

· 研究报告 ·

UPLC-MS/MS 法测定人血浆中丙硫氧嘧啶的含量

李群英¹, 凌琳², 李盛建¹, 周瑾¹, 李甜甜³, 赵亮¹, 吕磊⁴ (1. 上海市宝山区罗店医院, 上海 201908; 2. 浙江工业大学中药学院, 浙江 310014; 3. 上海市宝山区大场镇大场社区卫生服务中心, 上海 200442; 4. 海军军医大学附属东方肝胆外科医院, 上海 200438)

【摘要】 目的 建立 UPLC-MS/MS 法测定人血浆中丙硫氧嘧啶的含量, 为临床治疗药物监测(TDM)和生物等效性试验(BE)提供方法学基础。方法 采用 Agilent SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液(80 : 20, V/V), 等度洗脱。质谱采用 AJS-ESI 源, 多反应监测(MRM)正离子模式, 检测离子对为: 丙硫氧嘧啶 *m/z* 171.1→112.1、内标(丙硫氧嘧啶-D5)*m/z* 176.1→117.0。结果 血浆中丙硫氧嘧啶在 10~5 000 ng/ml 范围内线性关系良好, *r*=0.999 3; 批内和批间的精密度和准确度良好(RSD<10%, RE<±10%); 不同浓度的基质效应均<110%, 变异系数<5%; 不同浓度的平均回收率为 101.60%~113.56%, 符合方法学要求。结论 该方法快速简便、灵敏准确, 适用于血浆中丙硫氧嘧啶的含量测定。

【关键词】 超高效液相色谱-串联质谱; 丙硫氧嘧啶; 血浆; 含量测定

【中图分类号】 R917 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2020)04-0350-04

【DOI】 10.12206/j.issn.1006-0111.202001063

Determination of propylthiouracil in human plasma by UPLC-MS/MS

LI Qunying¹, LING Lin², LI Chengjian¹, ZHOU Jin¹, LI TianTian³, ZHAO Liang¹, LÜ Lei⁴ (1. Department of Pharmacy, Shanghai Baoshan Luodian Hospital, Shanghai 201908, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 3. Baoshan Dachang Community Health Center, Shanghai 200442, China; 4. Department of Pharmacy, Shanghai Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a method for the determination of propylthiouracil in human plasma by UPLC-MS/MS and provide methodological basis for therapeutic drug monitoring (TDM) and bioequivalence test (BE) in clinical. **Methods**

The chromatographic separation was performed on an Agilent SB-C₁₈ column (4.6 mm×150 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol and water containing 0.1% formic acid (80 : 20, V/V), isocratic elution. MS condition was optimized in the positive ion detection mode by multiple reaction monitoring (MRM), along with the Agilent JetStream electrospray source interface (AJS-ESI). The precursors to the product ion transitions were *m/z* 171.1→112.1 for propylthiouracil and *m/z* 176.1→117.0 for the internal standard (IS). **Results** The calibration curve was linear in the range of 10–5 000 ng/ml for propylthiouracil in human plasma, *r*=0.999 3. The intra-day and inter-day precision and accuracy were good (RSD<10%, RE<±10%). The matrix effect of different concentrations was less than 110% and the coefficient of variation was less than 5%. The average recovery of different concentrations was 101.60%–113.56%, which conformed with the requirement of methodological validation. **Conclusion** The method is rapid, sensitive and accurate, which can be used for the determination of propylthiouracil in human plasma.

【Key words】 UPLC-MS/MS; propylthiouracil; plasma; content determination

丙硫氧嘧啶(propylthiouracil), 为硫脲类化合物, 它可通过抑制甲状腺内过氧化物酶系统, 阻止酪氨酸的碘化及碘化酪氨酸的缩合, 从而抑制甲状腺激素的合成, 是临床常用的治疗甲亢的药物^[1-3]。其口服吸收迅速, 约 1~1.5 h 达血药浓度峰值; 代谢快, 24 h 内约有 35% 的药物以原型和葡萄糖醛酸

化物的形式从尿中排出, 血浆半衰期约为 1~3 h^[4]。口服丙硫氧嘧啶个体差异较大, 由于其血浆蛋白结合率高(约为 80%), 且存在肝毒性, 因此对其进行血药浓度监测, 能使药物应用更为安全合理^[5-6]。进口丙硫氧嘧啶的价格昂贵, 研发高质量、低价格的国产仿制药具有良好的经济效益和社会效益^[7], 开发高效稳定的丙硫氧嘧啶的血药浓度测定方法, 可为仿制药一致性评价中的生物等效性试验(BE)提供依据。

目前, 丙硫氧嘧啶的体内测定方法主要为高效

【作者简介】 李群英, 本科, 主管药师, 研究方向: 临床药学, Email: ldyyjk2015@sina.com

【通讯作者】 吕磊, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药药效物质基础及体内代谢, Email: k_owen2002@126.com

液相色谱法(HPLC)^[8-10],早期开发的液相测定方法,分析时间长,专属性和灵敏度均无法满足临床高通量测定的需求,因此,建立简单快速、灵敏准确的丙硫氧嘧啶血药浓度质谱分析方法(MS)具有重要意义。本文建立UPLC-MS/MS法测定人血浆中丙硫氧嘧啶的含量,可为临床治疗药物监测(TDM)和生物等效性试验(BE)提供方法学基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290 UPLC 超高效液相色谱(安捷伦科技有限公司,美国),配有在线脱气机、二元泵、低温自动进样器和柱温箱;Agilent 6470 Triple Quad 三重四极杆质谱(安捷伦科技有限公司,美国),配有AJS-ESI喷射流电喷雾离子源、MassHunter分析工作站;SECURA125-1CN型十万分之一电子天平、Arium mini超纯水仪(赛多利斯,德国);Fresco 21低温离心机(赛默飞,美国)。

1.2 试剂

对照品丙硫氧嘧啶(批号:100803-201503,纯度>99.4%)购自中国食品药品检定研究院,内标丙硫氧嘧啶-D5(批号:13-EQJ-150-1,纯度>98%),购自Toronto Research Chemicals;甲酸为色谱纯(ACS恩科化学,美国);甲醇和乙腈为色谱纯(霍尼韦尔,美国);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱为Agilent SB-C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相采用甲醇-0.1%甲酸水溶液(80:20, V/V),等度洗脱;流速:1 ml/min,柱后分流比2:3;柱温30℃;进样量5 μl,分析时间3 min。

2.1.2 质谱条件

采用AJS-ESI源,正离子模式,离子源参数:干燥气温度350℃;干燥气流速10 L/min;雾化器压力40 psi;鞘气温度350℃;鞘气流速11 L/min;毛细管电压4 000 V。多反应监测(MRM)的参数:丙硫氧嘧啶 m/z 171.1→112.1,碎片电压110 V,碰撞能量30 eV;丙硫氧嘧啶-D5(IS) m/z 176.1→117.0,碎片电压110 V,碰撞能量30 eV。丙硫氧嘧啶和氘代内标的保留时间均为1.9 min。

2.2 溶液的配制

2.2.1 丙硫氧嘧啶标准溶液

精密称取丙硫氧嘧啶对照品1.5 mg,置于2 ml

称量瓶中,用移液器(已校准)加入甲醇适量溶解,涡旋混匀,配成1.0 mg/ml的对照品储备液;取上述对照品储备液适量,用甲醇逐级稀释,配成浓度分别为200、500、1000、2 000、10 000、20 000、40 000、80 000、100 000 ng/ml的系列对照品溶液,置4℃冰箱保存,备用。

2.2.2 内标标准溶液

精密称取丙硫氧嘧啶-D5对照品1.3 mg,置于2 ml称量瓶中,用移液器(已校准)加入甲醇适量溶解,涡旋混匀,配成1.0 mg/ml的内标储备液;取上述储备液适量,用乙腈(含5%甲酸)稀释400倍,得2 500 ng/ml的内标溶液,置于4℃冰箱保存,备用。

2.2.3 标准含药血浆及质控样品溶液

取空白血浆950 μl,精密加入“2.2.1”项下制备的丙硫氧嘧啶系列标准溶液50 μl,旋涡混匀,配成浓度分别为10、25、50、100、500、1 000、2 000、4 000、5 000 ng/ml的标准含药血浆。同法制备4个浓度的质控样品(QC),分别为10、25、500、4 000 ng/ml,待用。

2.3 血浆样品前处理

血浆样品先置于室温下解冻,取100 μl血浆,依次加入200 μl内标溶液,200 μl乙腈(含5%甲酸),涡旋1 min,于4℃下13 000×g高速离心10 min,取100 μl上清液于进样瓶中,进行UPLC-MS/MS分析。

2.4 血浆样品分析方法验证

2.4.1 选择性

通过比较6个不同健康志愿者的空白血浆样品、质控样品和给药后实际样品的色谱图来评估。分别取空白血浆、质控样品(QC-L)和受试者给药后的血样各100 μl,按“2.3”项下血浆样品前处理方法操作,进样,获得样品的色谱图(图1),包括空白样品色谱图、质控样品色谱图和实际样品色谱图。结果显示,空白血浆中的内源性成分不干扰待测物和内标出峰,选择性良好。

2.4.2 标准曲线与定量下限

取“2.2.3”项下制备的标准含药血浆样品100 μl,按“2.3”项下血浆样品前处理方法操作,进样分析,记录色谱图。以待测物血浆浓度为横坐标(X),待测物与内标峰面积比为纵坐标(Y),进行回归,使用 $1/X$ 加权,求得回归方程: $Y=0.0004X-0.0002$ ($r=0.9993$)。结果表明,血浆中的丙硫氧嘧啶在10~5 000 ng/ml范围内线性关系良好。以 $S/N>10$ 确定,定量下限(LLOQ)10 ng/ml,为标准曲线最低点。

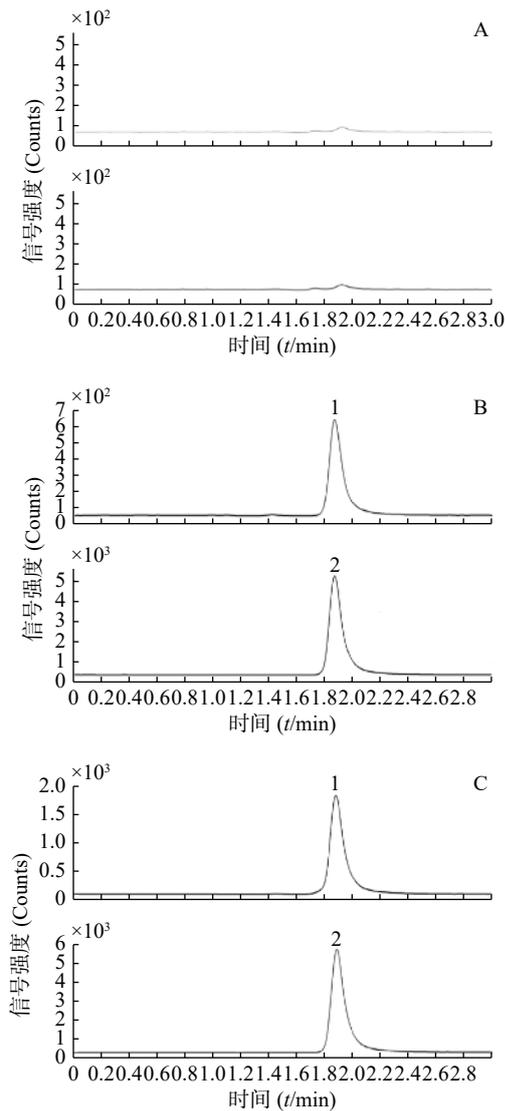


图1 血浆中丙硫氧嘧啶和内标的典型色谱图

A. 空白血浆; B. 质控样品(QC-L); C. 给药后的血浆样品;
1. 丙硫氧嘧啶; 2. 丙硫氧嘧啶-D5

2.4.3 精密度和准确度

在 LLQQ(10 ng/ml)、QC-L(25 ng/ml)、QC-M(500 ng/ml)、QC-H(4 000 ng/ml) 4 个浓度下, 通过批内和批间分别考察。按“2.2.3”项下制备丙硫氧嘧啶 4 个浓度质控样品, 每个浓度平行 5 份, 按“2.3”项下血浆样品前处理操作, 进样分析。并于每天制备 4 个浓度质控样本各 5 份, 进样分析, 连续 3 d, 计算批内、批间的精密密度(RSD)及准确度(RE), 批内和批间的 RSD<10%, RE \leq ±10%, 结果见表 1。

2.4.4 基质效应

取 6 位健康志愿者的空白血浆, 在相当于 QC-L(25 ng/ml)和 QC-H(4000 ng/ml)的 2 个浓度下来考察。先按“2.3”项下血浆样品前处理方法制备空

表 1 丙硫氧嘧啶精密度和准确度试验结果

| 浓度 (ng/ml) | 批内(n=5) | | 批间(n=15) | |
|---------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| | 精密密度 (RSD/%) | 准确度 (RE/%) | 精密密度 (RSD/%) | 准确度 (RE/%) |
| 10 | 3.40 | -0.55 | 8.38 | -0.88 |
| 25 | 8.35 | -5.59 | 9.53 | 1.63 |
| 500 | 7.61 | -1.00 | 6.21 | -3.39 |
| 4 000 | 2.90 | -2.79 | 4.71 | -5.95 |

白基质上清, 然后加入丙硫氧嘧啶及内标的标准溶液, 以使其终浓度与处理后 QC-L 和 QC-H 一致; 同时制备相同浓度不含基质的待测物和内标的乙腈溶液, 进样分析。通过峰面积分别计算待测物和内标的基质因子, 进一步得到经内标归一化的基质因子。不同基质下, 2 个浓度基质效应的变异系数均小于 5%, 符合方法学要求, 结果见表 2。

表 2 丙硫氧嘧啶的基质效应试验结果 (n=6)

| 浓度 (ng/ml) | 待测物 基质因子(%) | 内标 基质因子(%) | 归一化 基质因子(%) | 变异系数 (%) |
|---------------|----------------|---------------|----------------|-------------|
| 25 | 25.94 | 23.99 | 108.18 | 1.78 |
| 4 000 | 21.91 | 21.92 | 100.62 | 0.66 |

2.4.5 提取回收率

取单一来源的空白血浆, 在相当于 QC-L(25 ng/ml)、QC-M(500 ng/ml)、QC-H(4 000 ng/ml) 的 3 个浓度下来考察。先按“2.3”项下血浆样品前处理方法制备空白基质上清, 然后加入丙硫氧嘧啶及内标的标准溶液, 以使其终浓度与处理后 QC-L、QC-M、QC-H 一致; 同时按“2.2.3”和“2.3”项下制备和处理 3 个浓度的 QC 样品, 每个浓度平行操作 5 份, 分别进样分析。通过峰面积计算待测物的提取回收率, 平均回收率为 101.60%~113.56%, 结果见表 3。

表 3 丙硫氧嘧啶的提取回收率试验结果 (n=5)

| 被分析物 | 浓度(ng/ml) | 回收率(%) | RSD(%) |
|-------|-----------|--------|--------|
| 丙硫氧嘧啶 | 25 | 101.60 | 5.30 |
| | 500 | 113.56 | 1.72 |
| | 4 000 | 108.82 | 6.26 |

2.4.6 稳定性

首先通过新鲜配制丙硫氧嘧啶和内标的储备液 1.0 mg/ml, 考察对照品储备液于 4℃ 下放置 30 d 的稳定性, 结果显示, RE \leq ±10%, 稳定性良好。然后在 QC-L(25 ng/ml)、QC-H(4 000 ng/ml) 2 个浓度

下,分别考察4种条件下丙硫氧嘧啶的稳定性:室温放置4h、自动进样器(4℃)放置24h,冻融循环3次,以及-80℃下冻存30d,每个浓度平行操作5份。按“2.3”项下血浆样品前处理操作,进样分

析,将丙硫氧嘧啶和内标峰面积的比值代入随行标准曲线求得实测浓度,计算RE以及RSD,结果(见表4)显示稳定性良好。

表4 考察不同条件下丙硫氧嘧啶的稳定性试验结果(n=5)

| 浓度(ng/ml) | 室温放置4h | | 4℃放置24h | | 冻融循环3次 | | -80℃冻存30d | |
|-----------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|-----------|--------|
| | RE(%) | RSD(%) | RE(%) | RSD(%) | RE(%) | RSD(%) | RE(%) | RSD(%) |
| 25 | 2.82 | 6.58 | 1.99 | 6.00 | 4.67 | 4.85 | 8.17 | 5.59 |
| 4 000 | -4.65 | 6.24 | -7.70 | 4.51 | 4.82 | 3.90 | 3.73 | 1.93 |

2.4.7 残留

通过在定量上限(ULOQ)5 000 ng/ml完成测定之后立即测定空白样品来评估。结果显示,分析物保留时间处峰面积小于LLOQ的20%,IS保留时间处的峰面积小于实际IS的5%。该方法几乎无残留,不影响测定。

2.4.8 稀释可靠性

通过使用空白基质将定量上限(ULOQ)10倍(50 000 ng/ml)和50倍(250 000 ng/ml)浓度的样品稀释至定量范围(10~5 000 ng/ml)来评估,每个浓度平行操作5次。结果表明,RSD和RE均低于15%,样品稀释不影响测定的精密度和准确度。

3 讨论

3.1 样品前处理的优化

常用的样品前处理方法为蛋白沉淀和液液萃取,优先采用简单的蛋白沉淀法。沉淀剂考察了甲醇和乙腈,结果发现乙腈沉淀更完全,在同位素内标下,归一化的基质效应更低,添加5%甲酸后,待测物峰形更好,因此选择乙腈(含5%甲酸)为沉淀剂。进一步考察了血浆与沉淀剂的比例(1:3、1:4、1:5, V/V),结果发现,比例为1:4时,提取回收率最高,最终选定为前处理方法。

3.2 液相条件的优化

首先考察了甲醇-水和乙腈-水体系,结果发现,虽然乙腈-水体系的洗脱能力更强,但甲醇-水体系下峰形更佳,血浆中内源性成分与主峰分离完全,基线噪音小。在水相中添加0.1%的甲酸,可以显著提高丙硫氧嘧啶的质谱响应,检测灵敏度令人满意,也可进一步改善峰拖尾。柱后采用了2:3分流,实际进入质谱的流速约为0.4 ml/min,既保障了色谱柱的最佳流速(1 ml/min),又保证了ESI源的

离子化效率,结果稳定可靠。

3.3 质谱条件的优化

丙硫氧嘧啶在正离子模式下的响应明显优于负离子模式,因此确定采用正离子模式检测。采用Optimizer质谱参数优化程序依次对雾化室参数(鞘气温度、鞘气流速、干燥气温度、干燥气流速、雾化器压力、毛细管电压)以及MRM参数(母离子、子离子、碎片电压、碰撞能)进行调节优化,最终依据丙硫氧嘧啶和内标的检测灵敏度,确定了“2.2.2”项下最佳的质谱参数。得益于采用的同位素内标,丙硫氧嘧啶和氘代内标出峰稳定,虽保留时间同为1.9 min,但并没有离子串扰影响,而且归一化的基质效应结果满意。

综上,本文建立了快速简便、灵敏准确的测定人血浆中丙硫氧嘧啶含量的UPLC-MS/MS方法。样品采用简单蛋白沉淀法处理,LLOQ为10 ng/ml,基质效应低,回收率高,每个样本的分析时间3 min,每天可分析超过400样本,满足高通量测定需要。本研究为丙硫氧嘧啶的治疗药物监测(TDM)和生物等效性试验(BE)提供了方法学基础。

【参考文献】

- [1] 徐秀娟. 丙硫氧嘧啶治疗妊娠期甲状腺功能亢进的临床疗效观察[J]. 现代实用医学, 2017, 29(5): 624-625.
- [2] 杨霞. 丙硫氧嘧啶片治疗老年甲亢的临床疗效[J]. 中国社区医师, 2017, 33(4): 66-67.
- [3] GIANETTIE, RUSSO L, ORLANDI F, et al. Pregnancy outcome in women treated with methimazole or propylthiouracil during pregnancy[J]. J Endocrinol Invest, 2015, 38(9): 977-985.
- [4] 王大猷. 丙硫氧嘧啶的药学特性及安全问题[J]. 药物不良反应杂志, 2015, 17(2): 84-86.
- [5] 韩耕愚, 刘冰, 沈弢. 丙硫氧嘧啶(PTU)诱导药物性肝损伤的研究进展[J]. 肝脏, 2018, 23(9): 831-833.

(下转第378页)