

## · 论著 ·

## LC-MS-MS 法测定人血浆中非布司他浓度

姜楠 杨永革 宋丽雪 许雪廷 (北京军区总医院药理科,北京 100700)

**[摘要]** 目的 建立液质联用色谱法(LC-MS-MS)测定人血浆中非布司他(febugostat)浓度。方法 空白血浆加非布司他,用乙腈作为沉淀剂,取上清液用于LC-MS-MS分析。分析柱为Thermo Biobasic-8柱(5  $\mu$ m, 50 mm  $\times$  2.1 mm),流动相为乙腈-10 mmol/L 乙酸铵(含0.05%甲酸)(70:30),流速为0.2 ml/min;质谱条件:电喷雾离子化电离源ESI负离子检测,喷雾电压(SP)3 500 kV,鞘气(SGP)流速10 Arb,辅助气(AGP)流速45 Arb,毛细管温度(TEM)270 $^{\circ}$ C;非布司他和内标苯扎贝特的碰撞能量分别为10 eV、18 eV;选择反应监测(SRM)分别测定非布司他和内标苯扎贝特负离子  $m/z$  315 $\rightarrow$ 271 和  $m/z$  360 $\rightarrow$ 274。结果 非布司他在10~8 000  $\mu$ g/L检测浓度范围内呈良好线性关系( $r > 0.99$ ),最低定量限(LLOQ)为10  $\mu$ g/L,绝对回收率在85%以上,高中低3种浓度的日内和日间RSD < 15%。结论 该方法操作简便、灵敏、准确,适用于临床非布司他的血药浓度监测及其药动学研究。

**[关键词]** 非布司他;液质联用色谱法;血浆浓度

**[中图分类号]** R927

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2014)05-0354-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.05.010

## Determination of febuxostat in human plasma by LC-MS-MS

JIANG Nan, YANG Yongge, SONG Lixue, XU Xueting (Department of Pharmacy, General Hospital, Beijing Military Region, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a LC-MS-MS method for determining febuxostat in human plasma. **Methods** Febuxostat added into blank plasma was sedimented by acetonitrile, and the supernatant was determined by LC-MS-MS. Analytical column was Thermo Biobasic-8 5  $\mu$ m 50 mm  $\times$  2.1 mm (ID). The mobile phase consisted of acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate (0.05% acid = 70:30) at a flow rate of 0.2 ml/min. Mass spectrum conditions: ESI was performed in the SRM mode using target ions  $m/z$  315 $\rightarrow$ 271 (10 eV) (febuxostat),  $m/z$  360 $\rightarrow$ 274 (18 eV) (bezafibrate), SP 3 500 kV, SGP 10 Arb, AGP 45 Arb, TEM 270 $^{\circ}$ C. **Results** The calibration curve was linear over the range of 10-8 000  $\mu$ g/L. The LLOQ of Febuxostat in plasma was 10  $\mu$ g/L. The extracted recovery was >85%. The intra- and inter-day RSD were <15%. **Conclusion** The method was sensitive, simple and accurate to determine febuxostat plasma concentration and to study pharmacokinetics of febuxostat.

**[Key words]** febuxostat; LC-MS-MS; plasma concentration

非布司他(febugostat, FEB)是新型的非嘌呤黄嘌呤氧化酶选择性抑制剂<sup>[1]</sup>,临床上用于预防和治疗尿酸血症及引发的痛风。其化学名称为(3-氰基-4-异丁氧基苯基)-4-甲基-5-唑甲酸,是美国FDA于2009年2月13日批准的用于治疗尿酸过高症的药物,至今国内仍未上市。到目前为止,关于非布司他的研究报道较少。为了更清楚了解非布司他的药学特点,本研究建立了简单、灵敏的LC-MS-MS检测人血浆非布司他浓度的方法,适用于非布司他人药代动力学和生物等效性研究。

## 1 仪器与试剂

## 1.1 仪器 质谱仪:Thermo Finnigan TSQ Quantum

**[作者简介]** 姜楠,硕士,主管药师。Tel: (010) 66721899, E-mail: jiangnan7757@163.com.

型液相色谱-三重四极杆质谱联用仪,配有电喷雾离子化源(ESI源);Agilent 1100 高效液相色谱系统:G1313A 自动进样器;G1312A 二元梯度泵;在线脱气机、柱温箱(美国Agilent公司)、分析柱为Thermo Biobasic-8柱(5  $\mu$ m, 50 mm  $\times$  2.1 mm);FinniganX-calibur 色谱/质谱数据系统。Sigma1-14 型高速离心机(美国Sigma公司);XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器有限公司);Ohaus Discovery 型电子分析天平(奥豪斯国际贸易有限公司)。

**1.2 试剂** 非布司他对照品(南京海辰药业有限公司,纯度99.5%,批号:20100401),内标苯扎贝特对照品(中国药品生物制品检定所,批号:100732-200501)。乙腈、甲醇为色谱纯(均为Merck公司);乙酸胺、甲酸为分析纯,水为重蒸去离子水。

## 2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Thermo Biobasic-8 柱 (5 μm, 50 mm × 2.1 mm), 流动相: 乙腈-10 mmol/L 乙酸铵 (含 0.05% 甲酸) (70 : 30), 流速: 0.2 ml/min; 柱温: 室温。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子化电离源 ESI 负离子检测, 喷雾电压 (SP) 3 500 kV, 鞘气 (SGP) 流速 10 Arb, 辅助气 (AGP) 流速 45 Arb, 毛细管温度 (TEM) 270 °C; 非布司他和内标苯扎贝特的碰撞能量分别为 10、18 eV; 选择反应监测 (SRM) 分别测定非布司他和内标苯扎贝特负离子  $m/z$  315→271 和  $m/z$  360→274; 扫描时间为 0.5 s。

2.2 血浆样本的预处理 精密量取血浆样品 100

μl, 置 1.5 ml 具塞小塑料管中, 加 10 μl 内标溶液 (苯扎贝特 50 μg/ml) 混匀, 再加 300 μl 乙腈→在微型混合器上涡流振荡 2 min (沉淀蛋白) →离心 (10 000 r/min) 10 min 分层, 取上清液 100 μl 放入进样瓶中, 10 μl 进样检测。

2.3 方法的专属性 按选定的 LC-MS-MS 条件测试 6 名健康人的空白血浆、空白血浆 + 非布司他标准样品 + 内标、受试者口服非布司他片后的血浆样品, 来对特异性进行考察。由图 1 可见非布司他与苯扎贝特分别在 1.14 和 1.00 min 出峰 (图中从左至右分别为总离子流图、非布司他、苯扎贝特), 非布司他与苯扎贝特峰形良好, 无杂质峰干扰测定, 专属性好。

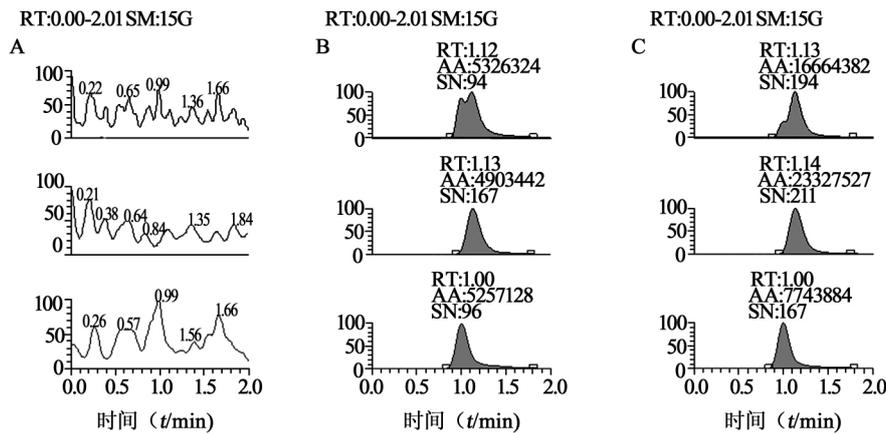


图 1 血浆中非布司他选择反应监测 (SRM) 色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 非布司他标准样品 + 内标; C. 受试者服药后 1 h 的血样

2.4 线性范围和定量限 精称 10.05 mg 非布司他对照品 (相当于非布司他 10 mg)、10 mg 苯扎贝特标准品, 分别溶于 10 ml 甲醇成 1 g/L 的标准品溶液, 分装后 -70 °C 储存待用。用 1 g/L 非布司他标准品溶液配成一系列浓度的工作溶液, 分别取各浓度工作溶液 10 μl 于 90 μl 空白血浆中, 使非布司他的血浆终浓度分别为 10、30、100、300、1000、3000、6 000、8 000 μg/L, 余同血浆样品处理和测定。将不同浓度系列标准样品测得的非布司他与内标峰面积比值为纵坐标, 非布司他浓度为横坐标, 直线加权回归。得到线性回归方程  $Y = 0.003\ 094 + 0.000\ 756X$ ,  $r$

> 0.99。方法的最低检测浓度为 10 μg/L。

2.5 精密度与回收率 按非布司他标准曲线制备方法制备质控样品, 对 30、1 000、7 000 μg/L 3 种浓度进行了连续 3 d 的 6 个样本分析, 以评价方法的日内、日间精密度。以空白血浆乙腈沉淀提取液, 加入非布司他与内标的标准溶液配制低、中、高 3 种浓度 (30、1 000、7 000 μg/L) 的标准品样本, 计算回收率。以流动相代替空白血浆, 同样方法配制低、中、高 3 种浓度 (30、1 000、7 000 μg/L) 的标准品样本, 计算基质效应。方法学考察结果见表 1。

表 1 方法学考察结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

样品	准确度	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)	提取回收率 (%)	基质效应 (%)
非布司他 (30 μg/L)	32.07 ± 2.89	8.32	11.09	89.39	9.05
非布司他 (1 000 μg/L)	987.58 ± 51.10	5.40	2.94	85.86	5.7
非布司他 (7 000 μg/L)	6 988.60 ± 546.32	7.80	7.91	90.48	11.74
苯扎贝特 (50 μg/L)				87.93	-7.07

**2.6 稳定性试验** 对室温放置 2 h、-70℃ 保存 30 d、-70℃-室温反复冻融 3 次的血浆样品稳定性进行考察,低、中、高 3 个浓度变异均小于 15%,符合指导原则要求;血浆样本经 2.2 项下预处理后室温放置 8 h 可保持稳定。

### 3 讨论

非布司他是美国 FDA 于 2009 年批准的用于治疗尿酸过高症的药物,至今国内仍未上市。国内发表的非布司他血药浓度检测的文献较少<sup>[2,3]</sup>。为了更清楚地了解非布司他在中国人体内的药学特点,笔者建立了简单、灵敏的 LC-MS-MS 检测方法,并用于临床生物样本的大批量检测。

本方法采用恒比流动相质谱检测法,比荧光梯度检测法<sup>[2]</sup>快捷灵敏;并通过优化色谱条件,选择了 Thermo Biobasic-8 柱(5 μm, 50 mm × 2.1 mm),使单个样品检测仅需要 2 min,比文献<sup>[3]</sup>大大减少了检测时间与环境污染;采用乙腈沉淀法,使血浆样

品处理非常简便快捷。

本方法检测专属性强,灵敏度高,简便快捷,适于临床生物样本的大批量检测,对非布司他生物等效性与药代动力学研究有很好的参考价值。

### 【参考文献】

- [1] Mayer MD, Khosravan R, Vermillet L, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of febuxostat, a new non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase, in subjects with renal impairment [J]. *Am J Ther*, 2005, 12(1): 22-34.
- [2] 张文丽,程航,阳国平. 高效液相-荧光法测定人血浆中非布司他的浓度及其人体药理学研究[J]. *临床药理学*, 2011, 16(10): 1148-1152.
- [3] 施政,刘健,申屠建中,等. 非布司他在中国健康人体的生物等效性[J]. *中国临床药理学杂志*, 2013, 162(4): 276-279.

[收稿日期] 2013-08-08 [修回日期] 2014-04-14

[本文编辑] 陈静

(上接第 353 页)

在,使溶液呈浅黄色,经染色后并不影响多糖的含量测定。样品加入染色剂后在室温环境下放置 30 min,一方面使其反应充分,再者当染色剂加入后溶液温度骤然升高(近 90℃),使其降温至室温后便于稳定操作。应严格控制反应时间和温度,时间过长或反应温度不一致会影响测定结果。

维地红涂剂是一种以白及溶胶为分散介质的混悬剂,白及溶胶本身在该制剂中不仅是分散介质,同时也是一种良好的治疗溃疡的药物,白及多糖溶于水,因而在制备供试液时以水为溶剂,用超声处理 3~5 min,使样品迅速分散、多糖溶出。在样品溶液染色时曾使用 10 ml 容量瓶,取样品溶液 2 ml 加染色剂至刻度,由于加入染色剂时溶液温度骤然升高,体积膨胀,当反应完全降至室温时,因为热胀冷缩原因,溶液体积只在 9~9.5 ml 之间,不便于定量,影响测定结果。参考文献[8]方法取样后在刻度试管中加入 6 ml 染色剂制备样品,则结果趋于稳定。蒽酮-硫酸法测定维地红涂剂中多糖的含量,操作便利、方法稳定,结果重现

性好。由于在浓酸条件下作业,应注意仪器及人身安全防护。

### 【参考文献】

- [1] 常明泉,余学英,杜士明,等. 维地红涂剂的制备与质量控制[J]. *儿科药理学杂志*, 2012, 18(11): 37-39.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版二部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 379-380.
- [3] 陈芳,钟明哲,常明泉,等. 凡胶软膏的体外释放度考察[J]. *医药导报*, 2012, 31(12): 1610-1612.
- [4] 陈芳,常明泉,杜士明,等. 不同浓度蒽酮-硫酸试液对白及溶胶含量的影响[J]. *中国药师*, 2012, 15(11): 1604-1606.
- [5] 王爱民,王永林,郑林,等. 白及药材中多糖的含量测定[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(22): 2963-2965.
- [6] 张庆红,马梅芳. 硫酸-蒽酮法测定天冬中多糖的含量[J]. *中国现代中药*, 2008, 10(8): 18-22.
- [7] 李云霞,戴卫红,张彬,等. 蒽酮-硫酸法测定参麦软胶囊中多糖的含量[J]. *解放军药学学报*, 2011, 27(6): 511-512.
- [8] 马国琴,王引权,赵勇. 蒽酮-硫酸比色法测定党参中可溶性糖含量的研究[J]. *甘肃中医学院学报*, 2009, 26(6): 46-48.

[收稿日期] 2013-10-12 [修回日期] 2013-12-27

[本文编辑] 陈静