

HPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中 LH14 的含量

王 彬^{①②} 杨雷琼^② 吴卓娜^② 顾若兰^② 朱晓霞^② 孟志云^② 甘 慧^②

[摘要] 目的 建立 SD 大鼠血浆中 LH14 的测定方法。方法 以 CS55 为内标,采用 HPLC-MS/MS 法测定,以 Ultimate C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm 3 μm)为分析柱,甲醇-水为流动相,梯度洗脱,流速为 0.2 ml/min,柱温为 25℃,进样量 5 μl。结果 在 2~500 ng/ml 浓度范围内具有良好的线性关系,线性方程为: $Y = 0.0333 + 0.0043X$, $R^2 = 0.9928$ ($n = 8$)。精密密度与准确度均符合生物样品的测定要求,最低定量浓度为 2 ng/ml。结论 该检测方法简便、准确、专属性强,能够满足 LH14 在 SD 大鼠体内药代动力学研究的需要。

[关键词] LH14; HPLC-MS/MS; 药代动力学

[中图分类号] R969.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2012)01-038-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2012.01.10

Assay for LH14 by HPLC-MS/MS in Rat Plasma

WANG Bin^{①②}, YANG Lei-qiong^②, WU Zhuo-na^②, GU Ruo-lan^②,
ZHU Xiao-xia^②, MENG Zhi-yun^②, GAN Hui^②

^① Clinical Laboratory, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China;

^② Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To develop a method for the determination of LH14 in plasma of SD rats. **Methods** CS55 was used as the internal standard. LH14 was chromatographed on Thermo-Finnigan TSQ Quantum with an Ultimate column C₁₈ (50 mm×2.1 mm 3 μm). The mobile phase was methanol-water at a flow rate of 0.2 ml/min. The column temperature was 25℃ and the injection volume was 5 μl. **Results** A good linear relationship was obtained between the peak area ratio of LH14/CS55 and the concentration of LH14 over the range of 2-500 ng/ml. The linear equation was $Y = 0.0333 + 0.0043X$, $R^2 = 0.9928$ ($n = 8$). The limit of quantitation was 2 ng/ml. **Conclusion** This method is simple, quick, accurate and suitable for the pharmacokinetic study of SD rats.

[Key words] LH14; HPLC-MS/MS; pharmacokinetic

LH14(结构式见图 1A)是一种新合成的化合物,具有抑制组蛋白脱乙酰基酶作用,组蛋白脱乙酰基酶在真核细胞染色体复制过程中起到至关重要的作用,从而 LH14 具有抑制肿瘤增生的药理活性^[1,2]。其结构类似药物 MGCD01039(结构式见图 1B)已进入临床评价阶段,但对于本药物在体液中色谱分析尚无报道。本研究建立 HPLC-MS/MS 法测定 LH14 在 SD 大鼠血浆内的浓度,方法简单、快速、专属性强。

1 材料

1.1 仪器 Finnigan TSQ Quantum Ultra 液相色谱-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 No. NSFC20903118

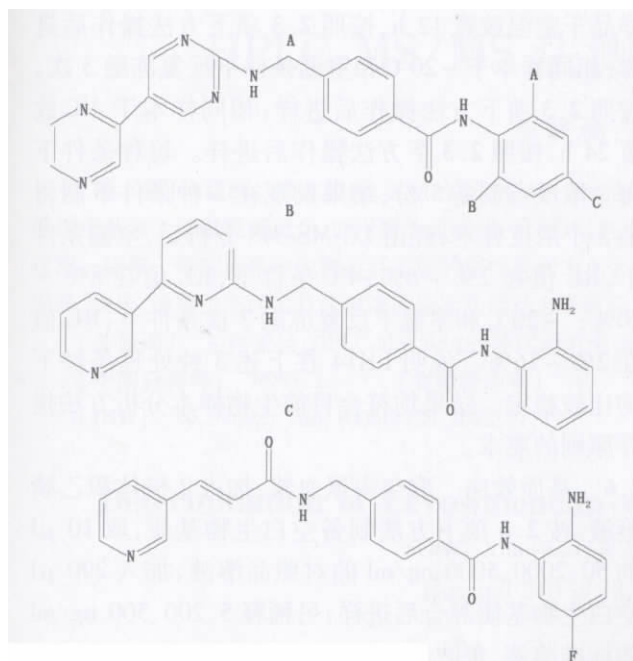
作者简介: 王 彬,硕士。研究方向: 药代动力学。

作者单位: ① 100853 北京,解放军总医院检验科; ② 100850 北京,军事医学科学院野战输血研究所

通讯作者: 甘 慧, Tel: (010) 66931993; E-mail: gan_huihui@yahoo.com.cn

质谱联用仪(Thermo Electron Corporation, Waltham, MA); 配有电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 四元泵; 自动进样器; 柱温箱; 真空脱气机; Xcalibur 2.0 数据处理系统(均为 Thermo Electron 公司)。3-48K 离心机(德国 Sigma 公司)。ME-235S 十万分之一精密电子天平(德国 Sartorius 公司)。
1.2 试药 LH14 对照品(纯度≥99.9%,军事医学科学院放射与辐射医学研究所,批号: 101117); 内标 CS55(纯度≥99.9%,深圳微芯生物技术有限公司提供,批号: 20030110)(结构式见图 1C); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 规格: 25 kg/袋,河北铭泰化工有限公司,批号: HV100216); 甲醇、乙腈为色谱纯; 水为自制三蒸水。

1.3 动物 SD 大鼠,♀,体质量 180~220 g,10~12 周龄(军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号: SCXK(军)2007-004,动物实验设施使用许可证号: SYXK(军)2007-004)。饲养环境: 温度: 20~25℃,日温



A: LH14; B: MGCD01039; C: CS55

图 1 结构式

差 $\leq 3^{\circ}\text{C}$ 相对湿度: 40% ~ 70% , 换气次数: 10 ~ 20 次/h, 气流速度: 0.1 ~ 0.2 m/s。压强梯度: 20 ~ 50 Pa, 空气洁净度 10 000 级, 落下菌数 ≤ 3 个/皿, 氨浓度 $\leq 14 \text{ mg/m}^3$, 噪声 $\leq 60 \text{ dB}$, 工作照度 150 ~ 300 lx, 动物照度 15 ~ 20 lx, 昼夜明暗交替 12 h。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制 (1) LH14 对照品溶液 精密称量 LH14 对照品 5.00 mg, 用含 25% DMSO 的甲醇配成 1 mg/ml 的贮备液, 用甲醇依次稀释成浓度为 20、50、100、200、500、1000、2000、5000 ng/ml 的对照品溶液。(2) 内标溶液 精密称量 CS55 对照品 5.00 mg, 用乙腈配成 1 mg/ml 的贮备液, 用乙腈稀释成浓度为 100 ng/ml 的内标溶液。

2.2 分组与给药 SD 大鼠, ♀, 12 只, 随机等分为 2 组, 即灌胃组和静脉给药组。灌胃组药物用含 0.5% CMC-Na, 1% 吐温-80, 0.1 mol/L HCl 的生理氯化钠溶液给药配成混悬液, 按体质量给药, 给药量为 25 mg/kg; 尾静脉给药组用 N,N-二甲基甲酰胺作溶剂, 按体质量给药, 给药剂量为 5 mg/kg。

2.3 血浆样品的预处理 采用乙腈使蛋白变性并离心沉淀血浆样品中蛋白的处理方式。取血浆 100 μl 加入 200 μl 内标溶液, 涡旋混合 3 min 后, 14 000 r/min 离心 30 min, 取上清液 200 μl 进样。

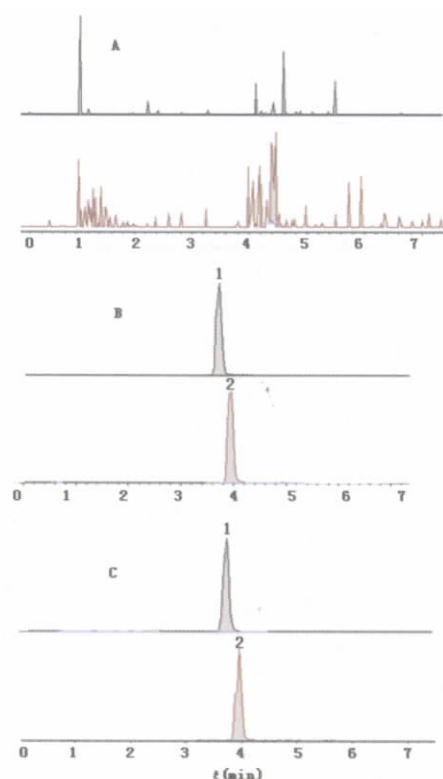
2.4 统计学处理 使用计算机程序 Excel for Windows 7.0a 版和 Microcal origin 7.5 进行数据处理和

制图。采用 WinNolin[®] ver 5.2 药代动力学数据处理软件拟合药动学参数, 按非房室模型用统计矩法进行拟合^[3]。

2.5 含量测定

2.5.1 LC-MS/MS 分析条件 (1) 色谱条件 Ultimate C₁₈ (50 mm $\times$ 2.1 mm 3 μm) 色谱柱为分析柱, 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 甲醇-水; 流速: 0.2 ml/min; 梯度洗脱: 0 ~ 1.5 min, 甲醇-水 (15: 85); 2 ~ 6 min, 甲醇-水 (95% : 5%); 6.5 ~ 7.5 min, 甲醇-水 (15% : 85%)。进样体积为 5 μl 。(2) 质谱条件 电离方式: ESI 源, 正离子检测; 毛细管温度 275 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾电压: 3700 V, 鞘气流速: 17 arb, 辅气流速: 3 arb; 碰撞气为氩气; 扫描方式: 选择反应检测 (SRM); 检测离子反应为 m/z 416.0 $\rightarrow$ 216.9, 289.9 (LH14) 碰撞能量: 22 eV; m/z 391.0 $\rightarrow$ 265.0 (内标) 碰撞能量: 22 eV; 分析时间: 7.5 min。

2.5.2 方法的专属性 取 SD 大鼠的空白血浆, 加入对照品的血浆、给药后血浆, 按照 2.3 项下操作, 得色谱图, 见图 2。内标物与待测物的保留时间分别为 3.72 和 3.95 min。结果表明, 待测物与内标能准确定量, 且血浆中内源性杂质不干扰测定。



A: 空白血浆; B: 空白血浆加入 LH14 (500 ng/ml);
C: SD 大鼠尾静脉给予 LH14 (5 mg/kg) 1h 后血浆样品;
1: 内标 CS55; 2: LH14

图 2 大鼠血浆样品色谱图

2.5.3 标准曲线的建立 取空白大鼠血浆 90 μl 加入 LH14 系列对照品溶液 10 μl , 配制成相当于浓度为 2、5、10、20、50、100、200、500 ng/ml 的对照品血浆溶液, 按照 2.3 项下方法操作。以血浆中待测物的浓度为横坐标, 待测物与内标的峰面积之比为纵坐标, 用加权最小二乘法 ($W = 1/C^2$) 进行回归计算, 所得标准曲线方程为:

$$Y = 0.0333 + 0.0043X, R^2 = 0.9928$$

结果表明, 在 2 ~ 500 ng/ml 范围内线性关系良好, 定量下限为 2 ng/ml。

2.5.4 精密度和准确度试验 制备低、中、高 (5、200、500 ng/ml) 3 个浓度的质控血浆样品, 每个浓度点 5 个样品, 按 2.3 项下方法, 依法与标准曲线同批测定, 重复测定 3 批, 以当日的标准曲线计算质控样品浓度。据此求算方法的精密度与准确度^[4]。

分析方法的准确度用相对误差表示 (relative error, RE), 即测定值的均值与理论值之间的百分误差。采用单因素方差分析法计算分析方法的批内和批间精密度。3 个浓度点的准确度、批内和批间精密度见表 1, 结果均符合目前生物样本分析方法指导原则的要求^[5 6]。

表 1 LH14 精密度与准确度测定结果 ($n = 5$)

加入浓度 (ng/ml)	测定浓度 (ng/ml)	准确度 RE (%)	RSD (%)	
			批内	批间
5	5.2	4.0	12.5	4.6
200	201.2	0.6	10.6	5.1
500	483.4	3.3	5.1	4.9

2.5.5 提取回收率 准确配制浓度为 5、200、500 ng/ml 的低、中、高 3 个浓度的 LH14 血浆溶液, 按照 2.3 项下方法操作, 记录 LH14 和内标峰面积比; 以 2.3 项下方法操作得到的空白血浆溶液溶解相应浓度的 LH14 对照品和内标, 每个浓度点平行操作 5 份, 结果见表 2。结果表明均符合目前生物样本分析方法指导原则的要求。

表 2 LH14 提取回收率测定结果 ($n = 5$)

加入浓度 (ng/ml)	测定浓度 (ng/ml)	回收率 (%)	RSD (%)
5	5.5	110.0	15.9
200	187.3	93.7	4.7
500	447.2	89.4	7.8

2.5.6 稳定性考察 对 LH14 在 3 种条件下进行稳定性考察: 配置浓度为 5、200、500 ng/ml 的血浆

样品于室温放置 12 h, 按照 2.3 项下方法操作后进样; 相同样本于 -20°C 和室温条件下反复冻融 3 次, 按照 2.3 项下方法操作后进样; 相同样本于 4°C 放置 24 h, 按照 2.3 项下方法操作后进样。每种条件下每个浓度点制备 5 份, 结果发现在 3 种条件下制得的 3 个浓度样本, 经由 LC-MS/MS 分析后, 室温条件下, RE 值在 2% ~ 6%; 4°C 条件下, RE 值在 8% ~ 20%; -20°C 和室温下反复冻融 3 次条件下, RE 值在 2% ~ 16%。说明 LH14 在上述 3 种处理条件下均比较稳定。结果均符合目前生物样本分析方法指导原则的要求。

2.6 基质效应 取空白鼠血浆, 加入 2 倍体积乙腈溶液, 按 2.3 项下方法制备空白生物基质, 取 10 μl 的 50、2000、5000 ng/ml 的对照品溶液, 加入 290 μl 空白生物基质混合后进样; 另稀释 5、200、500 ng/ml 的标准溶液, 每浓度点各加入二倍体积的乙腈溶液, 混合后分析测定。上述样本每个浓度点各 5 份, 计算加入生物基质和不加生物基质的待测物峰面积之比, 以考察血浆对待测物的质谱响应有无抑制效应, 即为基质效应 (matrix factor, MF)。当 MF 在 0.8 ~ 1.2 时, 认为无基质效应。结果受试 3 个浓度的 MF 在 0.9 ~ 1.0, 说明大鼠血浆对于化合物 LH14 无基质效应。

2.7 样品采集与测定结果 于给药前 0 h 及给药后 0.017、0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 经眼眶取血 0.5 ml, 置于肝素化管中, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血浆保存于 -20°C , 用经过确证的 LC-MS/MS 分析方法测定血浆中 LH14 浓度, 并记录色谱图和色谱峰面积。测得药-时曲线见图 3, 主要药代动力学参数见表 3。

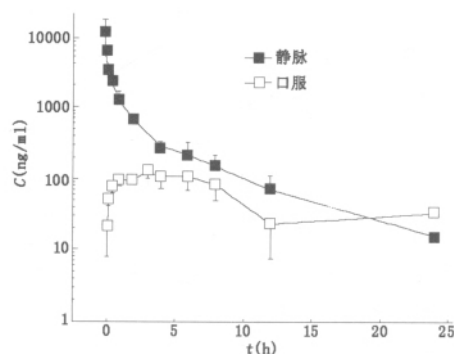


图 3 SD 大鼠单次口服 LH14 (25mg/kg) 及尾静脉给予 LH14 (5mg/kg) 的药-时曲线 ($n = 6$)

3 讨论

该实验开始阶段, 对于 LH14 对 (下转 44 页)

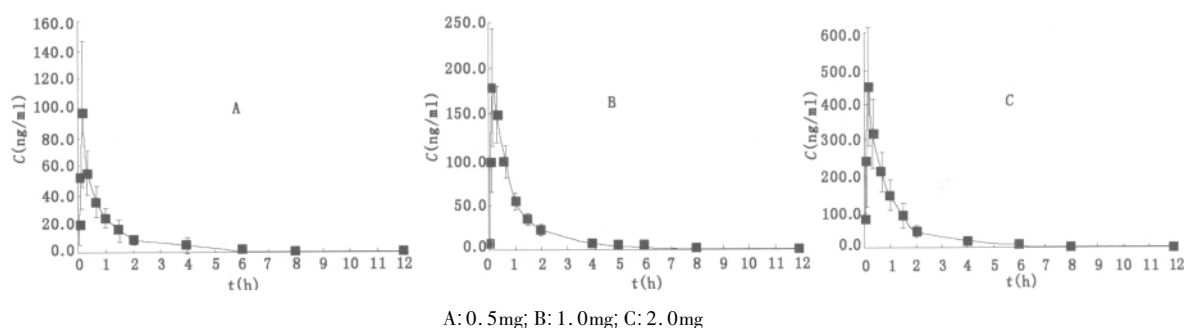


图 3 左西孟旦的平均血药浓度-时间曲线

3 结论

本文建立了 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中的左西孟旦。该方法精密、准确、快速,线性范围宽,可满足左西孟旦注射液在人体内的药代动力学研究。

[参考文献]

- [1] Zhao HL, Cui X, Wang BJ, et al. Pharmacokinetics of levosimendan administered as intravenous injection in Chinese healthy volunteers [J]. *J Chin Pharmaceut Sci*, 2007, 16(1): 61-64
- [2] Liu YF, Min S. Application and prospects of levosimendan in clinical anesthesia and intensive care units [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2008, 27: 212-215

- [3] Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bioanalytical method validation-A revisit with a decade of progress [J]. *Pharm Res*, 2000, 17: 1511-1517
- [4] Anttila S, Huuskonen H, Nevalainen T, et al. Site dependent bioavailability and metabolism of levosimendan in dogs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 1999, 9: 85-91
- [5] Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 269-296

(收稿日期: 2011-10-21; 修回日期: 2011-11-07)

(本文编辑 狄亚敏)

(上接 40 页)

表 3 灌胃和尾静脉注射 LH14 的主要药代动力学参数 ($n = 6$)

参数	尾静脉组 (25mg/kg)	灌胃组 (5mg/kg)
C_{max} (ng/ml)	11503.5 ± 5198.5	129.6 ± 23.9
T_{max} (h)	0.016	3.0
$AUC_{(0 \sim t)}$ (ng·h/ml)	6761.2 ± 1403.8	997.0 ± 251.6
$AUMC_{(0 \sim t)}$ (ng·h/ml)	20743.6 ± 9265.5	4937.9 ± 1690.3
MRT (h)	3.0 ± 0.9	4.8 ± 0.6
$t_{1/2}$ (h)	2.8 ± 0.7	2.9 ± 0.6

照品溶液的配制曾采用水、甲醇、乙腈等作溶剂,发现对照品均不能溶解。后采用含不同浓度的 DMSO 溶液作溶剂,发现浓度太高在 4℃ 条件会有晶体出现,浓度太低会有对照品析出,最终选定 25% DMSO 的甲醇溶液 LH14,发现溶解度良好。

本实验方法最低定量浓度为 2 ng/ml,已完全满足实验要求,且样品处理和测定过程简便,适合 SD 大鼠体内药代动力学研究。

[参考文献]

- [1] Nancy Z, Oscar M, Stephane R. Discovery of N-(2-Aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103), an orally active histone deacetylase inhibitor [J]. *Med. Chem.*, 2008, 51: 4072-4075
- [2] Stephane R, Nancy Z, Frederic G, et al. SAR and biological evaluation of analogues of a small molecule histone deacetylase inhibitor N-(2-Aminophenyl)-4-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)methyl]benzamide (MGCD0103) [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19: 644-649
- [3] 时美慧, 顾若兰, 甘慧, 等. 1,5-二咖啡酰奎宁酸与其四酰化物相对生物利用度的研究 [J]. *解放军药学报*, 2011, 27(4): 286-288
- [4] 丁建刚, 高允生, 刘江林, 等. HPLC-MS/MS 法测定比格犬血浆中丹参酮 II_A 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(5): 769-772
- [5] 萧参, 陈坚行. 生物药剂分析方法确证 [J]. *中国药学杂志*, 1993, 28(7): 425-429
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010. 附录 195-196

(收稿日期: 2011-07-22; 修回日期: 2011-09-26)

(本文编辑 金杨红)