

LC-MS/MS 测定大鼠血浆中 4-氯-2-氟-3-甲氧基苯硼酸及其毒代动力学研究

洪晓波^{1,2}, 曾奎¹, 雷金秀¹, 平丽¹, 余露山¹ (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 宁波大学医学院附属医院, 浙江 宁波 315020)

摘要: 目的 建立一种快速灵敏的高效液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)用于大鼠血浆中 4-氯-2-氟-3-甲氧基苯硼酸(4-chloro-2-fluoro-3-methoxybenzeneboronic acid, PBA)的测定, 并进行 PBA 的毒代动力学研究。方法 观察 SD 大鼠分别灌胃及静脉注射染毒不同剂量 PBA 后血浆中 PBA 的浓度变化。采用内标法进行定量分析, 获得血浆中 PBA 的浓度, 并采用 DAS 药动学软件拟合主要动力学参数 AUC、 C_{max} 、 T_{max} 、 $T_{1/2}$ 等。结果 血浆中 PBA 提取回收率为 88.8%~94.4%, 日间精密密度为 6.4%~8.9%, 日内精密密度为 3.9%~5.9%, 准确度为 97.8%~105.5%。PBA 的线性范围为 20~2 500 ng·mL⁻¹, 对照品曲线的相关系数 $r > 0.99$ 。PBA 的定量下限为 20 ng·mL⁻¹ (RSD=9.67%, $n=5$)。结论 该方法能成功应用于 PBA 在大鼠体内的血浆毒代动力学。PBA 在大鼠体内的暴露水平未随着染毒剂量的增加而线性增加, 表明 PBA 在大鼠体内的吸收呈现饱和性。

关键词: 4-氯-2-氟-3-甲氧基苯硼酸; 高效液相色谱串联质谱法; 大鼠血浆; 毒代动力学

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2018)01-0045-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.010

引用本文: 洪晓波, 曾奎, 雷金秀, 等. LC-MS/MS 测定大鼠血 4-氯-2-氟-3-甲氧基苯硼酸及其毒代动力学研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 45-48.

Determination of 4-Chloro-2-fluoro-3-methoxybenzeneboronic Acid in Rat Plasma by LC-MS/MS and Its Application in the Toxicokinetics Study

HONG Xiaobo^{1,2}, ZENG Kui¹, LEI Jinxiu¹, PING Li¹, YU Lushan¹ (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. The Affiliated Hospital of Medical School of Ningbo University, Ningbo 315020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a rapid, highly sensitive and selective high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the determination of 4-chloro-2-fluoro-3-methoxybenzeneboronic acid(PBA) in rat plasma. Explore and complete the toxicokinetic study of PBA in rats. **METHODS** To observe the plasma concentration change of PBA in SD rats after treated with different doses of PBA orally and intravenously, respectively. Internal standard method was used in analysis to quantify the PBA plasma concentration. DAS software was used to obtain kinetic parameters such as AUC, C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$ and so on. **RESULTS** The extraction recovery rate of PBA in rat plasma was in the range of 88.8%~94.4%, the intra-day precision was in the range of 6.4%~8.9%, and the inter-day precision was in the range of 3.9%~5.9%, respectively. Accuracy was in the range of 97.8%~105.5%. Linear calibration curves for PBA was observed at 20~2 500 ng·mL⁻¹ with correlation coefficient $r > 0.99$. The lowest limit of quantification(LLOQ) for PBA was 20 ng·mL⁻¹ (RSD=9.67%, $n=5$). **CONCLUSION** This method is successfully applied in the rat plasma concentration determination of PBA. The plasma concentrations of PBA in rats has nonlinear dynamics and its systemic exposure did not raise as the administered doses.

KEY WORDS: 4-chloro-2-fluoro-3-methoxybenzeneboronic acid; LC-MS/MS; rat plasma; toxicokinetics

毒代动力学(toxicokinetic, TK)作为药动学(pharmacokinetics, PK)和毒理学的交叉学科, 在毒性条件下进行研究, 是药动学在全身暴露评价中的延伸, 其试验目的是评估受试物和/或代谢物的全身暴露量, 探讨药物毒性发生机制和预测用药安全性^[1-2], 是安全性评价的重要组成部分^[3-4]。TK 研究的样品分析和数据处理工作除需遵守《药

物非临床药动学研究技术指导原则》的技术要求外, 还需严格遵循 GLP^[5]。

4-氯-2-氟-3-甲氧基苯硼酸(4-chloro-2-fluoro-3-methoxybenzeneboronic acid, PBA)是重要的有机合成中间体, 属于硼酸类化合物, 在胰岛素控释^[6]、肿瘤靶向^[7]、基因递释^[8]等方面, 基于硼酸类衍生物的糖敏感材料受到广泛的应用。PBA 的吸收、

基金项目: 宁波大学校级科研项目(XYY16042)

作者简介: 洪晓波, 女, 硕士生 Tel: 13967878295
18858194016 E-mail: yuls@zju.edu.cn

E-mail: hxb4425@163.com

*通信作者: 余露山, 男, 博士, 教授, 博导 Tel:

转运、分布、代谢和排泄特征报道少见, 目前没有相关的实验动物的毒代动力学完整资料。本实验按照 Organisation for Economic Co-operation and Development(OECD)的有关“毒物动力学 ADME 试验 417”要求^[9], 通过建立一种高效、重复性好的高效液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)^[10], 以探索并完成 PBA 的血浆毒代动力学研究, 对此类化学物质的规范管理和进一步完善提供参考和依据, 可为人群接触的危险性评价及其毒性作用机制提供参考。

1 材料

1.1 试剂

PBA 对照品[联化科技股份有限公司, 批号: LT-PBA(S)13002, 纯度: 97.8%]。对甲氧基苯甲酸对照品[内标, 阿拉丁试剂(中国)有限公司, 批号: M104368, 纯度: 98 %]。甲醇与乙腈(北京百灵威科技有限公司, 色谱纯); 乙酸铵(国药集团化学试剂有限公司, 分析纯); 甲酸(北京百灵威科技有限公司)。

1.2 仪器

Agilent 1200+ABI 4000⁺液质联用仪(美国应用生物系统公司, AB SCIEX); XS205 电子分析天平(梅特勒托尔多公司); Eppendorf 5417R 离心机(德国 Eppendorf 公司); KQ3200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Vortex-6 多功能涡旋混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); PureLab OptionS7 纯水仪(英国 ELGA LabWater 公司)。

1.3 动物

SD 大鼠(32 只, ♀♂各半, 6~8 周)购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司(合格证编号: 2008001635199)。大鼠饲养于不锈钢铁丝笼中(体积 500 mm×350 mm×200 mm)中, 饲养室温度保持在 20~26 °C, 湿度保持在 40%~70%, 每笼≤6 只, ♀♂分笼饲养。同时给予辐照繁殖饲料(北京科澳协力饲料有限公司)和饮用水进行喂养。

1.4 对照品溶液的配制

精密称取 10.0 mg PBA 对照品溶解在 50 mL 甲醇中得到浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PBA 储备溶液, 将储备溶液进一步用甲醇稀释获得浓度分别为 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 和 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。以相同方式在 3 个浓度水平(50, 200, 2 000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)独立制备质控样品。内标对甲氧基

苯甲酸储备溶液以 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的初始浓度制备, 使用甲醇稀释储备溶液制备内标溶液(400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。所有储备溶液、对照品、质控样品均立即置 4 °C 保存备用。

2 方法

2.1 色谱条件

日本 COSMASIL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 柱温为 30 °C。流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵-甲酸(90:10:0.15), 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 进样体积为 10 μL 。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾电离源(Turbo Ion Spray), 喷射电压为-4.5 kV; 温度为 550 °C。离子源气体 1(GAS1)压力为 50 psi; 离子源气体 2(GAS2)压力为 50 psi; 气帘气体(CUR)压力为 30 psi。去簇电压(DP)分别为-55 eV(PBA)和-92 eV(内标)。扫描方式为选择离子监测(SIM), 用于定量分析的离子为 m/z 203.1(PBA), m/z 150.4(内标), 扫描时间为 200 ms。

2.3 血浆样品处理

将冷冻的血浆样品放置室温解冻。取血浆样本 90 μL , 分别加入甲醇 5 μL , 内标溶液(对甲氧基苯甲酸 400 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)5 μL , 涡旋混合 1 min; 加入乙腈 0.3 mL, 涡旋混合 2 min, 离心 10 min (13 000 r·min⁻¹), 分离上清液于另一试管中, 取 10 μL 进行分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 方法专属性 通过比较空白血浆样品的色谱图、掺加了 PBA 对照品系列溶液及内标溶液的空白血浆的色谱图, 记录内标和 PBA 对照品的保留时间; 取灌胃染毒 PBA 的 SD 大鼠 1.5 h 时间段的血浆样品的色谱图来评估方法特异性, 结果见图 1。从图 1 可以看到, PBA 的出峰时间约为 2.8 min, 内标的出峰时间约为 2.5 min。PBA 对照品和内标分离良好, 内源性物质没有明显的干扰。

2.4.2 线性范围与灵敏度 取血浆样本 90 μL , 加入 PBA 系列浓度对照品液 5 μL , 配制成为 PBA 血浆终浓度分别为 20, 50, 100, 200, 500, 1 000 和 2 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆工作曲线。按“2.3”项下方法进行处理, 按“2.1”项下色谱条件进样 30 μL , 进行 HPLC 分析。所得结果以 PBA 血浆浓度为横坐标, 以所得 PBA 及内标峰面积比值为纵坐标, 以最小二乘法进行回归运算, 求得的回归方程为 $y=0.001\ 11x+0.031\ 6$, $r=0.991\ 4$, 在 20~2 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

内线性良好。定量下限(LLOQ)为 $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\text{RSD}\%=9.67\%$, $n=5$), 满足方法学样品测定要求。

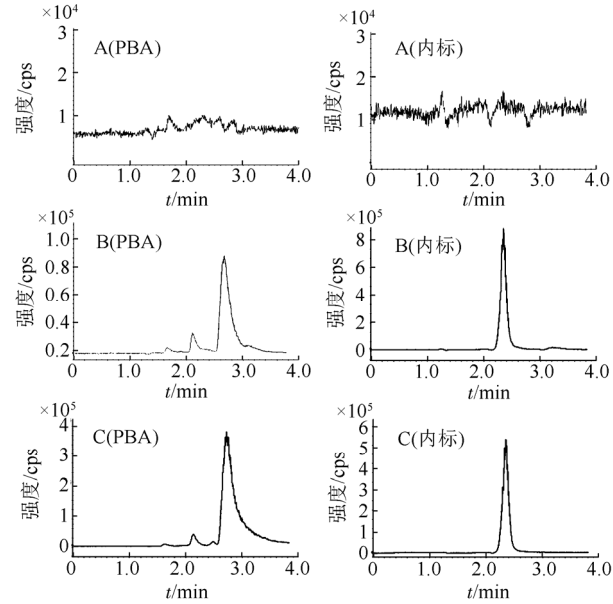


图 1 大鼠血浆样品中 PBA 和内标的代表性色谱图
A-空白血浆样品; B-质控血浆样品(含 $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ PBA); C-大鼠灌胃给药 1.5 h 后的血浆色谱图。

Fig. 1 Representative chromatograms of PBA and I.S. in rat plasma samples

A-blank plasma; B-QC sample spiked with $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of PBA; C-rat plasma sample in 1.5 h after administrated with $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of PBA.

2.4.3 精密度及准确度 按“2.3”项下方法处理高、中、低 3 种浓度($50, 200$ 和 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)质控样品。通过 3 d 内连续检测 3 种质控样品浓度(每浓度 5 个样品), $30 \mu\text{L}$ 进样, 考察日内与日间的精密度与准确度, 结果见表 1。结果表明, 该方法准确并具有良好的可重复性。

表 1 大鼠血浆中质控样品的精密度和准确度($n=5$)

Tab. 1 Precision and accuracy for PBA in rat plasma ($n=5$)

PBA 浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	批间平均浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	准确度/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
50	51.6	103.2	5.0	8.9
200	211.1	105.5	5.9	6.4
2 000	1 955.3	97.8	3.9	8.5

2.4.4 提取回收率的测定 在空白血浆中配制低、中、高 3 个浓度梯度的 PBA 血浆样品($50, 200$ 和 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 按“2.3”项下方法进行处理, $30 \mu\text{L}$ 进样。将血浆样品的 PBA 峰面积除以血浆中已知量的 PBA 应得到的峰面积比值, 得到该方法下血浆提取回收率为 $88.8\%\sim 94.4\%$ 。

2.4.5 稳定性 用低、中、高浓度质控样品放置于不同储存条件下来反映 PBA 的稳定性: 室温,

4°C , 冻融和 -20°C 长期储存(20 d)。通过 5 次重复分析暴露于不同条件下的 3 种浓度水平($50, 200, 2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的血浆样品来测试血浆中的稳定性。短期稳定性通过检测在室温暴露 8 h 后的已加对照品的血样, 及样品处理后在 4°C 放置 24 h 后进行测定。置 -20°C 冰箱保存, 考察血浆样品 3 次解冻冻融的稳定性。已加对照品的血浆样品置 -20°C 冰箱保存 20 d 后评价长期稳定性。结果见表 2, 各指标均符合方法学要求。

表 2 不同条件下 PBA 血浆样品的稳定性结果($n=5$)

Tab. 2 Stability results of PBA in rat plasma in different conditions ($n=5$).

条件	$50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		$200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$		$2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	测定值	RE/%	测定值	RE/%	测定值	RE/%
室温	50.96	1.9	214.6	3.8	1 838	8.0
4°C	55.7	11.4	218.8	9.4	1 786	10.7
冻融	50.1	0.2	221.0	10.5	1 780	11.0
-20°C , 20 d	47.8	4.4	196.6	1.7	2 154	7.7

2.4.6 基质效应 取空白血浆 $90 \mu\text{L}$, 分别加入甲醇 $5 \mu\text{L}$, 内标溶液(对甲氧基苯甲酸 $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) $5 \mu\text{L}$, 涡旋混合 1 min; 加入乙腈 0.3 mL , 涡旋混合 2 min, 离心 10 min($13000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)。取上清液 $200 \mu\text{L}$, 加入系列 PBA 对照品溶液 $5 \mu\text{L}$, 使其浓度与 $50, 200$ 和 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 种质控样品按“2.3”项下方法处理后相同, 作为 A 样品。取含与 A 样品相同内标浓度的乙腈溶液(乙腈: 水=3: 1) $200 \mu\text{L}$, 加入系列 PBA 对照品 $5 \mu\text{L}$, 使其浓度与 $50, 200$ 和 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 种质控样品按“2.3”项下方法处理后相同, 作为 B 样品。A 和 B 样品分别进样 $10 \mu\text{L}$, 分别获得 PBA 和内标的峰面积。以 A 样品中 PBA 的峰面积和内标峰面积的比值除以 B 样品中 PBA 的峰面积和内标峰面积的比值, 获得 $50, 200$ 和 $2000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 个浓度质控样品的基质效应, 分别为 $102.7\%, 107.6\%$ 和 101.3% 。符合生物样品测定的要求。

3 PBA 的毒代动力学研究

3.1 染毒方法

取 32 只 SD 大鼠, 随机分为灌胃低、中、高剂量组和静脉注射组 4 组, 每组 8 只, $\text{♀}\text{♂}$ 各半。用 0.5% 的羧甲基纤维素钠配制成 $1, 3$ 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试品混悬液用于灌胃低($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和高剂量($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组染毒。动物染毒后从眼眶静脉丛取血并肝素抗凝, 取血量为

0.5 mL。血样采集时间分别为染毒前, 染毒后 10, 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h。血样采集后立即放入碎冰中保存。静脉注射组的给药剂量为 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。静脉注射组以灭菌生理盐水配制 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 PBA 溶液作为静脉注射样品溶液, 每只给药 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。动物染毒后从眼眶静脉丛取血并肝素抗凝, 取血量为 0.5 mL。血样采集后立即放入碎冰中。血样采集时间分别为染毒前, 染毒后 5, 15, 30, 45 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h。血样在 $3\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)获得血浆,

表 3 SD 大鼠静脉注射和灌胃给予 PBA 后的主要动力学参数

Tab. 3 Main kinetic parameters of PBA in rats after iv or ig administration of PBA

参 数	iv $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		ig $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		ig $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		ig $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	
	均值	SD	均值	SD	均值	SD	均值	SD
$\text{AUC}_{(0-t)}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	10 105	1 456	2 647	946	5 764	1 777	8 131	1 919
$\text{AUC}_{(0-\infty)}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	14 591	5 221	2 832	976	6 977	2 394	9 570	3 121
$T_{1/2}/\text{h}$	16.1	14.7	5.8	3.3	9.4	6.4	8.1	3.9
T_{max}/h	0.08	0.00	2.6	1.6	2.8	0.9	3.0	0.8
$\text{CLz}/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.38	0.12	3.9	1.4	4.7	1.4	11.3	3.0
$\text{Vz}/\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	7.0	4.9	31.1	17.0	58.1	29.7	121.3	40.6
$C_{\text{max}}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3 648	791	435.3	143.0	775.5	313.1	1 273	592

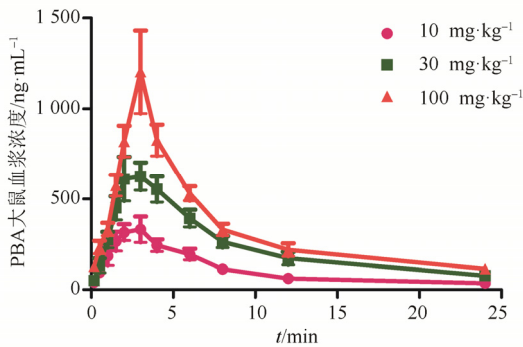


图 2 大鼠灌胃给予 PBA 后的血药浓度-时间曲线

Fig. 2 The plasma concentration-time curve of PBA in rats.

4 结论

本研究建立了一种快速、灵敏的用于测定大鼠血浆中 PBA 的 LC-MS/MS, 血浆样品中内源性杂质不干扰 PBA 测定。方法学考察结果和稳定性试验结果都符合要求, 证明本方法适合于大鼠血浆样品中 PBA 的分析。大鼠经 PBA 灌胃染毒后, 约在 3 h 血药浓度达到峰值。随着染毒剂量的增加, 其在大鼠体内的暴露量没有呈线性上升, 口服生物利用度下降显著, 说明其在大鼠体内的吸收呈现饱和性。

REFERENCES

[1] LANDRUM P F, CHAPMAN P M, NEFF J, et al. Influence of exposure and toxicokinetics on measures of aquatic toxicity for

$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备测。

3.2 毒代动力学特征

采用 DAS 药动学软件对所测数据进行分析, 拟合获得毒代动力学参数, AUC 、 C_{max} 、 T_{max} 、 $t_{1/2}$ 等, 结果见表 3。大鼠单次灌胃给予 10, 30, $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ PBA 后的血药浓度-时间曲线见图 2, 低、中、高剂量组的绝对生物利用度分别为 13.1%, 9.5% 和 4.0%。随着染毒剂量的增加, 大鼠血浆中 PBA 的 AUC 和 C_{max} 未呈线性升高, 口服生物利用度明显下降, 说明 PBA 在大鼠体内的吸收具有饱和性。

organic contaminants: a case study review [J]. Integr Environ Assess Manag, 2013, 9(2): 196-210.

- [2] WANG S J, YOU L, DENG M J. Progress in drug toxicokinetics [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2015, 29(8): 814-819.
- [3] LIN L H, DUAN M Y, CHEN G. An LC-MS/MS method for determination of novel fungicide pyraoxystrobin in rat plasma and tissues: Toxicokinetics and tissue distribution study [J]. Talanta, 2015(136): 183-189.
- [4] YU M, LI Z G. Status and prospects in drug toxicokinetics [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2017, 26(7): 742-748
- [5] 国家食品药品监督管理总局. 药物毒代动力学研究技术指导原则[S]. 北京, 2014.
- [6] LI L, JIANG G H, DU X X, et al. Preparation of glucose-responsive and fluorescent micelles via a combination of R AFT polymerization and chemoenzymatic transesterification for controlled release of insulin [J]. RSC Adv, 2015, 5(92): 75766-75772.
- [7] WANG J, WU W, ZHANG Y, et al. The combined effects of size and surface chemistry on the accumulation of boronic acid-rich protein nanoparticles in tumors [J]. Biomaterials, 2014, 35(2): 866-878.
- [8] PIEST M, ANKONÉ M, ENGBERSEN J F J. Carbohydrate-interactive pDNA and siRNA gene vectors based on boronic acid functionalized poly (amido amine)s [J]. J Control Release, 2013, 169(3): 266-275.
- [9] OECD. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 417 Toxicokinetics, 1-10 [DB/OL]. Paris: OECD, 2010.
- [10] ZOU H L, WANG S H, ZHOU Y F. Determination the concentration of barlerin in rat plasma by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(4): 440-444.

收稿日期: 2017-08-23

(本文责编: 曹粤锋)