

基于 NBD - Cl 衍生化试剂的 LC - MS/MS 法 在测定胺基/巯基类药物血药浓度中的应用

Application of LC - MS/MS method based on NBD - Cl derivatization reagent for determining blood concentrations of amino/mercaptan drugs

石 景¹, 郭继芬², 唐吉军²,
贺艳斌¹

(1. 长治医学院 药学院, 上党中药材品质提升与
利用厅市共建山西省重点实验室培育基地, 山西
长治 046000; 2. 万舒(北京)医药科技有限公司,
北京 100020)

SHI Jing¹, GUO Ji - Fen²,
TANG Ji - Jun², HE Yan - Bin¹

(1. Shanxi Provincial Department -
Municipal Key Laboratory Cultivation
Base for Quality Enhancement and
Utilization of Shangdang Chinese
Medicinal Materials, School of
Pharmacy, Changzhi Medical College,
Changzhi 046000, Shanxi Province,
China; 2. Wanshu (Beijing)
Pharmaceutical Technology Co., Ltd.,
Beijing 100020, China)

基金项目: 山西省研究生实践创新项目
(2024SJ407); 山西省基础研究计划
项目(202303021211109)

作者简介: 石景(1999 -), 男, 硕士研究生, 主要
从事药物分析研究

通信作者: 贺艳斌, 教授, 硕士生导师
Tel: (0355) 3151521

E - mail: heyb@czmc.edu.cn

摘要:目的 本研究以 4 - 氯 - 7 - 硝基苯并 - 2 - 氧杂 - 1,3 - 二唑(NBD - Cl) 为衍生化试剂, 建立 LC - MS/MS 分析方法, 用于定量检测胺基类药物美沙拉秦(mesalazine, 5 - ASA) 以及巯基类药物甲硫咪唑(methimazole, MMI) 与卡托普利(captopril, CAP)。方法 血浆样品采用衍生化法和蛋白沉淀法。对不同药物进行衍生化条件考察(衍生化试剂浓度、反应温度、衍生化时间), 以 Thermo AccucoreTM C₁₈ (2.4 μ m, 30 mm $\times$ 4.6 mm)、Agilent Poroshell 120 EC - C₁₈ (4 μ m, 50 mm $\times$ 4.6 mm) 为分析柱, 0.1% 甲酸水 - 乙腈、0.1% 甲酸水 - 甲醇和 5 mM 乙酸铵 - 甲醇: 乙腈 (V: V = 50: 50) 为梯度流动相, 流速分别为 0.5 mL $\cdot$ min⁻¹ 和 0.6 mL $\cdot$ min⁻¹, 采用 ESI 源在多反应监测方式(MRM) 下进行正/负离子检测。**结果** 5 - ASA、MMI 和 CAP 均与 NBD - Cl 发生亲核取代反应, 在适宜衍生化条件下反应迅速且彻底。所建立的 MMI 分析方法线性范围为 1.00 ~ 500 ng $\cdot$ mL⁻¹, 线性关系良好($r = 0.9989$)。CAP 和 5 - ASA 分析方法线性范围均为 2.00 ~ 1 000 ng $\cdot$ mL⁻¹, 且线性关系良好(CAP: $r = 0.9993$, 5 - ASA: $r = 0.9996$), 批内、批间精密度(CV) 和准确度(RE) 均 < 15%, 能够满足相关药物剂型的实际样品检测。**结论** 所建立的 3 种药物的 NBD - Cl 衍生化 LC - MS/MS 分析方法具有高灵敏度、专属强、背景噪音小等优势, 并成功解决了 MMI 和 5 - ASA 质谱响应低、色谱保留差以及 CAP 易被氧化等方面的缺陷, 所需血浆样品量少, 分析时间短, 为 3 种药物的生物样品分析提供了可行的方案, 同时也表明 NBD - Cl 衍生化技术在胺基类和巯基类药物分析中具有一定的适用性。

关键词: 4 - 氯 - 7 - 硝基苯并 - 2 - 氧杂 - 1,3 - 二唑; 衍生化; 液相 - 质谱联用; 血药浓度

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.02.012

中图分类号: R917 文献标志码: A

文章编号: 1001 - 6821(2026)02 - 0224 - 07

Abstract: Objective This study used 4 - chloro - 7 - nitrobenzo - 2 - oxa - 1,3 - diazole (NBD - Cl) as a derivatization reagent to establish an LC - MS/MS analytical method for the quantitative detection of a class of amine drugs, mesalazine (5 - ASA) and two thiol drugs, methimazole (MMI) and captopril (CAP). **Methods** Plasma samples were processed using derivatization and protein precipitation methods. Optimal derivatization conditions (derivatization reagent concentration, reaction temperature, and derivatization time) were investigated for different drugs. The analytical columns used were Thermo AccucoreTM C₁₈ (2.4 μ m, 30 mm $\times$ 4.6 mm), Agilent Poroshell 120 EC - C₁₈ (4 μ m, 50 mm $\times$ 4.6 mm) as analytical columns, with 0.1% formic acid -

acetonitrile, 0.1% formic acid – methanol, and 5 mM ammonium acetate – methanol; acetonitrile ($V:V = 50:50$) as the gradient mobile phase, with flow rates of $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively, using an ESI source for positive/negative ion detection in multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** 5 – ASA, MMI, and CAP all undergo nucleophilic substitution reactions with NBD – Cl, reacting rapidly and completely under suitable derivatization conditions. The established MMI analytical method has a linear range of $1.00 - 500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, with good linearity ($r = 0.9989$). The linear ranges of the CAP and 5 – ASA analytical methods are both $2.00 - 1\,000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, with good linear relationships (CAP: $r = 0.9993$, 5 – ASA: $r = 0.9996$). The intra – and inter – batch precision (CV) and accuracy (RE) were both less than 15%, making the methods suitable for the analysis of actual samples of the corresponding drug formulations and successfully applied to the pharmacokinetic studies of MMI. **Conclusion** The established NBD – Cl derivatization LC – MS/MS analytical methods for the three drugs exhibit advantages such as high sensitivity, strong specificity, and low background noise, and successfully address the issues of low mass spectrometry response, poor spectral retention, and the tendency of CAP to oxidize. The methods require minimal plasma sample volume and have short analysis times, providing a feasible solution for the analysis of biological samples of the three drugs. They also demonstrate the applicability of NBD – Cl derivatization technology in the analysis of amine – and thiol – containing drugs.

Key words: NBD – Cl; derivatization; LC – MS/MS; blood drug concentration

液相色谱 – 串联质谱 (LC – MS/MS) 是一种高灵敏度、高选择性的分析技术,已广泛应用于药物分析、临床诊断和环境监测等领域^[1]。然而,一些药物,特别是胺基类和巯基类化合物,由于其固有的理化性质,在 LC – MS/MS 分析中存在离子化效率低、灵敏度不足、色谱保留行为差等问题。化学衍生化技术是一种解决上述问题的有效手段,通过结构修饰引入具有强电离特性的功能基团或疏水性基团,从而显著增强目标化合物的电离效率及质谱响应信号,改善色谱保留行为及分离选择性^[2-3]。4 – 氯 – 7 – 硝基苯并 – 2 – 氧杂 – 1,3 – 二唑 (4 – chloro – 7 – nitrobenzo – 2 – oxa – 1,3 – diazole, NBD – Cl) 是一种广泛使用的衍生化试剂,可与胺和硫醇等多种官能团反应,生成具有强紫外吸收和荧光特性的衍生物^[4-8],其独特的化学性质使其在低浓度药物和代谢物的检测中展现出显著优势,因此也被应用于 LC – MS/MS 分析中。

美沙拉嗪 (Mesalazine, 5 – ASA) 为溃疡性结肠炎治疗一线药物,血浆浓度监测对疗效评估与剂量优化至关重要。其检测难点在于:①分子量小 ($153.1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$),缺乏强电离基团,电喷雾电离源中离子化效率低,信号响应弱;②亲水性强,反相色谱中保留弱,易与生物基质内源性成分共洗脱,进一步降低检测灵敏度。

中硫咪唑 (methimazole, MMI) 是抗甲状腺功能亢进症核心药物,治疗窗窄且个体药代动力学差异显著,需精准浓度监测。其分子量小 ($114.17 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$),分子含巯基 (–SH),导致常规 C_{18} 柱保留效果差,易快速流出色谱柱,分离效率低。目前仅少数文献报道其 LC – MS/MS 体内浓度测定方法,检测技术尚不

成熟^[9-11]。

卡托普利 (capeopril, CAP) 作为血管紧张素转换酶抑制剂,广泛用于高血压、心力衰竭等疾病治疗。其分子含游离巯基 (–SH) 与羧基 (–COOH),在生物基质中易氧化形成二硫键二聚体,稳定性差;其极性较强,在反相色谱保留弱,LC – MS/MS 检测灵敏度不足。现有研究多通过二硫苏糖醇 (DTT) 还原法或对溴苯甲酰甲基溴 (p – BPB) 衍生化法^[12-16]。

本研究旨在评估 NBD – Cl 作为衍生化试剂在 LC – MS/MS 法中对胺基类和巯基类药物进行药代动力学研究的应用潜力,通过对衍生化反应条件进行优化,建立灵敏、选择性高的 LC – MS/MS 方法,用于支持上述药物的药代动力学及生物等效性研究,具体衍生化示意图见图 1。

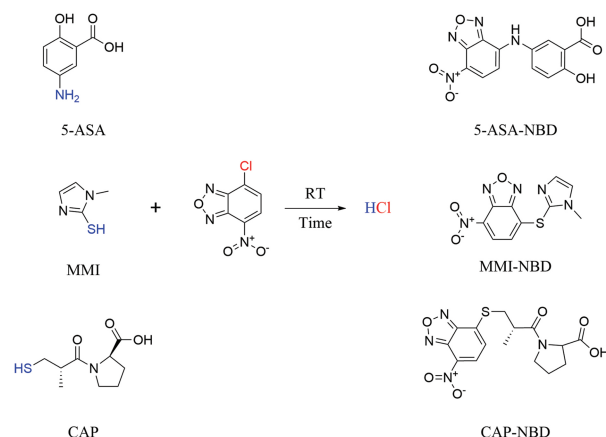


图 1 5 – ASA、MMI、CAP 和 NBD – Cl 衍生化反应示意图

Figure 1 Schematic diagram of derivatization reactions for 5 – ASA, MMI, CAP, and NBD – Cl

材料与方法

1 药品与试剂

CAP 对照品(批号:100318-201103,纯度:99.5%) 和 5-ASA 对照品(批号:100565-202103,含量:99.7%) 均购自中国食品药品检定研究院;CAP-d₃(批号:20-JHY-124-3,纯度:95%) 购自 TRC 公司;5-ASA-d₃(批号:3303-006A6,含量:99.2%) 和 MMI-d₃(批号:2872-091A1,含量:99.3%) 对照品均购自加拿大 TLC 公司;MMI 对照品(批号:19-APR-24-00,含量:98.4%) 购自美国 QCC 公司,NBD-Cl 购自东京化成工业株式会社;甲醇和乙腈(色谱级)均购自美国 Fisher 公司;娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

2 仪器

美国 AB Sciex 公司 API 4500 型串联质谱仪(配有 Turbo Ionspray 离子化源及 Analyst 1.6.3 数据处理系统);日本岛津公司 LC-20AD 型高效液相色谱系统。

方法与结果

1 色谱条件与质谱条件

色谱条件 1 (MMI-NBD) 色谱柱为 Thermo

AccucoreTM C₁₈(2.4 μm,30 mm×4.6 mm);保护柱为在线过滤器;梯度洗脱程序如下所示:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为乙腈。梯度洗脱:0.1 min,35% B;1.0 min,90% B;1.5 min,90% B;1.6 min,35% B;2.6 min,stop (0.8-1.8 min 切入质谱);流速为 0.5 mL·min⁻¹;进样量为 5 μL;柱温为 40 ℃。

色谱条件 2 (CAP-NBD) 色谱柱为 Thermo AccucoreTM C₁₈(2.4 μm,30 mm×4.6 mm);保护柱为预柱;梯度洗脱程序如下所示:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为甲醇。梯度洗脱:0 min,40% B;0.8 min,90% B;1.28 min,90% B;2.0 min,40% B;3.0 min,stop (0.8-2.5 min 切入质谱)。梯度洗脱:流速为 0.6 mL·min⁻¹;进样量为 5 μL;柱温为 40 ℃。

色谱条件 3 (5-ASA-NBD) 色谱柱为 Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈(4 μm,50 mm×4.6 mm);保护柱为在线过滤器;梯度洗脱程序如下所示:A 为 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵,B 为甲醇:乙腈(V:V=50:50),0 min,40% B;0.8 min,90% B;1.28 min,90% B;2.0 min,40% B;3.0 min,stop (0.7-2.5 min 切入质谱);流速为 0.6 mL·min⁻¹;进样量为 10 μL;柱温为 40 ℃。

质谱条件 采用电喷雾离子化源(Turbo Ionspray),扫描方式为多反应监测(MRM),扫描时间均为 150 msec,卷帘气(CUR)均为 30 psi。具体参数见表 1。

表 1 LC-MS/MS 测定 MMI、CAP、5-ASA 的质谱分析条件

Table 1 Mass spectrometry analysis parameters in the determination of MMI, CAP and 5-ASA

Item	Mode	IS	TEM	Standard	Internal Standard	CE
MMI-NBD	Positive ion	5500 V	550 ℃	m/z 278.1→m/z 202.1	m/z 281.1→m/z 205.1	30 eV
CAP-NBD	Positive ion	4500 V	500 ℃	m/z 381.1→m/z 116.1	m/z 384.1→m/z 119.1	15 eV
5-ASA-NBD	Negative ion	-4500 V	550 ℃	m/z 315.1→m/z 254.1	m/z 318.1→m/z 257.1	-25 eV

2 溶液配制

对照品系列溶液配制:精密称取 MMI 和 CAP 对照品,经称量因子校正,加入适量体积的甲醇,制得浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的储备液;精密称取 5-ASA 对照品,经称量因子校正,加入适量的二甲基亚砜,制得浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的储备液,于 -20 ℃ 冷冻保存。分别移取 3 种药物一定体积的储备液,用 50% 甲醇稀释成浓度系列标准溶液和质量控制溶液,于 4 ℃ 冰箱保存备用。

内标溶液配制:取 MMI-d₃ 和 CAP-d₃ 对照品 1 瓶(1 mg),经称量因子校正,加入适量体积的甲醇使其完全溶解;取 5-ASA-d₃ 对照品 1 瓶(1 mg),称量因子校正,加入适量体积的二甲基亚砜,使其完全溶解制备成 1.0 mg·mL⁻¹ 储备液,于 -20 ℃ 冷冻保存。

精密移取一定体积的储备液,用 50% 甲醇水溶液稀释成浓度内标溶液,于 4 ℃ 冰箱保存备用。

3 血浆样品处理

MMI、5-ASA 样品处理:取 MMI、5-ASA 人血浆样品各 50 μL,依次加入 20 μL 内标溶液、50 μL NBD-Cl 衍生化试剂,涡流混合 10 s,室温放置反应一定时间,加入 150 μL 乙腈后涡旋 2 min,以 13 200 g 转速离心 5 min,MMI 取 40 μL 上清液至含 160 μL 50% 甲醇水溶液的进样管中;CAP 取 50 μL 上清液至含 150 μL 50% 甲醇水溶液的进样管中混匀后待进样分析。

CAP 样品处理:在室温黄光条件下,取含 0.5% 甲酸的 CAP 人血浆样品 50 μL,依次加入 20 μL 内标溶液、50 μL NBD-Cl 衍生化试剂和 20 μL 0.25 M Na₂CO₃ 溶液,涡流混合 10 s,室温放置反应一定时间,

加入 150 μL 乙腈后涡旋 2 min, 以 13 200 g 转速离心 5 min, 取 50 μL 上清液至含 100 μL 50% 甲醇水溶液的进样管中涡旋混匀后待进样分析。

4 衍生化反应条件考察

为确定完全衍生化且无过量试剂干扰的最佳 NBD-Cl 浓度, 实验设计如下: 精密量取浓度为定量上限 (ULOQ-QC) 的血浆样品 50 μL , 置于 1.5 mL 离心管中; 分别加入 50 μL 浓度梯度为 1、5、10、15、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NBD-Cl 衍生化试剂涡旋混匀 1 min 后, 按“3 血浆样品处理”项下样品处理流程测定衍生化产物的峰面积。以衍生化产物峰面积为评价指标, 当峰面积达到最大值且不再随 NBD-Cl 浓度增加而显著变化时, 对应的浓度即为最佳 NBD-Cl 浓度。

基于 NBD-Cl 与化合物的亲核取代反应动力学特性, 考察温度对反应效率的影响: 精密量取 ULOQ-QC 浓度的血浆样品 50 μL , 加入 50 μL 上述优化后浓度的 NBD-Cl 溶液, 涡旋混匀后, 分别置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中, 反应 30 min; 反应结束后室温冷却 5 min, 按检测方法测定衍生化产物峰面积。通过比较不同温度下的峰面积变化, 筛选既能保证较高反应速率、又避免高温导致化合物降解或衍生化产物不稳定的最佳反应温度。

在上述优化的 NBD-Cl 浓度与反应温度基础上, 进一步考察反应时间对衍生化完全性的影响: 精密量取 ULOQ-QC 浓度的血浆样品 50 μL , 加入 50 μL 最佳浓度的 NBD-Cl 溶液, 涡旋混匀后置于最佳温度下反应, 分别于反应 0 min、10 min、20 min、30 min、40 min 时取样, 按检测方法测定各时间点衍生化产物峰面积, 以峰面积达到稳定平台期的最短时间作为最佳反应时间。

结 果

1 衍生化反应条件

结果表明, MMI 和 5-ASA 的最佳衍生化条件为 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NBD-Cl、20 min 衍生化反应时间和 25 $^{\circ}\text{C}$ 衍生化反应温度, CAP 最佳衍生化条件为 15 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NBD-Cl、20 min 衍生化反应时间和 25 $^{\circ}\text{C}$ 衍生化反应温度。由于内标溶液在血浆内浓度远低于待测物定量上限浓度, 且衍生化试剂保持过量, 因此内标可基本实现完全衍生化。

2 方法学验证

专属性试验 精密取 6 份不同来源的空白人血浆、1 份溶血血浆和 1 份高脂血浆 50 μL , 除不加内标

溶液外, 按“2.3 血浆样品预处理”项下方法操作, 记录色谱图。将定量下限 (LLOQ) 浓度的标准溶液和内标溶液分别加入空白人血浆, 依同法操作, 记录色谱图, 如图 2。结果表明, 空白人血浆不干扰待测物和内标的测定, 待测物和内标之间互相不干扰。

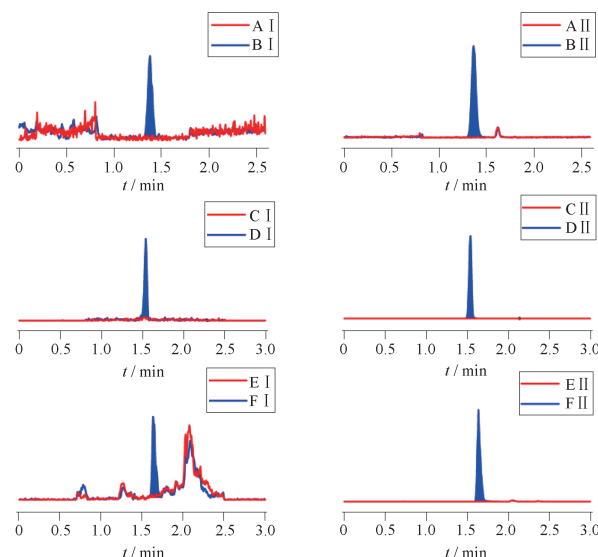


图 2 LC-MS/MS 测定人血浆中待测物 (I) 和内标 (II) 的色谱图

Figure 2 Chromatograms of the analyte (I) and internal standard (II) in human plasma measured by LC-MS/MS

注: A: MMI Blank Human Plasma Sample; B: MMI LLOQ-QC Plasma Sample; C: CAP Blank Human Plasma Sample; D: CAP LLOQ-QC Plasma Sample; E: 5-ASA Blank Plasma Sample; F: 5-ASA LLOQ-QC Plasma Sample.

标准曲线和最低定量限 取空白人血浆 190 μL , 加入标准系列溶液 10 μL , 配制成 MMI 浓度为 1.00、2.00、10.0、20.0、100、200、450、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准曲线样品, 以及含 5-ASA 和 CAP 浓度为 2.0、10.0、50.0、100、200、500、750、1 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的两条标准曲线样品; 其余按“3 血浆样品处理”项下操作, 进样并记录色谱图。以空白人血浆中待测物的浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标, 用加权最小二乘法进行回归运算, 求得的直线回归方程即为标准曲线, 标准曲线样品浓度即为最低定量下限。结果见表 2, 3 种药物相关系数 r 均大于 0.99, 线性关系良好。

精密度与准确度考察 取空白人血浆配制成的 5 个质量控制 (QC) - 定量下限 (LLOQ-QC)、低浓度 (LQC)、中低浓度 (LMQC)、中浓度 (MQC)、高浓度 (HQC) 样品用于考察空白人血浆的精密度与准确度, 具体浓度见表 3。每一浓度进行 6 样本分析, 测定

表 2 MMI、CAP、5-ASA 的线性关系实验结果

Table 2 Experimental results of linear relationships for MMI, CAP, and 5-ASA

Item	Linear range (ng · mL ⁻¹)	Regression equation	Correlation coefficient(<i>r</i>)
MMI-NBD	1-500	<i>y</i> = 0.00645 <i>x</i> + 0.000773	0.9989
CAP-NBD	2-1 000	<i>y</i> = 0.00688 <i>x</i> + 0.000818	0.9993
5-ASA-NBD	2-1 000	<i>y</i> = 0.00469 <i>x</i> + 0.000116	0.9996

3 个分析批,并与标准曲线同时进行,由标准曲线计算空白人血浆和真实基质的 QC 样品浓度,求空白人血浆和真实基质的精密度(CV)与准确度(RE),结果见表 4。

提取回收率和基质效应考察:取 3 份空白人血浆,按照“3 血浆样品处理”项下操作后,直接进行 LC-MS/MS 测定,获得空白人血浆基线值(峰面积均值),采用低、中、高 3 个浓度的人血浆 QC 样品测得的峰面积与空白人血浆经预处理后加入相应浓度溶液的峰面积之比(峰面积均扣除基线值),计算真实基质中待测物的提取回收率;以低、中、高 3 个浓度的空白人血浆 QC 样品测得的峰面积与空白人血浆经预处理后加入相应浓度溶液的峰面积之比,计算空白人血浆中待测物的提取回收率。取 6 份不同来源的空白人血浆和 3 份不同来源的高脂、溶血血浆,加入低、高浓度的 QC 溶液,用于评价真实基质的基质效应,结果见表 5,本实验所选择的分析条件下可忽略基质效应对测定的影响。

稳定性试验 本实验考察了低、高 2 个 QC 样品人血浆真实基质样品在不同条件下的稳定性。所有

表 3 MMI、CAP、5-ASA 质控样品标示浓度

Table 3 Labeled concentrations of MMI, CAP, and 5-ASA quality control samples

QC	LLOQ-QC (ng · mL ⁻¹)	LQC (ng · mL ⁻¹)	LMQC (ng · mL ⁻¹)	MQC (ng · mL ⁻¹)	HQC (ng · mL ⁻¹)
MMI	1	3	30	150	400
CAP	2	6	60	300	800
5-ASA	2	6	60	300	800

表 6 LC-MS/MS 法测定空白人血浆中 MMI、CAP、5-ASA 的稳定性(*n* = 6, RE/%)

Table 6 Stability of MMI, CAP, and 5-ASA in blank human plasma by LC-MS/MS (*n* = 6, RE/%)

Item	Concentration (ng · mL ⁻¹)	Room temperature for 22 h	Freeze-thaw 5 cycles	Post-treatment sample room temperature for 71 h	Long-term storage at -60 °C for 71 d	Long-term storage at -20 °C for 71 d
MMI	3	-5.0	8.0	1.0	15.0	11.3
	400	-8.3	7.0	-0.8	10.5	8.5

处理后样品自动进样器放置 24 h-71 h 内稳定,其他条件下的稳定性结果见表 6。

表 4 LC-MS/MS 法测定空白人血浆中 MMI、CAP、5-ASA 的精密度和准确度(*n* = 6)

Table 4 Precision and accuracy of MMI, CAP, and 5-ASA in blank human plasma by LC-MS/MS (*n* = 6)

Item	Concentration (ng · mL ⁻¹)	Measured (ng · mL ⁻¹)	Intra-day CV (%)	Inter-day CV (%)	RE (%)
MMI	1	1.02	4.3	5.7	2.0
	3	2.97	2.6	2.8	-1.0
	30	29.9	1.3	1.5	-0.3
	150	145	1.2	1.9	-3.3
	400	389	1.4	2.0	-2.8
CAP	2	2.10	6.4	8.4	4.8
	6	6.05	4.6	3.5	0.8
	60	59.0	2.1	2.8	-1.6
	300	292	2.6	1.9	-2.6
	800	766	1.7	2.5	-4.3
5-ASA	2	2.02	5.0	8.6	1.2
	6	5.93	4.1	5	-1.1
	60	59.3	2.7	3.7	-1.1
	300	302	2.1	2.4	0.9
	800	801	1.6	3.1	0.2

表 5 LC-MS/MS 法测定空白人血浆中 MMI、CAP、5-ASA 的提取回收率和基质效应

Table 5 Extraction recovery and matrix effects of MMI, CAP, and 5-ASA in blank human plasma by LC-MS/MS

Item	Concentration (ng · mL ⁻¹)	Extracted recovery		Matrix Effect	
		Recovery (%)	Internal standard recovery (%)	Matrix factor (%)	CV (%)
MMI	3	99.3	107.4	99.7	4.4
	150	100.0		NA	NA
	400	106.7		96.5	1.9
CAP	6	98.8	100.3	97.0	8.6
	300	99.8		NA	NA
	800	97.0		97.4	6.3
5-ASA	6	73.2	85.1	104.1	5.5
	300	71.7		NA	NA
	800	73.3		101	4.9

续表 6 (Continued tablet 6)

Item	Concentration (ng · mL ⁻¹)	Room temperature for 4 h	Freeze – thaw 3 cycles	Post – treatment sample room temperature for 24 h	Long – term storage at –60 °C for 30 d	Long – term storage at –20 °C for 30 d
CAP	6	–11.3	–7.1	4.5	5.0	2.3
	800	–10.5	–4.3	1.1	–2.3	–0.9

Item	Concentration (ng · mL ⁻¹)	Room temperature for 22 h	Freeze – thaw 5 cycles	Post – treatment sample room temperature for 24 h	Long – term storage at –60 °C for 41 d	Long – term storage at –20 °C for 41 d
5 – ASA	6	1.0	3.3	12.7	1.5	0.3
	800	0.1	5.5	6.4	1.3	–3.8

讨 论

1 CAP 样品处理与 NBD – Cl 衍生化方法确认

根据《中华人民共和国药典》2020 年版四部 9012 “生物样品定量分析方法验证指导原则”^[17], 评价生物等效性时应基于母体化合物的浓度, VASHKIV E^[16] 学者使用强还原剂 DTT 测定 CAP 的浓度, 虽可抑制巯基氧化, 但易与血浆内已转换后的卡托普利二聚体发生非特异性还原反应, 从而导致测定的血药浓度整体偏高, 不符合生物等效性研究的标准。陈涛等^[14] 学者在采用 p – BPB 衍生化法时, 通过向全血中加入 20 μL VC 溶液实现血浆样品稳定; 本研究前期亦尝试以 VC 溶液稳定血浆样品, 但其所需使用浓度较高。而本研究仅采用 0.5% 甲酸溶液即可实现样品稳定, 操作更为简便。上述两种方法均具备较高的检测灵敏度 (定量下限 2 ng · mL⁻¹)。本研究开发了一种以 NBD – Cl 衍生化 CAP 的新型分析方法, 通过对分离血浆后加入 0.5% 甲酸调节 pH, 能够有效抑制 CAP 上巯基的氧化反应, 使得 CAP 样品在室温 4 h 内保持稳定, 能够满足生物样品分析的要求。因此, 在临床血浆样品采集阶段需要对血浆提前进行上述酸化处理以保证待测物的稳定性。在方法开发过程中, 发现酸性血浆环境中会降低 NBD – Cl 的反应活性, 通过在样品处理中加入 20 μL 0.25 M Na₂CO₃ 的水溶液调节 pH 至 7.0 – 7.5, 使得 CAP 与 NBD 衍生化反应完全, 且衍生化产物在检测条件下无明显降解, 确保了 CAP 在检测过程中的完全转化, 为后续定量分析的准确性提供了保障。

2 MMI 药物分析及衍生化方法确认

MMI 作为硫脲类抗甲状腺药物, 性质活泼, 其结构中的巯基致使其极性较大, 在常规反相 C₁₈ 柱上保留效果欠佳。这种特性可能源于 MMI 分子结

构在 C₁₈ 色谱柱相互作用较弱, 一方面其较小分子量限制了在色谱柱上的吸附和保留能力, 另一方面巯基官能团与色谱柱固定相作用不显著, 从而致使其在色谱柱上保留时间较短。在溶液样品中, 虽然灵敏度可以满足基本的测试需求, 但在复杂生物基质尤其是血浆样品中, 由于存在大量的内源性物质和其他干扰因素, MMI 的低响应问题更加突出, 难以满足分析要求。ITO Y 等人^[9] 为了提高 MMI 在生物样本中的检测灵敏度和选择性, 采用 NBD – Cl 作为衍生化试剂, 对血浆样品进行衍生化处理, 采用液液萃取法完成样品提取, 最终建立的分析方法线性范围为 1 – 1000 ng · mL⁻¹, 基于上述研究基础, 本研究同样采用 NBD – Cl 作为衍生化试剂以保证检测的选择性与灵敏度, 同时针对样品前处理环节进行了优化: 将液液萃取法替换为蛋白沉淀法能有效简化了样品处理的操作流程, 显著缩短了样品前处理所需时间, 在提升分析效率的同时, 成功维持了与上述研究相同的定量下限, 确保了检测方法的准确性与可靠性。此外, 本研究进一步优化了色谱分离条件, 将单次样品的进样分析时间由 7 min 缩短至 2.5 min, 大幅提升了单位时间内的样品分析通量, 使其更适用于临床大批量血浆样品中 MMI 的快速、高效定量分析需求。

3 5 – ASA 临床应用及血药浓度分析方法确认

5 – ASA 作为炎症性肠病治疗的一线药物, 目前市售主要包括口服缓释片、直肠灌肠液及直肠栓剂等。其中, 直肠栓剂因给药途径特殊, 药物经直肠黏膜吸收后需通过直肠静脉丛进入体循环, 受个体吸收差异、黏膜吸收面积及药物在直肠腔内滞留时间等因素影响, 其入血效率显著低于口服制剂, 导致人体外周血中 5 – ASA 的稳态浓度及达峰浓度均处于较低水平。国内外对于 5 – ASA 的分析方法主要集中在丙酮酐衍生化上^[18–20], 田玉林等学者在衍生化后才用

乙酸乙酯进行液液萃取样品,该分析方法定量限为 $0.05 - 50.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,此样品处理过程不仅繁琐复杂,而且灵敏度较低无法满足栓剂等剂型的血药浓度测定。本实验室也曾使用丙酸酐进行衍生化,所建立的方法常伴随着干扰峰的存在。因此首次采用 NBD - Cl 衍生化试剂对 5 - ASA 的胺基进行衍生化,样品处理过程简单,不仅提高了 5 - ASA 的离子化效率和灵敏度,也解决了干扰峰影响实际血药浓度测定的问题,同时定量下限可达到 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,能够满足 5 - ASA 栓剂等更多剂型的药代动力学试验及生物等效性研究。

结 论

本研究通过 NBD - Cl 衍生化 3 种药物中胺基和巯基的方法,成功建立并验证了 LC - MS/MS 法测定人血浆中 MMI、CAP 和 5 - ASA 浓度的方法,该方法准确灵敏且可靠,拓宽了 NBD - Cl 衍生化试剂的应用范围,为含胺基类和巯基类药物临床生物样品衍生化提供了一定的参考。

参考文献:

- [1] D' OVIDIO C, LOCATELLI M, PERRUCCI M, *et al.* LC - MS/MS Application in Pharmacotoxicological Field: Current State and New Applications [J]. *Molecules*, 2023, 28(5): 2127
- [2] WEISSBERG A, DRUG E, PRIHED H, *et al.* Structural elucidation of amino amide - type local anesthetic drugs and their main metabolites in urine by LC - MS after derivatization and its application for differentiation between positional isomers of prilocaine [J]. *J Mass Spectrom*, 2020, 55(10): 4654.
- [3] ZHANG TY, SHA L, ZHU QF, *et al.* Derivatization for liquid chromatography - electrospray ionization - mass spectrometry analysis of small - molecular weight compounds [J]. *Trac - Trend Anal Chem*, 2019, 119: 115608.
- [4] ELIF Z, GAMZE EK, ERTÜRK TOKER SDKA. Development and Validation of Two New Methods for the Determination of Rilmenidine in Bulk and Pharmaceutical Preparation [J]. *J Chromatogr Sci*, 2021, 1: 1.
- [5] ABU - HASSAN AA, SHAABAN MOHAMMED B, MAHDI WA, *et al.* Synergistic utility of NBD - Cl fluorogenic loading activity and salting - out assisted liquid - liquid extraction as sample pretreatment in rasagiline tracking in different Matrices [J]. *Spectrochim Acta A*, 2024, 313: 124168.
- [6] BANDA J, LAKSHMANAN R, KATEPALLI RB, *et al.* Determination of mesalazine, a low bioavailability olsalazine metabolite in human plasma by UHPLC - MS/MS: Application to a pharmacokinetic Study [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1008: 1—10.
- [7] TRIVEDI V, SHAH PA, SHRIVASTAV PS, *et al.* Analysis of valsartan, clindamycin and mesalamine in human plasma by LC - MS/MS using different extraction methodologies to overcome matrix effect [J]. *Chem Pap*, 2020, 74(12): 4365—4378.
- [8] HACKMON R, BLICHOWSKI M, KOREN G. The Safety of Methimazole and Propylthiouracil in Pregnancy [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2013, 68(3): 189—191.
- [9] ITO Y, SAKAI H, NAGAO H, *et al.* Development of a high - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometric method for the determination of methimazole in human blood matrices [J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1144: 122083.
- [10] 房绍英, 邵华荣, 黄艳妮, 等. 复方 MMI 软膏在大鼠体内的药动学研究 [J]. *食品与药品*, 2019, 21(06): 464—469.
- [11] SORNUSVIT C, HONGWISIT D, NIAMHUN N, *et al.* Pharmacokinetics and bioequivalence of oral methimazole in healthy Thai volunteers, determined by the sensitive analytical method, LC - MS/MS [J]. *Int J Adv Eng Sci Ap*, 2017, 5(3): 67—70.
- [12] VAN DER VEEN SJ, GHOBADI G, DE BOER RA, *et al.* ACE inhibition attenuates radiation - induced cardiopulmonary damage [J]. *Radiother Oncol*, 2015, 114(1): 96—103.
- [13] ABDEL - MEGIED AM, KOVALENKO S, ELBARBRY FA, *et al.* LC - MS/MS bioanalytical method for the quantitative analysis of nifedipine, bisoprolol, and captopril in human plasma: Application to pharmacokinetic studies [J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(9): 5664.
- [14] 陈涛, 钟勤, 薛彩福, 等. 柱前衍生化 LC - MS/MS 测定生物等效性研究受试者血浆中卡托普利的浓度 [J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(02): 176—182.
- [15] SAMAINUKUL N, LINN AK, JAVADI MB, *et al.* Importance of the Cys¹²⁴ Cys¹²⁸ intermolecular disulfide bonding for oligomeric assembly and hemolytic activity of the *Helicobacter pylori* TlyA hemolysin [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2019, 514(2): 365—371.
- [16] VASHKIV E. Spectrofluorometric determination of captopril plus captopril disulfide metabolites in plasma [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 73(10): 1427—1430.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466—471.
- [18] BANDA J, LAKSHMANAN R, KATEPALLI RB, *et al.* Determination of Mesalazine, a low bioavailability Olsalazine metabolite in human plasma by UHPLC - MS/MS: Application to a pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 1008: 1—10.
- [19] 田玉林, 邸欣, 王鑫, 等. LC - MS/MS 法测定 Beagle 犬血浆中的美沙拉嗪及其代谢物的浓度 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2013, 30(12): 933—939.
- [20] 赵艳艳. 不同抗氧化剂条件下生物样品中卡托普利浓度测定方法的建立及应用 [D]. 桂林医学院, 2022.

(本文编辑: 冀希炜 收稿日期 2025 - 11 - 25)