

LC-MS 法测定大鼠血浆中长春瑞滨浓度及其药动学研究

孙杰, 梁艳, 谢林, 康安, 谢媛, 王广基*

(中国药科大学药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009)

摘要 目的:建立生物样本中长春瑞滨的 LC-MS 测定方法, 研究长春瑞滨大鼠体内的药动学过程。**方法:**生物样本经乙酸乙酯萃取后, 用 LC-MS 法测定长春瑞滨浓度。色谱柱为 Shimadzu ODS(150 mm × 2.0 mm, 5 μm), 以梯度洗脱方式进行色谱分离, 流速为 0.2 mL/min, 采用电喷雾(ESI)离子源以正离子方式检测。大鼠尾静脉注射长春瑞滨乳剂, 剂量为 2.0、4.0 和 8.0 mg/kg, 采用 DAS 2.0 计算药动学参数。**结果:**内源性杂质不干扰长春瑞滨的测定, 且未出现明显的基质效应; 线性范围为 0.01 ~ 5.0 μg/mL ($r=0.9994$), 回收率大于 90%, 最低检测限为 0.002 μg/mL ($S/N>3$); 精密度及准确度均符合生物样本测定要求。大鼠静脉注射长春瑞滨后, 广泛分布于各组织中; 在研究的剂量范围内, AUC 与剂量间均呈良好的线性关系。**结论:**本实验建立的血药浓度测定方法简便、灵敏、特异, 适用于大鼠血浆中长春瑞滨浓度的测定及药动学研究。

关键词 长春瑞滨; LC-MS; 药动学; 组织分布

中图分类号 R969.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2008)04-0329-04

Determination of vinorelbine in rat plasma by LC-MS and its pharmacokinetics

SUN Jie, LIANG Yan, XIE Lin, KANG An, XIE Yuan, WANG Guang-ji*

Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Aim: To establish an LC/MS method for the analysis of pharmacokinetics of vinorelbine in rats. **Methods:** The biological samples were extracted with acetic ether. The chromatographic conditions were as follows: Shimadzu ODS column (150 mm × 2.0 mm, 5 μm) was used. Linear gradient elution was employed at a flow rate of 0.2 mL/min. The LC-MS system was operated using an electrospray ionization probe in the positive ion mode. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0. **Results:** No interference was observed in blank plasma samples, and no ionization suppression effects were found in the biological samples. The linear range of vinorelbine in plasma was 0.01-5.0 μg/mL ($r=0.9994$) with a recovery more than 90%; the lowest limit of determination (LLOD) for vinorelbine was 0.002 μg/mL. The sensitive and specific method was suitable for vinorelbine determination in biological samples. After iv administration, vinorelbine was rapidly distributed into tissues, and the AUC increased linearly as the increasing of the dose. **Conclusion:** The method is accurate, stable and reliable, and can be used for the investigation of vinorelbine in pharmacokinetic research.

Key words vinorelbine; LC-MS; pharmacokinetics; tissue disposition

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA2Z3141)

长春瑞滨是长春碱的半合成衍生物, 主要通过抑制着丝点微管蛋白的聚合, 使细胞分裂停止于有丝分裂的中期, 是一细胞周期特异性的药物, 主要用于治疗非小细胞肺癌及乳腺癌等^[1,2]。

长春瑞滨结构中有苯环和羧酸酯等官能团, 是具有特征生色基团的化合物, 文献多采用 HPLC-UV^[3-5]、HPLC-IR^[6] 和 HPLC-ECD^[7] 等分析方法, 但分析时间长、灵敏度低且样本用量大, 不适于临

* 收稿日期 2008-02-28 * 通讯作者 Tel:025-83271128;83302827 E-mail:guangjiwang@hotmail.com
基金项目 国家高技术研究发展计划(“八六三”计划)资助项目(No. 2002AA2Z3141)

床前药动学研究。Schmidt 等^[8]报道了 HPLC-APCI-MS 法测定血浆中长春瑞滨的浓度,但使用 APCI 为离子源时流动相的流速需达到 1.0 mL/min,且重现性及灵敏度均低于 ESI 离子源。此外,对于长春瑞滨的生物样本的处理多采用固相萃取或多次液液萃取,方法繁琐且耗费高,本文以乙酸乙酯为溶剂对生物样本进行处理后,以 LC-MS 进行分析,方法简便、准确且灵敏度高,最低检测限为 0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。经对该方法进行线性范围、准确度、精密性、稳定性等指标考察后用于长春瑞滨的临床前药动学研究中。

1 材料

1.1 药品和试剂

长春瑞滨标准品(中国生物制品药品检定所,纯度大于 99.5%);长春新碱(内标,中国生物制品药品检定所,纯度大于 99.5%);甲醇(色谱纯,德国默克公司);实验用水为 Million-pore 超纯水;其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

岛津 LCMS-2010A 高效液相色谱-质谱联用仪;SCL-10Avp 系统控制器、LC-10ADvp 双泵、SIL-HTc 自动进样器、CTO-10Avp 柱温箱、电喷雾离子化接口的四极杆质谱检测器以及 LC/MS solution2.04 色谱工作站。

1.3 动物

SD 大鼠,雌雄各半,体重(200 \pm 20)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物合格证号:SCXK(沪)2003-0002。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack ODS(150 mm \times 2.0 mm, 5 μm);流速:0.2 mL/min;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ 。水相(A)含 1 mmol/L 醋酸铵和 0.02% 甲酸,水相经 0.45 μm 水相膜过滤,有机相(B)为甲醇。采用线性梯度洗脱方式:0~3.0 min,30%~70% B;3.0~4.0 min,70%~30% B;4.0~9.0 min,30% B;9 min 分析结束。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子化(ESI)方式,长春瑞滨和内标长春新碱检测的离子 $[M+H]^+$ m/z 分别为 779.6 和 826.0。雾化气流速 1.5 L/min,干燥气

流速 2.0 L/min;曲形脱溶剂装置(CDL)温度 250 $^{\circ}\text{C}$;探针(Probe)电压 4.5 kV;检测电压 1.60 kV。

2.3 血浆样品处理

血浆样品 0.1 mL,加入长春新碱溶液(内标) 10 μL ,涡旋 10 s;加入乙酸乙酯 1 mL,涡旋 3 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清 800 μL ,置 45 $^{\circ}\text{C}$ 离心浓缩装置中挥干,加甲醇 200 μL 复溶,22 000 r/min 离心 10 min,取上清 5 μL 进样。

2.4 组织样品处理

组织样品用生理盐水冲洗干净,用滤纸吸干,称取各组织约 0.2 g,剪碎后加入超纯水 1 mL,匀浆,加内标溶液 10 μL ,加入乙酸乙酯 4 mL,涡旋 3 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清 3 mL,置 45 $^{\circ}\text{C}$ 离心浓缩装置中挥干,加甲醇 200 μL 复溶,离心后取上清 5 μL 进样。

2.5 长春瑞滨大鼠体内药动学

SD 大鼠 36 只,随机分为 3 组,分别尾静脉注射 2.0,4.0,8.0 mg/kg 长春瑞滨注射用乳剂(按 0.2 mL/100 g 的容量以 5% 葡萄糖溶液调整药物浓度)。分别于给药前和给药后 0.08,0.16,0.25,0.5,1,1.5,2,3,4,6,8,12,16 和 24 h 从眼底静脉丛连续取血于肝素处理的试管中。给药后每条血药浓度-时间数据曲线由 2 批大鼠完成,0.08~2 h 从每组第一批(6 只)大鼠取血,3~24 h 从每组第二批(6 只)大鼠取血,离心后取血浆 0.1 mL 用于 LC-MS 分析。

3 结果

3.1 标准曲线的制备

取大鼠空白血浆 0.1 mL,加入不同浓度的标准品 10 μL 后,使其质量浓度分别为 0.01,0.02,0.05,0.10,0.20,0.50,1.00,2.00,5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按“2.3”项处理,利用标准品峰面积与内标峰面积比(R)对标准品加入量(c)作线性回归,得相应的回归方程: $R=0.7359c+0.0155$, $r=0.9994$ 。实验结果表明,长春瑞滨血浆质量浓度在 0.01~5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

3.2 专属性考察

在本试验条件下,长春瑞滨和长春新碱有较大的色谱峰和较好的分离度,大鼠血浆和组织中杂质不干扰样品峰,基线噪音小,长春瑞滨的保留时间约为 5.7 min,内标的保留时间约为 5.4 min(见

图1)。基质效应考查后发现血浆样本及组织样本均无明显的基质效应发生。在此条件下所测得的结果能代表长春瑞滨浓度。

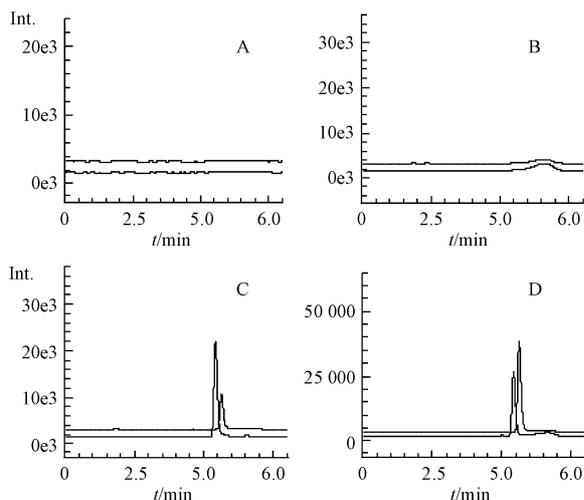


Figure 1 Chromatograms of drug-free plasma (A), blank liver samples (B), spiked plasma (C) and liver sample obtained 8 h after iv administration of 4 mg/kg vinorelbine in rats (D)

3.3 回收率

取空白大鼠血浆 0.1 mL,加入不同浓度的标准品工作液 10 μ L,使其质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.20, 2.50 μ g/mL,按照“2.3”项下操作,每个浓度重复 5 次。结果显示该方法的提取回收率大于 90%。

3.4 精密度

配制含长春瑞滨质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.20, 2.50 μ g/mL 的血浆样品,考察批内和批间变异情况,测定结果显示低、中、高浓度样本批间和批内的 RSD 均小于 10%。

3.5 稳定性

分别考察了血浆样本室温放置稳定性、提取后样本在自动进样器中稳定性、血浆样本反复冻融稳定性以及血浆样本长期冷冻(7 d)稳定性,结果表明长春瑞滨在贮存及测定过程中均是稳定的。

3.6 大鼠体内药动学

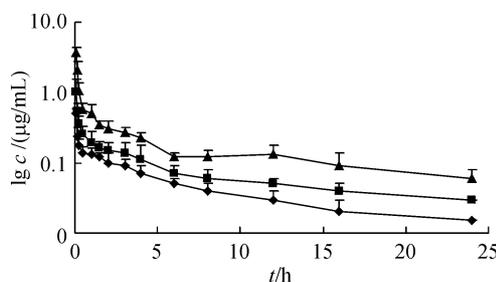
采用 DAS 2.0 软件以二房室模型和矩量法求算相应的药动学参数,结果见表 1。测得的半对数血药浓度-时间曲线见图 2。

3.7 组织分布研究

SD 大鼠 18 只,随机分成 3 组,每组 6 只,雌雄各半。禁食但可自由饮水 10 h 后,静脉注射 4 mg/kg 长春瑞滨注射用乳剂,分别于给药后

Table 1 Pharmacokinetic parameters of vinorelbine in rats after iv administration of vinorelbine bitartrate emulsion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| Parameter | Dose (mg/kg) | | |
|----------------------------------|------------------|-----------------|------------------|
| | 2 | 4 | 8 |
| $t_{1/2,\alpha}$ (h) | 3.04 ± 1.03 | 2.49 ± 0.44 | 2.79 ± 0.75 |
| $t_{1/2,\beta}$ (h) | 9.11 ± 3.09 | 7.47 ± 1.33 | 8.38 ± 2.26 |
| CL (L/h/kg) | 1.73 ± 0.26 | 2.12 ± 0.42 | 2.12 ± 0.37 |
| AUC_{0-7} (μ g·h/mL) | 1.02 ± 0.18 | 1.80 ± 0.42 | 3.40 ± 0.61 |
| $AUC_{0-\infty}$ (μ g·h/mL) | 1.18 ± 0.19 | 1.96 ± 0.43 | 3.89 ± 0.70 |
| MRT (h) | 11.30 ± 2.19 | 8.82 ± 1.64 | 10.51 ± 2.46 |



—◆—2.0 mg/kg; —■—4.0 mg/kg; —▲—8.0 mg/kg

Figure 2 Semilogarithmic plots of mean plasma concentration-time of vinorelbine in rats after iv administration of vinorelbine bitartrate emulsion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

15 min, 2 h 和 8 h,由股动脉放血处死大鼠。取血浆 0.1 mL,并立即分取心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、脑、肌肉、肠、胃、淋巴结、胸腺、睾丸或子宫、皮肤、脂肪等组织。胃和肠洗去内容物。称取组织约 0.1 g(精密称重,记录),加超纯水溶液 1.0 mL 制成匀浆,加内标 10 μ L,用 LC-MS 法测定组织中长春瑞滨浓度,结果见图 3。

4 讨论

文献报道,长春瑞滨生物样本的处理方法有多步液液萃取、固相萃取、离子对提取等^[6-8]。本实验分别比较了乙醚、乙酸乙酯、氯仿、异丙醇等有机溶剂萃取法,结果发现,乙醚的提取回收率显著低于乙酸乙酯,氯仿、异丙醇的回收率较高,但内源性杂质干扰多,且容易引起基质效应,故选择乙酸乙酯作为萃取溶剂;在色谱分离过程中还发现,若在流动相中加入适量醋酸铵可以显著改善色谱峰的峰形,于是比较了不同浓度的醋酸铵对色谱峰的影响,发现醋酸铵浓度低于 0.5 mmol/L 时,色谱峰峰形无明显改善;而当浓度高于 5 mmol/L 时,S/N 显著下降,说明产生了严重的离子抑制。最终选择加入 1 mmol/L 醋酸铵;此外,流动相中加入 0.02% 甲酸,灵敏度提高了约 2.5 倍。

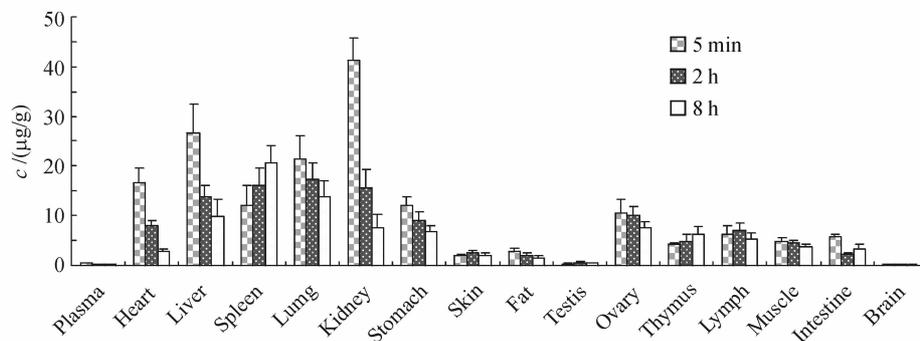


Figure 3 Tissue disposition of vinorelbine after iv dosing of 4 mg/kg in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

大鼠静脉注射长春瑞滨乳剂后,消除半衰期约为 8 h。AUC 与剂量间呈良好的线性关系,说明在研究的剂量范围内,长春瑞滨注射用乳剂在大鼠体内符合线性药动学特征。组织分布实验的结果显示,长春瑞滨静脉注射给药后可广泛分布于各组织,除脑组织外,其他组织中药物浓度均高于血浆中药物浓度,心脏、肝脏、脾脏、肺和肾脏中浓度最高:提示长春瑞滨易于进入血流灌注丰富的组织。

参考文献

- [1] 高正航(Gao ZH),李卫东(Li WD). 长春花生物碱类药物研究概述[J]. 贵州农业科学(Guizhou Agr Sci),2005,33(6):94-96.
- [2] Loo WT, Sasano H, Chow LW. Effects of capecitabine and vinorelbine on cell proliferation, metabolism and COX2 and p16 expression in breast cancer cell lines and solid tumour tissues[J]. Biomed Pharmacother,2007,61(9):596-600.
- [3] van Tellingen O, Kuijpers AV, Beijnen JH, et al. Plasma pharmacokinetics, tissue disposition, excretion and metabolism of vinorelbine in mice as determined by high performance liquid chromatography[J]. Invest New Drugs,1993,11(2-3):141-150.
- [4] Puozzo C, Ung HL, Zorza G. A high performance liquid chromatography method for vinorelbine and 4-O-deacetyl vinorelbine: a decade of routine analysis in human blood[J]. J Pharm Biomed Anal,2007,44(1):144-149.
- [5] Gauvin A, Pinguet F, Poujol S, et al. High-performance liquid chromatographic determination of vinorelbine in human plasma and blood: application to a pharmacokinetic study[J]. J Chromatogr Biomed Sci Appl,2000,748(2):389-399.
- [6] Robieux I, Vitali V, Aita P, et al. Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for measurement of vinorelbine plasma concentrations[J]. J Chromatogr B,1996,675(1):183-187.
- [7] Marquet P, Lachatre G, Debord J, et al. Pharmacokinetics of vinorelbine in man [J]. Eur J Clin Pharmacol,1992,42(5):545-547.
- [8] Schmidt MS, Huang R, Classon RJ, et al. Determination of vincristine in infant plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectroscopy [J]. J Pharm Biomed Anal,2006,41(2):540-543.

· 新进展 ·

国外研制的新复方制剂

- 溴莫尼定 + 噻吗洛尔 (brimonidine + timolol) 眼科用药,治疗青光眼,Allergan 公司研制,滴眼剂。
- 替米沙坦 + 氨氯地平 (telmisartan + amlodipine) 心血管系统用药,治疗高血压药,Boehringer Ingelheim 公司研制,口服制剂。
- 芬特明 + 托吡酯 (phentermine + topiramate) 消化系统用药,治疗肥胖症,口服制剂。
- 阿米特林 + 氯胺酮 (amitriptyline + ketamine) 神经系统用药,镇痛药,治疗带状疱疹后疼痛、神经病理性疼痛。
- 羟考酮 + 烟酸 (oxycodone + niacin) 神经系统用药,镇痛药,治疗术后疼痛。

(本刊编辑部)