

# 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用检测人血浆中舒尼替尼及其代谢物 SU12662

## LCMSMS-343

**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人血浆中舒尼替尼及其代谢物 SU12662 的方法。人血浆样品经乙腈沉淀蛋白后可在 5 min 内快速、准确地测定其中的舒尼替尼及其代谢物 SU12662。本文考察了方法的专属性、线性、定量限、重复性、基质效应、残留；结果表明：舒尼替尼、SU12662 在 0.5~500ng/mL 范围内线性良好，相关系数均大于 0.99；方法定量限为 0.5 ng/mL。使用 LCMS-8045 系统，可以快速、灵敏、稳定的对人血浆中舒尼替尼及其代谢物 SU12662 含量进行检测，从而满足临床药代动力学研究需求。

**关键词:** 舒尼替尼 SU12662 超高效液相色谱三重四极杆质谱

舒尼替尼是一种能抑制多个受体酪氨酸激酶 (RTK) 的小分子靶向药，已被多个国家和地区推荐作为晚期肾细胞癌的一线治疗药物 (如美国、加拿大、欧洲、中国等)。研究表明，某些受体酪氨酸激酶参与了肿瘤生长、病理性血管形成和肿瘤转移过程。体外实验表明，舒尼替尼能抑制靶向受体酪氨酸激酶如：血小板衍生生长因子受体 (PDGFR)、神经胶质细胞系衍生的神经营养因子受体 (RET) 或干细胞因子受体 (KIT)；在表达某些受体酪氨酸激酶靶点的肿瘤模型中 (体内)，舒尼替尼能够抑制多个受体酪氨酸激酶如：PDGFR $\beta$ 、血管内皮生长

因子受体 (VEGFR2)、KIT 的磷酸化进程，从而抑制肿瘤生长和 / 或抑制肿瘤转移。

合作方旨在考察舒尼替尼多次给药后药物及其代谢产物在患者体内的累积情况和稳态血药浓度水平；进而与国外临床实验结果对比，以发现舒尼替尼在不同人种中的药代动力学差异。

本文主要建立一种快速、灵敏、稳定的人血浆中舒尼替尼及其代谢物含量检测的方法，以满足合作机构临床药代动力学研究的需求。

## 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-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30ACMP 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutionsLCMS 版色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱：Shimpack-GISS C18, 2.1 mm I.D.

$\times$ 100 mm L., 1.9  $\mu$ m

流动相：A 相 -0.2% 甲酸水溶液；

B 相 -0.2% 甲酸乙腈

流速：0.60 mL/min

进样体积：2  $\mu$ L

柱温：45 $^{\circ}$ C

样品盘温度：6 $^{\circ}$ C

洗针液：R3 为乙腈 - 水 - DMSO - 甲酸 (体积比

90:10:0.5:0.5)；R0 为乙腈 - 水 - 甲酸

(体积比 80:20:0.2) 溶液；清洗液体积

500 $\mu$ L。

洗针模式：进样前后洗针，External (进样针外壁清洗)，清洗泵  $\rightarrow$  清洗口。

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%。

表1 梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.00	Pumps	Total Flow	0.6
1.80	Pumps	Pump B Conc.	98
1.80	Pumps	Total Flow	1
3.90	Pumps	Pump B Conc.	98
3.90	Pumps	Total Flow	1
4.00	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Pumps	Total Flow	0.6
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式分析

加热模块温度: 400°C

离子源接口电压: 4.5 kV

接口温度: 300°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

驻留时间: 30 ms

加热气: 干燥空气 10.0 L/min

延迟时间: 3 ms

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

表2 MRM参数

名称	CAS No.	前体离子 [M+H] <sup>+</sup>	产物离子 (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	碰撞能量 CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
舒尼替尼 Sunitinib	557795-19-4	399.20	283.10*	-12.0	-25.0	-19.0
			326.15	-21.0	-20.0	-23.0
SU12662 N-Desethylsunitinib	356068-97-8	371.20	283.15*	-11.0	-19.0	-20.0
			326.15	-19.0	-15.0	-23.0
邻甲苯海拉明枸橼酸盐 Orphenadrine citrate	59277-89-3	270.10	181.10	-17.0	-18.0	-16.0

\*代表定量离子对

1.3 标准品与试剂

舒尼替尼: 舒尼替尼标准对照品 (含量 >99.0%), -20°C避光保存。

SU12662: SU12662 标准对照品 (含量 >99.0%), -20°C避光保存。

邻甲苯海拉明枸橼酸盐 (内标): 邻甲苯海拉明枸橼酸盐标准对照品, 室温保存。

甲醇: Merck 公司, 色谱级, 室温保存。

乙腈: Merck 公司, 色谱级, 室温保存。

DMSO: 成都科龙化工有限公司, 分析纯, 室温保存。

实验用水: 由 Milli-Q Plus 水净化系统经去离子与二次净化制得。

甲酸: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 98%, 室温保存。

#### 1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

舒尼替尼标准储备液：精密称定 1.12 mg 舒尼替尼标准对照品，DMSO 溶解，用甲醇稀释至 10.0 μg/mL，于 -20℃ 冰箱避光保存，备用。

SU12662 标准储备液：精密称定 1.03 mg SU12662 标准对照品，用甲醇稀释至 10.0 μg/mL，于 -20℃ 冰箱避光保存，备用。

舒尼替尼及 SU12662 工作溶液：吸取适量舒尼替尼及 SU12662 储备液以体积比 1:1 混合，用甲醇配制浓度为 10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000、10000 ng/mL (舒尼替尼、SU12662) 工作液；至适宜容器中于 -20℃ 冰箱避光保存，备用。

邻甲苯海拉明枸橼酸盐 (内标) 标准储备液：精密称定 1.09 mg 邻甲苯海拉明枸橼酸盐标准对照品，用乙腈溶解，至适宜容器中于 4℃ 冰箱保存备用。

邻甲苯海拉明枸橼酸盐 (内标) 标准工作溶液：用乙腈配制浓度为 5 ng/mL 标准工作液，至适宜容器中于 4℃ 冰箱保存，备用。

#### 1.5 样品制备

标准曲线样品：取人血浆 95 μL，加入 5 μL 标准混合对照工作液，涡旋混合 30 s 后加入 400 μL 含内标的乙腈 (内标浓度为 5 ng/mL)，涡旋混合 1 min 后于 14000 rpm 离心 10 min；取上层清液 300 μL，以 2 μL 进样 LC-MS/MS 分析。

质控样品：取人血浆 95 μL，加入 5 μL 舒尼替尼及 SU12662 质控工作液、其余处理过程同标准曲线样品。低、中、高质控样品浓度分别为 1.5 ng/mL、8.5 ng/mL、450 ng/mL。

基质样品：人血浆 95 μL，400 μL 乙腈涡旋混合 1 min，加入 5 μL 标准混合对照工作液、5 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 95 μL，加入 5 μL 标准混合对照工作液、其余处理过程同标准曲线样品。

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

## 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

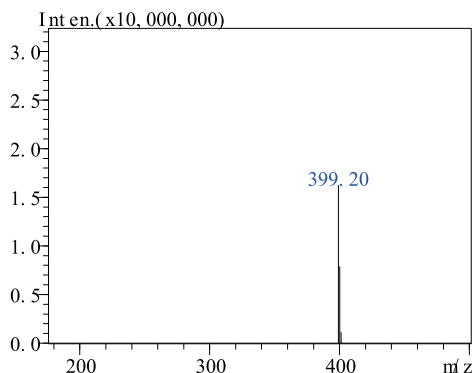


图1 舒尼替尼一级质谱图

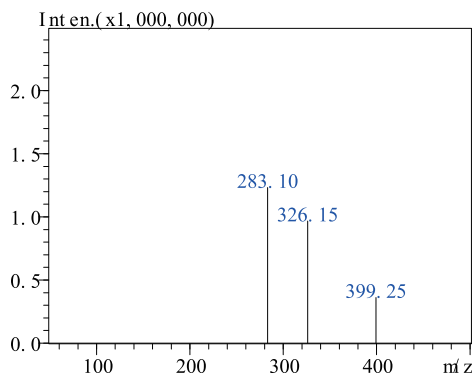


图2 舒尼替尼产物离子扫描质谱图

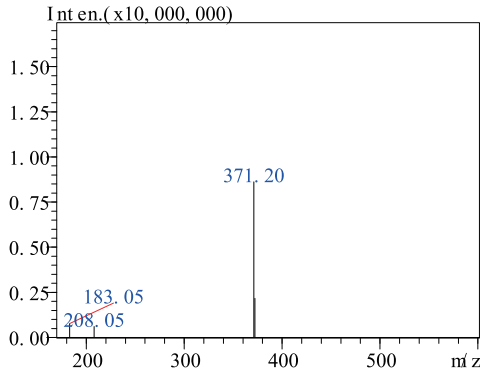


图3 SU12662一级质谱图

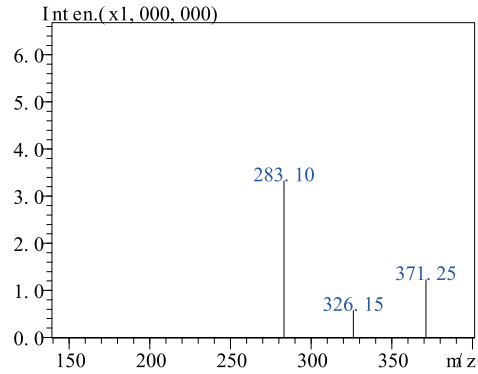


图4 SU12662产物离子扫描质谱图

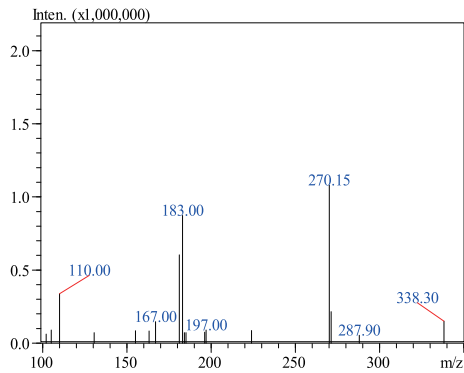


图5 内标-邻甲苯海拉明一级质谱图

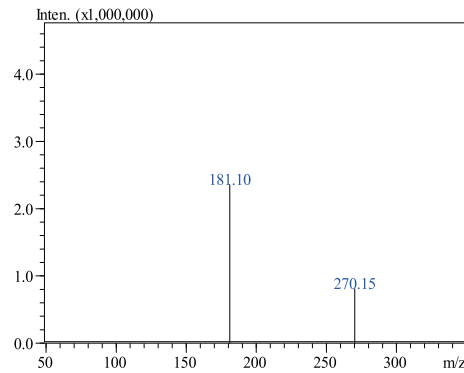


图6 内标-邻甲苯海拉明产物离子扫描质谱图

## 2.2 选择性

取空白人血浆 100  $\mu$ L, 按照样品处理方法制备, 结果如图 7~12 所示。结果显示, 人空白血浆中目标化合物舒尼替尼、SU12662 及内标的通道均不干扰定量限样品的检测。

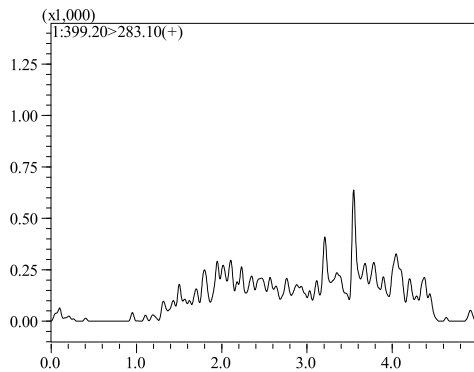


图7 空白血浆MRM谱图-舒尼替尼

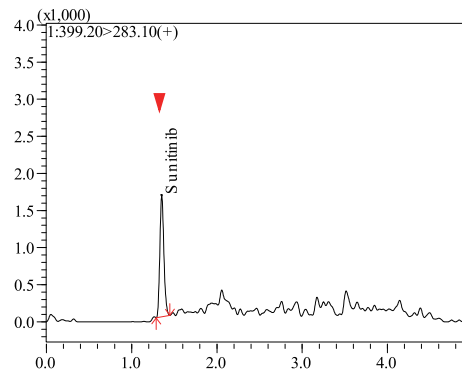


图8 血浆样品MRM谱图-舒尼替尼(0.5 ng/mL)

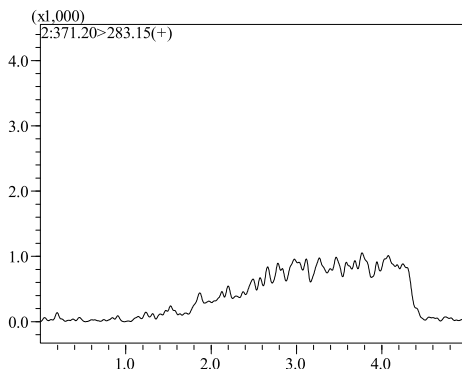


图9 空白血浆MRM谱图-SU12662

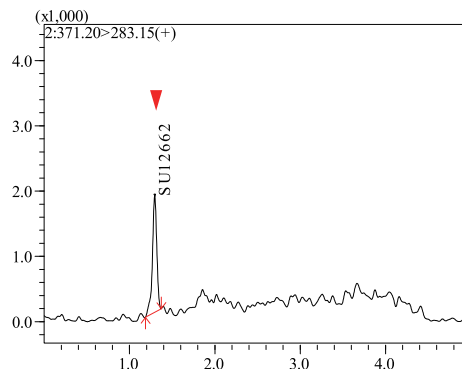


图10 血浆样品MRM谱图-SU12662(0.5 ng/mL)

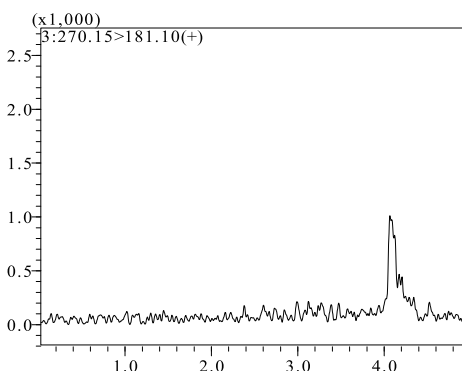


图11 空白血浆MRM谱图-IS

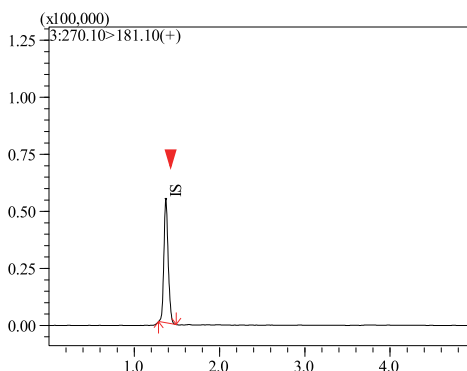


图12 血浆样品MRM谱图-IS

### 2.3 线性范围

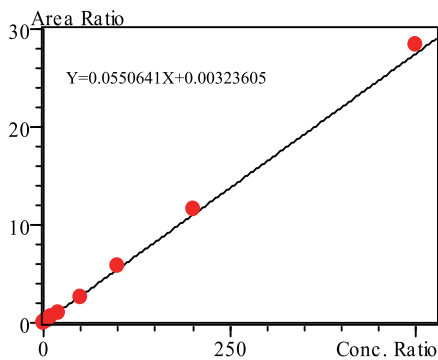


图13 舒尼替尼血浆校准曲线

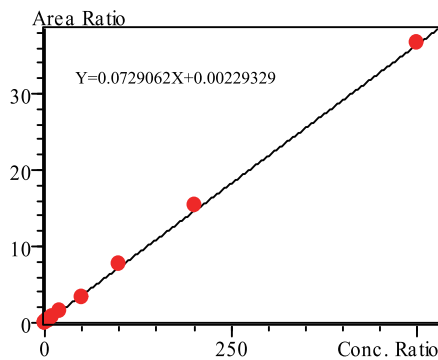


图14 SU12662血浆校准曲线

人血浆配制校准曲线样品浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL(舒尼替尼、SU12662)。标准曲线如图 13、14 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比。

表3 舒尼替尼、SU12662校准曲线参数(线性回归，权重为1/C<sup>2</sup>)

名称	校准曲线	线性范围(ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
舒尼替尼	Y=0.0550641X+0.00323605	0.5~500	91.6~104.8	0.9982
SU12662	Y=0.0729062X+0.00229329	0.5~500	93.3~105.3	0.9992

## 2.4 基质效应

基质效应考察结果如表 4 所示。

表4 基质效应(n=3)

浓度水平	基质效应 (%)			
	理论浓度 (ng/mL)	舒尼替尼	理论浓度 (ng/mL)	SU12662
LLOQ	0.5	100.87	0.5	93.67
LQC	1.5	106.19	1.5	97.83
MQC	8.5	104.44	8.5	108.33
HQC	450	97.71	450	100.25
内标	100.2			

结果表明, 舒尼替尼、SU12662 及内标的基质效应在 93.67~108.33% 之间。

## 2.5 精密度与准确度

考察三个浓度水平质控样品的日内精密度, 结果如表 5 所示。

表5 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%
舒尼替尼	0.5	9.04	SU12662	0.5	11.64
	1.5	3.87		1.5	5.76
	8.5	5.37		8.5	2.18
	450	1.57		450	2.08
		104.93		90.77	
		105.25		95.32	
		109.09		111.88	
		99.07		102.15	

结果表明, 舒尼替尼、SU12662 日内精密度在 1.57~11.64% 之间; 准确度在 90.77~109.09% 之间。

## 2.6 残留

在高浓度血浆样品 (500 ng/mL) 后进样分析空白样品, 结果舒尼替尼、SU12662 及内标物质检测通道均无目标化合物干扰。

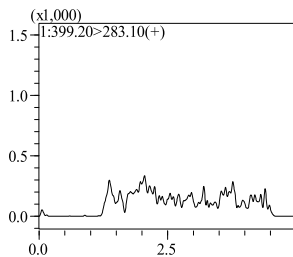


图15 舒尼替尼残留考察图谱

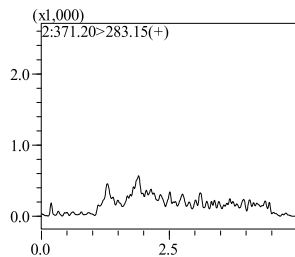


图16 SU12662残留考察图谱

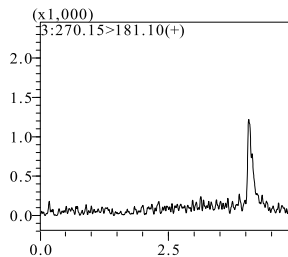


图17 内标残留考察图谱

## 2.7 室温稳定性

考察三个浓度水平质控样品的室温避光放置 3 h 稳定性, 结果如表 6。

表6 室温稳定性(n=3)

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%
0.5	5.32	108.67	0.5	4.47	100.07
舒尼替尼 8.5	5.60	100.03	SU12662 8.5	2.06	106.65
450	0.43	100.05	450	0.13	101.94

结果表明, 含舒尼替尼、SU12662 血浆样品室温避光放置 3 h 内稳定。

## 2.8 进样盘稳定性

考察三个浓度水平质控样品处理后于 6°C进样盘中放置 24 h 后稳定性, 结果如表 7。

表7 进样盘稳定性(n=3)

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%
0.5	6.47	112.40	0.5	13.46	94.67
舒尼替尼 8.5	3.16	100.06	SU12662 8.5	0.91	96.92
450	1.25	98.59	450	1.93	101.35

结果表明, 含舒尼替尼、SU12662 血浆样品处理后于 6°C进样盘中放置 24 h 后稳定。

## 2.9 反复冻融稳定性

考察三个浓度水平质控样品反复三次冻融稳定性 (于 -20°C至室温避光), 结果如表 8。

表8 冻融稳定性(n=3)

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%
0.5	7.84	97.67	0.5	6.39	88.53
舒尼替尼 8.5	5.31	103.77	SU12662 8.5	1.41	104.12
450	0.56	101.31	450	0.99	103.65

结果表明, 含舒尼替尼、SU12662 血浆样品反复冻融三次后稳定。

## 2.10 长期稳定性

考察三个浓度水平质控样品 -20°C冰箱放置 15 天稳定性, 结果如表 9 所示。

表9 冻存稳定性(n=3)

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%
0.5	5.41	98.00	0.5	3.06	93.73
舒尼替尼 8.5	1.65	99.00	SU12662 8.5	4.38	96.80
450	1.10	99.65	450	0.62	101.02

结果表明, 含舒尼替尼、SU12662 血浆样品于 -20°C条件放置 15 天内稳定。

## ■ 结论

舒尼替尼、SU12662 在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数均大于 0.99 ; 方法定量限为 0.5 ng/mL(舒尼替尼、SU12662); 舒尼替尼、SU12662 低、中、高浓度样品日内精密度在 1.57~11.64% 之间; 准确度在 90.77~109.09% 之间; 舒尼替尼、SU12662 低、中、高浓度样品及内标的基质效应在 93.67~108.33% 之间。舒尼替尼进样后残留较为严重; 为去除进样针外壁残留, R3 强洗溶液使用乙腈 - 水 -DMSO- 甲酸 ( 体积比 90:10:0.5:0.5); 残留的去除保证了检测方法的可靠。

使用 LCMS-8045 系统, 可以快速、灵敏、稳定的对人血浆中舒尼替尼及其代谢物 SU12662 含量进行检测, 从而满足合作方临床药代动力学研究需求。