

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.09.1063

UHPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中环磷酰胺及其代谢物的浓度

陈力^{1,2△}, 熊筱娟^{2△}, 高守红¹, 翟健秀^{1,3}, 陈万生¹, 刘震¹, 黄宏伟², 张凤^{1*}

1. 第二军医大学长征医院药材科, 上海 200003

2. 宜春学院化学与生物工程学院, 宜春 336000

3. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110015

[摘要] **目的** 建立利用超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)法同时测定大鼠血浆中环磷酰胺及其代谢产物(羧基磷酰胺、4-酮基环磷酰胺和脱氯乙基环磷酰胺)浓度的方法。**方法** 以 Agilent poroshell SB-C₁₈ 柱(75 mm×2.1 mm, 2.7 μm)为色谱柱, 甲醇-10 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.25 mL/min, 柱温 25℃, 进样量 5 μL; 质谱采用电喷雾离子源(ESI), 选择多重反应离子监测(MRM)正离子模式。取 8 只成年雄性 SD 大鼠分离获得血浆样品, 测定血浆样品中环磷酰胺及其代谢产物的血药浓度和药代动力学参数。**结果** 方法学验证表明, 环磷酰胺、羧基磷酰胺、4-酮基环磷酰胺在浓度为 20~4 000 ng/mL 范围内线性关系良好(*r* 分别为 0.998 0、0.995 3 和 0.998 6), 脱氯乙基环磷酰胺在浓度为 5~1 000 ng/mL 范围内线性关系良好(*r*=0.996 8)。日内、日间相对标准差(RSD)对于质控(QC)样品和最低定量限(LLOQ)样品分别小于 8.73% 和 15.38%, 基质因子的 RSD 均在 -15%~15% 之间, 提取回收率均在 (66.44±5.53)%~(96.66±1.73)% 之间; 所有待测化合物的稳定性均表现良好。大鼠血浆中各化合物药代动力学参数如下: 环磷酰胺、羧基磷酰胺、4-酮基环磷酰胺和脱氯乙基环磷酰胺的 *C*_{max} 分别为 (207.52±13.20)、(18.47±2.66)、(6.59±1.33) 和 (8.27±1.44) μg/mL, *T*_{1/2} 分别为 (1.28±0.09)、(5.03±0.48)、(6.72±0.47) 和 (7.47±0.68) h, *AUC*_{0-∞} 分别为 (372.52±32.79)、(65.70±5.04)、(33.26±11.76) 和 (45.03±8.93) μg·h·mL⁻¹。**结论** 该方法操作简单、灵敏、准确、专属性强, 适用于高剂量环磷酰胺在大鼠血浆中药代动力学研究。

[关键词] 环磷酰胺; 代谢; 超高效液相色谱-串联质谱法; 药代动力学

[中图分类号] R 979.11; R 965.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)09-1063-07

UHPLC-MS/MS in simultaneous determination of cyclophosphamide and its metabolites in rat plasma

CHEN Li^{1,2△}, XIONG Xiao-juan^{2△}, GAO Shou-hong¹, ZHAI Jian-xiu^{1,3}, CHEN Wan-sheng¹, LIU Zhen¹, HUANG Hong-wei², ZHANG Feng^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. College of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, Jiangxi, China

3. College of Traditional Chinese Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To establish a UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of cyclophosphamide (CTX) and its metabolites in rat plasma, including carboxyphosphamide (CPM), 4-ketocyclophosphamide (4-Keto CTX), and dechloroethylcyclophosphamide (DC-CTX). **Methods** Chromatogram separation was performed on an Agilent poroshell SB-C₁₈ (75 mm×2.1 mm, 2.7 μm) column using a gradient mobile phase consisting of methanol and 10 mmol/L ammonium acetate aqueous solution. The flow rate was 0.25 mL/min, column temperature was maintained at 25℃, and the injection volume was 5 μL. The protonated ions of analytes were detected in positive ionization under multiple reaction monitoring mode (MRM) with an electrospray ionization (ESI) source. The plasma samples were obtained from eight adult male SD rats to measure plasma concentrations and pharmacokinetic parameters of cyclophosphamide and its metabolites. **Results** It was showed that the linear relationships of CTX, CPM and 4-Keto CTX were good in the range of 20-4 000 ng/mL (*r* values were 0.998 0, 0.995 3 and 0.998 6, respectively), and the linear relationship of DC-CTX was good in the range of 5-1 000 ng/mL (*r*=0.996 8). Relative standard deviation (RSD) of intra-day and inter-day for the quality control (QC) samples and the lower limit of quantitation

[收稿日期] 2016-03-26 **[接受日期]** 2016-06-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81573793). Supported by National Natural Science Foundation of China (81573793).

[作者简介] 陈力, 硕士生. E-mail: chli0909@163.com; 熊筱娟, 教授. E-mail: ycxxxj@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-60748767, E-mail: fengzhangky@aliyun.com

(LLOQ) samples were lower than 8.73% and 15.38%, respectively. RSD for matrix factor were in the range of -15%~15%, and the recoveries were in the range of (66.44±5.53)% - (96.66±1.73)%. All analytes showed good stability. The rat plasma pharmacokinetic parameters were as follows: C_{max} of CTX, CPM, 4-Keto CTX and DC-CTX were (207.52±13.20) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (18.47±2.66) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, (6.59±1.33) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and (8.27±1.44) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively; $T_{1/2}$ were (1.28±0.09) h, (5.03±0.48) h, (6.72±0.47) h and (7.47±0.68) h, respectively; and $AUC_{0\rightarrow t}$ were (372.52±32.79) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, (65.70±5.04) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, (33.26±11.76) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ and (45.03±8.93) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusion** The established UHPLC-MS/MS method is simple, sensitive, accurate and selective, which makes it suitable for the comprehensive pharmacokinetic study of high-dose CTX in rat plasma.

[Key words] cyclophosphamide; metabolism; ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; pharmacokinetics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(9): 1063-1069]

环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)作为一种烷化剂类抗肿瘤药物,临床上常用于治疗多发性骨髓瘤、急性或慢性淋巴细胞白血病等疾病^[1-2]。CTX原型无活性,主要通过代谢酶 CYP2B6、CYP2C9/19 及 CYP3A 作用生成磷酰胺氮芥并与 DNA 发生交叉连接,阻断 DNA 的合成,抑制肿瘤细胞的生长繁殖^[3]。据报道,临床上相同剂量 CTX 在不同个体间的代谢速度差异很大(15~50 倍不等);另外,临床上使用高剂量 CTX(>1.0 g/m²)进行冲击治疗时,其代谢比常规剂量(0.12~0.24 g/m²)更为复杂,主要表现为 CTX 及其代谢物的药代动力学行为不同于常规剂量,并且毒性代谢物生成量相对较高,不良反应发生率上升^[4]。

关于 CTX 及其代谢物含量的监测方法在国内外已有诸多报道,近年来常规的检测方法有 HPLC、GC-MS/MS 或 LC-MS/MS 法,多数检测方法仅检测其中 1 种或 2 种化合物,并且大多数是测定常规剂量或小剂量 CTX 给药后的血药浓度^[5-9]。Kalthorn 等^[10]和 Sadagopan 等^[11]虽然对 CTX 的活性代谢产物 4-羟基环磷酰胺和磷酰胺氮芥进行了测定,但由于这两种化合物十分不稳定(其中 4-羟基环磷酰胺的消除半衰期仅 4 min),对实验环境和实验者要求很高,实际应用较为局限。因此,本课题通过监测其他 4 种化合物来间接反映这些活性及毒性产物的生成情况。为了有效监测 CTX 及其代谢产物的浓度,本研究采用 UHPLC-MS/MS 系统建立了快速、灵敏的检测方法,为 CTX 高剂量给药后大鼠的药代动力学研究及临床安全用药提供参考依据。

1 仪器和试剂

1.1 仪器设备 Agilent 1290 超高效液相色谱仪、G6460 型三重四级杆串联质谱仪、Agilent Masshunter B.06.00 工作站(Agilent 公司,美国);CPA225D 十万分之一天平(Sartorius 公司,德国);labnet VX-200 漩涡混合仪(Labnet 公司,美国);5810R 型低温高速离心机、微量移液器(Eppendorf

公司,德国);真空浓缩离心机(Gene 公司,中国香港);DAS 2.0 统计学软件(中国药理学会)。

1.2 实验试剂 羧基磷酰胺(carboxy phosphamide, CPM)对照品(批号:C181350,纯度:96%)、4-酮基环磷酰胺(4-ketocyclophosphamide, 4-Keto CTX)对照品(批号:O849900,纯度:98%)、脱氯乙基环磷酰胺(dechloroethylcyclophosphamide, DC-CTX)对照品(批号:D226400,纯度:96%)均购自加拿大 TRC 公司;CTX 对照品(批号:079K1569,纯度:99%)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;替硝唑(timidazole, TNZ;批号:10036-200703,纯度>98%)购自中国食品药品检定研究院。CTX 粉针(规格:0.2 g/瓶,批号:5A047B)购自德国 Baxer 公司;医用生理盐水(第二军医大学长征医院);甲醇、乙腈及乙酸铵为色谱纯,其他试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 UHPLC-MS/MS 条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent poroshell SB-C₁₈(75 mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相:10 mmol/L 乙酸铵溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱程序如下:0~0.5 min, 10%~15%(B);0.5~0.6 min, 15%~30%(B);0.6~3.7 min, 30%~90%(B);流速:0.25 mL/min;柱温:25℃;进样量:5 μL ;分析时间:3.7 min。

2.1.2 质谱条件 离子源参数:电喷雾离子源(ESI);鞘气流:350℃, 12 L/min;干燥气:325℃, 10 L/min;碰撞气压力:40 psi(1psi=6 894.8 pa);毛细管电压:4 000 V;监测模式:多重反应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM)正离子模式;离子通道:CTX $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 261.10→140.10,碰撞诱导解离电压(F)=135 V,碰撞能量(CE)=22 eV;CPM $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 293.10→221.10, F=90 V, CE=15 eV;4-Keto CTX $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 275.10→142.10, F=125 V, CE=27 eV;DC-CTX $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 199.20→78.00, F=120 V, CE=

21 eV;内标 TNZ $[M+H]^+$ m/z 248.10 \rightarrow 121.10, $F=90$ V, $CE=14$ eV.

2.2 实验溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 分别精密称取 CTX、CPM、4-Keto CTX、DC-CTX 及 TNZ 适量,加甲醇溶解制成浓度均为 2 mg/mL 的储备液。以 10%乙腈作为稀释剂制备 8 个水平的标准曲线工作溶液:CTX、4-Keto CTX 及 CPM 浓度均为 80、40、20、8、4、2、0.8、0.4 μ g/mL, DC-CTX 浓度为 20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.1 μ g/mL;3 个水平的质控 (quality control, QC) 工作液:CTX、4-Keto CTX 及 CPM 浓度均为 0.8、4、20 μ g/mL, DC-CTX 浓度为 0.2、1、5 μ g/mL。储备液贮藏于一20 $^{\circ}$ C 冰箱,工作液贮藏于 4 $^{\circ}$ C 冰箱。TNZ 用乙腈溶解配制成 6 ng/mL 的溶液备用。

2.2.2 标准曲线血浆添加样品和 QC 样品配制 分别精密移取 50 μ L 各对照品 8 个水平的标准曲线工作溶液于 1.5 mL 的离心管中,再精密移取 950 μ L 大鼠空白血浆于各管中,涡旋混匀即得 8 个水平的标准曲线血浆添加样品:CTX、4-Keto CTX 及 CPM (4 000、2 000、1 000、400、200、100、40、20

ng/mL), DC-CTX (1 000、500、250、100、50、25、10、5 ng/mL)。低、中、高 3 个水平的 QC 样品浓度如下: CTX、4-Keto CTX 及 CPM 均为 40、200、1 000 ng/mL, DC-CTX 为 10、50、250 ng/mL。

2.3 血浆样品预处理 大鼠血浆样品取出后置于室温条件下融化。取血浆 30 μ L 加 870 μ L 生理盐水进行稀释。涡旋混匀 30 s,取 100 μ L 稀释样品置于 1.5 mL 的离心管中,加入内标 TNZ (6 ng/mL) 的乙腈溶液 400 μ L,涡旋混匀 1.5 min。4 $^{\circ}$ C 21 912.8 $\times g$ 离心 15 min,取上清 100 μ L 加 10%乙腈 400 μ L 稀释后,涡旋混匀 30 s。4 $^{\circ}$ C 21 912.8 $\times g$ 离心 15 min,离心 5 min,取上清进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 质谱条件 取储备液用 10%乙腈稀释制备成浓度均为 200 ng/mL 的 CTX、CPM、4-Keto CTX、DC-CTX 及 TNZ 标准品溶液,按照 2.1 项下条件进样分析,经过对质谱参数的优化使各化合物响应最佳,同时各化合物之间不产生相互干扰,在质谱 product ion 监测模式下,各化合物的二级产物离子图见图 1。

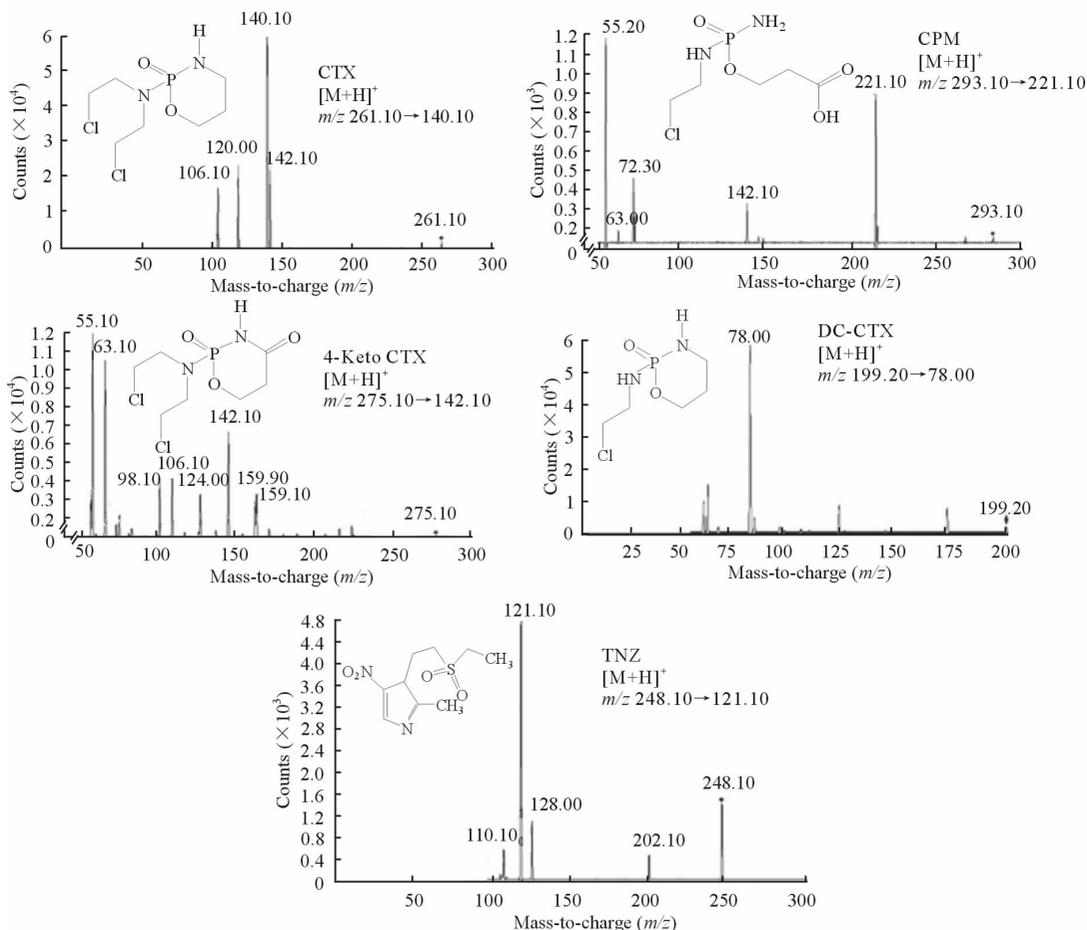


图 1 CTX、CPM、4-Keto CTX、DC-CTX 及 TNZ 的二级产物离子图

Fig 1 MS 2 scan mass spectra of CTX, CPM, 4-Keto CTX, DC-CTX and TNZ

CTX: Cyclophosphamide; CPM: Carboxyphosphamide; 4-Keto CTX: 4-Ketocyclophosphamide; DC-CTX: Dechloroethylcyclophosphamide; TNZ: Tinidazole

2.4.2 方法专属性 分别取6份大鼠空白血浆 (blank plasmas), CTX、CPM、4-Keto CTX 浓度为 400 ng/mL 及 DC-CTX 浓度为 100 ng/mL 的标准血浆添加样品 (blank plasma spiked with standards) 和大鼠给药后的血浆样品 (test

samples), 按 2.3 项下方法处理后进样分析, CTX、CPM、4-Keto CTX、DC-CTX 及内标 TNZ 的保留时间分别为 3.29、2.20、2.75、2.35 和 2.38 min。MRM 提取色谱图见图 2, 实验结果表明空白血浆中的杂质对待测化合物无干扰, 该方法专属性良好。

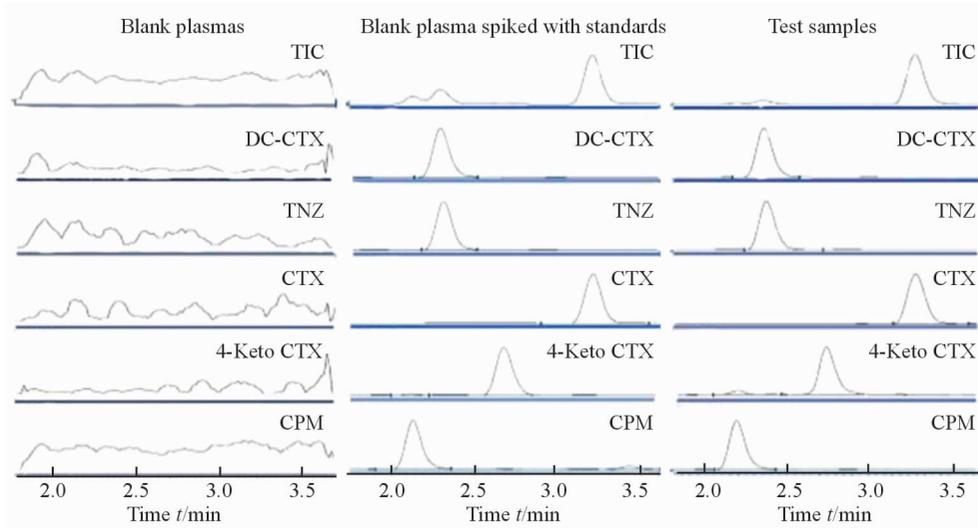


图 2 CTX、CPM、4-Keto CTX、DC-CTX 及 TNZ 的 MRM 提取色谱图

Fig 2 MRM extracted chromatograms of CTX, CPM, 4-Keto CTX, DC-CTX and TNZ in rat plasma

CTX: Cyclophosphamide; CPM: Carboxyphosphamide; 4-Keto CTX: 4-Ketocyclophosphamide; DC-CTX: Dechloroethylcyclophosphamide; TNZ: Tinidazole; TIC: Total ion chromatogram; MRM: Multiple reaction monitoring

2.4.3 标准曲线、线性范围及最低检测限 分别取各浓度 CTX、CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 的标准曲线血浆添加样品在室温下放置融化, 按 2.3 项下方法操作, 每一浓度取 3 个样本进行平行分析。以待测物浓度为横坐标(x), 待测物与内标的峰面积

比为纵坐标(y)进行加权线性回归, 权重系数为 $1/x^2$, 得各标准曲线血浆添加样品的标准曲线方程、最低定量限 (lower limit of quantification, LLOQ) 及检测限 (limit of detection, LOD), 见表 1。

表 1 CTX、CPM、4-Keto CTX 和 DC-CTX 的线性回归方程

Tab 1 Regression equation of CTX, CPM, 4-Keto CTX and DC-CTX

$n=3$

Analyte	Regression equation	Calibration range $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$	r	LLOQ $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$	LOD $\rho_B/(ng \cdot mL^{-1})$
CTX	$y=0.023\ 343x-0.100\ 771$	20-4 000	0.998 0	20	0.5
DC-CTX	$y=0.141\ 953x+0.027\ 137$	5-1 000	0.996 8	5	0.2
4-Keto CTX	$y=0.009\ 246x-0.003\ 226$	20-4 000	0.998 6	20	5
CPM	$y=0.025\ 715x+0.016\ 253$	20-4 000	0.995 3	20	2

CTX: Cyclophosphamide; CPM: Carboxyphosphamide; 4-Keto CTX: 4-Ketocyclophosphamide; DC-CTX: Dechloroethylcyclophosphamide; LLOQ: Lower limit of quantification; LOD: Limit of detection

2.4.4 精密度与准确度 取 3 个浓度水平的 CTX、CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 的 QC 样品和标准曲线最低浓度点的样品, 按照 2.3 项下方法操作, 每个浓度样品平行制备 5 份, 连续测定 3 d。根

据当天的标准曲线计算每一样本实测浓度, 计算各化合物在每个浓度下的日内、日间 相对标准差 (RSD) 及准确度, 结果表明各样品的精密度及准确度均符合血浆生物样本测定要求, 见表 2。

表2 CTX、CPM、4-Keto CTX和DC-CTX的日内、日间精密度和准确度

Tab 2 Intra-day and inter-day precision of CTX, CPM, 4-Keto CTX and DC-CTX

n=5

Analyte	Nominal concentration $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	Intra-day precision			Inter-day precision		
		Average concentration $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}), \bar{x} \pm s$	Accuracy (%)	RSD (%)	Average concentration $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}), \bar{x} \pm s$	Accuracy (%)	RSD (%)
CTX	20	20.33±0.12	1.65	0.59	21.19±0.63	5.95	2.97
	40	37.38±0.73	-6.55	1.95	38.22±1.10	-4.45	2.88
	200	204.53±3.62	2.26	1.77	206.57±3.56	3.29	1.72
	1 000	1 065.27±13.01	6.53	1.22	1 077.81±20.20	7.78	1.87
DC-CTX	5	4.86±0.21	-2.80	4.32	4.21±0.35	-15.80	8.31
	10	10.97±0.27	9.74	2.46	9.96±0.87	0.40	8.73
	50	45.73±1.30	-8.54	2.84	45.23±1.16	-9.54	2.56
	250	273.59±2.52	9.44	0.92	273.62±3.32	9.45	1.21
4-Keto CTX	20	21.66±0.77	8.30	3.55	20.16±1.19	0.80	5.90
	40	39.45±2.92	-1.38	7.40	37.96±2.37	-5.10	6.24
	200	190.80±6.30	-4.60	3.30	184.81±7.40	-7.60	4.00
	1 000	1 048.70±22.82	4.87	2.18	1 034.41±22.36	3.44	2.16
CPM	20	19.52±2.17	-2.40	11.12	21.52±3.31	7.60	15.38
	40	36.27±1.86	-9.32	5.13	38.26±2.65	-4.35	6.93
	200	177.90±1.78	-11.05	1.00	182.54±6.90	-8.73	3.62
	1 000	1 035.71±12.55	3.57	1.21	1 052.73±27.41	5.27	2.60

CTX: Cyclophosphamide; CPM: Carboxyphosphamide; 4-Keto CTX: 4-Ketocyclophosphamide; DC-CTX: Dechloroethylcyclophosphamide

2.4.5 稀释效应 取大鼠空白血浆配制 CTX 浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 CPM、4-Keto CTX 和 DC-CTX 浓度均为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准血浆添加样品,再用空白血浆将其稀释 50 倍,然后按照 2.3 项下方法操作制备 5 份,进样分析。结果显示各样品稀释效应的准确度和精密度的分别为 CTX(-6.63%, 7.53%)、CPM(12.62%, 8.93%)、4-Keto CTX(-12.02%, 12.10%)和 DC-CTX(-1.91%, 4.21%),均符合测定要求。

2.4.6 稳定性 精密制备 3 个水平的 CTX、CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 的 QC 样品,考察各样品室温放置 6 h、进样室(4 $^{\circ}\text{C}$)放置 24 h、循环冻融 3 次及冻存(-20 $^{\circ}\text{C}$)15 d 的稳定性。所有样品均平行制备 3 份,按 2.3 项下方法进样分析。结果显示所有 QC 样品的准确度均在标示值的 -15%~15%之间, RSD 均小于 15%,符合测定要求,表明 CTX、CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 在上述条件下均稳定性良好。

2.4.7 提取回收率和基质效应 分别取高、中、低 3 个水平的各样品工作溶液,以相同体积(950 μL)

的水代替空白血浆进行添加,其他操作与 2.3 项相同,样品进样分析得峰面积 A_1 ;另取 3 个浓度水平的 QC 样品按 2.3 项下方法处理后进样得峰面积 B_1 ,即得提取回收率(%)=(B_1/A_1) \times 100%,结果表明各化合物的提取回收率均在(66.44 \pm 5.53)%~(96.66 \pm 1.73)%之间。另取部分空白血浆并提取获取上清液,4 $^{\circ}\text{C}$ 真空条件下高速离心挥干,分别用高、中、低 3 个水平的各样品工作溶液复溶,制得终浓度与标准血浆添加样品相同的溶液,3 个水平的样品各制备 6 份,进样得峰面积 C_1 ,即得基质因子(%)=(C_1/A_1) \times 100%,设定分析物基质因子为 m,内标基质因子为 n,则 m/n 即为内标归一化基质因子,结果显示各化合物归一化基质因子偏差均在 -15%~15%之间,表明血浆基质不干扰测定。

2.5 大鼠血浆药动力学研究

2.5.1 实验动物给药及采血 8 只成年雄性 SD 大鼠,体质量(220 \pm 20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[许可证号:SCXK(沪)2007-0005]。所有动物均在第二军医大学药学院动物房环境[12 h 黑暗/12 h 光照,温度(25 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$]正常饲养 1

周时间,在实验开始前禁食 12 h。第 2 天分别按 300 mg/kg 的剂量尾静脉注射 CTX 溶液,于给药后 5、15、30 min 和 1、2、3、4、6、8、12、24 h 从大鼠眼眶静脉丛采血 0.2~0.3 mL,置于 1.5 mL 肝素化的离心管中,轻轻混匀,随即 1 006.2×g 离心 10 min 分离血浆,置于-20℃冰箱中保存,并在 2 周内完成测定。

2.5.2 实验数据处理及实验结果 大鼠血浆 2.1 项下的方法进行测定,4 种化合物的原始血药浓度数据采用 DAS 2.0 软件进行二房室模型法拟合,不加权。 C_{max} 、 T_{max} 均为实测值,其他药动学参数均采用梯形拟合。各化合物的血药浓度-时间曲线见图 3,药代动力学参数见表 3。

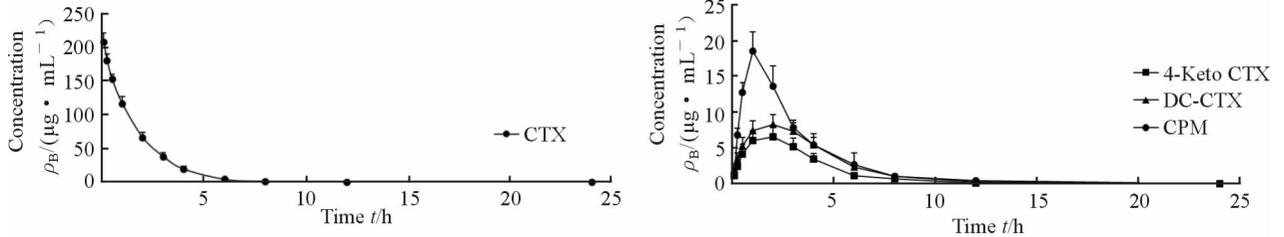


图 3 CTX、CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 的平均血药浓度-时间曲线图

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of CTX, CPM, 4-Keto CTX and DC-CTX

CTX: Cyclophosphamide; CPM: Carboxyphosphamide; 4-Keto CTX: 4-Ketocyclophosphamide; DC-CTX: Dechloroethylcyclophosphamide. $n=8$, $\bar{x}\pm s$

表 3 CTX、CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 的药代动力学参数

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of CTX, CPM, 4-Keto CTX and DC-CTX

Pharmacokinetic parameter	CTX	CPM	4-Keto CTX	DC-CTX
C_{max}^a $\rho_B/(\mu g \cdot mL^{-1})$	207.52±13.20	18.47±2.66	6.59±1.33	8.27±1.44
T_{max}^b t/h	0.08	1.00	2.00	2.00
$T_{1/2}^c$ t/h	1.28±0.09	5.03±0.48	6.72±0.47	7.47±0.68
CL ^d ($mL \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$)	801.86±77.05	4 500.44±324.96	8 229.76±3 181.52	6 864.37±1 339.30
$AUC_{0 \rightarrow t}^e$ ($\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$)	372.52±32.79	65.70±5.04	33.26±11.76	45.03±8.93
$AUC_{0 \rightarrow \infty}^f$ ($\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$)	377.00±36.01	66.95±4.76	44.57±26.92	45.15±9.03
$AUMC_{0 \rightarrow t}^g$ ($\mu g \cdot h \cdot mL^{-1}$)	843.51±75.14	310.42±34.84	222.00±150.98	222.68±72.26
$MRT_{0 \rightarrow t}^h$ t/h	2.27±0.22	6.33±2.03	6.25±1.75	4.88±0.65

$n=8$, $\bar{x}\pm s$

a: Peak concentration; b: Time to C_{max} ; c: Half-life; d: Clearance; e: Area under concentration-time curve (from 0 to t); f: Area under concentration-time curve (from 0 to ∞); g: Area under the first moment of the plasma concentration-time curve (from 0 to t); h: Mean retention time (from 0 to t). CTX: Cyclophosphamide; CPM: Carboxyphosphamide; 4-Keto CTX: 4-Ketocyclophosphamide; DC-CTX: Dechloroethylcyclophosphamide

3 讨论

3.1 色谱及质谱条件的优化 由于粒径为 2.7 μm 的实心 poroshell 色谱柱对分析物具有较好的分离度,近年来常用于生物样品分析。本研究参考相关文献^[4-7]考察了乙腈/甲醇-甲酸水溶液、乙腈/甲醇-乙酸铵水溶液以及乙腈/甲醇-甲酸与乙酸铵混合水溶液等不同流动相,结果发现甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相时待测物的响应、峰形较好。此外,本研究发现,在分析 CTX 浓度较高的样品时,

CTX 表现出微小残留,但均未超过 20% 的 LLOQ,因此可在每进样 10 次样品后增进 1 针空白溶剂,减少 CTX 的系统残留。

3.2 样品前处理 本研究中样品前处理采用了简单、快速的蛋白沉淀法。预实验结果表明,相对于甲醇,乙腈的沉淀效果更好,并且采用甲醇沉淀后的样品容易导致仪器系统压力升高,因此选择乙腈进行沉淀。而在优化沉淀剂比例时,本研究也尝试了不同比例的 $V_{血浆}:V_{沉淀剂}$ (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6),结果发现当二者比例超过 1:4 后,提取回收

率均无明显差异,故最终选择血浆与乙腈体积比为1:4的方案。获得的上清液需要进行稀释后进样,以获得较好的基质效应和色谱图,由于稀释会耗费较多的大鼠空白血浆,本研究对比了血浆和生理盐水作为稀释剂对待测物质质谱响应及相应的基质效应、提取回收率的影响,结果发现两种稀释剂的结果差别不大,故最终选择生理盐水作为稀释剂。预实验结果表明 CTX 的 $C_{\max} > 200 \mu\text{g/mL}$,其代谢物 CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 的浓度也均较高,而 UHPLC-MS/MS 方法灵敏度较高,因此本实验考察了稀释效应,且结果符合方法学要求。

综上所述,本文建立的 UHPLC-MS/MS 法测定血浆中 CTX 及其代谢产物 CPM、4-Keto CTX 及 DC-CTX 的血药浓度符合生物样本分析要求,方法操作简单、检测耗时少、灵敏度高、重现性好,样品前处理简便,适用于 CTX 高剂量给药后血浆的药代动力学研究。

[参考文献]

- [1] 韦凤华. 环磷酰胺临床应用研究进展[J]. 中国药事, 2013,27:324-326.
- [2] QUACH H, JOSHUA D, HO J, SZER J, SPENCER A, HARRISON S, et al. Treatment of patients with multiple myeloma who are eligible for stem cell transplantation: position statement of the Myeloma Foundation of Australia Medical and Scientific Advisory Group[J]. Intern Med J, 2015, 45: 335-343.
- [3] 陈玲燕,王雪丁,黄民. 环磷酰胺的药物基因组学研究进展[J]. 药学学报,2014,49:971-976.
- [4] DE JONGE M E, HUITEMA A D, RODENHUIS S, BEIJNEN J H. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide [J]. Clin Pharmacokinet, 2005, 44: 1135-1164.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京:中国医药科技出版社,2015:363-368.
- [6] KASEL D, JETTER A, HARLFINGER S,

- GEBHARDT W, FUHR U. Quantification of cyclophosphamide and its metabolites in urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004, 18: 1472-1478.
- [7] BAI F, FRAGA C H, TAGEN M, SCHAIQUEVICH P, HAGEDORN N, STEWART C F. Simultaneous determination of cyclophosphamide and carboxyethylphosphoramidate mustard in human plasma using online extraction and electrospray tandem mass spectrometry (HTLC-ESI-MS/MS) [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877 (18-19): 1709-1715.
- [8] ATTIÉDE CASTRO F, SCATENA GDOS S, CASS Q B, SIMÕES B P, LANCHOTE V L. Analysis of cyclophosphamide and carboxyethylphosphoramidate mustard enantiomers in human plasma and application to clinical pharmacokinetics [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014, 971: 14-19.
- [9] YANG L, FENG J, ZHANG F, JIANG B, GAO S, CHEN W. Fast quantification of cyclophosphamide and its N-dechloroethylated metabolite 2-dechloroethylcyclophosphamide in human plasma by UHPLC-MS/MS[J]. Biomed Chromatogr, 2014, 28: 1303-1305.
- [10] KALHORN T F, HOWALD W N, COLE S, PHILLIPS B, WANG J, SLATTERY J T, et al. Rapid quantitation of cyclophosphamide metabolites in plasma by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 835: 105-113.
- [11] SADAGOPAN N, COHEN L, ROBERTS B, COLLARD W, OMER C. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric quantitation of cyclophosphamide and its hydroxyl metabolite in plasma and tissue for determination of tissue distribution[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 759: 277-284.

[本文编辑] 曾奇峰