

高效液相色谱法在静脉麻醉药血药浓度测定中的应用

吕扬 综述 李恩有 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院,黑龙江 哈尔滨 150001)

【摘要】 高效液相色谱法(HPLC)是一种常用的测定血药浓度的方法,它具有灵敏度高、选择性好、定量准确等优点。HPLC法测定静脉非阿片类麻醉药(丙泊酚、咪达唑仑、依托咪酯等)、静脉阿片类麻醉药(吗啡、芬太尼、舒芬太尼等)和麻醉中的其他常用药物(顺式阿曲库铵、利多卡因等)血药浓度的结果显示,其具有较高的回收率、日内及日间精密度,适用临床血药浓度测定。

【关键词】 高效液相色谱法;静脉麻醉药;血药浓度

【中图分类号】 R614 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)11-1571-04

Application of high-performance liquid chromatography in the determination of blood concentration of intravenous anesthetics. LV Yang, LI En-you. The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, CHINA

【Abstract】 High-performance liquid chromatography (HPLC) is a commonly used method for the determination of plasma drug concentrations, which has the advantages of high sensitivity, good selectivity and accurate quantification. Determination by HPLC of the plasma concentration of intravenous non-opioid anesthetics (propofol, midazolam, etomidate, etc.), intravenous opioid anesthetics (morphine, fentanyl, sufentanil, etc.) and other commonly used drugs in anesthesia (cisatracurium, lidocaine, etc.) shows that it has a high recovery rate, intra-day and inter-day accuracy, and can be used for clinical plasma drug concentration determination.

【Key words】 High-performance liquid chromatography (HPLC); Intravenous anesthetics; Plasma drug concentration

静脉麻醉药的可控性问题一直是麻醉界的重要研究课题。麻醉药用量过多将导致循环、呼吸的抑制^[1],用药量不足将引起显著的应激反应、内分泌紊乱、代谢异常,并会增加术中知晓的风险^[2-3],因此,麻醉医师的经验、麻醉药物浓度监测技术和完善的药代动力学理论的结合才能够掌握患者的麻醉深度,合理化静脉麻醉药用量。

分光光度法、气象色谱法、高效液相色谱法和免疫学方法是目前常用的血药浓度测定方法。高效液相色谱法(HPLC)是20世纪60年代末期引入的一种分析方法,如今已经广泛应用于药物分析研究^[4]。早在1981年,Adam等^[5]就应用高效液相色谱法分析血中丙泊酚的浓度,现将高效液相色谱法在静脉麻醉药物浓度测定中的应用进展综述如下:

1 静脉非阿片类麻醉药

1.1 丙泊酚 丙泊酚是目前最常用的静脉麻醉药,由于其起效快、作用消失快等特点,广泛应用于临床麻醉。然而,丙泊酚也有许多缺点和不足,其用量过多或不足均会带来严重后果^[6],且进入人体后,其药代动力学受性别、体质量、年龄、合并用药等多种因素的影响^[7]。因此,监测丙泊酚血药浓度具有重要临床意义。李莉等^[8]应用C18色谱柱,以乙腈/甲醇混合液[乙腈—甲醇 80:20(V/V)]—水(加1%的三氟乙酸,使pH=4)为流动相,进行二元梯度洗脱,0~7 min (50:50,

V/V), 7~9 min (50:50~70:30, V/V), 9~22 min (70:30, V/V), 流速为1.0 mL/min,检测波长为274 nm;柱温为40℃。结果显示丙泊酚的血药浓度在0.098~25 mg/L时线性关系良好($r=0.9998$),定量限为0.098 mg/L,方法回收率在85%~115%,日内、日间RSD均<10%。这是文献中首次应用梯度洗脱法测定丙泊酚的血药浓度,内标峰和丙泊酚峰的保留时间合理,峰形好,取得了良好的分离效果。

关于丙泊酚浓度测定技术文献中有较多报道,传统的测定方法如HPLC法、LC-MS法、GC-MS法等^[9-10],以及近年来新兴的呼出气丙泊酚分析技术,如选择性离子流动管-MS、质子迁移反应-MS、离子迁移谱IMS法等^[11-12]。与HPLC法相比,LC-MS法^[9]综合了色谱法和质谱法的优势,然而该方法的检测成本较高;GC-MS法^[10]具有成本低、可检测痕量物质、分辨率高等优点,但是该方法预处理过程复杂,常影响结果的准确性,使得测定结果重现性差;新兴的呼出气丙泊酚浓度检测技术,虽然可以反映丙泊酚的血药浓度,但目前标准的丙泊酚测定方法仍在探索之中。HPLC法作为丙泊酚浓度测定的经典技术,具有回收率高、灵敏性强、重现性好等优点,应用最为广泛。

1.2 苯二氮卓类 苯二氮卓类药物是一类广泛应用的镇静催眠药,由于该类药物的特殊性,其治疗量与中毒量相接近,过量使用将导致严重的后果^[13],因此,

测定其血药浓度是安全应用该类药物的重要保障。地西洋(DZP)、咪达唑仑(MID)是最常用的苯二氮卓类药物。陈德志等^[14]建立同时测定MID、DZP血药浓度的反相HPLC法。以RP18为色谱柱,甲醇-磷酸盐缓冲液(55:45, V/V, pH=2.15)为流动相,流速0.9 mL/min,检测波长为230 nm,柱温26℃。结果显示DZP、MID质量浓度均在20~4 000 ng/mL与峰面积呈良好线性关系($r \geq 0.999 6$),最低检测浓度DZP为10 ng/mL, MID为20 ng/mL,回收率为98.2%~103.9%,日内及日间RSD均<5%,表明该法适用于两种药物的临床血药浓度监测。

1.3 依托咪酯 作为非巴比妥类静脉麻醉药的依托咪酯,具有起效快、作用时间短、呼吸循环抑制作用小等优点。相关研究发现,应用该药可抑制皮质醇的合成^[15]。张海峰等^[16]建立的测定依托咪酯血药浓度的HPLC法,色谱柱为Agilent TC-C18柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(75:25),流速为1.0 mL/min,检测波长为241 nm。结果显示依托咪酯浓度线性范围为0.25~5.00 μg/mL($r=0.998 7$),方法回收率为98.6%~101.3%,提取回收率为72.6%~74.6%,日内及日间RSD均<5%。文献检索发现,血浆中依托咪酯含量的测定方以高效液相色谱法为主^[17-18],与相关文献对比可见,张海峰等^[16]建立的HPLC法,室温下即可完成检测,流动相配置简单,样品出峰时间快,检测灵敏度高,专属性及重现性良好,可以达到临床测定血药浓度的要求。

1.4 其他 作为α-2肾上腺素受体激动剂的右美托咪定,具有镇痛、可唤醒的镇静和抗焦虑作用,已被广泛应用于消除谵妄、机械通气、减轻交感兴奋及炎症反应等诸多临床实践中^[19],该药血药浓度的测定方法大多采用液-质联用(LC-MS)法^[20-21],此类方法能检测的最低浓度为5 ng/L,样品前处理方法有液液萃取法^[21]和固相萃取法^[20]等。

2 静脉阿片类麻醉药

2.1 天然生物碱 吗啡为阿片类生物碱,由于该药品治疗窗口窄,测定其血药浓度并分析其药代动力学特点尤为重要^[22]。丁信园等^[23]建立的测定人血浆中吗啡浓度的HPLC法,使用Waters Spherisorb C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液-0.002 5 mol/L庚烷硫磺酸钠水溶液-乙腈(5:5:2),流速为0.5 mL/min,紫外检测波长为220 nm。结果显示人血浆中吗啡浓度在1.0~100 μg/mL范围内线性关系良好($r=0.999 4$),最低检测限为0.3 μg/mL,回收率96.51%~113.71%,日内RSD为2.27%~4.96%,日间RSD为3.18%~7.64%。在测定吗啡血药浓度的相关文献^[24-25]中,采用有机溶剂萃取法,从生物样本中萃取吗啡,其涉及多次的容器转移,影响方法回收率和重复性。丁信园等^[23]建立的测定吗啡血药浓度的HPLC法,优化了样品处理过程,采用高氯酸直接沉淀

生物样品中的蛋白,样品处理过程简便、快速,然而在该条件下,吗啡的出峰时间较长,尚不能完成吗啡血药浓度的快速测定,该方法有待进一步优化。

2.2 合成的麻醉性镇痛药

2.2.1 芬太尼 芬太尼为阿片受体激动剂,属于强效麻醉性镇痛药,为了更好的理解其药代动力学,伦新强等^[26]建立了测定芬太尼血药浓度的高效液相色谱法,以正己烷-乙醇(20:1)为提取溶剂;采用Hypersil ODS-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,溶剂A(甲醇:乙腈:冰醋酸=400:P200:0.6)-溶剂B[0.2%无水硫酸钠的醋酸铵溶液(1.5→100)]=68:32为流动相(pH=6.5),流速为1.0 mL/min,柱温为室温,紫外检测波长为220 nm。结果显示芬太尼的血浆浓度在0.476~19.048 μg/L范围内线性关系良好($r=0.999 9$),方法回收率为100.0%~114.7%,日内、日间精密密度均小于2%,表明该方法准确度和灵敏度高,且该方法能够测定血浆中微量的芬太尼,最低定量限为0.476 μg/L,适用于临床芬太尼微量血药浓度检测及药代动力学的研究。

2.2.2 舒芬太尼 舒芬太尼是一种高选择性阿片类受体激动药,镇痛效能强、作用时间长,广泛应用于临床麻醉。谢瑞祥等^[27]建立HPLC法测定人血清中的舒芬太尼浓度,应用Symmetry C18分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)及预柱,流动相:乙腈-0.02 mol/L醋酸铵-盐酸(pH 4.3)(45:55),流速:1 mL/min;检测波长:230 nm;柱温为室温。结果显示舒芬太尼血药浓度在0.025~4.000 μg/mL范围内线性关系良好($r=0.999 9$);日内、日间RSD分别为3.49%~4.51%、4.67%~5.99%,平均回收率为101.92%~107.04%。近年来,有文献报道,使用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血中舒芬太尼血药浓度^[28],与高效液相色谱法相比,ELISA法具有检测限更低、操作简单易行、检测条件要求低和检测耗时短等优点,将来可能会成为舒芬太尼血药浓度测定的主要方法。

2.2.3 瑞芬太尼 瑞芬太尼是一种超短效、血浆非特异性酯酶代谢的阿片类药物,具有停止输注后半衰期短、无蓄积的特点,且起效迅速、镇痛效果好、作用持续时间短。唐丽琴等^[29]建立高效液相色谱法测定围术期患儿血浆中瑞芬太尼浓度,应用Hypersil CN柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.02 mol/L磷酸二氢钾溶液(30:70),含三乙胺0.02%,流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm。结果显示瑞芬太尼血药浓度在1.0~100.0 μg/L范围内线性关系良好($r=0.999 3$)。最低检测浓度为1.0 μg/L,方法回收率为99.66%~102.40%。日内和日间RSD均小于15%。关于瑞芬太尼靶控输注系统在成人中应用的安全性有较多报道,而对于小儿应用靶控输注系统,其临床性能有待进一步验证,唐丽琴等^[29]建立的测定小儿瑞芬太尼血药浓度的高效液相色谱法,专属性强、灵敏度高,适用于小儿血药浓度测定。

3 麻醉中的其他常用药

3.1 肌肉松弛剂 顺式阿曲库铵是常用的中时效非去极化肌松药,为监测术后不同时间患者体内顺式阿曲库铵的浓度,沈芊等^[30]建立了HPLC-荧光法测定人血清中顺式阿曲库铵的浓度。以Kromasil 100-5 C18为色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:1.0%三氟乙酸-乙腈(58:42);流速:0.8 mL/min;柱温:常温;荧光检测波长:280 nm (激发波长, Ex), 320 nm (发射波长, Em)。结果显示,顺式阿曲库铵血药浓度在15.625~2 000 ng/mL范围内线性关系良好($r=0.999\ 3$),平均方法回收率为98.58%~101.23%,日内、日间RSD均小于10%,该方法灵敏度高、重现性好、结果可靠,可以满足血药浓度监测的需求。

随着肌松药物的广泛应用,人们对于肌松状态有了更高层次的要求。只有通过监测肌松状态,合理调整肌松药物剂量,准确把握肌松恢复情况,才能实现个体化神经肌肉阻滞。目前应用最广泛的检测手段是肌松监测仪,然而,各种监测仪普遍存在基线不稳、电磁干扰、连接复杂等弊端^[31]。通过沈芊等^[30]的研究发现,高效液相色谱法可以准确的测定顺式阿曲库铵的血药浓度,在完善的药代动力学理论的支持下,高效液相色谱法将来会成为肌松监测中的一柄利剑。

3.2 局麻药利多卡因 研究表明,利多卡因能抑制炎症反应、减少术中麻醉药用量、缓解术后疼痛、加快胃肠功能恢复,以及缩短患者住院时间^[32]。Bhusal等^[33]建立HPLC法测定血浆利多卡因血药浓度,采用Kinetex C18 ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以磷酸二氢钾-乙腈(74:26)为流动相,流速1.0 mL/min,紫外检测波长为230 nm。结果显示,利多卡因血药浓度在1.60~50.0 μg/mL范围内线性关系良好($r=0.998$),平均方法回收率为91.1%~101%,定量限为0.40 μg/mL,检测限为0.025 μg/mL,日内、日间RSD均<6.70%。该方法回收率高,适用于临床血药浓度监测。

4 结 语

只有在测定静脉麻醉药体内药物浓度的基础上,才能更好地理解药物的药代动力学,进而实现个体化用药。高效液相色谱法是目前临床上最常用的血药浓度测定方法,然而,此方法对样品的前期处理要求较高^[34]。随后采用的液质联用技术(LC-MS/MS),同时具备了质谱的高选择性、高敏感性以及色谱的高分离能力,拓宽了液相色谱的应用范围^[35]。因此,高效液相色谱法会越来越普及,越来越多的应用于药物浓度测定。

参 考 文 献

[1] Dahan A, Aarts L, Smith TW. Incidence, reversal, and prevention of opioid induced respiratory depression [J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(1): 226.
[2] Avidan MS, Jacobsohn E, Glick D, et al. Prevention of intraoperative awareness in a high-risk surgical population [J]. *New England Journal of Medicine*, 2011, 365(7): 591.
[3] Whitlock EL, Rodebaugh TL, Hassett AL, et al. Psychological sequel-

ae of surgery in a prospective cohort of patients from three intraoperative awareness prevention trials [J]. *Anesthesia & Analgesia*, 2015, 120(1): 87-95.

- [4] 汪建龙. 高效液相色谱法在中药分析中的应用进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(16): 2072-2074.
[5] Adam HK, Douglas EJ, Plummer GF, et al. Estimation of ICI 35, 868 (Diprivan R) in blood by high-performance liquid chromatography, following coupling with Gibbs' reagent [J]. *J Chromatogr*, 1981, 223(1): 232-237.
[6] Gold MI, Abraham EC, Herrington C. A controlled investigation of propofol, thiopentone and methohexitone [J]. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 1987, 34(5): 478-483.
[7] Absalom AR, Mani V, De Smet T, et al. Pharmacokinetic models for propofol defining and illuminating the devil in the detail [J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2009, 103(1): 26.
[8] 李莉, 李培. 反相高效液相梯度洗脱法测定人血浆中丙泊酚浓度[J]. *安徽医药*, 2015, 19(4): 669-672.
[9] Alvarez JC, Abe E, Etting I, et al. Quantification of remifentanyl and propofol in human plasma: a LC-MS/MS assay validated according to the EMA guideline [J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(13): 1675-1684.
[10] 郑宏, 曹兴华, 王江, 等. 气相色谱-质谱法测定异丙酚的血药浓度[J]. *中华麻醉学杂志*, 2004, 24(1): 71-72.
[11] Kamysek S, Fuchs P, Schwoebel H, et al. Drug detection in breath: effects of pulmonary blood flow and cardiac output on propofol exhalation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(7): 2093-2102.
[12] Boshier PR, Cushnir JR, Mistry V, et al. On-line, real time monitoring of exhaled trace gases by SIFT-MS in the perioperative setting: a feasibility study [J]. *Analyst*, 2011, 136(16): 3233-3237.
[13] Steentoft A, Linnet K. Blood concentrations of clonazepam and 7-aminoclonazepam in forensic cases in Denmark for the period 2002-2007 [J]. *Forensic Sci Int*, 2009, 184(1-3): 74-79.
[14] 陈德志, 陈巧辉, 陈翠萌, 等. 反相高效液相色谱法同时测定3种抗癫痫药物的血药浓度[J]. *中国药业*, 2014, 23(1): 7-8.
[15] Wagner RL, White PF. Etomidate inhibits adrenocortical function in surgical patients [J]. *Anesthesiology*, 1984, 61(6): 647.
[16] 张海峰, 马爱玲, 王漪檬, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中依托咪酯的浓度[J]. *中国医药科学*, 2015, 5(3): 54-56.
[17] McIntosh MP, Rajewski RA. A simple and efficient high performance liquid chromatographic assay for etomidate in plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24(4): 689-694.
[18] 阎克里, 朱秀卿, 赵丽, 等. HPLC法测定人血浆中依托咪酯的浓度[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(6): 1125-1128.
[19] 张晓琴. 右美托咪啶临床应用的研究进展[J]. *医学综述*, 2011, 17(24): 3789-3790.
[20] Lee JI, Su F, Shi H, et al. Sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation of dexmedetomidine in pediatric plasma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 852(1/2): 195.
[21] Li W, Zhang Z, Wu L, et al. Determination of dexmedetomidine in human plasma using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection: application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(5): 897.
[22] 王森, 李琦, 陈运芳. 吗啡自控镇痛泵治疗24例重度癌痛疗效观察[J]. *医药论坛杂志*, 2012, 33(10): 116-117.
[23] 丁信园, 金星, 陈芳, 等. 人血浆中吗啡血药浓度的测定[J]. *抗感染学*, 2015, 12(3): 342-344.
[24] 陈利琴, 康学军, 李琦, 等. RP-HPLC法测定人全血中吗啡血药浓度[J]. *药物分析杂志*, 2006, 10: 1426-1429.

年龄相关性黄斑变性流行病学研究进展

李之忠

(天津海滨人民医院眼科,天津 300280)

【摘要】 年龄相关性黄斑变性在临床中属于一种与年龄相关的致盲性退行性眼底病变,随着人们老龄化的加剧,黄斑变性的发病率呈现逐年增长的趋势。现阶段年龄相关性黄斑变性发病机制尚未完全明确,主要认为与炎症免疫反应及氧化应激等因素相关,临床中主要针对患者实施药物治疗、激光光凝治疗、光动力治疗、放射治疗、经瞳孔温热治疗、中医治疗、剥离体腔注射拮抗剂、黄斑下手术等方式。本文主要针对年龄相关性变性患者的具体情况及引起流行病学因素进行了相应的分析。

【关键词】 年龄相关性;黄斑变性流行病学;研究;进展

【中图分类号】 R774.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2018)11—1574—03

Progress in epidemiologic study of age-related macular degeneration. LI Zhi-zhong. Department of Ophthalmology, Tianjin Haibin People's Hospital, Tianjin 300280, CHINA

【Abstract】 Age-related macular degeneration (AMD) is a kind of age-related blindness degenerative fundus lesions in clinic. As the aging of the population intensified, the incidence of macular degeneration is increasing year by year. At present, the pathogenesis of AMD is not fully clear, and it is reported that it may be related to inflammatory immune response and oxidative stress. Clinical treatments mainly include drug therapy, laser photocoagulation operation, radiation therapy, the pupil warm treatments, Chinese medicine treatment, intravitreal injection of antagonist, submacular surgery. This paper mainly presents the specific situation of patients with AMD and progress in the epidemiological studies.

【Key words】 Age-related; Epidemiology of macular degeneration; Research; Progress

年龄相关性黄斑变性主要是指老年性黄斑变性,主要表现为黄斑区结构的衰老性变化,视网膜色素上皮细胞对视细胞外节盘膜吞噬消化功能出现下降^[1],使得未完全消化的盘膜残留小体滞留于基底部的细胞原浆中,并呈现向细胞外排出现象,最终形成玻璃膜疣;由于黄斑部结构与功能的特殊性,使得改变更加明显,玻璃膜疣主要常见于视力正常的老年人,但由此继发的病理改变后会导致黄斑部变性现象的出现导致脉络膜毛细血管通过破裂的Bruch膜进入RPE下及视网膜神经上皮,形成脉络膜新生血管,

由于血管壁结构的异常特征极易出现出血及渗漏现象,导致病理变化^[2]。

1 年龄相关性黄斑变性流行病学的危险因素

1.1 个体原因 相关报道显示,年龄相关性黄斑变性流行病学最主要的危险因素是年龄,年龄越大的黄斑变性患者死亡率越高,且年龄相关性黄斑变性疾病发生具有种族方面的差异,亚洲人与白人的发病率大致相同,其次是黑种人,而黑种人进展为渗出性年龄相关性黄斑变性的发病率较高。虞思伊等^[3]在研究中指出年龄属于影响年龄相关性黄斑变性疾病的最

通讯作者:李之忠。E-mail:13516279927@139.com

- *****
- [25] 黄洪勇, 职晓燕, 张瑞岭, 等. 简便快速测定人体血浆中吗啡含量的RP-HPLC法[J]. 重庆医学, 2012, 41(23): 2392-2393.
- [26] 伦新强, 梁健成. 高效液相色谱法测定芬太尼的血药浓度[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(9): 820-821.
- [27] 谢瑞祥, 范芳, 张莲莲, 等. RP-HPLC法测定人血清中舒芬太尼的浓度[J]. 中国药房, 2012, 23(6): 528-529.
- [28] 王宗杰, 黄卫彤, 廖旺. 酶联免疫吸附法检测血清舒芬太尼血药浓度的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2013(16): 2100-2101.
- [29] 唐丽琴, 张善堂, 胡利国, 等. HPLC法测定围手术期患儿血浆中瑞芬太尼浓度[J]. 中国药师, 2012, 15(7): 990-992.
- [30] 沈芊, 吕鲜艳, 元华龙. HPLC-荧光法测定人血清中顺式阿曲库胺的浓度[J]. 中国药房, 2014, 25(42): 3983-3984.
- [31] 侯桂婷, 金孝炬. 肌松监测研究进展[J]. 牡丹江医学院学报, 2016,

37(2): 114-116.

- [32] Kranke P, Jokinen J, Pace N L, et al. Continuous intravenous perioperative lidocaine infusion for postoperative pain and recovery [J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2015, 7(7): CD009642.
- [33] Bhusal P, Sharma M, Harrison J, et al. Development, validation and application of a stability indicating HPLC method to quantify lidocaine from polyethylene-co-vinyl acetate (EVA) matrices and biological fluids [J]. Journal of Chromatographic Science, 2017, 55 (8): 1-7.
- [34] 范玲, 于栋伟. 高效液相色谱法在血药浓度监测中的应用进展[J]. 山东医药, 2015, 32: 100-102.
- [35] 姜艳彬, 单吉浩, 王莹, 等. LC-MS/MS技术在药物代谢研究中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 385-391.

(收稿日期:2017-09-08)