

LC-MS/MS 法测定比格犬血浆中芬太尼浓度及药动学研究

洪正飞¹, 刘 莉^{2*}

1. 湖北省中西医结合医院, 湖北 武汉 430015

2. 武汉市第五医院 药学部, 湖北 武汉 430050

摘要: **目的** 建立比格犬血浆中芬太尼的液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 测定方法, 并用于药动学研究。**方法** 采用固相萃取 (SPE) 法从血浆中提取芬太尼和内标芬太尼-*d*5, 建立比格犬血浆中芬太尼的 LC-MS/MS 测定方法, 进行特异性、准确度、精密度、基质效应、灵敏度、稀释可靠性、稳定性方法学验证; 8 只比格犬, 分别单次 iv 给予芬太尼的生理盐水溶液 400 mg/只, 用 LC-MS/MS 测定给药后血浆中芬太尼浓度, 并用 WinNonLin 软件计算药动学参数。**结果** 芬太尼的线性范围为 2~1 000 pg/mL, 精密度、准确度、基质效应、灵敏度、稀释可靠性、稳定性均符合生物样品分析要求。比格犬体内芬太尼药动学参数: $t_{1/2}$ 为 (4.53 ± 0.748) h, AUC_{0-t} 为 $(19\,659 \pm 3\,889)$ h·ng/mL, CL 为 $(2\,259 \pm 284)$ mL/(h·kg), 符合二室开放模型。**结论** 建立的 LC-MS/MS 分析方法准确灵敏, 适用于芬太尼的药动学研究。

关键词: 芬太尼; 芬太尼-*d*5; 比格犬; 液相色谱-串联质谱; 药动学

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 06- 1042 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.018

Study on determination of fentanyl in beagle dog plasma and their pharmacokinetics with LC-MS/MS

HONG Zhengfei¹, LIU Li²

1. Hubei Province Hospital of Integrated Chinese & Western Medicine, Wuhan 430015, China

2. Department of Pharmacy, Fifth Hospital in Wuhan, Wuhan 430050, China

Abstract: **Objective** To establish a LC-MS/MS method to determine fentanyl in beagle dog's plasma and study their pharmacokinetics. **Method** A solid phase extraction (SPE) method was used to extract fentanyl and fentanyl -*d*5 from the plasma to establish a LC-MS/MS determination method for fentanyl in the plasma of beagle dogs. The specificity, accuracy, precision, matrix effect, sensitivity, dilution reliability, and stability methods were tested. Eight beagle dogs were iv injected with 400 mg of normal saline solution of fentanyl, respectively. Their drug plasma concentration was determined by LC-MS/MS, and the pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonLin. **Results** The liner concentration ranges of fentanyl was 2 - 1 000 pg/mL. Precision, accuracy, matrix effect, sensitivity, dilution reliability, and stability meet the requirements of biological sample analysis. For fentanyl, the pharmacokinetic parameter $t_{1/2}$, AUC_{0-t} , and CL were (4.53 ± 0.748) h, $(19\,659 \pm 3\,889)$ h·ng/mL, and $(2\,259 \pm 284)$ mL/h/kg, respectively. **Conclusion** The LC-MS/MS analysis method established in this study was proved to be so accurate and sensitive that it can be applied to the pharmacokinetic study of fentanyl.

Key words: fentanyl; fentanyl - *d*5; beagle dogs; LC-MS/MS; pharmacokinetics

芬太尼是一种合成阿片类药物, 为苯胺基哌啶衍生物, 于 1959 年间世, 在临床上广泛用于麻醉和监护病房 (ICU)^[1], 其系一种人工合成的强效麻醉性镇痛药, 镇痛效能约为吗啡的 80~100 倍, 具有较强的亲脂性, 极易透过血脑屏障进入中枢神经系

统与阿片受体结合, 进而产生镇痛作用^[2]。芬太尼的起效血药质量浓度为 2 ng/mL, 持续时间较短, 给药 30 min 后超过 80% 的药物以代谢物方式排出体外^[3]。目前临床上常使用的剂型为透皮贴剂和注射液^[4], 但透皮贴剂的皮肤屏障作用明显^[5], 而注射剂给药不方

收稿日期: 2018-01-11

第一作者: 洪正飞, 女, 主管药师, 主要从事口腔黏膜给药制剂与工程化研究。Tel: 15162118649 E-mail: 921082046@qq.com

*通信作者: 刘 莉, 女, 副主任药师, 主要从事仿制药一致性评价。Tel: 15162240277 E-mail: 1460608399@qq.com

便,患者顺应性较差,因此开拓新的给药途径显得尤为重要。口腔黏膜有较大的表面积,血流丰富,颊黏膜为非角质化上皮组织,渗透性能好^[6],药物可以直接吸收进入体循环,既避免首过效应,又方便患者使用,同时可减轻药物的不良反应,延长作用时间,因此芬太尼经口腔黏膜给药是一个较好的途径^[7]。目前,国外已有芬太尼经口腔给药剂型上市,商品名 Fentora[®],国内已有厂家在仿制。根据CFDA相关要求,在国内上市的仿制药需与原研药开展疗效一致性评价研究。为了更好的评价仿制产品与原研药在体内的分布代谢情况,以及为二者在体内生物等效性研究提供一种评价手段,有必要建立一种灵敏度高、准确性好、专属性强的测定血浆中芬太尼含量的方法。

生物样品中芬太尼的前处理方法主要包括蛋白质沉淀法^[8]、液液萃取(LLE)法^[9-10]、固相萃取(SPE)法^[11]、干血点(DBS)法^[12]等。蛋白质沉淀法操作较为简单,但在处理过程中样品存在稀释过程,仪器的灵敏度要求较高;LLE法主要用于脂溶性化合物的提取,但在处理过程中需要用到大量的有机溶剂,操作费时且易发生乳化现象;SPE法适用于大多数液体生物样品的前处理,其操作简单,处理样品速度快,不会出现分离不完全、乳化、回收率较低等现象,且不会产生大量的有机废液,本文采用SPE法,使用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术测定比格犬血清中芬太尼含量,并研究其在比格犬体内的药动学。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

枸橼酸芬太尼(江苏恩华药业股份有限公司,批号 B01-20140401,质量分数 99.7%);芬太尼-d5(Cerilliant,批号 FE08141402,质量浓度 100 µg/mL);生理盐水(安徽双鹤药业有限责任公司,批号 1402070821);水为超纯水,甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸、氨水为分析纯。

1.2 主要仪器

Mixmate Vortex-Genie-2 G-560 涡旋仪(VWR);AL-104 分析天平(Mettler);XSC105DU 分析天平(Mettler);5417R/5810R 离心机(Eppendorf Scientific Industries);岛津 UFLC 30-AD XR 超快速液相(岛津公司);API-5000 三重四级杆质谱仪(美国应用生物系统公司);pH 计(Mettler Toledo);Drict-Q5 超纯水机(Millipore)。

1.3 动物

比格犬,雌雄各半,8只,体质量 8~11 kg,由南京亚东实验动物研究中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 色谱及质谱检测条件

Waters Cortecs Hilic 色谱柱(2.7 µm, 4.6 mm×75 mm);柱温:室温;体积流量 0.8 mL/min;进样体积 5.0 µL;流动相为 0.4%甲酸水溶液(用氨水调节 pH 至 3.2)-乙腈(12:88)。

离子源 ESI;离子化模式正离子;定量模式为多反应监测模式(MRM);离子化电压 5 500 V;离子源温度 550 °C;芬太尼的去集束电压(DP)、入口电压(EP)、碰撞能量(CE)、碰撞室出口电压(CXP)分别为 120、10、35、23 V;检测对象芬太尼 m/z 337.2/188.2,芬太尼-d5 m/z 342.3/188.3。

2.2 溶液配制

2.2.1 内标溶液的制备 取芬太尼-d5 对照品溶液(100 µg/mL)适量,用甲醇稀释成质量浓度为 500 pg/mL 的溶液,于-20 °C 保存,备用。

2.2.2 芬太尼工作溶液的配制 精密称取枸橼酸芬太尼适量,用甲醇溶解并分别稀释成芬太尼质量浓度为 200.0、50.0、45.0、40.0、25.0、20.0、5.0、2.5、0.5、0.3、0.2、0.1 ng/mL 标准曲线工作液,于-20 °C 保存,备用。

2.2.3 药物溶液的配制 精密称取枸橼酸芬太尼适量,用生理盐水溶解并稀释成芬太尼质量浓度为 200 mg/mL 的溶液,备用。

2.3 血浆样品处理

移取 200 mL 的血浆样品,依次加入 50 mL 的 IS 溶液、200 mL 的 1%的甲酸水溶液,混合均匀;将上述的混合样品全部转移至活化好的固相萃取板,依次加入 0.8 mL 1%的甲酸水溶液、0.8 mL 甲醇:水(2:8)、加入 0.8 mL 甲醇清洗 SPE 后,加入 0.3 mL 含 2%氨水的甲醇溶液洗脱 2 次,收集洗脱液(抽干);将上述洗脱液于 35 °C N₂ 流下吹干后,用 300 µL 乙腈:水(9:1)复溶,涡旋 3 min,离心,取上清液 5 µL 进样分析。

2.4 药动学研究

8 只比格犬(雌雄各半),分别单次静脉推注(2 min) 2 mL 药物溶液。分别于给药前及给药后 5、10、15、20、25、30、40 min、1、2、4、7、12、24 h 采血。在设定的时间点从每只动物静脉留置针

采血约 1 mL 至含抗凝剂 K2EDTA 的采血管中, 经 4 °C 离心 (18 000 r/min, 10 min) 分离获得血浆。

2.5 数据处理

使用已系统验证的芬太尼在比格犬血浆中的 LC-MS/MS 定量分析方法测定上述血浆样品中芬太尼的含量, 并使用 WinNonLin (6.3 版, Pharsight) 按照非房室模型计算药动力学参数。

2.6 方法学考察

2.6.1 系统适应性考察 取空白血浆, 加入适宜浓度的芬太尼工作溶液, 制备成质量浓度为 2 pg/mL 的系统适应性检测溶液 (SVS), 按照 “2.3” 项下方法处理后进样分析。平行制备 3 份。

2.6.2 特异性考察 取 6 个不同来源空白犬血浆, 分别配制空白样品 (不含分析物和内标的处理过的基质样品)、内标空白样品 (含内标处理过的基质样品); 此外, 使用 6 个不同来源空白犬血浆的混合基质配制内标空白样品和不含内标的芬太尼定量上限样品 (1 000 pg/mL)。分别取上述样品进样分析。

2.6.3 标准曲线考察 取空白血浆, 加入不同浓度的芬太尼工作溶液, 制备成质量浓度分别为 1 000、900、500、100、50、10、4、2 pg/mL 的 8 个标准血浆样品, 按照 “2.3” 项下方法处理后进样分析。分析物对内标峰面积的比率为纵坐标, 样品的浓度为横坐标, $1/X^2$ 为权重, 应用 Watson[®] LIMS 软件 (7.2 版) 进行回归计算。其中, 定量下限 (2 pg/mL) 和定量上限 (1 000 pg/mL) 血浆样品分别平行配制 6 份。

2.6.4 基质效应考察 取 6 份不同来源的空白血浆按照 “2.3” 项下操作提取空白基质, 对于每份空白基质, 分别在低、高质量浓度 (6、800 pg/mL) 下, 通过计算基质存在下的峰面积 (由空白基质提取后加分析物测得) 与基质不存在下的峰面积 (分析物纯溶液) 比值, 得出分析物和内标的基质因子, 并通过分析物和内标峰面积的比值, 计算经内标归一化的基质因子。

2.6.5 进样残留和灵敏度考察 取定量上限样品进样分析完成后立即分析一个空白样品, 考察分析物和内标从一个样品到下一个样品的残留。取芬太尼定量下限样品 ($n=6$) 进样分析, 考察分析方法的灵敏度, 结果见图 1G、H。

2.6.6 准确度和精密度考察 取空白血浆, 加入不同浓度的芬太尼工作溶液, 制备成质量浓度分别为 6、400、800 pg/mL 的低、中、高质量浓度质控样

品, 每个浓度平行配制 6 份, 共做 3 批。按照 “2.3” 项下操作进样分析, 连续测定 3 d, 计算实测浓度。实测浓度间的相对标准差 (RSD) 即为精密度, 实测浓度与加入浓度的比值即为准确度。800 pg/mL 芬太尼的典型色谱图见图 1I、J。

2.6.7 提取回收率考察 取空白血浆, 加入不同浓度的芬太尼工作溶液, 制备成质量浓度分别为 6、400、800 pg/mL 的低、中、高质量浓度质控样品, 每个浓度平行配制 6 份, 按照 “2.3” 项下操作进样分析, 记录分析物峰面积 A_1 ; 同时制备相同质量浓度的低、中、高浓度纯溶液进样分析, 记录分析物峰面积 A_2 。 A_1 与 A_2 的比值即为提取回收率。另按照同法考察内标的提取回收率。

2.6.8 稀释可靠性考察 取适宜浓度的芬太尼工作溶液, 用甲醇稀释成质量浓度为 40 000 pg/mL 的样品 (QCD)。取上述 QCD 5 μ L, 加入 195 μ L 空白血浆混合, 按照 “2.3” 项下操作, 平行制备 6 份进样分析, 考察基质稀释可靠性; 另取空白血浆, 按照 “2.3” 项下操作提取空白基质, 分别移取 QCD 5 μ L, 加入 195 μ L 空白血浆提取物, 混合均匀进样, 考察提取后稀释可靠性。

2.6.9 稳定性考察 取空白血浆, 加入不同浓度的芬太尼工作溶液, 制备成质量浓度分别为 6、400、800 pg/mL 的低、中、高浓度质控样品 ($n=6$), 分别于室温条件下放置 24 h、-20 °C 反复冻融 3 次、-40 °C 长期冷冻 26 d 后, 按照 “2.3” 项下操作进样分析。考察样品在上述条件下的稳定性。

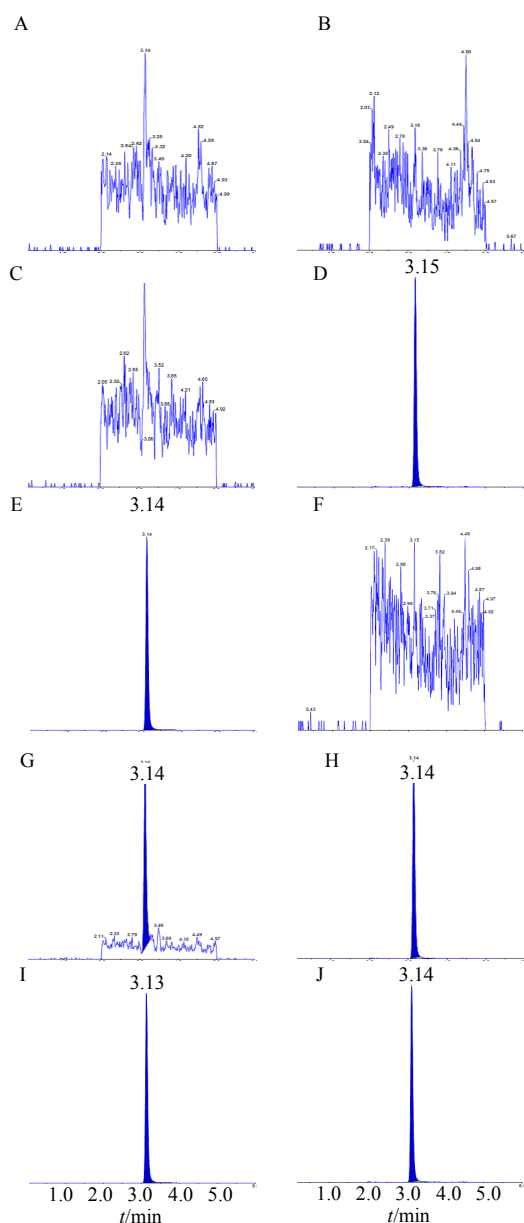
3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 系统适应性 分析物和内标保留时间变化均在 ± 0.5 min 之内, 分析物与内标峰面积比值的 RSD 小于 10%, 表明分析方法的系统适应性良好。

3.1.2 特异性 在 6 个不同来源空白犬血浆样品中均未检测到芬太尼 (图 1A) 或内标 (图 1B)、内标空白样品中未检测到芬太尼 (图 1C、D)、不含内标的芬太尼定量上限样品中未检测到内标 (图 1E、F)。结果表明, 不同来源的基质对芬太尼的测定不存在干扰, 且芬太尼以及内标之间也不存在相互干扰。

3.1.3 标准曲线 芬太尼质控样品在 2~1 000 pg/mL 范围内线性良好, 回归方程为 $Y=0.00779X+0.00262$ ($r=0.9989$), 定量下限为 2 pg/mL, 定量上限为 1 000 pg/mL。



犬血浆空白样品中芬太尼 (A) 和内标 (B)、犬血浆零浓度样品中芬太尼 (C) 和内标 (D)、犬血浆不含内标的芬太尼定量上限 (1 000 pg/mL) 样品中芬太尼 (E) 和内标 (F)、犬血浆最低定量下限 (2 pg/mL) 样品中芬太尼 (G) 和内标 (H)、犬血浆高浓度 (800 pg/mL) 质控样品中芬太尼 (I) 和内标 (J) 的典型色谱图
Typical chromatograms of fentanyl (A) and internal standard (B) in canine plasma blank samples, fentanyl (C) and internal standard (D) in zero concentration samples of dog plasma, fentanyl (E) and internal standard (F) in the quantitative upper limit of fentanyl (1000 pg/mL) without internal standard in dog plasma, fentanyl (G) and internal standard (H) in the lowest quantitative lower limit of dog plasma (2 pg/mL); fentanyl (I) and internal standard (J) in plasma high concentration (800 pg/mL) quality control samples of dog plasma

图1 样品的液-质联用离子流图

Fig. 1 Combined LC-MS/MS ion chromatograms

3.1.4 基质效应 低、高浓度芬太尼的基质因子分别为 0.970 (RSD=5.22%)、0.931 (RSD=2.29%)，内标基质因子分别为 0.948 (RSD%=2.94%)、0.950 (RSD=1.77%)；芬太尼经内标归一化基质因子分别为 1.023 (RSD=5.13%)、0.981 (RSD=1.24%)。表明犬血浆中芬太尼和内标化合物的测定不受生物基质的影响。

3.1.5 进样残留考察和灵敏度 在定量上限样品后紧接着分析一个空白样品，未出现明显残留。定量下限样品 ($n=6$) 准确度为 -5.00%，RSD 为 7.32%，表明分析方法灵敏度良好。

3.1.6 准确度和精密度 低、中、高 3 个浓度质控样品日内准确度 ($n=6$) 分别为 91.67%~99.83% (RSD = 2.80%)、98.00%~103.75% (RSD = 2.15%)、97.25%~100.25% (RSD=1.28%)；日间准确度 ($n=18$) 分别为 91.67%~101.17% (RSD=2.80%)、97.75%~103.75% (RSD = 1.89%)、95.50%~105.25% (RSD=2.95%)，表明分析方法的准确度和精密度良好。

3.1.7 提取回收率 低、中、高浓度下的提取回收率分别为 (85.93±5.36)%、(86.93±8.61)%、(84.35±7.29)%，内标提取回收率为 (87.98±6.39)%、(88.06±5.25)%、(86.08±4.20)%，表明在本方法的定量范围内芬太尼和内标提取回收率良好。

3.1.8 稀释可靠性 稀释质控样品和提取后稀释样品的准确度在真实值的±15%之内，RSD<15%，均满足检测要求，表明基质稀释方法适用于对超出定量上限的样品进行稀释后测定芬太尼浓度。

3.1.9 稳定性考察 低、中、高浓度血浆样品放置 24 h、-20 °C 反复冻融 3 次、-40 °C 长期冷冻 26 d 后芬太尼浓度 RSD 均小于 5.0%，表明芬太尼的犬血浆样品在上述条件下放置后保持稳定。

3.2 比格犬体内药动学

比格犬单次注射芬太尼 400 mg/只后，芬太尼血药浓度-时间曲线见图 2。所测数据使用 WinNonLin (6.3 版, Pharsight) 软件进行处理，主要药动学参数见表 1。结果提示，芬太尼的比格犬体内的药动学符合二室开放模型。

4 讨论

近些年来，国内外对于血浆中芬太尼的分析多向低检测限、高灵敏度、仪器联用、方法简单快捷、重复性高的方向发展，这对目前建立血浆中芬太尼

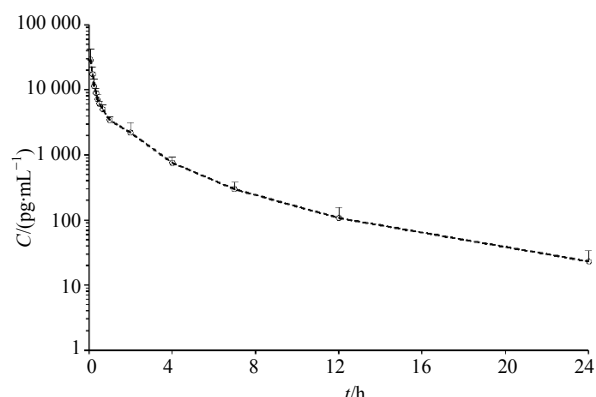


图2 比格犬体内芬太尼平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Mean plasma concentration - time curves for fentanyl in beagle dog plasma ($\bar{x} \pm s, n=8$)

表1 比格犬注射芬太尼溶液后芬太尼的药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of fentanyl in beagle dogs with single intravenous administration of fentanyl solution ($\bar{x} \pm s, n=8$)

参数	单位	雌性均值	雄性均值	总体均值
$C_{\max}$	$\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	31 600±12 619	24 050±5 537	27 825±9 883
AUC_{0-t}	$\text{h} \cdot \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	22 022±4 340	17 296±1 249	19 659±3 889
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{h} \cdot \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	22 195±4 344	17 442±1 345	19 818±3 913
CL	$\text{mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	2 118±331	2 401±157	2 259±284
V_{ss}	$\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	5 193±1 906	5 462±972	5 328±1 408
MRT	h	2.20±0.556	2.05±0.280	2.12±0.416
$t_{1/2}$	h	4.51±0.689	4.54±0.912	4.53±0.748
C_0	$\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	57 380±27 672	34 405±19 993	45 892±25 501

本研究的给药剂量为 400 mg/只, 与 FDA 列明的参比制剂 (Fentora[®]) 规格一致 (400 mg/片), 因此, 本研究开发的方法对于芬太尼口腔粘膜给药剂型前期的非临床药代动力学研究有一定的借鉴意义。

参考文献

- [1] Bovill J G. Clinical profiles of alfentanil and sufentanil [J]. Chin J Clin Pharmacol, 1989, 5(2): 1-10.
- [2] Peng P W, Sandler A N. A review of the use of fentanyl analgesia in the management of acute pain in adults [J]. Anesthesiology, 90(1999): 576-599.
- [3] Labroo R B, Paine M F, Thummel K E, et al. Fentanyl metabolism by human hepatic and intestinal cytochrome P450 3A4: implication for interindividual variability in disposition efficacy and drug interactions [J]. Drug Metab Dispos, 25(1997): 1072-1080.
- [4] 何京亚, 桑广泽, 吴红. 芬太尼双层口颊片含量及释

的含量检测方法具有较强的指导意义。本方法中, 芬太尼的标准样品使用 K2EDTA 为抗凝剂的犬血浆配制, 芬太尼-*d5* 作为芬太尼的内标, 采用固相萃取法从 200 mL 血浆中提取分析物和内标, 使用反相色谱柱将芬太尼和内标从生物基质中分离, 并采用串联四级杆质谱仪的电喷雾离子化方式 (ESI) 对分析物进行定量分析。本研究对测定犬血浆中芬太尼的 LC-MS/MS 法进行了全面方法验证, 经验证的芬太尼的定量范围为 2~1 000 pg/mL, 方法验证结果证明了本方法对于测定大鼠血浆中芬太尼浓度的可靠性, 此方法的特异性、准确度、精密度、基质效应、灵敏度、稀释可靠性、生物基质和储备液在储存和处理过程中的稳定性均满足检测标准。

放度测定方法的研究 [J]. 中国药师, 2016, 19(4): 755-757.

- [5] 廖艺, 韦宁, 许海棠. HPLC 法测定芬太尼透皮贴片中芬太尼的含量 [J]. 中国药师, 2009, 16(7): 897-898.
- [6] Squier C A, Rooney L. The permeability and nonkeratinized oral epithelium to horseradish peroxidase [J]. J Ultrastruct Res, 1976, 54(3): 286-293.
- [7] Richard P, Paul C, Lowell H, et al. Long-term safety of oral transmucosal fentanyl citrate for breakthrough cancer pain [J]. J Pain and Symptom Management, 2001, 22(1): 575-583.
- [8] Bista S R, Lobb M, Haywood A, et al. Development, validation and application of a HPLC-MS/MS method for the determination of fentanyl and norfentanyl in human plasma and saliva [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, (960): 27-33.

- [9] Mahlke N S, Ziesenitz V, Mikus G, et al. Quantitative low-volume assay for simultaneous determination of fentanyl, norfentanyl, and minor metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *Int J Legal Med*, 2014, 128(5): 771-778.
- [10] Huynh N H, Tyrefors N, Ekman L, et al. Determination of fentanyl in human plasma and fentanyl and norfentanyl in human urine using LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(5): 1095-1100.
- [11] Verplaetse R, Tytgat J. Development and validation of a sensitive ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its major metabolite in forensic context [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(22): 1987-1996.
- [12] Clavijo C F, Thomas J J, Cromie M, et al. A low blood volume LC-MS/MS assay for the quantification of fentanyl and its major metabolites norfentanyl and despropionyl fentanyl in children [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(24): 3568-3577.