犬血浆中盐酸雷诺嗪 LC-MS 测定及药物动力学研究

谢 林*, 梁 艳, 刘晓东, 王广基

(中国药科大学药物代谢研究中心, 南京 210009)

【摘 要】 目的: 建立 LC-MS 法测定犬血浆中盐酸雷诺嗪浓度, 研究犬 ig 和 iv 盐酸雷诺嗪后的药物动力学。方法: 取血浆 20 μl, 加乙腈 300 μl 沉淀蛋白, 离心后 10 μl 直接进样。色谱柱为 Shim-pack ODS 5 μm, 150 mm × 2.0 mm, I.D.; 流动相为 0.05% 甲酸-乙腈(40∶60, v/v)。检测仪器为岛津 LC-MS-2010 四极杆质谱检测器, 离子源为 APCI 源。检测离子 m/z: 雷诺嗪 428.00, 盐酸非洛普(DDPH) 344.00。犬 ig 和 iv 雷诺嗪剂量为 25 mg/kg, 不同时间取血, 离心取血浆 20 μl 进行分析, 估算药物动力学参数。结果: 盐酸雷诺嗪的线性范围为 0.039 ~ 10.00 μg/ml, 方法的回收率为 79% ~ 90%, 日内和日间的精密度均小于 10%。犬 ig 和 iv 雷诺嗪 25 mg/kg, 估算的末端相半衰期分别为 7.31±3.08 和 5.67±2.43 h, 犬 ig 后, 测得的血药浓度峰时间和峰浓度分别为 1.0±0.6 h 和 4.32±1.25 μg/ml。测得绝对生物利用度约为(72.6±15.6)%。结论: 建立的犬血浆中盐酸雷诺嗪 LC-MS 测定法适合药物动力学研究。雷诺嗪口服吸收快, 吸收良好。

【关键词】 盐酸雷诺嗪; LC-MS 法; 药物动力学; 血浆; 含量测定

【中图分类号】 R969.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1000-5048(2004)02-0156-04

盐酸雷诺嗪(ranolazine)为吡嗪类抗心绞痛的Ⅰ类新药[1-3], 具有改善缺血心肌细胞代谢和氧的利用[4,5]。关于盐酸雷诺嗪药物动力学研究的文献甚少, 而在犬体内的药物动力学研究未见报道。本文根据我国新药审批办法的有关规定, 建立了犬血浆中盐酸雷诺嗪 LC-MS 测定法, 并对其在犬体内的药物动力学进行研究, 为临床研究提供参考依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

岛津 LCMS-2010 高效液相色谱-质谱联用仪。该仪器包括 2 台 LC-10ADVP 泵, DGU-14AM 在线真空脱气机, SIL-10ADVP 恒温自动进样器, CTO-10Avp 柱温箱, APCI 大气压化学离子化接口的四极杆质谱检测器以及 LCMS solution 2.02 色谱工作站。Milli-Q Gradient A10 超纯水器(Millipore Inc. USA)。Super T21 全自动高速冷冻离心机(Sorvall)和 Eppendorf 5432 旋涡混合器(Netheler+ Hinz GmbH)。

乙腈为色谱纯(Tedia Company, Inc, USA); 其余试剂均为市售分析纯。

Beagle 犬, 8 条, 雌雄各半, 体重(11.3±1.2) kg, 由中国药科大学实验动物中心提供。合格证号: SCXK(苏)2002-0001。

盐酸雷诺嗪, 批号 010320, 含量 99.96%。由中国药科大学医药化工研究所提供。内标: 盐酸非洛普(DDPH), 中国药科大学药化研究室提供。

静脉给药用生理盐水制成水溶液, 灌胃将药物装入胶囊中, 剂量均为 25 mg/kg(体重)。

1.2 血浆样品中盐酸雷诺嗪 LC-MS 测定法的建立与验证

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Shim-pack(VP-ODS), 5 μm, 150 mm × 2.0 mm I.D.(岛津公司), 柱温 40 ℃。流动相由乙腈-0.05% 甲酸(60∶40, v/v)组成, 流速为 0.2 ml/min。

大气压离子化(API)检测模式: 大气压化学离子化(APCI); 选择性离子监测(selected-ion monitoring, SIM); 探针温度 400 ℃, 曲型脱溶剂装置温度 250 ℃; 加热块温度 200 ℃; 探针电压 4.5 kV; CDL 电压: 25 V; 检测电压: +1.6 kV; 监测离子[M+H]+: 盐酸雷诺嗪, m/z: 428.00; DDPH, m/z: 344.00。雾化气体流速 2.5 L/min。

* 【收稿日期】 2003-07-15 【*通讯作者】 Tel: 025-83271006 E-mail: jsxielin@sina.com.cn

【基金项目】 国家 863 计划资助项目(No. 2003AA2Z347A); 江苏省药物代谢动力学重点实验室资助项目(No. BM2001201)

1.2.2　标准溶液的配制　盐酸雷诺嗪标准品的配制: 精密称取盐酸雷诺嗪标准品 10.0 mg, 超纯水溶解定容, 配制成 1.00 mg/ml 贮备液, 临用时用超纯水稀释到相应的浓度。

内标液: 精密称取 DDPH, 用重蒸馏水溶解后, 稀释至 0.02 mg/ml 备用。

1.2.3　血浆样品处理　取血浆 20 μl, 加内标 10 μl (20 μg/ml) 混均后, 加乙腈 0.3 ml, 振荡 5 min, 18 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液 10 μl 进样, 用样品与内标峰面积比进行定量分析。

1.2.4　方法的特异性考证　取犬空白血浆 20 μl, 按"1.2.3"项处理, 并与给药后血浆样品以及标准品对照, 所得的 LC-MS 图见图 2。盐酸雷诺嗪和内标的保留时间约为 1.7 min。由图 2 可见, 血浆中内源性物质不干扰盐酸雷诺嗪质谱峰和内标峰。

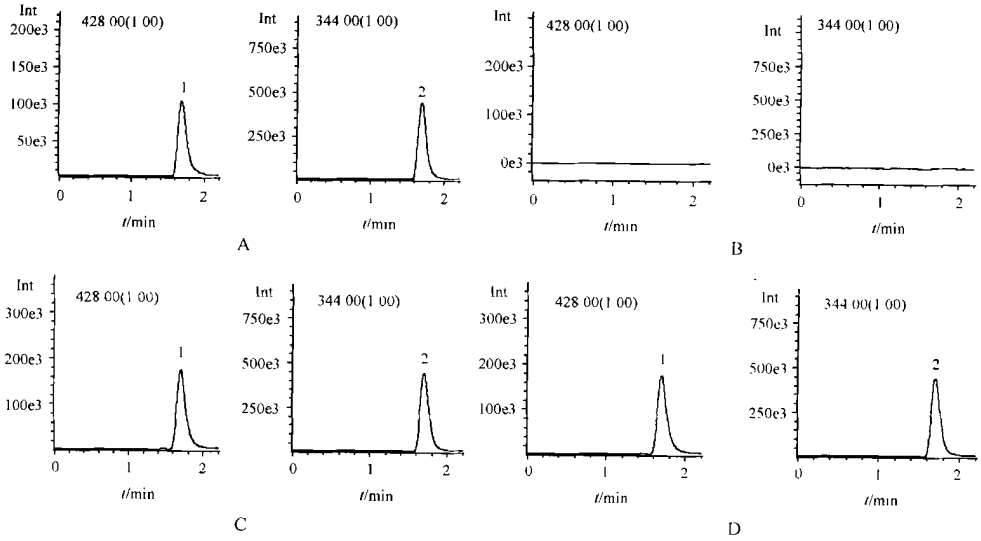

Fig 2. LC-MS chromatograms of ranolazine

A. Standard; B. blank plasma; C. blank plasma spiked with ranolazine and DDPH; D. plasma from a dog after oral administration of 25 mg/kg ranolazine
1. ranolazine(m/z=428); 2. DDPH(m/z=344)

1.2.5　标准曲线的制备及最低检测浓度测定　取犬血浆加入不同量的标准品后, 使其浓度分别为 0, 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 μg/ml 按相应的"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(浓度 c)作线性回归, 得回归方程 $R = 0.048c - 0.0004$, $r = 0.9995$ ($P < 0.01$, $n = 5$)。按上法测得血浆中最低检测浓度为 39 ng/ml。

1.2.6　回收率测定　取犬空白血浆 20 μl, 精密加入标准品, 使浓度分别为 0.156, 0.625 和 10.00 μg/ml, 按"1.2.3"项处理, 测定样品/内标峰面积比 Ri。代入用蒸馏水代替血浆所制得的曲线方程, 计算测得浓度。回收率 = 测得浓度/加入浓度 × 100%。每种浓度重复 5 次, 结果见表 1。

1.2.7　精密度的测定　取犬空白血浆 20 μl, 加标准品使其浓度分别为 0.156, 0.625 和 10.00 μg/ml, 同"1.2.3"项处理, 用样品/内标峰面积比 Ri 代入同一条工作曲线, 计算相应的浓度, 考察日内和连续 5 d 的日间变异情况, 结果见表 2。

Tab 1. Recoveries of ranolazine in plasma(n=5)

Added(μg/ml)	Found(μg/ml)	Recoveries(%)	RSD(%)
0.16	0.14±0.01	90.85±7.31	8.04
0.62	0.54±0.03	87.01±4.46	5.13
10.00	7.93±0.51	79.32±5.07	6.39

Tab 2. Precision for determination of ranolazine in plasma($\bar{x}\pm s$, n=5)

Added (μg/ml)	Intra-day		Inter-day	
	Found(μg/ml)	RSD(%)	Found(μg/ml)	RSD(%)
0.16	0.17±0.014	8.24	0.18±0.01	3.04
0.62	0.67±0.035	5.16	0.67±0.04	6.74
10.0	9.83±0.630	6.39	9.16±0.76	8.31

2　实验与结果

2.1　动物实验

Beagle 犬 8 条, 雌雄各半, 随机等分成 A、B 两

组，每组4条。A组先ig 25 mg/kg盐酸雷诺嗪，后iv等剂量的盐酸雷诺嗪。B组先iv 25 mg/kg盐酸雷诺嗪，后ig等剂量的盐酸雷诺嗪。两种给药途径间隔一周。动物禁食12 h后ig，给药后继续禁食3 h。ig后0.25，0.5，0.75，1.0，1.5，2.0，3.0，4.0，6.0，8.0，12.0，24.0 h；iv后0.167，0.33，0.5，0.75，1.0，1.5，2.0，3.0，4.0，6.0，8.0，12.0，24.0 h从前肢静脉取血2 ml于肝素处理的试管中，离心取血浆，用LC-MS法测定血浆中药物浓度。

2.2 药物动力学

犬ig和iv 25 mg/kg盐酸雷诺嗪后，血药浓度-时间曲线见图3。

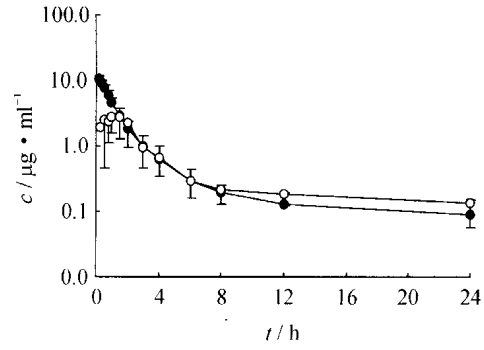

Fig 3 Mean plasma concentration-time profiles after intravenous(●) and oral(○) administration of 25 mg/kg ranolazine in Beagle dogs (n=4)

估算的药物代谢动力学参数列于表3和表4。

Tab 3. Pharmacokinetic parameters of ranolazine in Beagle dogs after iv 25 mg/kg

No.	c_{max} (μg/ml)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)	CL (L/kg·h^{-1})	V_β (L/kg)	AUC $_{0\to\tau}$ (μg·h/ml)	AUC $_{0\to\infty}$ (μg·h/ml)
A	11.39	0.167	8.09	6.15	1.49	17.39	15.35	16.77
B	11.59	0.167	7.05	4.96	1.78	18.08	13.17	14.07
C	8.43	0.167	7.45	7.67	1.46	15.69	15.39	17.14
D	10.42	0.167	6.67	6.42	1.44	13.88	16.00	17.34
E	9.76	0.167	6.21	4.70	1.59	14.27	14.88	15.71
F	8.74	0.33	6.11	5.00	1.54	13.56	15.31	16.24
G	13.03	0.167	1.80	1.79	1.59	4.12	15.21	15.74
H	9.91	0.167	1.95	2.25	1.25	3.52	19.72	20.00
Mean	10.41	0.2	5.67	4.87	1.52	12.56	15.63	16.63
±s	1.54	0.1	2.43	2.01	0.15	5.63	1.85	1.71

Tab 4. Pharmacokinetic parameters of ranolazine in Beagle dogs after ig 25 mg/kg

No.	c_{max} (μg/ml)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	MRT (h)	CL (L/kg·h^{-1})	V_β (L/kg)	$AUC_{0\to\tau}$ (μg·h/ml)	$AUC_{0\to\infty}$ (μg·h/ml)	F(%)
A	5.68	0.5	12.61	15.54	1.37	24.96	13.49	18.22	87.9
B	3.04	0.5	9.62	12.96	1.86	25.85	10.79	13.43	81.9
C	2.85	1.0	7.74	10.30	2.52	28.15	8.42	9.92	54.7
D	3.59	1.0	6.73	8.02	2.10	20.35	10.81	11.93	67.6
E	6.00	1.5	5.47	7.06	1.59	12.57	14.51	15.69	97.5
F	4.38	1.0	2.49	3.57	2.33	8.35	10.35	10.75	67.6
G	5.47	0.25	8.56	7.95	2.08	25.67	10.72	12.03	70.5
H	3.59	2.0	5.22	6.72	2.23	16.80	10.39	11.20	52.7
Mean	4.32	1.0	7.31	9.02	2.01	20.34	11.19	12.90	72.6
±s	1.25	0.6	3.08	3.79	0.38	7.15	1.92	2.79	15.6

由图3可见，Beagle犬ig和iv 25 mg/kg盐酸雷诺嗪后，在末端相两种给药途径血药浓度曲线基本重叠，算得半衰期分别为7.31±3.08和5.67±2.43 h。犬ig后，测得的血药浓度峰时间和峰浓度分别为1.0±0.6 h和4.32±1.25 μg/ml，绝对生物利用度约为(72.6±15.6)%，估算的V_β约为20.34±7.15 L/kg。

3 讨 论

1）本文建立的犬血浆中盐酸雷诺嗪LC-MS测定法，血浆样品处理简单、快速，仅需微量的血浆样品；但其方法的回收率高、灵敏度、重现性和精密度

均较好。

2）实验测得犬 iv 和 ig 盐酸雷诺嗪的 $t_{1/2}$分别是 5.67±2.43 和 7.31±3.08 h; 犬 ig 后, 测得绝对生物利用度为(72.6±15.6)%, 说明盐酸雷诺嗪在犬体内吸收良好。

3）犬 iv 和 ig 盐酸雷诺嗪后, 血药浓度未见有性别差异, 而在大鼠则观察到有性别差异[6]。

【参 考 文 献】

[1] Pepine CJ, Wolff AA. A controlled trial with a novel anti-ischemic agent, ranolazine, in chromic stable angina pectoris that responsive to conventional antianginal agents. Ranolazine study group[J]. *Am J Cardiol*, 1999, **84**: 46-50.

[2] Bagger JP, Botker HE, Thomassen A, *et al*. Effects of ranolazine on ischemic threshold coronary sinus blood flow, and myocardial metabolism in coronary artery disease[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1997, **11**: 47-84.

[3] Herron WJ, Eadie J, Penman A D. Estimation of ranolazine and eleven phase I metabolites in human plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry with selected-ion monitoring[J]. *J Chromatogr A*, 1995, **712**: 55-60.

[4] McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, *et al*. Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic ischemic and reperfusion ischemic rat hearts[J]. *Circulation*, 1996, **93**: 135-142.

[5] Wang J X, Maruyama K, Murakami M, *et al*. Antianginal effects of ranolazine in various experimental models of angina[J]. *Arzneimittelforschung*, 1999, **49**: 193-199.

[6] XD Liu, L Xie, Y Liang, *et al*. Gender difference in ranolazine pharmacokinetics in rats[J]. *Eur J Drug Metabo Pharmacokinet*, 2003, **28**: 119-123.

Determination of Ranolazine and Its Pharmacokinetics in Dog by LC-MS

XIE Lin, LIANG Yan, LIU Xiao-Dong, WANG Guang-Ji

(*Center of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*)

【ABSTRACT】 AIM: To develop an LC-MS method for the determination of ranolazine concentration in dog plasma and study pharmacokinetics of ranolazine in Beagle dog. METHOD: 20 μl plasma was mixed 10 min with 300 μl acetonitrile. After being centrifuged, 10 μl supernatant was injected into a Shim-pack C18 150 mm×2.0 mm column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% acetic acid (60∶40, *v*/*v*) at flow rate of 0.2 ml/min. The elute from the HPLC column was plumbed directly into APCI probe. Analysis in the mass spectrometer was operated in the selected-ion monitoring model. The mass spectrometers was operated in SIM *m*/*z* 428 for ranolazine and 344 for DDPH (as internal standard). Dog blood samples were obtained after oral and intravenous administration of 25 mg/kg respectively. Ranolazine concentrations in plasma were determined and pharamcokinetic parameters were also estimated. RESULT: Recoveries of ranolazine at 0.16, 0.62 and 10.0 μg/ml were 90.8, 87.0 and 79.3% respectively. The standard curve was linear in the range of 0.039~10.00 μg/ml. The relative standard derivation of intra-day and inter-day was smaller than 10%. Terminal phase $t_{1/2}$ were estimated to be 7.31 and 5.67 hours after ig and iv of 25 mg/kg ranolazine. Peak concentration (4.32±1.25 μg/ml) occurred at 1.0±0.6 hours after ig. Absolute bioavailability was (72.6±15.6)% for ig. CONCLUSION: The bioanalytical method of LC-MS is suitable for pharmacokinetic study of ranolazine. Oral absorption of ranolazine occurs rapidly and completely in dogs.

【KEY WORDS】 Ranolazine; LC-MS; Pharmacokinetics; Dtermination of content; Plasma

【Foundation Item】 This study was supported by National 863 Program Foundation of China (No. 2003AA2Z347A), and Jiangsu Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics Foundation (No. BM2001201)