

UPLC-MS/MS 测定 beagle 犬内西罗莫司血药浓度

陈咏^{1,2}, 林晨³, 张晶⁴, 邱彬¹, 周欣⁴, 宋洪涛⁴ (1. 福州大学化学化工学院, 福建福州 350002; 2. 福建卫生职业技术学院, 福建福州 350101; 3. 福建省药品检验所, 福建福州 350025; 4. 南京军区福州总医院药学科, 福建福州 350025)

[摘要] 目的 建立测定 beagle 犬内西罗莫司(SRL)血药浓度的 UPLC-MS/MS 联用方法。方法 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 预柱为 C₁₈ 柱(4.0 mm × 3.0 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(90:10, v/v); 流速为 0.30 ml/min; 柱温为 50℃; 进样室温度为 4℃。离子源为 ESI 源; 正离子方式检测; 扫描方式为多反应监测(MRM); 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 936.6 → m/z 409.7(西罗莫司)和 m/z 826.6 → m/z 415.4(内标他克莫司)。取全血样品经液-液萃取后进样 20 μl。结果 SRL 在 0.50 ~ 12.00 ng/ml 浓度范围内呈良好的线性($r = 0.9997$), 定量下限 0.5 ng/ml, 日内、日间精密密度(RSD)均小于 15%, 方法回收率均大于 90%, 萃取回收率大于 76%。结论 本方法具有样品处理简单, 方法灵敏、快速、选择性强, 满足西罗莫司在 beagle 犬体内药物检测的要求。

[关键词] 西罗莫司; 超高效液相色谱-质谱联用; 血药浓度

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0353-04

Determination of sirolimus in whole blood of beagle dog by UPLC-MS/MS

CHEN Yong^{1,2}, LIN Chen³, ZHANG Jing⁴, QIU Bin¹, ZHOU Xin⁴, SONG Hong-tao⁴ (1. Chemistry and Chemical Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China; 2. Fujian Medical College, Fuzhou 350101, China; 3. Fujian institute for Drug Control, Fuzhou 350025, China; 4. Deptment of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To develop a UPLC-MS/MS method for the determination of sirolimus in whole blood of beagle dog. **Methods** Sirolimus and internal standard Tacrolimus were extracted from whole blood with liquid-liquid extraction, then separated on a Agilent C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) at the flow-rate of 0.30 ml/min. The mobile phase was Acetonitrile-water (90:10) and the column temperature was 50℃. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in the positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode with the transitions of m/z 936.6 → 409.7 and m/z 826.6 → 415.4 were used to quantify sirolimus and the internal standard, respectively. **Results** The calibration linea range of blood-Sirolimu concentrations was 0.50 ~ 12.00 ng/ml ($r = 0.9997$). The low limit of quantification was 0.50 ng/ml. The intra-and inter-day precisions (RSDs) were less than 15%. The method recoveries were more than 90%. The extraction recoveries were more than 76%. **Conclusions** The method was specific, sensitive, rapid and suitable for the pharmacokinetic study of sirolimus in whole blood of beagle dog.

[Key words] sirolimus; UPLC-MS/MS; whole blood

西罗莫司 (sirolimus, rapamycin, SRL) 是一种新型、强效的免疫抑制剂, 1999 年 10 月在美国首次上市, 用于预防器官移植患者的急性排斥反应^[1]。西罗莫司具有骨髓抑制和高血脂的不良反应, 文献^[2]表明西罗莫司谷浓度与其免疫抑制效价和药物副作用有关。因此本课题组将其制备成缓控释制剂, 以降低达峰浓度, 维持较为平稳的血药浓度, 使药物的有效性、安全性及适应性均有所提高。由于西罗莫司的生物利用度比较低, 个体差异大, 治疗指数窄^[1], 需要灵敏的检测方法, 所以本文拟建立 UP-

LC-MS/MS 的方法来测定西罗莫司在 beagle 犬全血中的药物浓度, 用于研究西罗莫司制剂在 beagle 犬体内的药动学特征, 为人体研究及临床合理用药提供参考。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂 西罗莫司对照品 (SRL, 含量 99.9%, 福建科瑞药业有限公司, 批号 070703); 他克莫司对照品 (tacrolimus, FK506, 含量 99.9%, 福建科瑞药业有限公司, 批号 080301); 乙腈、乙醚为色谱纯、水为高纯水。

1.2 仪器 Agilent 6410 高压液相色谱质谱仪 (包括 1200 系列 HPLC: G1312B 二元泵, G1379B 脱气机, G1367C 自动进样器; G1316A 柱温箱; G6410AA

[作者简介] 陈咏 (1975-), 女, 学士, 讲师。Tel: (0591) 22869830, 13509322094, E-mail: cy951@sina.com.

[通讯作者] 宋洪涛。Tel: (0591) 22859459, E-mail: sohoto@vip.sohu.com.

质谱仪:四极杆串接质谱仪,API-ES 电喷雾源, G1947B 大气压化学电离源,美国 Agilent 公司); TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);WH-1 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

1.3 试验动物 6 只健康 beagle 犬(南京军区福州总医院比较医学科实验动物中心,动物合格证号为 SCXK(川)2004-15),体重为 (12.4 ± 2.16) kg,受试犬无肝肾功异常,近两周未使用过任何药物。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的建立 色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Agilent 公司);预柱为 C₁₈ 柱(4.0 mm × 3.0 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司);流动相为乙腈-水(90 : 10, v/v);流速为 0.30 ml/min;进样量为 20 μl;柱温为 50 °C;进样室温度为 4 °C。

2.2 质谱条件的建立 离子源为 ESI 源;正离子方式检测;扫描方式为多反应监测(MRM);离子源电离电压为 3 500 V;离子源温度 350 °C;雾化气流速 10 L/min;用于定量分析的离子反应分别为 m/z 936.6 → m/z 409.7(西罗莫司)和 m/z 826.6 → m/z 415.4(内标他克莫司)(见图 1, 2);碎裂电压(fragmentor)分别为 290 eV 和 230 eV;碰撞能量(collision energy)分别为 63 eV 和 60 eV;扫描时间为 200 ms。

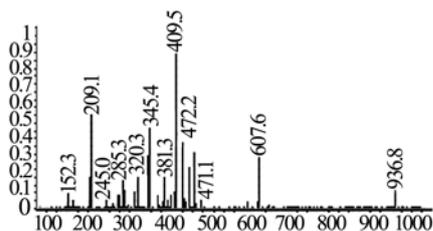


图 1 西罗莫司的产物离子全扫描质谱图
m/z 936.6 → 409.7

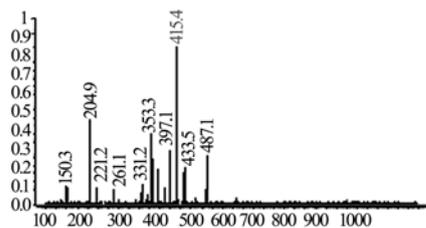


图 2 内标他克莫司的产物离子全扫描质谱图
m/z 826.6 → 415.4

2.3 溶液的配制

2.3.1 SRL 标准溶液的制备 精密称取 SRL 对照

品 10 mg, 置 100 ml 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 摇匀。精密量取该溶液适量, 分别配制成浓度为 5、10、20、40、60、80、100、120 ng/ml 的系列标准溶液。

2.3.2 内标溶液的制备 精密称取他克莫司对照品 10 mg, 置 100 ml 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度线, 摇匀。取该溶液适量, 配制成浓度为 20 ng/ml 的内标溶液。

2.4 全血样本处理方法 向 500 μl 全血中依次加入 100 μl 的内标溶液(0.020 ng/ml 他克莫司乙腈溶液), 100 μl 乙腈 : 水(50 : 50, v/v) 和 500 μl 的水, 混匀后加入 4 ml 乙醚, 涡流混合 1 min, 往复振荡 15 min(240 r/min), 离心 5 min(3 500 r/min), 分取上层有机相于另一试管中, 40 °C 氮气流下吹干, 残留物加入 150 μl 流动相溶解, 涡流混合, 取 20 μl 进行 UPLC-MS/MS 分析。

2.5 方法专属性考察 取 beagle 犬的空白全血, 除不加内标外, 其他按“2.4”项下操作, 记录色谱图(见图 3); 另取 beagle 犬的空白全血, 先配制成一定浓度的标准全血样品, 再依“2.4”项下操作并测定, 记录色谱图(见图 4); 取服药后的全血样品, 依“2.4”项下进行操作并测定, 记录色谱图(见图 5)。由图观察到, 西罗莫司的保留时间约为 1.167 min, 内标他克莫司的保留时间约为 1.144 min。全血中本底及杂质对西罗莫司和他克莫司的测定没有任何干扰。

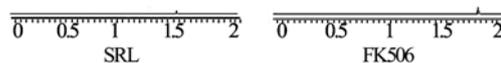


图 3 空白全血样品的 HPLC 图谱

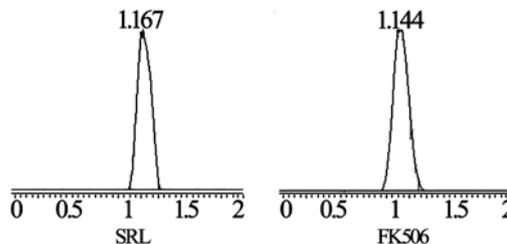


图 4 空白全血 + 对照 SRL + 内标 FK506 的 HPLC 图谱

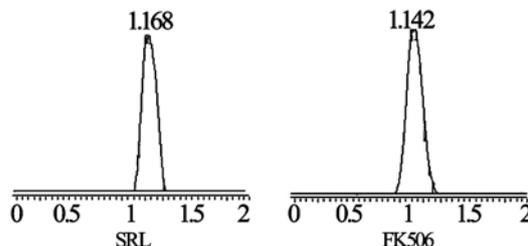


图 5 全血样品 + 对照内标 FK506 的 HPLC 图谱

2.6 标准曲线制备 取 450 μl 的空白全血数份, 分别加入 50 μl 的 SRL 标准系列溶液, 混合均匀。配制成相当于西罗莫司浓度为 0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00 ng/ml 的标准全血样品。按“2.4”项下进行操作, 记录色谱图。以待测物浓度 (ng/ml) 为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权 ($W = 1/X^2$) 最小二乘法进行回归运算, 求得直线回归方程为 $Y = 0.2016X - 0.0031$, $r = 0.9997$ 。根据标准曲线, 西罗莫司测定方法的线性范围为 0.50 ~ 12.00 ng/ml。

2.7 最低定量浓度 取 SRL 浓度为 0.50 ng/ml 的标准全血样品, 按“2.6”项下进行 6 样本分析, 根据当日标准曲线求得每一样本测定浓度, 求得该浓度下的西罗莫司日内精密度 (RSD) 为 13.1%, 准确度为 97.0%。该结果表明 LC-MS/MS 法测定全血中西罗莫司的定量下限可达 0.50 ng/ml。

2.8 精密度和方法回收率试验 取 450 μl 的空白全血数份, 按“2.6”项下的方法配制低、中、高 3 个浓度 (西罗莫司浓度分别为 1.0、4.0 和 8.0 ng/ml) 的质量控制样品, 每一浓度进行 6 样本分析, 连续测定 3 d, 记录色谱图。根据当日的标准曲线, 计算质量控制样品的测得浓度, 计算本法的精密度和方法回收率, 详见表 1。结果表明, 本方法精密、准确, 符合生物样本分析要求。

表 1 全血样品中西罗莫司的方法回收率和精密度

浓度 (ng/ml)	方法回收率 (%)	日内精密度 ($n=6$)	
		RSD (%)	RSD (%)
1.0	92.6 \pm 0.11	11.6	14.1
4.0	94.3 \pm 0.09	9.4	9.2
8.0	97.4 \pm 0.05	5.5	4.7

2.9 全血样品萃取回收率试验 取 450 μl 的空白全血数份, 按“2.6”项下的方法制备低、中、高 3 个浓度 (西罗莫司浓度分别为 1.0、4.0 和 8.0 ng/ml) 的全血样品, 每一浓度进行 6 样本分析。同时另取 450 μl 的空白全血, 除不加内标溶液外, 按“2.4”项下操作, 向获得的上层有机相中加入相应浓度的标准溶液 50 μl 和内标溶液 100 μl , 涡流混合, 取混合液 40 C 氮气流下吹干。残留物加入 150 μl 流动相溶解, 涡流混合, 取 20 μl 进行 LC-MS/MS 分析。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。3 种浓度下西罗莫司的提取回收率分别为 76.0%, 81.7%, 80.2% ($n=6$)。同样计算他克莫司的提取回收率为 89.2%。

2.10 稳定性试验 取 450 μl 的空白全血数份, 按“2.6”项下的方法配制低、中、高 3 个浓度 (西罗莫司浓度分别为 1.0、4.0 和 8.0 ng/ml) 的质量控制样

品数份。将西罗莫司全血样品在不同温度下 (25 $^{\circ}\text{C}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$) 避光贮存, 分别进行不同温度下不同时间的稳定性试验考察; 将全血样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光贮存, 1 周后取出在常温下解冻, 分别进行 1、2、3 个冻融周期的稳定性试验考察。根据当日的标准曲线, 计算质量控制样品的测得浓度, 结果表明西罗莫司在冷冻 (-20 $^{\circ}\text{C}$) 条件下至少能稳定 15 d, 准确度为 85.2% ~ 95.0% ($n=6$); 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下至少能稳定 8 h, 准确度为 85.0% ~ 95.9% ($n=6$); 在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 条件下至少能稳定 4h, 准确度为 85.3% ~ 94.5% ($n=6$); 反复冻融 3 个周期, 血药浓度未发生显著变化, 准确度为 85.7% ~ 93.6% ($n=6$), 均符合生物样品分析要求。

3 讨论

由于血中 SRL 小部分与血浆蛋白结合, 大部分与红细胞结合, 所以测定时需用全血^[3]。

国内外文献^[4-9]中分别采用 UPLC-MS/MS、HPLC-MS/MS、HPLC 法、酶联免疫法等方法测定全血中西罗莫司的浓度。本实验采用 UPLC-MS/MS 检测 beagle 犬体内西罗莫司血药浓度, 与其他方法比较, UPLC-MS/MS 具有更高的分离效率和更快的分离速度, 尤其与质谱联用后更能显示其优越的性能, 由于不需要组分完全分离, 大大缩短了保留时间, 且灵敏度提高数倍。

本实验分别采用沉淀蛋白法 (PPT)、液液萃取法 (LLE) 及固液萃取法 (SPE) 3 种方法处理样本, 并进行了对比, 结果发现: 使用 PPT 方法, 快速简便, 但内源性物质不能完全分离, 不利于仪器的保护; LLE 法采用乙醚作为萃取溶剂时, 提取回收率约有 76%, 而 SPE 方法 82%, 会稍高一些, 重复性亦好于 LLE 法。但采用 SPE 法时, 发现因为血样组成复杂, 重复使用 SPE 小柱, 使提取效率明显下降, 故要有满意的效果, 不能再生使用, 考虑到本实验的样品数量多, 选用 LLE 方法能有效降低实验成本。因此最终选定 LLE 法做为血样萃取方法。

本实验中所建立的 UPLC-MS/MS 方法具有样品处理简单, 方法灵敏、快速、选择性强, 能满足西罗莫司在 beagle 犬体内药物检测的要求。

【参考文献】

- [1] 朱曼, 郭代红. 新型大环内酯类免疫制剂——西罗莫司 [J]. 中国药物应用与监测, 2005 (6): 26.
- [2] Yáñez JA, Forrest ML, Ohgami Y, et al. Pharmacometrics and delivery of novel nanoformulated PEG-b-poly (ϵ -cap-rolactone) micelles of rapamycin [J]. Cancer Chemoth Pharm, 2008, 61 (1): 133.

次。试验当日,用粗砂纸擦伤右后足背剃毛处,面积1平方厘米,局部再涂药一次,对照组给予等量蒸馏水。末次涂药后10 min,开始在创面处滴0.01%磷

酸组织胺0.05 ml/只。直至出现豚鼠回头舔右后足,以最后出现豚鼠回头舔右后足时所给予的磷酸组织胺总量为致痒阈。记录并比较各组的致痒阈。

表4 复方参蛇洗剂抑菌试验结果(液体试管法)

菌体	复方参蛇洗剂浓度(g/ml)							药物对照	菌株对照
	0.2	0.1	0.05	0.025	0.012 5	0.006 2	0.003 1		
金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	-	-	-	+
肺炎双球菌	-	-	+	+	+	+	+	-	+
乙型溶血性链球菌	-	-	-	-	+	+	+	-	+
福氏志贺氏菌	-	-	-	-	+	+	+	-	+
致病性大肠杆菌	-	-	-	+	+	+	+	-	+
伤寒沙门氏菌	-	-	-	-	+	+	+	-	+
绿脓杆菌	+	+	+	+	+	+	+	-	+

表5 复方参蛇洗剂对磷酸组织胺致痒反应的影响

组别	剂量	动物数	致痒阈(磷酸组织胺总量 μg)	P
对照组		10	35.68 ± 20.1	
洁尔阴组	10%	10	625.6 ± 26.3	<0.01
复方参蛇洗剂组	5%	10	47.9 ± 32.6	
复方参蛇洗剂组	10%	10	325.6 ± 32.1	<0.05
复方参蛇洗剂组	20%	10	526.6 ± 36.2	<0.01

由表5可见,复方参蛇洗剂大剂量组有明显提高豚鼠致痒阈的作用,与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$);中剂量组亦有较显著的提高致痒阈的作用($P < 0.05$)。洁尔阴组致痒阈与对照组相比有极显著的差异($P < 0.01$)。

3 讨论

复方参蛇洗剂以苦参、蛇床子、黄柏等为主要药物,其中苦参清热燥湿、解毒杀虫、祛风止痒为君药;黄柏清热燥湿、泻火解毒,蛇床子祛风燥湿、杀虫止痒共为臣药,以协助苦参的作用。苦参主要有效成分是苦参碱和氧化苦参碱,具有良好的调节免疫和

抗过敏作用^[4]。

通过本研究,制备工艺中中药成分的提取方案得到了优化,其质量标准针对方中主药采用了专属性较强的HPLC测定法,提高后的检查项较以前更为合理。药效学研究印证了复方参蛇洗剂在临床上杀菌、消炎和止痒的功效。制剂制备工艺、质量标准和药效学研究结果表明研制的复方参蛇洗剂具有一定的临床应用前景。

【参考文献】

- [1] 中国药典2010年版.二部[S].2010:461.
- [2] 张杰,向大雄,罗杰英.等.反相高效液相色谱法测定苦参药材中苦参碱的含量[J].中国医院药学杂志,2004,24(11):718.
- [3] 刘斌,石任兵,周素蓉.苦参汤有效部位总生物碱含量测定方法研究[J].北京中医药大学学报,2004,27(2):76.
- [4] 江苏新医学院.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社.1975:2121.

[收稿日期]2011-02-26

[修回日期]2011-07-08

(上接第355页)

- [3] Ren B, Li SX, Deng B, et al. Determination of sirolimus in human whole blood by HPLC[J]. Chin Pharm J, 2004, 39(1):52.
- [4] Lee JH, Cha KH, Cho W, et al. Quantitative determination of sirolimus in dog blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and its applications to pharmacokinetic studies [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 53(4):1042.
- [5] 张东娣,范艳花.液-质联用在西罗莫司和依维莫司血药浓度监测中的应用进展[J].商丘师范学院学报,2007,23(12):90.
- [6] 时颖华,李中东,施孝金,等. HPLC法测定人全血中西罗莫司的浓度[J].中国临床药学杂志,2004,13(2):76.
- [7] 孙明辉,斯陆勤,翟雪珍,等.高效液相色谱-质谱联用测定大

鼠体内西罗莫司血药浓度[J].中国药学杂志,2010,45(2):132.

- [8] 祝仕清,牛长群. UPLC(超高效液相色谱)/MS/MS 联用技术测定全血中的西罗莫司[J].中国抗生素杂志,2007,32(6):347.
- [9] 董振南,贾兴旺,王玲,等.微粒子酶联免疫吸附法测定西罗莫司血药浓度的方法学评价[J].军医进修学院学报,2006,27(5):366.
- [10] 孙春华,黄建权,刘志鹏,等. HPLC-MS/MS 快速同时测定全血中3种免疫抑制剂的浓度[J].中国药学杂志,2008,43(21):1643.

[收稿日期] 2010-10-10

[修回日期] 2011-03-31