

LC-MS/MS法测定人血浆中表柔比星浓度及其药动学研究

杨润祥^{1*},冯恩富²,董超¹,杨芳¹,董丽春²,贺建昌^{2#}(1.云南省肿瘤医院肿瘤内二科,昆明 650118;2.成都军区昆明总医院药学部,昆明 650032)

中图分类号 R969.1;979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)46-4355-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.46.13

摘要 目的:建立测定人血浆中表柔比星浓度的方法并研究其药动学行为。方法:以液-液萃取法进行样品前处理,采用液-质联用法进样测定。色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-水(含0.1%甲酸)(55:45),流速为0.3 ml/min。电喷雾离子化电离源(ESI),正离子方式检测,扫描方式为多反应监测(MRM),用于定量的离子分别为表柔比星 m/z 544.2→397.1和柔红霉素(内标) m/z 528→321。结果:表柔比星血药浓度在0.506~202.4 ng/ml范围内线性关系良好,最低定量限(LLOQ)为0.506 ng/ml;提取回收率均>80%,方法回收率为95.09%~112.93%,日内、日间精密度良好(RSD<4%)。4名患者应用表柔比星治疗后,药动学参数 c_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 t_{max} 、 AUC_{0-144h} 分别为(37.54±21.13) μg/L、(38.02±7.63)h、(47.00±8.25)h、(1 132.81±414.92) μg·h/L。结论:本方法经考察符合生物样品的分析要求,可以应用于临床上血浆中表柔比星浓度的测定和药动学研究。

关键词 液-质联用法;表柔比星;微量泵入;药动学;血药浓度

Determination of Epirubicin Concentration in Human Plasma by LC-MS/MS and Its Pharmacokinetic Study

YANG Run-xiang¹, FENG En-fu², DONG Chao¹, YANG Fang¹, DONG Li-chun², HE Jian-chang²(1. Second Dept. of Internal Medical Oncology, Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming 650118, China; 2. Dept. of Pharmacy, Kunming General Hospital of Chengdu Military Command, Kunming 650032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the determination of epirubicin concentration in human plasma and study its pharmacokinetics. METHODS: After liquid-liquid extraction, plasma samples were determined by LC-MS/MS. The determination was performed on Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water (containing 0.1% formic acid) (55:45) at the flow rate of 0.3 ml/min. The analytes were detected by positive ion electrospray ionization (ESI) in multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring the transitions m/z 544.2→397.1 and m/z 528→321 for epirubicin and daunorubicin (IS), respectively. RESULTS: The linear range of epirubicin was 0.506-202.4 ng/ml, with lowest limit of quantitation (LLOQ) of 0.506 ng/ml. The extraction recovery was more than 80%. RSDs of intra-day and inter-day were 4%. Pharmacokinetic parameters of epirubicin were as follows: c_{max} was (37.54±21.13) μg/L; $t_{1/2}$ was (38.02±7.63)h; t_{max} was (47.00±8.25)h and AUC_{0-144h} was (1 132.81±414.92) μg·h/L. CONCLUSIONS: The method is in line with the requirements of biological sample analysis and can be used for the determination of plasma concentration and pharmacokinetic study of epirubicin.

KEYWORDS LC-MS/MS; Epirubicin; Micro-pump; Pharmacokinetics; Plasma concentration

表柔比星(表阿霉素, Epirubicin)是阿霉素的同分异构体,广泛应用于乳腺癌、淋巴瘤、卵巢癌、肺癌等多种肿瘤的化疗,具有抗癌谱广、高效、毒性相对较低等特点,是临床常用的恶性肿瘤化疗药物之一。目前临床上对于表柔比星确切的给药剂量和方案仍存在诸多分歧,这就需要借助药动学-药效学及毒代动力学数据进行客观评价。在研究过程中首先要建立灵敏、可靠和简便的检测方法。目前国内已有文献报道使用高效液相色谱(HPLC)法测定表柔比星血药浓度^[1-3],高效毛细管电泳法^[4]和电化学发光法^[5]测定盐酸表柔比星的含量,但专属性不高,灵敏度不够,血浆样本取样量多;国外也有文献报道使用液-质联用(LC-MS/MS)法^[6-7]或超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法^[8]测定人血浆中表柔比星的浓度,但其分析仪器、样本提取(固相提取法)和预柱分离过程成本较高,技

术要求复杂,限制了临床应用。本研究建立了可靠、灵敏、快速、简便的测定表柔比星血药浓度的LC-MS/MS定量分析法,并成功用于微量泵入给药后人血浆中表柔比星浓度的测定。

1 材料

1.1 仪器

1200SL-6410B型LC-MS/MS联用仪,电喷雾离子化电离源(ESI)、Agilent MassHunter软件(美国Agilent公司);BP121S电子天平(德国赛多利斯股份公司);LN-9527-01高速离心机(美国雅培公司,离心半径:3.8 cm);XW-80A涡旋混合器(上海精科实业有限公司);AS2060B超声仪(Autoscience公司);Milli-Q Academic纯水机[密理博(上海)贸易有限公司];SC-3616低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);HF-328-U86超低温冷冻储藏箱(上海力申科学仪器股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

注射用盐酸表柔比星(浙江海正药业股份有限公司,规格:10 mg/支,批号:060910);盐酸表柔比星对照品(中国药品

* 主任医师,硕士。研究方向:肺癌与乳腺癌相关的临床研究。

电话:0871-68245627。E-mail:jenny_yrx@sohu.com

#通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:药动学、临床药理学。

电话:0871-65413120。E-mail:kmhejianchang@163.com

生物制品检定研究院,批号:130560-200501);内标:柔红霉素对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:130559-200501);甲醇、甲酸、乙酸乙酯均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件:色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(含0.1%甲酸)(55:45);流速为0.3 ml/min;柱温为35 ℃;进样量为10 μl。

2.1.2 质谱条件:ESI;干燥气流速为8 L/min;干燥气温度为350 ℃;雾化气压力为15 psi;毛细管电压为4 000 V;正离子方式检测,扫描方式为多反应监测(MRM),用于定量的离子分别为表柔比星 m/z 544.2→397.1,逃逸电压为94 V,碰撞能量为8 eV;内标柔红霉素 m/z 528→321,逃逸电压为88 V,碰撞能量为25 eV;扫描时间:200 ms。

2.2 血浆样品处理

精密量取血浆200 μl于空白离心管中,再加入内标(200 ng/ml柔红霉素)溶液20 μl,涡旋混匀,加入1 mol/L碳酸氢钠(NaHCO₃)溶液200 μl后再加入乙酸乙酯提取液3.5 ml,涡旋3 min,4 500 r/min离心5 min,提取有机层,40 ℃水浴N₂下吹干,以流动相200 μl复溶,涡旋1 min,10 000 r/min离心5 min,取10 μl进样。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性:在本试验所采用的试验条件下,表柔比星保留时间为0.98 min,内标柔红霉素的保留时间约为1.6 min,无杂峰干扰测定,色谱见图1。

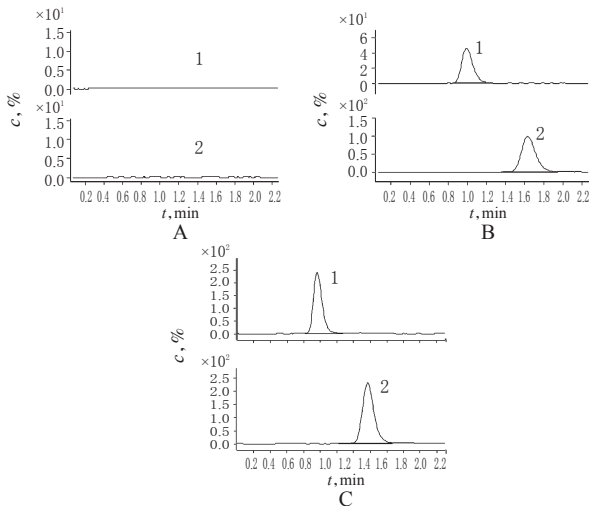


图1 专属性色谱图

A. 空白血浆;B. 空白血浆+表柔比星(10.12 ng/ml)+内标溶液;C.患者持续静脉微量泵入给药24 h后的血浆样品;1.表柔比星;2.柔红霉素

Fig 1 Specificity chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+epirubicin (10.12 ng/ml) + internal standard; C. plasma sample of patients 24 h after continuous intravenous micro-pump; 1. epirubicin; 2. daunorubicin

2.3.2 标准曲线的制备和最低定量限考察:精密量取不同浓度的表柔比星标准溶液各20 μl于9个空白离心管中,加入空白血浆180 μl配成血浆中药物质量浓度分别为0.506、1.012、2.024、5.06、10.12、20.24、50.6、101.2、202.4 ng/ml的样品,再按“2.2”项下方法操作进行分析,建立表柔比星标准曲线。结果表明,表柔比星血药浓度在0.506~202.4 ng/ml范围内线性关

系良好。按上述条件测得表柔比星在血浆中的最低定量限为5.06 ng/ml(信噪比>5),在最低定量限时的准确度及精密度均符合要求。

2.3.3 精密度和准确度试验:取空白离心管,分别加入不同浓度的表柔比星质控(QC)样本溶液各20 μl,再加入空白血浆180 μl配制成血浆中药物质量浓度分别为1.012、10.12、161.92 ng/ml的样品,按“2.2”项下方法操作,在不同天内连续制备并测定3个分析批,每个浓度进行5个样本分析。计算得日内和日间RSD均<10%,另计算准确度得方法回收率约为95.09%~112.93%。精密度试验结果见表1。

表1 精密度试验结果

Tab 1 Results of precision tests

质量浓度, ng/ml	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x} \pm s$, ng/ml	RSD, %	$\bar{x} \pm s$, ng/ml	RSD, %
1.012	0.99 ± 0.04	3.97	1.03 ± 0.03	2.78
10.12	10.95 ± 0.06	0.52	10.82 ± 0.12	1.08
161.92	167.93 ± 3.27	1.95	168.95 ± 2.59	1.53

2.3.4 提取回收率试验:取空白离心管,分别加入不同浓度的表柔比星QC溶液各20 μl,再加入空白血浆180 μl配制成药物质量浓度分别为1.012、10.12、161.92 ng/ml的血浆样品各5份,再按“2.2”项下方法操作,进样10 μl,得到相应的药物峰面积和内标峰面积,分别记为A_s(H)、A_i(H)。另取空白血浆200 μl加入1 mol/L NaHCO₃溶液200 μl、乙酸乙酯3.5 ml,涡旋3 min,4 200 r/min离心5 min后,提取有机层,40 ℃ N₂下吹干,加入不同浓度的表柔比星QC溶液各20 μl、内标(200 ng/ml柔红霉素)溶液20 μl,加入流动相160 μl复溶,配制对应浓度的对照品溶液,进样10 μl分析,得到药物峰面积和内标峰面积,分别记为A_s(T)、A_i(T)。按下式计算表柔比星提取回收率(%) = [A_s(H)/A_s(T)]_{平均} × 100%,内标回收率(%) = [A_i(H)/A_i(T)]_{平均} × 100%。提取回收率试验结果见表2。

表2 提取回收率试验结果

Tab 2 Results of extraction recovery tests

质量浓度, ng/ml	表柔比星		柔红霉素	
	$\bar{x} \pm s$, %	RSD, %	$\bar{x} \pm s$, %	RSD, %
1.012	83.44 ± 2.87	3.43	86.84 ± 5.12	5.89
10.12	82.32 ± 1.67	2.03	87.98 ± 5.99	6.80
161.92	81.33 ± 1.78	2.19	92.47 ± 4.93	5.33

2.3.5 介质效应(Matrix effect)考察:取空白血浆200 μl,加入1 mol/L NaHCO₃溶液200 μl、乙酸乙酯3.5 ml,涡旋3 min,4 200 r/min离心5 min后,提取有机层,40 ℃ N₂下吹干,加入不同浓度的表柔比星QC溶液各20 μl、内标(200 ng/ml柔红霉素)溶液20 μl,加入流动相160 μl复溶,即配制成药物质量浓度分别为1.012、10.12、161.92 ng/ml的样品,处理后进样10 μl分析,得到药物峰面积和内标峰面积,分别记为A_s(D)、A_i(D)。另取不同浓度的表柔比星QC溶液各20 μl,加入内标(200 ng/ml柔红霉素)溶液20 μl、160 μl,配制相同浓度的对照品溶液,处理后进样10 μl分析,得到药物峰面积和内标峰面积,分别记为A_s(T)、A_i(T)。每一浓度进行5个样本分析,药物介质效应(M) = [A_s(D)/A_s(T)]_{平均} × 100%,内标介质效应(M) = [A_i(D)/A_i(T)]_{平均} × 100%,结果见表3。

2.3.6 表柔比星稳定性试验:取空白离心管,分别加入不同浓度的表柔比星QC溶液各20 μl,加入空白血浆180 μl配制成血浆中药物质量浓度分别为1.012、10.12、161.92 ng/ml的样品各

表3 介质效应试验结果

Tab 3 Results of medium effect tests

质量浓度, ng/ml	表柔比星		柔红霉素	
	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \%$	RSD, %
1.012	94.42 ± 4.47	4.74	98.55 ± 3.25	3.30
10.12	96.51 ± 2.52	2.61	95.39 ± 4.80	5.03
161.92	98.04 ± 2.19	2.23	97.62 ± 1.85	1.90

4份。分别进行“血浆样本的室温稳定性试验”“血浆样本的冻融稳定性试验”“血浆样本的长期冰冻(-80℃)稳定性试验”和“血浆样本处理液的室温稳定性试验”考察。结果显示相对误差(RE)在±15%以内,表柔比星血样在室温下放置4h、反复冻融3次以及-80℃长期冷冻30d稳定性均较好。

2.3.7 血浆样本测定过程中的随行标准曲线及质量控制:为减少系统误差,每批样本分析时,建立随行标准曲线计算血药浓度,并平行测定含表柔比星质控样本(低、中、高质量浓度分别为1.012、10.12、161.92 ng/ml)。质控样品均匀分布在未知样品测试顺序中,质控样品测定结果均符合生物样本分析要求。

2.4 药动学试验

本试验经成都军区昆明总医院伦理委员会同意后实施,试验前获得患者知情同意。选择云南省肿瘤医院化疗研究中心在2012年1-6月住院治疗的女性乳腺浸润性导管癌患者4例,中位年龄40岁,Karnofsky功能状态(KPS)评分>80分,无器质性心脏病及肝肾疾病,未接受过化疗和纵隔放射治疗,均使用70 mg/m²表柔比星联合紫杉醇(PXT)的方案化疗。灭菌注射用水200 ml后置入微量输液泵,以4 ml/h的速度持续泵入表柔比星;给药48 h后再给予PXT治疗。于患者给药6、12、24、36、48、52、56、62、72、84、96、108和144 h后分别采血3 ml,血标本离心后取上层血浆于-80℃冰箱保存备用,采用LC-MS/MS法测定血药浓度。

4名患者的血药浓度结果采用DAS3.0软件处理。计算所得药动学参数见表4,平均药-时曲线见图2。

表4 4名患者接受表柔比星微量泵入给药后的平均药动学参数($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 4 Mean pharmacokinetic parameters of epirubicin in 4 patients with continuous intravenous micro-pump ($\bar{x} \pm s, n=4$)

参数	$\bar{x} \pm s$
$c_{max}, \mu\text{g/L}$	37.54 ± 21.13
$t_{1/2}, \text{h}$	38.02 ± 7.63
t_{max}, h	47.00 ± 8.25
$AUC_{0-144\text{h}}, \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	1 132.81 ± 414.92
$AUC_{0-\infty}, \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$	1 189.51 ± 428.44

3 讨论

血浆样品的预处理方法曾进行多种尝试。笔者曾试用3倍甲醇、乙腈、高氯酸沉淀蛋白;用乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、甲基叔丁基醚等有机溶剂单独萃取及以不同比例混合液-液萃取,均不能很好地兼顾表柔比星及内标的回收率和介质效应。参照文献,血浆样品经碱化后,再用各种有机溶剂萃取,结果发现碱化后乙酸乙酯萃取表柔比星回收率明显提高;但介质效应太强,考虑到是否碱度太强的影响。后对血样采

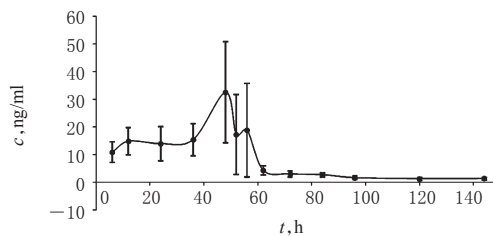


图2 4名患者接受表柔比星微量泵入给药后的平均药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of epirubicin in 4 patients with continuous intravenous micro-pump

用弱碱化处理,介质效应减弱,回收率虽略有降低但可以通过调整乙酸乙酯用量来提高。

本方法采用液-液萃取对样品进行前处理,较国外文献^[8-9]报道的固相萃取法更简单、有效且成本低。本测定方法具有更低的检测限(0.506 ng/ml),灵敏度更高,经考察符合生物样品的分析要求,可以应用于临床肿瘤患者微量血液样本量的血药浓度测定和药动学研究。

参考文献

- [1] 董梅,冯奉仪,傅强,等. HPLC测定人血浆中表柔比星浓度[J]. 中国药学杂志,2001,36(7):474.
- [2] 杨丽杰,齐添,谢良军. RP-HPLC法测定人血浆中盐酸表柔比星的浓度[J]. 中国药房,2008,19(5):346.
- [3] 蓝晓红,李祥,许锐,等. 高效液相-荧光检测法测定兔血浆中表柔比星的药动学研究[J]. 解放军药学学报,2010,26(6):503.
- [4] 王建,黄宗玉. 高效毛细管电泳法测定盐酸表柔比星的含量[J]. 药物分析杂志,2000,20(6):383.
- [5] He PG, Liu XP, Yu H, et al. Determination of pharmorubicin in pharmaceutical by electrogenerated chemiluminescence[J]. *Chinese J Anal Chem*,2000,28(9):1 062.
- [6] Rachel W, Gillian MM, John C, et al. Rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation of epirubicin and identification of metabolites in biological samples[J]. *Talanta*,2007,72(4):145.
- [7] Cristina S, Emanuela L, Benedetta P, et al. Validation of an LC-MS/MS method for the determination of epirubicin in human serum of patients undergoing drug eluting microsphere-transarterial chemoembolization (DEM-TACE)[J]. *Journal of Chromatography B*,2009,877(11):3 543.
- [8] Li RP, Dong LL, Huang JX, et al. Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma[J]. *Analytica Chimica Acta*,2005,546(4):167.
- [9] Camaggi AM, Ciuliam FC. Preclinical properties of epirubicin[M]//Bonadoma C. *Advance in anthracycline chemotherapy:epirubicin*. Milano:Masson,1984:31-40.

(收稿日期:2014-04-21 修回日期:2014-09-15)