

• 化学工程与材料工程 •

DOI:10.15961/j.jsuese.201700661

UPLC-MS/MS法同时检测大鼠体内7-乙基-14-氨基喜树碱及其代谢产物

王 万^{1,2}, 廖立东², 干玉娟², 李 晖^{1*}

(1.四川大学 化学工程学院, 四川 成都 610065; 2.四川赛诺唯新生物技术有限公司, 四川 成都 610023)

摘要:7-乙基-14-氨基喜树碱(EAC)是具有良好抗肿瘤活性的新型喜树碱衍生物,为测定静脉注射EAC后原形化合物及其酰胺型代谢产物(EAC-M)在体内的浓度,揭示体内动力学性质,现研究建立了同时定量测定SD大鼠血浆中EAC和EAC-M的UPLC-MS/MS方法。以7-乙基-14-硝基喜树碱(ENC)、吉咪替康(CMT)为内标,血浆样品加入内标溶液和乙腈沉淀蛋白后,以Phenyl-Hexyl柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)为分离柱,5 mmol/L醋酸铵水溶液(含0.1%甲酸)-乙腈为流动相梯度洗脱,流速0.5 mL/min。洗脱物经电喷雾离子源(ESI)正离子化,在三重四级杆质谱仪上以多反应监测模式(MRM)测定EAC(m/z 392→291)和EAC-M(392→290)。方法学研究结果显示,内源性物质不干扰待测物和内标的测定。在0.500~250 ng/mL范围内,EAC和EAC-M的浓度与响应值的线性关系良好,定量下限均为0.500 ng/mL。方法的日内、日间精密度(RSD)≤7.6%,准确度(RE)为-4.2%~5.9%。提取回收率为84.4%~98.7%,基质效应为94.8%~104%。高于定量上限浓度的样品,用空白血浆稀释6倍至线性范围,测得的精密度(RSD)为1.8%,准确度(RE)为-10%~-3.0%。样品经设定的稳定性考察条件后,测得的准确度(RE)为-8.6%~11%, RSD <7.2%。药代动力学结果显示,静脉注射后EAC在大鼠体内的清除速率中等,组织分布高。给药后EAC-M在血浆中迅速检出,暴露量约相当于EAC的5%。连续给药5 d,EAC和EAC-M在大鼠体内无明显蓄积。所建立的方法简便、灵敏、选择性强,适用于SD大鼠血浆中EAC及代谢产物EAC-M的测定和药代动力学研究。

关键词:7-乙基-14-氨基喜树碱; 内酰胺代谢产物; 大鼠血浆; 超高效液相色谱-串联质谱; 同时定量检测
中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:2096-3246(2018)02-0226-05

Simultaneous Determination of 7-ethyl-14-Aminocamptothecin and Metabolite in Rat by UPLC-MS/MS Method

WANG Wan^{1,2}, LIAO Lidong², GAN Yujuan², LI Hui^{1*}

(1.College of Chemical Eng.,Sichuan Univ.,Chengdu 610065,China; 2.Sichuan Sino-innovation Bio-technology Co.,Ltd,Chengdu 610023,China)

Abstract: 7-ethyl-14-Aminocamptothecin (EAC) is a novel derivate of camptothecin which exhibits favorable antitumor activity. To determine the concentrations of the parent drug and lactam form metabolite (EAC-M) in vivo after intravenous administration of EAC, an UPLC-MS/MS method was established to simultaneously quantify EAC and EAC-M in SD rat plasma. 7-ethyl-14-Nitrocamptothecin (ENC) and Chimmitecan (CMT) were used as internal standards. After protein precipitation by adding solution of internal standards and acetonitrile, plasma samples were separated on a Phenyl-Hexyl column (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) with the mobile phase consisting of 0.5 mmol/L ammonium acetate solution (containing 0.1% formic acid)-acetonitrile. Gradient elution was employed at a flow rate of 0.5 mL/min. Eluted compounds were ionized by an electrospray ionization source (ESI) in positive mode. The parent to production transitions for both the parent drug (m/z 392→291) and the metabolite (m/z 392→290) were monitored on a triple quadrupole mass spectrometer, using the multiple reaction monitoring (MRM). Based on the results from method validation, no interference was observed in blank plasma samples. The linear ranges for EAC and EAC-M were 0.500~250 ng/mL, the limits of quantitation were 0.500 ng/mL. The inter- and intra-day precisions (RSD) were not more than 7.6%, the accuracies (RE) were -4.2%~5.9%. The extraction recovery values were 84.4%~98.7%, and the matrix effects were 94.8%~104%. Samples beyond the upper limits of quantification were analyzed after a 6-fold-dilution with

收稿日期:2017-05-15

作者简介:王 万(1980—),男,博士生.研究方向:生物化工.E-mail: myrid@foxmail.com

* 通信联系人 E-mail: lihuilab@sina.com

网络出版时间:2018-03-18 23:07:38

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1773.tb.20180318.2307.001.html>

<http://jsuese.ijournals.cn>

<http://jsuese.scu.edu.cn>

blank plasma, the precisions (*RSD*) were 1.8%, and the accuracies (*RE*) were $-10\% \sim -3.0\%$. In stability tests, the accuracies (*RE*) were $-8.6\% \sim 11\%$ and the precisions (*RSD*) were below 7.2%. Data from pharmacokinetic tests indicated that EAC is moderately cleaned and is widely distributed in tissues. EAC-M was rapidly detected in plasma after intravenous administration which showed a 5% exposure of EAC. No accumulation of EAC or EAC-M was observed after an administration for 5 consecutive days. In summary, the provided method is convenient, sensitive, selective, and suitable for investigation of EAC and EAC-M in pharmacokinetic research.

Key words: 7-ethyl-14-Aminocamptothecin; lactam metabolite; rat plasma; UPLC-MS/MS; simultaneous quantitative analysis

喜树碱(CPT)是一种细胞毒类生物碱,于1966年首次从植物中分离得到^[1]。因其具有显著的抗肿瘤活性,以及特异性抑制拓扑异构酶 I (TOP I)的机理^[2-3]而受到广泛关注,一度成为世界性研究热点。若干衍生物成功合成并应用于临床,在人类抗击肿瘤中发挥了重要作用^[4-5]。近年, Duan等^[6]在喜树碱D环进行氨基取代,得到了新型衍生物7-乙基-14-氨基喜树碱(EAC),如图1所示。与其他喜树碱衍生物相比, EAC抗肿瘤活性强,安全性高。但是,有关生物样本中EAC及其代谢产物的分析方法和应用研究尚未见报道。

作者基于超高效液相色谱-串联质谱方法(UPLC-MS/MS)具有高选择性、高灵敏度,尤其适合生物样本复杂体系中微量甚至痕量物质的定量分析等特点,建立了UPLC-MS/MS同时定量大鼠血浆中EAC及其内酰胺型代谢产物(EAC-M,图1)的分析方法,并应用于大鼠药代动力学试验。

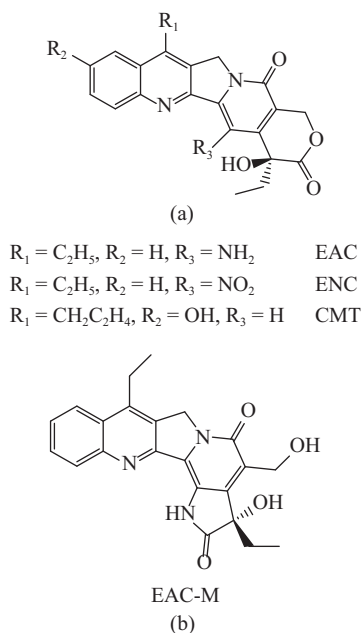


图1 EAC、EAC-M、ENC与CMT的化学结构

Fig.1 Chemical structure for EAC, EAC-M, ENC and CMT

1 实验部分

1.1 药品和试剂

EAC(纯度99.2%)、EAC-M(纯度97.0%)、7-乙

基-14-硝基喜树碱(ENC,纯度97.5%,用作EAC的内标)由实验室自行合成;吉咪替康(CMT,纯度94.7%,用作EAC-M的内标)由上海海和药物研究开发有限公司提供;甲醇、乙腈为色谱纯,购自德国Merck公司;醋酸铵为色谱纯,购自美国ROE公司;甲酸为色谱纯,购自德国Fluka公司;超纯水由法国Millipore公司纯水机制备。

标准溶液和质控样品溶液配制:精密称取EAC、EAC-M对照品各适量,分别用乙腈溶解成1.00 mg/mL的储备液。精密吸取等量的两种储备液混合,用含0.2%甲酸乙腈逐级稀释,得到不同浓度的混合标准工作液。再取混合标准工作液(20 μ L)加入大鼠空白血浆(380 μ L),得系列标准溶液,浓度分别为0.500、1.00、3.00、10.0、30.0、100和250 ng/mL。同法制备4份质控样品,浓度分别为0.500 ng/mL(定量下限, LLOQ)、1.50 ng/mL(低浓度质控, LQC)、20.0 ng/mL(中浓度质控, MQC)和200 ng/mL(高浓度质控, HQC)。

内标溶液配制:精密称取ENC、CMT对照品各适量,分别用乙腈溶解成1.00 mg/mL的内标储备液。精密吸取等量的两种内标储备液混合,以含0.2%甲酸乙腈稀释成浓度均为200 ng/mL内标溶液。

配制过程在避光条件下进行。QC及LLOQ样品于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内保存备用,其余溶液在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.2 实验动物

SD大鼠,雌雄各半,体重180~260 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可证号SCXK(沪)2013-0016。饲养于中国科学院上海药物研究所,使用许可证号SYXK(沪)2010-0049。

1.3 仪器与分析条件

液相色谱-质谱联用仪:岛津高效液相色谱系统(日本Shimadzu公司),包含DGU-20A5在线脱气机、LC-30AD泵、SIL-30AC自动进样器、CTO-30A柱温箱;Qtrap5500三重四极杆串联质谱仪,配备电喷雾电离源(美国Applied Biosystems公司)。数据处理软件为Analyst 1.5.2(美国Applied Biosystems公司)。CT15RE型台式高速离心机(日本Hitachi公司)。H-101型多功能漩涡混合器(上海康禾光电仪器有限公司)。

液相色谱条件:Phenyl-Hexyl柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μ m, 美国Agilent公司);以5 mmol/L醋酸铵水溶液

(含0.1%甲酸)为流动相A,乙腈为流动相B;梯度洗脱条件:0.0~0.6 min(25% B),0.6~0.8 min(25%~75%B),0.8~2.5 min(75%B),2.5~2.6 min(75%~25%B),2.6~3.5 min(25%B);流速0.5 mL/min;进样量15 μ L;自动进样器温度:4 $^{\circ}$ C;柱温:室温。

MS/MS条件:ESI正离子方式检测;源喷射电压5 000 V;温度500 $^{\circ}$ C;离子源气体1(N_2)压力50 psi(344.738 kPa);离子源气体2(N_2)压力50 psi;气帘气体(N_2)压力30 psi;扫描方式为多反应监测(MRM);扫描时间100 ms;各成分的主要质谱参数及用于定量分析的母离子 \rightarrow 子离子对见表1。

表1 MS/MS参数与定量分析的MRM离子对

Tab.1 MS/MS parameters and MRM ions pair selected for quantitation

化合物	Q1(m/z)	Q3(m/z)	去簇电压/V	碰撞能/eV
EAC	392.2	291.0	80	44
EAC-M	392.2	290.3	70	46
ENC	422.2	357.1	80	36
CMT	405.0	361.0	70	30

1.4 血浆样品处理

采用乙腈沉淀蛋白处理待测样品。取25.0 μ L待测样品中加入25.0 μ L内标溶液和125 μ L含0.2%甲酸的乙腈,涡旋1 min,11 000 r/min离心5 min。取上清液100 μ L,加入100 μ L水,涡流混匀,吸取15.0 μ L进行UPLC-MS/MS分析。

1.5 大鼠体内药代动力学试验

SD大鼠随机分成2组,每组6只,雌雄各半。EAC溶解于HS15-丙二醇-乙醇-生理盐水(体积比7:10:5:78)并经孔径0.22 μ m的滤膜过滤。

第1组单次尾静脉给予0.8 mg/kg EAC,于给药前和给药后0.083、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 h经眼球后静脉丛取血0.2 mL。第2组按0.8 mg/kg,1次/天,连续尾静脉给药5天。第5天于给药前和给药后0.083、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 h经眼球后静脉丛取血0.2 mL。血样置EDTA抗凝试管中,11 000 r/min离心5 min,分离血浆,-70 $^{\circ}$ C保存待测。

测得数据后,利用Phoenix 1.3软件(美国Pharsight公司)的非房室模型计算药代动力学参数。

2 结果与讨论

2.1 方法选择性

在ESI+方式下,EAC、EAC-M、ENC、CMT分别主要生成m/z为392、392、422和405的[M+H]⁺峰。选择性对这些基峰离子进行产物离子全扫描分析,EAC、EAC-M、ENC及CMT生成的碎片离子中,丰度较高的分别为m/z 291、290、357和361,将其作为定量分析时

监测的产物离子;EAC、EAC-M、ENC和CMT的保留时间分别约为2.5、2.1、2.7和2.1 min。结合MS/MS的选择性和UPLC保留时间的差别,对各组份进行定位和归属。

与空白血浆样品的色谱图比较,大鼠空白血浆样品中内源性物质不干扰待测物和内标的检测。结果如图2所示。

2.2 标准曲线和定量下限

样品按第1.4节方法处理。以待测物浓度为横坐标,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。EAC的回归方程为 $y=0.0115x-0.00147$ ($R^2=0.9944$),EAC-M的回归方程为 $y=0.00331x+0.000721$ ($R^2=0.9948$)。结果表明,在0.500~250 ng/mL范围内,EAC和EAC-M的浓度与响应值线性关系良好,两者的定量下限均为0.500 ng/mL。

2.3 方法的精密度与准确度

取不同浓度的质控样品(HQC、MQC、LQC、LLOQ),每一浓度进行6样本分析,根据当日的标准曲线计算,结果如表2所示。

表2 精密度与准确度结果

Tab.2 Results of Precision and accuracy

组份	加入浓度/(ng·mL ⁻¹)	测得浓度/(ng·mL ⁻¹)	准确度 RE/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
EAC	0.500	0.489	-2.3	5.5	6.7
	1.50	1.47	-2.3	4.5	3.5
	20.0	19.7	-1.5	7.6	6.2
	200	192	-4.2	3.5	4.3
EAC-M	0.500	0.529	5.9	5.5	7.3
	1.50	1.53	2.2	4.5	5.6
	20.0	20.8	3.9	7.6	5.1
	200	208	3.8	3.5	4.2

结果表明,各浓度质控样品中EAC与EAC-M的准确度(RE)为-4.2%~5.9%,日内精密度(RSD)和日间精密度(RSD) \leq 7.6%,结果均在可接受限度内。

2.4 提取回收率与基质效应

取LQC、MQC、HQC按照第1.4节方法处理,进样测定。另取空白血浆按第1.4节方法处理(不加内标)后,加入待测物、内标。每一浓度进行6样本分析,以前、后两种方法测得峰面积的比值计算回收率。

取6只大鼠空白血浆在低(1.50 ng/mL)、高(200 ng/mL)2个浓度下考察基质效应。空白血浆按第1.4节方法处理(不加内标)后,加入待测物、内标,测得待测物峰面积 A_p 、内标峰面积 I_p 。同时,用水代替空白血浆同法上述操作,测得待测物峰面积 A_a 、内标峰面积 I_a ,按式(1)计算内标归一化基质因子 MF_n 。

$$MF_n = A_p \times I_a / (A_a \times I_p) \quad (1)$$

回收率与基质效应测试结果见表3。

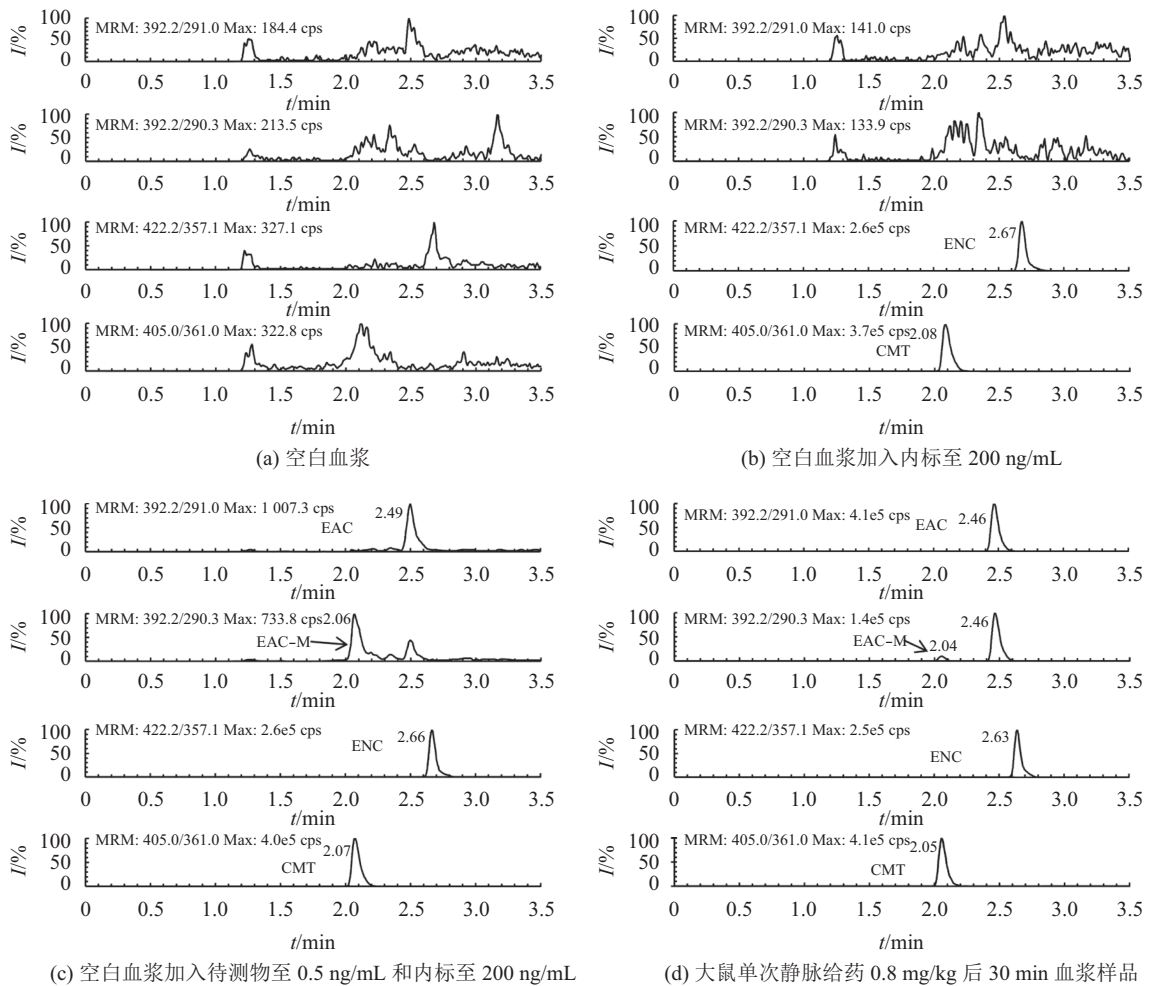


图2 血浆中待测物与内标的典型MRM图谱

Fig.2 Represent chromatograms of analytes and internal standards in plasma samples

表3 回收率与血浆基质效应结果

Tab.3 Extration recovery and matrix effects in plasma

组份	浓度/(ng·mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
EAC	1.50	91.9	2.5	94.8	5.0
	20.0	93.0	3.5	—	—
	200	92.6	6.7	104	2.7
EAC-M	1.50	86.9	7.0	101	2.6
	20.0	96.3	6.1	—	—
	200	84.4	7.0	100	1.1
ENC	200	96.6	6.6	—	—
CMT	200	98.7	6.8	—	—

由测试结果可见,各组份在低、中、高3个浓度的回收率为84.4%~98.7%。各组份在每一浓度水平下基质效应的RSD≤5%,基质对本方法的影响可以忽略。

2.5 稀释试验

6份浓度为1 200 ng/mL的质控样品经空白血浆稀释6倍后进行分析,EAC测得值的精密度(RSD)和准确度(RE)分别为1.8%、-10%,EAC-M测得值的精密度(RSD)和准确度(RE)分别为1.8%、-3.0%。结果表明,样品经空白血浆稀释6倍后不影响结果的准确性。

2.6 样品稳定性考察

取低(1.50 ng/mL)、高(200 ng/mL)2个浓度的全血样品和血浆样品,低(10.0 ng/mL)、高(5 000 ng/mL)2个浓度的标准溶液,以及标准储备液进行稳定性考察。分别考察全血样品室温放置2 h、血浆样品室温放置4 h、血浆样品经历3次冻融、血浆样品-70 ℃放置27 d、血浆样品预处理后4 ℃放置24 h、储备液和标准溶液在4 ℃放置30 d、储备液和标准溶液在室温放置6 h的稳定性。每一浓度进行3样本分析。

结果表明,EAC的准确度(RE)为-4.0%~11%,RSD小于7.2%;EAC-M的准确度(RE)为-8.6%~6.2%,RSD小于5.9%。说明EAC和EAC-M在上述条件下均稳定。

2.7 药动力学试验

将所建立的UPLC-MS/MS方法应用于SD大鼠药代动力学试验,血浆样品中分析物的代表性MRM图谱见图2(d)。SD大鼠以0.8 mg/kg单次静脉给药、连续5 d多次静脉给药(1次/d)后,血浆中EAC和EAC-M的药-时曲线见图3,药代动力学参数见表4。

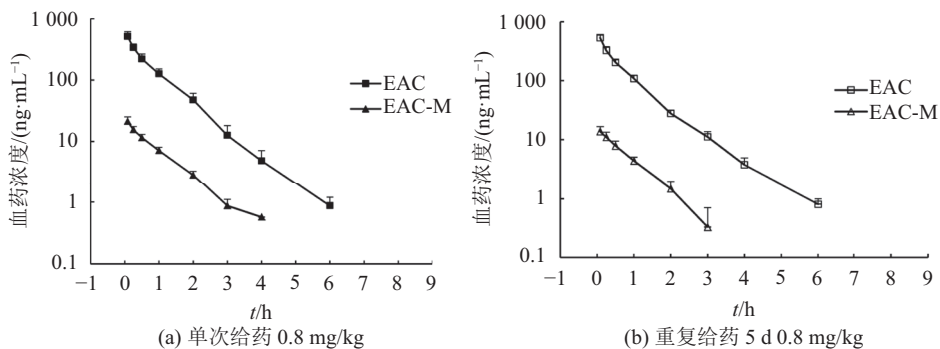


图 3 大鼠静脉给药后EAC和EAC-M的平均药-时曲线

Fig.3 Mean plasma concentration-time profiles of EAC and EAC-M after intravenous administration in rats

表 4 大鼠单次及多次给药0.8 mg/kg后药动学参数

Tab.4 Pharmacokinetic parameters after single or repeated dose of 0.8 mg/kg EAC in rats

项目		$AUC_{0-t}/(\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1})$	$AUC_{0-\infty}/(\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1})$	$MRT_{0-\infty}/\text{h}$	$t_{1/2}/\text{h}$	$CL/(\text{mL}\cdot\text{min}\cdot\text{kg}^{-1})$	$V_{ss}/(\text{L}\cdot\text{kg}^{-1})$
单次给药	EAC	405±61	406±61	0.809±0.11	0.799±0.078	33.5±5.8	1.61±0.23
	EAC-M	19.9±2.0	20.7±2.0	0.921±0.12	0.680±0.086	—	—
多次给药	EAC	367±19	368±20	0.726±0.075	0.876±0.34	36.3±1.9	1.58±0.16
	EAC-M	12.2±2.0	13.0±2.0	0.844±0.13	0.618±0.090	—	—

结果显示,SD大鼠静脉注射EAC后,血浆清除率(CL)相当于大鼠肝脏血流量(约55 mL/(min·kg⁻¹))的60.9%,稳态分布容积(V_{ss})为小鼠体液总量(约0.67 L/kg)的2.40倍,表明EAC在大鼠体内的清除速率中等,组织分布高。给药后,代谢产物EAC-M在血浆中迅速检出,血浆中的暴露量约相当于EAC的5%。连续给药5 d,EAC和EAC-M的 AUC_{0-t} 与单次给药无明显差别,表明在大鼠体内无明显蓄积。

3 结论

研究建立了UPLC-MS/MS方法,大鼠血浆样品仅需一步沉淀处理后进样,可同时检测EAC及其代谢产物EAC-M进行定性、定量分析。单个样品分析时间仅需3.5 min,具有较高的样品通量。经验证,该方法分离度好、灵敏度高、专属性强、准确度和精密度良好,符合生物样品分析的要求^[7-8]。

应用所建立的分析方法开展SD大鼠药代动力学研究,揭示了EAC及其代谢产物EAC-M的体内药动学性质,可以为后续临床研究提供参考。

参考文献:

[1] Wall M E,Wani M C,Cook C E,et al.Plant antitumor agents.I:The isolation and structure of camptothecin,a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca

acuminate[J].Journal of the American Chemical Society, 1966,88(16):3888-3890.

[2] Hisang Y H,Hertzberg R,Hecht S,et al.Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I[J].The Journal of Biological Chemistry,1985, 260(27):14873-14878.

[3] Liu L F,Duann P,Lin C T,et al.Mechanism of action of camptothecin[J].Annals of the New York Academy of Sciences,1996,803(1):44-49.

[4] Oberlies N H,Kroll D J.Camptothecin and taxol:Historic achievements in natural products research[J].Journal of Natural Products,2004,67(2):129-135.

[5] Garciacarbonero R,Supko J G.Current perspectives on the clinical experience,pharmacology,and continued development of the camptothecins[J].Clinical Cancer Research,2002, 8(3):641-661.

[6] Duan Jianxin,Cai Xiaohong,Meng Fanyin,et al.14-Aminocamptothecins:Their synthesis,preclinical activity,and potential use for cancer treatment[J].Journal of Medicinal Chemistry,2011,54(6):1715-1723.

[7] Shah V P,Midha K K,Findlay J W,et al.Bioanalytical method validation:A revisit with a decade of progress[J].Pharmaceutical Research,2000,17(12):1551.

[8] Viswanathan C T,Bansal S,Booth B,et al.Quantitative bioanalytical methods validation and implementation:Best practices for chromatographic and ligand binding assays[J]. Pharmaceutical Research,2007,24(10):1962-1973.

(编辑 黄小川)

引用格式:Wang Wan,Liao Lidong,Gan Yujuan,et al.Simultaneous determination of 7-ethyl-14-aminocamptothecin and metabolite in rat by UPLC-MS/MS method[J].Advanced Engineering Sciences,2018,50(2):226-230.[王万,廖立东,干玉娟,等.UPLC-MS/MS法同时检测大鼠体内7-乙基-14-氨基喜树碱及其代谢产物[J].工程科学与技术,2018,50(2):226-230.]