

眼组织中缓释地塞米松药膜的 HPLC/MS/MS 测定方法研究

汪国权 张勤* 盛耀华* 温忆敏 王宏

(上海市疾病预防控制中心, *上海新华医院眼科 上海 200336)

摘要 眼部手术后,在眼组织的前房中植入缓释地塞米松药膜以防术后感染。本实验采用液液萃取、液固萃取的方法来提取生物样品中的地塞米松药物,经液相色谱/质谱/质谱进行检测,样品中药物浓度在 1.08—54 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈现良好的线性($r^2 = 0.9995$),最低检测浓度为 0.4 $\mu\text{g/L}$,平均回收率大于 77%。用这一方法可高灵敏度、高选择性地应用于临床相关药物的药动力学研究。

关键词: 地塞米松 液相色谱/质谱 临床药物检测

白内障是一种发病率较高的眼科常见病,也是我国人群主要致盲原因之一。手术是目前唯一有效的治疗方法。为了控制前房炎症反应,术后常滴用抗生素和激素^[1]。由于角膜屏障的存在、泪液的稀释作用及泪道的引流,导致眼内药物浓度不能达到治疗水平。现利用生物降解性聚合物作为载体与药物结合,植入眼内,以期随聚合物的降解,在体内持续、缓慢地释放药物,减少毒性反应,并减少给药次数,增加疗效。本文使用具有很强抗炎作用的糖皮质激素药物——地塞米松作为治疗药物,用 Surodex (Oculex Pharmaceuticals, Inc) 作为前房植入型缓释装置^[2],采用液相色谱/质谱/质谱仪分析地塞米松药物在体内分布,具有重要的实际意义,和较高的精密度、灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂:

Waters2690 高效液相色谱仪,Quattro LC 质谱仪(英国质谱公司, micromass) SHZ - 22 水浴恒温振荡器(太仓医疗器械厂),MW - 80A 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),IDL - 5 离心机(上海安亭科学仪器厂),HW - 8B 超级微量恒温器(上海浦江分析仪器厂)。

地塞米松(上海华联制药有限公司惠赠),泼尼松(中国药品生物制品检定所),乙腈(光谱纯,BDH 公司),二氯甲烷(分析纯,上海建信化工有限公司试剂厂),Oasis 固相萃取柱(WATERS),去离子水(Millipore)。

内标溶液制备:精密称取 11.0 毫克泼尼松标准品,用甲醇溶解并定容至 50mL,制成浓度为 220 $\mu\text{g/mL}$ 的内标储备液。再水稀释成 110ng/mL 内标使用溶液。

地塞米松对照品溶液的制备:精密称取地塞米松对照品 54 毫克,用甲醇溶解并定容至 50ml,制成浓度为 1.08mg/mL 的标准储备液。

上述溶液均应在 4℃ 冰箱中保存。

1.2 色谱条件

Symmetry C₁₈ 色谱柱 (2.1mm ×150mm, 5μm) (Waters); 流动相 A: 水; 流动相 B: 乙腈, 流速: 0.3mL/min; 梯度洗脱 0.0min 42% B, 0.0 - 3.0min 42% B, 3.0 - 3.1min 90% B (curve 6), 3.1 - 6.0min 90% B (curve 6), 6.0 - 6.1min 42% B (curve 6); 柱温: 30℃ 进样体积: 60μL。

1.3 质谱条件

大气压化学电离源 (APCI); 电离电压: 2.38kV; 导入电压: 31V; 聚焦电压: 0.98V; 离子源温度: 120℃; 干燥气温度: 550℃; 电子倍增器电压: 650V; 喷雾气流速: Max; 干燥气流速: 105L/hr; 四级杆区真空度: 2.4×10^{-5} mBar; 碰撞室气体: 氦气; 碰撞室真空度: 1.0×10^{-3} mBar; 碰撞能量: 15eV; 检测通道 1 (地塞米松): 393.0 > 147.0; 检测通道 2 (泼尼松): 359.0 > 147.0。

1.4 样品处理^[3-6]:

精确移取房水样本 0.2mL, 记录体积。置于 10mL 具塞离心管中, 加入 100μL 浓度为 110ng/mL 泼尼松内标溶液, 旋涡混匀。再加入 2mL 二氯甲烷溶液, 加盖后将离心管置于旋涡混合器上混匀 30 秒, 用振荡器振荡提取 15 分钟, 以 4000 转/分钟离心 10 分钟, 移取有机相于另一试管中, 剩余样本溶液中用 2mL 二氯甲烷溶液再次抽提, 合并有机相。将装有两次抽提所得的有机相试管置于 70℃ 恒温槽中, 用氮气吹干有机溶剂。残渣用 200μL 含 30% 乙腈的水溶液溶解, 混匀后进样。

精确量取血浆样品 2.0mL, 加入 100μL 浓度为 110ng/mL 泼尼松内标溶液, 和 100μL 磷酸溶液, 混匀。将 Oasis 固相萃取柱经活化处理后, 导入上述血浆样品, 并依次用水、5% 甲醇水溶液洗涤 Oasis 固相萃取柱, 以去除各种蛋白质和低保留组分的干扰。真空干燥 Oasis 固相萃取柱 1 分钟, 用 1ml 纯甲醇洗脱吸附并收集于柱上的地塞米松。于 70℃ 恒温槽中, 用氮气吹干有机溶剂。残渣用 200μL 含 30% 乙腈的水溶液溶解, 混匀后进样。

1.5 标准曲线的制备

在 0.2mL 房水液中以一定比例方式加入地塞米松标准溶液, 制成含地塞米松浓度分别为 1.08ng/mL、2.16ng/mL、5.4ng/mL、10.8ng/mL、21.6ng/mL、54ng/mL 的系列样品标准溶液, 加入 100μL 浓度为 110ng/mL 泼尼松内标溶液, 按房水处理方法提取测定, 以地塞米松浓度 X (ng/mL) 对对照品与内标峰面积比 Y 进行线性回归, 得地塞米松的回归方程为: $Y = 0.01214X - 0.0051$, $r = 0.9995$, 最低检测浓度为 0.4ng/mL。

1.6 回收率和精密度

在相同体积的兔空白房水和水中, 均加入一定量的地塞米松和 100μL 浓度为 100ng/mL 泼尼松内标溶液, 配制成地塞米松浓度为 2.16ng/mL、10.8ng/mL、54ng/mL 的标准样品, 房水样品提取测定所得的 DEX 与 PHE 峰面积比和水溶液样品直接测定所得的峰面积的比值, 即为 DEX 相对回收率, 结果 3 种浓度的回收率分别为 77.5%、92.9%、91.4%; RSD 分别为 3.4%、2.8%、2.4%。同样方法测得 3 种浓度得日内 RSD 分别为 3.8%、

3.5%, 2.1%; 日间 RSD 分别为 4.5%, 3.6%, 2.5%。

2 讨论

2.1 质谱检测质量的选择

DXM在大气压化学电离源(APCI)直接进样质谱图中(图1)发现除产生 $[M+H]^+$ (DEX:393;PHE:359),同时分别产生一个 m/z 为434、400的质量峰,这是由于化合物在离子化过程中,与乙腈离子形成的加合峰,但其强度低于 $[M+H]^+$ 峰,因此在MS1中选择 $[M+H]^+$,即对DEX选择 m/z 393;对PHE选择 m/z 359。在维持一定碰撞室气压(约 10^{-3} mBar),通过控制不同碰撞能量,使目标分子产生裂解,在MS2中均产生特征离子碎片(m/z 147)。同时发现随碰撞能量的增加,其 m/z 393、359峰会逐步降低,特征离子碎片 m/z 147逐步增高,在碰撞能量为20eV时产生最大峰值(图2,3),因此对这两种化合物的检测用多反应监测模式(MRM)检测,即对DEX检测 m/z 393的裂解碎片 m/z 147,对PHE检测 m/z 359的裂解碎片 m/z 147,换言之,要产生色谱峰,必须在MS1、MS2中同时检测出相应的离子质量才会有色谱峰(图4)。

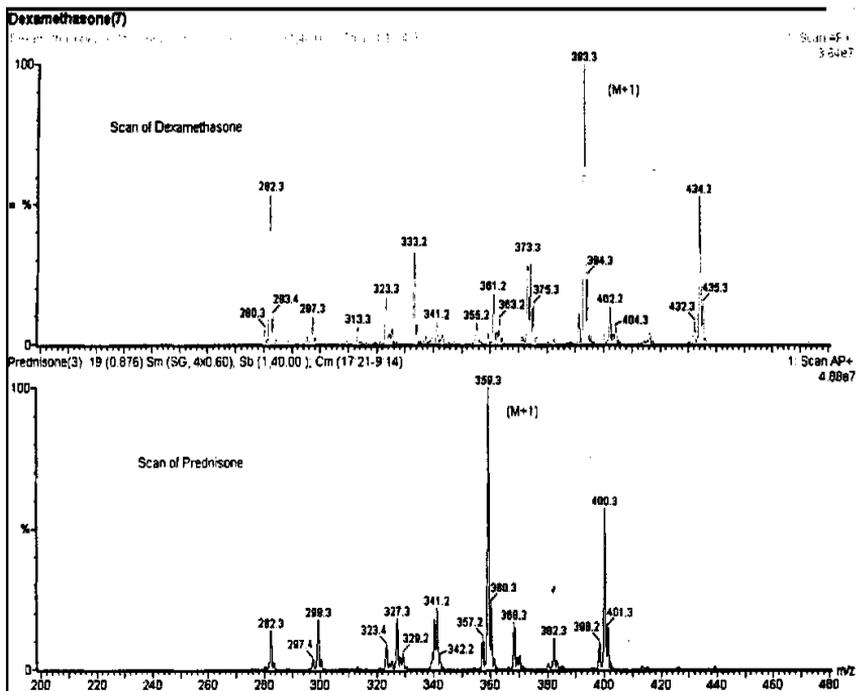


图1 地塞米松(Dexamethasone, DEX)、泼尼松(Prednisone, PHE)的直接进样质谱图

2.2 离子源方式的选择

现代液相色谱与质谱的接口方式主要为电喷雾(ESI)与大气压化学电离源(APCI)。

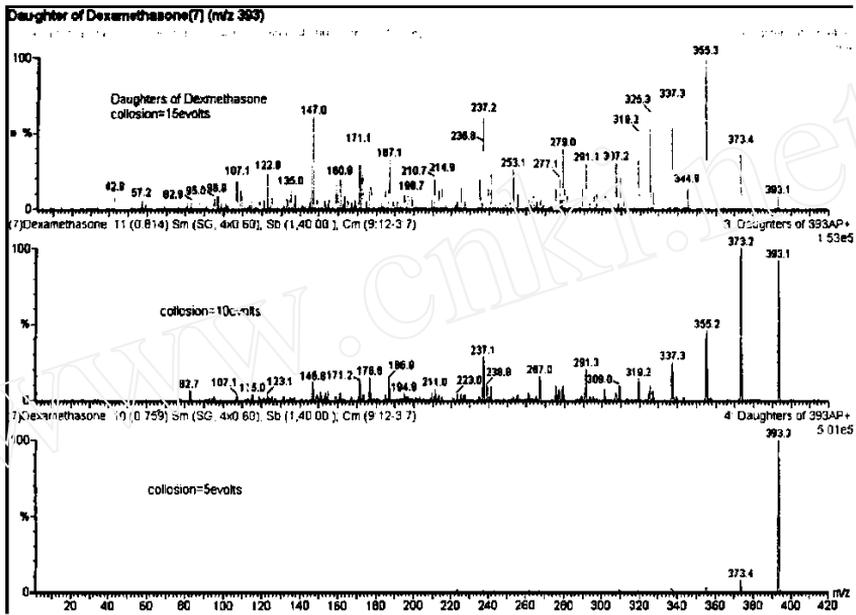


图 2 地塞米松 (M + H)⁺ 离子的不同碰撞能量条件下的裂解质谱图

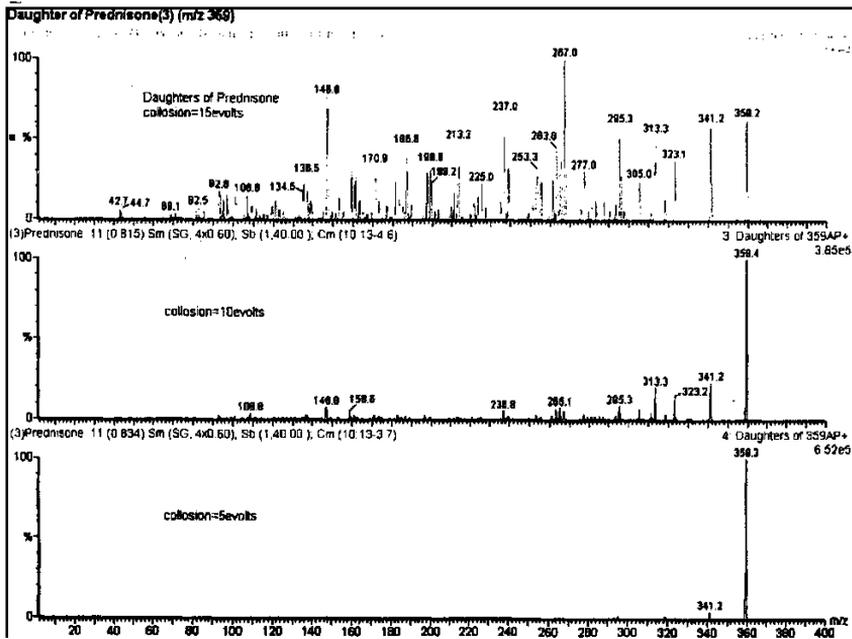


图 3 泼尼松 (M + H)⁺ 离子的不同碰撞能量条件下的裂解质谱图

DEX 虽然在高浓度条件下 (> 10 μ g/mL), 也容易产生带电荷的分子离子, 但随浓度下降,

其灵敏度急剧下降,在浓度为 100ng/mL 时,无论是通过增加流动相的 PH 来加强电离,还是在质谱中用单离子检测或多反应检测,均无法测出。究其原因,是因为该分子具有较大的非极性性质,而 APCI 主要用于非极性物质,即通过与溶剂电离产生的等离子体发生质子的交换反应,而使非极性化合物带上电荷。因此本实验采用 APCI 源,最低检测 DEX 浓度达 1.0ng/mL。

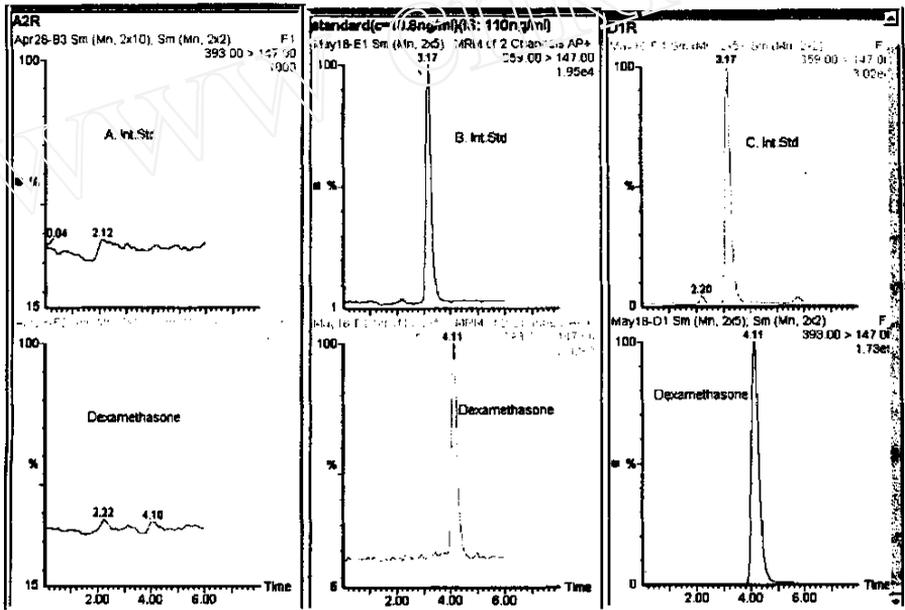


图 4 地塞米松 (DEX)、泼尼松 (PHE) 的质量色谱图

- A. 空白房水色谱图 B. 房水含 10.8ng/mL 地塞米松 (DEX) 和 110ng/mL 泼尼松 (PHE) 的色谱图
C. 实际房水样品中含 134ng/mL 地塞米松 (DEX) 和 110ng/mL 泼尼松 (PHE) 的色谱图

2.3 提取方式选择

由于房水的组成近似于血浆,分别考察采用无水乙醚、乙酸乙酯、二氯甲烷等有机溶剂进行抽提分析,结果表明用二氯甲烷抽提,无论是在抽提效率与后期处理上都是最好的。

2.4 DEX 缓释药膜的释药动力学指标

含 DEX 为 600 μ g 的药膜在植入后,其在房水中维持至少一周的药物浓度,且血液中该药含量极低 (<1.0ng/mL) (见表 1),在临床上未见有毒性反应,且眼压在术前、术后无显著性差异,达到了优于滴剂的效果。

表 1 眼中植入 600 μ gDEX 后
各时点房水和血浆中 DEX 的平均浓度 (ng/ mL)

时间	房水中药物浓度	血浆中药物浓度
1 天	906.33 \pm 280.14	0.56 \pm 0.06
3 天	444.00 \pm 84.02	0.48 \pm 0.35
5 天	258.67 \pm 112.06	0.08 \pm 0.14
7 天	95.33 \pm 45.74	0.10 \pm 0.09
均值	426.08 \pm 344.51	0.30 \pm 0.28

参 考 文 献

- 1 Roberts C W, Brennan K M. A Comparison of Topical Diclofenac with Prednisone for Postcataract Inflammation, *Arch Ophthalmol* 1995, 113:725 - 727
- 2 Tan D T H, Chee S P, Lim L *et al.* Randomized Clinical Trial of a New Dexamethasone Delivery System (Surodex) for Treatment of Post - cataract Surgery Inflammation, *Ophthalmology* 1999, 106:223 - 231
- 3 Lamiabile D, Vistelle R, Millart H. High - performance Liquid Chromatographic Determination of Dexamethasone in Human Plasma, 1986, 378:486 - 491
- 4 Dijkstra J, Dekker D. High - performance Liquid Chromatographic Determination of Phosphate Esters of Dexamethasone and Prednisolone and Their Sulphite Adducts, *Journal of Chromatography* 1982, 238:247 - 249
- 5 Gupta V D. Quantitative Dexamethasone and Dexamethasone Sodium Phosphate Determinations in Pharmaceutical Dosage Forms by High - pressure Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography* 1979, 68:926 - 928
- 6 Park S J, Kim Y, Pyo H S *et al.* Analysis of Corticosteroids in Urine by HPLC and Thermospray LC/MS, *Journal of Analytical Toxicology* 1990, 14:102 - 108
- 7 Wong Y N, Chien B M, Dmello A P. Analysis of Corticosterone in Rat Plasma by High - performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography* 1994, B661:211 - 218

Quantitative Analysis of Dexamethasone in Eyes by Liquid Chromatography/ MASS/ MASS

Wang Guoquan ,Zhang Qin * ,Sheng Yaohua * ,Wen Yimin ,Wang Hong

(Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention ,Shanghai 200336 ,China)

(* Shanghai Xinhua Hospital ,Shanghai 200336 ,China)

Received 2000 - 07 - 20

Abstract

To prevent the inflammation in the anterior chamber ,topical antibiotic and corticosteroids (such as dexamethasone ,cefuroxime etc) are often used after the surgery. A method combining liquid chromatography (LC) with tandem mass spectrometry (MS/MS) was developed to quantify dexmethasone in aqueous humor and plasma. Before narrow - bore LC/MS/MS analysis ,aqueous humor was performed by liquid - liquid extraction ,and plasma was extracted by solid - phase extraction. Prednisone was used as an internal standard. The standard curve was composed of six points ranging from 1.08 to 54 μ g/l (average $r^2 = 0.9995$). Limits of detection was 0.4 μ g/l. In-precision was < 5 % across the therapeutic range. Dexmethasone recovery averaged over 77 %. With its high sensitivity and specificity ,this LC/MS/MS method presents a valuable tool for metabolism studies.

Key Words :dexmethasone ,high performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry ,
therapeutic drug monitoring