

· 技术与方法 ·

## LC-ESI-MS/MS 方法测定人血浆肌苷的应用研究\*

王洪波<sup>1</sup>, 张梦亮<sup>2</sup>, 张芸辉<sup>2</sup>, 杨 艳<sup>2</sup>, 张宝昌<sup>1△</sup>

(1. 长春工业大学化学与生命科学学院, 长春 130012; 2. 吉林大学生命科学学院, 长春 130012)

**摘要:**目的 建立 LC-MS/MS 测定人血浆中肌苷浓度的方法并应用于异丙肌苷药代动力学研究。方法 以阿德福韦为内标, 采用甲醇: 10 mmol/L 乙酸铵(15: 85, v/v) 为流动相, 以 Agilent SB-C18 柱(5  $\mu$ m 粒径, 150.0 mm  $\times$  4.6 mm I. D.) 为分析柱, 通过电喷雾电离源(ESI), MRM 扫描方式进行检测。用于定量分析的离子反应分别为 m/z 母离子为 267.3, 子离子为 135.0(肌苷)和 m/z 母离子为 272.0, 子离子为 134.1(阿德福韦)。结果 血浆中肌苷定量的线性范围 10~3 000 ng/mL, 定量下限为 10 ng/mL。日内、日间精密度(RSD) 小于 5%, 平均回收率大于 90%, 无基质效应。结论 本法专属性强, 样品处理方便, 灵敏度高, 适用于肌苷临床药动力学研究。

**关键词:**肌苷; 肌酐普拉诺贝; 液相色谱-质谱联用法; 血浆; 药代动力学

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)03-0311-03

## Application study on LC-ESI-MS/MS determination of inosine in human plasma\*

Wang Hongbo<sup>1</sup>, Zhang Mengliang<sup>2</sup>, Zhang Yunhui<sup>2</sup>, Yang Yan<sup>2</sup>, Zhang Baochang<sup>1△</sup>

(1. School of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun, Jilin 130012, China;

2. College of Life Science, Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China)

**Abstract: Objective** To develop a LC-MS/MS method for the determination of inosine in human plasma and to apply it in the isoprinosine pharmacokinetic researches. **Methods** With adefovir as the internal standard, methanol-10 mmol/L ammonium acetate(15:85, v/v) was adopted as the mobile phase. The chromatographic column was the Agilent SB-C18 column(5  $\mu$ m, 150 mm  $\times$  4.6 mm I. D.). Electrospray ionization(ESI) source was applied and the detection was conducted by the multiple-reaction monitoring(MRM) mode. The ion reactions for the quantitative analysis were m/z 135.0-267.3(inosine) and m/z 134.1-272.0(adefov-ir). **Results** The linear range of plasma inosine was 10-3 000 ng/mL. The lower detection limit was 10 ng/mL. The inter- and intra-day precisions(RSD) were less than 5%. The average recovery rate was above 90% without the matrix effect. **Conclusion** This method has the strong specificity, convenience in treating the sample and high sensitivity, and is suitable for the inosine pharmacokinetic researches.

**Key words:** inosine; inosine pranobex; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; plasma; pharmacokinetics

异丙肌苷原为一抗病毒药, 对人体疱疹、流感及鼻病毒感染均有疗效, 用于单纯疱疹病毒感染的患者疗效显著。现发现异丙肌苷具有增强机体免疫功能的作用, 主要是增强细胞免疫功能, 作为一新的免疫调节剂, 在国外临床上广泛应用<sup>[1-9]</sup>。异丙肌苷由肌苷与二甲胺基异丙醇-对乙酰氨基苯甲酸盐(1:3) 3 部分组成, 易水解成为肌苷、二甲胺基异丙醇、对乙酰氨基苯甲酸, 以往有关异丙肌苷的体内药代动力学报道甚少。本试验建立了快速、灵敏的测定血浆中肌苷浓度的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS) 分析方法, 并对 4 名健康受试者口服 1 g 异丙肌苷后肌苷的体内药代动力学过程进行了初步的研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器和药品** 三重四极杆串联质谱仪, 型号 API 4000, 配有电喷雾离子源(加拿大 Applied Biosystem 公司); Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司); TGL-16G-A 高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

肌苷对照品(浓度为 99.8%, 上海微蒙生物科技有限公司提供, 批号: 140669-200702); 内标阿德福韦对照品(浓度

99.0%, 葛兰素史克苏州制药公司提供, 批号: 9002); 色谱纯级别甲醇由 Sigma-Aldrich 有限公司提供, 其他试剂为分析纯级别; 人血浆由吉林大学附属第一医院提供。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 色谱/质谱条件** 色谱条件 Agilent SB-C18 色谱柱, 5  $\mu$ m 粒径, 150.0 mm  $\times$  4.6 mm I. D., 美国 Agilent 公司; 流动相: 甲醇: 10 mmol/L 乙酸铵-水溶液(15: 85, v/v); 流速: 1 mL/min; 柱温: 40  $^{\circ}$ C; 进样量: 5  $\mu$ L。质谱条件 离子源: ESI 离子源; 喷射电压: -4 000 V; 温度: 500  $^{\circ}$ C; 源内气体(N<sub>2</sub>) GS1、GS2 和气帘气体压力分别为: 40 psi、40 psi 和 15 psi; 正离子方式检测; 扫描方式为多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 肌苷的解簇电压(DP)、碰撞能量(CE) 分别为 -78 V 和 -30 eV; 内标阿德福韦的 DP 和 CE 分别为 -75 V 和 -50 eV; 用于定量分析的离子对分别为 m/z 母离子为 267.3, 子离子为 135.0(肌苷)和 m/z 母离子为 272.0, 子离子为 134.1(内标阿德福韦)。

**1.2.2 样品采集和处理** 全血取出后置肝素化试管中, 立即

4 ℃离心(15 000 r/min×5 min),取出血浆置另一试管(每毫升血浆加 100 μL 30%高氯酸溶液),充分振荡混匀,低温离心(15 000 r/min×5 min),取上清液,于 80 ℃冷冻待测。室温溶解,取 100 μL 上清液,立即加入内标溶液 100 μL,充分振荡混匀后,取上清液 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

**1.2.3 溶液的配制** 称取 25.0 mg 肌苷(分子式: C<sub>10</sub> H<sub>12</sub> N<sub>4</sub> O<sub>5</sub>)对照品,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇-水定容至刻度,配制成 1 mg/mL 的肌苷母液。

**标准系列溶液的配制:**取肌苷储备液适量,分别用室温放置超过 3 d 后的空白血浆稀释至 10、30、100、300、1 000、3 000 ng/mL。内标的配制:称取 25.0 mg 阿德福韦,置于 25 mL 容量瓶中,加甲醇-水定容至刻度,配制成 1 mg/mL 的母液,取适

量用甲醇水(1:1, v/v)稀释至浓度为 1 μg/mL,即为内标溶液。

## 2 结果

本试验参照相关指导原则进行了方法学确证<sup>[10]</sup>。

**2.1 方法的专属性** 分别取 6 名健康受试者的空白血浆(室温放置超过 3 d 后的空白血浆)1 000 μL,按血浆样品处理方法操作,得到空白样品色谱图(图 1A);将含有 10 ng/mL 肌苷的血浆样品加入内标阿德福韦后,依同法操作,得到定量下限样品的色谱图(图 1B);取受试者给药后收集的血浆样品,依同法操作,得色谱图 1C。结果表明:室温放置超过 3 d 后的空白血浆内源性物质不干扰肌苷和阿德福韦的测定。

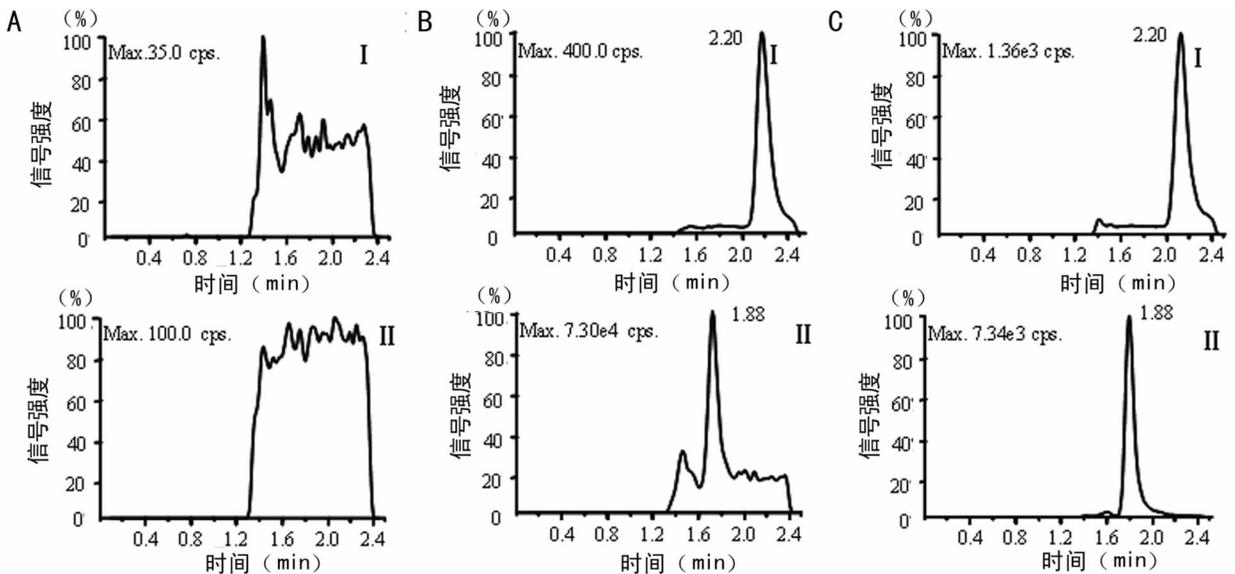


图 1 测定人血浆中肌苷和内标阿德福韦的典型 MRM 色谱图

表 1 血浆中肌苷 LC-MS/MS 测定方法的准确度与精密度(3 个分析批,每分析批 n=6)

标示浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	日内精密度 RSD (%)	日间精密度 RSD (%)	准确度 (%)
30	31.7±1.6	4.38	3.21	105.67
100	98.8±8.1	2.91	3.55	98.80
1 000	967.0±62.0	4.40	2.61	96.70

**2.2 标准曲线制备和定量下限** 取用空白血浆(室温放置超过 3 d 后的空白血浆)配制的标准系列溶液(10、30、100、300、1 000、3 000 ng/mL) 1000 μL,按血浆样品处理方法操作,取 5 μL 进行 LC-MS/MS 分析;以肌苷标示浓度为横坐标,肌苷与内标物阿德福韦的色谱峰面积比值为纵坐标,以加权系数  $W=1/\chi^2$  进行线性回归<sup>[11]</sup>,得到标准曲线的回归方程。典型的回归方程曲线为  $Y=0.0019X-0.00689(r=0.9954)$ ,其中 Y 为待测物与内标的峰面积比, X 为标准系列溶液浓度。根据标准曲线,血浆中肌苷的线性范围为 10~3 000 ng/mL,定量下限(9.8±0.4) ng/mL(n=6)。

**2.3 精密度、准确度** 取空白血浆(室温放置超过 3 d 的空白

血浆)配制的低、中、高 3 个浓度(30、300、2 400 ng/mL)的质量控制(QC)样品,按血浆样品处理方法操作,每浓度 6 样本,连续测定 3 d。根据当日的工作曲线,计算 QC 样品测得浓度,根据 QC 样品结果计算本法的准确度与精密度,测定血浆中肌苷的准确度与精密度。见表 1。

表 2 血浆中肌苷的稳定性(n=3)

稳定性考察条件	浓度(ng/mL)		相对标准 偏差(%)	回收率 (%)
	标示浓度	实测浓度		
-80 ℃冰冻 30 d	30	28.60±1.90	6.67	95.27
	100	109.00±33.30	3.13	109.32
	1 000	970.00±63.30	6.37	97.02
3 次反复冻融	30	31.70±4.01	12.70	105.68
	10	10.10±0.41	3.83	101.74
	1 000	949.00±90.00	9.59	94.84
样品经处理后室温 放置 2.5 h	30	31.50±1.23	3.95	105.05
	10	9.93±0.80	7.99	99.28
	1 000	992.00±89.90	9.15	99.49

**2.4 提取回收率和基质效应** 取一定量空白血浆(室温放置超过 3 d 的空白血浆),按血浆样品处理方法(不加入内标)操作,获得的空白血浆上清液,用此上清液配制低、中、高 3 个浓度的 QC 样品和内标,每浓度 4 个样本。将该样本进行 LC-MS/MS 分析,获得相应峰面积,两种处理方法得到的峰面积比值(百分比)即为提取回收率。血浆样品中肌苷低、中、高 3 个浓度回收率分别为  $(96.7 \pm 3.45)\%$ 、 $(93.7 \pm 2.60)\%$ 、 $(93.2 \pm 2.58)\%$ 。用水配制的低、中、高 3 个浓度(30、300、2 400 ng/mL)的质量控制(QC)样品,按照标准曲线制备方法操作,每浓度 4 个样本;同时取一定量空白血浆(室温放置超过 3 d 的空白血浆),按血浆样品处理方法(不加入内标)操作,获得的空白血浆上清液,用此上清液配制低、中、高 3 个浓度的 QC 样品和内标,每浓度四样本,进样分析,获得相应峰面积,以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取基质效应,分别为  $(98.9 \pm 9.09)\%$ 、 $(104.8 \pm 3.87)\%$ 、 $(102.5 \pm 6.20)\%$ 。

**2.5 稳定性考察** 依据“2.3”项下方法制备稳定性 QC 样品,每浓度 3 个样本,不经提取,经  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 30 d 后,测定样品浓度;或经反复 3 次  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰冻-溶解循环,测定样品浓度。结果(表 2)表明:所有冻融试验测定值与添加值的相对偏差(R. E. %)均小于 15%。即血浆样品可以进行反复冻融或在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 30 d,不会影响测试结果的准确度。

试验中对处理后的 QC 样品(每浓度 3 个样本)进行了 2.5 h 室温放置稳定性考察,结果显示所有样品的试验测定值与添加值 R. E. %均小于 15%,说明分析测试过程中的样品较为稳定。

**2.6 分析方法在药动学研究中的应用** 4 例健康受试者,男女各半。试验方案经吉林大学第一医院医学伦理委员会审核批准。向受试者解释知情同意,并签署受试者知情同意书进入该试验。受试者于服药前 1 d 入住 I 期病房,并于第 2 天 8:00 口服 1 g 异丙肌苷片(北京赛而生物药业有限公司生产,批号:20081215),温开水 200 mL 送服。临床医生及研究者随时观察不良事件并对受试者进行监护。给药前、给肌苷药后 10、20、30、45 min,1.00、1.25、1.50、2.00、2.50、3.00、4.00、6.00 h 于上肢肘窝静脉取血 5 mL,按“1.2.2”操作,以当日标准曲线计算各时间点的血药浓度,测得的药时曲线见图 2。由图 2 可见,给药前,健康受试者血浆基础肌苷在 20~60 ng/mL。

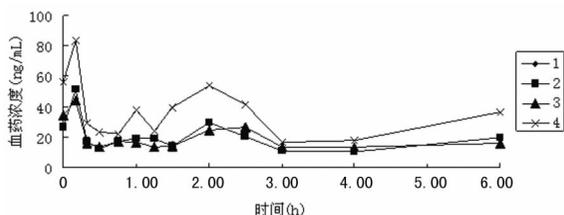


图 2 4 名健康受试者口服 1 g 异丙肌苷后肌苷血药浓度-时间曲线

### 3 讨论

**3.1 肌苷作为一种内源性核苷类物质,对其定量分析报道不多。**Jeng 等<sup>[12]</sup>用 LC-MS/MS 同时定量分析了肝癌患者和健康人尿中 7 种核苷;David 等<sup>[13]</sup>利用微渗析技术用 HPLC-DAD 检测了犬心肌缺血模型细胞间隙中 5 种核苷浓度;文献<sup>[14-15]</sup>报道用 HPLC-DAD 或 HPLC-UV 测定人血浆中内源

性肌苷浓度。本实验建立了人血浆肌苷 LC-MS/MS 分析方法,该方法灵敏度高(定量下限 10 ng/mL),分析时间短,处理方法简单(一步沉淀蛋白),适用于高通量的药代动力学研究或临床样本检测。该方法已应用于健康受试者口服异丙肌苷后的体内药代动力学研究。

**3.2 肌苷在全血和血浆中均不稳定。**在全血中,嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)快速代谢肌苷成为次黄嘌呤( $t_{1/2} < 5\text{ min}$ );在血浆中,PNP 的活力相对较低<sup>[14]</sup>。因此,为保证样品在处理过程中的稳定性,尽快按照“1.2.2”处理,置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。高氯酸可以破坏酶的活性,所以高氯酸处理过的样品相对稳定。实验证明含肌苷的新鲜大鼠血浆处理后上清  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下至少稳定 30 d。同时未处理的含肌苷的新鲜血浆室温放置一段时间(3 d)后肌苷完全降解,可以用来作为空白血浆配制标准曲线,不干扰肌苷和内标阿德福韦的定量分析。

**3.3 4 例受试者的血药浓度-时间曲线见图 2。**由图可见,4 名受试者的药-时曲线均呈现不规律的多峰现象,推测其原因可能是多方面的。肌苷为机体内源性物质,内源性肌苷的干扰无法避免;在人体内,肌苷的变化途径复杂,作为嘌呤代谢过程中一个中间代谢产物,可以由腺苷、次黄嘌呤核苷酸和次黄嘌呤生成肌苷,同时肌苷也能通过不同途径代谢成次黄嘌呤或次黄嘌呤核苷酸,十几种酶参与其中,如肌苷酶、核苷磷酸化酶等。很多情况下,机体会针对某种内源性物质的增多或减少发生代偿反应,肌苷在人体内是否存在这种代偿性的保护机制目前尚不明确;另外,有些内源性物质受饮食、昼夜节律或生理周期影响明显,肌苷是否受饮食、昼夜节律或生理周期的影响还需进一步考察。

本研究建立 LC-MS/MS 测定人血浆中肌苷浓度的方法并进行了方法确证。该方法专属性强,样品处理方便,灵敏度高,适用于肌苷临床药动学研究。

### 参考文献:

- [1] Ghram A, Reddy PG, Blecha F, et al. Effects of bovine respiratory disease viruses and isoprinosine on bovine leukocyte function in vitro[J]. *Vet Microbiol*, 1989, 20(4): 307-314.
- [2] Pedersen BK, Tvede N, Diamant M, et al. Effects of isoprinosine treatment of HIV-positive patients on blood mononuclear cell subsets, NK- and T-cell function, tumour necrosis factor, and interleukins 1, 2, and 6[J]. *Scand J Immunol*, 1990, 32(6): 641-649.
- [3] Singh H, Herndon DN. Effect of isoprinosine on lymphocyte proliferation and natural killer cell activity following thermal injury[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1989, 11(4): 631-644.
- [4] inosiplex GC, intraventricular interferon-alpha in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): international multicenter study[J]. *J Child Neurol*, 2003, 18(12): 819-827.
- [5] Tay SK. Efficacy of inosine pranobex oral therapy in subclinical human papillomavirus infection of the vulva: a randomized double-blinded placebo controlled study[J]. *Int J STD AIDS*, 1996, 7(4): 276-280. (下转第 316 页)

慢下降,诱发疾病<sup>[11-13]</sup>。因此处于这个阶段人群应该关注自己的健康,尤其是心理健康这个比较隐形的杀手。意外伤害,不在预料范围内,它不惧有普遍性,但是随着经济的发展,交通工具的普及使交通事故的发生率大大增加,加上各种疾病的发病率增加,尤其是糖尿病、心脑血管疾病、癌症的发生率增加,无异于雪上加霜,增加了家人的负担和压力,增加了心理健康问题发生的几率。这种意外其实也不是不可避免的,不要疲劳作业,适当锻炼身体,定期体检,让生活变得更健康。对于交通事故意外,应避免酒后驾车。

综上所述,本地心理亚健康患者以人际关系敏感、偏执及睡眠差等症状较为突出,尤其是知识分子、睡眠不好者,及发生意外伤害的人群都是心理亚健康的易发人群。

#### 参考文献:

- [1] 周旭,李伟,肖元梅,等.大学生心理亚健康对生理亚健康的影响研究[J].南昌大学学报:医学版,2012,52(8):80-83.
  - [2] 黄彦,黄祎,张太君,等.亚健康抑郁倾向人群的中医辨识及影响因素分析[J].重庆医学,2013,42(3):315-317.
  - [3] 唐尉杰,彭青渝,刘溢,等.军医大学生亚健康及其流行病学特征调查[J].西南国防医药,2013,23(3):347-348.
  - [4] 中华中医药学会.亚健康中医临床指南[M].北京:中国中医药出版社,2006.
  - [5] Nikolaidis G. Indeterminacy of definitions and criteria in mental health: case study of emotional disorders [J]. J Eval Clin Pract,2013,19(3):531-536.
  - [6] McCormack M, Connolly P, Lawlor E, et al. Managing physical health in mental health populations[J]. Ir Med J,2013,106(4):101-102.
  - [7] Sood P, Priyadarshini S, Aich P. Estimation of psychological stress in humans: a combination of theory and practice [J]. PLoS One,2013,8(5):e63044.
  - [8] McGrath L, Reavey P. Heterotopias of control: placing the material in experiences of mental health service use and community living[J]. Health Place,2013,22(2):123-131.
  - [9] Allen JG. Psychotherapy is an ethical endeavor: Balancing science and humanism in clinical practice[J]. Bull Menninger Clin,2013,77(2):103-131.
  - [10] 邹媛,姚华,林炜,等.新疆高校知识分子亚健康症状调查[J].现代预防医学,2009,36(16):3083-3084.
  - [11] 李春艳,刘星亮,何燕燕.我国中年男女亚健康人群血液生化指标的比较研究[J].武汉体育学院学报,2011,45(9):41-45.
  - [12] Bar-Zeev ON, Chiwaula, economic growth and child health in sub saharan Africa[J]. Malawi Med J,2012,24(4):87-88.
  - [13] Porter G, Hampshire K, Dunn C, et al. Health impacts of pedestrian head-loading: a review of the evidence with particular reference to women and children in sub-Saharan Africa[J]. Soc Sci Med,2013,88(1):90-97.
- (收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-22)
- 
- (上接第 313 页)
- [6] Georgala S, Katoulis AC, Befon A, et al. Oral inosiplex in the treatment of cervical condylomata acuminata; a randomised placebo-controlled trial[J]. BJOG,2006,113(9):1088-1091.
  - [7] De Simone C, Famularo G, Tzantzoglou S, et al. Inosine pranobex in the treatment of HIV infection; a review[J]. Int J Immunopharmacol,1991,13 Suppl 1:19-27.
  - [8] Brzeski M, Madhok R, Hunter JA, et al. Randomised, double blind, placebo controlled trial of inosine pranobex in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis,1990,49(5):293-295.
  - [9] Georgala S, Katoulis AC, Befon A, et al. Inosiplex for treatment of alopecia areata; a randomized placebo-controlled study[J]. Acta Derm Venereol,2006,86(5):422-424.
  - [10] US Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation [S/OL]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>.
  - [11] 钟大放.以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J].药物分析杂志,1996,16(5):343-346.
  - [12] Jeng LB, Lo WY, Hsu WY, et al. Analysis of urinary nucleosides as helper tumor markers in hepatocellular carcinoma diagnosis [J]. Rapid Commun Mass Spectrom,2009,23(11):1543-1549.
  - [13] Mei DA, Gross GJ, Nithipatikom K. Simultaneous determination of adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid in microdialysis samples using microbore column high-performance liquid chromatography with a diode array detector[J]. Anal Biochem,1996,238(1):34-39.
  - [14] Farthing D, Sica D, Gehr T, et al. An HPLC method for determination of inosine and hypoxanthine in human plasma from healthy volunteers and patients presenting with potential acute cardiac ischemia[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2007,854(1/2):158-164.
  - [15] Farthing D, Xi L, Gehr L, et al. High-performance liquid chromatography(HPLC) determination of inosine, a potential biomarker for initial cardiac ischaemia, using isolated mouse hearts[J]. Biomarkers,2006,11(5):449-459.
- (收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-12)