

## LC-MS 法测定大鼠血浆中 EXH-1626 的浓度

李泰平<sup>1</sup>, 肖红<sup>2\*</sup>, 向华<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属友谊整形外科医院, 江苏南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学附属脑科医院研究所, 江苏南京 210029; <sup>3</sup>中国药科大学药物化学教研室, 江苏南京 210009)

**[摘要]** 目的: 建立测定大鼠血浆中 EXH-1626 浓度的液相色谱-质谱(LC-MS)方法。方法: 大鼠血浆样品中加入内标卡马西平, 经蛋白沉淀剂(甲醇:5%硫酸锌溶液 = 70:30, V/V)沉淀血浆蛋白后取上清液 5  $\mu$ l 进行 LC-MS 测定。色谱条件: 色谱柱为汉邦 ODS C<sub>18</sub> 柱(5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm), 流动相为乙腈:10 mmol/L 醋酸铵水溶液(用乙酸调 pH 至 3)70:30, 流速为 0.6 ml/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C; 质谱条件: 采用电喷雾离子化(ESI)方式, 以选择性离子监测(SIM)方式检测, EXH-1626 和内标选择检测离子的质荷比( $m/z$ )分别为 453.3([M+H]<sup>+</sup>)和 274.3([M+H]<sup>+</sup>)。结果: 大鼠血浆中 EXH-1626 在 5~10 000 ng/ml 内线性关系良好( $r = 0.9997$ ), 最低定量限(LOQ)为 5 ng/ml, 由低到高(10、100、1 000 和 10 000 ng/ml)4 个浓度的日内和日间精密度 RSD 均 < 10%, 绝对回收率均 > 70%, 相对回收率 90%~110%。结论: 该方法快速、准确, 灵敏度高, 操作简便, 适用于 EXH-1626 血药浓度测定及其非临床药代动力学研究。

**[关键词]** EXH-1626; LC-MS 法; 血药浓度

**[中图分类号]** R969.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)01-118-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140129

## Determination of EXH-1626 concentration in rat plasma by LC-MS

Li Taiping<sup>1</sup>, Xiao Hong<sup>2\*</sup>, Xiang Hua<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>The Affiliated Friendship Plastic Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Institute of Neuropsychiatry of NJMU Affiliated Brain Hospital, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a LC-MS method for the determination of EXH-1626 in rat plasma. **Methods:** Using carbamazepine as internal standard (IS), plasma samples were deposited by blood precipitation reagent (methanol:5% zinc sulfate = 70:30, V/V) before sampling and determined by injecting 5  $\mu$ l supernatant to LC-MS system. Chromatographic condition: the analytes were separated on a Han Bang ODS C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm) analytical column with acetonitrile and 10 mmol/L ammonium acetate (using acetic acid to make pH = 3) (70:30) as the mobile phase. Analysis was performed at a flow rate of 0.6 ml/min and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. Mass spectrum determination was performed in electrospray ionization (ESI) mode and the selected ion monitoring (SIM) mode, EXH-1626 was monitored at  $m/z$  453.3 and internal standard at  $m/z$  274.3. **Results:** The linearity of EXH-1626 concentration curve was in a range of 5~1.0  $\times$  10<sup>4</sup> ng/ml,  $r = 0.9997$ , and the lowest limit of quantification (LOQ) was 5 ng/ml. The RSDs of inter-day and intra-day were less than 10%, absolute recoveries were greater than 70%, and relative recoveries were between 90% to 110%. **Conclusion:** The method is proved to be fast, precise, sensitive, convenient, and suitable for determination of concentration and non-clinical pharmacokinetic study of EXH-1626.

**[Key words]** EXH-1626; LC/MS; drug plasma concentration

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01): 118-123]

**[基金项目]** 科技部十二五“重大新药创制”科技重大专项课题(子课题)(2012ZX09103101-048)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xiaohong63xx@163.com

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 现阶段常用的治疗方法有手术治疗、放射治疗、内分泌治疗、化学药物治疗、免疫治疗和中医中药治疗, 其中抗雌激素疗法是雌激素受体(estrogen receptor, ER)

阳性乳腺癌内分泌治疗的重要手段之一,因其可降低激素敏感型乳腺癌患者的复发和转移风险而倍受重视。抗雌激素药物主要包括选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERMs)和纯抗雌激素药。SERMs 在不同的雌激素靶组织中,分别显示激动剂或拮抗剂活性,是当今乳腺癌临床内分泌治疗中最具代表性的一类药物。

EXH-1626 是中国药科大学药物化学教研室合成的一种 SERM,为新型 6-芳基茛并异喹啉酮衍生物,其分子式为  $C_{29}H_{28}N_2O_3$ ,药效学研究表明可以用于治疗乳腺癌。茛并异喹啉酮类化合物是美国国立癌症研究中心(NCI)通过 COMPARE 系统比较筛选而得到的一类新型拓扑异构酶 I 抑制剂,与喜树碱类化合物相比,茛并异喹啉酮类化合物没有内酯环,因而在体内表现出更好的化学稳定性<sup>[1]</sup>。关于 EXH-1626 在生物样品中的测定方法文献报道较少<sup>[2]</sup>,本研究旨在建立测定大鼠血浆中 EXH-1626 浓度的 LC-MS 法,为其非临床药物动力学研究提供方法学基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器和设备

Agilent 6410 型三重四级杆质谱联用仪与 1200 型液相色谱系统,均为美国 Agilent 公司产品,包括 ESI 离子化源、Mass Hunter B.03.01 (数据采集与定性)和 Mass Hunter B.04.00(数据分析)处理软件、Binary SL 四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器以及柱控温箱;TGL-16G 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);WH-3 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);GM-0.33 II 型隔膜真空泵(天津市腾达过滤器厂);BP 2215 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);KQ-3000Y 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

#### 1.1.2 药品与试剂

EXH-1626 盐酸盐标准品(由中国药科大学药物化学教研室提供,批号 20100927,纯度 99.2%);卡马西平(中国药品生物制品检定所,0142-9503);纯净水(杭州娃哈哈纯净水公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);蛋白沉淀剂(甲醇:5%硫酸锌 = 70:30, V/V),硫酸锌(汕头西陇化工股份有限公司,分析纯);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 色谱条件

色谱柱为 ODS  $C_{18}$  柱(150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m), 汉邦公司;流动相为乙腈-10 mmol/L 醋酸铵水溶液(乙酸调 pH 至 3)(70:30);流速:0.6 ml/min;柱温:30°C;自动进样量:5  $\mu$ l。

#### 1.2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源;检测方式为 SIM;干燥气温度为 350°C;干燥气流速为 10 L/min;毛细管电压 4 000 V;雾化器压力为 40 psi;扫描时间为 20 ms;定量分析的离子  $[M+H]^+$  质荷比(m/z)分别为 453.3 (EXH-1626),碰撞能 160 V,以及 274.3(内标),碰撞能 130 V(图 1)。

#### 1.2.3 标准溶液的配制

##### 1.2.3.1 EXH-1626 标准溶液的配制

精密称取 EXH-1626 标准品 25.0 mg,置 25 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,得 1.0 mg/ml 贮备液。精密吸取贮备液 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得 100.0  $\mu$ g/ml EXH-1626 标准溶液;同法,依次稀配成 100 000、50 000、10 000、5 000、1 000、500、200、100 和 50 ng/ml EXH-1626 标准溶液,4°C 保存备用。

##### 1.2.3.2 卡马西平内标溶液的配制

精密称取 5.8 mg 的卡马西平于 100 ml 容量瓶中,用流动相溶解并定容至刻度,即配制成 58 mg/ml 卡马西平储备液。取一定量的卡马西平储备液,用流动相稀释至 100  $\mu$ g/ml 作为内标溶液,4°C 保存备用。

#### 1.2.4 标准血样的制备

取离心管数支,分别精确加入不同量的 EXH-1626 标准液后以氮气流吹干,加入空白血浆 200  $\mu$ l,涡旋 1 min,配成血浆中含 EXH-1626 分别为 5、10、20、50、100、500、1 000、5 000 和 10 000 ng/ml 的标准系列浓度,同法依次配成血浆中含 EXH-1626 分别为 10、100、1 000 和 10 000 ng/ml 的由低到高浓度的质量控制(QC)血样。

#### 1.2.5 血浆样品的处理

精确量取大鼠血浆样品 200  $\mu$ l 于空白离心管中,精确加入 10  $\mu$ l 内标溶液(100  $\mu$ g/ml),涡旋混匀后再精确加入蛋白沉淀剂 200  $\mu$ l,涡旋 3 min,混匀后离心(12 000 r/min) 10 min,吸取上清液至分析小瓶中,进样 5  $\mu$ l 分析。

## 2 结果

### 2.1 方法的专属性

在本实验所采用的条件下,EXH-1626 和内标

的保留时间分别为 2.9 min 和 3.5 min 左右, EXH-1626 和内标峰形良好, 能有效分离, 无杂峰干扰测

定, 专属性良好, 血浆中内源性物质不干扰 EXH-1626 和内标的测定(图 2)。

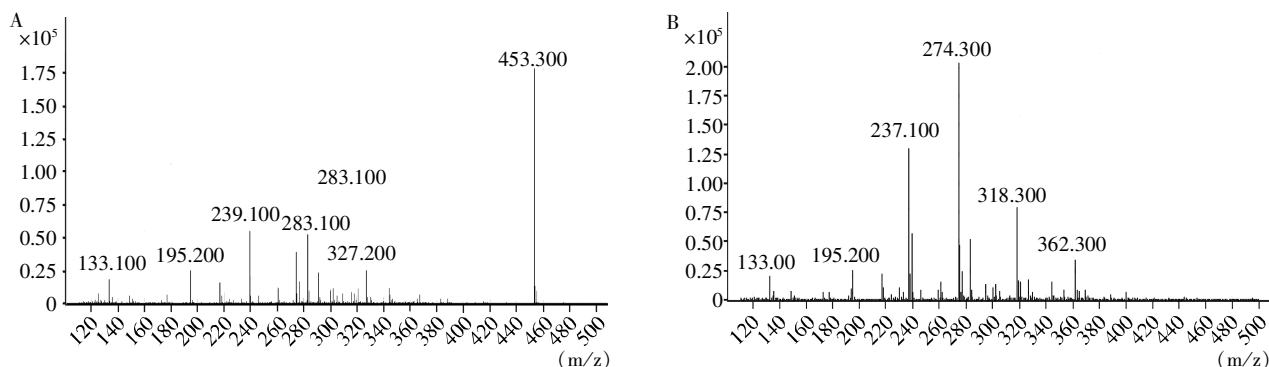
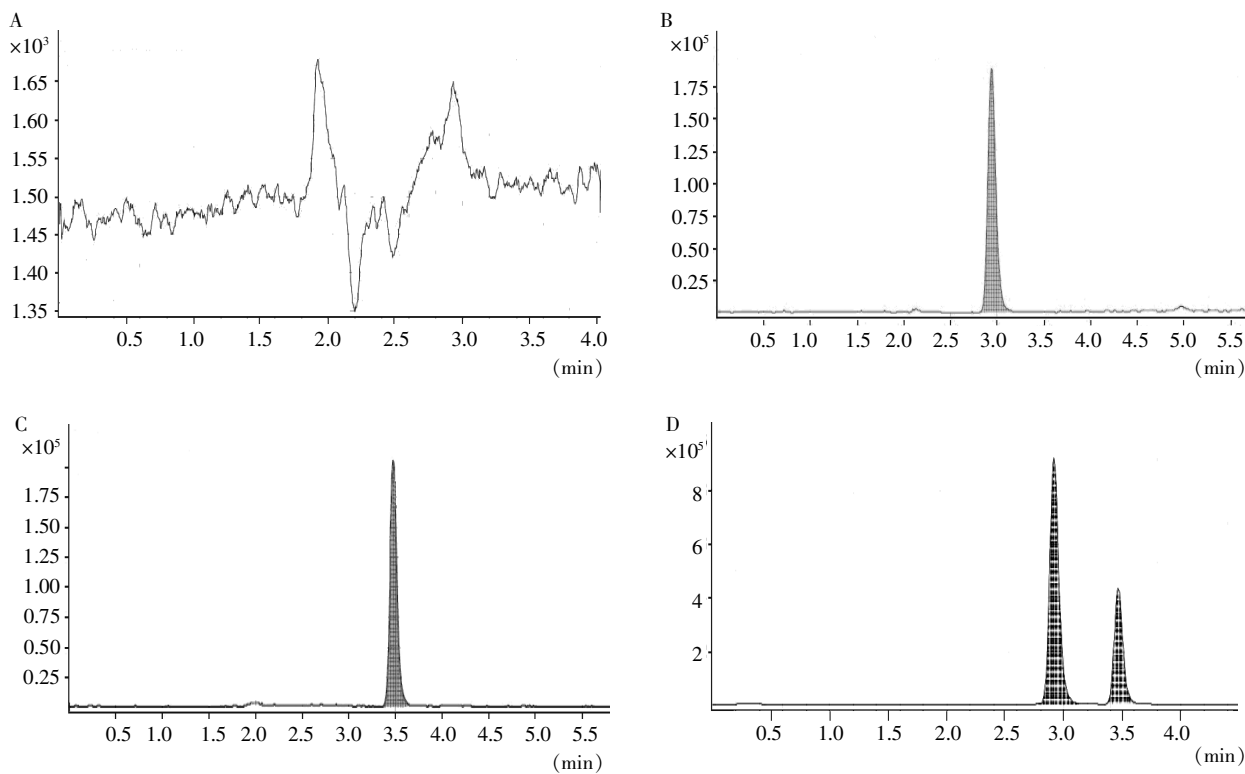


图 1 EXH-1626(A)及内标(B)的一级离子扫描质谱图

Figure 1 Product ion scan mass spectra of EXH-1626 (A) and the internal standard (B)



A: 空白血浆; B: 空白血浆+EXH-1626; C: 空白血浆 + 内标卡马西平; D: 空白血浆+EXH-1626+内标。

图 2 空白血浆、EXH-1626 及卡马西平的典型色谱图

Figure 2 HPLC chromatograms of blank plasma, EXH-1626 and carbamazepine in rat plasma

### 2.2 线性范围和定量限

按“1.2.4”操作配制系列血药浓度为 5、10、20、50、100、500、1 000、5 000 和 10 000 ng/ml 的样品, 按“1.2.5”操作, 进样分析, 建立 EXH-1626 的标准曲线。EXH-1626 浓度(ng/ml)为纵坐标, 以  $y$  表示, EXH-1626 峰面积( $A_s$ )与内标峰面积( $A_i$ )的比值( $A_s/A_i$ )为横坐标, 以  $x$  表示, 线性回归计算得回归方程为  $y = 101.13x - 34.55$  ( $r = 0.9997$ , 权重系数为

$1/c^2$ ), EXH-1626 血浆浓度在 5~10 000 ng/ml 范围内线性关系良好, 定量下限浓度为 5 ng/ml ( $S/N > 10$ )(图 3)。

### 2.3 精密度实验

以空白血浆配制由低到高 (10、100、1 000 和 10 000 ng/ml) 4 个不同浓度的 EXH-1626 QC 样品, 每一浓度 5 份样本, 连续测定 3 d, 并与标准曲线同时进行, 根据当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度,

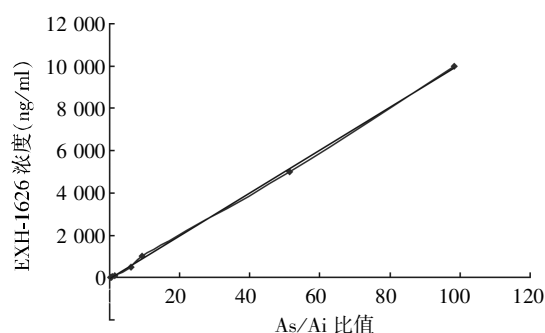


图 3 EXH-1626 大鼠血浆标准曲线

Figure 3 Standard curve of EXH-1626 in rat plasma

将 QC 样品的结果进行分析, 计算方法的精密度及 RSD(表 1)。结果表明该方法符合生物样品分析方法的要求。

#### 2.4 回收率实验

以空白血浆配制由低到高 (10、100、1 000 和 10 000 ng/ml)4 个不同质量浓度的 EXH-1626 QC 样品, 每一浓度各 5 份样本, 按“1.2.5”项下操作, 计算并记录 EXH-1626 与内标峰面积之比(a), 由相应

的标准曲线计算浓度, 该浓度与加入的浓度之比为相对回收率。同时以流动相代替空白血浆, 同样方法制备 4 个不同浓度(10、100、1 000 和 10 000 ng/ml)的 EXH-1626 标准溶液进样, 计算 EXH-1626 与内标峰面积之比 (b), 上述 a 与 b 比值即为绝对回收率。结果显示, 由低到高(10、100、1 000 和 10 000 ng/ml)4 个浓度的相对回收率 90%~110%, 绝对回收率均>70%(表 2), 表明该方法符合生物样品分析要求。

#### 2.5 稳定性实验

取离心管数支制备由低到高(10、100、1 000 和 10 000 ng/ml)4 个不同浓度的血浆样本各 5 份, 1 份制备好后立即进样分析; 1 份室温下放置 6 h; 1 份血样冰箱中 (4℃) 放置 12 h; 1 份于冰箱中 (-20℃) 冷冻保存 15 d 后取出化冻; 1 份在 1 个月内反复冻融 3 次, 然后同法操作。各浓度样本测定值的偏差均< 10%, 结果表明样品在上述条件下稳定性良好, 符合生物样品分析要求(表 3)。

表 1 大鼠血浆中 EXH-1626 的精密度

Table 1 The precision of EXH-1626 in rat plasma

(n = 5)

加入浓度(ng/ml)	日内精密度(ng/ml)	RSD(%)	日间精密度(ng/ml)	RSD(%)
10.0	11.0 ± 0.9	8.7	10.9 ± 0.8	7.4
100.0	106.5 ± 4.7	4.4	106.3 ± 4.4	4.1
1 000.0	1 034.4 ± 44.8	4.3	1 031.6 ± 40.9	4.0
10 000.0	10 056.5 ± 109.1	1.1	9 997.1 ± 135.6	1.4

表 2 大鼠血浆中 EXH-1626 的绝对回收率和相对回收率

Table 2 The absolute and relative recovery of EXH-1626

(n = 5)

加入浓度(ng/ml)	绝对回收率(%)	RSD(%)	相对回收率(%)	RSD(%)
10.0	72.5 ± 1.9	2.6	108.1 ± 7.8	7.2
100.0	76.3 ± 1.1	1.4	106.5 ± 4.7	4.4
1 000.0	78.4 ± 2.3	2.9	103.6 ± 4.9	4.7
10 000.0	76.6 ± 5.3	6.9	99.7 ± 1.4	1.4

表 3 测定大鼠血浆中 EXH-1626 浓度的平均值

Table 3 The average determination of the concentration of EXH-1626 in rat plasma

(ng/ml)

加入浓度(ng/ml)	立即测定	室温放置 6 h	冷藏放置 12 h	冷冻放置 15 d	反复冻融 3 次
10.0	10.3	9.6	11.1	11.6	10.4
100.0	109.2	102.5	108.3	109.4	101.2
1 000.0	1 004.8	996.7	927.9	1 007.2	988.7
10 000.0	9 912.7	9 856.9	9 978.4	10 003.7	9 677.4

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的选择

在流动相选择方面, 研究比较了甲醇、乙腈、醋酸和三乙胺水溶液的不同浓度、有机相与水相的不

同构成比及流动相的不同 pH 值对分析结果的影响, 选择乙腈-0.01 mol/L 醋酸铵水溶液(用乙酸调 pH 至 3)(70:30)为流动相, 在此条件下, 目标化合物峰形良好, 流动相中加入乙酸, 使化合物在柱子上保留较弱, 能较快洗脱出峰, 加入醋酸铵, 提高了质

子化效率,减少了基质抑制效应<sup>[3]</sup>。血浆内源性杂质均未干扰 EXH-1626 的测定,基线平稳,保留时间适宜。

### 3.2 质谱条件的选择

质谱条件采用 ESI 离子源显著减少了色谱峰的干扰,专属性及选择性均较高,定量限可达 5 ng/ml。SIM 检测方式下,EXH-1626 的响应良好,可以得到明显的质谱峰,EXH-1626 与内标在 ESI 离子化方式下主要生成  $[M+H]^+$  分子离子峰, $m/z$  分别为 453.3 和 274.3。在检测过程中发现, $m/z$  为 425.2 的  $[M+H]^+$  离子峰随着在大鼠体内 EXH-1626 血药浓度的降低而升高,初步定为 EXH-1626 的代谢产物,其分子量与主药相差 28,结合结构分析可能在体内代谢中失去一分子  $-CH_2CH_3$ ,转化为  $C_{27}H_{24}N_2O_3$  化合物,其色谱行为与主药极其相似,同时出峰,但其碰撞能为 135 V,与主药(碰撞能 160 V)不同,可以选择碰撞能量来加以区分。质谱条件选择 SIM 一级质谱工作模式主要为了能同时监测 EXH-1626 及其代谢物。由于缺乏该化合物的标准品,暂时无法对其进行定量分析。

### 3.3 内标的选择

合适的内标是生物样品分析的关键。选择内标物首先要满足以下四个方面的要求:①内标物应是该试样中不存在的纯物质;②它必须完全溶于试样中,并与试样中各组分的色谱峰能完全分离;③加入内标物的量应接近于被测组分;④色谱峰的位置应与被测组分的色谱峰的位置相近,或在几个被测组分色谱峰中间。内标法的优点是测定的结果较为准确,通过测量内标物及被测组分峰面积的相对值来进行计算,因而在一定程度上消除了操作条件等的变化所引起的误差,但缺点是操作程序较为麻烦,有时寻找合适的内标物也有困难。

本研究中 LC-MS 内标的选择既要考虑质谱的响应与待测物的匹配性,又要兼顾其不与 EXH-1626 药物及蛋白沉淀剂发生反应。实验中曾筛选了多个化合物,如甲硝唑、地西泮等,发现在本实验条件下由于保留时间较长或者干扰目标峰而放弃,选用卡马西平为内标,它不仅稳定性好,对待测物和沉淀剂稳定,与色谱柱亲和力适中,保留时间合适。

### 3.4 血样品的前处理

样品前处理主要有液液萃取、固液萃取和蛋白质沉淀 3 种方法,它们各有优缺点。本研究参照文献<sup>[4-10]</sup>采用蛋白沉淀剂进行血样处理。沉淀剂选择过程中发现使用高氯酸则酸性过强,对色谱柱损害

很大,文献<sup>[4-8]</sup>使用甲醇或乙腈作为沉淀剂,然而本实验使用甲醇、乙腈等作沉淀剂后发现不但蛋白沉淀率低、提取分离效果差,而且沉淀体积大,降低了灵敏度,但 Jain 等<sup>[4]</sup>将内标与沉淀剂混合处理血样的方法进一步减少了操作步骤,值得借鉴学习。Suh 等<sup>[10]</sup>应用硫酸锌和乙腈混合作为沉淀剂的方法已成功应用于人体血浆中的盐酸度洛西汀药代动力学的研究,与传统的液液萃取、固液萃取法相比该方法更方便快捷和环保。由于甲醇比乙腈便宜而且毒性更低,本文使用甲醇和 5%硫酸锌组成蛋白沉淀剂,两者体积比为 70:30,用此比例混合的沉淀剂直接沉淀血浆中的蛋白,不仅蛋白沉淀较完全,而且与主药及内标不发生反应,稀释体积也小(1:1, V/V)。沉淀离心蛋白后取上清液 5  $\mu$ l 自动进样分析,此法操作简便、快速,为 EXH-1626 浓度的测定提供了简便、可靠的方法。

### [参考文献]

- [1] 王天麟,向 华,徐晓莉,等. 新型 6-芳基茚并异喹啉酮衍生物的合成及抗肿瘤活性研究[J]. 中国药物化学杂志,2012,22(4):268
- [2] 李泰平,肖 红,向 华,等. RP-HPLC 法测定 EXH-1626 的浓度[J]. 中国药师,2011,14(4):5-6
- [3] 过 林,胡公允,余 慧,等. LC-MS/MS 测定人血浆米格列奈浓度及药代动力学研究 [J]. 中国新药杂志,2011,20(14):1308-1312
- [4] Jain L, Gardner ER, Venitz J, et al. Determination of PF-04928473 in human plasma using liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B. Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(30):3187-3192
- [5] Rower JE, Bushman LR, Hammond KP, et al. Validation of an LC/MS method for the determination of gemfibrozil in human plasma and its application to a pharmacokinetic study[J]. Biomed Chromatogr, 2010, 24(12):1300-1308
- [6] Nirogi R, Ajjala DR, Kandikere V, et al. LC-MS/MS method for the determination of pitolisant: application to rat pharmacokinetic and brain penetration studies [J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(11):1431-1437
- [7] Jin HE, Kim IB, Kim CK, et al. Determination of cefdinir levels in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics after oral and intravenous administration of cefdinir[J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(11):1423-1430
- [8] Gao S, Yang Z, Yin T, et al. Validated LC-MS/MS method for the determination of maackiain and its sulfate and glucuronide in blood: Application to pharmacokinetic and

- disposition studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55 (2): 288-293
- [9] Galuska CE, Hartmann MF, Sánchez-Guijo A, et al. Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) [J]. Analyst, 2013, 138 (13): 3792-3801
- [10] Suh JH, Lee YY, Lee HJ, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets followed by high performance liquid chromatography for the determination of duloxetine in human plasma [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 75: 214-219
- [收稿日期] 2013-07-15

## 参考文献的著录格式

### 1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨荣, 张浩, 等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110 (24): 9950-9955

### 2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何维. 医学免疫学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

### 3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况[M]//陆本瑞. 世界出版概况. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用 [C]//赵玮. 运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471

(本刊编辑: 接雅俐)