; 进样量 25 μ L; 柱温为室温。质谱检测采用 ESI 正离子模式, 扫描方式为多反应监测, 扫描离子对 m/z 右旋酮洛芬 253.0/209.0, 布洛芬 204.8/160.8。结果: 右旋酮洛芬的线性范围为 1.0 ~ 1000 ng \cdot mL⁻¹, 线性关系良好($r=0.9979$), 最低定量下限为 1.0 ng \cdot mL⁻¹, 绝对回收率在 100.0% ~ 104.3% 之间, 变异系数均小于 6%。结论: 该方法预处理快速简单, 灵敏度高, 所建立的 LC-MS/MS 法准确、可靠, 可用于犬血浆中右旋酮洛芬的浓度测定及药代动力学研究。

关键词: 酮洛芬; 右旋酮洛芬; Beagle 犬; 液相色谱串联质谱; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)04-0717-04

LC-MS/MS determination of dexketoprofen in Beagle dog plasma

CHEN Shan-shan, SUN Ying-ying, WEI Yang*, WANG Ke-shen

(Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract Objective: To establish an LC-MS/MS method for determination of dexketoprofen in beagle dog plasma. **Methods:** The plasma samples were deposited by acetonitrile before analysis. 25 μ L supernatant was performed on a Zorbax Eclipse SB-C₁₈ analytical column (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) using acetonitrile (10 μ L formic acid per 500 mL acetonitrile) - water (80:20 v/v) as the mobile phase. The flow rate was 0.5 mL \cdot min⁻¹. The mass spectrometer was operated under the positive ionmode and multiple reaction monitoring with the transitions of m/z 253.0/209.0 and m/z 204.8/160.8 was used to qualify dexketoprofen and ibuprofen (internal standard) respectively. **Results:** The linear calibration curve was obtained in the range of 1.0 - 1000 ng \cdot mL⁻¹. The lower limit of quantification was 1.0 ng \cdot mL⁻¹. Accuracy in the measurement of quality control samples were in the range of 100.0% - 104.3%. **Conclusion:** This method is simple, rapid and sensitive and can be used for determination of dexketoprofen in Beagle dogs plasma and pharmacokinetical study.

Key words: ketoprofen; dexketoprofen; Beagle dogs; HPLC-MS/MS; pharmacokinetics

酮洛芬是临床常用的芳基丙酸类解热镇痛药及非甾体抗炎药物, 临床上广泛用于治疗风湿病等^[1]。此类药物均具有一个手性中心, 一般都以外消旋体的形式应用于临床, 然而只有其右旋体才有抗炎抗风湿和镇痛作用, 左旋体几乎没有药理活性。据文献报道^[2], 右旋酮洛芬的药理活性是外消旋体的两倍, 且前者的毒性比后者小, 可减轻肝肾的负荷及胃肠道反应, 因此国内外越来越多的药学工作者致力于右旋酮洛芬新制剂的研究。本文建立了测定

右旋酮洛芬的 LC-MS/MS 法, 并将其用于酮洛芬制剂的药代动力学研究。

1 仪器和试剂

安捷伦 1100 泵, 安捷伦 1100 脱气仪, 安捷伦 1100 自动进样器; API3000 质谱仪, Analyt 1.4 工作站; 贝克曼 GPR 离心机; 梅特勒 AE100 电子分析天平; 迪马 4721-00 多管涡旋器; Scien Temp 低温冰箱; 50/200 μ L 微量进样器; Finnpiptette 可调节加样器; Eppendorf 可调节连续加样器。

* 通讯作者 Tel: (0571) 88215617; E-mail: weiyang56@hotmail.com

右旋酮洛芬对照品(99.3% ,sigma) ,布洛芬对照品(99.5% ,购于中国药品生物制品检定所) ;右旋酮洛芬贴片(规格:15 mg/70 cm² ,由本单位药剂研究室提供) ;右旋酮洛芬肠溶片(商品名:芬利 ,湖北安联药业有限公司) ;酮洛芬贴剂(基多托 ,韩国太平洋药业) ;甲醇、乙腈、甲酸均为:HPLC 级(TE-DIA 公司) ,自制双重蒸馏水。

2 动物

Beagle 犬 ,体重 10 ~ 12 kg ,雌雄各半 ,购自广州医药工业研究院 ,许可证号:SCXK(粤)2008-0007。

3 色谱质谱条件

色谱柱为 Zorbax Eclipse SB - C₁₈ 柱(5 μm ,150 mm × 4.6 mm) ;流动相为乙腈(每 500 mL 中加入甲酸 10 μL) - 水(80:20 v/v) ,流速:0.5 mL · min⁻¹ ;进样量 25 μL ,柱温为室温 ,每个样品测定时长为 5 min。

离子源为 ESI 源 ,扫描方式选择性多离子监测(MRM) ,负离子方式;用于定量分析的离子分别是右旋酮洛芬 253.0/209.0 ,布洛芬 204.8/160.8 ;离子源温度:400 °C ;雾化气:6 ;气帘气:6 ;电离电压:4.5 kV ;碰撞气:8 ;聚焦电压:-300 V ;入口电压:-10 V ;碰撞电压:-10 V ;碰撞池出口电压:-10 V ;解离电压:-25 V。待测化合物和内标的全扫描质谱图见图 1。

4 溶液的配制

精密称取右旋酮洛芬对照品和布洛芬对照品各 0.0250 g ,用甲醇溶解并转移至 25 mL 量瓶 ,用甲醇定容至刻度 ,配制成 1.0 mg · mL⁻¹ 右旋酮洛芬甲醇溶液和 1.0 mg · mL⁻¹ 布洛芬甲醇溶液作储备液。取右旋酮洛芬对照溶液和内标溶液适量 ,N₂ 吹干 ,依次加入 100 μL 空白血浆制成浓度分别为 1.0 , 2.0 ,5.0 ,20.0 ,50.0 ,200.0 ,800.0 ,1000.0 ng · mL⁻¹ 的对照品血浆。

5 方法和结果

5.1 血浆样品的预处理方法 将冷冻的血浆在室温下解冻 ,涡旋 10 s ,取血浆 100 μL 至 1.5 mL 塑料离心管中 ,加内标溶液(1 μg · mL⁻¹ 布洛芬甲醇溶液) 20 μL ,涡旋混匀 ,加入乙腈 200 μL ,涡旋 20 s ,在室温下放置 10 min ,3000 r · min⁻¹ 离心 5 min ,将上清液移至样品瓶中 ,进样 25 μL。

5.2 线性范围和定量限 本研究以样品的色谱峰面积为定量依据 ,以右旋酮洛芬样品峰面积对内标的峰面积的比值(*Y*) 对样品浓度(*X*) 用加权最小二乘法(权重因子 1/*X*) 进行线性回归 ,结果表明 ,在

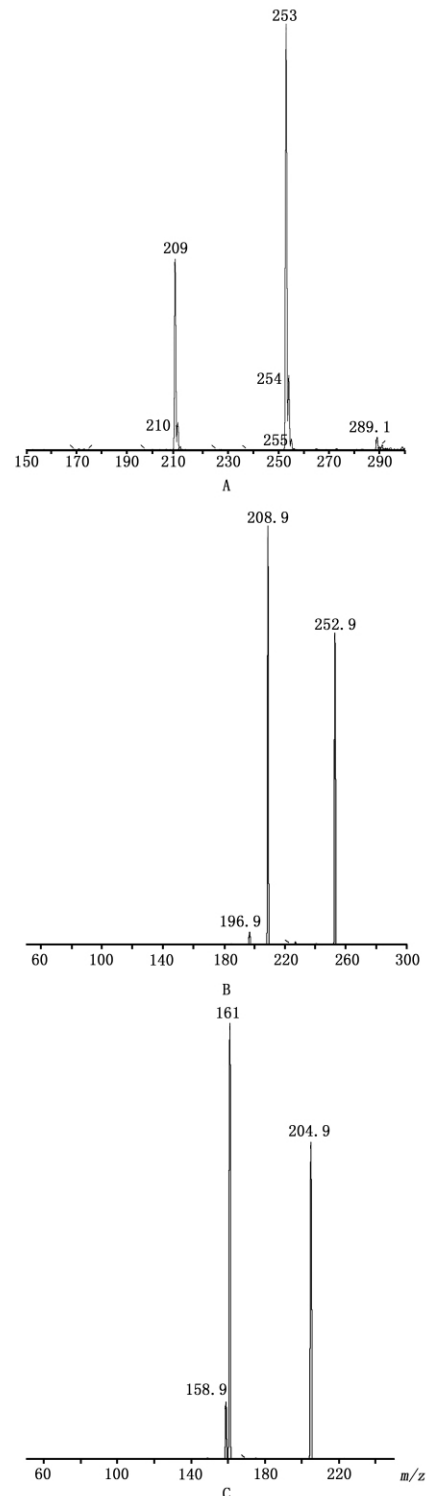


图 1 母离子(A) 、右旋酮洛芬子离子(B) 和布洛芬子离子(C) 离子扫描图

Fig 1 Ion Scanning images of precursor ion (A) ,dexketoprofen product ion (B) and Ibuprofen product ion (C)

1.0 ~ 1000 ng · mL⁻¹ 浓度范围内 ,峰面积与右旋酮洛芬有良好的线性关系。线性方程为:

$$Y = 0.0152X + 0.0097 \quad r = 0.9979$$

最低定量限可达 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.3 回收率及精密度试验 在同一天内对标准曲线范围内不同浓度右旋酮洛芬对照品血浆样品各 5 份进行分析测定,结果表明,测定方法的日内平均回收率均接近 100%,RSD 均小于 6%,在连续 5 d 对 $2.0 \text{ } 200.0 \text{ } 800.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 右旋酮洛芬对照品血浆各 5 份进行测定,结果表明,测定方法的日间平均回收率为 100.7%、94.7%、101.7%,RSD 均小于 3%,结果见表 1。

5.4 提取回收率 用空白血浆精密配制浓度分别为 $2 \text{ } 200 \text{ } 800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆按“5.1”项下方法处理;另取空白血浆按“5.1”项下方法处理,吹干前加入和配制对照品血浆相同的右旋酮洛芬对照品溶液,记录右旋酮洛芬的峰面积,两者的比值即

为右旋酮洛芬的提取回收率,结果见表 1。

5.5 稳定性试验 配制浓度分别为 $2 \text{ } 200 \text{ } 800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品血浆各 12 份,置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱内冷冻保存,在 30 d 内不同时间(0、10、20、30 d)分别取样 3 份,按“5.1”项下方法操作,计算浓度 3 种不同浓度的对照品血浆在不同时间点测得值的 RSD 分别为 6.7%、5.4%、7.5%,说明右旋酮洛芬血浆在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 30 d 稳定。

5.6 方法专属性考察 取空白血浆 $200 \text{ } \mu\text{L}$,按“5.1”项下方法处理,得空白血浆色谱图;将一定浓度的右旋酮洛芬溶液和内标溶液加入空白血浆中,同法操作,得对照色谱图;取用药后犬血浆,同法操作得样品色谱图。结果表明,血浆中内源性物质对右旋酮洛芬的测定无明显干扰,色谱图见图 2。

表 1 回收率及精密度结果

Tab 1 Results of recovery and precision

配制浓度 (concentration prepared) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	提取回收率 (extensive recovery) / %	测定浓度(concentration detected) / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		平均回收率(average recovery) / %		RSD / %	
		日内 (intra - day)	日间 (inter - day)	日内 (intra - day)	日间 (inter - day)	日内 (intra - day)	日间 (inter - day)
2	80	2.00	2.01	100.20	100.65	5.78	4.27
200	81.2	208.61	189.39	104.3	94.7	3.8	1.6
800	83.5	799.74	813.65	100.1	101.7	3.0	1.1

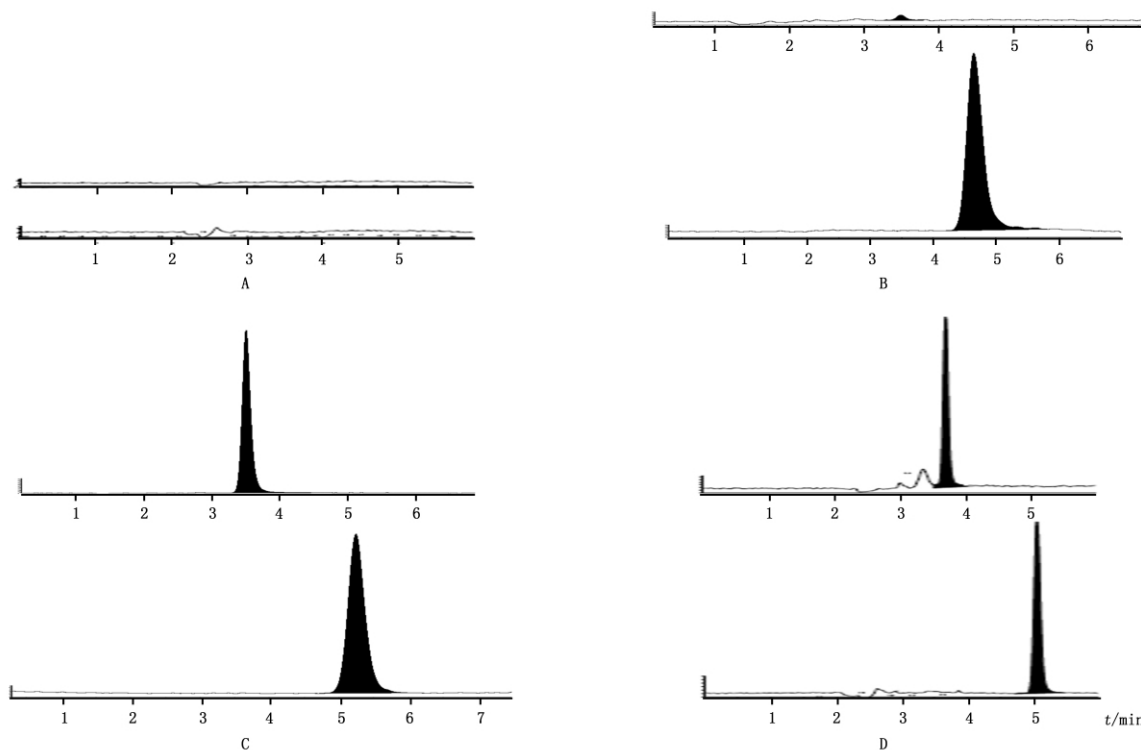


图 2 空白血浆(A)、含 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 右旋酮洛芬标准血浆(B)、含 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 右旋酮洛芬标准血浆(C)和给药后血浆(D)色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of blank plasma (A), standard plasma with $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (B), standard plasma with $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ dexketoprofen (C) and plasma sample after administration of dexketoprofen in beagle dog (D)

6 药代动力学研究

选取健康成年 beagle 犬 其中 2 只服用右旋酮洛芬贴剂(1.25 mg · kg⁻¹)、2 只服用酮洛芬贴剂(2.5 mg · kg⁻¹) 给药前及给药后(从贴上贴片开始计算)的第 2 6 10 12 14 16 18 20 24 30 36 48 h 以及第 48 h 除去贴片后的第 4 8 12 24 48 h 取血 3 mL, 3000 r · min⁻¹离心 5 min 去血浆冷冻保存待测; 3 只服用右旋酮洛芬片剂(1.25 mg · kg⁻¹) 在给药前将右旋酮洛芬肠溶片碾碎 按比例称取药物粉末, 强行放置于犬舌根上部处 并给予 50 mL 清水使之吞服, 于给药前及给药后第 0.5 1 1.5 2 2.5 3 4 5 6 8, 10 12 16 24 36 h 取血 3 mL, 3000 r · min⁻¹离心 5 min 取血浆冷冻保存待测。

口服片及贴片单剂量给药后的平均药时曲线见图 3 结果显示与参比制剂相比, 右旋酮洛芬贴片的 t_{1/2} 后移, C_{max} 较片剂降低, 体内驻留时间延长, 显示出良好的缓释特征。药动学参数用 3P97 处理 结果见表 2。

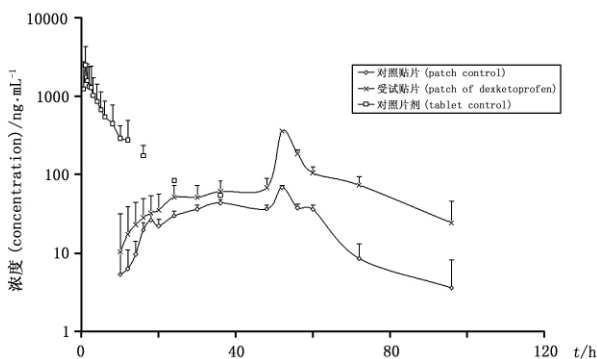


图 3 服用不同制剂 Beagle 犬的血浆酮洛芬浓度-时间曲线图
Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of ketoprofen in beagle dogs after single administration of different preparation

表 2 单剂量给药后的药动学参数 (n = 2)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters after single administration of ketoprofen

参数 (parameters)	酮洛芬贴剂 (patch of ketoprofen)	右旋酮洛芬贴剂 (patch of dexketoprofen)	右旋酮洛芬肠溶片 (dexketoprofen Enteric-coated Tablets)
T _{max} /h	52	52	0.833
C _{max} /ng · mL ⁻¹	68.62	360.2	2758
λ/h ⁻¹	0.06568	0.04028	0.06217
T _{1/2} /h	10.56	17.25	14.04
AUC _{in} /h · ng · mL ⁻¹	2185	6660	12044
AUC _{inf} /h · ng · mL ⁻¹	2240	7251	13314
AUC _{in} /AUC _{inf}	0.97927	0.91812	0.89257
MRT _{in} /h	43.49	52.676	8.062
MRT _{inf} /h	44.876	58.264	13.76

7 讨论

目前 酮洛芬的血浆浓度测定主要采用 HPLC 法 根据刘静^[3]等的研究报道, HPLC 法对酮洛芬的检测下限为 50 ng · mL⁻¹, 本研究建立的 LC-MS/MS 法最低检测限为 1.0 ng · mL⁻¹, 与 HPLC 法相比 检测灵敏度提高了 50 倍。

酮洛芬血浆样品的前处理方法主要有萃取法^[2]和蛋白沉淀法^[4-7], 而本研究用乙腈法沉淀蛋白 样品处理方便快捷。流动相选择乙腈(每 500 mL 中加入甲酸 10 μL) - 水(80:20) 能达到很好的分离效果, 且样品出峰快, 峰形好, 与血浆内源杂质峰分离完全, 每个样品测定时长仅为 5 min。

综上所述, 本文建立的方法灵敏度好、准确度高, 可用于右旋酮洛芬血浆浓度的测定即药代动力学研究。

参考文献

- 1 GUO Mei(郭梅), WU Guo-ming(吴国明), PAN Guo-xiong(潘国雄). New clinical application of non-steroid anti-inflammatory drugs(非甾体抗炎药的临床治疗新用途). *China Pharm*(中国药师) 2004 7(6): 469
- 2 MEI Zhi-nan(梅之南), PEI Xiao-ping(裴小平), CAI Hong-sheng(蔡鸿生). The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties dexketoprofen(右旋酮洛芬的药动学和药效学性质). *Chin J New Drugs*(中国新药杂志) 1998 7(5): 339
- 3 LIU Jing(刘静), TIAN Da-feng(田大丰), TIAN Xiao-lin(田晓琳), et al. Determination of Ketoprofen in rat plasma by HPLC (HPLC 法测定酮洛芬在大鼠血浆中的浓度). *Prog Mod Biomed*(现代生物医学进展) 2009 9(12): 2339
- 4 LIN Su(林舒), JIANG Xue-hua(蒋学华), ZHOU Jing(周静), et al. Determination of Ketoprofen in plasma by HPLC(HPLC 测定血浆中酮洛芬). *West China J Pharm Sci*(华西药理学杂志) 2002 18(1): 50
- 5 LIU Xin-yu(刘新宇), WU Fang(吴芳), CHEN Lian-jian(陈连剑). Determination of clinical therapeutic concentration of ketoprofen by HPLC(高效液相色谱法测定酮洛芬的血药浓度). *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报) 2001 32(4): 279
- 6 WU Wan-zheng(吴万征). Determination on ketoprofen in plasma by HPLC(高效液相色谱法测定血浆中酮洛芬的浓度). *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志) 2001 21(4): 205
- 7 Barbanj MJ, Gich I, Artigas R, et al. Pharmacokinetics of dexketoprofen trometamol in health volunteers after single and repeated oral doses. *J Clin Pharmacol* 1998 38(12): 33

(本文于 2010 年 7 月 19 日收到)