

· 研究报告 ·

基于 UPLC-MS/MS 技术监测老年患者术后血浆中苯磺酸顺阿曲库铵残留

徐佳明^{1,2}, 周晓芳², 郭建荣^{1,2} (1. 宁夏医科大学上海公利医院研究生培养基地, 上海 200135; 2. 海军军医大学附属上海浦东新区公利医院麻醉科, 上海 200135)

[摘要] **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定人血浆中苯磺酸顺阿曲库铵的含量, 并应用于临床治疗中监测老年患者手术后血浆中的药物残留。**方法** 样品经含 0.1% 甲酸的乙腈溶液蛋白沉淀处理后, 采用 SHISEIDO (资生堂)ADME(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm)色谱柱, 流动相以含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈溶液(30:70, V/V), 等度洗脱。质谱检测选择 AJS-ESI 离子源正离子模式, 多反应监测(MRM)检测离子对为: 苯磺酸顺阿曲库铵 464.3→358.2(*m/z*)、维库溴铵(IS)557.4→356.3(*m/z*)。收集老年脊柱手术患者麻醉诱导后、手术结束、术后 0.5 h、术后 1 h 以及自体血回输时刻血袋内的血浆样品, 于事先加入 2% 甲酸水溶液的冻存管中保存, 测定样本中的苯磺酸顺阿曲库铵的含量, 评估自体血回输对老年患者术后血浆苯磺酸顺阿曲库铵浓度的影响。**结果** 人血浆中苯磺酸顺阿曲库铵在 20~5 000 ng/ml 范围内线性良好, $r=0.999\ 7$; 批内和批间的精密度 $RSD<10\%$ 、准确度 $RE\leq\pm 10\%$; 低中高 3 个浓度的基质效应为 71.88%~80.64%、提取回收率为 83.62%~88.87%, 内标维库溴铵的提取回收率为 125.91%, 符合方法学要求。老年患者手术后血浆中有一定程度残留的苯磺酸顺阿曲库铵, 需严格掌握拔管时间, 适当延长患者在麻醉复苏室的停留时间。**结论** 该方法灵敏、准确、高效, 适用于临床治疗中老年患者手术后血浆中苯磺酸顺阿曲库铵的含量测定。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱; 苯磺酸顺阿曲库铵; 含量测定; 残余肌松

[文章编号] 2097-2024(2023)03-0192-05

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202206023

Monitoring of residual cisatracurium besylate in elderly patients plasma at post operation by UPLC-MS/MS

XU Jiaming^{1,2}, ZHOU Xiaofang², GUO Jianrong^{1,2} (1. Postgraduate Training Base of Shanghai Gongli Hospital, Ningxia Medical University, Shanghai 200135, China; 2. Department of Anesthesiology, Gongli Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200135, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for the determination of cisatracurium besylate in human plasma by UPLC-MS/MS which could be used in the monitoring of drug residual in plasma of elderly patients after operation. **Methods** The samples were precipitated with 0.1% formic acid-acetonitrile solution and separated by an SHISEIDO ADME column(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm) for isocratic elution with the mobile phase of water containing 0.1% formic acid with 2 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile (30:70, V/V). MS condition was optimized in the positive ion detection mode by multiple reaction monitoring (MRM), along with the Agilent jet stream electrospray source interface (AJS-ESI). The precursors to the product ion transitions were *m/z* 464.3→358.2 for cisatracurium besylate and *m/z* 557.4→356.3 for vecuronium bromide (the internal standard, IS). Plasma samples of elderly patients undergoing spinal surgery were collected after anesthesia induction, at the end of surgery, 0.5 h and 1 h after surgery, and from the blood bags while autologous blood transfusion, and stored in cryopreservation tubes with 2% formic acid solution. Then the contents of cisatracurium besylate were determined. The effects of autogenous blood transfusion on plasma concentration of cisatracurium besylate in elderly patients after surgery evaluated. **Results** The calibration curve was linear in the range of 20-5 000 ng/ml for cisatracurium besylate in human plasma, $r=0.999\ 7$. The intra-day and inter-day precision and accuracy were good ($RSD<10\%$, $RE\leq\pm 10\%$). The matrix effect of different concentrations was 71.88%~80.64%. The recovery of different concentrations was 83.62%~88.87%. The recovery of vecuronium bromide (IS) was 125.91%, which conformed with the requirement of methodological validation. There was a certain degree of residual cisatracurium besylate in the plasma of elderly patients, so the extubation time should be strictly controlled and the stay time of patients in the anesthesia recovery room should be appropriately extended. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, and efficient, which could be used for the determination of cisatracurium besylate in human plasma of elderly patients after operation.

[基金项目] 上海市浦东新区卫生健康委员会卫生科技项目(PW2020A-17)

[作者简介] 徐佳明, 硕士研究生, 主治医师, Email:gunroses1985@126.com

[通信作者] 郭建荣, 博士后, 主任医师, 研究方向: 围术期血液保护, 麻醉药理, Email:jianrguo@126.com

[Key words] UPLC-MS/MS; cisatracurium besylate; content determination; residual curarization

苯磺酸顺阿曲库铵为临床常用的中长效肌肉松弛药,苏醒期药物在体内的残留导致残余肌松的发生,成为导致麻醉后发生呼吸系统不良事件的主要原因,尤其是老年患者,术后残留会带来更严重的不良后果^[1],因此对老年患者手术后血浆中苯磺酸顺阿曲库铵的残留进行监测有重要意义。苯磺酸顺阿曲库铵易发生霍夫曼降解,温度和 pH 值的升高会加速降解^[2],因此,临床收集的血浆样本的稳定保存至关重要。本研究在既往文献报道的 HPLC 法及高效液相色谱-质谱(LC-MS)法^[3-6]基础上,开发了一种用灵敏、准确、高效的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定人血浆中苯磺酸顺阿曲库铵浓度的方法,有效避免了苯磺酸顺阿曲库铵的降解,对老年患者手术后血浆中苯磺酸顺阿曲库铵浓度随时间变化的规律进行研究,探讨自体血回输对患者体内苯磺酸顺阿曲库铵浓度的影响。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 UPLC 超高效液相色谱(安捷伦,美国); Agilent 6470 三重四极杆质谱,配备 AJS-ESI 喷射流电喷雾离子源(安捷伦,美国); SECURA125-1CN 型电子天平(赛多利斯,德国); Arium® mini 超纯水机(赛多利斯,德国)。

1.2 试剂

苯磺酸顺阿曲库铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号 101170-201902,纯度>98%);内标维库溴铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100813-201603,纯度>99%);甲酸、乙酸铵为色谱纯(麦克林,中国);乙腈为质谱纯(霍尼韦尔,美国);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 SHISEIDO(资生堂)ADME(3.0 mm×100 mm, 2.7 μm),柱温 35℃;流动相系统以含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 乙酸铵溶液为 A 相,以乙腈溶液为 B 相,等度洗脱, A : B=30 : 70(V/V),流速: 0.35 ml/min;进样量 2 μl,分析时间 3 min。

2.1.2 质谱条件

选择 AJS-ESI 离子源正离子模式,离子源参数

设置:雾化器压力 40 psi;干燥气流速 11 L/min;干燥气温度 350℃;鞘气流速 11 L/min;鞘气温度 350℃;毛细管电压 4 000 V。

多重反应监测(MRM)参数:苯磺酸顺阿曲库铵 464.3→358.2(*m/z*),碎片电压 135 V,碰撞能量 20 eV,保留时间为 2.05 min;维库溴铵(IS)557.4→356.3(*m/z*),碎片电压 135 V,碰撞能量 35 eV,保留时间为 1.86 min。

2.1.3 溶液配制

2.1.3.1 苯磺酸顺阿曲库铵标准溶液及质控溶液

取苯磺酸顺阿曲库铵对照品约 1.5 mg,精密称定,置于 2 ml 棕色称量瓶中,精密加入含 0.1% 甲酸的乙腈溶液溶解并涡旋混匀,配成浓度为 1.0 mg/ml 的储备液;取上述储备液适量,用含 0.1% 甲酸的乙腈溶液按比例逐级稀释,配成浓度为 400~100 000 ng/ml 的标准溶液,置于 4℃ 冰箱备用。

同法配制浓度为 800、40 000、80 000 ng/ml 的质控溶液,置于 4℃ 冰箱备用。

2.1.3.2 维库溴铵内标标准溶液

取维库溴铵对照品约 1.5 mg,精密称定,置于 2 ml 棕色称量瓶中,精密加入含 0.1% 甲酸的乙腈溶液溶解并涡旋混匀,配成浓度为 1.0 mg/ml 的内标储备液;取上述储备液用含 0.1% 甲酸的乙腈溶液稀释为 500 ng/ml 的内标标准溶液,置于 4℃ 冰箱备用。

2.1.3.3 模拟标准曲线样品及质控样品

精密吸取空白人血浆与不同浓度的苯磺酸顺阿曲库铵标准溶液,配制为浓度为 20、50、100、250、500、1 000、2 500、5 000 ng/ml 的苯磺酸顺阿曲库铵模拟标准曲线样品。同法配制浓度为 40、2 000、4 000 ng/ml 的质控样品。

2.1.3.4 血浆样品前处理

取血浆样品 50 μl,加入 50 μl 的维库溴铵内标标准溶液、400 μl 的含 0.1% 甲酸的乙腈溶液,涡旋 1 min, 13 000 r/min(5℃)离心 5 min,取上清液 100 μl 进样。

2.2 临床样本的采集

该临床试验经上海市浦东新区公利医院医学伦理委员会审批同意,批件号:(2020)临审第(018)号。选取老年脊柱手术患者给予咪达唑仑 0.05 mg/kg,丙泊酚 1.5 mg/kg、舒芬太尼 0.5 μg/kg、苯磺酸顺阿曲库铵 0.2 mg/kg 麻醉诱导;诱导后进行急性等容性血液稀释(ANH),采集总血容量的 10% 血液

冷藏保存于 ACD 储血袋中;术中丙泊酚 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、瑞芬太尼 0.1 ~ 0.2 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 、苯磺酸顺阿曲库铵 2.0 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 维持麻醉,于手术主要步骤完成后停止泵注苯磺酸顺阿曲库铵并回输采集的自体血液。收集麻醉诱导结束(T_1)、术毕(T_2)、术毕 0.5 h(T_3)、术毕 1 h(T_4)、回输时刻 ACD 血袋(LT)的血样各 5 ml,于 3 000 r/min 离心 5 min,分离得血浆,精密吸取 1 ml 血浆置于事先加入 100 μl 的 2% 甲酸水溶液的冻存管中,振摇 10 s 混合后,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3 方法验证结果

2.3.1 选择性

取空白人血浆样品、模拟血浆样品(苯磺酸顺阿曲库铵浓度为 5 000 ng/ml)以及手术中采集的人血浆样品,分别按“2.1.4”项下进行血浆样品前处理

后进样,获得相应的零点样品、模拟样品及人血浆样品的色谱图;空白人血浆样品处理时以含 0.1% 甲酸的乙腈溶液代替内标溶液,获得双空白样品的色谱图。结果表明该方法选择性良好,见图 1。

2.3.2 标准曲线与范围

以血浆中苯磺酸顺阿曲库铵浓度为 X ,苯磺酸顺阿曲库铵与维库溴铵的峰面积比值为 Y ,用 $1/X$ 权重求得回归方程: $Y=0.002\ 6\ X+0.010\ 9$, ($r=0.999\ 7$),表明在 20 ~ 5 000 ng/ml 范围内线性关系良好。

2.3.3 残留

通过在定量上限样品(浓度为 5 000 ng/ml)之后立即进样分析双空白样品来评估系统残留。结果显示双空白样品中苯磺酸顺阿曲库铵的峰面积不超过该分析批定量下限样品待测物峰面积的 20.0%,内标维库溴铵的峰面积不超过该分析批标

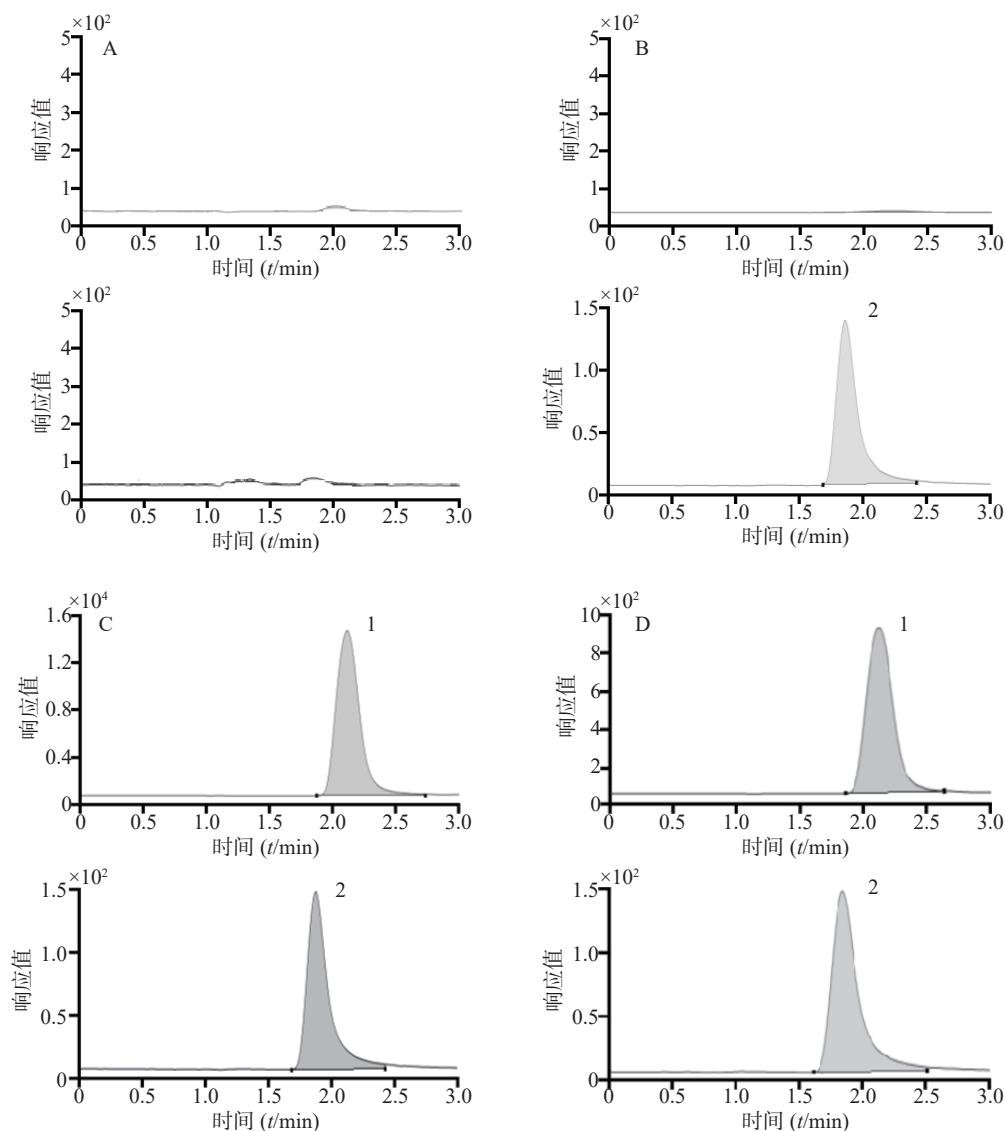


图 1 人血浆中苯磺酸顺阿曲库铵及内标维库溴铵典型色谱图

A. 双空白样品; B. 零点样品; C. 模拟样品; D. 人血浆样品; 1. 苯磺酸顺阿曲库铵; 2. 维库溴铵

准曲线内标最小峰面积的 5.0%, 表明该方法的残留效应不影响测定。

2.3.4 精密度和准确度

进样分析低、中、高 3 个浓度 (40、2 000、4 000 ng/ml) 的质控样品, 每个浓度平行操作 6 份, 连续分析 3 d, 计算批内、批间的精密度 (RSD) 及准确度 (RE), 结果表明批内和批间的 $RSD < 10\%$, $RE < \pm 10\%$, 见表 1。

表 1 苯磺酸顺阿曲库铵精密度和准确度考察结果

浓度 (ng/ml)	批内 (n=6)		批间 (n=18)	
	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)
40	3.10	1.34	7.66	-7.67
2 000	8.27	-5.98	5.23	-7.75
4 000	6.47	4.62	9.34	-5.17

2.3.5 基质效应和提取回收率

配制两种溶液, 其中苯磺酸顺阿曲库铵和维库溴铵的浓度均与低、中、高浓度质控样品处理后的浓度一致: ①将 6 个不同来源的空白人血浆按“2.3.1”项下处理为双空白样品后, 加入苯磺酸顺阿曲库铵和维库溴铵对照品溶液; ②配制两者的对照品溶液。分别记录两种溶液分析后苯磺酸顺阿曲库铵和维库溴铵的峰面积, 以峰面积的比值计算内标归一化的基质效应。

再配制 2 种溶液: ①将低、中、高 3 个浓度水平的质控样品按“2.1.4”项下处理; ②将单一来源的空白人血浆按“2.3.1”项下处理为双空白样品后, 加入苯磺酸顺阿曲库铵和维库溴铵对照品溶液, 使两者浓度均与低、中、高浓度质控样品处理后的浓度一致。分别记录两种溶液分析后苯磺酸顺阿曲库铵和维库溴铵的峰面积, 以峰面积的比值计算提取回收率。

结果表明, 低、中、高浓度的基质效应影响一致, RSD 为 5.81%, 基质效应和提取回收率的考察结果见表 2。

2.3.6 稳定性

将新鲜配制的苯磺酸顺阿曲库铵和维库溴铵

表 2 苯磺酸顺阿曲库铵基质效应和提取回收率考察结果

品名	浓度 (ng/ml)	内标归一化的基质效应 (%)	提取回收率 (%)
苯磺酸顺阿曲库铵	40	71.88	83.62
	2 000	77.67	83.40
	4 000	80.64	88.87
维库溴铵			125.91

的储备液 (浓度均为 1.0 mg/ml) 于 4 °C 冰箱中放置 28 d, 以峰面积的偏差考察其稳定性, 结果显示苯磺酸顺阿曲库铵峰面积的偏差为 -4.37%, 维库溴铵峰面积的偏差为 4.75%, 表明待测物和内标的储备液稳定性良好。再考察低、中、高 3 个浓度水平的质控样品 (浓度为 40、2 000、4 000 ng/ml), 室温下放置 3 h 后处理、处理后在自动进样器 (4 °C) 放置 24 h、反复冻融 3 次、-80 °C 冰箱中放置 30 d 的稳定性, 每个浓度平行操作 6 份, 结果见表 3。

2.4 检测方法在临床中的应用

研究纳入 8 名老年患者, 受试者 1~4 诱导后进行 ANH, 受试者 5~8 未进行 ANH。采用建立的方法测定临床采集的血浆样本的浓度, 结果见表 4。

3 讨论

既往文献报道的苯磺酸顺阿曲库铵血药浓度的检测方法主要有 HPLC 法及 LC-MS 法, 但往往需要经过真空离心浓缩或氮吹浓缩等较为复杂的样本前处理方法或经梯度洗脱而分析时间较长^[3-6]。本研究在此基础上, 开发了 UPLC-MS/MS 检测方法, 优化了前处理方法, 采用蛋白沉淀法, 操作简便, 基质效应和提取回收率满足方法学要求; 同时筛选了不同的流动相, 最终确定含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 乙酸钠溶液: 乙腈 (30:70, V/V) 等度洗脱, 使苯磺酸顺阿曲库铵的离子化程度达到最优, 方法验证结果显示该方法的精密度和准确度符合生物样本的分析要求。

苯磺酸顺阿曲库铵易发生霍夫曼降解而消除, 温度和 pH 值的升高会加速其降解^[2], 如不加入酸调节 pH 值, 即使在 -80 °C 的储存条件下, 其仍会

表 3 血浆样品稳定性考察结果

浓度 (ng/ml)	室温 (n=6)		进样器 (n=6)		冻融 (n=18)		长期 (n=6)	
	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)
40	6.23	7.30	6.75	-1.86	3.89	-2.19	2.23	8.24
2 000	1.38	0.33	2.57	-7.87	4.72	-8.99	3.62	-12.62
4 000	6.75	-2.25	2.40	-6.04	4.38	-10.96	3.48	-10.89

表 4 血浆样品中苯磺酸顺阿曲库铵的含量测定结果 (ng/ml)

时间点 (t/h)	受试者1	受试者2	受试者3	受试者4	受试者5	受试者6	受试者7	受试者8
T ₁	332.0	362.3	556.8	388.9	289.5	328.1	359.9	348.3
T ₂	228.4	190.9	363.6	205.9	65.71	180.3	170.1	158.5
T ₃	81.66	99.30	174.4	145.9	41.60	68.56	73.07	61.64
T ₄	50.11	58.34	125.9	84.42	24.72	35.21	40.14	34.22
LT	270.8	338.0	489.9	316.3				

很快降解。本研究中,经过对不同浓度甲酸溶液的考察,最终确定标准品的配制溶剂与蛋白沉淀剂均使用含 0.1% 甲酸的乙腈溶液、血浆样品的收集过程中加入含 2% 甲酸的水溶液,稳定性研究显示储备液可在 4 ℃ 稳定储存 28 d(RE=-4.37%),血浆样本可在-80 ℃ 稳定储存 30 d(低浓度 RE=8.24%,中浓度 RE=-12.62%,高浓度 RE=-10.89%),有效避免了苯磺酸顺阿曲库铵的降解。

残余肌松导致患者出现主观不适,导致低氧或高二氧化碳血症、咽部肌肉无力,严重的出现上呼吸道梗阻影响患者生命安全^[7]。国内一项多中心的纳入 1 571 例腹部手术患者的研究提示,术后肌松残余率高达 52.8%^[8],而国外一项使用新斯的明拮抗残余肌松的研究显示,拮抗后仍有 63.5% 的患者在拔除气管导管时存在残余肌松^[9]。ANH 常规在麻醉诱导后采集稀释血液,所以其中含有一定量的麻醉药物,本研究中亦检测到离体自体血在回输时刻血袋内含有较高浓度的苯磺酸顺阿曲库铵。回输采集自体血后,患者体内苯磺酸顺阿曲库铵浓度较未进行 ANH 自体血回输的患者浓度下降缓慢,存在残余肌松的风险。尹磊等^[10]研究亦显示,针对老年患者在术毕回输 ANH 采集自体血存在肌松恢复延迟的现象。因此,针对 ANH 回输自体血的患者,有必要监测苯磺酸顺阿曲库铵的血浆药物浓度,避免围术期不良事件发生。而本研究建立的检测方法有效、稳定,可以用于临床监测苯磺酸顺阿曲库铵的浓度。

【参考文献】

[1] RAVAL A D, ANUPINDI V R, FERRUFINO C P, et al. Epidemiology and outcomes of residual neuromuscular blockade: a

systematic review of observational studies[J]. *J Clin Anesth*, 2020, 66: 109962.
[2] LIM J, COX J, NGUYEN T, et al. Cisatracurium dosing in a patient with hyperthermia[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2019, 76(14): 1029-1032.
[3] GUO J R, YUAN X H, ZHOU X F, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium in patients undergoing surgery with two hemodilution methods[J]. *J Clin Anesth*, 2017, 38: 75-80.
[4] SAYER H, QUINTELA O, MARQUET P, et al. Identification and quantitation of six non-depolarizing neuromuscular blocking agents by LC-MS in biological fluids[J]. *J Anal Toxicol*, 2004, 28(2): 105-110.
[5] AYAD M M, BELAL F, HOSNEY M M, et al. Simultaneous HPLC determination of cisatracurium and propofol in human plasma via fluorometric detection[J]. *J Chromatogr Sci*, 2018, 56(6): 524-530.
[6] 辛博, 万丽丽, 王婧, 等. 用 LC-MS 法测定人血浆中顺式阿曲库铵的浓度[J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(2): 148-151.
[7] BRONSERT M R, HENDERSON W G, MONK T G, et al. Intermediate-acting nondepolarizing neuromuscular blocking agents and risk of postoperative 30-day morbidity and mortality, and long-term survival[J]. *Anesth Analg*, 2017, 124(5): 1476-1483.
[8] YU B W, OUYANG B Y, GE S J, et al. Incidence of postoperative residual neuromuscular blockade after general anesthesia: a prospective, multicenter, anesthetist-blind, observational study[J]. *Curr Med Res Opin*, 2016, 32(1): 1-9.
[9] FORTIER L P, MCKEEN D, TURNER K, et al. The RECITE study: a Canadian prospective, multicenter study of the incidence and severity of residual neuromuscular blockade[J]. *Anesth Analg*, 2015, 121(2): 366-372.
[10] 尹磊, 徐佳明, 吴敬医, 等. 急性等容血液稀释自体血回输对老年骨科手术患者脑电双谱指数与肌松效应的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(10): 1153-1158.

【收稿日期】 2022-06-07 【修回日期】 2022-10-12
【本文编辑】 李睿旻

(上接第 167 页)

[37] KIM B, PARK B. Saffron carotenoids inhibit STAT3 activation and promote apoptotic progression in IL-6-stimulated liver cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4): 1883-1891.
[38] FARAHI A, ABEDINI M R, JAVDANI H, et al. Crocin and

Metformin suppress metastatic breast cancer progression via VEGF and MMP9 downregulations: in vitro and in vivo studies[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(9): 3341-3351.

【收稿日期】 2022-06-15 【修回日期】 2022-10-28
【本文编辑】 李春德