



## Development of a Simple LC-MS Assay for Determination of Regorafenib in Rat Plasma and its Application to a Pharmacokinetic Study

Weiping JI <sup>1</sup>#, Qingwei ZHANG <sup>2</sup># & Lufeng HU <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Orthopedics, Lishui City People's Hospital, Lishui 323000, China

<sup>2</sup> Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China;

<sup>3</sup> The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China.

**SUMMARY.** Regorafenib is the first small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKI) which exhibits improvement in progression-free survival and overall survival in refractory, heavily pretreated patients with metastatic colorectal cancer. A sensitive and selective LC-MS method for determination of regorafenib in rat plasma was developed. After addition of midazolam as internal standard (IS), protein precipitation by acetonitrile-methanol (9:1, v/v) was used as sample preparation. An electrospray ionization source was applied and operated in positive ion mode; selective ion monitoring (SIM) mode was used for quantification using target fragment ions  $m/z$  483 for regorafenib and  $m/z$  326 for the IS. Chromatographic separation was achieved on a Zorbax SB-C18 (2.1 mm × 50 mm, 3.5 μm) column with acetonitrile-0.1% formic acid in water as mobile phase with gradient elution. Calibration plots were linear over the range of 8-5000 ng/mL for regorafenib in rat plasma. Mean recoveries of regorafenib in rat plasma were in the range of 84.4-93.0%. RSD of intra-day and inter-day precision were both < 13%. The method was successfully applied to pharmacokinetic study of regorafenib after oral and intravenous administration in rats. The bioavailability of regorafenib was 92.3% in rats.

**RESUMEN.** Regorafenib es el primer inhibidor de la tirosina quinasa (TKI) de pequeño tamaño molecular que exhibe una mejora en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global en pacientes con cáncer colorrectal metastásico refractario fuertemente pretratados. Se desarrolló un método de LC-MS sensible y selectivo para la determinación de regorafenib en plasma de rata. Después de la adición de midazolam como estándar interno (IS), las proteínas fueron precipitadas con acetonitrilo-metanol (09:01, v/v) para preparar la muestra. Se aplicó una fuente de ionización por electrospray operada en modo de iones positivos; el monitoreo selectivo de iones (SIM) se utilizó para la cuantificación utilizando iones fragmento diana de  $m/z$  483 para el regorafenib y  $m/z$  326 para el IS. La separación cromatográfica se realizó en una columna Zorbax SB-C18 2,1 mm x 50 mm, 3,5 μm) utilizando un gradiente de elución con ácido fórmico acetonitrilo-0,1 % en agua como fase móvil. Los gráficos de calibración fueron lineales en el rango de 8-5000 ng/mL para el regorafenib en plasma de rata. Las recuperaciones medias de regorafenib en plasma de rata estuvieron en el rango de 84,4-93,0 %. Las RSD de los valores de precisión intra- y entre días fueron ambos < 13 %. El método se aplicó con éxito para el estudio farmacocinético de regorafenib después de la administración oral e intravenosa en ratas. La biodisponibilidad de regorafenib fue del 92,3 % en ratas.

**KEY WORDS:** Regorafenib, LC-MS, Pharmacokinetics, Rat plasma.

\* Author to whom correspondence should be addressed. *E-mail:* hulufeng79@sina.com

# These authors were contributed equally to this work.