



## 全氟丙烷人血白蛋白微球注射剂中全氟丙烷气体含量测定

全氟丙烷(OFP)人血白蛋白微球注射剂是第三代超声造影剂,以白蛋白为包膜,内包裹OFP气体,采用超声-冻干干燥法制成的含气微球冻干制剂。OFP人血白蛋白微球注射剂通过外周静脉注射,能通过肺循环,使左心腔及外周血管显影[1]。该造影剂改用气体作为内包裹材料,共振气体散射声波的能效较固体或液体强上千倍。当声波通过组织器官时,其反射回的信号能被超声扫描仪捕捉,适当使用超声造影剂能增强这些信号,以达到明确诊断的目的[2]。OFP气体是该制剂的核心,国外有采用气相色谱(GC)方法测定其含量[3],本研究首次建立了气相色谱-质谱(GC-MS)在选择离子检测(SIM)方式下测定OFP的含量,可作为质控方法,并为药代动力学研究提供了检测方法学。

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器

安捷伦5973N型气相色谱-质谱检测器(Agilent公司),采气袋(500 ml或1 L,大连光明气体化工技术中心)。

#### 1.2 药品与试剂

OFP人血白蛋白微球注射剂(南方医院,批号20030403,20030512),平均粒径:( $3.2 \pm 0.5$ ) $\mu\text{m}$ (P20030403)和( $2.9 \pm 0.6$ ) $\mu\text{m}$ (P20030512),微球平均浓度( $16.4 \pm 0.6$ ) $\times 10^8$ 个/ml(P20030403)和( $17.2 \pm 0.4$ ) $\times 10^8$ 个/ml(P20030512);OFP标准气体(天津核工业理化工程研究院,批号20021209);高纯氮气(广州气体厂有限公司,批号20020603)。

#### 1.3 色谱条件

1.3.1 气相色谱条件 色谱柱为HP-VOC(60 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 1.8  $\mu\text{m}$ );载气为氦气;柱流量恒定为1.2 ml/min;柱升温程序为:始温35  $^{\circ}\text{C}$ ,保持5 min,然后以15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温速率升至230  $^{\circ}\text{C}$ ,保持5 min。

1.3.2 质谱条件 EI电离源,倍增电压1 600 V,选择离子: $m/z$ (质荷比)69、169。

#### 1.4 样品的处理

精密吸取OFP人血白蛋白微球注射剂2 ml,注入装有500 ml高纯氮气的采气袋内,水浴(37  $^{\circ}\text{C}$ )加热24 h,以使微球破裂完全释放OFP气体。精密抽取上述气体50  $\mu\text{l}$ 进样分析。

### 2 结果

#### 2.1 方法专属性

分别取空白气体(高纯氮气)、一定浓度的OFP气体以及OFP人血白蛋白微球注射剂样品加入空白气体中,按样品处理项下操作,分别得到总离子流色谱(图1),结果表明微球注射剂中其他物质不干扰OFP的测定。

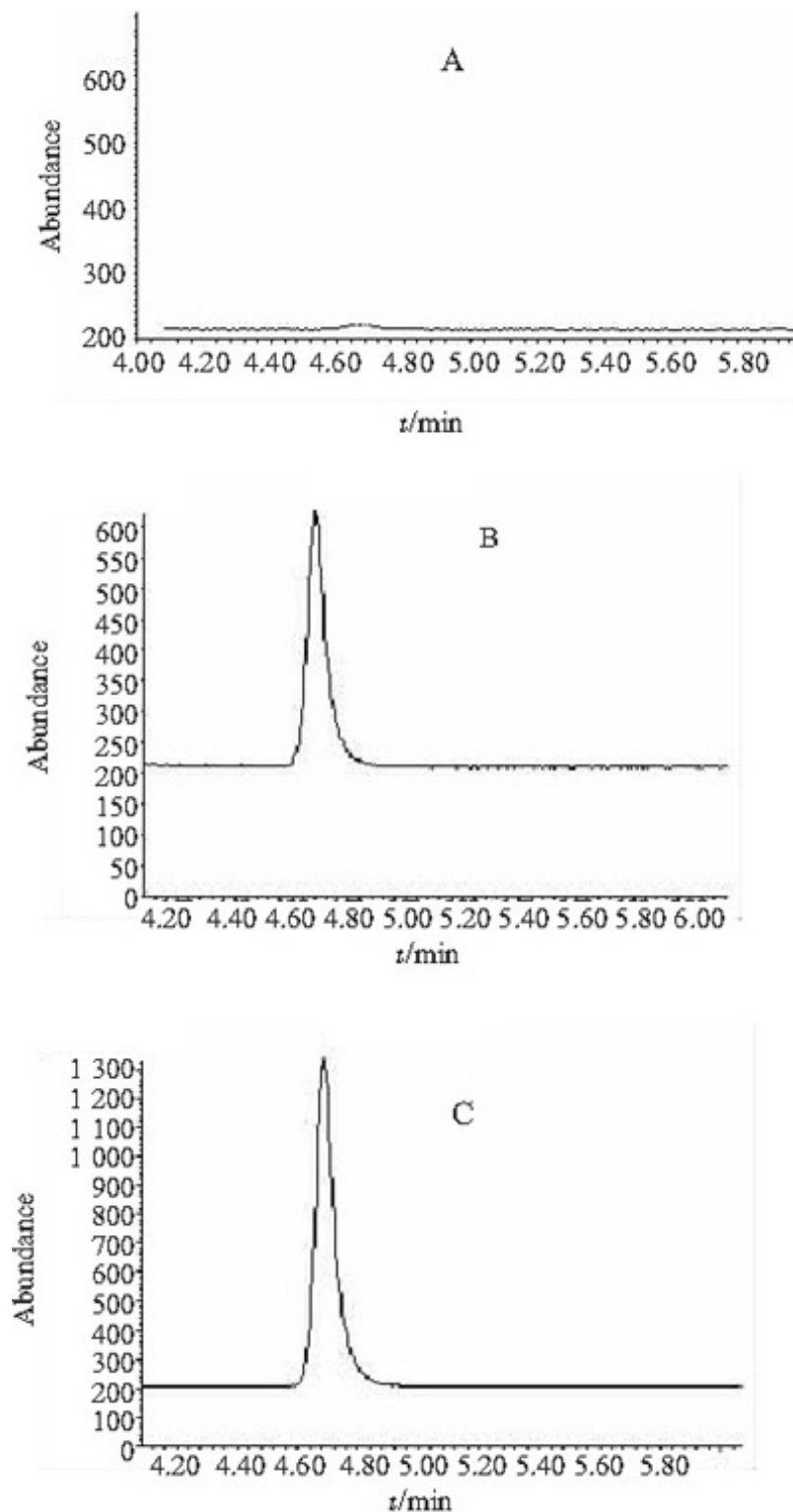


图1 OFP总离子流色谱图

Fig.1 Total ion chromatograms

A: Blank; B: Blank spiked with 204 nmol/L OFP; C: Sample of human albumin microspheres loaded with OFP

## 2.2 标准曲线和线性范围

标准曲线的制备：于各采气袋中分别准确注入空白气体高纯氮气1000 ml，再依次用气密性进样针准确加入OFP标准气体0、0.5、1、5、10、20、100、300、400  $\mu\text{l}$ 配制成0、20.5、40.9、205、409、818、4090、12 270、16 360 nmol/L标准浓度气体，准确进样50  $\mu\text{l}$ 进行分析。以选择离子m/z 169作为定量离子，对OFP峰面积与浓度进行线性回归，线性范围为40.92~16 368 nmol/L，标准曲线方程为  $Y=51.13X+40.38$ ， $R^2=0.999 9$ ，其方法检测限为8.18 nmol/L。

### 2.3 回收率和精密度实验

于3个采气袋中分别准确注入高纯氮气1000 ml, 按标准曲线项下配制方法, 分别配制204、2046、8184 nmol/L的OFP质控气体。按样本处理与测定项下操作, 于同一天内进样5次; 另取上述气体, 同法操作, 连续测定5 d, 结果见表1。

表 1 气体样本回收率和精密度测定

Tab.1 Recovery and accuracy of the method for rate determination of OFP in the gas sample ( $n=5$ )

Concentration (nmol/L)	Recovery (RSD%)	Accuracy (RSD%)	
		Intra-day	Inter-day
204	(100.98±1.4)%	0.6%	0.86%
2046	(102.63±2.29)%	1.67%	1.75%
8184	(97.5±2.2)%	2.0%	2.3%

### 2.4 样品的稳定性

按样品处理项下处理的气体样品, 常温常压下保存, 分别于0~7 d进行测定, 结果表明气体样本可稳定保存7 d, 能满足实验要求。

## 3 讨论

OFP气体是OFP人血白蛋白微球注射剂的核心, 与以往的超声造影剂中内包裹气体相比, 具有惰性更大、分子量较大、不易扩散、半衰期长和受动脉压影响较小等优点[4][5][6][7]; OFP气体含量是影响显影效果的重要因素, 因此也是该制剂质量控制的关键指标。

GC-MS/SIM法测定OFP气体含量, 具有准确、灵敏、稳定和特异性强的特点。试验犬呼出的气体成分十分复杂, 而采用质谱检测器检测OFP的特征离子峰, 测定中基本未受到外源性物质的干扰, 因而该方法的专属性强[8]。采用GC-MS/SIM法测定OFP的浓度, 目前在国内外尚无报道。国外有学者采用气相色谱法测定OFP浓度, 该方法的进样量为200  $\mu$ l, 最低检测限(信噪比大于3)为40.9 nmol/L, 标准曲线范围为204~14315 nmol/L[9]; 而GC-MS/SIM法的进样量为50  $\mu$ l, 方法检测限为8.18 nmol/L, 标准曲线范围为40.92~16368 nmol/L, 后者在进样量仅为前者1/4的情况下, 灵敏度比前者高近5倍, 标准曲线范围也更宽, 显然GC-MS/SIM法更灵敏、便捷, 覆盖的浓度范围也更广。

GC-MS/SIM法有效地克服了制剂中OFP的含量较低(120~430  $\mu$ g/ml)且波动范围较宽给检测带来的困难, 同时也为药代动力学研究奠定了分析方法学的基础。GC-MS/SIM法简便、易行, 样本无需做特殊处理, 可直接进样。我们曾采用将气体浓缩后进样的方法, 但该方法需要的样本量大(60 ml), 检测时间长, 每个样本需45 min, 且耗费成本高; 采用GC-MS/SIM法, 进样量仅为50  $\mu$ l, 每个样本的分析时间为15 min, 且色谱柱易清洗, 减少了交叉污染的机会, 既节约了成本也提高了工作效率, 同时也是检测大样本量的一个可行的方法。

致谢: 感谢中国科学院广州地球化学研究所王新明研究员的帮助。

### 参考文献:

[1]Herman B, Eninav S, Vered Z. Feasibility of mitral flow assessment by echo-contrast ultrasound, part I. Determination of the properier of echo-contrast agents[J]. Ultrasound Med Biol, 2000, 26(5): 787-95.

[2]Harvey CJ, Pilcher JM, Eckersley RJ, et al. Advances in ultrasound[J]. Clin Radiol,

2002, 57(1): 157-77.

[3]Anne LK, Paige MM, Paul AZ, et al. Tissue distribution of 125I-labeled albumin in rats, and whole blood and exhaled elimination kinetics of octafluoropropane in anesthetized canines following intravenous administration of OPTISON(FS069)[J]. Int J Toxicol, 1999, 18(1): 49-63.

[4]Richard CW, Kwan OL, Michael H, et al. Initial safety and myocardial perfusion imaging results with AI-700: a new ultrasound contrast agent[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2001, 14(5): 457.

[5]王方, 孙勇, 张哲. 小包装OFP气体动力学研究[J]. 上海医学, 1997, 20(4): 212-4.

[6]Clark LN, Dittrich HC. Cardiac image using Optison[J]. Am J Cardiol, 2000, 86(4A): 14G-18G.

[7]Olszowska W, Hlawaty M, Kostkiewicz M, et al. Role of contrast echocardiography in the improvement of left ventricular endocardial border visualization[J]. Acta Cardiol, 2002, 57(1): 60-1.

[8]Correas JM, Meuter AR, Singlas E, et al. Human pharmacokinetics of a perfluorocarbon ultrasound contrast agent evaluated with gas chromatography[J]. Ultrasound Med Biol, 2001, 27(4): 565-70.

[9]Denis R, Schwieger I, Laurent H, et al. Human pharmacokinetics and safety evaluation of SonoVue, a new contrast agent for ultrasound imaging[J]. Invest Radiol, 2000, 35(1): 80.