

超高效液相色谱 – 三重四极杆质谱联用 检测 SD 大鼠血浆中罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物

LCMSMS-231

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用技术测定 SD 大鼠血浆中的罗氟司特及其代谢物罗氟司特 N- 氧化物的方法。SD 大鼠血浆样品经乙酸乙酯 / 正己烷 (1:1) 萃取后, 可在 6 min 内快速、准确地测定其中的罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物。本文考察了方法的线性、定量限、重复性、基质效应与回收率, 结果表明: 罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物在 0.05~25 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数大于 0.999; 方法定量限为 0.05 ng/mL; LLOQ(定量下限)、低、中、高及 ULOQ(定量上限) 浓度 QC 样品连续进样 6 次, 其精密度与准确度分别在 1.63 ~ 12.71% 与 103.41 ~ 106.57% 之间; 罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物低、中、高及 ULOQ 浓度样品基质效应因子在 91.75~101.92 % 之间, 内标基质效应因子分别为 105.67 % (D4- 罗氟司特)、103.29 % (D4- 罗氟司特 N- 氧化物); 回收率在 59.10~78.19 % 之间, 内标回收率为 76.93%。

关键词：罗氟司特 罗氟司特 N- 氧化物 SD 大鼠血浆 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种具有气流阻塞特征的慢性支气管炎和 (或) 肺气肿, 可进一步发展为肺心病和呼吸衰竭的常见慢性疾病。其发病多与有害气体及有害颗粒的异常炎症反应相关, 致残率和病死率很高。罗氟司特是一种新型 COPD 治疗药物, 它能够选择性抑制磷酸二酯酶 PDE4, 阻断炎症反应信号传递, 进而抑制如 COPD 和哮喘等呼吸道疾病对肺组织造成的损伤。罗氟司特口服进入机体后, 通过细胞色素氧化 P450(CYP)3A4 和

(CYP)1A2 酶代谢为 N- 氧化物。罗氟司特 N- 氧化物的活性仅比罗氟司特弱 2~3 倍, 也具有较高的 PDE4 选择性 (在人体约 90% 的 PDE4 抑制作用是由罗氟司特 N- 氧化物产生的, 另外 10% 为罗氟司特原型产生)。本文旨在建立一种考察 SD 大鼠血浆中罗氟司特及其代谢物罗氟司特 N- 氧化物含量的方法, 为进一步研究人体内药物代谢过程提供一种快速、灵敏、简便的检测方法。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.75 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III Column(2.0 mm I.D.×50 mm L., 1.6 μm)

流动相: A 相 -0.025 % 甲酸 -2 mM 乙酸铵水溶液;
B 相 - 甲醇

流速: 0.30 mL/min

进样体积: 20 μL

柱温: 40°C

样品温度: 6°C

洗针液: 50% 甲醇 -50% 水

洗针模式: 进样后洗针, External only(进样针外壁清洗)

洗针体积: 500 μL

洗脱方式: 采用梯度洗脱, B 相初始浓度为 15 %

时间程序见表 1

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	Pumps	Pump B Conc.	15
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Total Flow	0.4
4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
4.00	Pumps	Total Flow	0.4
4.30	Pumps	Pump B Conc.	15
4.30	Pumps	Total Flow	0.3
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式分析

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 2.0 L/min

干燥气: 氮气 6.0 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 200°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 15 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

名称	前体离子 [M+H] ⁺	产物离子 (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	碰撞能量 CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
罗氟司特	402.95	186.90*	-29.0	-28.0	-20.0
		240.95	-29.0	-19.0	-26.0
罗氟司特 N-氧化物	418.95	186.90	-30.0	-26.0	-20.0
		240.95	-30.0	-19.0	-26.0
D4-罗氟司特	406.95	245.00	15.0	-30.0	-19.0
D4-罗氟司特 N-氧化物	422.95	245.00	-30.0	-20.0	-26.0

*代表定量离子对

1.3 标准品与试剂

罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准品: 含量 99.7%, -20°C 保存, 有效期 2016 年 6 月。

D4-罗氟司特及 D4-罗氟司特 N-氧化物标准品 (内标): 含量 99.5%, -20°C 保存, 有效期 2016 年 6 月。

甲醇: Merck 公司, 色谱级, 室温保存, 有效期至 2017 年 2 月 28 日。

实验用水: 由 Milli-Q Plus 水净化系统 (Millipore, Ltd.) 经去离子与二次净化制得; 色谱级, 有效期为配制后 2 天。

甲酸: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 98%, 室温保存。

乙酸铵: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 99%, 室温保存。

1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准储备液：精密称定 1.03 mg、1.05 mg 罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准品，用甲醇溶解并定容至 1 mL 混匀，至适宜容器中于 -20℃冰箱保存，备用。

罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物中间储备液：分别吸取罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准储备液 97.4 μL 与 95.5 μL 至 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成 10.0 μg/mL 的中间储备液，至适宜容器中于 -20℃冰箱保存，备用。

罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准工作溶液：用甲醇配制浓度 0.5、1、2.5、5、10、25、50、100、250 ng/mL 罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准工作液（混标），临用前配制。

罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物物质控工作溶液：吸取适量罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物储备液，用甲醇分别配制成浓度为 0.5、1、10、100、250 ng/mL 质控工作液（混标）。

D4-罗氟司特及 D4-罗氟司特 N-氧化物标准储备液：精密称定 1.02 mg、1.03 mg 罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准品，用甲醇溶解并定容至 1 mL 混匀，至适宜容器中于 -20℃冰箱保存，备用。

D4-罗氟司特及 D4-罗氟司特 N-氧化物中间储备液：分别吸取罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物标准储备液 98.5 μL 与 97.6 μL 至 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成 10.0 μg/mL 的中间储备液，至适宜容器中于 -20℃冰箱保存，备用。

D4-罗氟司特及 D4-罗氟司特 N-氧化物（内标）标准工作溶液：用甲醇配制浓度为 50 ng/mL 标准工作液，临用前配制。

1.5 样品制备

标准曲线样品：取 SD 大鼠血浆 135 μL，加入 15 μL 标准对照工作液、20 μL 内标工作液、涡旋混合 30 s 后加入 1000 μL 乙酸乙酯 / 正己烷（体积比 1：1）涡旋混合 1 min，于 10000 rpm 离心 5 min；取上层清液 800 μL 于 EP 管中，氮气流吹干。用甲醇 - 水（体积比 7：3）溶液 100 μL 溶解吹干后样品管，涡旋混合 2 min 后于 13000 rpm 离心 5 min，取上层清液过滤，20 μL 进样 LC/MS/MS 分析。

质控样品：取 SD 大鼠血浆 135 μL，加入 15 μL 罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物的质控工作液（0.5 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL）、20 μL 内标工作液、其余处理过程同标准曲线样品。

基质样品：SD 大鼠血浆 135 μL，加入 1000 μL 乙酸乙酯 / 正己烷（体积比 1：1）涡旋混合 1 min，于 10000 rpm 离心 5 min；取上层清液 800 μL 于 EP 管中，氮气流吹干。加入 15 μL 罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物的标准工作液（1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL）、20 μL 内标工作液、甲醇 65 μL 溶解，涡旋混合 2 min 后于 13000 rpm 离心 5 min，取上层清液过滤，20 μL 进样 LC/MS/MS 分析。

回收率样品：取 SD 大鼠血浆 135 μL，加入罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物的标准工作液（1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL）、20 μL 内标工作液、其余处理过程同标准曲线样品。

工作液样品：取纯水 135 μL，加入 1000 μL 乙酸乙酯 / 正己烷（体积比 1：1）涡旋混合 1 min，于 10000 rpm 离心 5 min；取上层清液 800 μL 于 EP 管中，氮气流吹干。其余处理过程同基质样品。

注：

$$\text{基质效应}(\%) = \frac{\text{基质样品峰面积}}{\text{工作液样品峰面积}} \times 100\%$$

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{回收率样品峰面积}}{\text{基质样品峰面积}} \times 100\%$$

■ 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

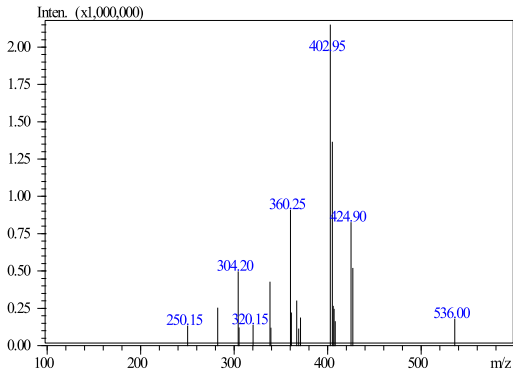


图1 罗氟司特一级质谱图

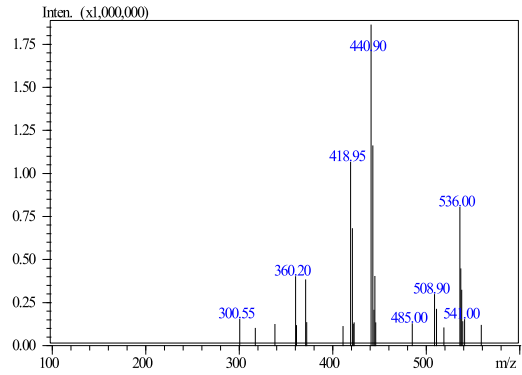


图2 罗氟司特N-氧化物一级质谱图

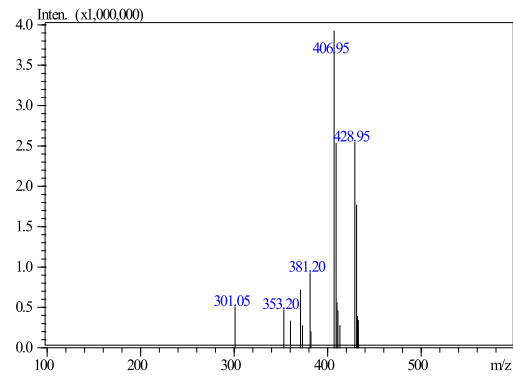


图3 D4-罗氟司特一级质谱图

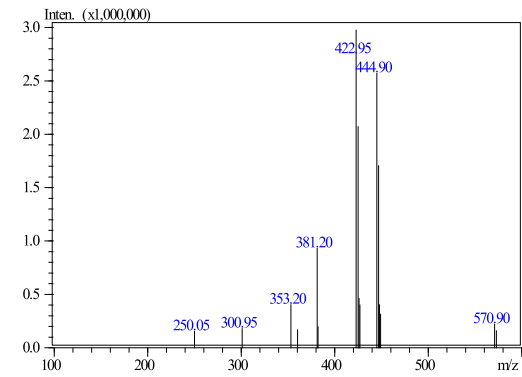


图4 D4-罗氟司特N-氧化物一级质谱图

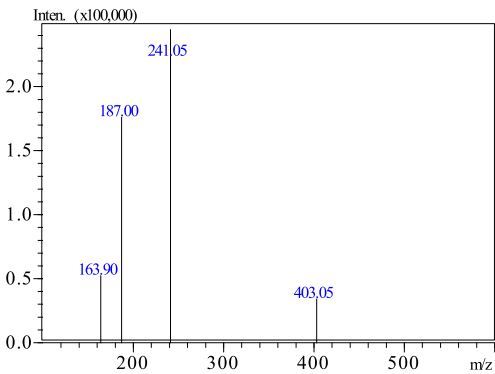


图5 罗氟司特产物离子质谱图(CE -20V)

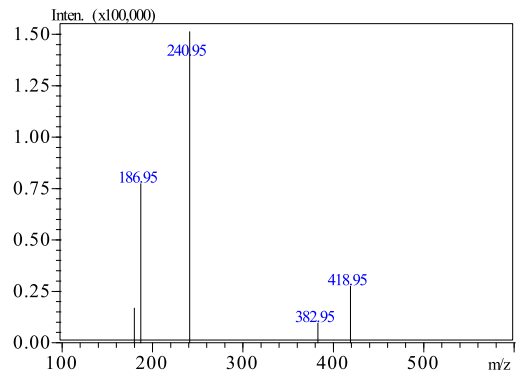


图6 罗氟司特N氧化物产物离子质谱图(CE -20V)

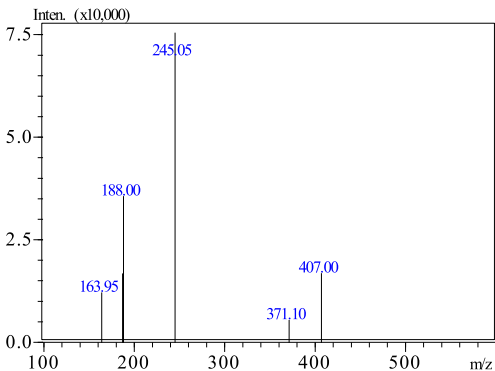


图7 D4-罗氟司特产物离子质谱图(CE -20V)

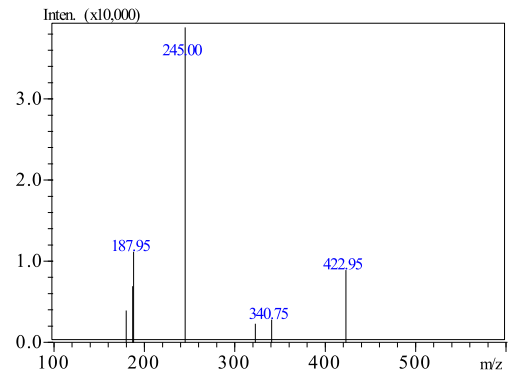


图8 D4-罗氟司特N氧化物产物离子质谱图(CE -20V)

2.2 选择性

取空白 SD 大鼠血浆匀浆 150 μ L, 按照样品处理方法制备, 结果如图 9~16 所示。结果显示, SD 大鼠空白血浆中目标化合物罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物及内标的通道均不干扰定量限样品的检测。

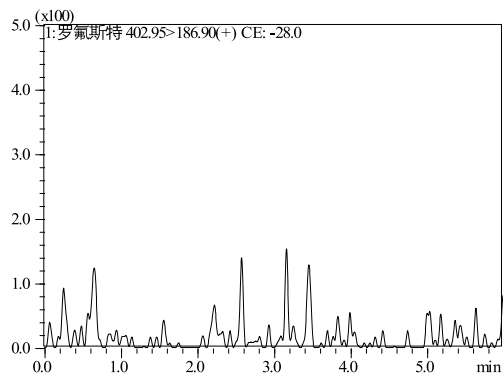


图9 空白血浆MRM谱图-罗氟司特

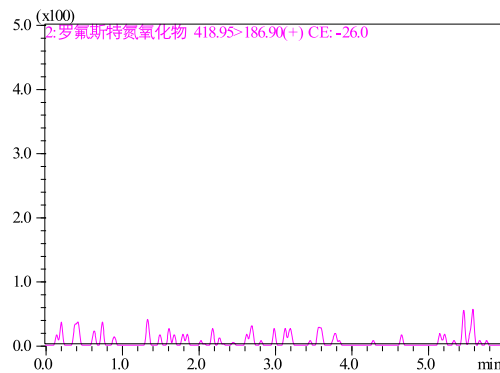


图10 空白血浆MRM谱图-罗氟司特N-氧化物

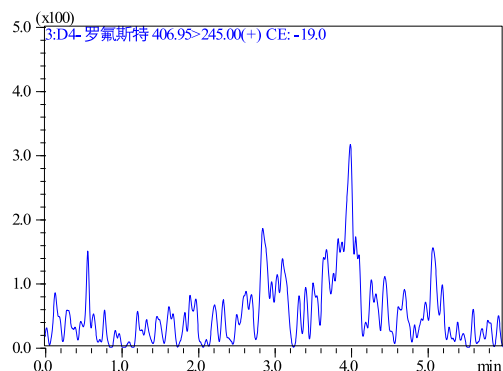


图11 空白血浆MRM谱图-D4-罗氟司特

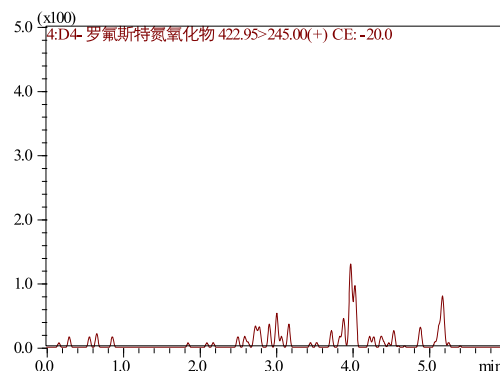


图12 空白血浆MRM谱图-D4-罗氟司特N-氧化物

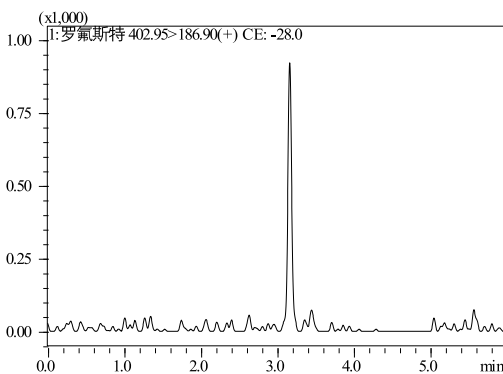


图13 血浆样品MRM谱图-罗氟司特STD1

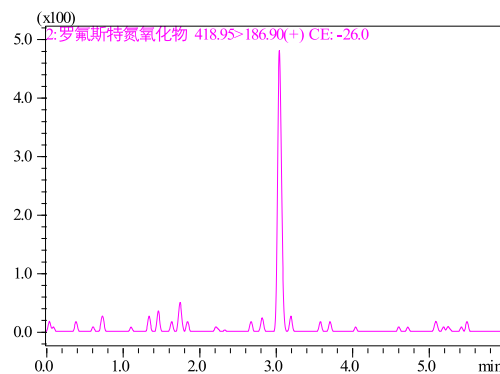


图14 血浆样品MRM谱图-罗氟司特N-氧化物STD1

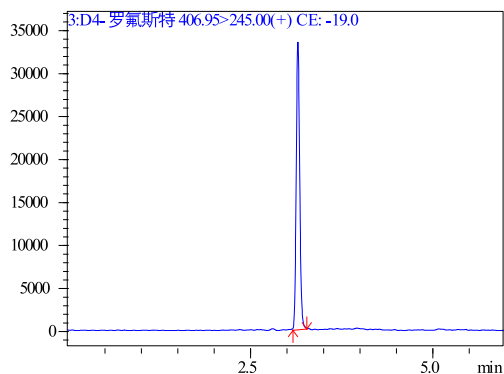


图15 血浆样品MRM谱图-D4-罗氟司特

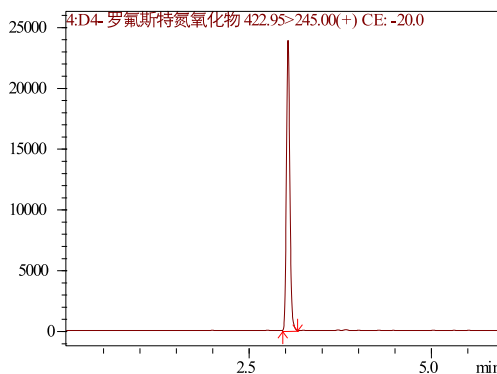


图16 血浆样品MRM谱图-D4-罗氟司特N-氧化物

2.3 线性范围

所得校准曲线样品浓度分别为 0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL。标准曲线如图 17、18 所示，线性方程及相关系数见表 3，其中 y 值代表待测物质与内标物质峰面积的比值，x 值代表血浆中待测物质浓度。罗氟司特及罗氟司特 N-氧化物定量限确定为 0.05 ng/mL(如图 19、20 所示)，在此浓度水平，6 次重复分析 RSD% 分别为 10.48%、6.18%，准确度为 108.00%、95.33%。

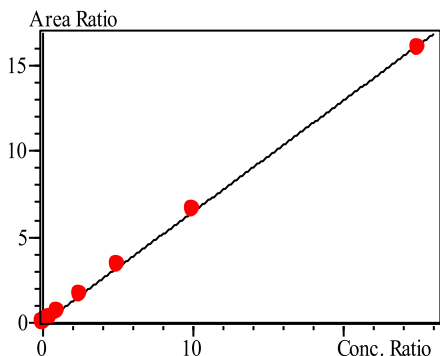


图17 罗氟司特校准曲线(0.05~25 ng/mL)

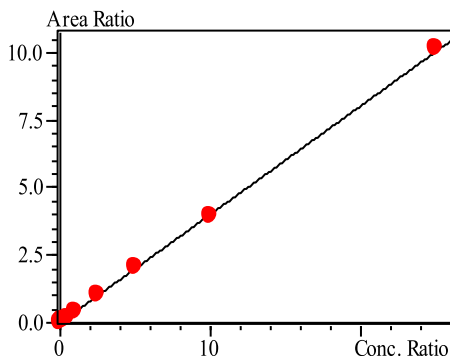


图18 罗氟司特N-氧化物校准曲线(0.05~25 ng/mL)

表3 罗氟司特及罗氟司特N-氧化物校准曲线参数 (线性回归, 权重为1/C)

名称	校准曲线	线性范围(ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
罗氟司特	$Y=0.649279X-0.00638492$	0.05~25	86.3~106.2 %	0.9997
罗氟司特 N-氧化物	$Y=0.402655X+0.00136119$	0.05~25	92.9~113.3 %	0.9998

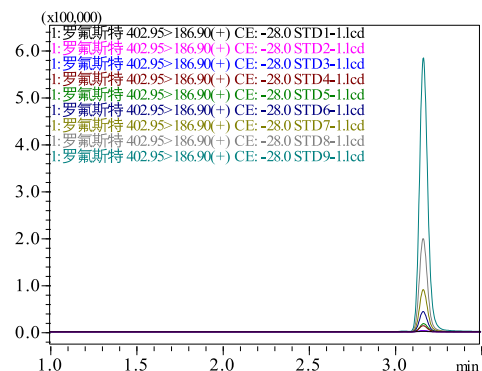


图19 罗氟司特MRM色谱图(标准曲线汇总)

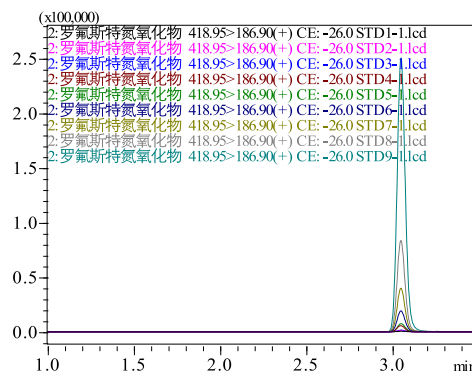


图20 罗氟司特N-氧化物MRM色谱图(标准曲线汇总)

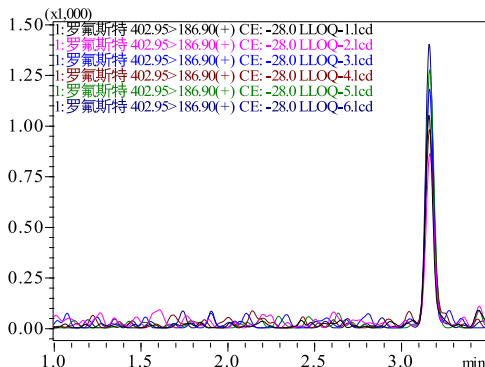


图21 罗氟司特MRM色谱图(LLOQ汇总,n=6)

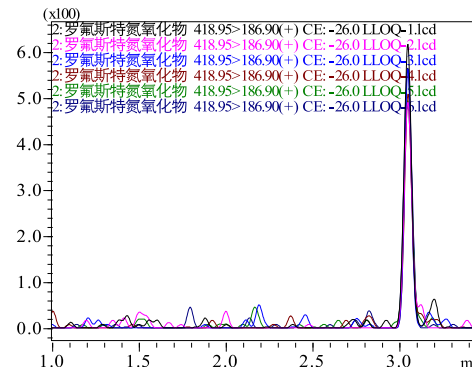


图22 罗氟司特N-氧化物MRM色谱图(LLOQ汇总,n=6)

2.4 基质效应及回收率

基质效应考察结果如表 4 所示、回收率考察结果如表 5 所示。

表4 基质效应(n=3)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	基质效应因子	
		罗氟司特	罗氟司特 N-氧化物
LQC	0.1	91.75 %	97.06 %
MQC	1	99.65 %	101.92 %
HQC	10	92.71 %	96.59 %
ULOQ	25	97.96 %	100.47 %
内标基质效应因子	/	105.67 %	103.29 %

结果表明，罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物低、中、高及 ULOQ 浓度样品基质效应因子在 91.75~101.92 % 之间，内标基质效应因子分别为 105.67%(D4- 罗氟司特)、103.29 %(D4- 罗氟司特 N- 氧化物)。

表5 回收率(n=3)

浓度水平	理论浓度 (ng/mL)	罗氟司特	罗氟司特 N-氧化物
LLOQ	0.05	62.52 %	70.98 %
LQC	0.1	72.14 %	72.29 %
MQC	1	78.19%	59.10%
HQC	10	76.84 %	59.21 %
ULOQ	25	76.21%	68.79%
内标回收率	/	76.93 %	/

结果表明，罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物 LLOQ、低、中、高及 ULOQ 浓度样品回收率在 59.10~78.19 % 之间，内标回收率为 76.93%。

2.5 精密度与准确度

考察五个浓度水平质控样品的日内精密度，结果如表 6 所示。

表6 方法精密度与准确度(n=6)

待测物质/样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%	待测物质/样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%
罗氟司特	0.05	10.48	罗氟司特 N-氧化物	0.05	6.18
	0.1	9.15		0.1	8.21
	1	3.64		1	7.09
	10	1.94		10	2.17
	25	2.46		25	1.84

结果表明，罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物 LLOQ、低、中、高及 ULOQ 浓度样品精密度在 1.84~10.48% 之间；准确度在 91.82~109.64% 之间。

2.6 残留

在高浓度样品 (STD10) 后进样分析空白样品, 考察罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物与内标残留情况。结果如图 23~26。

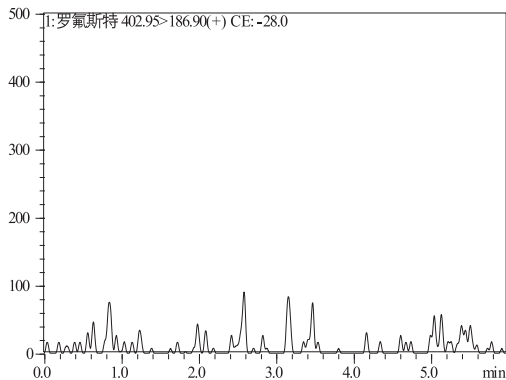


图23 罗氟司特残留考察

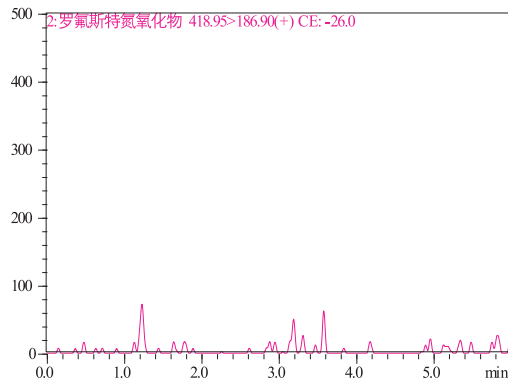


图24 罗氟司特N-氧化物残留考察

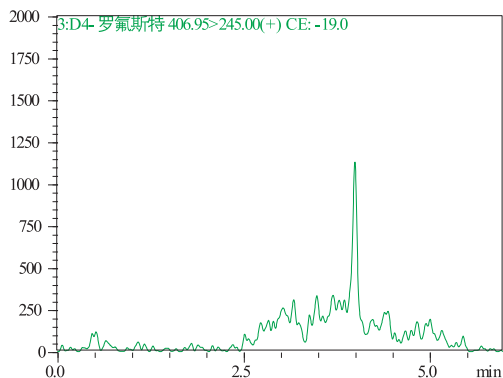


图25 D4-罗氟司特残留考察

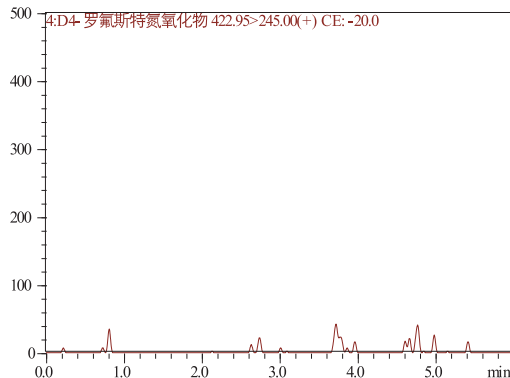


图26 D4-罗氟司特N-氧化物残留考察

结果表明, 在高浓度样品进样分析后进样分析空白样品, 显示罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物及内标物质检测通道均无目标化合物干扰。

结论

SD 大鼠血浆样品经乙酸乙酯 / 正己烷 (1:1) 萃取后, 可在 6 min 内快速、准确地测定其中的罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物。罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物在 0.05~25ng/mL 范围内线性良好, 相关系数大于 0.999; 方法定量限为 0.05 ng/mL; 不同浓度 QC 样品每批次连续进样 6 次, 其精密度与准确度分别在 1.63~12.71% 与 103.41~106.57% 之间; 罗氟司特及罗氟司特 N- 氧化物低、中、高及 ULOQ 浓度样品基质效应因子在 91.75~101.92 % 之间, 内标基质效应因子分别为 105.67 % (D4- 罗氟司特)、103.29 % (D4- 罗氟司特 N- 氧化物); 回收率在 59.10~78.19 % 之间, 内标回收率为 76.93%。该方法灵敏、稳定, 可以作为考察 SD 大鼠血浆中的罗氟司特及其代谢物的方法。