

LC-MS/MS 定量分析小鼠血浆和组织液中多西他赛的含量

李朝, 程怡*, 罗利华, 郑品劲, 陈宇潮, 陈静, 仝一丹
(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:建立小鼠血浆和组织样品中多西他赛的含量测定方法。方法:选择紫杉醇为内标物,进样前用甲基叔丁基醚萃取,Hypersil BDS C₁₈色谱柱(2.1 mm × 50 mm,2.4 μm),流动相甲醇-0.1%甲酸(80:20),柱温 40 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。电喷雾离子源,多反应检测模式进行正离子检测,离子源喷雾电压 3.5 kV,加热毛细管温度 320 °C,鞘气压力 35 Pa,辅助气压力 10 Pa,碰撞能量 30 V,碰撞诱导解离电压 12 V,多西他赛检测离子对 m/z 876.3 ~ 549.1,紫杉醇检测离子对 m/z 830.3 ~ 307.9。结果:多西他赛在小鼠血浆中的线性范围 0.013 ~ 13 mg·L⁻¹,在心、肝、脾、肺、肾的线性范围分别为 0.012 ~ 12.937,0.013 ~ 13.068,0.012 ~ 13.001,0.013 ~ 13.133,0.011 ~ 12.965 mg·L⁻¹;日内及日间精密密度、各条件下稳定性均 < 15%;血浆中低、中、高质量浓度多西他赛的平均回收率分别为 98.24%,97.51%,93.70%;在小鼠心、肝、脾、肺、肾各组织的平均回收率在 87.87% ~ 98.90%。结论:相较于 HPLC,LC-MS/MS 更适合检测小鼠血浆及组织液中多西他赛的含量,该方法稳定可行、重复性好。

[关键词] 多西他赛;紫杉醇;血浆;组织器官

[中图分类号] R969.1;R945;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0073-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090073

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160314.1552.008.html>

[网络出版时间] 2016-03-14 15:52

LC-MS/MS for Quantitative Analysis of Docetaxel in Mice Plasma and Tissue Fluid

LI Zhao, CHENG Yi*, LUO Li-hua, ZHENG Pin-jing, CHEN Yu-chao, CHEN Jing, TONG Yi-dan
(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a determination for docetaxel that derives from mice plasma and tissue fluid samples, and evaluate effectiveness for this method. **Method:** Samples were purified by methyl tert-butyl ether with paclitaxel as internal standard. Chromatographic separation was performed on a Hypersil BDS C₁₈ column using a mobile phase composed of methanol-0.1% formic acid (80:20), column temperature was 40 °C, flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. Detection was performed on a triple-quadrupole tandem mass spectrometer with multiple reaction monitoring (MRM) mode via electrospray ionization (ESI) source, ESI voltage was 3.5 kV, capillary temperature was 320 °C, sheath gas pressure was 35 Pa, auxiliary gas pressure was 10 Pa, collision energy was 30 V, CID pressure was 12 V, detection ion for docetaxel was m/z 876.3-549.1, detection ion for paclitaxel was m/z 830.3-307.9. **Result:** Docetaxel in mice plasma, heart, liver, spleen, lung and kidney showed good linear relationship within 0.013-13, 0.012-12.937, 0.013-13.068, 0.012-13.001, 0.013-

[收稿日期] 20150723(014)

[基金项目] 国家教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20134425110010);广东省公益研究与能力建设专项(2014A020210023)

[第一作者] 李朝,在读硕士,从事药物载体与新型给药系统研究,Tel:13535458815,E-mail:164380032@qq.com

[通讯作者] *程怡,教授,博士生导师,从事药物载体与新型给药系统研究,Tel:020-39358041,E-mail:vip.chengyi@gzhtcm.edu.cn

13.133, 0.011-12.965 mg·L⁻¹. RSD of intra-day and inter-day assays were less than 15%. Recovery rates of docetaxel with low, middle and high concentration in plasma were 98.24%, 97.51% and 93.70%, its recovery rates in heart, liver, spleen, lung and kidney were 87.87%-98.90%. **Conclusion:** Compared with HPLC, LC-MS/MS is more suitable for quantitative analysis of docetaxel in mice plasma and tissue fluid samples.

[**Key words**] docetaxel; paclitaxel; plasma; tissues and organs

多西他赛又名多西紫杉醇,是从浆果紫杉针叶中提取的前体物经半合成得到的紫杉烷类抗癌药物,在临床上被广泛应用于乳腺癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌及前列腺癌等肿瘤的治疗。近期研究发现多西他赛对人肝癌 HepG2 细胞具有抑制作用^[1],其水溶性比紫杉醇略好,目前上市的多西他赛注射液以聚山梨酯-80 和乙醇为注射溶媒,应用后多会出现过敏反应。在最近研究中,多西他赛主要被制备成脂质体^[2-3],多西他赛脂质体的抗癌疗效相较于其注射剂有明显提高,而且有效避免了过敏反应。

目前对多西他赛脂质体的含量测定方法多采用 HPLC,该法检测简便易行,但由于检测限较高,对于低浓度生物样品中多西他赛的检测准确度低^[4],甚至不易检测到低浓度样品。LC-MS/MS 具有纳克级的低检测限,且其检测方法灵敏度高、准确度好、专属性强,是生物样品定量分析的最佳手段。因此,本实验拟建立生物样本中多西他赛的 LC-MS/MS 并进行方法学评价,为多西他赛脂质体给药后小鼠血浆动力学研究和组织分布研究提供检测方法。

1 材料

TSQ Quantum ACCESS 型三重四极杆液质联用仪(赛默飞世尔科技有限公司),BS110s 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司),TLL-C 型冷冻离心机(北京四环科学仪器厂有限公司)。多西他赛原料药、紫杉醇(北京诺瑞医药技术有限公司,纯度均 >99%),多西他赛对照品(中国食品药品检定研究院,批号 10066-201002,纯度 98.0%),肝素钠(广州华奇盛生物科技有限公司),水为纯净水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

雌性 SPF 级小鼠,60 只,体重(20 ± 2) g,购自广东省医学实验动物中心,合格证号 SCXR(粤)2008-0002。

2 方法与结果

2.1 标准溶液的配制 分别精密称取多西他赛对照品适量,加入一定量甲醇制成 0.5 g·L⁻¹ 对照品溶液;内标物(紫杉醇)溶液配制方法同上。

2.2 色谱条件 Hypersil BDS C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 2.4 μm),流动相甲醇-0.1% 甲酸(80:20),柱温 40 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.3 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),多反应检测模式(MRM)进行正离子检测,离子源喷雾电压 3.5 kV,加热毛细管温度 320 °C,鞘气压力 35 Pa,辅助气压力 10 Pa,碰撞能量 30 V,碰撞诱导解离(CID)电压 12 V,定量离子多西他赛检测离子对 *m/z* 876.3 ~ 549.1,内标紫杉醇的检测离子对 *m/z* 830.3 ~ 307.9。

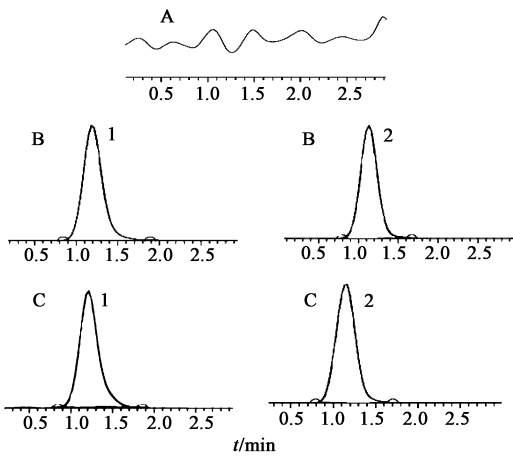
2.4 血浆样品处理 取待测血浆 100 μL,置 5 mL 离心管中,加入 80 μg·L⁻¹ 紫杉醇溶液 100 μL,混合 30 s,加入甲基叔丁基醚 2 mL,涡旋 3 min,10 000 r·min⁻¹ 高速离心 5 min。吸取上清液 1 mL 于 2 mL 离心管中,真空挥干,加入甲醇 50 μL,涡旋 3 min,超声 5 min,13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取 10 μL 进行 LC-MS/MS 检测。

2.5 组织样品处理 取组织 0.1 g 于 2 mL 离心管中(不足 0.1 g 取全部),加 10 倍量生理盐水于 40 Hz 匀浆 300 s,取匀浆液 0.5 mL 置于 5 mL 离心管中,精取 80 μg·L⁻¹ 内标物溶液 100 μL,混合 30 s,加甲基叔丁基醚 3 mL 萃取,涡旋 3 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液 1.5 mL 于 3 mL 离心管中,35 °C 氮气吹干,精密加入流动相 100 μL 复溶,涡旋 3 min,超声 5 min,13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 10 μL 进样待测。

2.6 LC-MS/MS 方法学考察

2.6.1 专属性考察 分别取小鼠空白血浆、空白血浆 + 多西他赛及紫杉醇对照品,给药血浆,按 2.4 项下方法操作后进样测定,结果显示血浆杂质不干扰多西他赛与紫杉醇的含量测定,说明本法具有较高的专属性,见图 1。分别取心、肝、脾、肺、肾空白组织样品,空白组织样品 + 多西他赛及紫杉醇对照品,给药 20 min 后各组织样品,按 2.5 项下方法操作后进样测定,结果显示小鼠各组织杂质不干扰多西他赛与紫杉醇的含量测定,其中肝、肾组织色谱图见图 2。

2.6.2 线性范围 取 9 个 5 mL 离心管,分别加入



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品; C. 血浆样品; 1. 多西他赛; 2. 紫杉醇

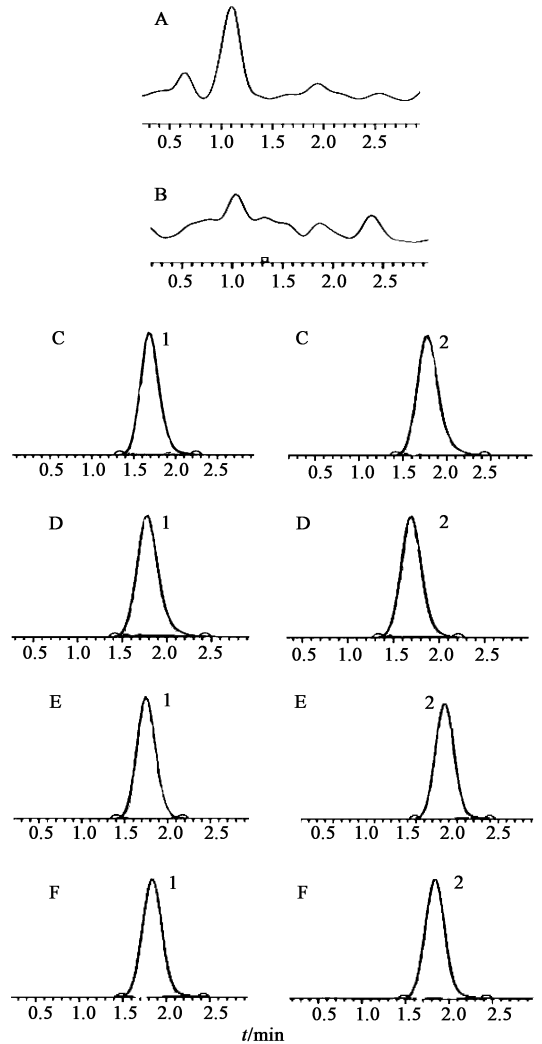
图 1 小鼠给药 20 min 后血浆样品 LC-MS/MS

Fig. 1 LC-MS/MS of mice plasma samples at 20 min after administration

小鼠空白血浆、多西他赛溶液、紫杉醇内标液,使混合溶液中多西他赛质量浓度分别为 3.25, 6.5, 13, 26, 65, 130, 650, 3 250, 13 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,紫杉醇内标液质量浓度均为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,按 2.4 项下操作处理样品,进样,以对照品与内标的峰面积之比为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.003\ 4X + 0.211\ 4$ ($r = 0.999\ 5$),线性范围 0.013 ~ 13 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。待测样品为空白组织液、内标液及质量浓度分别为 1.3, 6.5, 13, 26, 65, 130, 650, 3250, 26 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多西他赛溶液,按 2.5 项下操作处理,其余操作同上,得心、肝、脾、肺、肾回归方程分别为 $Y = 0.003\ 3X + 0.223\ 1$ ($r = 0.999\ 4$), $Y = 0.003\ 6X + 0.055\ 6$ ($r = 0.999\ 7$), $Y = 0.003\ 3X + 0.237\ 5$ ($r = 0.999\ 4$), $Y = 0.003\ 3X + 0.108\ 8$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 0.003\ 6X + 0.014\ 6$ ($r = 0.999\ 6$),线性范围分别为 0.012 ~ 12.937, 0.013 ~ 13.068, 0.012 ~ 13.001, 0.013 ~ 13.133, 0.011 ~ 12.965 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.6.3 精密度考察 用质量浓度分别为 6.5, 130, 3 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多西他赛质控溶液、小鼠空白血浆或各组织液、紫杉醇内标液,按 2.4 和 2.5 项下方法操作,每天进行 6 份样本测定,考察日内精密度;连续测定 3 d,考察日间精密度。结果显示小鼠血浆及心、肝、脾、肺、肾各组织中多西他赛的日内及日间精密度 RSD 均 < 15.0%。

2.6.4 提取回收率 取小鼠空白血浆 100 μL ,加入紫杉醇内标溶液和质量浓度 1.3, 650, 13 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多西他赛质控溶液各 100 μL ,按 2.4 项下方法处理后进行 LC-MS/MS 分析,得样品中多西他



A. 肝空白组织; B. 肾空白组织; C. 肝空白组织 + 对照品; D. 给药后肝组织; E. 肾空白组织 + 对照品; F. 给药后肾组织; 1. 多西他赛; 2. 紫杉醇

图 2 小鼠给药 20 min 后组织匀浆液 LC-MS/MS

Fig. 2 LC-MS/MS of mice tissue homogenate at 20 min after administration

赛峰面积。空白血浆 100 μL 按 2.4 项下方法处理,真空挥干后加入内标溶液及质量浓度 1.3, 650, 13 000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多西他赛质控溶液各 100 μL ,真空挥干,用甲醇 100 μL 复溶进行 LC-MS/MS 分析。分别取小鼠组织(心、肝、脾、肺、肾)匀浆液 500 μL ,按上述方法操作,按 2.5 项下方法处理。计算血浆中低、中、高质量浓度多西他赛的平均回收率分别为 98.24%, 97.51%, 93.70%;小鼠心、肝、脾、肺、肾各组织的平均回收率在 87.87% ~ 98.90%,其中肝组织中多西他赛在低、中、高质量浓度水平的平均回收率分别为 98.86%, 95.69%, 93.34%;肾组织中分别为 94.77%, 90.58%, 92.87%。

2.6.5 稳定性考察 配制质量浓度分别为 6.5,

130,3 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多西他赛血浆样品、小鼠各组织样品($n=5$),分别考察室温保存4 h,反复冻融3次,预处理后4 $^{\circ}\text{C}$ 保存15 h, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存7 d的稳定性,按2.4和2.5项下方法操作后进行LC-MS/MS分析。结果显示小鼠血浆、心、肝、脾、肺、肾样品多西他赛实际质量浓度与测得质量浓度的相对偏差 $<15.0\%$,表明多西他赛以上条件下稳定性良好。

3 讨论

近年来多西他赛多被制成脂质体,脂质体是近年来发展较为成熟的一种新剂型,因其含有磷脂双分子层结构,所以对人体细胞的亲和性很高,而且这种剂型具有很好的靶向性^[5],能够使药物浓集于靶器官,发挥更大的治疗作用,减少不良反应及毒副作用。单纯的血浆药物浓度检测只能评估药物在人体中的吸收情况,无法判断多西他赛在制成脂质体后的靶向性,故本实验中加入了小鼠心、肝、脾、肺、肾组织液中药物浓度的检测。

曾考虑采用HPLC,但通过查阅文献得知^[6-7],使用HPLC大多要先将样品用超滤、微柱离心等方式纯化,以排除杂质的影响,操作繁琐,并且在纯化过程中会出现有效物质的损失;LC-MS/MS检测限低,检测小鼠血浆及组织液中药物浓度时,该法灵敏度高、精确度好^[8-10]。故选用LC-MS/MS。在内标物选择时,理想的内标物是指标成分的同位素标记物,但不易获得,故选择化合物的结构类似物——紫杉醇,二者的质谱断裂规律、色谱行为及生物样品的提取回收率等相对一致,这样环境的变化对指标成分及内标的影响相似,结果更为稳定。

[参考文献]

- [1] 郑宏志,张悦,周晓东,等. 载多西紫杉醇脂质微泡对人肝癌 HepG2 细胞抑制作用的体外研究[J]. 现代生物医学进展,2013,13(30):5806-5810.
- [2] 刘娜,张慧,李志平,等. 多西紫杉醇长循环热敏脂质体包封率测定方法的建立[J]. 国际药学研究杂志,2013,40(3):374-376.
- [3] 黄红兵,刘韬,徐月红,等. 多西紫杉醇脂质体制备工艺及处方优化研究[J]. 中国药学杂志,2007,42(24):1872-1876.
- [4] 陈肖家,李绍平,王一涛,等. HPLC、UPLC、CZE 测定淫羊藿中黄酮类成分含量的比较研究[J]. 中国药学杂志,2008,43(8):624-628.
- [5] Lu B. New Techniques and New Dosage Forms of Drugs [M]. 北京:人民卫生出版社,1998:136-137.
- [6] 许萌,陈丹,蒋晔,等. 中空纤维离心超滤-HPLC 法测定注射用两性霉素 B 脂质体的包封率[J]. 沈阳药科大学学报,2014,31(9):692-696.
- [7] 刘阳,陶胜尧,郭伟英. 葡聚糖凝胶微柱-HPLC 测定奥沙利铂脂质体包封率[J]. 中国现代应用药学,2014,31(1):74-77.
- [8] 陈健龙,张玉玲,董宇,等. LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中4种黄连生物碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):174-178.
- [9] 王正容,万旭,庞晓莹,等. LC-MS/MS 法测定荷瘤小鼠血浆和肿瘤组织中拉帕替尼的浓度[J]. 中国临床药理学杂志,2015,24(3):153-158.
- [10] 林晓斐,林力,张颖,等. 丹参提取物中5种酚酸类成分在大鼠血浆中的 LC-MS/MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(8):93-96.

[责任编辑 刘德文]