

LC-MS/MS法同时测定人血浆中依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉的浓度^Δ

刘晓茜*, 尹林, 孙涛, 贾小芳, 吴达革, 卢洪洲, 张丽军[#](上海市公共卫生临床中心, 上海 201508)

中图分类号 R978.7;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)02-0187-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.02.16

摘要 目的: 建立同时测定人血浆中依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉浓度的方法。方法: 血浆样品以沉淀蛋白联合萃取的方法进行处理后, 采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法进行测定, 以替米沙坦为内标, Eclipse XDB-C₁₈为色谱柱, 0.1%甲酸+100%水-甲醇(20:80)为流动相进行色谱分离。采用电喷雾电离源(ESI), 以多反应监测(MRM)方式进行正电荷检测, 用于定量分析的依曲韦林、利匹韦林、地拉韦啉和内标检测离子对 *m/z* 分别为 437.1/165.1、367.2/195.2、457.3/221.2 和 515.1/276.0。结果: 依曲韦林、利匹韦林、地拉韦啉血药浓度分别在 0.02~5 μg/ml ($r=0.994\ 2$)、0.005~10 μg/ml ($r=0.995\ 6$)、0.001~5 μg/ml ($r=0.998\ 0$) 范围内线性关系良好, 定量下限可分别达 20、5、1 ng/ml; 各待测物的日内、日间精密度以及准确度均符合生物样品分析相关要求, RSD<10%。血浆样品在经历 3 次冷冻-解冻循环、室温放置 4 h 和 -80 °C 放置 60 d 的条件下均稳定, RSD<15%。结论: 该方法具有快速、灵敏、重复性好等特点, 适用于临床测定血药浓度及药动力学研究。

关键词 液相色谱串联质谱法; 依曲韦林; 利匹韦林; 地拉韦啉; 血药浓度

Simultaneous Determination of Etravirine, Rilpivirine and Delavirdine in Human Plasma by LC-MS/MS

LIU Xiao-qian, YIN Lin, SUN Tao, JIA Xiao-fang, WU Da-ge, LU Hong-zhou, ZHANG Li-jun (Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of etravirine, rilpivirine and delavirdine in human plasma. METHODS: After plasma sample was treated with protein precipitation combined with extraction, using telmisartan as internal standard, the determination was performed on Eclipse XDB-C₁₈ column with 0.1% formic acid+100% water+methanol (20:80). Etravirine (*m/z* 437.1/165.1), rilpivirine (*m/z* 367.2/195.2), delavirdine (*m/z* 457.3/221.2) and internal standard (*m/z* 515.1/276.0) were detected by electrospray ionization (ESI) with positive ion in MRM mode quantitatively. RESULTS: The linear range was 0.02-5 μg/ml for etravirine ($r=0.994\ 2$), 0.005-10 μg/ml for rilpivirine ($r=0.995\ 6$), 0.001-5 μg/ml for delavirdine ($r=0.998\ 0$), respectively. The lower limits of quantitation were 20, 5 and 1 ng/ml for etravirine, rilpivirine and delavirdine, respectively. The intra-day and inter-day precision and accuracy were all in line with the requirements of biological sample analysis (RSD<10%). The plasma samples were stable after three freeze-thaw cycles and being stored for 4 h at room temperature and 60 days at -80 °C (RSD<15%). CONCLUSIONS: The method is proved to be rapid, sensitive and repeatable, and can be used for the determination of plasma concentration and pharmacokinetic study.

KEYWORDS LC-MS/MS; Etravirine; Rilpivirine; Delavirdine; Plasma concentration

[3] 邓明燕, 薛菊兰. 神经内科医院感染病例分析[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(7): 637.

[4] 张蓉蓉, 江静舟, 计瑛, 等. 上海地区 12 家二级医院 2008—2010 年抗菌药物利用分析[J]. 中国药房, 2012, 23(2):

Δ 基金项目: 国家十二五重大新药创制: 抗艾滋病病毒新药临床评价研究技术平台建设课题(No.2012ZX09303013); 国家十二五传染病重大专项: 艾滋病合并结核病规范化诊疗方案的推广及优化研究课题(No.2012ZX10001003)

* 助理研究员。研究方向: 体内药物分析。电话: 021-37990333-5302

通信作者: 研究员, 博士。研究方向: 药动学。电话: 021-37990333-5368。E-mail: zhanglijun1221@163.com

111.

[5] 刘翠环. 我院抗生素合理用药分析[J]. 中国实用医药, 2012, 7(14): 188.

[6] 王凌, 徐玲玲. 我院神经内科住院患者用药分析[J]. 中国药房, 2010, 21(30): 2 810.

[7] 《中国国家处方集》编委会. 中国国家处方集: 化学药品与生物制品卷[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 468.

[8] 申音, 谢小云, 魏文树, 等. 抗菌药物临床合理选择应用进展[J]. 中国药房, 2012, 23(42): 4 016.

(收稿日期: 2013-12-24 修回日期: 2014-03-13)

(编辑: 余庆华)

全球共有 33 种抗艾滋病病毒药物,有些药物的专利即将到期,比如依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉等,国外新药和仿制药将会不断进入中国市场。

依曲韦林为人类免疫缺陷病毒(HIV)-1 非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTI),FDA 批准用于抗 HIV 感染^[1],与其他抗 HIV 药物联用,可以降低病毒载量,提高 CD4 细胞计数,提高免疫能力。利匹韦林作为新一代非核苷类反转录酶抑制剂,是用于抗 HIV 治疗的新型药物。它的不良反应更少,安全性更好,主要用于无 HIV 治疗史的 HIV-成年感染者^[2]。另外,它还适用于对其他 NNRTI 不良反应不耐受的 HIV 感染者和艾滋病患者,因为其不良反应较其他 NNRTI 少见^[3]。地拉韦啉亦属 NNRTI,该药能与 NNRTI 及蛋白酶抑制剂合用,故国外在治疗艾滋病“鸡尾酒”综合疗法中已作为典型的第 3、第 4 种药物应用于临床^[4]。

抗艾滋病病毒药物有时候需要多种药物一起服用,药物之间相互作用影响药物的血药浓度,其血药浓度与疗效、毒副作用密切相关,因此测定药物的血药浓度就显得尤为重要。目前国内尚未见有关依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉的血药浓度测定方法的报道。本研究旨在建立一种选择性好、灵敏度高的液相色谱串联质谱法,同时测定血浆中这 3 种药物的血药浓度,为临床药动学、治疗药物监测、生物利用度研究等奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司);API3200 串联三重四极杆质谱仪(美国 ABI 公司);Eppendorf5415R 低温高速离心机(德国艾本德公司);Techne 氮吹仪(英国 Techne 公司)。

1.2 药品与试剂

依曲韦林(加拿大 TRC 公司,产品号:E937000,纯度:98%);利匹韦林(加拿大 TRC 公司,产品号 R509800,纯度:98%);地拉韦啉(加拿大 TRC 公司,产品号:D230625,纯度:98%);内标:替米沙坦(北京柏雅方舟医药科技有限公司,纯度:99.5%,批号:040511);四甲基叔丁基醚、乙腈和甲醇均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A(0.1%甲酸+100%水)-B(甲醇)=20:80;流速:0.5 ml/min;柱温:35 °C;进样量:10 μl。采用自动进样方式。

2.2 质谱条件

电喷雾电离源(ESI),采用正电荷检测模式。离子源温度:550 °C;电压:4 500 V;气帘气:69 kPa;CAD:41 kPa;Gas 1:276 kPa;Gas 2:345 kPa。扫描方式:多反应监测(MRM);用于定量的替米沙坦、依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉的离子反应对 m/z 分别为 515.1/276.0、437.1/165.1、367.2/195.2、457.3/221.2,去簇电压(DP)分别为 80、70、70、65 V,入口电压(EP)分别为 3.5、8、10、7 V,碰撞能量(CE)分别为 63、45、45、35 eV,扫描时间分别为 100、200、200、200 ms。

2.3 对照品溶液的配制

分析物和内标用甲醇配成 1.0 mg/ml 的储备液,于 -80 °C 保存。对照品储备液的制备:将 1.0 mg/ml 储备液用甲醇配成依曲韦林质量浓度分别为 0.2、0.5、1、2、5、10、20、35、50 μg/ml,利匹韦林质量浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、75、100 μg/ml,地拉韦啉质量浓度分别为 0.01、0.02、0.1、0.5、2、10、20、35、50 μg/ml 的混合储备液。内标储备液质量浓度为 10 μg/ml。

2.4 血浆样品处理

精密移取血浆 200 μl,置于 1.5 ml 离心管中,精密加入甲醇 20 μl 和 10 μg/ml 内标替米沙坦溶液 20 μl,混合 30 s,再加入有机溶剂 A(50 mmol/L 醋酸铵-乙腈=1:6, V/V)200 μl,涡旋混合 2 min,再加入四甲基叔丁基醚 1 ml,涡旋混合 3 min,于 4 °C 下,以 12 000 r/min 高速离心(13 400 ×g)10 min,吸取上清液(乙酸乙酯层)至另一 1.5 ml 离心管中,37 °C 氮气吹干,残渣用流动相 200 μl 复溶,涡旋混合,取上清液 10 μl 进行 LC-MS/MS 分析。

2.5 质谱及图谱结果

质谱分析在选定的质谱条件下,依曲韦林、利匹韦林、地拉韦啉和内标替米沙坦主要生成 $[M+H]^+$ 准分子离子峰,分别为 m/z 437.1、367.2、457.3 和 515.1。选择性对 $[M+H]^+$ 进行 MS² 产物离子全扫描质谱分析,依曲韦林、利匹韦林、地拉韦啉和替米沙坦主要碎片离子分别为 m/z 165.1、195.2、221.2 和 276.0,将其作为 MRM 扫描时监测的产物离子。依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉的母离子、子离子图见图 1。

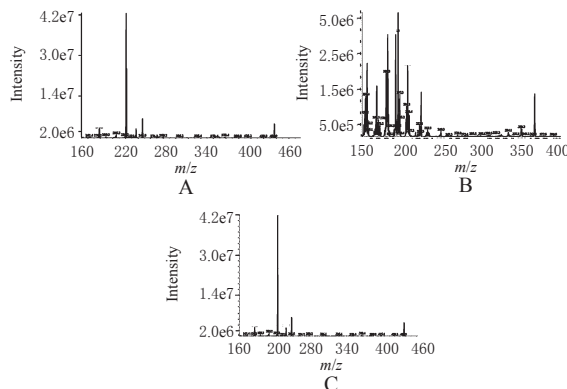


图 1 质谱特征离子图

A. 依曲韦林; B. 利匹韦林; C. 地拉韦啉

Fig 1 MS characteristic ion chromatograms

A. etravirine; B. rilpivirine; C. delavirdine

2.6 典型色谱图

分别取 6 名受试者空白血浆考察方法的选择性,结果表明各样品峰具有很好的分辨率,内源性杂质无干扰,内标响应稳定。空白血浆、空白血浆+依曲韦林+利匹韦林+地拉韦啉+内标替米沙坦对照溶液的血浆样品色谱图见图 2。

2.7 标准曲线的制备

取空白血浆 200 μl,加入依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉系列混合对照溶液 20 μl,配制成相当于依曲韦林血浆质量浓度为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3.5、5 μg/ml,利匹韦林血浆质量浓度为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、7.5、10 μg/ml,地拉韦啉血浆质量浓度为 0.001、0.002、0.01、0.05、0.2、1、2、3.5、5 μg/ml 的样品,按“2.4”项下依法操作,每一浓度进行双样本分析,

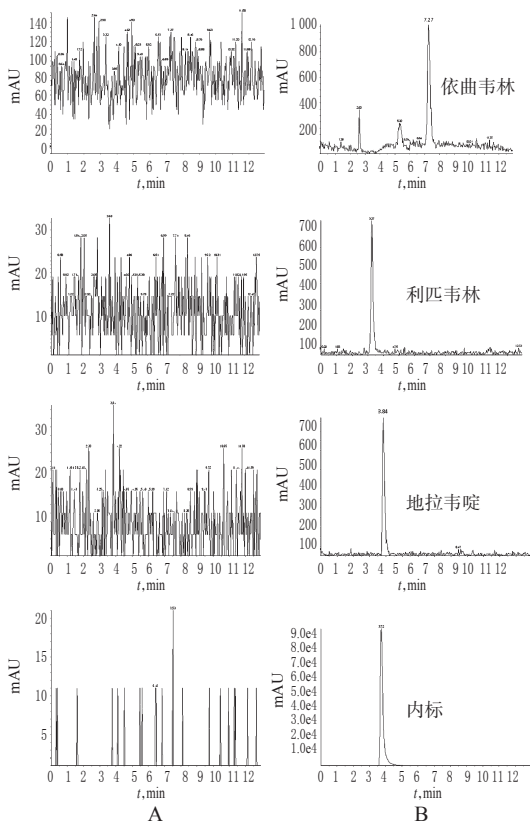


图2 典型色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+0.02 µg/ml 依曲韦林+0.005 µg/ml 利匹韦林+0.001 µg/ml地拉韦啉+1 µg/ml内标

Fig 2 Typical chromatograms

A.blank plasma; B. blank plasma+0.02 µg/ml etravirine+0.005 µg/ml rilpivirine+0.001 µg/ml delavirdine+1 µg/ml internal standard

进样 10 µl, 记录色谱图。以待测物浓度 (x) 为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值 (y) 为纵坐标, 用加权最小二乘法 ($w=1/x^2$) 进行回归运算, 得依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉的标准曲线回归方程分别为 $y_{依}=0.189x_{依}-8.58 \times 10^{-5}$ ($r=0.9942$)、 $y_{利}=0.556x_{利}+4.69 \times 10^{-4}$ ($r=0.9956$)、 $y_{地}=2.13x_{地}+5.03 \times 10^{-3}$ ($r=0.9980$)。结果表明, 三者血药浓度分别在 0.02~5、0.005~10、0.001~5 µg/ml 范围内线性关系良好。

2.8 灵敏度考察

定量下限 (LLOQ) 采用质谱分析时信噪比 ≥ 10 , 在 5 次独立试验中测量值与理论值的标准偏差 $< 20\%$ 。依曲韦林、利匹韦林、地拉韦啉的 LLOQ 分别为 20、5、1 ng/ml。检出限 (LOD) 采用质谱分析时信噪比 ≥ 3 , 依曲韦林、利匹韦林、地拉韦啉的 LOD 分别为 5、2、0.5 ng/ml。结果表明, 本方法有很好的灵敏度, 能够满足临床检测的需要。

2.9 精密度及提取回收率试验

取空白血浆 200 µl, 按照“2.7”项下方法配制成低、中、高 (依曲韦林质量浓度分别为 0.05、2、4 µg/ml, 利匹韦林质量浓度分别为 0.01、4、8 µg/ml, 地拉韦啉质量浓度分别为 0.002、2、4 µg/ml) 梯度浓度的 QC 样品, 每一浓度进行 5 样本分析, 连续测定 3 d, 根据当日的标准曲线计算 QC 样品测得的浓度并进行方差分析, 得到日内和日间精密度; 同法以空白血浆, 除不加标准系列溶液和内标外, 按照“2.4”项方法处理后, 再加入

相应浓度的依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉, 取 10 µl 进样。以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率 ($n=5$)。采用同一天数据, 将 3 种药物与内标峰面积的比值代入随行标准曲线, 计算所得浓度和加入浓度的比值, 即为方法回收率。精密度及回收率试验结果见表 1。

表 1 精密度及回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of precision and recovery tests ($\bar{x} \pm s, n=5$)

药品名称	加入量, µg/ml	日内精密度		日间精密度		提取回收率, %	方法回收率, %
		测得量, µg/ml	RSD, %	测得量, µg/ml	RSD, %		
依曲韦林	0.05	0.049 ± 0.003	5.94	0.051 ± 0.005	8.93	97.9 ± 5.09	119.5 ± 7.77
	2	1.906 ± 0.097	5.09	2.065 ± 0.139	6.75	90.5 ± 2.81	115.5 ± 5.66
	4	4.038 ± 0.170	4.22	4.103 ± 0.302	7.36	89.8 ± 3.77	112.4 ± 6.18
利匹韦林	0.01	0.010 ± 0.000	4.44	0.010 ± 0.001	9.23	93.1 ± 6.98	110.5 ± 9.06
	4	3.856 ± 0.164	4.25	3.978 ± 0.294	7.38	88.6 ± 3.81	102.8 ± 6.68
	8	7.680 ± 0.266	3.47	7.890 ± 0.428	5.42	88.2 ± 2.91	106.3 ± 4.89
地拉韦啉	0.002	0.002 ± 0.000	7.63	0.002 ± 0.000	9.83	102.4 ± 6.35	91.4 ± 7.22
	2	1.970 ± 0.092	4.65	2.016 ± 0.138	6.89	91.9 ± 2.02	95.8 ± 4.12
	4	3.758 ± 0.181	4.82	3.978 ± 0.350	8.81	93.0 ± 4.46	97.6 ± 6.05

2.10 基质效应

取志愿者空白血浆 200 µl, 按“2.4”项下方法处理, 加入依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉低、中、高质量浓度溶液 20 µl, 内标 20 µl, 进行 LC-MS/MS 分析获得峰面积, 与相同浓度混合标准品溶液直接进样获得峰面积之比评价基质效应, 比值均在 98%~120% 范围内, 内标的基质效应为 120%。

2.11 稳定性考察

考察了依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉低、中、高质量浓度的血浆样品在不同保存条件下的稳定性 ($n=3$), 检测结果的 RSD $< 15\%$ 。研究结果显示, 依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉血浆样品室温放置 4 h 稳定 (依曲韦林 RE 为 -13.8%~9.0%, 利匹韦林 RE 为 -6.5%~12%, 地拉韦啉 RE 为 -14.5%~-4.0%), 血浆样品经历 3 次冷冻-解冻循环稳定 (依曲韦林 RE 为 -10.8%~4.6%, 利匹韦林 RE 为 -10%~5.0%, 地拉韦啉 RE 为 -5.9%~13.8%), 血浆样品 -80 °C 保存 2 个月稳定 (依曲韦林 RE 为 -3.2%~12.6%, 利匹韦林 RE 为 -9.0%~2.8%, 地拉韦啉 RE 为 -13.2%~10.7%)。稳定性试验结果见表 2。

表 2 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Results of stability tests ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药品名称	加入量, µg/ml	测得量, µg/ml		
		室温放置 4 h	3 次冻融	-80 °C 保存 2 个月
依曲韦林	0.05	0.0431 ± 0.002	0.0446 ± 0.001	0.0484 ± 0.003
	2	2.181 ± 0.135	2.135 ± 0.124	2.138 ± 0.126
	4	4.462 ± 0.094	4.184 ± 0.205	4.504 ± 0.117
利匹韦林	0.01	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.009 ± 0.000
	4	4.171 ± 0.163	3.620 ± 0.245	4.112 ± 0.300
	8	7.483 ± 0.404	7.584 ± 0.698	7.560 ± 0.461
地拉韦啉	0.002	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000
	2	1.827 ± 0.046	2.158 ± 0.114	2.214 ± 0.137
	4	3.421 ± 0.106	3.764 ± 0.184	3.472 ± 0.128

3 讨论

3.1 应用前景

依曲韦林、利匹韦林和地拉韦啉这 3 种药物将在不久的将来进入抗艾滋病的临床治疗中, 这些药物的血药浓度与不良

反应存在一定相关性。因此,建立准确、简便、易行的抗病毒药物的血药浓度测定方法,对研究其不良反应具有非常重要的意义。

3.2 与其他文献比较

有文献^[6]应用液-液提取的方法测定了大鼠血浆中依曲韦林的浓度,灵敏度很高,但是峰形不好,有拖尾;Fayet A等^[6]用乙腈沉淀法测定人血浆中包括依曲韦林在内的4种抗病毒药物的浓度,两种方法依曲韦林的灵敏度欠佳。有文献^[7]应用蛋白沉淀、稀释上清液的方法测定人感染艾滋病的血浆样本;Burugula L^[7]用液-液萃取的方法测定血浆中利匹韦林的浓度,这两种方法回收率欠佳。目前只查到一篇关于地拉韦啉液-质联用检测方法的文章,Egge-Jacobsen W等^[8]用蛋白沉淀方法测定包括地拉韦啉在内的9种抗病毒药物的浓度,地拉韦啉的灵敏度是本方法中地拉韦啉LLOQ的20倍。本文应用蛋白沉淀联合液-液萃取的方法,样品处理后这3种药物的灵敏度和峰形都比较好,满足临床样本检测的要求。

一些国外文献给出了服用3种药物后血浆中各药物的浓度^[9-16],其中该3种药物的血药浓度均在笔者建立方法所设定的标准曲线的范围之内,因此所建立的方法适用于临床血药浓度测定、临床血药浓度监测和研究药物之间的相互作用,对国内抗艾滋病药物的临床研究可起到很好的支撑作用。

参考文献

[1] Schiller DS, Youssef-Bessler M. Etravirine: a second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) active against NNRTI-resistant strains of HIV [J]. *Clin Ther*, 2009, 31(4):692.

[2] Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, et al. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(2):718.

[3] Fulco PP, Mcnicholl IR. Etravirine and rilpivirine: nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors with activity against human immunodeficiency virus type 1 strains resistant to previous nonnucleoside agents[J]. *Pharmacotherapy*, 2009, 29(3):281.

[4] De Clercq E. Antiviral drugs: current state of the art[J]. *J Clin Virol*, 2001, 22(1):73.

[5] Abobo CV, Wu L, John J, et al. LC-MS/MS determination of etravirine in rat plasma and its application in pharmacokinetic studies[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(30):3181.

[6] Fayet A, Béguin A, Zanolari B, et al. A LC-tandem MS assay for the simultaneous measurement of new antiretroviral agents: Raltegravir, maraviroc, darunavir, and etravirine[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(11/12):1057.

[7] Burugula L, Pilli NR, Makula A, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor rilpivirine in human plasma[J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(2):172.

[8] Egge-Jacobsen W, Unger M, Niemann CU, et al. Automated, fast, and sensitive quantification of drugs in human plasma by LC/LC-MS: quantification of 6 protease inhibitors and 3 nonnucleoside transcriptase inhibitors[J]. *Ther Drug Monit*, 2004, 26(5):546.

[9] Tudor-Williams G, Cahn P, Chokeyphalbulkit K, et al. Etravirine in treatment-experienced, HIV-1-infected children and adolescents: 48-week safety, efficacy and resistance analysis of the phase II PIANO study[J]. *HIV Med*, 2014, 15(9):513.

[10] Djerada Z, Feliu C, Tournois C, et al. Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 86:100.

[11] Kakuda TN, Berckmans C, De Smedt G, et al. Single-dose pharmacokinetics of pediatric and adult formulations of etravirine and swallowability of the 200-mg tablet: results from three Phase 1 studies[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2013, 51(9):725.

[12] Di Perri G, Green B, Morrish G, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of etravirine 400 mg once daily in treatment-naïve patients[J]. *HIV Clin Trials*, 2013, 14(3):92.

[13] Shibata M, Takahashi M, Yoshino M, et al. Development and application of a simple LC-MS method for the determination of plasma rilpivirine (TMC-278) concentrations[J]. *J Med Invest*, 2013, 60(1/2):35.

[14] Crauwels HM, Van Heeswijk RP, Buelens A, et al. Impact of food and different meal types on the pharmacokinetics of rilpivirine[J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53(8):834.

[15] Morse GD, Cohn SE, Shelton MJ, et al. Multiple-dose pharmacokinetics of delavirdine mesylate and didanosine in HIV-infected patients[J]. *Clin Drug Investig*, 2003, 23(5):323.

[16] Morse GD, Fischl MA, Shelton MJ, et al. Effect of food on the steady-state pharmacokinetics of delavirdine in patients with HIV infection[J]. *Clin Drug Investig*, 2003, 23(4):255.

(收稿日期:2014-04-14 修回日期:2014-09-18)

(编辑:李劲)