

UPLC-MS/MS测定大鼠血浆多柔比星浓度方法的建立及毒代动力学应用

杨俊凤, 王旭光, 李彬瑶, 黄莹*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 建立一种简便、快速、灵敏的测定大鼠多柔比星血药浓度的超高效液相-质谱联用(UPLC-MS/MS)法,并将其应用于注射用盐酸多柔比星大鼠体内毒代动力学实验。方法 采用ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱,流动相为0.1%甲酸(含2 mmol/L 甲酸铵)水溶液-乙腈,梯度洗脱。体积流量为0.4 mL/min,进样量为10 μL。采用电喷雾离子源(ESI),多反应监测(MRM)方式扫描,以正离子方式进行检测,蛋白沉淀法提取样品。用于定量分析的离子对分别为多柔比星 m/z 544.43→ m/z 397.08, 内标地西洋 m/z 285.02→154.40。SD大鼠30只,按体质量随机分为3组,分别单次iv 52.2、61.4、72.3 mg/m² 盐酸多柔比星后测定血药浓度,并用DAS 3.1.4软件计算毒代参数。结果 血浆中内源性物质不干扰待测物和内标的测定,多柔比星在0.5~100 ng/mL范围内线性关系良好,定量下限为0.5 ng/mL。多柔比星在0.5、1、20、80 ng/mL 4个浓度的批内批间精密度的RSD值为3.21%~12.79%。多柔比星在1、80 ng/mL的提取回收率和基质效应分别为102.00%~103.75%和79.27%~89.34%。SD大鼠分别单次iv给予注射用盐酸多柔比星52.2、61.4、72.3 mg/m²后,多柔比星在大鼠体内的AUC₀₋₄分别为(2 318.78±282.65)、(3 203.11±829.41)和(3 326.96±546.04) ng·h/mL, C_{0.083h}分别为(1 720.50±851.19)、(3 363.00±1 458.84)和(2 156.50±919.90) ng/mL。结论 建立的UPLC-MS/MS分析方法灵敏度高、样品处理方法简单、样品分析时间短,可以应用于大鼠多柔比星毒代动力学试验中。

关键词: UPLC-MS/MS法; 多柔比星; 大鼠血浆; 毒代动力学

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 01-0077-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.013

UPLC-MS/MS method for quantification of doxorubicin in rat plasma and application to toxicokinetics study

YANG Junfeng, WANG Xuguang, LI Binyao, HUANG Ying

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co. Ltd, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective A simple, rapid, and sensitive ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method has been developed to detect doxorubicin in rat plasma. The method was also validated for its application in toxicokinetics. **Methods** The separation was carried out on ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid with 2 mmol/L ammonium formate and acetonitrile with gradient elution. The flow rate was 0.4 mL/min, and volume of injection was 10 μL. Electrospray ionization (ESI) source and multiple-reaction monitoring (MRM) was performed in the positive ion mode. The samples were prepared by protein precipitation. The ion pairs of m/z 544.43→ m/z 397.08 and m/z 285.02→ m/z 154.40 were used to doxorubicin and internal standard diazepam. A total of 30 SD rats were randomly divided into three groups according to body weight. The concentration of doxorubicin in rat plasma after intravenous administration of doxorubicin hydrochloride injection of 52.5, 61.4, and 72.3 mg/m² were determined, and the toxicokinetic parameters were calculated by using DAS 3.1.4. **Results** Endogenous substance in plasma had no effect on results. The linear ranges of doxorubicin were 0.5 — 100 ng/mL, with the lower limit of quantification of 0.5 ng/mL. Under concentrations of 0.5, 1, 20, and 80 ng/mL, the RSD value of intra and inter-day were 3.21%—12.79%. The extraction recovery and matrix effect of doxorubicin at 1 and 80 ng/mL were 102.00% — 103.75% and 79.27% — 89.34%, respectively. After intravenous administration of doxorubicin hydrochloride injection of 52.5, 61.4, and 72.3 mg/m², the toxicokinetic parameters were as follows: AUC₀₋₄ (2 318.78 ± 282.65), (3 203.11 ±

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 国家科技重大专项(2015ZX09501004)

第一作者: 杨俊凤(1988—), 女, 河北人, 理学硕士, 研究方向为毒代动力学。Tel: 15302101895 Email: yangjf@tjpr.com

*通信作者: 黄莹, 女, 副研究员。Tel: 13820118868 E-mail: huangy@tjpr.com

829.41) and (3 326.96 ± 546.04) ng·h/mL; $C_{0.083h}$ (1 720.50 ± 851.19), (3 363.00 ± 1 458.84) and (2 156.50 ± 919.90) ng/mL, separately. **Conclusion** The established UPLC-MS/MS method has high sensitivity, simple sample preparation method and short sample analysis time. It can be applied to the toxicokinetic test of doxorubicin in rats.

Key words: UPLC-MS/MS method; doxorubicin; rat plasma; toxicokinetics

多柔比星是临床上常用的蒽环类抗肿瘤药物,抗癌谱广,疗效好,但其没有选择性,易导致骨髓抑制、胃肠道毒性及严重的剂量相关性的心脏毒性等^[1-3]。基于降低毒副作用的目的,近年来多种围绕多柔比星的新型药物传输体系诞生,如多柔比星脂质体、聚乙二醇包被的多柔比星脂质体、多柔比星胶束以及各种新型生物材料表面修饰的脂质体及纳米颗粒等^[4-6],这些新药物传输体系的安全性评价离不开毒代动力学研究,因此多柔比星在各种生物基质中的检测显得尤为重要。

历年来学者们开发了众多检测生物基质中多柔比星的方法,最为常用的是HPLC-荧光法、HPLC-紫外法及LC-MS/MS法,其中HPLC法用时长、灵敏度低,有时无法达到检测要求,LC-MS/MS法虽然可提高灵敏度,但也存在分析时间长、样品处理复杂等问题,不够简便经济^[7-13]。本研究建立UPLC-MS/MS法检测多柔比星,分离度高,灵敏度高,分析时间短,样品处理方法简便,能快速检测出大鼠血浆中多柔比星的浓度,节省了人力及试剂,并应用于多柔比星毒代动力学实验中。

1 材料

1.1 主要仪器

I-Class型超高效液相色谱(美国Waters公司),配有ACQUITY I-Class二元高压梯度混合泵,ACQUITY SM-FTN自动进样器并配有高通量样品组织管理器;Xevo TQ-S型三重四极杆串联质谱仪美国(美国Waters公司),配有电喷雾离子化源(ESI)以及UNIFI数据处理软件;VX-II型多管涡旋振荡仪(北京踏锦科学技术有限公司);17R低温高速台式离心机(Thermo Scientific公司);TurboVAP浓缩仪(美国Caliper公司)。

1.2 药品与主要试剂

盐酸多柔比星对照品,批号130509-201302,规格10.33 mg/瓶,中国食品药品检定研究院;地西洋(内标),批号FE05291303, Cerilliant产品;甲醇、乙腈,色谱纯, Fisher Scientific产品;甲酸、甲酸铵均为分析纯。

1.3 实验动物

SD大鼠30只, SPF级,雌雄各半,体质量为

162~216 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产单位许可证编号SCXK(京)2012-0001。动物使用方案经天津药物研究院新药评价有限公司动物管理和使用委员会(IACUC)审查并批准。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用ACQUITY UPLC® BEH C₁₈色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱温为40℃,流动相为0.1%甲酸(含2 mmol/L甲酸铵)水溶液(A)-乙腈(B)。梯度洗脱:0~0.3 min: 20%B; 0.3~0.8 min: 20%~90%B; 0.8~1.3 min: 90%B; 1.3~1.8 min: 90%~20%B; 1.8~2.5 min: 20%B; 体积流量为0.4 mL/min,进样量为10 μL,单针运行时间为2.5 min。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子化源(ESI),正离子检测模式,扫描方式为多重反应监测(MRM)。锥孔气体积流量150 L/h;去溶剂气体积流量800 L/h;离子源温度150℃;去溶剂气温度400℃;毛细管电压3.00 kV;取样锥孔电压60 V。盐酸多柔比星的定量离子对为 m/z 544.43→397.08,锥孔电压5 V,碰撞能量10 eV;内标地西洋的定量离子对为 m/z 285.02→154.40,锥孔电压56 V,碰撞能量26 eV。

2.3 溶液的配制

2.3.1 盐酸多柔比星标准系列溶液及质控溶液配制 取整支盐酸多柔比星对照品,根据质量及纯度用甲醇将其溶解为1 mg/mL的标准储备液,并用60%甲醇逐级稀释成质量浓度为1 000、500、300、100、30、10.5 ng/mL的标准系列溶液及800、200、10.5 ng/mL的质控溶液。

2.3.2 内标溶液配制 将质量浓度为1 mg/mL的地西洋标准溶液用甲醇稀释成1 ng/mL的内标工作液。

2.4 校正曲线及质控模拟血浆的配制

取盐酸多柔比星标准系列溶液或质控溶液50 μL,加入到450 μL空白大鼠血浆中,加入500 μL甲醇,混匀,得到质量浓度为0.5、1.0、3.0、10.0、30.0、50.0、100.0 ng/mL校正曲线模拟血浆样品以及0.5、1、20、80 ng/mL的质控模拟血浆样品。

2.5 血浆样品处理方法

取大鼠血浆 100 μL (其中含 50 μL 甲醇), 加入 50 μL 内标溶液, 加入 100 μL 乙腈, 涡旋振荡 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 移取上清 100 μL 与 100 μL 去离子水混匀, 涡旋振荡 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取 10 μL 进样测定。

2.6 方法学考察

2.6.1 选择性 在 MS 模式下, 通过调整源参数, 盐酸多柔比星及内标产生稳定的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰 544.4 和 285.0, 对 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰进行产物离子扫描, 分别产生稳定的碎片离子 397.08 和 154.40, 并自动优化产生最佳碰撞能量和锥孔电压。

取 6 个不同来源的大鼠空白血浆, 除不加内标溶液 (改加同等体积的甲醇) 外, 其余按“2.5”项下操作, 进行 UPLC-MS/MS 分析。空白大鼠血浆样品、LLOQ 血浆样品以及动物给药后血浆样品色谱图见图 1。结果显示, 盐酸多柔比星的保留时间为 0.92 min, 地西洋的保留时间为 1.18 min, 内源性干扰组分的峰面积低于 LLOQ 待测物峰面积的 20% 及内标峰面积的 5%, 表明血浆中内源性物质不干扰待测物和内标的定量分析。

2.6.2 残留 在校正曲线最高浓度样品 (ULOQ) 后, 进样空白大鼠血浆样品, 经 UPLC-MS/MS 分析, 考察残留情况。ULOQ 样品后进样的空白大鼠血浆样品中, 干扰组分峰面积低于当批次 LLOQ 待测物峰面积的 20% 及内标峰面积的 5%, 说明残留不影响盐酸多柔比星及内标的测定。

2.6.3 校正曲线 取盐酸多柔比星校正曲线模拟血浆样品, 按“2.5”项血浆样品处理方法处理样品,

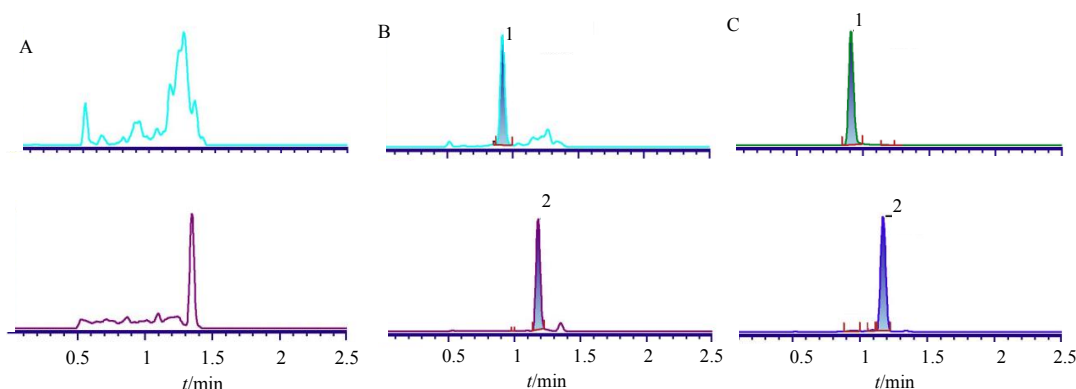
进行 UPLC-MS/MS 分析。使用 UNIFI 软件对待测物及内标进行积分, 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标物峰面积比值为纵坐标, 采用加权最小二乘法进行回归运算, 得到校正曲线的回归方程。

在 0.5~100 ng/mL 线性范围内校正曲线回归方程为 $Y=0.0728X-0.000239$, $r^2=0.999$ 。结果表明, 大鼠血浆中盐酸多柔比星在 0.5~100 ng/mL 线性关系良好。

2.6.4 精密度和准确度 取质量浓度为 0.5、1、20、80 ng/mL 的盐酸多柔比星质控模拟血浆样品, 按“2.5”项血浆样品处理方法处理样品, 分析每批每浓度 6 样本, 连续考察 3 个分析批, 应用当批校正曲线计算各样品浓度, 考察分析方法的准确度和精密密度。

盐酸多柔比星在 0.5、1.0、20.0、80.0 ng/mL 4 个浓度水平的批内精密密度分别为 5.99%、3.97%、3.69% 及 3.21%, 批间精密密度分别为 12.79%、10.42%、8.26% 及 4.37%, 准确度分别为 4.60%、0.02%、-0.06% 及 2.79%, 符合生物样品检测的相关规定。

2.6.5 基质效应和提取回收率 配制质量浓度为 1、80 ng/mL 的质控模拟血浆样品, 每浓度 6 样本, 处理血浆并测定; 去离子水溶解盐酸多柔比星配制相当于质控模拟血浆样品浓度的样品 C, 按“2.5”项血浆样品处理方法处理并测定, 每浓度 6 样本; 另取 6 个不同来源空白大鼠血浆 50 μL , 加入 50 μL 甲醇和 150 μL 乙腈, 涡旋、离心, 上清液 100 μL 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 残留物用 200 μL 样品 C 复溶, 涡流、离心后测定, 每浓度 6 样本。计算该测定方法的基质效应和提取回收率。



A-空白血浆; B-空白血浆中加入多柔比星 (0.5 ng/mL) 及内标 (1 ng/mL); C-大鼠 iv 给予注射用盐酸多柔比星 52.2 mg/m² 4 h 后的大鼠血浆; 1-多柔比星; 2-内标

A-blank rat plasma; B-blank rat plasma spiked with doxorubicin (0.5 ng/mL) and IS (1 ng/mL); C-rat plasma at 4 h after iv administration of doxorubicin hydrochloride injection of 52.5 mg/m²; 1- doxorubicin; 2- IS

图1 盐酸多柔比星及内标代表性色谱图

Fig. 1 Representative chromatograms of doxorubicin and IS in rat plasma

盐酸多柔比星在1、80 ng/mL两个浓度水平提取回收率分别为 $(103.75 \pm 4.66)\%$ 和 $(102.00 \pm 2.92)\%$,总体回收率RSD值为3.71%,内标提取回收率为 $(110.65 \pm 3.28)\%$,说明待测物及内标提取回收率高且稳定,不影响样品测定;盐酸多柔比星在1、80 ng/mL的基质效应分别为 $(79.27 \pm 5.41)\%$ 和 $(89.34 \pm 9.02)\%$,总体基质效应的RSD值为10.47%,内标的基质效应为 $(90.19 \pm 8.02)\%$,说明基质效应不影响样品测定,符合生物样品检测要求。

2.6.6 稳定性 配制质量浓度为1、80 ng/mL的模拟血浆样品,每个浓度6样本,进行血样室温放置4 h、-80 °C室温反复冻融3次、处理后15 °C自动进样器放置24 h及血样-80 °C冻存347 d稳定性的考察。

UPLC-MS/MS分析结果表明,1、80 ng/mL两个浓度水平血浆样品室温放置4 h稳定(RE分别为2.95%和3.37%),血浆样品-80 °C室温冻融循环3次稳定(RE分别为3.50%和-3.35%),血浆样品处理后15 °C自动进样器放置24 h稳定(RE分别为-0.32%和0.17%),血浆样品-80 °C冻存347 d稳定(RE分别为9.67%和1.23%),符合生物样品检测要求。

2.6.7 稀释效应 配制质量浓度为2 000、1 000 ng/mL的校正曲线外模拟血浆样品,用大鼠空白血浆稀释100及50倍,得到20 ng/mL的稀释效应样品,进样分析;配制质量浓度为200 ng/mL的校正曲线外模拟血浆样品,分别用大鼠空白血浆稀释10、5倍,得到质量浓度为20、40 ng/mL的稀释效应样品,进行UPLC-MS/MS分析。每稀释倍数的稀释效应样品均平行6样本。

血浆样品稀释100、50、10、5倍的RE为7.08%、9.00%、-6.33%、5.42%,RSD值为14.33%、4.00%、4.27%、4.05%,说明血浆样品稀释100、50、10、5倍后的分析结果准确可靠,符合生物样品检测要求。

2.7 动物给药及样本采集

SD大鼠30只,雌雄各半,按体质量随机分为3

组,分别尾iv给予52.2、61.4、72.3 mg/m²的盐酸多柔比星,于给药前(0 h)及药后0.083、0.5、1、4、9、24、28、48、72、96、120 h眼底静脉丛采血,肝素钠抗凝,于0.5 h内,12 000 r/min离心10 min,取上清血浆与等体积甲醇混匀,放于-80 °C冻存,以经过验证的方法测定血药浓度。

将给药后的血浆样品处理并进行UPLC-MS/MS分析,以随行校正曲线计算血浆药物浓度,用DAS 3.1.4药代动力学计算程序计算出主要毒代动力学参数 AUC_{0-t} 、 $C_{0.083h}$ 、 t_{max} 。

3 结果

大鼠120 h内单次iv给予注射用盐酸多柔比星52.2、61.4、72.3 mg/m²后,对数转换后平均血药浓度-时间关系见图2,毒代参数见表1。结果显示,在52.2、61.4、72.3 mg/m²3个给药剂量下,盐酸多柔比星在大鼠体内的 AUC_{0-t} 分别为 (2318.78 ± 282.65) 、 (3203.11 ± 829.41) 、 (3326.96 ± 546.04) ng·h/mL, $C_{0.083h}$ 分别为 (1720.50 ± 851.19) 、 (3363.00 ± 1458.84) 、 (2156.50 ± 919.90) ng/mL。

4 讨论

多柔比星作为一种强有效的抗癌药物,因其严重的毒副作用,临床应用仍具有挑战性,应运而生的各种多柔比星药物传输体系的出现,使多柔比星毒代动力学的研究具有重要意义。由于多柔比星

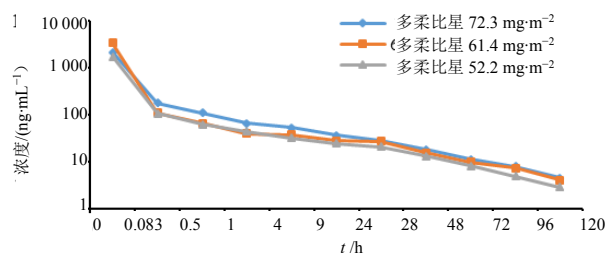


图2 多柔比星在大鼠体内药时曲线($n=10$)

Fig. 2 Concentration versus time curve of doxorubicin in rat plasma ($n=10$)

表1 盐酸多柔比星在大鼠体内的毒代动力学参数($n=10$)

Table 1 Toxicokinetic parameters of doxorubicin in rat plasma ($n=10$)

参数	单位	盐酸多柔比星		
		52.2 mg·m ⁻²	61.4 mg·m ⁻²	72.3 mg·m ⁻²
AUC_{0-t}	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	$2\,318.78 \pm 282.65$	$3\,203.11 \pm 829.41$	$3\,326.96 \pm 546.04$
$C_{0.083h}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$1\,720.50 \pm 851.19$	$3\,363.00 \pm 1\,458.84$	$2\,156.50 \pm 919.90$
t_{max}	h	0.083 ± 0.00	0.083 ± 0.00	0.083 ± 0.00
$t_{1/2Z}$	h	34.65 ± 7.16	42.31 ± 10.86	38.04 ± 5.89
V_z	$\text{L}\cdot\text{m}^{-2}$	$1\,071.46 \pm 271.40$	$1\,118.78 \pm 306.25$	1118.22 ± 184.83
CL_z	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$	21.35 ± 2.25	18.74 ± 5.39	20.53 ± 2.85

在体内通过进入细胞产生作用,如通过与DNA结合、胞内产生毒性代谢产物等。因此,近年来除传统的血浆及组织中多柔比星的检测外,已有许多研究涉及到细胞及亚细胞水平^[12,14-15],通过测定胞内多柔比星及代谢物的浓度来揭示多柔比星毒代动力学与毒性及疗效之间的关系,这就对多柔比星的测定技术提出了更高要求,UPLC-MS/MS法作为一种新的技术,比传统的HPLC法、LC-MS/MS法分离度更强、灵敏度更高、分析时间更短。

本研究曾使用LC-MS/MS法检测比格犬血浆中的多柔比星浓度,在方法开发过程中发现进样体积及溶剂组成对峰型影响较大,且用蛋白沉淀方法处理样品进样后干扰峰不易与待测物分离,用醋酸乙酯萃取的方法可解决干扰峰的问题,但操作复杂,并且最低定量下限仅达到2 ng/mL,分析时间为6 min。本研究通过简单地蛋白沉淀方法,分析时间缩短到2.5 min,定量下限降低到0.5 ng/mL,不仅提高了检测效率和检测灵敏度,同时降低成本。在液相条件优化过程中,发现流动相中加入甲酸可提高离子化效率,同时有机相中乙腈比甲醇能获得更低的基线,选择内标时,在本文梯度洗脱条件下,与吡格列酮、乙氧苯柳胺比较,地西洋保留时间与待测物接近且不受基质效应影响。

本文开发的UPLC-MS/MS法应用于市售注射用盐酸多柔比星毒代动力学实验中,为各种新型多柔比星药物传输体系临床前毒代动力学研究、药代动力学及临床研究提供方法,也为疗效更佳、毒副作用更低的新型多柔比星药物传输体系的研究提供手段。

参考文献

- [1] Rowan T. Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: A review[J]. West J Med, 1979, 131(5): 364-368.
- [2] 曾晓芳, 蔡鸿福, 杨菁, 等. 基于药理学及代谢物组学研究多柔比星在大鼠体内的心脏毒性[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(6): 666-674.
- [3] Chung W B, Youn H J. Pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity [J]. Korean J Int Med, 2016, 31(4): 625-633.
- [4] Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy [J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10(4): 853-858.
- [5] Tahover E, Patil Y P, Gabizon A A. Emerging delivery systems to reduce doxorubicin cardiotoxicity and improve therapeutic index [J]. Anti - Cancer Drugs, 2015, 26(3): 241-258.
- [6] 黄燕, 邱立朋, 朱梦琴, 等. 透明质酸修饰阿霉素脂质体的制备及抑制肿瘤细胞生长活性 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1272-1277.
- [7] Buehler P W, Robles S J, Adami G R, et al. Analysis of doxorubicin in cell culture media and human plasma using solid phase extraction and HPLC [J]. Chromatographia, 1999, 49(9/10): 557-561.
- [8] Han J, Zhang J, Zhao H Y, et al. Simultaneous determination of doxorubicin and its dipeptide prodrug in mice plasma by HPLC with fluorescence detection [J]. J Pharm Anal, 2016, 6(3): 199-202.
- [9] Kim H S, Wainer I W. Simultaneous analysis of liposomal doxorubicin and doxorubicin using capillary electrophoresis and laser induced fluorescence [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(3): 372-376.
- [10] Lucas A T, O'Neal S K, Santos C M, et al. A sensitive high performance liquid chromatography assay for the quantification of doxorubicin associated with DNA in tumor and tissues [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 119: 122-129.
- [11] Ahmad N, Ahmad R, Alam M A, et al. Enhancement of oral bioavailability of doxorubicin through surface modified biodegradable polymeric nanoparticles [J]. Chem Central J, 2018, 12: 65.
- [12] Semreen M H, Alniss H Y, Mousa M K, et al. Quantitative determination of doxorubicin in the exosomes of A549/MCF-7 cancer cells and human plasma using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Saudi Pharm J, 2018, 26(7): 1027-1034.
- [13] Ibsen S, Su Y X, Norton J, et al. Extraction protocol and mass spectrometry method for quantification of doxorubicin released locally from prodrugs in tumor tissue [J]. J Mass Spectrom, 2013, 48(7): 768-773.
- [14] 郑楠, 王兴, 王瑶琪, 等. UPLC-MS/MS法分析新型多柔比星前药在肿瘤细胞中的浓度 [J]. 药学学报, 2018, 53(2): 278-283.
- [15] Sakai-Kato K, Saito E, Ishikura K, et al. Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2010, 878(19): 1466-1470.