

测定生物样品中的丙泊酚

应用简报

法医毒理学

作者

Joe Crifasi
圣路易斯大学
法医毒理学实验室
美国密苏里州圣路易斯

Ron Honnold
安捷伦科技有限公司
美国加利福尼亚州圣克拉拉

Robert Kubas
安捷伦科技有限公司
美国伊利诺伊州伍德戴尔

摘要

使用电子轰击-串联质谱 (EI-MS/MS) 在 Agilent 220 四极杆离子阱上开发了一种方法，可对生物样品中的丙泊酚进行鉴定和定量。在 0.1-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作范围内显示了对丙泊酚的方法线性。在丙泊酚的分析中，气相色谱四极杆离子阱串联质谱在减少样品基质干扰、改善信噪比以及兼具高选择性和灵敏性方面表现出了超乎预料的优点。

前言

丙泊酚是一种镇静性催眠麻醉剂，常用于诱导全身麻醉。诱导麻醉的典型剂量约为 2-2.5 mg/kg，而维持麻醉则需要约 0.2 mg/kg/h 的输注。

本应用简报描述了血清、全血、玻璃体液、尿液或组织匀浆的分析方法。分析中样品的最少需要量为 1.0 mL。

将生物样品碱化至碱性 pH 值，用庚烷萃取，然后对丙泊酚进行分离。



Agilent Technologies

实验部分

标准品和试剂

试剂 — 庚烷和氢氧化铵 — 试剂级。

标准品 — 丙泊酚 (P-076 1 mg/mL) 和丙泊酚 d-17 (P-077 100 mcg/mL) 内标物购自Cerilliant。

丙泊酚储备 QC 标准品 — (1 g - MP Biomedical) 用于制备溶于甲醇的 1 mg/mL 的工作 QC 标准品。

碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液 — pH = 9.8 (将 100 g 碳酸钠和 50 g 碳酸氢钠混合于 1000 mL 去离子水中。通过逐滴加入 5 N 的 NaOH 或 10% 磷酸将 pH 调至 9.8)。

随后制备工作标准品:

丙泊酚 — 10 µg/mL (在容量瓶中用甲醇将 0.1 mL 的 Cerilliant 储备液稀释至 10 mL)。

丙泊酚 d-17 — 10 µg/mL (在容量瓶中用甲醇将 1.0 mL 的 Cerilliant 储备液稀释至 10 mL)。

丙泊酚工作 QC 标准品 — 10 µg/mL (在容量瓶中用甲醇将 0.1 mL 的 MP Biomedical 工作 QC 储备液稀释至 10 mL)。

在 2-8 °C 下储存所有标准品, 稳定期为 2 年。

对照和校准标准品

阴性对照 — 来自美国红十字会的的海血, 使用生理盐水 (0.9%) 按 1:2 稀释, 储存于 -20 °C 下, 可稳定 1 年。

低对照 — (0.25 µg/mL) 在 16 × 100 mm 螺口盖培养管内将 25 µL 工作丙泊酚 QC 标准品 (10 µg/mL) 加至 975 µL 的空白血液中。

高对照 1 — (0.75 µg/mL) 在 16 × 100 mm 螺口盖培养管内将 75 µL 工作丙泊酚 QC 标准品 (10 µg/mL) 加至 925 µL 的空白血液中。

高对照 2 — (1.5 µg/mL) 在 16 × 100 mm 螺口盖培养管内将 150 µL 工作丙泊酚 QC 标准品 (10 µg/mL) 加至 850 µL 的空白血液中。

样品制备

1. 使用如下在 16 × 100 mm 培养管中的工作标准品和不含药的血液制作校准曲线:
 - 0.1 µg/mL-10 µL 标准品和 990 µL 血液
 - 0.2 µg/mL-20 µL 标准品和 980 µL 血液
 - 0.5 µg/mL-50 µL 标准品和 950 µL 血液
 - 1.0 µg/mL-100 µL 标准品和 900 µL 血液
 - 2.0 µg/mL-200 µL 标准品和 800 µL 血液
2. 将 1 mL 样品、阴性和阳性对照移取到带标记的 16 × 100 mm 螺口盖培养管内。
3. 向各管内加入 100 µL 工作内标物。
4. 加入 2 mL pH 11.0 的缓冲液。加入 0.5 mL 庚烷。
5. 加盖, 涡旋 (约 15 s)。
6. 旋转 15 min, 然后在 3,000 rpm 下离心至少 10 min。
7. 将约 200 µL 的庚烷层转移入具有 300 µL 内插管的 ALS 瓶内。
8. 压合瓶盖, 转至气相质谱进行分析。

气相质谱离子阱分析

色谱柱	Agilent DB-5ms 超高惰性或同等 25 m × 200 mm, 0.33 µm 色谱柱
进样体积	2 µL
进样模式	不分流
进样口温度	250 °C
载气	氮气
柱流速	1.3 mL/min
柱箱程序	70 °C, 保持 1 min 以 25 °C/min 的速率升至 310 °C, 保持 4.4 min

四极杆离子阱质谱条件

调谐	自动调谐
采集	EI-MS/MS Scan 60–180 da
溶剂延迟	5.0 min
质谱温度	离子阱温度 150 °C, 多路连接管温度 50 °C, 传输线温度 310 °C

化合物	保留时间 (min)	母离子	定量离子	确认离子	激发电压	灯丝	倍增器	靶标
丙泊酚	5.944	163	121	107/135	0.31 V	50 μ A	+50 V	3,000
丙泊酚 d-17	6.007	177	129	113/145	0.37 V	50 μ A	+50 V	3,000

结果与讨论

下列标准用于确定丙泊酚是否存在以及其含量。

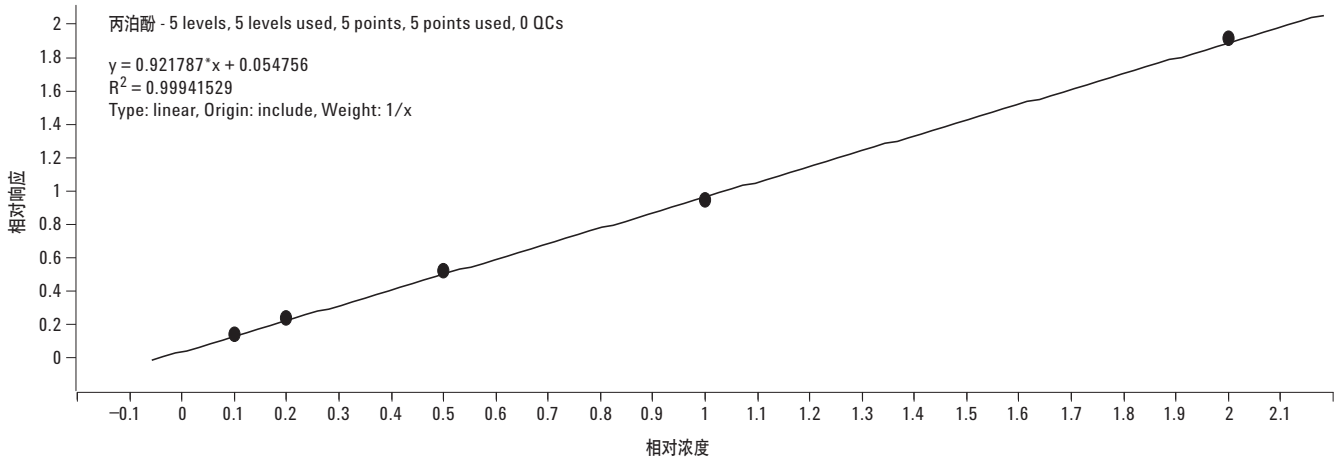
- 色谱分析结果可被接受（峰分辨率、峰对称性、不存在交叉污染）。
- 存在可用来定量和定性的选择性离子。
- 离子比例处于校准确定的靶标值的 20% 以内。
- 来自测试标本的假定丙泊酚的保留时间大约在最近一次校准保留时间的 $\pm 2\%$ 以内。

方法限

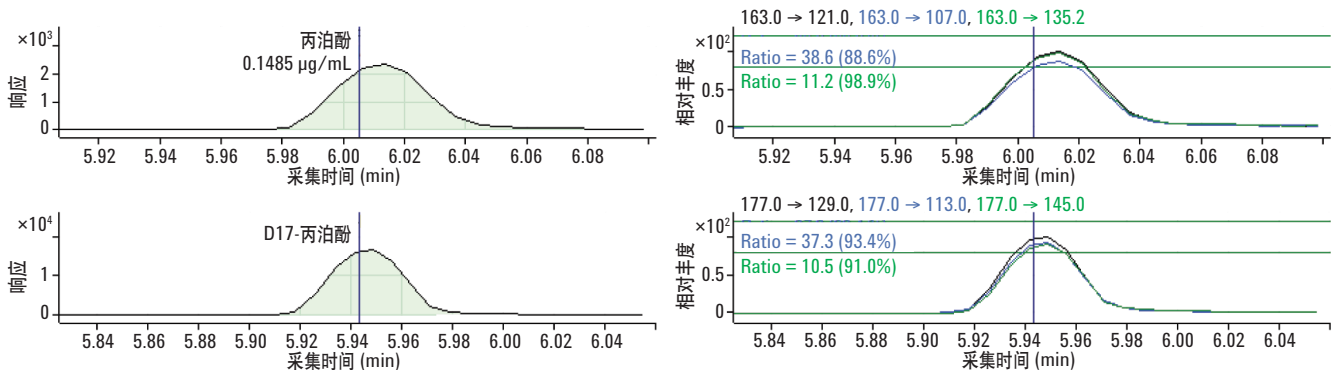
使用丙泊酚和内标物定量离子的面积进行定量分析。通过比较未知物和对照物的相对响应，并比较各校准物浓度的相对响应而产生的校准曲线来实现定量。阳性对照必须处于其靶标范围内，阴性对照中不能有丙泊酚的存在。

线性	0.1–2.0 μ g/mL
检测限 (LOD)	0.05 μ g/mL
定量限 (LOQ)	0.10 μ g/mL
交叉污染	在 2.0 μ g/mL 的浓度测量值后未见交叉污染
干扰物	未发现

丙泊酚校准



低标准品 0.1 μ g/mL



批分析结果

Sample						Propofol ...	Propofol Results						Qualifier ...	Qualifier ...	D17-Propofol (L...	Qualifier ...	Qualifier ...						
①	▼	Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Exp. Conc.	RT	Resp.	MI	Calc. Conc.	Final Conc.	Accuracy	Ratio	MI	Ratio	MI	RT	Resp.	Ratio	MI	Ratio	MI
		.10STD	.10STD 2-10-2012 1-24-12 PM.SMS.D	Cal	1	2/10/2012 11:24 AM	0.1000	6.014	5033		0.1485	0.1485	148.5	38.6		11.2		5.949	34101	37.3		10.5	
		.20STD	.20STD 2-10-2012 1-46-03 PM.SMS.D	Cal	2	2/10/2012 11:46 AM	0.2000	6.013	6423		0.2396	0.2396	119.8	43.4		12.4		5.941	26970	38.5		11.1	
		.50STD	.50STD 2-10-2012 2-07-51 PM.SMS.D	Cal	3	2/10/2012 12:07 PM	0.5000	6.012	13168		0.5274	0.5274	105.5	46.8		11.1		5.941	25124	39.7		11.0	
		1.0STD	1.0STD 2-10-2012 2-29-51 PM.SMS.D	Cal	4	2/10/2012 12:29 PM	1.0000	6.005	24141		0.9533	0.9533	95.3	45.0		11.7		5.941	25480	40.0		11.8	
		2.0STD	2.0STD 2-10-2012 2-51-46 PM.SMS.D	Cal	5	2/10/2012 12:51 PM	2.0000	6.005	45371		1.9312	1.9312	96.6	42.5		10.5		5.941	23640	44.2		13.5	
		NEG	NEG 2-10-2012 3-13-40 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 1:13 PM												5.941	21533	45.7		12.8	
		LOWQC	LOWQC 2-10-2012 3-35-34 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 1:35 PM		6.006	6433		0.2861	0.2861		48.5		12.4		5.941	22624	37.5		11.5	
		HIGH1QC	HIGH1QC 2-10-2012 3-57-28 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 1:57 PM		6.005	18310		0.8419	0.8419		42.7		11.2		5.941	21884	38.2		13.3	
		HIGH2QC	HIGH2QC 2-10-2012 4-19-26 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 2:19 PM		6.004	41553		1.7810	1.7810		42.3		10.4		5.941	23476	37.6		12.0	
		BLANK	BLANK 2-10-2012 4-41-22 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 2:41 PM																	
	▼	663AM	663AM 2-10-2012 5-03-22 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 3:03 PM		6.014	1460		0.0594	0.0594		46.8		11.3		5.941	24752	33.1		10.4	
	▼	663PM	663PM 2-10-2012 5-25-20 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 3:25 PM		6.004	74428		3.3371	3.3371		42.8		11.6		5.941	22442	38.8		12.4	
		BLANK	BLANK 2-10-2012 6-09-23 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 4:09 PM																	
	▼	0.05STD	0.05STD 2-10-2012 6-31-19 PM.SMS.D	Sample		2/10/2012 4:31 PM		6.006	1455		0.0721	0.0721		40.7		13.3		5.941	20290	38.2		13.0	

注意异常值及低于校准值的标签。

结论

本应用简报展示了一种使用丙泊酚 d-17 作为内标物测定生物样品中丙泊酚的灵敏且稳定的选择性方法。对于丙泊酚的分析，气相色谱四极杆离子阱串联质谱的优势不可低估。气相色谱四极杆离子阱串联质谱在减少样品基质干扰、改善信噪比以及兼具高选择性和灵敏性方面，为丙泊酚的分析提供了可信赖度更高的解决方案。气相色谱四极杆离子阱串联质谱分析能够减少假阳性和假阴性，还能在所得的结果中实现更高的可信赖度。使用上文所列的优化方法，可将快速、靶向的气相色谱-串联质谱方法用于解决当前法医实验室所面临的丙泊酚分析难题。联合使用三种阳性对照与阴性对照可确保在未知生物样品中进行精确定量并排除假阴性。在多种样品基质中均观察到了低至 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的检测限。

参考文献

- Baselt, R.C., Cravey, R.H., Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in MAN, 7th Edition, pages 949-951.
- Hikiji, W., Kudo, K., Usumoto, Y., Tsuji, A., Ikeda, N., A Simple and Sensitive Method for the Determination of Propofol in Human Solid Tissues by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Journal of Analytical Toxicology, Vol. 34, September 2010.

致谢

感谢圣路易斯大学法医毒理学实验室为本研究提供数据。

更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

©安捷伦科技（中国）有限公司，2012
中国印制
2012年12月7日
5991-1608CHCN



Agilent Technologies