

注射用酒石酸长春瑞滨胶束在比格犬体内的毒代动力学研究

贾长虹, 胡 雷, 肖宇萌, 黄 莹*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 建立测定比格犬血浆中酒石酸长春瑞滨浓度的LC-MS/MS方法并用于毒代动力学研究。方法 选择12只比格犬分为3组, 分别给予0.29、0.58、1.174 mg/kg注射用长春瑞滨胶束, 分别于给药前及给药后0.03、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 h采集血样; 用蛋白沉淀法处理血浆, 采用API4000三重四极杆串联质谱仪测定浓度, 离子化方式为电喷雾—正离子(ESI), 监测方式为多反应监测, 酒石酸长春瑞滨监测离子对 m/z 779.3/122.4, 兰索拉唑(IS)监测离子对 m/z 392.0/188.1。色谱柱为inertsil ODS-3 (50 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-5.0 mmol/L 乙酸铵(含0.02%甲酸)梯度洗脱, 体积流量为0.3 mL/min, 柱温为35 $^{\circ}$ C。结果 酒石酸长春瑞滨在1~1 000 ng/mL线性关系良好($r^2=0.997\ 9$); 定量限为1.0 ng/mL, 回收率为104.38%~106.15%, 基质效应为98.31%~107.37%, 日间精密度的4.43%~8.92%, 日内精密度的2.20%~8.40%。低、中、高剂量组AUC_{0-72 h}分别为(163.6±153.6)、(200.4±50.7)、(388.4±266.6) μ g/L·h, 峰浓度($C_{\max}$)分别为(142.9±127.0)、(198.4±107.8)、(442.5±259.9) μ g/L。结论 本法简单、快速、灵敏度高、重复性好, 可用于注射用酒石酸长春瑞滨胶束比格犬体内毒代动力学研究。比格犬静脉注射给予注射用酒石酸长春瑞滨胶束后, AUC_{0-72 h}及 $C_{\max}$ 与剂量均呈正相关。

关键词: 酒石酸长春瑞滨胶束; 比格犬血浆; 液相色谱-串联质谱法; 毒代动力学

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)10-1981-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.10.011

Toxicokinetics study of vinorelbine tartrate micelle in Beagle Dogs

JIA Changhong, HU Lei, XIAO Yumeng, HUANG Ying

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

Abstract: Objective To establish a LC-MS/MS method for the determination of vinorelbine tartrate in Beagle dog plasma and to study its toxicokinetics. **Methods** 12 Beagle dogs were divided into three groups, who received single dose of 0.29, 0.58, and 1.174 mg/kg vinorelbine tartrate micelle for injection, respectively. Blood samples were collected at 0.03, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h before and after administration respectively. The plasma was treated with precipitation by methanol. The API4000 triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry was used to determine the concentration. The ionization mode was electrospray positive ion (ESI). The monitoring method was multi reaction monitoring. The vinorelbine tartrate monitoring ion pair was m/z 779.3/122.4, and lansoprazole (IS) monitoring ion pair was m/z 392.0/188.1. The analysis was performed on a Inertsil ODS-3 column (50 mm × 4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was methanol - 5.0 mmol/L ammonium acetate (containing 0.02% formic acid) with gradient elution. The volume flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was 35 $^{\circ}$ C. **Results** The concentration range from 1 to 1 000 ng/mL had a good linearity ($r^2 = 0.997\ 9$). The quantitative limit was 1.0 ng/mL, the recovery was 104.38% — 106.15%, the matrix effect was 98.31% — 107.37%, the day precision was 4.43%—8.92%, and the day precision was 2.20% — 8.40%. The AUC_{0-72 h} in low, medium and high dose groups were (163.6 + 153.6), (200.4 + 50.7), (388.4 + 266.6) μ g/L·h, and peak concentrations ($C_{\max}$) were (142.9 + 127.0), (198.4 + 107.8), (442.5 + 259.9) μ g/L, respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive and reproducible. It can be used to study the toxicokinetics of vinorelbine tartrate micelle in Beagle dogs for injection. After intravenous administration of vinorelbine tartrate micelles in Beagle dogs, AUC_{0-72 h} and $C_{\max}$ were positively correlated with the dose.

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 科技部“重大新药创制”科技重大专项(2015ZX09501004-002-003)

第一作者: 贾长虹(1985—),女,硕士研究生,助理研究员,主要从事新药临床前毒理学评价及药物分析工作。E-mail:jiachanghong@163.com

*通信作者: 黄 莹,女,硕士研究生,副研究员,主要从事临床前药理学评价研究工作。E-mail:huangy@tjipr.com

Key words: vinorelbine tartrate micelle; plasma of beagle dogs; LC-MS/MS; toxicokinetics

酒石酸长春瑞滨(Vinorelbine Bitartrate)是一种可干扰微管聚集的半合成长春碱类化合物^[1],临床上主要与其他抗癌药物联合应用于治疗非小细胞肺癌^[2],也用于晚期乳腺癌^[3]、转移性乳腺癌、晚期卵巢癌、恶性淋巴瘤、食管癌等^[4]。相对于其他长春碱,酒石酸长春瑞滨具有较低的神经毒性,但仍有较强的血管刺激、骨髓抑制、支气管毒性及严重的胃肠道反应等,其毒性与血药浓度呈正相关。有关长春瑞滨测定方法的相关文献较少^[5-9],刘楠等^[9]曾报道了相关的测定法但其定量限为5 ng/mL,且样本处理过程繁琐,不适用于大量样本快速测定。

目前没有相关的实验动物的毒代动力学完整资料。本实验按照GLP实验要求,并参照Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)的有关“毒物动力学ADME试验417”要求^[10],通过建立一种简单、快速、灵敏度高、重复性好的高效液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS),以探索并完成注射用酒石酸长春瑞滨胶束的血浆毒代动力学研究,为临床用药提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

酒石酸长春瑞滨标准品(北京德科瑞医药科技有限公司,批号100709-201103);兰索拉唑标准品(IS)(中国食品药品检定研究院,批号20121220);注射用酒石酸长春瑞滨胶束(北京德科瑞医药科技有限公司,批号20130101-2);乙酸铵(分析纯,天津市化学试剂一厂);甲酸(分析纯,天津广福精细化工研究所);甲醇(色谱纯,Fisher公司);自制去离子水。

1.2 仪器

API4000 三重四级杆串联质谱(AB Sciex公司);ML104型电子天平(Mettler Toledo公司);MDF-382E超低温冰箱(三洋);Micro 16R高速冷冻离心机(Thermo公司生产);BM-70型纯水机(北京中盛茂源科技发展有限公司);GM-0.33A型真空隔膜泵(天津市津腾实验设备有限公司)。

1.3 试验动物

比格犬(普通级)12只,雌雄各半,7~9月,体重8.0~10.5 kg,购自上海新冈实验动物厂,试验动物合格证编号2007000900084。

1.4 色谱条件

色谱柱为inertsil ODS-3(50 mm×4.6 mm, 5

μm);流动相A为5 mmol/L 乙酸铵(含0.02%甲酸),流动相B为甲醇,梯度洗脱0.01~2.5 min, 70%~0% A; 6.0~8.0 min, 0%~70% A; 8.0~15.0 min, 70% A;体积流量0.3 mL/min;进样量10 μL;柱温35℃。

1.5 质谱条件

离子源为ESI,正离子检测;气帘气体积流量20 L/min;离子源气体1压力为275.79 kPa,离子源气体2压力为310.26 kPa;离子源温度500℃;喷射电压5 000 V;CAD为4;去簇电压100 eV;碰撞能为70 eV。MRM扫描方式: m/z 779.3→ m/z 122.4(酒石酸长春瑞滨); m/z 392.0→ m/z 188.1(兰索拉唑,IS)。

1.6 标准溶液制备

精密称取酒石酸长春瑞滨标准品10.0 mg,用甲醇定容至10 mL量瓶中。精密吸取上述溶液用甲醇稀释配制为1、2、5、25、100、500、800、1 000 ng/mL酒石酸长春瑞滨标准液,2~8℃避光保存。同法配制浓度为25 ng/mL的兰索拉唑标准溶液用作内标。

1.7 样品处理

取血浆(空白、给药后)100 μL,加内标(兰索拉唑,25 ng/mL)100 μL,加200 μL甲醇(处理标准样品时以100 μL标准溶液及100 μL甲醇替代),涡旋5 min,离心(13 300 r/min, 10 min),取上清液60 μL,离心(13 300 r/min, 10 min),10 μL进样。

1.8 比格犬体内实验

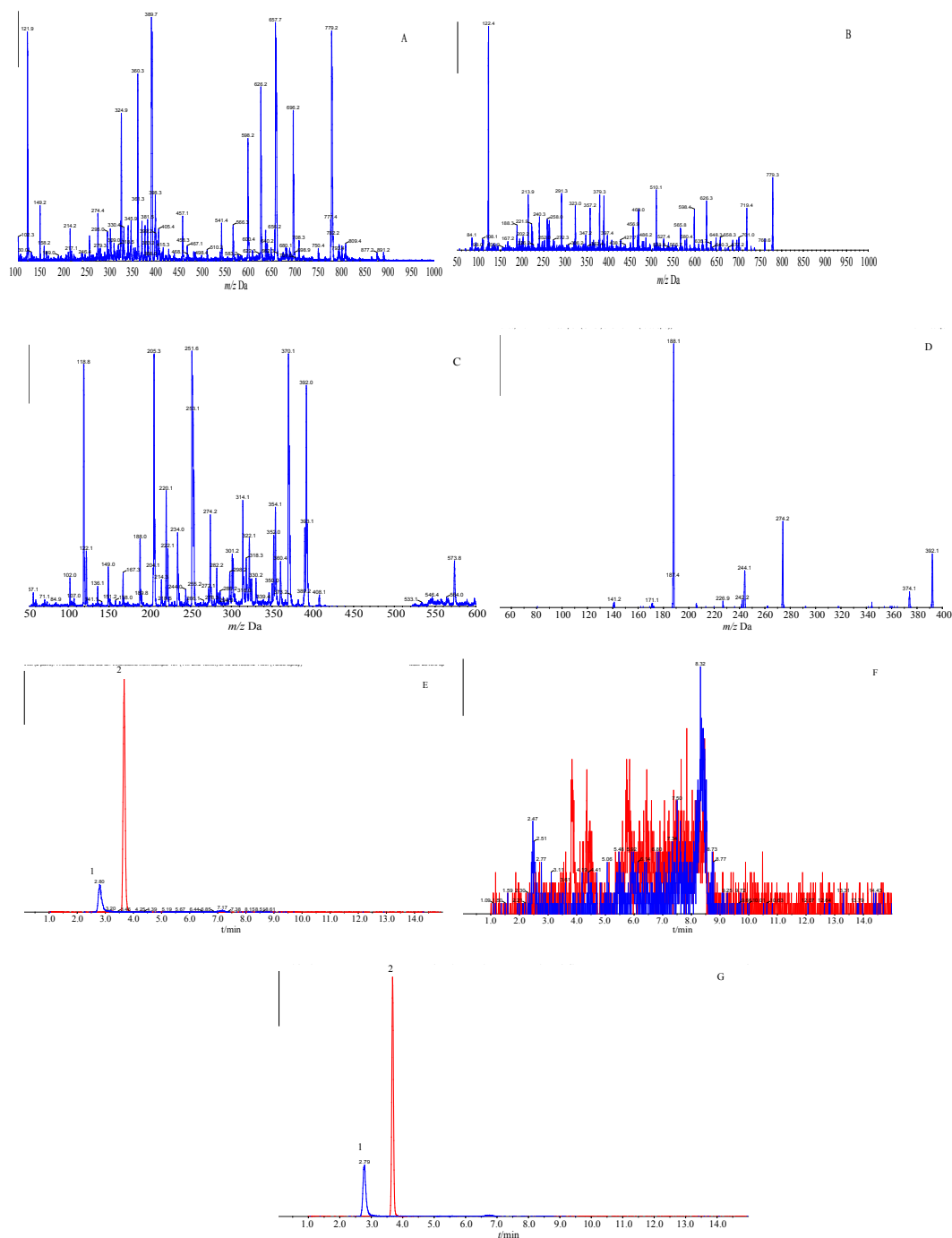
选取12只比格犬,分为低、中、高剂量3个组,分别单次静脉推注给予0.29、0.58、1.174 mg/kg,每组4只动物,雌雄各半。分别于给药前及给药后0.03、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72 h取血,以测定完整的血药浓度变化曲线,所有血样用肝素抗凝,室温2 h内12 000 r/min离心10 min分离血浆,-20℃冻存。

2 结果

2.1 方法学验证

2.1.1 专属性试验 取比格犬的空白血浆,按照“1.7 样品处理”的方法,处理并检测分析不同批次的空白血浆、空白血浆加标准样品以及比格犬血浆实测样品。结果显示,在上述检测条件下,酒石酸长春瑞滨和兰索拉唑(IS)实现色谱分离,血浆中内源性杂质及其他杂质不干扰血浆样品的测定,基质对待测物质无明显影响,结果见图1。

2.1.2 基质效应 按照“1.7 样品处理”的方法,在空白基质中加入浓度为2、100、800 ng/mL的酒石酸



长春瑞滨和内标,同时制备相同浓度不含基质的标准样品,以两者的峰面积比值得基质效应,低、中、高浓度的基质因子分别为 106.58 ± 5.07 、 98.31 ± 11.06 、 107.37 ± 12.37 。

2.1.3 线性分析 按“1.7 样品处理”方法处理,将系列浓度标准样品加入空白血浆中,进行 LC-MS/MS 分析。以酒石酸长春瑞滨与内标物的峰面积比(Y)与浓度(X)进行加权最小二乘法回归,得回归方程即校正曲线,说明在浓度 $1 \sim 1\,000$ ng/mL,样品和内标的峰面积比与浓度具有良好的线性关系。得到直线回归方程为: $Y = 0.880\,8 X + 6.583\,0$ ($r^2 = 0.997\,9$),方法的定量限为 1.0 ng/mL。

2.1.4 定量限 将校正曲线上的最低浓度点(1 ng/mL)做6个平行样本进行测定,求 RSD 值,定量限的 RSD 值为 3.09% ,表明本方法的最低定量限可以达到 1 ng/mL。

2.1.5 准确度和精密度 准确度和精密度按“1.7 样品处理”方法处理样品。血浆药物浓度分别为 2 、 100 、 800 ng/mL,每一浓度平行配制6份,测定1次/d,共测定3 d,计算酒石酸长春瑞滨峰面积与内标峰面积比值。将测得比值代入随行标准曲线,计算准确度和精密度。准确度和精密度符合规定,结果见表1。

2.1.6 回收率 制备低、中、高3个浓度的质控样品,按照“1.7 样品处理”方法处理样品,并对其进行测定分析。计算方法为:回收率($\%$) = $A(\text{标准溶液} + \text{内标} + \text{血浆}) / B(\text{标准溶液} + \text{内标}) \times 100\%$ 。结果显示,NVB低、中、高3个浓度的提取回收率符合指导原则要求,见表1。

2.1.7 样品稳定性 按血浆中酒石酸长春瑞滨的测定方法,进行 2 、 100 、 800 ng/mL 在 -20 °C 冻存约7个月、室温存放4 h、冻融1次、冻融3次和提取后样品 $2 \sim 8$ °C 放置24 h 的稳定性分析。每一浓度各做6个样品。结果表明酒石酸长春瑞滨的血浆样品在试验条件下稳定,见表2。

2.2 比格犬血浆药物浓度测定

比格犬静脉给予注射用酒石酸长春瑞滨胶束 0.29 、 0.58 、 1.174 mg/kg,用上述方法测定血药浓度见表3。

2.3 比格犬体内的毒代动力学参数

比格犬静脉给予注射用酒石酸长春瑞滨胶束 0.29 、 0.58 、 1.17 mg/kg,用上述方法测定血药浓度,得到血药浓度-时间曲线,数据用 Das 3.1.4 软件处理,毒代动力学参数见表4。

低、中、高剂量组酒石酸长春瑞滨药时曲线下面积(AUC_{0-72h})分别为 (163.6 ± 153.6) 、 (200.4 ± 50.7) 、 (388.4 ± 266.6) $\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$,峰浓度($C_{\max}$)分别为 (142.9 ± 127.0) 、 (198.4 ± 107.8) 、 (442.5 ± 259.9) $\mu\text{g/L}$ 。

从数据上看,雌、雄性动物之间比格犬静脉给予注射用酒石酸长春瑞滨胶束毒代参数不存在明显差异; AUC_{0-72h} 以及 $C_{\max}$ 随给药剂量增加而增大。

3 讨论

酒石酸长春瑞滨胶束在比格犬体内的毒代动力学研究未见报道,本研究建立了比格犬血浆中酒石酸长春瑞滨的 LC-MS/MS 分析方法,实现了药物和内标的快速分离。在实验之初选用了 Zorbax Eclipse XBD- C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Zorbax Eclipse XBD Plus C_{18} (75 mm $\times$ 4.6 mm, 3.5 μm)、Luna 5U C_{18} (2) (50 mm $\times$ 2.0 mm, $100\text{\AA}$) 及 inertsil

表1 准确度和精密度和回收率测定结果

Table 1 Accuracy, precision and recovery test results

质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	日内($n=6$)	日间($n=18$)		回收率/%
	精密度/%	精密度/%	RE/%	
2	8.40	4.43	1.47	104.55 $\pm$ 9.67
100	2.20	8.92	6.63	104.38 $\pm$ 4.09
800	2.39	7.14	-6.71	106.15 $\pm$ 4.19

表2 长春瑞滨在比格犬血浆中的稳定性($n=6$)

Table 2 Stability of vinorelbine in Beagle Dog plasma ($n=6$)

质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	保存条件				
	室温4 h	$2 \sim 8$ °C 24 h(沉淀后)	冻融1次	冻融3次	-20 °C冻存7个月
2	2.10 $\pm$ 0.13	2.11 $\pm$ 0.17	1.82 $\pm$ 0.12	1.78 $\pm$ 0.08	1.79 $\pm$ 0.05
100	109.50 $\pm$ 2.93	114.88 $\pm$ 2.90	91.02 $\pm$ 1.51	106.67 $\pm$ 3.78	89.30 $\pm$ 2.23
800	851.63 $\pm$ 16.67	857.00 $\pm$ 17.86	697.67 $\pm$ 14.21	825.67 $\pm$ 35.25	663.50 $\pm$ 11.79

表3 酒石酸长春瑞滨胶束在比格犬体内的血药浓度统计表($n=4$)Table 3 Statistical table of serum concentration of vinorelbine tartrate micelles in Beagle Dogs ($n=4$)

取血时间/h	注射用长春瑞滨血药浓度($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	低剂量组	中剂量组	高剂量组
0	—	—	—
0.03	142.88±126.97	198.38±107.82	442.5±259.93
0.25	34.33±13.71	37.73±12.24	71.63±22.40
0.5	24.58±10.56	34.75±15.14	57.1±25.06
1	18.72±13.50	19.33±7.75	37.75±15.58
2	14.82±11.23	19.50±9.76	26.95±10.47
4	7.76±5.54	8.56±3.36	13.43±3.49
8	6.28±7.82	5.71±3.30	9.76±3.73
12	2.59±1.78	3.79±2.12	4.28±1.56
24	1.68±1.32	1.54±0.39	18.76±33.37
48	—	—	—
72	—	—	—

表4 酒石酸长春瑞滨胶束在比格犬体内的毒代动力学参数($n=4$)Table 4 Toxicokinetic parameters of vinorelbine tartrate micelles in beagle dogs ($n=4$)

剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	$\text{AUC}_{(0-t)}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h})$			$C_{\text{max}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$			$T_{1/2}/\text{h}$
	雌性	雄性	总体	雌性	雄性	总体	
0.29	257.8±187.6	69.3±7.3	163.6±153.6	201.6±185.8	84.2±6.3	142.9±127.0	17.0±20.3
0.58	236.3±23.6	164.4±44.5	200.4±50.7	277.0±77.8	119.8±64.0	198.4±107.8	9.2±5.7
1.17	247.9±152.7	529.0±333.0	388.4±266.6	458.5±423.6	426.5±149.2	442.5±259.9	7.8±0.4

ODS-3(50 mm×4.6 mm, 5 μm)等色谱柱,对比发现相同条件下长春瑞滨及兰索拉唑经色谱柱 inertsil ODS-3(50 mm×4.6 mm, 5 μm)后,分离度高,峰尖锐且响应值高,最终选定该色谱柱进行正式试验。预试验发现该化合物的基质效应严重。于是对流动相进行了优化,配制了3种流动相A:1.0 mmol/L 乙酸铵、5.0 mmol/L 乙酸铵(含0.02%甲酸)、1.0 mmol/L 乙酸铵(含1.0%乙酸);流动相B:甲醇:乙腈(4:1)、100% 甲醇,经过交叉实验发现流动相A为5.0 mmol/L 乙酸铵(含0.02%甲酸)流动相为甲醇时梯度洗脱,基质效应最小。最低定量限为1 ng/mL,满足试验要求。通过系统的方法学验证,该法专属性强,基质效应、线性、准确度和精密度、回收率、室温、2~8 °C及冻存稳定性均符合生物样品分析要求。

参考文献

- [1] Domenech G H, Vogel C L. A review of vinorelbine in the treatment of breast cancer [J]. Clin Breast Cancer, 2001, 2(2): 113-128.
- [2] Gralla R, Harper P, Johnson S, et al. Vinorelbine (navelbine) in the treatment of non-small-cell lung cancer: recent developments in combination chemotherapy and radiotherapy [J]. Ann Oncol, 1999, 10 (Suppl 5): 47-51.
- [3] Poletti P, Bettini A C, Caremoli E R, et al. Liposomal-encapsulated doxorubicin (Myocet; D-99) and vinorelbine in previously treated metastatic breast cancer patients: a feasibility study [J]. Tumori, 2008, 94(5): 686-690.
- [4] 张伟明, 邓英杰, 顾吉晋, 等. 酒石酸长春瑞滨及其脂质体中药物的降解动力学研究 [J]. 中国医药导报, 2009, 6 (23): 23-25.
- [5] 刘磊, 陈秀杰, 朱文良, 等. HPLC法测定肿瘤细胞中酒石酸长春瑞滨的浓度 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(5): 807-809.
- [6] 林晓宏, 唐玮, 尹青, 等. HPLC法测定酒石酸长春瑞滨脂质体注射液的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1882-1885.
- [7] 杨雯妹, 邱利焱, 金一, 等. RP-HPLC法测定脂质体中重酒石酸长春瑞滨的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26 (5): 646-648.
- [8] 庄翌, 陈建伟, 徐鑫鑫, 等. 长春瑞滨脂质体与长春瑞滨注射液在荷瘤小鼠体内的药代动力学及组织分布 [J]. 中国药科大学学报, 2013, 44(3): 253-256.
- [9] 刘楠, 龚伟, 张慧, 等. 酒石酸长春瑞滨长循环(热敏)脂质体在比格犬体内的药代动力学研究 [J]. 军事医学, 2015, 39(9): 698-701.
- [10] 药物毒代动力学研究技术指导原则 [S]. 2014.